



universität
wien

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

„Analyse der Auswirkung lebensmittelrelevanter
Substanzen auf die DNA-Methylierung mittels
hochauflösender Schmelzkurvenanalyse“

Verfasserin

Bettina Karin Werner BSc

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, Mai 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 066 862

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Masterstudium Chemie

Betreuerin / Betreuer:

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

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all jenen Personen danken, die mich in den letzten Jahren unterstützt haben.

Ich danke Ao. Univ. Prof. Margit Cichna-Markl für die tolle Betreuung meiner Arbeit. Besonders für die Hilfeleistung, wenn ich sie brauchte, aber auch für die Möglichkeit, selbständig Ideen zu entwickeln und in ihrer Umsetzung unterstützt zu werden.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die nette Aufnahme, die Hilfe und vor allem für den Spaß, den wir hatten.

Ein Dank geht an die Arbeitsgruppe des Instituts für Lebensmittelchemie und Toxikologie für die Ermöglichung des Arbeitens mit Zellkulturen, sowie Univ. Prof. Christoph Gerner für die Bereitstellung von MCF7 Zellen.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die alles ermöglicht haben. Ihre Unterstützung in jeder Hinsicht hat mich immer wieder aufgemuntert und motiviert. Ich danke euch, dass ihr immer für mich da seid und ich mich darauf verlassen kann, einen Rettungsanker zu haben.

Meinen Großeltern gilt ein Dank für ihr reges Interesse und ihren Glauben an mich.

Meinem Freund Christian, der mir immer zugehört, mich aufgemuntert hat und immer für mich da war, danke ich für alles. Selbst wenn ich unausstehlich war, hat er mich ausgehalten.

Ich danke auch allen meinen Freunden und Freundinnen, die mir die Studienzeit erleichtert und die mich auch mal abgelenkt haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Kanzerogenese	1
1.2	Epigenetik	4
1.2.1	DNA-Methylierung	4
1.2.2	DNA-Methylierung bei Krebserkrankungen	9
1.2.3	In der vorliegenden Arbeit untersuchte Gene	12
1.3	Einfluss der Ernährung auf die DNA-Methylierung	16
1.3.1	Phytoöstrogene	18
1.3.2	Lignane	19
1.3.3	Isoflavone	21
1.3.4	Flavonole	22
1.3.5	Bisphenol A	24
1.3.6	Heterocyclische aromatische Amine	24
1.3.7	Mykotoxine	26
1.3.8	Methylierungsinhibitoren als Arzneimittel	28
2	Zielsetzung	30
3	Theoretischer Hintergrund	31
3.1	Die Polymerase Kettenreaktion	31
3.1.1	Beispiel für ein PCR-Protokoll	34
3.1.2	Kinetik der Polymerase Kettenreaktion	34
3.1.3	Real-Time PCR	36
3.1.4	PCR Methoden zur Analyse der DNA-Methylierung	39
3.2	Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (HRM)	42
3.2.1	DNA Schmelzkurven	42

3.2.2	Methylierungssensitive Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse	43
3.3	MethyLight	48
3.3.1	Vergleich der MS-HRM mit MethyLight	50
4	Ergebnisse und Diskussion	53
4.1	Entwerfen von Primern für die hochauflösende Schmelzkurvenanalyse	53
4.1.1	Allgemeine Regeln für das Primerdesign	53
4.1.2	Primerpaare für die MS-HRM	54
4.2	Optimierung der Methode für CDKN2A	67
4.2.1	Bestimmung der Annealing-Temperatur	67
4.2.2	Einfluss der MgCl ₂ -Konzentration	69
4.2.3	Optimierung der Methode für DAPK1	70
4.3	Validierung der MS-HRM	72
4.3.1	Reproduzierbarkeit der MS-HRM	72
4.3.2	Reproduzierbarkeit der Bisulfit-Konvertierung	74
4.3.3	Richtigkeit der MS-HRM	75
4.4	DNA-Methylierungsgrad der Promotorregion verschiedener Gene in HT29 Zellen	80
4.5	Ergebnisse der Inkubationsversuche mit HT29 Zellen	81
4.5.1	5-Aza-2'-Desoxycytidin	81
4.5.2	(+)-Lariciresinol und (-)-Matairesinol	83
4.5.3	MeIQx und PhIP	84
4.5.4	Desoxynivalenol und Zearalenon	85
4.5.5	Bisphenol A	86
4.5.6	Daidzein	87
4.5.7	Genistein	87
4.5.8	Quercetin	91
4.5.9	Bestimmung des Methylierungsgrads der Promotorregion von CDKN2A mittels MethyLight	93
4.5.10	Biologische Varianz	94

4.6	DNA-Methylierungsgrad der Promotorregion verschiedener Gene in MCF7 Zellen	94
4.7	Ergebnisse der Inkubationsversuche mit MCF7 Zellen	95
4.7.1	5-Aza-2'-Desoxycytidin	95
4.7.2	Genistein	98
4.7.3	Bisphenol A	100
4.7.4	Daidzein	102
4.7.5	Quercetin	104
5	Experimentelles	107
5.1	Zellkultur	107
5.1.1	Arbeiten unter der sterilen Werkbank	107
5.1.2	Kultivierung der Zellen	108
5.1.3	Mediumwechsel	110
5.1.4	Subkultivierung	110
5.1.5	Ausstreuung der Zellen	112
5.1.6	Inkubationsversuche	113
5.2	DNA Isolierung	115
5.2.1	Durchführung	116
5.2.2	Konzentrationsbestimmung der DNA	117
5.3	Bisulfit-Konvertierung	117
5.4	Durchführung der PCR-Versuche	120
5.4.1	Vermeidung von Kontaminationen	120
5.4.2	Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse	120
5.4.3	MethyLight	128
5.5	Chemikalien	130
5.6	Verwendete Kits	130
5.7	Zellkulturbedarf	131
5.8	Geräte	131
6	Zusammenfassung	132

7 Anhang	I
Abkürzungsverzeichnis	I
Rohdaten	III
Abbildungsverzeichnis	XII
Tabellenverzeichnis	XVII
Formelverzeichnis	XVIII
Literaturverzeichnis	XVIII
Lebenslauf	XXVIII

1 Einleitung

In den westlichen Ländern ist Krebs nach Herz-Kreislauf Erkrankungen die häufigste Todesursache. Im Jahr 2008 wurden allein in Österreich rund 35.000 Neuerkrankungen dokumentiert. [1] Allerdings konnten die Heilungschancen durch Fortschritte in Diagnose und Therapie stark gesteigert werden. Betrachtet man alle Krebsarten zusammen, liegt die Überlebensrate der Patienten nach fünf Jahren bei 64 %. [2]

Die Ursachen für eine Krebserkrankung können vielseitig sein, wobei es sich sowohl um externe Faktoren wie Umwelteinflüsse, Chemikalien oder radioaktive Strahlung, oder auch interne Faktoren wie Defekte des Immunsystems oder genetische Veranlagungen handeln kann. Die Lebensführung trägt wesentlich zum Krebsrisiko bei, so erhöhen Rauchen oder eine fettreiche und ballaststoffarme Ernährung das Risiko an Krebs zu erkranken. Diese individuellen Unterschiede zusammen mit der Vielzahl an externen Faktoren machen es unmöglich, alle Ursachen für eine Erkrankung ausschalten zu können. Daher ist es wichtig, eine frühe Erkennung der Krebserkrankung zu ermöglichen. Das Verständnis der Biologie der Krebszelle ist dafür besonders wichtig und die Erforschung der genetischen und epigenetischen Veränderungen spielt dabei eine zentrale Rolle. [1] [3]

1.1 Kanzerogenese

Krebs ist die Bezeichnung für eine Gruppe von Krankheiten in multizellulären Organismen. Er wird definiert als anormales Wachstum von Zellen, welches durch mannigfaltige Veränderungen in der Genexpression hervorgerufen wird. Dadurch kommt es zu einer Störung des Gleichgewichts zwischen Zellwachstum und -tod, woraus sich schlussendlich eine Population von Zellen entwickelt, die in das umliegende Gewebe eindringen und an entlegeneren Stellen metastasieren können. [1]

Weltweit wurde bei rund 7,6 Millionen Todesfällen Krebs als Ursache identifiziert. [4] Allein in Österreich starben 2009 fast 20.000 Personen an einer bösartigen Neubildung (entspricht etwa einem Viertel aller Sterbefälle), womit Krebs nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache darstellt. Die Krebslokalisationen hängen in ihrer Häufigkeit

Einleitung

stark vom Geschlecht ab. So werden bei Frauen bevorzugt Brusttumore, bei Männern Prostatakrebs gefunden (vergleiche Tabelle 1). [2]

**Tabelle 1: Darstellung der häufigsten Tumorlokalisationen nach dem Geschlecht.
Modifiziert nach [1] und [2]**

Männer			Frauen	
Häufigkeit	Tumorlokalisation		Tumorlokalisation	Häufigkeit
24,0 %	Prostata	Brust	27,6 %	
14,7 %	Lunge	Darm	12,2 %	
13,4 %	Darm	Lunge	8,8 %	
7,0 %	Blutbildendes System	Gebärmutter	7,4 %	
5,9 %	Harnblase	Blutbildendes System	7,2 %	
3,8 %	Magen	Bauchspeicheldrüse	4,4 %	
18.306 = 100 %		16.562 = 100 %		

Die Kanzerogenese, d.h. die Krebsentstehung, ist ein komplexer Mechanismus, der oft mit der Mutation von Genen beginnt. Es handelt sich dabei entweder um sogenannte Protoonkogene, die durch die Veränderung ihrer Gensequenz zu Onkogenen werden, oder um Tumorsuppressorgene. Protoonkogene sind Gene, die an Zellwachstum, -teilung oder -differenzierung beteiligt sind und durch die Mutation in ihrer Funktion gestört werden. Tumorsuppressorgene haben eine regulatorische Wirkung im Zellzyklus und in der Apoptose. Sie werden entweder ebenfalls genetisch verändert oder ihre Transkription wird unterdrückt. [1]

Mutationen und epigenetische Veränderungen stehen am Anfang der Krebsentstehung und bilden den Schritt der Initiation im Dreistufenmodell der Kanzerogenese. Dieses Modell, dargestellt in Abbildung 1, beschreibt den Weg von einer gesunden Zelle zu einem bösartigen Tumor in drei Schritten, der Initiation, Promotion und Progression. Nach der Initiation kann die geschädigte DNA repariert werden oder die Zelle wird in die Apoptose geleitet. Geschieht dies nicht, wird die Veränderung durch Zellteilung weitergegeben. Es kommt zur Promotionsphase, in der diese Zellen einen Wachstumsstimulus erhalten und sich in gesteigerter Weise teilen. So kommt es zu einer Gewebswucherung, einem Tumor. Tumore können in zwei Gruppen unterteilt werden, die gutartigen (benignen) und die bösartigen (malignen) Tumore. Es wird in der Kanzerogenese stets zuerst ein benigner Tumor gebildet, der im Laufe der Progression zu einem malignen Tumor weiterentwickelt werden kann. Der umgekehrte Weg, also die Umwandlung eines bösartigen in einen gutartigen Tumor ist nicht

Einleitung

möglich. Nach der Promotion kann es zur Progression kommen, während der noch weitere Mutationen auftreten. Es werden Tumorsuppressorgene inaktiviert und Onkogene aktiviert, wodurch die Zelle einen weiteren Wachstumsstimulus erfährt. Die Zellen teilen sich nun ungehemmt und werden als „unsterblich“ bezeichnet. Dieses Gewebe wird als maligner Tumor bezeichnet und unterscheidet sich von einem benignen Tumor dadurch, dass er in das umliegende Gewebe eindringt und auch Metastasen bilden kann. Gutartige Tumore besitzen immer eine klare Abgrenzung zum gesunden Gewebe und werden dann lebensbedrohlich, wenn sie durch ihre Größe andere Organe stören oder sonstige Schäden verursachen. Bösartige Tumore führen bei fehlender Behandlung zum Tode des Trägers. [3] [5]

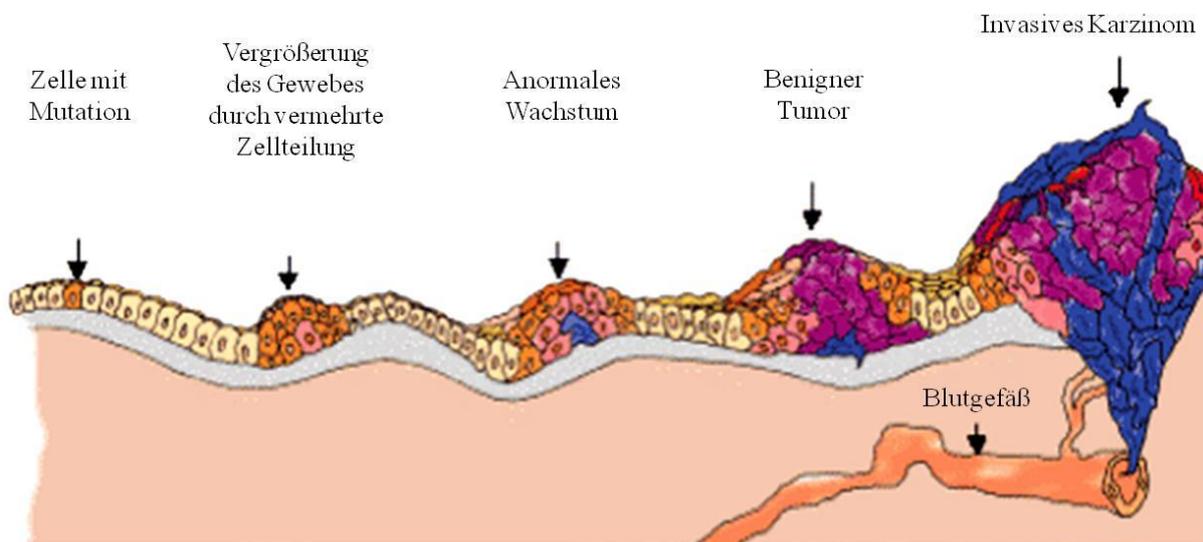


Abbildung 1: Entstehung eines malignen Tumors aus einer mutierten Zelle. Modifiziert nach [6]

Die Ursachen einer Mutation oder einer epigenetischen Veränderung können vielfältig sein. In den wenigsten Fällen kann eine genetische Erbanlage allein für die Krebsentstehung verantwortlich gemacht werden. Viel häufiger kommt es zu einer Exposition gegenüber einem Karzinogen. Dies kann eine natürlich umweltbedingte oder auch anthropogen verursachte Exposition sein, zum Beispiel gegenüber chemischen Schadstoffen im Trinkwasser oder Zigarettenrauch. Ob es zur Krebsentstehung kommt, hängt von der Anfälligkeit der Person ab und davon, wie sehr sie solchen Faktoren ausgesetzt ist. Das Krebsrisiko wird stark von Faktoren wie dem Alter, der ethnischen Herkunft, dem Geschlecht, der Funktion des Immunsystems, bereits vorhandenen Krankheiten und auch von der Ernährungsweise beeinflusst. [3]

1.2 Epigenetik

In multizellulären Organismen trägt jede einzelne Zelle dasselbe genetische Erbgut, das in der DNA-Sequenz kodiert ist. Trotzdem zeigen Zellen eine große Vielfalt in ihrer Morphologie und in ihrer Funktionalität. Dies lässt sich durch die unterschiedliche Expression der einzelnen Gene erklären. [7]

Es gibt zwei Arten der Information im Genom, die genetische und die epigenetische. K. Robertson beschreibt den Unterschied folgendermaßen: „Die genetische Information stellt den Bauplan für die Anfertigung aller Proteine, die nötig sind, um ein lebendes Ding zu schaffen, bereit. Die epigenetische hingegen gibt Angabe, wie, wo und wann die genetische Information genutzt werden soll.“ [8] Epigenetische Prozesse sorgen also dafür, dass Gene zur richtigen Zeit ein- und ausgeschaltet sind. Die drei generellen Modifikationen, die dafür benutzt werden, sind DNA-Methylierung, Histonmodifikationen und Chromatin Remodeling. [9]

Um die Epigenetik vollständig zu beschreiben, kann folgende Definition herangezogen werden: Es handelt sich um die Erforschung vererbbarer Veränderungen eines Phänotyps, wie zum Beispiel der Genexpression in einer bestimmten Zelle, die nicht auf einer Änderung der Nukleotidsequenz des genetischen Codes basieren. Bei epigenetischen Mechanismen wird die Basenabfolge der DNA nicht variiert, während dies bei genetischen Veränderungen sehr wohl der Fall ist. [7]

Ein wichtiger epigenetischer Prozess in Säugerzellen ist die DNA-Methylierung. Es handelt sich dabei um die kovalente Addition einer Methylgruppe an die DNA Base Cytosin und einen wichtigen Mechanismus zur Regulation der Genexpression. [8]

1.2.1 DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung ist eine Modifikation an der DNA Base Cytosin, bei der durch kovalente Addition einer Methylgruppe 5-Methylcytosin entsteht. 5-Methylcytosin kommt in der DNA aller Wirbeltiere und Blütenpflanzen vor, sowie in manchen Pilzen, Wirbellosen und Bakterien. Die Anbringung der Methylgruppe geschieht durch DNA-(Cytosin-5)-Methyltransferasen, es handelt sich also um einen enzymatischen Prozess. [10]

Einleitung

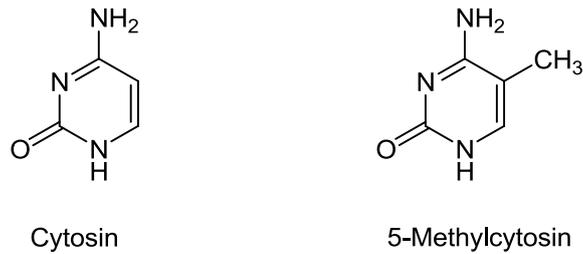


Abbildung 2: Cytosin und das in Position 5 des Pyrimidin Rings methylierte 5-Methylcytosin (modifiziert nach [11])

Die DNA-Methylierung ist eine stabile, epigenetische Markierung, die eine regulatorische Wirkung auf die Chromatinstruktur und die Genexpression hat. Während bei prokaryotischen Lebewesen die DNA-Methylierung vorwiegend dem Schutz vor Fremd-DNA dient, scheint bei den höher entwickelten Säugetieren die Regulation der Transkription im Vordergrund zu stehen. Die Beeinflussung der Genexpression kommt in Vorgängen wie der genomischen Prägung und damit auch der X Chromosom Inaktivierung und der Stilllegung von repetitiven, nicht kodierenden DNA Sequenzen zum Tragen. [10] [12]

Die Methylierung von Cytosin geschieht bevorzugt in CpG Dinukleotiden (Cytosin – Phosphat – Guanin – Dinukleotid). [13] Besonders isolierte CpG Dinukleotide sind in gesundem Gewebe häufig methyliert, im Unterschied zu Cytosinen in CpG Inseln, die meist unmethyliert vorliegen. [14] CpG Dinukleotide sind im Genom unterrepräsentiert, wahrscheinlich, da sie sehr leicht mutiert werden: methylierte CpG Dinukleotide können zu TpG Dinukleotiden (Thymin – Phosphat – Guanin) desaminiert werden. CpG Inseln sind Regionen in der DNA, die besonders reich an Cytosin – Phosphat – Guanin - Dinukleotiden sind. Definitionsgemäß muss ein Cytosin/Guanin Gehalt von über 50 % vorliegen. [7] CpG Inseln sind ungefähr 1.000 bis 4.000 Basenpaare (bp) lang und befinden sich bevorzugt in Promotoren und dem ersten Exon bzw. an 5' Enden von Genen. [8] [14] Im menschlichen Genom wurden ca. 27.800 CpG Inseln gefunden und ungefähr 60 % aller menschlichen Gene besitzen CpG Inseln nahe ihrer 5' Enden. CpG Inseln findet man sowohl in gewebsspezifischen Genen als auch in Haushaltsgenen (engl. housekeeping genes). Sie sind in normalen Zellen in allen Geweben unmethyliert oder schwach und variabel methyliert. [10] Werden aber CpG Dinukleotide in Promotorregionen von Genen methyliert, geschieht dies zur Allel - spezifischen Inaktivierung dieser Gene, wie zum Beispiel bei der Stilllegung eines X Chromosoms. [8] Es muss dazu aber angemerkt werden, dass der unmethylierte Status einer CpG Insel nicht unbedingt bedeutet, dass dieses Gen transkribiert wird. Viel eher sagt es aus, dass das Gen potentiell aktiviert werden kann. Genauso induziert das Vorhandensein einer Methylierung nicht, dass es zu einer Stilllegung des Genes kommt. Erst wenn es zur

Hypermethylierung der spezifischen Kernregion des Promotors kommt, wird die Expression modifiziert. [7]

Es ist wichtig anzumerken, dass es sich bei der DNA-Methylierung um einen reversiblen Prozess handelt. Gerade in der embryonalen Entwicklung kommt es zu einer aktiven Demethylierung der DNA. Die Mechanismen für die globale und die genspezifische Demethylierung sind allerdings nicht bekannt. [7]

1.2.1.1 Die genomische Prägung

Bei der genomischen Prägung, dem sogenannten „imprinting“, handelt es sich um eine Art der nicht-Mendelschen Vererbung. Dieser epigenetische Prozess kommt in höheren Säugetieren, Beuteltieren und höheren Pflanzen vor. Abhängig von der Herkunft (von der Mutter oder dem Vater) werden während der Entwicklung einzelne Gene unterschiedlich expremiert. Die regulierten Gene werden im Laufe der Keimbahn markiert und die „Erinnerung“ an die elterliche Herkunft führt dann zu einer unterschiedlichen Expression der Allele. Um die genomische Prägung entwickeln und aufrecht erhalten zu können, ist die DNA-Methylierung ein grundlegender Mechanismus. Vergleicht man die elterlichen Allele eines genomisch geprägten Gens, zeigen sich Unterschiede in der DNA-Methylierungsweise. Die Regionen, welche diese Unterschiede enthalten, sind normalerweise CpG reich und entsprechen den Kriterien von CpG Inseln. Wird eine Deletion dieses Bereichs durchgeführt, geht die genomische Prägung des Gens verloren. [13]

1.2.1.2 DNA-Methylierung in der X Chromosom Inaktivierung

Die X Chromosom Inaktivierung ist ein Vorgang, bei dem eines der beiden X Chromosomen bei Frauen stillgelegt wird. Frauen haben, im Gegensatz zu Männern, nicht ein Y und ein X Chromosom, sondern zwei X Chromosomen. Um die damit verbundene doppelte Menge an X chromosomalen Genen auszugleichen, wird ein Chromosom inaktiviert. Dies geschieht bei Säugetieren durch DNA-Methylierung. Die CpG Inseln in einem der beiden Chromosome werden dazu im Embrio *de novo* methyliert. [13][15]

1.2.1.3 DNA-Methyltransferasen

Die DNA-Methylierung ist ein enzymatischer Prozess, der von sogenannten DNA-Methyltransferasen (DNMT) durchgeführt wird. Bei Säugetieren wurden drei Familien von Methyltransferasen gefunden, die sich ihrem Aufbau nach unterscheiden: DNMT1, DNMT2 und DNMT3. Das Muster der Cytosin-Methylierung wird praktisch aber nur von drei unabhängig kodierten Enzymen etabliert; dies sind DNMT1, DNMT3A und DNMT3B. [8]

Im Laufe des Zellzyklus wird die DNA repliziert, wobei aber nur die Basenabfolge kopiert wird. Dabei entsteht sogenannte hemimethylierte DNA, bei der der Matrizen-Strang methyliert und der neu gebildete Strang unmethyliert ist. Um die epigenetische Information der DNA-Methylierung weiterzugeben, muss das Muster vervollständigt werden, was in der S-Phase des Zellzyklus geschieht. [9] Das Enzym DNMT1 ist vorwiegend für diese Ergänzung zuständig, wobei sie hemimethylierte DNA erkennt und die fehlenden Methylgruppen so addiert, dass eine mit dem Ausgangsstrang idente Kopie entsteht (siehe Abbildung 3). [16] DNMT1 methyliert hemimethylierte Substrate 5- bis 30-mal schneller als unmethylierte. Sie wird deshalb oft als „aufrechterhaltende“ Methyltransferase bezeichnet. [8]

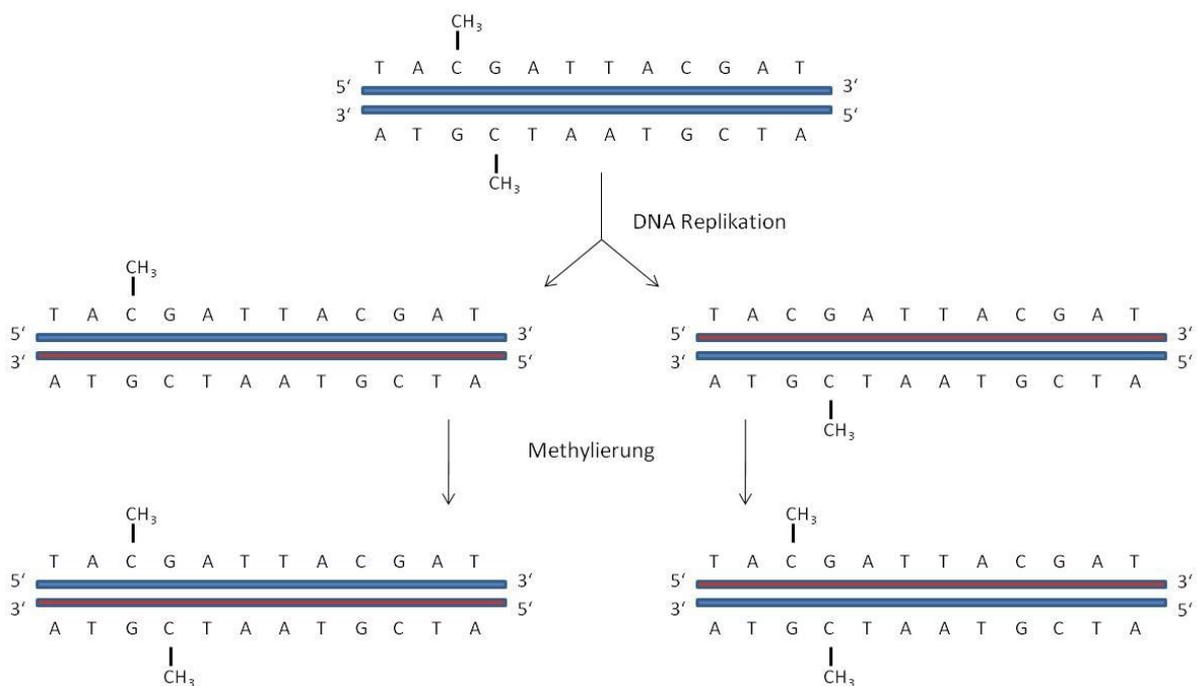


Abbildung 3: Ergänzung der DNA-Methylierung bei der Replikation (modifiziert nach [17])

In der Familie der DNMT3 gibt es zwei Enzyme, die DNA-Methyltransferasenaktivität aufweisen, DNMT3A und DNMT3B. Sie werden bei Erwachsenen in einer Vielzahl von

Einleitung

Gewebe exprimiert, im Vergleich zu DNMT1 aber in geringerer Konzentration. Beide Enzyme methylieren hauptsächlich CpG Dinukleotide, wobei sie unmethylierte und hemimethylierte Substrate mit derselben Affinität umsetzen. Allerdings wird *in vivo* von DNMT3A und DNMT3B vorwiegend unmethylierte DNA umgesetzt, weshalb sie für die Erstellung neuer DNA-Methylierungsmuster zuständig sind. Sie werden daher auch „*de novo*“ Methyltransferasen genannt. [8] Bei Versuchen in Mäusen, DNMT3A oder DNMT3B auszuschalten, hatte dies den Tod der Tiere zur Folge, was die Wichtigkeit der DNA-Methyltransferasen in der Entwicklung von Säugetieren hervorhebt. [10]

Die dritte DNA-Methyltransferasenfamilie, DNMT2, ist stark konserviert und weit verbreitet. Bisher ist wenig über dieses Protein bekannt, es scheint aber als RNA-Methyltransferase zu fungieren. [7] [10]

Eine Eigenart aller eukaryotischen DNA-Methyltransferasen ist, dass sie keine oder nur eine sehr geringe Sequenzspezifität aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass die Etablierung und Aufrechterhaltung der DNA-Methylierungsmuster nicht von der Erkennung spezifischer Sequenzen abhängt. Nach welchem Mechanismus entschieden wird, welche Sequenz methyliert wird, ist nicht ganz klar, verläuft aber wahrscheinlich über das Suchen nach repetitiven Stellen, der Interaktion von RNA und DNA und eventuell auch über die Histonmethylierung. [10]

1.2.1.4 Mechanismus der DNA-Methylierung

Die DNA-Methyltransferasen müssen, um eine Transmethylierungsreaktion durchführen zu können, einen Komplex mit der Akzeptor-DNA bilden. Anschließend wird die Helix nach Methylierungsstellen abgetastet und die Methylgruppe übertragen. Es kommt nach der Reaktion aber nicht zu einer Dissoziation, das Enzym bleibt komplexiert und sucht nach weiteren Targets. [18]

Der Mechanismus der DNA-Methylierung, dargestellt in Abbildung 4, verläuft über die kovalente Bindung des Enzyms mit dem Cytosin der DNA. Die Bindungsstelle bildet ein Cystein-Rest im aktiven Zentrum des Enzyms. Das Cytosin wird in einem ersten Schritt am Stickstoff in Position 3 protoniert und anschließend kommt es zu einem nukleophilen Angriff der Thiolgruppe des Cysteins am C6. Um die Methylgruppe einführen zu können, wird ein Methyl-Donor, das Cosubstrat S-Adenosyl-L-methionin (SAM) benötigt. Die Methylgruppe von SAM wird angegriffen, es kommt zur Deprotonierung durch β -Elimination, wodurch eine

Einleitung

Doppelbindung gebildet und das Enzym entfernt wird. So erhält man ein methyliertes Cytosin und S-Adenosylhomocystein. [19]

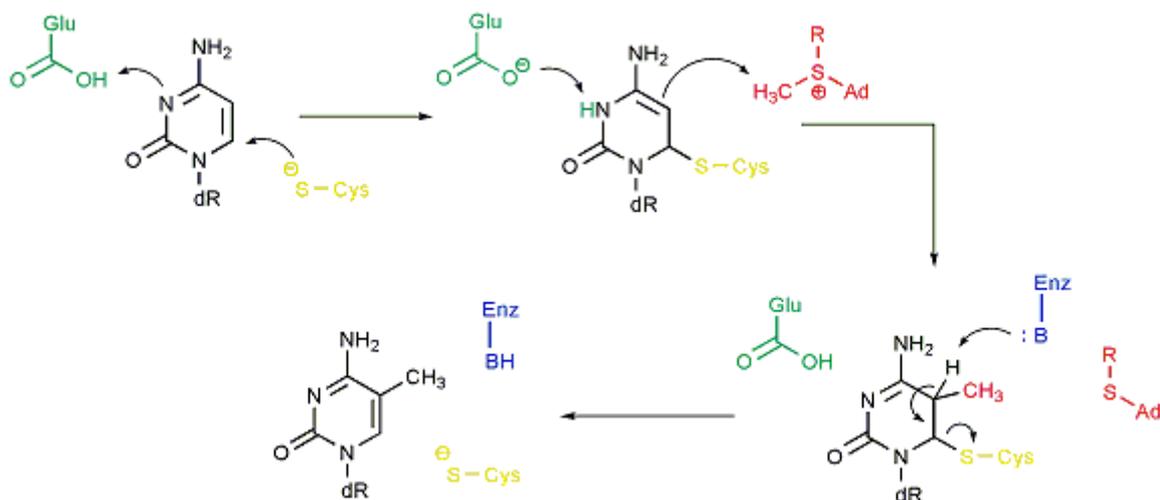


Abbildung 4: Mechanismus der enzymatischen Methylierung von Cytosin (Glu = Glutaminsäure; Cys = Cystein; Ad = Adenin; Enz = Enzym; B = Base). Bei dem Methylendonor (rot) handelt es sich um SAM. Modifiziert nach [11]

1.2.2 DNA-Methylierung bei Krebserkrankungen

Veränderungen der natürlichen DNA-Methylierungsmuster haben einen Einfluss auf die Entstehung verschiedener Krankheiten. Es konnte bisher eine Verbindung mit Schizophrenie, bipolaren Störungen, Alzheimer und Chorea Huntington gefunden werden, außerdem scheint die DNA-Methylierung auch bei verschiedensten Autoimmunkrankheiten wie Lupus, rheumatoider Arthritis und Asthma verändert zu sein. [7] Am besten untersucht ist allerdings der Einfluss der DNA-Methylierung auf die Kanzerogenese.

In Tumorzellen sind die genomischen Methylierungsmuster häufig verändert. In normalen Zellen sind vor allem isolierte CpG Dinukleotide methyliert, solche in CpG Inseln liegen aber unmethyliert vor. In Neoplasmen ist dieses Bild gemeinhin umgedreht. Daraus entstehend kann eine globale Hypomethylierung und eine Hypermethylierung in gewissen Regionen des Genoms beobachtet werden. Sowohl der allgemeine Verlust an genomischer DNA-Methylierung als auch die Hypermethylierung von CpG Inseln sind von großer Wichtigkeit für die Entstehung einer transformierten Zelle. Es ist dabei aber auch wichtig zu berücksichtigen, dass die DNA-Methylierung, im Gegensatz zu Mutationen, ein reversibler Prozess ist. Sie kann also in jeder Phase der Kanzerogenese durch demethylierende oder methylierende Agenzien beeinflusst werden. [8] [14]

1.2.2.1 Die globale Hypomethylierung

A. Feinberg und B. Vogelstein haben 1983 erstmals primäres, menschliches Tumorgewebe auf seinen DNA-Methylierungsstatus hin untersucht. Es wurden dazu Explantate von Patienten verwendet, die noch nicht mit einer Bestrahlung oder einer Chemotherapie behandelt wurden, um etwaige Veränderungen der DNA durch diese externen Einwirkungen zu vermeiden. Anormalitäten konnten durch einen Vergleich mit gesundem menschlichem Gewebe desselben Patienten erkannt werden, wobei der Methylierungsgrad dreier Gene untersucht wurde, die normalerweise nicht expremiert sind. Als Ergebnis zeigten sich eine viel geringere DNA-Methylierung der Gene in den Tumoren und ein noch geringerer Methylierungsgrad dieser Gene in den Metastasen eines Patienten. [20]

Diese Hypomethylierung spielt vor allem in sich wiederholenden und parasitären Elementen eine Rolle. Solche Sequenzen sind normalerweise stark methyliert und somit inaktiv. Durch den Verlust an Methylierung kommt es zu einer erhöhten Transkription sowie zu genomischer Instabilität. [8] Zusätzlich weisen Krebszellen, wie die oben genannte Studie beschreibt, auch eine Hypomethylierung in Promotorregionen von Genen, die normalerweise stillgelegt sind (vor allem von Onkogenen) auf, wodurch auch diese reaktiviert und transkribiert werden.[21]

1.2.2.2 Die regionale Hypermethylierung

Bei den Bereichen, die von Hypermethylierung betroffen sind, handelt es sich vor allem um CpG Inseln. [8] Diese CpG reichen Regionen, die vor allem nahe der 5' Enden von Genen vorkommen, sind in normalen Zellen meist unmethyliert. In Tumorzellen kommt es zu einer genspezifischen Promotor Hypermethylierung, was üblicherweise die Inaktivierung der Gentranskription zur Folge hat. Bei den Genen, die hauptsächlich von einer solchen Promotor Hypermethylierung betroffen sind, handelt es sich vor allem um Tumorsuppressorgene. [21] Diese Gene haben eine Funktion in der Signaltransduktion, DNA Reparatur, Detoxifikation, Zellzyklus Regulation, Differenzierung und Apoptose. Wie in Kapitel 1.1 beschrieben, erfährt die Zelle durch Inaktivierung einen Wachstumsvorteil, woraus sich ein Tumor bilden kann. Die Stilllegung von zum Beispiel DNA Reparatur Genen durch Hypermethylierung hat also einen wichtigen Einfluss auf die Krebsentstehung. [7]

Welche Gene in einer Tumorzelle durch DNA-Methylierung inaktiviert werden, ist nicht zufällig. Die anormale Änderung des DNA-Methylierungsgrads von CpG Inseln ist zwar zwischen individuellen Tumoren unterschiedlich, gewisse CpG Inseln liegen aber in jeder

Tumorart hypermethyliert vor. Außerdem zeigen in einer bestimmten Tumorart immer gewisse CpG Inseln Hypermethylierung, die in anderen Arten vielleicht nie hypermethyliert sind. Es ergibt sich daraus ein tumorspezifisches Methylierungsmuster. Erklärt werden kann diese bevorzugte Methylierung gewisser Promotorregionen von Genen dadurch, dass manche CpG Inseln anfälliger für eine *de novo* Methylierung sind als andere. Beim Verlust der Genexpression konnte eine Selektivität beobachtet werden, wobei zuerst solche Gene inaktiviert werden, die der Zelle einen Wachstumsvorteil bringen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ein anormaler DNA-Methylierungsgrad in allen Stufen der Kanzerogenese auftritt, die Hypermethylierung der Promotorregion von Genen also ein frühes Ereignis in der Krebsentstehung sein kann. [22] Die medizinische Bedeutung dieser Erkenntnisse zeigt sich vor allem durch den letzten Punkt, wodurch eine frühe, die Tumorart unterscheidende Erkennung möglich ist.

