



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Bestimmung des Methylierungsgrades von  
Brustkrebs-relevanten Genen in MCF-7 Zellen und  
Biopsieproben mittels methylierungs-sensitiver  
hochauflösender Schmelzkurvenanalyse“

Verfasserin

Viktoria Maria Fackler

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 190 423 445

Studienrichtung lt. Studienblatt: Lehramtsstudium UF Chemie UF Biologie und Umweltkunde

Betreuerin: Ao. Univ. Prof. Dr. Margit Cichna-Markl



## **DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich im Laufe meines Studiums unterstützt haben.

Als Erstes möchte ich mich bei meiner Betreuerin, Frau Ao. Univ. Prof. Dr. Margit Cichna-Markl, für ihre Betreuung, Hilfestellung und Beratung während meiner Diplomarbeit bedanken.

Außerdem gilt mein Dank Frau Eva Attakpah sowie den Mitgliedern der Arbeitsgruppe des Instituts für Lebensmittelchemie und Toxikologie für ihre hervorragende Unterstützung im Umgang mit der Zellkultur.

Weiters danke ich den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe für die nette Zeit im Labor, die zahlreichen Gespräche in den Mittagspausen sowie für die Tipps und Ratschläge, die sie mir gegeben haben.

Ein großes Dankeschön gilt auch meinen vielen Bekannten und StudienkollegInnen, welche mir immer wieder gezeigt haben, wie abwechslungsreich und humorvoll die Freizeit gestaltet werden kann.

Besonderer Dank gilt meinem Freund Thomas, welcher mir immer beistand und mich stets unterstützt und ermutigt hat, sowie meiner Familie für ihren Rückhalt in vielerlei Hinsicht.



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Epigenetik.....	1
1.2 DNA-Methylierung .....	2
1.2.1 DNA-Methyltransferasen.....	3
1.2.2 Mechanismus der DNA-Methylierung .....	4
1.3 DNA-Methylierung und Krebsentwicklung.....	5
1.3.1 DNA-Methylierung und Brustkrebs.....	6
1.4 Tumorsuppressor-Gene .....	7
1.4.1 CDH1 .....	7
1.4.2 ER $\alpha$ und ER $\beta$ .....	8
1.4.3 HIN-1.....	9
1.4.4 MGMT .....	9
1.4.5 CDKN2A.....	10
1.4.6 DAPK1 .....	11
1.4.7 RASSF1A.....	12
1.5 Beeinflussung der DNA-Methylierung durch ausgewählte Substanzen .....	12
1.5.1 Polyphenole .....	13
1.5.2 Flavanole.....	16
1.5.2.1 (-)-Epigallocatechin-3-gallat.....	16
1.5.3 Flavonole.....	19
1.5.3.1 Quercetin .....	19
1.5.4 Lignane .....	20
1.5.4.1 (+)-Lariciresinol.....	21
1.5.4.2 (-)-Matairesinol.....	22
1.5.5 Hydralazin .....	23
1.6 MCF-7 Zelllinie .....	23
1.7 Biopsieproben von Brustkrebsgewebe .....	24
<b>2. Zielsetzung</b> .....	<b>25</b>
<b>3. Theoretischer Hintergrund</b> .....	<b>26</b>
3.1 Polymerase-Kettenreaktion .....	26
3.1.1 Real Time-PCR.....	31
3.2 Bisulfit-Konvertierung .....	33
3.3 Primer-Design .....	34
3.4 Methylierungs-sensitive hochauflösende Schmelzkurvenanalyse .....	36
3.4.1 Prinzip der MS-HRM Analyse .....	36
3.4.2 Detektion der Schmelzprofile .....	36

3.4.3 Datenanalyse der Schmelzprofile .....	38
<b>4. Experimentelles .....</b>	<b>41</b>
4.1 Zellkultur .....	41
4.1.1 Zellkultur-Arbeit unter der Sterilbank .....	41
4.1.2 Kultivierung der MCF-7 Zellen .....	42
4.1.3 Subkultivierung .....	42
4.1.4 Bestimmung der Zellzahl .....	43
4.2 Inkubationsversuche .....	46
4.2.1 Erstellen der Verdünnungsreihe .....	46
4.2.2 Inkubation mit EGCG .....	47
4.2.3 Inkubation mit Polyphenolen .....	48
4.2.4 Durchführung der Inkubation .....	48
4.3 DNA-Extraktion .....	49
4.3.1 DNA-Extraktion aus MCF-7 Zellen .....	49
4.3.2 DNA-Extraktion aus Biopsieproben .....	50
4.4 Bestimmung der DNA-Konzentration und der Reinheit .....	51
4.5 Durchführung der Bisulfit-Konvertierung .....	52
4.5.1 Vorgangsweise .....	52
4.5.2 Verdünnung der Bisulfit-konvertierten DNA .....	56
4.6 Durchführung des Primer-Designs .....	56
4.7 Entwicklung und Optimierung der MS-HRM .....	59
4.7.1 Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen .....	59
4.7.2 DNA-Standards .....	59
4.7.3 Herstellung des Master-Mix .....	59
4.7.4 Herstellung des Reaktions-Mix .....	60
4.7.5 Temperaturprofil .....	61
4.8 Datenanalyse .....	62
4.8.1 Auswertung einer HRM-Analyse .....	62
4.8.2 Ausreißertest nach Nalimov .....	62
4.8.3 Signifikanztests .....	63
4.9 Chemikalien .....	64
4.10 Kits .....	64
4.11 Zellkulturbedarf .....	65
4.12 Geräte .....	65
<b>5. Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>67</b>
5.1 Primer-Design .....	67
5.1.1 Primer-Design am Beispiel des Gens ER $\alpha$ .....	67
5.1.1.1 Ergebnisse der MS-HRM Analyse für ER $\alpha$ .....	72

5.1.2 Primer-Design für das Gen ERβ .....	74
5.1.3 Primer-Design für das Gen MGMT .....	79
5.1.4 Primer-Design für das Gen CDH1.....	84
5.1.5 Primer für das Gen HIN-1 .....	88
5.2 Optimierung der MS-HRM Parameter .....	90
5.2.1 Optimierung der Annealingtemperatur .....	90
5.2.2 Optimierung der MgCl <sub>2</sub> -Konzentration .....	93
5.2.3 Optimierte MS-HRM Methoden.....	95
5.2.4 Optimierung des Temperaturprofils der MS-HRM Analyse.....	95
5.3 Bestimmung des DNA-Methylierungsgrades in MCF-7 Zellen .....	96
5.3.1 ERβ.....	99
5.3.2 MGMT .....	105
5.3.3 CDKN2A.....	109
5.3.4 DAPK1 .....	113
5.3.5 RASSF1A.....	114
5.4 Biopsieproben .....	120
5.4.1 Kontrollstandards für das Gen DAPK1.....	120
5.4.2 Bestimmung des DNA-Methylierungsgrades in Biopsieproben .....	121
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>124</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>I</b>
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	III
FORMELVERZEICHNIS .....	IX
TABELLENVERZEICHNIS.....	X
LITERATURVERZEICHNIS .....	XII
CURRICULUM VITAE.....	XX



# 1. Einleitung

Krebs zählt weltweit zu den häufigsten Erkrankungen mit Todesfolge. Bösartige Tumorerkrankungen sind nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Österreich. Krebserkrankungen treten überwiegend im höheren Alter auf. Auf Grund der zunehmenden Alterung der Gesamtbevölkerung werden Krebserkrankungen in Zukunft vermehrt in den Mittelpunkt unseres Interesses rücken [1]. Unter allen Krebsarten ist Brustkrebs mit einer Prävalenz von 29 % die häufigste Krebserkrankung bei Frauen [2].

Der Lebensstil, wie beispielsweise Ernährung, Rauchen, Stress und Körpergewicht, hat auf das Entstehen von Tumorerkrankungen einen großen Einfluss. Studien zeigen, dass bestimmte Lebensmittelinhaltsstoffe, wie beispielsweise Polyphenole im Grüntee, den genomischen und gen-spezifischen DNA-Methylierungsgrad verändern können [3]. Dank des zunehmenden Wissens über Brustkrebs sowie durch zahlreiche Studien in diesem Forschungsfeld kommt es zu einer verbesserten Früherkennung von Brustkrebs und folglich zu immer größeren Überlebenschancen nach einer Brustkrebsdiagnose [2].

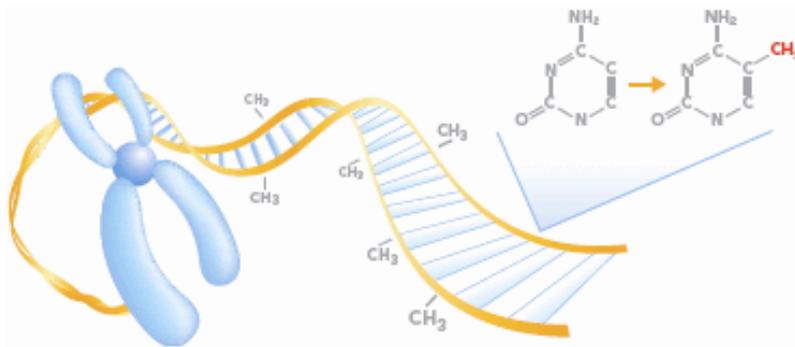
## 1.1 Epigenetik

Ein Genom enthält genetische sowie epigenetische (*epi*  $\triangleq$  darüber, außerhalb) Informationen. Genetik alleine kann das unterschiedliche Aussehen und die Erkrankungen von verschiedenen Phänotypen mit dem gleichen Genotyp nicht erklären. Personen, welche die gleiche DNA-Sequenz besitzen (eineiige Zwillinge), weisen unterschiedliche Phänotypen und Krankheitsanfälligkeiten auf. Die genetische Information stellt einen Bauplan für alle benötigten Proteine eines Lebewesens bereit. Die epigenetische Information liefert Anweisungen, wie, wo und wann die genetische Information verwendet werden soll. Epigenetische Prozesse gewährleisten, dass bestimmte Gene zur richtigen Zeit aktiv sind und auch wieder abgeschaltet werden, wenn sie nicht mehr erforderlich sind. Der Begriff der Epigenetik wurde bereits im Jahre 1939 von Conrad Hal Waddington eingeführt. Waddington definierte die Epigenetik als eine kausale Interaktion zwischen den Genen und ihren Produkten, welche zur Entstehung eines Phänotyps führen. Im Laufe der Jahre hat sich auf Grund des vermehrten Wissens über die Epigenetik deren Definition weiterentwickelt. Epigenetik wird nun als eine erbliche Veränderung in der Genexpression definiert, welche nicht zu einer Änderung in der DNA-Sequenz (Genotyp) führt [4, 5].

Epigenetische Prozesse umfassen eine Vielzahl an molekularen Mechanismen, wie beispielsweise Histonmodifikationen (Acetylierung, Deacetylierung, Methylierung), den Umbau der Chromatinstruktur, sowie die DNA-Methylierung. Diese Mechanismen greifen stark ineinander und stabilisieren sich gegenseitig, um eine zuverlässige Weitergabe der epigenetischen Information während der Zellteilung zu ermöglichen [6].

## 1.2 DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung ist bei Säugetieren die einzige genetisch programmierte DNA-Modifikation. Beim Menschen erfolgt die DNA-Methylierung nahezu immer am Cytosin einer Cytosin-Guanin Basenabfolge, auch CpG-Dinukleotid genannt. Die Methylierung des Cytosins erfolgt an der C-5 Position des Pyrimidinrings, dabei entsteht 5-Methylcytosin (siehe *Abbildung 1*) [6, 7].



**Abbildung 1: DNA-Methylierung am C-5 des Cytosins; aus [8]**

Der Anteil von 5-Methylcytosin im menschlichen Körper beträgt ungefähr ein Prozent aller DNA-Basen, wobei 75 % aller CpG-Dinukleotide im Säugetiergenom methyliert vorliegen. Regionen mit einem hohen Anteil an CpG-Dinukleotiden (Vorkommen an Cytosin und Guanin größer als 50 %) werden als CpG-Inseln bezeichnet. Eine CpG-Insel ist ungefähr ein Kilo-Basenpaar (kb) groß. Im menschlichen Genom gibt es ungefähr 30.000 CpG-Inseln. Das Auftreten der CpG-Inseln erfolgt im menschlichen Erbgut nicht zufällig, es gibt Regionen, wo sie häufiger anzutreffen sind. Das Vorkommen der CpGs ist in der Promotorregion und im ersten Exon eines Protein-kodierenden Gens besonders hoch. Dreiviertel der Positionen des Transkriptionsstarts, sowie 88 % der aktiven Promotorregion beherbergen CpG-reiche Sequenzen und werden über DNA-Methylierung reguliert [5, 6, 9].

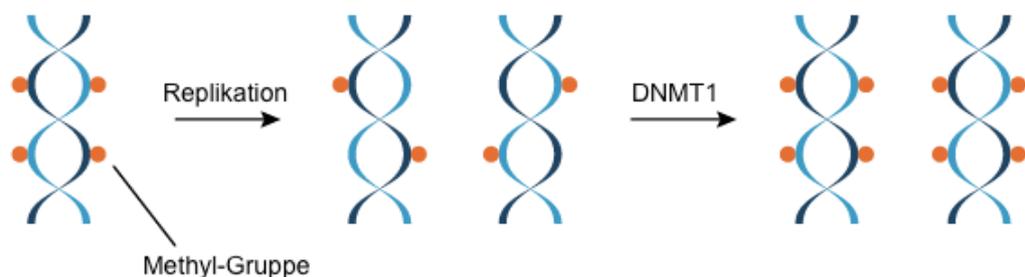
Bei Prokaryoten und Pilzen dient die DNA-Methylierung als Schutz für das eigene Genom, bei den höheren Eukaryoten hingegen hauptsächlich zur Inaktivierung von Genen [10]. Allerdings benötigt der Mensch einen bestimmten Anteil an Methylcytosin in seinem Genom. Die DNA-Methylierung spielt eine wichtige Rolle bei der

X-Chromosominaktivierung bei Frauen. Abweichungen im DNA-Methylierungsmuster können in die regionale Hypermethylierung und in die globale Hypomethylierung eingeteilt werden (Kapitel 1.3) [5, 7].

### 1.2.1 DNA-Methyltransferasen

Die DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysieren die Methylierung an der C-5 Position des Cytosinrings. Die DNMTs werden in 3 Familien eingeteilt, die DNMT1, DNMT2 und DNMT3. Die dritte Familie wird wiederum in 3 Mitglieder unterteilt, die DNMT3A, DNMT3B und DNMT3L. Generell besitzen fast alle DNMTs am C-terminalen Ende des Proteins eine katalytische und am N-Ende eine regulatorische Domäne. Ausnahmen sind hierbei DNMT2 und DNMT3L. DNMT2 besitzt zwar eine geringe DNMT-Aktivität, weist allerdings keine regulatorische Domäne auf. DNMT3L zeigt keine Methyltransferaseaktivität und ist katalytisch inaktiv. Diese DNA-Methyltransferase ist dennoch an der Regulierung der DNA-Methylierung beteiligt und ein wichtiger Kofaktor von DNMT3A [12].

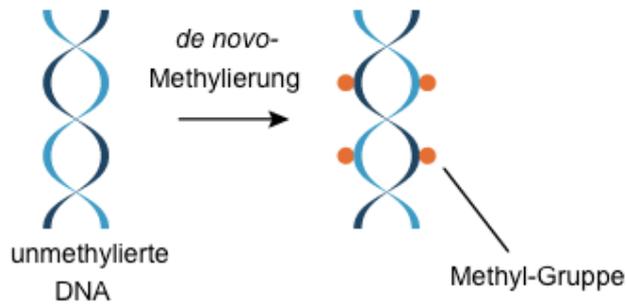
DNMT1 ist das erste entdeckte Enzym der Säugetier DNA-Methyltransferasen. DNMT1 wird häufig als die Haupterhaltungs-DNMT bezeichnet. Diese Bezeichnung ist darauf zurückzuführen, dass DNMT1 für den Erhalt des DNA-Methylierungsmusters verantwortlich ist. Es ergänzt das Methylierungsmuster des methylierten Original DNA-Strangs nach der DNA-Replikation (siehe *Abbildung 2*). Bei der Replikation erfolgt zwar eine Vervielfältigung des methylierten Mutterstrangs in 2 Tochterstränge, eine Weitergabe des Methylierungsprofils des Mutterstrangs erfolgt jedoch bei der Replikation nicht. In der Folge erhält man deshalb nach der Replikation 2 hemimethylierte DNA-Tochterstränge. DNMT1 ergänzt die fehlende Methylierung, wobei der originale Mutterstrang als Matrize dient [5, 12].



**Abbildung 2: Erhaltung des DNA-Methylierungsmusters durch DNMT1; aus [13], modifiziert**

Die Expression des DNMT1-Gens ist in proliferierenden Zellen sehr hoch. In somatischen Zellen ist DNMT1 die häufigste Methyltransferase. DNMT1 zeigt *in vivo* eine geringe bis keine *de novo* Methylierungsaktivität [5, 12].

Die DNMT3 Enzyme, DNMT3A und DNMT3B, methylieren zuvor unmethylierte DNA-Abschnitte, sie besitzen eine *de novo* Aktivität (siehe *Abbildung 3*) [5, 12].



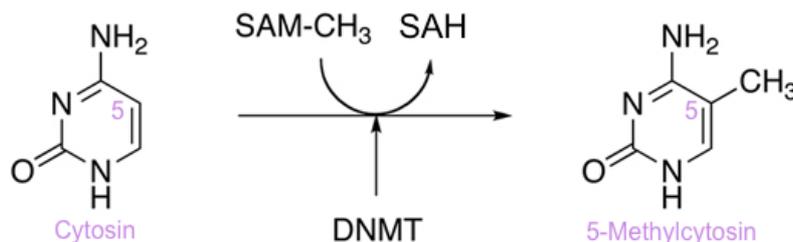
**Abbildung 3: De novo Methylierung durch DNMT3A und DNMT3B; aus [13], modifiziert**

Während der Embryogenese und Gametogenese ist die Expression der DNMT3-Gene sehr hoch. Die Expression nimmt allerdings bei differenzierten somatischen Geweben stark ab [5, 12].

Die DNMT1, das Enzym für die Erhaltung der Methylierung, arbeitet sehr effizient, neigt allerdings zu einer erhöhten Fehlerhäufigkeit. DNMT3A und DNMT3B agieren mit ihrer *de novo* Aktivität als Korrekturleser. Sie ergänzen CpG-Methylierungen dort, wo die DNMT1 eine Methylierung ausgelassen hat. DNMT3 Enzyme besitzen sowohl eine Präferenz für unmethylierte Sequenzen als auch für hemimethylierte DNA-Abschnitte. Weiters gibt es in Darmkrebszellen Anzeichen dafür, dass es zwischen der DNMT1 und der DNMT3B eine Zusammenarbeit hinsichtlich der Weitergabe des DNA-Methylierungsmusters gibt [5, 12].

### 1.2.2 Mechanismus der DNA-Methylierung

Bei einer DNA-Methylierung wird eine Methylgruppe vom Methyl donor S-Adosylmethionin (SAM) auf die DNA übertragen (siehe *Abbildung 4*). Dabei entsteht S-Adosylhomocystein (SAH). Die bereits im Abschnitt 1.2.1 genauer beschriebenen DNA-Methyltransferasen katalysieren die Übertragung der Methylgruppe vom SAM auf die Cytosin-Base. Bei hohen Konzentrationen von SAH wird die DNA-Methyltransferase (DNMT) blockiert [6].



**Abbildung 4: DNA-Methylierung katalysiert durch DNMT unter Anwesenheit des Methyl donors SAM; aus [14], modifiziert**

### 1.3 DNA-Methylierung und Krebsentwicklung

Die DNA-Methylierung ist in der Regulierung der Gen-Expression in verschiedenen Zelltypen von wesentlicher Bedeutung. Abweichungen im DNA-Methylierungsmuster spielen eine wichtige Rolle bei der Krebsentstehung und im Fortschreiten des Krankheitsverlaufs. In Krebszellen werden häufig zwei Formen von epigenetischen Modifikationen beobachtet. Eine Form der epigenetischen Modifikation ist der genomweite Verlust der DNA-Methylierung (Hypomethylierung), welcher zu einer Chromosomeninstabilität führen kann. Weiters kommt es häufig zu einer gen- und regionsspezifischen Erhöhung der Methylierung (Hypermethylierung) in CpG-Inseln. Eine Hypermethylierung von CpG-Inseln in einer Promotorregion eines Tumorsuppressor-Gens oder eines anderen Krebs-relevanten Gens wird oft mit einer Stilllegung des entsprechenden Gens in Verbindung gebracht [6, 15]. Es werden immer mehr Promotoren bekannt, welche während der Karzinogenese hypermethyliert werden. Gene werden häufig über DNA-Methylierungen inaktiviert. Diese Gene besitzen beispielsweise einen Einfluss auf die DNA-Reparatur (z.B. *MGMT*, engl. *O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA-Methyltransferase* und *BRCA1*, engl. *Breast Cancer 1*), die Zellzyklusregulierung (*CDKN2A*, engl. *Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A*), die Zell-Differenzierung (*MYOD1*, engl. *Myogenic Differentiation 1*), die Apoptose (*DAPK1*, engl. *Death-associated Protein Kinase 1*), sowie die Signalweiterleitung (*APC*, engl. *Adenomatous Polyposis Coli*) [6].

Anhand des Methylierungsmusters in den CpG-Inseln kann zwischen verschiedenen Tumortypen unterschieden werden. Studien haben gezeigt, dass durch die Verwendung von auf der Methylierung basierenden Biomarkern verschiedene Tumortypen identifiziert werden können, ohne in den Körper einzudringen (nicht-invasiv), da als Probenmatrix Körperflüssigkeiten (Blutserum, Plasma oder Urin) verwendet werden können. Weiters hilft eine frühe Bestimmung des Methylierungsgrades in CpG-Inseln, den Krebs rechtzeitig zu charakterisieren und zu klassifizieren [6].

Die DNA-Methylierung ist grundsätzlich eine nicht mutagene Veränderung der DNA und deshalb eine reversible Modifikation. Diese Tatsache ist ein wichtiger Gegenstand der aktuellen Krebsforschung. Es wird versucht, eine Demethylierung der methylierten CpG-Dinukleotide durch Behandlung der Krebszellen mit demethylierend wirkenden Chemikalien hervorzurufen [6].

### 1.3.1 DNA-Methylierung und Brustkrebs

Brustkrebs ist eine der häufigsten Krebsarten bei Frauen weltweit. In Österreich ist Brustkrebs mit 29 % die häufigste Krebserkrankung bei Frauen. Die Wahrscheinlichkeit an Brustkrebs zu erkranken ist in westlichen Ländern deutlich höher. Dies lässt darauf schließen, dass Ernährungs- und Umweltfaktoren eine bedeutende Rolle in der Brustkrebsentstehung einnehmen. Eine Diagnose in einem frühen Stadium ermöglicht eine Überlebensrate von 98 %. Eine Feststellung von Brustkrebs bei Auftreten von Metastasen vermindert die Heilungschancen auf 27 %. Eine möglichst frühe Diagnose ist folglich für die Heilung von Brustkrebs äußerst wichtig [16, 17].

Bisher wurden 4 Brustkrebs-Subtypen identifiziert, die Hormonrezeptor positiven Tumore Luminal-A und Luminal-B, die HER2 positiven Tumore, sowie der dreifach Hormonrezeptor negative/basale Brustkrebs. Dem dreifach-negativen Brusttumor fehlt es an Rezeptoren für die Östrogene, für das Hormon Progesteron und für den humanen epidermalen Wachstumsfaktor 2 (HER2). Solche Tumore sind sehr aggressiv und verheerend, weshalb sie schwierig zu behandeln sind. Luminalkrebs-A ist Östrogenrezeptor positiv und/oder Progesteronrezeptor positiv, sowie HER2 negativ. Der Luminalkrebs-B ist ebenfalls Östrogenrezeptor positiv und/oder Progesteronrezeptor positiv, allerdings HER2 positiv. Östrogenrezeptor positive Tumore sprechen oft auf eine Hormontherapie an. Weiters gibt es noch den HER2 Tumortyp, dieser ist Östrogenrezeptor und Progesteronrezeptor negativ, aber HER2 positiv [18, 19].

Mechanismen, welche mit Brustkrebs in Verbindung gebracht wurden, reichen von genetischen Modifizierungen, der Amplifikation spezifischer Gene, Deletionen, Punktmutationen bis hin zu epigenetischen Mechanismen [20].

Eine Veränderung im DNA-Methylierungsgrad ist typisch für das Auftreten menschlicher Krebsarten. Brustkrebstumore zeigen häufig eine globale Hypomethylierung. Diese Hypomethylierung führt zu einer abweichenden Genaktivität im Vergleich zur ursprünglich vorliegenden DNA-Methylierung [18, 19].

Unmethylierte Promotoren werden bei Brustkrebs wiederum stark methyliert, was zu einer Hypermethylierung vieler Tumorsuppressor-Gene führt. Diese Hypermethylierung führt in der Folge zur Stilllegung des entsprechenden Gens. Die Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen ist ein häufiges Ereignis in der Krebsentwicklung. Wie bereits im Abschnitt 1.3. erwähnt, werden meist solche Gene inaktiviert, welche beispielsweise einen Einfluss auf den Zellzyklus, die Apoptose oder die DNA-Reparatur zeigen. Das Stilllegen dieser wichtigen Gene führt in der Folge zu einer vermehrten Geninstabilität, einer verminderten DNA-Reparatur, sowie zur Ausbreitung der Krebserkrankung [18, 19].

Veränderungen im DNA-Methylierungsgrad in einigen Genen werden mit spezifischen Brustkrebstypen in Verbindung gebracht. Einige Studien zeigen, dass die Hypermethylierung der CpG-Inseln in Gewebe- und Blutproben als diagnostischer Marker verwendet werden kann [19, 21].

## 1.4 Tumorsuppressor-Gene

Tumorsuppressor-Gene werden in einer Vielzahl von Krebsarten, so auch bei Brustkrebs, hypermethyliert vorgefunden [15]. Bei einer Methylierung oder der Stilllegung eines solchen Gens kann sich aus einer gesunden Zelle eine Tumorzelle entwickeln.

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurden folgende Gene, welche im Zusammenhang mit einem Mammakarzinom stehen, ausgewählt und deren DNA-Methylierungsgrad mittels methylierungs-sensitiver hochauflösender Schmelzkurvenanalyse (MS-HRM) bestimmt:

### 1.4.1 CDH1

Das *CDH1*-Gen ist am Chromosom 16q22.1 lokalisiert. *CDH1* kodiert das Transmembran-Glykoprotein E-Cadherin. E-Cadherin ist ein Mitglied der Cadherin-Superfamilie. Cadherine sind  $\text{Ca}^{2+}$  abhängige Zelladhäsionsmoleküle (CAMs), deren Aufgabe es ist, die Kommunikation der Zellen untereinander zu ermöglichen [22].

E-Cadherin spielt eine wichtige Rolle in normalen physiologischen Prozessen, wie der Entwicklung, der Zellpolarität oder der Gewebemorphologie [23]. Weiters ist *CDH1* bedeutend für die Signalübertragung, die Differenzierung und die Genexpression [24].

Die Hypermethylierung des *CDH1*-Promotors während der Krebsentwicklung wurde mit dem Verlust der *CDH1*-Genexpression in Verbindung gebracht [25]. Der *CDH1*-Promotor kann sowohl durch Hypermethylierung, als auch durch Mutation inaktiviert werden [26]. Im Zuge einer von Shargh et al. durchgeführten Studie [24] zur Ermittlung des Expressionsverlustes des Gens E-Cadherin wurde der Methylierungsgrad in der Promotorregion von E-Cadherin in 50 Brustkrebsproben (Stadium 1 – 3) von Patientinnen im Alter zwischen 23 und 74 Jahren bestimmt. 94 % der Mammakarzinome zeigten eine Methylierung, wobei 44 % zu 100 % methyliert vorlagen. Nur 6 % der Proben waren nicht methyliert. Der Verlust der

*CDH1*-Expression in Krebszellen führt zu einem diffusen Wachstumsverlauf und zu einem Metastasenpotential in Tumoren [24].

### 1.4.2 ER $\alpha$ und ER $\beta$

Östrogene beeinflussen viele physiologische Prozesse im menschlichen Körper und nehmen daher eine sehr wichtige Rolle in den menschlichen Lebensabläufen ein. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass Östrogene in der Entwicklung und dem Fortschreiten von zahlreichen Erkrankungen, wie zum Beispiel bei verschiedenen Krebsarten (Brust, Eierstock, Prostata, ...), Osteoporose sowie neurodegenerativen und kardiovaskulären Erkrankungen, Einfluss haben. Östrogene induzieren ihre zelluläre Aktivität über verschiedene Mechanismen. Im Zentrum dieser Abläufe stehen Proteine, an welche Östrogene binden, die Östrogenrezeptoren (ER) [27].

Der Östrogenrezeptor gehört der nuklearen Rezeptorsuperfamilie der Steroid- und Schilddrüsenhormone an. Er kommt in zwei verschiedenen Formen vor, als Östrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) und Östrogenrezeptor  $\beta$  (ER $\beta$ ). Das *ER $\alpha$* -Gen befindet sich am Chromosom 6q25.1. Das ER $\alpha$ -Protein setzt sich aus 595 Aminosäuren zusammen. 1996 wurde der 2. Östrogenrezeptor, *ER $\beta$* , identifiziert, welcher am Chromosom 14q22-24 lokalisiert ist. Beide Östrogenrezeptoren weisen die gleiche funktionelle Organisation auf. Die DNA-Bindungsstelle von *ER $\alpha$*  und *ER $\beta$*  ist sehr homolog aufgebaut, sie unterscheidet sich in nur 2 Aminosäuren (97 % Übereinstimmung) [28]. Das *ER $\beta$* -Gen ist etwas kleiner und kodiert ein kürzeres Protein. Es besteht aus 485 Aminosäuren [28, 29].

*ER $\alpha$*  und *ER $\beta$*  spielen eine wichtige Rolle in der Regulierung des Zellzyklus [30]. Studien zufolge besitzt *ER $\alpha$*  in der Entwicklung und im Ablauf von Brustkrebs eine kritischere Funktion als *ER $\beta$*  [31]. Eine der Aufgaben des Gens *ER $\alpha$*  ist die Vermittlung der proliferativen Wirkung von Östrogenen im Brustgewebe. Das Gen *ER $\beta$*  übt einen antagonistischen Effekt auf die Aktivität von *ER $\alpha$*  aus, indem er beispielsweise die zelluläre Proliferation reduziert [30]. Weiters hat *ER $\beta$*  Einfluss auf die Morphologie und Beweglichkeit einer Zelle [32].

Es wurde festgestellt, dass das Verhältnis von *ER $\alpha$*  und *ER $\beta$*  zwischen normalem und kanzerogenem Gewebe, wie beispielsweise beim Brust-, Dickdarm- oder Ovarialkarzinom, abnimmt [32]. Es ist bereits bekannt, dass *ER $\beta$*  während der Entstehung von Brustkrebs herabreguliert wird. Am Beginn der Brustkrebsbildung erleidet die Expression des *ER $\beta$*  einen Abfall, bis es bei einem hochgradigem Karzinom beinahe komplett abgeschaltet wird. Der Verlust des *ER $\beta$* -Gens ist auf die Hypermethylierung des Promotors zurückzuführen [32-34].

### 1.4.3 HIN-1

Das *HIN-1* Gen ist am Chromosom 5q35 lokalisiert und spielt eine wichtige Rolle in der Epithelzellen-Differenzierung [35]. *HIN-1* kodiert ein kleines, 10 kDa großes Protein, das Secretoglobin 3A1, welches der Secretoglobin-Familie angehört [36]. Der HIN-1-Rezeptor ist noch unbekannt, aber Ligandbindungsstudien weisen auf das Vorkommen einer Zelloberfläche mit hoher HIN-1-Affinität hin [37]. *HIN-1* reguliert den Wiedereintritt in den Zellzyklus, es hemmt allerdings auch das Tumorzellwachstum, sowie die Migration und Invasion der Tumorzellen. Weiters induziert *HIN-1* in Brustkrebszelllinien den Zelltod. *HIN-1* ist in normalen Brustepithelzellen hoch exprimiert, bei einem Großteil der Brusttumore wird *HIN-1* allerdings kaum oder nicht mehr exprimiert [35]. Das Herabregulieren der *HIN-1*-Expression ist auf die Hypermethylierung des *HIN-1*-Promotors zurückzuführen. Das Stilllegen der *HIN-1*-Expression durch Promotormethylierung ist ein frühes und häufiges Ereignis bei verschiedenen menschlichen Krebsarten. Die Wahrscheinlichkeit der Inaktivierung von *HIN-1* liegt bei Brustkrebs bei mehr als 70 %. Der Verlust der *HIN-1*-Expression ist somit relevant für die Tumorgenese [36-38].

### 1.4.4 MGMT

Die O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase ist ein Reparaturprotein der DNA [39]. Unter allen DNA-Reparaturproteinen ist *MGMT* einzigartig, da es alleine agiert, um die DNA-Addukte zu entfernen. Alle anderen DNA-Reparatursysteme zur Entfernung abnormaler Verbindungen bestehen aus Multi-Enzymkomplexen [40]. *MGMT* schützt die Zellen vor toxischen Einwirkungen, die von methylierenden und chlorethylierenden Stoffen auf die DNA ausgeübt werden. Das Reparaturprotein besitzt eine Länge von 207 Aminosäuren. Das dazugehörige *MGMT*-Gen befindet sich am Chromosom 10q26. *MGMT* ist ein relativ stabiles Protein mit einer Halbwertszeit von mehr als 24 Stunden [39].

Die Alkylierung der DNA an der O<sup>6</sup>-Position der DNA-Base Guanin ist ein entscheidendes Ereignis, welches in der Folge zu Mutationen, Krebs und zum Zelltod führen kann [41]. Die O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase entfernt Alkyl-Addukte, zum Beispiel eine Methyl- (-CH<sub>3</sub>) oder Chlorethyl- (-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>Cl) Gruppe, von der O<sup>6</sup>-Position des Guanins [42]. Die Methyl- oder Chlorethyl-Gruppe an der O<sup>6</sup>-Position des Guanins wird zum aktiven Zentrum, einem Cysteinrest (Cystein 145), des *MGMT* Moleküls übertragen [39]. *Abbildung 5* zeigt die Desalkylierung von O<sup>6</sup>-Methylguanin, den Transfer der Methylgruppe zum aktiven Zentrum von *MGMT*:

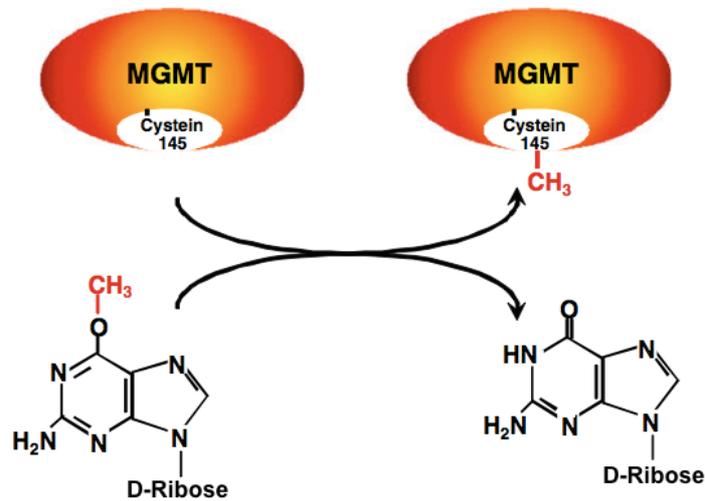


Abbildung 5: Transfer der Methyl-Gruppe zum aktiven Zentrum von MGMT; aus [39], modifiziert

Die DNA-Base Guanin wird hierbei wiederhergestellt. *MGMT* wird allerdings inaktiviert, dieser Vorgang ist irreversibel. Die O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase wird deshalb auch oft als „Suizid-Enzym“ bezeichnet, obwohl es sich bei *MGMT* streng genommen um kein Enzym handelt, da es bei dieser Reaktion verbraucht wird [39].

Bei einem Verlust oder einer Herabregulierung der *MGMT*-Aktivität werden die mutagenen Addukte nicht mehr von der DNA-Base Guanin entfernt und die Zellen daraufhin nicht weiter vor exogenen Kanzerogenen geschützt. Bei Brustkrebs wurde im Tumorgewebe (bei 72 % von 29 Proben) ein Verlust oder eine verringerte Expression des *MGMT*-Proteins festgestellt [43]. Eine geringe *MGMT*-Expression beruht hauptsächlich auf einer Methylierung der Promotorregion. Die Abnahme der *MGMT*-Expression ist wahrscheinlich ein frühes Ereignis in der Tumorgenese [44].

### 1.4.5 CDKN2A

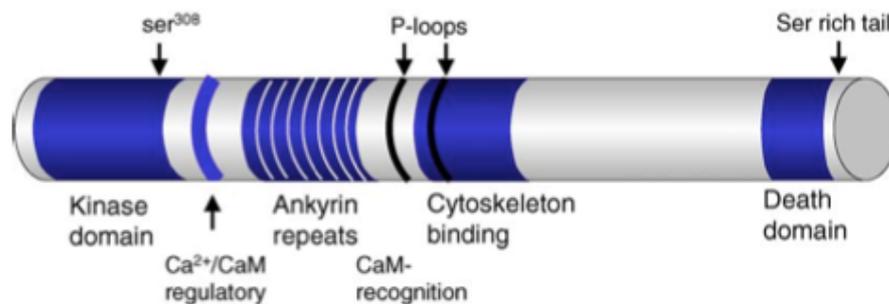
Das *CDKN2A*-Gen (engl. *Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A*) befindet sich am Chromosom 9p21 und kodiert das Protein p16INK4a [45]. *CDKN2A* gehört der Familie der INK4-Kinasen an. In einigen Dickdarmtumoren wurde eine heterogene Methylierung des *CDKN2A*-Gens festgestellt [46].

P16INK4a ist ein Zellzyklus-Inhibitor und somit ein bedeutender Faktor während der Karzinogenese [47]. Das p16INK4a-Protein wirkt als negativer Regulator des Zellzyklus. Es bindet an die freie Zyklin-abhängige Kinase (CDK) und unterbindet in der Folge die Aktivitäten der Zyklin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 [48]. Durch die Auslösung der zellulären Seneszenz unterdrückt das p16INK4a-Protein die Krebsentwicklung. In der Folge wird das Zellwachstum irreversibel eingestellt [49]. Der Verlust des Proteins p16INK4a ist häufig auf eine Hypermethylierung des *CDKN2A*-Promotors zurück zu führen [47]. Die Häufigkeit einer

Promotor-Hypermethylierung in Brusttumoren liegt zwischen 17 und 50 %. Punktmutationen und homozygotische Deletionen wurden als weitere Mechanismen zur Auslöschung der p16INK4a-Genaktivität festgestellt [50].

### 1.4.6 DAPK1

Das Gen *DAPK1* (engl. *Death-associated Protein Kinase 1*) ist am Chromosom 9 an der Stelle 9q21.33 zu finden. *DAPK1* kodiert für die 160 kDa große Proteinkinase „Death-associated Protein Kinase 1“ [51]. *DAPK1* wirkt als Mediator des Apoptosesystems, weiters spielt sie eine wichtige Rolle in verschiedenen Signalwegen und steuert somit die Langlebigkeit einer Zelle, sowie die Autophagozytose [52, 53]. Bei *DAPK1* handelt es sich um eine Serin/Threonin-Kinase, welche mittels Kalzium-Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) und Calmodulin (CaM) reguliert wird. Die DAPK1 ist ein Multidomänen-Protein mit einer katalytischen und Calmodulin regulierenden Domäne, welche die Substratspezifität, sowie die Kinaseaktivität kontrolliert. Die nicht katalytische Domäne ist an der subzellulären Lokalisierung und an der Interaktion mit anderen Proteinen beteiligt. Sie setzt sich aus 8 Ankyrin-Repeats, 2 Nukleotid bindenden P-Loops, einer Zytoskelett-bindenden Region und einer „Death-Domain“ zusammen (siehe *Abbildung 6*). Die „Death-Domain“ am C-Ende besitzt eine Homologie zu anderen Apoptose-assoziierten Proteinen [54].



**Abbildung 6: Schematisches Diagramm der DAPK-Proteinstruktur; aus [54]**

Viele Tumorzellen und Biopsieproben von Tumorgewebe zeigen einen Verlust der *DAPK1*-Expression. Die Verringerung der Expression ist auf eine Hypermethylierung des *DAPK1*-Promotors zurück zu führen. Diese Hypermethylierung des Promotors zeigt sich signifikant bei verschiedenen Tumortypen [54]. Mit einer Häufigkeit von 52 % (12 von 23 Brustkrebsproben) wurde bei Vorliegen eines Brustkarzinoms eine Methylierung von mehr als 75 % festgestellt [55]. Die Stilllegung von *DAPK1* korreliert mit dem erneuten Auftreten eines Tumors und der Metastasenhäufigkeit [56]. Die methylierungsabhängige *DAPK1*-Expression ist ein nützlicher Biomarker für die Tumorgenese [54].

### 1.4.7 RASSF1A

Das *RASSF1*-Gen (engl. *Ras-association Domain Family 1, Isoform A*) ist am Chromosom 3p21.3 lokalisiert und es gibt 7 *RASSF1* Isoformen (A bis G) [57, 58]. *RASSF1A* ist aus einer Cystein-reichen Diacylglycerol-Bindungsdomäne (C1 Domäne) und einer Ras-assoziierten (RA) Domäne aufgebaut [59]. Funktionell ist *RASSF1A* in die Kontrolle der Zellzyklen, die Stabilisierung von Mikrotubuli, die zelluläre Anhaftung, die Motilität und die Apoptose involviert [60]. Die Tumorsuppressor-Aktivität des *RASSF1A*-Gens beruht auf der Fähigkeit, Mikrotubuli zu binden und zu stabilisieren [61]. Das Tumorsuppressor-Gen *RASSF1A* erfährt häufig, in Abhängigkeit von der Tumorart, eine tumorspezifische, epigenetische Inaktivierung [62]. Der wichtigste Mechanismus für die Stilllegung des *RASSF1A*-Gens ist die Hypermethylierung des *RASSF1A*-Promotors. Der Verlust der *RASSF1A*-Expression ist eines der häufigsten Ereignisse in menschlichen Tumoren. In der Tumorentwicklung findet die Promotor-Hypermethylierung von *RASSF1A* bereits sehr früh statt. Die Methylierung dieses Promotors wurde bereits bei 37 Tumortypen festgestellt. Die Methylierung von *RASSF1A* hat das Potential eines idealen Krebs-Biomarkers [58, 61].

## 1.5 Beeinflussung der DNA-Methylierung durch ausgewählte Substanzen

Die Erkrankungsursachen bei Brustkrebs sind sehr komplex und zum Teil noch nicht vollständig erforscht. Fest steht, dass die Ernährung eine wichtige Rolle in der Tumorprävention einnimmt. Der unverhältnismäßig hohe Verzehr von Fleisch, Geflügel, gesättigten Fettsäuren und das daraus resultierende Übergewicht bringen ein erhöhtes Brustkrebsrisiko mit sich. Einige Studien deuten darauf hin, dass der Verzehr von Obst und Gemüse, Fisch, ein- und mehrfach ungesättigten Fettsäuren, Vitamin D, Kalzium, Phytoöstrogenen sowie Polyphenolen, zu einem verminderten Brustkrebsrisiko führen. Obst und Gemüse enthalten viele antikanzerogene Substanzen, wie Antioxidantien, Ballaststoffe, Vitamine, Mineralstoffe, sowie sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe (Flavonoide, Lignane, Tee-Polyphenole, Vitamin A, B<sub>6</sub> und B<sub>12</sub> etc.) [3, 63].

Der Einfluss dieser Nahrungsmittelbestandteile auf den menschlichen Körper gilt bereits als erwiesen. Die Mechanismen hinter diesen Effekten wurden allerdings noch nicht vollständig geklärt [64].

Im folgenden Abschnitt werden die Substanzen, mit denen in der Diplomarbeit Inkubationsversuche zur Feststellung einer etwaigen Veränderung des Methylierungsgrades in Brustkrebszellen durchgeführt wurden, näher beschrieben.

### **1.5.1 Polyphenole**

Die Polyphenole werden einer Untergruppe der Phytochemikalien, auch sekundäre Pflanzenstoffe genannt, zugeordnet. Sekundäre Pflanzenstoffe sind bioaktive Substanzen im Obst und Gemüse sowie im Getreide, die im sekundären Stoffwechsel einer Pflanze hergestellt werden [65]. In Summe wurden bereits mehr als 8.000 verschiedene Polyphenole identifiziert [66]. Größtenteils sind diese Polyphenolstrukturen in höher entwickelten Pflanzen anzutreffen, Hunderte dieser Pflanzen sind für den Menschen genießbar. Phenole nehmen unterschiedlichste Funktionen in einer Pflanze ein, sie sind an der Reproduktion, dem Wachstum, sowie der Farbgebung einer Pflanze beteiligt. Weiters sind Phenole in die Abwehr gegen Parasiten, Pathogene und Räuber involviert und dienen als Schutz vor ultraviolette Strahlung [65, 67].

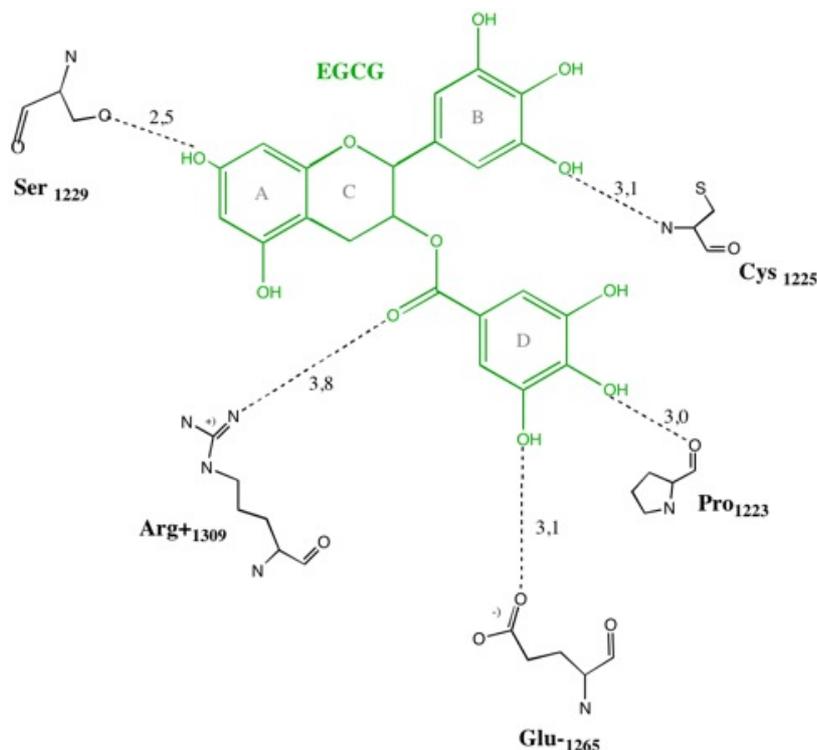
Preiselbeeren, Äpfel, rote Weintrauben und Erdbeeren besitzen den höchsten Anteil an unterschiedlichen Polyphenolen [68]. Beim Gemüse ist der Polyphenolgehalt in Brokkoli, Spinat, Zwiebel und rotem Pfeffer am höchsten [69].

Neben Obst und Gemüse enthalten auch einige Lebensmittel viele Polyphenole und Phenolklassen. Tee, Kakao und Schokolade sind zum Beispiel reich an Flavonolen und Kaffee enthält viele Phenolsäuren. In den meisten Fällen besitzen die Nahrungsmittel allerdings eine komplexe Mischung aus verschiedensten Polyphenolen. Das Vorkommen von Phenolen ist abhängig von der Pflanzenart, den Wachstumsbedingungen, der Fruchtreife, der Lagerung, sowie der Lebensmittelverarbeitung [66, 67].

Der Verzehr an Polyphenolen reicht in Europa von 800 – 900 mg/Tag, wie beispielsweise in Finnland, bis zu einem Verzehr von 1.100 mg/Tag in der mediterranen Küche. Diese Einnahmemenge entspricht einer 10 Mal höheren Zufuhr an Polyphenolen als an Vitamin C. Die Menge des Polyphenolverzehrs ist allerdings von den kulturellen Essgewohnheiten, sowie den Ernährungsvorlieben der jeweiligen Bevölkerung abhängig. Die effizienteste Absorption der Polyphenole findet im Dünndarm statt und erreicht ihr Maximum 1 – 3 Stunden nach der Nahrungsaufnahme. Im Anschluss an die Absorption werden die Polyphenole in den Darmzellen und in der Leber verstoffwechselt. Die Ausscheidungshalbwertszeit der Polyphenole beträgt zwischen 1 und 18 Stunden, für den Großteil der Polyphenole liegt die Zeit allerdings

bei weniger als 8 Stunden. Polyphenole werden somit größtenteils innerhalb eines Tages wieder ausgeschieden. Die Polyphenolkonzentration im Gewebe, sowie im Plasma, ist stark von der Konsumierung der Phenole abhängig. Bis heute liegen noch keine Hinweise vor, dass Polyphenole im Körper länger gespeichert werden können [66].

Nicht nur in Pflanzen nehmen Phenolkomponenten eine wichtige Stellung ein, auch auf den menschlichen Körper haben sie einen positiven Einfluss. Polyphenole reduzieren das Risiko, an einer chronischen Erkrankung zu leiden [65]. In *in vitro* Studien wurde festgestellt, dass Polyphenole eine potentiell antikanzerogene Wirkung besitzen. Polyphenole können sich direkt in die Bindungstasche der DNA-Methyltransferase einbauen und indirekt die intrazelluläre S-Adenosylmethionin-Konzentration verringern. *Abbildung 7* zeigt das Polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), welches sich in die Bindungstasche der DNMT1 eingebaut hat. Die Bindung der Polyphenole an die DNMT bewirkt eine Hemmung der DNMT-Aktivität. In der Folge kommt es zur Umkehrung der DNA-Hypermethylierung und zur Revitalisierung der Tumorsuppressor-Genaktivität [3].



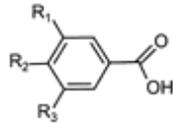
**Abbildung 7: Netzwerk der H-Brückenbindungen von EGCG in der DNMT1;**  
nach [70]

Neben der aufhebenden Wirkung stillgelegter Tumorsuppressor-Gene haben Studien gezeigt, dass Polyphenole aus Obst und Gemüse weitere wichtige und überlappende Funktionen besitzen. Phenole zeigen eine antioxidative Aktivität und können freie Radikale einfangen, weiters sind sie in die Mechanismen der Apoptose, der

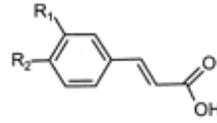
Stimulierung des Immunsystems, der Regulierung des Hormonmetabolismus, sowie in antibakterielle und antivirale Effekte involviert [65].

Die Polyphenole werden in verschiedene Gruppen in Abhängigkeit von der Anzahl der Phenolringe, sowie nach den strukturellen Elementen, welche an diese Ringe binden, unterteilt (*Abbildung 8*) [67].

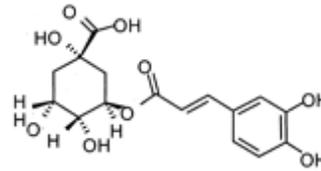
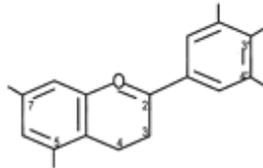
#### Hydroxybenzoesäuren



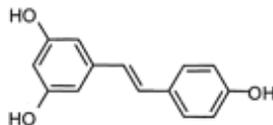
#### Hydroxyzimtsäuren



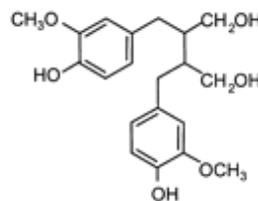
#### Flavonoide



#### Stilbene



#### Lignane



**Abbildung 8: Chemische Struktur der Polyphenol-Gruppen; aus [67], modifiziert**

Die Polyphenol-Gruppen werden in Phenolsäuren (Einteilung in die Gruppe der Hydroxybenzoesäuren und die Gruppe der Hydroxyzimtsäuren), Flavonoide, Stilbene und Lignane eingeteilt (*Abbildung 8*) [67].

Die Flavonoide sind eine Gruppe der Phenolkomponenten mit antioxidativer Aktivität. Es wurden bereits 4.000 unterschiedliche Flavonoide identifiziert. Flavonoide besitzen im Allgemeinen zwei aromatische Ringe, in *Abbildung 9* mit A und B gekennzeichnet, welche über drei Kohlenstoff-Atome verbunden sind, die gewöhnlich einen Sauerstoff-enthaltenden heterozyklischen Ring C bilden [65, 67].

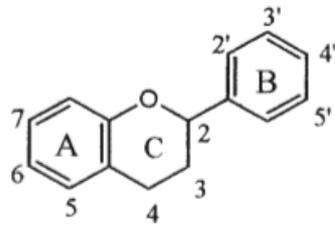


Abbildung 9: Grundstruktur der Flavonoide; aus [65]

Anhand der Unterschiede in den Substituenten des heterozyklischen Rings C werden die Flavonoide in 6 Subklassen eingeteilt. Wie in *Abbildung 10* ersichtlich, werden die Flavonoide in Flavonole, Flavanole, Flavone, Flavanone, Isoflavone und Anthocyanidine unterteilt [65, 67].

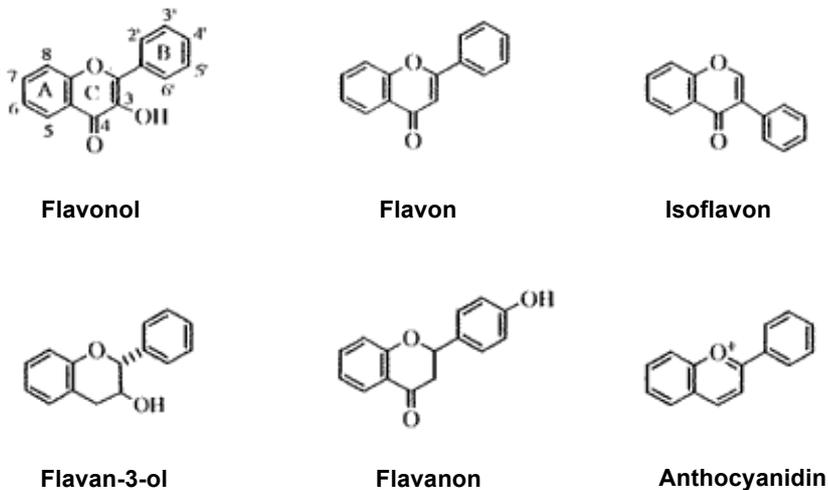


Abbildung 10: Einteilung der Flavonoide; aus [71]

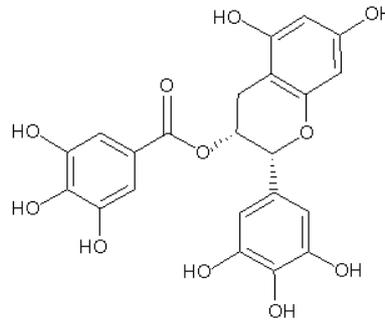
## 1.5.2 Flavanole

Die meist farblosen Flavanole kommen entweder als Monomere, wie zum Beispiel Catechin und EGCG, oder auch als Polymere, wie z.B. die Proanthocyanidine, vor. Die Flavanole Catechin und Epicatechin sind vermehrt in Früchten anzutreffen. Epigallocatechin, sowie EGCG, kommen im Samen von Hülsenfrüchten sowie in Trauben vor. Das hauptsächliche Vorkommen von EGCG ist in Tee. Die in Teeblättern enthaltenen Phenole sind zu 80 % den Flavanolen zuzuordnen [67, 72].

