



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Bestimmung des Grades der Genpromotormethylierung
mittels methylierungs-sensitiver hochauflösender
Schmelzkurvenanalyse“

Verfasserin

Elisabeth Gertrude Habla

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 419

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Chemie

Betreuerin / Betreuer:

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

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt allen Menschen die mich in den letzten Jahren unterstützt haben, und durch die diese Arbeit erst möglich gemacht wurde.

Meiner Betreuerin Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Margit Cichna-Markl danke ich für ihre hervorragende Betreuung während der Diplomarbeit. Für ihre ansteckende Begeisterung für das Thema dieser Arbeit und für die Freude die sie selbst an jedem kleinen Erfolg hatte.

Weiters möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für das angenehme Arbeitsklima und die heiteren Arbeitspausen danken.

Der Arbeitsgruppe des Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, dabei vor allem Volker Blust, für die Ermöglichung der Arbeit mit Zellkulturen und die Unterstützung bei den dazugehörenden Versuchen.

Ich möchte mich besonders bei meinen Eltern bedanken, die mir beigebracht haben, dass man mit harter Arbeit und Durchhaltevermögen jedes Ziel erreichen kann. Durch sie konnte ich das notwendige Selbstvertrauen entwickeln um alle Schwierigkeiten zu überwinden. Ohne eure Unterstützung wäre ich nicht der Mensch der ich heute bin.

Meinem Ehemann Martin möchte ich danken für seine Geduld mit mir, wenn ich mal wieder im Lernstress untergegangen bin, und für die vielen kleinen und großen Dinge mit denen er mir geholfen hat die wesentlichen Dinge im Leben nicht aus den Augen zu verlieren. Und natürlich fürs geduldige Zuhören wenn einmal etwas nicht geklappt hat.

Meinen Brüdern Andreas, Leopold und Martin, dafür dass sie mich mit ihren gutgemeinten Hänseleien immer wieder auf den Boden zurückholen, und für viele lustige Abende mit unseren Lieblingsgetränken. Außerdem dafür dass sie immer da sind um zu helfen wenn sie gebraucht werden.

Meinen langjährigen Freundinnen Silke, Mika, Ines und Juliane möchte ich für viele lustige und teilweise auch sehr verrückte Stunden danken, die einen den Alltag vergessen lassen.

Anna, Carina, Denise, Serpil und Yvonne die es geschafft haben die Studienzeit schnell vergehen zu lassen, und die mir immer wieder dabei geholfen haben mich zu motivieren.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Epigenetik.....	1
1.1.1 DNA-Methylierung.....	2
1.1.1.1 Mechanismus der Methylierung	4
1.1.1.2 Auswirkungen auf die Transkription	6
1.1.1.3 Auswirkungen auf die Krebsentwicklung.....	7
1.1.1.4 DNA Methylierung als Biomarker.....	9
1.2. Kolonkrebs.....	10
1.2.1 DNA-Methylierung bei Kolonkrebs.....	13
1.2.2 Im Zuge dieser Arbeit ausgewählte Gene	14
1.2.2.1 APC.....	15
1.2.2.2 HIC1.....	16
1.2.2.3 DAPK1.....	17
1.2.2.4 OSMR.....	17
1.3 Beeinflussung der DNA-Methylierung durch	
Lebensmittelinhaltsstoffe und -kontaminanten.....	18
1.3.1 Heterozyklische aromatische Amine.....	21
1.3.1.1 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridin – PhIP.....	23
1.3.1.2 2-Amino-3,8-dimethylimidazo-[4,5-f]chinoxalin - MeIQx.....	23
1.3.2 Lignane	24
1.3.2.1 (+)-Lariciresinol.....	25
1.3.2.2 (-)-Matairesinol.....	26
1.3.3 Mykotoxine.....	26
1.3.3.1 Desoxynivalenol - DON	27
1.3.3.2 Zearalenon – ZON.....	28
1.4 Demethylierende Arzneimittel.....	29
1.4.1 5-Aza-2'-Desoxycytidin - 5-aza-2dC.....	29
1.5 Zellkultur.....	30
1.5.1 HT-29 Zelllinie.....	30
2 Zielsetzung.....	31
3 Theoretischer Hintergrund.....	32

3.1 Polymerase-Kettenreaktion - PCR.....	32
3.1.1 Real-Time PCR.....	35
3.1.2 PCR-Amplifikation von methylierten DNA-Sequenzen.....	38
3.1.2.1 Bisulfitkonvertierung.....	38
3.1.2.2 PCR-Analyse bisulfitkonvertierter Proben.....	40
3.1.2.3 PCR mit methylierungs-unabhängigen Primern - MIP-PCR.....	42
3.2 Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse - HRM.....	45
3.2.1 Schmelzverhalten von DNA-Sequenzen.....	45
3.2.2 Detektion des Schmelzprofils.....	47
3.2.3 Analyse von DNA-Schmelzprofilen.....	48
4 Ergebnisse und Diskussion.....	51
4.1 Allgemeines.....	51
4.2 Primerdesign.....	52
4.2.1 APC.....	52
4.2.1.1 Ergebnisse der MS-HRM Analyse.....	55
4.2.2 HIC1.....	58
4.2.2.1 Ergebnisse der MS-HRM mit den Kontroll-Primern.....	59
4.2.2.2 Ergebnisse der MS-HRM mit den selbst entworfenen Primern.....	61
4.2.2.3 Ergebnisse der erneuten Primersuche für HIC1	62
4.2.3 Studie von in anderen Arbeiten veröffentlichten Primern.....	66
4.2.4 DAPK1.....	68
4.2.4.1 Ergebnisse der MS-HRM mit den DAPK1 Primern	69
4.2.4.2 Ergebnisse der MS-HRM mit den Kontroll-Primern.....	71
4.2.5 OSMR.....	73
4.2.5.1 Ergebnisse der MS-HRM mit den OSMR Primern.....	74
4.3 Optimierung der MS-HRM Bedingungen.....	75
4.3.1 Beispiele für die Auswirkungen der Optimierung.....	75
4.3.2 Optimierte Bedingungen die MS-HRM Methoden.....	79
4.3.2.1 Optimierte MS-HRM mit den APC Kontroll-Primern.....	80
4.3.2.2 Optimierte MS-HRM mit den HIC1 Primern1.....	81
4.3.2.3 Optimierte MS-HRM mit den DAPK1 Kontroll-Primern.....	82
4.3.2.4 Optimierte MS-HRM mit den OSMR Primern.....	83
4.4 MS-HRM von selbst bisulfitmodifizierten Standards	84
4.5 MS-HRM der DNA aus unbehandelten HT-29 Zellen.....	87

4.5.1 Methylierungsgrad der Promotorregion der ausgewählten Gene in HT-29 Zellen....	89
4.5.1.1 APC.....	89
4.5.1.2 HIC1.....	90
4.5.1.3 DAPK1.....	91
4.5.1.4 OSMR.....	92
4.6 Inkubationsversuche mit HT-29 Zellen.....	93
4.6.1 Inkubation mit 5-Aza-2dC.....	94
4.6.1.1 Abnahme des Methylierungsgrades im HIC1-Promotor.....	94
4.6.1.2 Abnahme des Methylierungsgrades im OSMR-Promotor.....	96
4.6.1.3 Ergebnisse der Inkubation für APC und DAPK1	98
4.6.2 Inkubation mit ausgewählten Substanzen.....	98
4.6.2.1 Ergebnisse der MS-HRM zu den Substanzinkubationen.....	98
5 Experimentelles.....	101
5.1 Methylierungs-sensitive hochauflösende Schmelzkurvenanalyse - MS-HRM.....	101
5.1.1 Primerdesign.....	101
5.1.2 Vorbereitung der Primer	102
5.1.3 Vorsichtsmaßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen.....	102
5.1.4 Temperaturprofil.....	103
5.1.5 Durchführung.....	104
5.1.6 Optimierung der Annealing-Temperatur (Ta) und der MgCl ₂ -Konzentration.....	106
5.2. Bisulfitkonvertierung.....	106
5.2.1 Durchführung.....	106
5.2.2 Verdünnung der bisulfitkonvertierten DNA.....	108
5.3 HT-29 Zellversuche.....	109
5.3.1 Arbeiten in der Laminar.....	109
5.3.2 Zellkultivierung.....	110
5.3.3 Passagieren der Zellen.....	110
5.3.4 Zellzahlbestimmung.....	111
5.3.5 Inkubationsversuche.....	112
5.4 DNA-Extraktion.....	114
5.4.1 Durchführung	114
5.5 DNA-Konzentrationsmessung.....	115
5.6 Übersicht der durchgeführten Zellinkubationen	116
5.7 Chemikalien	118

5.8 Verwendete Kits.....	118
5.9 Verwendete Geräte.....	119
6 Zusammenfassung.....	120
Anhang.....	122

1 Einleitung

In den USA und einigen europäischen Ländern stehen Krebserkrankungen an zweiter Stelle der häufigsten Todesursachen. Der erste Platz wird von kardiovaskulären Erkrankungen eingenommen. Geht man nur von Todesfällen bei Menschen unter dem 85. Lebensjahr aus, so übersteigen, zumindest in den USA, die Krebserkrankungen alle anderen Todesursachen.

Die möglichen Auslöser der Tumorbildung beim Menschen sind vielfältig. Dazu zählen sowohl vererbte genetische Anfälligkeiten als auch chemische, radiologische, virale und bakterielle Einflüsse. Aufgrund der großen Bandbreite dieser Einwirkungen wird es kaum möglich sein, alle diese Gefahren auszuschalten [1].

Besonders wichtig für die erfolgreiche Therapie einer sich entwickelnden oder bereits bestehenden Krebserkrankung ist die frühe Diagnose. Durch Forschungen im Gebiet der Epigenetik wurden in den letzten Jahren vielversprechende Ergebnisse zur Krebsfrüherkennung erzielt.

1.1 Epigenetik

Der Begriff Epigenetik wurde bereits im Jahr 1942 von Conrad Waddington als die Interaktion zwischen Genen und ihren Produkten, welche zur Ausbildung des Phänotyps führen, definiert. Über die Jahre wurde diese Definition erweitert und in mehrere Varianten abgeändert. Als eine Art Konsens kann unter Epigenetik die Studie der vererbaren Änderungen der Genregulation, ohne eine zugrundeliegende DNA-Sequenzänderung, verstanden werden. Die Vererbung der epigenetischen Information wurde zunächst nur bei Pflanzen beschrieben, konnte dann aber auch bei Hefezellen und Mäusen nachgewiesen werden [2].

Während sich die Genetik mit den direkt in den Gensequenzen kodierten Informationen befasst, wird in der Epigenetik die Auswirkung der Genexpression auf den Organismus erforscht. Durch Genetik alleine ist es nicht möglich, das unterschiedliche Auftreten von Phänotypen und Krankheitsanfälligkeiten bei Menschen mit dem gleichen Genotyp, wie z.B. bei eineiigen Zwillingen, zu erklären [3].

Ebenso wie Variationen der DNA-Sequenzabfolge stehen auch epigenetische Modifikationen im Verdacht, verschiedenste Krankheitsbilder, wie z.B. Krebs, auszulösen. Zu den möglichen epigenetischen Veränderungen zählen unter anderem Histonmodifikationen, wie z.B. Acetylierung und Methylierung, DNA-Methylierung und -Demethylierung, sowie der Umbau der Chromatinstruktur. Die Methylierung der C5-Position der Nukleinbase Cytosin der DNA ist eine der am besten untersuchten epigenetischen Variationen [4].

1.1.1 DNA-Methylierung

DNA-Methylierung tritt bei Säugetieren meist am Cytosin einer CpG-Dinukleotidabfolge auf [5]. CpG steht dabei für die Verbindung aus Cytosin – Phosphat – Guanin in der DNA Leserichtung 5' zu 3'.

Aus Cytosin wird 5-Methylcytosin (5-mC) gebildet, welches im menschlichen Körper etwa 1% aller DNA-Basen ausmacht (Abbildung 1) [5].

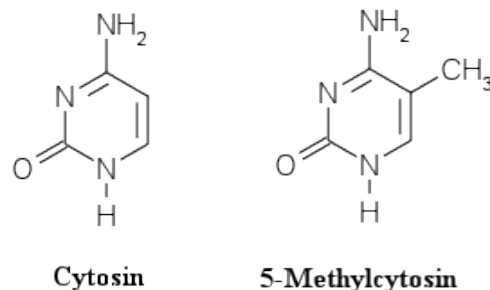


Abbildung 1: Cytosin und die an der C5-Position methylierte Form 5-Methylcytosin (5-mC); nach [6]

Prinzipiell sind CpG-Dinukleotide im Genom unterrepräsentiert. Der wahrscheinliche Grund dafür liegt in ihrer hohen Mutationsrate durch Deaminierung des methylierten Cytosins zu Thymin (mCpG zu TpG Transformation). Da es sich bei Thymin auch um eine natürlich in der DNA vorkommende Base handelt, gestaltet sich die Erkennung und Reparatur dieser Mutation durch körpereigene Mechanismen als schwierig. Daher dürfte es im Laufe der Evolution zu einer Verringerung der CpG-Häufigkeit gekommen sein [7].

60-90% der CpG-Dinukleotide liegen in Säugetiergenomen methyliert vor. Ausnahmen davon bilden die sogenannten CpG-Inseln (engl.: CpG islands). Dabei handelt es sich um DNA-Bereiche mit hoher CpG-Dichte, die sich oft mit Promotorregionen von Genen überschneiden

[5]. Ihre Länge variiert zwischen 300 und 3.000 Basenpaaren (bp; engl.: base pairs) und sie sind als Teil oder in nächster Nähe von 40% aller Promotoren der Gene in Säugetieren zu finden [8]. Liegt das Cytosin in diesen Bereichen unmethyliert vor, können die Gene ausgelesen werden sobald die notwendigen Transkriptionsfaktoren vorliegen [9].

Während bei den Prokaryoten die DNA-Methylierung zum Schutz des eigenen Genoms, z.B. vor dem Einbau von Fremd-DNA dient, wird angenommen, dass vor allem in höher entwickelten Eukaryoten die Inaktivierung von Genen das Hauptziel der Methylierung darstellt (engl.: gene-silencing). Der Mechanismus wird in Säugetieren gezielt zur Transkriptionskontrolle eingesetzt. Die Anwendung findet unter anderem bei wachstumsregulierenden Genen und bei der X-Chromosomen-Inaktivierung während der embryonalen Entwicklung bei weiblichen Tieren statt [5]. Dennoch muss erwähnt werden, dass bei einigen wenigen Genen auch eine Aktivierung über die Methylierung der CpG-Inseln ausgelöst wird [8].

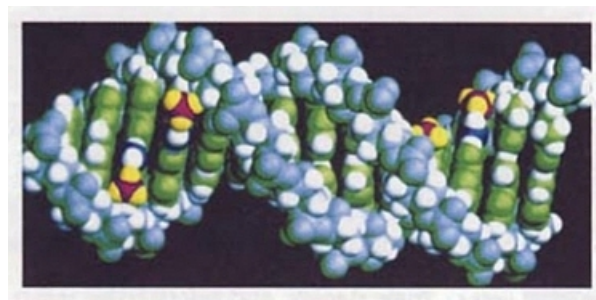


Abbildung 2: Modell der DNA mit zwei methylierten Cytosinen in CpG-Dinukleotiden; die Methylgruppe ist in diesem Bild durch ein rotes C-Atom und drei gelbe H-Atome gekennzeichnet; aus [10]

Bei Krebserkrankungen kann der DNA-Methylierungsstatus auf drei Arten verändert werden. Gezeigt wurden sowohl der allgemeine Verlust der genomischen Prägung (engl.: loss of imprinting; LOI) als auch Hypomethylierung (Demethylierung) und Hypermethylierung (Zunahme des Methylierungsgrades). Hypomethylierung tritt bei vielen Tumorarten in fortgeschrittenen Stadien auf. Es handelt sich dabei um eine genomweite Demethylierung, durch welche es zu einem Anstieg der Gentranskription kommen kann. Im Gegensatz dazu tritt die Hypermethylierung sehr früh bei der Entstehung von Tumorzellen und in diskreten Sequenzabschnitten auf. So wird durch die Methylierung im Promotor eines Tumorsuppressorgens die Freisetzung des dazugehörigen Proteins unterdrückt, und das Tumorwachstum kann durch diesen Suppressor nicht mehr gestoppt werden [11]. Dabei tritt die Promotormethylierung je nach Krebsart bei unterschiedlichen Genen auf. Es ist daher möglich, verschiedene Krebsarten anhand ihres Methylierungsmusters zu unterscheiden [9].

1.1.1.1 Mechanismus der Methylierung

Katalysiert wird die Methylierung der Position 5 am Cytosinring von DNA-Methyltransferasen (DNMT). Die bei Säugetieren gefundenen Enzyme dieser Klasse können anhand ihres Aufbaus in drei weitere Unterfamilien eingeteilt werden: DNMT1, DNMT2 und DNMT3. Zur Klasse der DNMT3 zählen dabei die drei Enzymfamilien DNMT3A, DNMT3B sowie DNMT3L (Tabelle 1) [12].

Tabelle 1: Die verschiedenen Klassen der DNA-Methyltransferasen (DNMT) bei Säugetieren; nach [12]

DNMT Klasse	Schematische Struktur	DNA-Methyltransferaseaktivität
DNMT1 Länge: 1616 Aminosäuren		vorhanden Haupt-Erhaltungs-DNMT de novo Aktivität möglich, aber sehr gering
DNMT2 Länge: 391 Aminosäuren		vorhanden (niedrig) genaue Funktion noch nicht geklärt
DNMT3A Länge: 912 Aminosäuren		vorhanden de novo Aktivität vielleicht geringe Erhaltungsfunktion
DNMT3B Länge: 853 Aminosäuren		vorhanden de novo Aktivität vielleicht geringe Erhaltungsfunktion
DNMT3L Länge: 387 Aminosäuren		nicht vorhanden Kofaktor der DNMT3A

Wie in Tabelle 1 dargestellt, besitzen die meisten dieser Proteine eine N-terminale regulatorische sowie eine C-terminale katalytische Domäne. Ausnahmen davon bilden DNMT2, welches keine regulatorische Domäne aufweist, sowie DNMT3L, welches katalytisch inaktiv ist.

In den schematischen Darstellungen der Enzyme werden die in den Unterfamilien der Enzymklasse spezifischen Bereiche Cys (Cystein reiche Domäne), *PHD* (Pflanzenhomöodomänen) und *PWWP* (Prolin und Tryptophan reiche Domänen) angedeutet [12].

DNMT1 ist im Körper für die Erhaltung des DNA-Methylierungsmusters verantwortlich. Die nach der Replikation vorliegende hemimethylierte DNA (nur der Originalstrang des neuen Doppelstranges ist methyliert) wird durch dieses Enzym vollständig methyliert, wobei der Originalstrang als Vorlage dient (Abbildung 3) [13]. Die Expression des DNMT1 Gens ist in allen somatischen Zellen zu beobachten. Besonders hoch ist sie jedoch in proliferierenden Zellen [12].

DNMT2 wurde in vielen menschlichen Geweben in geringen Konzentrationen nachgewiesen. Die Aufgabe des Enzyms konnte allerdings noch nicht ermittelt werden [12].

Die Hauptaufgabe der DNMT3A und DNMT3B liegt in der Methylierung vorher unmodifizierter DNA-Abschnitte [13]. Während die Expression dieser DNA-Methyltransferasen bei der Embryogenese sehr hoch ist, findet sie in differenzierten somatischen Zellen nur in weit geringerem Ausmaß statt. Bei dem letzten Enzym der DNMT3-Gruppe, DNMT3L, handelt es sich um einen Kofaktor, der die DNMT3A Aktivität verstärkt, jedoch selbst keine DNA-Methyltransferaseaktivität besitzt [12].

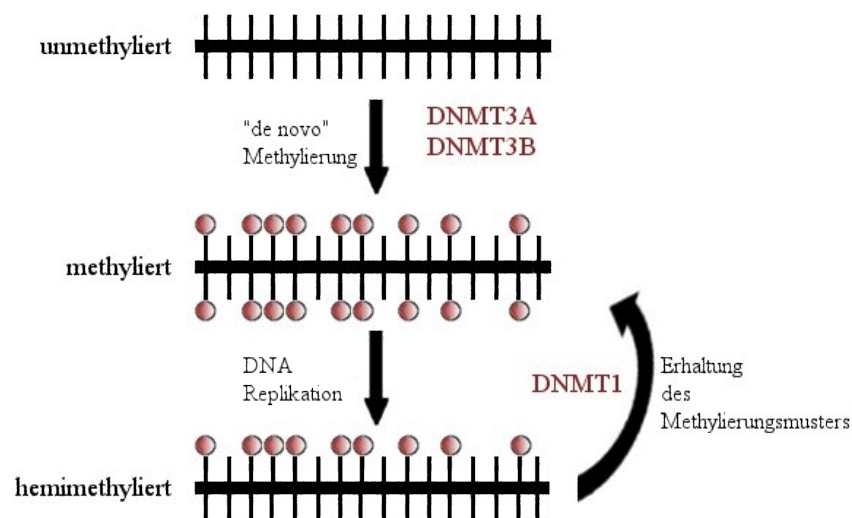


Abbildung 3: Die verschiedenen Möglichkeiten der DNA-Methylierung in Säugetieren; Es wird ein Stück der genomischen DNA gezeigt, wobei die selbstkomplementären CpG-Dinukleotide als senkrechte Linie dargestellt sind; nach [10]

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde DNMT1 ursprünglich als DNMT mit Erhaltungsfunktion klassifiziert (engl.: maintenance DNMT), während die Transferasen der DNMT3-Klasse als „*de novo*“ DNMT bezeichnet wurden. Es gibt jedoch inzwischen auch Hinweise auf eine Kooperation von DNMT1 mit DNMT3A und DNMT3B zur Weitergabe des Methylierungsstatus in Kolontumorzellen. DNMT1 zeigt dagegen *in vitro* nur geringe oder keine Aktivität zur vollständigen Neumethylierung [12].

Als Quelle der Methylgruppe, welche durch die DNMT übertragen wird, fungiert der universelle Methyl donor S-Adenosylmethionin (SAM). Nach Abspaltung der Methylgruppe liegt die Verbindung als S-Adenosylhomocystein (SAH) vor, welche bei hoher Konzentration die Aktivität der DNMT hemmt (Abbildung 4) [7].

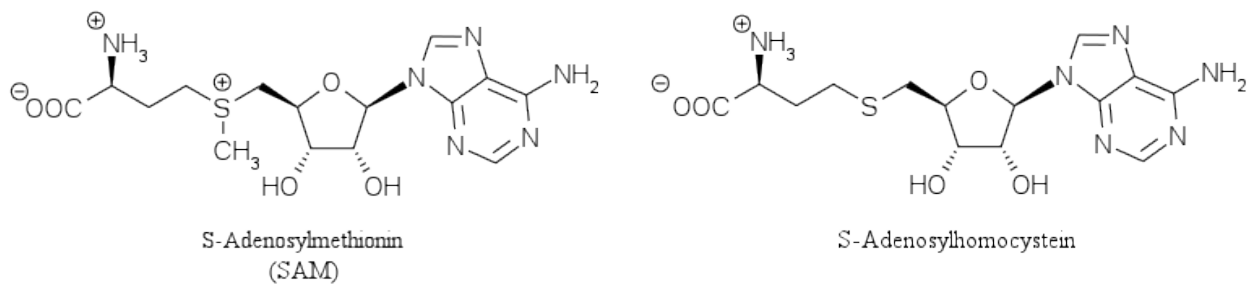


Abbildung 4: Struktur des Methyl donors S-Adenosylmethionin und seiner demethylierten Form S-Adenosylhomocystein; nach [14]

Es gibt auch Hinweise auf eine weitere, nicht-enzymatische Einwirkung der DNMT auf die Stilllegung der Transkription über Interaktionen mit Histonmethyltransferasen und Histondeacetylasen, sowie mit chromatinstruktur-verändernden Proteinen [15].

1.1.1.2 Auswirkungen auf die Transkription

Das Wissen über den genauen Ablauf der Modulation der Gentranskription über die Methylierung ist bis heute noch lückenhaft. So wäre es möglich, dass an unterschiedlichen Stellen der DNA verschiedene Mechanismen zur Anwendung kommen. Ein Indiz dafür ist die Steigerung der Expression des IGF2 Gens (engl.: insulin-like growth factor 2) durch DNA-Methylierung, obwohl normalerweise eine Stilllegung der Transkription zu erwarten wäre [5].

Nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft findet die Inaktivierung der Genexpression durch Promotormethylierung auf mindestens zwei Arten statt: Zum einen könnten Transkriptionsfaktoren durch die Methylgruppen an ihren spezifischen Bindungsstellen am Andocken gehindert werden. Es läge somit eine sterische Hinderung vor. Die zweite Möglichkeit wäre die Bildung von spezifischen Bindungsstellen für mCpG-bindende Proteine, welche Auslöser von vielen verschiedenen Prozessen sein können. So könnte diese Proteinanbindung weitere Veränderungen der Chromatinstruktur nach sich ziehen, wodurch wiederum die Transkription behindert wird [5].

In Säugetieren gibt es die Proteine der MBD Familie, welche sich durch eine mCpG-bindende Domäne (MBD, engl.: methyl-CpG-binding domain) auszeichnen. Einige Vertreter dieser Proteinfamilie (MeCP2, MBD1, MBD2) wirken als Transkriptionsrepressoren [5]. Zusätzlich zur Anbindung der MBD-Proteine an die DNA werden bei diesem Vorgang chromatinmodifizierende Komplexe mit Korepressoren gebildet [15]. Auch die nicht aus der MBD Gruppe stammenden Proteine Kaiso, ZBTB4 und ZBTB38 binden an methylierte CpG-Dinukleotide und unterdrücken die Gentranskription [7].

1.1.1.3 Auswirkungen auf die Krebsentwicklung

Krankhafte Veränderungen der DNA-Methylierungsmuster und Chromatinstrukturen wirken sich auf vielfältige Weise auf die menschliche Gesundheit aus. Besonders bei Krebserkrankungen und verschiedenen geistigen Behinderungen (z.B.: ATRX-Syndrom, Fragiles X-Syndrom) wurden schwerwiegende Veränderungen der DNA-Methylierung nachgewiesen [7].

Nach D. Hanahan et. al. [16] gibt es sechs Kennzeichen für Krebs:

1. Umgehung der Apoptose
2. Unempfindlichkeit gegenüber Anti-Wachstumssignalen
3. Andauernde Angiogenese
4. Uneingeschränktes Potential zur Replikation
5. Eindringen in Gewebe und Metastasierung
6. Selbstversorgung mit Wachstumssignalen

Inzwischen ist die Anzahl an Genen, welche nachweislich in die Onkogenese involviert sind, sehr groß. Bei allen oben genannten Kennzeichen, mit Ausnahme der Selbstversorgung mit

Wachstumssignalen, konnte inzwischen eine Beteiligung der DNA-Methylierung nachgewiesen werden [8, 16].

Die Apoptose wird durch Abnormalitäten oder Änderungen in der Zelle selbst oder in ihrer Umgebung ausgelöst. Dazu zählen Änderungen der Wachstumsrate, Strahlungseinwirkung oder Signale benachbarter Zellen und Gewebe. Es folgt eine Kaskade an Ereignissen, an denen mehrere Proteine beteiligt sind, welche schlussendlich zum programmierten Zelltod führen. Durch Methylierung von Genen, welche an der Kaskade beteiligt sind, kommt es nicht mehr zur Bildung der Proteine und die Apoptose wird unterdrückt [8, 16].

Die Fähigkeit von Tumorzellen, sich viel schneller als gesunde Zellen zu teilen und zu wachsen, stammt von ihrer Unempfindlichkeit gegenüber Anti-Wachstumssignalen. Dies geschieht durch Umgehung von Kontrollwegen im Ablauf des Zellzyklus. Es gibt hier verschiedene Signalwege, welche sich auf die Zellproliferation auswirken. Ein Vertreter wäre der Retinoblastom-Weg (engl.: retinoblastoma pathway, Rb pathway) welcher in vielen Krebsarten gestört ist. Er reguliert die Ausschüttung von Anti-Wachstumssignalen der Zelle zwischen den Phasen G1 und S des Zellzyklus. Auch hier kann durch Hypermethylierung die Transkription von beteiligten Proteinen beeinflusst werden [8, 16].

Um die abnorm hohe Wachstumsrate aufrecht erhalten zu können, benötigen Tumore eigene Blutgefäße, um ihren Sauerstoff- und Nährstoffbedarf zu decken. Es kommt zur Neubildung von Arterien und Venen, der so genannten Angiogenese. DNA-Methylierung kann hier zur Stilllegung von den Vorgang behindernden Genen führen [8, 16].

Das große Potential zur Replikation von Krebszellen ist auf ihre hohe Telomerase-Aktivität zurück zu führen. Im Gegensatz dazu zeigen normale Zellen eine sehr geringe bis nicht messbare Aktivität des Enzyms. Die Telomerase ist aus verschiedenen Untereinheiten aufgebaut. Die humane Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT) ist eine dieser Einheiten. Das kodierende Gen der hTERT ist eines der wenigen Beispiele, in welchem die CpG-Methylierung zur Aktivierung des Gens beiträgt. Allerdings muss ein Bereich des Promotors in nächster Nähe zum Startpunkt der Transkription unmethyliert bleiben [8, 16].

Im Fall von invasiv wachsendem Krebs kann eine Metastasierung auftreten. Eines der Kennzeichen von bösartigen Tumoren ist der Verlust der zellulären Anbindung, wodurch ein Ablösen und Abwandern der Zellen möglich wird. Es kommt zum Eindringen und Anwachsen der Tumorzellen in anderen Geweben. Hypermethylierung wirkt hier durch die Unterdrückung der Expression von Proteinen, welche zur Erhaltung der Zellverbindungen (engl.: cell junctions) beitragen [8, 16].

Im Zusammenhang mit den Auswirkungen der DNA-Methylierung wird oft von der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen gesprochen. Es handelt sich dabei um einen Überbegriff für Gene, die die Zelle vor DNA-Schäden, welche durch Umwelteinflüsse (UV-Strahlung, γ -Strahlung, etc.) oder übermäßige Proliferationssignale ausgelöst werden können, schützen [17]. Sie können unter anderem bei der Regulation der Zellzyklen und des Wachstums, bei der Signaltransduktion, der Transkription, der Zelladhäsion und der DNA-Reparatur von Bedeutung sein [1]. Einige Tumorsuppressorgene lösen auch die Apoptose von geschädigten Zellen aus [17].

Wird ihre Expression durch Mutationen oder Promotormethylierung gestoppt, ergibt sich ein Ungleichgewicht zwischen Proliferation und Zelltod, wodurch die Entstehung eines Tumors ermöglicht wird [17].

1.1.1.4 DNA Methylierung als Biomarker

Biomarker können als biologische Variablen, welche mit biologischen Abläufen korreliert sind, definiert werden [11]. Die möglichst frühe Erkennung einer Erkrankung wirkt sich besonders bei Krebs positiv auf die Verlaufsprognose aus. Üblicherweise wird Krebs erst nach dem Auftreten von Symptomen, der visuellen Detektion oder nach histopathologischen Untersuchungen sowie der Biopsie des betroffenen Gewebes diagnostiziert. Leider treten Symptome oft erst nach erfolgter Metastasierung auf, was zu hohen Sterblichkeitsraten führt. Die visuelle Detektion und die Entnahme einer Gewebeprobe sind meist auf leicht zugängliche Körperteile limitiert. Aus diesem Grund wird sehr viel Aufwand in die Weiterentwicklung von Früherkennungsstrategien investiert. Änderungen der DNA-Methylierung geschehen früh im Verlauf der Kanzerogenese, weshalb sie als potentiell gute Indikatoren von bestehenden Erkrankungen gehandelt werden. Auch zur Abschätzung des Risikos einer zukünftigen Tumorbildung und des Ansprechens auf verschiedene Arten der Medikation können Methylierungsmuster herangezogen werden [18].

Die Analyse der Methylierung wird jedoch durch das Einwirken von Alterungsprozessen und Umweltfaktoren auf den Methylierungsgrad verkompliziert. Es muss eine Unterscheidung zwischen den mit dem Alter assoziierten Veränderungen und den Änderungen durch die Erkrankung getroffen werden [7].

Die klinische Anwendbarkeit eines Biomarkers hängt auch mit seiner Zugänglichkeit zusammen. Der ideale Biomarker sollte einfach, ohne die Notwendigkeit von operativen Eingriffen, für die

Messung verfügbar sein. Freie DNA ist durch die hohe Zellerneuerungsrate im Blut leicht zugänglich. Auch Urin, Speichel, Sputum oder Stuhl, welche in Kontakt mit Krebszellen gekommen sind, können als Quelle für die DNA aus Tumorzellen dienen [13].

Wichtige Kriterien sind sowohl die Spezifität als auch die Sensitivität von Analysemethoden. Es gibt bereits einige Biomarker auf der Protein-, RNA- und DNA-Ebene, die den Anforderungen genügen. In der klinischen Praxis werden Tumordiagnosen mittels biochemischer Assays, welche die Anwesenheit oder die Menge von Enzymen, Rezeptoren, Wachstumsfaktoren oder Hormonen bestimmen, durchgeführt. Der große Vorteil der DNA im Vergleich zur RNA liegt in ihrer höheren Stabilität und der Möglichkeit ihrer Amplifikation. Außerdem sind methylierte Cytosine, im Gegensatz zu anderen epigenetischen Markern wie der Chromatinmodifizierung, Teil der kovalenten DNA-Struktur. Ist die Methylierung einmal erfolgt, ist sie im Großteil der Fälle chemisch und biologisch stabil. Im Gegensatz dazu kann die Expression der mRNA und die Bildung von Proteinen durch Überführung in ein anderes Medium mit nicht krankheitsassoziierte Umgebung, oder durch die verschiedenen Stadien im Zellzyklus schwanken [7].

Besonders gefragt wären für eine Krebsart spezifische DNA-Methylierungsmarker. Einmal gefunden, würden sie die akkurate Voraussage von unterschiedlichen Erkrankungstypen ermöglichen. Zur Zeit kann nur über die Kombination von verschiedenen, in einer Krebsart methylierten Genen eine zuverlässige Vorhersage des Krebsphänotyps erfolgen [13]. Die Nutzung der DNA-Methylierung als Biomarker bietet viele Möglichkeiten der Anwendung zur Krebsdetektion. Durch die Analyse von leicht verfügbaren Körperausscheidungen und Körperflüssigkeiten könnte ein Screeningverfahren zur Krebsfrüherkennung etabliert werden [18].

1.2. Kolonkrebs

Unter Kolonkrebs oder kolorektalen Karzinomen (CRC; engl.: colorectal cancer) versteht man Tumore des Dickdarms (Kolon) und des Mastdarms (Rektum). Er zählt in den westlichen Industrienationen zu den am häufigsten auftretenden Krebserkrankungen. Zusammen mit Lungenkrebs, sowie Brustkrebs bei Frauen und Prostatakrebs bei Männern zählt er zu den Karzinomen mit der höchsten Anzahl an Todesfällen. In Entwicklungsländern ist das Auftreten dieser Krebsart weniger häufig, was auf einen Zusammenhang mit dem Lebensstil, insbesondere

der Ernährung, hinweist [19]. Als Risikofaktoren für die Erkrankung an Darmkrebs gelten vor allem ein großer Anteil an Fett, raffinierten Zuckern und tierischen Proteinen, sowie eine geringe Aufnahme an Ballaststoffen, kombiniert mit wenig körperlicher Bewegung. Der Haupteinfluss liegt jedoch im Alter. Mehr als 90% der Kolonkarzinome werden bei Menschen über dem 50. Lebensjahr diagnostiziert. Der Grund dafür könnte in der Summe der lebenslang einwirkenden biologischen und chemischen Schäden liegen, welche aus den oben genannten Risikofaktoren resultieren [1].

Tabelle 2 zeigt eine Aufstellung der zehn häufigsten Krebsarten und ihr geschätztes Auftreten in den USA für das Jahr 2005. Sowohl bei Männern als auch bei Frauen liegen Kolonkarzinome an dritter Stelle der Neuerkrankungen. Der Anteil der voraussichtlichen Todesfälle durch CRC in den USA im Jahr 2005 liegt bei Männern sowie Frauen bei rund 10% aller durch Krebserkrankungen verursachten Todesfälle. Bei beiden Schätzungen sind in situ Karzinome (ausgenommen Harnblasenkrebs), Basalzellenkrebs und Plattenepithelkarzinome aufgrund der geringen Sterblichkeit nicht miteinbezogen worden [1].

Tabelle 2: Die zehn führenden Krebsarten bei den erwarteten neuen Krebserkrankungen in den USA für das Jahr 2005 und ihr Anteil an der Gesamtheit von Krebserkrankungen aller Art, ohne in situ Karzinome (ausgenommen Harnblasenkrebs), Basalzellenkrebs und Plattenepithelkarzinom; erstellt von der American Cancer Society; nach [1]

Krebslokalisation	Anteil	Männer	Frauen	Krebslokalisation	Anteil
Prostata	33%			Brust	32%
Lunge und Bronchien	13%			Lunge und Bronchien	12%
Kolon und Rektum	10%			Kolon und Rektum	11%
Harnblase	7%			Gebärmutter	6%
Hautmelanome	5%			Non-Hodgkin Lymphome	4%
Non-Hodgkin Lymphome	4%			Hautmelanome	4%
Niere und Nierenbecken	3%			Eierstöcke	3%
Leukämie	3%			Schilddrüse	3%
Mundhöhle und Rachen	3%			Harnblase	2%
Pankreas	2%			Pankreas	2%
andere	17%			andere	21%

In der Entwicklung von kolorektalen Tumoren können mehrere ausgeprägte Vorstufen unterschieden werden. Diese reichen vom Auftreten einer Hyperplasie (vermehrte Zellteilung) über verschiedene Stufen von gutartigen Adenomen bis hin zu invasiven Karzinomen und Metastasenbildung [19]. Abbildung 5 zeigt eine Übersicht der unterschiedlichen Entwicklungsstufen.

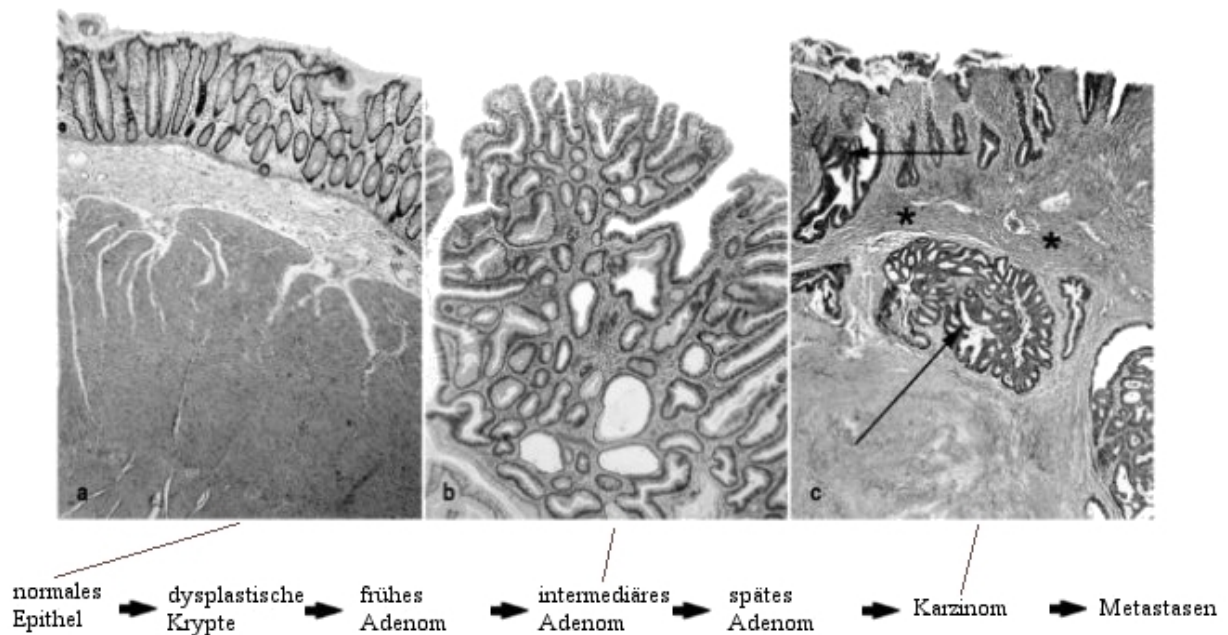


Abbildung 5: Die Abbildungen zeigen normale Mukosa (links), einen adenomatösen Polyp (mitte) und ein invasives Karzinom mit Tumordrüsen (gekennzeichnet durch Pfeile) in der Submukosa (rechts); modifiziert nach [19]

Hyperplastische oder dysplastische Krypten sind die ersten sichtbaren Veränderungen der Mukosa in der Bildung von gutartigen Krebsvorstufen, sogenannten Präneoplasien. Adenomatöse Polypen sind Vorläufer von vielen Karzinomen. Meist handelt es sich bei ihnen um einzelne gutartige Geschwüre, die in das Innere des Darmes ragen [19]. Aufgrund dieser erkennbaren Frühstadien der Erkrankung eignet sich CRC gut für die Erforschung von Markern zur Früherkennung [11]. Es ist möglich, die gefundenen Veränderungen an Genen oder Signaltransduktionswegen den unterschiedlichen Entwicklungsstadien zuzuordnen und so zugrundeliegende biologische Prozesse zu verstehen. Die Übertragung der gewonnenen Informationen auf andere Krebsarten sind Teil des aktuellen Forschungsgeschehens [19].

Es gibt einige vererbte Syndrome, welche das Risiko einer Erkrankung an Darmkrebs erhöhen. Unter ihnen finden sich die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), das hereditäre non-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC), das Peutz-Jeghers Syndrom und die Cowden Erkrankung. Studien dieser mäßig auftretenden bis seltenen Syndrome erbrachten viele Erkenntnisse, welche auch auf den sporadisch auftretenden Kolonkrebs anwendbar sind [19].

FAP und HNPCC sind die am besten untersuchten Formen des familiär vererbten Kolonkarzinoms. Bei beiden Syndromen kann die Entstehung von multiplen Tumoren bereits in jungen Jahren erfolgen. Der größte Unterschied zwischen FAP und HNPCC liegt in der Polypenentwicklung. FAP führt ab dem zweiten Lebensjahrzehnt zur Ausbildung von mehreren

hundert Polypen im Dickdarm. Ohne Behandlung entwickeln sich einer oder mehrere davon im Laufe der vierten oder fünften Lebensdekade zu Karzinomen. Das Verhältnis von Adenomen zu Karzinomen liegt hier bei ca. 1.000:1. HNPCC bewirkt das Auftreten von weit weniger Polypen, welche jedoch nur sehr kurze Zeit zur Umwandlung von Adenom zu Karzinom benötigen. Das Verhältnis von Polypen zu Tumoren liegt hier beinahe bei 1:1. Während also bei FAP die Wahrscheinlichkeit für die Umwandlung eines einzelnen Adenoms in ein Karzinom gering ist, liegt bei HNPCC eine extrem hohe Wahrscheinlichkeit vor. Aus diesen Erkenntnissen wurde geschlossen, dass die genetische Schädigung, welche bei FAP vorliegt, eine initiiierende Wirkung auf die Adenombildung hat, wohingegen bei HNPCC eine Beschleunigung der Tumorphprogression erfolgt. Sporadische Kolonkrebserkrankungen liegen mit einem ungefähren Verhältnis von 30:1 von Polypen zu Karzinomen zwischen den beiden Extremen [20].

Kolonkarzinome, welche noch keine Metastasierung aufweisen, können operativ entfernt werden. In vielen Fällen wird zur Abtötung von eventuell verbliebenen Tumorzellen zusätzlich eine Chemotherapie eingesetzt. Die Prognose des Krankheitsverlaufes hängt von der Zugänglichkeit für den operativen Eingriff und damit auch von der Lokalisation des Karzinoms ab. Liegt bereits eine Ausbreitung auf andere Gewebe, wie z.B. die lokalen Lymphknoten, Leber, Lunge oder andere Organe vor, wird die Behandlung schwieriger. Oft können die oben genannten Behandlungsmethoden dann nur mehr als lebensverlängernde Maßnahmen eingesetzt werden [19]. Die 5-Jahre-Überlebensrate bei metastasiertem Kolonkrebs liegt bei nur 9%, während sie bei lokalisierten Kolonkarzinomen 90% beträgt. Allerdings werden nur ungefähr 37% der Erkrankungen in diesem frühen Stadium diagnostiziert [1].

1.2.1 DNA-Methylierung bei Kolonkrebs

Interessanterweise können bei sporadischen Darmkrebserkrankungen ähnliche DNA-Methylierungsmuster auftreten wie bei den oben genannten vererbten Erkrankungen. Außerdem wurde an vielen Genen, welche bei den vererbten Syndromen mutiert sind, eine Inaktivierung durch Hypermethylierung oder Mutation bei sporadischem Kolonkrebs nachgewiesen [4].

So liegt bei der FAP eine Keimbahnmutation im APC Tumorsuppressorgen vor. In sporadischem Kolorektalkrebs konnte in rund 80% der Fälle eine Mutation am selben Gen nachgewiesen werden [4].

Inzwischen wurden viele weitere Gene identifiziert, die bei verschiedenen Unterarten von CRC mit verändertem Methylierungsstatus vorliegen. Methylierung der Promotorregion von MLH1 (engl.: mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (*E. coli*)) , MGMT (engl.: O-6-methylguanine-DNA methyltransferase) und HIC1 (engl.: hypermethylated in cancer 1) führt zur Progression des Tumors. Auch die Stilllegung von CDKN2A/p16 (engl.: cyclin dependent kinase 2A/p16), CDKN2A/p14 (engl.: cyclin dependent kinase 2a/p14), und HLTF (engl.: helicase-like transcription factor), welche als Tumorsuppressorgene in DNA-Reparaturprozesse und die Apoptose eingreifen, konnte beobachtet werden [11, 22, 23]. Weitere Beispiele für in der Literatur häufig beschriebene Gene wären K-ras (engl.: Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog), DCC (engl.: deleted in colorectal carcinoma), p53 (engl.: tumor protein p53) und DAPK (engl.: death associated protein kinase) [1, 21, 22, 23].

Die Stilllegung bestimmter Gene kann in unterschiedlichen Stadien der Krebserkrankung erfolgen. So wird das Gen UNC5C (unc-5 homolog C (*C. elegans*)) in Kolonkrebs früh methyliert, während DCC erst im fortgeschrittenen Stadium ausgeschaltet wird [11, 22]. UNC5C und DCC sind Teile des Netrin-1 Rezeptors und besitzen beide die Fähigkeit in Abwesenheit ihrer Liganden Signale für den Zelltod auszusenden. Diese Resultate weisen darauf hin, dass epigenetische Veränderungen im kolorektalen Krebs nicht wahllos passieren [11].