1.2.2.3 DNA-Methylierung als Biomarker

Studien haben gezeigt, dass das DNA-Methylierungsmuster zur Detektion von Tumoren genutzt werden kann. M. Esteller hat in einer Studie zwölf Gene auf die Hypermethylierung ihrer Promotorregionen in 15 der häufigsten Krebsarten untersucht. [23] Gewisse Gene waren in allen Krebsarten anormal methyliert, es zeigten sich aber auch tumorspezifische Methylierungsprofile. Die Analyse, welche Gene in einer transformierten Zelle anormal methyliert vorliegen, gibt nicht nur eine Aussage über die Art des Tumors oder eine ja/nein Entscheidung, ob ein Tumor vorliegt. Es kann zusätzlich eine Aussage über das biologische Verhalten des Tumors gemacht werden, so zum Beispiel über das Potential, Metastasen zu bilden. Dadurch könnte versucht werden, noch nicht metastasierende Tumore gezielt zu behandeln, um dies zu vermeiden. [24] Es konnten im Laufe der Studie von M. Esteller außerdem Gene ausgewählt werden, deren Analyse dazu beitragen könnte, eine Vorhersage darüber zu machen, welche Chemotherapie für den Krebspatienten die wirksamste ist. [23]

DNA-Methylierungsmarker können also sowohl für die Tumordetektion als auch zur Klassifikation und Prognose, sowie zur Vorhersage über die Wirkung der Chemotherapie genutzt werden.[25] [26] Die Detektion der anormalen DNA-Methylierung kann dazu mit dem relevanten Gewebe durchgeführt werden, es konnte aber gezeigt werden, dass die DNA-Methylierungsmuster in Körperflüssigkeiten wie Serum, Plasma, Urin und Sputum in hohem Maße mit den Ergebnissen von Tumorbiopsien übereinstimmen. So wurde in asymptomatischen Krebspatienten im Blut zirkulierende Tumor-DNA gefunden, deren

Einleitung

Nachweis eine Früherkennung zulässt. Ein Screening von Risikogruppen oder ganzer Bevölkerungsgruppen ist somit durch die Auswahl geeigneter Gene mittels einfacher Blutanalysen möglich. Deshalb ist das Finden von Biomarkern für nicht-invasive Untersuchungsmethoden besonders interessant. [7] [24]

1.2.3 In der vorliegenden Arbeit untersuchte Gene

1.2.3.1 CDKN2A

Das menschliche Zyklin-abhängige Kinase Inhibitor 2A Gen (CDKN2A, engl.: Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) befindet sich auf dem Chromosom 9p21 und kodiert für ein Protein, das die Zyklin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (CDK4/6) bindet. Diese Enzyme bewirken das Fortschreiten des Zellzyklus am G₁/S Kontrollpunkt und führen bei fehlender Regulation zu einem unkontrollierten Durchlaufen (siehe Abbildung 5). CDKN2A bildet spezifische Komplexe mit CDK4 oder CDK6 aus und kann so regulierend wirken. Mutationen des Gens konnten in vielen Tumorzellen nachgewiesen werden, wie auch die Inhibition der Tumorpheriferation durch Reaktivierung der Expression *in vitro* und *in vivo*. Es handelt sich bei CDKN2A also um ein Tumorsuppressorgen. Deletionen und Mutationen sind unter anderem für Primärtumoren in Gehirn, Gallengängen, Lunge, Pankreas und Ösophagus typisch.[27] [28] [29]

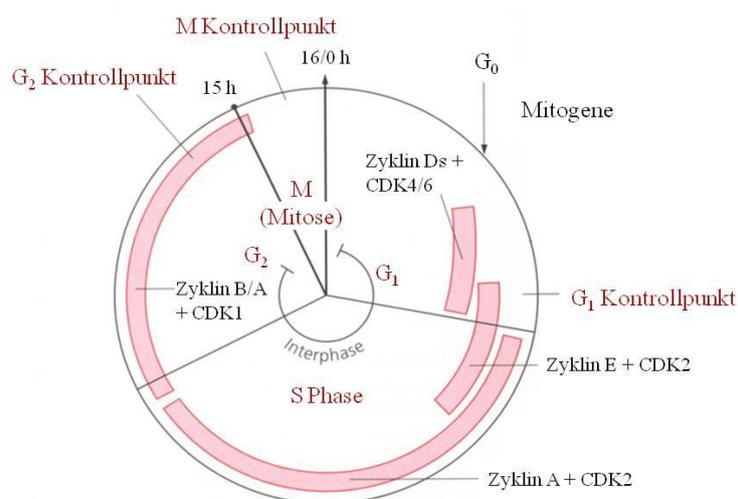


Abbildung 5: Übersicht über den Zellzyklus mit den Kontrollpunkten der einzelnen Phasen. (modifiziert nach [30])

Einleitung

Der Promotor von CDKN2A sowie die ersten zwei Exons enthalten CpG Inseln, deren Methylierung zu einer Stilllegung der Transkription und damit zum Verlust der Expression führt. Es konnte ein tumorspezifisches Methylierungsmuster beobachtet werden. Bei Darmkrebs zeigte ein hoher Methylierungsgrad einen großen Tumor an. [31] Die Stilllegung von CDKN2A ist meist ein frühes Ereignis in der Kanzerogenese und konnte im präinvasiven Stadium in Brust-, Darm-, Lungenkrebs und anderen Tumorarten nachgewiesen werden. [32] [33] [34]

1.2.3.2 APC

Das „Adenomatous polyposis coli“ Gen (APC) ist ein Tumorsuppressorgen im Wnt/ β -Catenin Signalweg. Es scheint eine Rolle bei der Interaktion von Zytoskelett und extrazellulärer Matrix zu haben und beeinflusst so die Regulation von Zellwachstum und Differenzierung. Mutierte APC Proteine binden nicht an β -Catenin und aktivieren so die Transkription von verschiedenen wachstumskontrollierenden Genen, wie dem Onkogen MYC. Mutationen im APC Gen in Keimzellen sind der Hauptgrund für familiäre adenomatöse Polyposis im Darm (FAP). FAP ist eine autosomal dominant vererbte Krankheit, bei der sich in der späten Kindheit und dem frühen Erwachsenenalter tausende Polypen in der Schleimhaut des Darms bilden. Jeder dieser Polypen kann sich zu einem Karzinom entwickeln. Für Personen, die an dieser Krankheit leiden, besteht ein erhöhtes Risiko, an Darmkrebs zu erkranken, weshalb sie mittels Kolektomie behandelt werden. [1] [35]

APC besitzt zwei Promotorregionen, wobei die erste normalerweise aktiv ist. Eine Hypermethylierung dieser Region konnte sowohl in Karzinomen als auch Adenomen des Kolons gefunden werden, jedoch nicht in der normalen Schleimhaut. [36] Eine Senkung der DNMT-Aktivität durch Inhibition mit Arzneimitteln zeigte in Mäusen eine stark verminderte Krebsinzidenz im Darm. [37] APC liegt auch in anderen gastrointestinalen Tumoren hypermethyliert vor, so im Ösophagus, Magen, Pankreas und der Leber. Außerdem ist dies oft bei Brustkrebs der Fall. [36] [38]

1.2.3.3 DAPK1

Das Gen DAPK1 kodiert für die „Death-associated protein kinase 1“. Es handelt sich dabei um eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die durch Ca^{2+} -Ionen und Calmodulin reguliert wird. [39] Die Aktivität von DAPK1 ist in verschiedenen Signalwegen, die in Zusammenhang mit

Einleitung

der Induktion des Zelltods stehen, notwendig. [40] DAPK1 weist eine große Ähnlichkeit mit DAPK3 auf (83 % der Aminosäuren im katalytischen Zentrum sind ident). Zu den Substraten von DAPK3 gehört das p21 Protein, welches unter anderem an den Zyklin D-CDK4/6 Komplex bindet und so seine Aktivität inhibiert. Damit hat DAPK3 eine Rolle in der Verhinderung des Fortschreitens des Zellzyklus im G₁/S Kontrollpunkt. Auch für DAPK1 wird eine Beteiligung an der Regulation des G₁ Phasen-Arrests diskutiert. [41]

DAPK1 wird im Vergleich mit normalen Zellen in einer Reihe von Krebsarten unterschiedlich stark expremiert. Es konnte als Biomarker für Plattenepithelkarzinome identifiziert werden. [39] Außerdem ist die Promotorregion des Gens in Darm-, Prostata-, Blasen- und Brustkrebs, sowie in akuter myeloische Leukämie und dem Myelodysplastischen Syndrom hypermethyliert. [38] [40] [42] [43]

1.2.3.4 GATA-4

GATA-4 ist ein Transkriptionsfaktor, der zu einer Gruppe von DNA Bindungsproteinen gehört, die sich strukturell sehr ähnlich sind. Sie kontrollieren die Genexpression und Differenzierung in einer Vielzahl von Zelltypen. GATA-4 ist bei erwachsenen Säugetieren im Herzen, Darmepithel und in der Keimdrüse expremiert. [44] GATA-4 ist zusammen mit GATA-5 wichtig für die Entwicklung des Gastrointestinaltrakts. Beide gelten als Tumorsuppressorgene. Eine Veränderung ihrer Expression wird mit Krebs im Gastrointestinaltrakt, aber auch in der Lunge, den Eierstöcken und dem Hirn assoziiert. [45] Es konnten bisher keine Mutationen oder Deletionen der Gene in menschlichen Tumoren gefunden werden, allerdings liegen sie sehr oft stillgelegt vor. Es wird vermutet, dass es sich dabei um ein frühes Ereignis in der Kanzerogenese handelt. In Darmtumoren konnte eine starke DNA-Methylierung der Promotorregion beobachtet werden (70 % für GATA-4). [46] Die Hypermethylierung war jedoch nicht mit dem Stadium, der Tumorlokalisation, dem Geschlecht, Alter oder dem Grad der Differenzierung assoziiert. Die Tatsache, dass GATA-4 in den meisten Darmtumoren hypermethyliert vorliegt und dies wahrscheinlich recht früh passiert, macht das Gen zu einem geeigneten Biomarker. In Stuhlproben von Krebspatienten konnte methylierte GATA-4 Promotor-DNA nachgewiesen werden, die zu einer Früherkennung beitragen könnte. [45] [46]

1.2.3.5 NTRK2

NTRK2 steht für Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2. Es handelt sich also um ein Gen, das für eine Rezeptor Tyrosinkinase kodiert, genauer gesagt für TRKB. Dieses Mitglied der TRK Familie, einer Gruppe von Neurotrophin Rezeptoren, wird vom Wachstumsfaktor BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) aktiviert. Damit wird eine Reihe von Signalwegen reguliert, die eine Rolle in der Zellproliferation, Differenzierung und dem Überleben von Neuronen spielen. [47]

Es ist bekannt, dass NTRK2 im Rett-Syndrom, einer X-chromosomal vererbten Entwicklungsstörung des Nervensystems, anormal expremiert wird. Diese Krankheit wird durch Mutationen des MeCP2 Gens (Methyl CpG binding protein 2) hervorgerufen, wobei als Folge das entsprechende Protein unzureichend gebildet wird. NTRK2 wird in solchen Fällen überexpremiert. Der genaue Zusammenhang dieser Aktivierung ist aber noch nicht bekannt, da der Promotor von NTRK2 nicht methyliert vorliegt und es so auch nicht zu einer Bindung des MeCP2 Proteins kommen kann. [47]

NTRK2 wurde ursprünglich nur in Verbindung mit dem Nervensystem gebracht, inzwischen ist auch seine Bedeutung für andere Bereiche bekannt. So hat es außerdem einen Einfluss auf die Entwicklung von Eierstöcken. [48] In Prostatakrebs wurden eine DNA-Methylierung der Promotorregion und eine Stilllegung der Expression festgestellt. [49]

1.2.3.6 OSMR

Oncostatin M (OSM) ist ein Zytokin der Interleukin-6 Familie, welches vorwiegend von aktivierten Monozyten und Lymphozyten produziert wird. Die biologischen Effekte von OSM kommen durch die Aktivierung verschiedener Signale zustande, was auf der Wechselwirkung mit dem OSM Rezeptor (OSMR) beruht. OSM wirkt als starker Tumorsuppressor, indem es eine Inhibierung des Wachstums und der Differenzierung sowie die Apoptose bei Krebszellen induziert. Die Resistenz von metastasierenden Melanomzellen gegen diese Wachstumsinhibition konnte auf den Verlust der OSMR Expression zurückgeführt werden, wobei das Gen durch Histon Acetylierung stillgelegt wurde. [50] Als weiterer epigenetischer Mechanismus konnte die Hypermethylierung der Promotorregion von OSMR in Darmtumoren, seltener auch in Magen- und Pankreaskrebs, identifiziert werden. [51] [52] Diese starke Methylierung konnte auch in Stuhlproben von Patienten nachgewiesen werden, weshalb OSMR als möglicher Biomarker für Kolonkrebs gilt. [52] OSM zeigt zusätzlich eine

Wirkung als Tumorsuppressor für Krebs in Brust, Eierstöcken, Lunge, Melanomen und Osteosarcomen. [50]

1.3 Einfluss der Ernährung auf die DNA-Methylierung

Die Lebensführung ist als wichtiger Faktor in der Krebsentstehung seit langem bekannt. Dabei stellen besonders das Rauchen und eine Ernährung, die reich an tierischen Fetten und arm an Ballaststoffen sowie Obst und Gemüse ist, einen großen Risikofaktor dar. Viele Lebensmittel-Inhaltsstoffe, wie zum Beispiel Antioxidantien, Spurenelemente (Vitamin A, C und E oder Selen) oder Flavonoide, weisen eine bekannte oder potentielle Schutzwirkung auf. Dabei steht vor allem die Verhinderung der Radikalbildung durch oxidativen Stress im Vordergrund. [3] Es sind aber auch einige Substanzen aus Lebensmitteln bekannt, welche die DNA-Methylierung beeinflussen. Diese können grundsätzlich in vier Gruppen unterteilt werden:

- Vitamine der B-Gruppe, die als Coenzyme im Ein-Kohlenstoff-Metabolismus fungieren
- Methylendonoren
- Mikronährstoffe, welche den Ein-Kohlenstoff-Metabolismus verändern können
- Bioaktive Substanzen, die die DNA-Methyltransferasen-Aktivität beeinflussen [53]

In den ersten drei Fällen ist jeweils eine Modifikation des Ein-Kohlenstoff-Metabolismus Ursache für die Änderung der DNA-Methylierung. Dies ist naheliegend, da die DNA-Methyltransferase die zu übertragende Methylgruppe daraus bezieht. Genauer betrachtet werden im Zuge des Ein-Kohlenstoff-Metabolismus der universale Methyl donor S-Adenosylmethionin (SAM) und auch S-Adenosylhomocystein als Inhibitor der DNA-Methylierung synthetisiert. Bei der enzymatischen Methylierungsreaktion überträgt die DNMT eine Methylgruppe von SAM auf die DNA, wobei S-Adenosylhomocystein zurückbleibt (siehe Abbildung 4). Damit kann jede Substanz, die einen Effekt auf den Ein-Kohlenstoff-Metabolismus ausübt, potentiell die DNA-Methylierung beeinflussen. [7] [53]

Die im ersten Punkt genannten B Vitamine sind an diesem Stoffwechselweg beteiligt. So spielt besonders Folsäure als Akzeptor und Donor für Methylgruppen eine wichtige Rolle. Pyridoxal-5'-Phosphat (Vitamin B6), Flavinadenindinukleotid (FAD, Vitamin B2) und Cobalamin (Vitamin B12) werden als Coenzyme bei verschiedenen Reaktionen benötigt. Ein Defizit dieser Vitamine bewirkt eine Veränderung der DNA-Methylierung. Weitaus geringer ist der Effekt für die Gruppe der Methylendonoren, der Substrate des Ein-Kohlenstoff-

Einleitung

Metabolismus. Es handelt sich dabei um Serin, Methionin, Cholin und Betain. Beispiele für die dritte Gruppe der DNA-Methylierungs-verändernden Lebensmittel-Inhaltsstoffe sind Vitamin A, Zink und Selen. [53]

Die letzte Gruppe der oben genannten Lebensmittel-Inhaltsstoffe ist jene, in welche die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Substanzen fallen. Diese sogenannten bioaktiven Inhaltsstoffe (engl.: bioactive food components) sind nicht essentielle Substanzen, die Stoffwechselwege beeinflussen und damit die Gesundheit verbessern können. Den meisten Stoffen dieser Gruppe wird eine Wirkung durch Inhibierung der Aktivität der DNA-Methyltransferasen zugeschrieben, wodurch eine Hypermethylierung verhindert oder rückgängig gemacht werden kann. [53] Als Beispiel dafür kann eine Studie von Fang et al. herangezogen werden, welche zeigte, dass (-)-Epigallocatechin-3-Gallat (EGCG) eine Reaktivierung von Genen, die in Krebszellen stillgelegt sind, bewirkt. Es handelt sich dabei um das Haupt-Polyphenol des grünen Tees, welches an DNMT1 bindet und das Enzym so inaktiviert. [54] Die Lebensmittel-Inhaltsstoffe und –Kontaminanten, welche in dieser Arbeit untersucht wurden, werden im Folgenden beschrieben.

***Tabelle 2. Beispiele für Substanzen, welche die DNA-Methylierung beeinflussen können.
(modifiziert nach [53])***

Gruppe	Substanz	Wirkung
Vitamine der B Gruppe	Folsäure	Methylgruppen-Akzeptor und -Donor
	Vitamin B2	Coenzym der Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase
	Vitamin B6	u.a. Coenzym der Serin-Hydroxymethyltransferase
	Vitamin B12	Coenzym der Methionin-Synthase
Methylendonoren	Methionin	Vorstufe zu S-Adenosylmethionin
	Cholin	Wird in Betain umgewandelt
	Betain	Donor zur Remethylierung von Homocystein
	Serin	Donor für die Methylierung von Tetrahydrofolat
Mikronährstoffe	Vitamin A	Erhöht die Aktivität der Glycin-N-Methyltransferase
	Zink	Coenzym der Methionin-Adenosyltransferase
	Selen	Erhöht die Aktivität der Transsulfurierungskaskade
Bioaktive Substanzen	Tee Polyphenole	Inhibierung von DNA-Methyltransferasen
	Genistein	Inhibierung von DNA-Methyltransferasen

1.3.1 Phytoöstrogene

Phytoöstrogene sind natürlich vorkommende, pflanzliche Stoffe, die in einer Vielzahl von Lebensmitteln enthalten sind. Sie zeigen biologische Aktivität, indem sie mit dem Hormonsystem von Säugetieren interagieren und dabei den Effekt von Steroidhormonen imitieren. [55] In den 1940er Jahren wurde man auf diese Wirkung aufmerksam, als eine Beeinträchtigung der Reproduktion von Schafen beobachtet wurde. Da dies einen großen Einfluss auf die australische Wirtschaft hatte, kam dem Problem eine große Aufmerksamkeit zu. Die darauf folgenden Untersuchungen zeigten, dass die Isoflavon-reichen Kleesorten (*Trifolium subterraneum*) bei den Schafen zu Schäden an den Eierstöcken und Fortpflanzungsstörungen geführt hatten. [56] [57]

Östradiol, das wichtigste weibliche Sexualhormon, spielt eine wichtige Rolle im Reproduktionssystem. Außerdem werden Östrogene für Zellwachstum, -proliferation und -differenzierung benötigt. Die Wirkung von Östrogenen entsteht durch das Binden an den Östrogenrezeptor (ER). Im Folgenden kommt es zu einer Signalkaskade und zur Transkription Östrogen-abhängiger Gene. Substanzen, die ebenfalls an den ER binden und eine Aktivierung von solchen Genen bewirken, werden als Östrogenagonisten bezeichnet. Substanzen, die binden, aber eine östrogene Antwort inhibieren, werden Östrogenantagonisten genannt. Phytoöstrogene können dabei sowohl als Östrogenagonisten, als auch als -antagonisten wirken. Grundsätzlich besitzt der Östrogenrezeptor zu Lebensmittel-Inhaltsstoffen mit östrogenartiger Wirkung eine Affinität, die 100 bis 1000 mal kleiner ist als jene des Östradiols. Obwohl Phytoöstrogene viel schwächer binden, ist ihr Effekt nicht zu vernachlässigen, da sie in vielen Lebensmitteln in hoher Konzentration vorkommen. [57] Phytoöstrogene müssen aber nicht zwingend über den Östrogenrezeptor wirken, es wird davon ausgegangen, dass sie die drei folgenden Mechanismen nutzen:

- Hormonelle Effekte durch Bindung an ER.
- Nicht-hormonelle Effekte, die sich auf die Kanzerogenese auswirken, wie Apoptose und antioxidative Wirkung.
- Interaktion mit Enzymen, die an der Synthese und dem Metabolismus von Sexualhormonen beteiligt sind. [58]

Die Hauptgruppen der Phytoöstrogene sind die Isoflavone und die Lignane. Ihre Wirkung auf den Körper kann vielseitig sein. So können östrogenartige Substanzen viele chronische Krankheiten wie kardiovaskuläre Krankheiten, Krebs und Osteoporose beeinflussen und dabei auch präventiv wirken. Besonders das Risiko hormonabhängiger Krebsarten wie Brust- oder

Gebärmutterkrebs wird vermindert. [58] Lignane und Isoflavone zeigen auch eine Senkung des Darmkrebsrisikos. [58] Die krebsvorbeugende Wirkung von Isoflavonen wurde durch epidemiologische Studien in Asien sichtbar, da dort ein vermindertes Brustkrebsrisiko besteht. Dies wurde auf den erhöhten Konsum von isoflavonreichem Soja zurückgeführt. [56] In westlichen Ländern spielt die Aufnahme von Isoflavonen eine eher untergeordnete Rolle, Lignane kommen dagegen reichlich vor und sind daher eher relevant. [56] [57]

1.3.2 Lignane

Lignane sind Polyphenole, die zur Gruppe der Phytoöstrogene gezählt werden. Sie kommen in geringen Konzentrationen in einer Vielzahl von Lebensmitteln vor und haben einen großen Anteil an den mit der Nahrung aufgenommenen Phytoöstrogenen. Vorstufen der Lignane kommen in Beeren, Getreide, Samen, Obst, Gemüse, Tee, Kaffee, Wein und Nüssen vor, wobei Leinsamen und Sesam besonders reich daran sind. Im unteren Darm von Säugetieren werden diese Vorstufen zu den entsprechenden Lignanen verstoffwechselt. Der Metabolismus der Vorstufen ist dabei abhängig von der bestehenden Microflora. Speziell die Glycoside Matairesinol und Secoisolariciresinol werden so in die humanen Lignane Enterolacton und Enterodiol umgewandelt (dargestellt in Abbildung 6), die sowohl im Urin als auch mit den Faeces ausgeschieden werden. [56] [57] [59] [60]

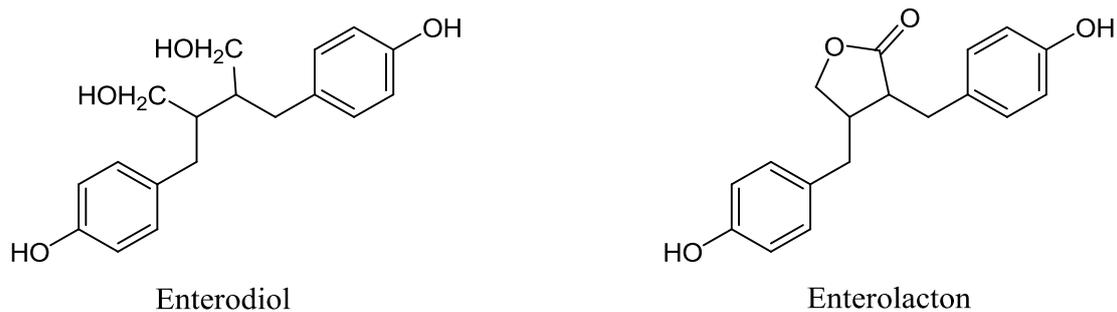


Abbildung 6: Struktur von Enterodiol und Enterolacton (nach [56])

Strukturell bestehen Lignane aus einem dimeren C₃C₆-Körper, wobei beide Teile jeweils über das mittlere C-Atom der C₃-Einheit miteinander verbunden sind (Abbildung 7). Die einzelnen Substanzen unterscheiden sich in der Gestaltung der C₃-Kette. Die Biosynthese der Lignane geschieht über eine radikal verlaufende oxidative Kupplung, primär aus Coniferylalkohol und Sinapylalkohol. [61]

Einleitung

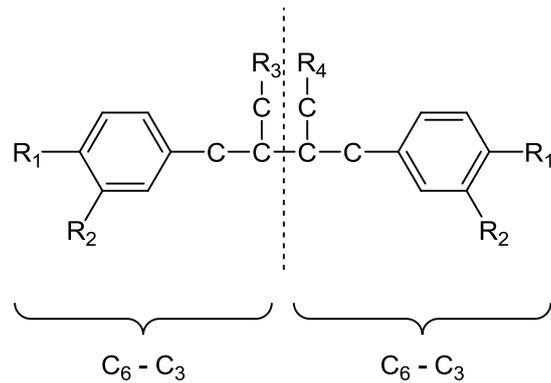


Abbildung 7: Grundstruktur der Lignane (nach [61])

Der biologische Effekt, den Lignane auf den Körper haben, ähnelt sehr jenem, den mit der Nahrung aufgenommene Östrogene bewirken. Sie wirken also als schwache Östrogene, was in Versuchen mit MCF7 Zellen, einer Brustkrebszelllinie, gezeigt werden konnte. [57] Weiters wird Lignanene eine tumorhemmende, antivirale, bakteriostatische und fungistatische Aktivität zugeschrieben. Der Einfluss von Lignanenen auf verschiedene Krebsarten ist gut untersucht. So geht man zum Beispiel von einer Abnahme des Brustkrebsrisikos durch eine Konkurrenz mit Östradiol in der Rezeptorbindung aus. Zusätzlich senkt die Lignan-Aufnahme das Risiko, an Darmkrebs zu erkranken. [57] [58]

1.3.2.1 (+)-Lariciresinol

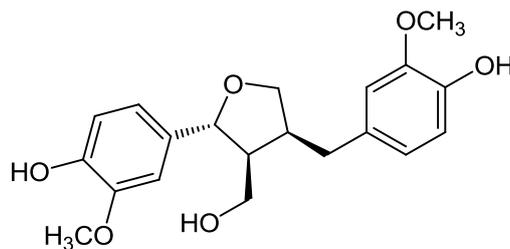


Abbildung 8: Struktur von (+)-Lariciresinol (nach [62])

Lariciresinol kommt vor allem in Sesam (94 mg/kg Frischgewicht) und Leinsamen (30 mg/kg Frischgewicht) vor, in geringeren Mengen auch in Brokkoli (9,7 mg/kg Frischgewicht) und Knoblauch (2,9 mg/kg Frischgewicht). Es wird im Darm zu 100% in Enterolignan umgewandelt. [59] [60]

1.3.2.2 (-)-Matairesinol

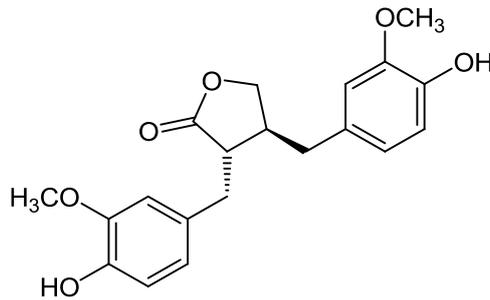


Abbildung 9: Struktur von (-)-Matairesinol (nach [62])

Matairesinol stellt die Vorstufe für das Enterolacton dar. Es kommt vor allem in Leinsamen (5 mg/kg Frischgewicht), Sesam (5 mg/kg Frischgewicht) und Roggenbrot (0,1 mg/kg Frischgewicht) vor. [56] [59]

1.3.3 Isoflavone

Isoflavone sind eine der drei Hauptvertreter der Phytoöstrogene. Diese phenolischen, sekundären Metaboliten sind vor allem in Pflanzen der Familie der Hülsenfrüchte (Fabaceen) weit verbreitet. Es hat sich eine Vielzahl strukturell ähnlicher Verbindungen entwickelt, die vor allem in Futterpflanzen und Pflanzen zur Gründüngung vorkommen, wie Kleearten (*Trifolium*), Luzerne (*Medicago sativa*), Lupinen, Saubohne (*Vicia faba*), Kichererbse (*Cicer*) und die ostasiatische Sojabohne (*Glycine soja*). [55] [56]

Als erster Vertreter dieser Verbindungsklasse wurde Genistein entdeckt. 1953 konnte nachgewiesen werden, dass es in Nagetieren eine Vergrößerung der Gebärmutter bewirkt und es wurde daher als Phytoöstrogen klassifiziert. [57] Isoflavone besitzen eine ähnliche Größe und räumliche Anordnung wie steroidale Östrogene. Die beiden Hydroxylgruppen, die die Bindungsfunktion zum ER ausmachen, sind etwa gleich weit voneinander entfernt und angeordnet. [55] [56]

Genistein und andere Isoflavone sind schwache Agonisten des ER. Sie kommen in Pflanzen glycosidisch gebunden vor und müssen im Darm hydrolysiert werden, da nur die Aglycone resorbiert werden können. Daher würde man von einer recht geringen Bedeutung dieser Substanzen ausgehen. Genistein kommt aber in auf Soja basierenden Lebensmitteln in einer Konzentration von 1-2 mg/g Trockengewicht vor. Damit kann recht einfach eine Menge von 50 mg Genistein pro Tag konsumiert werden. Dies würde zu einer Plasmakonzentration von

ungefähr 200 nM führen, was 200-mal der Plasmakonzentration an Östrogenen einer Frau vor der Menopause entspricht. Epidemiologische Studien zeigen, dass eine Soja-reiche Ernährung zu einer niedrigen Brustkrebsinzidenz führt. [57]

1.3.3.1 Genistein

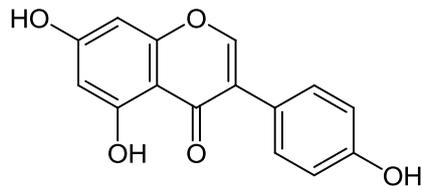


Abbildung 10: Struktur von Genistein (nach [56])

Genistein liegt als Hauptvertreter der Isoflavone vor allem in der Sojabohne vor. Sein Gehalt liegt bei 442 mg/kg. [59]

1.3.3.2 Daidzein

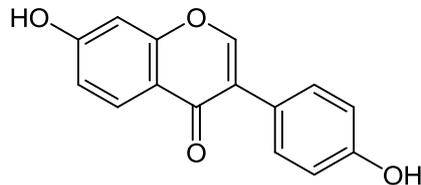


Abbildung 11: Struktur von Daidzein (nach [56])

Daidzein hat eine geringere östrogene Wirkung als Genistein und wirkt ebenfalls als Radikalfänger und Antioxidans. Es kommt in der Sojabohne in einer Konzentration von 566 mg/kg vor. [56] [59]

1.3.4 Flavonole

Flavonole gehören wie Isoflavone zur großen Substanzklasse der Flavonoide. Sie kommen sehr häufig in verschiedensten Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs vor. Viele Vertreter tragen zur gelben Farbe in Pflanzen bei, so zum Beispiel in der Schale von Zitrusfrüchten. Flavonole kommen in allen Obstsorten, Zitrus- und tropischen Früchten vor, dabei vor allem die Substanzen Quercetin, Kämpferol und Myricetin. Man findet sie fast ausschließlich

glycosidisch gebunden, vor allem als 3-Glycoside und seltener als 7-Glycoside. Die Bioverfügbarkeit der Substanzen hängt dabei maßgeblich vom Glycosidtyp ab, da sie nicht nur in Form ihrer Aglycone aufgenommen werden. [57] [59] [63] [64]

1.3.4.1 Quercetin

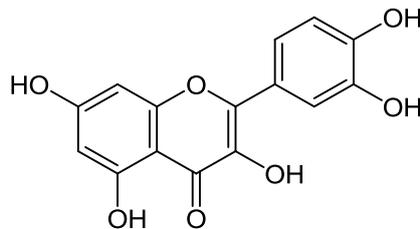


Abbildung 12: Struktur von Quercetin (nach [64])

Quercetin ist ein wichtiger Vertreter der Flavonole. Es ist mutagen und zeigt bei oraler Applikation in Säugetieren eine kanzerogene Wirkung. [63] Allerdings wirkt Quercetin auch als sehr effektives Antioxidans und entzündungshemmend. [65] Weitere positive Eigenschaften sind die Inhibition der Histaminausschüttung von Mastzellen in vitro (anti-allergischer Effekt) und der protektive Effekt vor kardiovaskulären Krankheiten. Zusätzlich zeigt es chemopräventive Eigenschaften wie Wachstumshemmung und Einleitung der Apoptose, so zum Beispiel bei Darm-, Prostata-, Gebärmutterhals-, Lungen- und Brustkrebs. [57] [64] [66]

Quercetin kommt vor allem in Qitten (180 mg/kg), Erdbeeren (170 mg/kg), Moosbeeren (130 mg/kg), Himbeeren (70 mg/kg), Äpfel (49 mg/kg), Kirschen (14 mg/kg) und in roten und schwarzen Johannisbeeren (13 mg/kg) vor. Das Hauptglycosid des Quercetins ist Rutin, ein 3-Glycosid mit Rutinose. Es kommt vor allem in Zitrusfrüchten vor (108 mg/kg Frischgewicht in süßer Orange (Fruchtfleisch), 290 mg/kg Frischgewicht in bitterer Orange (Fruchtfleisch), 473 mg/kg Frischgewicht in bitterer Orange (Schale) und je 51 mg/kg in Schale und Fruchtfleisch der Zitrone). [59]

1.3.5 Bisphenol A

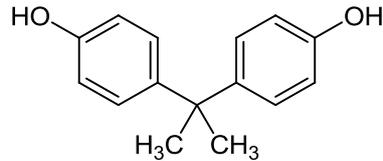


Abbildung 13: Struktur von Bisphenol A (nach [67])

Bisphenol A (BPA) wird als Ausgangsstoff zur Herstellung von Epoxidharzen und Polykarbonaten verwendet. Epoxidharze werden zum Beispiel zur Innenlackierung von Konservendosen verwendet und enthalten in der Regel kein BPA, wenn sie ausreichend ausgehärtet wurden. Bei einer anschließenden Temperatureinwirkung, wie bei der Sterilisation (121 °C) oder den Bedingungen einer Hydrolyse können das Monomer oder Oligomere entstehen und in das Lebensmittel migrieren. [56] [68] In Thermopapier wird nicht polymerisiertes BPA eingesetzt, weshalb das Recycling von Faxpapier als große Quelle für freies BPA gilt. Dieses gelangt so ins Abwasser und in den Klärschlamm. [56] Die weitläufige Verteilung von BPA in der Umwelt zeigt sich auch durch die Tatsache, dass es in einer Studie in über 90 % der untersuchten Urinproben nachgewiesen werden konnte. [69] BPA wird mit Entwicklungstoxizität, kanzerogenen Effekten und möglicher Neurotoxizität in Verbindung gesetzt. [70] Seine Hauptwirkung ist aber die östrogene Aktivität. Wie auch Phytoöstrogene bindet es an den ER. In den humanen Brustkrebszellen MCF7 konnte eine Bildung von Progesteron-Rezeptoren und eine Steigerung der Zellproliferation durch BPA beobachtet werden. [56]

1.3.6 Heterocyclische aromatische Amine

In den späten 1970er Jahren konnte gezeigt werden, dass die Oberfläche von gegrilltem Fleisch und Fisch sowie das Rauchkondensat Substanzen enthalten, die stark mutagen wirken. [59] Diese Stoffe entstehen durch die Pyrolyse von Aminosäuren und Proteinen. Es handelt sich vorwiegend um Imidazochinoline und Imidazochinoxaline, die sich bereits nach fünf Minuten bei Temperaturen von 175 °C bilden. Sie entstehen also nicht nur beim Grillen, sondern können in vielen gekochten Fleischwaren nachgewiesen werden. Allerdings ist ihre Entstehung zeit- und temperaturabhängig. Wie in Abbildung 14 dargestellt, kommt es dabei

Einleitung

zu einer Maillard-Reaktion, deren Produkte (Pyridine und Pyrazine) anschließend mit Kreatin oder Kreatinin reagieren. [55] [59]

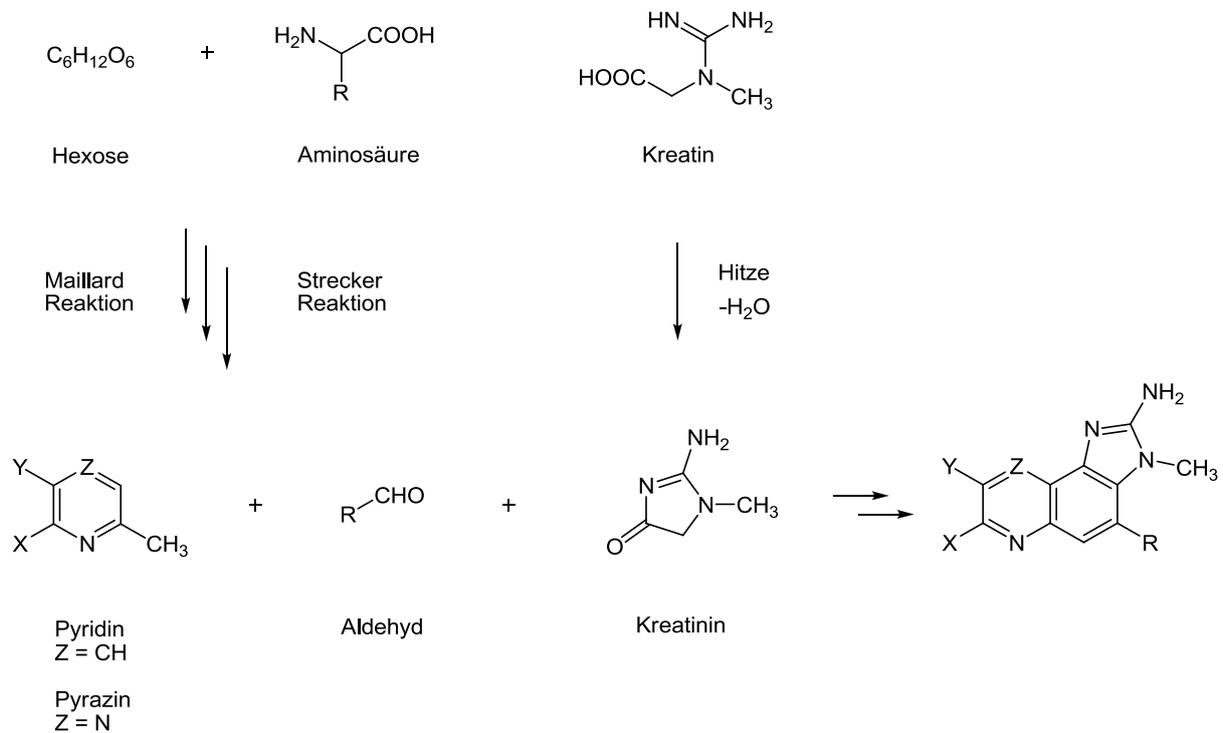


Abbildung 14: Schematischer Ablauf der Entstehung von heterocyclischen aromatischen Aminen (nach [59])

Die Toxizität der heterocyclischen aromatischen Amine beruht auf ihrer Metabolisierung. Sie werden oxidiert, wobei starke Elektrophile wie Nitrene entstehen. Diese können kovalent an die DNA oder Proteine binden, was ihre starke genotoxische Wirkung erklärt. Es wird davon ausgegangen, dass diese Substanzen einen Einfluss auf die Krebsentstehung in verschiedensten Körperteilen haben, so zum Beispiel in Darm, Brust, Pankreas oder auch in der Lunge, zum Beispiel durch Einatmen des Rauchs beim Kochen. [55] [59]

1.3.6.1 2-Amino-3,8-dimethylimidazo-[4,5-f]chinoxalin (MeIQx)

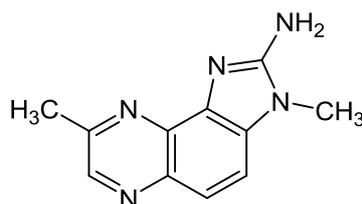


Abbildung 15: Struktur von MeIQx (nach [59])

Einleitung

Die Menge an MeIQx in zubereiteten Fleischwaren kann stark variieren. Sie hängt hauptsächlich von der Kochzeit und –temperatur ab. Durchschnittliche Werte reichen bis zu 6 ng/g Lebensmittel. [55]

1.3.6.2 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridin (PhIP)

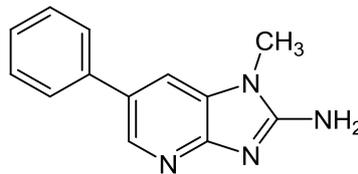


Abbildung 16: Struktur von PhIP (nach [59])

Von allen heterocyclischen aromatischen Aminen liegt PhIP sehr oft in der höchsten Konzentration vor. Es kann wiederum abhängig von Temperatur und Dauer der Hitzeeinwirkung in Mengen bis zu 50 ng/g in zubereiteten Fleischwaren vorkommen. [55] Die Bildung von PhIP konnte aus einer wässrigen Mischung aus Phenylalanin, Glucose und Kreatinin bereits bei einer Temperatur von 37 °C nachgewiesen werden. [71]

1.3.7 Mykotoxine

Mykotoxine sind toxische sekundäre Metaboliten, die von bestimmten Pilzarten produziert werden. Es gibt mehr als 200 Mykotoxine, die von rund 120 Pilzen gebildet werden. Die Pilze befallen dabei Feldfrüchte auf dem Feld oder Lebensmittel bei der Lagerung und können diese so kontaminieren. Mykotoxine haben eine Vielzahl von verschiedenen chemischen und physikalischen Eigenschaften sowie unterschiedlichste toxische Effekte auf Mensch und Tier. Einige erwiesen sich als Karzinogene, Mutagene oder Teratogene, andere greifen wiederum das Immunsystem, die Nieren oder die Leber an. [55][59]

Eine Übersicht über die wichtigsten Mykotoxine, ihre Produzenten und ihr hauptsächlich Vorkommen ist in Tabelle 3 dargestellt. Besonders häufig sind Getreide, Nüsse, getrocknete Früchte, Kaffee, Kakao, Gewürze und Obst kontaminiert. Die Pflanzen werden meist auf dem Feld vor der Ernte mit Mykotoxinen infiziert, wobei die wichtigsten Bildner den Gattungen Fusarium, Alternaria und Aspergillus angehören. Es kann auch während des Transports und der Lagerung zu einem Befall kommen, in diesem Fall sind vor allem Spezies der Gattungen Penicillium und Aspergillus dafür verantwortlich. [55]

Tabelle 3: Übersicht über die häufigsten Mykotoxine, ihre Produzenten und die befallenen Lebensmittel (nach [55]).