### 1.5.2.1 (-)-Epigallocatechin-3-gallat

Tee ist neben Wasser und Kaffee eines der beliebtesten Getränke weltweit. Grüntee besitzt einen sehr hohen Gehalt an Polyphenolen, wie z.B. EGCG. Bei diesen Polyphenolen handelt es sich hauptsächlich um Flavonoide, einschließlich EGCG,

Epicatechingallat, Epicatechin, Catechin und Proanthocyanidin [73]. Grüntee catechine, im besonderen EGCG, besitzen antioxidative, sowie antikanzerogene Eigenschaften. EGCG (Struktur siehe *Abbildung 11*) ist ein wichtiger Vertreter der Flavanole und lieferte die aussichtsreichsten Ergebnisse unter den Flavonoiden im Hinblick auf der Suche nach chemopräventiven Wirkstoffen [74].



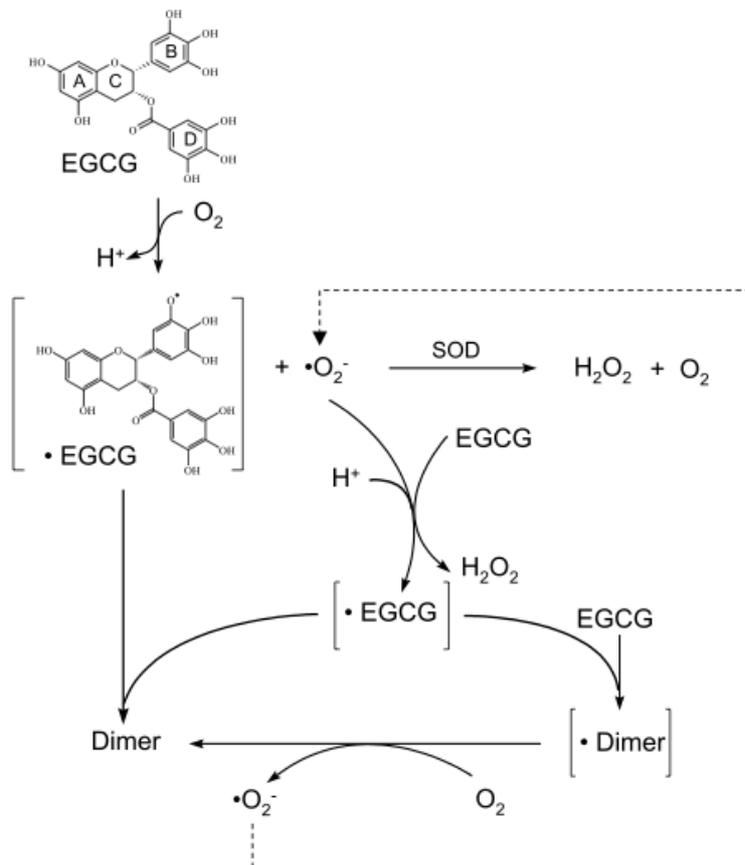
**Abbildung 11: Struktur von EGCG; aus [75]**

EGCG gilt als wirksamer Inhibitor der DNA-Methyltransferasen, wie bereits in Abschnitt 1.5.1 erwähnt [3]. Das Andocken von EGCG an die vermeintliche Cytosintasche führt dazu, dass der Gallat-Rest des EGCG eine Wasserstoffbrückenbindung zu den zwei katalytisch wichtigen Resten Glu1265 und Pro1223 der DNMT ausbildet (siehe *Abbildung 7*). Ser1229 und Cys1225 sind so positioniert, dass sie Wasserstoffbrückenbindungen mit den Hydroxylgruppen (-OH) der A- und B-Phenolringe von EGCG bilden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass EGCG seinen inhibitorischen Effekt auf die DNMT-Funktion durch Blockierung der wichtigen Nukleinbase Cytosin ausübt. EGCG verhindert den Übergang von Cytosin zu seiner aktiven Seite und somit unterbindet dieser Schritt das Fortschreiten der Methylierung [70].

In einer Studie wurde gezeigt, dass eine Zugabe von  $Mg^{2+}$  zu EGCG die Bindungsenergie von EGCG zur DNMT verändert, welche in der weiteren Folge zu einer Abänderung der hemmenden Aktivität von EGCG führt [76]. Die  $Mg^{2+}$ -Koordinierung an der katalytischen Seite der DNMT1 führt zu einer deutlichen Zunahme der Bindungsstärke zwischen EGCG und DNMT1, da ihre Bindungsinteraktionen durch  $Mg^{2+}$  stabilisiert werden. Eine Zugabe von einer 2 mmol/l  $Mg^{2+}$ -Konzentration erhöhte die inhibitorische Stärke von EGCG in einem *in vitro* Versuch deutlich [76].

In verschiedenen Studien wurde festgestellt, dass EGCG die Tumorbildung und das Wachstum der Tumore über verschiedene Mechanismen aufhalten kann. Weiters ist bekannt, dass EGCG das Zellwachstum reduziert und die Zellmigration verringert. Die Induzierung der Apoptose in verschiedenen Krebszelllinien, wie Haut-, Prostata-, Magen-, sowie Brustkrebs, durch EGCG wurde auch gezeigt [3, 73].

Einige Experimente deuten darauf hin, dass EGCG zytotoxisch ist und dadurch die Apoptose induziert wird, allerdings ohne davor eine Demethylierung hervorzurufen. Der Wachstumsstopp von Krebszelllinien ist wahrscheinlich auf den oxidativen Stress, den EGCG durch seine Auto-Oxidation verursacht, zurückzuführen. EGCG ist weiters unter Zellkulturbedingungen sehr instabil, es wurde eine Halbwertszeit von ~30 Minuten festgestellt. Die Auto-Oxidation (siehe *Abbildung 12*) wird vermutlich von einem Metall-Ion im Kulturmedium, wie beispielsweise  $\text{Cu}^{2+}$ , katalysiert. Diese Reaktion produziert ein Superoxid-Radikal ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) und ein EGCG-Radikal ( $\bullet\text{EGCG}$ ). Das Superoxid-Radikal kann daraufhin mit einem weiteren EGCG-Molekül reagieren, dabei entsteht Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und ein weiteres EGCG-Radikal ( $\bullet\text{EGCG}$ ). Zwei EGCG-Radikale ( $\bullet\text{EGCG}$ ) können kollidieren und in der Folge ein Dimer bilden. Allerdings ist es wahrscheinlicher, dass ein EGCG-Radikal ein EGCG-Molekül angreift, wobei ein Radikaldimer ( $\bullet\text{Dimer}$ ) entsteht. Dieses entstandene Radikaldimer kann wiederum mit einem molekularen Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) zu einem EGCG-Dimer und einem Superoxid-Radikal ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) reagieren. Mit dem entstandenen Superoxid-Radikal ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) beginnt die Reaktion erneut von vorne, wobei das Superoxid-Radikal erneut mit einem EGCG-Molekül reagiert und dabei Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) entsteht [77, 78].



**Abbildung 12: Mechanismus der Auto-Oxidation von EGCG; aus [78], modifiziert**

Die Zugabe des Enzyms Superoxiddismutase (SOD) unterstützt die Umsetzung des Superoxid-Radikals ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) zu Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und hemmt das Fortschreiten der Kettenreaktion. Die Auto-Oxidation von EGCG wird somit verhindert. SOD dient zur Stabilisierung von EGCG im Zellkulturmedium. In einer Studie [78] wurde gezeigt, dass die Zugabe von SOD die Halbwertszeit von EGCG auf 24 Stunden erhöht. Das beim Abbau des Superoxid-Radikals ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) durch SOD entstandene  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist ein Zellgift und verantwortlich für die Auslösung der Apoptose. Durch Zugabe des Enzyms Katalase wird das  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu Wasser und Sauerstoff umgesetzt [77, 78]:



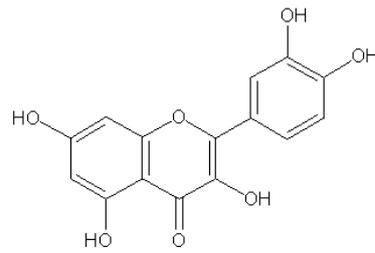
Katalase ist eine Oxidoreduktase und ein wichtiges Schutzenzym der Zellen, da es beim Abbau der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt ist [77, 78].

### 1.5.3 Flavonole

Die Flavonole werden, wie die Flavanole, zu der großen Substanzklasse der Flavonoide gezählt und sind in der Nahrung weit verbreitet. Sie sind in einer Vielzahl von Obst- und Gemüsesorten zu finden, allerdings nur in relativ geringen Konzentrationen von ungefähr 15 – 30 mg pro kg Frischgewicht. Die höchste Menge an Flavonol enthalten Zwiebeln, mit bis zu 1,2 g pro kg Frischgewicht. Weiters findet man einen erhöhten Flavonolanteil in Grünkohl, Lauch, Brokkoli und in der Heidelbeere. Die Gruppe der Flavonole, besonders Quercetin, Myricetin und Kämpferol, besitzt krebsvorbeugende und antioxidative Eigenschaften [67, 74].

#### 1.5.3.1 Quercetin

Quercetin ist das in der Nahrung am häufigsten vorkommende Flavonoid und in der Pflanzenwelt weit verbreitet (Strukturformel siehe *Abbildung 13*). Eine Vielzahl an Lebensmitteln wie Äpfel, Beeren, Kohlgemüse, Trauben, Zwiebeln, Tomaten, sowie viele Samen und Nüsse enthalten Quercetin. Vor allem die äußeren Zwiebelschalen besitzen einen sehr hohen Gehalt an Quercetinderivaten [79]. Natürliche Getränke, wie Tee und Wein, enthalten ebenfalls Quercetin. In einigen Pflanzenarten und Baumrinden, sowie in bestimmten Bäumen, wie dem Ginkgo (*Ginkgo biloba*), dem Echten Johanniskraut (*Hypericum perforatum*), als auch im Schwarzen Holunder (*Sambucus nigra*), ist Quercetin weit verbreitet [64, 80].

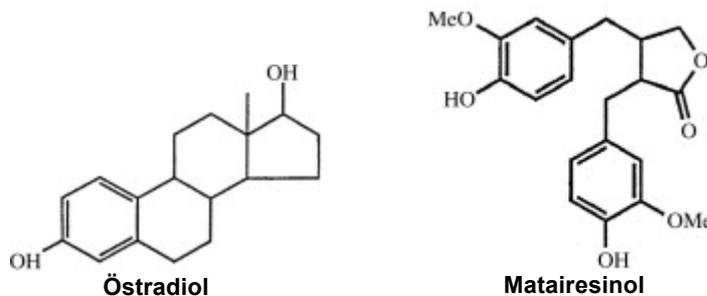


**Abbildung 13: Struktur von Quercetin; aus [81]**

Die antioxidativen und entzündungshemmenden Eigenschaften von Quercetin machen es für die Krebsprävention und Therapie sehr interessant. Bei höheren Konzentrationen (ab einer intravenösen Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht) gilt Quercetin auch als toxisch, was wiederum auf die Eigenschaften als Antioxidans zurückzuführen ist. Weiters ist Quercetin ein wichtiger Radikalfänger von reaktiven Sauerstoffspezies und reaktiven Stickstoffspezies [80, 82]. Das Flavonol Quercetin gilt außerdem als wirksamer Inhibitor der DNA-Methyltransferasen [76].

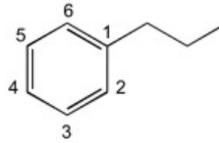
#### 1.5.4 Lignane

Lignane zählen neben den Isoflavonen zu den am besten erforschten Phytoöstrogenen. Phytoöstrogene sind Polyphenole mit einer strukturellen Ähnlichkeit zum weiblichen Sexualhormon 17 $\beta$ -Östradiol (vgl. *Abbildung 14*) [83].



**Abbildung 14: Struktur von Östradiol und dem Lignan Matairesinol; aus [83], modifiziert**

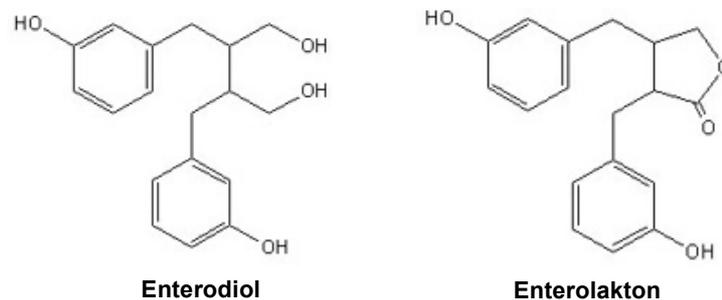
Diese Analogie ermöglicht die Bindung an den Östrogenrezeptor (ER). Die Phytoöstrogene können als Östrogenagonisten oder Antagonisten wirken [83, 84]. Die östrogene Wirkung der Phytoöstrogene ist um den Faktor 100 – 10.000 geringer als die des Sexualhormons 17 $\beta$ -Östradiol. Allerdings können die Phytoöstrogene in einer Konzentration vorliegen, welche um 100 – 10.000fach höher ist als die der Östrogene [85]. Es wird vermutet, dass das Auftreten von Erkrankungen, welche mit Östrogenen in Verbindung gebracht werden, von Lignanen beeinflusst wird. Ein Beispiel für eine solche Erkrankung ist der durch hormonelle Faktoren ausgelöste Brustkrebs [86]. Lignane sind aus zwei Phenylpropan-Einheiten aufgebaut (siehe *Abbildung 15*).



**Abbildung 15: Strukturformel von Phenylpropan; nach [85], modifiziert**

Durch den Einbau von Sauerstoff- und Kohlenstoffatomen ergibt sich die große strukturelle Vielfalt der Lignane [85].

Anders als bei den Isoflavonen werden die Lignane im Darm umgewandelt: Die Pflanzenlignane Secoisolariciresinol und Matairesinol werden von der Darmmikroflora in die humanen Lignane Enterolakton und Enterodiol überführt (siehe *Abbildung 16*) [85].



**Abbildung 16: Strukturformel von Enterodiol und Enterolakton; aus [87], modifiziert**

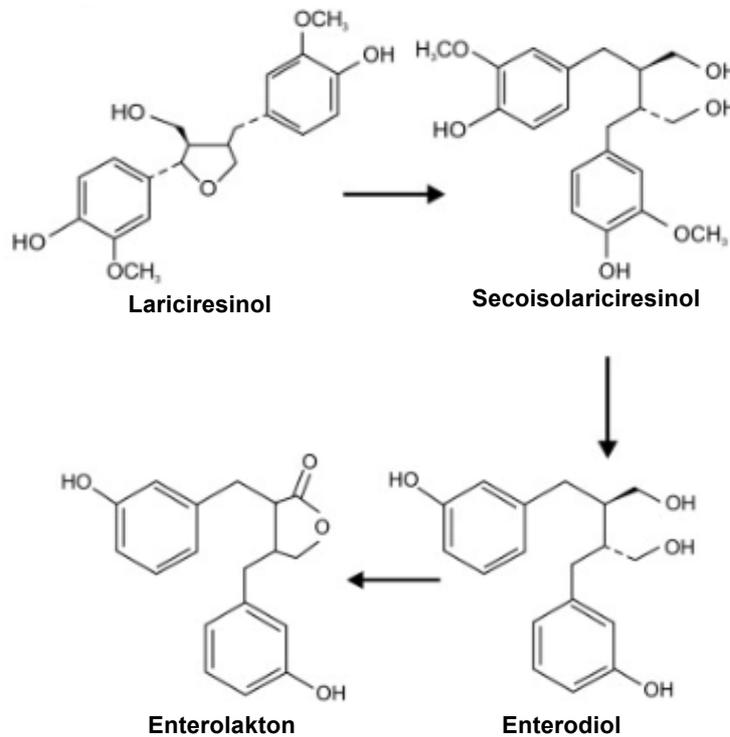
Enterodiol und Enterolakton sind physiologisch aktiver als ihre Vorstufen, die pflanzlichen Lignane [85, 88].

Das Vorkommen von Lignanenen ist weit verbreitet. Lignane sind im gesamten Getreide, in Ölsaaten, Hülsenfrüchten, Nüssen, Obst und Gemüse, sowie im Rotwein anzutreffen. Getränke wie beispielsweise Kaffee und Orangensaft enthalten eine sehr geringe Menge an Lignanenen, allerdings werden sie in größeren Mengen dem Körper zugeführt. Im Vergleich zu anderen Lignan-enhaltenden Lebensmitteln besitzen Leinsamen eine um 1.000fach höhere Lignanenkonzentration. Leinsamen enthalten bis zu 3,7 g Secoisolariciresinol pro kg Trockengewicht. Studien haben gezeigt, dass eine erhöhte Lignaneinnahme zu einem geringeren Brustkrebsrisiko führen kann [67, 88, 89].

#### 1.5.4.1 (+)-Lariciresinol

Lariciresinol ist eine der am häufigsten verzehrten Pflanzenlignane in Europa und Nordamerika. Den höchsten Anteil an Lariciresinol enthalten Sesamsamen mit 9,5 mg/100 g, gefolgt von Leinsamen mit 3,0 mg/100 g. Sowohl im Rotwein, als auch im Weißwein, wurde Lariciresinol nachgewiesen. Die Lignanenkonzentration ist allerdings stark von den Standortbedingungen der Trauben abhängig [86, 88, 90].

Lariciresinol ist eine Enterolignanvorstufe und wird (wie in *Abbildung 17* dargestellt) im Körper zuerst zu Secoisolariciresinol und in der Folge zu den Enterolignanen Enterodiol und Enterolaktol metabolisiert [86].



**Abbildung 17: Metabolismus von Lariciresinol; aus [91], modifiziert**

In einer prospektiven Studie stellte sich heraus, dass Frauen mit einem hohen Verzehr an Lariciresinol ein statistisch signifikant niedrigeres Risiko für ein postmenopausales Mammakarzinom besitzen, als Frauen mit einem sehr niedrigen Verzehr an Lariciresinol [84].

#### 1.5.4.2 (-)-Matairesinol

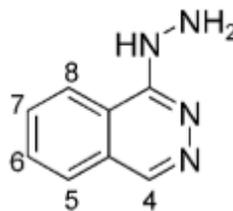
Matairesinol (siehe *Abbildung 14*) ist ein weiteres pflanzliches Lignan, welches in Lebensmitteln allerdings nur in sehr geringen Konzentrationen vorkommt. Die höchsten Matairesinol-Konzentrationen findet man in Leinsamen mit 0,6 mg/100 g Trockengewicht und Sesamsamen mit 0,5 mg/100 g [88, 90].

Wie bereits unter 1.5.4 erwähnt, wird das pflanzliche Lignan Matairesinol von der Darmmikroflora in die humanen Lignane Enterodiol und Enterolaktol metabolisiert. Es ist bekannt, dass die beiden Enterolignane Enterodiol und Enterolaktol einen Effekt auf die Zellvermehrung in Brustkrebszellen ausüben. Im Zuge einer von Abarzua et al. durchgeführten Studie [92] zur wachstumshemmenden Aktivität der Lignane in MCF-7 Zellen wurde festgestellt, dass sich bei einer Matairesinol-Konzentration von

$1 \times 10^{-3}$  mol/l das Zellwachstum in MCF-7 Zellen um 60 % im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen reduzierte.

### 1.5.5 Hydralazin

Hydralazin wurde 1950 unter der Leitung des deutschen Pharmakologen Franz Gross entwickelt. Der synthetisierte Wirkstoff Hydralazin war das erste blutdrucksenkende Medikament [93]. Hydralazin ist ein gefäßerweiterndes Arzneimittel, welches bei Herzinsuffizienz eingesetzt wird. Wie in *Abbildung 18* ersichtlich ist, besteht das Hydralazin-Grundgerüst aus zwei Benzolringen und ist ein Derivat des Phthalazins [77, 94, 95].



*Abbildung 18: Strukturformel von Hydralazin; aus [96], modifiziert*

Es wird vermutet, dass Hydralazin einen inhibitorischen Effekt auf die DNA-Methyltransferase besitzt. Der genaue Mechanismus ist zum Teil noch unbekannt und umstritten, allerdings wird vermutet, dass Hydralazin an CpG-reiche Sequenzen bindet. Diese Bindung wirkt störend auf die Translokation der DNMT entlang des DNA-Strangs. In einer Studie wurde festgestellt, dass Hydralazin die Stilllegung der Expression von verschiedenen Tumorsuppressor-Genen aufheben kann [77, 94, 95]. Hydralazin gilt weiters als zytotoxisch, da es eine intrazelluläre Ansäuerung, sowie eine tumorselektive Unterversorgung mit Sauerstoff induziert [97].

### 1.6 MCF-7 Zelllinie

Zur Durchführung von Inkubationsversuchen wurde in der vorliegenden Diplomarbeit mit MCF-7 Zellen gearbeitet.

Bei den MCF-7 Zellen handelt es sich um eine Zelllinie eines menschlichen Adenokarzinoms der Brust. Etabliert wurde diese Zelllinie im Jahr 1970 aus einem Pleuraerguss einer 69-jährigen kaukasischen Frau mit einem metastasierenden Brustkrebs. Diese Brustkrebszellen sind Östrogenrezeptor-positiv und besitzen einen hypotetraploiden Karyotyp mit 8 % Polyploidie. Die Zellen wachsen als Monolagen und

ihre Verdopplungszeit beträgt zwischen 30 und 72 Stunden, meist allerdings ca. 50 Stunden [98].

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden die MCF-7 Zellen auf eine mögliche Kontamination mit Mykoplasmen untersucht. Mykoplasmen sind 0,15 µm große, zellwandlose Prokaryoten. Eine Infektion der Zellkultur mit Mykoplasmen ist über eine längere Zeit rein optisch nicht offensichtlich. Mykoplasmen beeinflussen das Wachstum sowie den Zellstoffwechsel. Dies kann zu Anfälligkeiten für Mutationen und zur Apoptose führen. Aus diesem Grund wurden die MCF-7 Zellen mit dem DAPI-Test untersucht. Das Fluorochrom DAPI (4-6-Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid) bindet an die Mykoplasmen-DNA. Die Mykoplasmen werden in der Folge als hell leuchtende Punkte unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar [99, 100].

## **1.7 Biopsieproben von Brustkrebsgewebe**

Die Bestimmung des Methylierungsgrades in Biopsieproben von Brustkrebspatientinnen wurde in Zusammenarbeit mit der Universitätsklinik für Frauenheilkunde des AKH Wien durchgeführt. Die benötigten Gewebeproben wurden von Ass. Prof. Dr. Georg Pfeiler, Facharzt für Gynäkologie und Geburtshilfe, zur Verfügung gestellt.

Es wurde Tumorgewebe, tumornahes Gewebe sowie tumorfernes Gewebe auf ihren Methylierungsgrad in verschiedenen Brustkrebs-relevanten Genen untersucht.

## 2. Zielsetzung

Weltweit zählt Krebs, neben den Herz-/Kreislaufkrankungen, zu den am weitesten verbreiteten Erkrankungen mit Todesfolge. Bei Frauen ist das Mammakarzinom die häufigste Krebserkrankung.

Ein frühes Ereignis in der Kanzerogenese ist die Hypermethylierung der Promotorregion von Krebs-relevanten Genen sowie von Tumorsuppressor-Genen. In der Folge werden diese Gene stillgelegt. Die DNA-Methylierung ist ein reversibler Mechanismus, wobei bestimmte Lebensmittelinhaltsstoffe den DNA-Methylierungsgrad positiv beeinflussen können.

Ein Ziel dieser Diplomarbeit war es, Änderungen in der DNA-Methylierung von Tumorsuppressor-Genen zu analysieren. Dazu sollten Analysemethoden basierend auf der methylierungs-sensitiven hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse (MS-HRM) entwickelt werden. Für die Brustkrebs-relevanten Tumorsuppressor-Gene *CDH1*, *HIN-1*, *ER $\alpha$* , *ER $\beta$* , sowie *MGMT* sollten spezielle Primerpaare entworfen und die Bedingungen für den Einsatz in der MS-HRM optimiert werden.

Der Methylierungsgrad sollte in MCF-7 Zellen, sowie in Biopsieproben von Brustkrebspatientinnen mittels der entwickelten MS-HRM Methoden bestimmt werden. Dazu musste sowohl aus MCF-7 Zellen als auch aus Biopsieproben die DNA isoliert und anschließend Bisulfit-konvertiert werden. Für die Bestimmung des DNA-Methylierungsgrades sollten neben den entwickelten Methoden auch bereits optimierte Methoden für die Gene *CDKN2A*, *DAPK1* und *RASSF1A* verwendet werden. Als zweites Ziel sollte im Rahmen dieser Diplomarbeit untersucht werden, in wie weit die Substanzen Hydralazin, Epigallocatechingallat, Quercetin, Lariciresinol und Matairesinol einen Einfluss auf den Methylierungsgrad in Brustkrebszellen haben. Die MCF-7 Zellen sollten mit verschiedenen Konzentrationen der ausgewählten Substanzen 9 Tage lang inkubiert werden.

Des Weiteren sollte untersucht werden, in wie weit es bei den Gewebeproben von Brustkrebspatientinnen einen Unterschied in der Methylierung der Tumorgewebe-DNA im Vergleich zur tumornahen bzw. tumorfernen Gewebe-DNA gibt.

## 3. Theoretischer Hintergrund

Die methylierungs-sensitive hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (MS-HRM) wird häufig zur Bestimmung des DNA-Methylierungsgrades verwendet. Dazu wird die DNA zuerst Bisulfit-konvertiert und im Anschluss eine Real Time-Polymerase-Kettenreaktion (PCR), unter Verwendung eines Bisulfit-konvertierungs-spezifischen Primerpaares (engl. *bisulfite sequencing PCR primer*, BSP-Primer), durchgeführt. Nach der erfolgreichen DNA-Amplifikation erfolgt die hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (HRM-Analyse).

### 3.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) findet vor der methylierungs-sensitiven hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse statt und ermöglicht die Vervielfältigung der gewünschten DNA-Sequenz des zu untersuchenden Gens [101]. Kary Mullis entwickelte 1983 die PCR und erhielt 1993 für diese Leistung den Nobelpreis für Chemie. In einer lebenden Zelle ist die Vervielfältigung der DNA, unter Einbeziehung vieler unterschiedlicher Proteine, ein hoch komplexer Prozess. Mittlerweile ist die PCR bei DNA-Analysen unabdingbar [102].

Zur Amplifikation einer bestimmten DNA-Sequenz benötigt man zwei Primer, welche komplementär zur einzelsträngigen Nucleinsäurematrize, der Templat-DNA, sind. Primer sind synthetisch hergestellte DNA-Sequenzen mit einer Länge von ungefähr 20 Nucleotiden. Diese beiden Primer hybridisieren mit der einzelsträngig vorliegenden Ziel-DNA. Dies ermöglicht der DNA-Polymerase, ausgehend vom 3'-Ende der Primer, den neuen DNA-Doppelstrang zu synthetisieren. Durch die zyklische Wiederholung der Reaktionsschritte wird die Matrize (theoretisch) exponentiell vervielfältigt [101-103].

Wesentliche Komponenten einer PCR sind die Templat-DNA, die Oligonucleotid-Primer, die hitzestabile DNA-Polymerase, die Desoxyribonucleosid-Triphosphate (dNTPs), sowie das Magnesiumchlorid ( $MgCl_2$ ).

Das **Primer**-Paar besteht aus einem Forward- und einem Reverse Primer. Die Primer nehmen Einfluss auf die Spezifität, die Sensitivität und die Reproduzierbarkeit der PCR. Aus diesem Grund ist beim Primer-Design auf einige Parameter zu achten: Die beiden Primer sollten die gleiche Schmelztemperatur aufweisen, sowie keine Sekundärstrukturen oder Heterodimere bilden können. Weiters sollen die Primer nicht komplementär zu sich selbst sein und keine Self-Dimere bilden. Die Basenabfolge,

sowie die Zusammensetzung der 3'-Enden der Primer, sind zu beachten [103]. Weitere Informationen zum Primer-Design siehe Abschnitt 3.3.

Die **Desoxyribonukleosid-Triphosphate** (dNTPs) sind dATP (Desoxyadenosintriphosphat), dCTP (Desoxycytidintriphosphat), dGTP (Desoxyguanosintriphosphat) und dTTP (Desoxythymidintriphosphat). Diese vier dNTPs werden von der DNA-Polymerase zur Synthese des neuen komplementären Strangs als Bausteine benötigt [101].

Für die Durchführung der PCR wird ein hitzestabiles Enzym, die **Taq-Polymerase**, eingesetzt. Die Taq-Polymerase wurde aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert. Dieses Bakterium lebt in Thermalquellen, welche eine hohe Umgebungstemperatur besitzen. Deshalb sind die Enzyme, welche diese Bakterien synthetisieren, hitzebeständig. Die Taq-DNA-Polymerase besitzt ein Temperaturoptimum von 72 °C und bei 100 °C eine Halbwertszeit von 5 Minuten. Auf Grund dieser Eigenschaft ist die Taq-Polymerase nach jedem Denaturierungsschritt weiterhin aktiv [101, 103-105].

**Magnesiumchlorid**,  $MgCl_2$ , ist einer der wichtigsten Bestandteile für die Spezifität der PCR.  $Mg^{2+}$ -Ionen agieren als Ko-Aktivatoren der Taq-Polymerase. Weiters unterstützen sie das Primerpaar bei der Anlagerung an den DNA-Einzelstrang, auch fördern sie den Einbau der dNTPs während der Elongation [101]. Meist liegt die  $MgCl_2$ -Konzentration zwischen 0,5 und 2,5 mmol/l, wobei die optimale Konzentration für jeden PCR-Lauf ermittelt werden muss [102].

Jeder PCR-Zyklus besteht aus drei zeit- und temperaturoptimierten Schritten: der Denaturierung, dem Annealing und der Elongation (siehe *Abbildung 19*) [101, 104].

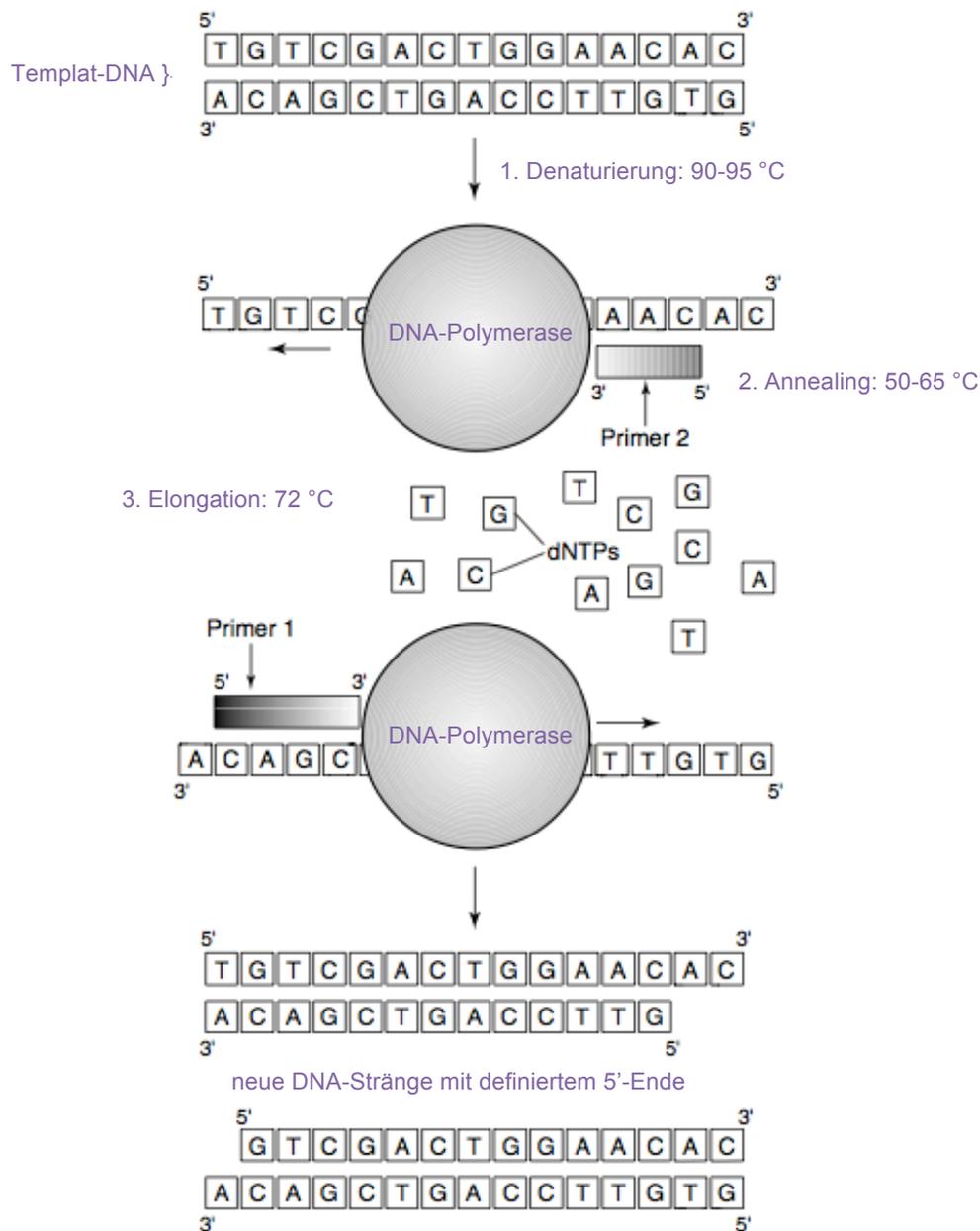


Abbildung 19: Ablauf eines PCR-Zyklus; aus [102], modifiziert

Der PCR-Zyklus beginnt mit der thermischen **Denaturierung** der doppelsträngigen Templat-DNA bei 90 – 95 °C. Hierbei wird der DNA-Doppelstrang in zwei komplementäre Einzelstränge aufgespalten, wobei die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren getrennt werden. Die zu amplifizierende Sequenz wird somit für das Primerpaar zugänglich [102-104].

Nach der Trennung des DNA-Doppelstrangs erfolgt der **Annealing**-Schritt bei 50 – 65 °C. In Abwesenheit der Primer ergänzt die DNA-Polymerase die komplementären Basen nicht, da die Polymerase einen Startpunkt benötigt. Es wird die Temperatur gesenkt, um die Primer an die komplementären Sequenzen der Templat-Stränge zu binden. Es kommt zur Primer-Hybridisierung, indem

Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden. Diese Annealingtemperatur ist vom jeweilig verwendeten Primerpaar abhängig [101-103, 105].

Die **Touchdown-Funktion** ist eine nützliche Technik zur Vermeidung der Amplifikation von unspezifischen Sequenzen. Während sieben Zyklen wird die Temperatur je Zyklus um 1 °C gesenkt. Ab dem 7. Zyklus wird die Annealingtemperatur des Primerpaares erreicht. Diese Technik ermöglicht es, dass die Primer mit größerer Wahrscheinlichkeit an die gewünschte Sequenz des Einzelstrangs binden. Somit erhält man ein Templat, welches höchst spezifisch ist [102, 104].

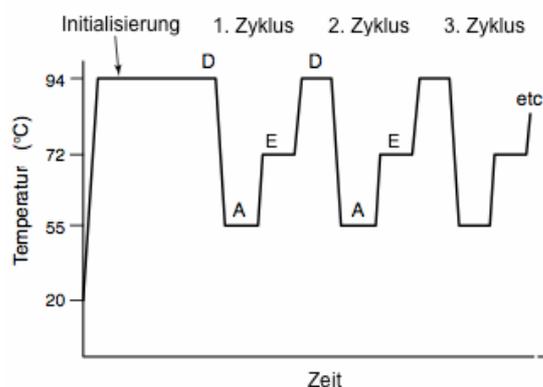
Wenn die Primer an ihre spezifische Zielsequenz gebunden haben, beginnt die DNA-Polymerase mit dem Einbauen der Basen am 3'-Ende der Primer, um den komplementären Strang zu vervollständigen. Die DNA-Polymerase fügt an eine freie Hydroxylgruppe (-OH) eines Primers die entsprechende komplementäre Base zum Mutterstrang ein. Dies erfolgt nach der Watson und Crick Paarungsregel, wobei Adenin immer mit Thymin und Guanin immer mit Cytosin gepaart wird [101, 102, 105]. Dieser dritte Syntheseschritt wird **Elongation** genannt und findet bei 72 °C statt. Dies ist die optimale Arbeitstemperatur für die Taq-Polymerase. Primer, welche nicht genau zur komplementären Templat-Sequenz passen, werden auf Grund der erhöhten Temperatur wieder vom Einzelstrang gelöst. Die beiden katalytischen Aktivitäten der Taq-DNA-Polymerase besitzen die gleiche Richtung, sowohl die DNA-Synthese als auch die Exonukleaseaktivität erfolgt in 5' → 3' Richtung. Am Ende des ersten PCR-Zyklus erhält man aus einem Doppelstrang zwei Doppelstränge. Jeder neu entstandene Doppelstrang besteht aus einem Mutterstrang und einem neu synthetisierten Tochterstrang [101, 102, 105].

Um zu verhindern, dass die PCR-Reaktion bereits bei Raumtemperatur startet, wird häufig, wie auch in dieser Diplomarbeit, eine **HotStarTaq Plus DNA-Polymerase** verwendet. Dieses Enzym liegt bei Raumtemperatur im inaktiven Zustand vor. Die HotStarTaq DNA-Polymerase benötigt zur Aktivierung eine Initialisierung bei 95 °C. Durch die Verwendung der HotStarTaq-Polymerase kommt es zu keiner Elongation von unspezifischen Primern sowie zu keiner Bildung von Primer-Dimeren bei geringen Temperaturen [103].

Nach dem ersten PCR-Zyklus erhält man zwei Original DNA-Stränge, sowie zwei neue Stränge. Der neue Strang ist um einiges kürzer als der ursprüngliche Strang (siehe *Abbildung 19*), allerdings ist dieser neue Strang noch immer länger, als die gewünschte Zielsequenz, welche amplifiziert werden soll. Im 2. Zyklus binden die Primer sowohl am Original-Templat, als auch am neuen Strang, welcher während des ersten Zyklus synthetisiert wurde. Am Ende des 2. Zyklus erhält man zwei Einzelstränge mit der entsprechenden Länge, welche durch die beiden Primer definiert wurde. Dieses

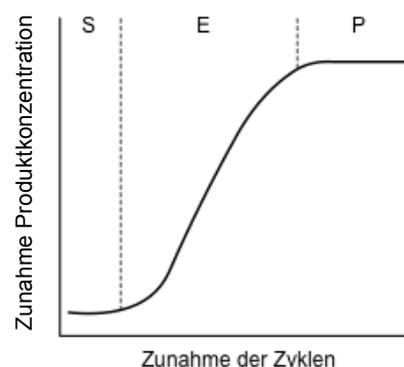
Amplikon mit der gewünschten Sequenz wird nun in jedem Zyklus amplifiziert und in der Folge kommt es zu einer exponentiellen Vervielfachung dieses gewünschten PCR-Produktes. Theoretisch erhält man am Ende von „n“ Zyklen eine Gesamtmenge der Zielsequenz von  $2^n$ . Diese exakte Zunahme von  $2^n$  ist allerdings nur unter idealen Bedingungen zu erwarten. In der Praxis ist die PCR-Amplifikation nicht zu 100 % effizient, deshalb wird eine größere Anzahl an Zyklen (30 – 40 Zyklen) verwendet, um eine ausreichende Amplifikation für nachfolgende Analysen zu erreichen [101].

Die drei Schritte der PCR sowie deren Temperaturbedingungen und die Anzahl der Zyklen einer PCR werden über einen Thermocycler eingestellt und durchgeführt [101]. In *Abbildung 20* ist das Temperaturprofil einer PCR, in Abhängigkeit von der Zeit, zusammengefasst.



**Abbildung 20: Temperaturprofil während einer PCR (D = Denaturierung, A = Annealing, E = Elongation); aus [102], modifiziert**

Die erhaltene Amplifikationskurve wird in drei Phasen eingeteilt: eine Start-Phase (S), eine exponentielle Phase (E), sowie eine Plateau-Phase (P), vgl. *Abbildung 21* [102].



**Abbildung 21: Kinetik einer PCR-Reaktion; aus [102], modifiziert**

In der Start-Phase lagern sich die Primer ab dem 1. Zyklus an die komplementäre Matrizen-DNA an. Dieser Abschnitt ist durch eine geringe Produktbildung gekennzeichnet. In der anschließenden mittleren Phase der PCR kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA-Template, wobei unter idealen Bedingungen

die Anzahl der Templat-Sequenzen pro Zyklus verdoppelt wird. Das Plateau ist erreicht, wenn nur wenig bis keine Produkte mehr gebildet werden, da die Reaktionskomponenten (Nukleotide, Primer) verbraucht wurden [102].

### 3.1.1 Real Time-PCR

Die Real Time-PCR ist eine Technik zur Erfassung des Fortschritts einer PCR-Reaktion. Die gebildeten PCR-Produkte werden in Echtzeit abgebildet. Die Real Time-PCR beruht auf der Detektion eines Fluoreszenzsignals, welches von einem Reporter-molekül ausgestrahlt wird. Die Real Time-PCR ermöglicht die Feststellung eines PCR-Produkts bereits in einer sehr frühen Phase der PCR-Reaktion. Das Fluoreszenzsignal wird jeweils während der einzelnen Reaktionszyklen gemessen. Die Anzahl der in jedem Zyklus gebildeten DNA-Stränge ist direkt proportional zur erhaltenen Fluoreszenzintensität. Um die PCR-Produkte während der Reaktion zu markieren, gibt es die Möglichkeit, DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe wie beispielsweise SYBR Green oder EvaGreen zu verwenden. Eine weitere Option ist der Einsatz von sequenzspezifischen Sonden-molekülen, welche mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind [101, 103].

Bei der Verwendung sequenzspezifischer Fluoreszenzsonden binden an den DNA-Einzelstrang neben den beiden sequenzspezifischen Primern zusätzlich fluoreszenzmarkierte Sonden. Die verschiedenen Sondentypen, TaqMan-Sonden, Molekular Beacons, sowie Scorpions, beruhen auf dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET). Hierbei wird ein Fluoreszenzsignal mittels Kopplung eines fluoreszierenden Donor-Farbstoffmoleküls mit einem Quencher erhalten. Als ein Beispiel für die sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden wird nun auf die TaqMan-Sonden genauer eingegangen. Die TaqMan-Sonde ist ein Oligonukleotid mit einem Fluoreszenzreporterfarbstoff am 5'-Ende und einem Quencher am 3'-Ende. Diese Sonden sind sequenzspezifisch entworfen und hybridisieren am entsprechenden DNA-Einzelstrang. Vor dem Ende der Elongation wird kein Fluoreszenzsignal erhalten, da der an die Sonde gebundene Quencher eine Fluoreszenzemission unterdrückt. Während der DNA-Synthese erreicht die Taq-DNA-Polymerase die an den Einzelstrang angelagerte Sonde (siehe *Abbildung 22*) [101, 103].

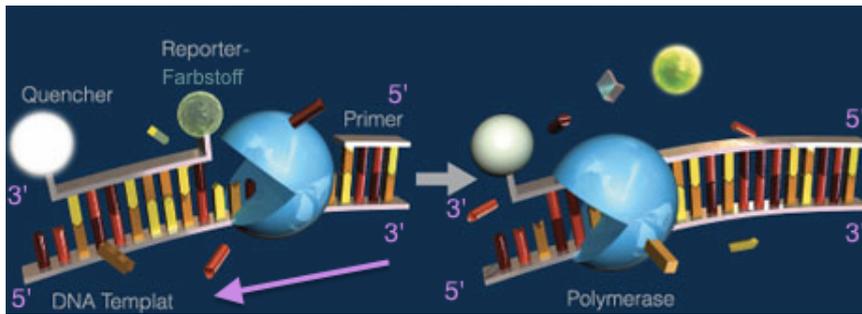


Abbildung 22: Real Time-PCR mit einer Fluoreszenzsonde; aus [106], modifiziert

Die Taq-Polymerase spaltet, auf Grund ihrer 5' → 3' Exonukleaseaktivität, die Fluoreszenzsonde hydrolytisch von der DNA ab. Es werden der Fluoreszenzreporter und der Quencher voneinander getrennt, wodurch das Fluoreszenzsignal nicht mehr gequencht wird. Durch die Anregung des Reporters kommt es zur Emission eines Fluoreszenzsignals, welches detektiert werden kann. Die Fluoreszenzzunahme in jedem Zyklus ist direkt proportional zur Anzahl der abgespaltenen Sonden. Es kann somit aus der Fluoreszenzintensität auf die neu gebildete Menge der DNA-Doppelstränge geschlossen werden [101, 103].

Neben den sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden werden häufig unspezifische interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe, wie beispielsweise SYBR Green oder EvaGreen, verwendet. SYBR Green und EvaGreen lagern sich in jeden DNA-Doppelstrang ein. In Lösung besitzt der ungebundene Farbstoff nur eine geringe Fluoreszenz. Diese Fluoreszenz erhöht sich beträchtlich, wenn der Farbstoff an den DNA-Doppelstrang gebunden wird (siehe Abbildung 23) [101, 103].

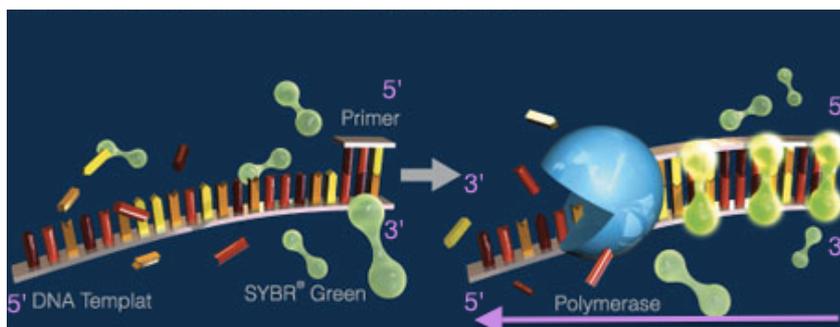


Abbildung 23: Real Time-PCR mit Fluoreszenzfarbstoff; aus [106], modifiziert

Das Fluoreszenzsignal erhöht sich proportional mit der Anzahl der gebildeten PCR-Produkte [101, 103].

Nachteilig an interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen ist, dass SYBR Green und EvaGreen an jede doppelsträngige DNA binden und dadurch auch an unspezifische Produkte wie Primer-Dimere [101].

Häufig wird SYBR Green durch EvaGreen ersetzt. EvaGreen ist, im Gegensatz zu SYBR Green, weder mutagen noch zytotoxisch, da die Zellmembran für EvaGreen

undurchlässig ist. Verglichen mit dem häufig eingesetzten Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green weist EvaGreen eine geringere Hemmung der PCR und eine geringere Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Amplifikation auf. Aus diesem Grund kann der Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen in höheren Konzentrationen als SYBR Green eingesetzt werden. In der Folge erhält man ein robusteres PCR-Signal. EvaGreen bindet ebenso an die doppelsträngige DNA und besitzt dieselben spektralen Eigenschaften wie SYBR Green. Im gebundenen Zustand liegt das Absorptionsmaximum bei 500 nm und das Emissionsmaximum bei 530 nm [107].

### 3.2 Bisulfit-Konvertierung

Die epigenetische Information der DNA-Matrize geht während der PCR verloren, da die DNA-Polymerase nicht zwischen methyliertem und unmethyliertem Cytosin unterscheiden kann. Das DNA-Templat muss deshalb vor der PCR-Amplifikation chemisch modifiziert werden, um die Methylierungsinformation zu erhalten. Die Methode der Wahl ist hierbei die Behandlung der DNA mit Natriumbisulfit. Bei der Verwendung von Natriumbisulfit wird das Cytosin zu Uracil umgewandelt (siehe *Tabelle 1*). Da die Desaminierungsrate von 5-Methylcytosin zu Thymin viel niedriger ist, als die Umsetzung von unmethyliertem Cytosin zu Uracil, wird davon ausgegangen, dass nach der Bisulfitbehandlung nur Cytosin zu Uracil umgewandelt wurde. Bei der anschließenden PCR wird Uracil als Thymin repliziert, wobei 5-Methylcytosin als Cytosin repliziert wird [9, 108].

*Tabelle 1: DNA-Sequenz vor bzw. nach der Bisulfit-Konvertierung; aus [109], modifiziert*

	<b>Original Sequenz</b>	<b>Bisulfit-konvertierte Sequenz</b>
Unmethylierte DNA	A-C-G-T-C-G-A-C-G-T	A-U-G-T-U-G-A-U-G-T
Methylierte DNA	A-C-G-T-C-G-A-C-G-T	A-C-G-T-C-G-A-C-G-T

Die Bisulfit-Konvertierung ist stark einzelstrangspezifisch [110]. Deshalb muss vor der Konvertierung der DNA-Doppelstrang denaturiert werden, um eine vollständige Bisulfit-Konvertierung zu erzielen. Die Bisulfit-Konvertierung der genomischen DNA umfasst drei Schritte, die Sulfonierung des Cytosins, die hydrolytische Desaminierung des Cytosinsulfonats zum Uracilsulfonat und die alkalische Desulfonierung des Uracilsulfonats (siehe *Abbildung 24*) [111].

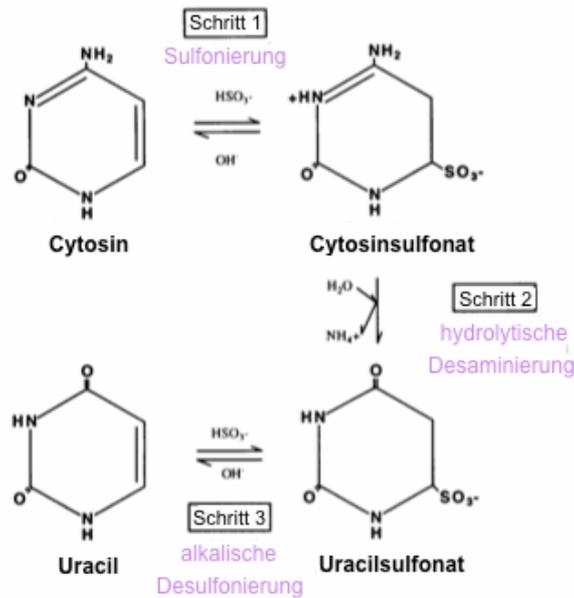


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Bisulfit-Konvertierung; aus [110], modifiziert

Den ersten Schritt der Konvertierung stellt die **Sulfonierung** dar, wobei Natriumhydrogensulfit ( $\text{NaHSO}_3$ ), auch Bisulfit genannt, an die Position 6 des Cytosins addiert wird. Die Bildung des sulfonierten Cytosins ist noch reversibel. Die Menge des gebildeten Cytosinsulfonats ist abhängig vom pH-Wert, der Bisulfitkonzentration, sowie der Temperatur. Im Anschluss erfolgt die **hydrolytische Desaminierung**, dabei wird die Amino-Gruppe ( $-\text{NH}_2$ ) an Position 4 des Cytosinsulfonats abgespalten und durch Sauerstoff ersetzt. Durch diese hydrolytische Desaminierung entsteht das Uracilsulfonat. Dieser Schritt wird durch Sulfit, Bisulfit und Acetat anionen katalysiert. Den letzten Schritt der Bisulfit-Konvertierung stellt die **Desulfonierung**, die Entfernung des Bisulfitaddukts ( $-\text{SO}_3$ ) durch eine alkalische Behandlung dar, wobei am Ende Uracil erhalten wird [110].

### 3.3 Primer-Design

In der vorliegenden Diplomarbeit wurden BSP-Primer entworfen und im Anschluss eine methylierungs-sensitive hochauflösende Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die in dieser Diplomarbeit erstellten Primer wurden laut den Vorgaben von Wojdacz et al. [9, 112] entsprechend entworfen:

Der Forward-, als auch der Reverse Primer, sollen eine begrenzte **Anzahl an CpG-Dinukleotiden** enthalten. Ein bis zwei CpG-Dinukleotide sollen im Primer enthalten sein. Die enthaltenen CpG-Dinukleotide sollen soweit wie möglich vom

3'-Ende des Primers entfernt sein, da die Primer sonst selektiv hinsichtlich des methylierten Templates sind [9, 112].

Die **Schmelztemperatur** ( $T_m$ ) der Primer soll bei ungefähr 65 °C liegen. Der Forward- und der Reverse Primer sollen einen  $T_m$ -Unterschied von maximal 1 °C besitzen. Die Annealingtemperatur ( $T_a$ ) während einer PCR wird ungefähr 4 bis 5 °C unter der  $T_m$  der beiden Primer gewählt [9, 112].

Nahe bzw. am **3'-Ende** der Primer sollen sich eine oder mehrere **Thymin**-Basen befinden, welche nicht von einem CpG-Cytosin stammen. Das Vorhandensein solch eines Thymins am 3'-Ende gewährleistet die Amplifikation von ausschließlich Bisulfit-konvertierten Templates [9, 112].

Das entworfene Primerpaar soll hinsichtlich der **Standardparameter für das Primer-Design** untersucht und bewertet werden. Dies umfasst die Ermittlung der Wahrscheinlichkeit zur Bildung von Sekundärstrukturen und Primer-Dimeren [9, 112].

Die bevorzugte Länge des **Amplikons** beträgt 100 Basenpaare (bp), um die Komplexität des Schmelzprofils zu reduzieren. Weiters soll die zu amplifizierende Sequenz 6 bis 8 CpG-Dinukleotide enthalten, um ein eindeutiges Schmelzprofil zu erhalten. Der Unterschied in der Schmelztemperatur zwischen dem unmethylierten und methylierten Template steigt mit der Anzahl der CpGs im Amplikon [9].

In der Praxis kommt es häufig zur Bildung eines PCR-Bias [112]. Ein PCR-Bias ist eine bevorzugte Amplifikation eines DNA-Templates [9]. Ein PCR-Bias kann durch die Optimierung der Annealingtemperatur als auch durch die Variation der  $Mg^{2+}$ -Konzentration verringert werden. Die im HRM-Mix enthaltene  $Mg^{2+}$ -Konzentration reicht meist nicht aus, um eine effiziente Amplifikation der Bisulfit-modifizierten Template zu garantieren. Eine Erhöhung der Konzentration um 2 – 3 mmol/l verbessert die Amplifikation merklich [9, 112]. Die  $Mg^{2+}$ -Konzentration muss für jedes Primerpaar individuell optimiert werden. Eine weitere Möglichkeit zur Reduzierung eines PCR-Bias ist die Veränderung der Annealingtemperatur ( $T_a$ ). Beim Auftreten eines Bias soll das Primerpaar bei verschiedenen  $T_a$  getestet werden, um eine Annealingtemperatur zu erhalten, bei welcher der PCR-Bias ausgeglichen wird [9]. Bei Vorliegen eines Bias in Richtung des unmethylierten Strangs führt eine Erhöhung der  $T_a$  zu einer Reduzierung des PCR-Bias, da methylierte Template bevorzugt amplifiziert werden [9]. Für weitere Informationen siehe Kapitel 4.6 und Abschnitt 5.1.1.