In Studien wurden unterschiedliche Kombinationen der Methylierung von an der Kanzerogenese beteiligten Genen gefunden. Dadurch kam man zu dem Schluss, dass es sich bei Kolonkrebs um eine heterogene Tumorfamilie handeln muss, deren Bildung durch Störungen in unterschiedlichen Signaltransduktionswegen ausgelöst werden kann [1].

In den letzten Jahren wurden viele Forschungsarbeiten, die sich mit der DNA-Methylierung im Verlauf der Entwicklung von kolorektalen Karzinomen beschäftigen, veröffentlicht. Die Anzahl der Gene, welche als potentielle Biomarker genutzt werden könnten, steigt dadurch laufend.

1.2.2 Im Zuge dieser Arbeit ausgewählte Gene

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden Methoden basierend auf der methylierungs-sensitiven hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse entwickelt, um den DNA-Methylierungsgrad von Genen zu bestimmen, welche im Bezug zu kolorektalen Karzinomen stehen.

1.2.2.1 APC

Die Abkürzung APC steht für „Adenomatous Polyposis Coli“. Es handelt sich dabei um dasselbe Gen, welches bei der familiären adenomatösen Polyposis mutiert vorliegt. Die Identifizierung erfolgte im Jahr 1991 bei einem FAP Patienten, bei dem eine Deletion am Chromosom 5q21, auf welchem sich APC befindet, zytogenetisch festgestellt werden konnte. Im Anschluss daran wurde eine Untersuchung des Gens bei Patienten mit sporadischem kolorektalem Krebs durchgeführt. Es wird angenommen, dass in 70-80% aller CRC-Fälle eine Inaktivierung dieses Gens durch Punktmutationen, Deletion oder Hypermethylierung erfolgt [19].

Das zugehörige APC-Protein hat eine Länge von 2843 Aminosäuren und kann in vielen Zellen sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern nachgewiesen werden [1, 24]. Das Protein erfüllt viele verschiedene Aufgaben und kann an der Zelladhäsion, der Zellmigration, der Progression der Zelle im Zellzyklus, der Regulierung der Transkription, der neuronalen Aktivität und den Funktionen des Zytoskeletts beteiligt sein [24]. Besonders wichtig im Bezug auf die Kanzerogenese bei Darmkrebs ist die Beteiligung des APC-Proteins an der Regulation des Wnt-Signalweges [25]. Der Wnt-Signalweg ist in der Spezifizierung und Lokalisation von neuen Zellen während der Gewebsdifferenzierung involviert [26].

In der gesunden Zelle wird aus den Proteinen Axin, GSK3 β (Glycogensynthasekinase 3 β) und APC ein Komplex gebildet, welcher β -Catenin phosphoryliert, und so dessen proteolytischen Abbau auslöst. Bei normaler Funktion des Signalweges binden Wnt-Liganden an die Frizzled-Rezeptoren der Zellmembran und behindern die Bildung des Axin/GSK3 β /APC Komplexes. Es erfolgt eine Bindung des β -Catenin an Transkriptionsfaktoren wie z.B. TCF/LEF und die Expression von wachstumsregulierenden Genen (darunter c-MYC, Cyclin D) kann erfolgen. [26]. Abbildung 6 zeigt ein Schema der Signalkaskade.

Durch Freigabe des Frizzled-Rezeptors und Anbindung der SFRP Proteine (engl.: secreted frizzled-related proteins) kommt es wieder zur Komplexbildung und das Expressionssignal wird gestoppt [25].

Durch Inaktivierung des APC-Gens kann der Axin/GSK3 β /APC Komplex nicht gebildet werden und β -Catenin sammelt sich an. Es folgt eine Überexpression der wachstumsregulierenden Gene und eine Aktivierung von weiteren Genen, welche in die Zellteilung involviert sind. Als Folge davon können die Epithelzellen des Darmes proliferieren und Adenome ausbilden [24].

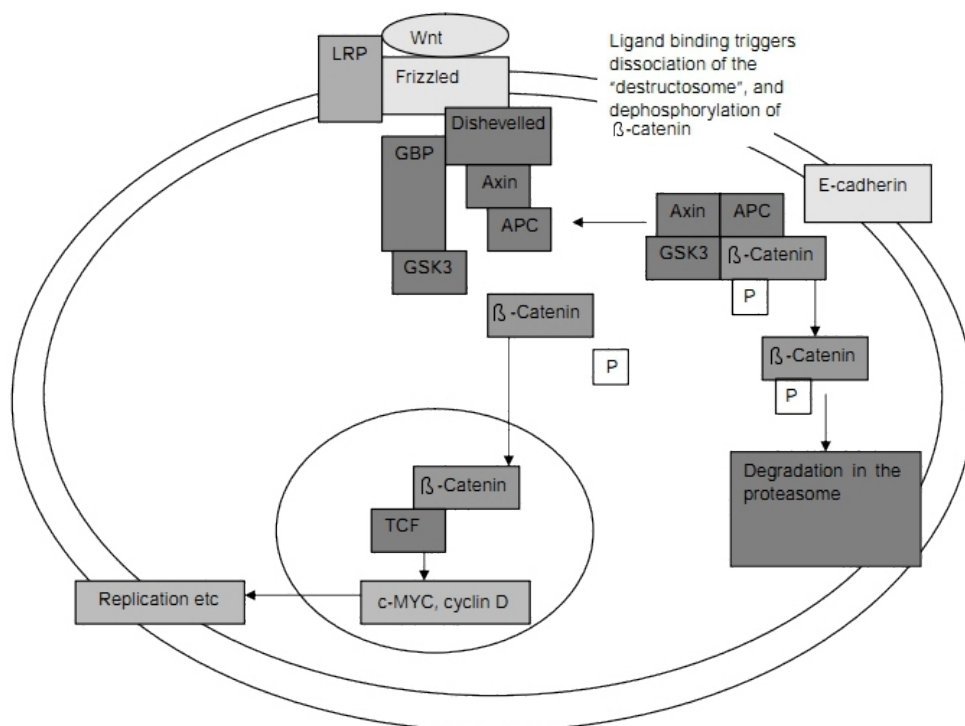


Abbildung 6: Schema des Wnt-Signalwegs; modifiziert nach [26]

In den rund 20% der Kolorektalkarzinom-Fälle, in denen keine Störung am APC vorliegt, ist fast immer eine Inaktivierung eines anderen, am Wnt-Signalweg beteiligten Gens zu finden. Oft liegt die Mutation dann am CTNNB1, welches β-Catenin kodiert, vor. Es scheint, als wäre eine Störung der Wnt-Kaskade ein notwendiges Ereignis bei der Entstehung von CRC [19].

1.2.2.2 HIC1

Das Gen „Hypermethylated in Cancer 1“ oder HIC1- Gen befindet sich am Chromosom 17p13.3. Dabei handelt es sich um eine Region, die oft in präinvasiven Stadien von Brust- und Kolonkrebs hypermethyliert wird [25].

Das HIC1 Protein ist aus 714 Aminosäuren aufgebaut und hat die Funktion eines Transkriptionsrepressors. Es gehört zur Familie der BTB/POZ und Krüppel C2H2 Zinkfingerproteine und ist in vielen gesunden Geweben nachzuweisen [27].

HIC1 interagiert mit dem CtBP Korepressor und unterdrückt die Transkription der NAD⁺ abhängigen Klasse III Deacetylase SIRT1 [25, 27]. Ein Ziel von SIRT1 ist das Gen p53, welches an der Auslösung der Apoptose geschädigter Zellen beteiligt ist. Durch epigenetische Stilllegung von HIC1 steigt die Konzentration an SIRT1 und die Transkriptionsaktivität des p53 Gens wird

über Deacetylierung negativ beeinflusst. Die apoptotische Antwort auf DNA-Schäden wird dadurch vermindert [25].

1.2.2.3 DAPK1

Die „Death Associated Protein Kinase 1“ ist ein Protein mit einer Länge von 1430 Aminosäuren. Das zugehörige DAPK1-Gen befindet sich am Chromosom 9q21.33 [28]. Die Kinase spielt eine Rolle in verschiedenen Zellsignalkaskaden, die sich auf die Langlebigkeit bzw. die Apoptose von Zellen auswirken. Weiters reguliert sie die Ca^{2+} /Calmodulin (Ca^{2+} /CaM) Reaktion [29].

DAPK1 induziert die Apoptose von Zellen. Ihre Funktion ist mit der des p53 Proteins verknüpft. Die Inaktivierung des DAPK1-Gens führt zu einer signifikanten Verminderung der Reaktion von p53. Der von DAPK1 induzierte Zelltod ist charakterisiert durch die Bildung von autophagischen Vesikeln und der Entstehung von Ausbuchtungen an der Zellmembran (engl.: membrane blebbing) [28].

Die Promotormethylierung von DAPK1 wurde sowohl im Bezug auf Kolonkarzinome, Karzinome der Lunge als auch auf Plattenepithelkarzinome untersucht, und wird für letztere ebenfalls als möglicher Biomarker aufgefasst [29, 30]. Die Hypermethylierung von DAPK1 wird oft mit dem schlechten Ansprechen auf Chemotherapie und einer schlechten Verlaufsprognose in Verbindung gebracht [31].

1.2.2.4 OSMR

OSMR steht für Oncostatin M Rezeptor. Das Gen liegt am Chromosom 5p13.1 [32].

Oncostatin M (OSM) ist ein Interleukin-6 Zytokin und wird hauptsächlich von aktivierten Monozyten und Lymphozyten produziert. Bei mehreren Krebsarten wird durch OSM die Wachstumshemmung und die Apoptose geschädigter Zellen ausgelöst. Die biologischen Effekte werden über einen Komplex, gebildet aus dem Glykoprotein GP130 und dem OSM Rezeptor, vermittelt. Dies kann über die Aktivierung verschiedener Signalwege passieren [33].

Der Nachweis der geringeren Konzentration an OSMR bei einigen Krebserkrankungen führte zu Untersuchungen des Methylierungsstatus des OSMR-Gens [33].

Im Zuge einer von Kim et. al. durchgeführten Studie [11] wurde eine Übersicht möglicher Biomarker bei Kolonkrebs veröffentlicht. Verschiedene Gene wurden dabei auf ihre Methylierung bei kolorektalen Karzinomen und in normalem Gewebe untersucht [11].

Das OSMR-Gen wurde dabei in 80% aller entnommenen Tumorgewebsproben (80 von 100) und nur in 4% (4 von 100) bei adäquater normaler Mukosa methyliert vorgefunden. In normalen nicht-kanzerösen Darmzellen waren es 0% (0 von 13). Auch in Stuhlproben von an CRC erkrankten Personen war bei 38% (26 von 69) ein positiver Nachweis möglich. In 5% (4 von 81) der Stuhlproben von gesunden Menschen konnte ebenfalls eine Hypermethylierung am OSMR-Gen nachgewiesen werden [11].

In einer Arbeit, welche im Jahr 2009 veröffentlicht wurde, fand man in 90% von Zellen aus Kolonkarzinomen und in 89% der untersuchten kolorektalen Polypen eine Promotormethylierung im OSMR-Gen. Im an den Tumor angrenzenden Gewebe wurde in 55% der Fälle ein positives Ergebnis erhalten. Normale Darmmukosa wies in 5% der untersuchten Proben eine Methylierung auf [33].

1.3 Beeinflussung der DNA-Methylierung durch Lebensmittelinhaltsstoffe und -kontaminanten

Für die meisten bei Menschen auftretenden Krebsarten gibt es keine einzelnen klar definierten Auslöser, die man einfach meiden könnte. So kann die Reduktion der Menge an Sonnenlicht, welches die ungeschützte Haut trifft, zwar die Entstehung einiger Hautkrebstypen, aber eben nicht aller Arten von Hautkrebs verhindern [19].

Nur bei einer der vier am häufigsten tödlich verlaufenden Krebserkrankungen in den westlichen Industrienationen kann bei einem Großteil der Erkrankungen von dem selben Auslöser ausgegangen werden. Es handelt sich hierbei um den Tabakkonsum als Risikofaktor für Tumore der Lunge. Bei den drei anderen, kolorektalen Karzinomen sowie Brust- und Prostatakrebs, ist es nicht möglich, ein einzelnes Hauptkarzinogen festzulegen. In epidemiologischen Studien konnte jedoch der westliche Lebensstil als Risikofaktor mit allen drei Erkrankungen assoziiert werden. Besonders die damit verbundenen Ernährungsgewohnheiten scheinen eine wesentliche Rolle in der Kanzerogenese zu spielen [19].

Im Vergleich zur westlichen Welt ist in Ostasien die Kalorienaufnahme nur ein wenig geringer. Der große Unterschied liegt in der Quelle der Kalorien. In der typischen westlichen Ernährung ist der Anteil an tierischen Fetten, aus rotem Fleisch und Milchprodukten, hoch. Typische „östliche“ Speisepläne liefern dagegen mehr Energie aus Getreide und Hülsenfrüchten. Auch der Verzehr von Obst, Gemüse und Fisch ist hier wesentlich höher. Allerdings muss man beachten, dass auch in den Regionen „Ost“ und „West“ zwischen den einzelnen Ländern große Unterschiede vorliegen [19].

Es gibt verschiedene Lebensmittelinhaltsstoffe, die das Risiko an Krebs zu erkranken, verringern. Ein Beispiel dafür wären Carotinoide, welche durch ihre antioxidative Wirkung vor reaktiven Sauerstoffspezies schützen [19]. Es sind auch Inhaltsstoffe bekannt, die sich direkt auf die DNA-Methylierung auswirken. Eine unausgewogene Versorgung mit diesen Nährstoffen kann zur Veränderung des Methylierungsstatus der DNA führen [34]. Diese Substanzen können in vier Gruppen eingeteilt werden:

1. B Vitamine als Koenzyme des Ein-Kohlenstoff Metabolismus
(engl.: one-carbon metabolism)
2. Methyl donor Inhaltsstoffe
3. Mikronährstoffe, die den Ein-Kohlenstoff Metabolismus modulieren können
4. Bioaktive Komponenten, welche sich auf die Aktivität der DNMTs auswirken [34]

Der Ein-Kohlenstoff Metabolismus ist ein Netzwerk aus voneinander abhängigen biochemischen Reaktionen, bei dem eine Kohlenstoffgruppe von Methyl donoren abgegeben wird, und über biochemische und molekulare Wege unter anderem zur DNA-Synthese und DNA- und RNA-Methylierung genutzt werden kann. An den Reaktionen haben mehrere Enzyme, wie z.B. SHMT (engl.: serine hydroxymethyltransferase), MAT (engl.: methionine S-adenosyltransferase) und MTHFR (engl.: methylenetetrahydrofolate reductase) Anteil. Im Zuge dieses Metabolismus wird aus S-Adenosylhomocystein das für die DNA-Methylierung benötigte S-Adenosyl-methionin hergestellt [34].

Tabelle 3 zeigt eine Übersicht der die Methylierung beeinflussenden Nährstoffe und ihre Zuteilung in die vier oben genannten Gruppen.

Tabelle 3: Modulierung der DNA-Methylierung durch Nährstoffe; nach [34]

Gruppe	Nährstoff	Auswirkung im Körper
B Vitamine	Folsäure	Methylakzeptor und -donor im Ein-Kohlenstoff Metabolismus
	Vitamin B12	Koenzym für MS (engl.: methionine synthase)
	Vitamin B6	Koenzym für SHMT (engl.: serine hydroxymethyltransferase), CBS (engl.: cystathionine- β -synthase) und Cystathionase
	Vitamin B2	Koenzym für MTHFR (engl.: methylenetetrahydrofolate reductase)
Methyldonoren	Methionin	Homocystein-Remethylierung nach Konversion zu Betain
	Cholin	Homocystein-Remethylierung durch BHMT (engl.: betaine homocysteine methyltransferase)
	Betain	Homocystein-Remethylierung durch SHMT
	Serin	Methyldonor für Tetrahydrofolat über SHMT
Mikronährstoffe	Retinsäure	erhöht die GNMT (engl.: glycine N-methyltransferase) Aktivität
	Zink	Koenzym für MAT (engl.: methionine adenosyltransferase)
	Selen	steigert die Aktivität der Transsulfurierungskaskade
Bioaktive Komponenten	Genistein	Hemmung der DNMT (DNA-Methyltransferasen)
	Tee Polyphenole	Hemmung der DNMT

Folsäure dient als einer der Hauptmethyldonoren für die Remethylierung von S-Adenosylhomocystein zu S-Adenosylmethionin und wirkt sich dadurch auf die Verfügbarkeit von SAM aus. Das macht sie zu einer der wichtigen Größen für die Erhaltung des DNA-Methylierungsmusters. In Versuchen zur Auswirkung von folsäurearmer Ernährung wurde das Auftreten von Hypomethylierung in lymphatischer DNA nachgewiesen. Die Effekte erwiesen sich nach Korrektur der Folsäurezufuhr als reversibel [34].

Aber nicht nur im Hinblick auf die Erhaltung der normalen DNA-Methylierung spielen Lebensmittelinhaltsstoffe im menschlichen Körper eine wichtige Rolle. Die Polyphenole (-)-Epigallocatechin-3-gallat aus grünem Tee und Genistein, welches in Sojabohnen vorkommt, hemmen die Aktivität der DNA-Methyltransferasen. Dieser Effekt könnte für die Demethylierung von in Krebs stillgelegten Genen wie p16^{INK4a} und RAR β nutzbar sein. Durch die geringe Bioverfügbarkeit der Polyphenole ist allerdings fraglich, wie groß die Auswirkung einer normalen Aufnahme mit der Nahrung ist. Für den Einsatz zur aktiven Senkung des Erkrankungsrisikos müssen noch einige Fragen zur Toxikologie bei großen Aufnahmemengen und der Kombination mit anderen Wirkstoffen geklärt werden [35].

Lebensmittelinhaltsstoffe und -kontaminanten können auch die Hypermethylierung der DNA begünstigen. Ein Beispiel dafür sind die Mykotoxine Zearalenon, Fumonisin B1 und Desoxynivalenol, welche in einem 24 Stunden Inkubationsversuch an Caco-2 Zellen in bestimmten Konzentrationen eine Steigerung des gesamten Methylierungsgrades auslösten [36].

Im Folgenden werden die Substanzen näher beschrieben, mit denen in der vorliegenden Arbeit Inkubationsversuche durchgeführt wurden, um ihren etwaigen Einfluss auf den Methylierungsgrad in Kolonkrebszellen zu beobachten.

1.3.1 Heterozyklische aromatische Amine

Bereits Ende der siebziger Jahre konnten in frittiertem Fleisch und gegrilltem Fisch heterozyklische aromatische Amine (HAAs) nachgewiesen werden [37].

Bei den Verbindungen handelt es sich überwiegend um Imidazochinoline und Imidazochinoxaline [37]. Der vermutete Entstehungsweg der heterozyklischen aromatischen Amine aus Kreatin oder Kreatinin, Aminosäuren und Produkten der Maillard-Reaktion, wie Pyridin und Pyrazin, ist in Abbildung 7 dargestellt.

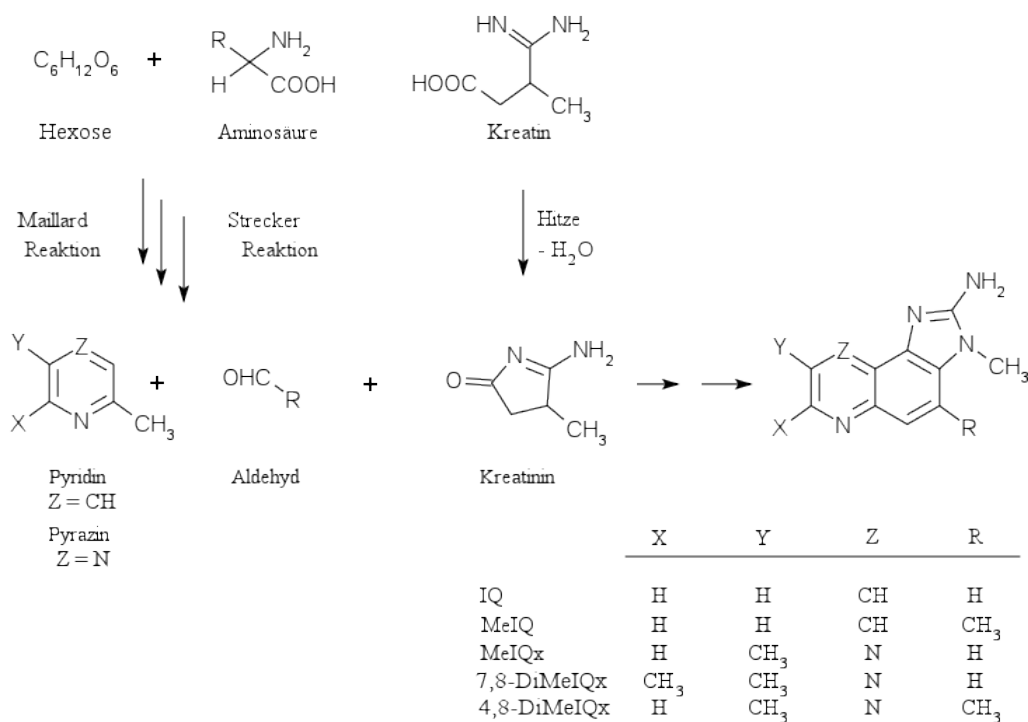


Abbildung 7: Bildung von HAAs beim Erhitzen eines Modellsystems aus Kreatin, Glucose und einer Mischung von Aminosäuren, entsprechend den Konzentrationen in Rindfleisch; nach [37]

Die bei der Zubereitung gebildete Menge an HAAs hängt stark von der Art der Erhitzung, der Höhe der Temperatur, sowie der Dauer der Hitzeeinwirkung ab [38]. So werden bei indirekter Wärmeübertragung wie beim Kochen und Dämpfen weniger HAAs gebildet als beim Braten oder Grillen [39]. Auch in Modellmischungen bestehend aus Kreatin, einer Aminosäure wie z.B. Glycin, Alanin oder Threonin und dem reduzierenden Zucker Glucose, erfolgten nach entsprechender Wärmebehandlung positive Nachweise. HAAs waren in diesen Versuchen bereits nach einer Erhitzung von 5 min bei 175 °C nachweisbar [37].

Die mutagene Wirkung der heterozyklischen aromatischen Amine wurde im mikrobiellen Ames Test nachgewiesen. Nach der Aufnahme der Substanzen können sie metabolisch aktiviert oder durch Detoxifizierungsprozesse mit dem Urin ausgeschieden werden [38]. Die Aktivierung passiert durch oxidative metabolische Überführung in starke Elektrophile [37]. Diese können dann kovalent an die DNA oder an Proteine binden. Epidemiologische Studien über den Zusammenhang des Garzustandes von Fleisch und dem Auftreten von Krebserkrankungen lassen auf eine Erhöhung des Risikos für unter anderem Brust-, Kolon-, Prostata-, Bauch- und Pankreaskrebs schließen [38].

1.3.1.1 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridin – PhIP

PhIP (Abbildung 8) ist das HAA mit den höchsten nachgewiesenen Konzentrationen in Lebensmitteln und kann in Rindfleisch, Schweinefleisch, Huhn und Fisch gebildet werden. Die höchsten Konzentrationen wurden in Grillhuhn und die niedrigsten in Schweinefleisch gefunden. In drei Studien, welche in den USA durchgeführt wurden, bewegten sich die mittleren Aufnahmemengen an PhIP zwischen 285,5 und 457 ng/Tag [39].

In Tierstudien erwies sich PhIP in verschiedenen Geweben als kanzerogen. In Ratten stieg die Häufigkeit von Tumorerkrankungen des Dünndarms, des Kolons und der Prostata in männlichen Tieren sowie der Brustdrüse in weiblichen Tieren. In Mäusen beider Geschlechter und in männlichen Ratten induzierte PhIP die Bildung von aberranten Krypten, welche eine Vorstufe des Kolonkrebs darstellen [39].

Die Mutagenität von PhIP wurde in Prokaryoten (*S. typhimurium*, *E. coli*), Insekten, Nagetieren (in vitro und in vivo) und Menschen nachgewiesen. Die genotoxische Wirkung in Nager und Mensch umfasst Chromosomenaberration, DNA-Schäden, Mikrokernbildung und Schwesterchromatidaustausch, sowie unplanmäßige DNA-Synthese (engl.: unscheduled DNA synthesis) [39].

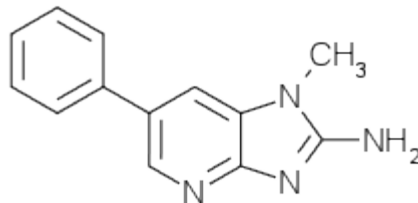


Abbildung 8: Struktur des heterozyklischen aromatischen Amins PhIP; nach [37]

1.3.1.2 2-Amino-3,8-dimethylimidazo-[4,5-f]chinoxalin - MeIQx

MeIQx (Abbildung 9) wird bei der Erhitzung von Rind-, Schweine-, Hühnerfleisch und Fisch gebildet. Die höchsten Konzentrationen treten bei gut durchgebratenem, gegrilltem Huhn und Rindfleisch auf. Drei in den USA durchgeführten Studien zufolge lagen die Aufnahmemengen von MeIQx zwischen 33 und 36 ng/Tag [39].

In Langzeittierstudien induzierte MeIQx Lebertumore, Lymphdrüsenkrebs und Leukämie in männlichen sowie Lungentumore in weiblichen Mäusen. Auch eine Zunahme bei der Entstehung

von aberranten Krypten konnte in Mäusen beobachtet werden. MeIQx wirkte jedoch nicht kanzerogen in Cynomolgus-Makaken (Javaneraffen) bei einer Verabreichungsdauer von 84 Monaten. Das Ergebnis wird der geringen metabolischen Aktivierung des HAAs in dieser Spezies zugeschrieben [39].

MeIQx wirkt mutagen in Prokaryoten (*S. typhimurium*, *E. coli*) und in Nagern (in vitro und in vivo). Die Genotoxizität beim Menschen umfasste bei in vitro Versuchen die Ausbildung von DNA-Schäden, die Mikrokernbildung, den Schwesterchromatidaustausch und unplanmäßige DNA-Synthese [39].

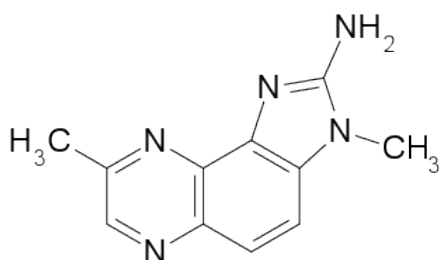


Abbildung 9: Struktur des heterozyklischen aromatischen Amins MeIQx; nach [37]

1.3.2 Lignane

Lignane gehören zur Gruppe der Polyphenole und dienen in Pflanzen als Ausgangsstoff für die Synthese des Zellwandbestandteils Lignin. Nach der Aufnahme über die Nahrung werden sie von Darmbakterien zu für Säugetiere spezifischen Lignanen (z.B.: Enterolacton, Enterodiol) modifiziert und anschließend in die Leber transportiert. Über den enterohepatischen Kreislauf werden diese im Körper verteilt und können in vielen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Die pflanzlichen Lignane selbst werden jedoch nur in geringen Konzentrationen in ihrer ursprünglichen Form resorbiert [40].

Lignane sind in vielen Lebensmitteln in geringen Konzentrationen enthalten. Höhere Lignan-Konzentrationen sind in Leinsamen und Sesam zu finden [37]. Vom Menschen werden Lignane hauptsächlich durch getreide- und ballaststoffreiche Kost aufgenommen [40].

Im menschlichen Körper entfalten Lignane eine ähnliche Wirkung wie die Hormone der Östrogene, weshalb sie zu den Phytoöstrogenen gezählt werden [37, 40].

Epidemiologische Studien wiesen besonders im Bezug auf hormonbezogene Krebsarten wie Brust-, Gebärmutter-schleimhaut- und Prostatakrebs auf eine protektive Wirkung der Aufnahme

verschiedener Phytoöstrogene hin. Dazu zählen unter anderem die Lignane Lariciresinol, Matairesinol, Isolariciresinol und Secoisolariciresinol. Dies scheint auf ihre antiöstrogene Wirkung, die von ihnen geförderte Produktion von SHBG (Sex-hormon-bindendes Globulin) und die Stimulation der Synthese von inaktiven Östrogenen zurückzuführen zu sein [40].

Weiters wird die Aufnahme der Phytoöstrogene aber auch mit der Reduzierung des Risikos von hormonunabhängigen Krebsarten, wie z.B. Dickdarmkrebs, in Verbindung gebracht [40, 41]. Zu den wahrscheinlichen Mechanismen zählen hier die Hemmung der Kanzerogenaktivierung über Cytochrom P450-abhängige Enzyme, die Beeinflussung des Gallensäuren- und Cholesterinstoffwechsels sowie die Hemmung der Blutgefäßbildung [40].

1.3.2.1 (+)-Lariciresinol

Lariciresinol (Abbildung 10) wird besonders durch den Konsum von Sesam (94 mg/kg Sesam) und Leinsamen (30 mg/kg) aufgenommen. Geringere Konzentrationen finden sich z.B. in Broccoli (9,7 mg/kg), Knoblauch (2,9 mg/kg), Erdbeeren (1,2 mg/kg) und Aprikosen (1,1 mg/kg) [37].

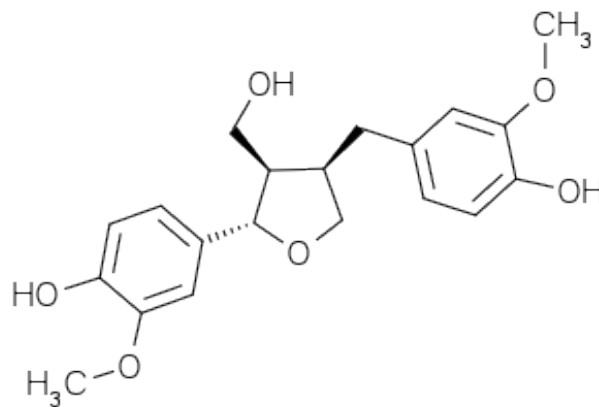


Abbildung 10: Struktur des Lignans (+)-Lariciresinol; nach [42]

1.3.2.2 (-)-Matairesinol

Matairesinol (Abbildung 11) ist unter anderem in Leinsamen (5 mg/kg) und Sesam (5 mg/kg) enthalten [37].

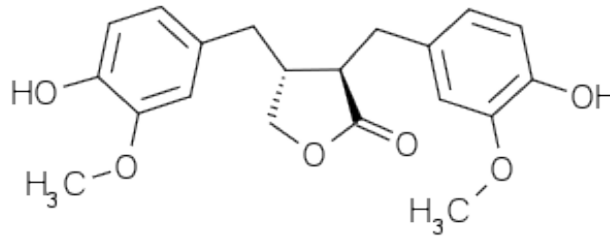


Abbildung 11: Struktur des Lignans (-)-Matairesinol; nach [43]

1.3.3 Mykotoxine

Die Bezeichnung Mykotoxine wird für toxische Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen verwendet. Sie werden von mehreren Pilzarten gebildet welche Feldfrüchte noch am Feld selbst oder nach der Ernte befallen können. Durch die Aufnahme mit der Nahrung stellen sie ein potentiellies Risiko für die Gesundheit von Menschen und Tieren dar [44].

Mykotoxine treten weltweit auf und können in wichtigen Lebensmitteln wie Getreide, Nüssen, getrockneten Früchten, Kaffee, Kakao, Gewürzen und Obst nachgewiesen werden. Durch ihre hohe Stabilität können sie auch in weiterverarbeiteten Produkten wie Bier und Wein enthalten sein. Eine Übertragung durch das Fleisch von Tieren, welche schimmelbefallenes Futter aufnehmen, ist ebenfalls möglich [44].

Schimmelpilzgifte sind Auslöser für eine große Bandbreite an akuten und chronischen Vergiftungserscheinungen. Auch in geringen Mengen können einige ihrer Vertreter nach langer Aufnahmedauer genotoxisch und kanzerogen wirken. Weiters sind Auswirkungen auf die Nieren, die Leber und das Immunsystem beschrieben worden [44].

Einige der wichtigsten Mykotoxinbildner sind die Gattungen der Fusarien und der Alternaria Schimmelpilze, welche die Feldfrüchte bereits vor der Ernte befallen. Im Laufe der Lagerung können Penicillium oder Aspergillus Pilze auftreten, wobei letztere jedoch auch schon am Feld wachsen können. Die gebildeten Substanzen sind oft für eine Pilzart spezifisch. Tabelle 4 zeigt

eine Übersicht einiger wichtiger Mykotoxine, ihrer Produzenten und ihres Auftretens in Lebensmitteln [44].

Tabelle 4: Beispiele wichtiger Mykotoxine, ihrer Erzeuger und möglicher befallener Lebensmittel; nach [44]

Mykotoxinarten	Bsp. erzeugender Schimmelpilzspezies	Befallene Lebensmittel
Aflatoxine B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Nüsse, Feigen, getrocknete Früchte, Gewürze, Mais
Aflatoxine M ₁ , M ₂	<i>Metabolische Produkte der Aflatoxine B₁ und B₂</i>	Milch, Milchprodukte
Ochratoxin	<i>Penicillium verrucosum</i> <i>Aspergillus ochraceus</i>	Zerealien, Kaffeebohnen, Feldbohnen, Bier, Nüsse
Desoxynivalenol, Nivalenol	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i>	Zerealien
T-2 Toxin, HT-2 Toxin	<i>Fusarium poae</i> <i>Fusarium sporotrichioides</i>	Zerealien
Zearalenon	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i>	Zerealien
Patulin	<i>Penicillium expansum</i>	Apfelsaft, Früchte, Silage
Citrinin	<i>Penicillium verrucosum</i>	Zerealien
Sterigmatocystin	<i>Aspergillus versicolor</i> <i>Aspergillus nidulans</i>	Zerealien, Käse
Alternariol	<i>Alternaria alternata</i> <i>Aspergillus tenuis</i>	Früchte, Tomaten, Zerealien

1.3.3.1 Desoxynivalenol - DON

Desoxynivalenol (Abbildung 12) zählt zur Gruppe der Trichothecene, welche von verschiedenen Spezies der Fusarien gebildet werden, darunter *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. culmorum* und *F. graminearum*. Eine weitere Bezeichnungen für DON ist Vomitoxin [44].

Trichothecene wurden in Zerealien (z.B.: Weizen, Mais) und Futtermitteln nachgewiesen [37, 44]. Die Aufnahme der vier Vertreter DON, Nivalenol, HT-2 Toxin und T2 Toxin erfolgt hauptsächlich durch den Konsum von Weizen und Weizenprodukten wie Brot und Nudeln [44].

Akute Vergiftungserscheinungen als Folge der Aufnahme von Trichothecenen sind Störungen des Gastrointestinaltraktes wie Erbrechen und Diarrhoe. Auch Hautirritationen, Appetitlosigkeit, Anämie und Abortus können auftreten. Trichothecene wirken zytotoxisch und sind stark immunsuppressiv. Bis jetzt wurde noch keine karzinogene oder mutagene Wirkung nachgewiesen. In der Literatur wird jedoch eine Störung der DNA- und Proteinsynthese beschrieben [44].

Die akute Toxizität des DON liegt bei Mäusen bei einem LD₅₀ von 70 mg/kg KG [37].

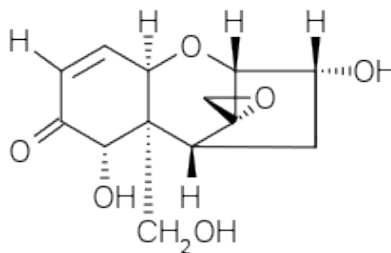


Abbildung 12: Struktur des Mykotoxins Desoxynivalenol; nach [44]

1.3.3.2 Zearalenon – ZON

Zearalenon (ZON; Abbildung 13) wird von einigen der Fusarien spp, wie z.B. *F. culmorum*, *F. graminearum* und *F. crookwellense* gebildet. Es tritt in Getreide, insbesondere im Mais auf, und übersteht durch seine hohe Stabilität auch verschiedene Verarbeitungsprozesse. Daher ist es auch in Maisbier und Weizenmehl nachweisbar. In der Brotproduktion werden durch Hitzeeinwirkung ca. 60%, und bei der Herstellung von Nudeln ungefähr 50% des in den Rohstoffen enthaltenen ZON zerstört. Auch in Nüssen, Silage, Gemüse und Früchten kann ZON enthalten sein [44].

Die akute Toxizität von Zearalenon ist gering. Die wichtigste Auswirkung liegt in der Störung des reproduktiven Systems. In Schweinen wird durch ZON-Aufnahme die Ausschüttung von Östrogen gesteigert. Es kommt zum Hyperöstrogenismus. Bei Schafen kann die Aufnahme von belastetem Gras zu Unfruchtbarkeit führen. Fütterungsversuche an weiblichen Schweinen haben gezeigt, dass eine Konzentration von 0,25 mg/kg Futter bereits Änderungen an den reproduktiven Organen auslöst [44].

Es gibt einige Hinweise auf eine kanzerogene Wirkung von Zearalenon im Tierversuch. Versuche zur Genotoxizität von ZON ergaben bisher widersprüchliche Ergebnisse [44].

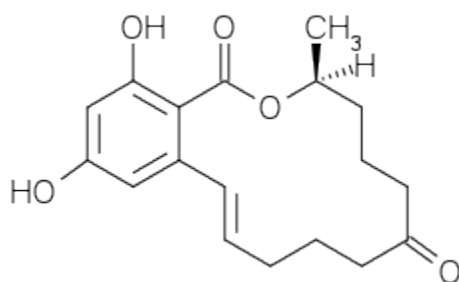


Abbildung 13: Struktur des Mykotoxins Zearalenon; nach [44]

1.4 Demethylierende Arzneimittel

Die Erkenntnisse über den Einfluss der DNA-Methylierung auf die Tumorentstehung und -entwicklung führten zu Überlegungen, Substanzen mit demethylierender Wirkung in der Krebstherapie einzusetzen. Ein neuer therapeutischer Ansatz unter dem Namen „Epigenetische Therapie“ (engl.: epigenetic therapy) wurde entwickelt, wobei Arzneistoffe eingesetzt werden, welche Chromatin- oder DNA-Methylierungsmuster beeinflussen können [45].

1.4.1 5-Aza-2'-Desoxycytidin - 5-aza-2dC

Bei 5-Azacytidin und seiner deoxidierten Form, dem 5-Aza-2'-Desoxycytidin (5-Aza-2dC; Abbildung 14), handelt es sich um Nukleosidanaloga, welche als Inhibitoren der DNA-Methylierung wirken. Nach ihrer Metabolisierung zu Desoxynukleosid-Triphosphaten werden sie in die DNA sich replizierender Zellen eingearbeitet. Durch Bildung von kovalenten Zwischenprodukten mit allen drei Klassen der DNMT wird die Methylierung in den darauffolgenden Zellzyklen unterbunden [45].

Die Verbindungen werden schon seit längerem in Zellkulturen zur Demethylierung stillgelegter Gensequenzen genutzt [45]. Mehrere Studien haben inzwischen die Auswirkungen der dadurch ausgelösten Re-Expression von Genen auf die Proliferation von Tumoren (in vivo als auch in vitro) beschrieben. Die klinische Anwendbarkeit ist allerdings durch die mutagenen Eigenschaften und die Toxizität der Verbindungen beschränkt [46]. In Amerika sind Präparate, welche 5-Azacytidin oder 5-Aza-2'-Desoxycytidin enthalten, unter den Namen Vidaza und

Decitabine für die Behandlung einiger Erkrankungen zugelassen worden. Ein Einsatzbereich liegt bei myeloid-dysplastischen Syndromen, welche vor allem bei älteren Menschen eine Vorstufe der Leukämie darstellen [45].

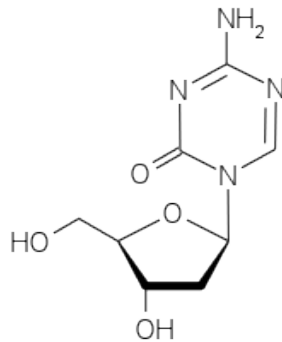


Abbildung 14: Struktur des 5-Aza-2'-Desoxycytidins; nach [47]

1.5 Zellkultur

In der vorliegenden Diplomarbeit wurden HT-29 Zellen zur Durchführung der Inkubationsversuche verwendet.

1.5.1 HT-29 Zelllinie

Bei der Zelllinie HT-29 handelt es sich um Zellen eines menschlichen Adenokarzinoms des Kolons. Etabliert wurde die Zelllinie im Jahr 1964 aus dem primären Tumor einer 44-jährigen kaukasischen Frau. Die Zellen werden als heterotransplantabel beschrieben und bilden gut differenzierte Tumore 1. Grades aus. Ihr Karyotyp ist hypertriploid mit 17,5% Polyploidie. Die Zellen sind adhären und wachsen sowohl als Monolagen als auch in großen Kolonien. Ihre Verdopplungszeit wird mit 40 bis 60 Stunden angegeben [48].

2 Zielsetzung

Krebserkrankungen zählen in den westlichen Ländern zu den häufigsten Todesursachen. Die frühe Diagnose der sich entwickelnden oder bestehenden Erkrankung ist ein wichtiger Faktor für den Erfolg der Therapie und wirkt sich positiv auf die Überlebensprognose aus.

Die Veränderung der Promotormethylierung von Genen geschieht bereits früh im Krankheitsverlauf und stellt somit einen möglichen Biomarker zur Erkennung von Krebserkrankungen dar. Durch die je nach Tumorart unterschiedlichen betroffenen Gene könnte in Zukunft auch die Auswahl der erfolgversprechendsten Behandlungsmethode erleichtert werden.

Die Einführung der Bisulfitkonvertierung der DNA ebnete den Weg für mehrere auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierende Analysenmethoden zur Bestimmung des Methylierungsstatus von Genpromotoren. Zu diesen Methoden zählt die methylierungs-sensitive hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (MS-HRM) unter Einsatz von methylierungs-unabhängigen Primern (MIP) für die PCR-Amplifikation.

Das Ziel dieser Diplomarbeit war es, auf der MS-HRM basierende Methoden zur Bestimmung des Methylierungsstatus der Promotorregion von Genen, welche in der Literatur mit Kolonkrebs in Zusammenhang gebracht wurden, zu entwickeln. Einer der wesentlichsten Schritte bei der Entwicklung von MS-HRM Methoden ist das Design der methylierungs-unabhängigen Primer. Da es in unserer Arbeitsgruppe noch keine Erfahrung auf dem Gebiet der MS-HRM gab, sollten in der Fachliteratur publizierte Richtlinien für das Primerdesign umgesetzt und auf ihre Anwendbarkeit überprüft werden. Bei der Entwicklung und Optimierung der Methoden lag ein großes Augenmerk auf der Vermeidung eines PCR-Bias, d.h. methylierte und unmethylierte DNA sollten mit annähernd gleicher Effizienz amplifiziert werden.

Die optimierten MS-HRM Methoden sollten angewendet werden, um den Methylierungsgrad der Promotorregionen der Gene in HT-29 Kolonkrebszellen zu bestimmen. Um einen Einfluss von Lebensmittelinhaltsstoffen und –kontaminanten auf die Methylierung feststellen zu können, sollten HT-29 Zellen mit verschiedenen Substanzen (heterozyklischen aromatischen Aminen, Lignanen und Mykotoxinen) inkubiert werden und die extrahierte DNA mit den entwickelten MS-HRM Methoden analysiert werden.

3 Theoretischer Hintergrund

3.1 Polymerase-Kettenreaktion - PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion, kurz PCR (engl.: polymerase chain reaction), ist ein Teil der methylierungs-sensitiven hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse. Sie dient zur Vermehrung der Promotorsequenz des zu untersuchenden Gens.

Die PCR ist eine in vitro Technik zur Amplifikation von spezifischen Nukleinsäure-Sequenzen. Eines der wichtigsten Elemente für die Reaktion sind die so genannten Primer. Dabei handelt es sich um Oligonukleotide mit einer Länge von 10-30 Basenpaaren, deren Basenabfolgen komplementär zu den beiden Enden des gewünschten DNA-Stückes sind. Für eine spezifische Amplifikation wird dabei immer ein Primerpaar, bestehend aus Forward-Primer und Reverse-Primer benötigt. Sie binden an je einen der beiden Stränge der Original-DNA, welche als Templat bezeichnet wird. Die DNA Synthese erfolgt dabei immer in 5' zu 3' Richtung des Templates [49].

Die Reaktion läuft in einem Gefäß ab, welches als PCR-Tube bezeichnet wird [49].

Folgende Reagenzien werden benötigt:

1. die Templat-DNA, von welcher ein Teil amplifiziert werden soll
2. die gewählten Primer im Überschuss
3. das Enzym DNA-Polymerase in hitzestabiler Form (Taq Polymerase)
4. die vier Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTP) dATP, dCTP, dGTP und dTTP im Überschuss
5. ein Puffergemisch welches zur Stabilisierung des pHs und als Lieferant für benötigte Ionen wie Mg^{2+} dient [49]

Es werden inzwischen von mehreren Firmen Reaktionsgemische der DNA-Polymerase, der dNTPs und des Puffergemisches angeboten. Zur Verwendung müssen diesem „Supermix“ nur noch die Templat-DNA und die Primer hinzugegeben werden.

Die Amplifikation geschieht dann in drei Schritten, welche über die Temperatur kontrolliert werden (Abbildung 15) [49].

Die erste Stufe ist die Denaturierung der Templat-DNA. Die Spaltung in ihre zwei Einzelstränge passiert dabei durch Temperaturerhöhung auf 94-95 °C, wodurch die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren des DNA-Doppelstrangs aufgebrochen werden. Die DNA-Polymerase ist bei diesen hohen Temperaturen inaktiviert [49].

Das Primer-Annealing stellt die zweite Stufe der PCR dar. Die Temperatur beträgt hier oft zwischen 50 und 60 °C [49]. Prinzipiell sind aber Annealing-Temperaturen zwischen 40 und 72 °C möglich, zu geringe Temperaturen können jedoch zu Problemen mit der Spezifität der Primer für das ausgewählte Gen führen [50]. In diesem Temperaturbereich können wieder Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden. Es erfolgt die Anlagerung der Primer an den komplementären Regionen der Original-DNA [49]. Durch den hohen Überschuss an Primern im Reaktionsgemisch und das rasche Abkühlen des Gefäßes wird die Reaktion mit den Primern gegenüber der Rehybridisierung der Original-DNA-Stränge bevorzugt [49, 50]. Die thermostabile DNA-Polymerase ist in diesem Schritt bereits wieder teilweise aktiv und beginnt gleich nach der Anbindung des Primerpaars mit der Ergänzung des weiteren Stranges [50].

Der dritte Schritt ist die Verlängerung der Primer durch die Polymerase, die Primer-Extension. Die DNA-Polymerase wirkt als Katalysator und baut Desoxynukleosid-Triphosphate, nach ihrer passenden Komplementarität zum Templat, an den gebundenen Primermolekülen an. So werden die Primer in 5' zu 3' Richtung verlängert, bis der Komplementärstrang des Abschnittes beendet ist. Versuche ergaben ein Temperaturoptimum von 72 °C für diesen Schritt [49].