Mykotoxin	Produzierender Pilz	Kontaminierte Lebensmittel
Aflatoxine B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus	Nüsse, Feigen, getrocknete Früchte, Gewürze, Mais
Aflatoxine M ₁ , M ₂	Metabolite von Aflatoxin B ₁ und B ₂	Milch, Milchprodukte
Ochratoxin A	Penicillium verrucosum, Aspergillus ochraceus	Getreide, Kaffeebohnen, Feldbohnen, Bier, Nüsse
Desoxynivalenol, Nivalenol	Fusarium graminearum, Fusarium culmorum	Getreide
T-2 Toxin, HT-2 Toxin	Fusarium poae, Fusarium sporotrichioides	Getreide
Zearalenon	Fusarium graminearum, Fusarium culmorum	Getreide
Fumonisine B ₁ , B ₂ , B ₃	Fusarium moniliforme, Fusarium proliferatum	Mais, Maisprodukte
Patulin	Penicillium expansum	Apfelsaft, Früchte, Silage
Sterigmatocystin	Aspergillus versicolor, Aspergillus nidulans	Getreide, Käse
Alternariol	Alternaria alternate, Aspergillus tenuis	Früchte, Tomaten, Ölsamen, Getreide

1.3.7.1 Desoxynivalenol (DON)

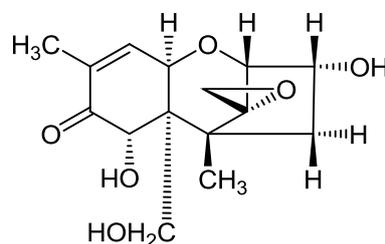


Abbildung 17: Struktur von Desoxynivalenol (nach [55])

DON ist der am häufigsten vorkommende Vertreter der Trichothecene. Trichothecene werden von Fusarium, genauer von *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. culmorum* und *F. graminearum* gebildet. DON kommt besonders häufig in Getreide und Getreideprodukten wie Weizenmehl vor. Trichothecene bewirken Störungen des Gastrointestinaltrakts wie Erbrechen, Diarrhö und

Entzündungen. Außerdem lösen sie Hautirritationen, Appetitlosigkeit, Anämie und Fehlgeburten aus. Sie sind immunsuppressiv, zeigen aber keine mutagene oder karzinogene Wirkung. [55]

1.3.7.2 Zearalenon (ZON)

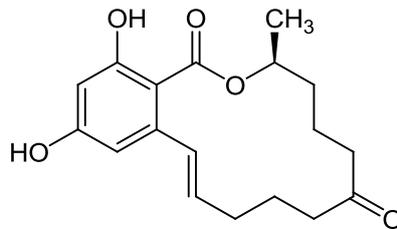


Abbildung 18: Struktur von Zearalenon (nach [55])

ZON wird von mehreren Vertretern der Gattung *Fusarium* gebildet, so von *F. culmorum*, *F. graminearum* und *F. crookwellense*. Es kommt vor allem in Getreide vor, dabei besonders in Mais und übersteht die meisten Verarbeitungsprozesse, sodass es in Weizenmehl oder Maisbier zu finden ist. ZON konnte in Maiskörnern in Konzentrationen bis zu 300 µg/kg nachgewiesen werden und ist in geringen Mengen auch in Obst, Gemüse, Ölsamen und Nüssen vorhanden. Es kann teilweise durch Hitze zerstört werden. [55]

Der wichtigste Effekt von ZON ist seine Wirkung auf das Fortpflanzungssystem, während seine akute Toxizität eher niedrig ist. Es kann Hyperöstrogenismus auslösen, was anhand von unfruchtbaren Schafen, die ZON-haltiges Gras gefressen hatten, gezeigt wurde. ZON gilt weiter als genotoxisch, seine Karzinogenität konnte noch nicht hinreichend bewiesen werden. [55]

1.3.8 Methylierungsinhibitoren als Arzneimittel

Die DNA-Methylierung als epigenetisches Ereignis in der Kanzerogenese bildet einen Ansatzpunkt in der Krebstherapie. Besonders die Tatsache, dass es sich um einen reversiblen Effekt handelt, lässt die Demethylierung hypermethylierter Tumorsuppressorgene als interessante Behandlungsmöglichkeit erscheinen. Bei den bekannten Arzneimitteln handelt es sich vorwiegend um Nukleosidanaloga, die als Inhibitoren der DNA-Methyltransferasen wirken. [72] Beispiele dafür sind 5-Azacytidin, 5-Aza-2'-Desoxycytidin, 5-Fluoro-2'-Deoxycytidin und Zebularin, das im Moment noch in der klinischen Testphase ist. Es hat den

Vorteil, dass es oral appliziert werden kann und weniger toxisch ist als 5-Aza-2'-Desoxycytidin. [73] [74]

1.3.8.1 5-Aza-2'-Desoxycytidin

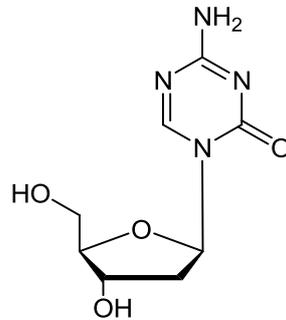


Abbildung 19: Struktur von 5-Aza-2'-Desoxycytidin (nach [75])

Schon seit fast 40 Jahren sind Azanukleoside als Wirkstoffe, die den Status der Zelldifferenzierung beeinflussen, bekannt. 5-Aza-2'-Desoxycytidin (5-Aza-dC) ist ein Nukleosidanalogen, das einen starken inhibitorischen Effekt auf verschiedene biologische Systeme hat, so auch auf Neoplasmen. Es zeigt eine starke bakterio-statische und mutagene Wirkung. Außerdem kommt es zu immunsuppressiven, antimykotischen und virostatistischen Effekten. [76] [77]

Die Wirkungsweise von 5-Aza-dC wie auch anderer Nukleosidanaloga beruht auf der Ähnlichkeit ihrer Struktur zu Cytidin. Sie werden daher bei der DNA-Replikation eingebaut und auch von den DNA-Methyltransferasen als Substrat erkannt. Das Enzym bildet wie gewöhnlich eine kovalente Bindung mit der Substrat-DNA aus, kann diese aber nicht mehr lösen. Damit ist es an die DNA gefesselt und inaktiviert und wird im Folgenden abgebaut. [32] [72]

Ein Nachteil der Wirkstoffe, welche die DNA-Methylierung inhibieren ist, dass sie nicht spezifisch sind und so würde man erwarten, dass sie alle Gene aktivieren, ohne zu diskriminieren. Besonders eine Überexpression von Proto-Onkogenen aufgrund einer entstehenden Hypomethylierung wäre fatal für die Krebstherapie. Dies ist aber nicht der Fall, da diese Stoffe nur auf sich teilende Zellen eine Wirkung haben, während normale, sich nicht teilende Zellen nicht beeinflusst werden. Außerdem scheinen bevorzugt solche Gene reaktiviert zu werden, die im Tumor anormal stillgelegt wurden. [34] [78] [79] Der eigentliche große Nachteil von 5-Aza-dC ist seine Zytotoxizität, was eine Suche nach geeigneten Alternativen erforderlich macht. [19]

2 Zielsetzung

Krebs ist eine der führenden Todesursachen in Europa und den USA. Darmtumore werden in beiden Geschlechtern häufig diagnostiziert, Brusttumore stehen an erster Stelle bei Frauen. Der Erforschung der Krankheit, dem Finden von geeigneten Tumormarkern zur Detektion und der Suche nach Substanzen zur Prävention und Therapie kommt daher eine große Bedeutung zu. Epigenetische Faktoren wie die DNA-Methylierung spielen eine wichtige Rolle bei Krebserkrankungen und stehen häufig am Beginn der Kanzerogenese. Die Hypermethylierung der Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen und die daraus folgende Stilllegung des Gens sind bedeutende Ereignisse in der Entstehung einer Krebszelle. Besonders die Tatsache, dass es sich um reversible Mechanismen handelt, machen sie zu geeigneten Anhaltspunkten für Detektion, Prävention und Behandlung. Sowohl natürlich in Lebensmitteln vorkommende Substanzen als auch Kontaminanten zeigen einen Einfluss auf die DNA-Methylierung, ohne dabei die genetische Sequenz zu verändern. [7]

Ziel dieser Arbeit war es, den DNA-Methylierungsgrad in verschiedenen Tumorsuppressorgenen zu bestimmen und eine eventuelle Wirkung von Lebensmittel-Inhaltsstoffen und Kontaminanten auf die DNA-Methylierung zu untersuchen. Dazu muss die geringe Menge an zur Verfügung stehender DNA vervielfältigt und die Methylierung am Cytosin auf Ebene der Basenabfolge sichtbar gemacht werden. Diese Veränderung der Basenabfolge kann durch die Bisulfit-Konvertierung erreicht werden. Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Anreicherung der zu untersuchenden DNA-Sequenz, mittels Methylierungssensitiver Hochauflösender Schmelzkurvenanalyse (MS-HRM) kann der Methylierungsgrad ermittelt werden. Die Aufgabe bestand im Entwerfen von Primerpaaren und der Optimierung von MS-HRM Methoden, um den Methylierungsgrad der Tumorsuppressorgene CDKN2A, RASSF1 und HIC1 bestimmen zu können. Zusätzlich sollten diese und früher in der Arbeitsgruppe entwickelte Methoden angewendet werden, um den Methylierungsgrad der Gene in humanen HT29 Kolonkarzinomzellen und MCF7 Brustkrebszellen zu bestimmen. Durch die Behandlung der Zellen mit lebensmittelrelevanten Substanzen und dem demethylierenden Arzneimittel 5-Aza-2'-Desoxycytidin sollte ein eventueller Einfluss auf den Methylierungsgrad festgestellt werden.

Zur Validierung der MS-HRM sollte ein kommerziell erhältlicher, auf der MethyLight Methode basierender Kit herangezogen werden.

3 Theoretischer Hintergrund

Für die Bestimmung des gesamten genomischen Gehalts an 5-Methylcytosin sind die HPLC (high-performance liquid chromatography) und die HPCE (high-performance capillary electrophoresis) die Methoden der Wahl. [80] Will man aber den Methylierungsgrad einer bestimmten Sequenz ermitteln, werden andere Methoden benötigt. Eine Möglichkeit ist, Enzyme zu verwenden, die zwischen methylierten und unmethylierten Erkennungsstellen im zu untersuchenden Gen unterscheiden können. Dies bringt aber einige Nachteile mit sich, wie zum Beispiel das nicht vollständige Schneiden der Restriktionsenzyme und eine Beschränkung in den möglichen Regionen (Die Enzyme sind spezifisch und so kann nicht in jedem Abschnitt an beliebiger Stelle geschnitten werden). Außerdem muss bei solchen Methoden meist ein Southern Blot durchgeführt werden, für den eine recht große Menge an DNA benötigt wird. [80] Es ist daher wünschenswert, andere Möglichkeiten zu nutzen, zum Beispiel die Polymerase Kettenreaktion.

3.1 Die Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction, PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA *in vitro*. Sie wurde 1983 von Kary Mullis entwickelt, wofür er 1993 den Nobelpreis erhielt. Inzwischen ist die PCR zu einer Routinemethode im Labor geworden, die es ermöglicht, DNA-Abschnitte (bestimmter Länge) aus jedem Organismus zu vervielfältigen. [81]

Die PCR imitiert in vereinfachter Weise die natürliche DNA Replikation. Während in einer Zelle viele verschiedene Proteine benötigt werden, die in einem komplexen System zusammenarbeiten, arbeitet die PCR mit nur einem, der DNA Polymerase. Der Ablauf der PCR kann in drei Schritte geteilt werden, der Denaturierung, dem Anlagern der Primer und der Elongation (Abbildung 20). [81]

Theoretischer Hintergrund

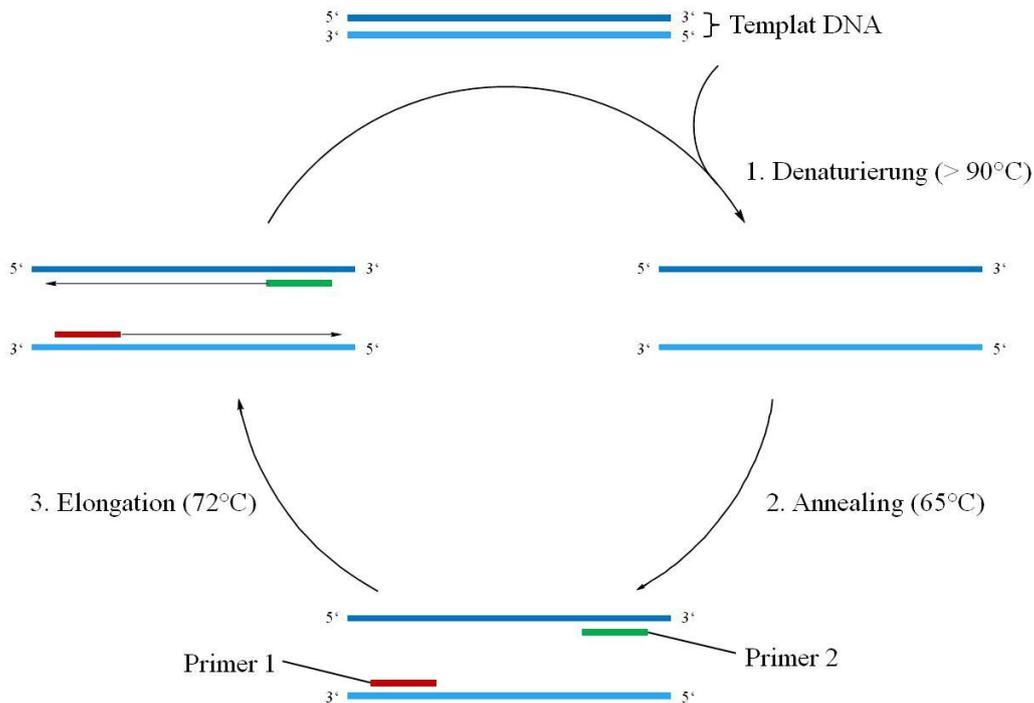


Abbildung 20: Schematischer Ablauf eines Zyklus der Polymerase Kettenreaktion. (Modifiziert nach [82])

Die genomische DNA liegt natürlich als doppelsträngige Helix vor, die im Verlauf der *in vivo* Replikation von einem Enzymkomplex zu zwei Einzelsträngen aufgewunden wird. In der PCR wird statt dessen auf 95 °C erhitzt, wodurch die Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren gespalten werden und sich die Stränge trennen. Dieses thermische Entzweien der DNA wird als Denaturierung bezeichnet. Anschließend wird die Temperatur wieder gesenkt und die Primer lagern sich an, dies wird auch Annealing genannt. Primer sind Oligonukleotide, die den zu vervielfältigenden Bereich markieren. Sie sind nötig, da die Polymerase einen Startpunkt für die DNA Synthese braucht. Die Primer enthalten also die komplementäre Sequenz zur DNA und binden so an die Enden des Zielstranges. Gerade dies stellt den großen Vorteil der PCR dar: es kann, solange die Sequenz sorgfältig ausgewählt wurde, sodass es zu keiner Replikation ungewollter Abschnitte der DNA kommt, genau kontrolliert werden, welcher Teil der DNA vervielfältigt wird. Die Primer werden im Überschuss eingesetzt und hybridisieren bei 40-70 °C an die Zielsequenz, auch Target DNA genannt. Die genaue Temperatur, bei der das Anlagern stattfindet, ist von den jeweiligen Primern abhängig. Wie in Abbildung 20 ersichtlich, werden immer zwei Primer, also ein Primerpaar verwendet, je ein Primer für das 3' Ende und einer für das 5' Ende. Ist das Primerpaar gebunden, kann der komplementäre Strang vervollständigt werden (Elongation). Man spricht dabei von einem Mutterstrang, der aus der eingesetzten DNA kommt (je zwei

Mutterstränge aus einer DNA Helix) und von einem Tochterstrang, der als Ergänzung zum jeweiligen Mutterstrang gebildet wird. In diesem dritten Schritt der PCR kommt es zur eigentlichen DNA Synthese, ausgeführt von einer DNA Polymerase. Die Polymerase baut an eine freie Hydroxylgruppe eines Desoxynukleotids weitere Basen ein und zwar nach den Watson Crick Regeln, also komplementär zum Mutterstrang. Dabei wird Cytosin gegenüber von Guanin und Adenin gegenüber von Thymin eingebaut. Die freie Hydroxylgruppe findet die Polymerase jeweils am 3' Ende des Primers, weshalb sie auch von dort aus synthetisiert. Anfänglich ergab sich das Problem, dass bei den Temperaturen, die zur Denaturierung der DNA benötigt werden, auch die Proteine denaturieren. Damit würde auch die DNA Polymerase inaktiviert werden und so müsste das Enzym nach dem Annealing Schritt manuell zugegeben werden. Es konnte aber eine thermostabile DNA Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert werden, die es erlaubt, den Vorgang zu automatisieren. Diese Taq DNA Polymerase besitzt ein Temperaturoptimum bei 72 °C und hält einer längeren Erhitzung auf 95 °C stand. [81] [83]

Als Ergebnis dieser einzelnen Vorgänge erhält man zwei doppelsträngige DNA-Helices aus jedem eingesetzten Doppelstrang. Ein einmaliger Durchlauf der drei Schritte wird als Zyklus bezeichnet, der im Folgenden mehrmals wiederholt wird. Im nächsten Zyklus wird wieder denaturiert und jeder Einzelstrang fungiert als Mutterstrang, es werden also auch die neu synthetisierten Stränge als Templat verwendet. Die Produkte haben in diesem Stadium noch nicht die durch die Primer bestimmte Länge. Im ersten Zyklus amplifiziert die Polymerase ausgehend vom jeweiligen Primer, hat aber kein Signal, wo die gewünschte Sequenz endet. Im zweiten Zyklus lagern sich nun wiederum die komplementären Primer an, sodass die Begrenzung am anderen Ende liegt und genau das gewünschte Produkt entsteht. Es sind also erst ab dem dritten Zyklus DNA-Template der vorbestimmten Länge vorhanden. Aus einem eingesetzten DNA-Molekül sind in den beiden Zyklen vier Doppelstränge entstanden, es hat sich die Menge also verdoppelt. Da eine PCR aus mehreren Zyklen besteht, gewinnt man eine große Menge an Target DNA. Gerade für Analysen, für die nur kleine Mengen an DNA vorhanden sind, ist es interessant, einfach nur zu vervielfachen. Die PCR wird aber nicht nur als reiner „Kopierer“, sondern auch als eigene Analysemethode verwendet. So zum Beispiel, wenn in einer Probe DNA eines gewissen Organismus nachgewiesen werden soll. [81] [83]

3.1.1 Beispiel für ein PCR-Protokoll

Die PCR wird normalerweise in kleinen Ansätzen durchgeführt, weshalb temperaturstabile Eppendorf-Reaktionsgefäße verwendet werden. Die geringen Volumina ermöglichen einen guten Temperatúraustausch und damit eine kurze Reaktionszeit für die einzelnen Schritte. Folgende Chemikalien werden benötigt:

- Ein geeigneter Puffer, um einen optimalen pH-Wert und eine geeignete Ionenkonzentration zu gewährleisten
- Die thermostabile DNA Polymerase
- Das spezifische Primerpaar
- Die Desoxynukleotide (dNTPs) als Bausteine
- Die zu amplifizierende DNA [81]

Da die PCR durch das Wechseln zwischen den unterschiedlichen Temperaturen gesteuert wird, bedarf es eines Thermocyclers, der es ermöglicht, die Temperatur rasch, präzise und reproduzierbar zu ändern. Ein beispielhaftes Temperaturprogramm ist in Tabelle 4 gegeben. In einem ersten Schritt wird für mehrere Minuten stark erhitzt, um eine vollständige Trennung der Einzelstränge zu gewährleisten. Anschließend beginnt der erste Zyklus mit den drei oben beschriebenen Schritten, die mehrmals wiederholt werden. [81]

Tabelle 4: Beispiel für ein Temperaturprogramm für eine PCR. (Modifiziert nach [81])

Schritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	95 °C	10 sec
Annealing	55 °C	20 sec
Elongation	72 °C	20 sec

} 40 – 50 mal wiederholen

3.1.2 Kinetik der Polymerase Kettenreaktion

Aus dem einmaligen Durchlaufen der drei Temperaturschritte der PCR erhält man aus einem DNA-Molekül zwei Doppelstränge. Es wird also in einem Zyklus die Menge an Templaten verdoppelt. Hier würde man theoretisch in n Zyklen eine 2^n -fache Vervielfältigung erzielen.

Praktisch hat eine PCR jedoch keine Effizienz von 100 %, es können aber durch Optimierung durchaus 10^6 oder mehr Duplikate erzeugt werden. [81]

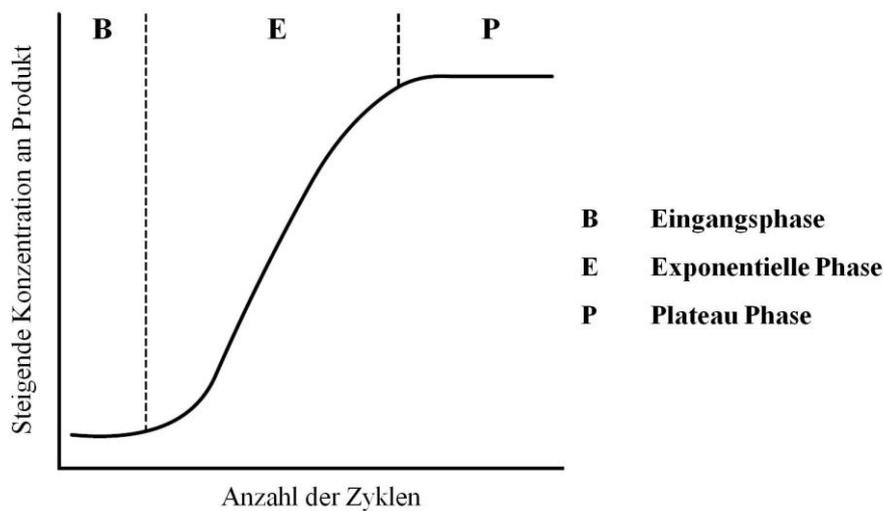


Abbildung 21: Schema des Anstiegs der Menge an gebildetem Templat mit steigender Zyklenzahl. (Modifiziert nach [81])

Der Verlauf einer PCR kann generell in drei Phasen unterteilt werden. (Abbildung 21) Am Anfang ist nur die eingesetzte, meist genomische DNA vorhanden, also ein langer Strang, der nicht nur die gewünschte Sequenz erhält. Die dazu relativ kurzen Primer (um die 20 Nukleotide) können mit einer Nadel verglichen werden, die in diesem genomischen Heuhaufen die richtige Bindungsstelle finden müssen. Allerdings sind die Primer im Überschuss vorhanden, was ein rechtzeitiges Anlagern im Annealingschritt sichert. Die Primer erkennen dabei nicht direkt ihr Target, sie binden an falschen Stellen, dissoziieren aber schnell wieder, bis sie mit der exakt komplementären Sequenz einen Doppelstrang bilden, von dem ausgehend, wie oben beschrieben, die DNA Synthese erfolgt. [81]

In der exponentiellen Phase, dem mittleren Bereich, liegt eine größere Menge an reinem Templat vor, wodurch die Suche nach der richtigen Bindungsstelle für die Primer vereinfacht wird. Es kommt optimal zu einer Verdopplung der Produkte in jedem Zyklus, bis die Amplifikation gestört wird und in die Plateau-Phase übergeht. Dieser dritte Bereich ist durch die begrenzte Verfügbarkeit der Reagenzien bedingt. So liegen mehr Stränge als Substrat vor als es DNA Polymerase Moleküle gibt, weshalb nicht jeder ergänzt werden kann. Außerdem verändert sich auch das Verhältnis von Einzelsträngen zu Primern, weshalb es zu einem Binden der komplementären Sequenzen aneinander kommen kann. In den anfänglichen Zyklen geschieht dies nicht, weil die Stränge zu lang und zu komplex sind, um in der kurzen Zeit anzulagern. Die Primer, die im Überschuss vorliegen und viel kürzer sind, haben einen

viel besseren Zugang und werden daher ausschließlich gebunden. In den späten Zyklen verändert sich dieses Bild nicht nur wegen der höheren Konzentration, sondern auch aufgrund der kürzeren Sequenz des Templates. Sind die komplementären Stränge nach Absenken der Temperatur im Annealingschritt wieder aneinander gebunden, sind sie auch für die Primer nicht mehr zugänglich, weshalb es zu keiner Replikation mehr kommen kann. [81]

3.1.3 Real-Time PCR

Der große Unterschied zwischen einer konventionellen und einer Real-Time PCR ist, dass bei letzterer die Entstehung der Amplifikationsprodukte im Reaktionsgefäß direkt verfolgt werden kann. Es wird dazu ein Fluoreszenzsignal gemessen, das durch verschiedene Methoden generiert werden kann. [83]

3.1.3.1 Real-Time PCR mit interkalierenden Farbstoffen

Eine Möglichkeit, eine Real-Time PCR durchzuführen, ist mit Hilfe interkalierender Farbstoffe, wie SYBR Green. SYBR Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in Lösung ein sehr schwaches Signal emittiert. Er bindet nicht an Einzelstränge, lagert er sich aber in doppelsträngige DNA ein, verstärkt sich das Signal erheblich. Als Ergebnis steigt die Fluoreszenzintensität proportional zur Zunahme an Templaten, welche am Ende jedes Zyklus als Doppelstrang vorliegen. Da die Interkalierung nicht sequenzspezifisch ist, kann SYBR Green grundsätzlich für jede PCR Reaktion verwendet werden. Dies kann aber auch einen Nachteil darstellen, weil sowohl Fehlprodukte als auch Primerdimere eine Erhöhung des Signals hervorrufen. Andere Vorteile der Verwendung von SYBR Green sind eine einfache Handhabung, es ist temperaturstabil und stellt eine billige Alternative zu Fluoreszenzsonden dar. [81] [83]

3.1.3.2 Fluoreszenzsonden in der Real-Time PCR

Die Menge an gebildeter DNA kann über sogenannte Sonden detektiert werden. Diese Sonden enthalten einen Fluoreszenzfarbstoff sowie einen Quencher und sind so entworfen, dass sie spezifisch an das Target binden. Dabei kann es sich um ein Oligonukleotid handeln, das zwischen den Primerpaaren bindet (sogenannte TaqMan Sonden oder Molecular Beacons),

oder sie werden als Teil eines der beiden Primer entworfen (Scorpions). Das Prinzip ist bei allen Methoden, dass sich der Fluoreszenzfarbstoff in räumlicher Nähe zum Quencher befindet und es so zu einer Fluoreszenzlöschung kommt. Werden die beiden aber voneinander getrennt, kann ein Signal detektiert werden. Dies wird im Folgenden anhand der TaqMan Variante diskutiert. [81]

Die TaqMan Technologie basiert auf der Verwendung zweier Primer und eines Oligonukleotids, das, wie bereits beschrieben, zwischen dem Primerpaar hybridisiert. Sowohl in Lösung als auch in gebundener Form wird das emittierte Signal vom Quencher absorbiert. Der am häufigsten verwendete Farbstoff ist FAM (6-Carboxyfluorescein), welcher kovalent am 5'-Ende gebunden ist. Am 3'-Ende befindet sich der Quencher, bevorzugt TAMRA (6-Carboxytetramethylrhodamin). Erst wenn die DNA-Polymerase den Doppelstrang vervollständigt, kommt es zu einem Signal. Dies beruht auf der 5' zu 3' Exonukleaseaktivität der Polymerase, die bewirkt, dass bereits gebundene DNA- oder RNA-Stränge am Mutterstrang wieder entfernt werden. So wird die Sonde abgebaut und ihre einzelnen dNTPs gehen in Lösung. Damit wird auch der Quencher räumlich getrennt und Fluoreszenz kann detektiert werden (Abbildung 22). Da mit jedem neu synthetisierten Strang eine Sonde abgebaut wird, ist das Signal direkt proportional zur Menge an vervielfältigter DNA. Als Vorteil der TaqMan Sonden kann nicht nur die Spezifität genannt werden, sie erlauben auch die Unterscheidung zwischen verschiedenen Sequenzen im gleichen Ansatz. Werden nämlich mehrere Sonden mit verschiedenen Farbstoffen verwendet, können unterschiedliche Sequenzen detektiert werden. Dies wird als Multiplex-PCR bezeichnet, hat aber den Nachteil, dass es sowohl besondere Anforderungen an das Gerät stellt, als auch das Design einer solchen Methode kompliziert ist. Sollen zum Beispiel drei verschiedene Gene analysiert werden, werden drei Primerpaare und drei Sonden benötigt, die alle in ihrer Annealingtemperatur kompatibel sein müssen und dabei keine Wechselwirkungen, wie zum Beispiel die Bildung von Primerdimeren, miteinander eingehen dürfen. Generell ist die TaqMan Technologie in ihrem Design komplex, relativ teuer und eine Sonde kann immer nur für ein bestimmtes Gen eingesetzt werden, während interkalierende Farbstoffe universell sind. [81] [83]

Theoretischer Hintergrund

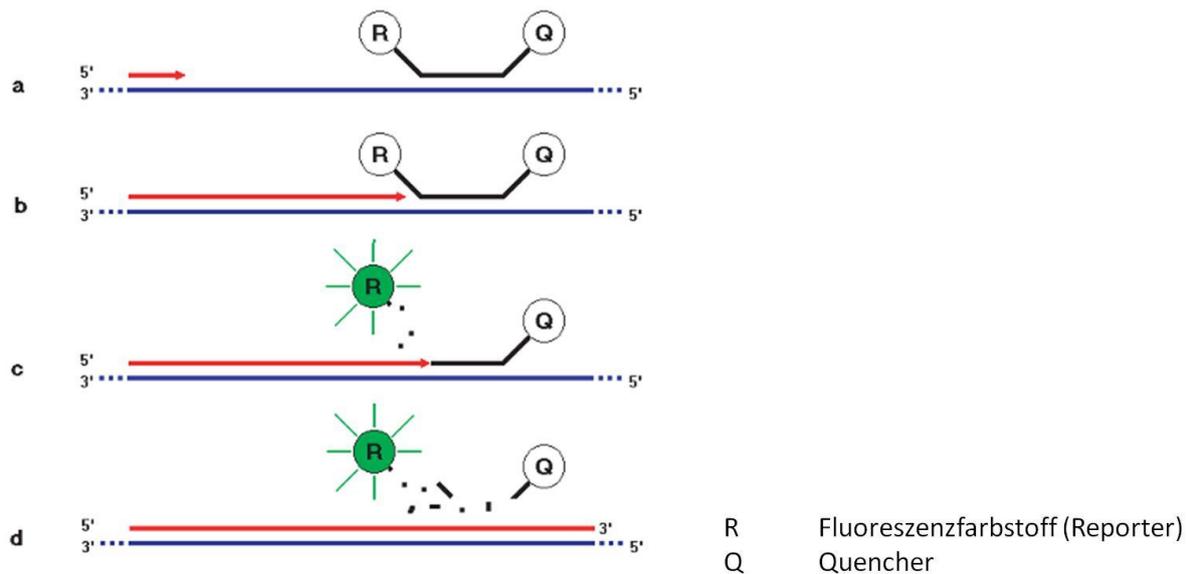


Abbildung 22: Signalerzeugung in der Real-Time PCR mit TaqMan Sonden. In Schritt a lagert die Sonde an, b zeigt die Elongation. Die Polymerase baut die Sonde ab, es kommt zur räumlichen Entfernung des Quenchers und zum Fluoreszieren des Farbstoffs (c und d). [84]

3.1.3.3 Quantitative Real-Time PCR

Herkömmliche PCR-Methoden benötigen mindestens einen weiteren Schritt, um die PCR Produkte detektieren zu können. Dabei ist die Agarose-Gelelektrophorese die Methode der Wahl, wobei auch Southern Blot oder DNA-Sequenzierung verwendet werden. Mittels Real-Time PCR können solche zusätzlichen Schritte vermieden und gleichzeitig kann auch quantifiziert werden, was mittels der traditionellen PCR schwierig ist. Auf einem Agarosegel zum Beispiel kann man nur zwischen Bandenlänge und –stärke vergleichen, weshalb auch mittels Kalibration nur eine semi-quantitative Aussage gemacht werden kann. [81]

Wie oben beschrieben ist das gemessene Fluoreszenzsignal in der Real-Time PCR proportional zur Menge an synthetisiertem Templat. Trägt man die Fluoreszenz-Intensität gegen die Zyklenzahl auf, ergibt sich die in Abbildung 21 dargestellte Kurve. Erst nach einigen Zyklen wird ein Signalanstieg beobachtet. Der Zyklus, bei dem die Hintergrundfluoreszenz signifikant überschritten wird, bzw. die Reaktion in die exponentielle Phase übergeht, wird Schwellenwertzyklus, oder im Englischen „Threshold cycle“ genannt. Um ihn zu bestimmen, wird ein fixer sogenannter Threshold bestimmt, d.h. eine Fluoreszenzstärke über der Basislinie. An dem Punkt, an dem die Kurve diese Treshold Linie schneidet, wird der Schwellenwertzyklus oder C_T -Wert abgelesen (Abbildung 23). Wann die Reaktion in die exponentielle Phase übergeht, ist nicht nur abhängig von der Methode bzw.

der Effizienz der PCR, sondern auch von der Anfangskonzentration der eingesetzten DNA. Da es in jedem Zyklus zu einer Verdopplung kommt, wird sich bei halber Menge an DNA der C_T -Wert um eins nach hinten verschieben. Je später die Kurve steigt, desto weniger Templat DNA wurde eingesetzt. Es kann daher durch eine Verdünnungsreihe eines Standards bekannter Konzentration die Konzentration der Probe ermittelt werden. [81]

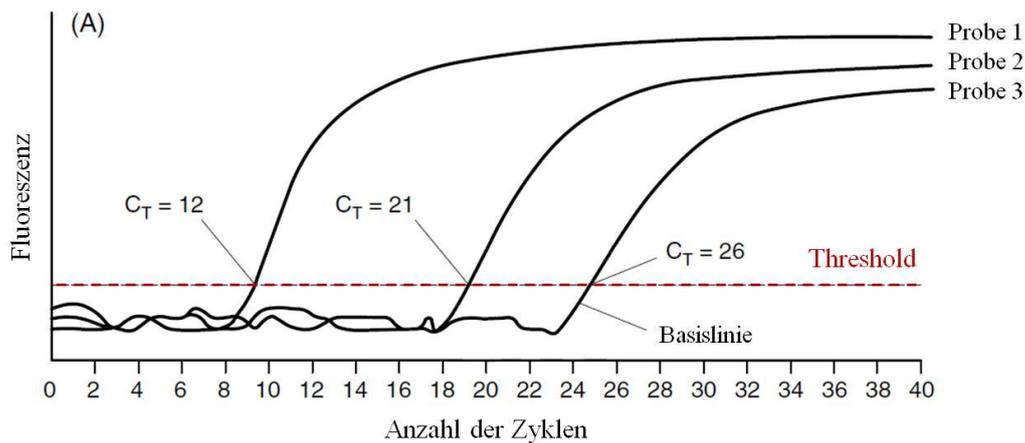


Abbildung 23: Beispiel für eine Real-Time PCR mit Fluoreszenzmessung und Bestimmung des C_T -Wertes. (Modifiziert nach [81])

3.1.4 PCR Methoden zur Analyse der DNA-Methylierung

In einem PCR-Gefäß sind keine DNA-Methyltransferasen vorhanden, sodass das Methylierungsmuster bei der Replikation nicht weitergegeben werden kann. Die DNA Polymerasen können nicht zwischen methyliertem und unmethyliertem Cytosin unterscheiden, weshalb in beiden Fällen Guanin und dann wieder Cytosin eingebaut wird. Die PCR-Produkte sind daher nicht methyliert und können nicht zur Bestimmung des Methylierungsgrads herangezogen werden. Trotzdem gibt es einige Methoden, die auf der PCR-Technik beruhen. Es muss dafür die DNA in einer Weise modifiziert werden, die eine Unterscheidung zwischen methylierter und unmethylierter DNA erlaubt. Dies ermöglicht die Bisulfit-Konvertierung. [85]

3.1.4.1 Bisulfit-Konvertierung als Grundlage der methylierungs-spezifischen PCR

Die sogenannte Bisulfit-Konvertierung, erstmals 1992 von Frommer *et al.* publiziert, stellt eine wichtig Grundlage für die methylierungs-spezifische PCR dar. Dabei werden Cytosin-Nukleotide in Uracil umgewandelt, während methyliertes Cytosin unverändert bleibt (Abbildung 24). Dazu muss die DNA zuerst denaturiert werden, damit die einzelnen Basen für das Bisulfit, oder auch Hydrogensulfit, zugänglich sind. Dies führt zu einer Sulfonierung des Cytosins am C6, gefolgt von einer hydrolytischen Desaminierung. Im Folgenden wird im Alkalischen desulfoniert, wobei Uracil entsteht. 5-Methylcytosin zeigt eine sehr geringe Reaktivität, weshalb es bei optimierten Bedingungen nicht verändert wird. Die Reaktion zeigt sehr gute Ausbeuten von ungefähr 99 %. [86] [87]

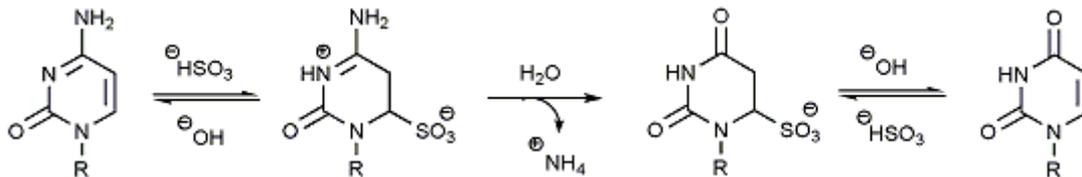


Abbildung 24: Mechanismus der Bisulfit-Konvertierung (nach [11])

In der folgenden PCR Reaktion kann nun zwischen methyliertem und unmethyliertem Cytosin unterschieden werden, wozu die DNA Polymerase an sich nicht fähig ist. Uracil, welches vor der Bisulfit-Konvertierung unmethyliertes Cytosin war, wird bei der Elongation mit Adenin gepaart, da die DNA Polymerase Uracil wie Thymin behandelt. So wird im Folgenden auch Thymin an diesen Stellen eingesetzt, während für methyliertes Cytosin Cytosin verwendet wird. Damit erhält man eine Änderung der Basensequenz, wie in Abbildung 25 dargestellt. [86] [87]

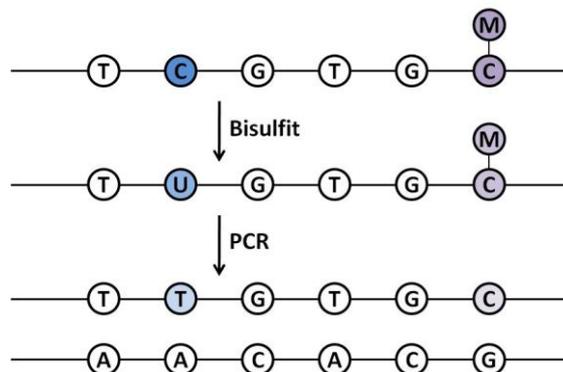


Abbildung 25: Änderung der Basenabfolge durch die Bisulfit-Konvertierung und Auswirkung auf die PCR.

Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass die DNA dabei intakt bleibt und für verschiedenste Untersuchungen verwendet werden kann. Es kann allerdings passieren, dass gerade bei CpG reichen Sequenzen, die schwerer zu denaturieren sind (siehe 3.2.1), die Trennung der Stränge nicht vollständig gelingt und sie nicht konvertiert werden. Dies spiegelt sich in einem zu hohen erhaltenen Methylierungsgrad wider. Außerdem sind bei einer zuvor unmethylierten Sequenz anschließend nur mehr drei Basen vorhanden, was das Finden von geeigneten Primern erschweren kann. [87]

Die Bisulfit-Konvertierung ist der erste Schritt für alle unten beschriebenen Methoden zur Ermittlung des Ausmaßes der DNA-Methylierung. Wird im Folgenden von methylierter DNA, zum Beispiel von Primern, die spezifisch für methylierte DNA sind, gesprochen, so ist damit ursprünglich vollständig methylierte DNA gemeint. Die Primer enthalten in diesem Fall aber die Basenabfolge für die Bisulfit-konvertierte, methylierte DNA.

3.1.4.2 Methylierungs-spezifische PCR

Methylierungs-spezifische PCR-Methoden (MSP) basieren auf der Verwendung von verschiedenen Primern, die entweder spezifisch für methylierte oder für unmethylierte DNA sind. Durch die Änderung der Basenabfolge durch die Bisulfit-Konvertierung erhält man zwei unterschiedliche Primersequenzen, falls ein CpG-Dinukleotid (im Folgenden als CpG bezeichnet) enthalten ist. Im einfachsten Fall werden zwei Primerpaare für dieselbe Sequenz entworfen und für jedes eine eigene PCR durchgeführt. Der Methylierungsgrad kann anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese ermittelt werden. [87]

Ist in der Primersequenz nur ein CpG enthalten, unterscheiden sich die beiden Primer nur durch eine Base. Dies kann zu einer falschen Anlagerung führen, die durch genaues Optimieren der Annealing-Temperaturen überwunden werden kann. Vorteilhaft ist es dabei auch, mehrere CpG zu verwenden. Sind aber zu viele CpG enthalten, wird das Templat nur mehr dann amplifiziert, wenn alle CpG des Primers methyliert oder unmethyliert sind. [87]

3.1.4.3 Methylierungs-unspezifische PCR

Die zweite Möglichkeit, das Ausmaß der DNA-Methylierung mittels PCR zu bestimmen, ist die methylierungs-unspezifische PCR (MIP). Dabei werden Primer verwendet, welche das Templat unabhängig vom Methylierungsstatus amplifizieren. Es wird dennoch Bisulfit-konvertierte DNA verwendet, da die eigentliche Methylierungs-Analyse anschließend

durchgeführt wird. Beispiele für solche post-PCR-Analysen sind die Bisulfit-Sequenzierung, Restriktionsanalyse und Schmelzkurvenanalyse. Besonders wichtig ist für diese Methoden, dass unmethylierte und methylierte DNA gleich gut amplifiziert werden. Dieses Problem wird in Abschnitt 3.2.2 behandelt. [88] [89]

3.2 Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (HRM)

3.2.1 DNA Schmelzkurven

Als Schmelztemperatur wird in der DNA-Analytik jene Temperatur bezeichnet, bei der die doppelsträngige Helix in ihre Einzelstränge dissoziiert. Für die Trennung müssen dazu die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen gelöst und die Stapelwechselwirkungen aufgehoben werden. Die Temperatur für das Schmelzen der DNA ist nicht für jeden Strang dieselbe, sondern hängt von der Basensequenz ab. Guanin (G) bildet bei der Paarung mit Cytosin (C) drei Wasserstoffbrückenbindungen aus, Thymin (T) und Adenin (A) allerdings nur zwei (Abbildung 26). Daher ist auch der Energieaufwand, ein Thymin von einem Adenin zu trennen, viel geringer. Die Energiemenge und damit auch die Temperatur, die benötigt wird, hängen also von der Anzahl der Wasserstoffbrücken zwischen den Strängen ab. Ein hoher Cytosin- und Guanin-Gehalt erhöht somit die Schmelztemperatur. Ein exakter Schmelzpunkt kann aber nur für sehr kurze Sequenzen bestimmt werden, normalerweise erhält man eher ein Schmelzprofil. Das Aussehen eines solchen Profils wird durch die Basenabfolge bestimmt. [24] [90]

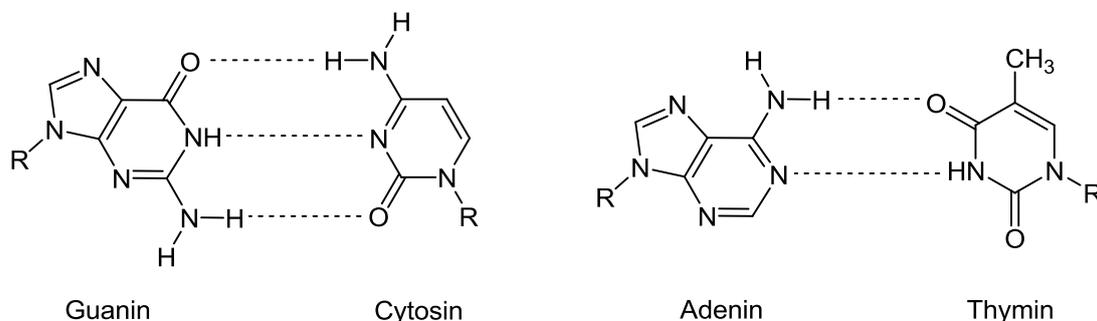


Abbildung 26: Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleinbasen (nach [84]).

Das Schmelzprofil des Amplikons kann durch langsames Erhitzen und Verwendung eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes sichtbar gemacht werden. Bei Temperaturen unter

dem Beginn des Schmelzens ist der Farbstoff gesättigt in die Doppelhelix eingelagert und gibt ein maximales Fluoreszenzsignal. Mit Anstieg der Temperatur bleibt das Signal solange konstant, bis sich die Stränge zu teilen beginnen. An die Einzelstränge kann der Farbstoff nicht mehr binden, was ein Sinken der Fluoreszenzintensität mit sich bringt. Wird nun die Fluoreszenzänderung (eigentlich die negative, erste Ableitung der Fluoreszenz, $-dF/dT$), gegen die Temperatur aufgetragen, so zeigt der erhaltene Peak den Temperaturbereich an, in welchem das Amplikon schmilzt. An der Peakhöhe, also dem Punkt, an dem das Signal am stärksten abfällt und sich damit die Stränge am meisten trennen, kann die sogenannte Schmelztemperatur abgelesen werden. Sie wird oft an eine Real-Time PCR angeschlossen, weil damit überprüft werden kann, ob auch tatsächlich das Templat amplifiziert wurde. Bei einer Anlagerung der Primer an einer falschen Stelle erhält man einen verschobenen Peak oder auch zwei Peaks, sollte das Templat ebenso amplifiziert worden sein. Außerdem können auf diese Weise auch Primerdimere oder Kontaminationen in der Negativkontrolle nachgewiesen werden. [90]

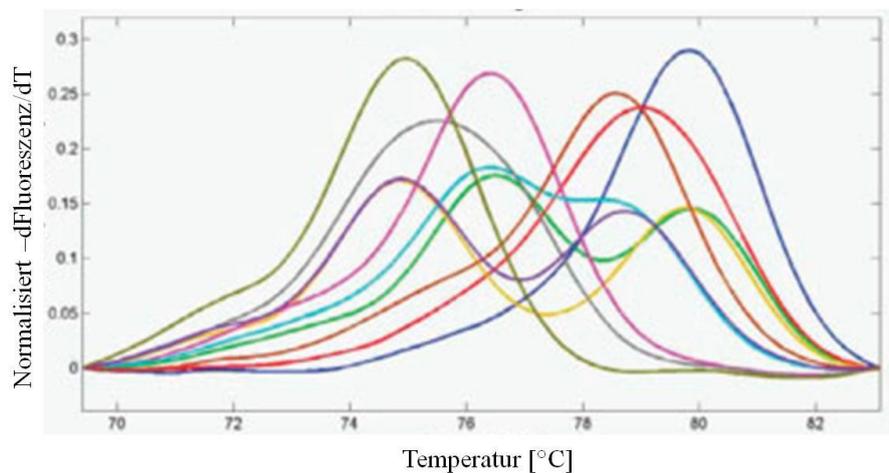


Abbildung 27: Schmelzkurven verschiedener DNA Sequenzen (nach [91]).

3.2.2 Methylierungssensitive Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse

Der Unterschied zwischen einer herkömmlichen Schmelzkurvenanalyse und einer HRM-Analyse (hochauflösende Schmelzkurvenanalyse, engl.: high resolution melting) ist in erster Linie der Temperaturgradient. Der schrittweise Temperaturanstieg wird dabei in kleinen Änderungen von bis zu $0,05\text{ }^{\circ}\text{C}$ vollzogen. Dies ermöglicht es, auch einzelne Änderungen der Basenabfolge, wie zum Beispiel eine Mutation, zu erfassen. [92]

Für diese Methode kann SYBR Green I (beschrieben in 3.1.3.1) nicht als Fluoreszenzfarbstoff verwendet werden, da es in zu hohen Konzentrationen die DNA Polymerase hemmt. Somit kann nicht genügend SYBR Green I zugegeben werden, um die PCR-Produkte zu sättigen. Als die HRM Analyse entwickelt wurde, stellte dies ein Problem dar, da somit der hauptsächlich verwendete Fluoreszenzfarbstoff nicht geeignet war. Inzwischen wurden Alternativen gefunden, die es erlauben, ohne Einschränkungen in der PCR eine Sättigung zu erreichen. Beispiele dafür sind LC Green Farbstoffe, Syto 9 und Eva Green. [90]

Die HRM-Methode kann zur Analyse des Methylierungsgrads verwendet werden. Da sich Schmelzkurven dann voneinander unterscheiden, wenn die Sequenzen in mindestens einer Base variieren, muss auch die Methylierung durch eine Änderung der Basenabfolge aufscheinen. Dies wird durch die Bisulfit-Konvertierung erreicht. Da unmethylierte Cytosine zu Uracil und in der PCR in Thymin umgeschrieben werden, ergibt sich für eine vollständig unmethylierte DNA ein viel höherer A+T Gehalt als für eine methylierte. Damit schmelzen unmethylierte Template früher, also bei tieferen Temperaturen. Der Methylierungsstatus einer unbekanntenen Probe kann durch den Vergleich des Schmelzprofils mit jenen unmethylierter und methylierter Standards erhalten werden (Abbildung 28). [90]

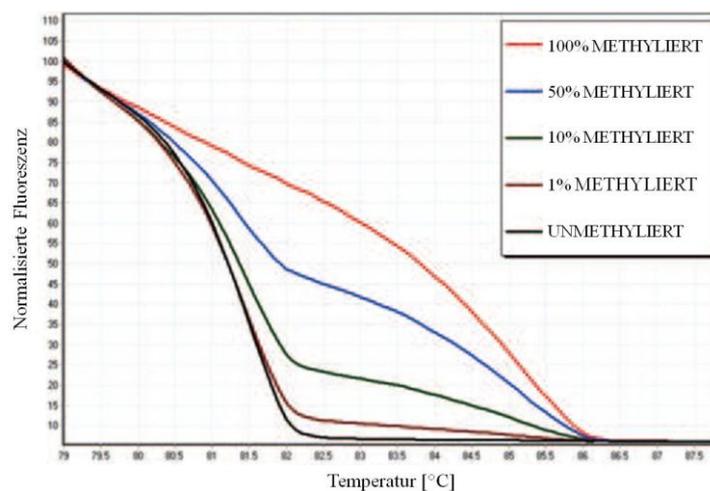


Abbildung 28: Schmelzkurven von DNA Sequenzen verschiedenen Methylierungsgrads (nach [88]).

In der oben beschriebenen Unterteilung gehört die methylierungssensitive HRM (MS-HRM) zu den MIP-PCR Methoden. Die Primer sollten so entworfen werden, dass sie unmethylierte und methylierte DNA gleichermaßen amplifizieren, eine Unterscheidung sollte ja erst im anschließenden Schmelzen erfolgen. Deshalb ist theoretisch ein Bereich optimal, der keine methylierten Cytosine enthalten kann, also keine CpG-Dinukleotide. Im Laufe der Bisulfit-Konvertierung würde ein solches nämlich zu einer Änderung der Basenabfolge führen. Je

nachdem, ob dieses Cytosin in der Probe nun methyliert ist oder nicht, ist der Primer komplementär oder weicht in einer Base ab. Somit kommt es zu einer bevorzugten Amplifikation, die unerwünscht ist. Das Primerdesign kann sich daher als schwierig erweisen, da die gewünschten Regionen für solche Analysen meist in CpG-Inseln liegen und diese einen sehr hohen Gehalt an CpG-Dinukleotiden aufweisen. Welche Regeln für das Entwerfen von Primerpaaren für die MS-HRM-Analyse gelten und wie es praktisch durchgeführt wird, ist in Abschnitt 4.1 beschrieben. [24]

Wie oben bereits erwähnt, müssen methylierte und unmethylierte Sequenzen in der PCR gleichermaßen amplifiziert werden. Wird ein Templat bevorzugt, spricht man von einem PCR-Bias. Grundsätzlich gilt die Regel, dass beim Einsatz eines Primerpaars zur Amplifikation zweier Template mit verschiedenem C+G Gehalt jenes mit dem tieferen C+G Gehalt bevorzugt wird. Dies schlägt sich natürlich auch in der Sensitivität der Methode nieder. Warnecke *et al.* haben mittels PCR und anschließender Analyse mit methylierungsspezifischen Restriktionsenzymen den Bias für Standards mit bekanntem Methylierungsgrad untersucht. Es zeigten sich teilweise starke Verfälschungen der Ergebnisse durch die bevorzugte Amplifikation, sodass für einen Standard aus 95 % methylierter und 5 % unmethylierter DNA ein Ergebnis von 50 % methyliert erhalten wurde. [93] Da es sich bei der MS-HRM-Analyse aber nicht um eine absolute Methode handelt, sondern eine Kalibrierung mit Standards benötigt wird, kann ein geringer Bias durchaus zur Steigerung der Empfindlichkeit der Methode ausgenutzt werden. Wird für die Proben ein niedriger Methylierungsgrad erwartet, zeigt sich ein Bias ins Methylierte (also eine bevorzugte Amplifikation des methylierten Templates) als vorteilhaft, wie in Abbildung 29 zu sehen ist. Es kommt so zu einer starken Änderung des Signals bei kleinen Änderungen des Methylierungsgrads, sodass selbst sehr geringe Differenzen detektiert werden können. [90]

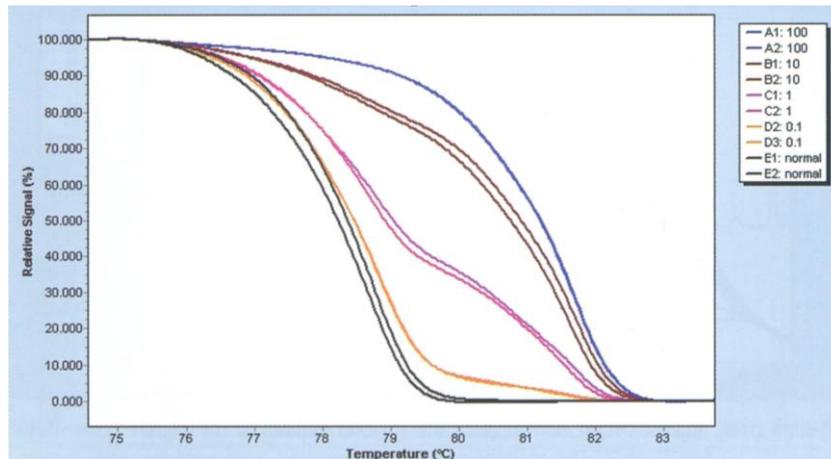


Abbildung 29: Beispiel für eine stark bevorzugte Amplifikation des methylierten Templats. Die normalisierten Schmelzkurven zeigen einen großen Unterschied zwischen 0,1 % und 1 % methylierter DNA und einen weitaus geringeren für 10 % und 100 %. [90]

Eine weitere Schwierigkeit ist die Auswahl der zu amplifizierenden Sequenz. Lange Sequenzen besitzen oft ein sehr komplexes Schmelzprofil, da sie aus mehreren kleinen Schmelzdomänen bestehen. Ein kurzes Amplikon, das nur aus einer einzigen Domäne besteht bzw. eine Hauptdomäne besitzt, führt zu einem einzelnen Abfall der Fluoreszenz und damit zu einem einfach zu interpretierenden Ergebnis. Umso kürzer das Templat ist, desto besser können Variationen kurzer Sequenzen wie die Differenz in einer einzelnen Base nachgewiesen werden. Die bevorzugte Länge für eine Schmelzkurvenanalyse beträgt 100 bp. Das Schmelzprofil des Templats kann beim Entwerfen der Methode auf seine Tauglichkeit (es sollten nicht mehr als ein oder zwei Schmelzdomänen enthalten sein) überprüft werden, indem Programme zur Abschätzung des Schmelzverlaufs verwendet werden. Ein Beispiel ist die frei zugängliche Anwendung POLAND, mit der auch die Schmelztemperatur errechnet wird. [94] Die Schmelztemperatur ist deshalb ein wichtiger Faktor, weil der Unterschied zwischen methylierter und unmethylierter DNA groß genug sein muss, um die Kurven unterscheiden zu können. Da eine vollkommen unmethylierte DNA nach der Bisulfit-Konvertierung einen viel höheren A+T Gehalt aufweist, sinkt die Schmelztemperatur. Umso mehr CpG-Dinukleotide in der Sequenz enthalten sind, desto größer ist der Unterschied. Da nun aber nicht nur zwischen vollkommen methyliert und unmethyliert differenziert werden soll, sondern auch teilweise methylierte Proben untersucht werden sollen, muss die Temperaturdifferenz groß genug sein. [90] [91] [92]

Die Analyse von Proben unbekanntem Methylierungsgrads ist nur möglich, indem über eine Standardreihe kalibriert wird. Es werden dazu vollständig methylierte und unmethylierte, Bisulfit-konvertierte DNA verwendet, die in den gewünschten Verhältnissen gemischt

werden. Die einzelnen Proben werden mittels Real-Time PCR amplifiziert und anschließend im selben Thermocycler die Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Die Auswertung erfolgt im ersten Schritt über das Auftragen der Abnahme des Fluoreszenzsignals ($-dF/dT$) gegen die Temperatur. Dabei erhält man, wie bereits oben beschrieben, die Schmelztemperatur über die Peaks. Für eine methylierungsspezifische Analyse wird ein Peak für das unmethylierte und ein zweiter, bei höherer Temperatur, für das methylierte Amplikon erhalten. Unterschiedlich stark methylierte Template zeigen bei beiden Temperaturen einen Peak, wobei die Peakhöhe vom jeweiligen Methylierungsgrad abhängig ist. So sollten für einen Standard mit 50 % Methylierung zwei Peaks derselben Höhe erhalten werden. Eine Ungleichheit der Peaks würde auf einen Bias hindeuten. Wird zum Beispiel die unmethylierte Sequenz bevorzugt amplifiziert, liegen am Ende der PCR nicht mehr 50 % methylierte und 50 % unmethylierte Template vor. Damit kommt es zum stärkeren Abfall des Fluoreszenzsignals bei der Schmelztemperatur des unmethylierten Amplikons und so auch zu einem höheren Peak. Es kann über diese Darstellung also auf das Vorhandensein eines PCR-Bias geprüft werden und durch Vergleich mit den Peakhöhen der Standards der Methylierungsgrad abgeschätzt werden. [90]

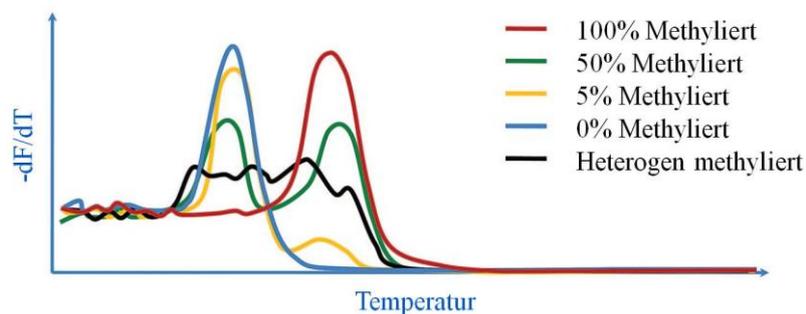


Abbildung 30: Beispiel für den Schmelzpunkt unterschiedlich methylierter DNA Sequenzen. Modifiziert (nach [85])

Eine quantitative Auswertung einer HRM-Analyse kann mit den erhaltenen Schmelzkurven nicht durchgeführt werden. Der Grund dafür sind die Unterschiede zwischen den einzelnen Anfangsintensitäten des Fluoreszenzsignals. Bedingt werden sie durch die unterschiedliche Menge an PCR-Produkten am Ende der Amplifikation. Selbst wenn eine Doppelbestimmung derselben Probe durchgeführt wird, wird nicht dieselbe Anfangsfluoreszenz erhalten. Die Kurven können so also nicht direkt miteinander verglichen werden, da ein höheres Signal am Anfang auch zu einem stärkeren Abfall führt und das Ergebnis beeinflusst. Die Kurven müssen aneinander angepasst werden, was durch Normalisierung der Anfangs- und

Endintensitäten erreicht wird. Damit werden die Schmelzkurven direkt vergleichbar und der exakte Methylierungsgrad kann über die Kalibriergerade bestimmt werden. [90]

Die Kalibrierung erfolgt über die Darstellung der einzelnen Standards in Bezug auf den unmethylierten Standard (0 %). Dazu werden die Differenzialkurven aus den normalisierten Kurven erstellt. Bei Auftragung der normalisierten Kurve minus dem 0 % Standard gegen die Temperatur werden Peaks erhalten. Die Grundlinie bildet damit der 0 % Standard, die Peakhöhe kann bei der Schmelztemperatur abgelesen werden. Über diese relativen Peakhöhen gegen die Methylierung in % kann eine Kalibriergerade erstellt werden. [95]

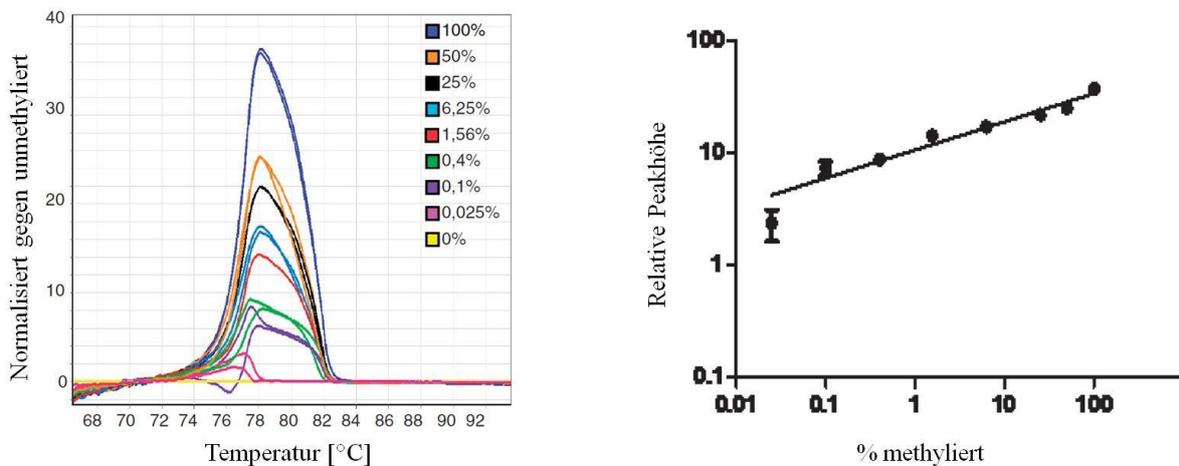


Abbildung 31: Darstellung der Differenzialkurven verschiedener Standards (% methyliert) und der zugehörigen Kalibriergerade (nach [95]).

3.3 MethyLight

MethyLight ist eine weitere quantitative Real-Time PCR Anwendung zur Bestimmung des DNA-Methylierungsgrads. Sie wird zu den MS-PCR Methoden gezählt, es werden also Primer verwendet, die spezifisch methylierte oder unmethylierte DNA amplifizieren. Die Primer lagern an eine Sequenz an, die mindestens ein CpG-Dinukleotid enthält und durch die Bisulfit-Konvertierung ergeben sich damit zwei verschiedene Sequenzen für dasselbe Templat, je nach Methylierungsstatus. MethyLight verwendet zwei Primerpaare und bestimmt in einer Real-Time PCR parallel die Menge der beiden Template. Im Rahmen dieser Arbeit wurde aber eine andere Version verwendet, welche methylierungs-unspezifische Primer verwendet. Diese Version wird im Folgenden erklärt. [96]

Die Methode basiert auf der TaqMan-Technologie, d.h. es wird also die Menge an entstehendem Templat über eine Sonde bestimmt. MethyLight zeichnet sich dadurch aus, dass

die Sonden CpG-Dinukleotide enthalten, wie in Abbildung 32 dargestellt. Wie bei methylierungs-spezifischen Primern werden auch in diesem Fall zwei verschiedene Sequenzen für methyliert und unmethyliert benötigt. Jede Sequenz wird nun mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert, sodass zwei Sonden erhalten werden. In der verwendeten Version amplifiziert ein methylierungs-unspezifisches Primerpaar dasselbe Templat, ob methyliert oder unmethyliert. Zur Unterscheidung kommt es durch die Anlagerung der entsprechenden Sonde. Durch die Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase kommt es zum Abbau der Sonde und es wird das jeweilige Fluoreszenzsignal erhalten. Die Bestimmung der DNA-Methylierung kann im selben Gefäß durchgeführt werden, wenn gleichzeitig bei zwei verschiedenen Wellenlängen (bestimmbar durch die gewählten Farbstoffe) detektiert wird. Es ergibt sich daher für eine Probe je eine Kurve für methylierte und eine für unmethylierte Template. [97] [98] [99] [100]

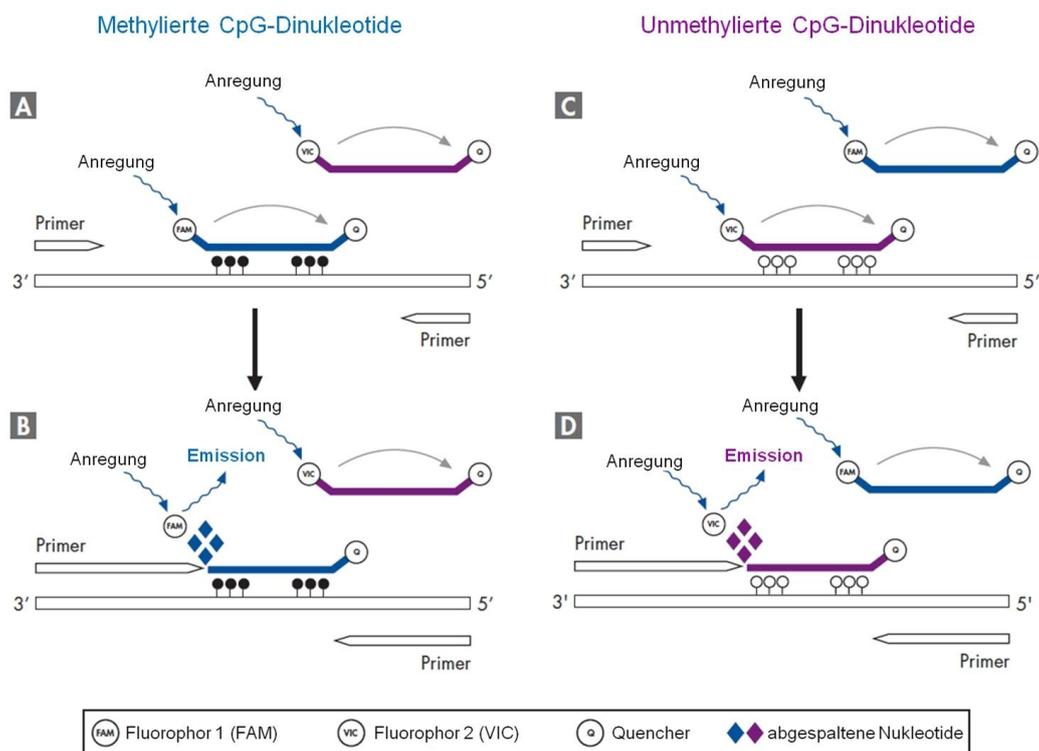


Abbildung 32: Ablauf der verwendeten MethyLight Methode. Schwarze Punkte auf dem Templat zeigen methylierte, leere unmethylierte CpG-Dinukleotide an. (Modifiziert nach [99])

Als Ergebnis der Real-Time PCR erhält man C_T -Werte, die eine quantitative Auswertung möglich machen. Umso stärker die Probe methyliert ist, desto stärker ist das Signal für den Farbstoff der für methylierte DNA spezifischen Sonde. Es kommt also zu einem früheren Übergang in die exponentielle Phase. Über den Unterschied in den C_T -Werten kann eine

Aussage über das Mengenverhältnis von methylierter und unmethylierter DNA gemacht werden. Ist in einer Probe doppelt so viel methylierte DNA enthalten, so ist theoretisch ein Zyklus mehr nötig, um dieselbe Menge an unmethylierter DNA zu erhalten. Dem entsprechend werden die C_T -Werte um eins differieren. Subtrahiert man nun den C_T -Wert der Kurve für methylierte DNA von jener für unmethylierte, zeigt sich das Verhältnis der beiden; eine große Zahl spricht dabei für eine schwache Methylierung (hoher C_T -Wert bedeutet weniger Ausgangstemplat). Um den Anteil an unmethylierter DNA zu erhalten, muss die Verdopplung in jedem Zyklus (x) berücksichtigt werden (2^x). Der Methylierungsstatus in Prozent kann über Formel 1 berechnet werden. Es handelt sich bei MethyLight also um eine absolute Methode, für die keine Kalibrierung nötig ist. [101] [102]

$$Konz_{Meth} = 100/[1 + 2^{Ct_{Meth} - Ct_{Unmeth}}]\%$$

Formel 1: Berechnung des Methylierungsgrads in % für ein MethyLight Experiment. [99]

Die Berechnung des DNA-Methylierungsstatus des Templats kann an einem Beispiel einfach erklärt werden. Enthält eine Probe viermal so viel unmethylierte DNA wie methylierte, sie ist also zu 20 % methyliert, so wird der C_T -Wert für die Amplifikation methylierter DNA um zwei Werte höher sein als jener der unmethylierten. Damit ergibt sich für C_T methyliert – C_T unmethyliert = 2 und für $2^2 = 4$ als der verhältnismäßige Anteil an unmethylierter DNA. Die Probe besteht danach also aus 1 Teil methyliert und 4 Teilen unmethyliert und insgesamt aus $1/(1+4) = 1/5 = 0,2$ Teilen methylierter DNA. Die Multiplikation mit 100 ergibt den DNA-Methylierungsgrad in Prozent.

3.3.1 Vergleich der MS-HRM mit MethyLight

Nur wenige Methoden erlauben eine quantitative Bestimmung der DNA-Methylierung. Beide vorgestellten Methoden (MS-HRM und MethyLight) ermöglichen eine solche. Es werden beide in der Literatur als sehr empfindlich, mit Nachweisgrenzen bis zu 0,1 % methylierter oder unmethylierter DNA beschrieben. Sie unterscheiden sich aber nicht nur darin, dass es sich einmal um eine MS-PCR und einmal um eine MIP-PCR handelt. Die einzelnen Vor- und Nachteile werden im Folgenden besprochen. [88] [101]

Der erste Punkt in der Entwicklung einer der beiden Methoden ist jeweils das Entwerfen von geeigneten Primern. Definitionsgemäß würde eine MS-PCR Methode zwei kompatible Primerpaare erfordern, da aber eine Art von MethyLight verwendet wurde, die mit

methylierungs-unspezifischen Primern arbeitet, wird in beiden Fällen ein Primerpaar benötigt. Die methylierungs-spezifischen Sonden für MethyLight müssen aber noch zusätzlich entworfen werden und kompatibel zueinander und mit dem Primerpaar sein. Dies stellt ein weitaus komplexeres Problem dar und ist relativ teuer. Das für die HRM benötigte Primerpaar ist kostengünstig und kann über geeignete Programme relativ einfach gefunden werden (siehe Kapitel 4.1.2.1 und 4.1.2.2). [88] [97]

Weitere Kostenpunkte sind das Gerät und die Kontroll-Standards. Bei MethyLight-Analysen wird die Fluoreszenz bei zwei Wellenlängen gemessen, es muss also ein geeigneter Thermocycler mit verschiedenen Detektionskanälen vorhanden sein. Aufwändiger ist dabei der Thermocycler für HRM, der schnell kleinste Temperaturänderungen einstellen muss. Der zweite Punkt, die Kontroll-Standards für die Kalibration, sind ein laufender und recht hoher Kostenpunkt in der HRM-Analyse. Vollständig methylierte und unmethylierte DNA sind kommerziell erhältlich, sie müssen für jeden Versuch in verschiedenen Verhältnissen gemischt und mitgeführt werden. Für die absolute MethyLight-Methode werden dagegen nur die Proben analysiert, was auch einen geringeren Arbeitsaufwand bedeutet. Allerdings zeigt die Verwendung von Standards auch einen Vorteil: ein PCR-Bias kann nachgewiesen werden. Die Auswahl der Primer und das Optimieren der Methode kann in beiden Fällen durch die Verwendung von Kontrollen, im Besonderen eines 50 % Standards überprüft werden. Bei der HRM wird in jedem Versuch ein eventueller Bias aufgezeigt. Außerdem kann hier durch den Bias die gewünschte Empfindlichkeit gesteuert werden. Eine ungleiche Amplifikation ist damit nicht unbedingt ein großes Problem, im Gegensatz zum MethyLight. [89]

Zusätzlich sollte jede MethyLight-Analyse über ein Kontrollgen normalisiert werden, um Abweichungen in der eingesetzten DNA-Menge zu korrigieren. Diese Ungenauigkeiten werden bei der HRM, wie oben beschrieben, durch das Normalisieren der Kurven behoben. Es wird nur eine geeignete Software und kein eigenes Primerpaar für ein Kontrollgen benötigt. [96]

Eine weitere Einschränkung von MethyLight ist die Analyse weniger CpG-Dinukleotide. Es werden nur jene einbezogen, die in der Sequenz der Sonden enthalten sind. Da die Sondenlänge begrenzt ist, werden normalerweise nur vier bis sechs CpGs verwendet. Es wird außerdem nur zwischen vollständig methyliert oder unmethyliert unterschieden, außer die Sonde enthält die Sequenz für ein teilweise methyliertes Templat. Bei einer heterogenen Methylierung würde nur ein Trend gesehen werden, weil zum Beispiel eine Sonde mit der Sequenz für vier methylierte CpG eher an ein Templat anlagert, bei dem drei dieser CpGs methyliert sind, als wenn nur eines methyliert vorliegt. Im ersten Fall unterscheidet sich die

Theoretischer Hintergrund

Sequenz nur in einer, im zweiten in gleich drei Basen. Wollte man alle Möglichkeiten berücksichtigen, würden 2^n Sonden benötigt, wobei n der Anzahl der CpG-Dinukleotide entspricht. Bei zwei CpGs braucht man schon vier Sonden mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, um alle Fälle abzudecken. Dies würde nicht nur zu einem viel zu komplexen Design und einer aufwendigen Optimierung führen, der Kostenaufwand würde sich zusätzlich um ein Vielfaches steigern. [97] [101]

Die hochauflösende Schmelzkurvenanalyse bezieht im Gegensatz dazu einige CpG Dinukleotide mit ein. Der Methylierungsstatus jedes CpG Dinukleotids des Templats hat einen Einfluss auf das Schmelzverhalten. Damit ist diese Methode die einzige, die teilweise methylierte Sequenzen unterscheiden kann. Die einzige Einschränkung bildet dabei die Länge des Amplikons, bzw. die Komplexität der Schmelzkurve, wie in 3.2.2 beschrieben. [88]

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Entwerfen von Primern für die hochauflösende Schmelzkurvenanalyse

4.1.1 Allgemeine Regeln für das Primerdesign

Die Grundlage für die Analyse des gewünschten Bereichs der DNA bildet die Verwendung von geeigneten Primern. Es werden zwei Oligonukleotide verschiedener Sequenz benötigt, welche jeweils an einen der komplementären Stränge der Templat DNA binden. Die Primer flankieren damit den zu amplifizierenden Bereich, wobei sie nur spezifisch an diesen anlagern dürfen. Das Finden eines geeigneten Paares stellt sich dabei häufig als anspruchsvoll heraus, was durch die Verwendung einer dafür entwickelten Software erleichtert werden kann. Zusätzlich gibt es Nukleotid-Sequenz Suchprogramme, welche auf Datenbanken mit bekannten Gensequenzen zugreifen können und damit die Selektivität überprüfen. Werden die Primer manuell entworfen, aber auch bei der Benutzung solcher Software, ist es nötig, die grundlegenden Voraussetzungen zu kennen und auf diese zu achten. Im Folgenden werden die Regeln nach M. J. McPherson und S. G. Møller angeführt. [81] [83]

- Die Länge des Primers sollte 16-30 Nukleotide betragen, sodass eine gute Selektivität für das Templat erreicht wird. Je länger die Sequenz, desto unwahrscheinlicher ist das Vorhandensein von Bereichen mit derselben Basenabfolge. Die angegebene Anzahl ist ausreichend für die spezifische Bindung, sogar bei komplexen Ausgangs-Templaten wie der menschlichen, genomischen DNA.
- Es sollte ungefähr dieselbe Anzahl von jedem Nukleotid vorhanden sein.
- Die Wiederholung einer Base öfter als dreimal sollte vermieden werden. Besonders drei oder mehr C oder G am 3'-Ende können eine falsche Anlagerung bewirken. Regionen, die Abschnitte aufweisen, welche reich an einem Nukleotid sind, sind außerdem ungünstig, da sie zu einem „Rutschen“ des Primers führen können.
- Der Primer darf in sich nicht komplementär sein, also keine Sekundärstruktur ausbilden.