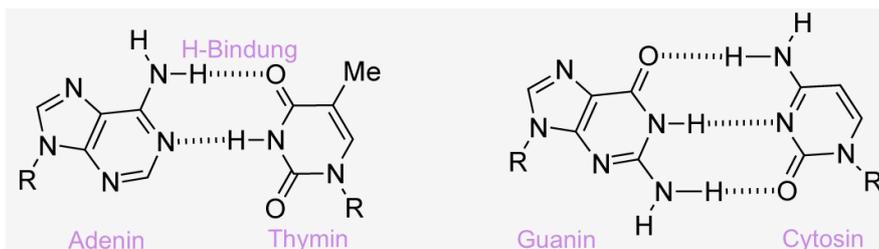
### 3.4 Methylierungs-sensitive hochauflösende Schmelzkurvenanalyse

Die MS-HRM ist eine an die PCR anschließende Bestimmungsmethode der DNA-Methylierung. Dabei wird eine eventuell vorhandene DNA-Methylierung nach der PCR-Amplifikation mittels hochauflösender Schmelzkurvenanalyse analysiert [113].

#### 3.4.1 Prinzip der MS-HRM Analyse

Während einer Bisulfit-Konvertierung wird unmethyliertes Cytosin in Uracil umgewandelt, wobei methyliertes Cytosin unverändert bleibt (siehe Kapitel 4.5). Nach einer Bisulfit-Modifikation besitzt das DNA-Templat eine methylierungsabhängige Basenzusammensetzung. Die Schmelztemperatur der DNA ( $T_m$ ) ist jene Temperatur, bei welcher die Hälfte der DNA-Doppelstränge in 2 Einzelstränge dissoziiert sind. Dabei werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen der beiden DNA-Einzelstränge aufgebrochen. Die benötigte Energie zur Dissoziation der Wasserstoffbrückenbindungen ist von der Anzahl der Wasserstoffbrücken zwischen den Einzelsträngen abhängig [113].

Die Dissoziation der drei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Guanin und Cytosin erfordert mehr Energie, als die Dissoziation der zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Adenin und Thymin (siehe *Abbildung 25*) [111].

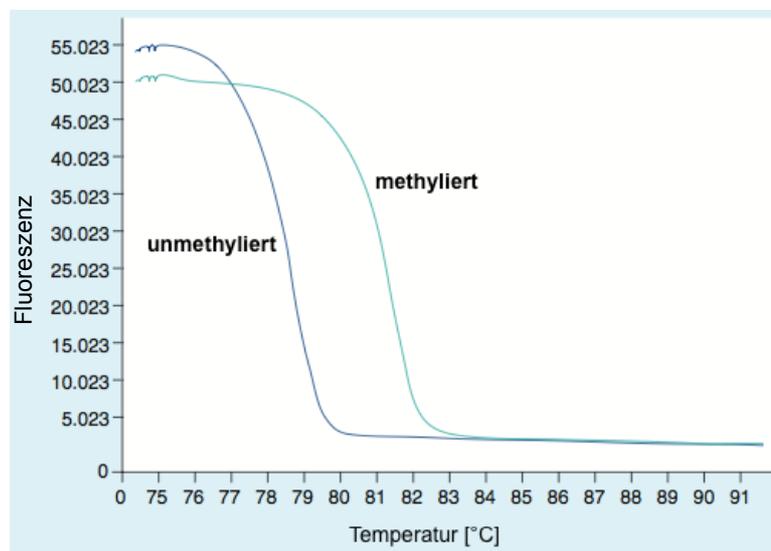


**Abbildung 25: Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren A und T, sowie G und C; aus [114], modifiziert**

#### 3.4.2 Detektion der Schmelzprofile

Jedes doppelsträngige DNA-Molekül kann über seine spezifische Schmelztemperatur charakterisiert werden. Unter einem Schmelzprofil wird das sequenzabhängige Schmelzen eines Amplikons entlang eines zunehmenden Temperaturgradienten

verstanden [111]. Die Schmelztemperatur eines PCR-Produktes kann ermittelt werden, indem der Temperaturgradient, unter Anwesenheit eines interkalierenden DNA-Farbstoffs, erhöht wird. Der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff lagert sich in die doppelsträngige DNA ein und emittiert in der Folge ein hohes Fluoreszenzsignal (siehe Abschnitt 3.1.1). Es wird solange ein stabiles Signal erhalten, bis auf Grund der ständig steigenden Temperatur das Amplikon zu schmelzen beginnt. Die doppelsträngige DNA dissoziiert in zwei Einzelstränge, der Fluoreszenzfarbstoff kann sich nicht länger einlagern und es kommt zu einem starken Fluoreszenzabfall. Die Veränderung des Fluoreszenzniveaus entlang eines Temperaturgradienten beschreibt das Schmelzprofil eines Amplikons. Methylierte und unmethylierte DNA-Amplikons besitzen eine unterschiedliche Basenzusammensetzung (Guanin- und Cytosin-reich bzw. Adenin- und Thymin-reich), deshalb haben sie unterschiedliche Schmelztemperaturen und Schmelzprofile (siehe *Abbildung 26*) [9].



**Abbildung 26: Schmelzprofil eines methylierten und unmethylierten Templates entlang eines Temperaturgradienten; aus [113], modifiziert**

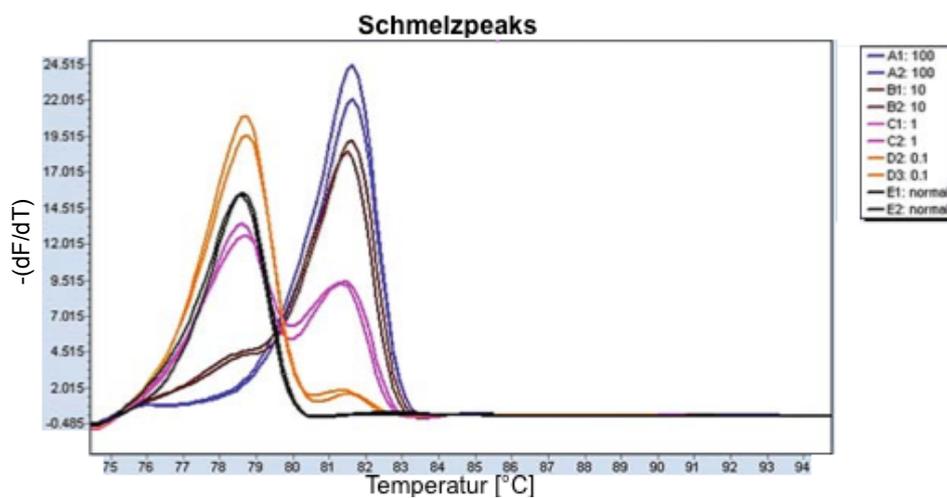
Anhand der Schmelzkurvenanalyse ist es nicht möglich, genaue Informationen über die Methylierung einzelner Cytosin-Basen zu erhalten. Dazu wird eine DNA-Sequenzierung benötigt [9].

Die ersten interkalierenden Farbstoffe, wie beispielsweise SYBR Green I waren für die Durchführung einer Schmelzkurvenanalyse nicht geeignet. SYBR Green I ist für die DNA-Polymerase toxisch und die PCR-Amplifikation in Anwesenheit von SYBR Green I nicht robust. Die neue Generation der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, wie beispielsweise der in dieser Diplomarbeit eingesetzte Farbstoff EvaGreen, kann in Konzentrationen eingesetzt werden, welche die PCR-Amplifikation nicht hemmen. Weiters ist es mit diesen Farbstoffen möglich, sowohl eine Real-Time PCR, als auch eine Schmelzkurvenanalyse durchzuführen [111].

Eine deutliche und exakte Erfassung des Fluoreszenzsignals und ein kleiner, kontinuierlicher Temperaturanstieg, stellen das Fundament der HRM-Analyse dar. Eine Kombination eines Thermocyclers mit einem Fluoreszenzdetektor eignet sich für die Durchführung einer PCR mit anschließender MS-HRM Analyse am besten [111]. Mit einem Real-Time PCR Gerät kann einerseits die Bisulfit-Konvertierung, als auch die MS-HRM Analyse durchgeführt werden. Weiters ist es mit einem neuen Thermocycler möglich, die Temperatur in kleinen Schritten, wie beispielsweise  $0,05\text{ }^{\circ}\text{C/s}$ , zu erhöhen [111].

### 3.4.3 Datenanalyse der Schmelzprofile

Schmelzkurven entstehen anhand der kontinuierlichen Erfassung der Fluoreszenzemission während einer linearen Temperaturzunahme. Die Schmelzkurven können in Peaks umgewandelt werden, indem die negative Ableitung der Fluoreszenz gegen die Temperatur ( $-(dF/dT)$ ) aufgetragen wird (siehe *Abbildung 27*) [111].

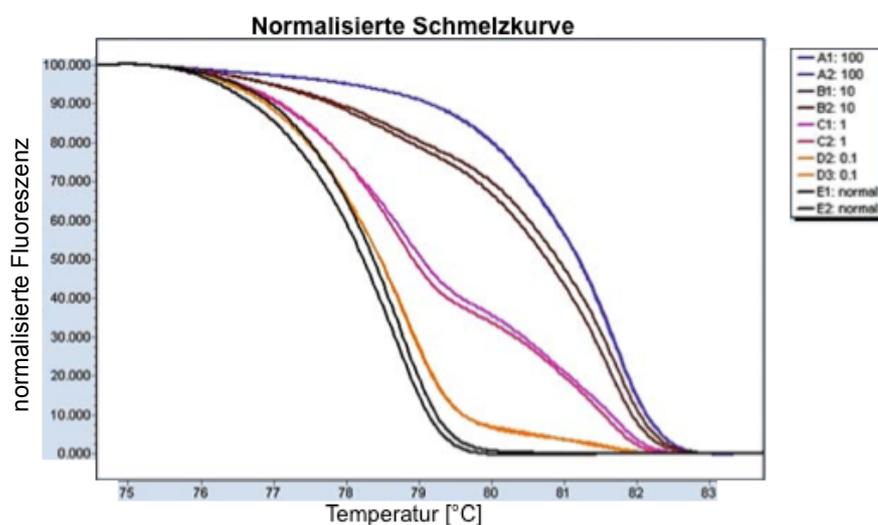


**Abbildung 27: Schmelzpunkte einer Standardreihe aus methylierter und unmethylierter DNA; aus [111], modifiziert**

Die Spitze eines Peaks repräsentiert den stärksten Fluoreszenzanstieg während des Schmelzens. Dieser Peak zeigt die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) des PCR-Produkts an. Mit zunehmender Temperatur werden die DNA-Doppelstränge in zwei Einzelstränge aufgetrennt und der Fluoreszenzfarbstoff wird freigesetzt. Daraufhin kommt es zu einer Abnahme der Fluoreszenz. Zur Bestimmung des Methylierungsgrades werden bei jeder MS-HRM Analyse eine Standardreihe mit verschiedenen Mischungsverhältnissen der methylierten und unmethylierten Standard-DNA erstellt. Hierbei werden in einem bestimmten Mischungsverhältnis Standards von 0 % methyliert bis 100 % methyliert hergestellt. Der Methylierungsgrad wird in Prozent angegeben. Der in *Abbildung 27*

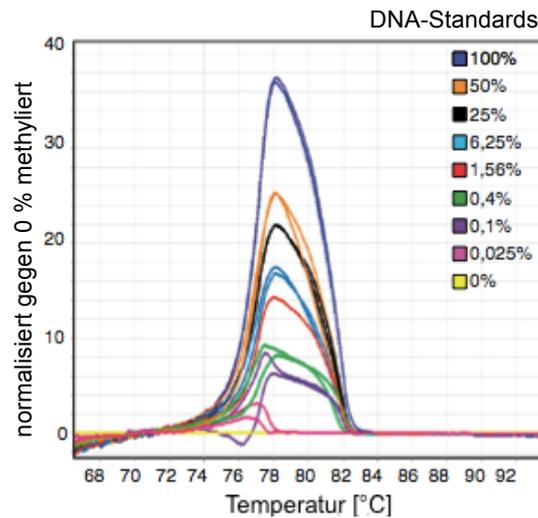
und 28 als B1 und B2 benannte Standard 10 beispielsweise besteht zu 90 % aus unmethylierter DNA und zu 10 % aus vollständig methylierter Standard-DNA. Die vollständig methylierte Probe, in *Abbildung 27* und *28* der blaue Kurvenverlauf, zeigt eine deutlich höhere  $T_m$ , als die niedrig methylierten Proben (in *Abbildung 27* und *28* die schwarzen, gelben, pinken und braunen Kurvenverläufe). Werden die Peaks der bekannten Standardreihe mit den Peaks der unbekanntenen Proben verglichen, erhält man den Methylierungsgrad der unbekanntenen Proben [111]. Anhand dieser Darstellung der Schmelzkurven kann auf das Vorhandensein eines Bias geschlossen werden. Hierbei wird der Kurvenverlauf des 50 % methylierten DNA-Standard, eine 50 : 50 Mischung aus methylierter und unmethylierter DNA, genauer analysiert. Werden bei dieser Schmelzkurve 2 gleich hohe Peaks erhalten, so liegt kein Bias vor und es wird keines der beiden Template bei der Amplifikation bevorzugt [9].

Für jeden Standard, als auch für jede Probe, erfolgt üblicherweise eine Doppelbestimmung. Bei diesen Doppelbestimmungen können nach einer erfolgreichen Amplifikation unterschiedliche Mengen an PCR-Produkten enthalten sein und dadurch abweichende Fluoreszenzintensitäten erhalten werden. Um die HRM-Kurven vergleichen zu können, erfolgt eine Normalisierung der Start- und Endniveaus der Fluoreszenzkurven (siehe *Abbildung 28*) [9, 111].



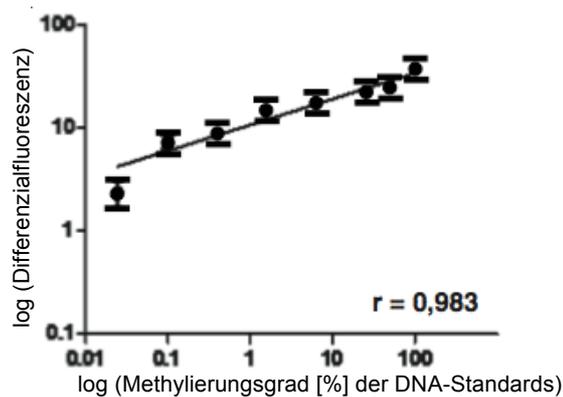
**Abbildung 28: Normalisierte Schmelzkurven einer durchgeführten Doppelbestimmung von Standards mit unterschiedlichem Methylierungsgrad; aus [111], modifiziert**

Um eine Kalibriergerade zu erhalten, werden im ersten Schritt Differenzialkurven aus den normalisierten Schmelzkurven erstellt. Die Fluoreszenzintensität der einzelnen unbekanntenen Proben und bekannten DNA-Standards werden gegen den unmethylierten DNA-Standard (0 % methyliert) in Bezug gesetzt (siehe *Abbildung 29*) [115].



**Abbildung 29: Differenzialkurven im Bezug auf 0 % DNA-Standard; aus [115], modifiziert**

Bei der Differenzialanalyse werden Peaks mit unterschiedlicher Höhe, in Abhängigkeit ihrer Fluoreszenzintensität bezogen auf den unmethylierten DNA-Standard, erhalten. Der 0 % methylierte DNA-Standard stellt die Basislinie dieses Diagramms dar (siehe gelbe Linie in *Abbildung 29*). Der höchste Peak entspricht der vollständig methylierten Standard-DNA (100 % methyliert). Die Höhe der anderen Peaks steigt proportional mit ihrem zunehmenden Methylierungsgrad. Durch Auftragen der Peakhöhe gegen den Methylierungsgrad der Standards kann eine Kalibriergerade erhalten werden. Die Differenzialfluoreszenzwerte wurden gegen den Methylierungsgrad der Standardreihe aufgetragen und eine typische Kalibriergerade erhalten (siehe *Abbildung 30*) [115].



**Abbildung 30: Kalibriergerade; aus [115], modifiziert**

## 4. Experimentelles

### 4.1 Zellkultur

Die Kultivierung der Brustkrebszellen wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie der Universität Wien durchgeführt. Die nötige Einrichtung für diese Arbeit, wie Brutschränke und Sterilbank, wurden von Univ.-Prof. Dr. Doris Marko zur Verfügung gestellt.

#### 4.1.1 Zellkultur-Arbeit unter der Sterilbank

Um eine Kontamination der Zellen mit Mikroorganismen zu vermeiden, wurden alle durchgeführten Arbeiten an den Zellen in einer Laminar, auch Sicherheitswerkbank, Sterilkammer, Sterilbank oder Laminar Flow Werkbank genannt, durchgeführt. Eine Sicherheitswerkbank (siehe *Abbildung 31*) erfordert steriles Arbeiten, um mögliche Verunreinigungen, sowie Keime, in der Zellkultur zu vermeiden.



**Abbildung 31: Sterilbank (Laminar)**

Die Laminar besitzt ein spezielles Belüftungssystem, wobei darauf geachtet werden muss, dass die Lüftungsöffnungen nicht verstellt werden, da es sonst zu einer Störung des Luftstromes kommen kann und vermehrt Mikroorganismen aufgewirbelt werden. Die bis zur Hälfte der Fläche heruntergefahrne Frontscheibe schützt vor dem Eindringen von Raumluft und der darin enthaltenen Partikel. Vor Beginn der

Zellkultivierung wurde die Arbeitsfläche der Sterilbank mit Ethanol (70 %ig) gereinigt. Generell wurde nur bis zum Ellenbogen in die Sterilbank hineingefahren, um die Kontamination möglichst gering zu halten. Die benötigten Geräte, wie Glaspipetten, Pasteurpipetten, Reaktionsgefäße, sowie Pipettenspitzen wurden vor der Verwendung autoklaviert. Die Behälter der Pipetten, sowie alle anderen Materialien, wie z.B. Kulturflaschen und Röhrchen, wurden mit Ethanol (70 %ig) besprüht und erst im Anschluss in die Laminar hineingestellt. Vor der Öffnung der Pipettenbehälter wurden sie über dem Laborgasbrenner abgeflammt. Die Pipetten selbst, sowie verschlossene Gefäße, wie z.B. das Nährmedium für die Zellen, wurden vor Gebrauch auf diese Art und Weise gereinigt [116].

#### 4.1.2 Kultivierung der MCF-7 Zellen

Die MCF-7 Zellen wurden in einer Zellkulturflasche, mit 75 cm<sup>2</sup> Bodenfläche, bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank gezüchtet. Die Kultivierung erfolgte mit dem Medium RPMI 1640 (engl. *Roswell Park Memorial Institute 1640*), welches zusätzlich L-Glutamin und den Indikator Phenolrot enthielt. Dem Kulturmedium wurden 10 Vol.-% fötales Kälberserum (FKS), sowie ein Vol.-% Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) zugegeben.

Der Verbrauch der Nährstoffe im Medium, sowie die Stoffwechselprodukte der Zellen, führen zu einem Absinken des pH-Wertes. Phenolrot zeigt bei einem pH-Wert von unter 7,2 einen Farbumschlag von rot auf orange-gelb. Besitzt das Medium eine gelbliche Farbe, ist ein Mediumwechsel notwendig, um ein gleichmäßiges Zellwachstum weiterhin zu garantieren [116].

#### 4.1.3 Subkultivierung

Neben dem Nährstoffverbrauch im Medium ist die Zelldichte ein ebenso wichtiger Faktor für das Wachstumsverhalten der Zellen. Die Zellen wurden kurz vor einer eintretenden Konfluenz, ein beinahe die gesamte Flaschenoberfläche bedeckender Zellrasen, gesplittet. Bei einer Konfluenz befinden sich die Zellen in einem sehr engen Kontakt, was in der Folge zur Blockierung der Zellteilung führen kann.

Um die Zellen in Monolagen zu kultivieren und Polylogen zu vermeiden, erfolgte alle vier Tage das Passagieren der MCF-7 Zellen. Hierbei wurden das RPMI 1640 Medium, eine phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) und das Verdauungsenzym Trypsin im

Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Alle in Folge beschriebenen Tätigkeiten wurden in der Sterilbank durchgeführt.

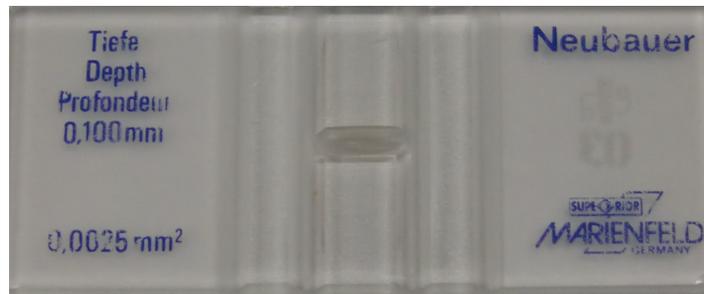
Das in der Kulturflasche gelb gefärbte Medium wurde über eine autoklavierte und gereinigte Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt. Zur Entfernung der Mediumreste wurde mit 4 bis 5 ml 37 °C warmem PBS gespült und im Anschluss wieder abgesaugt. Um den Zellrasen von der Oberfläche der Kulturflasche zu lösen, wurde 1 ml Trypsin zur Überschichtung der Zellen zugegeben und im Anschluss für 2 Minuten im Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde durch leichtes Klopfen an der Flaschenwand der Zellrasen vollständig vom Flaschenboden abgelöst. Um keine Zellschäden durch Trypsin zu verursachen, wurden zur Inaktivierung des Verdauungsenzyms 10 ml des RPMI 1640 Mediums mit einer sterilen Glaspipette hinzugegeben. Mit der Glaspipette wurde diese Zellsuspension aufgesaugt und wieder in die Kulturflasche entleert. Dabei wurden einerseits die Zellen voneinander getrennt, sowie Zellen, welche sich eventuell noch auf der Kulturoberfläche befanden, abgelöst. Ungefähr die Hälfte dieser Zellsuspension wurde in der Kulturflasche belassen, der Rest verworfen. Zu den Zellen wurden noch 20 ml des RPMI 1640 Mediums hinzugegeben und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellkulturflaschen wurden zwei Mal für das Anwachsen der Zellen benutzt, beim dritten Passagieren wurden sie in eine neue Kulturflasche überführt. Mit jeder Subkultivierung der MCF-7 Zellen stieg die Passagenzahl. Die Passagennummer wurde nach jedem Splitting auf der Zellkulturflasche vermerkt. Bei einer Passagenzahl von ungefähr 30 wurden neue MCF-7 Zellen aufgetaut und die Zellen mit einer hohen Passagenzahl verworfen, um immer mit voll teilungsfähigen MCF-7 Zellen zu arbeiten.

#### **4.1.4 Bestimmung der Zellzahl**

Für die Inkubationsversuche wurde je Petrischale die gleiche Menge an Zellen eingesetzt. Zur Bestimmung der Zellzahl vor dem Ausstreuen der Zellen wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Zu den nach der Trypsinbehandlung (siehe 4.1.3) abgelösten Zellen wurden 5 ml des RPMI 1640 Mediums hinzugegeben. Aus dieser Zellsuspension wurden 20 µl in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Zur Bestimmung der Zellviabilität wurden in das Reaktionsgefäß 180 µl Trypanblau hinzugefügt (Verdünnung 1 : 10) und im Anschluss gevortext. Trypanblau ist ein polyanionischer Azofarbstoff, lebende Zellen schließen den blauen Farbstoff aus und erscheinen im blauen Hintergrund weiß. Tote Zellen sind dagegen dunkelblau gefärbt [117]. Somit

kann unter dem Mikroskop zwischen lebenden und abgestorbenen Zellen unterschieden werden.

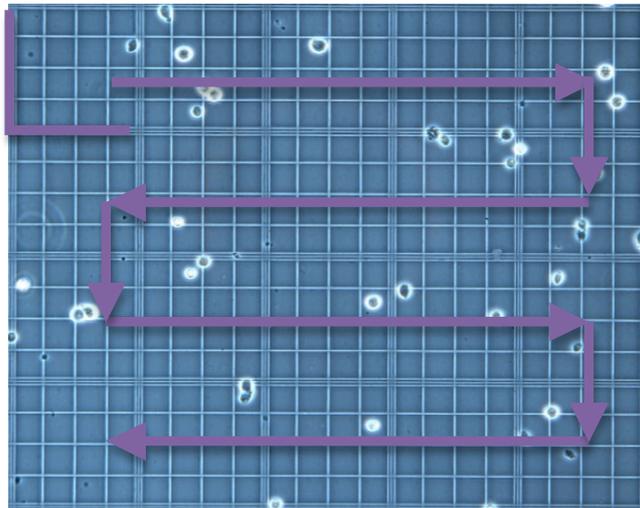
Bei einem Hämozytometer handelt es sich um eine rechteckige Grundplatte (siehe *Abbildung 32*) mit 4 Vertiefungen. Der mittlere Steg, welcher in der Mitte geteilt ist, enthält die eingravierten Zählnetze.



**Abbildung 32: Neubauer-Zählkammer zur Zellzahlbestimmung**

Vor der Verwendung der Zählkammer wurden sowohl die Grundplatte, als auch das Deckglas mit Ethanol (70 %ig) gereinigt. Das Deckglas wurde durch Anhauchen befeuchtet und auf die Zählkammer mit sanftem Druck aufgelegt. Durch Auf- und Abschieben des Glasplättchens wurde die Richtigkeit des Aufsetzens geprüft. Zusätzlich wurden bei der Anhaftung des Deckglases an der Zählkammer die Newtonschen Ringe sichtbar.

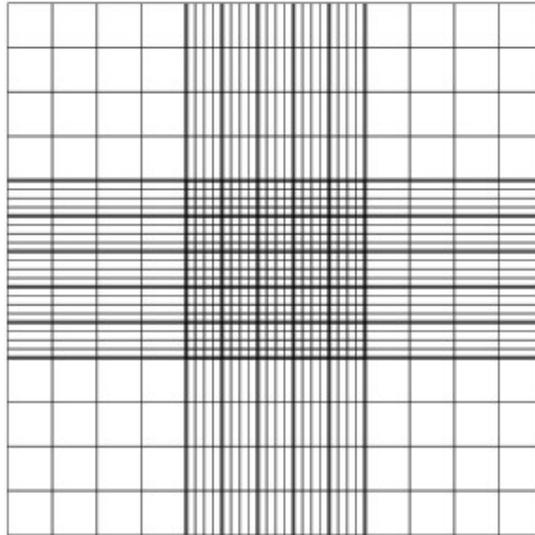
10  $\mu\text{l}$  der gevortexten Zellsuspension wurden zwischen die Zählkammer und das Deckglas pipettiert. Unter dem Mikroskop ergab sich folgendes Bild (*Abbildung 33*):



**Abbildung 33: Ein Eckquadrat der Neubauer-Zählkammer, mit lebenden (weiß) und toten Zellen; aus [119], modifiziert**

Die Neubauer-Zählkammer besteht aus 9 großen Quadraten. Die 4 Eckquadrate sind wiederum jeweils aus 16 kleineren Quadraten (siehe *Abbildung 34*) aufgebaut. In

diesen 4 Quadraten wurde jedes Mal die Zellanzahl ausgezählt und deren Mittelwert bestimmt.



**Abbildung 34: Zählfeld der Neubauer-Zählkammer; aus [118]**

Wie vorhin bereits erwähnt, kann man mittels Trypanblau zwischen toten und lebenden Zellen unterscheiden. Die vitalen Zellen erscheinen unter dem Mikroskop weiß (siehe *Abbildung 33*), die toten dunkelblau bis schwarz. Um Zellen, welche sich auf den Begrenzungslinien befinden, nicht doppelt mitzuzählen, muss man sich für 2 Seiten eines Quadrates entscheiden, z.B. die linke waagrechte und senkrechte Linie (wie in *Abbildung 33* ersichtlich). Diese beiden Seiten werden während des gesamten Zählvorgangs beibehalten. Die Auszählung sollte mäanderförmig erfolgen. Wie in *Abbildung 33* dargestellt, beginnt man in der oberen linken Ecke und folgt der Pfeilrichtung, bis man am Ende in der unteren linken Ecke angelangt ist. Die Tiefe der Neubauer-Zählkammer beträgt 0,1 mm (vgl. *Abbildung 32*). Von den 9 großen Quadraten besitzt jedes Quadrat eine Fläche von einem Quadratmillimeter, daraus ergibt sich ein Volumen von 0,1 µl pro Quadrat [120]. Nach Bestimmung des Mittelwertes der 4 Zählungen wird die Zellzahl mit folgender Formel bestimmt:

$$n = \bar{X} * 10 * 10.000$$

$n$  ..... Zellzahl pro ml

$\bar{X}$  ..... Mittelwert der Zählungen der 4 Eckquadrate (in 0,1 µl Zellsuspension)

*Faktor* 10 ..... Verdünnungsfaktor der Zellsuspension mit Trypanblau (Verhältnis 1 : 10)

*Faktor* 10.000 ... Umwandlung von 0,1 µl auf 1 ml

**Formel 1: Bestimmung der Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension**

## 4.2 Inkubationsversuche

Die Zellen wurden mit den ausgewählten Substanzen (EGCG, Hydralazin, Quercetin, (+)-Lariciresinol und (-)-Matairesinol) inkubiert. Von den Substanzen wurden jeweils die gleichen 6 Konzentrationen hergestellt und inkubiert, siehe 4.2.1. Zusätzlich wurde eine Nullprobe inkubiert, in der sich keine Substanz, sondern nur das entsprechende Lösungsmittel, sowie in den meisten Fällen die Enzyme Katalase und Superoxiddismutase (SOD) zur Stabilisierung der Chemikalien befanden. Als Lösungsmittel wurde für jede Substanz Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. Die verschiedenen Inkubationsversuche und die dabei verwendeten Stabilisatoren sind in *Tabelle 2* aufgelistet. Für die Inkubationsversuche mit den verschiedenen Substanzen wurden jeweils 7 Petrischalen mit der gleichen Zellanzahl ausgestreut. Das Ausstreuen der Zellen erfolgte 96 Stunden vor dem Inkubationsbeginn. In dieser Zeit konnten die Zellen am Boden der Petrischale anwachsen. Pro Petrischale wurden 50.000 Zellen benötigt. Um die nötige Zellanzahl zu erhalten, wurde eine Zellzählung, wie bereits unter 4.1.4. beschrieben, durchgeführt. Nach dem Erhalt der Zellzahl wurde die benötigte Gesamtmenge an Zellen für alle 7 Petrischalen entnommen und dem Gesamtvolumen an Kulturmedium (für jede Petrischale 5 ml RPMI 1640 Medium ergibt für 7 Petrischalen 35 ml Medium) hinzupipettiert. Die hinzugefügte Zellsuspension und das Kulturmedium wurden gut gemischt und im Anschluss auf die 7 Petrischalen aufgeteilt. Um die Zellen gleichmäßig in der Petrischale zu verteilen, wurden die Petrischalen mehrmals entlang eines imaginären Achters bewegt. Im Anschluss wurden die Zellen bis zur Inkubation 96 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 4.2.1 Erstellen der Verdünnungsreihe

Von allen zu inkubierenden Substanzen wurden die selben Verdünnungen hergestellt. Die eingewogene Substanzmenge wurde im Anschluss in DMSO gelöst. Die folgenden Konzentrationen wurde mit DMSO hergestellt: 10 mmol/l, 5 mmol/l, 2,5 mmol/l, 1 mmol/l, 500 µmol/l und 100 µmol/l. Neben den 6 Verdünnungen der jeweiligen Substanzen wurde jeweils eine Leerprobe mit DMSO und den entsprechenden Stabilisatoren verwendet. Bei der Inkubation der ausgewählten Stoffe wurden 50 µl der jeweiligen Verdünnung zu den 5 ml RPMI 1640 Medium hinzupipettiert. Die verwendeten Substanzen wurden dadurch um den Faktor 100 verdünnt und man

erhielt eine Endkonzentration der Substanzen von 100 µmol/l, 50 µmol/l, 25 µmol/l, 10 µmol/l, 5 µmol/l und 1 µmol/l.

Wie aus *Tabelle 2* zu entnehmen ist, wurden folgende Substanzen inkubiert:

**Tabelle 2: Übersicht über die Inkubationsversuche mit ihren Stabilisatoren**

Substanz	Anzahl der Inkubationsversuche	Stabilisator
EGCG	1	-
EGCG	2	Superoxiddismutase
EGCG	2	Katalase, Superoxiddismutase
EGCG	1	Katalase, Mg <sup>2+</sup> , Superoxiddismutase,
Hydralazin	1	-
(+)-Lariciresinol	1	Katalase
(-)-Matairesinol	1	Katalase
Quercetin	1	Katalase

Polyphenole erleiden oft eine Auto-Oxidation, wie im Abschnitt 1.5.2.1 am Beispiel von EGCG gezeigt wurde. Um diesem oxidativen Stress und der dadurch induzierten Apoptose der MCF-7 Zellen entgegenzuwirken, wurde zu den Polyphenolen zur Stabilisierung Katalase, sowie zum Teil Superoxiddismutase, hinzugefügt (siehe *Tabelle 2*).

#### 4.2.2 Inkubation mit EGCG

Im Falle des EGCG wurden, wie in *Tabelle 2* zu sehen ist, bei zwei Inkubationsversuchen zu den entsprechenden Verdünnungen jeweils 5 Units Superoxiddismutase (SOD)/ml Medium hinzugegeben. Die Nullprobe mit DMSO enthielt ebenso 5 Units SOD/ml Medium. Bei zwei weiteren Inkubationsversuchen wurden ebenfalls jeweils 5 Units SOD/ml Medium, sowie 30 Units Katalase/ml Medium hinzugefügt. Die DMSO-Leerprobe enthielt neben 5 Units SOD/ml Medium auch 30 Units Katalase/ml Medium.

Wie bereits unter 1.5.2.1 erwähnt, erhöht Mg<sup>2+</sup> die Bindungsenergie von EGCG an DNMT1. Um zu prüfen, ob die Mg<sup>2+</sup>-Konzentration den demethylierenden Effekt von EGCG verstärkt, wurde bei dieser Inkubation zusätzlich zu SOD und Katalase 2 mmol MgCl<sub>2</sub> zugegeben.

### 4.2.3 Inkubation mit Polyphenolen

Bei den weiteren, während dieser Diplomarbeit inkubierten Polyphenolen Lariciresinol, Matairesinol und Quercetin wurden zu jeder Verdünnung jeweils 30 Units Katalase/ml Medium hinzupipettiert.

### 4.2.4 Durchführung der Inkubation

Vor der Durchführung der Inkubation wurden von den Substanzen unterschiedlich konzentrierte Lösungen in DMSO hergestellt (siehe 4.2.1.) und bei -20 °C im Gefrierfach gelagert. Das alte Medium in den Petrischalen wurde mittels steriler Pasteurpipette abgesaugt und das RPMI 1640 Medium auf 37 °C im Wasserbad vorgewärmt. Die entsprechenden Inkubationslösungen wurden auf Raumtemperatur erwärmt und im Anschluss 50 µl zu 5 ml RPMI 1640 Medium gegeben. Diese wurden danach auf die Zellen in der Petrischale aufgebracht. Das Inkubationsmedium wurde alle 48 Stunden neu zubereitet und im Anschluss ausgewechselt. Eine Ausnahme war hierbei der Inkubationsversuch mit (-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) und den Stabilisatoren Katalase, Mg<sup>2+</sup>, sowie SOD. EGCG und die zugegebenen Stabilisatoren wurden alle 24 Stunden erneuert. Die Inkubationsdauer lag bei diesem Versuch bei 4 Tagen.

Alle anderen Inkubationsversuche erfolgten über eine Dauer von 9 Tagen. Am 10. Tag wurde das Inkubationsmedium erneut abgesaugt, die Zellen mit 2 ml PBS-Lösung gewaschen und diese Lösung im Anschluss wieder entfernt. Um die Zellen vom Boden der Petrischale zu lösen, wurde wie bei der Subkultivierung beschrieben (siehe 4.1.3.), das Verdauungsenzym Trypsin verwendet. In jede Petrischale wurden 500 µl Trypsin pipettiert und zur Inkubation 2 Minuten in den Brutschrank bei 37 °C gegeben. Um möglichst alle Zellen von der Oberfläche abzulösen wurde auf die Petrischale von unten sachte geklopft. Die Verdauungsreaktion wurde im Anschluss mit 2 ml RPMI 1640 Medium gestoppt. Mit einer Pipette wurde die Zellsuspension aufgenommen und im Anschluss in die Zellkulturflasche entleert, um die Zellen von einander zu lösen. Als nächster Schritt erfolgte die DNA-Extraktion.

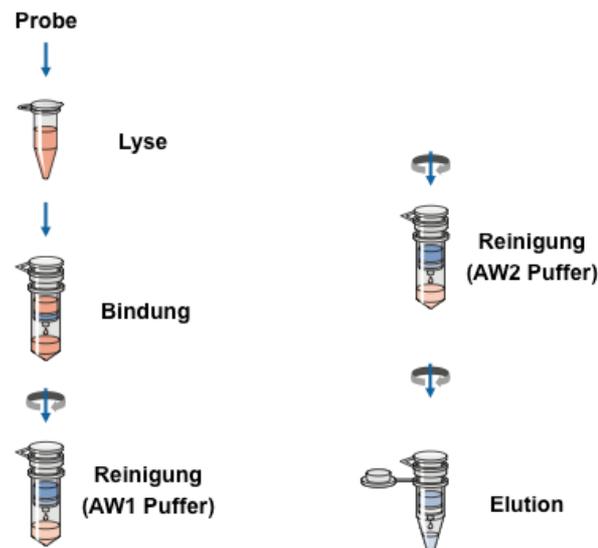
## 4.3 DNA-Extraktion

Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen geerntet und deren DNA isoliert. Der QIAamp DNA Mini Kit wird verwendet, um die DNA aus Blut, Plasma, Serum, Knochenmark, Leukozyten, Lymphozyten, Körperflüssigkeiten, Gewebe und Zellkulturen zu isolieren.

### 4.3.1 DNA-Extraktion aus MCF-7 Zellen

Das in der Folge verwendete PBS, sowie das Ethanol (96 %ig), waren nicht im QIAamp DNA Mini Kit enthalten.

Nach Abschluss der Inkubation wurden die Zellen, wie bereits in Abschnitt 4.2 beschrieben, jeweils von der Oberfläche der Petrischale gelöst und in ein Zentrifugenröhrchen transferiert. Die Zellen wurden daraufhin in der Hettich-Zentrifuge (Rotina 420 R) für 5 Minuten bei 1.000 rpm (engl. *revolutions per minute*; Umdrehungen pro Minute) abzentrifugiert. Der RPMI 1640 Medium-Überstand wurde abgenommen und verworfen. Im Anschluss wurden die Zell-Pellets in 2 ml PBS resuspendiert, kurz gevortext und erneut bei 1.000 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde wieder entfernt und die Zellen in 200 µl PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Zur Lyse der Zellmembran wurden 20 µl Proteinase K-Lösung, sowie 200 µl AL Puffer zugegeben. Um eine möglichst effiziente Lyse zu gewährleisten, wurde jede Probe für 15 Sekunden pulsierend gevortext und im Trockenschrank für 10 Minuten bei 56 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 200 µl Ethanol (96 %ig) hinzupipettiert und wiederum 15 Sekunden lang gevortext, um eine homogene Lösung zu erhalten. Die Mikrozentrifugenröhrchen wurden kurz bei 3.000 – 4.000 rpm zentrifugiert. Der folgende Ablauf der DNA-Extraktion mit den QIAamp Mini Spin-Säulen kann in *Abbildung 35* mitverfolgt werden.



**Abbildung 35: Ablauf der DNA-Extraktion mit QIAamp Mini Spin-Säulen; aus [121], modifiziert**

Das DNA-Lösungsmittel-Gemisch wurde in die Mini Spin-Säule überführt und für 1 Minute bei 8.000 rpm abzentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Das alte Röhrchen wurde gegen ein neues 2 ml Sammelröhrchen (engl. *collection tube*) ersetzt und jeweils 500 µl AW1 Puffer zugegeben. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 8.000 rpm für 1 Minute wurde das Filtrat verworfen und die Säule in ein neues Sammelröhrchen gesteckt. Nun wurden 500 µl AW2 Puffer hinzupipettiert und bei 14.000 rpm für 3 Minuten abzentrifugiert. Das Filtrat wurde wiederum verworfen und die Spin-Säule in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen platziert. Zur Entfernung eventuell vorhandener AW2 Puffer-Reste wurde noch einmal bei 14.000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Zur Elution der DNA wurde die Spin-Säule in ein neues 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen gegeben und 200 µl RNase freies Wasser auf die Säule pipettiert. Bei Raumtemperatur wurde 5 Minuten inkubiert und im Anschluss bei 8.000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Die daraus gewonnene DNA, welche sich nun im Mikrozentrifugenröhrchen befand, stellte die A-Probe dar. Um die DNA-Ausbeute zu erhöhen, wurde die Säule in ein neues Röhrchen (B-Probe) gegeben und wieder 200 µl RNase freies Wasser zupipettiert, 5 Minuten inkubiert und bei 8.000 rpm 1 Minute lang zentrifugiert [121]. Die nach der Extraktion erhaltene DNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 4.3.2 DNA-Extraktion aus Biopsieproben

Die DNA-Extraktion aus Biopsieproben verlief zu Beginn etwas modifiziert gegenüber der DNA-Isolation aus Zellkulturen ab. Maximal 25 mg Gewebe wurden eingewogen

und in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Zur Biopsieprobe wurden im Anschluss 180  $\mu\text{l}$  des ATL Puffers, sowie 20  $\mu\text{l}$  der Proteinase K-Lösung zugegeben. Daraufhin wurde das Mikrozentrifugenröhrchen in den Trockenschrank (56 °C) gestellt, bis sich alles gelöst hatte. In der Folge wurden 14  $\mu\text{l}$  RNase-Lösung hinzugegeben und 2 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden 200  $\mu\text{l}$  AL Puffer hinzupipettiert und 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Daraufhin wurden 200  $\mu\text{l}$  Ethanol zugegeben und 15 Sekunden pulsierend gevortext. Alle weiteren Schritte wurden, wie in Abschnitt 4.3.1. beschrieben, durchgeführt.

#### 4.4 Bestimmung der DNA-Konzentration und der Reinheit

Im Anschluss an die DNA-Extraktion erfolgte die Konzentrationsbestimmung und die Bestimmung der Reinheit der isolierten DNA mit dem NanoDrop UV-Vis Spektralphotometer (siehe *Abbildung 36*).



**Abbildung 36: NanoDrop Spektralphotometer; aus [122], modifiziert**

Zu Beginn der Messung wurde ein Nullabgleich mit RNase freiem Wasser durchgeführt, da zur Elution Wasser verwendet wurde. Es wurden dazu 1,5  $\mu\text{l}$  des Wassers mit einer Pipette auf die Linse aufgebracht und photometrisch gemessen. Alle DNA-Lösungen (A- und B-Proben) wurden zuvor kurz gevortext und im Anschluss 1,5  $\mu\text{l}$  der Lösung auf die Linse pipettiert und die Extinktion gemessen.

Die Reinheit der DNA wird über das Verhältnis der Extinktion der Nukleinbasen (Absorptionsmaximum bei 260 nm) und der Extinktion der in der DNA enthaltenen Proteine (Absorptionsmaximum bei 280 nm) bestimmt. Die Konzentration  $c$  in  $\text{ng}/\mu\text{l}$  und die Reinheit  $P$  der DNA-Lösung wurden mit folgenden Formeln berechnet:

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

$c$  ..... Konzentration [ng/μl]  
 $A_{260}$  ..... Extinktion bei 260 nm  
 $f_{DNA}$  ..... Faktor ( $f_{DNA} = 50$ )

**Formel 2: Bestimmung der DNA-Konzentration**

$$P = A_{260} / A_{280}$$

$P$  ..... Reinheit  
 $A_{260}$  ..... Extinktion bei 260 nm  
 $A_{280}$  ..... Extinktion bei 280 nm

**Formel 3: Bestimmung der DNA-Reinheit**

## 4.5 Durchführung der Bisulfit-Konvertierung

Es wurden alle Proben, sowie die methylierte (Millipore) und unmethylierte (Qiagen) Standard-DNA Bisulfit-konvertiert.

Das Temperaturprogramm enthält verschiedene Inkubationsschritte, welche die optimale DNA-Denaturierung, die anschließende Sulfonierung und Cytosin-Desaminierung ermöglichen, um eine hohe Cytosin-Konvertierungsrate zu erhalten. Der EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit ermöglicht eine Konvertierung innerhalb von 30 Minuten, was beim bisher verwendeten EpiTect Bisulfite Kit 5 Stunden in Anspruch nahm. Die Desulfonierung und Aufreinigung der Bisulfit-konvertierten DNA stellt den letzten Schritt der Konvertierung dar und wird über eine Spin-Säule sowie verschiedene Wasch-Puffer erreicht.

### 4.5.1 Die Vorgangsweise der Bisulfit-Konvertierung

Der Ablauf der Bisulfit-Konvertierung entsprach dem Protokoll des EpiTect Fast DNA Bisulfite Kits [109]. Das benötigte Ethanol (96 %ig) war nicht Bestandteil des Kits. Der Ansatz für die Konvertierung im Thermocycler setzte sich, wie in *Tabelle 3* ersichtlich, aus folgenden Komponenten zusammen:

**Tabelle 3: Bisulfit-Konvertierungs-Ansatz für den EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit und den EpiTect Bisulfite Kit**

Komponente	DNA-Menge 2 µg – 1 ng	DNA-Menge 500 – 1 ng
	Volumen [µl]	Volumen [µl]
DNA-Lösung	variabel (maximal 20)	variabel (maximal 40)
RNase freies H <sub>2</sub> O	Differenz auf 20	Differenz auf 40
Bisulfit-Lösung	85	85
DNA-Schutzpuffer	35	15
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>140</b>	<b>140</b>

Die meisten DNA-Extrakte aus (unbehandelten bzw. behandelten) MCF-7 Zellen wiesen eine DNA-Konzentration  $>2 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$  auf, deshalb wurde in diesen Fällen weniger als  $20 \mu\text{l}$  DNA-Lösung eingesetzt. Um ein Gesamtvolumen von  $20 \mu\text{l}$  zu erreichen, wurde der fehlende Rest mit RNase freiem Wasser ergänzt. Vereinzelt lag die DNA-Konzentration in den Proben unter  $500 \text{ ng}/20 \mu\text{l}$ . Hierbei wurde der 2. Ansatz gewählt und mehr als  $20 \mu\text{l}$  DNA eingesetzt. Die unmethylierte Standard-DNA hatte vor der Bisulfit-Konvertierung eine Konzentration von  $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$  und die methylierte Standard-DNA eine Konzentration von  $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ . Für die Bisulfit-Konvertierung wurden  $20 \mu\text{l}$  der jeweiligen DNA-Lösung eingesetzt.

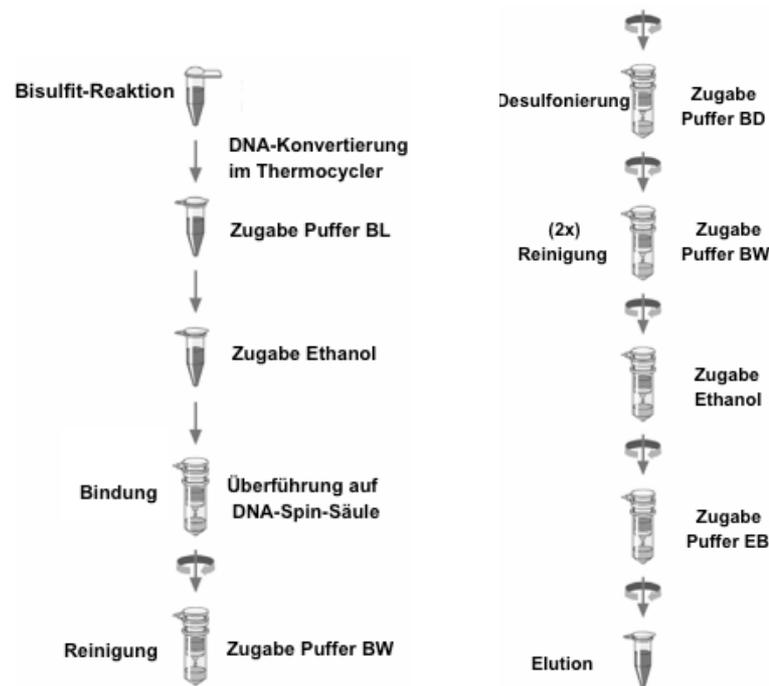
Für den Konvertierungsansatz wurde ein dickwandiges  $200 \mu\text{l}$  Mikrozentrifugenröhrchen verwendet. Die DNA-Lösung, sowie eventuell erforderliches Wasser, wurden als erstes in das Röhrchen pipettiert (vgl. *Tabelle 3*). Im Anschluss erfolgte das Hinzufügen von  $85 \mu\text{l}$  der Bisulfit-Lösung, sowie  $35 \mu\text{l}$  bzw.  $15 \mu\text{l}$  des DNA-Schutzpuffers. Nach der Zugabe des DNA-Schutzpuffers wurde das Reaktionsgemisch mehrmals mit einer Pipette auf- und abgesogen, um eine homogene Mischung aller Komponenten zu erreichen. Der Farbumschlag von grün auf dunkelblau nach der Zugabe des DNA-Schutzpuffers zeigte den optimalen pH-Wert im Reaktionsgemisch an. Die Bisulfit-Konvertierung erfolgte im Anschluss im Rotor Gene Q Thermocycler. Das verwendete Temperaturprogramm ist in *Tabelle 4* angegeben. Es wurde bei der Verwendung des Fast Kits ein Temperaturprogramm mit einer Gesamtdauer von 35 bzw. 55 Minuten eingestellt. Vor der Verwendung des EpiTect Fast DNA Bisulfite Kits wurde für zwei Konvertierungen der EpiTect Bisulfite Kit verwendet, wobei das Temperaturprogramm hierfür 5 Stunden dauerte.

**Tabelle 4: Temperaturprogramm der Bisulfit-Konvertierung - Fast Bisulfite Kit im Vergleich zum Bisulfite Kit**

Schritt	Fast Bisulfite Kit		Bisulfite Kit
	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Denaturierung	5	95	5
Inkubation	10 / 20	60	25
Denaturierung	5	95	5
Inkubation	10 / 20	60	85
Denaturierung	-	95	5
Inkubation	-	60	175
Abkühlen	5	25	5
<b>Gesamt</b>	<b>35 / 55</b>		<b>300</b>

Die Inkubationszeit kann beim Fast Kit sowohl 10 Minuten, als auch 20 Minuten betragen. In bestimmten Fällen ist es notwendig, die Inkubation auf 20 Minuten zu verlängern, um eine komplette DNA-Bisulfit-Konvertierung zu gewährleisten. Im Laufe dieser Arbeit hat sich herausgestellt, dass für DNA aus MCF-7 Zellen und Biopsieproben bereits 10 Minuten für die Konvertierung ausreichen, da bei den Schmelzkurven kein Unterschied zwischen 10 und 20 Minuten Inkubationszeit während der Bisulfit-Konvertierung festgestellt wurde.

Am Ende des Temperaturprogramms wurde die einzelsträngige DNA gemäß dem Protokoll des Fast Kits (siehe *Abbildung 37*) gewaschen und desulfoniert. Der Inhalt des 200 µl Mikrozentrifugenröhrchen wurde in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Zu jeder Probe wurden 310 µl Puffer BL pipettiert. Wurde für die Bisulfit-Konvertierung eine DNA-Menge kleiner als 100 ng eingesetzt, wurden nicht 310 µl des Puffers BL hinzupipettiert. In diesem Fall wurde Carrier RNA zum Puffer BL im Verhältnis 3,5 µl : 350 µl/Probe zugegeben. Das Röhrchen wurde gevortext und kurz zentrifugiert. Im Anschluss wurden 250 µl Ethanol (96 %ig) zugegeben, 15 Sekunden pulsierend gevortext und daraufhin das Röhrchen erneut kurz zentrifugiert, um die Tropfen vom Deckel zu entfernen. Um die DNA an die Membran zu binden, wurde der Inhalt des Mikrozentrifugenröhrchens in eine MinElute DNA-Spin-Säule überführt und bei 14.000 rpm für 1 Minute zentrifugiert.



**Abbildung 37: Ablauf der Bisulfit-Konvertierung in MinElute DNA-Spin-Säulen;  
aus [109], modifiziert**

Das Filtrat wurde verworfen. Daraufhin wurden 500 µl Puffer BW zur Säule zugegeben und 1 Minute zentrifugiert. Das Filtrat wurde ebenfalls verworfen. Im Anschluss wurden, zur Desulfonierung, 500 µl Puffer BD zur Spin-Säule zupipettiert. Mit geschlossenem Säulen-Deckel wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde für 1 Minute zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Daraufhin wurden 500 µl Puffer BW zum Entsalzen der DNA zugegeben, 1 Minute zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Dieser Waschschrift wurde wiederholt. Zur Säule wurden im Anschluss 250 µl Ethanol (96 %ig) hinzugegeben und 1 Minute abzentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und die Säule in ein neues Sammelröhrchen platziert. Zur Entfernung des restlichen Ethanols wurde als erstes 1 Minute bei 14.000 rpm zentrifugiert und im Anschluss die Säule mit geöffnetem Deckel bei 60 °C 5 Minuten in den Thermoschrank gestellt. In der Folge wurde das Sammelröhrchen gegen ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen ausgetauscht. Zur Elution der DNA von der Spin-Säulen-Membran wurden 15 µl (beim EpiTect Bisulfite Kit 20 µl) Puffer EB direkt auf die Mitte der Membran pipettiert und 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert, sowie im Anschluss bei 12.000 rpm abzentrifugiert. Die erhaltene Bisulfit-konvertierte DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

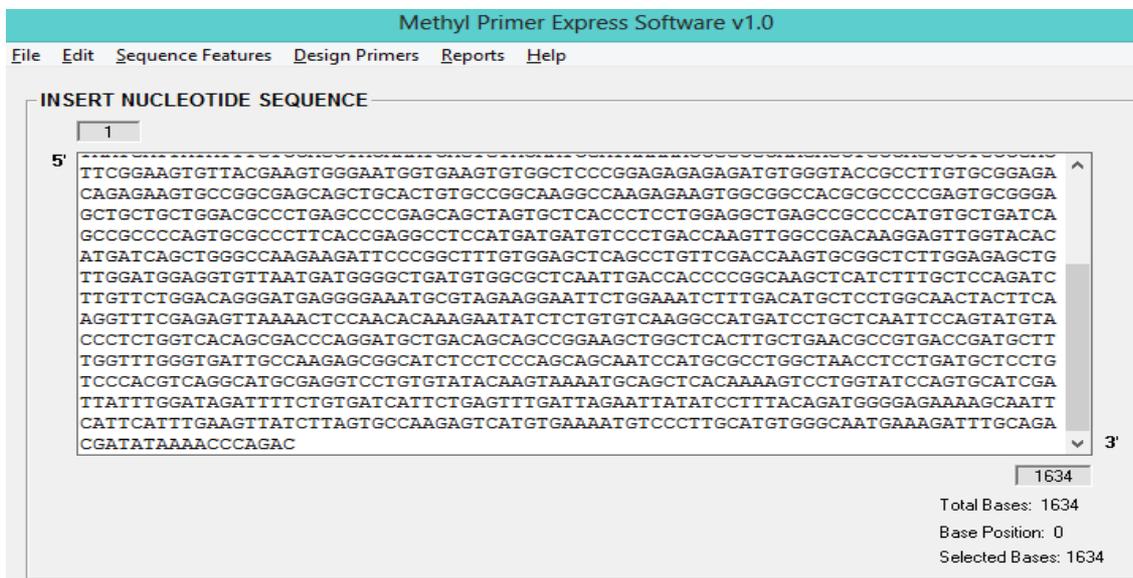
## 4.5.2 Verdünnung der Bisulfit-konvertierten DNA

Die Bisulfit-konvertierte Proben-DNA wurde mit RNase freiem Wasser auf eine Konzentration von 5 ng/µl verdünnt.