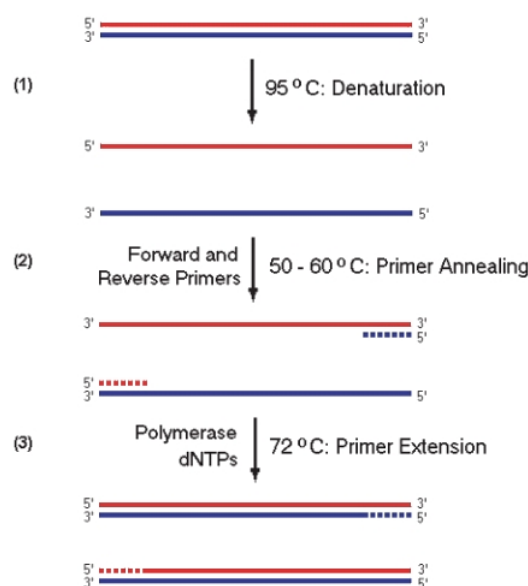


Abbildung 15: Schema der drei Schritte einer Polymerase-Kettenreaktion; aus [49]

Ein Amplifikationszyklus besteht aus der Abfolge dieser drei Schritte. Für eine PCR werden, je nach Anwendung, zwischen 25 und 40 Zyklen durchlaufen [50]. Im Denaturierungsschritt des ersten Zyklus sollte die Temperatur von 95 °C für ca. 2-5 min gehalten werden, um eine vollständige Trennung der DNA-Stränge zu gewährleisten [50].

Rein theoretisch würde die Anzahl an Kopien des DNA-Segmentes mit jedem Zyklus verdoppelt werden. In der Realität wirken sich aber einige limitierende Faktoren auf den Reaktionsverlauf aus [49]. Abbildung 16 zeigt den Anstieg der Konzentration an DNA im Bezug zur Anzahl der durchlaufenen Zyklen.

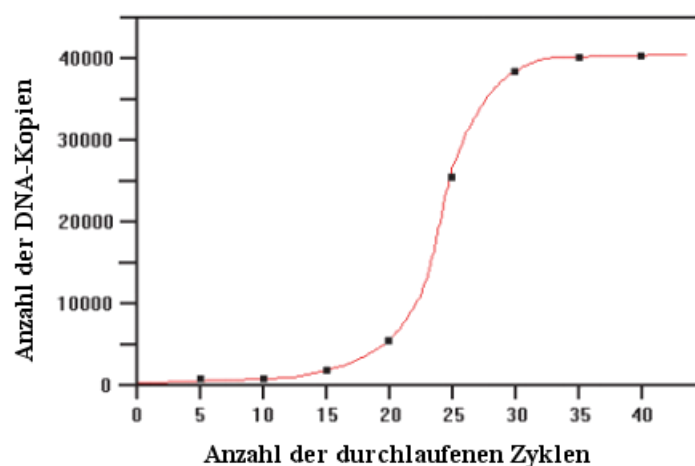


Abbildung 16: Anstieg an Kopien des gewünschten DNA-Segments mit der Anzahl der durchlaufenen Zyklen; modifiziert nach [49]

In dem Primer-Annealing und -Extensions Schritt des ersten Zyklus werden noch keine Moleküle mit der gewünschten Länge erzeugt. Die Primer binden an die Originalstränge und werden durch die DNA-Polymerase bis zum Ende des Originalstranges verlängert. Die ersten synthetisierten Stränge sind somit kürzer als der Originalstrang, jedoch noch immer länger als das gewünschte Amplikon. Im ersten Zyklus wird also noch kein Zielmolekül gebildet [49].

Im zweiten Zyklus wird auch das gebildete Produkt aus dem ersten Zyklus aufgespalten und als Templat genutzt. Die Primer binden an den entgegengesetzten Enden der gewünschten Sequenz an diese Stränge. Die Verlängerung in diesem Zyklus führt dann zu den ersten Amplikons mit der Länge der Zielregion. Gleichzeitig entstehen aber auch durch die erneute Amplifikation des Originalstranges weitere zu lange Produkte [49].

Im Zyklus Nummer drei werden dann erstmals zwei ganze Moleküle mit der gewünschten Länge synthetisiert (Abbildung 17). Dadurch kann ab dem vierten Zyklus die exponentielle Amplifikation der DNA erfolgen [49].

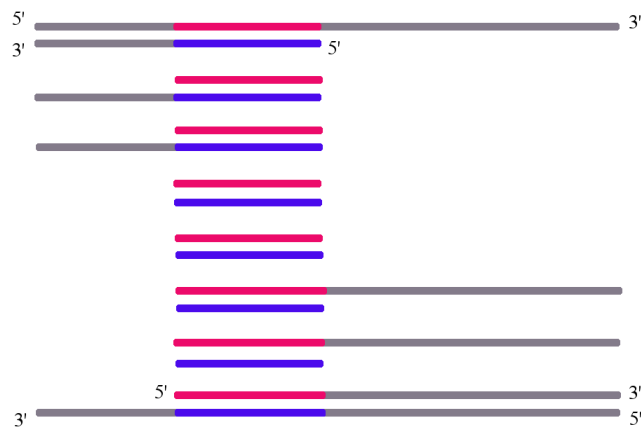


Abbildung 17: Länge der im 3. Zyklus gebildeten Amplikons; nach [49]

Der Anstieg der Anzahl an zu langen Sequenzen erfolgt dagegen nur linear. Am Ende der Reaktion ist der Gehalt an diesen Nebenprodukten gegenüber der Menge der gewünschten Amplikons vernachlässigbar klein [49].

Wie aus Abbildung 16 ersichtlich ist, wird nach einigen Zyklen eine Plateauphase im Konzentrationsanstieg erreicht. Es werden dann keine signifikanten Mengen an DNA mehr synthetisiert. Zu diesem Zeitpunkt verarmt die Reaktionsmischung an den benötigten Reagenzien, wie z.B. den Primern und den Desoxynukleosid-Triphosphaten. Die Aktivität der DNA-Polymerase lässt nach und Phosphate, welche während der Reaktion frei werden, beginnen die Amplifikation zu behindern. Auch sind die gebildeten kurzen DNA-Stränge in der Lage, im Abkühlschritt nach der Denaturierung schnell wieder zu hybridisieren, bevor die Anlagerung eines Primers erfolgen kann [49].

3.1.1 Real-Time PCR

Die Durchführung einer Real-Time PCR ermöglicht das Beobachten der Zunahme an DNA während der PCR. Üblicherweise wird dafür die Fluoreszenzintensität eines dem Reaktionsgemisch beigefügten Fluoreszenzfarbstoffes ausgewertet [49].

Eine oft genutzte Art an Farbstoffen in der Real-Time PCR sind an die DNA bindende Substanzen. Es handelt sich dabei um Moleküle, welche nach dem Anbinden an die doppelsträngige DNA zur Fluoreszenz angeregt werden können [49]. Ein Beispiel dafür wäre der Interkalationsfarbstoff SYBR Green, welcher zwischen die beiden Stränge des Amplikons eingelagert wird und nach Anregung bei 498 nm Licht mit einer Wellenlänge von 522 nm

emittiert. Der Farbstoff bindet nicht an einzelne Stränge und zeigt frei in Lösung nur eine geringe Fluoreszenz [50]. Abbildung 18 zeigt die Funktionsweise eines solchen interkalierenden Farbstoffes.

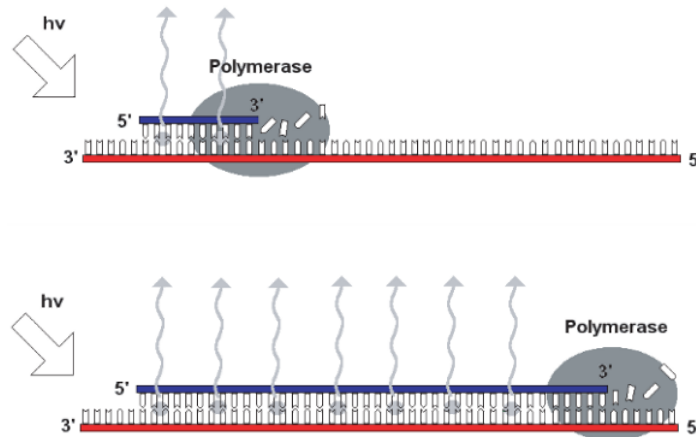


Abbildung 18: Fluoreszenzemission eines interkalierenden Farbstoffes nach der Einlagerung in den DNA-Doppelstrang; aus [49]

Eine weitere Möglichkeit besteht im Einsatz von Fluoreszenz-Energietransfer-Sonden (FRET, engl.: fluorescence energy transfer). Diese Sonden enthalten jeweils ein Fluoreszenzemitter-Molekül und einen Fluoreszenzlöcher (engl.: quencher). Sie müssen für jede gewünschte DNA-Sequenz spezifisch erstellt werden, und binden dann entweder zwischen den beiden Primern an das Amplikon, oder sind direkt Teil eines der beiden Primer. Die Sonde emittiert in ihrer ungebundenen Form keine Fluoreszenzstrahlung, da durch die räumliche Nähe zwischen Farbstoff und Quencher die Löschung der Fluoreszenz erfolgt. Im Zuge der Amplifikation werden je nach Sondenart Löschmolekül und Fluoreszenzfarbstoff voneinander abgespalten (z.B.: TaqMan-Sonden, s. Abbildung 19), oder durch räumliche Strukturänderung weiter voneinander entfernt (z.B.: Molecular Beacon, Scorpion Primer). Dadurch kann ein Fluoreszenzsignal ausgesendet und detektiert werden [50].

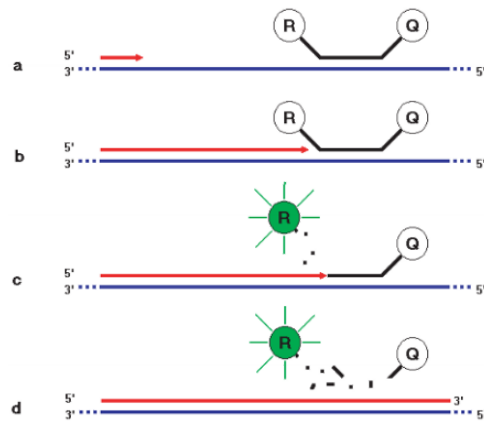


Abbildung 19: Funktionsweise einer TaqMan-Sonde; nach Abspaltung des Fluoreszenzfarbstoffes R von der Sonde wird das emittierte Photon nicht mehr durch den Quencher Q absorbiert und kann detektiert werden; aus [49]

In den ersten Amplifikationszyklen verändert sich das Fluoreszenzsignal nur wenig, da auch die DNA-Konzentration noch gering ist. Die gemessene Intensität stellt die Basislinie der Messung dar. Ab einem gewissen Gehalt an doppelsträngiger DNA beginnt sich das Fluoreszenzsignal von dieser Basislinie abzuheben. Es wird ein Grenzwert (engl.: threshold) über dem Hintergrundsignal festgelegt, ab welchem die Fluoreszenzstrahlung als Messwert angesehen wird. Dadurch ist es möglich, für jede Reaktion die Nummer des Zyklus zu ermitteln, in welchem das Signal über den festgelegten Grenzwert steigt. Dieser Zyklus wird als C_T (engl.: threshold cycle) bezeichnet [50].

Je größer die Menge an Templat im Tube zu Beginn der PCR ist, desto früher wird der C_T erreicht. Eine Anwendung der Real-Time PCR liegt in der Quantifizierung der Menge an Ausgangs-DNA-Material einer unbekannten Probe über die Auswertung des C_T in Bezug auf die C_T -Werte einer Standardreihe (Abbildung 20) [50].

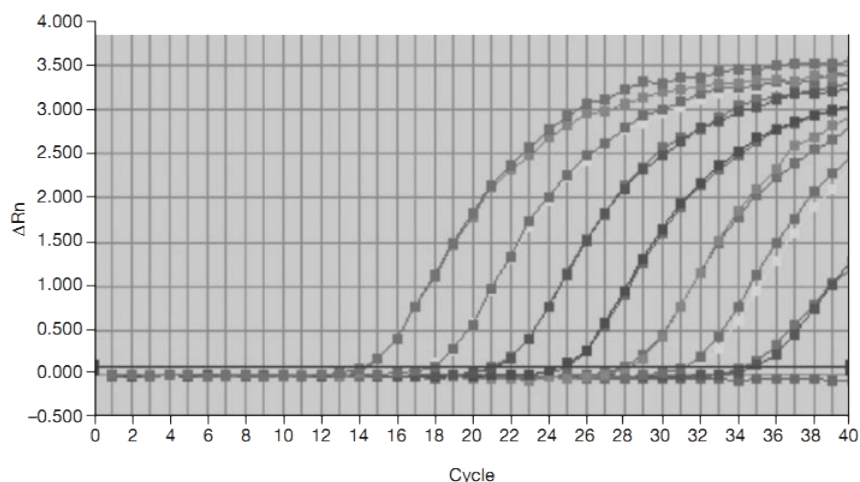


Abbildung 20: PCR einer Verdünnungsreihe von DNA-Standards; die schwarze Linie kennzeichnet den gewählten Grenzwert (threshold); aus [51]

3.1.2 PCR-Amplifikation von methylierten DNA-Sequenzen

Während der PCR entfernt die DNA-Polymerase das Methylierungsmuster der genomischen DNA und kann es auch bei der Amplifikation nicht wieder herstellen. Für die Analyse des Methylierungsmusters einer DNA-Sequenz mittels auf der PCR basierenden Techniken ist es daher notwendig, das DNA-Templat chemisch zu modifizieren, um die Information über den Methylierungsstatus zu erhalten. Dies ist durch die Bisulfitkonvertierung genomischer DNA möglich [52].

3.1.2.1 Bisulfitkonvertierung

Bei der Bisulfitkonvertierung wird die selektive Reaktion des Natriumbisulfits (auch Natriumhydrogensulfit, NaHSO_3) mit unmethylierten Cytosinen genutzt, wobei aus Cytosin durch Desaminierung Uracil gebildet wird. Im Laufe der PCR wird das gebildete Uracil als Thymin behandelt und daher auch so repliziert. 5-Methylcytosin ist von der Konvertierung nicht betroffen und geht daher weiter als Cytosin in die Reaktion ein (Abbildung 21) [53]. Da Cytosin außerhalb der CpG-Dinukleotide meist unmethyliert vorliegt, werden diese Cytosine mit großer Wahrscheinlichkeit konvertiert, und können als Indikatoren für die erfolgreiche Bisulfitmodifizierung herangezogen werden [54].



Abbildung 21: Bisulfitkonvertierung methylierter und unmethylierter DNA und ihre Auswirkungen auf die Basenabfolge der PCR-Produkte; nach [55]

Die Desaminierung kann in drei Schritte unterteilt werden:

1. Sulfonierung – Anbinden des Bisulfits an die 5-6 Doppelbindung des Cytosin
2. hydrolytische Desaminierung – Umwandlung des Cytosin in Uracil durch Abspaltung der Aminogruppe
3. alkalische Desulfonierung – Entfernung des Sulfitions [56]

Abbildung 22 zeigt die Reaktionsgleichung der Umwandlung.

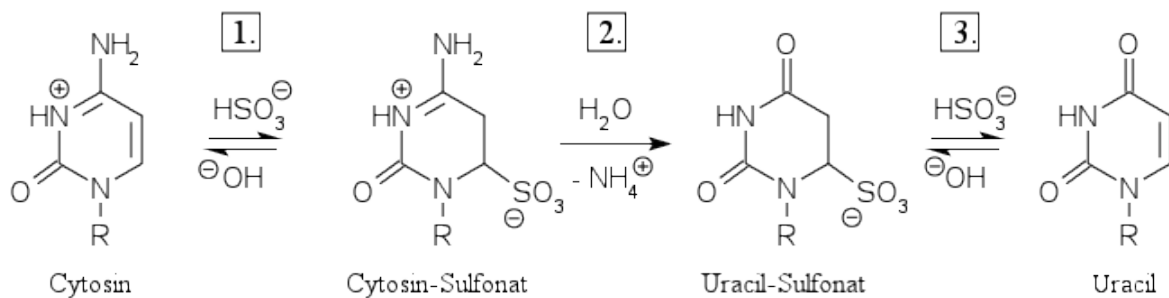


Abbildung 22: Reaktionsgleichung der drei Stufen der Bisulfitkonvertierung; 1. Sulfonierung, 2. Desaminierung, 3. Desulfonierung; nach [57]

Die Reaktion ist sehr selektiv für Einzelstränge, weshalb die vollständige Denaturierung der DNA gewährleistet sein muss [56]. Vor Beginn der Reaktion wird daher nach Zugabe von 3M NaOH eine Erwärmung auf 90-95 °C für mehrere Minuten durchgeführt [54, 56]. Um eine Renaturierung der Probe während der Inkubation im ersten Schritt zu verhindern, werden im Laufe der Inkubation bei einigen Protokollen erneute Denaturierungsschritte von einigen Minuten bei 95 °C eingefügt [54].

Große Auswirkungen auf die Ausbeute hat die Dauer der Inkubation mit Bisulfit (1. Stufe), welche bei 60-95 °C durchgeführt wird [54, 56]. Je nach Menge der eingesetzten DNA kann sie bis zu 16 Stunden betragen [56].

Das Ausmaß der Sulfonierung hängt außerdem vom pH-Wert und der Konzentration des Natriumbisulfits ab. Schritt 1, die Sulfonierung, wird bei niedrigem pH bevorzugt. Die Rückreaktion im 3. Schritt erfolgt dagegen bei höherem pH. Die Desaminierung der 2. Stufe wird von Sulfid-, Bisulfit- und Acetationen katalysiert und erfolgt wie die Desulfonierung bei einem pH=5 [56].

Ein weiterer Faktor für die möglichst effektive Konvertierung ist die frische Zubereitung der Natriumbisulfitlösung vor jeder Konvertierung. Weiters sollte durch den Zusatz von Hydrochinon als Radikalfänger die Oxidation des Bisulfits verhindert werden [56].

Je nach Verfahren und Qualität der eingesetzten DNA kann eine Umsatzrate von 95-98% erzielt werden [56].

Das Hauptproblem bei Analysen des Methylierungsgrades von Genen liegt in Abbauprozessen der DNA während der Bisulfitkonvertierung. Je geringer die DNA-Menge, desto stärker erfolgt die Degenerierung. Daher sollten immer große Probenmengen (z.B.: 1 µg) eingesetzt werden, um den Grad des Verlustes zu minimieren und mehr Templat für die Durchführung einer PCR

zur Verfügung zu haben. In Studien an Krebspatienten ist jedoch die Menge an leicht zugänglicher Patienten-DNA der limitierende Faktor. Der Einsatz von Carrier-DNA erlaubt höhere Rückgewinnungsraten bei geringen Mengen an genomischer DNA. Auch die Gestaltung des Reinigungsschrittes der DNA nach der Konvertierung hat Einfluss auf die Ausbeute der Reaktion. Die Nutzung von chromatographischen Reinigungssäulen ist hier gegenüber Ausfällungsprotokollen überlegen [53].

In der Literatur sind verschiedene Protokolle zur Durchführung der Modifizierung mit leicht variierenden Parametern beschrieben. Inzwischen sind auch Kits, welche die benötigten Chemikalien und oft auch chromatographische Säulen zur Aufreinigung und Rückgewinnung der DNA enthalten, kommerziell erhältlich.

3.1.2.2 PCR-Analyse bisulfitkonvertierter Proben

Proben genomischer DNA können sowohl DNA-Stränge mit methylierten Promotoren als auch Moleküle ohne Methylierung enthalten. Nach der Bisulfitmodifizierung liegen in der Probe DNA-Moleküle mit unterschiedlicher Basenabfolge im selben Gen vor (s. Abbildung 21). Im unmethylierten Anteil der Probe wurden die Cytosine zu Uracil umgewandelt, während in methylierten Sequenzen weiterhin 5-mC aufzufinden ist. Das gebildete Uracil des unmethylierten Promotors wird in der PCR als Thymin weitergegeben [53].

Die unterschiedlichen Basenabfolgen der methylierten und unmethylierten Template wirken sich auf den Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion aus. Es können Abweichungen in der Amplifikations-Effizienz der Stränge auftreten. Dies muss bei Anwendungen der PCR zur Bestimmung des Anteils an methylierter DNA in der Probe berücksichtigt werden [54].

Eine Schwierigkeit, die sich beim Primerdesign für bisulfitkonvertierte DNA ergibt, entsteht aus der Tatsache, dass ursprünglich unmethylierte Gene nach der Modifizierung nur mehr aus den drei Basen Thymin, Guanin und Adenin bestehen. Dadurch werden die Möglichkeiten zur Auswahl von Primern mit spezifischer Basenabfolge stark eingeschränkt [54].

In den letzten Jahren wurden verschiedene Ansätze zur Amplifizierung von bisulfitkonvertierten Proben mittels PCR vorgestellt.

In der methylierungs-spezifischen PCR (MSP; engl.: methylation specific PCR) werden separate Primer für die methylierte und die unmethylierte Form eines Gens eingesetzt. Da die

Unterscheidung der Stränge über ihren Cytosin- bzw. Thymingehalt erfolgt, sollte die Bindungsstelle der Primer die interessierenden CpG-Dinukleotide beinhalten. Mit jedem der Primerpaare wird ein PCR-Lauf durchgeführt um eine spezifische Amplifikation zu erhalten. Die Visualisierung der Resultate erfolgt dann mittels Agarose-Gelelektrophorese [54]. Mit der MSP wird eine prinzipielle Information über das Vorhandensein von methylierter DNA in der Probe erhalten [56]. Um falsch positive oder negative Ergebnisse aufgrund unvollständiger Bisulfitkonvertierung auszuschließen, sollten in jedem Versuch Standardmessungen an vollständig methylierter und komplett unmethylierter DNA durchgeführt werden [54].

Durch den Einsatz der nicht-selektiven PCR (NSP; engl.: nonselective PCR) können auch quantitative Informationen gewonnen werden [56]. Dieses Verfahren wird auch als PCR mit methylierungs-unabhängigen Primern (MI-Primer; engl.: methylation independent primer) bezeichnet [53]. Die Primer werden mit hoher Spezifität zu bisulfitkonvertierter DNA ausgewählt, um die Amplifikation unkonvertierter DNA zu minimieren [54]. MI-Primer werden meist so entworfen, dass keine CpGs in der Bindungsregion vorhanden sind. Ist es nicht möglich, für ein Gen Primer ohne CpGs zu finden, so werden die CpGs deaktiviert, um zu große Selektivität zu den methylierten Sequenzen zu verhindern. Dazu wird im Primer das zu dem CpG gehörende Cytosin durch Thymin ersetzt, wodurch die Basenabfolge des Primers nicht mehr genau der Abfolge in methylierten Sequenzen entspricht [53, 56]. Beide Formen des Gens (methyliert und unmethyliert) sollten dann in einem PCR-Lauf mit gleicher Effizienz amplifiziert werden [56]. Wojdacz et al. fanden aber ein starkes Ungleichgewicht in Richtung der Vervielfachung der unmethylierten Sequenz. Daher schlägt er die Miteinbeziehung einer begrenzten Anzahl an CpGs in die Primer vor, um eine Möglichkeit zur Beeinflussung der Affinität zu schaffen [53]. Sowohl in der MIP-PCR als auch in der MSP-PCR wird bei der Durchführung einer Real-Time Messung mit interkalierenden Farbstoffen gearbeitet [53, 58].

Das MethyLight-Verfahren basiert dagegen auf der Nutzung von TaqMan-Sonden. Dabei wird ein Primerpaar mit mehreren unterschiedlichen Sonden für die Analyse genutzt. Die TaqMan-Sonden werden innerhalb des Amplikons an den DNA-Strang gebunden, und durch die DNA-Polymerase gespalten, wodurch die Aussendung von Fluoreszenzstrahlung ermöglicht wird (s. Abschnitt 3.1.1) [54]. Die Bindungsstelle der Sonden umfasst bei diesem Verfahren die zu untersuchenden CpG-Dinukleotide, wobei der Methylierungsstatus vor der Bisulfitmodifizierung die nun vorliegende Basenabfolge bestimmt. Die Sonden binden an ihre genau komplementären Sequenzen und erzeugen so nur bei Vorhandensein der richtigen Basenabfolge ein Signal [58]. Es ist mit dieser Methode möglich, an einer Sequenz mit zwei CpGs die Einzelmethylierung des

ersten oder des zweiten CpG, oder die Methylierung beider oder keines der Dinukleotide nachzuweisen. Die Analyse einzelner CpG-Methylierungen ist ansonsten nur mit der aufwendigeren Bisulfitsequenzierung möglich [54].

Viele Methoden der Analyse bisulfitkonvertierter DNA wie COBRA (engl.: combined bisulfite restriction analysis), Ms-SNuPE (engl.: methylation-sensitive single nucleotide primer extension), die Bisulfitsequenzierung und auch die hochauflösende Schmelzkurvenanalyse, nutzen die PCR zur Amplifikation der für die weitere Messung benötigten DNA-Sequenzen [54]. Inzwischen ist es möglich, DNA-Methylierungsanalysen basierend auf der Bisulfitkonvertierung an einem großen Spektrum von DNA aus verschiedenen Quellen vorzunehmen [54].

3.1.2.3 PCR mit methylierungs-unabhängigen Primern - MIP-PCR

Für die MIP-PCR ist es erforderlich, dass die Replikation der Gensequenz für die hochauflösende Schmelzkurvenanalyse unabhängig vom Methylierungsstatus der DNA-Probe abläuft [53].

Die bekanntesten Regeln für das Primer-Design der MIP-PCR empfehlen die Vermeidung von CpG-Dinukleotiden in den Primersequenzen. Können keine Primerpaare gefunden werden, die dieser Anforderung genügen, sollte eine Fehlpaarung des Cytosins im CpG des DNA-Stranges mit einem Thymin eingefügt werden, um eine bevorzugte Bindung an methylierte Stränge zu verhindern [52].

Versuche mit Primern dieser Art zeigen jedoch ein Ungleichgewicht in der Amplifikations-Effizienz in Richtung des unmethylierten Stranges. Die bevorzugte Vervielfachung dieses Templates gegenüber dem methylierten wird als PCR-Bias bezeichnet. Die verstärkte Replikation der unmethylierten Gensequenzen kann in allen auf die PCR folgenden Analysenmethoden zu verfälschten Ergebnissen führen und dadurch die Sensitivität und Spezifität der Methoden beeinflussen [59].

Verschiedene Ansätze zur Vermeidung des Bias wurden entwickelt und getestet. Die Erhöhung der Annealing-Temperatur (T_a) im PCR-Lauf und der Zusatz verschiedener Additiva zum Reaktionsgemisch haben in einigen Fällen die Amplifikation der methylierten Sequenzen verbessert. Die Daten in der Literatur sind aber leider widersprüchlich [59].

Die von Wojdacz et al. gewählte Strategie zum Ausgleich des Bias konzentriert sich hauptsächlich auf das Primerdesign und die Optimierung der Reaktionsbedingungen für das gewählte Primerpaar [60]. Dieser Ansatz wurde auch für die vorliegende Arbeit ausgewählt.

Die aufgestellten Richtlinien für das Primerdesign laut Wojdacz et al. lauten:

1. Die Primer sollten ein oder zwei CpG-Dinukleotide enthalten. Versuche haben gezeigt, dass die Einbeziehung von bis zu drei CpGs in die Primer Sequenz möglich ist, ohne zu einer ausschließlichen Amplifizierung des methylierten Templates zu führen [52].
2. Die CpGs sollten sich dabei so nah wie möglich am 5'-Ende des Primers befinden. Je weiter ein CpG in 3'-Richtung des Primers rückt, desto stärker wird die Affinität zu methylierten Templaten, wodurch es zur ausschließlichen Anlagerung an diese Gene kommen kann [52, 60]
3. Die Schmelztemperaturen (T_m) der beiden Primer sollten in etwa 65 °C betragen. Die Annealing-Temperatur (T_a) der PCR kann dann bei ungefähr 60 °C gewählt werden, wodurch die prinzipielle Spezifität der PCR für das ausgewählte Gen gewährleistet wird. Außerdem sollten die T_m des Forward- und Reverse-Primers nahe beieinander liegen. Optimal wäre ein Unterschied von ≤ 1 °C [52, 60].
4. Das 3'-Ende des Primers sollte ein oder mehrere Thyminen enthalten, welche von Cytosinen im Originalstrang vor der Bisulfitkonvertierung abstammen, die keinen Anteil an einer CpG-Gruppe haben. Diese Cytosine werden bei der Modifizierung immer in Uracil umgewandelt. Da diese als Thymin in die PCR eingehen, werden so Primer erhalten, die nur an bisulfitkonvertierte DNA binden. Unmodifizierte DNA, welche die Ergebnisse verfälschen könnte, wird dadurch von der Reaktion ausgenommen [52, 60].
5. Die Primer sollten den Standard-Kriterien des Primer Designs für die PCR genügen. Dazu zählen eine Länge von 16-30 Basenpaaren, ein GC-Basengehalt zwischen 35 und 60% und die Vermeidung von langen Abfolgen der selben Base [50, 61]. Weiters sollten die Primer keine Sekundärstrukturen ausbilden und untereinander auch keine 3'-Komplementarität aufweisen. Ansonsten besteht die Gefahr der Primer-Dimer-Bildung während der PCR [52].
6. Das durch die Primer begrenzte Amplikon sollte eine Länge von ca. 100 Basenpaaren besitzen. Dadurch wird die Komplexität des bei der hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse erhaltenen Schmelzprofils reduziert [52].

Die Affinität der Primer zu den Templaten kann bei der oben beschriebenen Art des Designs über die Annealing-Temperatur (T_a) eingestellt werden [53]. Bei niedrigeren Temperaturen werden die unmethylierten Stränge bevorzugt, was dem bereits erwähnten PCR-Bias entspricht. Mit steigender T_a binden die Primer verstärkt an die methylierten Sequenzen, wodurch bei genügend hoher Temperatur die Umkehr des Bias erzielt werden kann [60]. Ist das bevorzugte Templat in der Probe nicht enthalten, werden die vorhandenen Stränge auch bei der nicht optimalen Annealing-Temperatur repliziert [53]. Die Einstellung einer mittleren Temperatur führt zu einer Reaktion ohne Bias. Je nach Anwendung kann die Annealing-Temperatur für die gewünschte Selektivität optimiert werden [60]. So ermöglicht die Umkehr des Bias die Detektion von 1-0,1% an methylierter DNA in der Probe [52].

Ein wichtiges Reagenz in jeder PCR-Reaktion ist Magnesiumchlorid ($MgCl_2$). Das Mg^{2+} -Ion bildet einen Komplex mit der Polymerase und der DNA aus, wodurch sich der räumliche Abstand zwischen Templat und Enzym verringert. Die Aktivität des Enzyms wird vom Magnesiumkation angeregt und auch die negativen Ladungen an der DNA werden ausgeglichen. Aus diesen Gründen hat die Konzentration an $MgCl_2$ Auswirkungen auf die Spezifität und die Ausbeute der PCR. Eine zu geringe Konzentration an Mg^{2+} führt zur Abnahme der Aktivität der DNA-Polymerase. Ein Überschuss an Magnesiumionen behindert wiederum die Denaturierung der DNA und erleichtert die Bindung der Primer an falsche Sequenzen [49]. Die kommerziell für die PCR erhältlichen Supermix-Lösungen, bestehend aus DNA-Polymerase, dNTPs, Puffer und (bei Gemischen für die Real-time PCR) Fluoreszenzfarbstoffen, enthalten $MgCl_2$ in Konzentrationen, welche auf die Amplifikation von genomischer DNA abgestimmt sind. Die Replikation von bisulfitkonvertierter DNA ist jedoch weniger stabil als die PCR unmodifizierter Stränge. Grund dafür sind wahrscheinlich DNA-Abbauprozesse während der Bisulfitreaktion. Um die PCR-Effizienz zu verbessern, muss die Menge an Mg^{2+} im Reaktionsgemisch erhöht werden. Die experimentell optimierte Konzentration liegt meist in einem Bereich von 2,5-3,5 mM an $MgCl_2$. Sie muss aber für jeden Versuchsaufbau einzeln optimiert werden, da sie von dem für die Bisulfitkonvertierung angewendeten Protokoll, den verwendeten PCR-Reagenzien und der Menge an eingesetzter DNA abhängig ist [53]. Die Auswirkung des Magnesiums auf die spezifische Anbindung der Primer macht außerdem eine Optimierung für jedes neue Primerpaar notwendig [52].

3.2 Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse - HRM

Die durch die MIP-PCR von bisulfitkonvertierter DNA erhaltenen Amplikons weisen, je nachdem ob sie aus methylierten oder unmethylierten Sequenzen hervorgegangen sind, deutliche Abweichungen in ihrer Basenabfolge auf. Die Basenkombination wirkt sich auf die thermalen Eigenschaften der Produkte aus, und führt zu Unterschieden in ihrem Schmelzverhalten [53].

Dieser Effekt wird in der hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse HRM (engl.: high-resolution melting) zur Identifizierung und Quantifizierung der Anteile von methylierten und unmethylierten Probenanteilen herangezogen [53]. Die Methode wird auch als methylierungs-sensitive HRM (MS-HRM; engl.: methylation-sensitive HRM) bezeichnet [52].

3.2.1 Schmelzverhalten von DNA-Sequenzen

Unter dem Schmelzen von DNA versteht man die Dissoziation der Doppelstränge durch Aufbruch der Wasserstoffbrückenbindungen und die Auflösung der Stapelwechselwirkungen zwischen den Basen. Die doppelsträngige DNA-Struktur wird dabei entweder durch Temperaturerhöhung oder durch den Einsatz von denaturierenden Chemikalien aufgelöst. Dieser Vorgang ist gleichzusetzen mit der Denaturierung, wie sie auch in den Zyklen der PCR durchgeführt wird [53].

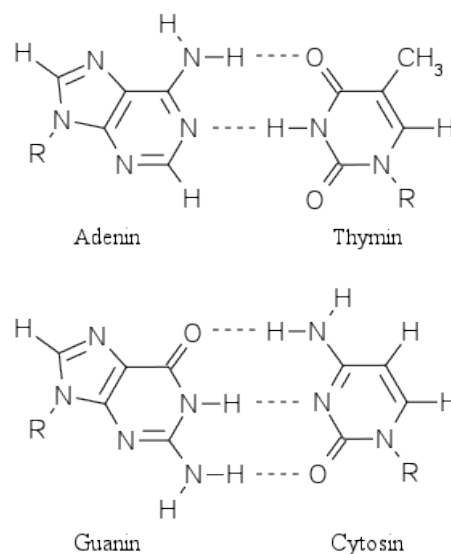


Abbildung 23: Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren der DNA; nach [6]

Die benötigte Dissoziationsenergie ist dabei von der Basenfolge der Stränge abhängig. Die Lösung der dreifachen Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Basenpaar Guanin (G) und Cytosin (C) benötigt mehr Energie als die Aufspaltung der doppelten Bindung zwischen Adenin (A) und Thymin (T) (Abbildung 23). Aus diesem Grund liegt die Schmelztemperatur (T_m) von GC-reichen Sequenzen höher als die der AT-reichen DNA-Abschnitte [53].

Das Aufschmelzen eines durch die PCR erhaltenen Amplikons setzt sich oft aus einer Serie schrittweiser Dissoziationsvorgänge zusammen. Kürzere Domänen des Gesamtstranges schmelzen aufgrund ihres GC-Gehaltes bei unterschiedlichen Temperaturen auf. Die Gesamtheit dieses sequenzabhängigen Schmelzverhaltens bei Anlegen eines Temperaturgradienten wird als Schmelzprofil (engl.: melting profile) bezeichnet [53].

Je länger eine Sequenz ist, desto komplizierter kann das Schmelzprofil durch die stufenweise Dissoziation werden. Ideal ist ein Abschnitt mit nur einer Haupt-Schmelzdomäne. Das erhaltene Profil ist dann leichter zu interpretieren. Dies ist bei Amplikons mit einer Länge von rund 100 Basenpaaren oft der Fall. Aus diesem Grund werden bei der Primersuche Primerpaare, die zu solchen Produkten führen, bevorzugt [53].

Da dennoch kompliziertere Schmelzprofile auftreten können, wird empfohlen, während der Primersuche ein Programm zur Vorausberechnung des Schmelzverhaltens zu nutzen. So erhält man zumindest eine ungefähre Abschätzung der thermischen Eigenschaften des Amplikons [53]. Es gibt dazu bereits mehrere frei zugängliche Tools im Internet, wie z.B. das POLAND Programm des Instituts für Physikalische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf [53, 62]. Profile mit mehreren Schmelzstufen erschweren die Interpretation der HRM Ergebnisse und können die spezifischen Änderungen des Schmelzverhaltens durch Methylierung überlagern [53].

Der Unterschied der Schmelztemperaturen zwischen methylierten und unmethylierten Sequenzen entsteht durch ihre unterschiedlichen Cytosin-Gehalte nach der Bisulfitkonvertierung. Die Größe der Differenz hängt dadurch von der Anzahl und Dichte an CpG-Dinukleotiden im gewählten DNA-Bereich ab. Es ist wichtig, das Amplikon so zu wählen, dass der Temperaturunterschied groß genug ausfällt, um die Sequenzen im erhaltenen Schmelzprofil eindeutig unterscheiden zu können. Auch hier können die oben erwähnten Berechnungsprogramme des Schmelzverhaltens zur groben Abschätzung dienen [53].

3.2.2 Detektion des Schmelzprofils

Werden die Produkte einer Real-Time PCR in Gegenwart eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes einer gleichmäßigen Temperaturerhöhung ausgesetzt, erhält man das Schmelzprofil der Amplikons [53].

Der Farbstoff ist nur dann in der Lage, Fluoreszenz auszusenden, wenn er in doppelsträngige DNA eingelagert ist. Bei niedrigen Temperaturen (unter dem Beginn der Dissoziation der Stränge) wird ein hohes Maß an Fluoreszenz ausgesendet. Das Fluoreszenzsignal bleibt während des Temperaturanstieges bis zu dem Punkt stabil, an dem die ersten Bereiche des Amplikons aufzuschmelzen beginnen. In diesen Abschnitten wird der eingelagerte Farbstoff freigesetzt und kann nicht mehr zur Fluoreszenz angeregt werden. Die detektierte Intensität nimmt ab, bis die gesamte Probe aufgeschmolzen ist [53].

SYBR Green I war der erste für diese Anwendung genutzte interkalierende Farbstoff. Allerdings konnte er nicht in den hohen Konzentrationen eingesetzt werden, welche zur Sättigung des PCR-Produkts mit Farbstoff notwendig gewesen wären, da er in diesen Mengen eine hemmende Wirkung auf die DNA-Polymerasen ausübt. Die PCR-Amplifikationen erwiesen sich unter diesen Bedingungen als nicht robust und führten zu geringen Ausbeuten [53].

Die Einführung von sättigenden Farbstoffen (engl.: saturating dyes) brachte die Lösung dieses Problems. Sie führen zur vollständigen Sättigung des PCR-Produkts bei Konzentrationen, welche die PCR nicht hemmen und sind mit den meisten kommerziell erhältlichen Polymerasen kompatibel. Ihr Einsatz ist sowohl für die Durchführung einer Real-Time Überwachung während der PCR-Amplifikation als auch für die HRM möglich. Beispiele für Farbstoffe dieser Klasse wären die LC Green Fluoreszenzfarbstoffe und der Farbstoff Eva Green. Auch hier sind inzwischen fertige Supermix-Lösungen im Handel erhältlich [53].

Idealerweise wird die Kombination von PCR und HRM auf einem Thermocycler, gekoppelt mit einem Fluoreszenz-Detektor, durchgeführt. Durch den Einsatz der Real-Time PCR entfällt hier die Notwendigkeit der Durchführung einer Gelelektrophorese zur Kontrolle der gelungenen Amplifikation. An sich könnte die Amplifikation für die HRM aber auf jedem beliebigen Thermocycler durchgeführt werden [53].

Die präzise Erfassung der Fluoreszenzänderung und ein möglichst geringer, schrittweiser Temperaturanstieg sind die Grundlagen der HRM Analyse. Temperaturgradienten von bis zu 0,05 °C/s in Kombination mit kontinuierlicher Fluoreszenzmessung ermöglichen die Aufnahme detaillierter Schmelzkurven [53].

3.2.3 Analyse von DNA-Schmelzprofilen

Durch Vergleich des Schmelzprofils einer Probe mit den Schmelzkurven von Standards mit bekanntem Methylierungsgrad kann eine Aussage über den Methylierungsstatus der Probe getroffen werden. Zur Erstellung der Standardreihe wird vollständig methylierte DNA in unterschiedlichen Verhältnissen mit vollständig unmethylierter DNA verdünnt [53].

Das Mischungsverhältnis wird meist in Prozent methylierter DNA beschrieben. So steht die Bezeichnung Standard 100 für einen Standard, in dem zu 100% methylierte DNA enthalten ist. Im Standard 50 werden die selben Anteile an methylierter und unmethylierter DNA vermischt. Der Standard 10 enthält dagegen nur 10% methylierte und 90% unmethylierte Sequenzen.

Nach der Vervielfachung der DNA durch die PCR können selbst in Mehrfachbestimmungen der selben Probe Unterschiede in der erhaltenen Amplikonmenge auftreten. Als Folge davon werden voneinander abweichende Fluoreszenzsignal-Intensitäten erhalten. In der HRM Analyse verhindern diese Unterschiede den direkten Vergleiche der Kurven. Daher muss eine Normalisierung der Start- und Endniveaus der Fluoreszenzkurven erfolgen, um eine Auswertung zu ermöglichen [53]. Abbildung 24 zeigt die normalisierten Schmelzkurven der Doppelbestimmungen mehrerer Standards mit unterschiedlicher Konzentration an methylierter DNA.

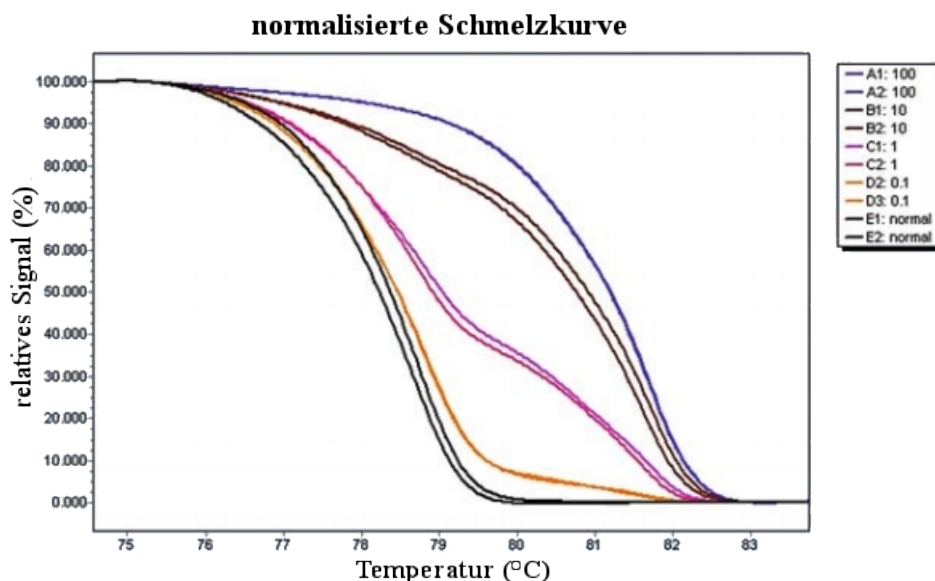


Abbildung 24: Schmelzprofile einer Standardreihe von Mischungen methylierter und unmethylierter DNA; jede Mischung wurde in Doppelbestimmungen analysiert; die Angaben in der Legende beziehen sich immer auf den Prozentanteil der methylierten DNA im Gesamtgemisch; modifiziert nach [53]

Durch den Auftrag der negativen Ableitung der Fluoreszenz gegen die Temperatur ($-dF/dT$) erhält man die Schmelzpeaks der Kurven. Die Peakspitze repräsentiert die stärkste Fluoreszenzabnahme während des Schmelzvorganges und kann als die Schmelztemperatur der Gensequenz angegeben werden. Im Fall des Vorhandenseins von methylierten DNA-Anteilen ergeben sich zwei Peaks bei unterschiedlichen Temperaturen. Dabei entspricht der Peak der tieferen Temperatur der T_m des unmethylierten Anteils, während der Peak der höheren Schmelztemperatur für die methylierte Sequenz steht (Abbildung 25) [53].

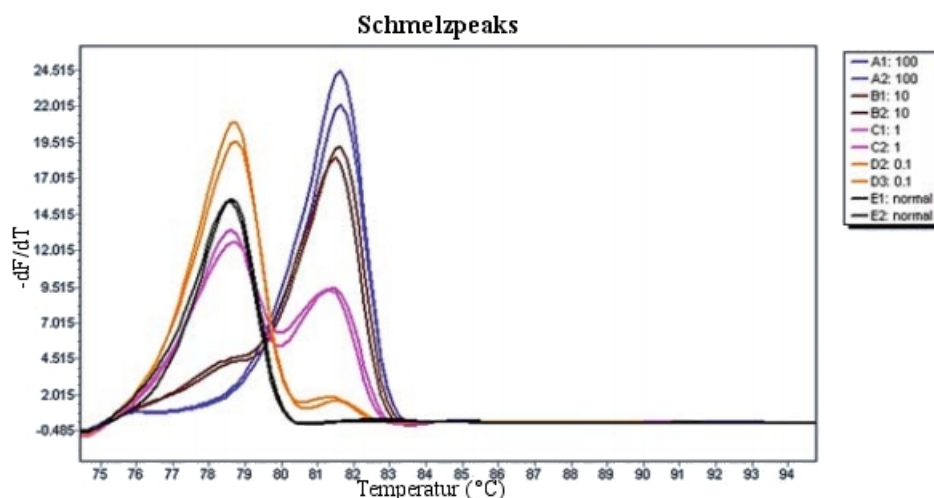


Abbildung 25: Auftragung von $(-dF/dT)$ der Standardreihe von Gemischen methylierter und unmethylierter DNA; modifiziert nach [53]

Für eine 50 zu 50 Mischung von methylierter und unmethylierter DNA kann hier das Vorhandensein eines Bias bei der Amplifikation erkannt werden. Besitzen die beiden Peaks dieser Kurve die selbe Höhe, liegt auch die selbe Menge an Amplicon der beiden Stränge vor. Die Amplifikation erfolgte dann ohne Bevorzugung eines der beiden Template [52].

Der Vergleich der Peaks einer unbekannten Probe mit den Ergebnissen der Standardmessungen ergibt ihren Methylierungsgrad. Diese Ansicht der Ergebnisse kann für einfache Analysen des Methylierungsstatus herangezogen werden [53].

Zur Erstellung einer Kalibriergerade werden aus den normalisierten Schmelzprofilen Differenzialkurven erstellt. Die Fluoreszenzsignale der verschiedenen Verdünnungen werden dafür in Bezug zur Schmelzkurve der komplett unmethylierten Standard-DNA (0%) gesetzt. Sie erscheinen als Peaks unterschiedlicher Höhe, wobei die Grundlinie durch den 0%-Standard gebildet wird [63]. Eine solche Differenzialdarstellung wird in Abbildung 26 gezeigt.