- Die Entstehung von Primerdimeren muss verhindert werden. Deshalb darf das 3'-Ende keine Sequenzen enthalten, welche eine Basenpaarung mit dem zweiten Primer oder anderen Oligonukleotiden der PCR erlaubt.

Der Primer muss nicht unbedingt vollständig komplementär zur Zielsequenz sein. Wichtig ist vor allem das 3'-Ende, da dieses den Startpunkt der Verlängerung durch die DNA-Polymerase bildet und deshalb spezifisch binden muss, um auch das gewünschte Templat zu erhalten. Besonders die ersten drei Basen müssen übereinstimmen, das 5'-Ende ist dagegen von weniger großer Bedeutung. In diesem Bereich können Nukleotide ausgetauscht werden, um dem Primer gewünschte Eigenschaften zu verleihen. [81]

Ein weiterer wichtiger Punkt in der Auswahl der Primer ist die optimale Annealing-Temperatur. Da die Temperatur ausschlaggebend für die spezifische Anlagerung ist, muss das Primerpaar in dieser übereinstimmen. Um sie abschätzen zu können, wird oft die Schmelztemperatur des Primer/Target Duplex (T_m) herangezogen. Sie wird auch als die Temperatur definiert, bei der die Hälfte des Primers an das Target gebunden ist. Die einfachste Methode, sie für aus bis zu 20 Nukleotiden bestehenden Primern zu berechnen, ist das Addieren der Anzahl der einzelnen Basen und die Verwendung von Formel 2.

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

Formel 2: Formel zur Abschätzung der Schmelztemperatur eines Oligonukleotids. [81]

Diese Berechnung basiert auf der unterschiedlich starken Bindung zwischen C und G und dem A/T Basenpaar, was in einer höheren Schmelztemperatur für C/G reiche Sequenzen resultiert. Diese Eigenschaft wird auch in der Schmelzkurvenanalyse verwendet und ist in Kapitel 3.2.1 beschrieben. Die Annealing-Temperatur wird empirisch 5 °C unter T_m angesetzt, wobei eine Erhöhung eventuell die Selektivität erhöhen kann. [81] [83]

4.1.2 Primerpaare für die MS-HRM

Für die MS-HRM wird das Templat unabhängig von seinem Methylierungsstatus amplifiziert. Da die Unterscheidung nicht während der PCR, sondern beim anschließenden Schmelzen passiert, darf es zu keiner Bevorzugung einer Sequenz (methyliertes oder unmethyliertes Templat) kommen. Deshalb sollten grundsätzlich, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, keine CpG-Dinukleotide in der Basenabfolge der Primer vorkommen. Allerdings zeigt diese Regel im Praktischen nicht das gewünschte Resultat. Durch den Unterschied im C+G-Gehalt der

beiden Sequenzen tritt ein Bias auf, es wird also das unmethylierte Templat bevorzugt amplifiziert. Das Verwenden einiger weniger CpG-Dinukleotide gerade am 5'-Ende des Primers ermöglicht das Steuern dieses Phänomens. Der Grund dafür könnte das selektive Binden an methylierte oder unmethylierte Template sein. Sind keine CpG-Dinukleotide enthalten, binden die Primer immer gleich gut an beide Template und es kann zur bevorzugten Elongation eines der beiden kommen. Enthalten die Primer aber wenige CpG-Dinukleotide, binden sie mit unterschiedlicher Effizienz an die beiden Template und können so einen Bias ausgleichen. Die Effizienz wird zusätzlich über die Annealing-Temperatur gesteuert, wie später beschrieben wird. [90] [93] [103]

Die einzelnen Regeln für das Entwerfen eines Primerpaars für die methylierungsunspezifische PCR werden im Folgenden beschrieben. Dabei wird in einem ersten Abschnitt der allgemeine Ablauf geschildert und anschließend soll dieser am Beispiel des Primerdesigns für die Promotorregion von CDKN2A aufgezeigt werden.

4.1.2.1 Ablauf des Primerdesigns

Für die Entwicklung von MS-HRM Methoden wurde in einem ersten Schritt ein Primerpaar mit der Methyl Primer Express Software (Version 1.0) entworfen. Die Gensequenz wurde aus der Datenbank des National Center for Biotechnology Information [104] entnommen und eingefügt. Die Software ermittelt daraus die CpG-Inseln des Gens und es kann die gewünschte CpG-Insel ausgewählt werden. Grundsätzlich wurde immer jene CpG-Insel gewählt, die näher am 5'-Ende des Gens liegt. Als nächster Schritt musste die Bisulfit-Konvertierung simuliert werden, was wiederum von der Software ausgeführt wurde. Dabei wird eine vollständig methylierte und unmethylierte Version der Region erstellt, bei der in einem Fall jedes Cytosin (C) durch ein Thymin (T) ersetzt und im anderen Fall jedes C in einem CpG-Dinukleotid belassen wurde. Es wurde die Funktion BSP-Primer ausgewählt, welche das Entwerfen von Bisulfit-konvertierungsspezifischen PCR Primern ermöglicht. Damit begann die eigentliche Suche nach geeigneten Primern, die nach den allgemeinen Regeln des Primerdesigns und für die MIP-PCR speziellen Regeln durchgeführt wurde. Die Parameter wurden folgendermaßen festgelegt:

Allgemeine Anforderungen:

- Länge des Amplikons: 90 – 150 bp
- Länge des Primers: 18 – 27 bp
- Annealing-Temperatur: 60 – 68 °C

Methylierungs-spezifische Anforderungen:

- Summe der CpG im Primerpaar: 3
- Anzahl der C im Primerpaar, ohne C in CpG: 1 – 10
- Minimale Anzahl der C pro Primer, ohne C in CpG: 3

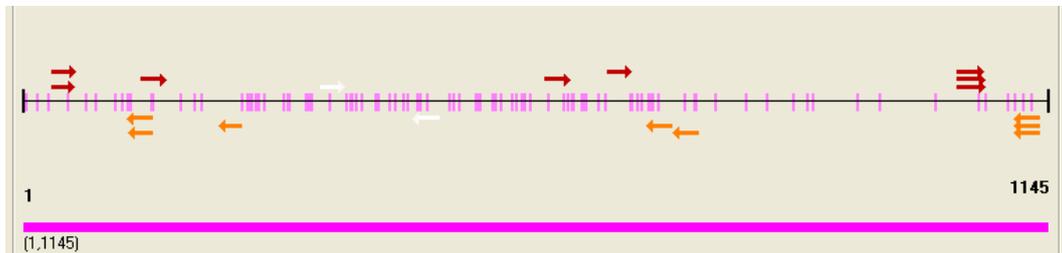


Abbildung 33: Vorschlag der Methyl Primer Express Software für mögliche Primerpaare. Die Pfeile geben die Primer, die vertikalen rosa Striche die CpG-Dinukleotide an.

Durch die Bestimmung dieser einzelnen Parameter wurde von der Software eine Gruppe möglicher Primerpaare vorgeschlagen (Abbildung 33). Beim Auswählen eines Paares wurden die verschiedenen Eigenschaften wie Länge, Schmelzpunkt usw. angezeigt. Außerdem wird auch die Basenabfolge angegeben, wobei C aus CpG-Dinukleotiden zur besseren Erkennung mit Y, bzw. für die komplementäre Sequenz (Reverse Primer) mit R ersetzt werden. Die Primer wurden nun nach verschiedenen Gesichtspunkten aussortiert:

Das Aufeinanderfolgen derselben Base öfter als viermal wurde vermieden. Da dies nicht eingestellt werden konnte, mussten solche Primer manuell aussortiert werden. Besonders an den Enden waren Wiederholungen unerwünscht, weshalb Primer, welche mehr als drei gleiche Basen an einem Ende besaßen, gleichfalls ausgeschlossen wurden.

Das Verwenden eines T am oder nahe des 3' Endes sollte sicherstellen, dass nur Bisulfit-konvertierte DNA amplifiziert wird. Dieses sollte allerdings nicht aus einem CpG stammen, sondern von einem ursprünglichen C, welches nicht von einem G gefolgt wird und im Laufe der Konvertierung in T umgeschrieben wurde. [105]

Die Anzahl der CpG-Dinukleotide wurde, wie von T. Wojdacz et al. empfohlen, nicht gleich null gesetzt. Es sollte eine Anzahl von zwei, höchstens drei CpG-Dinukleotiden pro Primer einbezogen, eine höhere Anzahl aber vermieden werden, um eine bevorzugte Amplifikation des methylierten Templates zu umgehen. [105] Die Verwendung von drei CpG-Dinukleotiden im Primerpaar hat sich als günstig herausgestellt, wobei diese Zahl auch zwei oder vier betragen konnte. Der forward Primer sollte dabei ein bis zwei CpG enthalten, der reverse eines. Manchmal enthielt der reverse Primer auch zwei oder kein CpG. Die Y und R der CpG wurden in der eigentlichen Primersequenz wieder durch C bzw. G (komplementär) ersetzt.

Damit wird der Primer empfindlicher für das methylierte Templat und kann so eine bevorzugte Amplifikation des unmethylierten ausgleichen.

Bei zu vielen CpG wurden gewisse CpG „ausgeschaltet“. Dazu wurde für Y (R) T (A) eingesetzt, was der Sequenz des unmethylierten Templats entspricht. Welches CpG nun ausgeschaltet wurde, wurde durch seine Lage bestimmt. Grundsätzlich sollte beim forward Primer das aktive CpG eher am 5' Ende oder eventuell auch in der Mitte liegen. Bei einer Lage sehr nahe am 5' Ende zeigte es sich von Vorteil, ein zweites CpG zu aktivieren, falls eines in der Mitte des Primers zur Verfügung stand. Bestand nur die Möglichkeit eines zweiten CpG nahe am 3' Ende, wurde eher auf die Aktivierung verzichtet, wobei dies von Fall zu Fall individuell entschieden wurde. Liegt ein aktives CpG sehr nahe dem 3' Ende, wird in der Amplifikation meist das methylierte Templat stark bevorzugt. [105]

Das Amplikon wurde auf seine Länge und die Anzahl der CpG überprüft. Ein zu langes Templat zeigt meist ein kompliziertes Schmelzprofil, ein sehr kurzes enthält normalerweise zu wenig CpG, um eine gute Unterscheidung zwischen methyliert und unmethyliert zu gewährleisten. Es wurden daher Sequenzen um die 100 bp mit ungefähr 10 bis 15 CpG angestrebt.

Die Sequenz der Primer konnte bei Bedarf auch verlängert oder verkürzt werden. Dazu wurde von der Software ein möglicher Bereich vorgegeben. Normalerweise wurden nur einzelne Basen (bis zu vier) am Primerende verwendet, um zum Beispiel die Anforderung des T am 3' Ende zu erfüllen. Anschließend wurden die möglichen Primerpaare, welche nicht nach den obigen Kriterien ausgeschlossen wurden, nach weiteren Gesichtspunkten analysiert.

In erster Linie wurde der Schmelzpunkt überprüft, da das Primerpaar darin auf jeden Fall übereinstimmen muss. Eine Abweichung von bis zu 2 °C wurde toleriert, wobei die von der Software berechnete Temperatur nicht verlässlich war. Sie wurde einerseits nach der Formel 2 berechnet und andererseits mit der Freeware Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator bestimmt. [106] Die daraus erhaltene „salt adjusted“ Temperatur wurde als endgültige herangezogen. Sie wurde auch von T. Wojdacz als die genaueste bewertet. [105]

Ein weiteres wichtiges Kriterium der Primer ist, dass sie keine Sekundärstrukturen ausbilden. Dies wurde mit der Freeware RNAfold überprüft [107]. Zusätzlich wurde bestimmt, ob die Primer untereinander komplementär sind. Dafür wurde die Funktion „Hetero-Dimer“ im Programm OligoAnalyzer (Version 3.1) verwendet, wobei die Anzahl der miteinander wechselwirkenden Basen nicht höher als sieben oder acht sein durfte. [108]

Weiters konnte das Schmelzverhalten des Amplikons simuliert und so überprüft werden, ob es homogen schmilzt. Es wurde dafür die von T. Wojdacz empfohlene Freeware POLAND

verwendet und das vollständig methylierte und unmethylierte Templat analysiert. [94] [105] Zusätzlich zum Verlauf der Schmelzkurve wurde der Unterschied zwischen den Schmelzpunkten von 100 % methyliert und unmethyliert bestimmt. Dieser sollte sich um mindestens vier bis fünf Grad unterscheiden, um eine gute Differenzierbarkeit zu gewährleisten.

4.1.2.2 Primerdesign für die Promotorregion von CDKN2A

Im Laufe der Arbeit wurden Primer für die Promotorregion von CDKN2A entworfen und die MS-HRM Methode optimiert. Die oben beschriebenen Schritte werden nun anhand dieses Beispiels veranschaulicht.

Es wurde die Referenzsequenz NM_000077.4 verwendet und diese in die Methyl Primer Express Software eingefügt. Die folgenden Schritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt, auch die Einstellungen wurden übernommen. Es konnte zusätzlich die Effizienz der Suche bestimmt werden, wobei die Präzision mit einer Skala von eins bis zehn bestimmt werden konnte. Eine niedrige Präzision bedeutete aber auch eine schnelle Suche und umgekehrt, sodass in der Skala mit 3 (relativ schnelle Suche) begonnen und bis zehn alle Stufen durchprobiert wurden. Es ergab sich zum Beispiel bei der Stufe 5 folgendes Bild an vorgeschlagenen Primerpaaren (Abbildung 34). Das weiße ausgewählte Paar zeigt die Versuchsprimer 1 an.

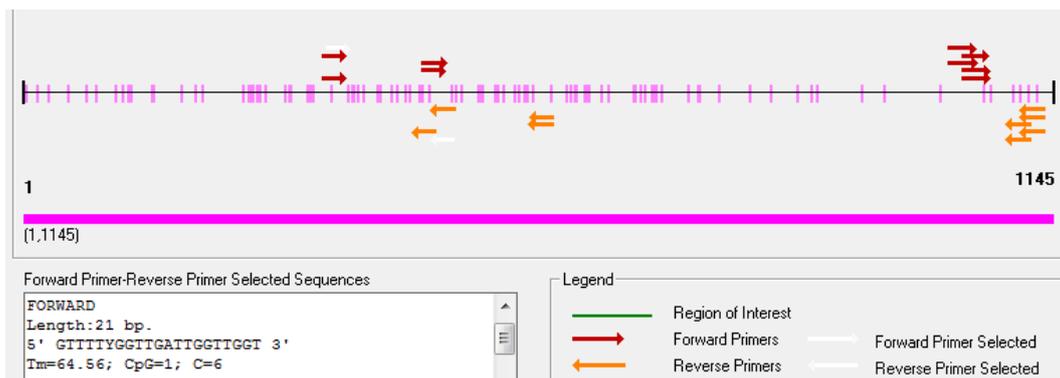


Abbildung 34: Mögliche Primerpaare für CDKN2A

Tabelle 5: Sequenz und Eigenschaften des Versuchsprimerpaars 1 und des entsprechenden Amplikons.

	Primer Forward	Primer Reverse
Vorgeschlagene Sequenz	GTTTTYGGTTGATTGGTTGGT	CRAACRCTACCCATCATCATA
Endgültige Sequenz	GGAGTTTTCGGTTGATTGGTTGGT	CGAACACTACCCATCATCATAACC
Umgebender Bereich	TGGAGTTTTYGGTTGATTGGTTGGTTAYG	CACTCRAACRCTACCCATCATCATAACCT
T _m nach Software [°C]	64,56	64,57
T _m nach Formel 2 [°C]	60	60
T _m nach Oligo Calc [°C]	57,5	57,5
T _m nach Oligo Calc für den endgültigen Primer [°C]	63,6	63,6
Amplikon	Länge: 147 bp	Anzahl der CpG-Dinukleotide: 17

Die Sequenzen für die Primer sind in Tabelle 5 angegeben. Der forward Primer enthält vier T, die sich sehr nahe dem 5' Ende befinden, er wurde aber dennoch verwendet. Direkt am 3' Ende befand sich ein T, welches nicht aus einem CpG stammt, womit das zweite Kriterium erfüllt ist. Es ist außerdem ein CpG enthalten, welches aktiviert wurde, indem in der endgültigen Sequenz ein C anstelle des Y verwendet wurde. Die Lage des CpG ist nahe dem 5' Ende und damit sehr günstig. Der reverse Primer enthält dagegen zwei CpG, eines am 5' Ende und eines in der Mitte. Es konnten nun entweder beide durch Ersetzen des R durch ein G aktiviert werden oder nur jenes am 5' Ende. Da für den reverse Primer immer nur ein CpG verwendet wurde, wurde in die endgültige Sequenz ein A anstelle des R eingefügt. Wäre in den Vorversuchen ein Bias ins Unmethylierte beobachtet worden, hätte man versuchen können, dies durch Aktivieren des zweiten CpG auszugleichen.

Die Überprüfung der Schmelztemperatur der Primer mit der Formel 2 und Oligo Calc ergab unterschiedliche Resultate. Es wurde der Wert von Oligo Calc als zuverlässiger angesehen, dieser entsprach jedoch nicht mehr den Kriterien. Da die optimale Annealing-Temperatur für die PCR bei 60 °C liegt, sollte die Schmelztemperatur ca. 65 °C betragen. [105] Die Temperatur kann eventuell über die Länge der Primer ausgeglichen werden, was auch in diesem Fall geschah. Aufgrund der zu tiefen Temperatur wurden Basen zugefügt, im Falle des forward Primer am 5' Ende, da sonst ein CpG am 3' Ende eingefügt worden wäre und zusätzlich das T am Ende weit in die Mitte des Primers gerückt wäre. Die Lage des aktiven CpG wurde dadurch zwar ungünstiger, eines am 3' Ende ist aber strikt zu vermeiden. Am reverse Primer hätten sowohl am 5' Ende als auch am 3' Ende Basen zugefügt werden

können, da sich damit aber die Lage der CpG nicht ändert, wurde das 3' Ende gewählt. Veränderungen am 5' Ende der Primer mussten auch in der Sequenz des Amplikons korrigiert werden, weshalb diesem am 5' Ende drei Basen zugefügt wurden (vom forward Primer stammend). Auf diese Weise kann auch nur ein Primer verändert werden, sollten die Schmelztemperaturen der beiden Primer nicht übereinstimmen ($< 2 \text{ }^\circ\text{C}$).

Die Primer wurden anschließend noch auf Ausbildung von Sekundärstrukturen und Heterodimeren mit den oben genannten Programmen getestet. In Abbildung 35 sind die Ergebnisse aus RNAfold dargestellt, welche keine Wechselwirkungen anzeigen. Die Oligonukleotide sind als Kreise dargestellt, da keine Base an die andere bindet, die rote Farbe bedeutet eine hohe Wahrscheinlichkeit dieses Ergebnisses, eine gelbe und grüne sind auch noch sehr wahrscheinlich (Blau zeigt eine Wahrscheinlichkeit von null an). Ein Beispiel für einen Primer, der Sekundärstrukturen ausbildet, ist ebenfalls in Abbildung 35 veranschaulicht. Die Freeware OligoAnalyzer errechnete eine mögliche Wechselwirkung von vier Basen zwischen den beiden Primern, was den Vorgaben von höchstens sieben bis acht entspricht.

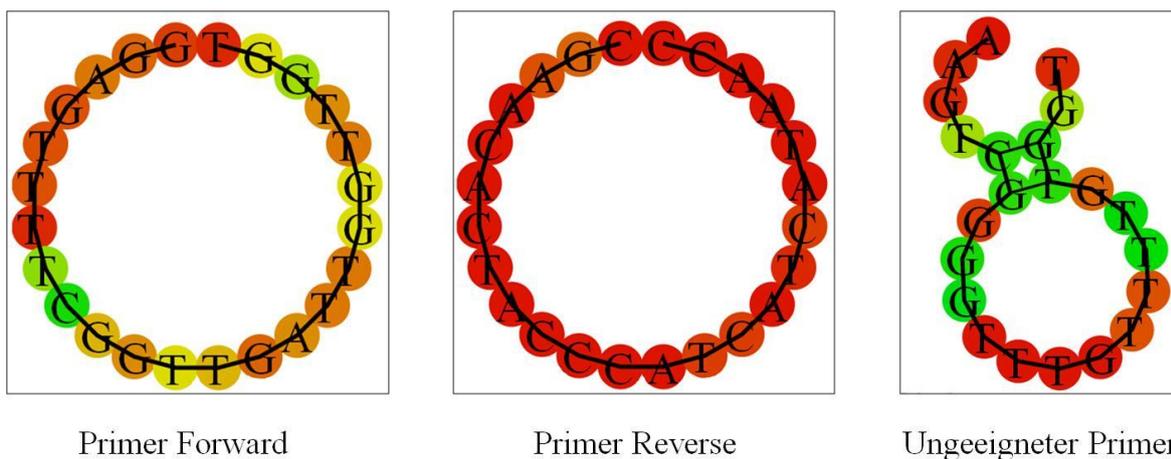


Abbildung 35: Simulation der Sekundärstrukturen von Oligonukleotiden mit RNAfold. Primer Forward und Reverse entsprechen dem Versuchsprimerpaar 1. Zusätzlich ist ein Primer mit Wechselwirkung zwischen vier Basen dargestellt. [107]

Das Amplikon wurde durch die Korrektur der Schmelztemperatur auf 140 bp verlängert und ist damit sehr lang. Dies zeigte sich auch in der Simulation des Schmelzverhaltens mit POLAND, bei der die wahrscheinliche Schmelztemperatur gegen die Sequenz aufgetragen wird. Bei einem homogenen Bereich würde sich eine horizontale Gerade ergeben, da das Templat bei einer bestimmten Temperatur schmilzt. In diesem Fall zeigte sich aber weder für das unmethylierte noch für das methylierte Amplikon eine durchgehende Gerade. Es wurde eine ungefähre Schmelztemperatur von $78 \text{ }^\circ\text{C}$ für die unmethylierte und $86 \text{ }^\circ\text{C}$ für die methylierte Sequenz bestimmt. Der Unterschied der beiden ist damit groß genug für eine

Unterscheidung, dies ließ sich schon anhand der Tatsache vermuten, dass 17 CpG enthalten sind.

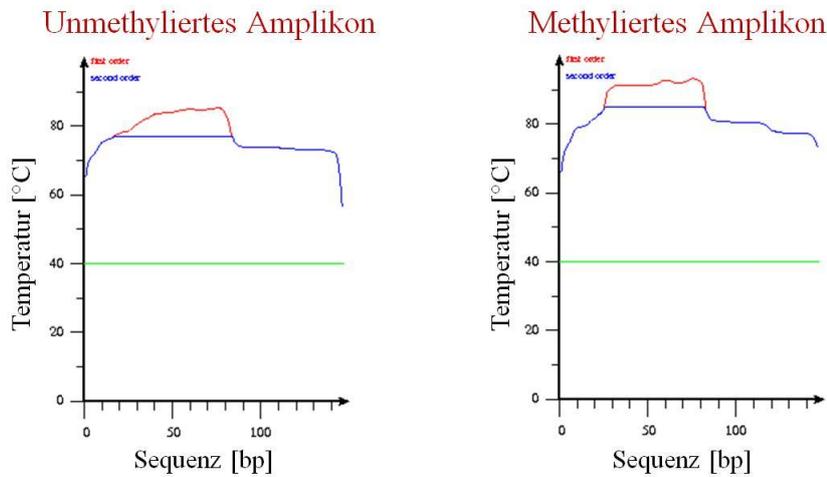


Abbildung 36: Simuliertes Schmelzverhalten des Amplikons für die Versuchsprimer 1 (nach [94])

Die so erhaltenen Versuchsprimer 1 wurden anschließend mit Kontroll-Standards getestet (MgCl₂-Zusatz: 1,5 mM, Annealing-Temperatur: 54 °C). Es wurden dabei aufgrund der bei den POLAND Kalkulation erhaltenen Ergebnisse recht komplexe Schmelzkurven erwartet, die sich aber eventuell aufgrund ihrer sehr unterschiedlichen Schmelztemperaturen gut unterscheiden lassen. Das Ergebnis, dargestellt in Abbildung 37, zeigt eher das Gegenteil. Die einzelnen Standards lassen sich kaum unterscheiden. Die Kurven zeigen zwar keinen einheitlichen Schmelzbereich, sind aber nicht besonders komplex. Dieses Primerpaar ist damit nicht geeignet und wurde für keine weiteren Versuche verwendet.

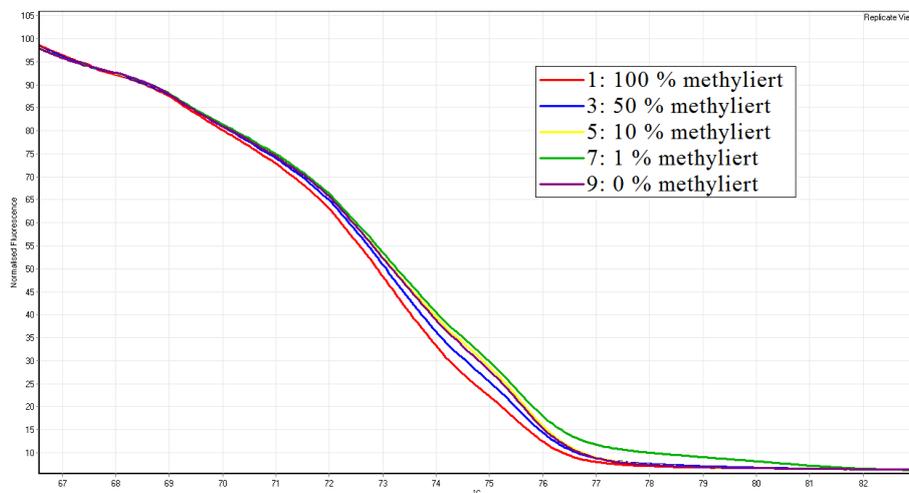


Abbildung 37: Schmelzverhalten des Amplikons für das Versuchsprimerpaar 1.

4.1.2.3 Endgültiges Primerpaar für CDKN2A

Tabelle 6: Sequenz und Schmelztemperatur des Primerpaars für CDKN2A, sowie Länge und Anzahl der CpG des Amplikons.

	Primer Forward	Primer Reverse
Vorgeschlagene Sequenz	GYGGAGTTGTTGTTGTTTAYG	ACAACACCACCAACRTATCCA
Endgültige Sequenz	GGCGGAGTTGTTGTTGTTTATG	ACAACACCACCAACGTATCAA
T _m nach Software [°C]	65,12	65,13
T _m nach Formel 2 [°C]	62	62
T _m nach Oligo Calc [°C]	58,4	59,5
T _m nach Oligo Calc für den endgültigen Primer [°C]	60,9	60,1
Amplikon	Länge: 116 bp	Anzahl der CpG-Dinukleotide: 13

Die Sequenz des schlussendlich verwendeten Primerpaares ist in Tabelle 6 gezeigt. Es wurde wiederum nach den oben beschriebenen Regeln entworfen. Es sind auch in diesem Fall vier gleiche Basen im Forward Primer enthalten und das T, welches nicht aus einem CpG stammt, liegt erst an vierter Stelle vom 3' Ende aus gesehen. Beides ist nicht optimal, trotzdem erwies sich der Primer als brauchbar. Er enthält außerdem zwei CpG, wobei jenes nahe dem 5' Ende aktiviert wurde und das zweite am 3' Ende durch ein T in der Sequenz ersetzt wurde. Im Reverse Primer ist nur ein CpG vorhanden, das dementsprechend auch aktiviert wurde. Beide Primer wurden zusätzlich noch um eine Base verlängert, um eine etwas höhere Schmelztemperatur zu erhalten. Das Schmelzverhalten des Amplikons sollte in diesem Fall homogener sein und der Abstand der Schmelzpunkte (70,5 °C für unmethyliert und 77 °C für methyliert) ausreichen (Abbildung 38). Dies zeigte sich auch im Ergebnis, welches in Abschnitt 4.2.1.1 zu sehen ist.

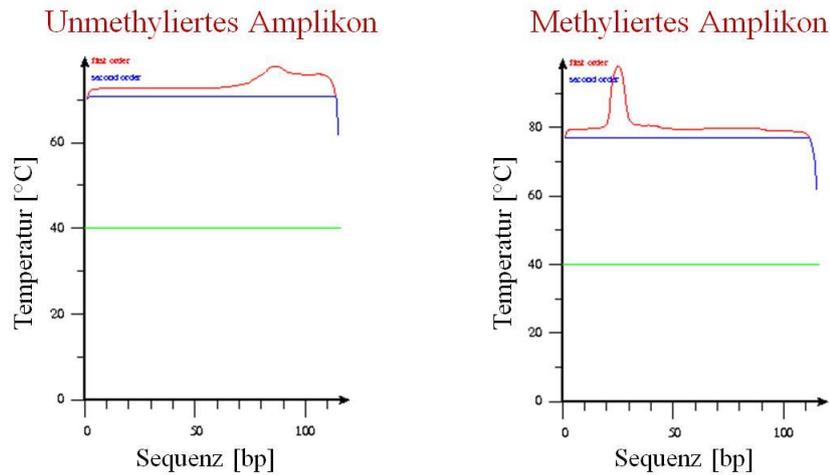


Abbildung 38: Schmelzverhalten des Amplikons für das endgültige Primerpaar für CDKN2A nach POLAND. [94]

4.1.2.4 Primerdesign für RASSF1

Bei RASSF1 (Ras association domain-containing protein 1) handelt es sich um ein Tumorsuppressorgen, dessen Promotor in Darm- sowie Brustkrebs häufig hypermethyliert vorliegt. [109] [110] Für die Primersuche wurde die Referenzsequenz NM_007182.4 verwendet und ein Paar entworfen, welches den Anforderungen entspricht (Tabelle 7). Es wurde ein erster Vorversuch bei einer Annealing-Temperatur von 56 °C gemacht (T_m der Primer lag bei etwa 62 °C), mit einem $MgCl_2$ Zusatz von 1,5 mM. Es zeigte sich dabei eine bevorzugte Amplifikation des unmethylierten Templates (Abbildung 39) und eine schlechte Unterscheidung zwischen den Kontroll-Standards (Abbildung 40). Allerdings kann nicht mit Bestimmtheit festgestellt werden, dass die Schmelzpunkte zu nahe beieinander lagen, da das Template nicht sehr effizient amplifiziert wurde. Dadurch ist relativ wenig Template vorhanden und das Ausgangssignal für das Schmelzen niedrig, was eine Analyse der Schmelzkurven erschwert.

Tabelle 7: Primer und Amplikon für RASSF1.

	Primer Forward	Primer Reverse
Sequenz	GT C GGGGTTCGTTTTGTGGTTT	TCCCGCAACTCAATAAACTCAAAC
T_m nach Oligo Calc [°C]	62,1	62,0
Amplikon	Länge: 114 bp	Anzahl der CpG-Dinukleotide: 12

Ergebnisse und Diskussion

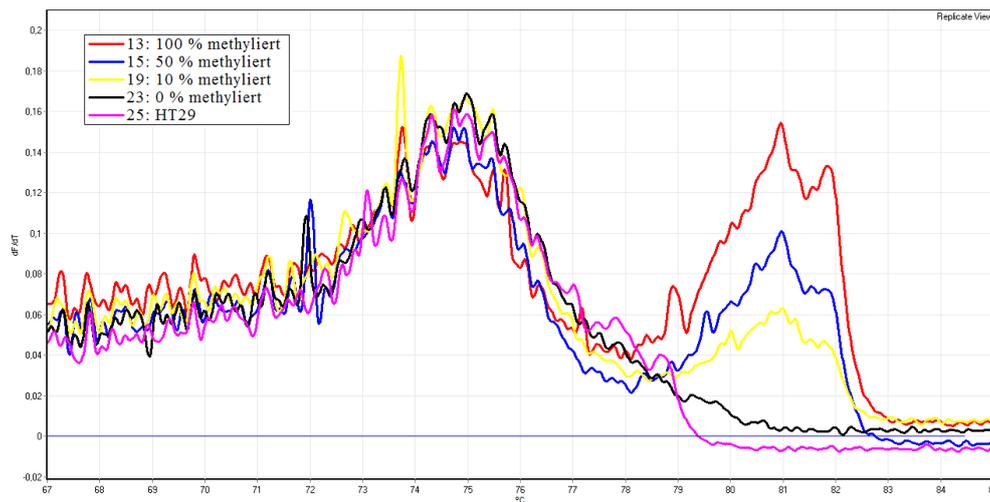


Abbildung 39: Ergebnis des Vorversuchs mit dem Primerpaar für RASSF1.

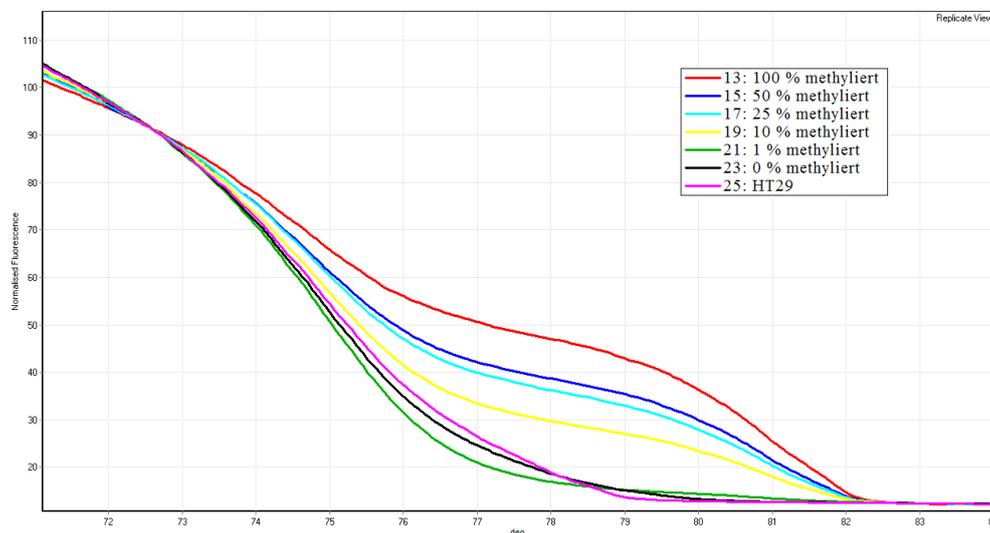


Abbildung 40: Normalisierte Schmelzkurven für RASSF1.

Die Annealing-Temperatur wurde in einem nächsten Versuch erhöht, um den Bias auszugleichen (vergleiche Abschnitt 4.2.1). Es wurde eine Temperatur von 60 °C verwendet und wiederum 1,5 mM MgCl₂ zugesetzt. Auch in diesem Fall wurde das unmethylierte Templat bevorzugt amplifiziert. Die Amplifikation erfolgte auch unter diesen Bedingungen mit einer schlechten Effizienz, die Schmelzkurven für methylierte und unmethylierte DNA zeigten aber einen besser unterscheidbaren Verlauf (Abbildung 41). Da der Bias immer noch sehr stark war und für HT29 Zellen ein Methylierungsgrad von 0 % ermittelt wurde (Abbildung 39 und Abbildung 41), wurde auf eine weitere Optimierung für dieses Primerpaar verzichtet.

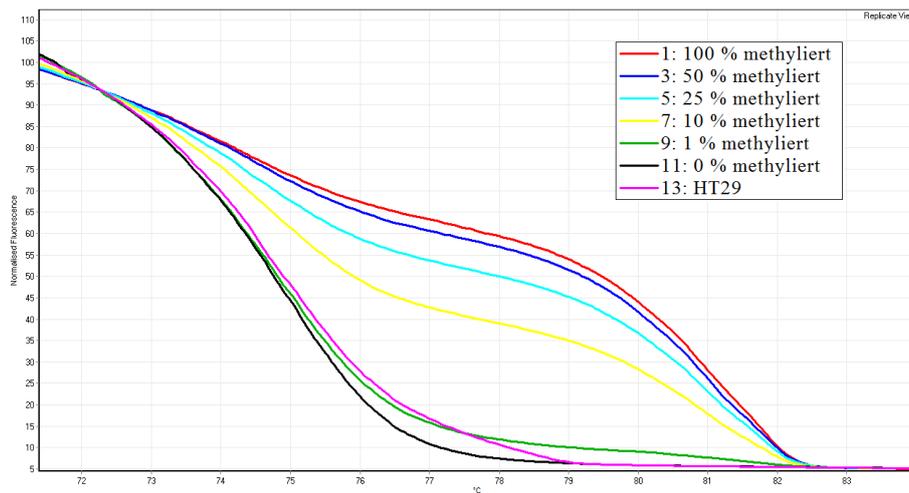


Abbildung 41: Normalisierte Schmelzkurven von RASSF1 nach Erhöhung der Temperatur.

4.1.2.5 Primerdesign für HIC1

Das Hypermethylated in cancer 1 Gen (HIC1) ist, wie sich aus dem Namen ableiten lässt, ein Tumorsuppressorgen, dessen Promotor in verschiedenen Krebsarten wie Darm- und Brustkrebs stark methyliert ist. [39] [110] Eine Methode für HIC1 wurde bereits von E. Habla im Rahmen ihrer Diplomarbeit entworfen und optimiert. [111] Da sich die Methode allerdings als nicht robust herausstellte und ein Bias ins Methylierte auftrat, der nicht ausgeglichen werden konnte, sollte ein neues Primerpaar entworfen werden.

Tabelle 8: Sequenzen für die entworfenen Primer für HIC1.

	Primer Forward	Primer Reverse
Primerpaar 1	T C GTG C GATAAGAGTTATAAGGAT	ACTTCTTCCC G CAAATAATACATAA
Primerpaar 1, Version 2	TTGTG C GATAAGAGTTATAAGGAT	ACTTCTTCCC G CAAATAATACATAA
Primerpaar 2	GAGGT C G C GGTTAATATGTATTG	C GAACTCTTCTTAAACAAATCCAAAC
Primerpaar 3	GAGGTTG C GGTTAATATGTATTG	C GAACTCTTCTTAAACAAATCCAAA

Es wurde dazu die Referenzsequenz NM_001098202.1 verwendet. Es konnte ein geeignetes Primerpaar gefunden werden, dessen Forward Primer zwei CpG enthielt. Da beide an geeigneten Stellen nahe des 5' Endes lagen, wurden beide aktiviert. Bei einem Versuch mit einer Annealing-Temperatur von 54 °C und einem MgCl₂ Zusatz von 1,5 mM konnte schon bei der Amplifikation die starke Bevorzugung des methylierten Templates gesehen werden

(Abbildung 42). Eine Senkung der Temperatur, wie dies für solche Fälle üblich ist (vergleiche Abschnitt 4.2.1), zeigte ein ähnliches Bild. Die Annealing-Temperatur wurde auf 50 °C herabgesetzt und wiederum 1,5 mM MgCl₂ zugesetzt. Abbildung 43 zeigt die normalisierten Schmelzkurven für diesen Versuch.