Die umethylierte Standard-DNA sowie die methylierte Standard-DNA mussten für den Einsatz in der PCR ebenfalls auf die Konzentration von 5 ng/µl mit RNase freiem Wasser verdünnt werden. Alle hergestellten Verdünnungen wurden im Anschluss aliquotiert, um ein häufiges Auftauen der DNA zu vermeiden.

## 4.6 Durchführung des Primer-Designs

Generell wurden Primer zur Amplifikation der Bisulfit-behandelten DNA, kurz BSP-Primer, entworfen. Zu Beginn des Primerentwurfs wurde eine passende Gensequenz in der NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI)-Datenbank [123] gesucht und die gefundene Sequenz in die verwendete METHYL PRIMER EXPRESS SOFTWARE, Version 1.0, eingefügt (siehe *Abbildung 38*).



**Abbildung 38: Eingabefeld für die Nukleotid-Sequenz in der Methyl Primer Express Software**

Es wurde die Schaltfläche „Find CpG Islands“ ausgewählt und die Software ermittelte im Anschluss die in der Gensequenz enthaltenen CpG-reichen Basenabfolgen, auch CpG-Inseln genannt. Gab es mehrere CpG-Inseln zur Auswahl, wurde bevorzugt die Insel nahe am 5' Ende des Gens für den Primerentwurf verwendet. Um Primer für die Bisulfit-konvertierte DNA zu entwerfen, musste die Bisulfit-Konvertierung von der

Software simuliert werden. Hierbei wurde bei der Schaltfläche Select MSP or BSP „Design BSP Primers“ ausgewählt.

Die Primer wurden von der Methyl Primer Express Software automatisch vorgeschlagen. Es wurden folgende Primer-Parameter eingestellt, wie in *Tabelle 5* ersichtlich ist.

**Tabelle 5: Parametereinstellungen in der Methyl Primer Express Software**

Primer-Parameter	Einstellung
Amplikon-Länge	90 – 150 bp
Primer-Länge	18 – 27 bp
Annealingtemperatur $T_a$	60 – 68 °C
$T_m$ Differenz zwischen Forward- + Reverse Primer	1 °C
Anzahl der CpGs im Primerpaar	3
Summe Cytosin im Primerpaar, ohne CpGs	1 – 10
Mindestanzahl Cytosin pro Primer, ohne CpGs	3

Als weitere Einstellung konnte die Geschwindigkeit der Suchabfrage eingestellt werden. Eingestellt wurde in dieser Arbeit eine sehr niedrige Suchgeschwindigkeit mit einer sehr hohen Genauigkeit der Suchabfrage.

Nach der richtigen Einstellung der verschiedenen Parameter schlug die Software mögliche Primerpaare vor, wie in *Abbildung 39* gezeigt.

The screenshot displays the 'BSP Primers' software interface. At the top, there is a menu bar with 'File', 'Edit', 'Sequence Features', 'Design Primers', 'Reports', and 'Help'. Below the menu, a instruction reads: 'Click on a primer that is closest to the horizontal line (CpG representation)'. The main window shows a DNA sequence from position 196 to 1085. A horizontal line represents CpG sites, with vertical bars indicating their positions. Several primer pairs are shown as red and orange arrows pointing towards each other. A legend identifies the symbols: green line for 'Region of Interest', red arrow for 'Forward Primers', orange arrow for 'Reverse Primers', grey arrow for 'Forward Primer Selected', and blue arrow for 'Reverse Primer Selected'. Other symbols include a red vertical bar for 'Translation Start Codon', a blue vertical bar for 'Transcription Bases', and a purple vertical bar for 'CpG Sites'. Below the sequence, there are two text boxes: 'Forward Primer-Reverse Primer Selected Sequences' and 'Bisulfite Modification of the DNA'. The 'Forward Primer-Reverse Primer Selected Sequences' box shows: 'FORWARD Length: 22 bp. 5' AAAAATGGYGTAAAGATTGTT 3' Tm=62.28; CpG=2; C=5'. Below this, it says 'You may modify the primer sequence if necessary, within this region: 5'. The 'Bisulfite Modification of the DNA' box shows a sequence of G's and C's. At the bottom right, there are buttons for '< Back' and '>BSP Primer Report'.

**Abbildung 39: Anzeige möglicher BSP-Primerpaare**

Die Forward Primer wurden als rote Pfeile und die Reverse Primer als orange Pfeile hervorgehoben, siehe *Abbildung 39*. Die markierten Pfeile erscheinen als weiße Pfeile, in *Abbildung 39* als graue Pfeile hervorgehoben. Durch die Auswahl eines Primerpaares wurde die Basenabfolge der Primer, die Schmelztemperatur der Primer  $T_m$ , die Primer-Länge, die Anzahl der CpGs, die Menge an Cytosin-Basen, das Amplikon, sowie weitere Primer-Eigenschaften angezeigt.

Zur Hervorhebung der einzelnen CpG-Dinukleotide wurde die Cytosin-Base im Forward Primer in der Basenabfolge als ein „Y“ und im Reverse Primer als ein „R“ dargestellt. In den entsprechenden Primern müssen „Y“, sowie „R“ durch die richtige Base ersetzt werden. Je nachdem, ob man ein CpG-Dinukleotid aktivieren bzw. „ausschalten“ wollte, setzte man im Forward Primer für ein „Y“ zur Aktivierung ein „C“ und zur Inaktivierung ein „T“ ein. Zur Aktivierung des CpG-Dinukleotids im Reverse Primer wurde an die Stelle „R“ ein „G“ und zum Ausschalten ein „A“ eingefügt.

Die Schmelztemperaturen der Primer wurden in der Methyl Primer Express Software angezeigt. Weiters wurde  $T_m$  mit folgender Formel [102] berechnet:

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

**Formel 4: Berechnung der Primer-Schmelztemperatur; aus [102], modifiziert**

Die Schmelztemperaturen  $T_m$  wurden zusätzlich mit dem Internetkalkulator OLIGOCALC [124] berechnet. Es wurde der Salz-bereinigte  $T_m$ -Wert abgelesen. Die mit OLIGOCALC berechneten Schmelztemperaturen  $T_m$  stimmten am besten mit den in der Praxis beobachteten Werten überein. Um Sekundärstrukturen der einzelsträngigen DNA-Sequenz zu vermeiden, wurden die zu erwartenden Faltungen der Forward- und Reverse Primer mit dem RNAFOLD WEBSERVER [125] ermittelt. Zur Kontrolle, ob das Primerpaar keine Heterodimere und keine Self-Dimere bildet, wurde der OLIGO ANALYZER [126] verwendet. Bei Heterodimeren kommt es zur Zusammenlagerung des Forward- und Reverse Primers. Bei Self-Dimeren sind die Primer komplementär zu sich selbst und bilden Basenpaare innerhalb der Primersequenz. Die Unterschiede im Schmelzverhalten des methylierten und unmethylierten Amplikons wurden über uMELT [127] erhalten.

Die bestellten Primer wurden auf eine Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  mit RNase freiem Wasser verdünnt. Alle Aliquote wurden bei  $-20 \text{ } ^\circ\text{C}$  gelagert.

## 4.7 Entwicklung und Optimierung der MS-HRM

### 4.7.1 Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen

Die Durchführung einer PCR erfordert die Vermeidung von Verunreinigungen mit Fremd-DNA. Generell wurden bei allen Arbeitsschritten mit der DNA (DNA-Extraktion, Bisulfit-Konvertierung, Pipettieren der PCR, Verdünnen der Primer) Handschuhe getragen.

Zum Erhalt der DNA-Stabilität, als auch zur Vermeidung einer möglichen Kontamination mit einer Fremd-DNA wurden von den Verdünnungen Aliquote hergestellt.

Zur Entfernung einer möglichen DNA-Kontamination auf der Arbeitsoberfläche wurde vor Beginn die Arbeitsfläche mit DNA-ExitusPlus besprüht und nach 5 Minuten Einwirkzeit entfernt.

### 4.7.2 DNA-Standards

Zur Bestimmung des Methylierungsgrades wurden DNA-Standards benötigt. Es wurden folgende Standards durch Mischen der methylierten sowie unmethylierten Standard-DNA hergestellt (siehe *Tabelle 6*). Wie aus *Tabelle 6* hervorgeht, konnten die Standards, in Abhängigkeit von dem untersuchten Gen, variieren.

*Tabelle 6: Methylierungsgrad der verwendeten Standards*

untersuchtes Gen	Methylierungsgrad [%] der verwendeten Standards
<i>CDH1</i>	0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 75, 100
<i>ER<math>\alpha</math></i>	0, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100
<i>ER<math>\beta</math></i>	0, 50, 60, 70, 80, 90, 100
<i>HIN-1</i>	0, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100
<i>MGMT</i>	0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 75, 100
<i>CDKN2A/p16</i>	0, 10, 25, 50, 75, 100
<i>DAPK1</i>	0, 1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 75, 100
<i>RASSF1A</i>	0, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100

### 4.7.3 Herstellung des Master-Mix

Vor dem Start einer MS-HRM Analyse wurde der Master-Mix immer frisch hergestellt. Der entsprechende eingesetzte Forward- und Reverse Primer wurde zuvor auf

10  $\mu\text{mol/l}$  verdünnt (siehe Abschnitt 4.6.). Durch Einsatz von 0,5  $\mu\text{l}$  des Primers, sowie durch die weitere Verdünnung bei der Herstellung des Reaktions-Mix, wurden die Primer mit einer Konzentration von 250  $\text{nmol/l}$  in der MS-HRM eingesetzt. Die zusätzlich zum HRM-Mix zugesetzte  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration variierte in Abhängigkeit vom jeweiligen Primerpaar zwischen 1,5 – 3  $\text{mmol/l}$ . Das genaue Pipettier-Schema ist der *Tabelle 7* zu entnehmen.

**Tabelle 7: Zusammensetzung des Master-Mix**

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Volumen [<math>\mu\text{l}</math>] / Probe</b>
Forward Primer	250 $\text{nmol/l}$	0,5
Reverse Primer	250 $\text{nmol/l}$	0,5
$\text{MgCl}_2$	1,5 – 3 $\text{mmol/l}$	0,75 – 1,5
$\text{H}_2\text{O}$ RNase frei		6,25 – 5,5
<b>Gesamt</b>		<b>8</b>

#### 4.7.4 Herstellung des Reaktions-Mix

Als Reaktions-Mix der MS-HRM Analyse wurde der EpiTect HRM PCR Kit von Qiagen verwendet. Dieser HRM-Mix enthält den Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen, den entsprechenden HRM-Puffer, sowie die HotStarTaq Plus DNA-Polymerase zur Vermeidung unspezifischer Amplifikationsprodukte [128].

Der Reaktions-Mix wurde in PCR Strip Tubes pipettiert. Wie in der *Tabelle 8* angegeben, wurde der Reaktions-Mix folgendermaßen hergestellt:

**Tabelle 8: Zusammensetzung des Reaktions-Mix**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen [<math>\mu\text{l}</math>] / Einzelbestimmung</b>
HRM-Mix	10
Master-Mix	8
Bisulfit-konvertierte DNA	2
<b>Gesamt</b>	<b>20</b>

Generell wurde bei jedem MS-HRM Lauf eine Doppelbestimmung der Standards sowie der Proben durchgeführt.

### 4.7.5 Temperaturprofil

Die PCR und die Schmelzkurvenanalyse (MS-HRM) wurden im Thermocycler Rotor Gene Q (Qiagen) durchgeführt. Generell wurde das EpiTect HRM-Protokoll etwas abgeändert. Das verwendete und optimierte Temperaturprofil ist in *Tabelle 9* dargestellt.

**Tabelle 9: Temperaturprofil der MS-HRM Analyse**

Schritt	Zeit	Temperatur
Denaturierung / Initialisierung	10 min	95 °C
3-Schritte-Zyklus:	∑ 50 Zyklen	
<i>Denaturierung</i>	10 s	95 °C
<i>Annealing</i>	10 s	primerspezifisch
Touchdown	7 Zyklen	je 1 °C
<i>Elongation</i>	20 s	72 °C
Haltephase	1 min	95 °C
HRM		primerspezifisch, meist 65–84 °C
Schritte der Temperaturerhöhung		alle 0,05 °C/2 s bzw. 0,1 °C/2 s

Nach der Aktivierung der DNA-Polymerase bei einer Temperatur von 95 °C für 10 Minuten erfolgte die PCR mit 50 Zyklen. Die Annealingtemperatur war vom eingesetzten Forward- und Reverse Primer abhängig. Diese Temperatur lag allerdings 6 °C über der eigentlichen Annealingtemperatur des Primerpaares, da für die ersten 7 Zyklen eine Touchdown-Funktion verwendet wurde. Bei den 7 Zyklen wurde die Temperatur jeweils um 1 °C gesenkt. Im Anschluss an den Annealing-Schritt erfolgte die Elongation bei 72 °C. Nach jeder Elongation wurde, nach einer Anregung bei 470 nm, ein Echt-Zeit-Fluoreszenzsignal des im HRM-Mix enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffs EvaGreen bei 510 nm gemessen. Vor der HRM-Analyse wurde eine Haltephase bei 95 °C für 1 Minute eingebaut, um die DNA vollständig zu denaturieren. Für die HRM-Analyse wurde ein Temperaturgradient von 65 bis 84 °C eingestellt, wobei dieser Bereich von Amplikon zu Amplikon etwas unterschiedlich war. Bei der Schmelzkurvenanalyse wurde die Temperatur alle 2 Sekunden um 0,05 °C erhöht [128]. Gegen Ende dieser Diplomarbeit wurde eine Temperaturerhöhung von 0,1 °C pro 2 Sekunden eingestellt.

## 4.8 Datenanalyse

### 4.8.1 Auswertung einer HRM-Analyse

Nach Ablauf eines MS-HRM Laufs wurde dieser mit der Rotor Gene Q Software analysiert. Zur Überprüfung, ob die Standards und die aufgetragenen Proben in einem engen Bereich amplifiziert worden sind, wurde die Amplifikation genauer betrachtet. Hierbei konnten erste Abweichungen bzw. Besonderheiten ausfindig gemacht werden. Die exakte Bestimmung des Methylierungsgrades der Proben erfolgte über eine Kalibriergerade (siehe Kapitel 3.4.3). Zuerst wurden die Schmelzkurven vor und nach dem Schmelzen der DNA normalisiert [111]. Aus den normalisierten Kurven wurden Differenzialkurven erstellt. Die normalisierten Schmelzkurven der DNA-Standards und der Proben wurden dabei als Differenzialsignal gegen den unmethylierten DNA-Standard (0 % methyliert) aufgetragen. Es wurde im Anschluss eine Kalibrierfunktion mit Hilfe des Programms SIGMAPLOT erstellt, indem die Differenzialfluoreszenzwerte der DNA-Standards gegen den Methylierungsgrad [%] der Kontrollstandards aufgetragen wurden [115].

### 4.8.2 Ausreißertest nach Nalimov

Um mögliche abweichende Werte als Ausreißer zu deklarieren, wurden die anhand der Kalibrierfunktion erhaltenen Werte dem Test nach Nalimov unterzogen. Die für den Methylierungsgrad [%] ermittelten Werte aus der HRM-Analyse wurden der Größe nach sortiert. Aus diesen Werten wurde der Mittelwert, sowie die Standardabweichung berechnet. Der niedrigste, sowie der höchste Wert der Reihung wurde auf einen Ausreißer getestet. Die Prüfgröße  $PG$  nach Nalimov wurde mit folgender Formel [129] berechnet:

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

- $x^*$  ..... ausreißerverdächtiger Wert (kleinster/größter Wert)  
 $\bar{x}$  ..... Mittelwert  
 $s_x$  ..... Standardabweichung

$N$ ..... Anzahl der Stichproben

**Formel 5: Berechnung der Prüfgröße  $PG$  nach Nalimov; aus [129]**

Der erhaltene Prüfwert  $PG$  wurde mit dem Vergleichswert für den Nalimov-Ausreißertest verglichen. War der erhaltene Wert  $PG$  kleiner als der Tabellenwert, lag kein Ausreißer vor [129].

### 4.8.3 Signifikanztests

Zur Feststellung, ob die Abnahme des Methylierungsgrades durch die verwendeten inkubierten Substanzen im Vergleich zur Null-Probe mit DMSO zufällig war, oder ob es sich hierbei um einen signifikanten Unterschied handelte, wurde der t-Test bzw. der Mann-Whitney-Rangsummentest mit allen Messergebnissen durchgeführt. Diese beiden Signifikanztests wurden mit der SIGMAPLOT Software durchgeführt. Verglichen wurden immer die Werte der mit MCF-7 Zellen inkubierten Substanzen, nach der Durchführung des Ausreißertests, mit der DMSO-Probe. Gestartet wurde der Signifikanztest immer mit einem t-Test. Beim t-Test wird untersucht, ob der Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen größer ist, als dass es sich um eine zufällige Stichprobenvariation handeln kann. Das Ergebnis des t-Tests beschreibt der *P-Wert*. Je kleiner dieser Wert ist, umso größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um einen signifikanten Unterschied handelt. Werte ab  $P < 0,05$  weisen auf einen signifikanten Unterschied hin. Zur Durchführung eines ungepaarten t-Tests mussten die Werte normalverteilt sein. Ist ein t-Test auf Grund nicht-normalverteilter Werte nicht möglich, schlägt die SigmaPlot Software automatisch den Mann-Whitney-Rangsummentest vor. Die Daten werden bei diesem Test in Rängen organisiert und der ungepaarte t-Test wurde mit den Summen dieser Ränge durchgeführt. Der t-Test besitzt den Vorteil, dass er etwas sensibler ist als der Mann-Whitney-Rangsummentest [130].

## 4.9 Chemikalien

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden die in *Tabelle 10* angeführten Substanzen verwendet.

*Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Chemikalien*

<b>Chemikalie</b>	<b>Bezugsquelle</b>
(-)-Epigallocatechin-gallat (EGCG)	Sigma-Aldrich
(-)-Matairesinol	Sigma-Aldrich
(+)-Lariciresinol	Arbo Nova
CpGenome universal, methylierte DNA, nicht Bisulfit-konvertiert	Millipore
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
DNA-ExitusPlus IF, AppliChem	VWR
EpiTect Control DNA, unmethyliert, nicht Bisulfit-konvertiert	Qiagen
Ethanol (EtOH)	VWR
Hydralazinhydrochlorid	Sigma-Aldrich
Katalase	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid-hexahydrat ( $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ )	Sigma-Aldrich
Primer	Sigma-Aldrich
Quercetin	Sigma-Aldrich
RNase freies Wasser ( $H_2O$ ), ultrafiltriert und autoklaviert	Sigma-Aldrich
Superoxid-Dismutase (SOD)	Sigma-Aldrich

## 4.10 Kits

Für die DNA-Extraktion, die Bisulfit-Konvertierung und die Durchführung der MS-HRM Analysen wurden die in *Tabelle 11* angegebenen Kits verwendet.

*Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Kits*

<b>Kit</b>	<b>Bezugsquelle</b>
EpiTect Bisulfite Kit	Qiagen
EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit	Qiagen
EpiTect HRM PCR Kit	Qiagen
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen

## 4.11 Zellkulturbedarf

Zur Durchführung der Inkubationsversuche mit der MCF-7 Zellkultur waren die in *Tabelle 12* aufgelisteten Substanzen erforderlich.

*Tabelle 12: Übersicht über die benötigten Zellkultur-Substanzen*

Komponente	Bezugsquelle
Fötales Kälberserum (FKS)	Gibco-Invitrogen
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco-Invitrogen
RPMI Medium 1640 (1x)	Gibco-Invitrogen
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich
Trypsin	Sigma-Aldrich

## 4.12 Geräte

In *Tabelle 13* sind alle Geräte angeführt, welche in der vorliegenden Diplomarbeit verwendet wurden.

*Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten Geräte*

Gerät	Typ	Bezugsquelle
Absaugpumpe	Vacusaft comfort	IBS Integra Biosciences
Analysenwaage	TE2144S	Sartorius
Brutschrank	Heracell 240i CO <sub>2</sub> Incubator	Thermo Scientific
Laborgasbrenner	Fuego basic	WLD-Tec
Mikroskop	Axiovert 40C	Zeiss
Mikrowaage	M3P	Sartorius
Spektralphotometer	NanoDrop 2000c	Thermo Scientific
Zählkammer	Neubauer – Improved	Marienfeld-Superior
Pipetten	0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1.000 µl	Biorad
	2-20 µl, 20-200 µl, 100-1.000 µl	Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Real-Time PCR Gerät	Rotor Gene Q	Qiagen
Sterilbank	Herasafe KS	Thermo Scientific
Trockenschrank	Memmert Modell 500	Memmert

Vortex	VF2 Vortex-Genie 2 VV3	Janke & Kunkel Scientific Industries VWR
Wasserbad	GD 100	Grant
Zentrifugen	Centrifuge 5424 Rotina 420 R	Eppendorf Hettich Zentrifugen

## 5. Ergebnisse und Diskussion

Ein Ziel dieser Diplomarbeit war es, auf der methylierungs-sensitiven hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse (MS-HRM) basierende Methoden für bestimmte Brustkrebs-relevante Gene zu entwickeln. Diese Methoden sollten angewandt werden, um einen eventuellen Einfluss von lebensmittelrelevanten Substanzen auf den Methylierungsgrad in MCF-7 Zellen zu ermitteln. Weiters sollten die Methoden angewandt werden, um den Methylierungsgrad in Biopsieproben von Brustkrebspatientinnen zu bestimmen.

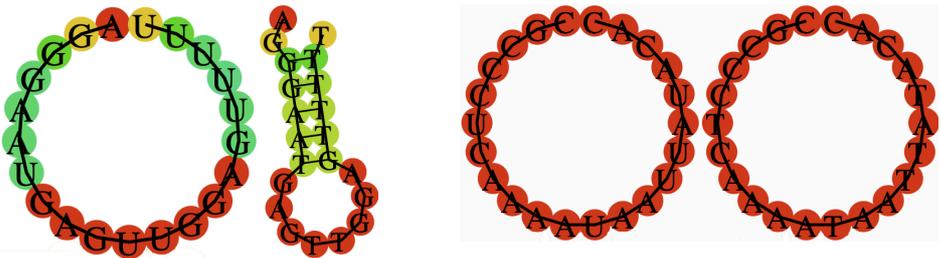
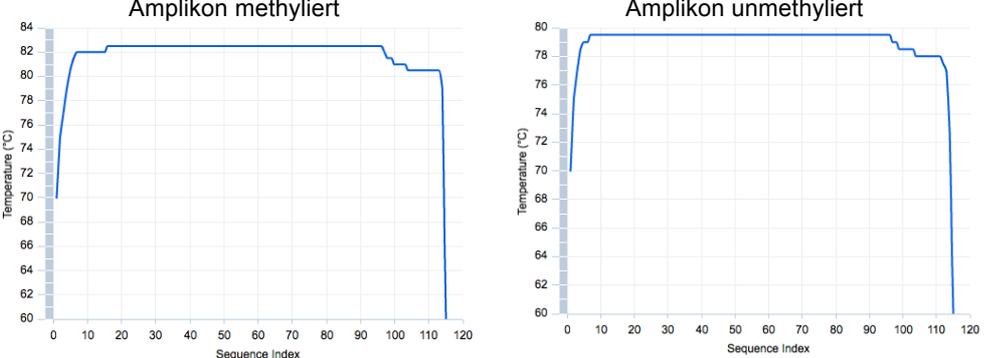
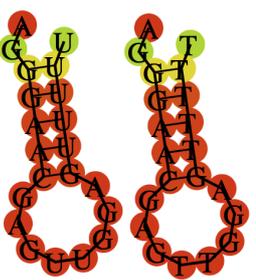
### 5.1 Primer-Design

Für die Gene *CDH1*, *ER $\alpha$* , *ER $\beta$* , *HIN-1* und *MGMT* wurden Primer entworfen, wobei beim Primer-Design die Vorgaben von Wojdacz et al. [9, 112] beachtet wurden, siehe Kapitel 3.3. Die für das Primer-Design benötigten Gensequenzen wurden aus der NCBI-Datenbank [123] entnommen. Der Entwurf der Forward- und Reverse Primer erfolgte mit der METHYL PRIMER EXPRESS SOFTWARE, Version 1.0. Der genaue Ablauf des Primerentwurfs wurde in Kapitel 4.6 ausführlich beschrieben.

#### 5.1.1 Primer-Design am Beispiel des Gens *ER $\alpha$*

Für den Östrogenrezeptor  $\alpha$  wurden die Primerpaare *ER $\alpha$ P1* und *ER $\alpha$ P2* entwickelt. Das Primer-Design wird in der Folge für das Primerpaar *ER $\alpha$ P2* beschrieben, da die mit dem Primerpaar 1 erhaltenen Amplikons bei der MS-HRM Analyse einen seltsamen Kurvenverlauf zeigten. Für das Design der Primer *ER $\alpha$ P2* wurde die NCBI-Referenzsequenz JF810888.1 verwendet. Das Primerpaar *ER $\alpha$ P2* war spezifisch für einen Abschnitt im Exon 5a. Eine Übersicht des Primerpaares *ER $\alpha$ P2* und deren Eigenschaften ist in *Tabelle 14* zusammengefasst.

Tabelle 14: Charakteristika des 2. Primerpaares für das Gen ERα

<i>ERα</i>	2. Primerpaar	
	Primer Forward 1	Primer Reverse
Anzahl der CpGs	1	2
Designsequenz	5'-TAAGGGAAYGAGTTGGAGTTT-3'	5'-CRCCCTCRAAATAATTATACAC-3'
Anzahl der CpGs	0	1
Länge	21 bp	22 bp
T <sub>m</sub> OligoCalc	55,4 °C	56,4 °C
T <sub>m</sub> berechnet	58,0 °C	60,0 °C
T's Nähe 3'-Ende	2	0
Sekundärstruktur		
Heterodimer-Bildung	4 bp	
Amplikonlänge	118 bp mit 6 CpGs	
Schmelzprofil		
Amplikon	<p>Amplikon methyliert</p> <p>Amplikon unmethyliert</p>	
	Primer Forward 2	
	5'-AGGGAACGAGTTGGAGTTT-3'	
Anzahl der CpGs	1	
Länge	21 bp	
T <sub>m</sub> OligoCalc	57,5 °C	
T <sub>m</sub> berechnet	60,0 °C	
Ts Nähe 3'-Ende	2	
Sekundärstruktur		

Häufig kommt es in der Praxis zur Bildung eines PCR-Bias [112]. Bei einem Bias wird ein DNA-Templat bevorzugt amplifiziert [9]. In manchen Fällen ist ein PCR-Bias durchaus erwünscht. Wenn die Proben einen niedrigen Methylierungsgrad aufweisen, ist ein Bias in Richtung des methylierten DNA-Strangs von Vorteil. Andererseits ist ein Bias in Richtung des unmethylierten Strangs erwünscht, wenn die Proben hoch methyliert sind. Die wesentlichen Punkte für das Vermeiden eines Bias (vgl. Kapitel 3.3) werden in der Folge genauer besprochen.

Die wichtigsten Eigenschaften für die Auswahl eines von der Software vorgeschlagenen Primerpaares sind die Anzahl und die Lage der **CpGs** im Forward- und Reverse Primer. Wie bereits in Kapitel 4.6 erwähnt, wird ein CpG im Forward Primer als ein „Y“ und im Reverse Primer als ein „R“ hervorgehoben, vgl. *Tabelle 14*. Je nachdem, ob ein CpG aktiviert bzw. inaktiviert werden soll, werden „Y“ und „R“ durch die entsprechenden Basen ersetzt. Im Falle des Forward Primer bei ER $\alpha$ P2 wurde das in der Mitte der Primersequenz vorkommende CpG ausgeschaltet, da bei Aktivierung dieses CpG Sekundärstrukturen ausgebildet wurden, siehe *Tabelle 14*, Primer Forward 2. Zur Inaktivierung des CpG im Forward Primer wurde anstelle von „Y“ ein „T“ eingesetzt. Für die Aktivierung würde im Forward Primer „Y“ durch ein „C“ ersetzt werden. Im Reverse Primer befanden sich 2 CpGs. Da der Reverse Primer vorzugsweise nur 1 CpG enthalten sollte, wurde 1 CpG ausgeschaltet. Nach Wojdacz et al. [9, 112] sollen sich die CpGs generell in der Nähe des 5'-Endes bzw. in der Mitte des Primers befinden. Deshalb wurde das CpG am 5'-Ende aktiviert, indem „R“ durch ein „G“ ersetzt wurde, wobei „R“ in der Mitte durch ein „A“ ausgetauscht und somit inaktiviert wurde.

Die **Schmelztemperatur** ( $T_m$ ) des Forward- und Reverse Primer ist für die Wahl der Annealingtemperatur  $T_a$  besonders von Bedeutung. Die Schmelztemperatur der beiden Primer wurde einerseits über den Internetkalkulator OLIGOCALC [124], als auch über eine Formel [102] berechnet (Formel siehe Kapitel 4.6). Die mit OLIGOCALC ermittelten  $T_m$  unterscheiden sich zum Teil stark von den mittels der Formel berechneten Werten. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass die mit OLIGOCALC berechneten Temperaturen besser mit den in der Praxis beobachteten Werten übereinstimmen. Generell wurde darauf geachtet, dass sich die OLIGOCALC berechneten  $T_m$  der beiden Primer sich um maximal 1 – 2 °C unterscheiden. War die Differenz der beiden Schmelztemperaturen größer, wurden die beiden Primersequenzen soweit optimiert, bis sich die Temperaturdifferenz im Toleranzbereich befand. Dem Primer mit der höheren  $T_m$  wurde beispielsweise eine Base entfernt und dem Primer mit der niedrigen  $T_m$  hingegen eine zusätzliche Base hinzugefügt (im Forward Primer 1 und Forward Primer 2 wurde „TT“ ergänzt).

Um sicherzustellen, dass nur Bisulfit-konvertierte DNA während der PCR amplifiziert wird, wurde darauf geachtet, dass am bzw. in der Nähe des 3'-Ende der Primer, vor allem beim Forward Primer, eine oder mehrere **Thymin**-Basen vorhanden waren. Vor der Bisulfit-Behandlung handelt es sich bei der Thymin-Base um ein Cytosin, welches während der Bisulfit-Modifikation in Uracil umgewandelt wird und als Thymin-Base in der PCR repliziert wird. Weiters musste darauf geachtet werden, dass es sich bei der Cytosin-Base nicht um ein CpG-Cytosin handelte.

In der Folge musste noch darauf geachtet werden, dass der Forward- und Reverse Primer keine **Sekundärstrukturen** ausbildeten. Zur Ermittlung der zu erwartenden Faltungen der beiden Primer wurde der RNAFOLD WEBSERVER [125] verwendet (siehe *Tabelle 14*). Aus *Tabelle 14* ist zu entnehmen, dass der Reverse Primer durch Basenpaarungen Ringe ausbilden kann. Beim Forward Primer 1 ist eine Ringbildung sowie die Bildung einer Haarnadel gleich wahrscheinlich. Wird beim Forward Primer das CpG-Dinukleotid in der Mitte des Primers aktiviert (Forward Primer 2), kommt es zu intramolekularen Interaktionen und ausschließlich zur Bildung von Haarnadeln.

Der OLIGO ANALYZER [126] wurde verwendet, um die Wahrscheinlichkeit der Heterodimer-Bildung und der Bildung von Self-Dimeren zu ermitteln (vgl. Kapitel 4.6). Eine Heterodimer-Bildung von bis zu 6 Basenpaaren wurde toleriert.

Laut Wojdacz et al. [9] soll das Amplikon eine Länge von rund 100 Basenpaaren (bp) besitzen und 6 bis 8 CpG-Dinukleotide enthalten. Das Amplikon soll einerseits nicht zu lange sein, um die Komplexität des Schmelzprofils zu reduzieren, andererseits wird ein eindeutiges Schmelzprofil angestrebt, deshalb soll eine bestimmte Anzahl an CpG-Dinukleotide enthalten sein. In dieser Arbeit wurde ein Amplikon angestrebt, welches ca. 1 CpG pro 10 Basenpaare enthielt. Das mit dem Primerpaar ER $\alpha$ P2 erhaltene Amplikon besitzt eine Länge von 118 bp und enthält 6 CpGs.

Weiters war es wichtig, dass das Amplikon homogen schmilzt, um komplexe Schmelzprofile bei der Analyse zu vermeiden. Deshalb wurde das Schmelzverhalten mit der Internetsoftware uMELT [127] simuliert. Zusätzlich sollte sich die Schmelztemperatur des für den unmethylierten und den methylierten DNA-Strang erhaltenen Amplikons um ungefähr 5 bis 6 °C unterscheiden. Der Primer-Report der METHYL PRIMER EXPRESS SOFTWARE enthielt die Sequenz des mit dem Primerpaar ER $\alpha$ P2 erhaltenen Amplikons.

Vor der Bisulfit-Konvertierung lautete die Sequenz wie folgt:

„AGGGAA**Y**GAGTTGGAGTTTTTGAAT**Y**GTT**Y**GTAGTTTAAGATTTTTTTGGAG**Y**GGT  
TTTTGGG**Y**GAGGTGTATTTGGATAGTAGTAAGTT**Y**GT**Y**GTGTATAATTATTT**Y**GAG  
GG**Y**G“

Die „Y“ kennzeichneten die 9 CpGs, wobei 3 CpGs im Forward- und Reverse Primer enthalten sind. Nach der Bisulfit-Modifizierung wird aus einem unmethylierten Cytosin ein Uracil, welches als Thymin repliziert wird. Das methylierte Cytosin verändert sich durch die Bisulfit-Behandlung nicht weiter, weshalb das Cytosin des methylierten Strangs als Cytosin verbleibt. Um nun das Schmelzprofil der beiden PCR-Produkte zu simulieren, mussten die CpGs des Amplikons für den 100 % methylierten, Bisulfit-konvertierten Strang von „Y“ auf „C“ umgeschrieben werden. Für den 0 % methylierten Bisulfit-konvertierten Strang wurde das „Y“ durch ein „T“ ausgetauscht. Mit dem Tool uMELT [127] wurden die in *Tabelle 14* dargestellten Schmelzprofile erhalten. Anhand dieser beiden Schmelzprofile kann man erkennen, dass die beiden Amplifikationsprodukte sehr homogen schmelzen, was für den Erfolg der MS-HRM Analyse unbedingt notwendig ist. Weiters konnte aus dieser Darstellung die Schmelztemperatur des methylierten und unmethylierten Amplikons abgelesen werden. Das unmethylierte Amplikon schmolz bei ungefähr 79 °C, das methylierte Amplikon hingegen bei ca. 82 °C. Generell sollten sich die Schmelztemperaturen der beiden Stränge um 5 bis 6 °C unterscheiden, bei diesem Primer reichte allerdings eine Differenz von 3 °C aus, um zwischen methylierten und unmethylierten Strang zu unterscheiden.

Für das Gen *ER $\alpha$*  wurde vor dem 2. Primerpaar das Primerpaar *ER $\alpha$ P1* entworfen und getestet. Für den Primerentwurf wurde die NCBI-Referenzsequenz AB685814.1 verwendet. Das mit dem Primerpaar *ER $\alpha$ P1* erhaltene Amplikon beginnt am Ende des Exon 5 und reicht bis zum Beginn des Exon 6. Eine Übersicht zu diesem Primerpaar ist der *Tabelle 15* zu entnehmen:

**Tabelle 15: Übersicht über das Primerpaar *ER $\alpha$ P1* für das Gen *ER $\alpha$***

Gen	Primer-paar	Primersequenz	CpGs / Primer	T <sub>m</sub> OligoCalc [°C]	Länge des Amplikons	CpGs Amplikon
<i>ER<math>\alpha</math></i>	1.	Forward 5'-CGAGTTTAGCGGTTATATGGT-3'	2	57,5	99 bp	7
		Reverse 5'-CAATCTTTCTCTACCACCCTA-3'	0	57,5		

Beide Primerpaare wurden auf ihre Anwendbarkeit in der MS-HRM Analyse getestet. Hierzu wurden DNA-Standards mit unterschiedlichem Methylierungsgrad eingesetzt (0 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 % und 100 % methyliert). Die verwendete methylierte und unmethylierte Standard-DNA wurde, wie alle DNA-Proben, Bisulfit-konvertiert und auf 5 ng/ $\mu$ l verdünnt. Genauere Informationen sind dem Kapitel 4.7.2, sowie dem Abschnitt 4.5.2 zu entnehmen. Die Herstellung des Master-Mix, sowie die Zusammensetzung des Reaktions-Mix sind in den Kapiteln 4.7.3 und 4.7.4 detailliert erläutert. Das Temperaturprotokoll aus *Tabelle 9* wurde für alle PCR-Läufe verwendet, wobei die Temperatur alle 2 Sekunden um 0,05 °C erhöht wurde. Häufig mussten die Parameter für die MS-HRM Analyse optimiert werden, um eine gute Amplifikation der DNA-Template zu erreichen, siehe Kapitel 5.2.

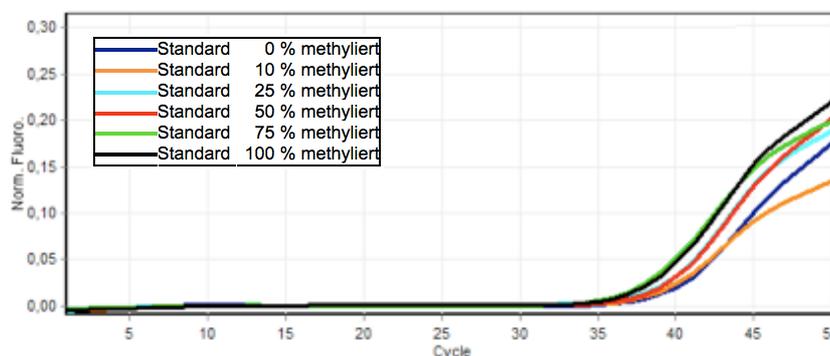
Die beiden Primerpaare für das Gen  $ER\alpha$  wurden in einer Konzentration von 250 nmol/l eingesetzt, die zugesetzte  $MgCl_2$ -Konzentration betrug 2 mmol/l. Einzig die Annealingtemperatur  $T_a$  war bei  $ER\alpha P1$  und  $ER\alpha P2$  unterschiedlich, vgl. *Tabelle 16*.

**Tabelle 16: Zusammenfassung der Bedingungen der MS-HRM Methoden für das Gen  $ER\alpha$**

Primerpaar	Primer-Konzentration	Annealingtemperatur	$MgCl_2$ -Zusatz
	[nmol/l]	$T_a$ [°C]	[mmol/l]
$ER\alpha P1$	250	55, 51	2
$ER\alpha P2$	250	53	2

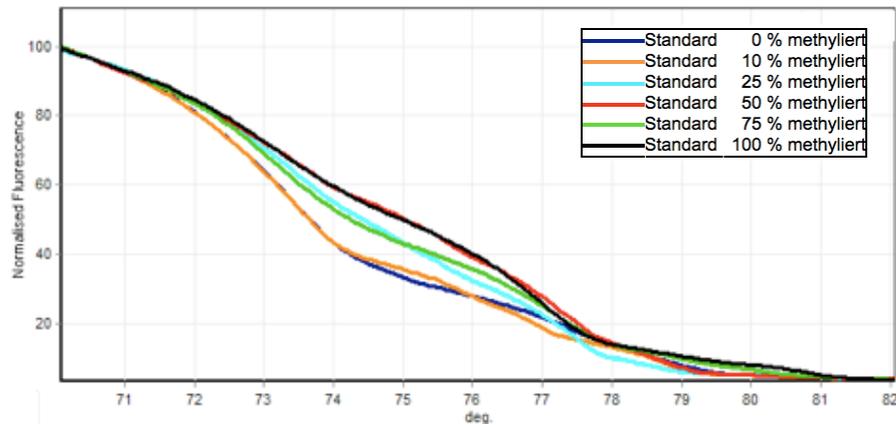
### 5.1.1.1 Ergebnisse der MS-HRM Analyse für $ER\alpha$

Das Primerpaar  $ER\alpha P1$  führte zu einer schlechten Amplifikation der DNA-Template bei einer Annealingtemperatur  $T_a$  von 55 °C, siehe *Abbildung 40*.



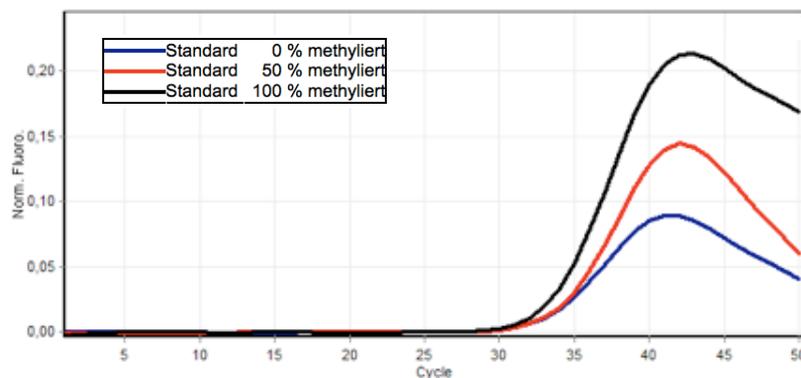
**Abbildung 40: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar  $ER\alpha P1$  ( $T_a = 55$  °C)**

Wie *Abbildung 41* zu entnehmen ist, unterscheiden sich die normalisierten Schmelzkurven, die für Amplikons von unterschiedlich methylierten Kontrollstandards erhalten wurden, nur geringfügig.



**Abbildung 41: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar ER $\alpha$ P1 ( $T_a = 55\text{ }^\circ\text{C}$ )**

Auf Grund der schlechten Amplifikation bei einer Annealingtemperatur  $T_a$  von  $55\text{ }^\circ\text{C}$  wurde der nächste Versuch bei einer  $T_a$  von  $51\text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt (nähere Details zur Optimierung der MS-HRM Bedingungen siehe Abschnitt 5.2). Die Amplifikationskurven sind in *Abbildung 42* dargestellt.



**Abbildung 42: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar ER $\alpha$ P1 ( $T_a = 51\text{ }^\circ\text{C}$ )**

Bei einer Annealingtemperatur  $T_a$  von  $51\text{ }^\circ\text{C}$  wiesen die Amplifikationskurven einen seltsamen Kurvenverlauf auf. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde ein 2. Primerpaar für das Gen ER $\alpha$  entworfen und getestet. Das Primerpaar ER $\alpha$ P2 führte bei einer  $T_a$  von  $53\text{ }^\circ\text{C}$  zu einer guten Amplifikation, vgl. *Abbildung 43*.

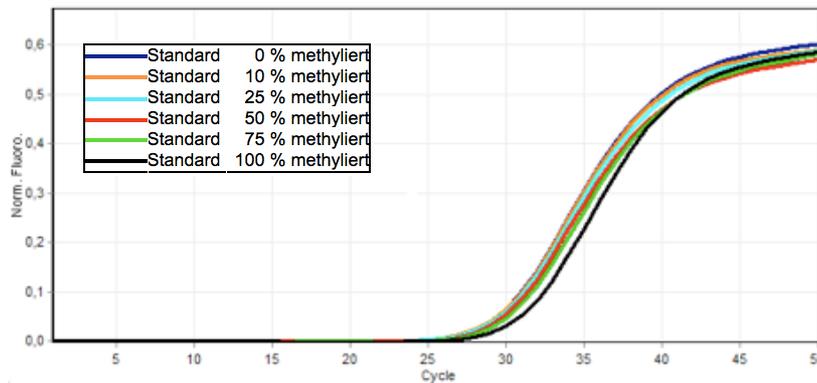


Abbildung 43: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar ER $\alpha$ P2 ( $T_a = 53\text{ }^\circ\text{C}$ )

Abbildung 44 zeigt, dass sich die Amplikons, die für niedrig und hoch methylierte Kontrollstandards erhalten wurden, im Schmelzverhalten unterscheiden. Es ist ersichtlich, dass ein Bias in Richtung der unmethylierten DNA vorlag. Das Primerpaar ER $\alpha$ P2 wurde ohne weitere Optimierung verwendet.

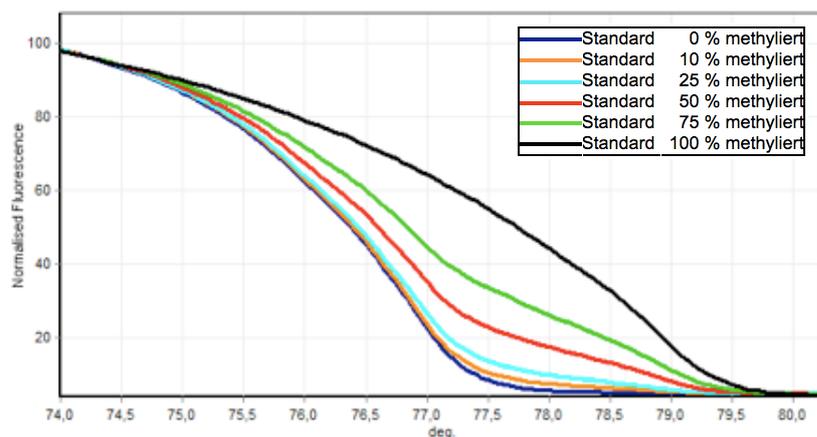


Abbildung 44: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar ER $\alpha$ P2 ( $T_a = 53\text{ }^\circ\text{C}$ )

### 5.1.2 Primer-Design für das Gen ER $\beta$

Für das Gen ER $\beta$  wurden zwei Primer entworfen. Für das Design der beiden Primerpaare wurde die NCBI-Referenzsequenz DQ777076.1 herangezogen. Die beiden Primerpaare ER $\beta$ P1 und ER $\beta$ P2 waren spezifisch für einen Abschnitt im Exon 6. Tabelle 17 gibt eine Übersicht über die beiden entworfenen Primerpaare ER $\beta$ P1 und ER $\beta$ P2.

**Tabelle 17: Übersicht über die Primerpaare für das Gen ER $\beta$** 

Gen	Primer-paar	Primersequenz	CpGs / Primer	T <sub>m</sub> OligoCalc [°C]	Länge des Amplikons	CpGs Amplikon
<b>ER<math>\beta</math></b>	1.	Forward 5'-GAGAAGTGTGGCGAGTAGTT-3'	2	61,2	150 bp	8
		Reverse 5'-CACATAAAACGACTCAACCTCCA-3'	1	60,9		
	2.	Forward 5'-GAGAAGTGTGGTGAGTAGTT-3'	0	57,5	150 bp	8
		Reverse 5'-CACATAAAACAAGTCAACCTCCA-3'	0	59,2		

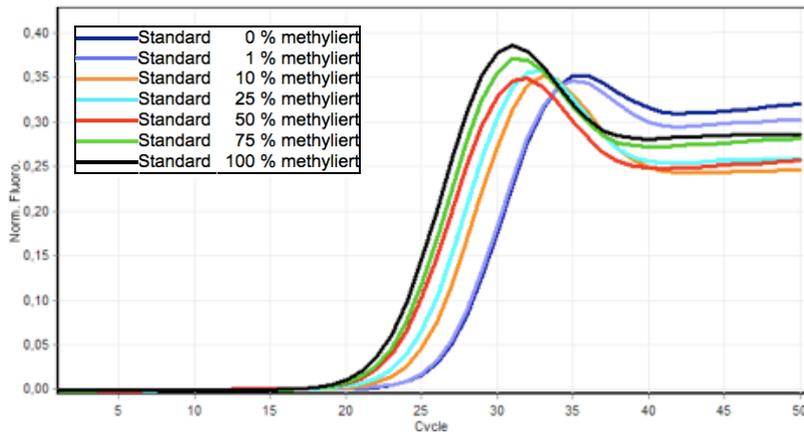
Der Unterschied zwischen den beiden Primerpaaren ist, dass im Primerpaar 2 sowohl im Forward-, als auch im Reverse Primer die CpG-Dinukleotide inaktiviert wurden.

Auch für diese Primerpaare wurde das in *Tabelle 9* angegebene Temperaturprotokoll verwendet. Beim Primerpaar ER $\beta$ P1 führte eine Temperaturoptimierung zwar zu einer Verbesserung der Amplifikation, jedoch wurden die hoch methylierten Kontrollstandards besser amplifiziert als die niedrig methylierten DNA-Standards. Deshalb wurde ein 2. Primerpaar (ER $\beta$ P2) entwickelt und getestet. Die Bedingungen der Optimierungsversuche, welche mit den beiden Primerpaaren durchgeführt wurden, sind in *Tabelle 18* zusammengefasst.

**Tabelle 18: Zusammenfassung der Bedingungen der MS-HRM Methoden für das Gen ER $\beta$** 

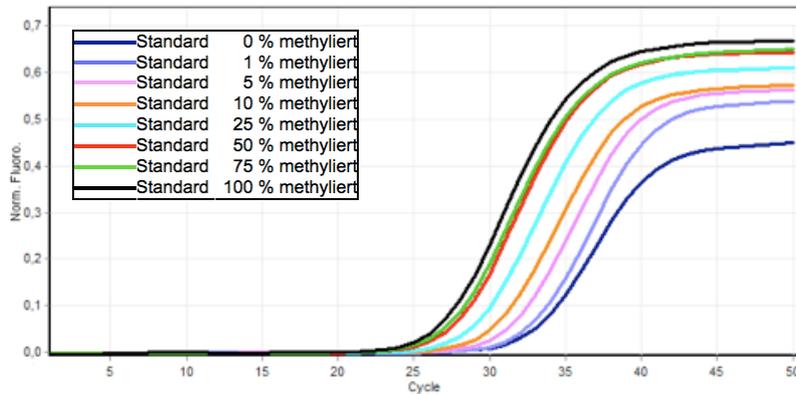
Primerpaar	Primer-Konzentration	Annealingtemperatur	MgCl <sub>2</sub> -Zusatz
	[nmol/l]	T <sub>a</sub> [°C]	[mmol/l]
<b>ER<math>\beta</math>P1</b>	250	46, 51, 49	2
<b>ER<math>\beta</math>P2</b>	250	49, 52	2

Wie in *Abbildung 45* gut zu erkennen ist, kommt es bei der Verwendung des Primerpaars ER $\beta$ P1 und einer T<sub>a</sub> von 46 °C zu einem seltsamen Kurvenverlauf, es wird kein richtiges Plateau erreicht.



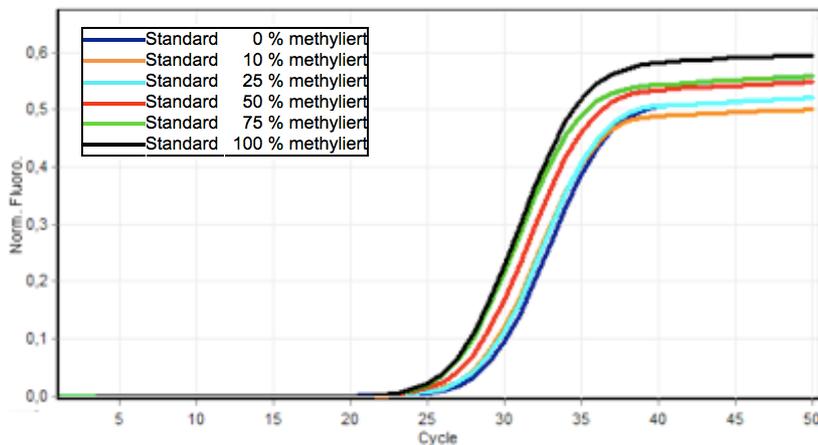
**Abbildung 45: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar ERβP1 ( $T_a = 46\text{ °C}$ )**

Eine Erhöhung der Annealingtemperatur auf 51 °C (siehe *Abbildung 46*) brachte eine Verbesserung der DNA-Amplifikation. Allerdings wurden hoch methylierte DNA-Standards deutlich besser amplifiziert als niedrig methylierte DNA-Standards.



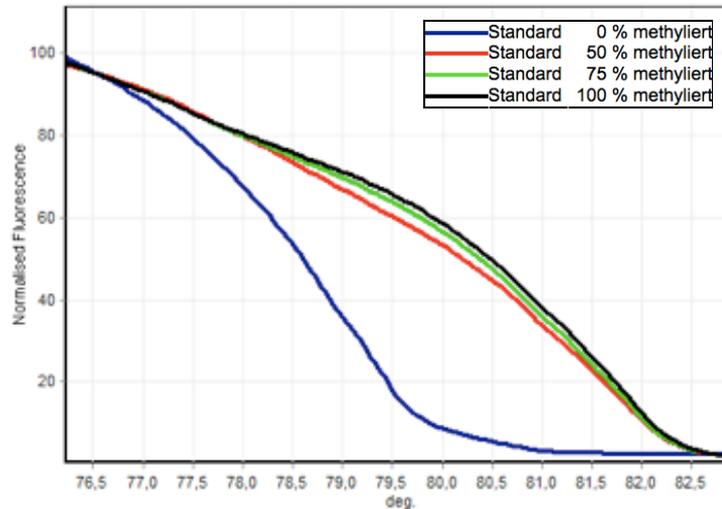
**Abbildung 46: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar ERβP1 ( $T_a = 51\text{ °C}$ )**

Eine Temperatursenkung auf 49 °C führte zu einer Steigerung der Amplifikationseffizienz der niedrig methylierten DNA (siehe *Abbildung 47*).