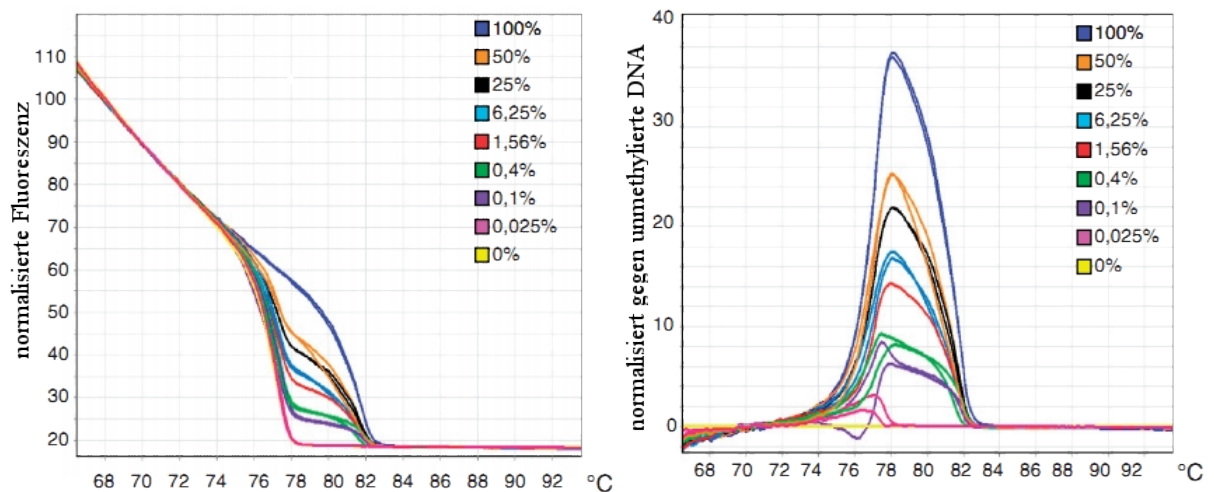


Abbildung 26: HRM Messungen verschiedener Standardmischungen; aus den normalisierten Schmelzkurven (links) wird eine Differentialdarstellung durch Normalisierung gegen die Schmelzkurve des unmethylierten Standards erhalten (rechts); modifiziert nach [63]

Die Peakmaxima werden als relative Peakhöhe ausgelesen und zur Erstellung einer Kalibriergerade genutzt (Abbildung 27) [63].

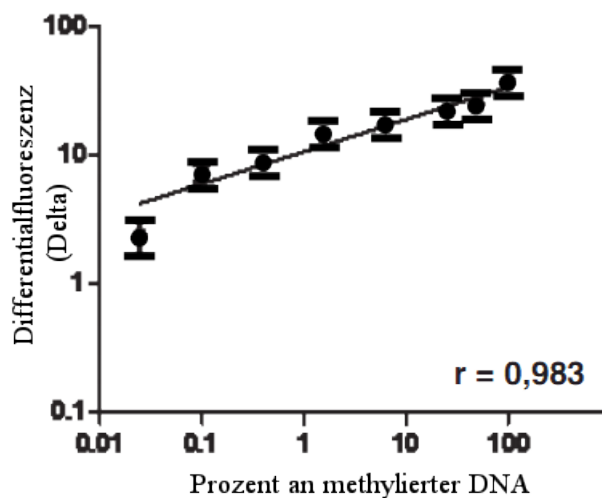


Abbildung 27: Kalibriergerade der Standardmessungen aus Abbildung 25; die Höhe der Differentialfluoreszenzpeaks wird gegen den Methylierungsgrad aufgetragen; modifiziert nach [63]

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Allgemeines

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Methoden, basierend auf der methylierungs-sensitiven hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse (MS-HRM) entwickelt werden, um den Methylierungsgrad in Promotorregionen von Genen, die bei der Entstehung von Karzinomen einen veränderten Methylierungsgrad aufweisen, bestimmen zu können. Es wurden Gene gesucht, bei welchen der Anstieg des Promotormethylierungsgrades mit der Entstehung von kolorektalen Karzinomen in Verbindung gebracht wird.

Da die benötigten Primer einige wichtige Kriterien erfüllen müssen (s. Abschnitt 3.1.3.3), kommt dem Primerdesign bei der Entwicklung einer MS-HRM Methode eine wesentliche Bedeutung zu. Die ersten Gene wurden anhand der Literatur zur hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse ausgewählt [67, 59]. So bestand die Möglichkeit bereits etablierte Methoden mit den selbst entwickelten vergleichen zu können. Aufgrund dieser Kriterien wurden die Gene APC, DAPK1 und HIC1 herangezogen. Für diese Gene und die dazugehörigen Primerpaare, waren die in den ausgewählten Forschungsarbeiten verwendeten optimierten Bedingungen (Annealing-Temperatur, MgCl₂-Konzentration) bekannt.

Zusätzlich wurde zur Auswahl der Gene eine von Kim et. al. durchgeführte Studie [11] über in kolorektalen Karzinomen (CRC) methylierte Gene herangezogen. In dieser Arbeit wurde der Methylierungsgrad vieler Gene in Kolonkrebspatienten mit dem Methylierungsstatus in gesunden Geweben verglichen. Es wurde nach einem Gen gesucht, welches in einem möglichst hohen Prozentsatz der CRC-Fälle methyliert vorliegt, jedoch in gesunder Mukosa unmethyliert aufzufinden ist. Die Wahl fiel dabei auf das OSMR Gen.

Die Suche nach Primern wurde mit der Methyl Primer Express Software (Version 1.0) durchgeführt. Es wurden die Gensequenzen aus der Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) verwendet [64].

Da die Methylierung in der CpG-reichen Promotorsequenz der Gene stattfindet (CpG-Insel), wurde als Bereich für die Primersuche immer die erste CpG-Insel am 5'-Ende des jeweiligen Gens ausgewählt. Aus mehreren Suchvorgängen mit unterschiedlichen Einstellungen der

Parameter (Amplikonlänge, Schmelztemperatur der Primer, etc.; s. Abschnitt 5.1.1) im Methyl Primer Express Programm wurden einige Vorschläge für Primerpaare erhalten.

Die Schmelztemperatur (T_m) der Primer wurde mittels der Freeware Oligo Calc errechnet. Sowohl die selbst entworfenen Primer als auch die aus der Literatur entnommenen Primerpaare wurden ebenfalls mit Oligo Calc auf Selbstkomplementarität untersucht [65]. Die mögliche Bildung von Sekundärstrukturen wurde mit dem RNAfold WebServer überprüft [66]. Informationen über das Schmelzprofil und die Schmelztemperatur der methylierten (nach der Bisulfitkonvertierung GC-reichen) und unmethylierten (nach der Bisulfitkonvertierung AT-reichen) Form der zugehörigen Amplikons wurden durch Einsatz des POLAND Programms erhalten [62].

Anschließend wurden anhand der Regeln von Wojdacz et al. (s. Abschnitt 3.1.2.3) die erfolgversprechendsten Primer ausgewählt.

Zum Testen der entworfenen Primer und zur Optimierung der Methoden wurde kommerzielle, bereits bisulfitkonvertierte Standard-DNA von Qiagen eingesetzt. Die benötigten DNA-Standardreihen wurden durch Mischen der 100% methylierten und 100% unmethylierten DNA im gewünschten Verhältnis hergestellt. Das Mischungsverhältnis wird in weiterer Folge in Prozent der methylierten DNA angegeben. Ein vollständig methylierter Standard trägt daher die Bezeichnung „Standard 100“, während der unmethylierte Standard als „Standard 0“ bezeichnet wird.

4.2 Primerdesign

4.2.1 APC

Das APC-Gen (NCBI Accession: U02509) wurde für diese Arbeit ausgewählt, da es in vielen Formen von Kolonkrebs nachweislich methyliert vorliegt (s. Abschnitt 1.2.2.1). Weiters war es durch seine Länge von nur 866 Basenpaaren (bp) eine übersichtliche Gensequenz und dadurch gut geeignet, um das Primerdesign für MS-HRM Analysen zu erlernen. In einer Publikation von Balic et al. [67] wurden Primer für die MS-HRM von APC veröffentlicht, welche zum Vergleich mit den selbst entworfenen Primern verwendet werden konnten. Dieses von Balic et al. veröffentlichte Primerpaar wird im Folgenden als Kontroll-Primer bezeichnet.

Der Buchstabe *f* kennzeichnet den Forward-Primer, während *b* den Backward-Primer (auch Reverse-Primer) anzeigt. Im Forward-Primer sind die Cytosine, welche zu einem CpG-Dinukleotid gehören, in Rot gekennzeichnet. Der Reverse-Primer besitzt keine CpG in seiner Sequenz.

APC Kontroll-Primer

APC Kontroll-Primer f

AAGTAGTTGTGTAATT**C**GTTGGAT

$T_m = 58,3\text{ }^{\circ}\text{C}$

APC Kontroll-Primer b

CACCTCCATTCTATCTCCAATA

$T_m = 58,4\text{ }^{\circ}\text{C}$

Aus den verschiedenen bei der im Rahmen der Diplomarbeit durchgeführten Primersuche erhaltenen Kombinationen wurden folgende Primer ausgewählt.

APC Primer

APC Primer f

CGGGGTTAGGGTTAGGTAGGTT

$T_m = 64,5\text{ }^{\circ}\text{C}$

APC Primer b1

CGAACTCCCA**AACG**AAAATAA

$T_m = 63,7\text{ }^{\circ}\text{C}$

APC Primer b2

CAAACTCCCA**AACG**AAAATAA

$T_m = 62,9\text{ }^{\circ}\text{C}$

Amplikonlänge

142 bp

CpG im Amplikon

12

Da der zugehörige Reverse-Primer drei CpG-Dinukleotide aufwies, bestand die Gefahr der verstärkten Selektivität zum GC-reichen (ursprünglich methylierten) Templat. Um dem Auftreten dieser bevorzugten Amplifikation, dem sogenannten umgekehrten PCR-Bias, entgegenzuwirken, kann in einem CpG des Backward-Primers das G durch ein A ersetzt werden. Aus diesem Grund wurden hier zwei unterschiedliche Reverse-Primer erstellt, wobei bei einem ein CpG und beim anderen zwei CpG durch diese Fehlpaarung ausgeschaltet wurden. Die betreffenden Basen sind in Rot gekennzeichnet.

Sowohl die Kontroll-Primer als auch das selbst entworfene Primerpaar „APC Primer f“ und „APC Primer b1“ wurden unter denselben Bedingungen (s. Tabelle 5) einer PCR-Amplifikation mit anschließender HRM Analyse unterzogen. Der Reaktionsansatz wurde dabei an die in der Publikation von Balic et al. [67] beschriebenen Bedingungen angelehnt. Balic et al. setzten

500 nmol/l (nM) jedes Primers und 50 ng der bisulfitkonvertierten DNA pro Tube ein [67]. Die Primerkonzentration wurde für diesen Lauf beibehalten, die Menge der DNA jedoch auf 10 ng pro Tube reduziert.

Tabelle 5: Reaktionsansatz für die MS-HRM Analyse von APC mit einem Endvolumen von 20 µl

Reagenz	Konzentration/Inhalt pro Tube
Supermix (HRM PCR Mix)	10 µl
Primer f	500 nM
Primer b	500 nM
MgCl ₂	4 mM
H ₂ O	5 µl
Bisulfitkonvertierte DNA	10 ng

Das angewendete Temperaturprogramm wird in Tabelle 6 wiedergegeben.

Die PCR wurde mit einem Touchdown-Protokoll von 1 °C in sieben Zyklen durchgeführt. Dabei wird in den ersten sieben Zyklen die Annealing-Temperatur immer um 1 °C gesenkt (Abbildung 28). Dadurch wird die Spezifität der Primer-Bindung erhöht, und die Bildung von Primer-Dimeren und Artefakten verringert [68, 69].

Tabelle 6: Temperaturprogramm der HRM mit Prä-Amplifikation

	Dauer	Temperatur [°C]
Denaturierung	10 min	95
PCR 50 Zyklen	10 s	95
	10 s	52
	20 s	72
HRM 0,1 °C Anstieg pro Stufe	1 min	95
	1 min	40
	2 s halten der Temperaturstufe	74-90

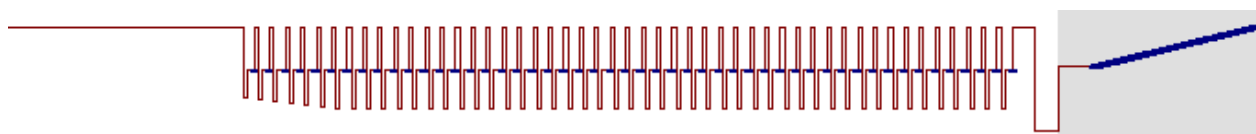


Abbildung 28: Schematische Darstellung des Temperaturprofils inklusive Prä-Amplifikation und Touchdown-Protokoll; der grau gekennzeichnete Bereich zeigt den Temperaturgradienten der HRM Analyse

4.2.1.1 Ergebnisse der MS-HRM Analyse

Die Kontroll-Primer führten bei dieser Annealing-Temperatur zu einer guten Amplifikation (Abbildung 29).

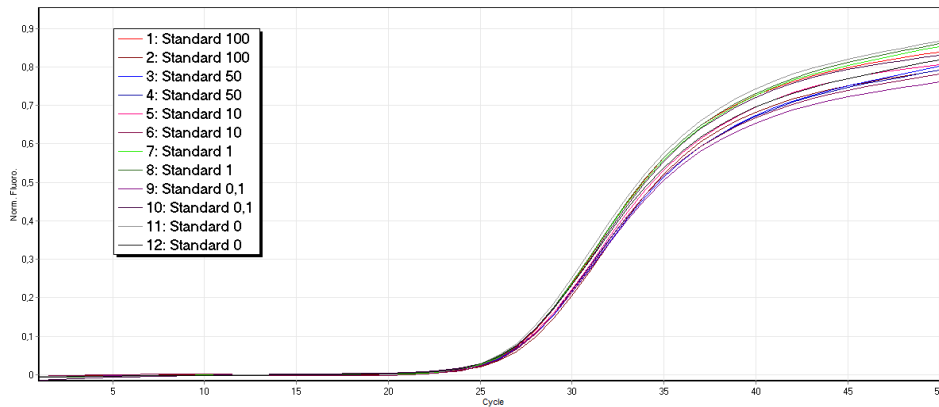


Abbildung 29: PCR-Amplifikation mit den Kontroll-Primern, $T_a = 52\text{ °C}$

Aus Abbildung 30 ist ersichtlich, dass bei den Doppelbestimmungen der Standards ähnliche Schmelzkurven erhalten wurden. Allerdings war ein deutlicher Bias in Richtung der unmethylierten DNA in der $(-dF/dT)$ Ansicht (Abbildung 31) zu erkennen. Daraus wurde auf eine Notwendigkeit für weitere Versuche zur Optimierung der PCR-Bedingungen geschlossen.

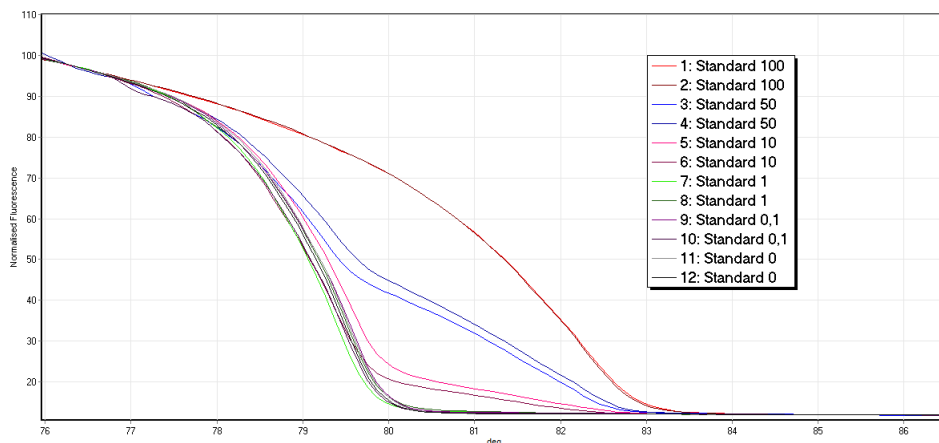


Abbildung 30: HRM nach Amplifikation mit den Kontroll-Primern

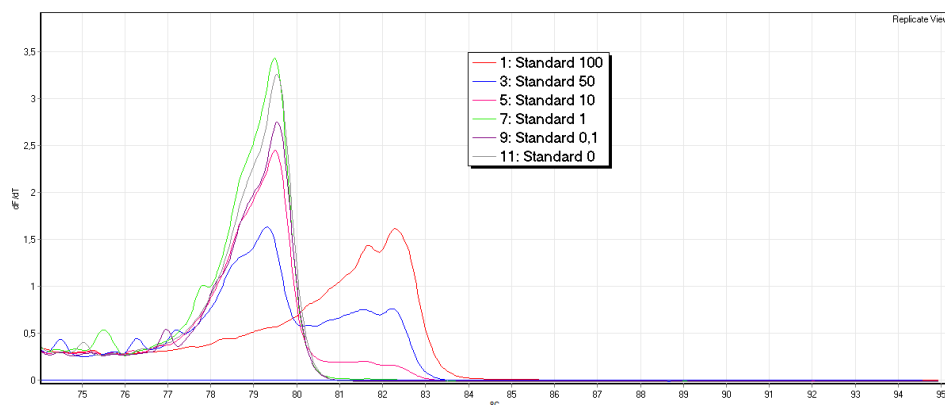


Abbildung 31: $(-dF/dT)$ Darstellung der HRM Ergebnisse; diese Ansicht zeigt die Mittelwerte der Doppelbestimmungen

Mit den selbst entworfenen Primern wurde eine geringere Amplifikations-Effizienz erreicht (Abbildung 32). Es wurden keine sigmoiden Amplifikationskurven erhalten, und auch nach Beendigung des 50. Zyklus wurde die Plateauphase noch nicht erreicht.

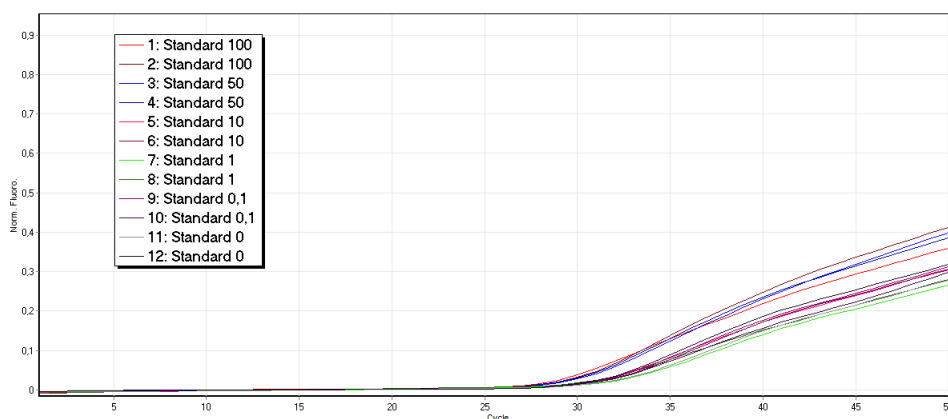


Abbildung 32: PCR-Amplifikation mit den Primern „APC Primer f“ und „APC Primer b1“ ; $T_a = 52\text{ }^{\circ}\text{C}$

Auch die erhaltenen HRM Kurven waren leider nicht auswertbar. Die DNA-Stränge begannen bei niedrigen Temperaturen bereits aufzuschmelzen und es war kein Unterschied zwischen den GC-reichen und den AT-reichen Amplikons zu erkennen (Abbildung 33).

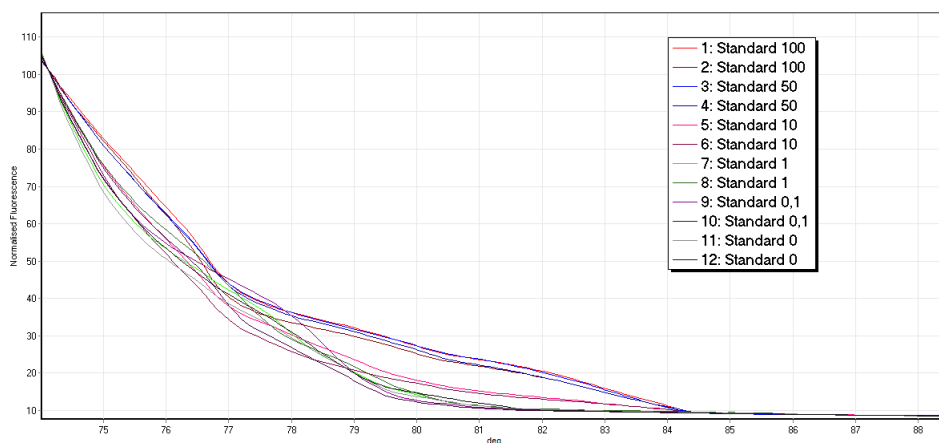


Abbildung 33: HRM nach Amplifikation mit den eigenen APC Primern

Da die Möglichkeit einer schlechten Amplifikation aufgrund einer zu niedrigen Annealing-Temperatur bestand, wurde eine MS-HRM Analyse mit den selbst erstellten Primerpaaren bei einer höheren T_a von 54 °C durchgeführt.

Beide Primerpaare führten erneut zu einer schlechten Amplifikation der Template. Im Fall des Primerpaars „APC Primer f“ und „APC Primer b1“ unterschieden sich die Amplifikationskurven außerdem in ihrer Steilheit, wie aus Abbildung 34 ersichtlich ist.

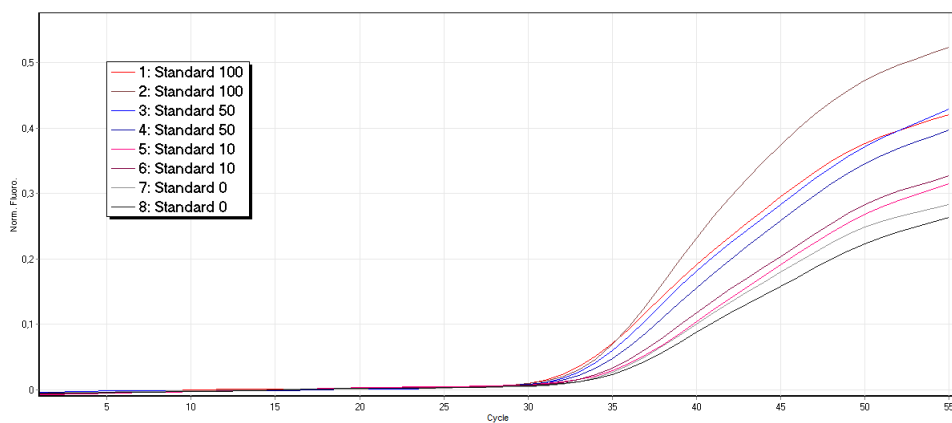


Abbildung 34: PCR-Amplifikation mit den Primern „APC Primer f“ und „b1“; $T_a = 54$ °C

Abbildung 35 zeigt die Ergebnisse der PCR für das Primerpaar „APC Primer f“ und „APC Primer b2“.

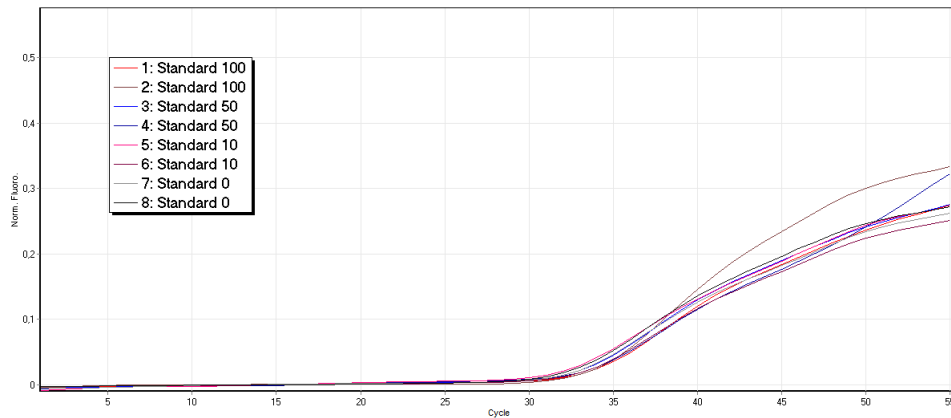


Abbildung 35: PCR-Amplifikation mit den Primern „APC Primer f“ und „b2“; $T_a = 54^\circ\text{C}$

Aufgrund der schlechten Ergebnisse mit den selbst entworfenen Primern wurde beschlossen die Bedingungen für die Kontroll-Primer zu optimieren (s. Abschnitt 4.3)

4.2.2 HIC1

Mit HIC1 (NCBI Accession: NM_001098202.1) wurde erneut ein Gen ausgewählt, dessen Promotorregion häufig in Krebserkrankungen methyliert vorliegt, und zu welchem bereits Primer veröffentlicht wurden [59], die als Kontroll-Primer verwendet werden konnten.

HIC1 Kontroll-Primer

HIC1 Kontroll-Primer f

GGCGGTT**C**GGGTAGTAAGTAGTT

$T_m = 64,6^\circ\text{C}$

HIC1 Kontroll-Primer b

AAC**G**AAACAACAAAACCCCAACC

$T_m = 63,6^\circ\text{C}$

Das selbst entworfene Primerpaar wies folgende Basenabfolge auf:

HIC1 Primer

HIC1 Primer f

TATAAGAA**C**GTGTTGG**C**GGTTAGT

$T_m = 62,0^\circ\text{C}$

HIC1 Primer b

CC**G**AACTCACCATATCATAATCC

$T_m = 60,9^\circ\text{C}$

Amplikonlänge

94 bp

CpG im Amplikon

4

Die Reaktionsbedingungen wurden an die von Wojdacz et al. angelehnt [53]. Tabelle 7 zeigt die Zusammensetzung des eingesetzten Reaktionsansatzes und Tabelle 8 das Temperaturprogramm, welches ohne Touchdown angewendet wurde.

Tabelle 7: Reaktionsansatz für die MS-HRM Analyse von HIC1 mit einem Endvolumen von 20 µl

Reagenz	Konzentration/Inhalt pro Tube
Supermix (HRM PCR Mix)	10 µl
Primer f	250 nM
Primer b	250 nM
MgCl ₂	3 mM
H ₂ O	6,9 µl
Bisulfitkonvertierte DNA	6 ng

Tabelle 8: Temperaturprogramm der HRM mit Prä-Amplifikation

	Dauer	Temperatur [°C]
Denaturierung	10 min	95
PCR 50 Zyklen	10 s	95
	10 s	59
	20 s	72
HRM 0,1 °C Anstieg pro Stufe	1 min	95
	2 s halten der Temperaturstufe	70-90

4.2.2.1 Ergebnisse der MS-HRM mit den Kontroll-Primern

Unter den oben angeführten Bedingungen wurde mit dem Kontroll-Primer-Paar eine wenig zufriedenstellende Amplifikation erzielt (Abbildung 36). Aufgrund der Ähnlichkeit der bei der HRM Analyse erhaltenen Schmelzkurven für GC-reiche und AT-reiche Amplikons wurde auf eine zu niedrige Annealing-Temperatur geschlossen (Abbildung 37).

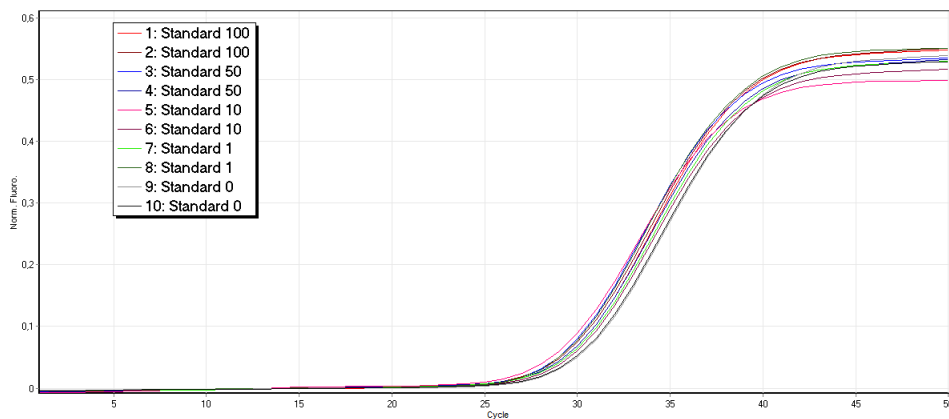


Abbildung 36: PCR-Amplifikation mit den Kontroll-Primern; $T_a = 59\text{ }^{\circ}\text{C}$

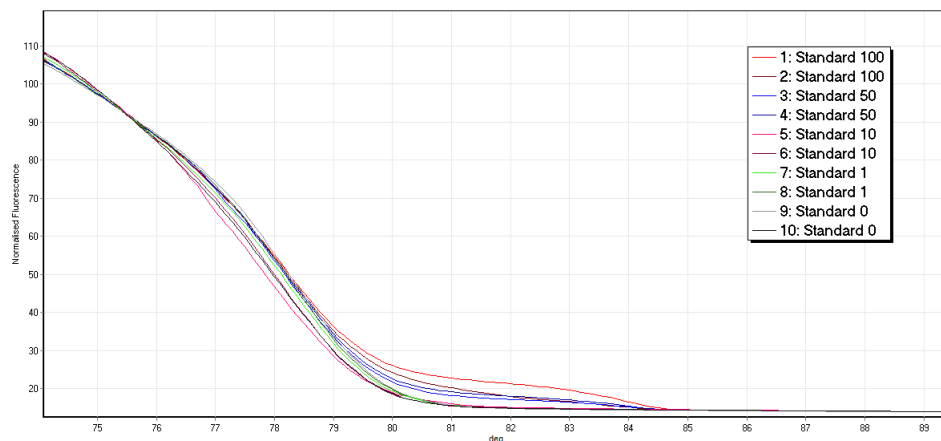


Abbildung 37: HRM nach Amplifikation mit den Kontroll-Primern

Aus diesem Grund wurde der Versuch bei einer T_a von $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ erneut durchgeführt, was jedoch nur zu einer geringen Verbesserung der HRM Ergebnisse führte (Abbildung 38).

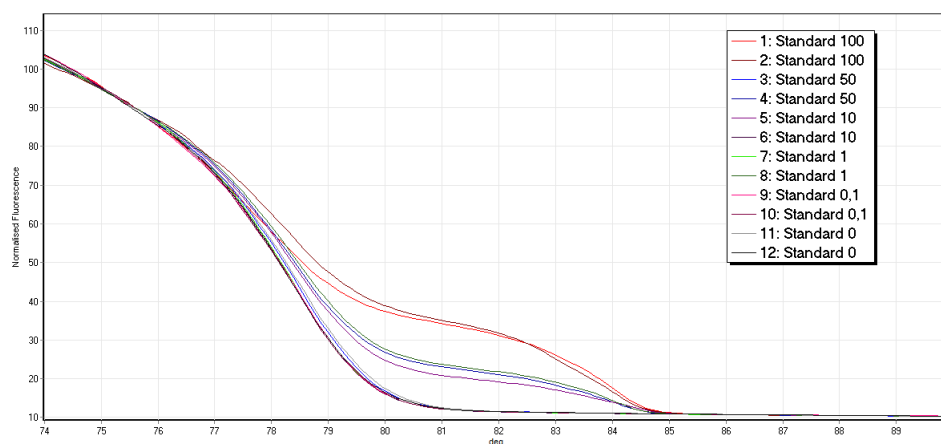


Abbildung 38: HRM nach Amplifikation mit den Kontroll-Primern bei einer $T_a = 62\text{ }^{\circ}\text{C}$

Da die errechnete Schmelztemperatur des „HIC1 Kontroll-Primer b“ bei 63,6 °C lag, wurden Versuche bei einer höheren T_a nicht durchgeführt.

4.2.2.2 Ergebnisse der MS-HRM mit den selbst entworfenen Primern

Die bei der MS-HRM von DNA-Standards mit bekanntem Methylierungsgrad erhaltenen Amplifikationskurven wiesen große Unterschiede in den C_T -Werten auf (Abbildung 39).

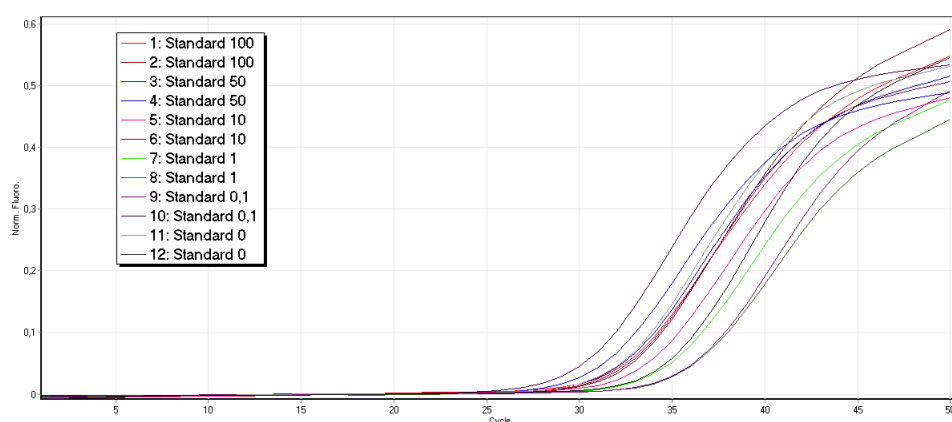


Abbildung 39: PCR-Amplifikation mit den eigenen HIC1 Primern; $T_a = 59\text{ °C}$

Die vorhergehende Prüfung der Schmelztemperaturen der GC-reichen und AT-reichen Amplikons mittels der POLAND Software ergab einen Unterschied von 2 °C, welcher aus den vier im Templat enthaltenen CpG-Dinukleotiden entsteht. Diese Differenz sollte bei der Durchführung einer hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse theoretisch genügen. Da es sich bei der Berechnung aber nicht um eine exakte Vorhersage der Schmelztemperaturen handelt, kann es in der Praxis zu Abweichungen vom erwarteten Schmelzverhalten kommen.

Das traf auf die mit dem selbst entworfenen Primerpaar erhaltenen Amplikons zu. Es war kein ausreichender Unterschied in der T_m der methylierten und unmethylierten DNA-Standards erkennbar (Abbildung 40).

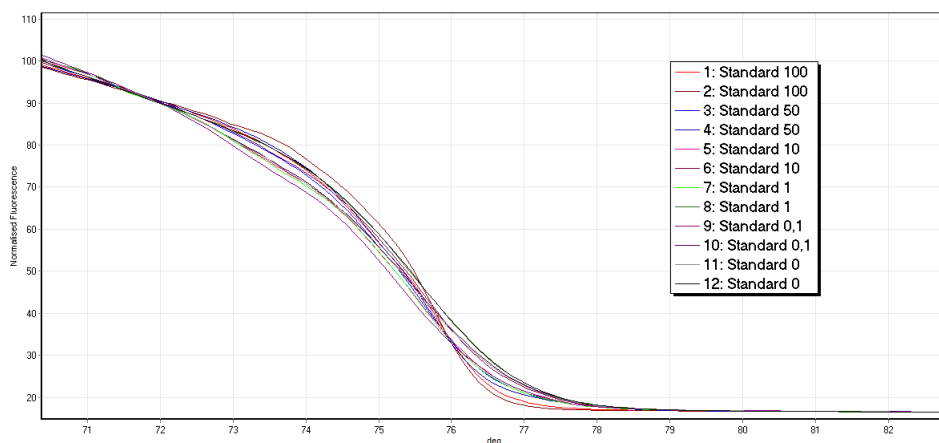


Abbildung 40: HRM nach Amplifikation mit den HIC1 Primern

Aus den erhaltenen Daten wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass beim Primerdesign auf einen größeren Unterschied in der Schmelztemperatur der Amplikons geachtet werden muss. In der Folge wurden daher nur mehr Primer in Betracht gezogen, mit denen Amplikons mit mindestens 6 CpG erhalten wurden, und die laut der Berechnung mit der POLAND Software einen Unterschied von mindestens 4 °C in der Schmelztemperatur aufwiesen.

4.2.2.3 Ergebnisse der erneuten Primersuche für HIC1

Aufgrund dieser neuen Erkenntnisse wurde ein anderes Primerpaar für HIC1 ausgewählt und getestet.

HIC1 Primer1	
HIC1 Primer1 f	HIC1 Primer1 b
TGGTTTATGGCGAGTTCGAGAGTT	CTCCTCCTCCACGTAAACCTCC
$T_m = 63,6\text{ °C}$	$T_m = 65,8\text{ °C}$
Amplikonlänge	CpG im Amplikon
119 bp	9

Auch für dieses Primerpaar wurde der in Tabelle 7 angeführte Reaktionsansatz und das Temperaturprogramm aus Tabelle 8 mit einer $T_a = 59\text{ °C}$ verwendet.

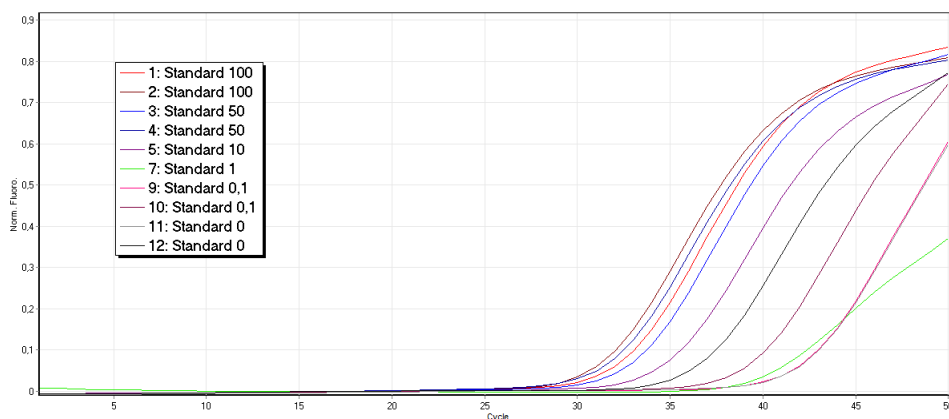


Abbildung 41: PCR-Amplifikation mit den HIC1 Primern I; $T_a = 59^\circ\text{C}$

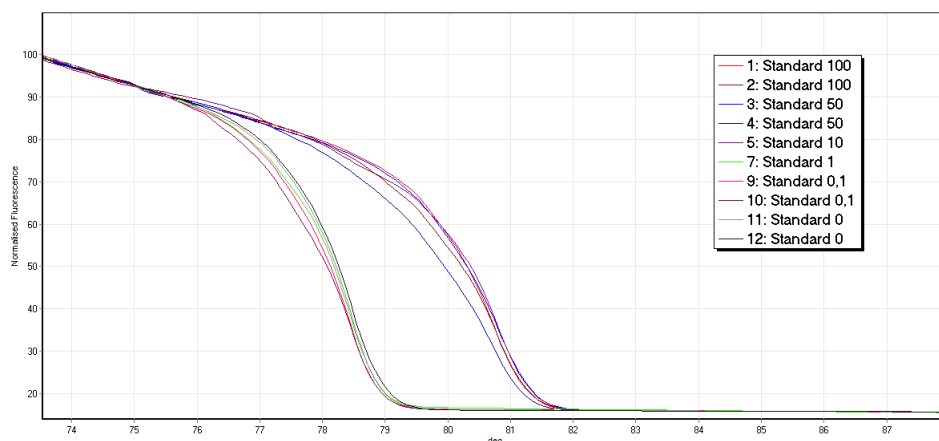


Abbildung 42: HRM nach Amplifikation mit den HIC1 Primern I

Wie aus Abbildung 41 ersichtlich ist, wurden die methylierten und unmethylierten DNA-Standards erneut unterschiedlich gut amplifiziert. Um mögliche Schwankungen beim Pipettieren der geringen DNA-Menge von 6 ng als Ursache auszuschließen, wurde beschlossen, in den weiteren Ansätzen die DNA-Menge auf 10 ng pro Tube zu erhöhen.

Im HRM war keine Unterscheidung der Standards 0, 0,1 und 1 möglich, was auf eine schlechte Selektivität für methylierte DNA-Stränge hinweist (Abbildung 42). Dennoch zeigte die Schmelzkurve des 50% methylierten Standards einen eindeutigen umgekehrten Bias in Richtung des methylierten Stranges. Um den Einfluss der Annealing-Temperatur auf die PCR Amplifikation zu untersuchen, wurde der nächste Lauf bei einer Annealing-Temperatur von 58°C durchgeführt.

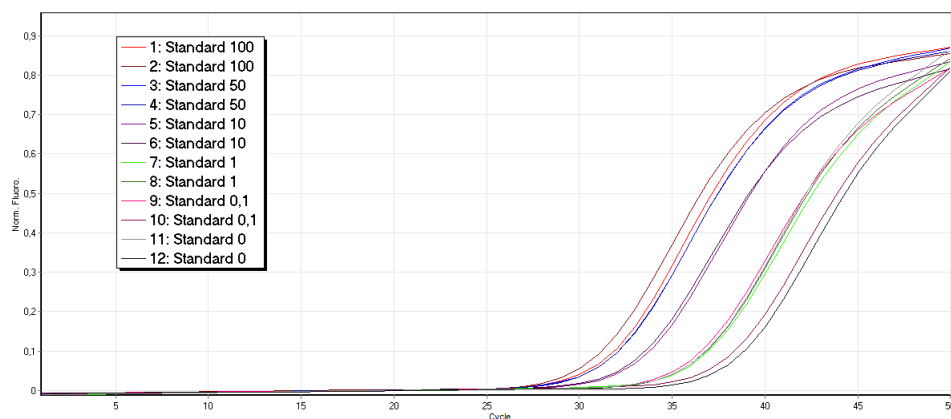


Abbildung 43: PCR-Amplifikation mit den HIC1 Primern 1; $T_a = 58^\circ\text{C}$

Unter diesen veränderten Bedingungen wurde eine geringere Differenz in den C_T -Werten beobachtet (Abbildung 43). Dennoch konnte der Bias nicht eliminiert werden (Abbildung 44).

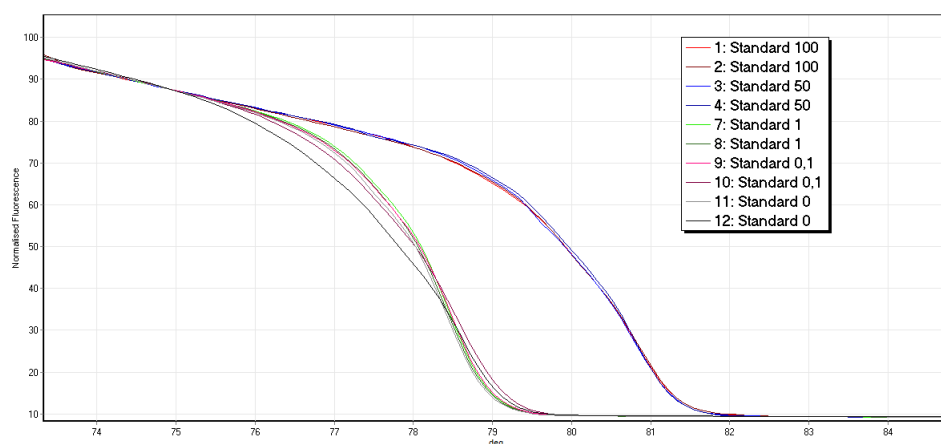


Abbildung 44: HRM nach Amplifikation mit den HIC1 Primern 1

Aus der parallel zu diesen Versuchen durchgeführten Studie verschiedener veröffentlichter Primerpaare (s. Abschnitt 4.2.3) war inzwischen erkannt worden, dass Forward-Primer mit zwei CpG-Dinukleotiden nur dann verwendet wurden, wenn beide sehr nahe am 5'-Ende der Primersequenz lagen. Im „HIC1 Primer1 f“ liegen die CpG jedoch an den Positionen 11 und 17, also zu nahe am 3'-Ende der Sequenz.

Es wurde daher versucht, durch den Austausch des Cytosins mit einem Thymin im CpG an der Position 17 den PCR-Bias in Richtung der unmethylierten DNA zu verstärken.

HIC1 Primer1

HIC1 Primer1 f2

TGGTTTATGG**C**GAGTT**T**GAGAGTT

$T_m = 62,0\text{ }^{\circ}\text{C}$

Amplikonlänge

119 bp

HIC1 Primer1 b

CTCCTCCTCCAC**G**TAAACCTCC

$T_m = 65,8\text{ }^{\circ}\text{C}$

CpG im Amplikon

9

Ab diesem Zeitpunkt wurde für die Amplifikation ein Touchdown-Protokoll und eine Annealing-Temperatur von $53\text{ }^{\circ}\text{C}$ angewendet.

Die Modifikation des Forward-Primers führte sowohl zu einer wesentlichen Verbesserung der Amplifikations-Effizienz als auch zu größeren Unterschieden im Schmelzverhalten der Amplikons (Abbildungen 45 und 46). Die Standards 50 und 10 sind nun deutlich vom vollständig methylierten Standard 100 zu unterscheiden.

In der Darstellung der Schmelzpeaks (Abbildung 47) ist die verbesserte Amplifikation der GC-reichen DNA zu erkennen.