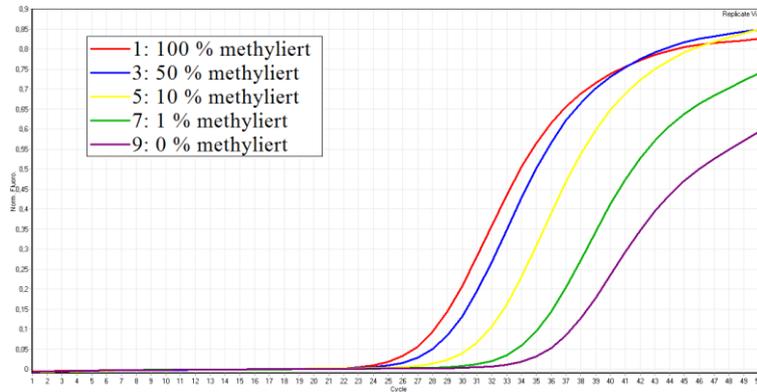


Abbildung 42: Amplifikation von HIC1 bei einer Annealing-Temperatur von 54 °C.

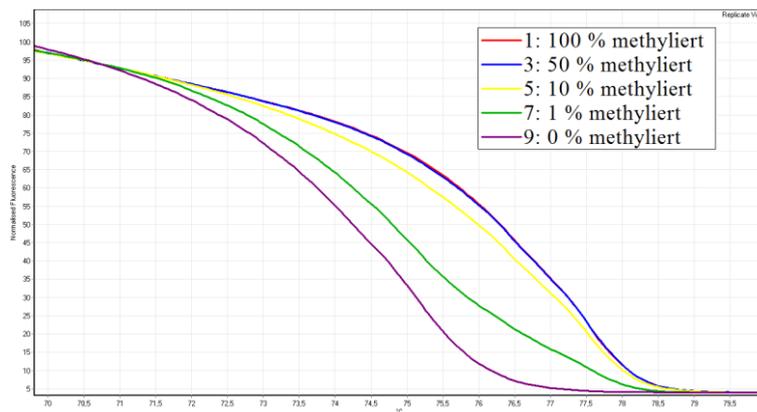


Abbildung 43: Normalisierte Schmelzkurven für HIC1 nach Senkung der Annealing-Temperatur auf 50 °C.

Als nächster Schritt wurde versucht, den forward Primer zu verändern (Version 2), indem das CpG am 5' Ende „ausgeschaltet“ wurde (Y wurde durch T ersetzt). Damit sollte der Primer weniger spezifisch für methylierte Template sein, was sich allerdings in den Ergebnissen nicht widerspiegelt (Abbildung 44). Als Annealing-Temperatur wurden 52 °C gewählt und wiederum 1,5 mM MgCl₂ zugesetzt. Da sich keine Veränderung des Bias erkennen ließ, wurden weitere Versuche zu diesen Primern unterlassen. Zusätzlich wurden noch zwei weitere Primerpaare für HIC1 entworfen, da sich aber auch für diese dasselbe Bild, nämlich ein unveränderlicher Bias ins Methylierte ergab, werden die zugehörigen Optimierungsversuche an dieser Stelle nicht angeführt.

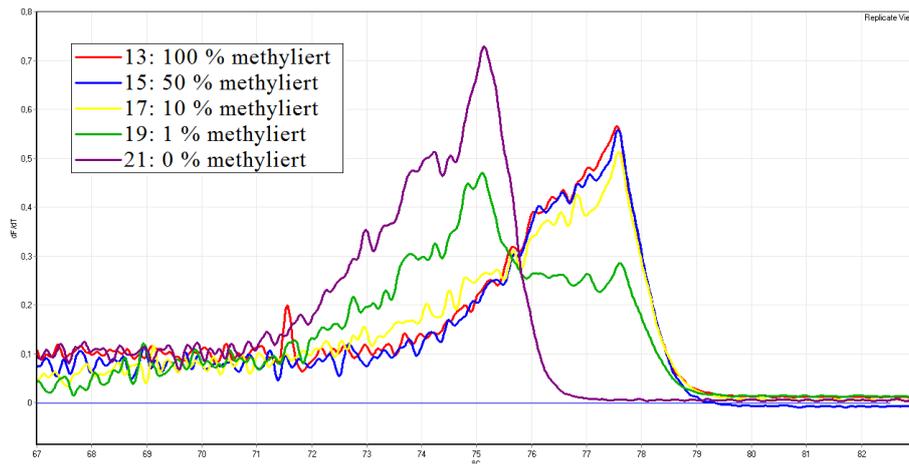


Abbildung 44: Darstellung $(-dF/dT)$ der Schmelzkurven für das Primerpaar 1 (Version 2) nach Inaktivierung eines CpG im forward Primer.

4.2 Optimierung der Methode für CDKN2A

Das Primerpaar, welches den obigen Kriterien entspricht und damit eine HRM-Analyse zulässt, wurde für die einzelnen Versuche verwendet. Zuvor mussten allerdings noch gewisse Parameter der PCR optimiert werden:

- Primerkonzentration
- Menge an eingesetzter DNA
- Annealing-Temperatur
- $MgCl_2$ -Konzentration
- Anzahl der Zyklen

Die geeignete Konzentration der Primer sowie der eingesetzten DNA wurden bereits in früheren Versuchen ermittelt und aus der Diplomarbeit von E. Habla entnommen. Die Primerkonzentration betrug 250 nM, von der DNA wurden je 10 μg pro Ansatz eingesetzt. [111]

4.2.1 Bestimmung der Annealing-Temperatur

Werden CpG-Dinukleotide in der Primersequenz verwendet, so hängt die relative Bindungsaffinität für methylierte und unmethylierte Template von der Annealing-Temperatur ab. Bei niedrigen Annealing-Temperaturen binden die Primer gleichermaßen an die methylierte und unmethylierte Sequenz, eine Erhöhung der Temperatur führt dagegen zu einer

bevorzugten Anlagerung an das methylierte Templat. [112] Es kann daher durch Veränderung der Temperatur der Bias gesteuert werden. Sollte eine bevorzugte Amplifikation der unmethylierten Sequenz vorliegen, wie es vor allem für Primer ohne CpG-Dinukleotide oft der Fall ist, könnte dies durch eine Erhöhung der Temperatur kompensiert werden. Es ist aber nicht unbedingt nötig, den Bias vollständig auszugleichen. In manchen Fällen ist es von Vorteil, eine hohe Empfindlichkeit im methylierten oder unmethylierten Bereich zu haben, um kleine Veränderungen detektieren zu können (siehe auch Abschnitt 3.2.2). [90]

4.2.1.1 Optimierung der Annealing-Temperatur für CDKN2A

Für das Primerpaar für CDKN2A wurden theoretische Schmelzpunkte von 60,1 °C und 60,9 °C bestimmt, weshalb ein erster Versuch mit einer Annealing-Temperatur von 56 °C durchgeführt wurde. Dem Reaktionsansatz wurden außerdem 1,5 mM MgCl₂ zugesetzt, wie auch bei allen anderen Versuchen zur Bestimmung der optimalen Temperatur.

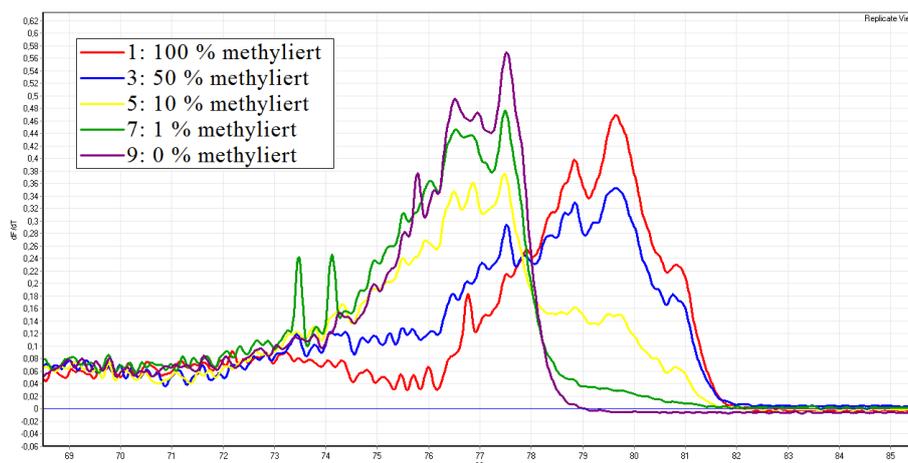


Abbildung 45: Erster Vorversuch zu CDKN2A bei 56 °C.

Bei diesem ersten Versuch konnte eindeutig ein Bias ins Methylierte beobachtet werden. Eine Annealing-Temperatur von 56 °C erwies sich als zu hoch. Für den nächsten Ansatz wurde eine Temperatur von 52 °C gewählt.

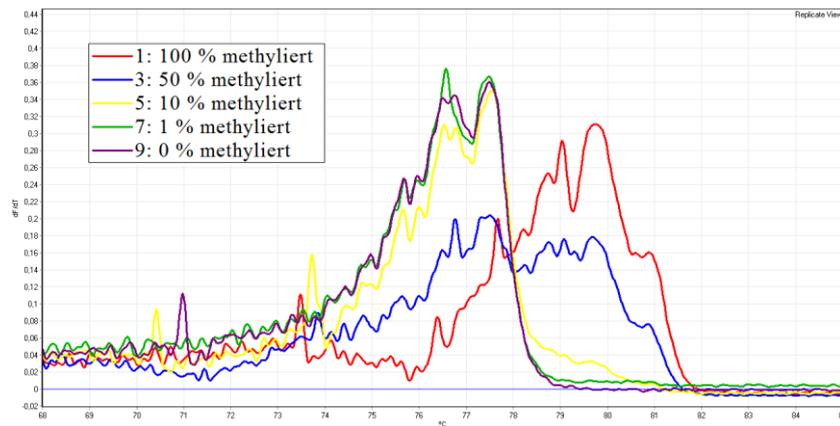


Abbildung 46: Darstellung $(-dF/dT)$ der Schmelzkurven für CDKN2A nach Absenken der Annealing-Temperatur auf 52 °C.

Der Einfluss der Annealing-Temperatur auf die Amplifikation wird durch den Vergleich von Abbildung 45 und Abbildung 46 ersichtlich. Bei einer Annealing-Temperatur von 52 °C wurden für den 50 % methylierten Standard zwei Peaks erhalten, während beim ersten Versuch der Bias so stark war, dass ein solcher beim Schmelzpunkt für das unmethylierte Templat kaum zu erkennen ist. Bei einer Temperatur von 52 °C waren die beiden Peakhöhen in etwa gleich, sodass keine weitere Optimierung nötig war. Als optimale Annealing-Temperatur für das CDKN2A Primerpaar wurde damit eine Temperatur von 52 °C ermittelt.

4.2.2 Einfluss der $MgCl_2$ -Konzentration

Mg^{2+} -Ionen sind essentiell für die Funktion der DNA Polymerase, weshalb der Puffer für die PCR stets $MgCl_2$ enthält, um eine effiziente Amplifikation zu gewährleisten. Die Ionen binden zusätzlich äquimolar an die dNTP. Daher wird der optimale Zusatz durch die dNTP-Konzentration beeinflusst. In den meisten Puffern beträgt die Konzentration 1,5 mM $MgCl_2$. Die Amplifikation Bisulfit-konvertierter DNA ist allerdings nicht so robust wie jene der genomischen DNA und erfordert daher zusätzliche Mg^{2+} -Ionen. Eine Endkonzentration von 2,5 bis 3,0 mM verbessert die Amplifikation deutlich. Ist zu viel Mg^{2+} vorhanden, steigt auch die Replikation nicht-spezifischer Sequenzen, weshalb eine Optimierung nötig ist. [81][90]

4.2.2.1 Optimierung der $MgCl_2$ -Konzentration für CDKN2A

Die Optimierung der Annealing-Temperatur zeigte bereits, dass mit 52 °C und einem Zusatz von 1,5 mM $MgCl_2$ der Bias ausgeglichen war. Die Effizienz der Amplifikation war sowohl

bei 56 °C als auch bei 52 °C ausreichend, um ein hohes Fluoreszenzsignal und damit eine gute Unterscheidung der einzelnen Schmelzprofile zu erhalten. Inwiefern sich eine Veränderung der MgCl₂-Konzentration auf den Bias auswirkt, wurde trotz der guten Ergebnisse für 1,5 mM MgCl₂ getestet. Es wurde in einem Ansatz eine Endkonzentration von 1,0 mM MgCl₂ und in einem zweiten 2,0 mM MgCl₂ zugesetzt. Es konnte in beiden Fällen keine Veränderung des Bias beobachtet werden, sodass ein MgCl₂-Zusatz von 1,5 mM als optimal betrachtet wurde.

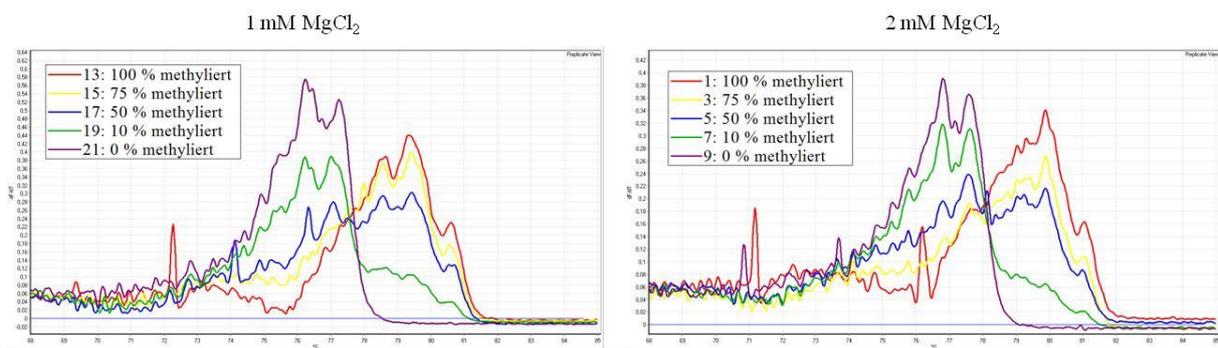


Abbildung 47: Einfluss der MgCl₂-Konzentration auf die Amplifikation von CDKN2A.

4.2.3 Optimierung der Methode für DAPK1

Die MS-HRM Methode für DAPK1 wurde von E. Habla entwickelt und optimiert. [111] Dabei wurde eine Annealing-Temperatur von 57 °C und eine Zugabe von 3 mM MgCl₂ festgelegt. Unter diesen Bedingungen wurde allerdings eine bevorzugte Amplifikation des methylierten Templates und zusätzlich eine schlechte Effizienz beobachtet.

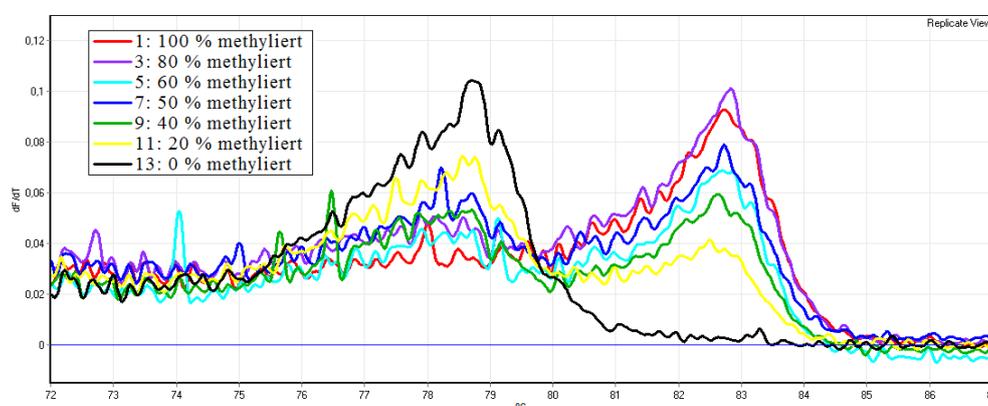


Abbildung 48: Darstellung (-dF/dT) der Schmelzkurven von DAPK1 bei 57 °C.

Ergebnisse und Diskussion

Daher wurde die Annealing-Temperatur auf 55 °C gesenkt. Dadurch konnte der Bias ausgeglichen werden (Abbildung 49). Die Effizienz der Amplifikation war allerdings auch hier um einiges schlechter als bei anderen entwickelten MS-HRM Methoden. Dies wird aus der geringeren Höhe des Signals in der Plateau-Phase ersichtlich (Vergleich DAPK1: 0,3, Abbildung 50 und CDKN2A: 0,85, Abbildung 51). Zusätzlich erwies sich diese Methode als nicht sehr robust, da bei denselben Bedingungen manchmal ein Bias auftrat und manchmal nicht.

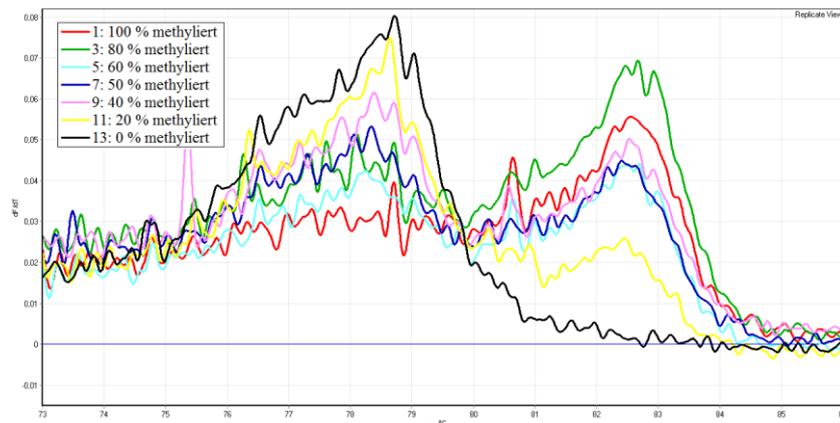


Abbildung 49: Darstellung ($-dF/dT$) der Schmelzkurven von DAPK1 bei einer Annealing-Temperatur von 55 °C.

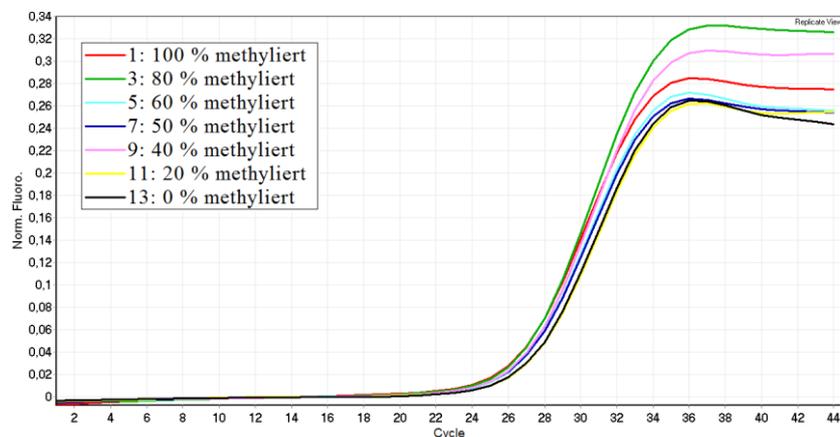


Abbildung 50: Amplifikation von DAPK1 bei einer Annealing-Temperatur von 55 °C.

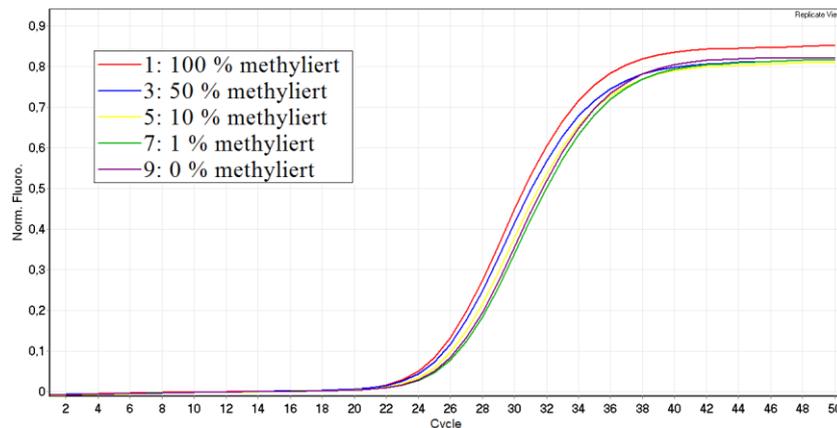


Abbildung 51: Amplifikation von CDKN2A bei einer Annealing-Temperatur von 52 °C.

4.3 Validierung der MS-HRM

4.3.1 Reproduzierbarkeit der MS-HRM

Die Reproduzierbarkeit der MS-HRM hängt stark von der Genauigkeit beim Pipettieren ab. Es können aber durchaus gute Ergebnisse erzielt werden, da kleine Unterschiede in der Amplifikationseffizienz bzw. in der eingesetzten DNA-Menge durch das Normalisieren der Schmelzkurven ausgeglichen werden. Ein Beispiel dazu zeigt Abbildung 52.

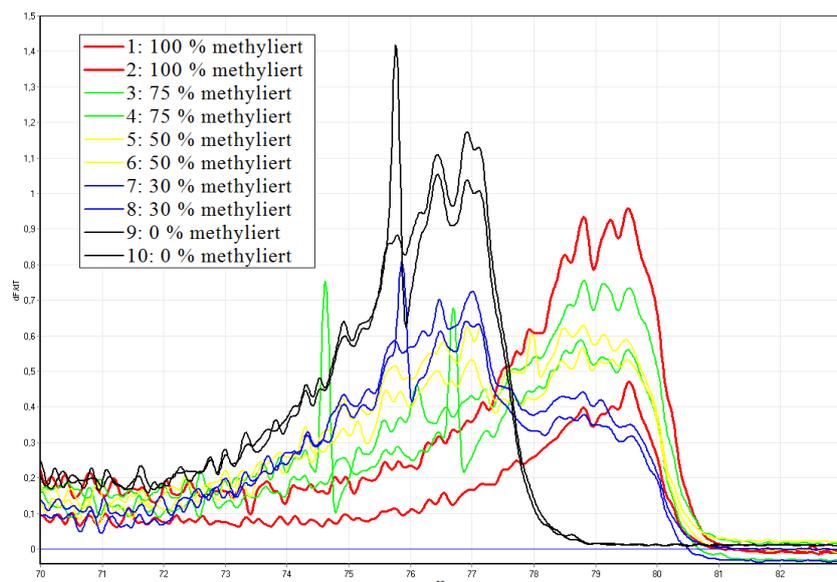


Abbildung 52: Doppelbestimmungen verschiedener Standards in Darstellung $(-dF/dT)$.

Für den 100 % methylierten Standard ist eine starke Abweichung der Doppelbestimmung zu sehen. Die Peakhöhen unterscheiden sich stark, da in einem der beiden Ansätze weniger effizient amplifiziert wurde und daher ein niedrigeres Fluoreszenzsignal erhalten wurde. Nach dem Normalisieren stimmen die Schmelzkurven mit gleichem Methylierungsgrad jedoch gut überein.

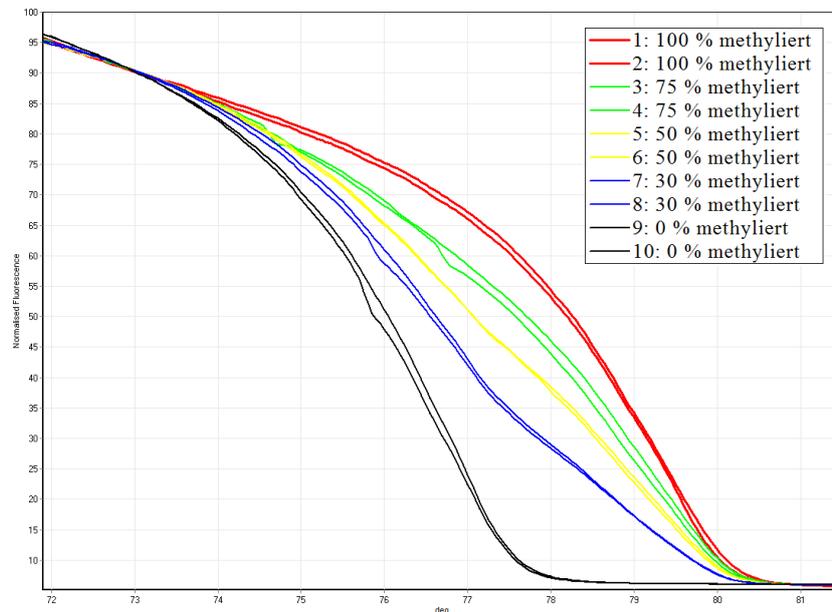


Abbildung 53: Normalisierte Schmelzkurven zu Abbildung 52.

Die Reproduzierbarkeit zwischen einzelnen MS-HRM Analysen hängt stark von der verwendeten Methode ab. Wie in Abschnitt 4.2.3 erwähnt, zeigte die Amplifikation bei DAPK1 eine schlechte Effizienz und so kam es zu großen Schwankungen der Werte. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode für CDKN2A zeigte eine recht gute Reproduzierbarkeit zwischen den einzelnen MS-HRM Bestimmungen. Die relativen Peakhöhen für die Kontroll-DNA und die Proben waren meist gut vergleichbar. Dies ist anhand von Abbildung 54 erkennbar, welche drei Kalibriergeraden aus MS-HRM Versuchen dargestellt, die an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden.

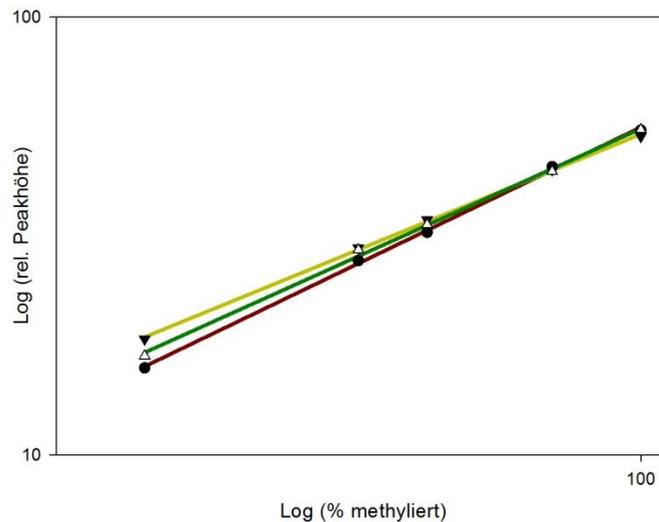


Abbildung 54: Kalibriergeraden der MS-HRM Methode für CDKN2A von drei verschiedenen Tagen.

4.3.2 Reproduzierbarkeit der Bisulfit-Konvertierung

Es wurde in seltenen Fällen eine Abweichung im Methylierungsgrad von aus unbehandelten Zellen isolierter DNA (siehe 4.4) und solcher aus Zellen, welche nur mit Lösungsmittel inkubiert wurden, erhalten. Diese sollten denselben Methylierungsgrad wie die DNA unbehandelter Zellen haben. Als Erklärung dafür kommt eine Kontamination des Mediums für die Zellinkubation, eine anderweitig induzierte Veränderung der Zellen oder ein Faktor bei der Aufarbeitung und Analyse der Proben in Frage. Da die Zellen in den folgenden Versuchen keine Veränderungen zeigten, wurden die ersten beiden Punkte ausgeschlossen. Es wurde daher vermutet, dass das Problem bei der Bisulfit-Konvertierung oder bei den Standards lag. Die relativen Peakhöhen der einzelnen Standards waren bei den Versuchen mit der Methode für CDKN2A vergleichbar und deshalb konnte ausgeschlossen werden, dass durch die Kalibration zu niedrige Werte erhalten wurden. Es wurde daher davon ausgegangen, dass die Abweichung durch ein Problem bei der Bisulfit-Konvertierung zustande kam.

In manchen Fällen wurden außerdem stark abweichende relative Peakhöhen für die Standards im Vergleich zu anderen Versuchen erhalten. Wie in Abbildung 54 ersichtlich, lagen die Kalibriergeraden verschiedener MS-HRM Versuche bei der Methode für CDKN2A sehr nahe beieinander. In den oben beschriebenen Fällen wurde für DNA mit gleichem Methylierungsgrad zu niedrige Peakhöhen erhalten. Da die vollständig methylierte und unmethylierte DNA kommerziell erworben und anschließend Bisulfit-konvertiert wurden, wurde vermutet, dass die Abweichungen auf eine mangelnde Reproduzierbarkeit der Bisulfit-

Konvertierung oder eine mangelnde Stabilität bei der Lagerung zurückzuführen waren. Abbildung 55 zeigt die relativen Peakhöhen von vier vollständig methylierten Standards (1 bis 4), die sich nur im Zeitpunkt ihrer Bisulfit-Konvertierung und der Dauer der Lagerung (bei -20 °C) unterschieden. Die Standards „Methyliert 3“ und „Methyliert 4“ entsprechen dabei den Peakhöhen von vollständig methylierten Standards anderer Versuche, „Methyliert 1“ und „Methyliert 2“ führten zu deutlich niedrigeren relative Peakhöhen. Um eine eventuelle Instabilität der DNA bei -20 °C auszuschließen, wurde Bisulfit-konvertierte DNA bei -80 °C gelagert.

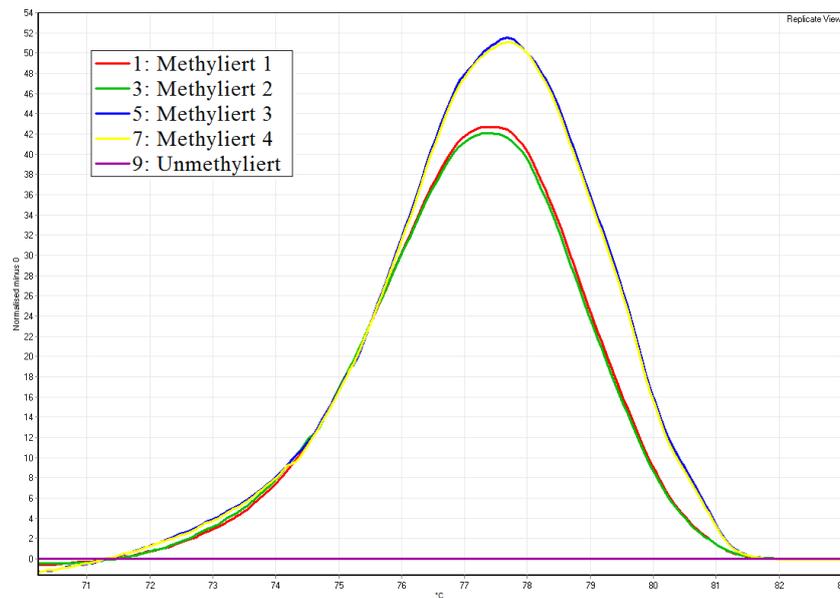


Abbildung 55: Beispiel für nicht übereinstimmende methylierte Kontroll-DNA.

4.3.3 Richtigkeit der MS-HRM

4.3.3.1 Bestimmung des Methylierungsgrads mittels MethyLight

Um die Richtigkeit der MS-HRM Methode zu überprüfen, wurde die MethyLight Methode herangezogen. Da ein MethyLight Kit für CDKN2A kommerziell erhältlich war, sollte die für CDKN2A entwickelte Methode damit validiert werden. Obwohl es sich bei der MethyLight Methode um eine absolute Methode handelt, wurden Vorversuche mit DNA-Standards verschiedenen Methylierungsgrads durchgeführt. Das Ergebnis des ersten Versuchs ist in Abbildung 56 und Abbildung 57 dargestellt. Die Fluoreszenzintensität wird bei zwei verschiedenen Wellenlängen gemessen, hier als grüner (für methylierte Sequenzen) und gelber (für unmethylierte Sequenzen) Kanal bezeichnet. Anhand der Abbildung 56 lässt sich

Ergebnisse und Diskussion

das Prinzip von MethyLight recht gut aufzeigen (siehe 3.3). Die Sonde für das methylierte Templat lagert sich nicht an die unmethylierte Sequenz an, daher wird bei 0 % methylierter DNA kein Fluoreszenzsignal beobachtet. Umso niedriger der C_T -Wert, desto stärker ist die Probe methyliert.

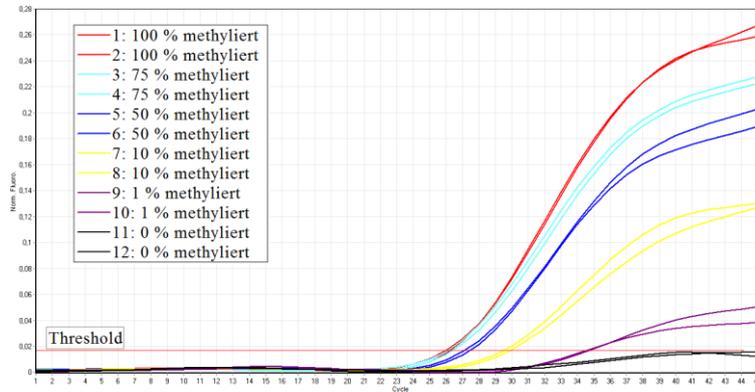


Abbildung 56: Erste Kalibration von MethyLight, grüner Kanal.

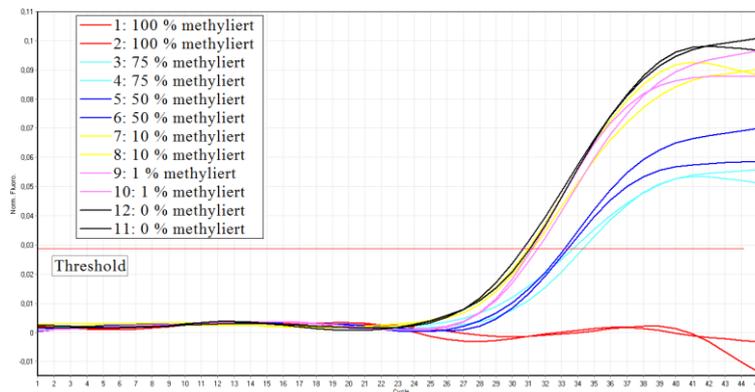


Abbildung 57: Erste Kalibration von MethyLight, gelber Kanal.

Tabelle 9: Ergebnisse der ersten Kalibration von MethyLight mit Standards.

Standard	Sonde für methylierte Sequenzen			Sonde für unmethylierte Sequenzen			berechnetes Ergebnis
	C_{T1}	C_{T2}	C_T Mittelwert	C_{T1}	C_{T2}	C_T Mittelwert	
[0% methyliert]							
100	25,03	25,73	25,15	45	45	45	100
75	25,83	25,28	25,83	31,66	31,58	31,11	97,5
50	26,45	25,72	25,86	30,54	29,64	29,63	93,2
10	29,02	28,47	28,46	28,45	28,01	27,77	38,3
1	32,53	45*	32,17	28,67	27,61	27,72	4,4
0	45	45	45	28,57	29,04	28,45	0

* Ausreißer gemäß Test nach Nalimov

Ergebnisse und Diskussion

Die Effizienz der Amplifikationen war schlecht, besonderes jene für das unmethylierte Templat. Da methylierte Sequenzen besser amplifiziert werden, oder aber sich die Sonden unterschiedlich anlagern, resultiert dies in einem Bias. Die Ergebnisse zeigen, dass die berechneten Werte deutlich höher waren als der tatsächliche Methylierungsgrad. Es wurden daher noch weitere Kalibrationen mit bereits vom Anbieter Bisulfit-konvertierten DNA-Standards durchgeführt. Zwei Versuche ergaben dieselben Resultate wie der erste Versuch, es wurde darauf eine Anfrage an den Hersteller gesandt, der einen Versuch mit einer Verdünnungsreihe der Standards und einem geänderten Temperaturprogramm vorschlug (ursprüngliches Temperaturprogramm in Tabelle 32). Dieses enthielt einen getrennten Annealing- und Elongationsschritt, dargestellt in Tabelle 10.

Tabelle 10: Alternatives Temperaturprogramm für MethyLight.

Schritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	95 °C	15 sec
Hybridisierung	55 °C	30 sec
Elongation	72 °C	30 sec

} 45 Zyklen

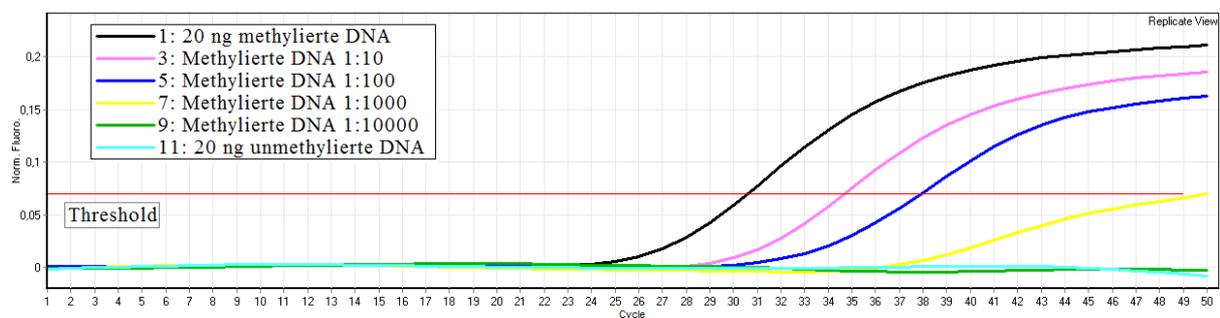


Abbildung 58: Zweite Kalibration von MethyLight mit Verdünnungen der Kontroll-DNA, grüner Kanal.

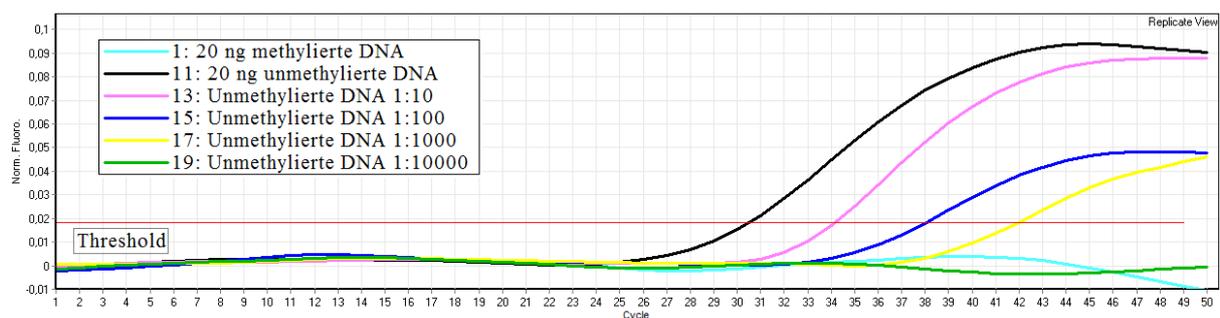


Abbildung 59: Zweite Kalibration von MethyLight, gelber Kanal.