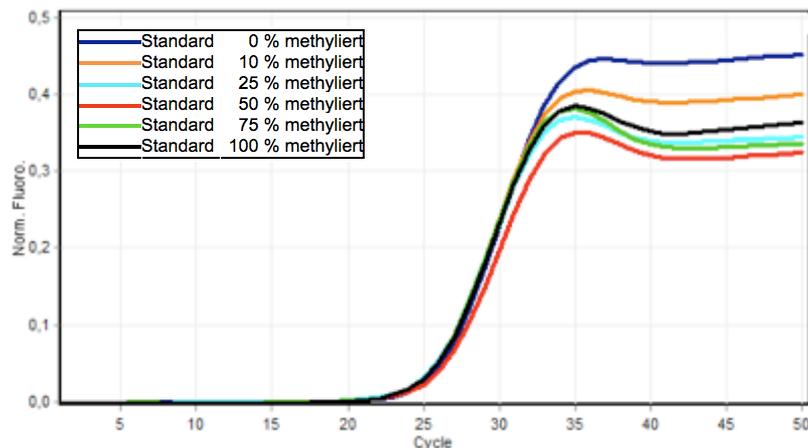
**Abbildung 47: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar ERβP1 ( $T_a = 49\text{ °C}$ )**

Die Schmelzkurven (*Abbildung 48*) zeigen einen Bias in Richtung des methylierten DNA-Strangs. Es wurde festgestellt, dass die in dieser Diplomarbeit untersuchte Region des *ER $\beta$*  in MCF-7 Zellen hoch methyliert ist. Deshalb kann bei Verwendung dieses Primerpaares der Methylierungsgrad nicht genau bestimmt werden.

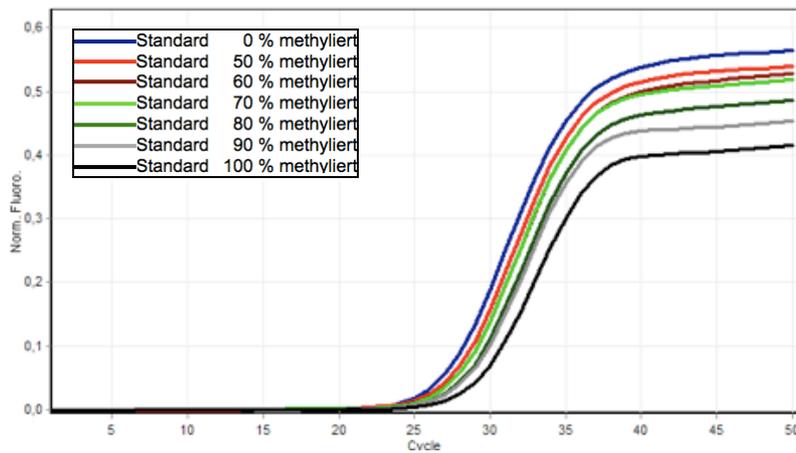


**Abbildung 48: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar ER $\beta$ P1 ( $T_a = 49\text{ °C}$ )**

Aus diesem Grund wurde beschlossen, das Primerpaar ER $\beta$ P1 nicht weiter zu verwenden, sondern ein neues Primerpaar ER $\beta$ P2 zu entwerfen, welches daraufhin getestet wurde. Bei einer  $T_a$  von 49 °C zeigte der erste Testlauf mit dem Primerpaar ER $\beta$ P2 gegen Ende der PCR einen Abfall der Amplifikation (siehe *Abbildung 49*), weshalb ein weiterer PCR-Lauf bei 52 °C durchgeführt wurde (*Abbildung 50*).

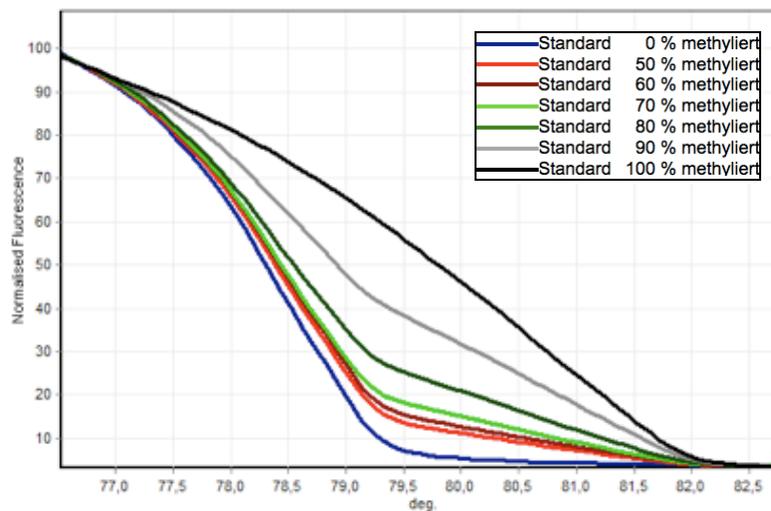


**Abbildung 49: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar ER $\beta$ P2 ( $T_a = 49\text{ °C}$ )**



**Abbildung 50: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar ERβP2 ( $T_a = 52\text{ °C}$ )**

Die niedrig methylierten und methylierten DNA-Standards wurden ähnlich gut amplifiziert. Außerdem war ein starker Bias in Richtung des unmethylierten Strangs ersichtlich (vgl. *Abbildung 51*). Deshalb konnte dieses Primerpaar für die Bestimmung des Methylierungsgrades von *ERβ* in MCF-7 Zellen (Abschnitt 5.3.1) und in Biopsieproben von Brustkrebspatientinnen (Abschnitt 5.4.2) verwendet werden, da *ERβ* in beiden Matrices sehr hoch methyliert war.



**Abbildung 51: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar ERβP2 ( $T_a = 52\text{ °C}$ )**

### 5.1.3 Primer-Design für das Gen MGMT

Das Primer-Design für das Gen *MGMT* stellte sich als herausfordernd heraus. Als erstes (MGMTP1) wurde zum Primer-Design die NCBI-Referenzsequenz NM\_002412.3 herangezogen. Mit diesem Primerpaar wurden die methylierten und niedrig methylierten DNA-Stränge ungleich amplifiziert. Um die Amplifikation zu verbessern, wurden die CpG-Dinukleotide inaktiviert und das Primerpaar MGMTP2 erhalten. Der gewünschte Erfolg blieb allerdings aus, weshalb ein neues Primerpaar MGMTP3 mit inaktivierten CpGs entworfen wurde. Hierbei wurde die Referenzsequenz AK293593.1 verwendet. Es wurde nur nach Primersequenzen gesucht, die keine CpGs enthielten.

Die beiden Primerpaare MGMTP1 und MGMTP2 waren spezifisch für einen Abschnitt im Exon 5. Das Primerpaar MGMTP3 war für einen Abschnitt im Exon 4 spezifisch. Eine Übersicht der drei entworfenen Primerpaare ist der *Tabelle 19* zu entnehmen.

**Tabelle 19: Übersicht über die Primerpaare für das Gen MGMT**

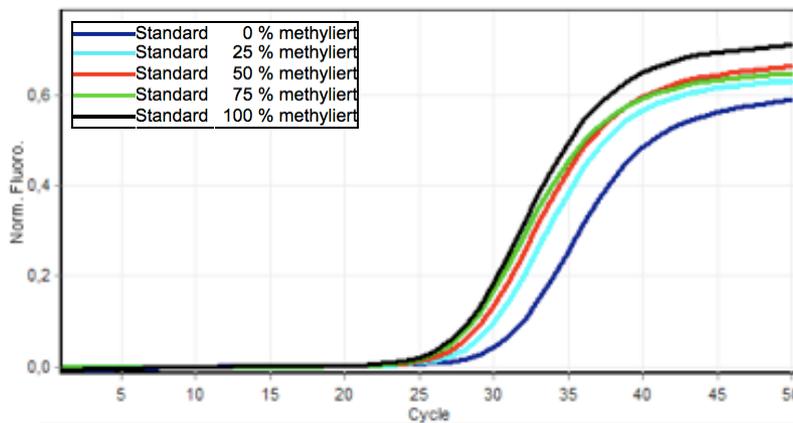
Gen	Primer-paar	Primersequenz	CpGs / Primer	T <sub>m</sub> OligoCalc [°C]	Länge des Amplikons	CpGs Amplikon
<b>MGMT</b>	1.	Forward 5'-ATGGATGTTTGAGCGATATATATGT -3'	1	59,2	106 bp	4
		Reverse 5'-CAAACACGCTTATTCCCAAAC-3'	1	58,4		
	2.	Forward 5'-ATGGATGTTTGAGTGATATATATGT -3'	0	57,6	106 bp	4
		Reverse 5'-CAAACACACTTATTCCCAAAC-3'	0	56,4		
	3.	Forward 5'- ATAGGTGTTATGGAAGTTGTTGAAGGT -3'	0	63,7	126 bp	4
		Reverse 5'- AAATTACCTCTCATTACTCCTCCCA -3'	0	62,5		

Das Temperaturprotokoll aus *Tabelle 9* wurde für alle *MGMT*-Primerpaare verwendet. Die drei Primerpaare wurden unter den in *Tabelle 20* angegebenen Bedingungen getestet.

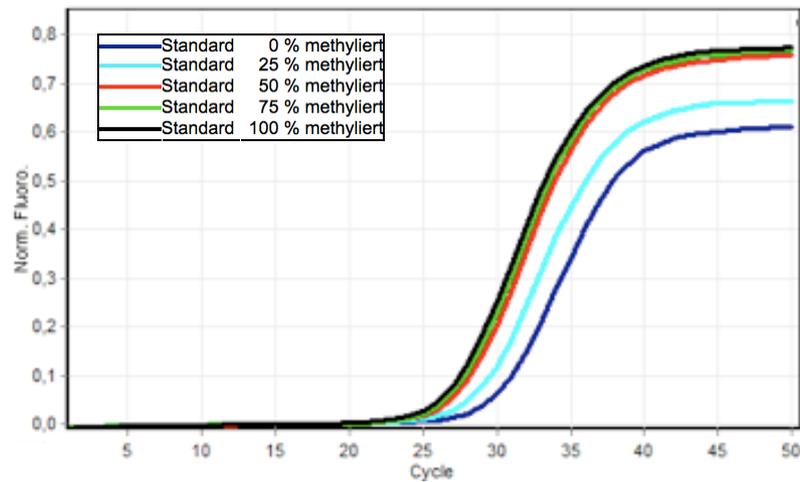
**Tabelle 20: Zusammenfassung der Bedingungen der MS-HRM Methoden für das Gen *MGMT***

Primerpaar	Primer-Konzentration [nmol/l]	Annealingtemperatur $T_a$ [°C]	MgCl <sub>2</sub> -Zusatz [mmol/l]
<b>MGMTP1</b>	250	49, 46	2
<b>MGMTP2</b>	250	49, 51	2
<b>MGMTP3</b>	250	49, 55	2

Das erste entworfene Primerpaar für das *MGMT*-Gen war das Primerpaar MGMP1. Es zeigte sich bei einer  $T_a$  von 49 °C ein deutlicher Unterschied in der Amplifikationseffizienz der methylierten und niedrig methylierten DNA-Standards (vgl. *Abbildung 52*). Eine Temperatursenkung auf  $T_a = 46$  °C führte zu keiner gravierenden Verbesserung der Amplifikation der niedrig methylierten Standards (siehe *Abbildung 53*).

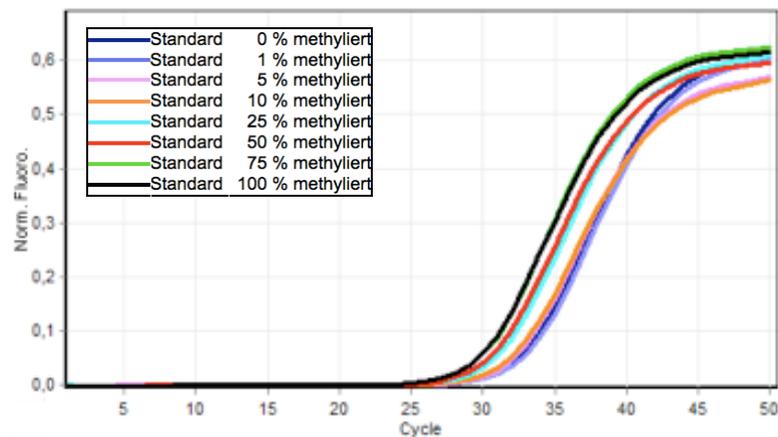


**Abbildung 52: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar MGMP1  
( $T_a = 49$  °C)**



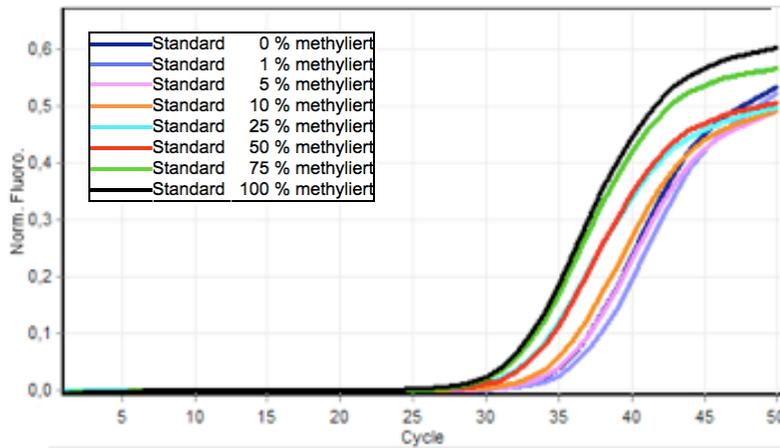
**Abbildung 53: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar MGMP1**  
( $T_a = 46 \text{ }^\circ\text{C}$ )

Daraufhin wurde durch Inaktivierung der im Forward- und Reverse Primer enthaltenen CpG-Dinukleotide (MGMP2) versucht, die DNA-Amplifikation zu verbessern. Bei einer Temperatur von  $T_a = 49 \text{ }^\circ\text{C}$  wurden die verschiedenen DNA-Standards wiederum ungleich amplifiziert (siehe *Abbildung 54*).



**Abbildung 54: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar MGMP2**  
( $T_a = 49 \text{ }^\circ\text{C}$ )

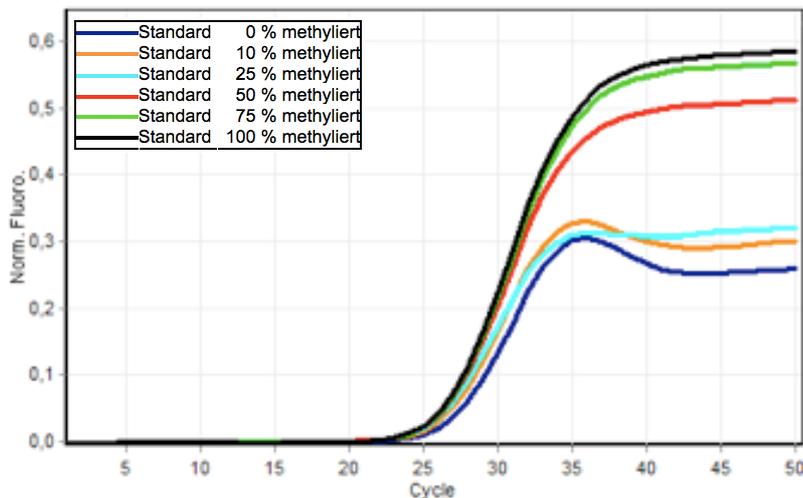
Die Temperaturerhöhung auf  $T_a = 51 \text{ }^\circ\text{C}$  führte zu einer Verschlechterung der Amplifikation der niedrig methylierten DNA-Standards (siehe *Abbildung 55*), woraufhin auf eine weitere Optimierung der Bedingungen für das Primerpaar MGMP2 verzichtet wurde.



**Abbildung 55: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar MGMP2**  
( $T_a = 51\text{ °C}$ )

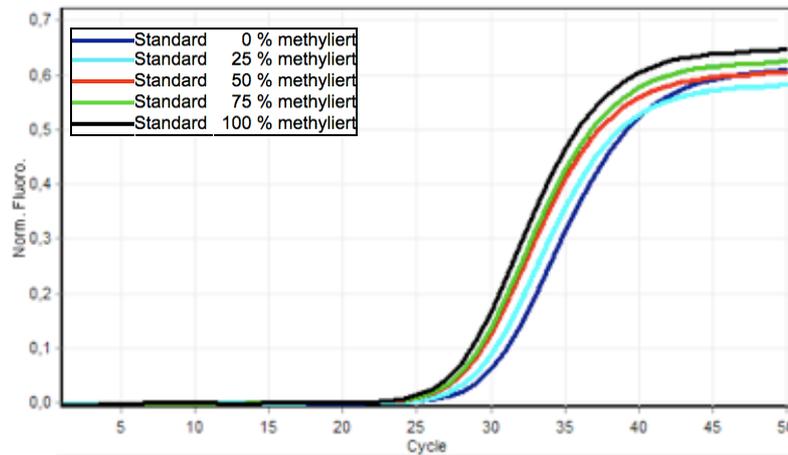
Beim Primer-Design wurde in der Folge drauf geachtet, dass sowohl im Forward-, als auch im Reverse Primer keine CpG-Dinukleotide enthalten sind.

Der erste PCR-Testlauf mit dem neuen Primerpaar MGMP3 bei  $T_a = 49\text{ °C}$  führte zu einer schlechten Amplifikation der niedrig methylierten DNA-Standards (vgl. *Abbildung 56*).



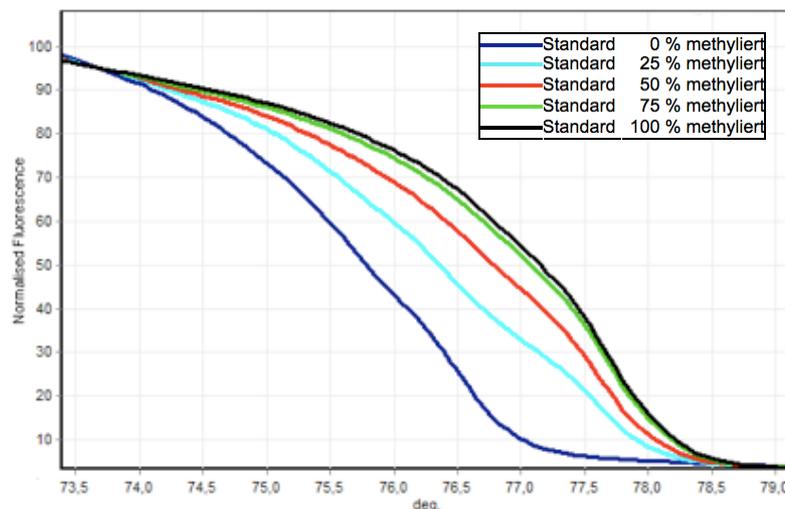
**Abbildung 56: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar MGMP3**  
( $T_a = 49\text{ °C}$ )

Eine Erhöhung der Annealingtemperatur um  $6\text{ °C}$  auf  $T_a = 55\text{ °C}$  führte zu den in der *Abbildung 57* dargestellten Amplifikationskurven.



**Abbildung 57: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar MGMP3  
( $T_a = 55\text{ °C}$ )**

Die in *Abbildung 58* dargestellten normalisierten Schmelzkurven lassen auf einen Bias in Richtung der methylierten Standards schließen. Allerdings wurde das Primerpaar MGMP3 nicht weiter optimiert und für die Bestimmung des Methylierungsgrades in Brustkrebszellen und Biopsieproben verwendet.



**Abbildung 58: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar MGMP3  
( $T_a = 55\text{ °C}$ )**

In der vorliegenden Diplomarbeit wurden einige Messungen mit dem Primerpaar MGMP3 durchgeführt, bis die geringe Robustheit dieser Methode festgestellt wurde. Daraufhin wurde die Verwendung dieser MS-HRM Methode für das *MGMT*-Gen eingestellt.

### 5.1.4 Primer-Design für das Gen CDH1

Für den Primerentwurf für das Gen *CDH1* wurde die NCBI-Referenzsequenz AK312551.1 verwendet. Das Amplikon dieses Primerpaares befindet sich zwischen dem 1. und 2. Exon. Weitere Informationen zum Primerpaar CDH1P1 sind der *Tabelle 21* zu entnehmen.

**Tabelle 21: Übersicht über das Primerpaar CDH1P1 für das Gen CDH1**

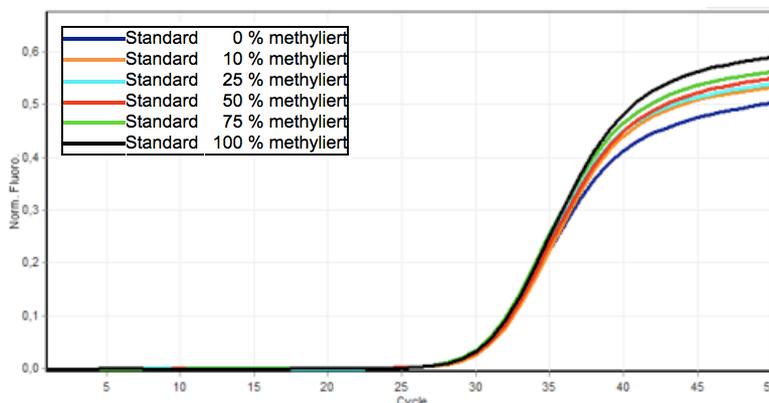
Gen	Primer-paar	Primersequenz	CpGs / Primer	T <sub>m</sub> OligoCalc [°C]	Länge des Amplikons	CpGs Amplikon
<i>CDH1</i>	Forward	5'-CGTTGTTGTTGTTGTTGTAGGT-3'	1	58,4	126 bp	7
	Reverse	5'-AACGCAACCTCTCTCCAAATAA-3'	1	58,4		

Für den ersten PCR-Testlauf mit dem Primerpaar CDH1P1 wurde das Temperaturprotokoll aus der *Tabelle 9* verwendet. Folgende Bedingungen wurden angewendet, um dieses Primerpaar zu optimieren, siehe *Tabelle 22*:

**Tabelle 22: Zusammenfassung der Bedingungen der MS-HRM Methode für das Gen CDH1**

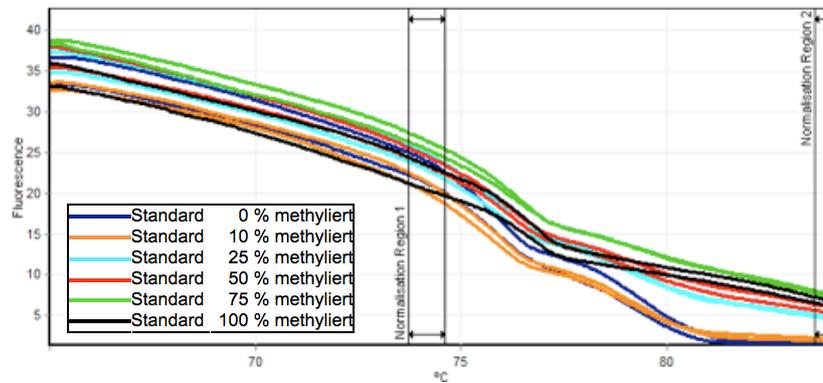
Primerpaar	Primer-Konzentration [nmol/l]	Annealingtemperatur T <sub>a</sub> [°C]	MgCl <sub>2</sub> -Zusatz [mmol/l]
<b>CDH1P1</b>	250	54, 56	2

Bei einer Annealingtemperatur T<sub>a</sub> von 54 °C wurden sowohl niedrig- als auch hoch methylierte DNA-Standards gut amplifiziert, siehe *Abbildung 59*.



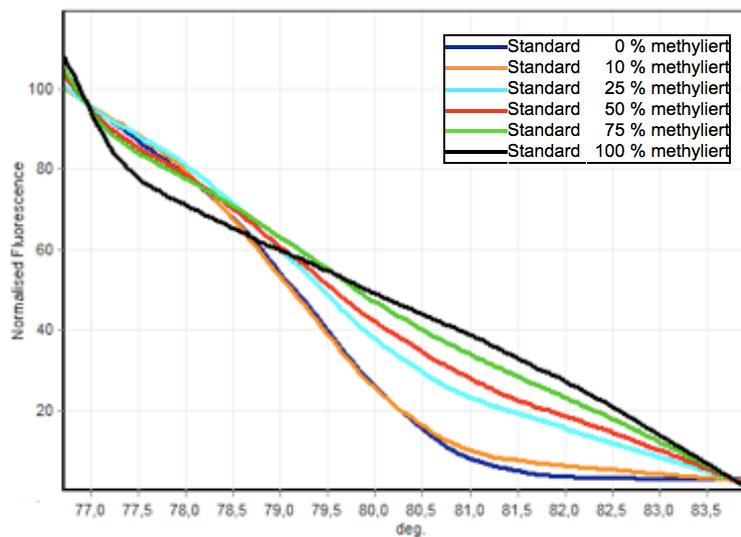
**Abbildung 59: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar CDH1P1 (T<sub>a</sub> = 54 °C)**

Die Schmelzkurven ließen jedoch darauf schließen, dass die DNA-Stränge bei einer Temperatur von 84 °C noch nicht vollständig aufgeschmolzen waren (siehe *Abbildung 60*).



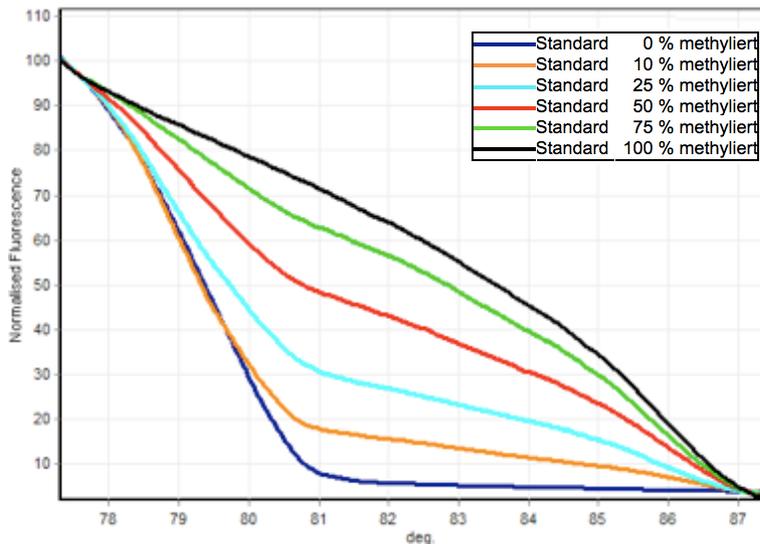
**Abbildung 60: Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar CDH1P1 ( $T_a = 54$  °C)**

Eine Normalisierung in diesem Bereich (*Abbildung 60*) ergab folgende normalisierte Schmelzkurven (siehe *Abbildung 61*):



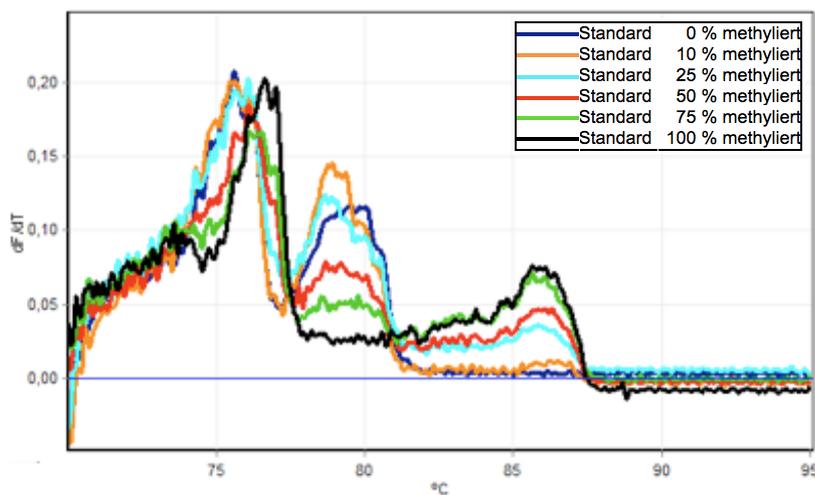
**Abbildung 61: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar CDH1P1 ( $T_a = 54$  °C)**

Aus diesem Grund wurde im nächsten Versuch die HRM-Analyse in einem Temperaturbereich von 70 – 95 °C durchgeführt (siehe *Abbildung 62*).



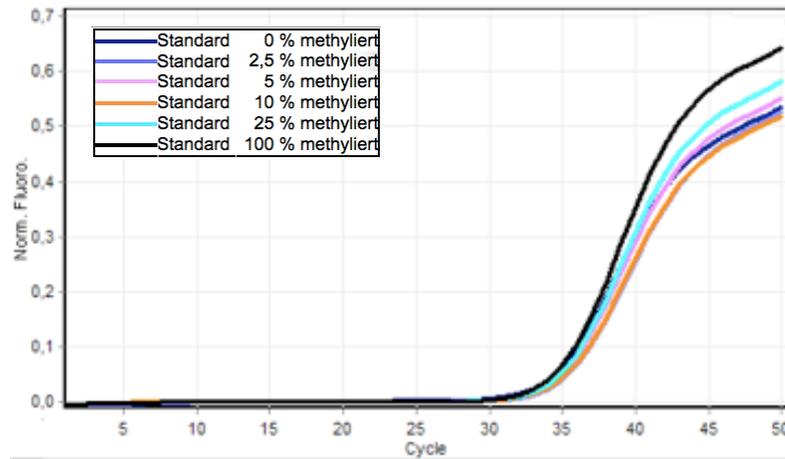
**Abbildung 62: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar CDH1P1**  
( $T_a = 54\text{ °C}$ , HRM-Analyse: 70 – 95 °C)

Anhand der Schmelzkurven, in der  $(-dF/dT)$ -Ansicht, ist zu erkennen, dass es mehrere Schmelzbereiche gibt (siehe *Abbildung 63*).



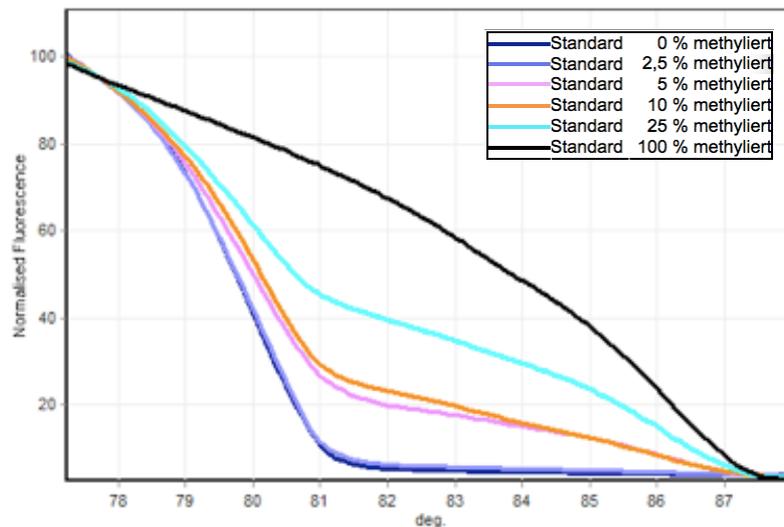
**Abbildung 63: Schmelzkurven (Ansicht  $-dF/dT$ ) mit dem Primerpaar CDH1P1**  
( $T_a = 54\text{ °C}$ , HRM-Analyse: 70 – 95 °C)

Daraufhin wurde die Annealingtemperatur  $T_a$  auf 56 °C erhöht, siehe *Abbildungen 64* und *65*. Diese Temperaturerhöhung führte dazu, dass die für die DNA-Standards erhaltenen Amplifikationskurven nach 50 Zyklen kein Plateau erreichten, vgl. *Abbildung 64*.



**Abbildung 64: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar CDH1P1 ( $T_a = 56\text{ °C}$ )**

Diese Temperaturoptimierung führte hinsichtlich der Schmelzbereiche zu keiner Verbesserung, bei einer  $T_a$  von  $56\text{ °C}$  waren ebenfalls mehrere Schmelzbereiche sichtbar. Wie aus den normalisierten Schmelzkurven zu entnehmen ist, gab es einen Bias in Richtung des methylierten Strangs (siehe *Abbildung 65*).



**Abbildung 65: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar CDH1P1 ( $T_a = 56\text{ °C}$ , HRM-Analyse:  $70\text{ – }95\text{ °C}$ )**

Dieses Primerpaar konnte für die Bestimmung des Methylierungsgrades von *CDH1* in MCF-7 Zellen und Biopsieproben von Brustkrebspatientinnen nicht verwendet werden, da *CDH1* sowohl bei den Brustkrebszellen als auch bei den Biopsieproben unmethyliert vorlag.

### 5.1.5 Primer für das Gen HIN-1

Für das Gen *HIN-1* wurde in der NCBI-DNA-Sequenzdatenbank keine Sequenz gefunden, es konnten daher keine Primer entworfen werden. Es wurde deshalb ein Primer aus der Literatur [131] verwendet. Das Primerpaar HIN-1P1 wurde ohne Veränderung übernommen und getestet. Da mit dem Primerpaar 1 niedrig methylierte Kontrollstandards deutlich schlechter amplifiziert wurden, wurden die CpG-Dinukleotide im Primerpaar 2 HIN-1P2 ausgeschaltet. Eine Übersicht über die beiden Primerpaare ist in *Tabelle 23* gegeben.

**Tabelle 23: Übersicht über die Primerpaare für das Gen HIN-1, nach Avraham et al. [131]**

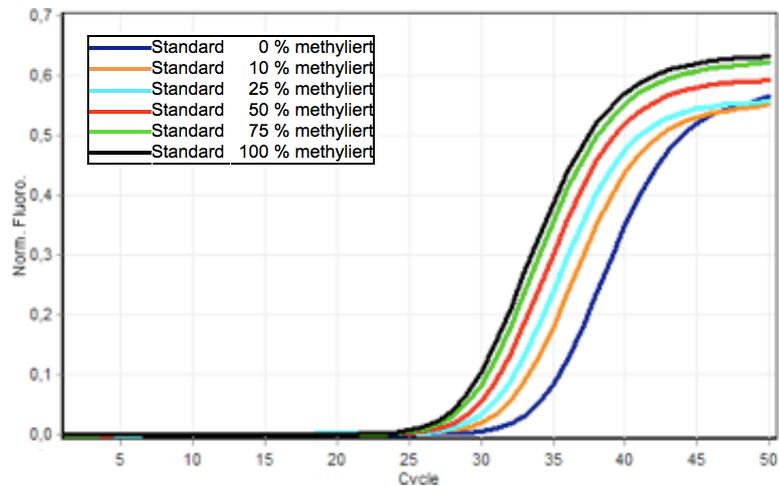
Gen	Primerpaar	Primersequenz	CpGs / Primer	T <sub>m</sub> OligoCalc [°C]	Länge des Amplikons	CpGs Amplikon
<i>HIN-1</i>	1.	Forward 5'-GCGAGGATCGGGTATAAGAAGTT-3'	2	62,9	keine Angabe	15
		Reverse 5'-CACCGAAACATACAAAACAAAACCA-3'	1	58,4		
	2.	Forward 5'-GTGAGGATTGGGTATAAGAAGTT-3'	0	59,2	keine Angabe	15
		Reverse 5'-CACCAAAACATACAAAACAAAACCA-3'	0	59,2		

Für beide HIN-1-Primerpaare wurde das Temperaturprotokoll aus der *Tabelle 9* verwendet. Folgende Bedingungen wurden angewandt, um die Amplifikation und die HRM-Analyse für die Primerpaare HIN-1P1 und HIN-1P2 zu optimieren, siehe *Tabelle 24*:

**Tabelle 24: Zusammenfassung der Bedingungen der MS-HRM Methoden für das Gen HIN-1**

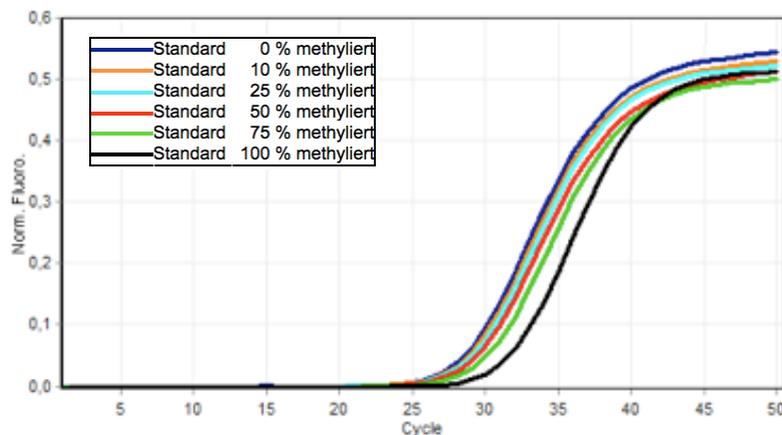
Primerpaar	Primer-Konzentration [nmol/l]	Annealingtemperatur T <sub>a</sub> [°C]	MgCl <sub>2</sub> -Zusatz [mmol/l]
HIN-1P1	250	55	2
HIN-1P2	250	53	2

Bei Verwendung des Primerpaars HIN-1P1 wurden die niedrig methylierten DNA-Standards schlechter amplifiziert als die hoch methylierten Kontrollstandards (siehe *Abbildung 66*).



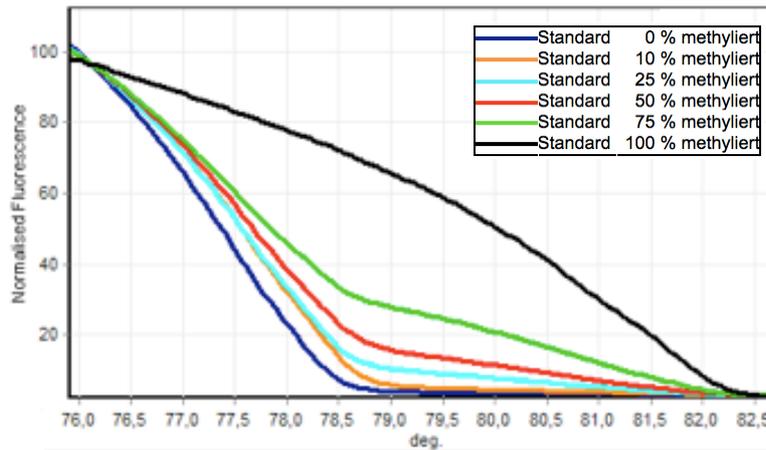
**Abbildung 66: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar HIN-1P1**  
( $T_a = 55 \text{ }^\circ\text{C}$ )

Daraufhin wurden die CpG-Dinukleotide im HIN-1P1 ausgeschaltet und das Primerpaar HIN-1P2 bei einer  $T_a$  von 53 °C getestet. Der methylierte DNA-Standard (100 % methyliert) wurde etwas schlechter amplifiziert, generell wurde jedoch eine Verbesserung der Amplifikation verzeichnet (siehe *Abbildung 67*).



**Abbildung 67: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar HIN-1P2**  
( $T_a = 53 \text{ }^\circ\text{C}$ )

Die in *Abbildung 68* dargestellten Schmelzkurven weisen jedoch einen starken Bias in Richtung der unmethylierten DNA auf.



**Abbildung 68: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar HIN-1P2 ( $T_a = 53 \text{ }^\circ\text{C}$ )**

Die DNA der Biopsieproben war bei diesem Gen zu 0 % methyliert. Dieses Primerpaar war daher ungeeignet, um den Methylierungsgrad in den Biopsieproben zu bestimmen und deshalb wurden keine weiteren Optimierungsversuche durchgeführt.

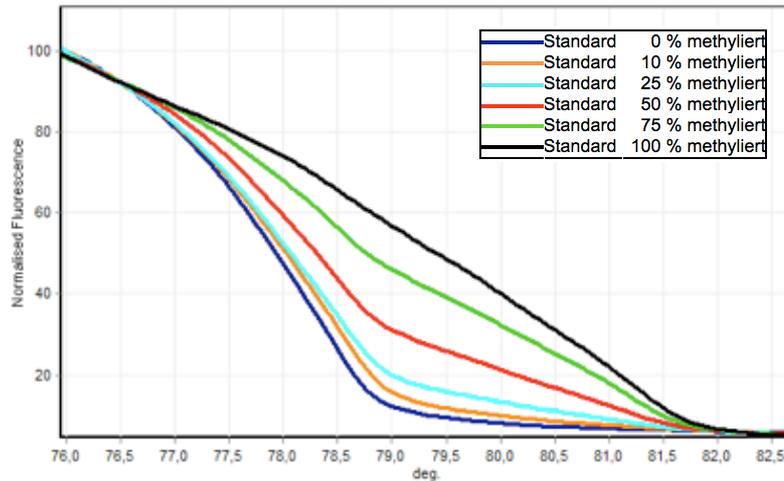
## 5.2 Optimierung der MS-HRM Parameter

Häufig müssen bestimmte MS-HRM Bedingungen optimiert werden, um eine gute Amplifikation des Templates zu erreichen (vgl. *Abbildung 49* und *Abbildung 50*). Hierbei werden die Annealingtemperatur  $T_a$  sowie die  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration variiert, um die MS-HRM Methode zu optimieren. Obwohl bei einigen Genen ein Bias durchaus erwünscht war, wurde bei Vorliegen eines starken Bias versucht, diesen abzuschwächen. Zur Eliminierung eines starken Bias wurde im ersten Schritt die Annealingtemperatur verändert und in der Folge verschiedene  $\text{MgCl}_2$ -Konzentrationen getestet.

### 5.2.1 Optimierung der Annealingtemperatur

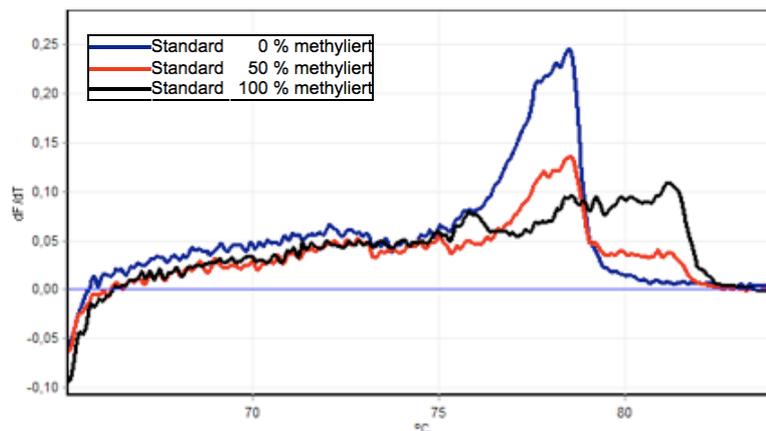
Die Auswirkungen von unterschiedlichen Annealingtemperaturen auf einen PCR-Bias werden am Beispiel des Primerpaares ER $\beta$ P2 gezeigt (vgl. Abschnitt 5.1.2).

Bei einer  $T_a$  von  $49 \text{ }^\circ\text{C}$  wiesen die für niedrig- und hoch methylierte DNA-Standards erhaltenen Schmelzkurven einen unterschiedlichen Kurvenverlauf auf (siehe *Abbildung 69*).



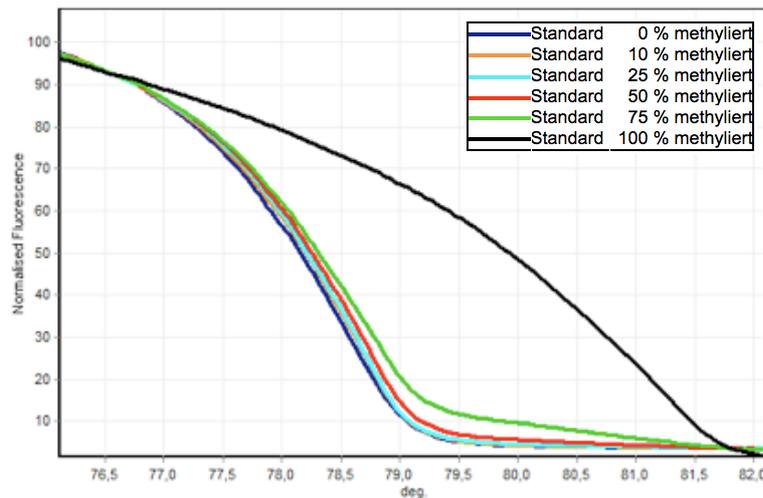
**Abbildung 69: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar ER $\beta$ P2 ( $T_a = 49 \text{ }^\circ\text{C}$ ), Zusatz an  $\text{MgCl}_2 = 2 \text{ mmol/l}$**

Weiters ist anhand der normalisierten Schmelzkurven (Abbildung 69) sowie der Schmelzkurven in der  $(-dF/dT)$ -Ansicht (Abbildung 70) ein Bias in Richtung des unmethylierten Strangs zu erkennen.

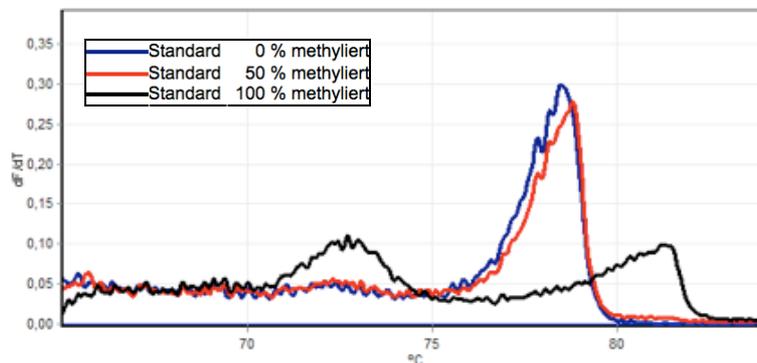


**Abbildung 70: Schmelzkurven (Ansicht  $-dF/dT$ ) mit dem Primerpaar ER $\beta$ P2 ( $T_a = 49 \text{ }^\circ\text{C}$ ); Zusatz an  $\text{MgCl}_2 = 2 \text{ mmol/l}$**

Eine Erhöhung der Annealingtemperatur auf  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  führte zu einem stärkeren Bias in Richtung des niedrig methylierten Strangs (siehe Abbildungen 71 und 72). Wie aus Abbildung 71 ersichtlich ist, kann unter diesen Bedingungen nicht mehr zwischen einem 0 %, 10 %, 25 %, sowie 50 % DNA-Standard unterschieden werden.

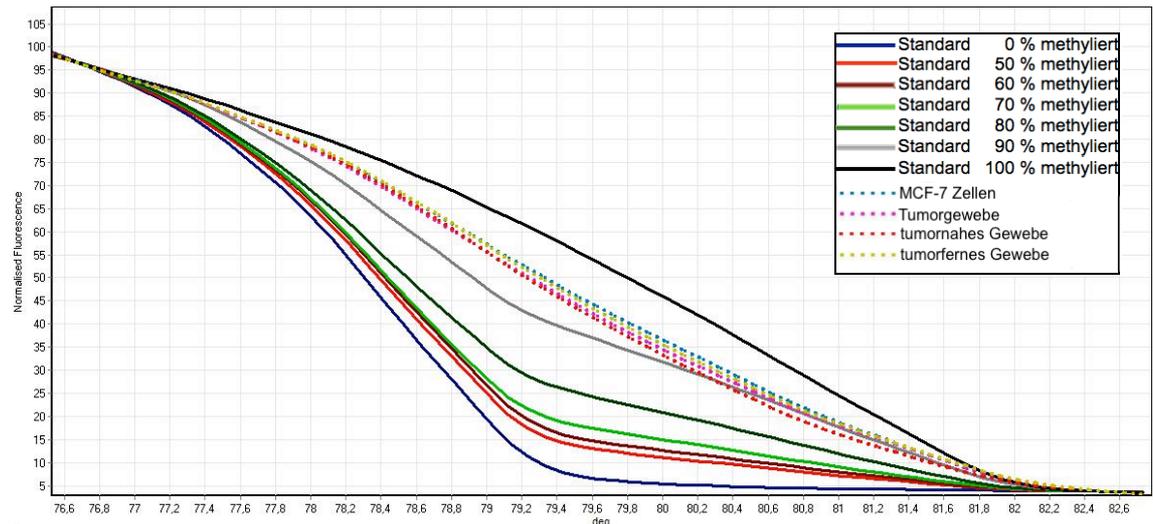


**Abbildung 71: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar ER $\beta$ P2 ( $T_a = 55\text{ }^\circ\text{C}$ ), Zusatz an  $\text{MgCl}_2 = 2\text{ mmol/l}$**

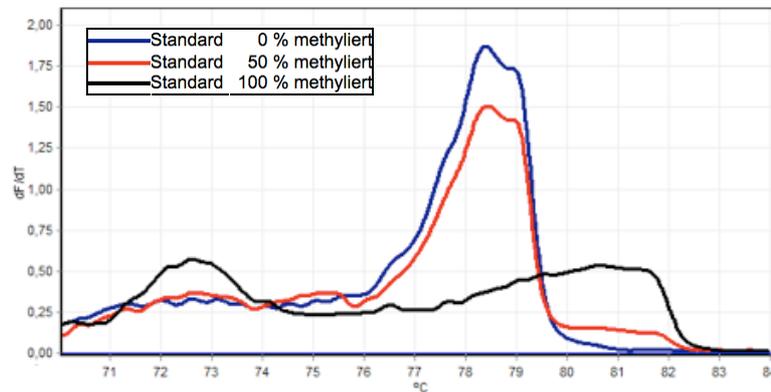


**Abbildung 72: Schmelzkurven (Ansicht  $-dF/dT$ ) mit dem Primerpaar ER $\beta$ P2 ( $T_a = 55\text{ }^\circ\text{C}$ ); Zusatz an  $\text{MgCl}_2 = 2\text{ mmol/l}$**

Um den Bias abzuschwächen, wurde die Temperatur auf  $52\text{ }^\circ\text{C}$  gesenkt, wobei der Bias etwas zurückging, wie die *Abbildungen 73* und *74* zeigen. Außerdem wurde bei einer Annealingtemperatur von  $52\text{ }^\circ\text{C}$ , im Vergleich zu einer  $T_a$  bei  $49\text{ }^\circ\text{C}$ , eine bessere PCR-Amplifikation erreicht (siehe *Abbildung 49* und *50*). Aus der Analyse einiger DNA-Extrakte der MCF-7 Zellen (vgl. *Abbildung 73*) wurde darauf geschlossen, dass die untersuchte Region des ER $\beta$  in MCF-7 Zellen einen eher hohen Methylierungsgrad aufweist. ER $\beta$  war in mehreren Biopsieproben ebenfalls hoch methyliert. Dieser hohe Methylierungsgrad war sowohl in Tumorgewebe, tumornahem und tumorfernem Gewebe zu finden (vgl. *Abbildung 73*). Da ER $\beta$  sowohl in MCF-7 Zellen, als auch in Biopsieproben der Brustkrebspatientinnen einen hohen Methylierungsgrad besitzt, ist der Bias in Richtung unmethylierte DNA durchaus erwünscht.



**Abbildung 73: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards, MCF-7 Zellen-DNA und Gewebeproben-DNA mit dem Primerpaar ER $\beta$ P2 ( $T_a = 52\text{ °C}$ ); Zusatz an  $\text{MgCl}_2 = 2\text{ mmol/l}$**

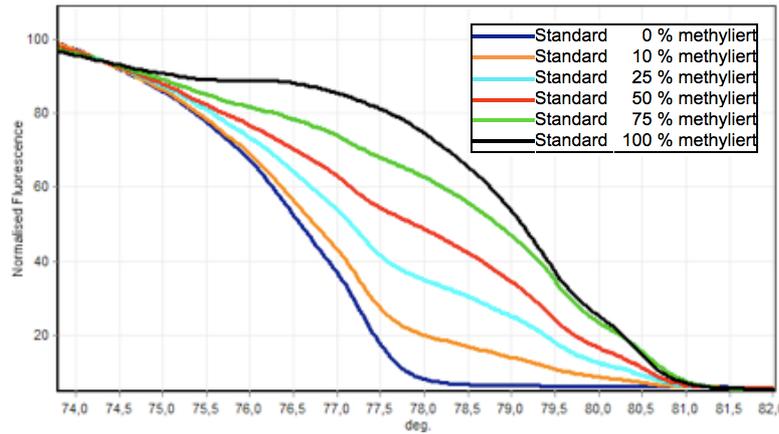


**Abbildung 74: Schmelzkurven (Ansicht  $-dF/dT$ ) mit dem Primerpaar ER $\beta$ P2 ( $T_a = 52\text{ °C}$ ); Zusatz an  $\text{MgCl}_2 = 2\text{ mmol/l}$**

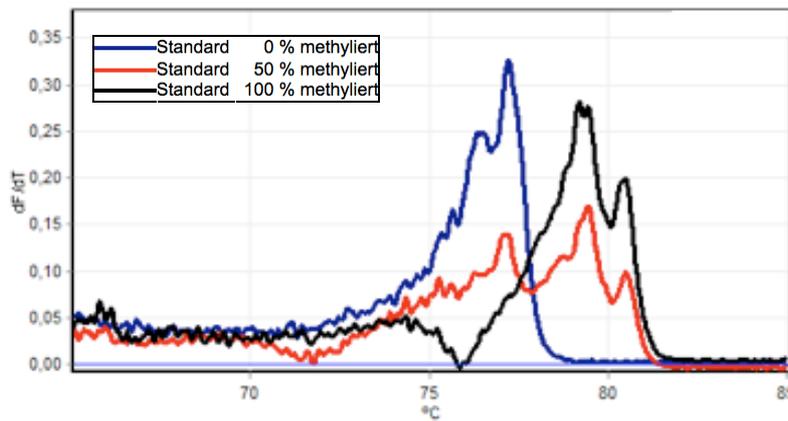
### 5.2.2 Optimierung der $\text{MgCl}_2$ -Konzentration

Eine Veränderung der  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration wirkt sich häufig nicht so deutlich aus wie beispielsweise eine Annealingtemperaturänderung. Die Auswirkung der  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration wird am Primerpaar *CDKN2A* gezeigt. Dieses Primerpaar wurde von B. Werner [132] entworfen.

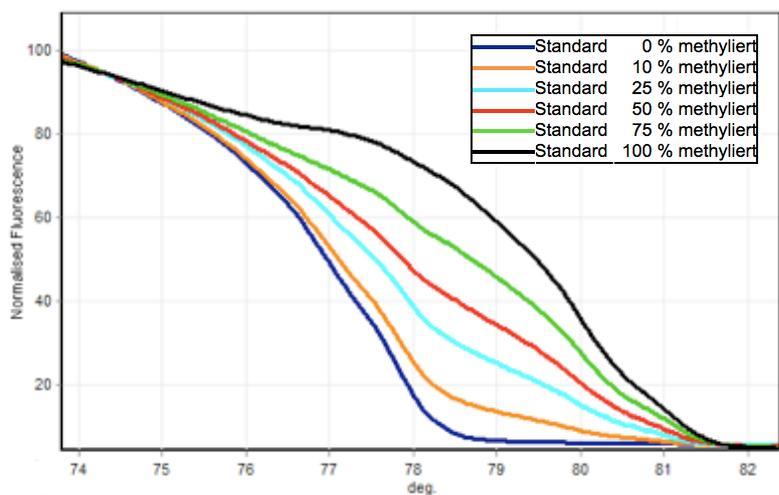
In den *Abbildungen 75 – 78* ist ersichtlich, dass bei einer Zugabe von  $1,5\text{ mmol/l}$   $\text{MgCl}_2$  zum HRM-Mix ein leichter Bias in Richtung des methylierten DNA-Standards zu sehen ist, wobei bei einer Zugabe von  $3\text{ mmol/l}$   $\text{MgCl}_2$  ein leichter Bias in die Richtung des niedrig methylierten Strangs festzustellen ist.