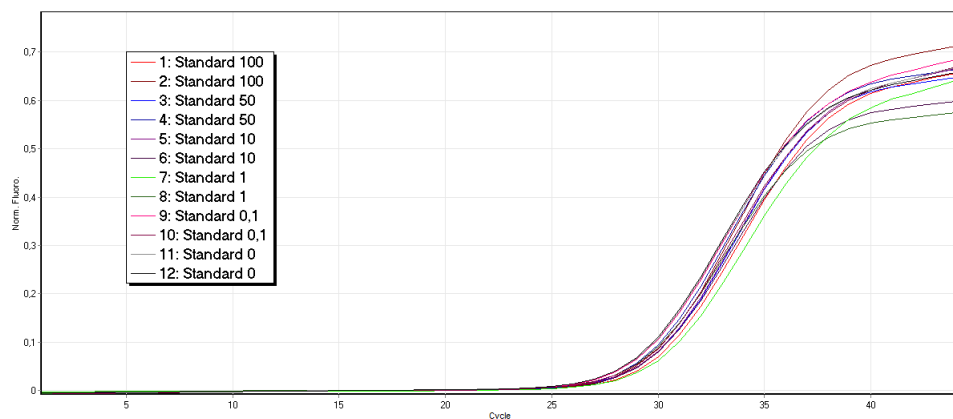


Abbildung 45: PCR-Amplifikation mit dem Primerpaar "HIC 1 Primer1 f2" und "HIC1 Primer1 b"; $T_a = 53\text{ }^{\circ}\text{C}$

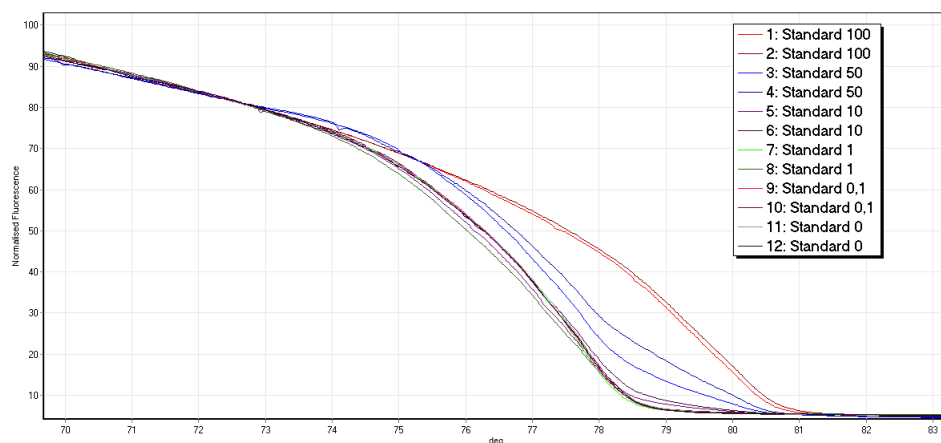


Abbildung 46: HRM nach Amplifikation mit "HIC1 Primer1 f2" und "HIC 1 Primer1 b"

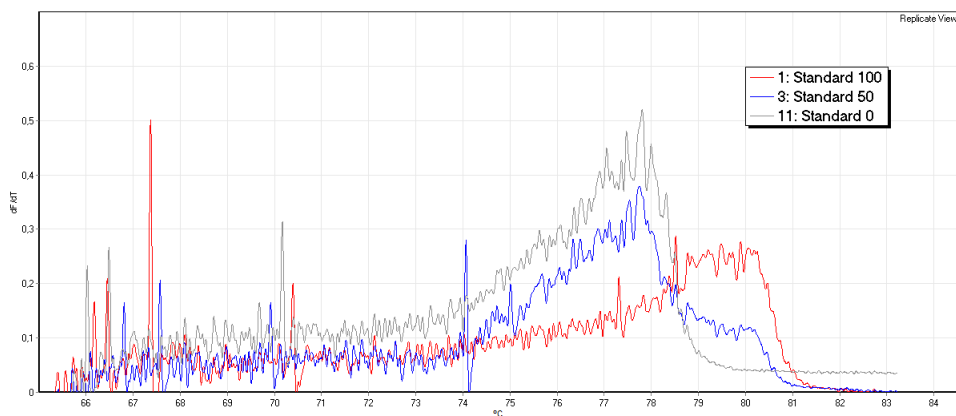


Abbildung 47: Darstellung der Schmelzpeaks der Doppelbestimmungen der Standards 100, 50 und 0 in der $(-dF/dT)$ Ansicht

In einem nächsten Schritt sollte versucht werden, das Auftreten dieses Bias durch Optimierung der Annealing-Temperatur und des $MgCl_2$ -Gehaltes des Reaktionsansatzes zu vermeiden (s. Abschnitt 4.3).

4.2.3 Studie von in anderen Arbeiten veröffentlichten Primern

Zeitgleich mit dem Design der Primer für das HIC1-Gen wurden Primerpaare aus unterschiedlichen Veröffentlichungen auf die Einhaltung der von Wojdacz et al. [52] aufgestellten Regeln zum Primerdesign (s. Abschnitt 3.1.2.3) untersucht. Dadurch sollte die unterschiedliche Gewichtung der einzelnen Punkte beim Design funktionierender methylierungs-unabhängiger Primer ermittelt werden. Diese Erkenntnisse sollten als weitere Kriterien zur Auswahl der besten Primerpaare aus den Vorschlägen der Methyl Primer Express Software dienen.

Betrachtet wurden die MS-HRM Primerpaare des Papers [59] von Wojdacz et al. zu den Genen DAPK1, HIC1, RASSF1 A (Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1), BSG (basigin (Ok blood group)) und ESR1 (estrogen receptor 1) sowie die Primer aus der Veröffentlichung [70] von Huang et al. für die Gene SDHA (succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)), SDHB1 (succinate dehydrogenase complex II, subunit B), SDHB2 (succinate dehydrogenase complex II, subunit B), SDHC (succinate dehydrogenase complex II, subunit C), SDHD (succinate dehydrogenase complex II, subunit D) und FH (fumarate hydratase) [22, 23].

Die Länge der veröffentlichten Primer lag zwischen 19 und 36 bp, die Amplikonlänge war nicht bekannt.

Die ersten beiden von Wojdacz et al. aufgestellten Auswahlregeln (s. Abschnitt 3.1.2.3) empfehlen, ein oder zwei CpGs in den Primern zu inkludieren, wobei diese möglichst nahe am 5'-Ende des Forward-Primers liegen sollten. In den von Wojdacz et al. publizierten Primern [58] waren nur dann zwei CpGs enthalten, wenn beide nicht mehr als 9 Basen vom 5'-Ende entfernt waren. War nur ein CpG vorhanden, so konnte es auch weiter vom 5'-Ende entfernt liegen. Auch in der Publikation [70] von Huang et al. wurde mit einer Ausnahme (SDHC) nach diesem Schema vorgegangen.

Die Schmelztemperaturen der untersuchten Primer lagen laut Oligo Calc im Bereich von 60,3 – 68,2 °C. In beiden Arbeiten wurden Primer veröffentlicht, die einen T_m Unterschied > 1 °C aufwiesen, wobei der größte Unterschied für das SDHA-Primerpaar aus [70] mit 7,9 °C errechnet wurde. Allerdings muss erwähnt werden, dass bei Verwendung anderer Berechnungsmethoden Abweichungen in den erhaltenen Schmelztemperaturen der einzelnen Primer auftreten können. Aus diesen Ergebnissen wurde der Schluss gezogen, dass ähnliche T_m der Primer von Vorteil sind, eine Abweichung > 1 °C jedoch vernachlässigt werden kann, falls die anderen Kriterien des Primerdesigns erfüllt werden.

Wojdacz et al. empfehlen ein oder mehrere T am 3'-Ende der Primer, welche im nicht bisulfitkonvertierten Originalstrang noch als Cytosine vorliegen. Diese Cytosine dürfen nicht zu CpG-Dinukleotiden zählen, damit sie bei der Bisulfitmodifizierung und der anschließenden PCR sicher in Thymin umgewandelt werden. Dadurch wird die Selektivität der Primer zu bisulfitkonvertierter DNA erhöht.

Da die Basenabfolgen der Original-Template nicht veröffentlicht wurden, konnte nicht festgestellt werden, ob ein T vor der Bisulfitkonvertierung als C vorlag, oder ob sich bereits im Originalstrang ein T an dieser Stelle befand.

Die Recherche ergab, dass diese Auswahlregel üblicherweise nur auf den Forward-Primer angewendet wird. Die Reverse-Primer wiesen, bis auf das für RASSF1 A entworfene Primerpaar [59], keine T an den äußersten drei Stellen ihres 3'-Endes auf. Im Gegensatz dazu waren in allen untersuchten Forward-Primern, mit Ausnahme des SDHD aus [70], ein bis drei T vorhanden.

Bei der Überprüfung auf Sekundärstrukturen der Primer mittels dem RNAfold WebServer wurde für einzelne Primer die Wahrscheinlichkeit einer Haarnadelbildung festgestellt. Dies schien jedoch keinen negativen Einfluss auf die PCR-Amplifikation zu haben. Die tatsächliche Auswirkung auf die PCR-Amplifikation durch diese Sekundärstrukturen muss empirisch festgestellt werden.

4.2.4 DAPK1

Die Kontroll-Primer für DAPK1 (NCBI Accession: NM_004938.2) wurden ebenfalls aus der Publikation [59] von Wojdacz et al. entnommen.

DAPK1 Kontroll-Primer	
DAPK1 Kontroll-Primer f	DAPK1 Kontroll-Primer b
G CC CGGAGTTGGGAGGAGT	CTCC G AACTACCCTACCAAACC
$T_m = 63,6\text{ }^{\circ}\text{C}$	$T_m = 64,2\text{ }^{\circ}\text{C}$
Sie wurden zum Vergleich mit dem selbst entworfenen Primerpaar genutzt.	
DAPK1 Primer	
DAPK1 Primer f	DAPK1 Primer b
TTT C GGAGTGTGAGGAGGAT	G ACCCCAAACCCTACC A C
$T_m = 58,4\text{ }^{\circ}\text{C}$	$T_m = 58,4\text{ }^{\circ}\text{C}$
Amplikonlänge	CpG im Amplikon
100 bp	10

Tabelle 9 zeigt den Reaktionsansatz für die durchgeführte MS-HRM.

Das verwendete Temperaturprogramm mit Touchdown wird in Tabelle 10 wiedergegeben.

Tabelle 9: Reaktionsansatz für die MS-HRM Analyse von DAPK1 mit einem Endvolumen von 20 µl

Reagenz	Konzentration/Inhalt pro Tube
Supermix (HRM PCR Mix)	10 µl
Primer f	250 nM
Primer b	250 nM
MgCl ₂	3 mM
H ₂ O	6,5 µl
Bisulfitkonvertierte DNA	10 ng

Tabelle 10: Temperaturprogramm der HRM mit Prä-Amplifikation

	Dauer	Temperatur [°C]
Denaturierung	10 min	95
PCR 50 Zyklen	10 s	95
	10 s	51
	20 s	72
HRM 0,1 °C Anstieg pro Stufe	1 min	95
	2 s halten der Temperaturstufe	70-90

4.2.4.1 Ergebnisse der MS-HRM mit den DAPK1 Primern

Die MS-HRM Analyse wurde mit einer PCR-Annealing-Temperatur von 51 °C durchgeführt.

Die Amplifikation verlief, wie aus Abbildung 48 ersichtlich, zufriedenstellend. Die HRM Kurven wiesen jedoch auf einen starken PCR-Bias hin und die für GC-reiche und AT-reiche Amplikons erhaltenen Schmelzkurven unterschieden sich kaum. Außerdem ließ die unregelmäßige Form der erhaltenen Kurven auf eine zu tiefe T_a schließen (Abbildung 49).

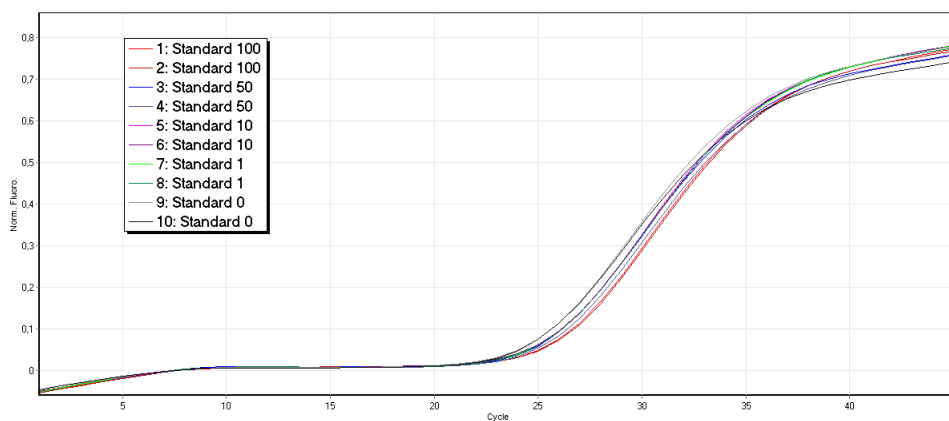


Abbildung 48: PCR-Amplifikation mit den DAPK1 Primern; $T_a = 51\text{ }^{\circ}\text{C}$

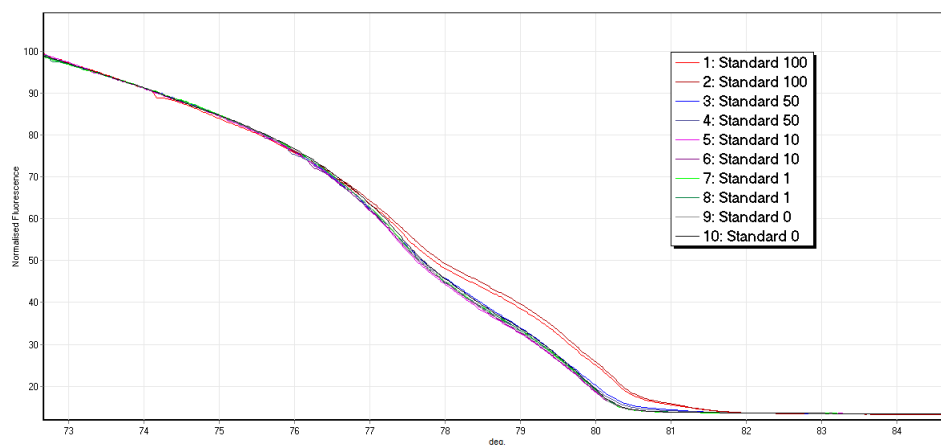


Abbildung 49: HRM nach Amplifikation mit den DAPK1 Primern

Der nächste Versuch erfolgte bei einer T_a von $53\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Abbildungen 50 und 51).

Es wurden größere Unterschiede im Schmelzverhalten von GC-reichen und AT-reichen Sequenzen und somit ein geringerer Bias erhalten. Der Verlauf der Schmelzkurven wies aber auf mehrere Schmelzbereiche in den Amplikons hin. Durch diese unterschiedlichen Schmelzdomänen werden die HRM Kurven schwieriger zu interpretieren und sind dadurch für die Bestimmung des Methylierungsgrades von Genen unvorteilhaft.

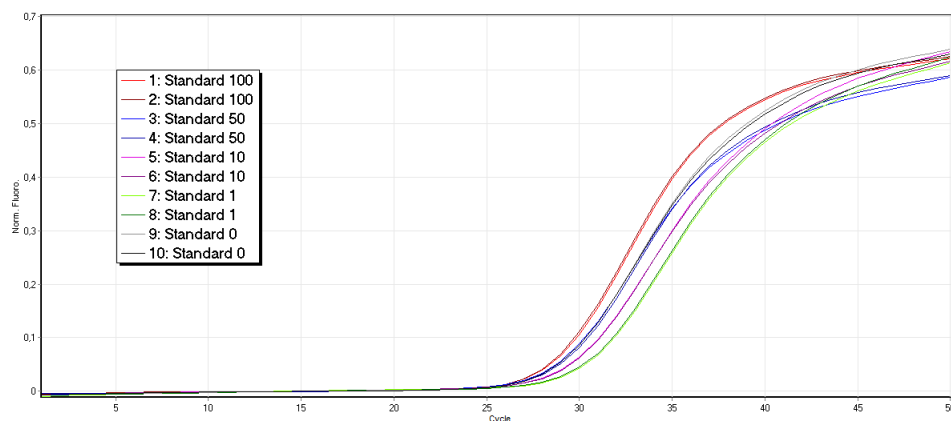


Abbildung 50: PCR-Amplifikation mit den DAPK1 Primern; $T_a = 53\text{ }^{\circ}\text{C}$

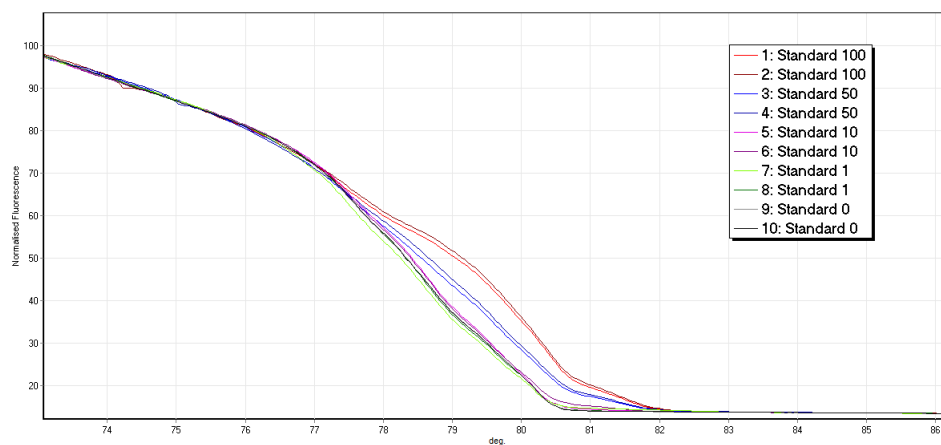


Abbildung 51: HRM nach Amplifikation mit den DAPK1 Primern

4.2.4.2 Ergebnisse der MS-HRM mit den Kontroll-Primern

Die erste MS-HRM Analyse mit den Kontroll-Primern wurde bei einer T_a von $53\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Abbildung 52 zeigt die erhaltenen Amplifikationskurven.

Die Schmelzkurven wiesen einen Bias zur unmethylierten DNA auf. Aus der Kurvenform wurde außerdem auf die Verwendung einer zu tiefen Annealing-Temperatur geschlossen (Abbildung 53).

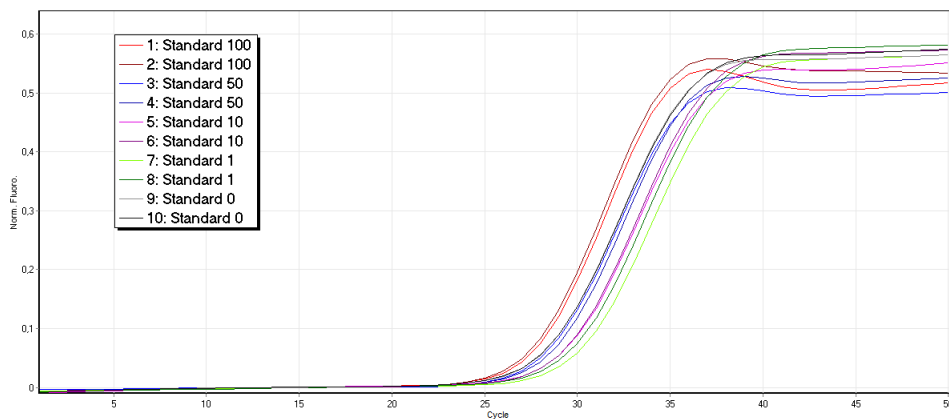


Abbildung 52: PCR-Amplifikation mit den Kontroll-Primern, $T_a = 53\text{ }^{\circ}\text{C}$

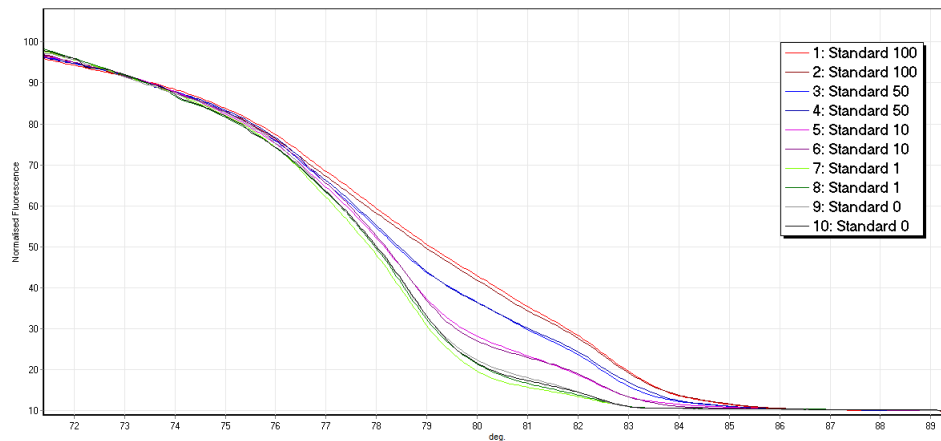


Abbildung 53: HRM nach der Amplifikation mit den Kontroll-Primern

Als nächstes wurde eine MS-HRM bei einer T_a von $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. (Abbildungen 54 und 55).

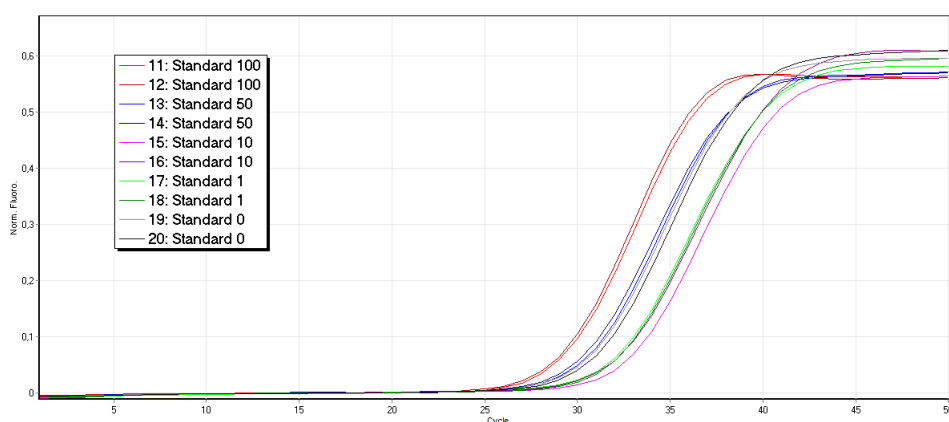


Abbildung 54: PCR-Amplifikation mit den Kontroll-Primern; $T_a = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$

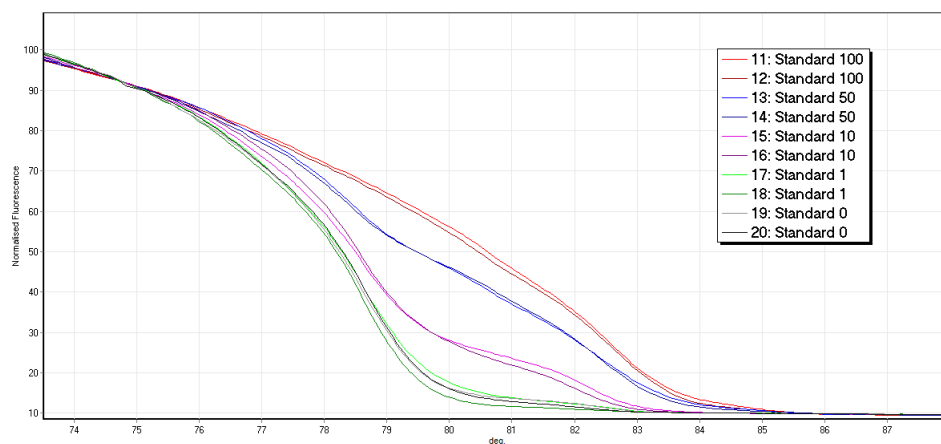


Abbildung 55: HRM nach Amplifikation mit den Kontroll-Primern

Aufgrund der guten Ergebnisse wurden die DAPK1 Kontroll-Primer für die Optimierung und die weiteren Messungen dem selbst entworfenen DAPK1 Primerpaar vorgezogen.

4.2.5 OSMR

Für das Gen OSMR (NCBI Accession: NM_003999.2) wurde ein Primerpaar entworfen.

OSMR Primer	
OSMR Primer f	OSMR Primer b
CGTGTTGTGCGGGAAAGAATT	CAAACGCTAAACAAAAACACACC
$T_m = 59,5\text{ }^{\circ}\text{C}$	$T_m = 60,3\text{ }^{\circ}\text{C}$
Amplikonlänge	CpG im Amplikon
109 bp	12

Der für den ersten Versuch eingesetzte Reaktionsansatz wird in Tabelle 11 gezeigt. Das Temperaturprogramm mit Touchdown wurde mit einer Annealing-Temperatur von 51 °C durchgeführt (Tabelle 12).

Tabelle 11: Reaktionsansatz für die MS-HRM Analyse von OSMR mit einem Endvolumen von 20 µl

Reagenz	Konzentration/Inhalt pro Tube
Supermix (HRM PCR Mix)	10 µl
Primer f	250 nM
Primer b	250 nM
MgCl ₂	3 mM
H ₂ O	6,5 µl
Bisulfitkonvertierte DNA	10 ng

Tabelle 12: Temperaturprogramm der HRM mit Prä-Amplifikation

	Dauer	Temperatur [°C]
Denaturierung	10 min	95
PCR 50 Zyklen	10 s	95
	10 s	51
	20 s	72
HRM 0,1 °C Anstieg pro Stufe	1 min	95
	2 s halten der Temperaturstufe	70-90

4.2.5.1 Ergebnisse der MS-HRM mit den OSMR Primern

Das Primerpaar führte bereits beim ersten Versuch zu einer guten Amplifikation in der PCR und zu HRM Kurven, welche eine Unterscheidung von GC-reichen und AT-reichen Sequenzen erlaubten (Abbildungen 56 und 57). Ein leichter Bias in Richtung des unmethylierten Stranges war erkennbar, weshalb eine Optimierung der Annealing-Temperatur und der MgCl₂-Konzentration durchgeführt werden musste (s. Abschnitt 4.3.2.4).

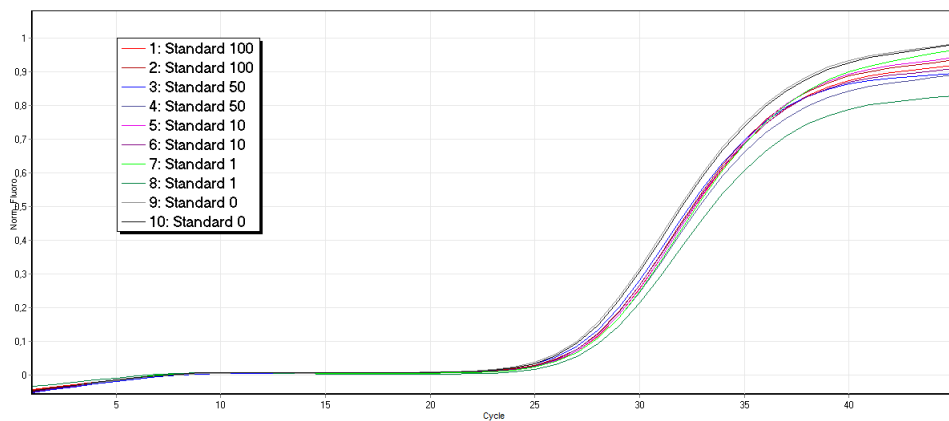


Abbildung 56: PCR-Amplifikation mit den OSMR Primern; $T_a = 51\text{ }^{\circ}\text{C}$

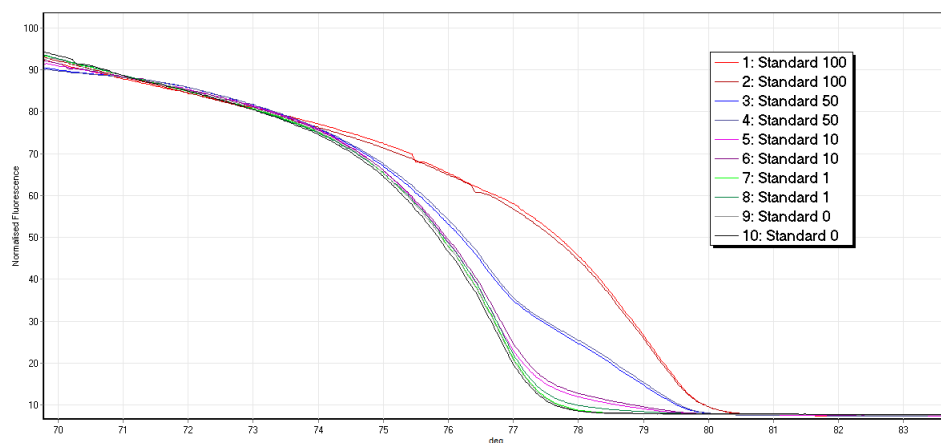


Abbildung 57: HRM nach Amplifikation mit den OSMR Primern

4.3 Optimierung der MS-HRM Bedingungen

Bei der Optimierung der MS-HRM Bedingungen für die einzelnen Primerpaare wurde immer zuerst mit der Änderung der Annealing-Temperatur begonnen. Bei Vorliegen eines geringen Bias wurden verschiedene Konzentrationen an MgCl_2 getestet, um den Bias möglichst vollständig zu eliminieren.

4.3.1 Beispiele für die Auswirkungen der Optimierung

Die Auswirkungen der Veränderung der Annealing-Temperatur soll anhand der DAPK1 Kontroll-Primer demonstriert werden.

Die Annealing-Temperatur wurde dabei von 55 °C (Abbildungen 58 und 59) auf 57 °C erhöht, um den Bias zu kompensieren. Alle Messungen wurden mit einer zusätzlichen Zugabe von 3 mM an $MgCl_2$ durchgeführt.

Sowohl bei 55 °C als auch bei 56 °C war ein Bias in Richtung des methylierten Stranges in geringem Ausmaß zu erkennen. Die Erhöhung der T_a um 1 °C führte zu kaum einer Änderung im Bindungsverhalten der Primer. Zum besseren Vergleich werden in den $(-dF/dT)$ Darstellungen nur die Mittelwerte der Doppelbestimmungen der 100%, 50% und 0% Standards gezeigt.

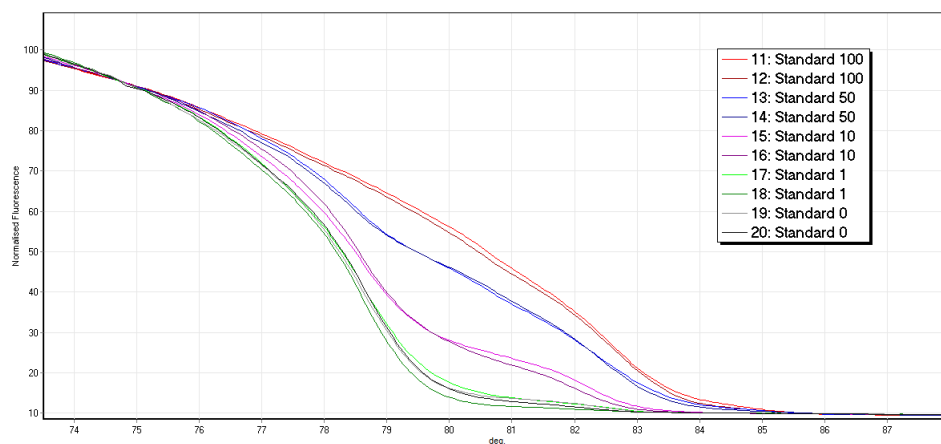


Abbildung 58: HRM nach Amplifikation mit den DAPK1 Kontroll-Primern bei einer $T_a = 55$ °C

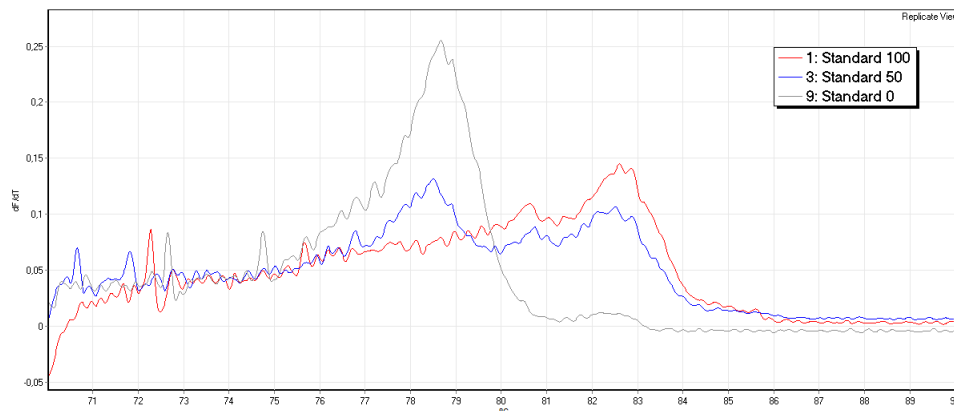


Abbildung 59: Ansicht $(-dF/dT)$ für die MS-HRM mit einer $T_a = 55$ °C

Abbildung 60 zeigt, dass sich bei einer Annealing-Temperatur von 57 °C die Schmelzkurven des 1% Standards deutlich von der unmethylierten DNA unterscheiden. Durch Erhöhung der T_a wurde der Bias umgekehrt, wie aus Abbildung 61 ersichtlich ist. Da dies zu einer niedrigeren Nachweisgrenze für methylierte Sequenzen führt, wurde diese Annealing-Temperatur beibehalten.

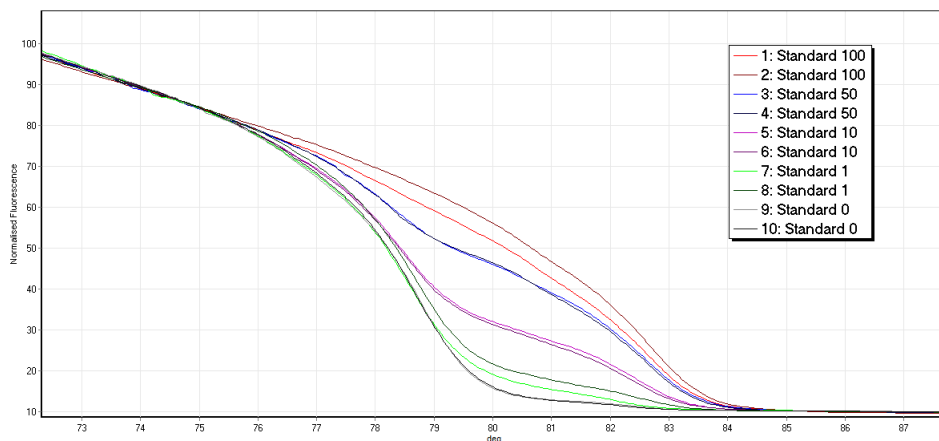


Abbildung 60: HRM nach Amplifikation mit den DAPK1 Kontroll-Primern bei einer $T_a = 57\text{ }^{\circ}\text{C}$

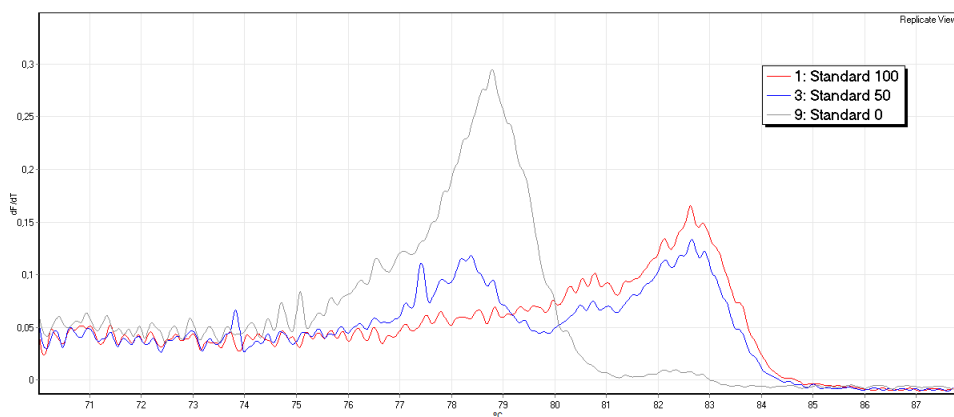


Abbildung 61: Ansicht $(-dF/dT)$ für die MS-HRM mit einer $T_a = 57\text{ }^{\circ}\text{C}$

Die Auswirkungen der MgCl_2 -Konzentration sind im Vergleich zur Temperaturänderung nicht eindeutig vorhersehbar. Eine Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration kann sowohl zur Verbesserung als auch zur Verschlechterung des PCR-Bias führen. In seltenen Fällen werden auch gar keine Änderungen im Annealing-Verhalten der Primer beobachtet. Aus diesem Grund muss der Einfluss der MgCl_2 -Konzentration auf die Amplifikations-Effizienz experimentell untersucht werden.

Die Abbildungen 62 bis 65 zeigen, dass für die Versuche mit den OSMR Primern bei einer MgCl_2 -Konzentration von 2 mM der Bias auf der Seite der GC-reichen DNA liegt, und bei 4 mM ein leichter Bias zur AT-reichen DNA auftritt.

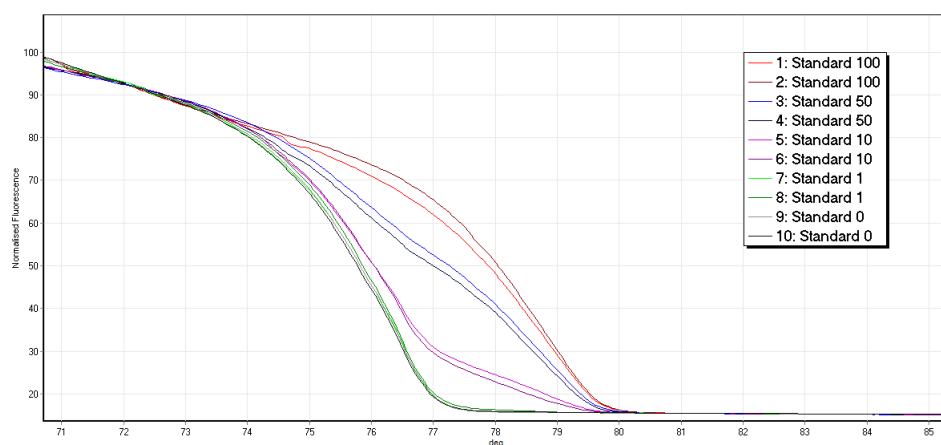


Abbildung 62: HRM nach Amplifikation mit den OSMR Primern bei einer $T_a = 51\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 2 mM MgCl_2

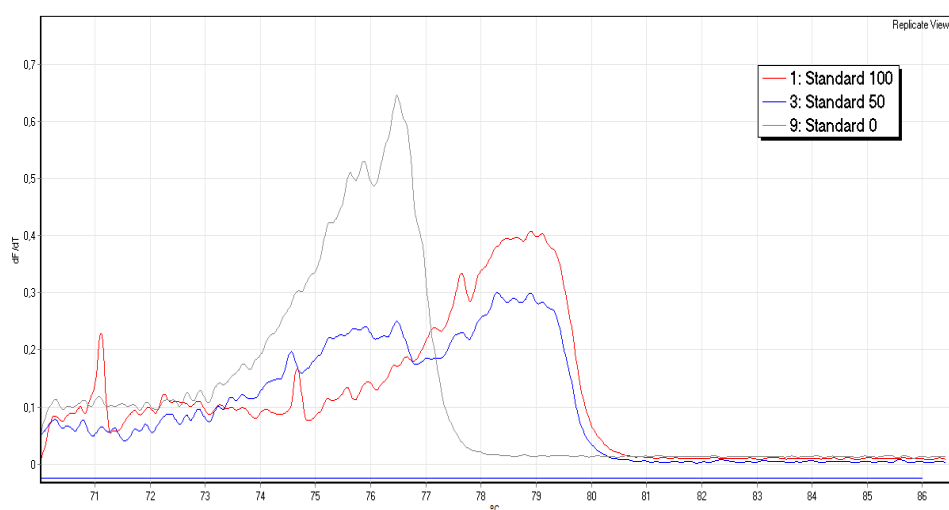


Abbildung 63: Ansicht $(-dF/dT)$ für die MS-HRM mit einer $T_a = 51\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 2 mM MgCl_2

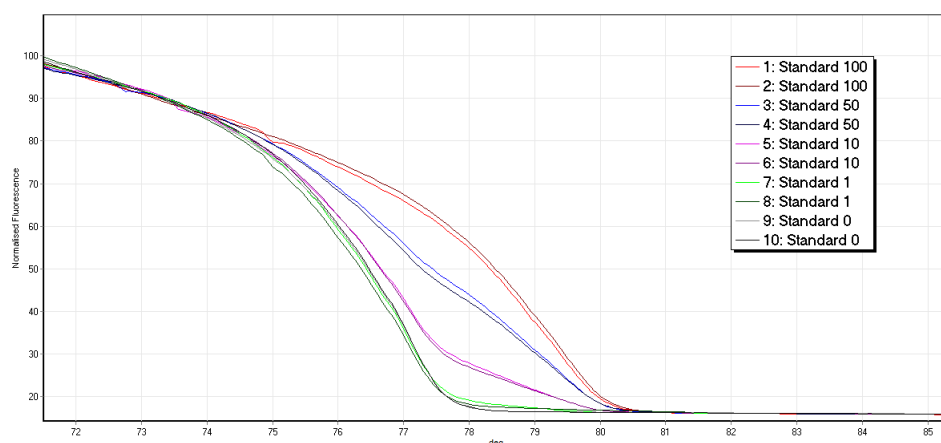


Abbildung 64: HRM nach Amplifikation mit den OSMR Primern bei einer $T_a = 51\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 4 mM MgCl_2

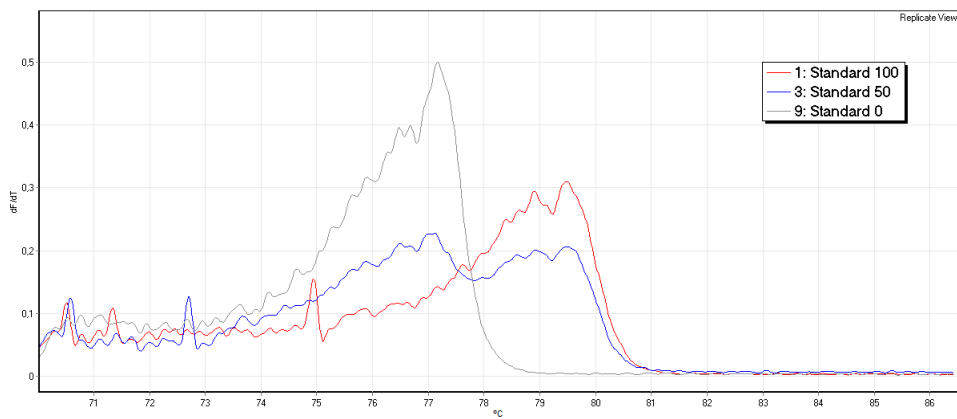


Abbildung 65: Ansicht ($-dF/dT$) für die MS-HRM mit einer $T_a = 51\text{ °C}$ und 4 mM MgCl_2

4.3.2 Optimierte Bedingungen die MS-HRM Methoden

Tabelle 13 gibt eine Übersicht über die für die MS-HRM Methoden optimierten Bedingungen, bei welchen der PCR-Bias annähernd eliminiert wurde.

Tabelle 13: Optimierte Bedingungen der MS-HRM Methoden mit den ausgewählten Primerpaaren

Primerpaar	c Primer pro Tube [nM]	T_a [°C]	c MgCl_2 pro Tube [mM]
APC Kontroll-Primer	500	53	2
HIC1 Primer1	250	53	2
DAPK1 Kontroll-Primer	250	57	3
OSMR Primer	250	51	4

Diese Bedingungen wurden bei allen weiteren Versuchen angewendet.

Die folgenden Abbildungen zeigen die bei den optimierten MS-HRM Versuchen erhaltenen Ergebnisse zu den jeweiligen Genen.