Ergebnisse und Diskussion

Aus Gründen der einfacheren Erkennung werden in Abbildung 58 die Mittelwerte der Doppelbestimmungen dargestellt. Es zeigt sich wiederum eine schlechte Amplifikation. In Folge wurde ein neues Set an bereits Bisulfit-konvertierter Kontroll-DNA vom Anbieter erhalten. Es wurde mit dem Standardprotokoll (Tabelle 32) eine weitere Kalibration durchgeführt (Abbildung 60 und Abbildung 61).

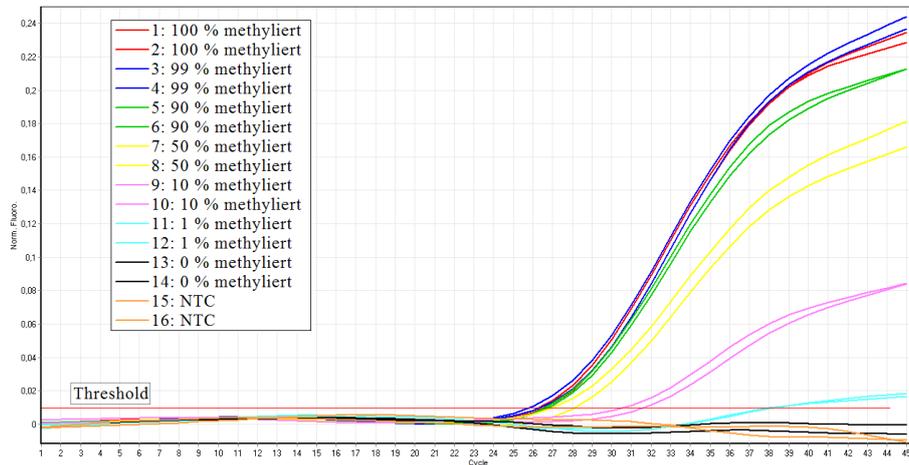


Abbildung 60: Kalibration für MethyLight mit neuer kommerzieller, bereits Bisulfit-konvertierter Standard-DNA, grüner Kanal (NTC = Negativkontrolle).

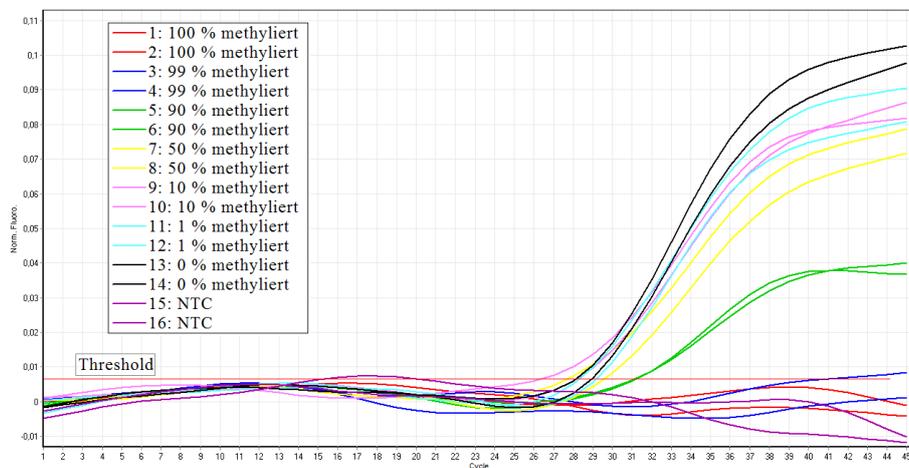


Abbildung 61: Kalibration für MethyLight mit neuer kommerzieller, bereits Bisulfit-konvertierter Standard-DNA, gelber Kanal (NTC = Negativkontrolle).

Aus den erhaltenen PCR Kurven ist keine Verbesserung der Amplifikation zu erkennen. Die Berechnung des Methylierungsgrads aus den C_T -Werten ergab jedoch eine recht gute Übereinstimmung mit den Sollwerten (Tabelle 11). Da es auch in diesem Fall zu einer effizienteren Amplifikation des methylierten Templates kam, konnten für Standards mit hohem Methylierungsgrad eine recht gute Übereinstimmung erhalten werden, für Standards mit einem niedrigen Methylierungsgrad wurden aber zu niedrige Werte erhalten.

Tabelle 11: Ergebnisse der Kalibration von MethyLight mit bereits Bisulfit-konvertierter Kontroll-DNA.

Standard	Sonde für methylierte Sequenzen			Sonde für unmethylierte Sequenzen			berechnetes Ergebnis
	C _T 1	C _T 2	C _T Mittelwert	C _T 1	C _T 2	C _T Mittelwert	
[% methyliert]							[% methyliert]
100	26,38	26,63	26,51	45	45	45	100,0
99	26,45	25,84	26,14	45	40,75	40,75	100,0
90	26,83	26,67	26,75	31,13	31,21	31,17	95,5
50	28,15	27,07	27,61	29,59	27,71	28,65	67,3
10	30,68	31,72	31,2	26,33	28,18	27,26	6,1
1	38,21	38,35	38,28	29,17	28,34	28,76	0,1
0	45	45	45	28,93	28,15	28,54	0,0

4.3.3.2 Vergleich der MethyLight mit der MS-HRM Methode

Die Richtigkeit der MethyLight Methode konnte, wie oben beschrieben, nicht verifiziert werden (Abschnitt 4.3.3.1). Dennoch wurde DNA, die aus mit 5-Aza-dC behandelten HT29 Zellen isoliert wurde, mittels MethyLight analysiert (4.5.9). Die Gegenüberstellung mit den MS-HRM Ergebnissen ist in Abbildung 62 und Abbildung 63 dargestellt.

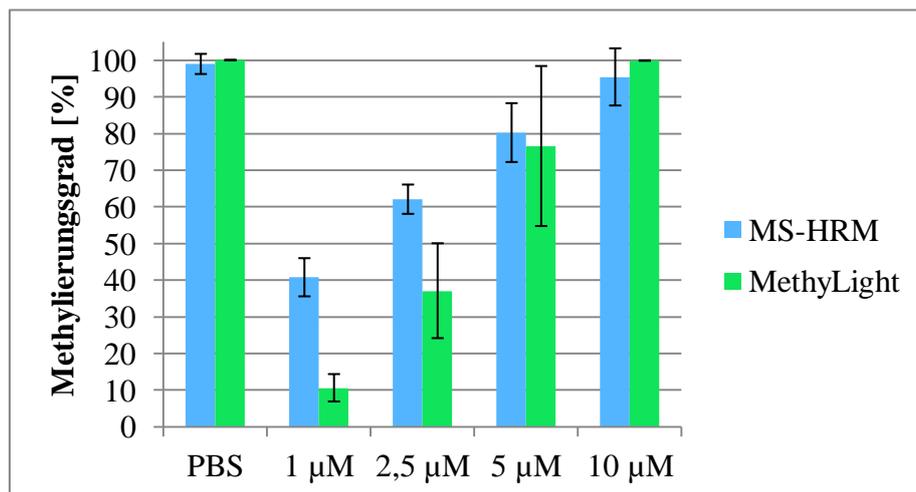


Abbildung 62: Methylierungsgrad des Promotors von CDNK2A nach Behandlung mit 5-Aza-dC (1. Inkubation), bestimmt mittels MethyLight und der MS-HRM Methode.

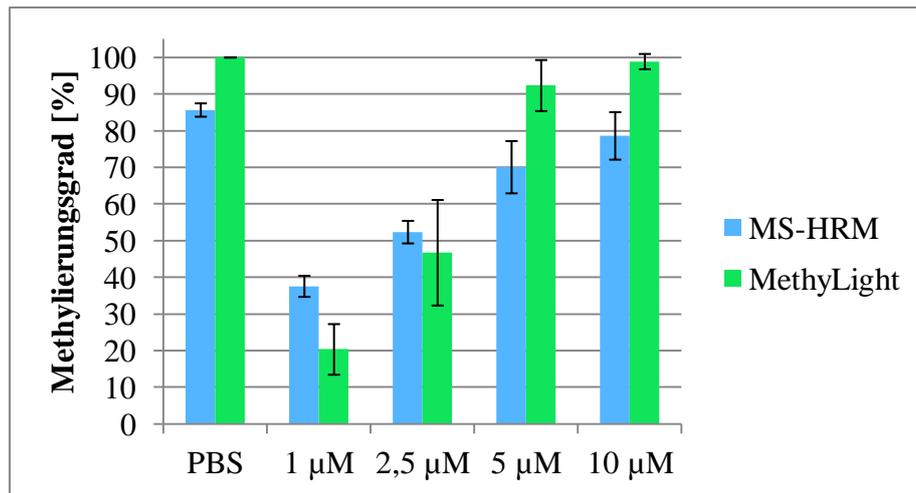


Abbildung 63: Methylierungsgrad des Promotors von CDNK2A nach Behandlung mit 5-Aza-dC (2. Inkubation), bestimmt mittels MethyLight und der MS-HRM Methode.

Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden. Während bei einem niedrigen Methylierungsgrad höhere Ergebnisse mit der MS-HRM Methode erzielt wurden, war es bei einem höheren Methylierungsgrad umgekehrt. Eine Validierung der MS-HRM Methode ist auf diese Weise allerdings nicht möglich.

4.4 DNA-Methylierungsgrad der Promotorregion verschiedener Gene in HT29 Zellen

Verschiedene MS-HRM Methoden wurden angewandt, um den Grad der DNA-Methylierung in den Promotorregionen der zu untersuchenden Gene in HT29 Zellen zu bestimmen und den Einfluss von lebensmittelrelevanten Substanzen auf den Methylierungsgrad zu untersuchen. HT29 Zellen wurden mit den verschiedenen Substanzen inkubiert, wobei für jede Substanz ein bis drei Versuche durchgeführt wurden. Es wurden verschiedene Konzentrationen eingesetzt, die zwischen 1 und 100 µM lagen, und eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der nur das Lösungsmittel verwendet wurde. Inkubiert wurde für 96 Stunden und anschließend wurden die Zellen aufgearbeitet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden HT29 Zellen mit 5-Aza-dC, Genistein und Quercetin behandelt. Andere Versuche mit 5-Aza-dC, BPA und Daidzein wurden von B. Druml, jene mit (+)-Lariciresinol, (-)-Matairesinol, MeIQx, PhIP, DON und ZON von E. Habla durchgeführt. Die Durchführung der Inkubationsversuche ist in Abschnitt 5.1.6 beschrieben, die verschiedenen Substanzen der selbst durchgeführten Versuche und die eingesetzten Konzentrationen sind in Tabelle 14 und Tabelle 15 aufgelistet.

Aus den Zellen wurde anschließend die DNA extrahiert (beschrieben in 5.2) und diese nach dem in 5.3 angeführten Protokoll Bisulfit-konvertiert. Danach konnte der Methylierungsgrad mittels MS-HRM (und MethyLight) bestimmt werden, wie in 5.4 beschrieben. Die verwendeten MS-HRM Methoden sind in Abschnitt 5.4.2.2 aufgelistet, bei Versuchen mit HT29 Zellen wurde der Promotor von CDKN2A, GATA-4, NTRK2 und OSMR untersucht.

Tabelle 12: Methylierungsstatus der einzelnen Gene in HT29 Zellen.

Gen	Methylierungsgrad [%]
CDKN2A	100
RASSF1	0
HIC1	100
NTRK2	71
OSMR	87
GATA-4	80
APC	0 ^a
DAPK1	0 ^a
TUBG2	0 ^b

a Gemessen von E. Habla

b Gemessen von B. Druml

4.5 Ergebnisse der Inkubationsversuche mit HT29 Zellen

4.5.1 5-Aza-2'-Desoxycytidin

Der demethylierende Effekt von 5-Aza-dC ist hinreichend bekannt. In vielen Studien mit vergleichenden Methoden wird es deshalb als Positivkontrolle verwendet. Auch für HT29 konnte durch die Behandlung mit 5-Aza-dC eine Änderung des DNA Methylierungsstatus und in Folge eine Reaktivierung der Genexpression beobachtet werden. [113]

4.5.1.1 CDKN2A

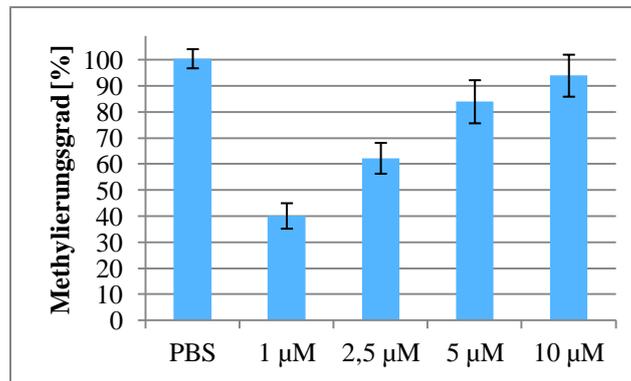


Abbildung 64: Methylierungsgrad von CDKN2A in HT29 Zellen nach Behandlung mit 5-Aza-dC. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von fünf MS-HRM Bestimmungen (zwei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt (n = 10).

Die Ergebnisse zeigen deutlich den konzentrationsabhängigen Effekt von 5-Aza-dC. Am stärksten ist dieser bei einer Konzentration von 1 µM und nimmt mit steigender Konzentration ab. Dieses Phänomän wurde auch von Fang *et. al.* beobachtet, die eine wiederhergestellte Expression von CDKN2A in HT29 Zellen bereits nach 24 stündiger Behandlung mit 1 µM 5-Aza-dC beobachteten. Die Inkubationsversuche mit 10 µM 5-Aza-dC zeigten auch nach 72 Stunden eine Stilllegung der Expression des Gens. [79] Ein weiterer Versuch mit HT29 Zellen, die wiederum für 24 Stunden mit 1 µM 5-Aza-dC inkubiert wurden, wurde von Chuang *et. al.* durchgeführt. In diesem Fall wurde eine Reduktion des Ausmaßes der DNA-Methylierung im Promotor von CDKN2A von 100% auf ca. 50% methyliert festgestellt. [114] Dieses Ergebnis ist mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnissen vergleichbar. Es ist jedoch zu bedenken, dass die Inkubationsdauer verschieden war. Wie in Abschnitt 1.3.8.1 beschrieben, zeigt 5-Aza-dC eine zytotoxische Wirkung und inhibiert das Wachstum von Tumorzellen. Damit könnte erklärt werden, warum bei einer geringen Konzentration (1 µM) der stärkste Effekt beobachtet wurde. Wenn sich die Zellen nicht mehr teilen, kann auch das Methylierungsmuster nicht weitergegeben werden. Allerdings wurde im Laufe der Inkubationsversuche keine wachstumshemmende Wirkung beobachtet.

4.5.2 (+)-Lariciresinol und (-)-Matairesinol

4.5.2.1 CDKN2A

(-)-Matairesinol zeigte keine demethylierende Wirkung, für (+)-Lariciresinol kann eine solche bei 10 μM vermutet werden. Es wären in diesem Fall jedoch noch weitere Inkubationsversuche nötig, um eine statistisch signifikante Aussage machen zu können.

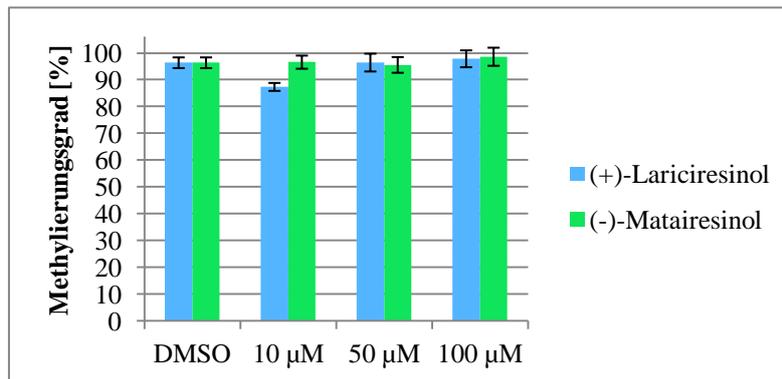


Abbildung 65: Methylierungsgrad von CDKN2A in HT29 Zellen nach Behandlung mit (+)-Lariciresinol und (-)-Matairesinol. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt ($n = 4$).

4.5.2.2 NTRK2

Eine sehr geringe Abnahme der DNA-Methylierung zeigte sich bei einer (+)-Lariciresinol Konzentration von 10 μM , die aber durch weitere Versuche bestätigt werden müsste.

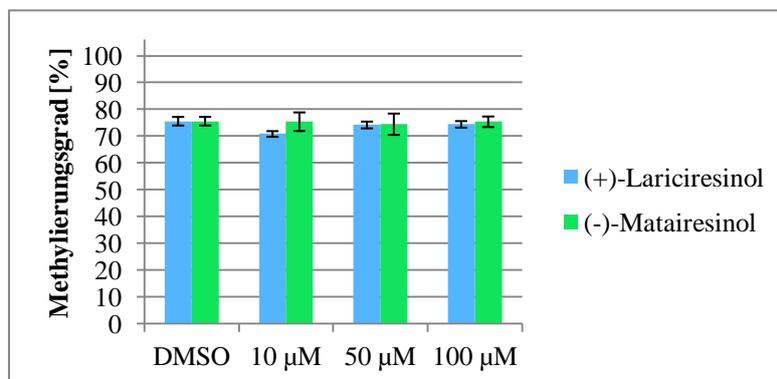


Abbildung 66: Methylierungsgrad von NTRK2 in HT29 Zellen nach Behandlung mit (+)-Lariciresinol und (-)-Matairesinol. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt ($n = 4$).

4.5.3 MeIQx und PhIP

4.5.3.1 CDKN2A

Weder MeIQx noch PhIP führten zu einer Änderung des Methylierungsgrads von CDKN2A.

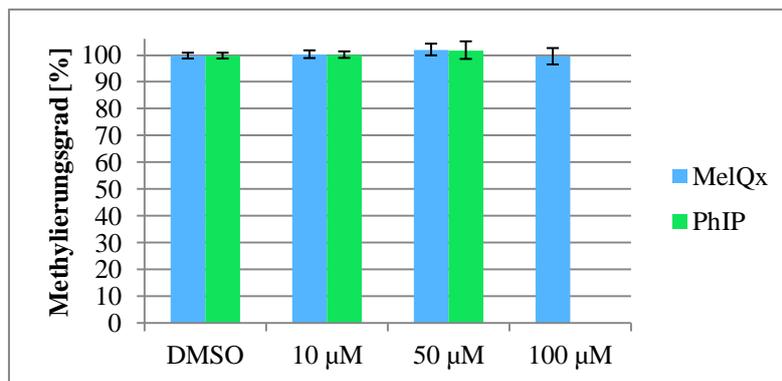


Abbildung 67: Methylierungsgrad von CDKN2A in HT29 Zellen nach Behandlung mit MeIQx und PhIP. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt ($n = 4$).

4.5.3.2 NTRK2

Ein demethylierender Effekt der heterocyclischen aromatischen Amine in der Promotorregion von NTRK2 wurde nicht beobachtet.

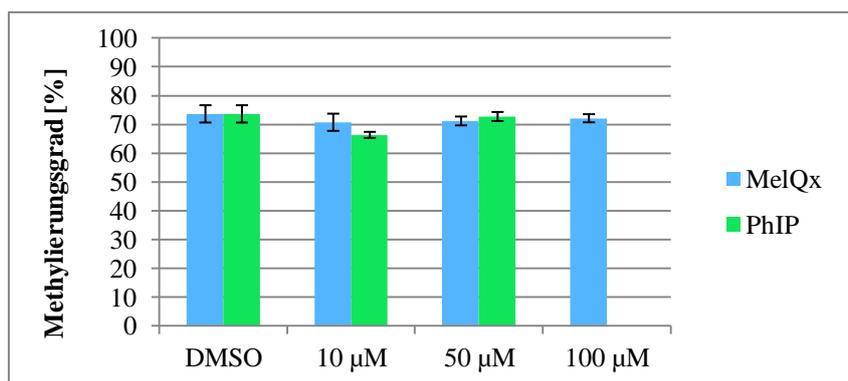


Abbildung 68: Methylierungsgrad von NTRK2 in HT29 Zellen nach Behandlung mit MeIQx und PhIP. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt ($n = 4$).

4.5.4 Desoxynivalenol und Zearalenon

4.5.4.1 CDKN2A

Eine Wirkung auf den Methylierungsgrad des Promotors von CDKN2A in HT29 Zellen konnte nicht festgestellt werden.

Kouadio *et. al.* untersuchten in einer Studie die Wirkung von Mykotoxinen auf die DNA-Methylierung in Caco-2 Zellen. Sie konnten dabei eine Erhöhung der Gesamtmethylierung (mittels HPLC bestimmt) durch eine 24 stündige Inkubation mit ZON (Konzentration 40 μM) nachweisen. Für DON wurde nach 24 Stunden dasselbe Ergebnis schon bei 5 - 10 μM erhalten. [115]

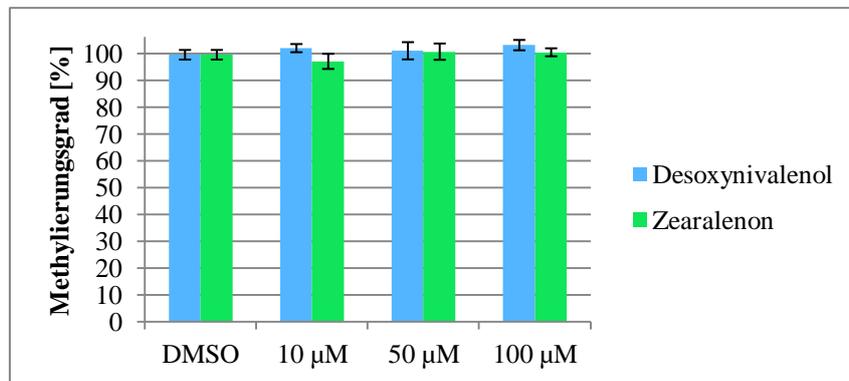


Abbildung 69: Methylierungsgrad von CDKN2A in HT29 Zellen nach Behandlung mit DON und ZON. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt ($n = 4$).

4.5.4.2 NTRK2

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann geschlossen werden, dass DON und ZON den Methylierungsgrad der Promotorregion von NTRK2 nicht verändern.

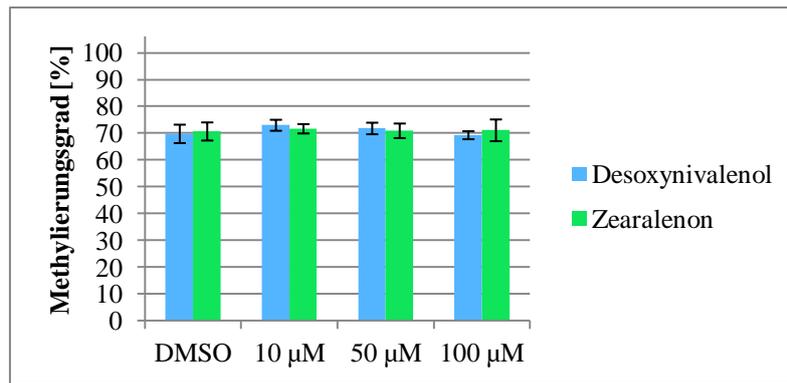


Abbildung 70: Methylierungsgrad von NTRK2 in HT29 Zellen nach Behandlung mit DON und ZON. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).

4.5.5 Bisphenol A

4.5.5.1 CDKN2A

Die bisher publizierten Effekte von BPA deuten auf eine demethylierende Wirkung hin. Es konnte eine Senkung der Methylierung in der Promotorregion des stark methylierten Gens Hoxa10 in der Gebärmutter von Mäusen nach 7 Tagen nachgewiesen werden (es wurden 5 mg BPA/kg Körpergewicht verabreicht). [116] Außerdem sind ein hypomethylierender Effekt sowie eine Demethylierung in nicht stabilen Bereichen bekannt. [117]

Wie in Abbildung 71 dargestellt, konnte für BPA in den verwendeten Konzentrationen kein Effekt auf die Methylierung des Promotors von CDKN2A festgestellt werden.

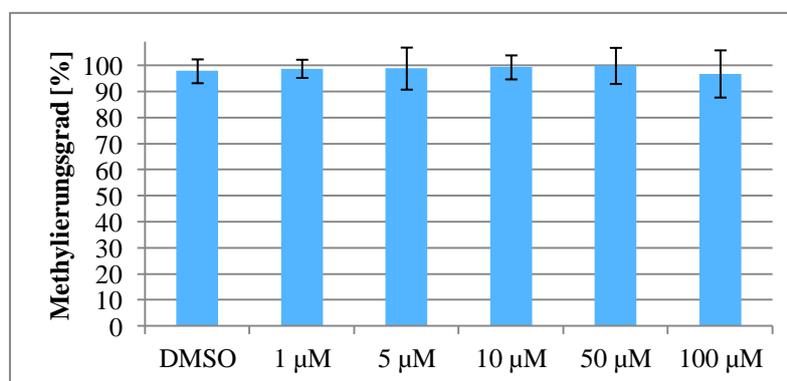


Abbildung 71: Methylierungsgrad von CDKN2A in HT29 Zellen nach Behandlung mit BPA. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von sechs MS-HRM Bestimmungen (drei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt (n = 12).

4.5.6 Daidzein

4.5.6.1 CDKN2A

Daidzein zeigte in einer Studie von Fang *et. al.* einen demethylierenden Effekt auf die Promotorregion von CDKN2A. Die Versuche wurden mit einer Ösophagus- und einer Prostatakrebs Zelllinie durchgeführt, wobei die beschriebene Wirkung bei Konzentrationen von 20 und 50 μM erhalten wurde. [118] In der vorliegenden Arbeit konnte keine Veränderung des Methylierungsgrads des Promotors von CDKN2A beobachtet werden.

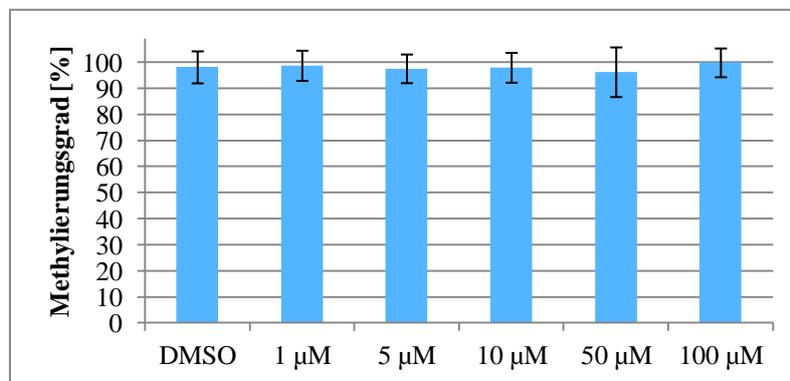


Abbildung 72: Methylierungsgrad von CDKN2A in HT29 Zellen nach Behandlung mit Daidzein. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von drei MS-HRM Bestimmungen (zwei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt ($n = 6$).

4.5.7 Genistein

4.5.7.1 CDKN2A

Fang *et. al.* konnten zeigen, dass Genistein eine Hypermethylierung von CDKN2A in KYSE 510 Zellen reduzieren konnte. Außerdem konnte eine dosisabhängige Inhibierung der DNA-Methyltransferasen festgestellt werden. Bereits bei Konzentrationen von 2 – 20 μM Genistein konnte nach 6 Tagen ein demethylierender Effekt beobachtet werden. [119]

In der vorliegenden Arbeit wurde bei den HT29 Zellen, die 50 bzw. 100 μM Genistein ausgesetzt waren, eine Wachstumshemmung sowie ein Absterben einiger Zellen beobachtet. Ein Effekt auf die DNA-Methylierung konnte jedoch nicht festgestellt werden.

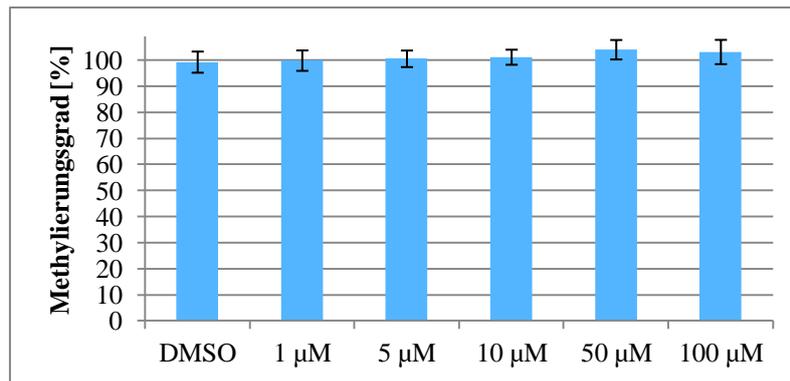


Abbildung 73: Methylierungsgrad von CDKN2A in HT29 Zellen nach Behandlung mit Genistein. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (zwei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt (n = 8).

4.5.7.2 NTRK2

Wie Abbildung 74 entnommen werden kann, zeigt Genistein keine methylierende oder demethylierende Wirkung auf den Promotor von NTRK2.

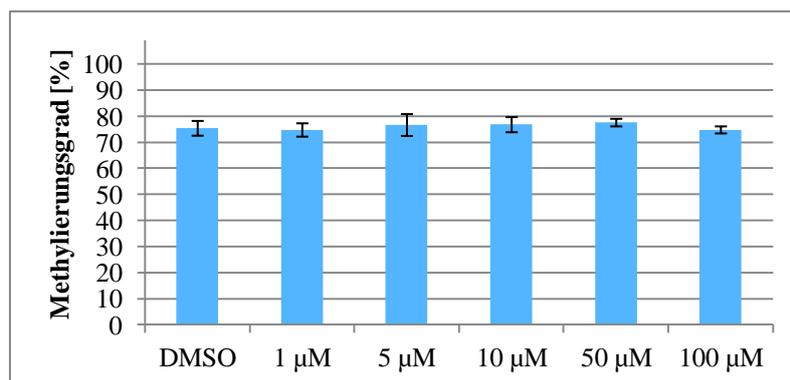


Abbildung 74: Methylierungsgrad von NTRK2 in HT29 Zellen nach Behandlung mit Genistein. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (zwei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt (n = 8).

4.5.7.3 GATA-4

Die für die Promotorregion von GATA-4 erhaltenen Ergebnisse streuen sehr stark, wie aus Abbildung 75 abzulesen ist. Dies kann durch den starken Bias in Richtung des methylierten Templates erklärt werden (Abbildung 76). Eine kleine Änderung des Signals bei hohen Werten führt in diesem Fall zu einer großen Differenz in den Ergebnissen (siehe Abbildung 77).

Ergebnisse und Diskussion

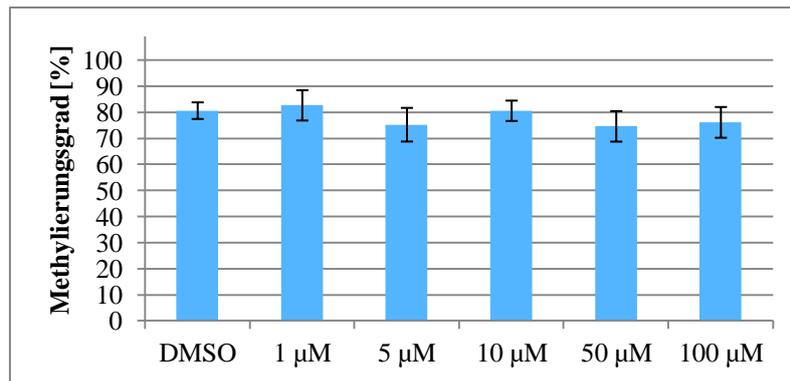


Abbildung 75: Methylierungsgrad von GATA-4 in HT29 Zellen nach Behandlung mit Genistein. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (zwei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt (n = 8).

Die Methode wurde ursprünglich von B. Druml entwickelt und optimiert, wobei der Bias ursprünglich ausgeglichen werden konnte. Die Methode erwies sich jedoch als nicht robust und amplifizierte im Laufe der Zeit stärker das methylierte Templat (Vergleiche [111]). Es wurde daher die Annealing-Temperatur von 56 °C auf 55 °C gesenkt, was aber keine Reduktion des Bias zur Folge hatte (Abbildung 76). Trotz der schlechten Reproduzierbarkeit kann darauf geschlossen werden, dass Genistein keine Änderung des Methylierungsgrads im Promotor von GATA-4 verursacht.

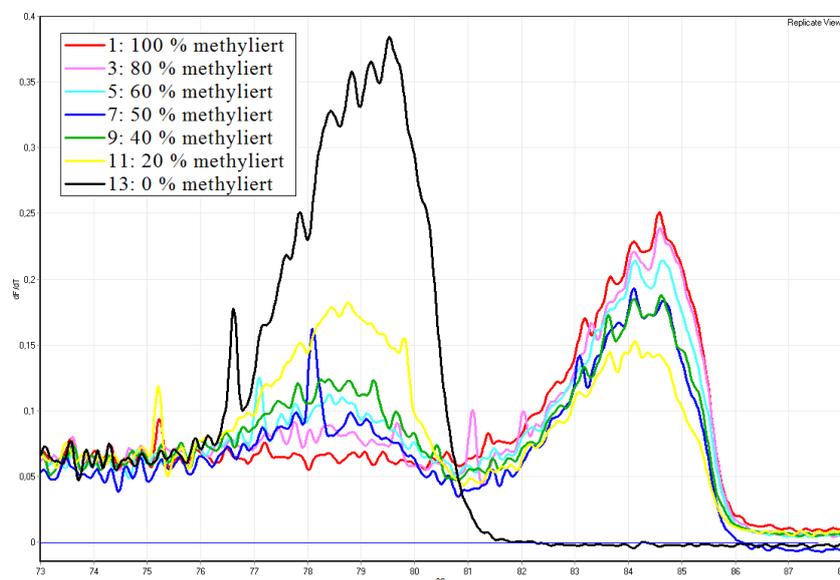


Abbildung 76: Darstellung des starken Bias bei der Methode für GATA-4.

Ergebnisse und Diskussion

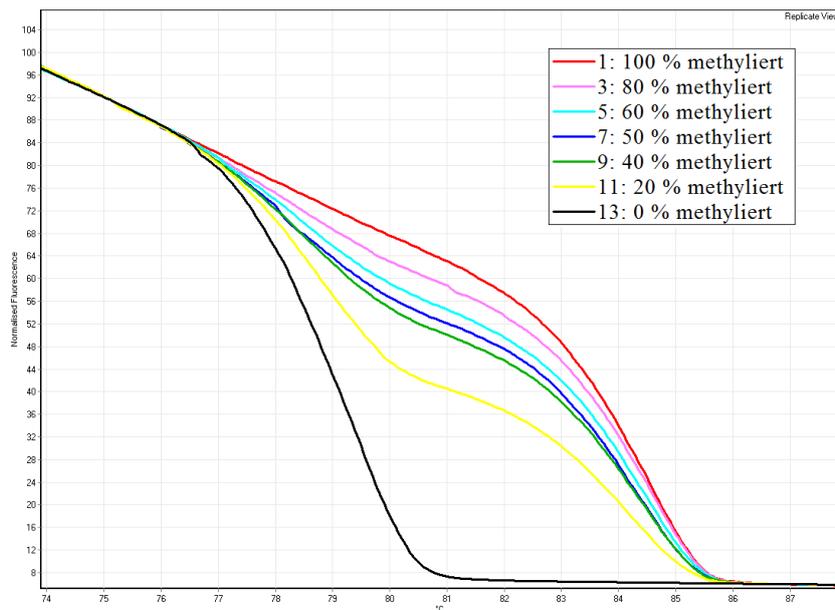


Abbildung 77: Normalisierte Schmelzkurven von Standards für die GATA-4 Methode.

4.5.7.4 OSMR

Die MS-HRM Methode für OSMR erwies sich als schlecht reproduzierbar, was sich in den schwankenden Werten widerspiegelt (Abbildung 78). Anhand der erhaltenen Ergebnisse kann nicht von einem methylierenden oder demethylierenden Effekt von Genistein ausgegangen werden.

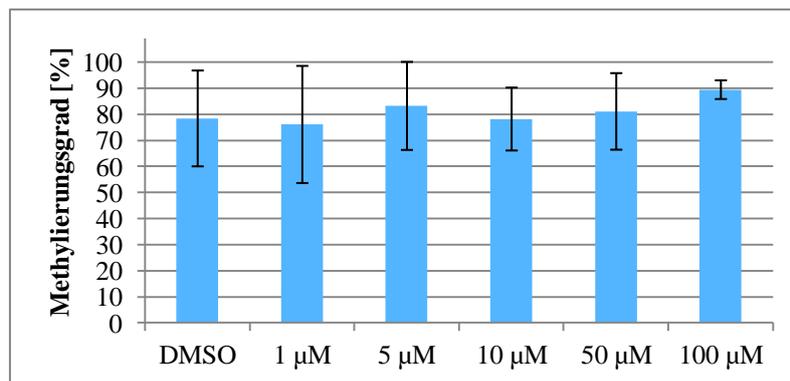


Abbildung 78: Methylierungsgrad von OSMR in HT29 Zellen nach Behandlung mit Genistein. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (zwei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt ($n = 8$).

4.5.8 Quercetin

Kim *et. al.* konnten in einer Studie zeigen, dass Quercetin in HT-29 Zellen Apoptose induziert. Die Zellen wurden für 24 und 48 Stunden mit 0, 50 bzw. 100 μM Quercetin inkubiert, wobei bei der höchsten Konzentration die Zahl der lebenden Zellen nach 48 Stunden um 50 % reduziert wurde, während bei 50 μM Quercetin 90 % überlebten. [65]

Beim ersten Inkubationsversuch mit den HT29 Zellen wurden Konzentrationen zwischen 0 und 100 μM Quercetin verwendet. Bereits nach 24 Stunden konnte ein Absterben der Zellen und eine Deformation einiger lebender Zellen bei den Konzentrationen 50 und 100 μM beobachtet werden. Auch bei Zellen, die 10 μM Quercetin ausgesetzt waren, konnte nach 48 Stunden teilweise eine veränderte Morphologie gesehen werden. Nach einer Inkubationszeit von 96 Stunden war die Anzahl der lebenden Zellen bei den beiden höchsten Quercetin-Konzentrationen so gering, dass eine zu geringe DNA-Ausbeute erwartet wurde und die DNA-Extraktion nicht durchgeführt wurde. Daher wurde ein zweiter Inkubationsversuch durchgeführt, bei dem die höchste Quercetin-Konzentration 30 μM betrug. Auch in diesem Fall wurde die DNA nicht isoliert.

Die aus den beiden Inkubationsversuchen mit Quercetin erhaltenen DNA-Proben wurden mittels MS-HRM analysiert und in den Promotorregionen aller Gene zeigte sich ein stark abweichender Methylierungsgrad zwischen der DNA unbehandelter Zellen und jener der Negativkontrollen (nur mit Lösungsmittel inkubiert). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden zwei weitere Inkubationsversuche durchgeführt. Als höchste Konzentration wurde im ersten Versuch 20 μM Quercetin verwendet. Es wurde zwar auch bei diesem Versuch ein Absterben einiger Zellen beobachtet, es konnte aber dennoch eine ausreichende DNA-Menge isoliert werden. Im zweiten Versuch wurde daher als höchste Konzentration 30 μM Quercetin verwendet und wiederum war der zytotoxische Effekt weitaus geringer als bei den beiden ersten Inkubationsversuchen. Für die Bestimmung der Wirkung von Quercetin wurden daher nur die Ergebnisse der letzten beiden Versuche herangezogen.

4.5.8.1 CDKN2A

Quercetin zeigte bei keiner der verwendeten Konzentrationen einen Effekt auf die DNA-Methylierung.