**Abbildung 75: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar CDKN2A ( $T_a = 51 \text{ }^\circ\text{C}$ ); Zusatz an  $\text{MgCl}_2 = 1,5 \text{ mmol/l}$**



**Abbildung 76: Schmelzkurven (Ansicht  $-dF/dT$ ) mit dem Primerpaar CDKN2A ( $T_a = 51 \text{ }^\circ\text{C}$ ); Zusatz an  $\text{MgCl}_2 = 1,5 \text{ mmol/l}$**



**Abbildung 77: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar CDKN2A ( $T_a = 51 \text{ }^\circ\text{C}$ ); Zusatz an  $\text{MgCl}_2 = 3 \text{ mmol/l}$**

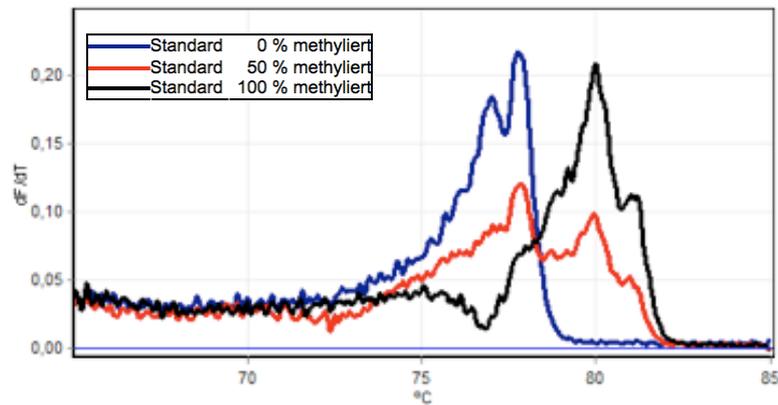


Abbildung 78: Schmelzkurven (Ansicht  $-dF/dT$ ) mit dem Primerpaar CDKN2A ( $T_a = 51$  °C);  
Zusatz an  $MgCl_2 = 3$  mmol/l

### 5.2.3 Optimierte MS-HRM Methoden

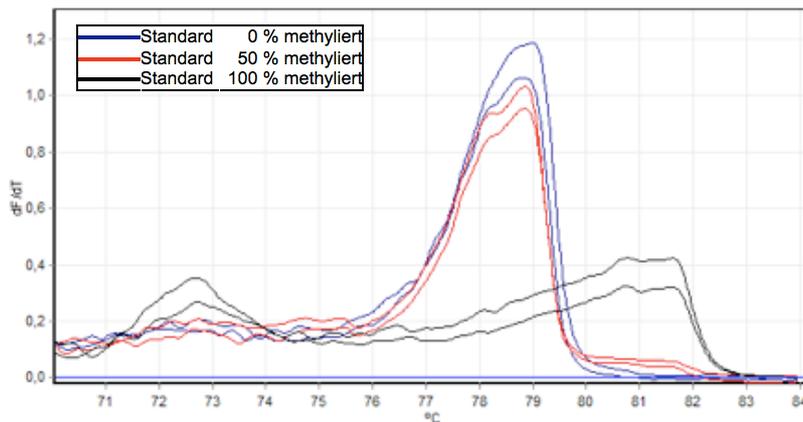
Eine Übersicht über die optimierten Bedingungen der entwickelten MS-HRM Methoden ist der *Tabelle 25* zu entnehmen.

*Tabelle 25: Zusammenfassung der optimierten Bedingungen der entwickelten MS-HRM Methoden*

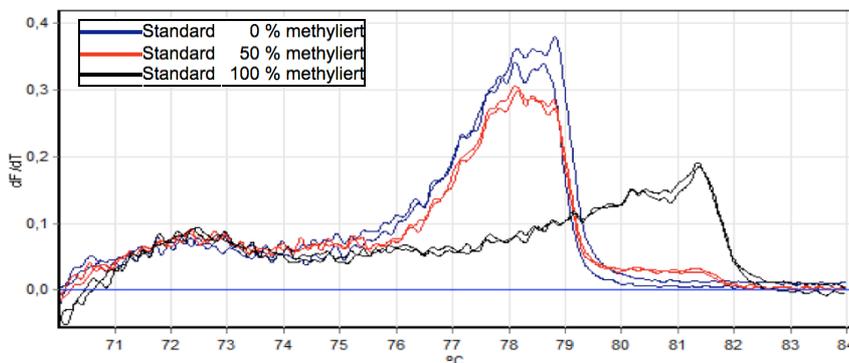
Primerpaar	Primer-Konzentration	Annealingtemperatur	MgCl <sub>2</sub> -Zusatz
	[nmol/l]	$T_a$ [°C]	[mmol/l]
ER $\alpha$ P2	250	53	2
ER $\beta$ P2	250	52	2
MGMP3	250	55	2

### 5.2.4 Optimierung des Temperaturprofils der MS-HRM Analyse

Gegen Ende dieser Diplomarbeit, im Rahmen einer Optimierung der MS-HRM Analyse, wurde das Temperaturprofil etwas abgeändert. Anstatt einer Temperaturerhöhung von 0,05 °C pro 2 Sekunden wurde die Temperatur um 0,1 °C pro 2 Sekunden erhöht. Die Optimierung der Temperaturerhöhung um 0,1 °C pro 2 Sekunden führte einerseits dazu, dass die Schmelzkurven einen glatteren Verlauf zeigten (*Abbildung 79*) und weniger „abgezackt“ erscheinen (*Abbildung 80*). Andererseits kann durch eine Erhöhung der Schritttemperatur viel Zeit eingespart werden, pro MS-HRM Lauf ungefähr 20 Minuten.



**Abbildung 79: Schmelzkurven (Ansicht  $-dF/dT$ ) mit dem Primerpaar ER $\beta$ P2 bei einer Temperaturerhöhung von 0,1 °C / 2 s**



**Abbildung 80: Schmelzkurven (Ansicht  $-dF/dT$ ) mit dem Primerpaar ER $\beta$ P2 bei einer Temperaturerhöhung von 0,05 °C / 2 s**

### 5.3 Bestimmung des DNA-Methylierungsgrades in MCF-7 Zellen

Für die Bestimmung des DNA-Methylierungsgrades von Brustkrebs-relevanten Genen in Brustkrebszellen wurden die optimierten MS-HRM Methoden verwendet (siehe *Tabelle 25* und *Tabelle 27*). Zur Überprüfung, ob lebensmittelrelevante Verbindungen den Methylierungsgrad von bestimmten Genen beeinflussen, wurden im Rahmen dieser Diplomarbeit verschiedene Inkubationsversuche mit MCF-7 Zellen durchgeführt (vgl. Kapitel 4.2). Die MCF-7 Zellen wurden mit den Substanzen EGCG, Hydralazin, (+)-Lariciresinol, (-)-Matairesinol und Quercetin inkubiert. Von allen Substanzen wurden Lösungen bestimmter Konzentration (100  $\mu\text{mol/l}$ , 50  $\mu\text{mol/l}$ , 25  $\mu\text{mol/l}$ , 10  $\mu\text{mol/l}$ , 5  $\mu\text{mol/l}$  und 1  $\mu\text{mol/l}$ ) hergestellt und die MCF-7 Zellen damit inkubiert. Da die Substanzen in DMSO gelöst wurden, wurde pro Inkubationsversuch eine Null-Probe mit DMSO durchgeführt.

Generell wurde die entsprechende Substanz alle 48 Stunden dem Medium zugesetzt. Eine Ausnahme bildete der Inkubationsversuch mit EGCG, bei dem zusätzlich Katalase, Superoxiddismutase (SOD), sowie  $Mg^{2+}$  zugegeben wurden. EGCG und die zugesetzten Stabilisatoren wurden alle 24 Stunden dem Medium zugegeben. Die Versuchsdauer bei diesem Inkubationsversuch lag bei 4 Tagen. Alle weiteren Inkubationsversuche fanden über eine Dauer von 9 Tagen statt. Die Versuche, bei denen die Zellen mit EGCG und SOD bzw. mit EGCG, SOD und Katalase inkubiert wurden, wurden 2 Mal durchgeführt.

Am Ende eines Inkubationsversuchs mit MCF-7 Zellen wurde die Zell-DNA extrahiert (Kapitel 4.3) und die DNA-Konzentration im Anschluss mit einem Spektralphotometer (Kapitel 4.4) bestimmt. Um den Methylierungsgrad mittels Schmelzkurvenanalyse bestimmen zu können, wurde die isolierte DNA Bisulfit-konvertiert (Kapitel 4.5). Zur Bestimmung des Methylierungsgrades wurden DNA-Kontrollstandards mit unterschiedlicher Methylierung aus einer vollkommen unmethylierten, sowie methylierten DNA hergestellt. Zur genauen Bestimmung des Methylierungsgrades in den Proben wurde eine Kalibrierfunktion erstellt (nähere Details siehe Kapitel 3.4.3). Die ausgewählten Gene wiesen in unbehandelten MCF-7 Zellen folgenden Methylierungsgrad auf, siehe *Tabelle 26*.

**Tabelle 26: Übersicht über den DNA-Methylierungsgrad (Mittelwert mit Standardabweichung) der untersuchten Gene in unbehandelten MCF-7 Zellen**

Gen	DNA-Methylierungsgrad unbehandelter MCF-7 Zellen [%] (Bestimmungen)	Standardabweichung [%]
<b><i>ER<math>\beta</math></i></b>	97 (n = 28)	3
<b><i>MGMT</i></b>	76 (n = 28)	18
<b><i>CDH1</i></b>	Kurvenverlauf $\hat{=}$ unmethylierten Standard	-
<b><i>ER<math>\alpha</math></i></b>	Kurvenverlauf $\sim$ unmethylierten Standard	-
<b><i>HIN-1</i></b>	Kurvenverlauf $\hat{=}$ 100 % methylierten Standard	-
<b><i>CDKN2A</i></b>	70 (n = 19)	7
<b><i>DAPK1</i></b>	99 (n = 8)	9
<b><i>RASSF1A</i></b>	99 (n = 12)	6

Das Gen *CDH1* war in den MCF-7 Zellen zu 0 % methyliert. Da erwartet wurde, dass die Substanzen, mit denen die MCF-7 Zellen inkubiert wurden, einen demethylierenden Effekt zeigen, wurden die erhaltenen DNA-Extrakte nicht mit der MS-HRM Methode für *CDH1* analysiert.

*ER $\alpha$*  war in den MCF-7 Zellen nur gering methyliert, woraufhin die extrahierte DNA nicht mit der MS-HRM Methode für das Gen *ER $\alpha$*  analysiert werden konnte.

Das Gen *HIN-1* lag in der DNA der Brustkrebszellen vollständig methyliert vor. Aus diesem Grund wurde die am Ende der Inkubationsversuche extrahierte DNA nicht mit der *HIN-1* Methode analysiert.

Die Gene *ER $\beta$*  und *MGMT* lagen in den Brustkrebszellen hypermethyliert vor. Aus diesem Grund wurde die am Ende der Inkubationsversuche aus den MCF-7 Zellen extrahierte DNA mittels den entsprechenden MS-HRM Methoden analysiert, um den Methylierungsgrad zu bestimmen.

Weiters wurde der Einfluss der Inkubation auf den Methylierungsgrad der Gene *CDKN2A*, *DAPK1* und *RASSF1A* untersucht. Die entsprechenden Methoden waren bereits vor Durchführung der Diplomarbeit entwickelt und optimiert worden. Die MS-HRM Methode für das Gen *CDKN2A* wurde von B. Werner [132], für das Gen *DAPK1* von E. Habla [133] und für das Gen *RASSF1A* von A. Raab [134] entwickelt. Die Bedingungen der bereits optimierten MS-HRM Methoden sind in *Tabelle 27* zusammengefasst.

**Tabelle 27: Zusammenfassung der bereits entwickelten MS-HRM Methoden**

Gen	Primer-Konzentration	Annealingtemperatur	MgCl <sub>2</sub> -Zusatz
	[nmol/l]	T <sub>a</sub> [°C]	[mmol/l]
<b><i>CDKN2A</i></b>	250	52	1,5
<b><i>DAPK1</i></b>	250	55	3
<b><i>RASSF1A</i></b>	250	56	2

*Tabelle 28* fasst die mit MCF-7 Zellen durchgeführten Inkubationsversuche und die Gene, deren Methylierungsgrad jeweils bestimmt wurde, zusammen.

**Tabelle 28: Übersicht über die durchgeführten Inkubationsversuche und die Gene, deren Methylierungsgrad bestimmt wurde**

Substanz	<i>ERβ</i>	<i>MGMT</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>DAPK1</i>	<i>RASSF1A</i>
EGCG			+		
EGCG + SOD	+	+	+		
EGCG + SOD + Katalase	+	+	+	+	+
EGCG + SOD + Katalase + Mg <sup>2+</sup> (24h)	+				
EGCG + SOD + Katalase + Mg <sup>2+</sup>	+				
Hydralazin			+		
(+)-Lariciresinol + Katalase	+	+			+
(-)-Matairesinol + Katalase	+	+			
Quercetin + Katalase	+	+			

Es wurde sowohl für jeden DNA-Kontrollstandard, als auch für jede Probe, eine Doppelbestimmung des Methylierungsgrades durchgeführt. Jede Messung wurde zusätzlich noch an einem anderen Tag wiederholt. Um zu prüfen, ob die zugesetzte Substanz zu einer signifikanten Änderung des DNA-Methylierungsgrades führte, wurde der Student t-Test durchgeführt.

Die Ergebnisse der Inkubationsversuche mit den Brustkrebszellen sind in den folgenden Abschnitten dargestellt.

### 5.3.1 ERβ

Die detaillierten Ergebnisse der verschiedenen Inkubationsversuche mit EGCG, (+)-Lariciresinol, (-)-Matairesinol und Quercetin für das Gen *ERβ* sind in der *Tabelle 29* zusammengefasst.

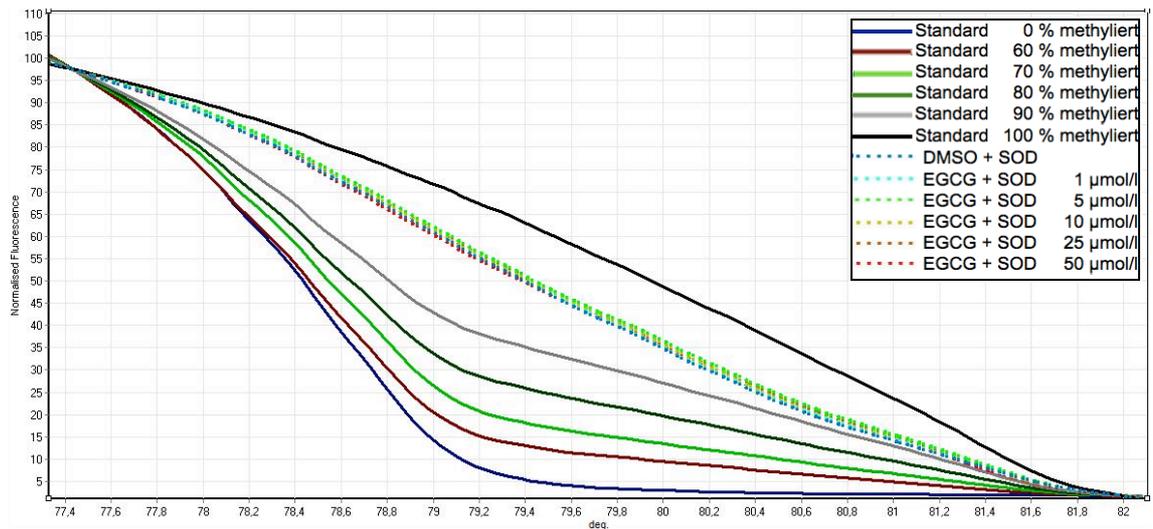
Tabelle 29: Ergebnisse der Inkubationsversuche für das Gen ER $\beta$ 

Rot hinterlegte Werte sind mit dem Nalimov Ausreißertest ermittelte Ausreißer; S. = SOD;

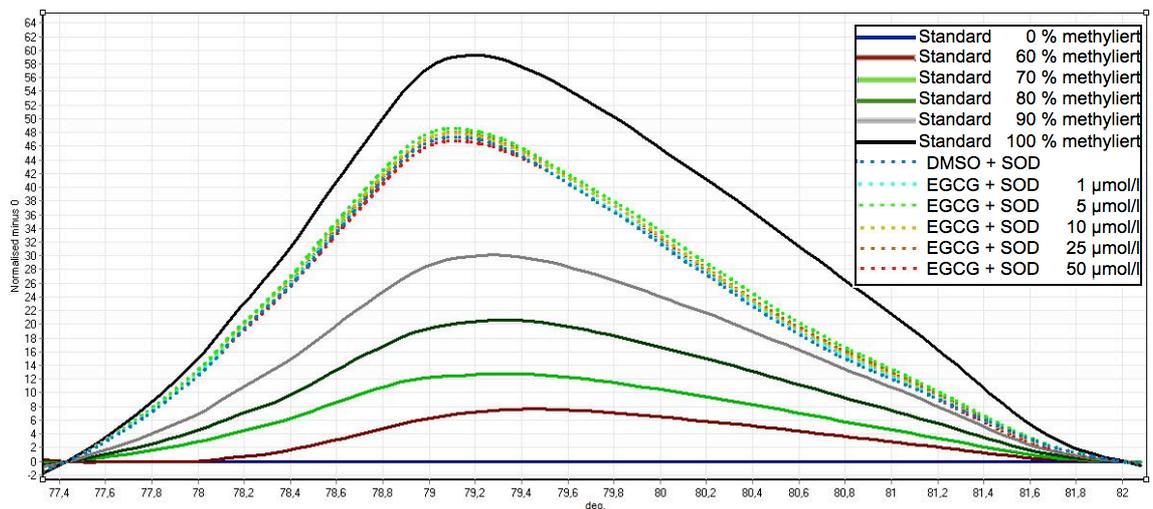
K. = Katalase; EGCG+S.+K.+Mg<sup>2+</sup>24h = EGCG+SOD+Katalase+Mg<sup>2+</sup> alle 24 Stunden zugegeben;

Konzentration [ $\mu\text{mol/l}$ ]	DNA-Methylierungsgrad [%]								
<b>EGCG + SOD</b>	<b>1. Inkubation</b>				<b>2. Inkubation</b>				
DMSO + SOD	91	92	97	96	98	100	98	98	
1	91	92	96	96	99	99	97	98	
5	89	91	94	96	98	99	98	99	
10	91	94	96	97	98	99	98	98	
25	92	93	95	95	98	99	98	98	
50	94	97	95	96	98	99	97	98	
<b>EGCG+S.+K.</b>	<b>1. Inkubation</b>				<b>2. Inkubation</b>				
DMSO+S.+K.	90	90	94	94	101	101	100	100	
1	94	95	97	98	100	100	99	99	
5	92	94	97	98	100	100	98	99	
10	91	91	94	95	98	99	98	99	
25	93	94	95	99	99	100	97	98	
50	90	92	94	96	98	100	97	98	
100	90	93	95	95	99	105	98	98	
<b>EGCG+S.+K.+Mg<sup>2+</sup>24h</b>	<b>1. Inkubation</b>				<b>EGCG+S.+K.+Mg<sup>2+</sup></b>	<b>1. Inkubation</b>			
DMSO+S.+K.+Mg <sup>2+</sup>	97	98	98	98	DMSO+S.+K.+Mg <sup>2+</sup>	97	97	98	99
1	97	97	98	98	1	95	95	98	98
5	97	97	98	100	5	97	97	99	99
10	96	97	98	98	10	97	97	98	99
25	96	97	98	99	25	95	95	98	98
50	98	98	98	100	50	97	97	99	99
100	96	97	99	100	100	97	98	98	99
<b>(+)-Lariciresinol+K.</b>	<b>1. Inkubation</b>				<b>(-)-Matairesinol+K.</b>	<b>1. Inkubation</b>			
DMSO + K.	99	100	99	98	DMSO + K.	98	99	99	99
1	94	96	97	102	1	98	99	98	98
5	92	94	96	97	5	99	99	99	100
10	95	97	98	98	10	100	100	98	100
25	96	103	98	99	25	99	99	99	99
50	96	96	98	98	50	99	99	98	99
100	94	97	97	97	100	99	100	98	99
<b>Quercetin+K.</b>	<b>1. Inkubation</b>								
DMSO+ K.	97	96	97	98					
1	95	103	98	102					
5	95	96	97	98					

Die normalisierten Schmelzkurven und der Differentialgraf, welche mit der DNA von mit EGCG und SOD behandelten MCF-7 Zellen erhalten wurden, sind in den *Abbildungen 81* und *82* dargestellt. Es wurden keine Unterschiede zwischen mit EGCG und SOD behandelten MCF-7 Zellen und unbehandelten Zellen festgestellt. Ein Unterschied im DNA-Methylierungsgrad des Gens *ER $\beta$*  konnte daher nicht beobachtet werden.

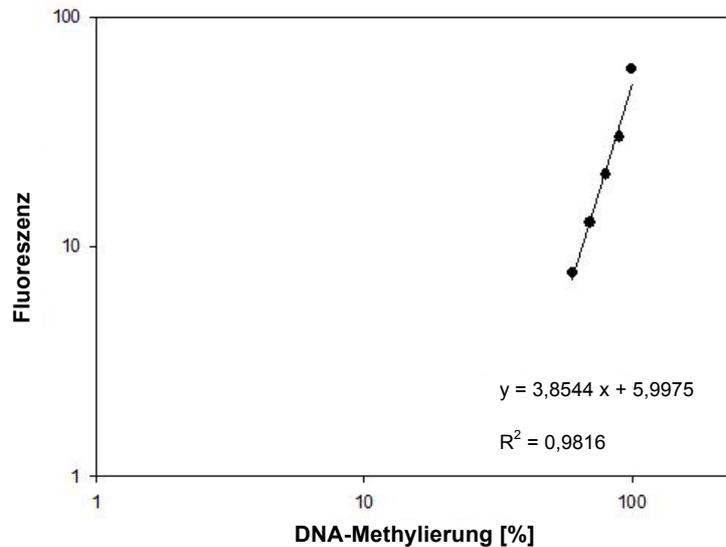


**Abbildung 81: Normalisierte Schmelzkurven der DNA aus mit EGCG und SOD inkubierten MCF-7 Zellen für *ER $\beta$***



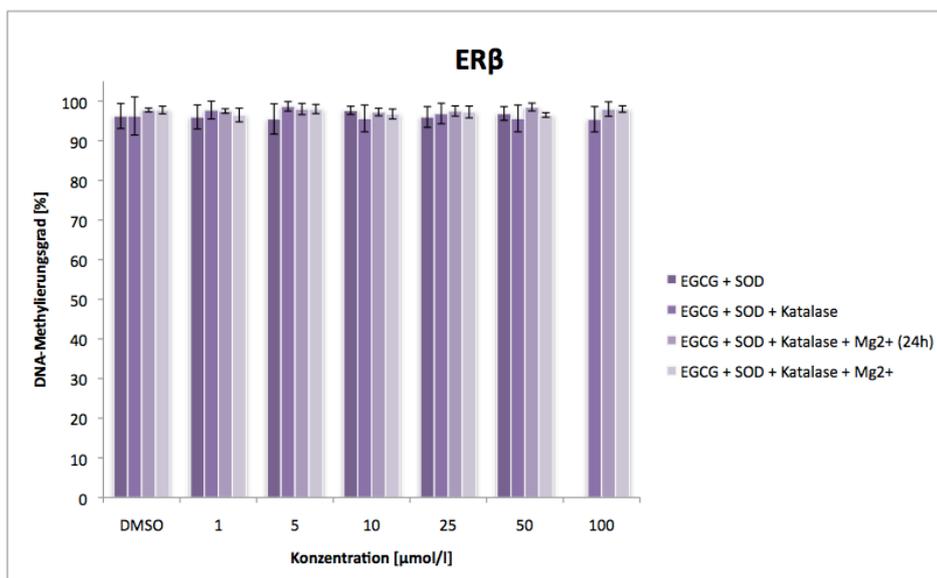
**Abbildung 82: Differentialgraf der DNA aus mit EGCG und SOD inkubierten MCF-7 Zellen für *ER $\beta$***

Die in der *Abbildung 83* dargestellte Kalibriergerade wurde für die Berechnung der DNA-Methylierung verwendet.



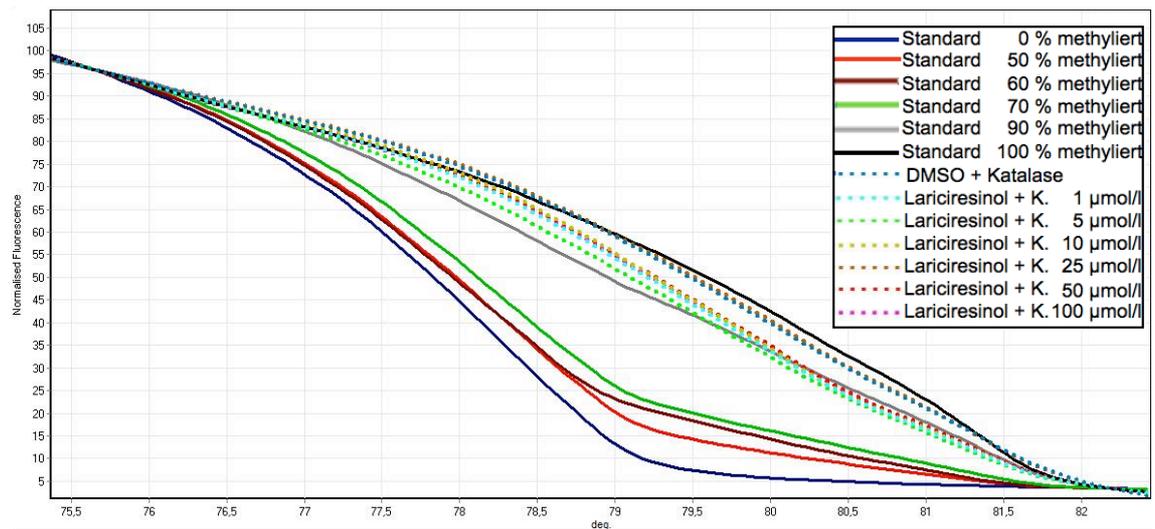
**Abbildung 83: Kalibriergerade für ER $\beta$  (für die Inkubation von MCF-7 Zellen mit EGCG und SOD)**

Die Inkubation der MCF-7 Zellen mit EGCG in Gegenwart von verschiedenen Stabilisatoren (SOD, Katalase und Mg<sup>2+</sup>) hatte keinen nachweisbaren Effekt auf die DNA-Methylierung von ER $\beta$ . Wie aus *Abbildung 84* und *Tabelle 29* gut zu erkennen ist, liegt der Methylierungsgrad des ER $\beta$ -Gens in MCF-7 Zellen, die mit EGCG behandelt wurden, zwischen 90 und 100 %.

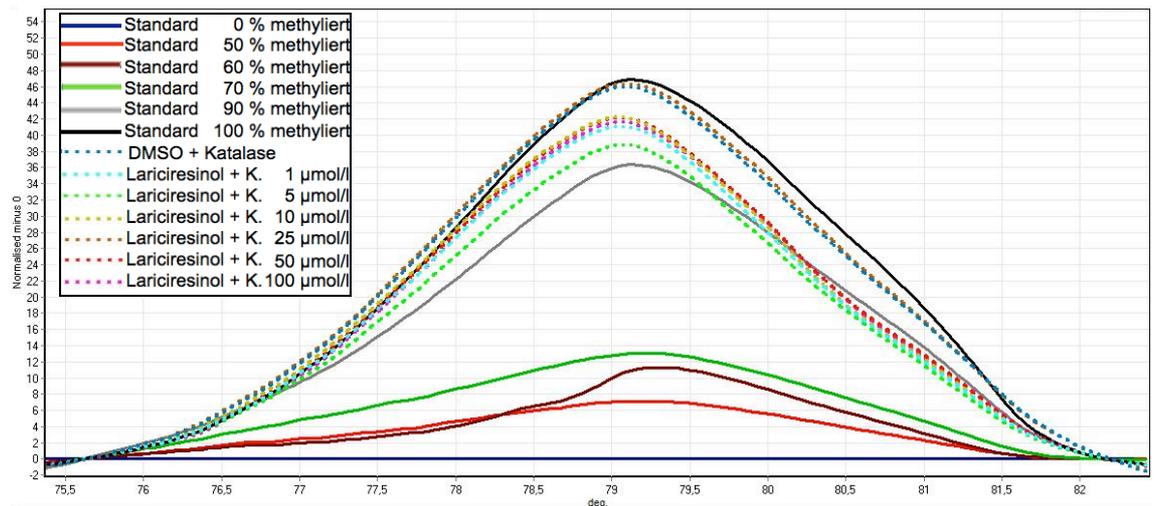


**Abbildung 84: Methylierungsgrad von ER $\beta$  in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit EGCG.** Mit EGCG + SOD und EGCG + SOD + Katalase wurden 2 unabhängige Inkubationsversuche durchgeführt. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von 2 unabhängigen MS-HRM Bestimmungen (n=4) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die DMSO-Kontrolle, wurden mit dem Student t-Test berechnet (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

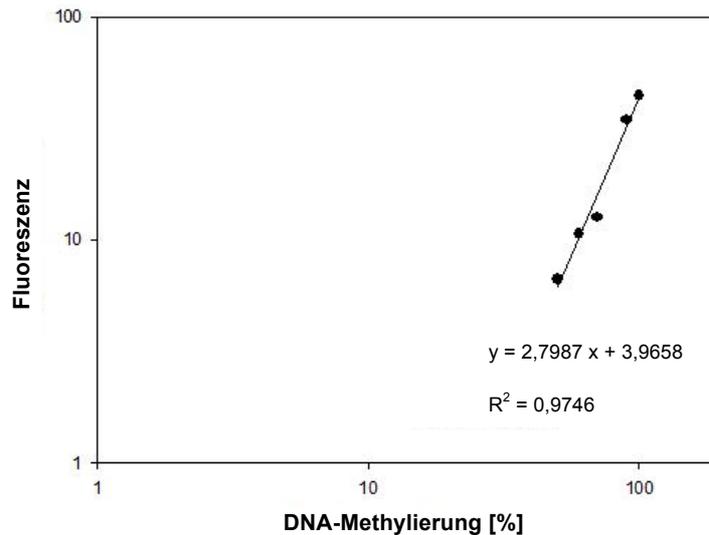
Die normalisierten Schmelzkurven, der Differentialgraf sowie die Kalibriergerade, welche mit der DNA von mit (+)-Lariciresinol und Katalase behandelten MCF-7 Zellen erhalten wurden, sind in den *Abbildungen 85 bis 87* dargestellt. Es wurden sehr geringe Unterschiede in den Kurvenverläufen der mit (+)-Lariciresinol und Katalase behandelten MCF-7 Zellen im Vergleich zur Null-Probe (DMSO und Katalase) festgestellt. Ein signifikanter Unterschied im DNA-Methylierungsgrad des Gens *ER $\beta$*  konnte nicht beobachtet werden.



**Abbildung 85: Normalisierte Schmelzkurven der DNA aus mit Lariciresinol und Katalase (K.) inkubierten MCF-7 Zellen für *ER $\beta$***

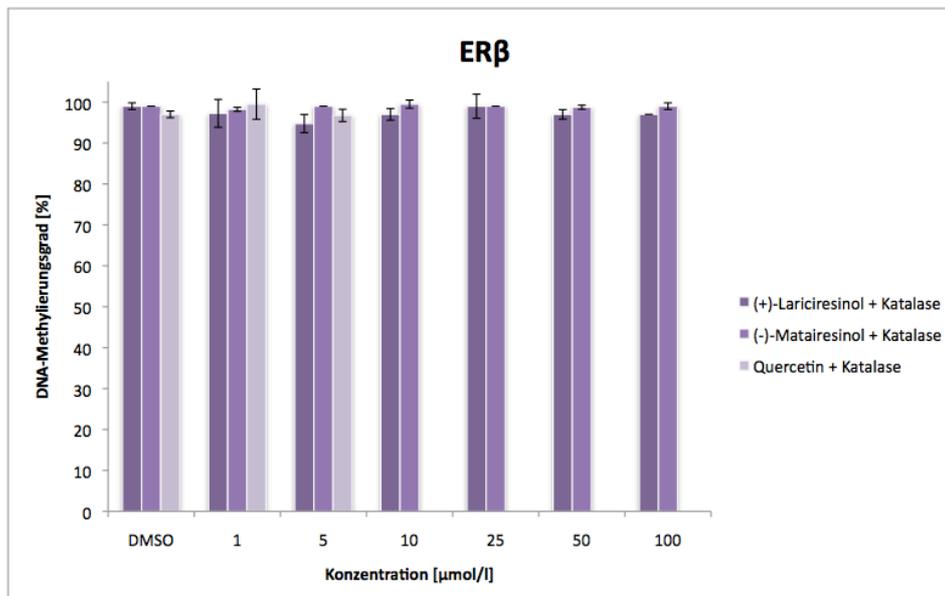


**Abbildung 86: Differentialgraf der DNA aus mit Lariciresinol und Katalase (K.) inkubierten MCF-7 Zellen für *ER $\beta$***



**Abbildung 87: Kalibriergerade für ER $\beta$  (für die Inkubation von MCF-7 Zellen mit Lariciresinol und Katalase)**

Die Ergebnisse der Inkubationsversuche mit (+)-Lariciresinol, (-)-Matairesinol, sowie Quercetin, für das Gen *ER $\beta$*  sind in *Abbildung 88* dargestellt. Der Methylierungsgrad lag zwischen 94 % und 100 %. Es wurde keine Abnahme der Methylierung mit steigender Konzentration der inkubierten Substanzen festgestellt. Auf Grund der zytotoxischen Wirkung von Quercetin kam es bei hohen Quercetin-Konzentrationen (> 5  $\mu\text{mol/l}$ ) zu einem vermehrten Absterben der MCF-7 Zellen während der Versuchsdauer von 9 Tagen. In der Folge konnte bei hohen Quercetin-Konzentrationen keine DNA isoliert werden.



**Abbildung 88: Methylierungsgrad von ER $\beta$  in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Lariciresinol, Matairesinol und Quercetin. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von 2 unabhängigen MS-HRM Bestimmungen (n=4) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die DMSO-Kontrolle, wurden mit dem Student t-Test berechnet (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).**

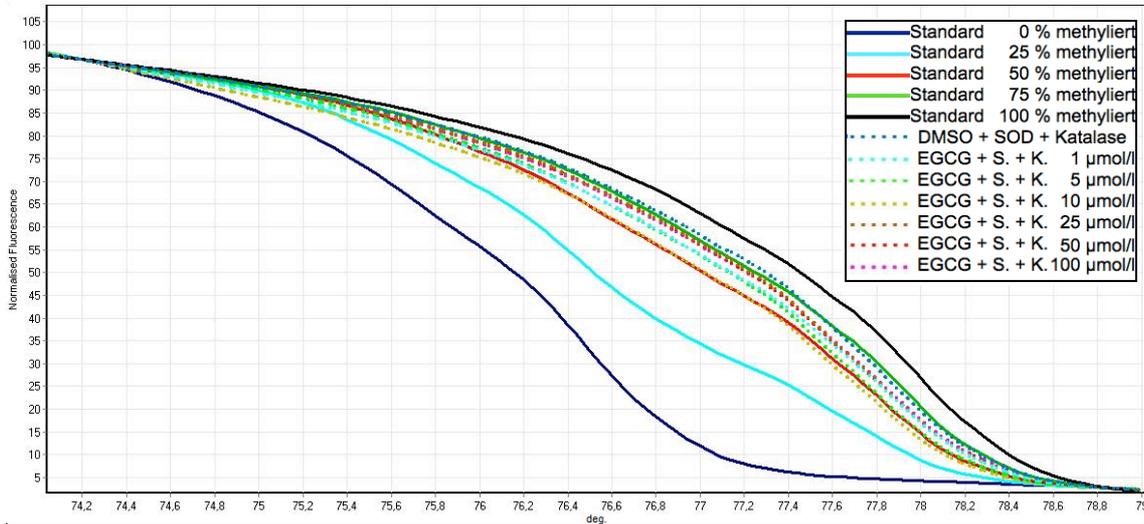
### 5.3.2 MGMT

Die detaillierten Ergebnisse der verschiedenen Inkubationsversuche mit EGCG, (+)-Lariciresinol, (-)-Matairesinol und Quercetin für das Gen *MGMT* sind in der *Tabelle 30* zusammengefasst.

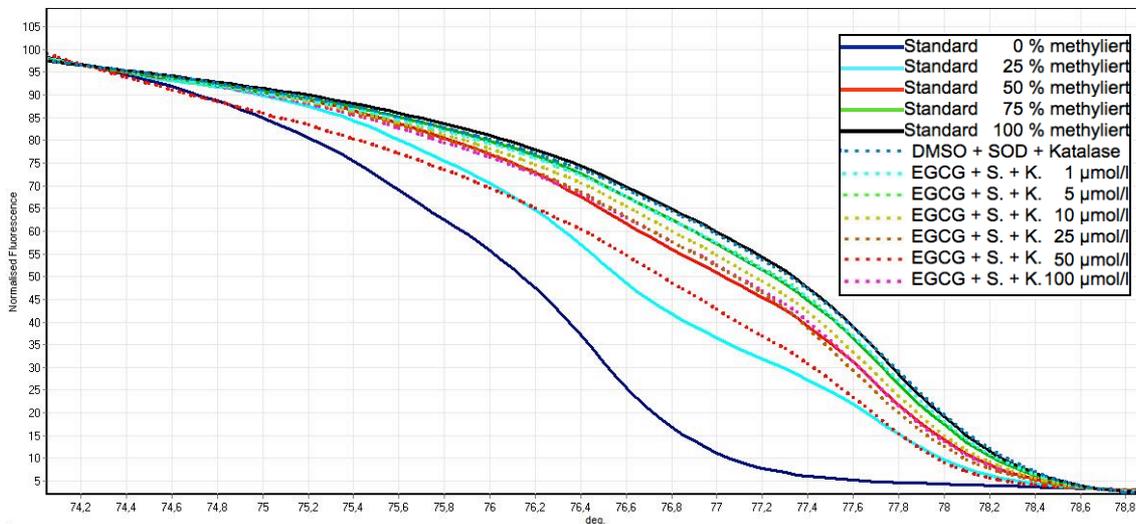
**Tabelle 30: Ergebnisse der Inkubationsversuche für das Gen *MGMT***  
 Rot hinterlegte Werte sind mit dem Nalimov Ausreißertest ermittelte Ausreißer;  
 S. = SOD; K. = Katalase;

Konzentration [ $\mu\text{mol/l}$ ]	DNA-Methylierungsgrad [%]								
	1. Inkubation				2. Inkubation				
<b>EGCG + SOD</b>	<b>1. Inkubation</b>				<b>2. Inkubation</b>				
DMSO + SOD	54	59	47	51	68	71	65	70	
1	55	57	63	68	68	69	68	72	
5	63	70	68	71	69	73	76	76	
10	49	57	58	64	72	77	79	82	
25	47	54	60	73	67	74	71	73	
50	39	49	66	69	87	96	68	81	
<b>EGCG+S.+K.</b>	<b>1. Inkubation</b>				<b>2. Inkubation</b>				
DMSO+S.+K.	89	93	69	75	72	85	85	90	
1	69	83	63	67	62	72	78	82	
5	83	87	65	74	62	71	77	83	
10	81	85	48	48	51	66	68	73	
25	85	99	64	74	69	78	59	68	
50	87	88	53	69	67	78	43	45	
100	79	93	49	62	65	79	47	64	
<b>(+)-Lariciresinol+K.</b>	<b>1. Inkubation</b>				<b>(-)-Matairesinol+K.</b>	<b>1. Inkubation</b>			
DMSO+ K.	79	81	99	104	DMSO+ K.	70	76	67	75
1	82	82	71	88	1	68	69	66	70
5	73	74	76	81	5	71	71	69	77
10	69	78	59	87	10	74	74	87	93
25	76	84	101	59	25	66	66	75	76
50	80	88	94	91	50	56	69	66	78
100	88	93	75	80	100	73	75	70	71
<b>Quercetin +K.</b>	<b>1. Inkubation</b>								
DMSO + K.	97	89	71	80					
1	79	82	70	83					
5	79	82	79	84					

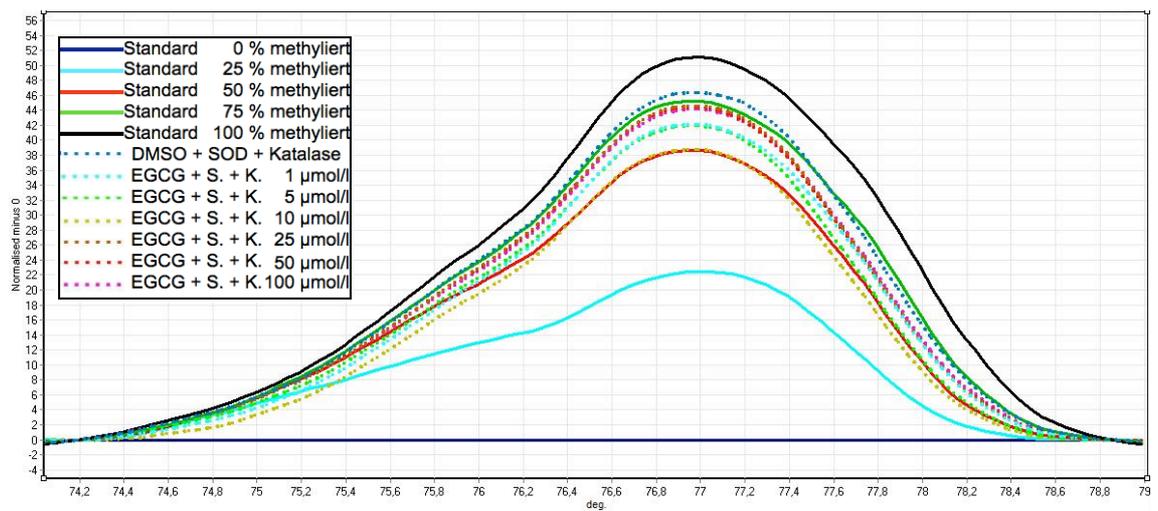
Die verwendete MS-HRM Methode für das Gen *MGMT* erwies sich als nicht robust, die gemessenen Werte zeigten eine relativ große Streuung. Die *Abbildungen 89 bis 93* zeigen die großen Unterschiede zwischen dem an zwei verschiedenen Analysentagen ermittelten DNA-Methylierungsgrad.



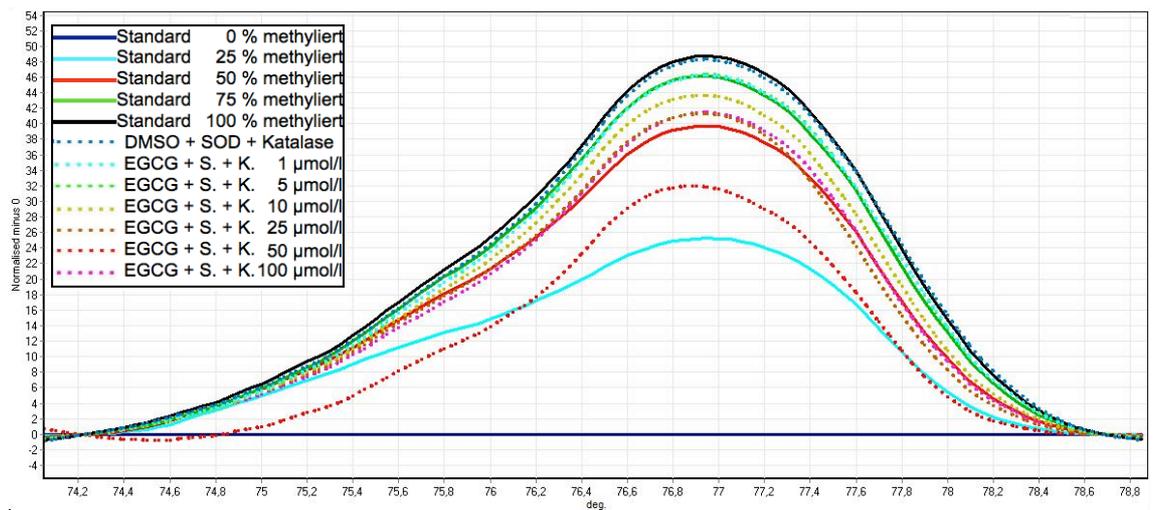
**Abbildung 89: Normalisierte Schmelzkurven der DNA aus mit EGCG, SOD (S.) und Katalase (K.) inkubierten MCF-7 Zellen für *MGMT* (Analysentag 1)**



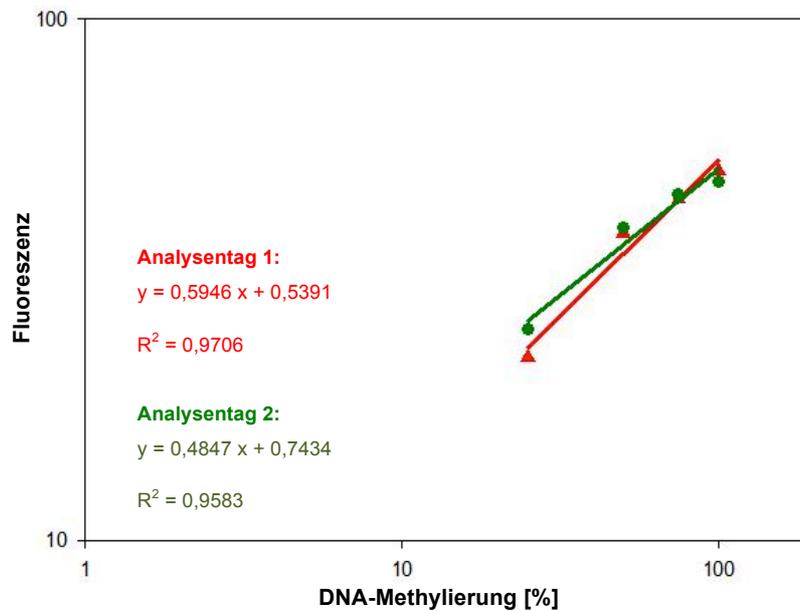
**Abbildung 90: Normalisierte Schmelzkurven der DNA aus mit EGCG, SOD (S.) und Katalase (K.) inkubierten MCF-7 Zellen für *MGMT* (Analysentag 2)**



**Abbildung 91: Differentialgraf der DNA aus mit EGCG, SOD (S.) und Katalase (K.) inkubierten MCF-7 Zellen für MGMT (Analysentag 1)**

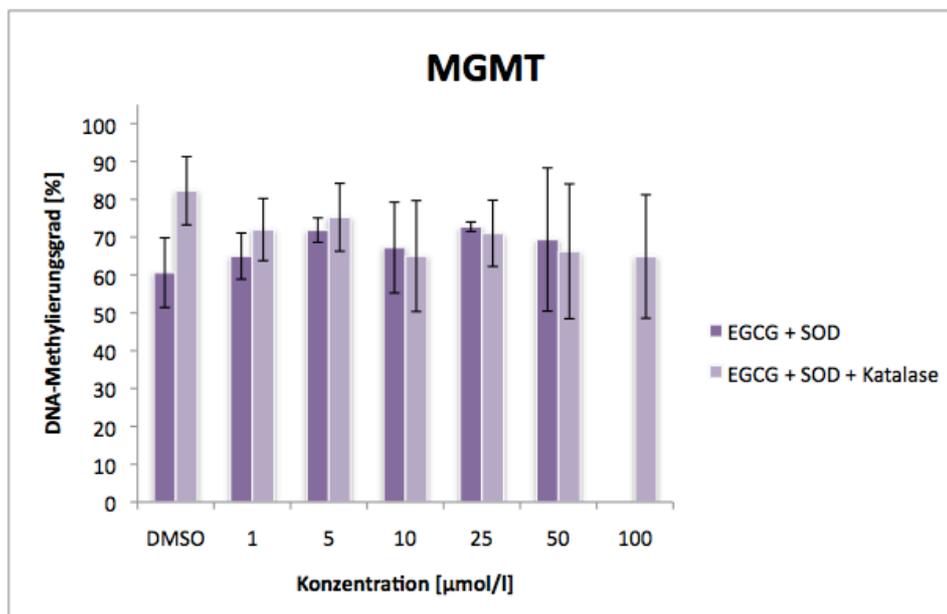


**Abbildung 92: Differentialgraf der DNA aus mit EGCG, SOD (S.) und Katalase (K.) inkubierten MCF-7 Zellen für MGMT (Analysentag 2)**

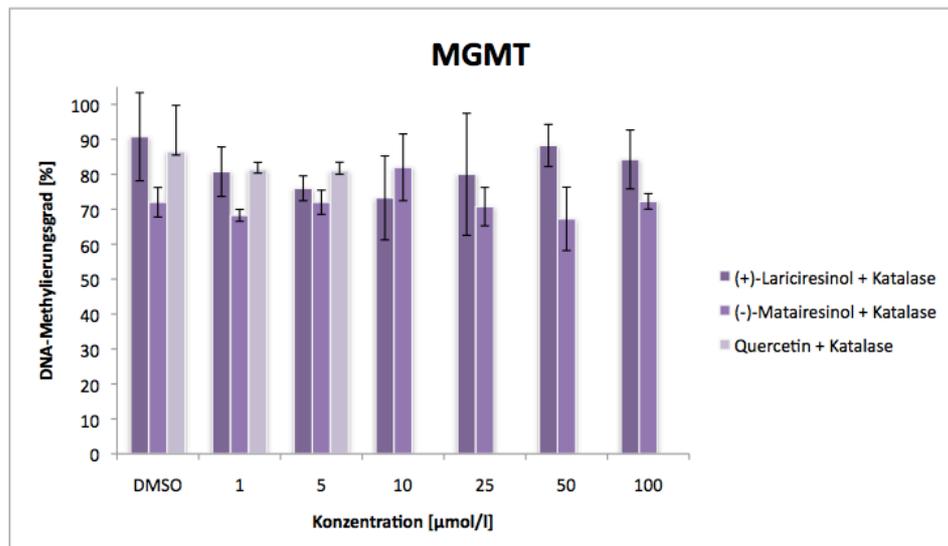


**Abbildung 93: Zwei Kalibriergeraden für MGMT (für die Inkubation von MCF-7 Zellen mit EGCG, SOD und Katalase (Analysentag 1 und 2))**

Die starke Streuung der Werte (vgl. *Abbildung 94* und *95*) macht deutlich, dass die entwickelte Methode nicht geeignet ist, den Methylierungsgrad von hoch methylierter DNA genau zu bestimmen.



**Abbildung 94: Methylierungsgrad von MGMT in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit EGCG. Mit EGCG + SOD und EGCG + SOD + Katalase wurden 2 unabhängige Inkubationsversuche durchgeführt. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von 2 unabhängigen MS-HRM Bestimmungen (n=4) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die DMSO-Kontrolle, wurden mit dem Student t-Test berechnet (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).**



**Abbildung 95: Methylierungsgrad von MGMT in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Lariciresinol, Matairesinol und Quercetin.**

*Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von 2 unabhängigen MS-HRM Bestimmungen (n=4) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die DMSO-Kontrolle, wurden mit dem Student t-Test berechnet (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).*

### 5.3.3 CDKN2A

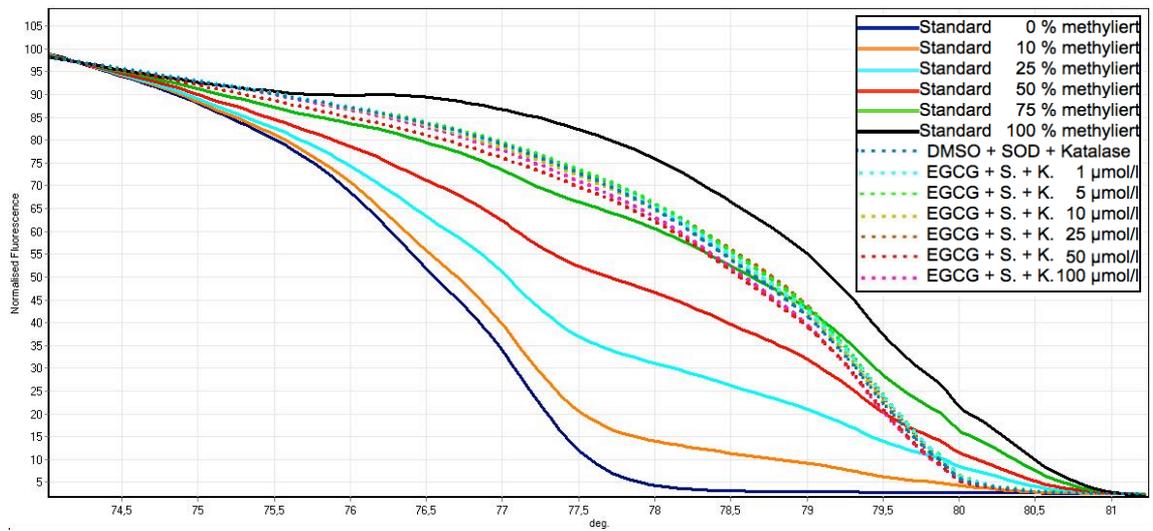
Die Ergebnisse der verschiedenen Inkubationsversuche mit EGCG, und Hydralazin für das Gen *CDKN2A* sind in der *Tabelle 31* zusammengefasst.