4.3.2.1 Optimierte MS-HRM mit den APC Kontroll-Primern

$T_a = 53\text{ }^{\circ}\text{C}$ $c [\text{Mg}^{2+}] = 2\text{ mM}$

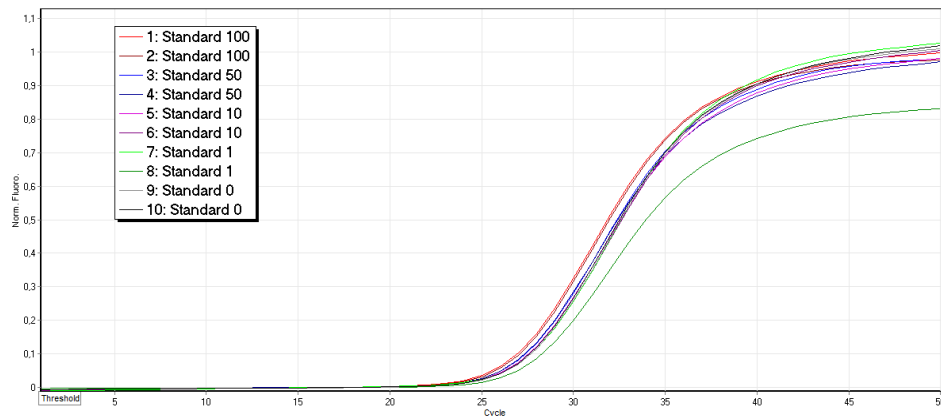


Abbildung 66: PCR-Amplifikation des APC-Gens unter optimierten Bedingungen

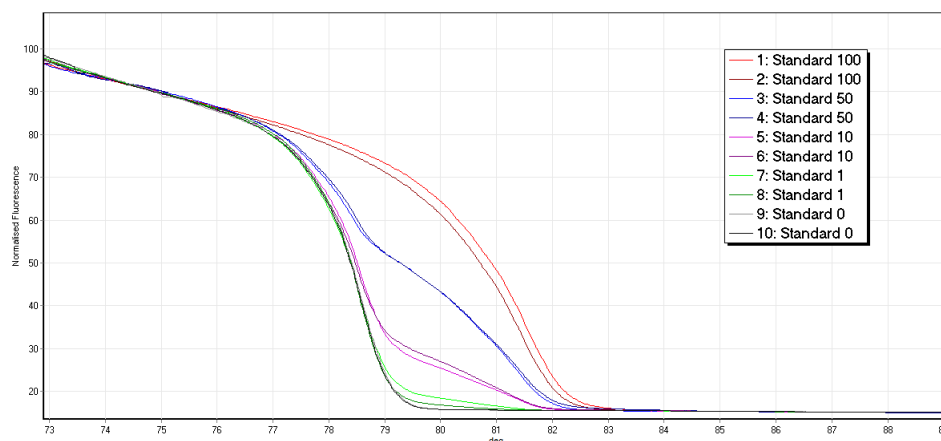


Abbildung 67: HRM Kurven des APC bei optimierten Bedingungen

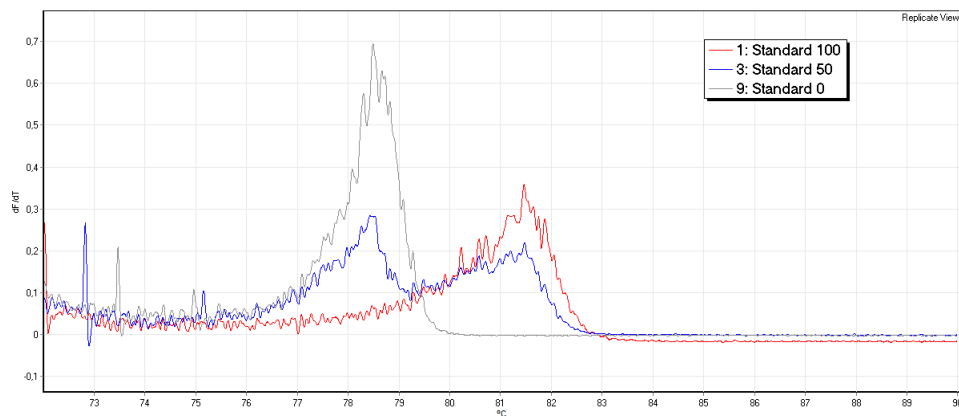


Abbildung 68: $(-dF/dT)$ Ansicht der Mittelwerte der Doppelbestimmungen der Standards 100, 50 und 0

4.3.2.2 Optimierte MS-HRM mit den HIC1 Primern1

$T_a = 53\text{ °C}$ $c [\text{Mg}^{2+}] = 2\text{ mM}$

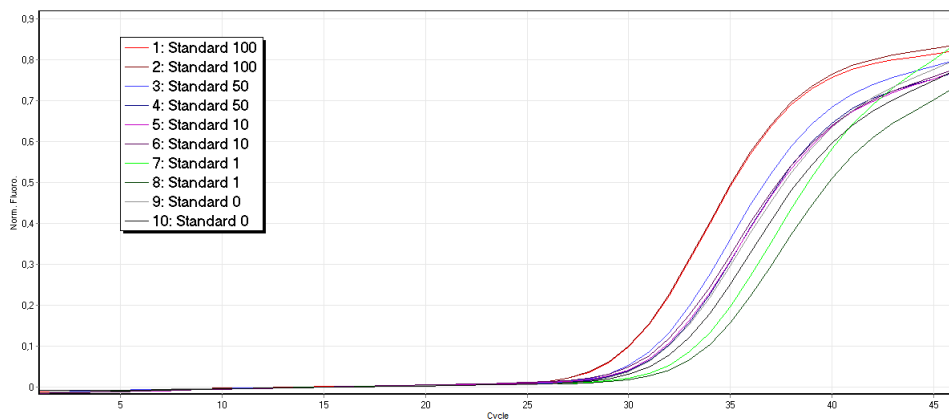


Abbildung 69: PCR-Amplifikation des HIC1-Gens unter optimierten Bedingungen

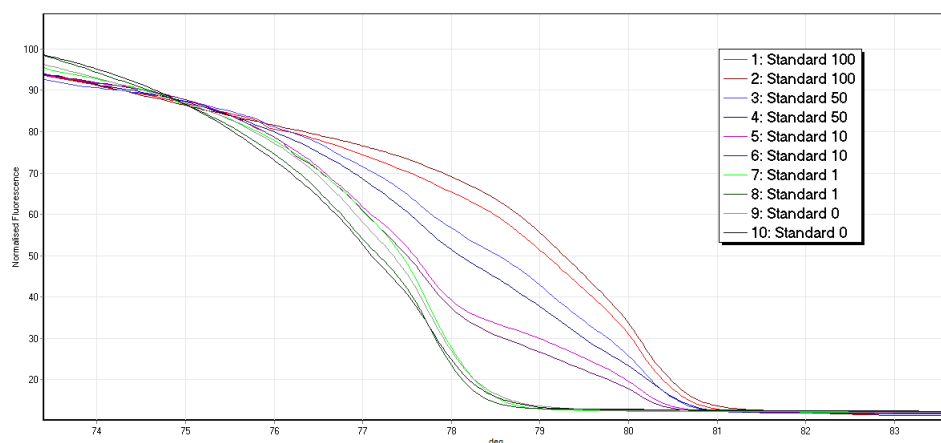


Abbildung 70: HRM Kurven des HIC1 bei optimierten Bedingungen

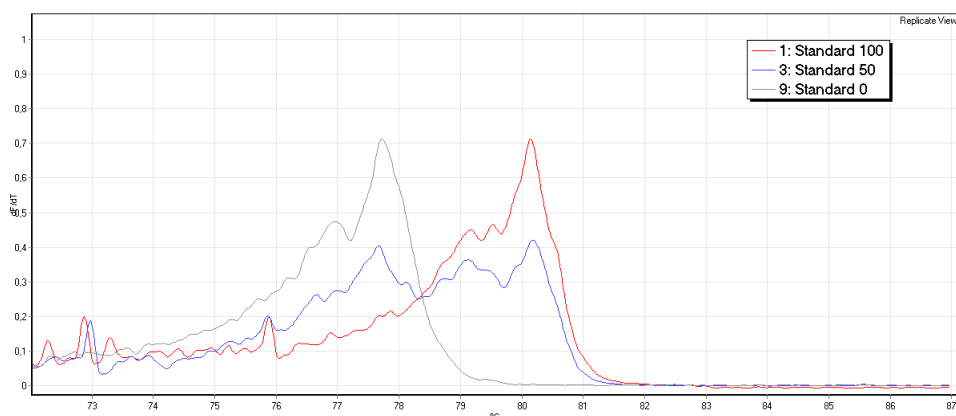


Abbildung 71: $(-dF/dT)$ Ansicht der Mittelwerte der Doppelbestimmungen der Standards 100, 50 und 0

4.3.2.3 Optimierte MS-HRM mit den DAPK1 Kontroll-Primern

$T_a = 57\text{ }^{\circ}\text{C}$ $c[\text{Mg}^{2+}] = 3\text{ mM}$

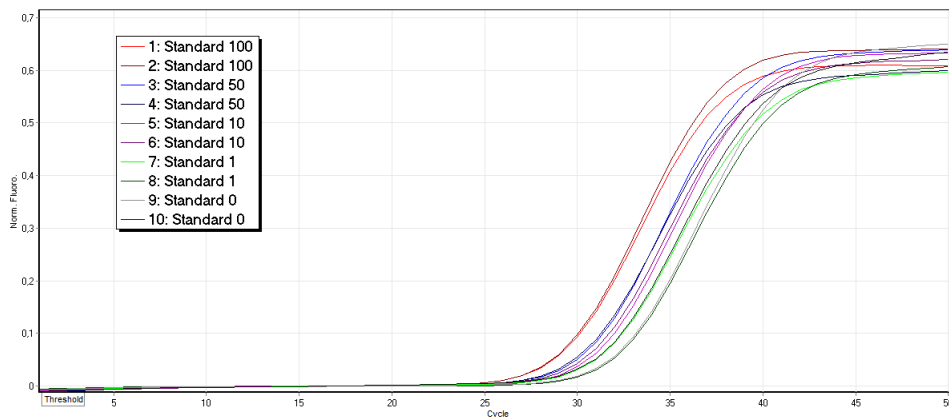


Abbildung 72: PCR-Amplifikation des DAPK1-Gens unter optimierten Bedingungen

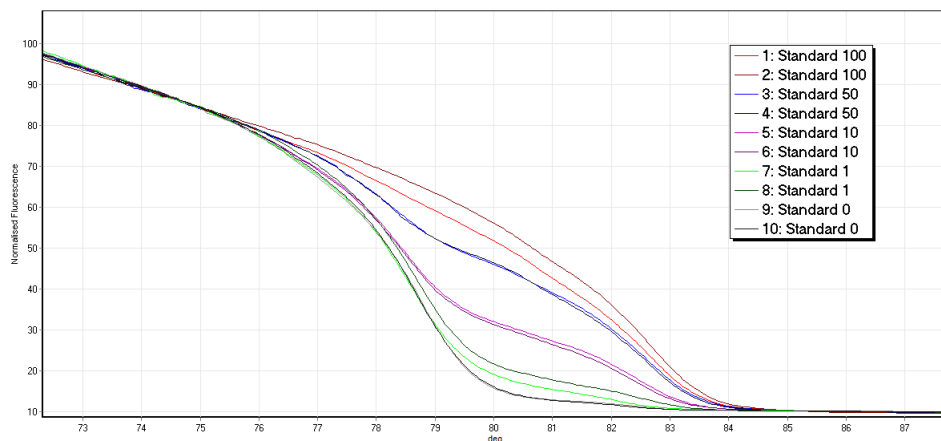


Abbildung 73: HRM Kurven des DAPK1 bei optimierten Bedingungen

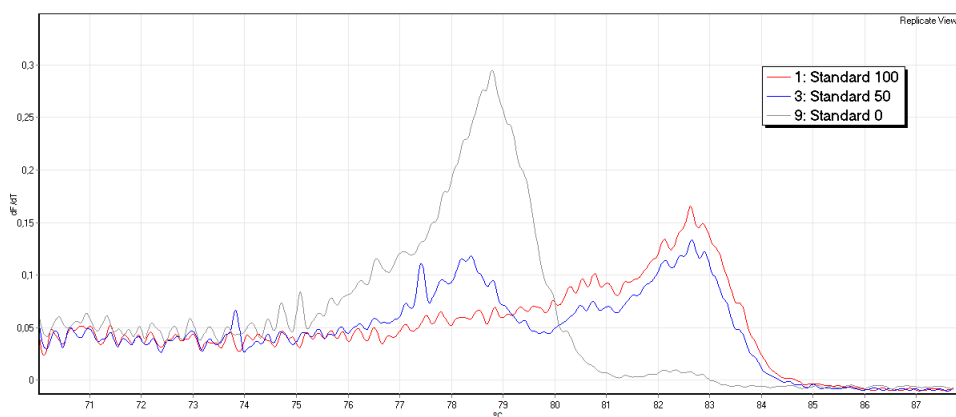


Abbildung 74: $(-dF/dT)$ Ansicht der Mittelwerte der Doppelbestimmungen der Standards 100, 50 und 0

4.3.2.4 Optimierte MS-HRM mit den OSMR Primern

$T_a = 51\text{ }^{\circ}\text{C}$ $c [\text{Mg}^{2+}] = 4\text{ mM}$

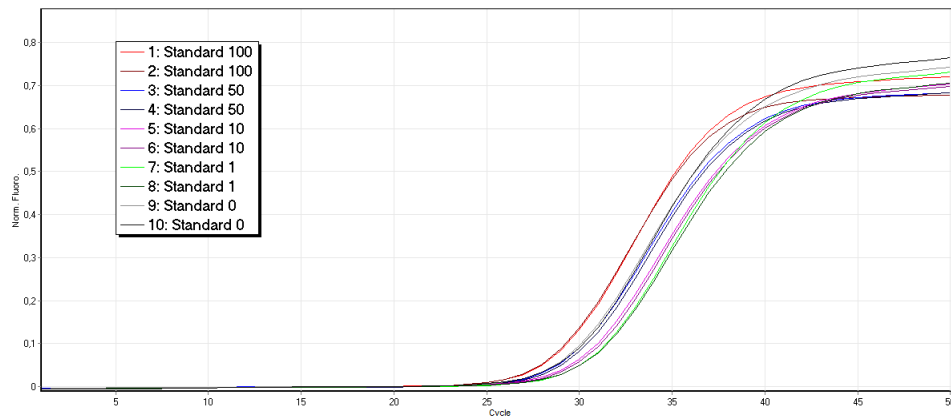


Abbildung 75: PCR-Amplifikation des OSMR-Gens unter optimierten Bedingungen

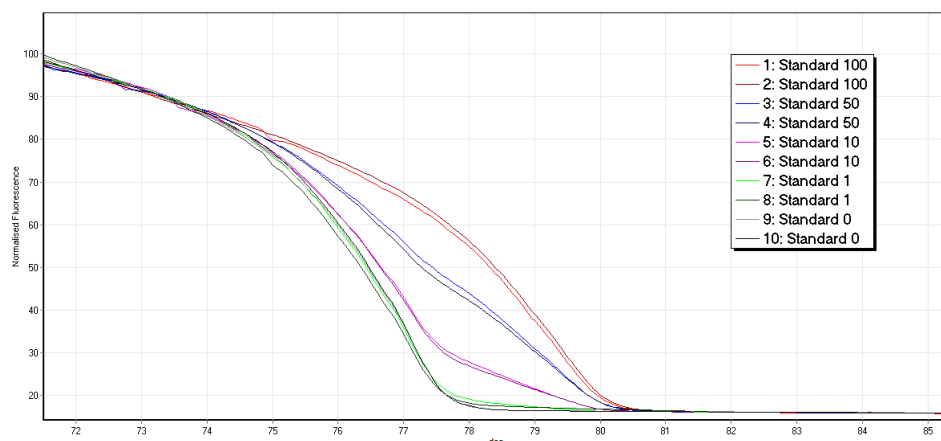


Abbildung 76: HRM Kurven des OSMR bei optimierten Bedingungen

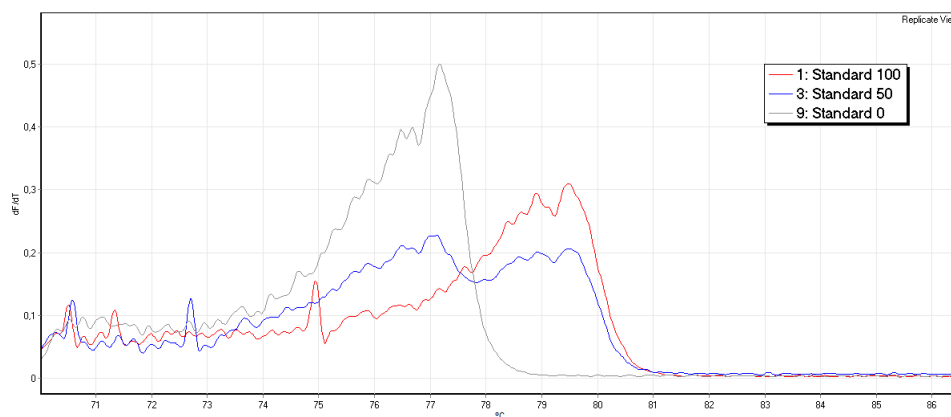


Abbildung 77: $(-dF/dT)$ Ansicht der Mittelwerte der Doppelbestimmungen der Standards 100, 50 und 0

4.4 MS-HRM von selbst bisulfitmodifizierten Standards

Nach der erfolgreichen Optimierung der PCR-Bedingungen für die verschiedenen Primer erfolgten die ersten Versuche mit DNA aus HT-29 Zellen. Die DNA der Zellen wurde extrahiert und anschließend bisulfitmodifiziert.

Als Kontrolle der erfolgreichen Bisulfitkonvertierung der DNA aus HT-29 Zellen wurde kommerzielle, vollständig unmethylierte, nicht bisulfitkonvertierte Standard-DNA ebenfalls selbst konvertiert. Die Ergebnisse der MS-HRM Analysen wurden mit denen der bereits beim Erwerb bisulfitmodifizierten vollständig unmethylierten DNA (Standard 0) verglichen. Die selbst bisulfitkonvertierten Proben wurden für die Messungen als „um X BK“ bezeichnet (s. Abschnitt 5.6, Tabelle 22). Die Konvertierung wurde zu Beginn immer an zwei Aliquoten pro Probe durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Methode zu prüfen.

Im Anschluss an die Bisulfitkonvertierung wurden mit den vier Primerpaaren MS-HRM Analysen durchgeführt. In allen Fällen wurde eine Abweichung der Schmelzprofile von den mit den kommerziell erhältlichen, bereits bisulfitkonvertierten Standards erhaltenen Schmelzkurven beobachtet. Abbildung 78 zeigt diese Verschiebung am Beispiel des OSMR-Gens.

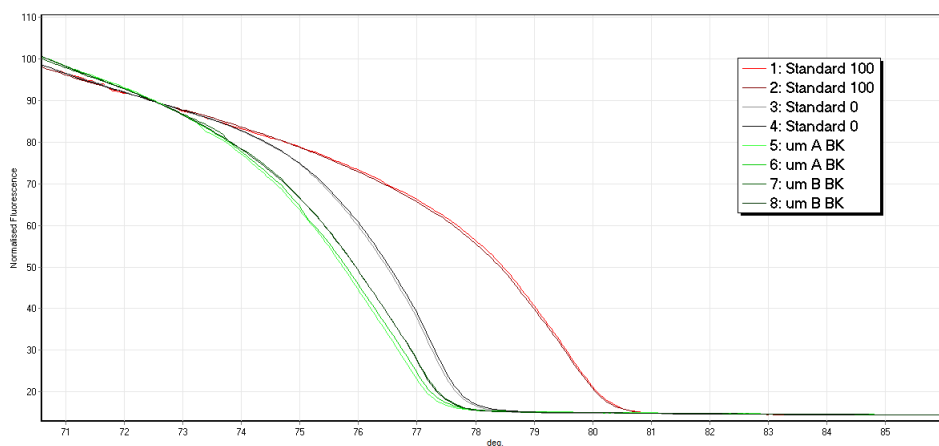


Abbildung 78: Abweichung der HRM Kurven der selbst bisulfitkonvertierten Proben „um A BK“ und „um B BK“ zum Standard 0 bei der MS-HRM am OSMR-Gen

Der letzte Schritt der selbst durchgeführten Bisulfitkonvertierung beinhaltet die Elution der DNA von einer Säule mit TrisCl-Puffer (s. Abschnitt 5.2.1). Die dabei erhaltene Konzentration der selbst konvertierten DNA im Puffer lag deutlich unter der Konzentration der kommerziell erworbenen, bereits bisulfitkonvertierten DNA. Es musste daher eine größere Menge der selbst hergestellten DNA-Lösung für die MS-HRM eingesetzt werden, um die gleiche Konzentration an DNA im PCR-Tube wie bei den bereits konvertierten DNA-Standards zu erhalten. Die

dadurch erhaltene unterschiedliche TrisCl-Konzentration in den Tubes hätte der für diese Kurvenverschiebung auslösende Faktor sein können.

Im nächsten Versuch wurde daher die Puffer-Konzentration erhöht (Standard 0 +TrisCl), um die Auswirkungen auf die Schmelzkurve zu beobachten. Als Vergleich wurden erneut Kurven des Standards 0 ohne TrisCl-Ausgleich, sowie der selbst bisulfitkonvertierten unmethylierten DNA herangezogen (Abbildung 79).

Die Erhöhung der TrisCl-Konzentration führte zu einer Veränderung der Kurvenform und einer Verschiebung der Kurve zu höheren Schmelztemperaturen und konnte daher als Grund für die gefundene Abweichung ausgeschlossen werden.

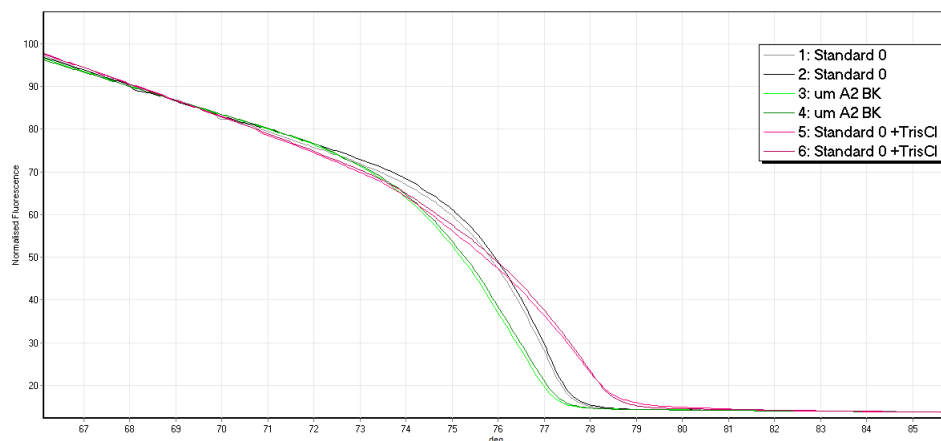


Abbildung 79: HRM des selbst konvertierten Standards „um A2 BK“, des Standards 0 und des Standards 0 mit erhöhter TrisCl-Konzentration im PCR-Tube an einer Messung des OSMR-Gens

Als nächstes wurde geprüft, ob Reste von Ethanol, welches in der Probenaufreinigung nach der Bisulfitkonvertierung benutzt wird, zu einer Verschiebung der T_m in Richtung geringerer Temperaturen führen können. Die Abdampfzeit des Ethanols bei 56 °C im Trockenschrank vor der Rückgewinnung der DNA (s. Abschnitt 5.2.1) wurde daher bei den nächsten Versuchen von 5 min auf 15 min erhöht. Dadurch erfolgte eine eindeutige Verbesserung der Ergebnisse. Dennoch stimmten die Schmelzkurven der kommerziell erhältlichen, bereits bisulfitkonvertierten unmethylierten Standards mit denen der selbst bisulfitkonvertierten unmethylierten nicht vollständig überein (Abbildung 80).

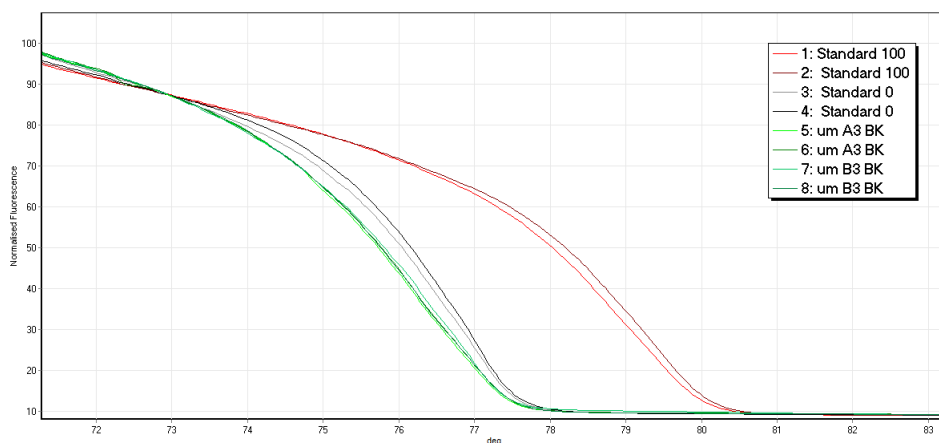


Abbildung 80: HRM der selbst bisulfitekonzertierten Proben nach längerem Abdampfen von EtOH im Aufreinigungsschritt der Bisulfitekonzertierung

Auch eine weitere Verlängerung der Abdampfdauer auf 25 min führte nicht zu einer vollständigen Überlappung der Schmelzkurven.

Obwohl die von Qiagen erworbenen, bereits bisulfitemodifizierten Standards mit der selben Methode konvertiert werden, wie sie auch im EpiTect Bisulfite Kit von Qiagen zum Einsatz kommt, konnten diese Abweichungen nicht kompensiert werden und traten auch für den methylierten Standard auf (Abbildung 81).

Da dies zu fehlerhaften Ergebnissen bei der Analyse von selbst bisulfitekonzertierter DNA aus Zellproben führen könnte, wurden in der Folge nur selbst konvertierte methylierte und unmethylierte Standards verwendet.

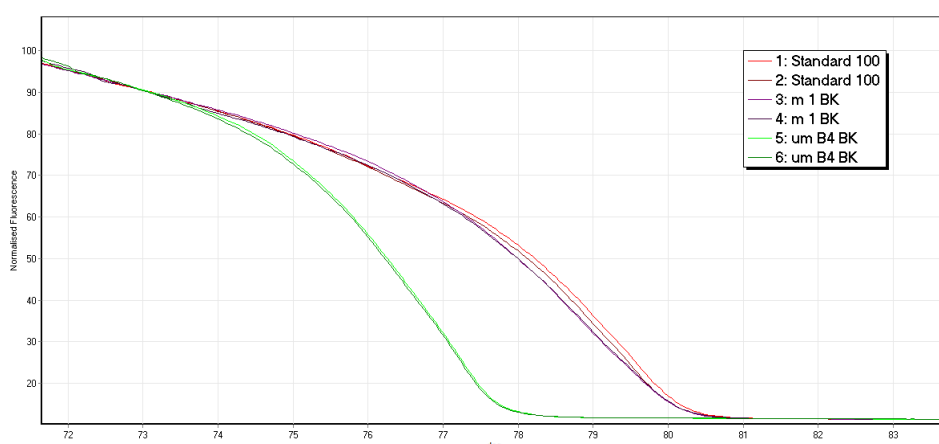


Abbildung 81: HRM des erworbenen, bereits bisulfitekonzertierten Standards 100 und des selbst konvertierten 100% methylierten Standards für das OSMR-Gen

Die Analyse einer Standardreihe aus den selbst konvertierten Proben wurde unter den für die jeweiligen Primer optimierten Bedingungen durchgeführt. Da die Ergebnisse denen ähnlich waren, die mit erworbenen, bereits modifizierten Standards erhalten wurden, konnten die

Annealing-Temperaturen und MgCl_2 -Konzentrationen ohne erneute Optimierung angewendet werden.

Die Abbildungen 82 und 83 zeigen die Ergebnisse einer Messung der Standardreihe der selbst modifizierten Standards für den DAPK1 Kontroll-Primer (vergleiche Abschnitt 4.3.2.3; Abbildungen 73 und 74).

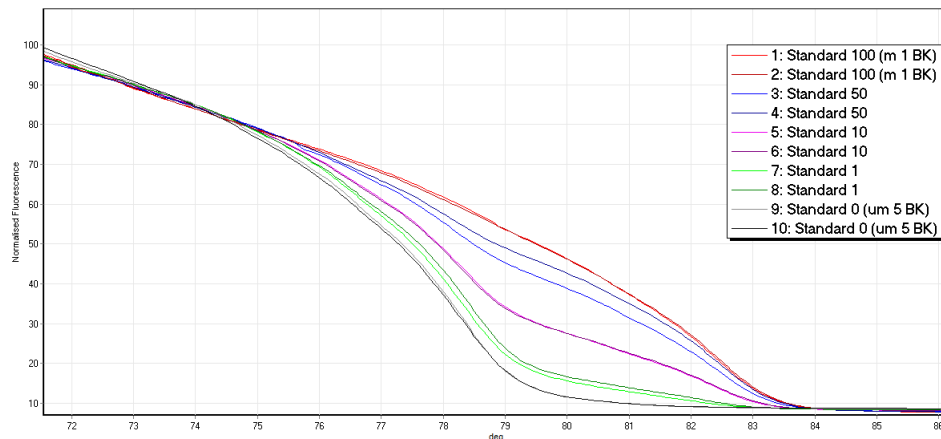


Abbildung 82: HRM nach Amplifikation mit den DAPK1 Kontroll-Primern bei optimierten Bedingungen mit den selbst konvertierten Standards

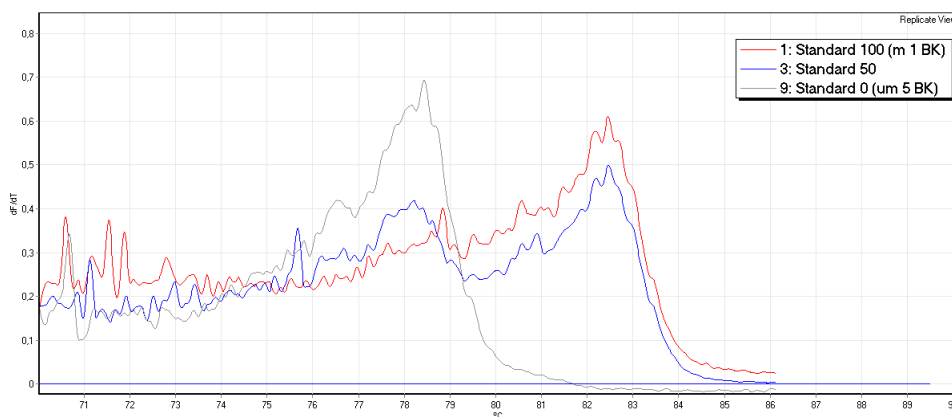


Abbildung 83: $(-dF/dT)$ Ansicht der Mittelwerte der Doppelbestimmungen der Standards 100, 50 und 0

4.5 MS-HRM der DNA aus unbehandelten HT-29 Zellen

Die Zellkultur der HT-29 Zellen erfolgte in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-Medium) mit einem Zusatz von 10 Vol% fötalem Kälberserum (FKS) und 1 Vol% Penicillin/Streptomycin (P/S) Gemisch. Die Passage der Zellen in ein neues Nährmedium

erfolgte alle drei bis fünf Tage, um ein Zellwachstum in Monolagen zu gewährleisten (s. Abschnitt 5.3).

Die DNA-Extraktion zweier Proben aus den HT-29 Zellen (Proben 1_1 und 1_2, s. Abschnitt 5.6, Tabelle 23) erfolgte mit dem QIAamp DNA Mini Kit von Qiagen (s. Abschnitt 5.4). Die Konzentration der erhaltenen DNA-Lösung wurde mittels Nanodrop-Messung festgestellt (s. Abschnitt 5.5). Die Bisulfitkonvertierung der Proben wurde mit dem EpiTect Bisulfite Kit von Qiagen durchgeführt (s. Abschnitt 5.2). Für beide Proben der HT-29 Zellen wurden dabei Konvertierungen von mehreren Aliquoten durchgeführt (Proben 1_1A BK, 1_1B BK, 1_2A BK, 1_2B BK; s. Abschnitt 5.6, Tabelle 23). Dadurch sollte die Reproduzierbarkeit der Bisulfitkonvertierung geprüft werden. Die Abbildungen 84 und 85 zeigen, dass für Proben aus unterschiedlichen Ansätzen bei der Bisulfitkonvertierung sehr ähnliche Schmelzkurven erhalten wurden. Diese Ergebnisse lassen auf eine hohe Reproduzierbarkeit der Bisulfitkonvertierung schließen.

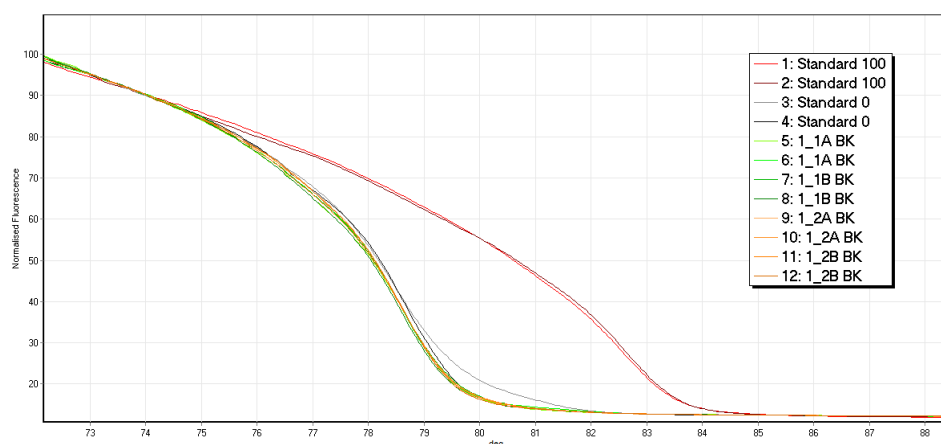


Abbildung 84: HRM der DNA aus HT-29 Zellen nach Amplifikation mit den HIC1 Primern1

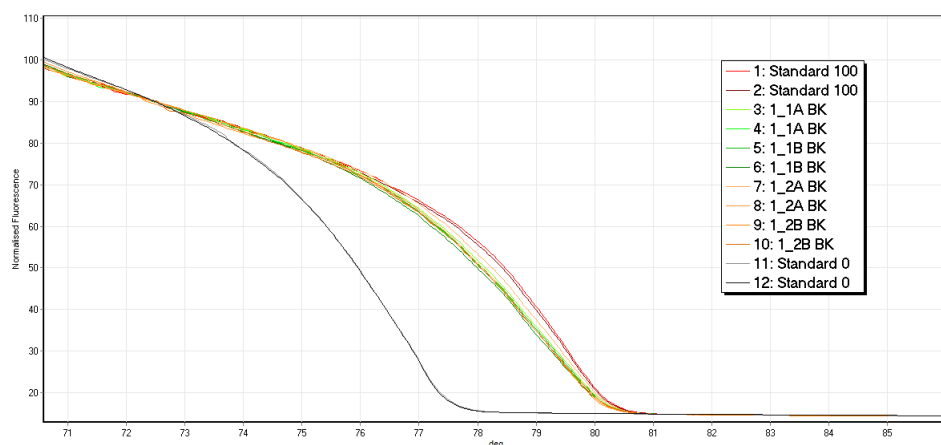


Abbildung 85: HRM der DNA aus HT-29 Zellen nach Amplifikation mit den OSMR Primern

4.5.1 Methylierungsgrad der Promotorregion der ausgewählten Gene in HT-29 Zellen

Der Methylierungsgrad der ausgewählten Gene in HT-29 Zellen wurde mit den entwickelten MS-HRM Methoden bestimmt.

Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der selbst bisulfitkonvertierten DNA-Standards. Zu diesem Zweck werden die Ergebnisse der MS-HRM als Differentialkurven auf den Standard 0 bezogen (s. Abschnitt 3.2.3).

4.5.1.1 APC

Die HT-29 Zellen zeigen keine Methylierung in der Promotorregion des APC-Gens (Abbildungen 86 und 87).

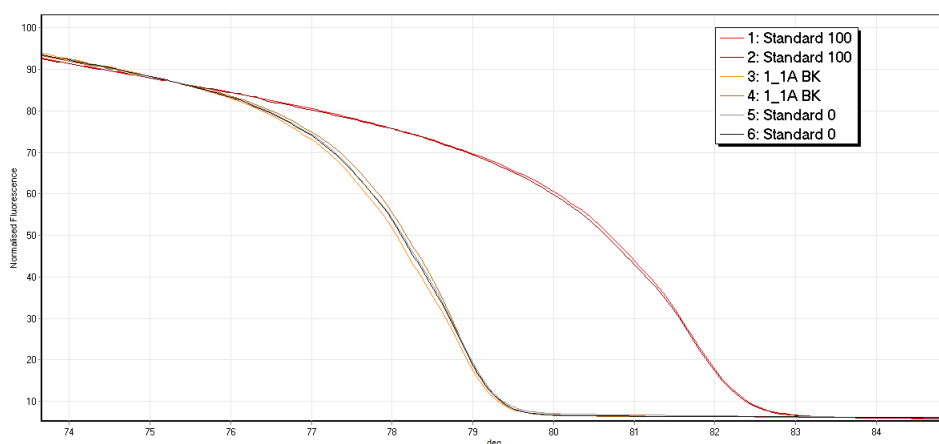


Abbildung 86: HRM der DNA aus unbehandelten HT-29 Zellen nach Amplifikation mit den APC Kontroll-Primern

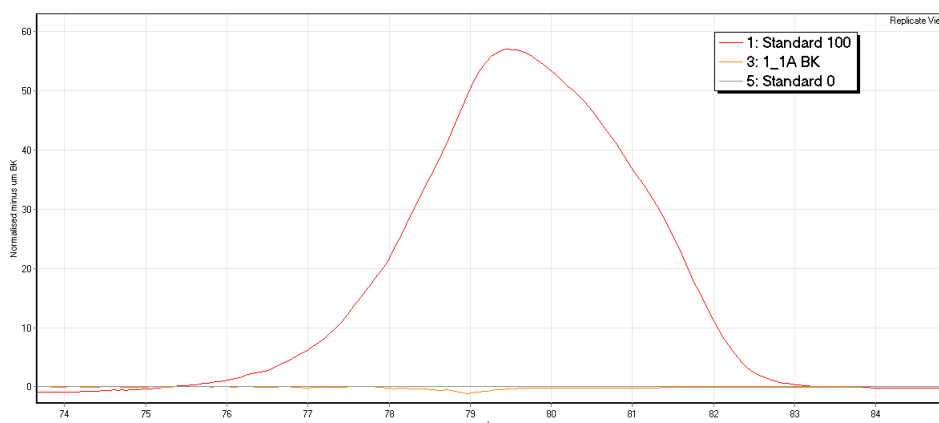


Abbildung 87: Differentialkurven der HT-29 Zell-DNA für das APC-Gen

4.5.1.2 HIC1

Im Laufe der Arbeit mit den Primern „HIC1 Primer1 f2“ und „HIC1 Primer1 b“ erfolgte eine deutliche Verschlechterung der Ergebnisse. Gegen Ende dieser Arbeit wurde bei den MS-HRM Messungen trotz optimierter Bedingungen ein starker umgekehrter Bias in Richtung der CG-reichen Template beobachtet. Die genaue Bestimmung des Methylierungsgrades von stark methylierten Sequenzen war daher nicht mehr möglich.

Der Grund für diese Entwicklung konnte nicht eruiert werden und trotz mehrerer Versuche konnte der Bias nicht eliminiert werden. Diese MS-HRM Methode wurde daher als nicht robuste Methode eingestuft und nicht mehr angewandt.

Aus diesem Grund wurden zur Bestimmung des Methylierungsgrades Ergebnisse herangezogen, welche zu einem früheren Zeitpunkt mit kommerziellen, bereits bisulfatkonvertierten Standards durchgeführt worden waren.

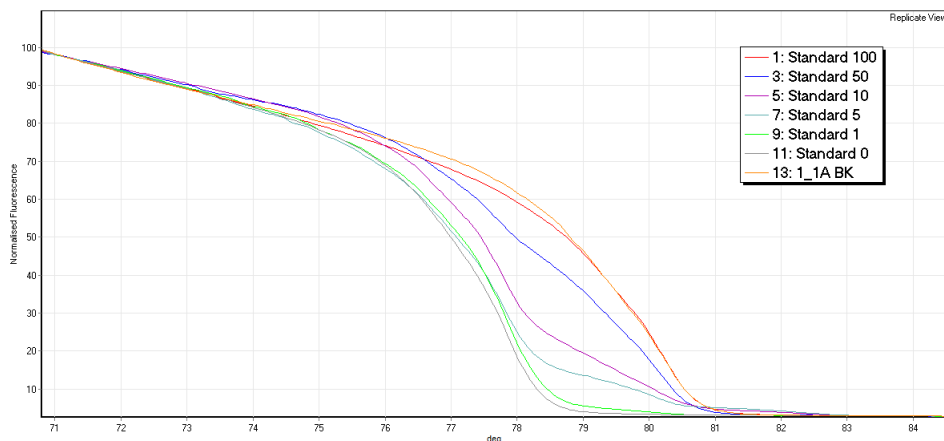


Abbildung 88: HRM der DNA aus unbehandelten HT-29 Zellen nach Amplifikation mit den HIC1 Primern1

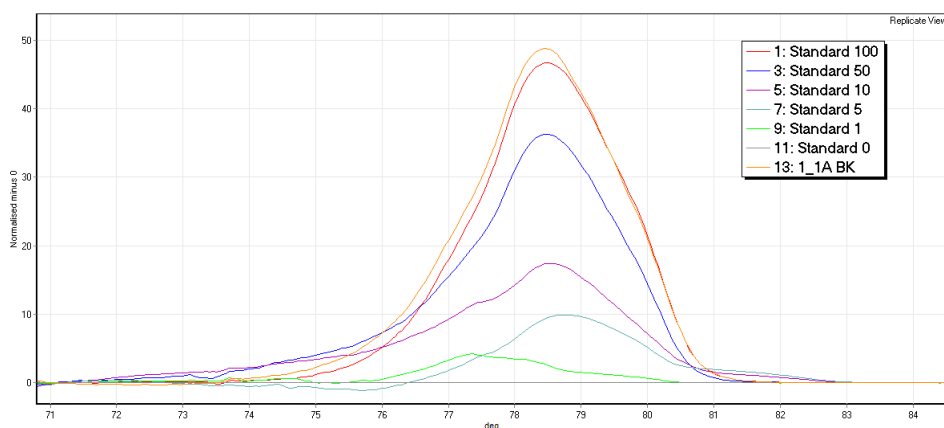


Abbildung 89: Differentialkurven der HT-29 Zell-DNA für das HIC1-Gen

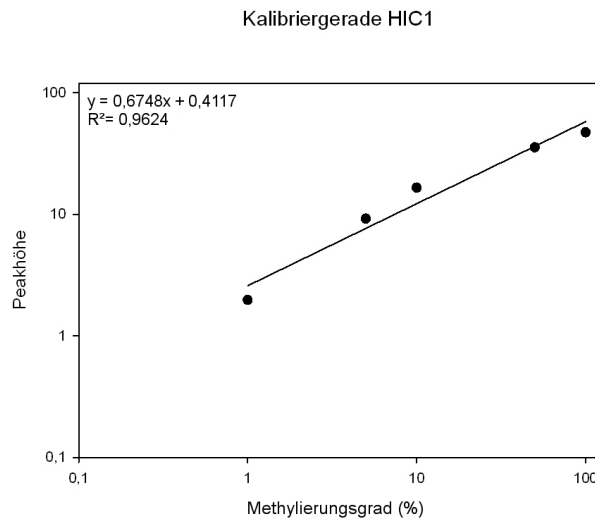


Abbildung 90: Kalibriergerade der MS-HRM für HIC1

Die Ergebnisse lassen auf einen Methylierungsgrad von 100% schließen.

4.5.1.3 DAPK1

In der Promotorregion des DAPK1-Gens der HT-29 Zellen konnte keine Methylierung festgestellt werden (Abbildungen 91 und 92).

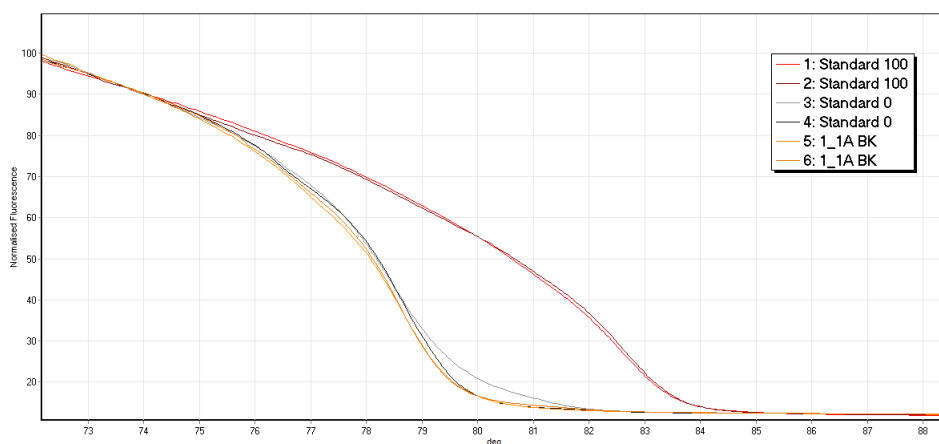


Abbildung 91: HRM der DNA aus unbehandelten HT-29 Zellen nach Amplifikation mit den DAPK1 Kontroll-Primern

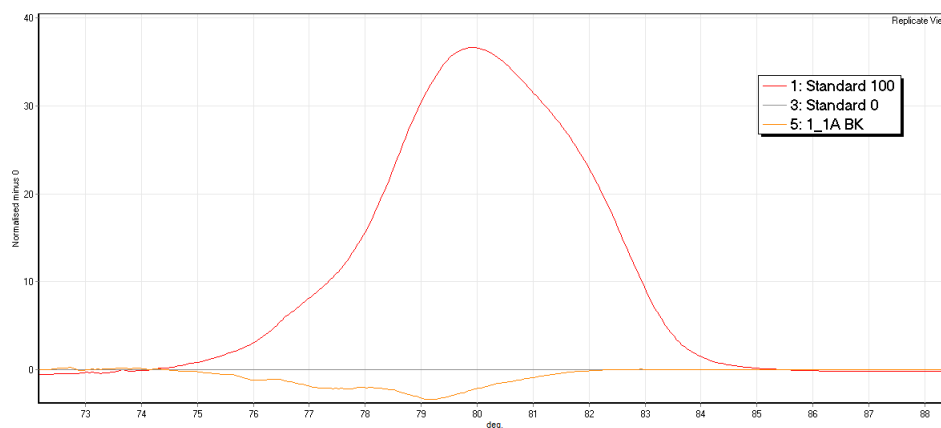


Abbildung 92: Differentialkurven der HT-29 Zell-DNA für das DAPK1-Gen

4.5.1.4 OSMR

Die Abbildungen 93 und 94 lassen auf einen Methylierungsgrad des OSMR-Gens von unter 100% schließen.

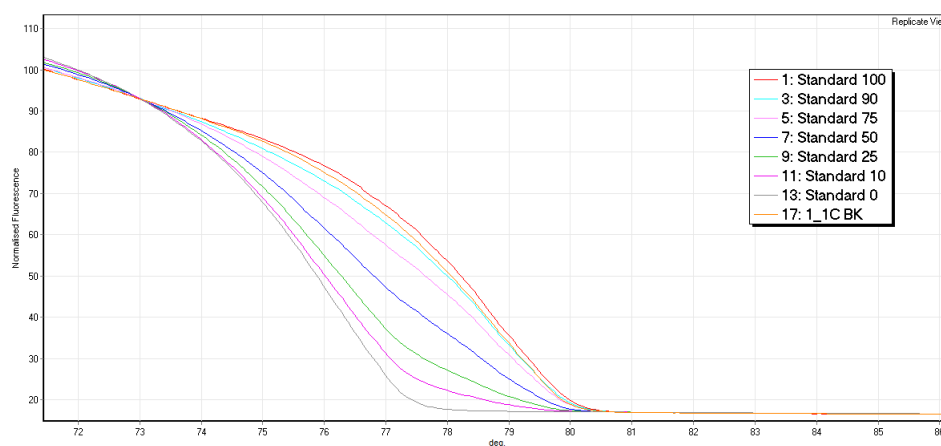


Abbildung 93: HRM der DNA aus unbehandelten HT-29 Zellen nach Amplifikation mit den OSMR Primern

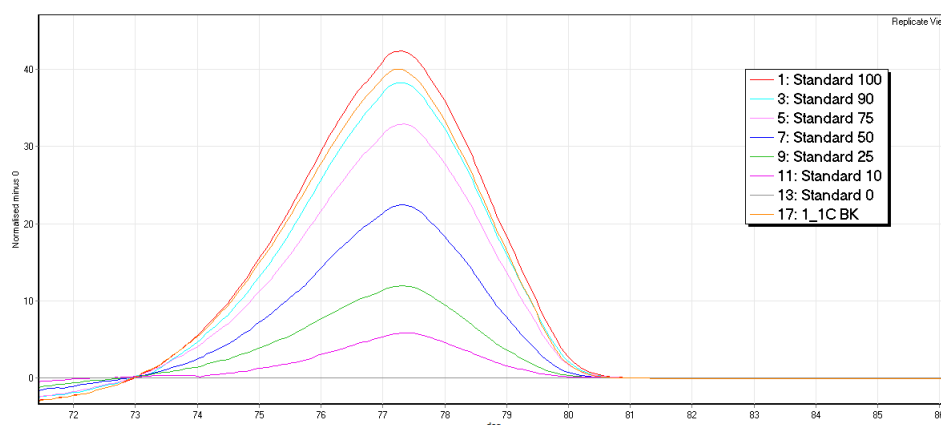


Abbildung 94: Differentialkurven der HT-29 Zell-DNA für das OSMR-Gen

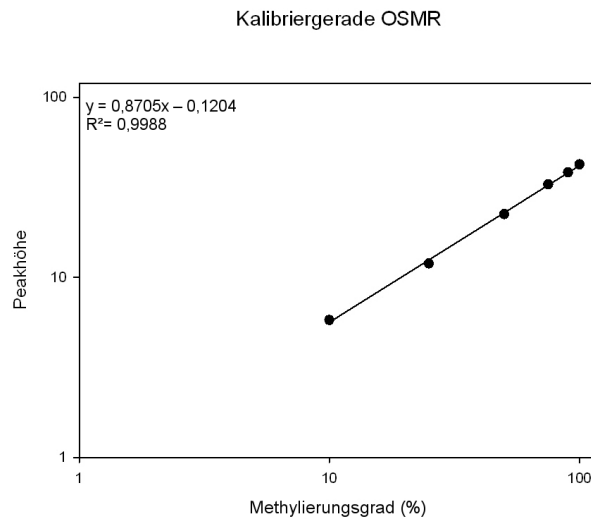


Abbildung 95: Kalibriergerade der MS-HRM für OSMR

Mittels der erhaltenen Geradengleichung (Abbildung 95) wurde ein Methylierungsgrad von 95% für die Promotorregion des OSMR-Gens in den HT-29 Zellen ermittelt.