**Tabelle 31: Ergebnisse der Inkubationsversuche für das Gen CDKN2A**  
 Rot hinterlegte Werte sind mit dem Nalimov Ausreißertest ermittelte Ausreißer;  
 S. = SOD; K. = Katalase;

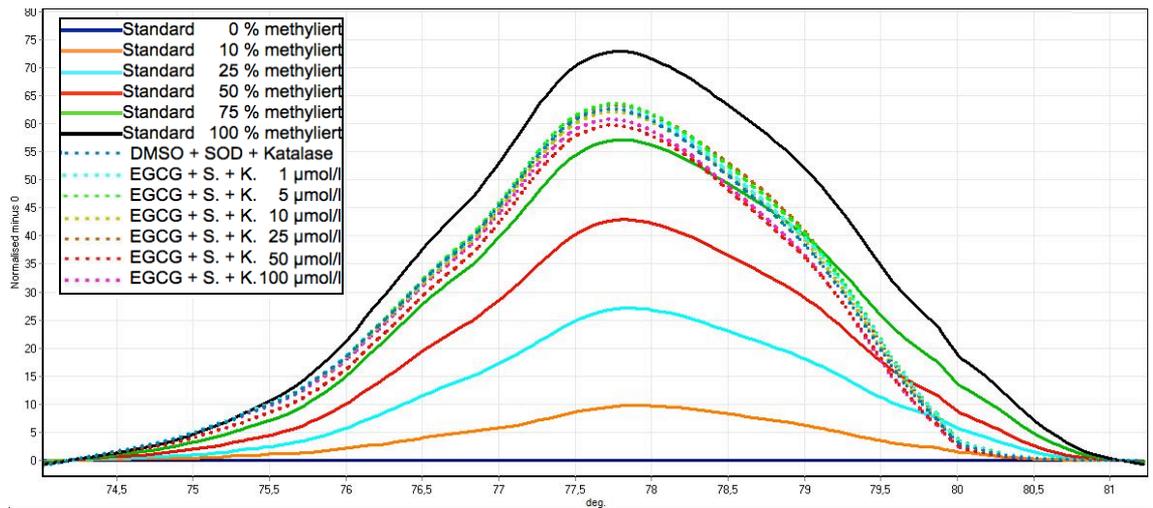
Konzentration [ $\mu\text{mol/l}$ ]	DNA-Methylierungsgrad [%]							
	1. Inkubation				2. Inkubation			
<b>EGCG</b>								
DMSO	70	71	64	65				
1	71	73	65	67				
5	68	72	63	66				
10	73	73	66	67				
25	73	75	67	68				
50	69	75	64	68				
<b>EGCG + SOD</b>	1. Inkubation				2. Inkubation			
DMSO + SOD	74	75	68	69	74	77	79	81
1	71	74	65	68	77	80	79	81
5	76	76	69	69	18	77	77	79
10	46	74	45	68	77	81	79	82
25	70	77	64	70	78	81	79	79
50	72	77	66	70	75	79	80	82
<b>EGCG + S. + K.</b>	1. Inkubation				2. Inkubation			
DMSO + S.+ K.	76	81	79	80	73	82	79	82
1	83	85	78	83	81	84	80	81
5	76	85	78	79	80	80	82	82
10	84	84	74	77	77	83	79	81
25	85	89	78	80	73	77	79	84
50	78	82	77	79	81	83	73	79
100	82	85	78	81	77	80	76	80
<b>Hydralazin</b>	1. Inkubation							
DMSO	78	79	70	71				
1	77	81	70	73				
5	81	81	73	73				
10	75	76	69	69				
25	75	79	69	71				
50	74	80	67	72				

Die normalisierten Schmelzkurven und der Differentialgraf, welche mit der DNA von mit EGCG, SOD und Katalase behandelten MCF-7 Zellen erhalten wurden, sind in den *Abbildungen 96* und *97* dargestellt. Es wurden sehr geringe Unterschiede in den Kurvenverläufen der mit EGCG, SOD und Katalase behandelten MCF-7 Zellen im Vergleich zur Null-Probe (DMSO, SOD und Katalase) festgestellt. Ein signifikanter

Unterschied im DNA-Methylierungsgrad des Gens *CDKN2A* konnte nicht beobachtet werden.

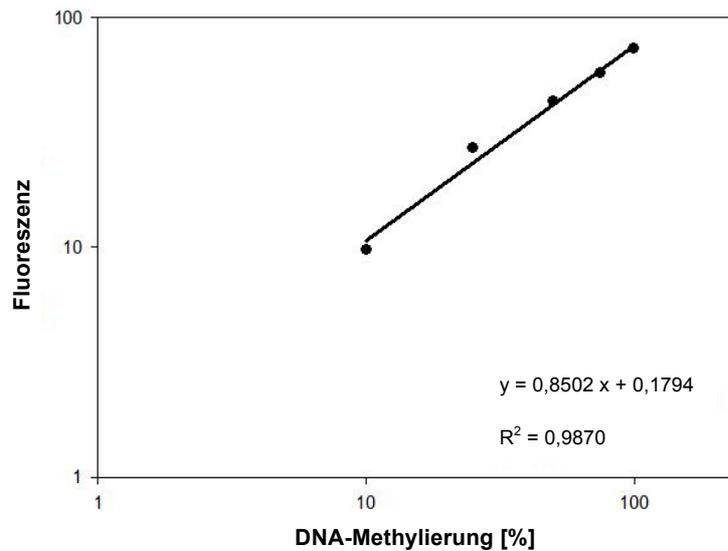


**Abbildung 96: Normalisierte Schmelzkurven der DNA aus mit EGCG, SOD (S.) und Katalase (K.) inkubierten MCF-7 Zellen für *CDKN2A***



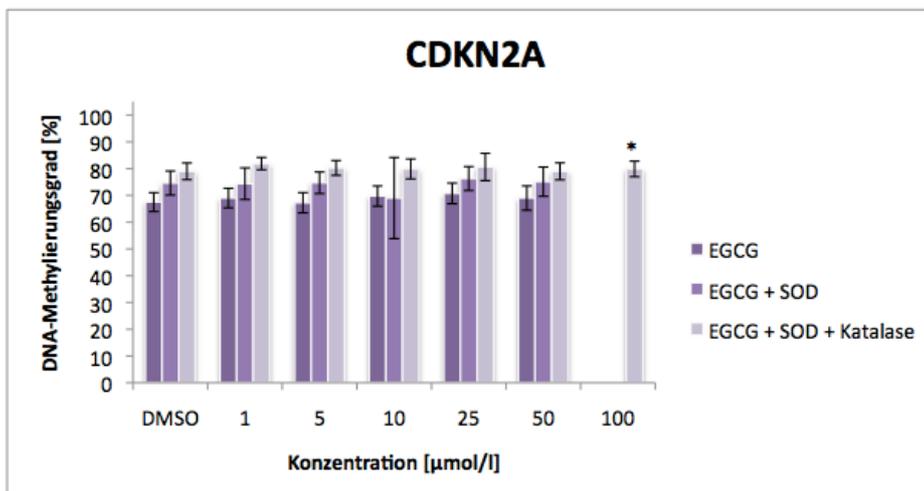
**Abbildung 97: Differentialgraf der DNA aus mit EGCG, SOD (S.) und Katalase (K.) inkubierten MCF-7 Zellen für *CDKN2A***

Die in der *Abbildung 98* dargestellte Kalibriergerade wurde für die Berechnung der DNA-Methylierung verwendet.



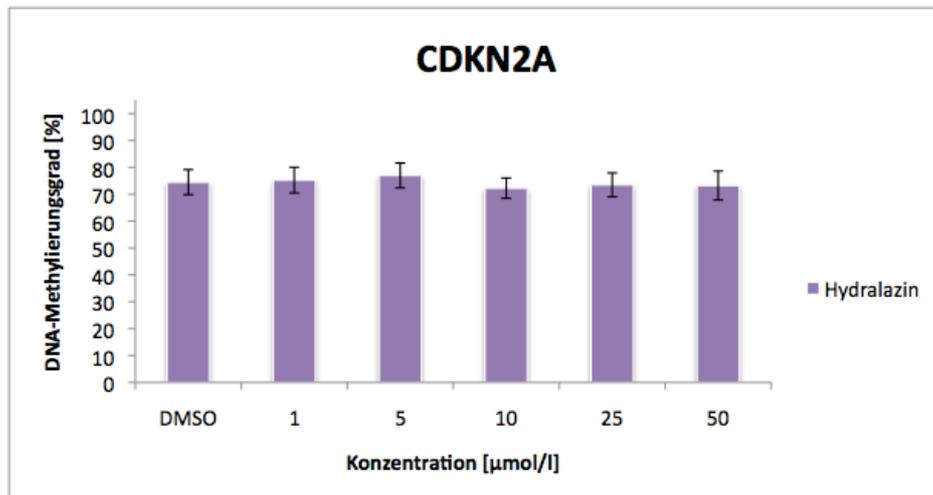
**Abbildung 98: Kalibriergerade für CDKN2A (für die Inkubation von MCF-7 Zellen mit EGCG, SOD und Katalase)**

Eine signifikante Abnahme in Abhängigkeit von der inkubierten Substanzkonzentration konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 99). Nach dem Inkubationsversuch mit EGCG lag das Gen *CDKN2A* zwischen 63 % und 75 % methyliert vor. Nach der Inkubation von EGCG mit dem Stabilisator SOD besaß das Gen *CDKN2A* einen DNA-Methylierungsgrad von 66 % bis 82 %. Am höchsten methyliert war *CDKN2A* (73 % – 89 % methyliert) nach Inkubation mit EGCG und den Stabilisatoren SOD und Katalase.



**Abbildung 99: Methylierungsgrad von CDKN2A in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit EGCG. Mit EGCG + SOD und EGCG + SOD + Katalase wurden 2 unabhängige Inkubationsversuche durchgeführt. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von 2 unabhängigen MS-HRM Bestimmungen (n=4) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die DMSO-Kontrolle, wurden mit dem Student t-Test berechnet (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ )**

Das Ergebnis des Inkubationsversuchs mit Hydralazin für das Gen *CDKN2A* ist in *Abbildung 100* dargestellt. Der Methylierungsgrad lag zwischen 67 % und 81 %. Es wurde im Konzentrationsbereich von 1  $\mu\text{mol/l}$  – 50  $\mu\text{mol/l}$  keine Änderung des Methylierungsgrades beobachtet.



**Abbildung 100: Methylierungsgrad von *CDKN2A* in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Hydralazin .**  
**Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von 2 unabhängigen MS-HRM Bestimmungen (n=4) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die DMSO-Kontrolle, wurden mit dem Student t-Test berechnet (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).**

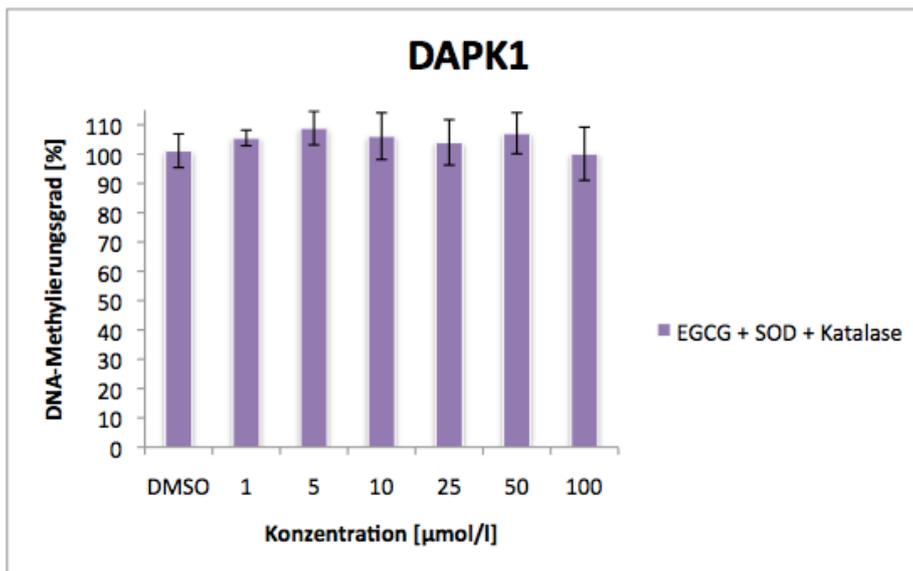
### 5.3.4 DAPK1

Die Ergebnisse des Inkubationsversuchs mit EGCG für das Gen *DAPK1* sind in der *Tabelle 32* zusammengefasst.

**Tabelle 32: Ergebnisse des Inkubationsversuchs für das Gen *DAPK1***  
**Rot hinterlegte Werte sind mit dem Nalimov Ausreißertest ermittelte Ausreißer;**  
**S. = SOD; K. = Katalase;**

Konzentration [µmol/l]	DNA-Methylierungsgrad [%]							
	1. Inkubation				2. Inkubation			
<b>EGCG + S. + K.</b>								
DMSO + S. + K.	96	96	106	108	<b>80</b>	102	94	106
1	<b>87</b>	<b>92</b>	104	106	106	110	102	105
5	99	101	111	114	112	114	109	111
10	96	98	107	112	111	119	99	107
25	97	98	103	111	113	114	94	102
50	96	98	106	108	108	114	112	115
100	87	93	112	113	95	104	98	99

Wie in *Abbildung 101* dargestellt, bewirkte die Inkubation der MCF-7 Zellen mit EGCG keine signifikante Änderung des Methylierungsgrades im Gen *DAPK1*.



**Abbildung 101: Methylierungsgrad von *DAPK1* in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit EGCG + SOD + Katalase. Es wurden 2 unabhängige Inkubationsversuche durchgeführt. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von 2 unabhängigen MS-HRM Bestimmungen ( $n=4$ ) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die DMSO-Kontrolle, wurden mit dem Student *t*-Test berechnet (\*:  $p<0,05$ ; \*\*:  $p<0,01$ ; \*\*\*:  $p<0,001$ ).**

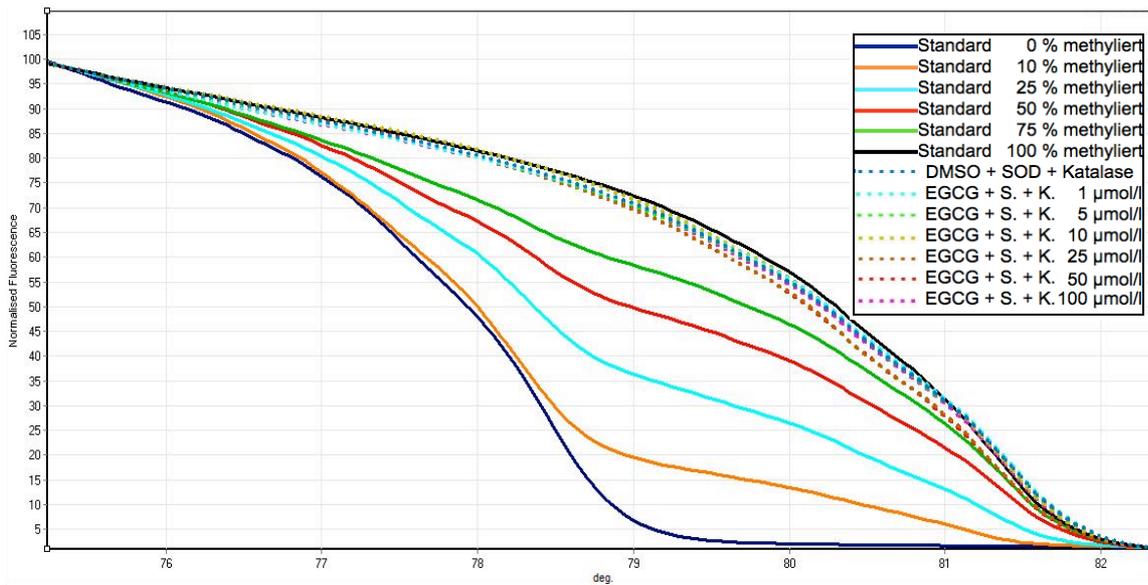
### 5.3.5 RASSF1A

Die Ergebnisse der Inkubationsversuche mit EGCG und (+)-Lariciresinol für das Gen *RASSF1A* sind in der *Tabelle 33* zusammengefasst.

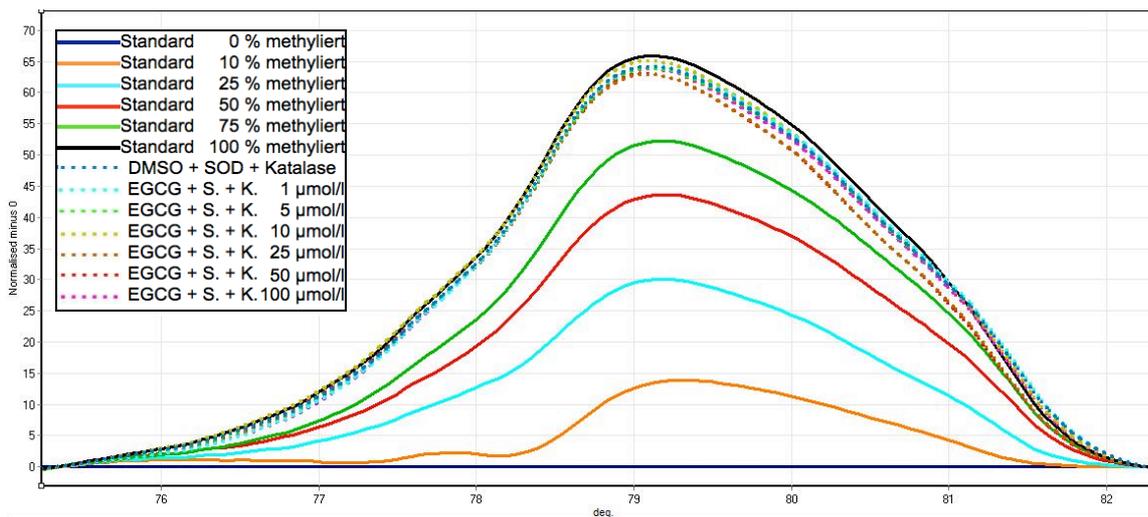
**Tabelle 33: Ergebnisse der Inkubationsversuche für das Gen RASSF1A**  
 Rot hinterlegte Werte sind mit dem Nalimov Ausreißertest ermittelte Ausreißer;  
 S. = SOD; K. = Katalase;

Konzentration [ $\mu\text{mol/l}$ ]	DNA-Methylierungsgrad [%]							
	1. Inkubation				2. Inkubation			
<b>EGCG + S. + K.</b>								
DMSO + S. + K.	95	102	96	102	92	94	99	102
1	89	91	90	92	93	95	90	96
5	91	97	94	95	91	94	102	102
10	90	94	92	92	93	96	99	106
25	93	94	91	92	91	91	97	105
50	91	95	91	93	90	91	99	100
100	89	92	93	99	92	93	103	106
<b>(+)-Lariciresinol+K.</b>								
DMSO+ K.	95	106	101	111				
1	99	100	98	103				
5	97	100	94	99				
10	104	105	104	105				
25	102	104	101	101				
50	99	102	102	102				
100	103	104	102	103				

Die normalisierten Schmelzkurven und der Differentialgraf, welche mit der DNA von mit EGCG, SOD und Katalase behandelten MCF-7 Zellen erhalten wurden, sind in den *Abbildungen 102* und *103* dargestellt. Es wurden geringe Unterschiede für die mit EGCG, SOD und Katalase behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (DMSO, SOD und Katalase) festgestellt. Es konnte ein signifikanter Unterschied im DNA-Methylierungsgrad des Gens *RASSF1A* beobachtet werden.

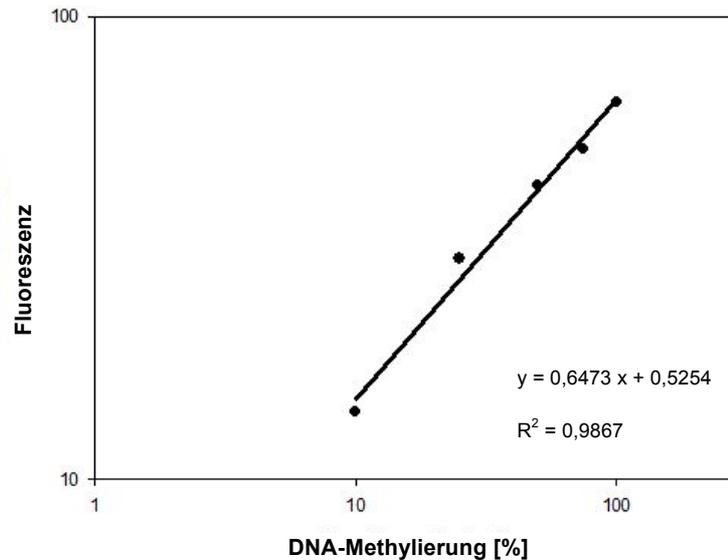


**Abbildung 102: Normalisierte Schmelzkurven der DNA aus mit EGCG, SOD (S.) und Katalase (K.) inkubierten MCF-7 Zellen für RASSF1A**



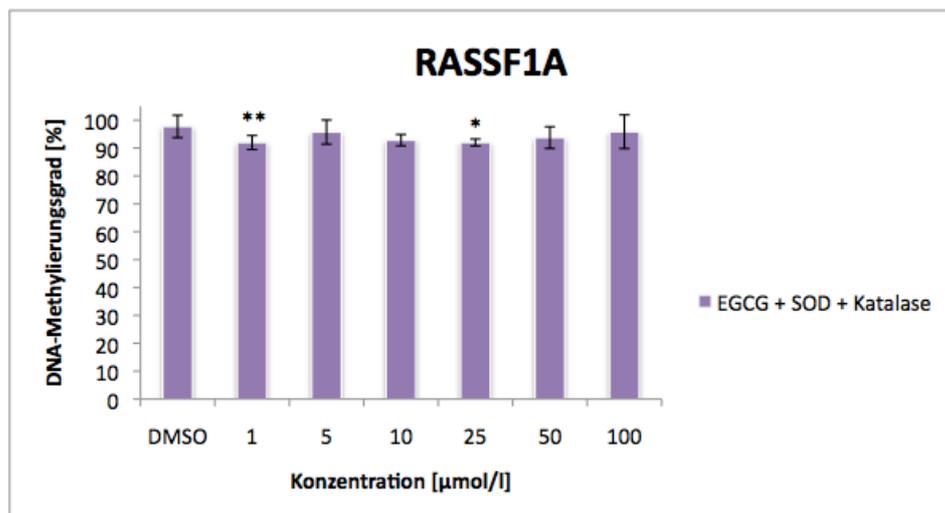
**Abbildung 103: Differentialgraf der DNA aus mit EGCG, SOD (S.) und Katalase (K.) inkubierten MCF-7 Zellen für RASSF1A**

Die in der *Abbildung 104* dargestellte Kalibriergerade wurde für die Berechnung der DNA-Methylierung verwendet.



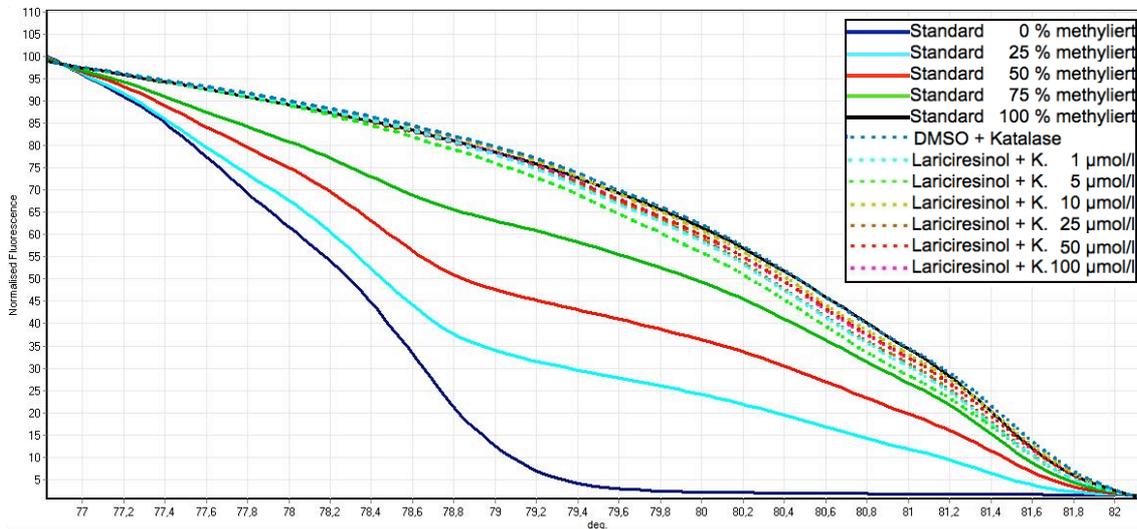
**Abbildung 104: Kalibriergerade für RASSF1A (für die Inkubation von MCF-7 Zellen mit EGCG, SOD und Katalase)**

In den unbehandelten Zellen war *RASSF1A* am höchsten methyliert, der Methylierungsgrad nahm mit steigender Konzentration an EGCG etwas ab (Abbildung 105). Bei einer EGCG-Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  war eine starke Signifikanz der Abnahme des Methylierungsgrades im Vergleich zur DMSO-Probe feststellbar. Auch die Inkubation mit einer EGCG-Konzentration von 25  $\mu\text{mol/l}$  führte zu einer signifikanten Abnahme des Methylierungsgrades.

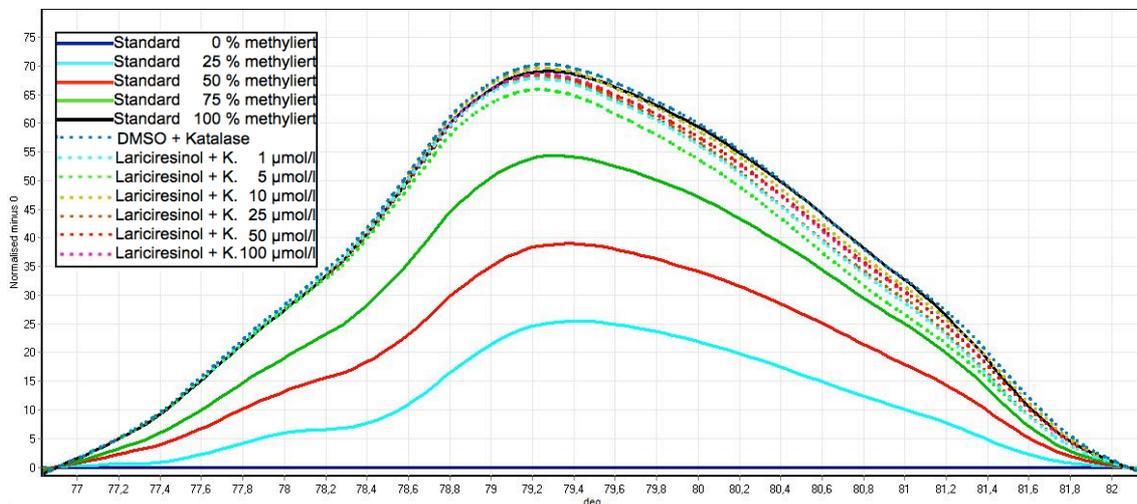


**Abbildung 105: Methylierungsgrad von RASSF1A in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit EGCG, SOD und Katalase. Es wurden 2 unabhängige Inkubationsversuche durchgeführt. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von 2 unabhängigen MS-HRM Bestimmungen ( $n=4$ ) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die DMSO-Kontrolle, wurden mit dem Student t-Test berechnet (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).**

Die normalisierten Schmelzkurven und der Differentialgraf, welche mit der DNA von mit (+)-Lariciresinol und Katalase behandelten MCF-7 Zellen erhalten wurden, sind in den *Abbildungen 106* und *107* dargestellt. Bei einer Lariciresinol-Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  und 5  $\mu\text{mol/l}$  konnte ein Unterschied in den Kurvenverläufen im Vergleich zur Null-Probe (Katalase) festgestellt werden.

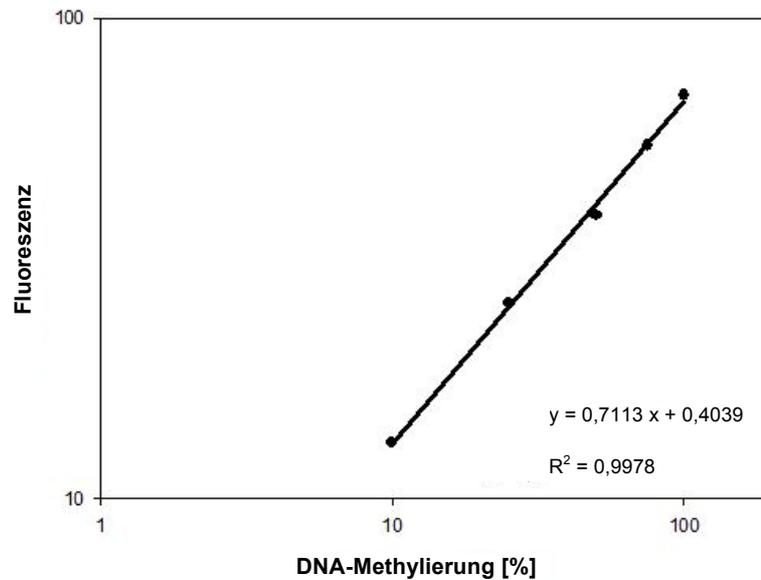


**Abbildung 106: Normalisierte Schmelzkurven der DNA aus mit Lariciresinol und Katalase (K.) inkubierten MCF-7 Zellen für RASSF1A**



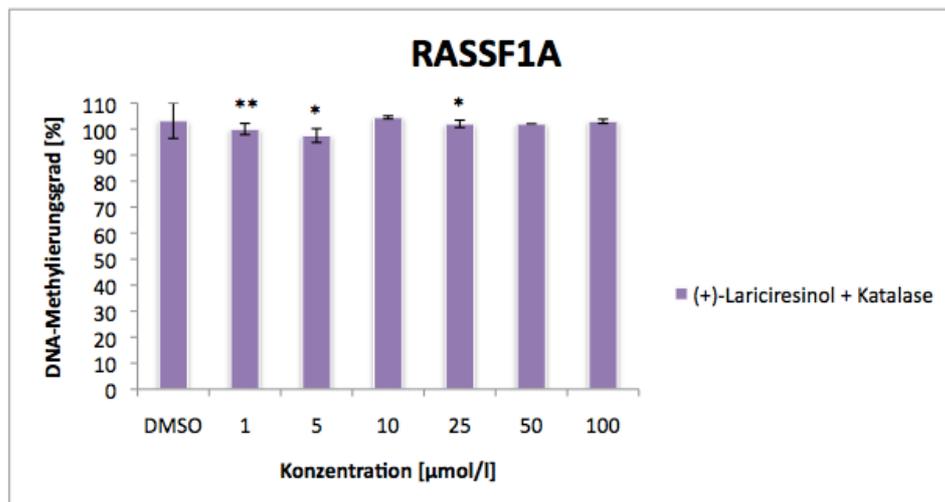
**Abbildung 107: Differentialgraf der DNA aus mit Lariciresinol und Katalase (K.) inkubierten MCF-7 Zellen für RASSF1A**

Die in der *Abbildung 108* dargestellte Kalibriergerade wurde für die Berechnung der DNA-Methylierung verwendet.



**Abbildung 108: Kalibriergerade für RASSF1A (für die Inkubation von MCF-7 Zellen mit Lariciresinol und Katalase)**

Es konnte bei drei (+)-Lariciresinol-Konzentrationen (1  $\mu\text{mol/l}$ , 5  $\mu\text{mol/l}$  und 25  $\mu\text{mol/l}$ ) eine geringe, aber signifikante Abnahme der DNA-Methylierung von *RASSF1A* in MCF-7 Zellen im Vergleich zur DMSO-Probe ermittelt werden (Abbildung 109).



**Abbildung 109: Methylierungsgrad von RASSF1A in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Lariciresinol. Es wurden 2 unabhängige Inkubationsversuche durchgeführt. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von 2 unabhängigen MS-HRM Bestimmungen ( $n=4$ ) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die DMSO-Kontrolle, wurden mit dem Student *t*-Test berechnet (\*:  $p<0,05$ ; \*\*:  $p<0,01$ ; \*\*\*:  $p<0,001$ ).**

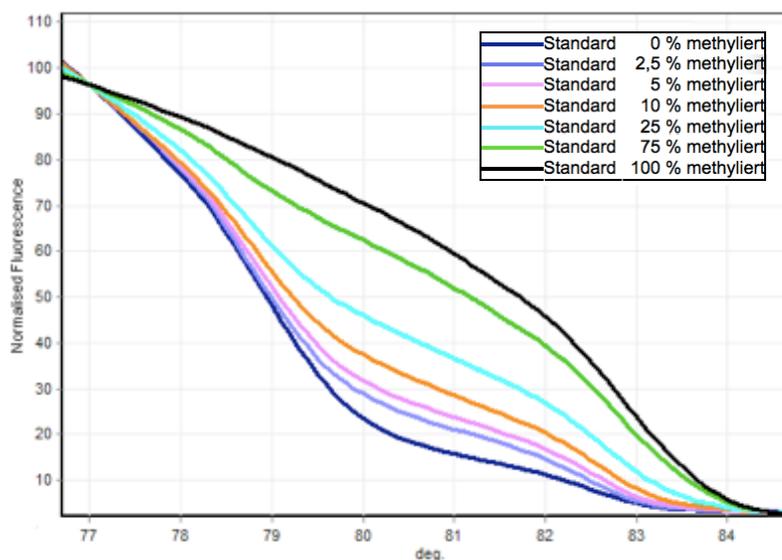
## 5.4 Biopsieproben

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden Biopsieproben von Brustkrebspatientinnen von Tumorgewebe, sowie von tumornahem und tumorfernem Gewebe auf den Grad ihrer Methylierung in ausgewählten Brustkrebs-relevanten Genen bestimmt. Es sollte untersucht werden, ob und in wie weit sich die DNA-Methylierung zwischen Tumorgewebe und tumornahem, sowie tumorfernem Gewebe unterscheidet. Weiters wurde untersucht, ob es zwischen Biopsieproben von unterschiedlichen Patientinnen im gleichen Gen Unterschiede in der DNA-Methylierung gibt.

Die DNA wurde aus den Gewebeproben extrahiert, genauere Informationen sind im Abschnitt 4.3.2. zu finden. Im Anschluss wurde die Biopsieproben-DNA Bisulfit-konvertiert (siehe Kapitel 4.5) und für die MS-HRM Analyse verwendet.

### 5.4.1 Kontrollstandards für das Gen DAPK1

Der Methylierungsgrad von *DAPK1* betrug in den meisten Biopsieproben weniger als 10 %. Die ursprünglich verwendeten DNA-Standards waren zu 0 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 % bis 100 % methyliert. Um eine höhere Genauigkeit im niedrigen Methylierungsbereich zu erzielen, wurden zur Erstellung der Kalibrierfunktion zwei weitere Kontrollstandards mit einem Methylierungsgrad von 2,5 % und 5 % analysiert (siehe *Abbildung 110* und *111*).



**Abbildung 110: Normalisierte Schmelzkurven mit den neuen Kontrollstandards für das Gen DAPK1**

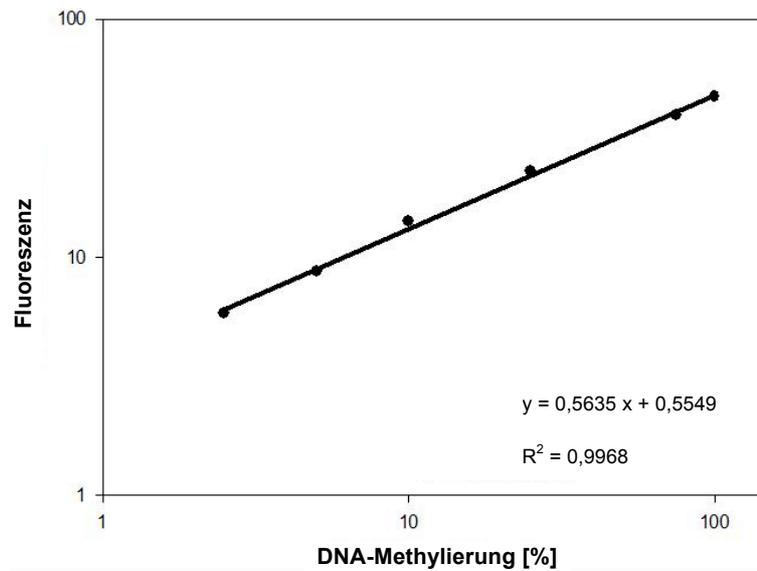


Abbildung 111: Kalibriergerade für DAPK1 mit den neuen Kontrollstandards

#### 5.4.2 Bestimmung des DNA-Methylierungsgrades in Biopsieproben

Mit der Bestimmung des Methylierungsgrades in Tumor, tumornahem und tumorfernem Gewebe wurde bereits in der Diplomarbeit von meiner Kollegin A. Raab begonnen. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die MS-HRM Analyse verschiedener Gewebeproben fortgesetzt. Zur gleichen Zeit arbeitete meine Kollegin E. Holzweber ebenfalls an der Vervollständigung der Biopsieprobenmessungen. Bei der in *Tabelle 34* dargestellten Übersicht des DNA-Methylierungsgrades der Biopsieproben in ausgewählten Genen handelt es sich um vorläufige Ergebnisse, da die Analysen noch nicht abgeschlossen wurden. Nach Abschluss der Analysen erfolgt eine statistische Auswertung. Aus diesem Grund kann nur eine vorläufige Interpretation der Daten und der sich abzeichnenden Trends erfolgen.

In *Tabelle 34* sind die im Rahmen dieser Diplomarbeit erhaltenen Messwerte (flieder hinterlegt) sowie die von A. Raab (gelb hinterlegt) und E. Holzweber (grün hinterlegt) erhaltenen Messwerte zusammengefasst.

**Tabelle 34: Übersicht über den Methylierungsgrad [%] von ausgewählten Genen in Biopsieproben von Brustkrebspatientinnen; (P = Patientin; T = Tumorgewebe; N = tumornahes Gewebe; F = tumorfernes Gewebe; Farbe hinterlegter Überschriften: Gelb = Messwerte von A. Raab, Grün = Messwerte von E. Holzweber, Flieder = im Rahmen der Diplomarbeit erhaltene Messwerte)**

	CDKN2A	RASSF1A	DAPK1	APC	MGMT	ER beta	ER alpha	
P1	T	35 43 31 29 46 43	1 0 2 1	0 1 0 0	4 3 0 0	79 89	94 95 93 94	
	N	24 28 26 28 30 29	0 1 0 0	3 2 0 0	5 3 0 0	44 58	94 94 92 92	
	F	29 28 32 40 31 28	1 1 2 0	3 4 0 0	4 4 12 1	70 78	94 96 94 94	
P2	T	42 37 36 33	8 7 10 10	7 7 16 13	3 3 0 0	76 78	97 97 95 97	
	N	21 19 19 21	3 3 3 2	5 5 0 0	4 4 0 0	66 70	92 95 94 94	
	F	33 42 35 30	0 7 9 0	5 1	12 12 0 1	4 7 3 7	57 73	91 96 93 95
P3	T	41 41 35 33	20 21 13 12 20 18	10 6 13 12	25 26 25 23	79 82 74 78	95 96 95 96	7 8
	N	18 14 12 11	12 13 5 5 10 10	2 2 4 2	10 14 13 13	82 85 74 76	96 97 92 97	5 6
	F	17 19 10 12	9 7 3 1 9 3	1 1 0 0	9 9 8 9	65 66 63 73	94 96 72 79	96 97
P4	T	21 30 13 11 34 34	2 2 1 1	2 3 0 0	0 0 0 0	80 82 59 62 84 104	90 90 95 96	24 26 25 31
	N	20 18 14 11 33 62	6 5 5 4	2 2 0 0	0 0 0 0	76 84 60 61 76 97	89 91 93 94	9 15 8 18
	F	17 21 10 12 34 34	2 2 1 1	1 0 0 0	0 0 0 0	53 67 51 58 77 106	88 89 93 94	7 9 0 14
P5	T	72 53 54 54 65 63	19 18 17 16	5 3 0 0	1 0 1 1	100 103 65 71	100 100 100 100	0 0
	N	15 15 10 9	5 6 4 2	2 2 2 0	0 0 1 1	64 81 61 66	97 97 94 96	1 1
	F	11 10 9 10	3 0 2 2	2 2 0 0	0 0 1 1	74 77 60 77	95 97 95 96	0 0
P6	T	28 32 36 29	1 1 2 2	0 0 0 0		54 83 78 84 85 86	97 97 94 98	2 4
	N	24 24 28 27	1 1 2 2	0 0		85 96 81 82 95 105	96 97 98 99	6 9
	F	33 27 34 46	1 1 2 2	0 0		44 106 82 87 65 95	97 98 99 99	7 9
P7	T	60 60	15 14	1 1		81 89 103 105	95 96	
	N	18 16	4 3			28 63 80 83	95 96	
	F	21 19	5 5			82 99 59 153	96 97	

Die *Tabelle 34* zeigt, dass die untersuchten Gene einen sehr unterschiedlichen Methylierungsgrad aufweisen. Manche Gene waren bei allen Patientinnen hoch methyliert, andere wiederum wiesen einen niedrigen Methylierungsgrad auf. Allerdings gibt es auch zwischen den verschiedenen Patientinnen einen großen Unterschied im Methylierungsgrad der untersuchten Gene.

Beim tumornahem und tumorfermem Gewebe befand sich der Methylierungsgrad von *CDKN2A* im mittleren Methylierungsbereich (10 % – 60 % methyliert). Generell war *CDKN2A* im Tumorgewebe höher methyliert, als im tumornahem und tumorfermem Gewebe.

Beim Gen *RASSF1A* waren alle analysierten Biopsieproben meist sehr gering methyliert, eine Ausnahme stellen hierbei die Probe 3 und 5 dar, wo der Methylierungsgrad im Tumorgewebe beinahe 20 % erreicht. Generell ist bei den meisten Patientinnen eine Abnahme des Methylierungsgrades vom Tumorgewebe zu den ferneren Gewebeproben zu erkennen.

Die Messwerte im Gen *DAPK1* zeigten bei allen Gewebeproben (Tumorgewebe, tumornahes und tumorfermes Gewebe) eine starke Streuung der DNA-Methylierung. Das Gen *DAPK1* lag bei den Proben von unterschiedlichen Patientinnen oft unmethyliert vor. Nur bei Patientin 3 konnte anhand der DNA-Methylierung zwischen Tumorgewebe, tumornahem und tumorfermem Gewebe unterschieden werden.

Das Gen *APC* war bis auf eine Probe (Patientin 3) sehr niedrig bis gar nicht methyliert. Bei der Biopsieprobe 3 konnte eine deutliche Unterscheidung zwischen Tumorgewebe, tumornahem und tumorfernem Gewebe festgestellt werden.

Für das Gen *MGMT* wurden bei verschiedenen HRM-Analysen sehr unterschiedliche Messwerte erhalten. Die starke Streuung der Messwerte ist darauf zurück zu führen, dass die entwickelte Methode eigentlich nicht geeignet ist, in stark methylierten Proben den Methylierungsgrad genau zu bestimmen.

Das Gen *ER $\beta$*  wies in allen Biopsieproben einen hohen Methylierungsgrad auf. Zwischen den verschiedenen Gewebetypen konnte kein Unterschied im DNA-Methylierungsgrad festgestellt werden.

Im Vergleich zu *ER $\beta$*  wies *ER $\alpha$*  eine sehr geringe Methylierung auf. Ein Unterschied in der Expression der beiden Östrogenrezeptoren wurde bereits von Speirs et al. [135] beschrieben. Im Zuge einer von Speirs et al. durchgeführten Studie [135] zur Bestimmung der Expression beider ER-Isoformen wurden 23 Proben von gesundem Brustgewebe sowie 60 Brustkrebsgewebeproben untersucht. Im gesunden Brustgewebe erfolgte bei 22 % der Patientinnen nur eine Expression von *ER $\beta$* . Im Tumorgewebe wurde eine alleinige Expression von *ER $\beta$*  bei keiner Probe beobachtet. Bei 27 % der Brusttumore erfolgte nur eine Expression von *ER $\alpha$*  [135].

Beim Gen *ER $\alpha$*  war bei zwei Proben (Probe 3 und 4) das Tumorgewebe stärker methyliert, als das tumornahe und tumorferne Gewebe.

## 6. Zusammenfassung

Die DNA-Methylierung in der Promotorregion von Tumorsuppressor-Genen ist ein sehr frühes Ereignis in der Kanzerogenese. Diese Hypermethylierung der Promotorregion führt in den meisten Fällen zur Stilllegung des jeweiligen Gens. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde der Methylierungsgrad von Brustkrebs-relevanten Genen in MCF-7 Zellen, sowie in Biopsieproben von Brustkrebspatientinnen, mittels der methylierungs-sensitiven hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse (MS-HRM) bestimmt. Es wurden spezielle Primerpaare für die ausgewählten Brustkrebs-relevanten Tumorsuppressor-Gene *CDH1* (Cadherin 1), *HIN-1* (High in Normal 1), *ER $\alpha$*  (Östrogenrezeptor  $\alpha$ ), *ER $\beta$*  (Östrogenrezeptor  $\beta$ ), sowie *MGMT* (O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase) entworfen und für den Einsatz in der MS-HRM Analyse optimiert. Für *CDH1* und *HIN-1* konnte kein geeignetes Primerpaar entworfen und für den Einsatz in der MS-HRM Analyse optimiert werden. Im Laufe dieser Diplomarbeit wurde die entwickelte Methode für das Gen *MGMT* als nicht robust eingestuft.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass lebensmittelrelevante Substanzen einen demethylierenden Effekt auf die DNA haben können. In dieser Diplomarbeit wurde untersucht, in wie weit ausgewählte Polyphenole ((-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), (+)-Lariciresinol, (-)-Matairesinol und Quercetin), sowie Hydralazin, den Methylierungsgrad in Brustkrebszellen verringern können. Polyphenole erfahren eine Auto-Oxidation. Um diesem oxidativen Stress und der dadurch induzierten Apoptose der MCF-7 Zellen entgegenzuwirken, wurde bei den Inkubationsversuchen mit den entsprechenden Polyphenolen das Enzym Katalase zur Stabilisierung hinzugefügt. Weiters wurden Inkubationsversuche mit EGCG in Gegenwart des Enzyms Superoxiddismutase (SOD) und der Zugabe von MgCl<sub>2</sub> durchgeführt. Die MCF-7 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen (1 – 100  $\mu\text{mol/l}$ ) der entsprechenden Substanzen 216 bzw. 96 Stunden lang inkubiert. Aus den MCF-7 Zellen wurde die DNA isoliert, Bisulfit-konvertiert und anschließend der Methylierungsgrad mittels MS-HRM Analyse ermittelt.

Bei den Inkubationsversuchen mit EGCG, sowie mit Quercetin, wurde eine Wachstumshemmung beobachtet. Bei der Inkubation von EGCG und Quercetin erfolgte bei einer Substanzkonzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  die Apoptose der Brustkrebszellen. Die Zugabe von SOD und Katalase während der Inkubation von MCF-7 Zellen mit EGCG hatte zur Folge, dass die Zellen nicht abstarben und auch bei

einer EGCG-Konzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  die DNA isoliert und ihr Methylierungsgrad bestimmt werden konnte.

Der Methylierungsgrad der folgenden Gene wurde ermittelt: *ER $\beta$*  (Östrogenrezeptor  $\beta$ ), *MGMT* (O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase), *CDKN2A* (Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A), *DAPK1* (Death-associated Protein Kinase 1) und *RASSF1A* (Ras-association Domain Family 1, Isoform A) untersucht. Die MS-HRM Methoden für die Gene *CDKN2A*, *DAPK1* und *RASSF1A* wurden von B. Werner [132], E. Habla [133] und A. Raab [134] entwickelt. Die Promotorregion der untersuchten Gene war in MCF-7 Zellen durchgehend hoch methyliert (Methylierungsgrad über 75 %). Die stärkste demethylierende Wirkung auf die *RASSF1A* Promotormethylierung in den Brustkrebszellen wurde durch die Inkubation mit (+)-Lariciresinol (5  $\mu\text{mol/l}$ ) in Gegenwart von Katalase erzielt. Beim Gen *RASSF1A* konnte beim Inkubationsversuch mit EGCG, SOD und Katalase bei einer höheren Konzentration (Konzentration über 10  $\mu\text{mol/l}$ ) ebenfalls eine Abnahme der DNA-Methylierung festgestellt werden.

Weiters wurde in dieser Diplomarbeit untersucht, in wie weit es bei Brustkrebspatientinnen einen Unterschied im Grad der Methylierung der Tumorgewebe-DNA, im Vergleich zu tumornahem bzw. tumorfernen Gewebe-DNA gibt. Es wurde der Methylierungsgrad der Gene *CDKN2A*, *RASSF1A*, *DAPK1*, *APC*, *MGMT*, *ER $\beta$*  und *ER $\alpha$*  auf eine mögliche DNA-Methylierung in der Promotorregion ermittelt. Der Methylierungsgrad in den Gewebeproben stellte sich als sehr genspezifisch heraus. Einige Gene wiesen in den Biopsieproben einen hohen Methylierungsgrad auf (*ER $\beta$*  und *MGMT*), andere Gene zeigten hingegen eine sehr geringe DNA-Methylierung (*APC*, *RASSF1A* und *ER $\alpha$* ). Weiters gab es auch zwischen den Patientinnen einen Unterschied in der DNA-Methylierung des jeweiligen Gens. Bei den Genen *CDKN2A*, *RASSF1A* und *ER $\alpha$*  konnte eine Abnahme der DNA-Methylierung zwischen Tumorgewebe und tumornahem bzw. tumorfernem Gewebe festgestellt werden.