4.6 Inkubationsversuche mit HT-29 Zellen

Um eine Anwendungsmöglichkeit der entwickelten Methoden zu demonstrieren, sollte ein Screening der Auswirkungen verschiedener Lebensmittelinhaltsstoffe und einiger Lebensmittelkontaminanten auf den DNA-Methylierungsstatus der HT-29 Zelllinie von Kolonkrebszellen durchgeführt werden. Die Auswahl der Substanzen erfolgte über die bereits bekannte Einflussnahme auf andere Gensequenzen, oder den Verdacht der positiven oder negativen Beeinflussung der allgemeinen Krebsinzidenz (s. Abschnitt 1.3).

5-Aza-2'-Desoxycytidin (5-Aza-2dC) wurde verwendet, um die Senkung des Methylierungsstatus bei den für diese Arbeit ausgewählten Genen zu beobachten, und mittels methylierungs-sensitiver hochauflösender Schmelzkurvenanalyse das Ausmaß der Änderung zu bestimmen.

Weiters wurden aus den drei Substanzklassen der heterozyklischen aromatischen Amine, der Lignane und der Mykotoxine je zwei bekannte Vertreter für die Versuche ausgewählt.

Ein eventueller Einfluss der Substanzen auf Krebszellen wurde durch Inkubation von lebenden Zellen mit Nährmedium, welchem die jeweilige Verbindung in gewissen Konzentrationen zugesetzt wurde, beobachtet. Die für die Arbeit ausgewählten Gene wurden sowohl bei

unbehandelten, als auch bei inkubierten Zellen mittels MS-HRM auf ihren Promotormethylierungsgrad untersucht.

Da es sich bei Zellen um ein lebendes System handelt, welches sich beim Durchlaufen mehrerer Zellzyklen auch verändern kann, sind Schwankungen in den Ergebnissen der einzelnen Inkubationsversuche zu erwarten. Daher ist es notwendig, die selben Inkubationsversuche mehrmals an unterschiedlichen Einzelkulturen der selben Zelllinie durchzuführen, um die Ergebnisse abzusichern.

Der vordergründige Zweck der Zellinkubation war es, die Anwendbarkeit der entwickelten Methoden für die Quantifizierung der Änderungen im Methylierungsgrad von Proben aus realen Systemen zu zeigen. Ein weiteres Ziel war ein Screening nach Substanzen, welche eine Methylierung oder Demethylierung in den ausgewählten Genen bewirken.

4.6.1 Inkubation mit 5-Aza-2dC

Die Substanz 5-Aza-2dC bewirkt generell eine Verringerung des Methylierungsstatus von Gensequenzen (s. Abschnitt 1.4.1). In der vorliegenden Arbeit wurde die Inkubation mit 1 μ M (Probe 2A_BK, s. Abschnitt 5.6, Tabelle 23) und 5 μ M (Probe 3A_BK) 5-Aza-2dC, gelöst in PBS, und mit dem Lösungsmittel PBS (Probe 4A_BK) für 96h durchgeführt.

4.6.1.1 Abnahme des Methylierungsgrades im HIC1-Promotor

Die Inkubation der Zellen mit 5-Aza-2dC führte in der Promotorregion des Gens HIC1 zu einer deutlichen Verringerung des Methylierungsgrades (Abbildungen 96 und 97).

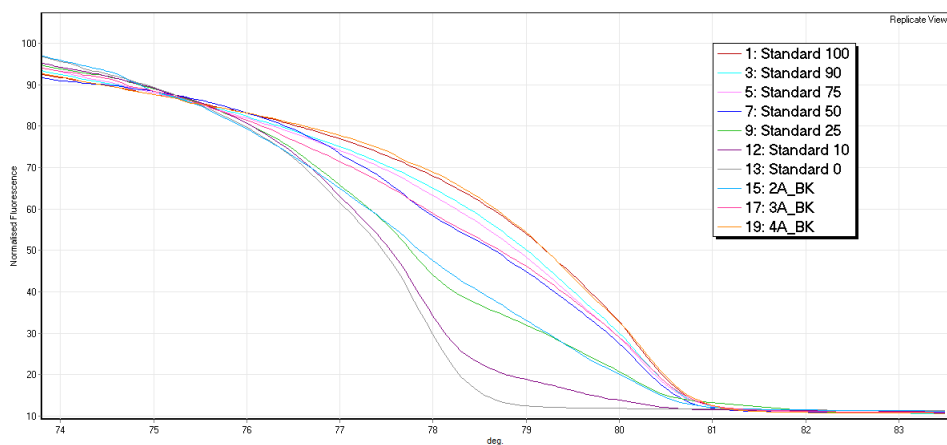


Abbildung 96: HRM einer Standardreihe und der DNA aus mit 5-Aza-2-dC inkubierten HT-29 Zellen nach der Amplifikation mit den HIC1 Primern I

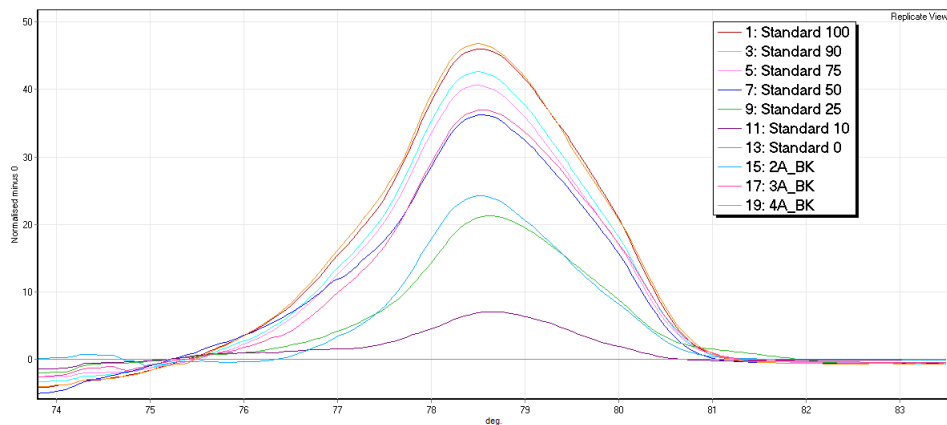


Abbildung 97: Differentialkurven der Standardreihe und der Zell-DNA für das HIC1-Gen

Kalibriergerade HIC1

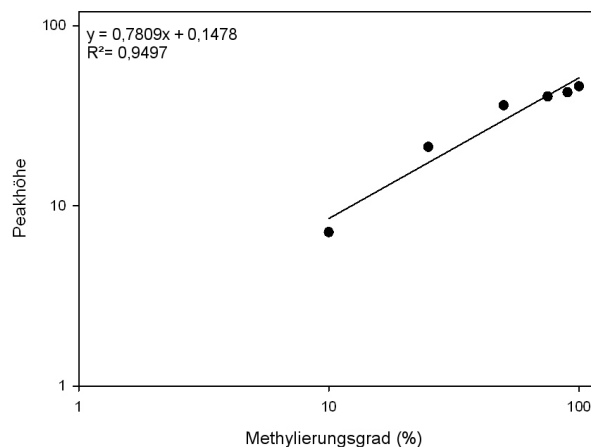


Abbildung 98: Kalibriergerade der MS-HRM für HIC1

In den mit 1 μ M 5-Aza-2dC inkubierten Zellen wurde eine stärkere Abnahme des Methylierungsgrades beobachtet als in jenen, die mit 5 μ M 5-Aza-2dC behandelt wurden. Dieses

Ergebnis ist wahrscheinlich auf die Zytotoxizität der Substanz zurückzuführen. Nach der Aufnahme durch die Zellen sterben diese ab und die Weitergabe des Methylierungsmusters auf die Tochterzellen ist dadurch nicht mehr möglich.

Die Auswertung erfolgte über die Gleichung der erhaltenen Kalibriergerade aus Abbildung 98.

Tabelle 14: Ergebnisse der Inkubation mit 5-Aza-2dC für das Gen HIC1

Probe	Konzentration [μM]	Methylierungsgrad [%]
2A_BK	1	38
3A_BK	5	65
4A_BK	0 (PBS)	89

Die Probe 4A_BK zeigt in der HRM Darstellung (Abbildung 96) einen Methylierungsgrad von 100%. Dieses Ergebnis wurde auch für die DNA aus unbehandelten HT-29 Zellen erhalten. Die Abweichung zum aus der Geradengleichung berechneten Ergebnis kann durch das Auftreten der ersten Probleme im Bezug auf die Robustheit der Methode (s. Abschnitt 4.5.1.2), und des relativ niedrigen Korrelationskoeffizienten von 0,9497 erklärt werden.

4.6.1.2 Abnahme des Methylierungsgrades im OSMR-Promotor

Auch für den Promotor des OSMR-Gens konnte eine Verringerung der Methylierung als Folge der Inkubation mit 5-Aza-2dC beobachtet werden (Abbildungen 99 und 100).

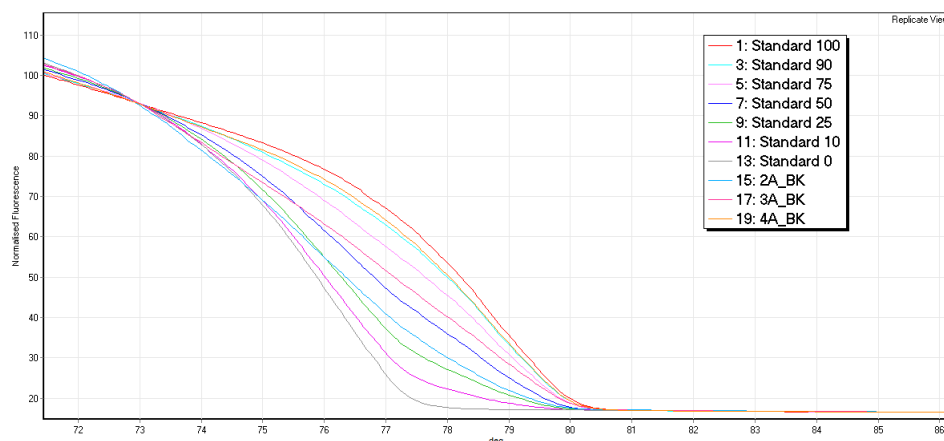


Abbildung 99: HRM einer Standardreihe und der DNA aus mit 5-Aza-2-dC inkubierten HT-29 Zellen nach der Amplifikation mit den OSMR Primern

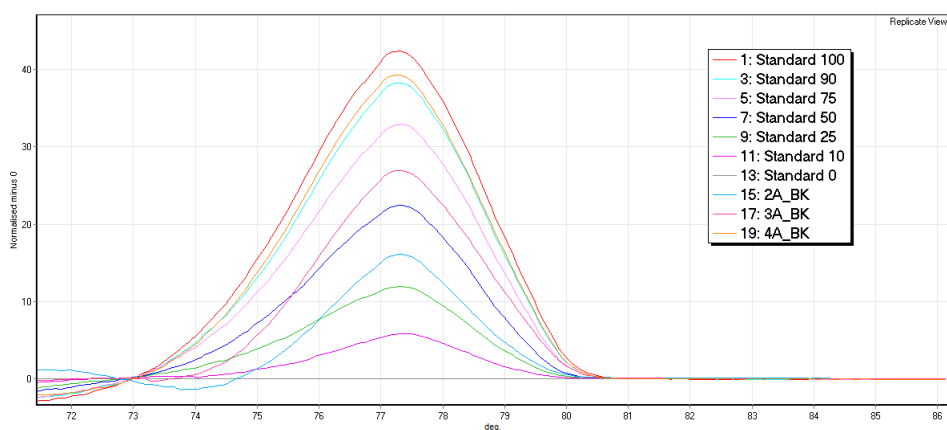


Abbildung 100: Differentialkurven der Standardreihe und der Zell-DNA für das OSMR-Gen

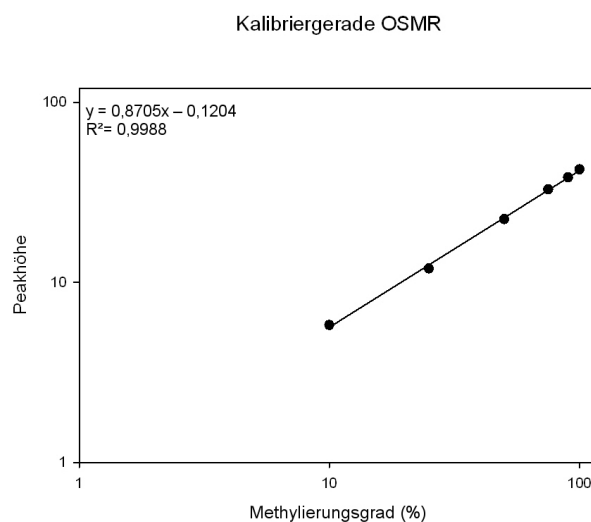


Abbildung 101: Kalibriergerade der MS-HRM für OSMR

Die Auswertung mittels der Geradengleichung der Kalibriergerade aus Abbildung 101 ergab folgende Werte für den Methylierungsgrad der Proben:

Tabelle 15: Ergebnisse der Inkubation mit 5-Aza-2dC für das Gen OSMR

Probe	Konzentration [μM]	Methylierungsgrad [%]
2A_BK	1	33
3A_BK	5	60
4A_BK	0 (PBS)	93

4.6.1.3 Ergebnisse der Inkubation für APC und DAPK1

Obwohl nur die Gene HIC1 und OSMR eine Promotormethylierung in den HT-29 Zellen aufwiesen, wurde die aus den mit 5-Aza-2dC behandelten Zellen extrahierte DNA auch mit den für die Gene APC und DAPK1 entwickelten MS-HRM Methoden analysiert. Erwartungsgemäß erfolgte hier keine Veränderung der Promotormethylierung.

4.6.2 Inkubation mit ausgewählten Substanzen

Die Inkubation der Zellen mit den Substanzen erfolgte in einem ersten Schritt mit Konzentrationen von je 1 μM und 5 μM , wobei die Versuche mit den Verbindungen der gleichen Substanzklasse parallel durchgeführt wurden. Da die Zellen als lebendes System sich immer weiter verändern können, wurde jedesmal ein Kontrollversuch mit dem verwendeten Lösungsmittel durchgeführt.

In weiteren Versuchen wurden die Konzentrationen auf 10 μM , 50 μM und 100 μM erhöht. Aus Zeitgründen wurde der Methylierungsgrad des APC-Gens bei diesen Versuchen nicht bestimmt. Aufgrund der mangelnden Robustheit der MS-HRM Methode für HIC1 konnte der Einfluss der Substanzen auf den Methylierungsgrad des Gens nicht ermittelt werden.

4.6.2.1 Ergebnisse der MS-HRM zu den Substanzinkubationen

Die Tabellen 16 und 17 geben eine Übersicht der Ergebnisse der Inkubationsversuche.

Dabei steht das Kürzel „k.Ä.“ für keine Änderung des Methylierungsgrades (Änderung < 1%), während „n.d.“ nicht durchgeführte Bestimmungen kennzeichnet.

**Tabelle 16: Ergebnisse der Inkubationsversuche mit niedrigen Konzentrationen der Testsubstanzen;
k.Ä.= keine Änderung, n.d.= nicht durchgeführt**

Substanz	Konzentration [µM]	APC	HIC1	DAPK1	OSMR
HT-29 unbehandelt	-	0%	100%	0%	95%
5-Aza-2-dC	5	k.Ä.	65%	k.Ä.	60%
	1	k.Ä.	38%	k.Ä.	33%
	0 (PBS)	k.Ä.	100%	k.s.Ä.	93%
PhIP	5	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.
	1	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.
MeIQx	5	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.
	1	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.
	0 (DMSO)	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.
(+) -Lariciresinol	5	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.
	1	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.
(-) -Matairesinol	5	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.
	1	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.
	0 (DMSO)	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.
DON	5	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.
	1	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.
ZON	5	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.
	1	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.
	0 (DMSO)	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.	k.Ä.

**Tabelle 17: Ergebnisse der Inkubationsversuche mit höheren Konzentrationen der Testsubstanzen;
k.Ä.= keine Änderung, n.d.= nicht durchgeführt**

Substanz	Konzentration [µM]	APC	HIC1	DAPK1	OSMR
PhIP	100	n.d.	n.d.	k.Ä.	k.Ä.
	50	n.d.	n.d.	k.Ä.	k.Ä.
	10	n.d.	n.d.	k.Ä.	k.Ä.
	0 (DMSO)	n.d.	n.d.	k.Ä.	k.Ä.
MeIQx	100	n.d.	n.d.	k.Ä.	k.Ä.
	50	n.d.	n.d.	k.Ä.	k.Ä.
	10	n.d.	n.d.	k.Ä.	k.Ä.
	0 (DMSO)	n.d.	n.d.	k.Ä.	k.Ä.
(+)–Lariciresinol	100	n.d.	n.d.	k.Ä.	k.Ä.
	50	n.d.	n.d.	k.Ä.	k.Ä.
	10	n.d.	n.d.	k.Ä.	k.Ä.
	0 (DMSO)	n.d.	n.d.	k.Ä.	k.Ä.
(–)-Matairesinol	100	n.d.	n.d.	k.Ä.	k.Ä.
	50	n.d.	n.d.	k.Ä.	k.Ä.
	10	n.d.	n.d.	k.Ä.	k.Ä.
	0 (DMSO)	n.d.	n.d.	k.Ä.	k.Ä.
DON	100	n.d.	n.d.	k.Ä.	k.Ä.
	50	n.d.	n.d.	k.Ä.	k.Ä.
	10	n.d.	n.d.	k.Ä.	k.Ä.
	0 (DMSO)	n.d.	n.d.	k.Ä.	k.Ä.
ZON	100	n.d.	n.d.	k.Ä.	k.Ä.
	50	n.d.	n.d.	k.Ä.	k.Ä.
	10	n.d.	n.d.	k.Ä.	k.Ä.
	0 (DMSO)	n.d.	n.d.	k.Ä.	k.Ä.

Durch die Inkubationen mit den Lebensmittelinhaltsstoffen und -kontaminanten wurde der Methylierungsstatus der Promotorsequenzen bei den ausgewählten Genen weder bei niedrigen noch bei höheren Konzentrationen in der Nährlösung verändert.

Die hier angeführten Ergebnisse beruhen nur auf einmaligen Inkubationsversuchen für jede Konzentration und jede Testsubstanz. Für endgültige Aussagen zur etwaigen Beeinflussung des Methylierungsgrades der Gene müssten die Versuche wiederholt werden.

5 Experimentelles

5.1 Methylierungs-sensitive hochauflösende Schmelzkurvenanalyse - MS-HRM

5.1.1 Primerdesign

Für die Primersuche wurden die gewünschten Gensequenzen aus der NCBI Datenbank [64] ausgewählt und in die Methyl Primer Express Software (Version 1.0) kopiert. Unter „Design Primers“ wurde der Punkt „find CpG islands“ ausgewählt, wodurch die Software CpG-reiche Basenabfolgen in der Gen-Sequenz sucht. Die CpG-Insel, welche sich möglichst am 5'-Ende des Gens befindet, wurde für die Primersuche ausgewählt. Für das Design von methylierungs-unabhängigen Primern musste in diesem Programm die Auswahl der Erstellung von BSP-Primern (Primer für Bisulfitsequenzierung) erfolgen. Die Einstellungen der Suchoptionen erfolgte nach folgenden Parametern, welche nach den Kriterien von Wojdacz et. al. (s. Abschnitt 3.1.2.3) ausgefüllt wurden:

1. Primerparameter
 - Amplikonlänge
 - Primerlänge
 - T_m der Reaktion
 - Differenz der T_m des Forward- und des Reverse-Primers
 - Anzahl der Primerpaare die gesucht werden sollen
2. Methylierungs-spezifische Parameter
 - Gesamtanzahl der CpG in beiden Primern
 - Gesamtanzahl der C in beiden Primern, welche nicht zu CpG-Dinukleotiden gehören
 - Minimum an C, welche nicht zu CpG-Dinukleotiden gehören, pro Primer
3. Einstellungen der Suchgeschwindigkeit im Verhältnis zur Suchgenauigkeit

Für jedes Gen wurden mehrere Versuche mit leicht unterschiedlichen Einstellungen durchgeführt.

Die T_m der Primer wurde immer über 60 °C festgelegt (z.B.: 60 °C – 68 °C), da die Ergebnisse der Schmelzpunktberechnungen der Software immer deutlich über den Werten anderer Berechnungsmethoden lagen, und so der tatsächliche Schmelzpunkt der Primer geringer war.

Die Überprüfung der Primer auf ihre T_m und eine etwaige Selbstkomplementarität erfolgte mit der Freeware Oligo Calc [65]. Die Bildung von Sekundärstrukturen wurde durch Einsatz des RNAfold WebServer ausgeschlossen [66]. Die Differenz der Schmelztemperaturen des unmethylierten und methylierten Amplikons wurde mit Hilfe des POLAND Programms [62] errechnet.

Aus den erhaltenen Vorschlägen wurde anhand der Richtlinien von Wojdacz et al. [52] (s. Abschnitt 3.1.2.3) ein Primerpaar ausgewählt.

5.1.2 Vorbereitung der Primer

Die Primer wurden bei Sigma-Aldrich bestellt, wo ihre Produktion und die Aufreinigung durch Reversed-Phase Chromatographie erfolgte. Nach Erhalt der Primer wurden diese laut den Herstellerangaben mit ultrafiltriertem und autoklaviertem H₂O versetzt, um eine Konzentration von 100 µM zu erreichen, und in 20 µl Aliquoten in Eppendorfgefäßen bei -20 °C eingefroren.

Für ihren Einsatz in der PCR wurde ein Aliquot aufgetaut und 1:10 mit H₂O verdünnt. Die erhaltene Konzentration lag somit bei 10 µM.

5.1.3 Vorsichtsmaßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen

Besonderes Augenmerk musste auf die Vermeidung von Kontaminationen durch nicht bisulfitkonvertierte DNA gelegt werden. Aus diesem Grund erfolgten alle Pipettierarbeiten vor der MS-HRM räumlich getrennt von der DNA-Extraktion und der Bisulfitkonvertierung.

Es wurden mit Ethanol gereinigte Handschuhe getragen. Das Pipettieren des Reaktionsgemisches erfolgte auf einer mit DNA-Exitus behandelten Arbeitsfläche und mit einem extra Pipettensatz, welcher nur für die Vorbereitung der PCR eingesetzt wurde. Die Spitzenaufsätze der Pipetten wurden vor Gebrauch mit EtOH gereinigt und es wurden sterile Filterspitzen unterschiedlicher

Voluminabereiche verwendet. Es musste darauf geachtet werden, kein Ethanol in die Reaktion einzubringen, da dies zu einer Verschiebung der HRM Kurven geführt hätte.

Alle verwendeten Eppendorfgefäße und Geräte wurden ausschließlich mit gereinigten Handschuhen entnommen und verwendet.

Der EpiTect HRM PCR Kit und die bisulfitkonvertierten Standard-DNAs (methyliert und unmethyliert) wurden vor Gebrauch aliquotiert, um ein Verschleppen von eventuellen Kontaminationen zu verhindern und ein häufiges Auftauen der empfindlichen Substanzen zu vermeiden. Die Aliquote wurden unmittelbar vor Beginn des Pipettierens aufgetaut und vor jeder Entnahme gevortext.

5.1.4 Temperaturprofil

Für die Durchführung der MS-HRM wurde der Rotor Gene Q von Qiagen verwendet.

Die zugehörige Rotor Gene Q Series Software wurde für den Betrieb des Gerätes und die Auswertung der Ergebnisse genutzt.

Der Versuch wurde als HRM mit vorhergehender Amplifikation (engl.: HRM with pre amplification) durchgeführt. Das dreistufige Temperaturprogramm der PCR erfolgte mit einem Touchdown von je 1 °C in den ersten sieben Zyklen. Die als Annealing-Temperatur eingestellte Temperatur galt dabei als Startpunkt für den Touchdown, wodurch die Eingabe um 6 °C höher als die gewünschte T_a erfolgen musste. Eine Eingabe der $T_a = 57$ °C im Programm entsprach also einer T_a von 51 °C für die restlichen PCR-Zyklen. Insgesamt wurden 50 Zyklen pro PCR gefahren.

Die Messung des Real-Time Fluoreszenzsignals des Interkalationsfarbstoffes Eva Green erfolgte am Ende des Elongationsschrittes bei 72 °C im Kanal „Green“ (Anregung: 470 nm, Messung: 510 nm).

Im Anschluss an die PCR wurde eine Temperaturstufe (engl.: hold) von 1 min bei 95 °C eingefügt, bevor der Temperaturgradient der HRM eingegeben wurde. Im Fall der APC Kontroll-Primer wurde zusätzlich eine zweite Temperaturstufe von 1 min bei 40 °C aus der Literatur übernommen, um die vollständige Renaturierung der Amplikons zu gewährleisten. Für die Gene HIC1, DAPK1 und OSMR wurde auf diese Stufe verzichtet, da das HRM Protokoll die Anfangstemperatur des Gradienten vor Beginn der eigentlichen Schmelzanalyse für 90 s konstant hält, und diese Funktion dadurch ebenfalls erfüllt wurde.

Bei den ersten Versuchen umfasste der Temperaturgradient den Temperaturbereich von 70 °C bis 90 °C. Um die Analysenzeit zu verkürzen, wurde nach den ersten Versuchen zu jedem Gen der Bereich auf ungefähr 5 °C vor und nach dem Aufschmelzen der Amplikons verkleinert.

Die Schrittrate der HRM wurde nach mehreren Versuchen bei 0,05 °C pro Stufe mit 2 s Zeit zwischen den Temperaturschritten für alle Gene belassen.

5.1.5 Durchführung

Laut Bedienungsanleitung des EpiTect HRM PCR Kit (wird in dieser Arbeit auch als Supermix bezeichnet) wurden für ein Endvolumen von 20 µl pro Tube 10 µl von dem Supermix verwendet. Die bereits bisulfitkonvertierte Standard-DNA von Qiagen besaß eine Konzentration von 10 ng/µl. Pro Tube wurden 10 ng eingesetzt. Auch die aus den HT-29 Zellen extrahierte DNA und die selbst bisulfitkonvertierten Standards wurden auf diese Konzentration verdünnt und in 10 ng pro Tube zupipettiert. Durch Mischen der vollständig methylierten und unmethylierten Standards wurden Standards mit dem gewünschten Methylierungsgrad erhalten.

Es wurde ein Mastermix (MM) bestehend aus den Primern, dem MgCl₂ und ultrafiltriertem und autoklaviertem H₂O für alle Tubes eines Versuches hergestellt. Das Wasser diente zum Auffüllen auf das benötigte Endvolumen.

Tabelle 18: Pipettiermuster eines Mastermix (MM) für das APC Gen mit den APC Kontroll-Primern

Komponente	c der Urlösung	c im Tube	Volumen pro Tube	Volumen im MM (12x)
APC Kontroll-Primer f	10 µM	500 nM	1 µl	12 µl
APC Kontroll-Primer b	10 µM	500 nM	1 µl	12 µl
MgCl ₂	40 mM	2 mM	1 µl	12 µl
H ₂ O			6 µl	72 µl
Gesamtvolumen			9 µl	108 µl

Tabelle 18 zeigt ein Berechnungsbeispiel anhand des APC-Gens für die Herstellung des Mastermix für eine Standardreihe mit 5 Standards in Doppelbestimmung (10 Tubes → MM wird für 12 Tubes hergestellt). Der Mastermix wurde gevortext, um eine gleichmäßige Durchmischung zu gewährleisten.

Das Zusammenpipettieren des Reaktionsansatzes in den einzelnen Tubes (Abbildung 102) erfolgte in einem gekühlten Metallblock, um unspezifische Reaktionen zu verhindern. Tabelle 19 zeigt das Pipettierschema für die MS-HRM Reaktion.

Tabelle 19: Pipettierschema der Substanzgemische und der DNA für die einzelnen Tubes in der MS-HRM

Komponente	Volumen pro Tube [µl]
Supermix	10
Mastermix	9
DNA	1
Gesamtvolumen	20

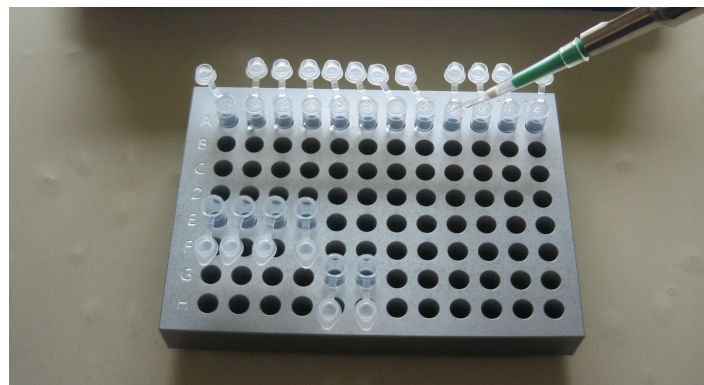


Abbildung 102: Pipettieren des Reaktionsgemisches in die PCR-Tubes im gekühlten Metallblock



Abbildung 103: Rotor Gene Q mit eingesetztem Tube Rotor vor Beginn eines Versuches

5.1.6 Optimierung der Annealing-Temperatur (T_a) und der $MgCl_2$ -Konzentration

Die Optimierung der MS-HRM Bedingungen anhand der T_a und Mg^{2+} -Konzentration wurde nach den Vorgaben von Wojdacz et al. durchgeführt (s. Abschnitt 3.1.2.3 und Abschnitt 4.3). Dabei führt eine Erhöhung der T_a zu einer verstärkten Selektivität in Richtung des methylierten (nach der Bisulfitkonvertierung GC-reichen) Sequenz, und eine Senkung der T_a zu einer vermehrten Amplifikation des unmethylierten (AT-reichen) DNA-Stranges. Der Einfluss der $MgCl_2$ -Konzentration muss experimentell bestimmt werden.

Die Versuche wurden mit einer Annealing-Temperatur von bis zu 5 °C unter den Schmelztemperaturen der Primer begonnen. Anhand der erhaltenen MS-HRM Ergebnisse wurde dann die T_a erhöht oder gesenkt, um die bevorzugte Amplifikation eines der beiden Template (Bias) zu vermeiden. Nachdem die Annealing-Temperatur mit dem geringsten Bias gefunden worden war, wurde die $MgCl_2$ -Konzentration des Reaktionsansatzes zwischen 2 und 4 mM variiert, um noch eine etwaige Verbesserung der Ergebnisse zu erzielen.

5.2. Bisulfitkonvertierung

Für die Bisulfitkonvertierung der extrahierten Zell-DNA wurde der EpiTect Bisulfite Kit von Qiagen verwendet. Er erlaubt die Konvertierung von 1 ng – 2 µg DNA pro Reaktionsgemisch. Die Sulfonierung und Deaminierung des Cytosins erfolgt dabei im PCR-Gerät. Anschließend wird die einsträngige DNA an die Membran einer miniaturisierten LC-Säule (engl.: spin column) gebunden, gewaschen und desulfoniert (Stufen der Bisulfitkonvertierung s. Abschnitt 3.1.2.1).

5.2.1 Durchführung

Der Kit wurde gemäß den Angaben des Herstellers angewendet.

Der Bisulfit-Mix wurde vor jeder Durchführung frisch bereit. Dazu wurden die benötigten Aliquote des Bisulfit-Mixes in je 800 µl Wasser gelöst, wobei ein Aliquot für acht

Konvertierungsreaktionen ausreicht. Etwaige Reste konnten bei -20 °C für vier Wochen gelagert werden.

Anschließend wurden die verschiedenen Komponenten des Reaktionsmixes in die PCR-Tubes pipettiert. 1 ng - 2 µg DNA in maximal 20 µl konnten für die Reaktion eingesetzt werden. Lag die Konzentration der DNA-Lösung höher, musste der Rest der 20 µl mit H₂O aufgefüllt werden, um ein Gesamtreaktionsvolumen von 140 µl zu erreichen. Tabelle 20 zeigt das zugehörige Pipettierschema.

Tabelle 20: Pipettierschema der Bisulfitkonvertierung für den EpiTect Bisulfite Kit

Komponente	Volumen pro Tube [µl]
DNA Lösung	variabel (maximal 20)
H ₂ O	variabel (Differenz DNA Lösung zu 20)
Bisulfit-Mix	85
DNA-Schutzpuffer	35
Gesamtvolumen	140

Die PCR-Tubes wurden geschlossen und kurz gevortext. Der richtige pH-Wert der Reaktionsmischung wurde dabei durch den Umschlag des Indikatorfarbstoffes im DNA-Schutzpuffer von grün auf blau angezeigt.

Die Modifizierungsreaktion erfolgte im Rotor Gene Q Thermocycler. Das dabei verwendete Temperaturprogramm wird in Tabelle 21 wiedergegeben. Abbildung 108 zeigt das Schema des Temperaturverlaufs.

Tabelle 21: Temperaturprogramm der Bisulfitkonvertierung

Reaktionsstufe	Dauer [min]	Temperatur [°C]
Denaturierung	5	95
Inkubation	25	60
Denaturierung	5	95
Inkubation	85	60
Denaturierung	5	95
Inkubation	175	60
Abkühlen	unbegrenzt	20
Gesamt	300	



Abbildung 104: Schema des Temperaturverlaufs der Bisulfitkonvertierung

Anhand der durchgeführten Bisulfitkonvertierungen wurde die benötigte Menge an BL Puffer mit Carrier RNA berechnet und hergestellt. Pro Tube werden 620 µl des Puffers mit 6,2 µl Carrier RNA versetzt und gründlich gevortext.

Nach Beendigung der Reaktion wurde die Reaktionslösung in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 560 µl der frisch bereiteten BL Puffer und Carrier RNA Lösung versetzt. Die Lösung wurde gevortext und kurz zentrifugiert um etwaige Tropfen vom Verschluss des Gefäßes zu entfernen. Die Lösungen wurden in Spin Columns, welche in 2 ml Eppendorfgefäßen platziert waren, überführt und bei maximaler Geschwindigkeit (20.000 x g) für 1 min zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die Säule mit 500 µl BW Puffer bei 20.000 x g für 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend mit 500 µl BD Puffer für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte mit 500 µl BW Puffer und einer Zentrifugation bei 20.000 x g für 1 min. Die Spin Columns wurden in neue 2 ml Gefäße überführt und zur Entfernung von Pufferresten erneut zentrifugiert. Um Restethanol zu entfernen wurde bei offener Verschlusskappe für 15 min bei 56 °C im Trockenschrank erhitzt.

Die LC-Säulen wurden anschließend in saubere 1,5 ml Eppendorfgefäßen platziert. Die Elution der DNA mit 20 µl EB Puffer, welcher in der Mitte der Säulenoberfläche aufgebracht wurde, erfolgte durch Zentrifugation bei 15.000 x g für 1 min. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde dieser Schritt noch einmal wiederholt.

Die bisulfitkonvertierte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

5.2.2 Verdünnung der bisulfitkonvertierten DNA

Da für bisulfitmodifizierte DNA die Konzentrationsbestimmung mittels photometrischen Messmethoden nicht möglich ist, musste bei der Bisulfitkonvertierung sehr sorgfältig gearbeitet werden.

Für den Einsatz der DNA in der MS-HRM musste diese mit H₂O auf 10 ng/µl verdünnt werden.

5.3 HT-29 Zellversuche

Die Arbeit mit den HT-29 Zellen erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie der Universität Wien, von welchem sowohl die benötigten Zellen, Geräte und Chemikalien als auch die Räumlichkeiten für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurden.

5.3.1 Arbeiten in der Laminar

Das Arbeiten in einer Laminar (Reinraumbank, Sterilbank; Abbildung 104) erforderte steriles Arbeiten, um keine Verunreinigungen in die Zellkultur einzubringen.



Abbildung 105: Laminar (Sterilbank) für die Arbeit mit Zellkulturen

Das Arbeiten in der Sterilbank erfolgte mit Handschuhen, welche mit 70%igem EtOH gereinigt wurden. Vor Beginn der Arbeit musste die Arbeitsfläche mit Ethanol gereinigt werden. Alle von Außen in die Bank eingebrachten Chemikalien und Geräte mussten gründlich mit EtOH abgesprüht werden. Die benötigten Pipetten, Eppendorfgefäße und die Spitzen der Kolbenhubpipetten wurden autoklaviert. Die Behälter der Glaspipetten sowie die Flaschenhälse aller Chemikaliengefäße wurden vor dem Öffnen über dem Bunsenbrenner abgeflammt. Auch die benötigten Glas- und Pasteurpipetten wurden vor dem Gebrauch auf diese Art gereinigt. Erfolgte eine mögliche Kontamination der Pipetten durch Berührung der Außenseite von Chemikaliengebinden oder anderen Oberflächen, wurde diese Pipette gegen eine neue ausgetauscht.

5.3.2 Zellkultivierung

Die Züchtung der HT-29 Zellen erfolgte in 75 cm² Polystyrol-Zellkulturflaschen (Abbildung 105) bei 37 °C und 5% CO₂ mit dem Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM mit 4,5 g/l Glukose und L-Glutamin; ohne Pyruvat). Dem Medium wurden 10 Vol% fötales Kälberserum (FKS) und 1 Vol% Penicillin/Streptomycin (P/S) zugesetzt.

Weiters enthält das Nährmedium den Indikator Phenolrot. Durch von den Zellen produzierte Stoffwechselprodukte und den Verbrauch der Nährstoffe erfolgt ein Absinken des pHs der Lösung, was durch einen Farbumschlag von rot auf orange-gelb des Indikators angezeigt wird. In diesem Fall wäre ein Mediumwechsel notwendig, um ein weiteres gleichmäßiges Wachstum der Zellen zu ermöglichen.

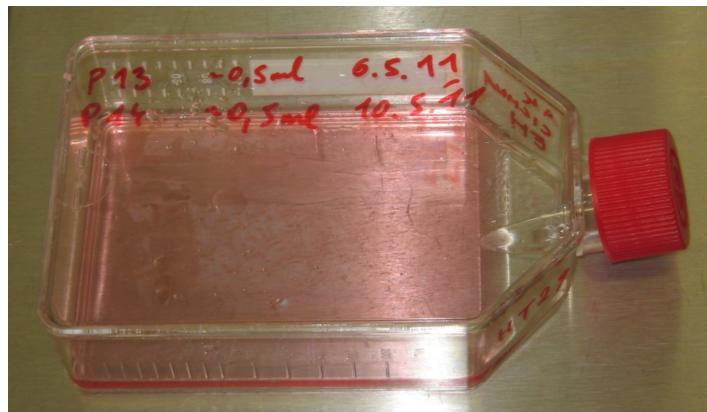


Abbildung 106: Zellkulturflasche mit HT-29 Zellen im DMEM-Medium

5.3.3 Passagieren der Zellen

Unter Passagieren versteht man das Ablösen der Zellen von der Kulturflasche und eine Weiterkultivierung nach Reduzierung der Menge an Zellen. Dadurch soll das Wachstum der Zellen in Monolagen gehalten und die Bildung von Polylagen vermieden werden.

Das Passagieren erfolgte zweimal pro Woche (Montag und Freitag). Die Zellkulturflaschen konnten dabei bis zu drei mal für das erneute Anwachsen der Zellen genutzt werden, bevor das Passagieren in ein neues Gefäß erfolgte. Unter dem Mikroskop wurde eine tägliche Kontrolle des Wachstums und eine Überprüfung auf grobe Verunreinigungen durchgeführt.

Für das Passagieren der Zellen wurden DMEM-Medium, phosphatgepufferte Lösung (PBS) und Trypsin im Wasserbad auf ca. 37 °C erwärmt. Das in der Kulturflasche vorhandene Medium

wurde mit einer sterilen Pasteurpipette, welche an einem halbautomatisches Absaugsystem angeschlossen war, entfernt. Mediumreste wurden durch Spülen mit 5-10 ml vortemperierter PBS-Lösung und anschließendem Absaugen entfernt. Die Ablösung des Zellrasens erfolgte durch Übersichtung der Zellen mit ca. 2,5 ml Trypsinlösung und anschließender Inkubation für 2-3 min im Brutschrank bei 37 °C. Die endgültige Trennung der Zellen von der Flaschenwand wurde durch vorsichtiges Klopfen an der Seite der Flasche ausgelöst. Die Inaktivierung des Trypsins zum Schutz vor Zellschäden wurde durch Zugabe von 10 ml des DMEM-Mediums mit 10 Vol% FKS durchgeführt. Durch mehrmaliges Abspülen der Flascheninnenwand und Aufsaugen dieser Zelllösung in einer Glaspipette wurde die Trennung der einzelnen Zellen voneinander gewährleistet.

0,5 bis 1 ml der Zellsuspension wurden in der Kulturflasche belassen und mit 40 ml Nährmedium versetzt. Unter den oben beschriebenen Bedingungen (s. Abschnitt 5.3.2) erfolgte ein erneutes Anwachsen und eine Vermehrung der Zellen bis zum nächsten Passagieren.

5.3.4 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl der beim Passagieren abgelösten Zellen im DMEM-Medium wurde eine Neubauer-Zellzählkammer verwendet.

Es wurden 20 µl der Zelllösung mit 180 µl Trypanblau-Lösung (1:10) verdünnt und kurz gevortext. Der Diazoarbstoff Trypanblau wird von lebenden Zellen aufgenommen und wieder ausgeschieden, während tote Zellen sich dunkelblau anfärben. Aufgrund dieser Färbereaktion war es möglich, lebende von abgestorbenen Zellen zu unterscheiden.

Die Neubauer-Zählkammer und ein plangeschliffenes Glasplättchen wurden mit Ethanol gereinigt. Das Deckglas wurde leicht angefeuchtet und auf die Zellkammer aufgelegt. Durch leichtes Hin- und Herschieben des Glasplättchens wurde sein Anhaften auf der Zählkammer geprüft (im Gegenlicht sollten am Glasplättchen „Newtonringe“ erkennbar sein). Die Zellsuspension wurde vorsichtig zwischen die Kammer und das Deckglas einpipettiert, bis der Zwischenraum gerade gefüllt war.

In die Oberfläche der Neubauer-Kammer sind große Quadrate mit definiertem Volumen von je 0,1 µl eingätzt, welche unter dem Mikroskop sichtbar sind. Jedes dieser großen Quadrate besteht wiederum aus 16 kleineren Quadraten. Von vier dieser großen Quadrate wurde unter dem Mikroskop die Zellanzahl ausgezählt, wobei die sich direkt auf den äußeren Grenzlinien

befindenden Zellen nur an der oberen und linken Seite mitgezählt wurden, um die korrekte Zellanzahl zu erhalten. Abbildung 106 zeigt den Aufbau der Neubauer-Zellkammer und die Durchführung der Zellzählung.

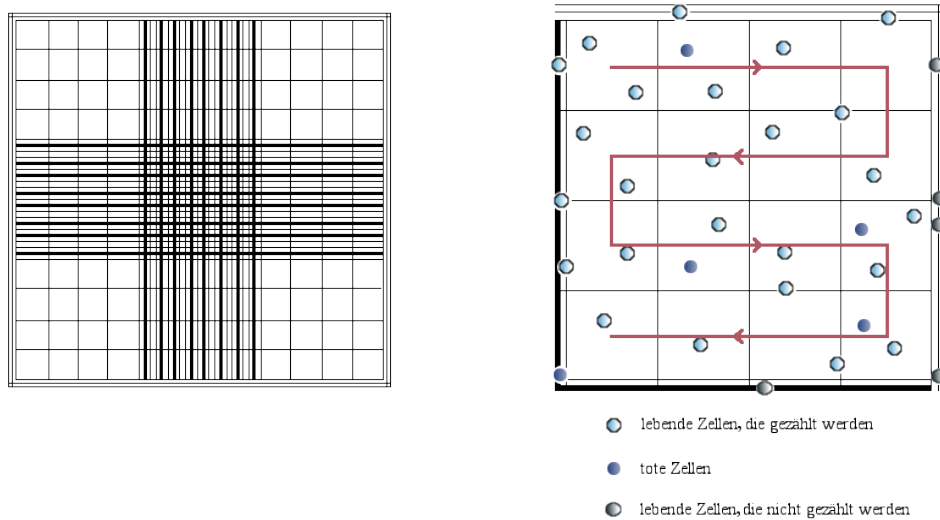


Abbildung 107: Schematische Darstellung des Zählfeldes der Neubauer-Zählkammer (rechts) und des Ablaufs des Zählvorganges (links), nach [71]

Aus den Ergebnissen dieser vier Zählungen wurde der Mittelwert errechnet. Die Anzahl der Zellen n pro ml wurde nach [71] mit folgender Formel errechnet:

$$n = \bar{X} * f * 10^4$$

- $\bar{X}$ Mittelwert der Zellzählergebnisse der 4 großen Quadrate
- f Verdünnungsfaktor der Zellsuspension mit der Trypanblau-Lösung

5.3.5 Inkubationsversuche

Die Inkubationsversuche mit den ausgewählten Substanzen erfolgten in 5 ml oder 10 ml Petrischalen für je 96 h. Es wurden immer Inkubationen unterschiedlicher Konzentrationen einer Substanz sowie eine Kontrollinkubation mit dem gewählten Lösungsmittel durchgeführt.

Das Ausstreuen der Zellen geschah 72 h vor dem Beginn der Inkubationsversuche. Je nach Größe der Petrischale wurden 150.000 Zellen in 10 ml DMEM-Medium oder 75.000 Zellen in 5 ml DMEM-Medium ausgestreut. Dazu wurde im Anschluss an die Zellzählung die benötigte

Gesamtmenge an Zellen für alle Inkubationsversuche entnommen und dem benötigten Volumen an Medium zupipettiert. Nach sorgfältiger Durchmischung wurde die Lösung in die Petrischalen pipettiert. Die Petrischalen wurden zur gleichmäßigen Verteilung der Zellen leicht geschwenkt und im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ bis zur Inkubation gelagert.

Das gleichmäßige Wachstum der ausgestreuten Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Die für die Inkubation der Zellen ausgewählten Substanzen wurden je nach Polarität in PBS-Lösung oder DMSO gelöst und bei -20 °C gelagert. Diese UrLösung sollte eine um den Faktor 100 höhere Konzentration besitzen als für die eigentliche Inkubation geplant war. Dadurch wurde die erneute Verdünnung mit dem DMEM-Medium im Verhältnis 1:100 ermöglicht. Die eigentliche Inkubationslösung wurde dann in der je nach Petrischalengröße benötigten Menge an DMEM bereitet (Abbildung 107).

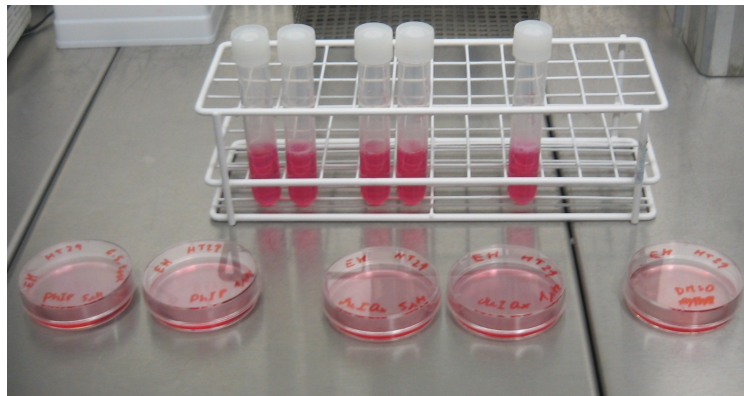


Abbildung 108: Inkubation der HT-29 Zellen in Petrischalen vor dem Wechsel des Mediums

Das alte Medium in der Petrischale wurde mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt, und das Inkubationsmedium wurde aufgebracht. Anschließend erfolgte die weitere Lagerung im Brutschrank. Das Inkubationsmedium wurde alle 24 h frisch bereitete und ausgewechselt.