## 7. Anhang

### ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
<i>APC</i>	Adenomatous Polyposis Coli
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
<i>BRCA1</i>	Breast Cancer 1
BSP-Primer	Primer für Bisulfit-behandelte DNA
C	Cytosin
<i>CDH1</i>	Cadherin 1
<i>CDKN2A</i>	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A
cDNA	komplementäre DNA
CpG	Cytosin-Guanin Basenabfolge
DAPI	4-6-Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid
<i>DAPK1</i>	Death-associated Protein Kinase 1
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNMTs	DNA-Methyltransferasen
DNS/DNA	Desoxyribonukleinsäure/deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EGCG	(-)-Epigallocatechin-3-gallat
<i>ER<math>\alpha</math>/ER<math>\beta</math></i>	Östrogenrezeptor $\alpha/\beta$
FKS	fetales Kälberserum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
G	Guanin
HER2	humaner epidermaler Wachstumsfaktor 2
<i>HIN-1</i>	High in Normal-1
HRM	hochauflösende Schmelzkurvenanalyse
kb	Kilo-Basenpaare
<i>MGMT</i>	O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MS-HRM	methylierungs-sensitive hochauflösende Schmelzkurvenanalyse
<i>MYOD1</i>	Myogenic Differentiation 1
MW	Mittelwert
nm	Nanometer
PBS	Phosphate Buffered Saline

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen	Penicillin
<i>RASSF1A</i>	Ras-association Domain Family 1, Isoform A
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI-1640	Zellkulturmedium
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SOD	Superoxiddismutase
Strep	Streptomycin
T	Thymin
$T_a$	Annealingtemperatur
$T_m$	Schmelztemperatur
U	Uracil

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: DNA-Methylierung am C-5 des Cytosins; aus [8].....	2
Abbildung 2: Erhaltung des DNA-Methylierungsmusters durch DNMT1; aus [13], modifiziert .....	3
Abbildung 3: De novo Methylierung durch DNMT3A und DNMT3B; aus [13], modifiziert .....	4
Abbildung 4: DNA-Methylierung katalysiert durch DNMT unter Anwesenheit des Methyl donors SAM; aus [14], modifiziert .....	4
Abbildung 5: Transfer der Methyl-Gruppe zum aktiven Zentrum von MGMT; aus [39], modifiziert.....	10
Abbildung 6: Schematisches Diagramm der DAPK-Proteinstruktur; aus [54].....	11
Abbildung 7: Netzwerk der H-Brückenbindungen von EGCG in der DNMT1; nach [70].....	14
Abbildung 8: Chemische Struktur der Polyphenol-Gruppen; aus [67], modifiziert .....	15
Abbildung 9: Grundstruktur der Flavonoide; aus [65].....	16
Abbildung 10: Einteilung der Flavonoide; aus [71].....	16
Abbildung 11: Struktur von EGCG; aus [75] .....	17
Abbildung 12: Mechanismus der Auto-Oxidation von EGCG; aus [78], modifiziert .....	18
Abbildung 13: Struktur von Quercetin; aus [81] .....	20
Abbildung 14: Struktur von Östradiol und dem Lignan Matairesinol; aus [83], modifiziert .....	20
Abbildung 15: Strukturformel von Phenylpropan; nach [85], modifiziert .....	21
Abbildung 16: Strukturformel von Enterodiol und Enterolakton; aus [87], modifiziert .....	21
Abbildung 17: Metabolismus von Lariciresinol; aus [91], modifiziert.....	22
Abbildung 18: Strukturformel von Hydralazin; aus [96], modifiziert.....	23
Abbildung 19: Ablauf eines PCR-Zyklus; aus [102], modifiziert.....	28
Abbildung 20: Temperaturprofil während einer PCR (D = Denaturierung, A = Annealing, E = Elongation); aus [102], modifiziert .....	30
Abbildung 21: Kinetik einer PCR-Reaktion; aus [102], modifiziert .....	30
Abbildung 22: Real Time-PCR mit einer Fluoreszenzsonde; aus [106], modifiziert.....	32
Abbildung 23: Real Time-PCR mit Fluoreszenzfarbstoff; aus [106], modifiziert .....	32
Abbildung 24: Schematische Darstellung der Bisulfit-Konvertierung; aus [110], modifiziert.....	34
Abbildung 25: Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren A und T, sowie G und C; aus [114], modifiziert .....	36
Abbildung 26: Schmelzprofil eines methylierten und unmethylierten Templats entlang eines Temperaturgradienten; aus [113], modifiziert .....	37
Abbildung 27: Schmelzpunkte einer Standardreihe aus methylierter und unmethylierter DNA; aus [111], modifiziert.....	38
Abbildung 28: Normalisierte Schmelzkurven einer durchgeführten Doppelbestimmung von Standards mit unterschiedlichem Methylierungsgrad; aus [111], modifiziert .....	39
Abbildung 29: Differenzialkurven im Bezug auf 0 % DNA-Standard; aus [115], modifiziert.....	40
Abbildung 30: Kalibriergerade; aus [115], modifiziert.....	40
Abbildung 31: Sterilbank (Laminar).....	41

Abbildung 32: Neubauer-Zählkammer zur Zellzahlbestimmung.....	44
Abbildung 33: Ein Eckquadrat der Neubauer-Zählkammer, mit lebenden (weiß) und toten Zellen; aus [119], modifiziert.....	44
Abbildung 34: Zählfeld der Neubauer-Zählkammer; aus [118].....	45
Abbildung 35: Ablauf der DNA-Extraktion mit QIAamp Mini Spin-Säulen; aus [121], modifiziert.....	50
Abbildung 36: NanoDrop Spektralphotometer; aus [122], modifiziert.....	51
Abbildung 37: Ablauf der Bisulfit-Konvertierung in MinElute DNA-Spin-Säulen; aus [109], modifiziert .....	55
Abbildung 38: Eingabefeld für die Nukleotid-Sequenz in der Methyl Primer Express Software.	56
Abbildung 39: Anzeige möglicher BSP-Primerpaare.....	57
Abbildung 40: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar ER $\alpha$ P1 ( $T_a = 55 \text{ }^\circ\text{C}$ ).....	72
Abbildung 41: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar ER $\alpha$ P1 ( $T_a = 55 \text{ }^\circ\text{C}$ ).....	73
Abbildung 42: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar ER $\alpha$ P1 ( $T_a = 51 \text{ }^\circ\text{C}$ ).....	73
Abbildung 43: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar ER $\alpha$ P2 ( $T_a = 53 \text{ }^\circ\text{C}$ ).....	74
Abbildung 44: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar ER $\alpha$ P2 ( $T_a = 53 \text{ }^\circ\text{C}$ ).....	74
Abbildung 45: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar ER $\beta$ P1 ( $T_a = 46 \text{ }^\circ\text{C}$ ).....	76
Abbildung 46: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar ER $\beta$ P1 ( $T_a = 51 \text{ }^\circ\text{C}$ ).....	76
Abbildung 47: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar ER $\beta$ P1 ( $T_a = 49 \text{ }^\circ\text{C}$ ).....	76
Abbildung 48: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar ER $\beta$ P1 ( $T_a = 49 \text{ }^\circ\text{C}$ ).....	77
Abbildung 49: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar ER $\beta$ P2 ( $T_a = 49 \text{ }^\circ\text{C}$ ).....	77
Abbildung 50: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar ER $\beta$ P2 ( $T_a = 52 \text{ }^\circ\text{C}$ ).....	78
Abbildung 51: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar ER $\beta$ P2 ( $T_a = 52 \text{ }^\circ\text{C}$ ).....	78
Abbildung 52: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar MGMP1 ( $T_a = 49 \text{ }^\circ\text{C}$ ).....	80
Abbildung 53: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar MGMP1 ( $T_a = 46 \text{ }^\circ\text{C}$ ).....	81
Abbildung 54: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar MGMP2 ( $T_a = 49 \text{ }^\circ\text{C}$ ).....	81

Abbildung 55: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar MGMTP2 ( $T_a = 51\text{ °C}$ ).....	82
Abbildung 56: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar MGMTP3 ( $T_a = 49\text{ °C}$ ).....	82
Abbildung 57: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar MGMTP3 ( $T_a = 55\text{ °C}$ ).....	83
Abbildung 58: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar MGMTP3 ( $T_a = 55\text{ °C}$ ).....	83
Abbildung 59: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar CDH1P1 ( $T_a = 54\text{ °C}$ ).....	84
Abbildung 60: Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar CDH1P1 ( $T_a = 54\text{ °C}$ ).....	85
Abbildung 61: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar CDH1P1 ( $T_a = 54\text{ °C}$ ).....	85
Abbildung 62: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar CDH1P1 ( $T_a = 54\text{ °C}$ , HRM-Analyse: 70 – 95 °C).....	86
Abbildung 63: Schmelzkurven (Ansicht $-dF/dT$ ) mit dem Primerpaar CDH1P1 ( $T_a = 54\text{ °C}$ , HRM-Analyse: 70 – 95 °C).....	86
Abbildung 64: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar CDH1P1 ( $T_a = 56\text{ °C}$ ).....	87
Abbildung 65: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar CDH1P1 ( $T_a = 56\text{ °C}$ , HRM-Analyse: 70 – 95 °C).....	87
Abbildung 66: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar HIN-1P1 ( $T_a = 55\text{ °C}$ ).....	89
Abbildung 67: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar HIN-1P2 ( $T_a = 53\text{ °C}$ ).....	89
Abbildung 68: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar HIN-1P2 ( $T_a = 53\text{ °C}$ ).....	90
Abbildung 69: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar ER $\beta$ P2 ( $T_a = 49\text{ °C}$ ), Zusatz an $MgCl_2 = 2\text{ mmol/l}$ .....	91
Abbildung 70: Schmelzkurven (Ansicht $-dF/dT$ ) mit dem Primerpaar ER $\beta$ P2 ( $T_a = 49\text{ °C}$ ); Zusatz an $MgCl_2 = 2\text{ mmol/l}$ .....	91
Abbildung 71: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar ER $\beta$ P2 ( $T_a = 55\text{ °C}$ ), Zusatz an $MgCl_2 = 2\text{ mmol/l}$ .....	92
Abbildung 72: Schmelzkurven (Ansicht $-dF/dT$ ) mit dem Primerpaar ER $\beta$ P2 ( $T_a = 55\text{ °C}$ ); Zusatz an $MgCl_2 = 2\text{ mmol/l}$ .....	92
Abbildung 73: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards, MCF-7 Zellen-DNA und Gewebeprouben-DNA mit dem Primerpaar ER $\beta$ P2 ( $T_a = 52\text{ °C}$ ); Zusatz an $MgCl_2 = 2\text{ mmol/l}$ .....	93
Abbildung 74: Schmelzkurven (Ansicht $-dF/dT$ ) mit dem Primerpaar ER $\beta$ P2 ( $T_a = 52\text{ °C}$ ); Zusatz an $MgCl_2 = 2\text{ mmol/l}$ .....	93

Abbildung 75: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar CDKN2A ( $T_a = 51 \text{ }^\circ\text{C}$ ); Zusatz an $\text{MgCl}_2 = 1,5 \text{ mmol/l}$ .....	94
Abbildung 76: Schmelzkurven (Ansicht $-dF/dT$ ) mit dem Primerpaar CDKN2A ( $T_a = 51 \text{ }^\circ\text{C}$ ); Zusatz an $\text{MgCl}_2 = 1,5 \text{ mmol/l}$ .....	94
Abbildung 77: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar CDKN2A ( $T_a = 51 \text{ }^\circ\text{C}$ ); Zusatz an $\text{MgCl}_2 = 3 \text{ mmol/l}$ .....	94
Abbildung 78: Schmelzkurven (Ansicht $-dF/dT$ ) mit dem Primerpaar CDKN2A ( $T_a = 51 \text{ }^\circ\text{C}$ ); Zusatz an $\text{MgCl}_2 = 3 \text{ mmol/l}$ .....	95
Abbildung 79: Schmelzkurven (Ansicht $-dF/dT$ ) mit dem Primerpaar ER $\beta$ P2 bei einer Temperaturerhöhung von $0,1 \text{ }^\circ\text{C} / 2 \text{ s}$ .....	96
Abbildung 80: Schmelzkurven (Ansicht $-dF/dT$ ) mit dem Primerpaar ER $\beta$ P2 bei einer Temperaturerhöhung von $0,05 \text{ }^\circ\text{C} / 2 \text{ s}$ .....	96
Abbildung 81: Normalisierte Schmelzkurven der DNA aus mit EGCG und SOD inkubierten MCF-7 Zellen für ER $\beta$ .....	101
Abbildung 82: Differentialgraf der DNA aus mit EGCG und SOD inkubierten MCF-7 Zellen für ER $\beta$ .....	101
Abbildung 83: Kalibriergerade für ER $\beta$ (für die Inkubation von MCF-7 Zellen mit EGCG und SOD).....	102
Abbildung 84: Methylierungsgrad von ER $\beta$ in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit EGCG. Mit EGCG + SOD und EGCG + SOD + Katalase wurden 2 unabhängige Inkubationsversuche durchgeführt. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von 2 unabhängigen MS-HRM Bestimmungen ( $n=4$ ) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die DMSO-Kontrolle, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p<0,05$ ; **: $p<0,01$ ; ***: $p<0,001$ ). .....	102
Abbildung 85: Normalisierte Schmelzkurven der DNA aus mit Lariciresinol und Katalase (K.) inkubierten MCF-7 Zellen für ER $\beta$ .....	103
Abbildung 86: Differentialgraf der DNA aus mit Lariciresinol und Katalase (K.) inkubierten MCF-7 Zellen für ER $\beta$ .....	103
Abbildung 87: Kalibriergerade für ER $\beta$ (für die Inkubation von MCF-7 Zellen mit Lariciresinol und Katalase) .....	104
Abbildung 88: Methylierungsgrad von ER $\beta$ in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Lariciresinol, Matairesinol und Quercetin. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von 2 unabhängigen MS-HRM Bestimmungen ( $n=4$ ) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die DMSO-Kontrolle, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p<0,05$ ; **: $p<0,01$ ; ***: $p<0,001$ ). .....	104
Abbildung 89: Normalisierte Schmelzkurven der DNA aus mit EGCG, SOD (S.) und Katalase (K.) inkubierten MCF-7 Zellen für MGMT (Analysentag 1) .....	106
Abbildung 90: Normalisierte Schmelzkurven der DNA aus mit EGCG, SOD (S.) und Katalase (K.) inkubierten MCF-7 Zellen für MGMT (Analysentag 2).....	106
Abbildung 91: Differentialgraf der DNA aus mit EGCG, SOD (S.) und Katalase (K.) inkubierten MCF-7 Zellen für MGMT (Analysentag 1) .....	107

<i>Abbildung 92: Differentialgraf der DNA aus mit EGCG, SOD (S.) und Katalase (K.) inkubierten MCF-7 Zellen für MGMT (Analysentag 2).....</i>	<i>107</i>
<i>Abbildung 93: Zwei Kalibriergeraden für MGMT (für die Inkubation von MCF-7 Zellen mit EGCG, SOD und Katalase (Analysentag 1 und 2)).....</i>	<i>108</i>
<i>Abbildung 94: Methylierungsgrad von MGMT in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit EGCG. Mit EGCG + SOD und EGCG + SOD + Katalase wurden 2 unabhängige Inkubationsversuche durchgeführt. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von 2 unabhängigen MS-HRM Bestimmungen (n=4) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die DMSO-Kontrolle, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: p&lt;0,05; **: p&lt;0,01; ***: p&lt;0,001).....</i>	<i>108</i>
<i>Abbildung 95: Methylierungsgrad von MGMT in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Lariciresinol, Matairesinol und Quercetin. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von 2 unabhängigen MS-HRM Bestimmungen (n=4) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die DMSO-Kontrolle, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: p&lt;0,05; **: p&lt;0,01; ***: p&lt;0,001).....</i>	<i>109</i>
<i>Abbildung 96: Normalisierte Schmelzkurven der DNA aus mit EGCG, SOD (S.) und Katalase (K.) inkubierten MCF-7 Zellen für CDKN2A.....</i>	<i>111</i>
<i>Abbildung 97: Differentialgraf der DNA aus mit EGCG, SOD (S.) und Katalase (K.) inkubierten MCF-7 Zellen für CDKN2A.....</i>	<i>111</i>
<i>Abbildung 98: Kalibriergerade für CDKN2A (für die Inkubation von MCF-7 Zellen mit EGCG, SOD und Katalase).....</i>	<i>112</i>
<i>Abbildung 99: Methylierungsgrad von CDKN2A in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit EGCG. Mit EGCG + SOD und EGCG + SOD + Katalase wurden 2 unabhängige Inkubationsversuche durchgeführt. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von 2 unabhängigen MS-HRM Bestimmungen (n=4) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die DMSO-Kontrolle, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: p&lt;0,05; **: p&lt;0,01; ***: p&lt;0,001).....</i>	<i>112</i>
<i>Abbildung 100: Methylierungsgrad von CDKN2A in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Hydralazin . Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von 2 unabhängigen MS-HRM Bestimmungen (n=4) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die DMSO-Kontrolle, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: p&lt;0,05; **: p&lt;0,01; ***: p&lt;0,001).....</i>	<i>113</i>
<i>Abbildung 101: Methylierungsgrad von DAPK1 in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit EGCG + SOD + Katalase. Es wurden 2 unabhängige Inkubationsversuche durchgeführt. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von 2 unabhängigen MS-HRM Bestimmungen (n=4) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die DMSO-Kontrolle, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: p&lt;0,05; **: p&lt;0,01; ***: p&lt;0,001).....</i>	<i>114</i>
<i>Abbildung 102: Normalisierte Schmelzkurven der DNA aus mit EGCG, SOD (S.) und Katalase (K.) inkubierten MCF-7 Zellen für RASSF1A.....</i>	<i>116</i>
<i>Abbildung 103: Differentialgraf der DNA aus mit EGCG, SOD (S.) und Katalase (K.) inkubierten MCF-7 Zellen für RASSF1A.....</i>	<i>116</i>
<i>Abbildung 104: Kalibriergerade für RASSF1A (für die Inkubation von MCF-7 Zellen mit EGCG, SOD und Katalase).....</i>	<i>117</i>

<i>Abbildung 105: Methylierungsgrad von RASSF1A in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit EGCG, SOD und Katalase. Es wurden 2 unabhängige Inkubationsversuche durchgeführt. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von 2 unabhängigen MS-HRM Bestimmungen (n=4) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die DMSO-Kontrolle, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: <math>p &lt; 0,05</math>; **: <math>p &lt; 0,01</math>; ***: <math>p &lt; 0,001</math>).</i>	117
<i>Abbildung 106: Normalisierte Schmelzkurven der DNA aus mit Lariciresinol und Katalase (K.) inkubierten MCF-7 Zellen für RASSF1A.</i>	118
<i>Abbildung 107: Differentialgraf der DNA aus mit Lariciresinol und Katalase (K.) inkubierten MCF-7 Zellen für RASSF1A.</i>	118
<i>Abbildung 108: Kalibriergerade für RASSF1A (für die Inkubation von MCF-7 Zellen mit Lariciresinol und Katalase).</i>	119
<i>Abbildung 109: Methylierungsgrad von RASSF1A in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Lariciresinol. Es wurden 2 unabhängige Inkubationsversuche durchgeführt. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von 2 unabhängigen MS-HRM Bestimmungen (n=4) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die DMSO-Kontrolle, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: <math>p &lt; 0,05</math>; **: <math>p &lt; 0,01</math>; ***: <math>p &lt; 0,001</math>).</i>	119
<i>Abbildung 110: Normalisierte Schmelzkurven mit den neuen Kontrollstandards für das Gen DAPK1.</i>	120
<i>Abbildung 111: Kalibriergerade für DAPK1 mit den neuen Kontrollstandards.</i>	121

## FORMELVERZEICHNIS

<i>Formel 1: Bestimmung der Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension .....</i>	<i>45</i>
<i>Formel 2: Bestimmung der DNA-Konzentration .....</i>	<i>52</i>
<i>Formel 3: Bestimmung der DNA-Reinheit.....</i>	<i>52</i>
<i>Formel 4: Berechnung der Primer-Schmelztemperatur; aus [102], modifiziert .....</i>	<i>58</i>
<i>Formel 5: Berechnung der Prüfgröße PG nach Nalimov; aus [129].....</i>	<i>63</i>

## TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: DNA-Sequenz vor bzw. nach der Bisulfit-Konvertierung; aus [109], modifiziert</i> .....	33
<i>Tabelle 2: Übersicht über die Inkubationsversuche mit ihren Stabilisatoren</i> .....	47
<i>Tabelle 3: Bisulfit-Konvertierungs-Ansatz für den EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit und den EpiTect Bisulfite Kit</i> .....	53
<i>Tabelle 4: Temperaturprogramm der Bisulfit-Konvertierung - Fast Bisulfite Kit im Vergleich zum Bisulfite Kit</i> .....	54
<i>Tabelle 5: Parametereinstellungen in der Methyl Primer Express Software</i> .....	57
<i>Tabelle 6: Methylierungsgrad der verwendeten Standards</i> .....	59
<i>Tabelle 7: Zusammensetzung des Master-Mix</i> .....	60
<i>Tabelle 8: Zusammensetzung des Reaktions-Mix</i> .....	60
<i>Tabelle 9: Temperaturprofil der MS-HRM Analyse</i> .....	61
<i>Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Chemikalien</i> .....	64
<i>Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Kits</i> .....	64
<i>Tabelle 12: Übersicht über die benötigten Zellkultur-Substanzen</i> .....	65
<i>Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten Geräte</i> .....	65
<i>Tabelle 14: Charakteristika des 2. Primerpaares für das Gen ER<math>\alpha</math></i> .....	68
<i>Tabelle 15: Übersicht über das Primerpaar ER<math>\alpha</math>P1 für das Gen ER<math>\alpha</math></i> .....	71
<i>Tabelle 16: Zusammenfassung der Bedingungen der MS-HRM Methoden für das Gen ER<math>\alpha</math></i> ... 72	
<i>Tabelle 17: Übersicht über die Primerpaare für das Gen ER<math>\beta</math></i> .....	75
<i>Tabelle 18: Zusammenfassung der Bedingungen der MS-HRM Methoden für das Gen ER<math>\beta</math></i> ... 75	
<i>Tabelle 19: Übersicht über die Primerpaare für das Gen MGMT</i> .....	79
<i>Tabelle 20: Zusammenfassung der Bedingungen der MS-HRM Methoden für das Gen MGMT80</i>	
<i>Tabelle 21: Übersicht über das Primerpaar CDH1P1 für das Gen CDH1</i> .....	84
<i>Tabelle 22: Zusammenfassung der Bedingungen der MS-HRM Methode für das Gen CDH1</i> .. 84	
<i>Tabelle 23: Übersicht über die Primerpaare für das Gen HIN-1, nach Avraham et al. [131]</i> ..... 88	
<i>Tabelle 24: Zusammenfassung der Bedingungen der MS-HRM Methoden für das Gen HIN-1</i> 88	
<i>Tabelle 25: Zusammenfassung der optimierten Bedingungen der entwickelten MS-HRM Methoden</i> .....	95
<i>Tabelle 26: Übersicht über den DNA-Methylierungsgrad (Mittelwert mit Standardabweichung) der untersuchten Gene in unbehandelten MCF-7 Zellen</i> .....	97
<i>Tabelle 27: Zusammenfassung der bereits entwickelten MS-HRM Methoden</i> .....	98
<i>Tabelle 28: Übersicht über die durchgeführten Inkubationsversuche und die Gene, deren Methylierungsgrad bestimmt wurde</i> .....	99
<i>Tabelle 29: Ergebnisse der Inkubationsversuche für das Gen ER<math>\beta</math></i> .....	100
<i>Tabelle 30: Ergebnisse der Inkubationsversuche für das Gen MGMT</i> .....	105
<i>Tabelle 31: Ergebnisse der Inkubationsversuche für das Gen CDKN2A</i> .....	110
<i>Tabelle 32: Ergebnisse des Inkubationsversuchs für das Gen DAPK1</i> .....	113

<i>Tabelle 33: Ergebnisse der Inkubationsversuche für das Gen RASSF1A</i> .....	115
<i>Tabelle 34: Übersicht über den DNA-Methylierungsgrad [%] von ausgewählten Genen in Biopsieproben von Brustkrebspatientinnen; (P = Patientin; T = Tumorgewebe; N = tumornahes Gewebe; F = tumorfernes Gewebe; Farbe hinterlegter Überschriften: Gelb = Messwerte von A. Raab, Grün = Messwerte von E. Holzweber, Flieder = im Rahmen der Diplomarbeit erhaltene Messwerte)</i> .....	122

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] “STATISTIK AUSTRIA - Krebserkrankungen”, *STATISTIK AUSTRIA*, 04-Feb-2013. [Online]. Available: [http://www.statistik.at/web\\_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/index.html](http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/index.html).
- [2] “STATISTIK AUSTRIA - Brust”, *STATISTIK AUSTRIA*, 04-Feb-2013. [Online]. Available: [http://www.statistik.at/web\\_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/brust/index.html](http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/brust/index.html).
- [3] R. G. Dumitrescu and M. Verma, in *Cancer Epigenetics: Methods and Protocols*, Humana Press, pp. 343–393, 2012.
- [4] M. Esteller, “An introduction to epigenetics”, in Esteller (Ed.) *Epigenetics in Biology and Medicine*, 1st ed., CRC Press, p. 1, 2008.
- [5] K. D. Robertson, “DNA methylation, methyltransferases, and cancer”, *Oncogene*, vol. 20, no. 24, pp. 3139–3155, 2001.
- [6] J. Tost, “DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker”, in Tost (Ed.) *DNA Methylation: Methods in Molecular Biology*, 2nd ed., Humana Press, pp. 3–22, 2009.
- [7] M. Esteller, “Impact of DNA methylation on health and disease”, in *DNA Methylation: Approaches, Methods, and Applications*, Taylor & Francis, pp. 1–10, 2004.
- [8] “Genomics & proteomics core facility - Methylation Analysis”, *dkfz. German Cancer Research Center in the Helmholtz Association*, 04-Mar-2013. [Online]. Available: <http://www.dkfz.de/gpcf/methylation.html>.
- [9] T. K. Wojdacz, A. Dobrovic, and L. L. Hansen, “Methylation-sensitive high-resolution melting”, *Nature Protocols*, vol. 3, no. 12, pp. 1903–1908, 2008.
- [10] A. Brero, H. Leonhardt, and M. C. Cardoso, “Replication and translation of epigenetic information”, in *DNA Methylation: Basic Mechanisms*, 1st ed., W. Doerfler and P. Böhm, Eds. Springer, pp. 21–44, 2006.
- [11] M. S. Kim, J. Lee, and D. Sidransky, “DNA methylation markers in colorectal cancer”, *Cancer Metastasis Reviews*, vol. 29, no. 1, pp. 181–206, 2010.
- [12] C. Brenner and F. Fuks, “DNA methyltransferases: facts, clues, mysteries”, in *DNA Methylation: Basic Mechanisms*, 1st ed., W. Doerfler and P. Böhm, Eds. Springer, pp. 45–66, 2006.
- [13] “epigenetic-dna-methylation-large.png 1.845x409 Pixel”, *atdbio*, 04-Mar-2013. [Online]. Available: <http://www.atdbio.com/img/articles/epigenetic-dna-methylation-large.png>.
- [14] “SAM.jpg 545x204 Pixel”, *University of Cambridge, DNA Methylation and Genome Stability*, 04-Apr-2013. [Online]. Available: [http://www-medchem.ch.cam.ac.uk/lab\\_rotations/images/sam.jpg](http://www-medchem.ch.cam.ac.uk/lab_rotations/images/sam.jpg).
- [15] S. A. Qureshi, M. U. Bashir, and A. Yaqinuddin, “Utility of DNA methylation markers for diagnosing cancer”, *International Journal of Surgery*, vol. 8, no. 3, pp. 194–198, 2010.
- [16] R. Radpour, Z. Barekati, C. Kohler, Q. Lv, N. Bürki, C. Diesch, J. Bitzer, H. Zheng, S. Schmid, and X. Y. Zhong, “Hypermethylation of tumor suppressor genes involved in critical regulatory pathways for developing a blood-based test in breast cancer”, *PLoS ONE*, vol. 6, no. 1, p. e16080, 2011.
- [17] A. T. Vo and R. M. Millis, “Epigenetics and breast cancers”, *Obstetrics and Gynecology International*, vol. 2012, pp. 1–10, 2012.
- [18] S. Dedeurwaerder, C. Desmedt, E. Calonne, S. K. Singhal, B. Haibe-Kains, M. Defrance, S. Michiels, M. Volkmar, R. Deplus, J. Luciani, F. Lallemand, D. Larsimont, J. Toussaint, S. Haussy, F. Rothé, G. Rouas,

- O. Metzger, S. Majjaj, K. Saini, P. Putmans, G. Hames, N. van Baren, P. G. Coulie, M. Piccart, C. Sotiriou, and F. Fuks, "DNA methylation profiling reveals a predominant immune component in breast cancers", *EMBO Molecular Medicine*, vol. 3, no. 12, pp. 726–741, 2011.
- [19] L. P. Blair and Q. Yan, "Epigenetic mechanisms in commonly occurring cancers", *DNA Cell Biology*, vol. 31, Suppl 1, pp. 49–61, 2012.
- [20] S. I. Khan, P. Aumsuwan, I. A. Khan, L. A. Walker, and A. K. Dasmahapatra, "Epigenetic events associated with breast cancer and their prevention by dietary components targeting the epigenome", *Chemical Research in Toxicology*, vol. 25, no. 1, pp. 61–73, 2012.
- [21] G.-E. Kim, K. H. Lee, Y. D. Choi, J. S. Lee, J. H. Lee, J. H. Nam, C. Choi, M. H. Park, and J. H. Yoon, "Detection of Slit2 promoter hypermethylation in tissue and serum samples from breast cancer patients", *Virchows Archiv*, vol. 459, no. 4, pp. 383–390, 2011.
- [22] J. R. Caldeira, É. C. Prando, F. C. Quevedo, F. A. Neto, C. A. Rainho, and S. R. Rogatto, "CDH1 promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer", *BioMed Central Cancer*, vol. 6, no. 1, p. 1–9, 2006.
- [23] Y.-J. Woo and K. L. Jang, "All-trans retinoic acid activates E-cadherin expression via promoter hypomethylation in the human colon carcinoma HCT116 cells", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 425, no. 4, pp. 944–949, 2012.
- [24] S. A. Shargh, "Evaluation of methylation modification in E-cadherin gene and its application in the improvement of breast cancer", *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 5, no. 16, 2011.
- [25] F. van Roy and G. Berx, "The cell-cell adhesion molecule E-cadherin", *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 65, no. 23, pp. 3756–3788, 2008.
- [26] R. van Horssen, A. Hollestelle, J. A. P. Rens, A. M. M. Eggermont, M. Schutte, and T. L. M. ten Hagen, "E-cadherin promoter methylation and mutation are inversely related to motility capacity of breast cancer cells", *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 136, no. 2, pp. 365–377, 2012.
- [27] B. J. Deroo, "Estrogen receptors and human disease", *Journal of Clinical Investigation*, vol. 116, no. 3, pp. 561–570, 2006.
- [28] F. F. Parl, *Estrogens, Estrogen Receptor and Breast Cancer*. IOS Press, 2000.
- [29] E. Anderson, "Progesterone receptors - animal models and cell signaling in breast cancer: The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis", *Breast Cancer Research*, vol. 4, no. 5, p. 197–201, 2002.
- [30] C. Lattrich, A. Stegerer, J. Häring, S. Schüller, O. Ortmann, and O. Treeck, "Estrogen receptor  $\beta$  agonists affect growth and gene expression of human breast cancer cell lines", *Steroids*, vol. 78, no. 2, pp. 195–202, 2013.
- [31] L. Van De Voorde, R. Speeckaert, D. Van Gestel, M. Bracke, W. De Neve, J. Delanghe, and M. Speeckaert, "DNA methylation-based biomarkers in serum of patients with breast cancer", *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, vol. 751, no. 2, pp. 304–325, 2012.
- [32] G. Lazennec, D. Bresson, A. Lucas, C. Chauveau, and F. Vignon, "ER $\beta$  inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells", *Endocrinology*, vol. 142, no. 9, pp. 4120–4130, 2001.
- [33] Sameer Mirza, Gayatri Sharma, Rajinder Parshad, Anurag Srivastava, Siddhartha Datta Gupta, and Ranju Ralhan, "Clinical significance of promoter hypermethylation of ER $\beta$  and RAR $\beta$ 2 in tumor and serum DNA in indian breast cancer patients", *Annals of Surgical Oncology*, vol. 19, no. 9, pp. 3107–3115, 2012.
- [34] O. Treeck, C. Lattrich, A. Springwald, and O. Ortmann, "Estrogen receptor beta exerts growth-inhibitory effects on human mammary epithelial cells", *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 120, no.

3, pp. 557–565, 2010.

- [35] Y. Gong, “Silence of HIN-1 expression through methylation of its gene promoter in gastric cancer”, *World Journal of Gastroenterology*, vol. 17, no. 4, p. 526–533, 2011.
- [36] C.-M. Ho, C.-J. Huang, C.-Y. Huang, Y.-Y. Wu, S.-F. Chang, and W.-F. Cheng, “Promoter methylation status of HIN-1 associated with outcomes of ovarian clear cell adenocarcinoma”, *Molecular Cancer*, vol. 11, no. 1, p. 1–14, 2012.
- [37] I. Krop, M. T. Parker, N. Bloushtain-Qimron, D. Porter, R. Gelman, H. Sasaki, M. Maurer, M. B. Terry, R. Parsons, and K. Polyak, “HIN-1, an inhibitor of cell growth, invasion, and AKT activation”, *Cancer Research*, vol. 65, no. 21, pp. 9659–9669, 2005.
- [38] T. Tomita and S. Kimura, “Regulation of mouse Scgb3a1 gene expression by NF-Y and association of CpG methylation with its tissue-specific expression”, *BioMed Central Molecular Biology*, vol. 9, no. 1, p. 1–15, 2008.
- [39] B. Kaina, G. P. Margison, and M. Christmann, “Targeting O6-methylguanine-DNA methyltransferase with specific inhibitors as a strategy in cancer therapy”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 67, no. 21, pp. 3663–3681, 2010.
- [40] S. L. Gerson, “MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics”, *Nature Reviews Cancer*, vol. 4, no. 4, pp. 296–307, 2004.
- [41] F. V. Jacinto and M. Esteller, “MGMT hypermethylation: A prognostic foe, a predictive friend”, *DNA Repair*, vol. 6, no. 8, pp. 1155–1160, 2007.
- [42] K. Munot, S. M. Bell, S. Lane, K. Horgan, A. M. Hanby, and V. Speirs, “Pattern of expression of genes linked to epigenetic silencing in human breast cancer”, *Human Pathology*, vol. 37, no. 8, pp. 989–999, 2006.
- [43] G. Sharma, S. Mirza, R. Parshad, A. Srivastava, S. D. Gupta, P. Pandya, and R. Ralhan, “Clinical significance of promoter hypermethylation of DNA repair genes in tumor and serum DNA in invasive ductal breast carcinoma patients”, *Life Sciences*, vol. 87, no. 3–4, pp. 83–91, 2010.
- [44] J. C. Neto, M. M. Ikoma, K. C. Carvalho, J. Vassallo, M. De Brot, H. Gobbi, F. A. Soares, and R. M. Rocha, “MGMT and PTEN as potential prognostic markers in breast cancer”, *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 92, no. 1, pp. 20–26, 2012.
- [45] M. P. Bihl, A. Foerster, A. Lugli, and I. Zlobec, “Characterization of *CDKN2A*(p16) methylation and impact in colorectal cancer: systematic analysis using pyrosequencing”, *Journal of Translational Medicine*, vol. 10, no. 1, p. 1–10, 2012.
- [46] H. Mitomi, N. Fukui, N. Tanaka, H. Kanazawa, T. Saito, T. Matsuoka, and T. Yao, “Aberrant p16INK4a methylation is a frequent event in colorectal cancers: prognostic value and relation to mRNA expression and immunoreactivity”, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 136, no. 2, pp. 323–331, 2010.
- [47] L. Kriegl, J. Neumann, M. Vieth, F. R. Greten, S. Reu, A. Jung, and T. Kirchner, “Up and downregulation of p16Ink4a expression in *BRAF*-mutated polyps/adenomas indicates a senescence barrier in the serrated route to colon cancer”, *Modern Pathology*, vol. 24, no. 7, pp. 1015–1022, 2011.
- [48] R. A. Hinshelwood, J. R. Melki, L. I. Huschtscha, C. Paul, J. Z. Song, C. Stirzaker, R. R. Reddel, and S. J. Clark, “Aberrant *de novo* methylation of the *p16INK4A* CpG island is initiated post gene silencing in association with chromatin remodelling and mimics nucleosome positioning”, *Human Molecular Genetics*, vol. 18, no. 16, pp. 3098–3109, 2009.
- [49] A. V. Bazarov, M. Van Sluis, W. C. Hines, E. Bassett, A. Beliveau, E. Campeau, R. Mukhopadhyay,

- W. J. Lee, S. Melodyev, Y. Zaslavsky, L. Lee, F. Rodier, A. Chicas, S. W. Lowe, J. Benhattar, B. Ren, J. Campisi, and P. Yaswen, “p16INK4a-mediated suppression of telomerase in normal and malignant human breast cells”, *Aging Cell*, vol. 9, no. 5, pp. 736–746, 2010.
- [50] S. Vallian, M. Sedaghat, I. Nassiri, and A. Frazmand, “Methylation status of *p16* INK4A tumor suppressor gene in Iranian patients with sporadic breast cancer”, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 135, no. 8, pp. 991–996, 2009.
- [51] Weizmann Institute of Science, “DAPK1 gene - genecards I DAPK1 protein I DAPK1 antibody”, *Gene Cards - The Human Gene Compendium*. [Online]. Available: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DAPK1>. [Accessed: 22-Jan-2013].
- [52] L. C. Pulling, M. J. Grimes, L. A. Damiani, D. E. Juri, K. Do, C. S. Tellez, and S. A. Belinsky, “Dual promoter regulation of death-associated protein kinase gene leads to differentially silenced transcripts by methylation in cancer”, *Carcinogenesis*, vol. 30, no. 12, pp. 2023–2030, 2009.
- [53] S. Pehlivan, M. Artac, T. Sever, H. Bozcuk, C. Kilincarslan, and M. Pehlivan, “Gene methylation of *SFRP2*, *P16*, *DAPK1*, *HIC1*, and *MGMT* and *KRAS* mutations in sporadic colorectal cancer”, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, vol. 201, no. 2, pp. 128–132, 2010.
- [54] R. Schneider-Stock, A. Roessner, and O. Ullrich, “DAP-kinase—Protector or enemy in apoptotic cell death”, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 37, no. 9, pp. 1763–1767, 2005.
- [55] I. A. Ahmed, C. M. Pusch, T. Hamed, H. Rashad, A. Idris, A. A. El-Fadle, and N. Blin, “Epigenetic alterations by methylation of *RASSF1A* and *DAPK1* promoter sequences in mammary carcinoma detected in extracellular tumor DNA”, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, vol. 199, no. 2, pp. 96–100, 2010.
- [56] T. H. Lee, C.-H. Chen, F. Suizu, P. Huang, C. Schiene-Fischer, S. Daum, Y. J. Zhang, A. Goate, R.-H. Chen, X. Z. Zhou, and K. P. Lu, “Death-associated protein kinase 1 phosphorylates pin1 and inhibits its prolyl isomerase activity and cellular function”, *Molecular Cell*, vol. 42, no. 2, pp. 147–159, 2011.
- [57] M. Ye, B. Xia, Q. Guo, F. Zhou, and X. Zhang, “Association of diminished expression of *RASSF1A* with promoter methylation in primary gastric cancer from patients of central China”, *BioMed Central Cancer*, vol. 7, no. 1, p. 1–7, 2007.
- [58] L. van der Weyden and D. J. Adams, “The Ras-association domain family (*RASSF*) members and their role in human tumorigenesis”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, vol. 1776, no. 1, pp. 58–85, 2007.
- [59] M. S. Song, S. J. Song, N. G. Ayad, J. S. Chang, J. H. Lee, H. K. Hong, H. Lee, N. Choi, J. Kim, H. Kim, J. W. Kim, E.-J. Choi, M. W. Kirschner, and D.-S. Lim, “The tumour suppressor *RASSF1A* regulates mitosis by inhibiting the APC–Cdc20 complex”, *Nature Cell Biology*, vol. 6, no. 2, pp. 129–137, 2004.
- [60] Y. Jiang, L. Cui, W. Chen, S. Shen, and L. Ding, “The prognostic role of *RASSF1A* promoter methylation in breast cancer: a meta-analysis of published data”, *PLoS ONE*, vol. 7, no. 5, p. e36780, 2012.
- [61] C. Alvarez, T. Tapia, V. Cornejo, W. Fernandez, A. Muñoz, M. Camus, M. Alvarez, L. Devoto, and P. Carvallo, “Silencing of tumor suppressor genes *RASSF1A*, *SLIT2*, and *WIF1* by promoter hypermethylation in hereditary breast cancer”, *Molecular Carcinogenesis*, p. 1–13, 2012.
- [62] A. Agathangelou, W. N. Cooper, and F. Latif, “Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers”, *Cancer Research*, vol. 65, no. 9, pp. 3497–3508, 2005.
- [63] V. Bissonauth, B. Shatenstein, and P. Ghadirian, “Nutrition and breast cancer among sporadic cases and gene mutation carriers: An overview”, *Cancer Detection and Prevention*, vol. 32, no. 1, pp. 52–64, 2008.
- [64] L. Daimiel, T. Vargas, and A. Ramírez de Molina, “Nutritional genomics for the characterization of the effect of bioactive molecules in lipid metabolism and related pathways”, *Electrophoresis*, vol. 33, no. 15,

pp. 2266–2289, 2012.

- [65] R. H. Liu, “Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action”, *The Journal of Nutrition*, vol. 134, no. 12, p. 3479S–3485S, 2004.
- [66] M. T. Mitjavila and J. J. Moreno, “The effects of polyphenols on oxidative stress and the arachidonic acid cascade. Implications for the prevention/treatment of high prevalence diseases”, *Biochemical Pharmacology*, vol. 84, no. 9, pp. 1113–1122, 2012.
- [67] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, and L. Jiménez, “Polyphenols: food sources and bioavailability”, *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 79, no. 5, pp. 727–747, 2004.
- [68] J. Sun, Y.-F. Chu, X. Wu, and R. H. Liu, “Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 25, pp. 7449–7454, 2002.
- [69] Y.-F. Chu, J. Sun, X. Wu, and R. H. Liu, “Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 23, pp. 6910–6916, 2002.
- [70] M. Z. Fang, Y. Wang, N. Ai, Z. Hou, Y. Sun, H. Lu, W. Welsh, and C. S. Yang, “Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines”, *Cancer Research*, vol. 63, no. 22, pp. 7563–7570, 2003.
- [71] A. Crozier, J. Burns, A. A. Aziz, A. J. Stewart, H. S. Rabiasz, G. I. Jenkins, C. A. Edwards, and M. E. Lean, “Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability”, *Biological Research*, vol. 33, no. 2, pp. 79–88, 2000.
- [72] N. Welsch and C. C. Liebmann, *Farben: Natur, Technik, Kunst*. Springer DE, 2012.
- [73] T. Hudson, “Green tea and women’s health”, *Alternative and Complementary Therapies*, vol. 13, no. 5, pp. 269–272, 2007.
- [74] L. L. Bennett, S. Rojas, and T. Seefeldt, “Role of antioxidants in the prevention of cancer”, *Journal of Experimental & Clinical Medicine*, vol. 4, no. 4, pp. 215–222, 2012.
- [75] “(-)-Epigallocatechin gallate - CAS Number 989-51-5”, *R&D Chemicals*, 15-Feb-2013. [Online]. Available: [http://www.rdchemicals.com/chemicals.php?mode=details&mol\\_id=7771](http://www.rdchemicals.com/chemicals.php?mode=details&mol_id=7771).
- [76] W. J. Lee, J.-Y. Shim, and B. T. Zhu, “Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids”, *Molecular Pharmacology*, vol. 68, no. 4, pp. 1018–1030, 2005.
- [77] C. Gros, J. Fahy, L. Halby, I. Dufau, A. Erdmann, J.-M. Gregoire, F. Ausseil, S. Vispé, and P. B. Arimondo, “DNA methylation inhibitors in cancer: recent and future approaches”, *Biochimie*, vol. 94, no. 11, pp. 2280–2296, 2012.
- [78] Z. Hou, S. Sang, H. You, M.-J. Lee, J. Hong, K.-V. Chin, and C. S. Yang, “Mechanism of action of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate: auto-oxidation-dependent inactivation of epidermal growth factor receptor and direct effects on growth inhibition in human esophageal cancer KYSE 150 cells”, *Cancer Research*, vol. 65, no. 17, pp. 8049–8056, 2005.
- [79] G. G. Habermehl and W. Ternes, *Naturstoffchemie: Eine Einführung*. Springer DE, 2008.
- [80] G. S. Kelly, “Quercetin”, *Alternative Medicine Review*, vol. 16, no. 2, pp. 172–194, 2011.
- [81] “Quercetin - CAS Number 117-39-5”, *R&D Chemicals*, 15-Feb-2013. [Online]. Available: [http://www.rdchemicals.com/chemicals.php?mode=details&mol\\_id=8185](http://www.rdchemicals.com/chemicals.php?mode=details&mol_id=8185).
- [82] M. Russo, C. Spagnuolo, I. Tedesco, S. Bilotto, and G. L. Russo, “The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: Facts and fancies”, *Biochemical Pharmacology*, vol. 83, no. 1, pp. 6–15, 2012.
- [83] L. S. Velentzis, J. V. Woodside, M. M. Cantwell, A. J. Leathem, and M. R. Keshtgar, “Do phytoestrogens reduce the risk of breast cancer and breast cancer recurrence? What clinicians need to know”, *European Journal of Cancer*, vol. 44, no. 13, pp. 1799–1806, 2008.

- [84] M. S. Touillaud, A. C. M. Thiébaud, A. Fournier, M. Niravong, M.-C. Boutron-Ruault, and F. Clavel-Chapelon, "Dietary lignan intake and postmenopausal breast cancer risk by estrogen and progesterone receptor status", *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 99, no. 6, pp. 475–486, 2007.
- [85] S. E. Kulling and B. Watzl, "Phytoöstrogene", vol. Ernährungs-Umschau 50, no. Heft 6, pp. 234–239, 2003.
- [86] N. M. Saarinen, A. Wärrä, R. P. M. Dings, M. Airio, A. I. Smeds, and S. Mäkelä, "Dietary lariciresinol attenuates mammary tumor growth and reduces blood vessel density in human MCF-7 breast cancer xenografts and carcinogen-induced mammary tumors in rats", *International Journal of Cancer*, vol. 123, no. 5, pp. 1196–1204, 2008.
- [87] "Linus Pauling Institute at Oregon State University", *OSU Oregon State University*, 15-Feb-2013. [Online]. Available: <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/lignans/mamlignans.html>.
- [88] L. U. Thompson, B. A. Boucher, Z. Liu, M. Cotterchio, and N. Kreiger, "Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestan", *Nutrition and Cancer*, vol. 54, no. 2, pp. 184–201, 2006.
- [89] S. E. McCann, K. C. Hootman, A. M. Weaver, L. U. Thompson, C. Morrison, H. Hwang, S. B. Edge, C. B. Ambrosone, P. J. Horvath, and S. A. Kulkarni, "Dietary intakes of total and specific lignans are associated with clinical breast tumor characteristics", *The Journal of Nutrition*, 2012.
- [90] U.-P. R. Ebermann and U.-P. I. Elmadafa, "Phenolische Verbindungen als Bestandteile von Lebensmitteln", in *Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung*, Springer Vienna, pp. 191–214, 2011.
- [91] I. Bondia-Pons, A.-M. Aura, S. Vuorela, M. Kolehmainen, H. Mykkänen, and K. Poutanen, "Rye phenolics in nutrition and health", *Journal of Cereal Science*, vol. 49, no. 3, pp. 323–336, 2009.
- [92] S. Abarzua, T. Serikawa, M. Szewczyk, D.-U. Richter, B. Piechulla, and V. Briese, "Antiproliferative activity of lignans against the breast carcinoma cell lines MCF 7 and BT 20", *Archives of Gynecology and Obstetrics*, vol. 285, no. 4, pp. 1145–1151, 2012.
- [93] M. Middeke, "Welches Medikament ist das richtige?", in *Bluthochdruck - endlich wieder gute Werte: Sind Sie medikamentös richtig versorgt?*, Georg Thieme Verlag, pp. 106–129, 2005.
- [94] S. Amatori, I. Bagaloni, B. Donati, and M. Fanelli, "DNA demethylating antineoplastic strategies: a comparative point of view", *Genes Cancer*, vol. 1, no. 3, pp. 197–209, 2010.
- [95] A. Nebbioso, V. Carafa, R. Benedetti, and L. Altucci, "Trials with 'epigenetic' drugs: an update", *Molecular Oncology*, vol. 6, no. 6, pp. 657–682, 2012.
- [96] "Hydralazine H716531", *TRC Toronto Research Chemicals Inc.*, 04-Apr-2013. [Online]. Available: [http://www.trc-canada.com/search\\_cat.php?Option=All&Find=Find&Search=H716531](http://www.trc-canada.com/search_cat.php?Option=All&Find=Find&Search=H716531).
- [97] B. Segura-Pacheco, C. Trejo-Becerril, E. Perez-Cardenas, L. Taja-Chayeb, I. Mariscal, A. Chavez, C. Acuña, A. M. Salazar, M. Lizano, and A. Dueñas-Gonzalez, "Reactivation of tumor suppressor genes by the cardiovascular drugs hydralazine and procainamide and their potential use in cancer therapy", *Clinical Cancer Research*, vol. 9, no. 5, pp. 1596–1603, 2003.
- [98] "Details: ACC-115", *Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*, 21-Feb-2013. [Online]. Available: [http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-115.html?tx\\_dsmzresources\\_pi5%5BreturnPid%5D=192](http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-115.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=192).
- [99] "FAQ 1.0 Mykoplasmen", *minvera biolabs*, 04-Feb-2013. [Online]. Available: <http://www.minverabiolabs.com/de/support/fehlersuche-und-faq/faq-10-mykoplasmen>.
- [100] T. Lindl and G. Gstraunthaler, "2.7 Mycoplasmen", in *Zell- und Gewebekultur: Von den Grundlagen zur Laborbank*, 6. Aufl. 2008., Spektrum Akademischer Verlag, pp. 37–49, 2008.

- [101] S. Agrawal, in *Techniques In Molecular Biology*, International Book Distributing Co., pp. 55–80; 113–117, 2008.
- [102] M. J. McPherson and S. G. Moller, in *PCR THE BASICS*, 2nd ed., Taylor & Francis, pp. 1–43, 68, 2006.
- [103] H. Schmidt and S. Rothhämel, “Polymerase-Kettenreaktion (PCR)”, in *Gentechnische Methoden*, M. Jansohn and S. Rothhämel, Eds. Spektrum Akademischer Verlag, pp. 135–171, 2012.
- [104] J. M. Walker and R. Rapley, in *Molecular Biology and Biotechnology*, 5th ed. 2009., Royal Society of Chemistry, pp. 83–87, 122–126, 2009.
- [105] W. J. Lennarz and M. D. Lane, “PCR (Polymerase Chain Reaction)”, *Encyclopedia of Biological Chemistry; Academic Press*, p. 208, 2004.
- [106] “Pathways I SABiosciences”, *Real-Time PCR for Systems Biology*, 14-Mar-2013. [Online]. Available: <http://www.sabiosciences.com/pathwaymagazine/pathways8/ppage14.php>.
- [107] “EvaGreen Product Information.” Biotium, 12-May-2007.
- [108] L. S. Kristensen and L. L. Hansen, “PCR-based methods for detecting single-locus DNA methylation biomarkers in cancer diagnostics, prognostics, and response to treatment”, *Clinical Chemistry*, vol. 55, no. 8, pp. 1471–1483, 2009.
- [109] “EpiTect® Fast Bisulfite Conversion Handbook.” Qiagen® Sample & Assay Technologies, 2012.
- [110] S. J. Clark, J. Harrison, C. L. Paul, and M. Frommer, “High sensitivity mapping of methylated cytosines.”, *Nucleic Acids Research*, vol. 22, no. 15, pp. 2990–2997, 1994.
- [111] T. K. Wojdacz and A. Dobrovic, “Melting curve assays for DNA methylation analysis”, *Methods in Molecular Biology*, vol. 507, pp. 229–240, 2009.
- [112] T. K. Wojdacz, L. L. Hansen, and A. Dobrovic, “A new approach to primer design for the control of PCR bias in methylation studies”, *BioMed Central Research Notes*, vol. 1, no. 1, p. 1–3, 2008.
- [113] T. K. Wojdacz, “Methylation-sensitive high-resolution melting in the context of legislative requirements for validation of analytical procedures for diagnostic applications”, *Expert Review of Molecular Diagnostics*, vol. 12, no. 1, pp. 39–47, 2012.
- [114] “Nucleic acid structure”, *atdbio*, 19-Mar-2013. [Online]. Available: <http://www.atdbio.com/content/5/Nucleic-acid-structure>.
- [115] F. Malentacchi, G. Forni, S. Vinci, and C. Orlando, “Quantitative evaluation of DNA methylation by optimization of a differential-high resolution melt analysis protocol”, *Nucleic Acids Research*, vol. 37, no. 12, p. 1–10, 2009.
- [116] S. Schmitz, “Steriltechnik und Subkultur”, in *Der Experimentator: Zellkultur*, Springer DE, pp. 87–101, 2011.
- [117] “Trypanblau (C.I. 23850): AppliChem - BioChemica.Chemica.Synthesis.Service”, *AppliChem*, 21-Feb-2013. [Online]. Available: <http://www.applichem.com/de/shop/produktdetail/as/trypanblau-ci-23850/>.
- [118] “The hemocytometer (counting chamber)”, *Microbehunter Microscopy Magazine*, 21-Feb-2013. [Online]. Available: <http://www.microbehunter.com/2010/06/27/the-hemocytometer-counting-chamber/>.
- [119] “neubauer\_improved\_with\_cells.jpg 1.280x960 Pixel”, *Academic dictionaries and encyclopedias*, 21-Feb-2013. [Online]. Available: [http://de.academic.ru/pictures/dewiki/110/neubauer\\_improved\\_with\\_cells.jpg](http://de.academic.ru/pictures/dewiki/110/neubauer_improved_with_cells.jpg).
- [120] “Marienfeld-Superior Zählkammer.” Marienfeld-Superior, 2010.
- [121] “QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook.” Qiagen® Sample & Assay Technologies, 2007.
- [122] “NanoDrop 2000c”, *peqlab*, 22-Feb-2013. [Online]. Available: [http://www.peqlab.at/images/ProdGroup/ND2000c\\_Pipette.jpg](http://www.peqlab.at/images/ProdGroup/ND2000c_Pipette.jpg).

- [123] “Nucleotide - NCBI”, *NCBI*, 26-Feb-2013. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>.
- [124] “OligoCalc: oligonucleotide properties calculator”, *Basic Sciences at Northwestern University Medical School*, 27-Feb-2013. [Online]. Available: <http://www.basic.northwestern.edu/biotoools/OligoCalc.html>.
- [125] “RNAfold web server”, *Vienna RNA WebServers*, 27-Feb-2013. [Online]. Available: <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>.
- [126] “Oligo Analyzer”, *Integrated DNA technologies*, 27-Feb-2013. [Online]. Available: <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>.
- [127] “uMelt - DNA Melting Curve Prediction - 2010 - Wittwer DNA Lab - All Rights Reserved”, *Wittwer DNA Lab at the University of Utah*, 27-Feb-2013. [Online]. Available: <https://dna.utah.edu/umelt/um.php>.
- [128] “EpiTect® HRM PCR Handbook.” Qiagen® Sample & Assay Technologies, 2009.
- [129] W. Gottwald, “Test nach Nalimov”, in *Statistik für Anwender*, 1st ed., Wiley-VCH, pp. 70–73, 1999.
- [130] “SigmaPlot-11-Handbuch, deutsch, Teil 2.” Justus-Liebig-Universität Giessen, Hochschulrechenzentrum (HRZ), 2013.
- [131] A. Avraham, R. Uhlmann, A. Shperber, M. Birnbaum, J. Sandbank, A. Sella, S. Sukumar, and E. Evron, “Serum DNA methylation for monitoring response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients”, *International Journal of Cancer*, vol. 131, no. 7, pp. E1166–E1172, 2012
- [132] B. K. Werner, “Analyse der Auswirkung lebensmittelrelevanter Substanzen auf die DNA-Methylierung mittels hochauflösender Schmelzkurvenanalyse”, Diplomarbeit, Universität Wien, 2012
- [133] E. Habla, “Bestimmung des Grades der Genpromotormethylierung mittels methylierungs-sensitiver hochauflösender Schmelzkurvenanalyse”, Diplomarbeit, Universität Wien, 2011
- [134] A. Raab, “Bestimmung des Methylierungsgrades Brustkrebs-relevanter Tumorsuppressorgene in vitro und in vivo mittels hochauflösender Schmelzkurvenanalyse”, Diplomarbeit, Universität Wien, 2013
- [135] V. Speirs, A. T. Parkes, M. J. Kerin, D. S. Walton, P. J. Carleton, J. N. Fox, and S. L. Atkin, “Coexpression of estrogen receptor alpha and beta: poor prognostic factors in human breast cancer?”, *Cancer Research*, vol. 59, no. 3, pp. 525–528, 1999

## CURRICULUM VITAE

VIKTORIA FACKLER

H Ä U S L B E R G 7

5231 SCHALCHEN

vikiF@gmx.at

0680 / 231 17 53

Geburtsdatum: 26. November 1988

Geburtsort: Braunau am Inn

Staatsbürgerschaft: Österreich

### AUSBILDUNG

---

- 10.2008 – 06.2013 UNIVERSITÄT WIEN  
Lehramtsstudium Chemie, Biologie und Umweltkunde  
Diplomarbeit:  
„Bestimmung des Methylierungsgrades von Brustkrebs-relevanten Genen in MCF-7 Zellen und Biopsieproben mittels methylierungs-sensitiver hochauflösender Schmelzkurvenanalyse“
- 02.2010 – 10.2012 TECHNISCHE UNIVERSITÄT WIEN  
Mitbelegung Lehrveranstaltungen Wahlfach Chemie
- 09.2003 – 06.2008 BUNDESHANDELSAKADEMIE BRAUNAU AM INN  
Fachrichtung SAP – Module CO, FI, MM, PP und SD  
Reifediplomprüfung mit gutem Erfolg

### BERUFSERFAHRUNG

---

- 04.2013 – 06.2013 AVENARIUS-AGRO BAUCHEMIE GmbH | Wels  
Erstellung von ÖNORM Prüfungsanweisungen; Projektarbeit zur Neuentwicklung von Rezepturen für Bitumenemulsionen zur Qualitätssteigerung und Verringerung der Herstellkosten
- 03.2013 – 06.2013 FAKULTÄT CHEMIE  
10.2012 – 01.2013 Tutorin Lebensmittelanalytisches Praktikum
- 10.2012 – 01.2013 FACHDIDAKTISCHES ZENTRUM FÜR CHEMIE  
Tutorin Chemische Schulversuche aus organischer Chemie
- 07.2012 – 09.2012 AVENARIUS-AGRO BAUCHEMIE GmbH | Wels  
Durchführung von DIN-Prüfungen, Zertifizierungen, Projektarbeit zur Neuentwicklung und Optimierung von Rezepturen für Bitumenemulsionen zur Qualitätssteigerung und Verringerung der Herstellkosten

07.2011 – 09.2011	SILTRONIC AG   Burghausen (DE) Oberflächenbearbeitung der Reinst-Siliciumwafer
07.2010 – 08.2010	MST OBERFLÄCHENTECHNIK GmbH   Uttendorf
07.2009 – 09.2009	Oberflächenveredelung von Aluminiumwerkstoffen durch Eloxierung,
08.2008 – 09.2008	Qualitätsprüfung nach DIN-Norm
02.2009 – 03.2009	VOGL CONNECTING CONTACTS   Mattighofen Ausstellerakquise für Fachmessen, Erstellung von Präsentationen und Statistiken
07.2008	FCI AUSTRIA GmbH   Mattighofen
08.2007	Montage
07.2006	TC MATTIGHOFEN Tenniscamp – Betreuung der TennisschülerInnen
07.2005	OBERBANK AG   Mattighofen Verwaltungsarbeiten
07.2004	SONNEN APOTHEKE   Mattighofen Medikamentenverwaltung, Mithilfe bei Tee- und Cremeherstellung

## PROJEKTARBEIT

---

09.2007 – 04.2008	AUSTRIA METALL AG   Ranshofen Entwicklung einer Softwarelösung zum automatisierten Preislistenvergleich als Schnittstelle zu SAP
09.2006 – 05.2007	TECHNO-Z INNVIERTEL GmbH   Braunau Optimierung einer auf MS Access basierenden Verwaltungssoftware

## AUSZEICHNUNGEN

---

Studienjahr 2010	UNIVERSITÄT WIEN Leistungsstipendium gemäß §§ 57-61 StudFG
Schuljahr 2007/2008	JUGEND INNOVATIV – AUSTRIA WIRTSCHAFTSSERVICE 1. Platz in der Kategorie BWL / VWL Projekt: „OMI – Orderbuch-, Materialstamm & Infosatz UPDATE - Tool zum automatisierten Preislistenvergleich als Schnittstelle zu SAP“ Partner: Austria Metall AG

## SPRACHEN

---

Englisch:	fließend
Italienisch:	Grundkenntnisse

**SOFTWARE**

---

SAP: 4-jährige Schulung in den Modulen CO, FI, MM, PP, SD  
MS Word, Excel, Powerpoint, Visio  
Betriebssysteme Windows und Mac OS X

**INTERESSEN**

---

Tennis (MeisterschaftsspielerIn), Laufen  
Naturwissenschaften, Reisen, Lesen, Nachrichten