Das Ablösen der Zellen am letzten Tag erfolgte nach Absaugen des letzten Inkubationsmediums. Die Zellen wurden mit PBS-Lösung gewaschen und mit 0,5–1 ml Trypsin pro Petrischale behandelt. Nach einer Inkubation von 2-3 min bei 37 °C wurden die Zellen durch vorsichtiges Klopfen an der Petrischalenseite abgelöst, und die Reaktion mit 2 ml DMEM-Medium mit 10 Vol% FKS gestoppt. Die Zellsuspension wurde aus der Petrischale in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für die DNA-Extraktion verwendet.

5.4 DNA-Extraktion

Der QIAamp DNA Mini Kit von Qiagen kann zur Extraktion der Gesamt-DNA aus unter anderem Blut, Knochenmark, Gewebe und Zellkulturen genutzt werden. Je nach Quelle und Menge der DNA werden leicht voneinander abweichende Extraktionsprotokolle empfohlen.

Für die Aufreinigung der DNA werden in jedem dieser Protokolle miniaturisierte LC-Säulen genutzt (engl.: spin columns), welche in 2 ml Eppendorfgefäßen zentrifugiert werden. Dabei wird die DNA an eine Silica-Gel-Membran gebunden, während unerwünschte Kontaminanten (z.B.: Proteine) durch verschiedene Waschschrte abgetrennt werden. Die DNA wird im letzten Schritt eluiert und kann dann bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

5.4.1 Durchführung

Der Kit wurde gemäß den Angaben des Herstellers angewendet.

Die Zellen wurden, wie in den Abschnitten 5.3.3 und 5.3.5 beschrieben, aus den Kulturbedingungen abgelöst, in ein Zentrifugenröhrchen überführt, und in der Zentrifuge für 5 min bei 300 x g abzentrifugiert. Das überstehende DMEM-Medium wurde verworfen, und die Zellen wurden mit ca. 2 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen wurden in 200 µl PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden 20 µl Qiagen Protease und 200 µl AL Puffer zupipettiert. Die Mischung wurde gevortext und für 10 min bei 56 °C im Trockenschrank inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl EtOH wurde erneut gevortext. Die Probenröhrchen wurden kurz zentrifugiert, um etwaige Lösungstropfen von der Verschlusskappe zu entfernen, bevor die Proben auf die Spin Columns (in 2 ml Eppendorfgefäßen) transferiert wurden. Das Lösungsmittelgemisch wurde bei 6.000 x g für 1 min abzentrifugiert und entsorgt. Die LC-Säulen wurden in neue 2 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 500 µl des Puffers AW1 wurde erneut für 1 min bei 6.000 x g zentrifugiert und die Säulen wurden in ein neues Eppendorfgefäß platziert. 500 µl des AW2 Puffers wurden zupipettiert und bei voller Geschwindigkeit (20.000 x g) für 3 min abzentrifugiert. Zur gründlichen Entfernung aller Pufferreste wurde die Säule in ein frisches Zentrifugengefäß überführt und erneut bei 20.000 x g für 1 min zentrifugiert.

Für die Elution der DNA von der stationären Phase wurden die Spin Columns in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß transferiert und mit 200 µl Wasser für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zentrifugation erfolgte dann bei 6.000 x g für 1 min. Der Elutionsschritt wurde in einem frischen Eppendorfgefäß einmal wiederholt, um die Ausbeute der DNA-Extraktion zu erhöhen.

Die gewonnene DNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

5.5 DNA-Konzentrationsmessung

Die Messung der Konzentration an extrahierter DNA erfolgte mit dem Nanodrop Spektralphotometer.

Die Proben wurden für die Messung 1:50 verdünnt. Da die DNA in Wasser gelöst wurde (s. Abschnitt 5.4.1), wurde der Nullabgleich ebenfalls mit Wasser durchgeführt. Für die Messung wurden 1,5 µl des Wassers oder der DNA-Lösung auf die Linse der Plattform des Nanodrop pipettiert und photometrisch vermessen.

Die Extinktion (engl.: absorbance) der Probe wurde bei 260 nm und 280 nm gemessen. Das Programm errechnete dann selbstständig die Konzentration c_v in ng/µl und die Reinheit P der DNA-Lösung nach folgenden Formeln:

$$c_v = A_{260} * f_{DNA}$$

$$P = \frac{A_{260}}{A_{280}}$$

- A_{260} Extinktion bei 260 nm
- A_{280} Extinktion bei 280 nm
- f_{DNA} DNA Konstante ($f=50$)

Lag das Ergebnis der Messung außerhalb des linearen Bereichs (Absorbance bei 260 und 280 nm größer als 2), wurden die Proben weiter verdünnt und die Extinktion erneut gemessen. Um die Konzentration c in ng/µl der unverdünnten Lösung zu erhalten, wurde die vom Programm errechnete Konzentration c_v mit dem angewendeten Verdünnungsfaktor f_v multipliziert.

$$c = c_v * f_v$$

5.6 Übersicht der durchgeführten Zellinkubationen

Tabelle 22 zeigt eine Übersicht über die selbst durchgeführten Bisulfitkonvertierungen von vollständig methylierter und unmethylierter Standard-DNA. Die Probenbezeichnungen setzen sich dabei aus „um“ für unmethyliert oder „m“ für methyliert, dem Namen des Aliquots der Standardprobe (Probe A oder B), der Nummer der durchgeführten Bisulfitkonvertierung X und dem Kürzel „BK“ für bisulfitkonvertiert zusammen.

In Tabelle 23 sind die durchgeführten Inkubationsversuche mit den HT-29 Zellen aufgelistet.

Tabelle 22: Übersicht der selbst bisulfitkonvertierten Standards und den zugeordneten Probenamen, X = Nummer der durchgeführten Bisulfitkonvertierung

Probenname	% methyliert	Entspricht
um A X BK	0	Standard 0
um B X BK	0	Standard 0
m X BK	100	Standard 100

Tabelle 23: Übersicht der durchgeführten Zellinkubationen und den zugeordneten Probenennamen

Probenname	Substanz	Konzentration [µM]
1_1X_BK	HT-29 unbehandelt	-
1_2X_BK		-
2X_BK	5-Aza-2-dC	1
3X_BK		5
4X_BK		0 (PBS)
5_BK	PhIP	5
6_BK		1
7_BK	MeIQx	5
8_BK		1
9_BK		0 (DMSO)
10_BK	(+) -Lariciresinol	5
11_BK		1
12_BK	(-) -Matairesinol	5
13_BK		1
14_BK		0 (DMSO)
15_BK	DON	5
16_BK		1
17_BK	ZON	5
18_BK		1
19_BK		0 (DMSO)
20_BK	PhIP	100
21_BK		50
22_BK		10
23_BK	MeIQx	100
24_BK		50
25_BK		10
26_BK		0 (DMSO)
34_BK	(+) -Lariciresinol	100
35_BK		50
36_BK		10
37_BK	(-) -Matairesinol	100
38_BK		50
39_BK		10
40_BK		0 (DMSO)
27_BK	DON	100
28_BK		50
29_BK		10
30_BK	ZON	100
31_BK		50
32_BK		10
33_BK		0 (DMSO)

5.7 Chemikalien

(-)-Matairesinol, Arbo Nova

(+)-Lariciresinol, Arbo Nova

2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridin (PhIP), TRC

2-Amino-3,8-dimethylimidazo-[4,5-f]chinoxalin (MeIQx), TRC

5-Aza-2'-Desoxycytidin (5-Aza-2-dC), Sigma

CpGenome™ Universal Methylated DNA, nicht bisulfitkonvertiert, Millipore

Desoxynivalenol (DON), Sigma

Dimethylsulfoxid (DMSO), Roth

DNA-Exitus Plus IF, GenX®press

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Gibco-Invitrogen

EpiTect Control DNA, 100% methyliert, bereits bisulfitkonvertiert, Qiagen

EpiTect Control DNA, 100% methyliert, nicht bisulfitkonvertiert, Qiagen

EpiTect Control DNA, 100% unmethyliert, bereits bisulfitkonvertiert, Qiagen

EpiTect HRM PCR Kit (Supermix), Qiagen

Ethanol (EtOH), VWR

Fötale Kälberserum (FKS), Gibco-Invitrogen

Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), Merck

Penicillin/Streptomycin (P/S), Gibco-Invitrogen

Trypanblau-Lösung, Sigma

Trypsin, Serva

Wasser (H_2O) ultrafiltriert und autoklaviert, Sigma

Zearalenon (ZON), Sigma

5.8 Verwendete Kits

EpiTect Bisulfite Kit, Qiagen

QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen

5.9 Verwendete Geräte

Absaugpumpe:	Vacusafe comfort, IBS Integra Biosciences
Analysenwaage:	Sartorius TE2144S
Brutschrank:	Heracell 240i CO ₂ Incubator, Heraeus
Bunsenbrenner:	Fuego basic, WLD-Tec
Mikroskop:	Axiovert 40 C, Zeiss
Nanodrop:	NanoDrop 200c Spectrophotometer
Neubauer-Kammer:	Marienfeld
PCR:	Rotor Gene Q, Qiagen
Pipetten:	Eppendorf (2-20 µl, 20-200 µl, 100-1.000 µl) Biorad (0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1.000 µl)
Pipetus:	Pipetus, Hirschman Laborgeräte
Sterilbank:	Herasafe KS 18, Heraeus
Trockenschrank:	Memmert Modell 500, Memmert
Vortex:	Janke & Kunkel VF2 VWR VV3
Wasserbad:	Grant CD100, Grant
Zentrifugen:	Eppendorf Centrifuge 5424 Sigma 4K10

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden Analysemethoden, basierend auf der methylierungs-sensitiven hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse (MS-HRM) mit methylierungs-unabhängigen Primern (MIP), zur Analyse des Methylierungsgrades in der Promotorregion ausgewählter Gene erarbeitet. Für die Entwicklung der Methoden wurden verschiedene Kriterien im Bezug auf das Primerdesign und die Optimierung der MS-HRM Bedingungen aus der Fachliteratur verwendet.

Für das Primerdesign wurden die von Wojdacz et al. [52] beschriebenen Regeln zum Entwurf von Primern für die methylierungs-unabhängige Polymerase-Kettenreaktion (MIP-PCR) genutzt. Weiters wurde eine Studie von Primerpaaren aus verschiedenen Veröffentlichungen zur Priorisierung der Auswahlregeln für mögliche Primer durchgeführt, wodurch die Wahrscheinlichkeit des erfolgreichen Primerdesigns erhöht wurde.

Primer wurden für die mit der Entstehung von kolorektalen Karzinomen in Verbindung stehenden Gene APC (Adenomatous Polyposis Coli), HIC1 (Hypermethylated in Cancer 1), DAPK1 (Death Associated Protein Kinase 1) und OSMR (Oncostatin M Rezeptor) entworfen. Diese wurden in MS-HRM Versuchen an kommerzieller, bereits bisulfitkonvertierter methylierter und unmethylierter Standard-DNA getestet, und mit erfolgreich eingesetzten Primern aus der Literatur verglichen. Im Fall des OSMR-Gens erfolgte nur der Einsatz eines selbst entwickelten Primerpaares, da zu diesem Zeitpunkt bereits genügend Erfahrung im Primerdesign vorhanden war.

Anhand der durchgeführten Versuche wurde zu jedem Gen das Primerpaar mit den besten Ergebnissen ausgewählt. Für APC und DAPK1 wurden daher die aus der Literatur [59, 67] entnommenen „Kontroll-Primer“ verwendet, während für HIC1 und OSMR die selbst erstellten Primerpaare zum Einsatz kamen.

Durch die Optimierung der MS-HRM Versuchsbedingungen im Bezug auf die Annealing-Temperatur und die $MgCl_2$ -Konzentration wurde für jedes Primerpaar die Selektivität der Amplifikation für methylierte und unmethylierte Template angeglichen. Dies ermöglichte die Bestimmung der Veränderungen im Methylierungsgrad der Gensequenz, sowohl in Richtung der Methylierung als auch der Demethylierung, mit gleicher Sensitivität. Die für HIC1 entwickelte Methode erwies sich im Laufe der Arbeit als nicht robust. Trotz Optimierung kam es zu einem Anstieg der Selektivität für das methylierte Templat.

Im Zuge der MS-HRM Analyse von selbst bisulfitkonvertierter unmethylierter Standard-DNA wurde eine Verschiebung der Schmelztemperatur der Amplikons im Vergleich zu den Schmelzkurven von kommerziell erhältlicher, bereits bisulfitkonvertierter DNA beobachtet. Experimente zur Bestimmung der Ursachen für diese Abweichung führten zwar zu einer Verringerung der Verschiebung, konnten sie jedoch nicht zur Gänze eliminieren. Für alle weiteren MS-HRM Versuche wurden ab diesem Zeitpunkt die Standardreihen mit selbst bisulfitkonvertierter DNA hergestellt.

Die Anwendbarkeit der Methoden auf reale Proben wurde durch die Bestimmung des Promotormethylierungsgrades der ausgewählten Gene in HT-29 Kolonkrebszellen überprüft. Die Gene APC und DAPK1 waren in den Zellen unmethyliert. Das Gen HIC1 wies einen Methylierungsgrad von 100% auf. Für das OSMR-Gen wurde ein Methylierungsgrad von 95% erhalten.

Versuche zur Quantifizierung von Veränderungen des Methylierungsstatus erfolgten durch Inkubation der HT-29 Zellen mit dem demethylierenden Agens 5-Aza-2-dC. Die Abnahme der Methylierung in den Genen HIC1 und OSMR wurde über die Erstellung einer Kalibriergerade ausgewertet.

Die MS-HRM Methoden wurden zur Analyse des Einflusses kanzerogener Lebensmittelkontaminanten (PhIP, MeIQx, DON, ZON) und krebsprotektiv wirkender Lebensmittelinhaltsstoffe ((+)-Lariciresinol, (-)-Matairesinol) auf die Promotormethylierung in den Krebszellen eingesetzt. Bei keiner der ausgewählten Verbindungen konnte eine Änderung der Methylierung in den Genen APC, HIC1, DAPK1 und OSMR festgestellt werden. Die Inkubation erfolgte dabei als Screening nur einmal pro Substanzkonzentration. Für endgültige Aussagen über die etwaige Beeinflussung des Methylierungsgrades der Gene durch die ausgewählten Substanzen müssten die Versuche noch mehrmals wiederholt werden.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

5-Aza-2-dC	5-Aza-2'-Desoxycytidin
5-mC	5-Methylcytosin
A	Adenin
APC	engl.: adenomatous polyposis coli
BHMT	engl.: betaine homocysteine methyltransferase
BK	bisulfitkonvertiert
bp	Basenpaar
C	Cytosin
CBS	engl.: cystathionine- β -synthase
CDKN2A/p14	engl.: cyclin dependent kinase 2A/p14
CDKN2A/p16	engl.: cyclin dependent kinase 2a/p16
COBRA	engl.: combined bisulfite restriction analysis
CpG	Basenabfolge von Cytosin – Phosphat - Guanin
CRC	kolorektales Karzinom
Cys	Cystein reiche Domäne
DAPK1	engl.: death associated protein kinase 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
DON	Desoxynivalenol
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
G	Guanin
GNMT	engl.: glycine N-methyl-transferase
GSK3 β	Glycogensynthasekinase 3 β
h-TERT	humane Telomerase Reverse Transkriptase
HAA	heterozyklisches aromatisches Amin
HIC1	engl.: hypermethylated in cancer 1

HLTF	engl.: helicase-like transcription factor
HNPPC	hereditäres non-polypöses Kolonkarzinom
HRM	hochauflösende Schmelzkurvenanalyse
IGF2	engl.: insulin-like growth factor 2
k.Ä	keine Änderung
LOI	Verlust der genomischen Prägung
MAT	engl.: methionine adenosyltransferase
MBD	Methyl-CpG-bindende Domäne
MeIQx	2-Amino-3,8-dimethylimidazo-[4,5-f]chinoxalin
MGMT	engl.: O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
MIP	methylierungs-unabhängiger Primer
MLH1	engl.: mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (<i>E. coli</i>)
MS	engl.: methionine synthase
MS-HRM	methylierungs-sensitive hochauflösende Schmelzkurvenanalyse
MS-SNuPE	engl.: methylation-sensitive single nucleotide primer extension
MSP-PCR	methylierungs-spezifische Polymerase-Kettenreaktion
MTHFR	engl.: methylenetetrahydrofolate reductase
n.d.	nicht durchgeführt
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OSMR	Oncostatin M Rezeptor
PBS	phosphatgepufferte Lösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PHD	Pflanzenhomöodomäne
PhIP	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridin
PWWP	Prolin und Tryptophan reiche Domäne
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SFRP	engl.: secreted frizzled-related proteins
SHBG	Sex-hormon-bindendes Globulin
SHMT	engl.: serine hydroxymethyltransferase
T	Thymin
T _a	Annealing-Temperatur
T _m	Schmelztemperatur
ZON	Zearalenon

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Cytosin und die an der C5-Position methylierte Form 5-Methylcytosin.....	2
Abbildung 2: Modell der DNA mit zwei methylierten Cytosinen in CpG-Dinukleotiden.....	3
Abbildung 3: Die verschiedenen Möglichkeiten der DNA-Methylierung in Säugetieren.....	5
Abbildung 4: Struktur des Methyl donors S-Adenosylmethionin und seiner demethylierten Form S-Adenosylhomocystein.....	6
Abbildung 5: normale Mukosa, adenomatöser Polyp und invasives Karzinom	12
Abbildung 6: Schema des Wnt-Signalwegs.....	16
Abbildung 7: Bildung von HAAs.....	22
Abbildung 8: Struktur des heterozyklischen aromatischen Amins PhIP.....	23
Abbildung 9: Struktur des heterozyklischen aromatischen Amins MeIQx.....	24
Abbildung 10: Struktur des Lignans (+)-Lariciresinol.....	25
Abbildung 11: Struktur des Lignans (-)-Matairesinol.....	26
Abbildung 12: Struktur des Mykotoxins Desoxynivalenol.....	28
Abbildung 13: Struktur des Mykotoxins Zearalenon.....	29
Abbildung 14: Struktur des 5-Aza-2'-Desoxycytidins.....	30
Abbildung 15: Schema der drei Schritte einer Polymerase-Kettenreaktion.....	33
Abbildung 16: Anstieg an Kopien des gewünschten DNA-Segments mit der Anzahl der durchlaufenen Zyklen.....	34
Abbildung 17: Länge der im 3. Zyklus gebildeten Amplikons.....	35
Abbildung 18: Fluoreszenzemission eines interkalierenden Farbstoffes.....	36

Abbildung 19: Funktionsweise einer TaqMan-Sonde.....	37
Abbildung 20: PCR einer Verdünnungsreihe von DNA-Standards.....	37
Abbildung 21: Bisulfitkonvertierung methylierter und unmethylierter DNA.....	38
Abbildung 22: Reaktionsgleichung der drei Stufen der Bisulfitkonvertierung.....	39
Abbildung 23: Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren der DNA.....	45
Abbildung 24: Schmelzprofile einer Standardreihe.....	48
Abbildung 25: Auftragung von $(-dF/dT)$ der Standardreihe.....	49
Abbildung 26: HRM Messungen verschiedener Standardmischungen.....	50
Abbildung 27: Kalibriergerade der Standardmessungen.....	50
Abbildung 28: Schematische Darstellung des Temperaturprofils.....	54
Abbildung 29: PCR-Amplifikation mit den Kontroll-Primern.....	55
Abbildung 30: HRM nach Amplifikation mit den Kontroll-Primern.....	55
Abbildung 31: $(-dF/dT)$ Darstellung der HRM Ergebnisse.....	56
Abbildung 32: PCR-Amplifikation mit den Primern „APC Primer f“ und „APC Primer b1“	56
Abbildung 33: HRM nach Amplifikation mit den eigenen APC Primern.....	57
Abbildung 34: PCR-Amplifikation mit den Primern „APC Primer f“ und „b1“.....	57
Abbildung 35: PCR-Amplifikation mit den Primern „APC Primer f“ und „b2“.....	58
Abbildung 36: PCR-Amplifikation mit den Kontroll-Primern.....	60
Abbildung 37: HRM nach Amplifikation mit den Kontroll-Primern.....	60
Abbildung 38: HRM nach Amplifikation mit den Kontroll-Primern	60

Abbildung 39: PCR-Amplifikation mit den eigenen HIC1 Primern.....	61
Abbildung 40: HRM nach Amplifikation mit den HIC1 Primern	62
Abbildung 41: PCR-Amplifikation mit den HIC1 Primern1.....	63
Abbildung 42: HRM nach Amplifikation mit den HIC1 Primern1.....	63
Abbildung 43: PCR-Amplifikation mit den HIC1 Primern1.....	64
Abbildung 44: HRM nach Amplifikation mit den HIC1 Primern1.....	64
Abbildung 45: PCR-Amplifikation mit dem Primerpaar "HIC 1 Primer1 f2" und "HIC1 Primer1 b"	65
Abbildung 46: HRM nach Amplifikation mit "HIC1 Primer1 f2" und "HIC 1 Primer1 b".....	66
Abbildung 47: Darstellung der Schmelzpeaks der Doppelbestimmungen der Standards in der (-dF/dT) Ansicht.....	66
Abbildung 48: PCR-Amplifikation mit den DAPK1 Primern.....	70
Abbildung 49: HRM nach Amplifikation mit den DAPK1 Primern.....	70
Abbildung 50: PCR-Amplifikation mit den DAPK1 Primern.....	71
Abbildung 51: HRM nach Amplifikation mit den DAPK1 Primern.....	71
Abbildung 52: PCR-Amplifikation mit den Kontroll-Primern.....	72
Abbildung 53: HRM nach der Amplifikation mit den Kontroll-Primern.....	72
Abbildung 54: PCR-Amplifikation mit den Kontroll-Primern.....	72
Abbildung 55: HRM nach Amplifikation mit den Kontroll-Primern.....	73
Abbildung 56: PCR-Amplifikation mit den OSMR Primern.....	75
Abbildung 57: HRM nach Amplifikation mit den OSMR Primern.....	75

Abbildung 58: HRM nach Amplifikation mit den DAPK1 Kontroll-Primern.....	76
Abbildung 59: Ansicht (-dF/dT) für die MS-HRM.....	76
Abbildung 60: HRM nach Amplifikation mit den DAPK1 Kontroll-Primern.....	77
Abbildung 61: Ansicht (-dF/dT) für die MS-HRM.....	77
Abbildung 62: HRM nach Amplifikation mit den OSMR Primern.....	78
Abbildung 63: Ansicht (-dF/dT) für die MS-HRM.....	78
Abbildung 64: HRM nach Amplifikation mit den OSMR Primern.....	78
Abbildung 65: Ansicht (-dF/dT) für die MS-HRM.....	79
Abbildung 66: PCR-Amplifikation des APC-Gens unter optimierten Bedingungen	80
Abbildung 67: HRM Kurven des APC bei optimierten Bedingungen.....	80
Abbildung 68: (-dF/dT) Ansicht der Mittelwerte der Doppelbestimmungen der Standards.....	80
Abbildung 69: PCR-Amplifikation des HIC1-Gens unter optimierten Bedingungen	81
Abbildung 70: HRM Kurven des HIC1 bei optimierten Bedingungen.....	81
Abbildung 71: (-dF/dT) Ansicht der Mittelwerte der Doppelbestimmungen der Standards.....	81
Abbildung 72: PCR-Amplifikation des DAPK1-Gens unter optimierten Bedingungen	82
Abbildung 73: HRM Kurven des DAPK1 bei optimierten Bedingungen.....	82
Abbildung 74: (-dF/dT) Ansicht der Mittelwerte der Doppelbestimmungen der Standards.....	82
Abbildung 75: PCR-Amplifikation des OSMR-Gens unter optimierten Bedingungen	83
Abbildung 76: HRM Kurven des OSMR bei optimierten Bedingungen.....	83
Abbildung 77: (-dF/dT) Ansicht der Mittelwerte der Doppelbestimmungen der Standards.....	83

Abbildung 78: Abweichung der HRM Kurven der selbst bisulfitkonvertierten Proben zum Standard 0	84
Abbildung 79: HRM des selbst konvertierten Standards, des Standards 0 und des Standards 0 mit erhöhter TrisCl-Konzentration.....	85
Abbildung 80: HRM der selbst bisulfitkonvertierten Proben nach längerem Abdampfen von EtOH.....	86
Abbildung 81: HRM des erworbenen, bereits bisulfitkonvertierten Standards 100 und des selbst konvertierten 100% methylierten Standards.....	86
Abbildung 82: HRM nach Amplifikation mit den DAPK1 Kontroll-Primern bei optimierten Bedingungen mit den selbst konvertierten Standards.....	87
Abbildung 83: (-dF/dT) Ansicht der Mittelwerte der Doppelbestimmungen der Standards.....	87
Abbildung 84: HRM der DNA aus HT-29 Zellen nach Amplifikation mit den HIC1 Primern1 ...	88
Abbildung 85: HRM der DNA aus HT-29 Zellen nach Amplifikation mit den OSMR Primern. .	88
Abbildung 86: HRM der DNA aus unbehandelten HT-29 Zellen nach Amplifikation mit den APC Kontroll-Primern.....	89
Abbildung 87: Differentialkurven der HT-29 Zell-DNA für das APC-Gen.....	89
Abbildung 88: HRM der DNA aus unbehandelten HT-29 Zellen nach Amplifikation mit den HIC1 Primern1.....	90
Abbildung 89: Differentialkurven der HT-29 Zell-DNA für das HIC1-Gen.....	90
Abbildung 90: Kalibriergerade der MS-HRM für HIC1.....	91
Abbildung 91: HRM der DNA aus unbehandelten HT-29 Zellen nach Amplifikation mit den DAPK1 Kontroll-Primern.....	91
Abbildung 92: Differentialkurven der HT-29 Zell-DNA für das DAPK1-Gen.....	92

Abbildung 93: HRM der DNA aus unbehandelten HT-29 Zellen nach Amplifikation mit den OSMR Primern.....	92
Abbildung 94: Differentialkurven der HT-29 Zell-DNA für das OSMR-Gen.....	92
Abbildung 95: Kalibriergerade der MS-HRM für OSMR.....	93
Abbildung 96: HRM einer Standardreihe und der DNA aus mit 5-Aza-2-dC inkubierten HT-29 Zellen nach der Amplifikation mit den HIC1 Primern1	95
Abbildung 97: Differentialkurven der Standardreihe und der Zell-DNA für das HIC1-Gen.....	95
Abbildung 98: Kalibriergerade der MS-HRM für HIC1.....	95
Abbildung 99: HRM einer Standardreihe und der DNA aus mit 5-Aza-2-dC inkubierten HT-29 Zellen nach der Amplifikation mit den OSMR Primern.....	96
Abbildung 100: Differentialkurven der Standardreihe und der Zell-DNA für das OSMR-Gen....	97
Abbildung 101: Kalibriergerade der MS-HRM für OSMR.....	97
Abbildung 102: Pipettieren des Reaktionsgemisches in die PCR-Tubes	105
Abbildung 103: Rotor Gene Q mit eingesetztem Tube Rotor.....	105
Abbildung 104: Schema des Temperaturverlaufs der Bisulfitkonvertierung.....	107
Abbildung 105: Laminar (Sterilbank) für die Arbeit mit Zellkulturen.....	109
Abbildung 106: Zellkulturflasche mit HT-29 Zellen im DMEM-Medium.....	110
Abbildung 107: Schematische Darstellung des Zählfeldes der Neubauer-Zählkammer.....	112
Abbildung 108: Inkubation der HT-29 Zellen in Petrischalen.....	113

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die verschiedenen Klassen der DNA-Methyltransferasen (DNMT) bei Säugetieren....	4
Tabelle 2: Die zehn führenden Krebsarten bei den erwarteten neuen Krebserkrankungen in den USA für das Jahr 2005.....	11
Tabelle 3: Modulierung der DNA-Methylierung durch Nährstoffe.....	20
Tabelle 4: Beispiele wichtiger Mykotoxine.....	27
Tabelle 5: Reaktionsansatz für die MS-HRM Analyse von APC.....	54
Tabelle 6: Temperaturprogramm der HRM mit Prä-Amplifikation.....	54
Tabelle 7: Reaktionsansatz für die MS-HRM Analyse von HIC1.....	59
Tabelle 8: Temperaturprogramm der HRM mit Prä-Amplifikation.....	59
Tabelle 9: Reaktionsansatz für die MS-HRM Analyse von DAPK1.....	69
Tabelle 10: Temperaturprogramm der HRM mit Prä-Amplifikation.....	69
Tabelle 11: Reaktionsansatz für die MS-HRM Analyse von OSMR.....	74
Tabelle 12: Temperaturprogramm der HRM mit Prä-Amplifikation.....	74
Tabelle 13: Optimierte Bedingungen der MS-HRM Methoden mit den ausgewählten Primerpaaren.....	79
Tabelle 14: Ergebnisse der Inkubation mit 5-Aza-2dC für das Gen HIC1.....	96
Tabelle 15: Ergebnisse der Inkubation mit 5-Aza-2dC für das Gen OSMR.....	97
Tabelle 16: Ergebnisse der Inkubationsversuche mit niedrigen Konzentrationen.....	99
Tabelle 17: Ergebnisse der Inkubationsversuche mit höheren Konzentrationen.....	100
Tabelle 18: Pipettiermuster eines Mastermix (MM) für das APC Gen.....	104

Tabelle 19: Pipettierschema der Substanzgemische und der DNA.....	105
Tabelle 20: Pipettierschema der Bisulfitkonvertierung.....	107
Tabelle 21: Temperaturprogramm der Bisulfitkonvertierung.....	107
Tabelle 22: Übersicht der selbst bisulfitkonvertierten Standards.....	116
Tabelle 23: Übersicht der durchgeführten Zellinkubationen.....	117

Literaturverzeichnis

- [1] R. W. Ruddon: Cancer biology; Fourth Edition; Oxford University Press; 69-70; (2007)
- [2] T. Tollefsbol: Epigenetics: The new science of genetics; in T. Tollefsbol (Editor(s)): Handbook of epigenetics: The new molecular and medical genetics; Academic Press; 1-6; (2011)
- [3] M. Esteller: An introduction to epigenetics; in M. Esteller (Editor(s)): Epigenetics in biology and medicine; CRC Press; 1; (2009)
- [4] R. Venkatachalam; M. J. L. Ligtenberg; N. Hoogerbrugge; D. R. H. de Bruijn; R. P. Kuiper; A. G. van Kessel: The epigenetics of (hereditary) colorectal cancer; Cancer genetics and cytogenetics; 206; 1-6; (2010)
- [5] A. Brero; H. Leonhardt; M. C. Cardoso: Replication and translation of epigenetic information; in W. Doerfler; P. Böhm (Editor(s)): DNA methylation basic mechanisms; Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York; 21-44; (2006)
- [6] W. H. Elliott; D. C. Elliot: Biochemistry and molecular biology; Third Edition; Oxford University Press; 341-355; (2005)
- [7] J. Tost: DNA methylation: An introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker; Molecular biotechnology; 44; 71-81; (2010)
- [8] J. T. DeAngelis; J. B. Berletch; L. G. Andrews; T. O. Tollefsbol: DNA hypermethylation and oncogenesis; in T. Tollefsbol (Editor(s)): Cancer epigenetics; CRC Press; 39-49; (2009)
- [9] M. Esteller: Impact of DNA methylation on health and disease; in M. Esteller (Editor(s)): DNA methylation - approaches, methods and applications; CRC Press; 1-10; (2005)
- [10] E. Li; A. Bird: DNA methylation in mammals; in C. D. Allis; T. Jenuwein; D. Reinberg; M. Caparros (Editor(s)): Epigenetics; Cold Spring Harbor Laboratory Press; 341-356; (2007)
- [11] M. S. Kim; J. Lee; D. Sidransky: DNA methylation markers in colorectal cancer; Cancer Metastasis Rev; 29; 181-206; (2010)

- [12] C. Brenner; F. Fuks: DNA methyltransferases: Facts, clues, mysteries; in W. Doerfler; P. Böhm (Editor(s)): DNA methylation basic mechanisms; Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York; 45-66; (2006)
- [13] S. A. Qureshi; M. U. Bashir; A. Yaqinuddin: Utility of DNA methylation markers for diagnosing cancer; International Journal of Surgery; 8; 194-198; (2010)
- [14] <http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/5/bc/vlus/atp.vlu/Page/vsc/de/ch/5/bc/atp/funktionen/enzyme/adomet/adomet.vscml.html>; S-Adenosylmethionin; Stand: 19.07.2011
- [15] R. J. Klose; A. P. Bird: Genomic DNA methylation: The mark and its mediators; TRENDS in Biochemical Sciences; Vol.31 No.2; 89-97; (February 2006)
- [16] D. Hanahan, R. A. Weinberg: The hallmarks of cancer; Cell; Vol. 100; 57-70; (2000)
- [17] M. Roussel: Tumor suppressor genes; in S. Pelengaris; M. Khan (Editor(s)): The molecular biology of cancer; Blackwell Publishing; 219-250; (2006)
- [18] P. W. Laird: The power and the promise of DNA methylation markers; Nature Reviews; Volume 3; 253-266; (2003)
- [19] W. A. Schulz: Molecular biology of human cancers - an advanced student's textbook; Springer; 271-287; (2005)
- [20] J. R. Jass; V. L. J. Whitehall; J. Young; B. A. Leggett: DNA methylation in colorectal cancer; in M. Szyf (Editor(s)): DNA methylation and cancer therapy; Eureka.com and Kluwer Academic/ Plenum Publishers; 59-68; (2005)
- [21] M. Esteller: How CpG island hypermethylation leads to cancer dissemination: The sounds of silence for tumor and metastasis suppressor genes; in M. Esteller (Editor(s)): DNA methylation, epigenetics and metastasis; Springer; 1-8; (2005)
- [22] <http://atlasgeneticsoncology.org>; Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology; Stand: 22.10.2011
- [23] <http://www.genecards.org>; Gene cards - The human gene compendium; Stand: 23.10.2011

- [24] J. J. Pasternak: An introduction to human molecular genetics - mechanisms of inherited diseases; Second Edition; Wiley-Liss; 471-516; (2005)
- [25] S. Choi; S. Friso: Role of DNA methylation in cancer progression; in T. Tollefsbol (Editor(s)): Cancer epigenetics; CRC Press; 79-93; (2009)
- [26] S. Pelengaris; M. Khan: Regulation of growth: Growth factors, receptors, and signaling pathways; in S. Pelengaris; M. Khan (Editor(s)): The molecular biology of cancer; Blackwell Publishing; 120-157; (2006)
- [27] <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/HIC1ID40819ch17p13.html>; HIC1 ; Stand: 01.08.2011
- [28] <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/DAPK1ID417ch9q21.html>; DAPK1; Stand: 01.08.2011
- [29] S. Pehlivan; M. Artac; T. Sever; H. Bozcuk; C. Kilincarslan; M. Pehlivan: Gene methylation of SFRP2, P16, DAPK1, HIC1 and MGMT and KRAS mutations in sporadic colorectal cancer; Cancer Genetics and Cytogenetics; 201; 128-132; (2010)
- [30] M. Herranz; M. Esteller: CpG island hypermethylation of tumor suppressor genes in human cancer: Concepts, methodologies and uses; in M. Szyf (Editor(s)): DNA methylation and cancer therapy; Eureka.com and Kluwer Academic/ Plenum Publishers; 69-84; (2005)
- [31] G. K. Reid; A. R. MacLeod: DNA methyltransferase inhibitors: Paving the way for epigenetic cancer therapeutics; in M. Szyf (Editor(s)): DNA methylation and cancer therapy; Eureka.com and Kluwer Academic/ Plenum Publishers; 187-204; (2005)
- [32] http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_OSMR.html; OSMR; Stand: 01.08.2011
- [33] G. Deng; S. Kakar; K. Okudiara; E. Choi; M. H. Sleisenger, Y. S. Kim: Unique methylation pattern of oncostatin M receptor gene in cancers of colorectum and other digestive organs; Clinical Cancer Research; 15(5); 1519-1526; (2009)
- [34] S. Choi; R Corrocher; S. Friso: Nutrients and DNA methylation; in S. Choi; S. Friso (Editor(s)): Nutrients and epigenetics; CRC Press; 105-125; (2009)

- [35] M. Fang; D. Chen; C. S. Yang: Dietary polyphenols may affect DNA methylation; *The Journal of Nutrition*; 137; 223S-228S; (2007)
- [36] J. H. Kouadio; S. D. Dano; S. Moukha; T. A. Mobio; E. E. Creppy: Effects of combination of *Fusarium* mycotoxins on the inhibition of macromolecular synthesis, malondialdehyde levels, DNA methylation and fragmentation, and viability in Caco-2 cells; *Toxicon*; 49; 306 - 317; (2007)
- [37] H.-D. Belitz; W. Grosch; P. Schieberle: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*; 6. Auflage; Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 27-30; (2008)
- [38] M. G. Knize; J. S. Felton: Heterocyclic amines; in J. Gilbert; H. Z. Senyuva (Editor(s)): *Bioactive compounds in foods*; Blackwell Publishing Ltd; 358-372; (2008)
- [39] U.S. Department of Health and Human Services; National Toxicology Program; National Institute of Environmental Health Sciences - National Institutes of Health; Prepared by: Technology Planning and Management Corporation: Report on carcinogens; Background document for selected heterocyclic amines: PhIP, MeIQ and MeIQx; Prepared for the: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program; ; (September 19,2002)
- [40] B. Watzl; C. Leitzmann: *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*; Hippokrates Verlag Stuttgart; 43-45; 93-96; (1995)
- [41] M. Cotterchio; B. A. Boucher; M. Manno; S. Gallinger; A. Okey; P. Harper: Dietary phytoestrogen intake is associated with reduced colorectal cancer risk; *The Journal of Nutrition*; 136 (12); 3046 - 3053; (2006)
- [42] http://www.rdchemicals.com/chemicals.php?mode=details&mol_id=7432; R&D Chemicals; (+) - Lariciresinol; Stand: 08.09.2011
- [43] http://www.rdchemicals.com/chemicals.php?mode=details&mol_id=7433; R&D Chemicals, (-) - Matairesinol; Stand: 08.09.2011
- [44] K. A. Scudamore: Mycotoxins; in J. Gilbert; H. Z. Senyuva (Editor(s)): *Bioactive compounds in foods*; Blackwell Publishing; 134-162; (2008)

- [45] S. B. Baylin; P. A. Jones: Epigenetic determinants of cancer; in C. D. Allis; T. Jenuwein; D. Reinberg; M. Caparros (Editor(s)): Epigenetics; Cold Spring Harbor Laboratory Press; 457-476; (2007)
- [46] P. Parrella: CpG island hypermethylation in breast cancer progression and metastasis; in M. Esteller (Editor(s)): DNA Methylation, epigenetics and metastasis; Springer; 81-132; (2005)
- [47] <http://jjco.oxfordjournals.org/content/35/6/293.full>; Japanese Journal of Clinical Oncology, Oxford Journals, 5-Aza-2'deoxyctidine; Stand: 12.08.2011
- [48] http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines/info.php?dsmz_nr=299&from=cell_line_index&select=H&term=&preselect=human;hamster;mouse;rat;insect;other&firstload=0; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ; Braunschweig; HT-29; Stand: 13.08.2011
- [49] A. Manz; N. Pamme; D. Iossifidis: Bioanalytical chemistry; Imperial College Press; 146-156; (2004)
- [50] M. J. McPherson; S. G. Moller: PCR; Second Edition; Taylor & Francis Group; 1-28; (2006)
- [51] G. L. Shipley: An introduction to real-time PCR; in M. T. Dorak (Editor(s)): Real-time PCR; Taylor & Francis Group; 1-38; (2006)
- [52] T. K. Wojdacz; A. Dobrovic; L. L. Hansen: Methylation-sensitive high-resolution melting; Nature Protocols; VOL.3 NO.12; 1903-1908; (2008)
- [53] T. K. Wojdacz, A. Dobrovic: Melting curve assays for DNA methylation analysis; in J. Tost (Editor(s)): DNA methylation: Methods and protocols; Second Edition; Humana Press; Springer Science + Business Media; 229-240; (2009)
- [54] O. Ammerpohl; J. I. Martin-Subero; J. Richter, I. Vater; R. Siebert: Hunting for the 5th base: Techniques for analyzing DNA methylation; Biochimica et Biophysica Acta; 1790; 847 - 862; (2009)

- [55] S. Ropero; M. Esteller: Epigenetics and cancer; DNA methylation; in M. Esteller (Editor(s)): Epigenetics in biology and medicine; CRC Press; 3-16; (2009)
- [56] S. J. Clark: Studying mammalian DNA methylation: Bisulfite modification; in M. Esteller (Editor(s)): DNA methylation: Approaches, methods and applications; CRC Press; 53-64; (2005)
- [57] <http://www.diagenode.com/en/catalog/catalog-36/kits-2/product/magbisulfite-kit-2237>; Bisulfite conversion workflow; Stand: 24.08.2011
- [58] N. Hattori; T. Ushijima: Analysis of gene-specific DNA methylation; in T. Tollefsbol (Editor(s)): Handbook of epigenetics: The new molecular and medical genetics; Academic Press - Elsevier Inc.; 125-134; (2011)
- [59] T. K. Wojdacz; T. Borgbo; L. L. Hansen: Primer design versus PCR bias in methylation independent PCR amplifications; Epigenetics; Vol. 4; Issue 4; 231 - 234; (2009)
- [60] T. K. Wojdacz; L. L. Hansen; A. Dobrovic: A new approach to primer design for the control of PCR bias in methylation studies; BMC Research Notes; 1:54; available from <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/1/54>; (2008)
- [61] X. Wang; B. Seed: High-throughput primer and probe design; in M. T. Dorak (Editor(s)): Real-time PCR; Taylor & Francis Group; 93-106; (2006)
- [62] <http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/local/POLAND/poland.html>; Poland service; Stand: 19.08.2011
- [63] F. Malentacchi; G. Forni; S. Vinci; C. Orlando: Quantitative evaluation of DNA methylation by optimization of a differential-high resolution melt analysis protocol; Nucleic Acids Research; Vol. 37 No. 12; e86; (2009)
- [64] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>; NCBI - Nucleotide; Stand: 31.08.2011
- [65] <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>; Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator; Stand: 31.08.2011
- [66] <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>; RNAfold WebServer; Stand: 31.08.2011

- [67] M. Balic; M. Pichler; J. Strutz; E. Heitzer; C. Ausch; H. Samonigg; R. J. Cote; N. Dandachi: High quality assessment of DNA methylation in archival tissues from colorectal cancer patients using quantitative high-resolution melting analysis; Journal of Molecular Diagnostics; Vol. 11; No. 2; 102-108; (2008)
- [68] <http://www.pcrlinks.com/variants/touchdown.htm>; PCRLinks.com - Variants / Touchdown PCR; Stand: 01.09.2011
- [69] http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/5/bc/vlus/pcr.vlu/Page/vsc/de/ch/5/bc/pcr/methoden/methodische_varianten/touchdown_pcr.vscml.html; Chemgaroo - Chemgapedia - Die touchdown-PCR; Stand: 09.01.2011
- [70] K. T. Huang; A. Dobrovic; S. B. Fox: No evidence for promotor region methylation of the succinate dehydrogenase and fumarate hydratase tumor suppressor genes in breast cancer; BMC Research Notes; 2; 194; (2009)
- [71] T. Lindl: Zell- und Gewebekultur; 4. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag; 102-104; (2000)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Elisabeth Gertrude Habla (geb. Schitkowitz)
Geburtsdatum	12.01.1984
Geburtsort	Neunkirchen, NÖ
Familienstand	verheiratet, keine Kinder
Eltern	Leopold Schitkowitz Gertrude Schitkowitz

Ausbildung

1990-1994	Volksschule Mühlfeld Neunkirchen
1994-1998	Gymnasium Neunkirchen (1996-1998 wirtschaftskundlicher Schwerpunkt)
1998-2003	Bildungsanstalt für Kindergartenpädagogik Wr. Neustadt (BAKIP)
Juni 2003	Abschluss der BAKIP mit Matura (ausgezeichneter Erfolg)
Oktober 2003	Technische Universität Wien Studium der Technischen Physik
Februar 2004	Universität Wien Diplomstudium der Chemie

Tätigkeiten

2003-2006	NÖ Landeskindergarten Wienerstraße, Neunkirchen Urlaubsvertretung der Kindergartenpädagoginnen in den Semester-, Oster- und Sommerferien
Sommer 2007	Semperit Technische Produkte Gesellschaft m.b.H, Wimpassing Laborantin in der Abteilung Chemie
Sommer 2008	Merkur Warenhandels AG, Regalbetreuerin in der Filiale Neunkirchen
Sommer 2009	Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit

	GmbH (AGES), Wien Spargelfeldstraße, Laborantin im Bereich Analytik Kompetenzzentren, CC Strahlenschutz und Radiochemie
11.2009-03.2010	Merkur Warenhandels AG, Kassierin in der Filiale Neunkirchen
04.2010-10.2010	Semperit Technische Produkte Gesellschaft m.b.H, Wimpassing Laborantin in der Abteilung Chemie
Wintersemester 2010/11	Tätigkeit als Tutorin am Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie
Sommersemester 2011	Tätigkeit als Tutorin am Institut für Analytische Chemie
Wintersemester 2011/12	Tätigkeit als Tutorin am Institut für Analytische Chemie

Wissenschaftliche Arbeiten

09.2011	qPCR Europe Conference, München, Deutschland Poster: „Detection of changes in promoter methylation of neurotrophin tyrosine kinase receptor type 2 (NTRK2) gene in HT29 cells by high resolution melting“ [<u>M. Cichna-Markl</u> , B. Druml, E. Habla, V. Blust, D. Marko]
	11th International Symposium and Ceepus Summer School on Bioanalysis, Graz, Österreich Posterpräsentation: „Methylation-sensitive high resolution melting analysis – primer development and optimization“ [<u>E. Habla</u> , M. Cichna-Markl]
	11th International Symposium and Ceepus Summer School on Bioanalysis, Graz, Österreich Lecture: „DNA methylation analysis by high resolution melting“, [<u>M. Cichna-Markl</u> , B.Druml, E.Habla]
	11th International Symposium and Ceepus Summer School on Bioanalysis, Graz, Österreich Poster: „Detection of changes in promoter methylation of the transcription factor GATA4 in HT29 cells by high resolution melting analysis“ [<u>B. Druml</u> , E. Habla, V. Blust, D. Marko, M. Cichna-Markl]