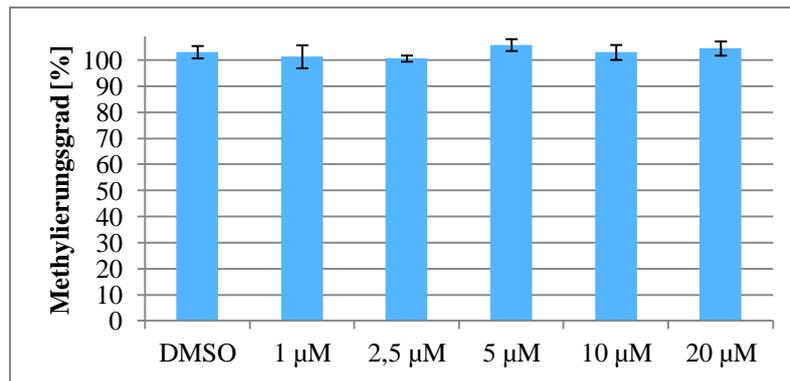


Abbildung 79: Methylierungsgrad von CDKN2A in HT29 Zellen nach Behandlung mit Quercetin. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (zwei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt (n = 8).

4.5.8.2 NTRK2

Der Promotor von NTRK2 zeigte als Folge der Inkubation der Zellen mit Quercetin keine Veränderung des Methylierungsgrads.

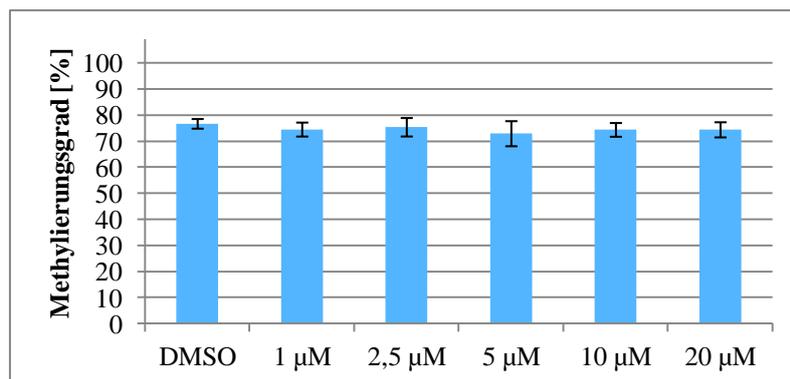


Abbildung 80: Methylierungsgrad von NTRK2 in HT29 Zellen nach Behandlung mit Quercetin. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (zwei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt (n = 8).

4.5.8.3 OSMR

Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass es zu keiner Veränderung der DNA-Methylierung in der Promotorregion von OSMR in HT29 Zellen durch die Behandlung mit Quercetin kam.

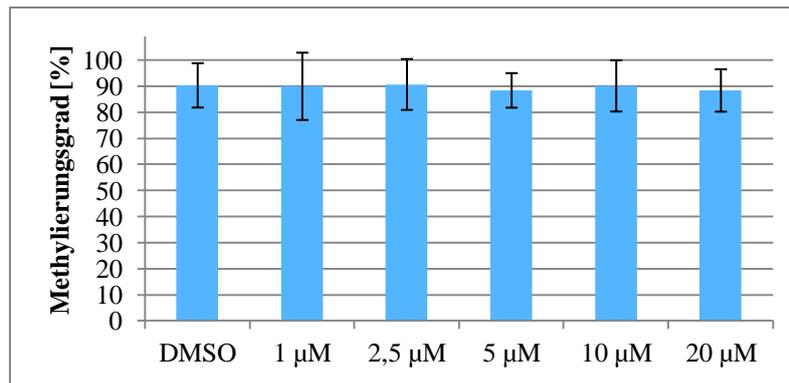


Abbildung 81: Methylierungsgrad von OSMR in HT29 Zellen nach Behandlung mit Quercetin. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).

4.5.9 Bestimmung des Methylierungsgrads der Promotorregion von CDKN2A mittels MethyLight

Die MethyLight Methode führte bei Proben mit hohem Methylierungsgrad zu einer starken Abweichung vom Sollwert (siehe Abschnitt 4.3.3). Es wurden dennoch die DNA-Proben der ersten beiden Inkubationsversuche mit 5-Aza-dC bei HT29 Zellen analysiert. Der stärkste demethylierende Effekt zeigte sich wiederum bei der Behandlung mit einer Konzentration von 1 µM 5-Aza-dC.

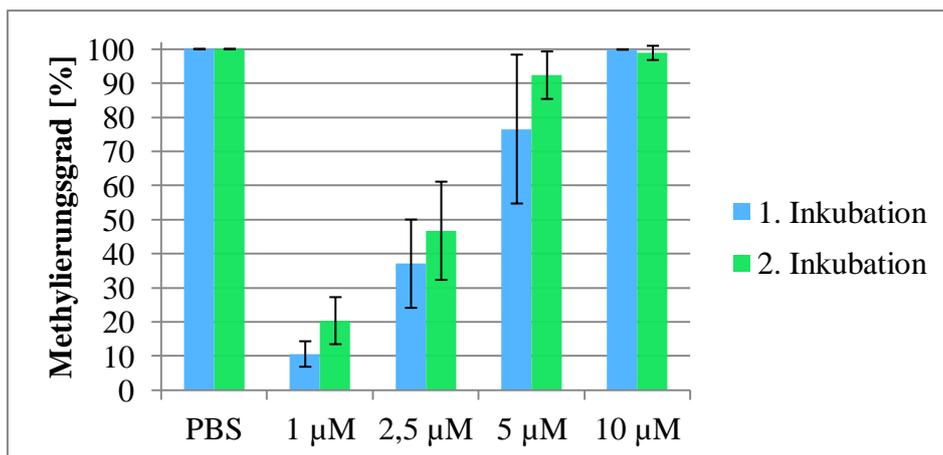


Abbildung 82: MethyLight Analyse des Methylierungsgrads von CDKN2A in HT29 Zellen nach Behandlung mit 5-Aza-dC. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von zwei unabhängigen Inkubationsversuchen und zwei MethyLight Bestimmungen dargestellt (n = 4).

4.5.10 Biologische Varianz

Da es sich bei den Zellen um ein lebendes System handelt, welches von vielzähligen Faktoren beeinflusst wird, sind mehrere unabhängige Inkubationsversuche mit der zu untersuchenden Substanz nötig. Abbildung 83 stellt den Methylierungsgrad des Promotors von CDKN2A aus zwei unabhängigen Inkubationsversuchen gegenüber. Es zeigt sich dabei eine gute Übereinstimmung.

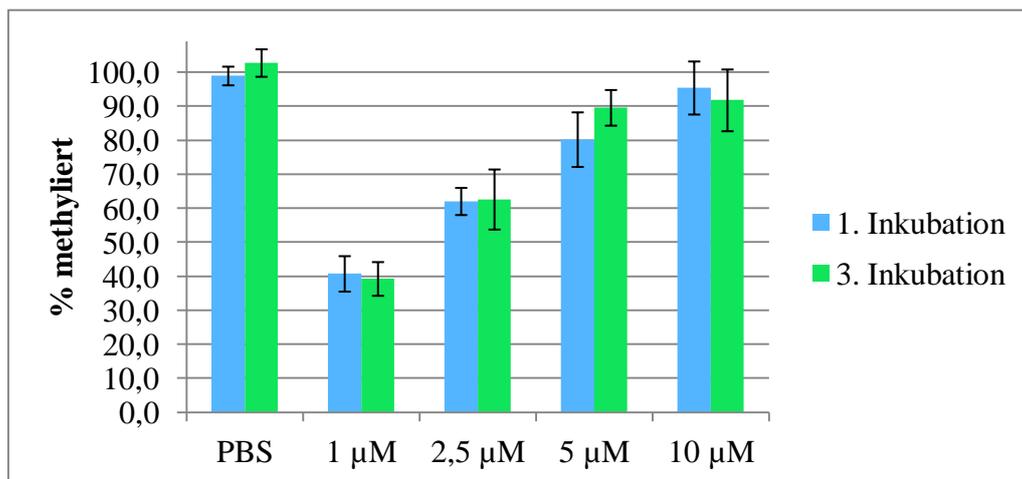


Abbildung 83: Vergleich des Effekts von 5-Aza-dC auf den Promotor von CDKN2A in HT29 Zellen bei zwei unabhängigen Inkubationsversuchen.

4.6 DNA-Methylierungsgrad der Promotorregion verschiedener Gene in MCF7 Zellen

Mit den MCF7 Zellen wurden aus Zeitgründen wenige Inkubationsversuche durchgeführt, die eine Abschätzung möglicher Veränderungen des Methylierungsgrads durch die Substanzen erlauben. Es wurde mit 5-Aza-dC, Genistein, BPA, Daidzein und Quercetin in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 100 µM inkubiert. Details zu den Inkubationsversuchen und den verwendeten Konzentrationen sind in Tabelle 14 und Tabelle 15 angeführt. Wiederum wurden die DNA aus den Zellen extrahiert, Bisulfit-konvertiert und anschließend mit den verschiedenen in der Arbeitsgruppe entwickelten MS-HRM Methoden analysiert (siehe Abschnitt 5).

Der Methylierungsgrad der Promotorregionen von verschiedenen Genen in der DNA un behandelter Zellen wurde bestimmt. Der Methylierungsstatus der Gene in % ist in Tabelle

13 angegeben. Bei den weiteren Versuchen wurde der Methylierungsgrad in der Promotorregion von CDKN2A, NTRK2, APC und DAPK1 bestimmt.

Tabelle 13: Methylierungsstatus der Promotorregion einzelner Gene in unbehandelten MCF7 Zellen.

Gen	Methylierungsgrad [%]
CDKN2A	74
NTRK2	84
OSMR	0
APC	26
DAPK1	75
TUBG2	0

4.7 Ergebnisse der Inkubationsversuche mit MCF7 Zellen

5-Aza-dC wurde auch bei MCF7 Zellen als Positivkontrolle verwendet. Es wurden zwei Inkubationsversuche im Konzentrationsbereich 0 bis 10 μM durchgeführt. Bei beiden konnte keine Inhibierung des Zellwachstums beobachtet werden.

4.7.1 5-Aza-2'-Desoxycytidin

Wie auch bei HT29 Zellen wurde der stärkste demethylierende Effekt bei der niedrigsten Konzentration (1 μM) beobachtet. Bei höheren Konzentrationen war der demethylierende Effekt deutlich geringer. Die Ergebnisse für den Promotor von CDKN2A sind in Abbildung 84 zusammengefasst.

4.7.1.1 CDKN2A

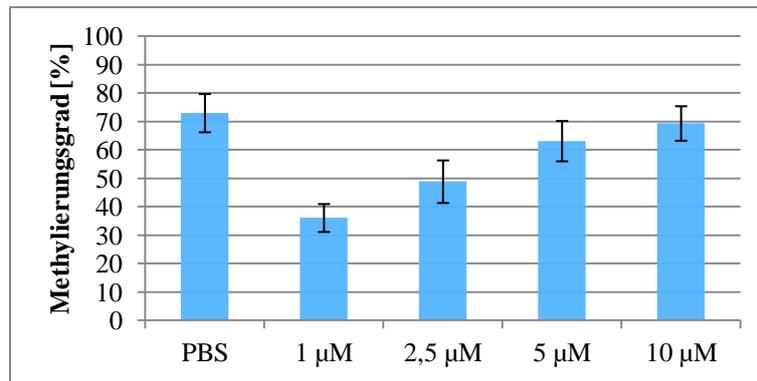


Abbildung 84: Methylierungsgrad von CDKN2A in MCF7 Zellen nach Behandlung mit 5-Aza-dC. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (zwei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt (n = 8).

4.7.1.2 NTRK2

Die Promotorregion von NTRK2 wurde durch 5-Aza-dC demethyliert. Die größte Wirkung wurde wiederum bei einer Konzentration von 1 µM erhalten. Im Unterschied zu CDKN2A (Abbildung 64 und Abbildung 84) konnte bei 10 µM 5-Aza-dC ebenfalls eine Demethylierung beobachtet werden.

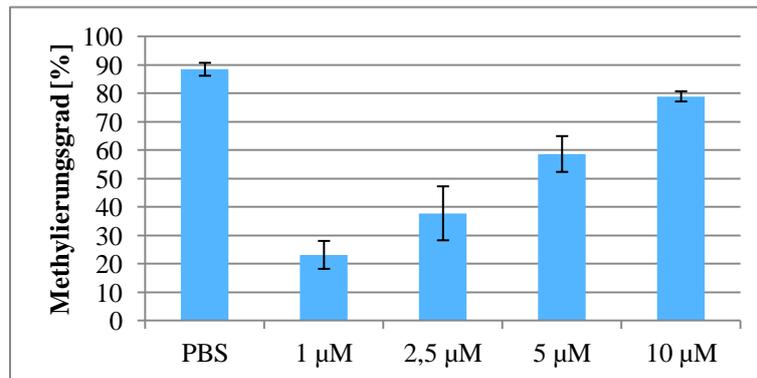


Abbildung 85: Methylierungsgrad von NTRK2 in MCF7 Zellen nach Behandlung mit 5-Aza-dC. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (zwei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt (n = 8).

4.7.1.3 APC

Die Promotorregion von APC liegt in unbehandelten MCF7 Zellen nicht sehr stark methyliert vor (26 %). Dennoch konnte durch die Inkubation mit 5-Aza-dC eine deutliche

Demethylierung beobachtet werden, wobei der stärkste Effekt wiederum bei einer Konzentration von 1 μM auftrat.

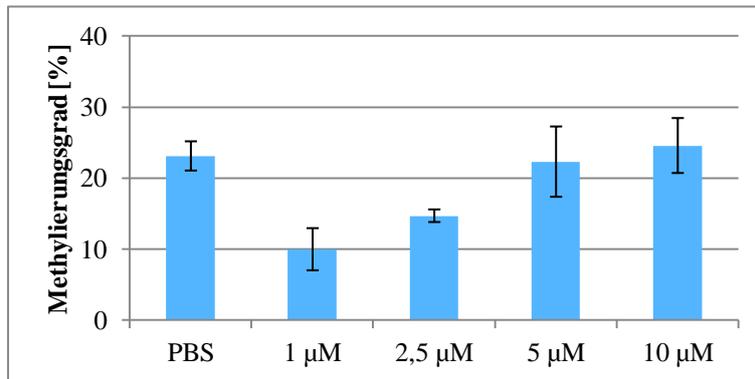


Abbildung 86: Methylierungsgrad von APC in MCF7 Zellen nach Behandlung mit 5-Aza-dC. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (zwei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt (n = 8).

4.7.1.4 DAPK1

Der zu untersuchende Bereich des Promotors von DAPK1 wurde in der PCR relativ schlecht amplifiziert (Siehe Abschnitt 4.2.3). Daher wurde ein niedriges Ausgangssignal erhalten, was dazu führte, dass sich die für vollständig methylierte und unmethylierte DNA erhaltenen Schmelzkurven nur gering unterschieden. Dennoch konnte ein demethylierender Effekt von 5-Aza-dC festgestellt werden.

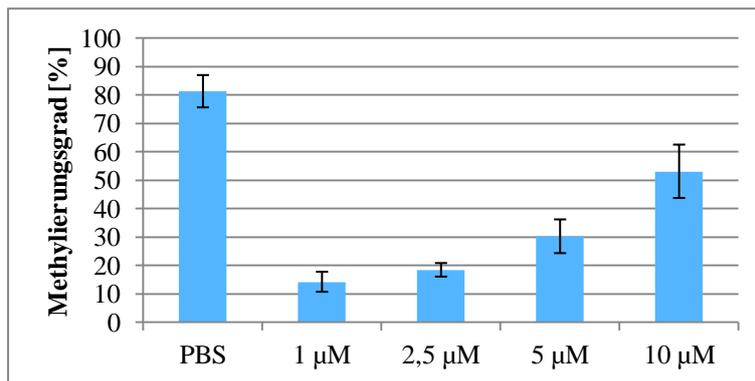


Abbildung 87: Methylierungsgrad von DAPK1 in MCF7 Zellen nach Behandlung mit 5-Aza-dC. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (zwei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt (n = 8).

4.7.2 Genistein

Laut einer Studie von Hsieh *et. al.* stimuliert Genistein das Zellwachstum von MCF7 Zellen schon ab Konzentrationen von 200 nM. Bei niedrigen Konzentrationen zeigte sich ein dosisabhängiger Anstieg des Wachstums, wobei bei 1 µM Genistein ein maximales Zellwachstum beobachtet wurde. Ab einer Konzentration von 20 µM Genistein kam es zu einer Reduktion des Zellwachstums. [120] Diese Ergebnisse wurden bei Inkubationsdauern von 96 Stunden erhalten. Jawaid *et. al.* stellten bei einer längeren Behandlung (40 bis 60 Tage) mit 10 nM Genistein eine Wachstumshemmung von MCF7 Zellen fest. [121]

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei der Behandlung der MCF7 Zellen mit 100 µM Genistein bereits nach 24 Stunden ein vermindertes Zellwachstum beobachtet. Nach 48 Stunden zeigten die Zellen bei dieser Konzentration eine veränderte Morphologie. Eine Konzentration von 50 µM führte ebenfalls zu einer Wachstumshemmung, und vereinzelt Zellen wiesen bereits Deformationen auf. Am Ende der Inkubationszeit waren alle Zellen, die Genistein Konzentrationen zwischen 0 und 10 µM ausgesetzt waren, stark angewachsen (100 % Konfluenz), während bei 50 µM Genistein die Konfluenz nur 70 % betrug. Eine Genistein Konzentration von 100 µM resultierte in einer Konfluenz von 20 – 30 %, weshalb diese Zellen nicht zur DNA-Extraktion verwendet wurden. Diese Ergebnisse stimmen damit mit den von Hsieh *et. al.* beobachteten Effekten überein.

4.7.2.1 CDKN2A

Für den Promotor von CDKN2A wurde eine leichte Reduktion der Hypermethylierung gefunden (siehe Abbildung 88). Genistein Konzentrationen von 1, 5 und 10 µM führten zu einem etwas geringeren Methylierungsgrad, wobei der Effekt nicht signifikant ist.

Ergebnisse und Diskussion

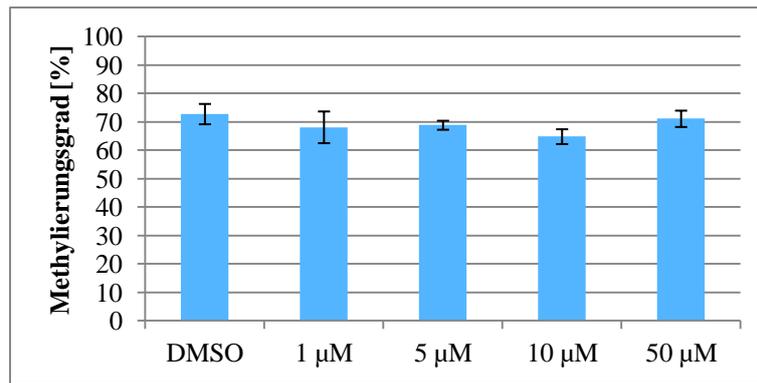


Abbildung 88: *Methylierungsgrad von CDKN2A in MCF7 Zellen nach Behandlung mit Genistein. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (zwei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt (n = 8).*

4.7.2.2 NTRK2

Im angewandten Konzentrationsbereich konnte keine Wirkung von Genistein auf den Methylierungsgrad des Promotors von NTRK2 festgestellt werden, wie aus Abbildung 89 abzulesen ist.

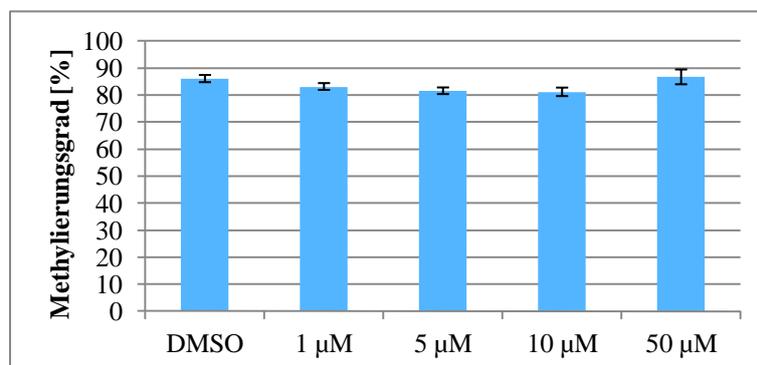


Abbildung 89: *Methylierungsgrad von NTRK2 in MCF7 Zellen nach Behandlung mit Genistein. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).*

4.7.2.3 APC

Die Promotorregion des Gens APC wurde durch Inkubation der Zellen mit Genistein nicht in seinem Methylierungsgrad verändert.

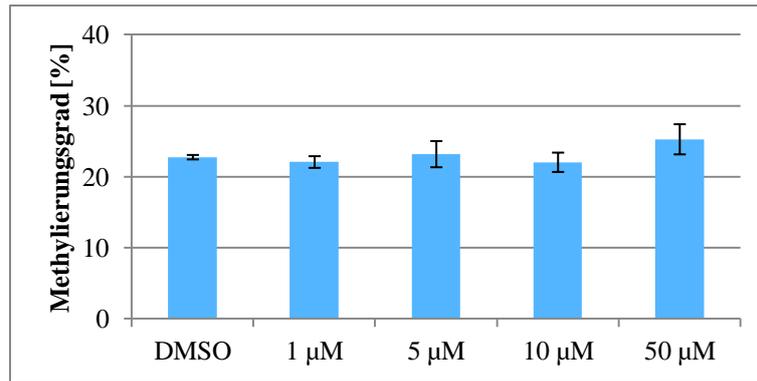


Abbildung 90: Methylierungsgrad von APC in MCF7 Zellen nach Behandlung mit Genistein. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt ($n = 4$).

4.7.2.4 DAPK1

Abbildung 91 zeigt, dass eine Inkubation der MCF7 Zellen mit Genistein im Konzentrationsbereich von 1 bis 50 µM keinen Effekt auf den Methylierungsgrad des Promotors von DAPK1 hatte.

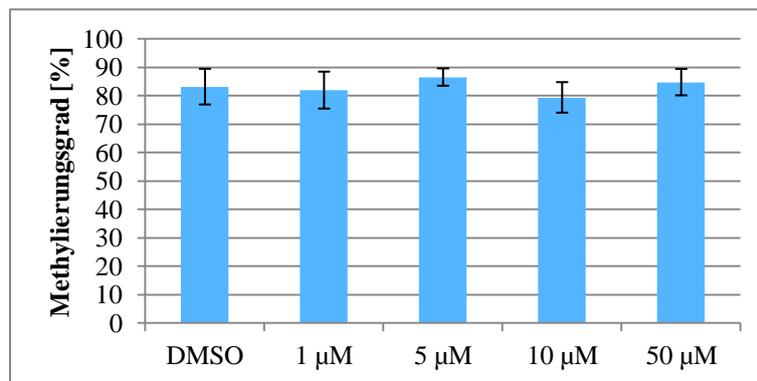


Abbildung 91: Methylierungsgrad von DAPK1 in MCF7 Zellen nach Behandlung mit Genistein. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (zwei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt ($n = 8$).

4.7.3 Bisphenol A

Bisphenol A führte in Konzentrationen von 50 µM und 100 µM bereits nach 24 Stunden zu einer Hemmung des Wachstums der Brustkrebszellen. Vereinzelt wurde auch eine Deformation der Zellen beobachtet. Nach 96 Stunden betrug die Konfluenz bei BPA Konzentrationen von 0 bis 10 µM 80 – 90 % und bei einer BPA Konzentration von 50 µM 60 %. Bei einer Konzentration von 100 µM lagen nur noch vereinzelt Zellen vor.

4.7.3.1 CDKN2A

Es konnte kein Effekt von BPA auf den Methylierungsgrad des Promotors von CDKN2A beobachtet werden.

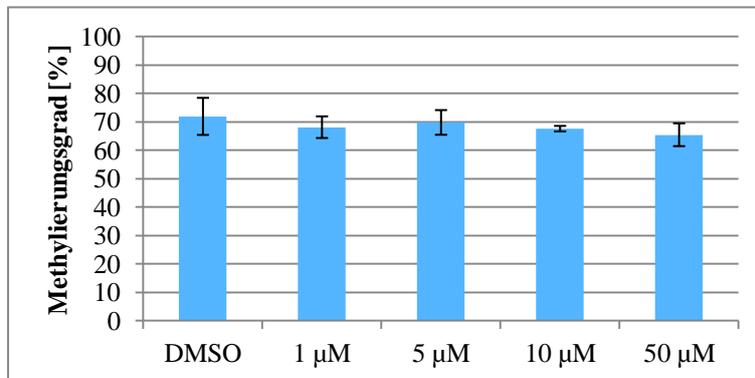


Abbildung 92: Methylierungsgrad von CDKN2A in MCF7 Zellen nach Behandlung mit BPA. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt ($n = 4$).

4.7.3.2 NTRK2

Die Promotorregion von NTRK2 wurde in ihrem Methylierungsgrad durch Inkubation mit BPA nicht verändert.

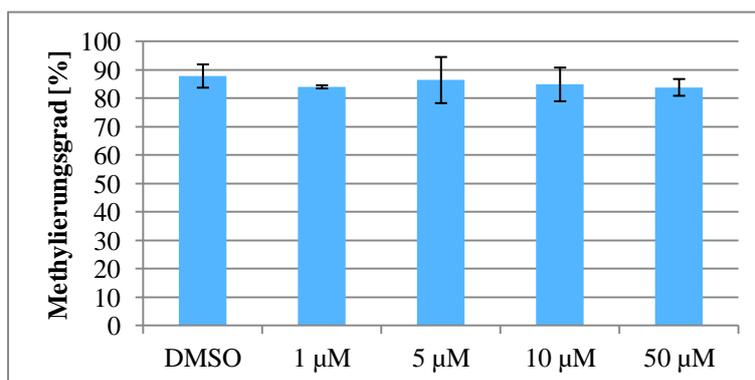


Abbildung 93: Methylierungsgrad von NTRK2 in MCF7 Zellen nach Behandlung mit BPA. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt ($n = 4$).

4.7.3.3 APC

BPA zeigte im untersuchten Konzentrationsbereich keine Wirkung auf die DNA-Methylierung des Promotors von APC.

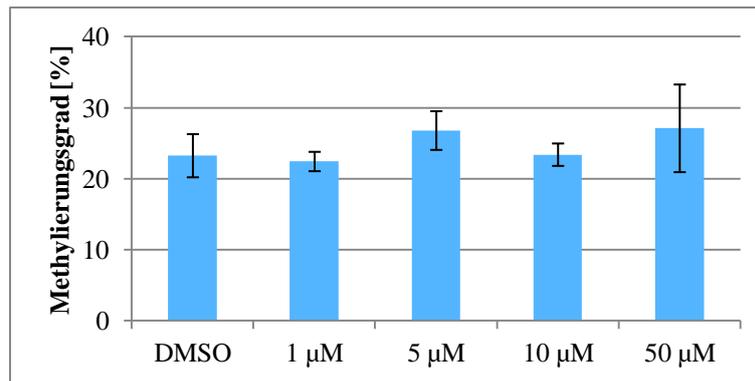


Abbildung 94: Methylierungsgrad von APC in MCF7 Zellen nach Behandlung mit BPA. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt ($n = 4$).

4.7.3.4 DAPK1

Die in Abbildung 95 dargestellten Ergebnisse lassen auf einen demethylierenden Effekt von BPA bei Konzentrationen von 1 und 10 µM schließen. Weitere Inkubationsversuche sind im Gang, um diese Ergebnisse zu verifizieren.

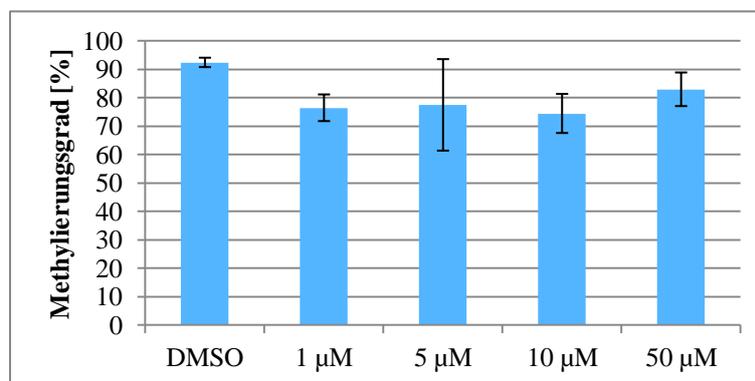


Abbildung 95: Methylierungsgrad von DAPK1 in MCF7 Zellen nach Behandlung mit BPA. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt ($n = 4$).

4.7.4 Daidzein

4.7.4.1 CDKN2A

MCF7 Zellen wurden nur einmal mit Daidzein behandelt, um einen möglichen Effekt abschätzen zu können. Es konnte bei einer Konzentration von 10 µM ein höherer

Methylierungsgrad erkannt werden, was allerdings durch weitere Versuche überprüft werden müsste.

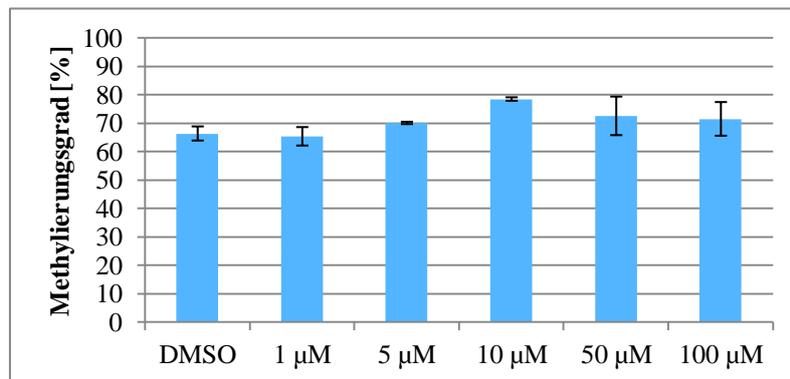


Abbildung 96: Methylierungsgrad von CDKN2A in MCF7 Zellen nach Behandlung mit Daidzein. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).

4.7.4.2 NTRK2

Daidzein zeigte keinen Einfluss auf den DNA-Methylierungsgrad der Promotorregion von NTRK2.

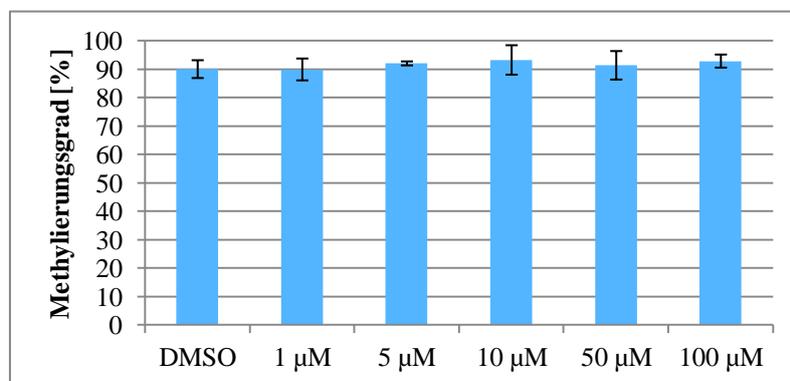


Abbildung 97: Methylierungsgrad von NTRK2 in MCF7 Zellen nach Behandlung mit Daidzein. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).

4.7.4.3 APC

Im untersuchten Konzentrationsbereich führte Daidzein nicht zu einer Veränderung des Methylierungsstatus der Promotorregion von APC.

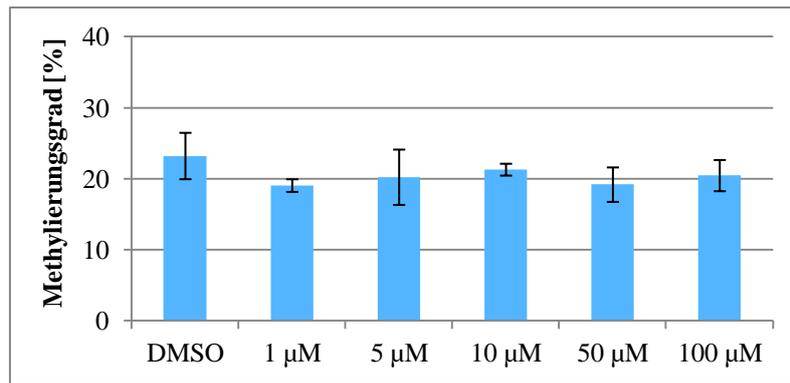


Abbildung 98: *Methylierungsgrad von APC in MCF7 Zellen nach Behandlung mit Daidzein. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).*

4.7.4.4 DAPK1

Die Promotorregion von DAPK1 wurde durch Inkubation mit Daidzein in ihrem Methylierungsgrad nicht verändert.

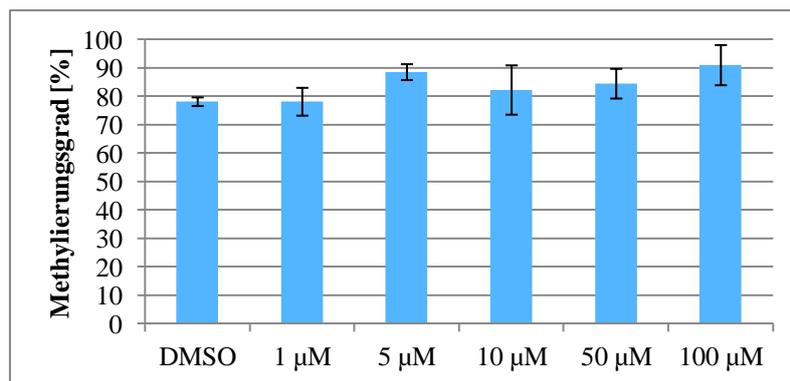


Abbildung 99: *Methylierungsgrad von DAPK1 in MCF7 Zellen nach Behandlung mit Daidzein. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).*

4.7.5 Quercetin

Quercetin inhibiert laut Russo *et. al.* das Fortschreiten des Zellzyklus in MCF7 Zellen schon ab Konzentrationen von 1 bis 10 µM nach 24 stündiger Behandlung. [64] In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zellkulturversuchen führten Konzentrationen von 50 und 100 µM bereits nach 48 Stunden zum Absterben aller Zellen. Bei niedrigeren Quercetin Konzentrationen konnte im Vergleich zur DMSO-Kontrolle kein verändertes Wachstum der Zellen beobachtet werden.

4.7.5.1 CDKN2A

Im Unterschied zu einer deutlichen zytotoxischen Wirkung wies Quercetin keinen Effekt auf die DNA-Methylierung auf. Abbildung 100 zeigt die für die Promotorregion von CDKN2A erhaltenen Ergebnisse.

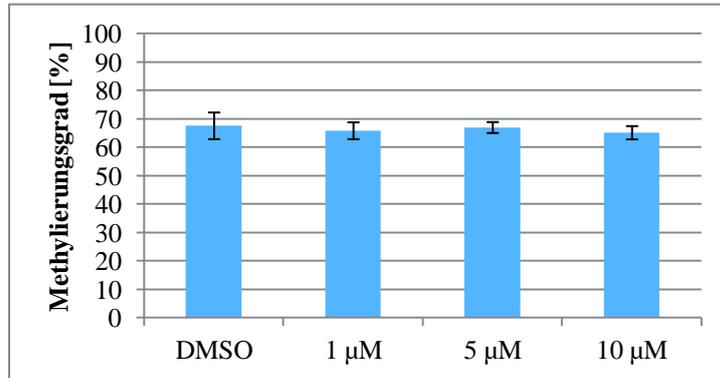


Abbildung 100: Methylierungsgrad von CDKN2A in MCF7 Zellen nach Behandlung mit Quercetin. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).

4.7.5.2 NTRK2

Die Promotorregion von NTRK2 wurde durch die Inkubation mit Quercetin in ihrem Methylierungsgrad nicht verändert.

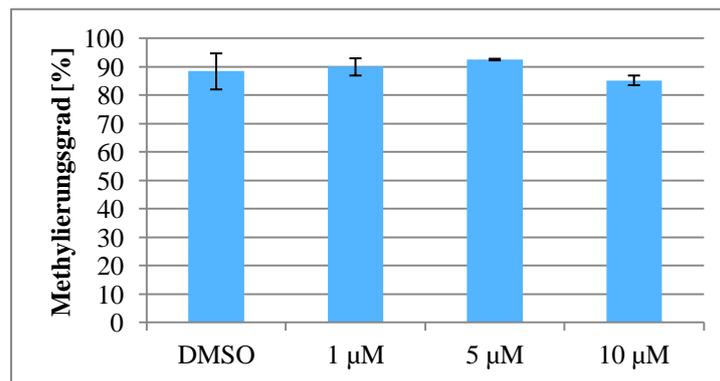


Abbildung 101: Methylierungsgrad von NTRK2 in MCF7 Zellen nach Behandlung mit Quercetin. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).

4.7.5.3 APC

Die in Abbildung 102 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Quercetin keinen Einfluss auf die DNA-Methylierung im Promotor von APC hat.

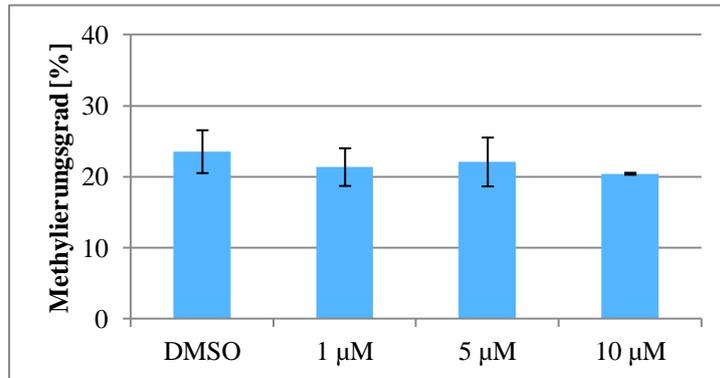


Abbildung 102: Methylierungsgrad von APC in MCF7 Zellen nach Behandlung mit Quercetin. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt ($n = 4$).

4.7.5.4 DAPK1

Ein signifikanter Effekt von Quercetin auf den DNA-Methylierungsgrad des Promotors von DAPK1 konnte nicht festgestellt werden.

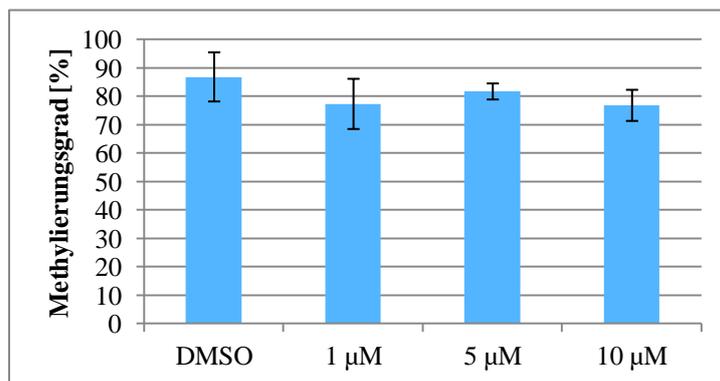


Abbildung 103: Methylierungsgrad von DAPK1 in MCF7 Zellen nach Behandlung mit Quercetin. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt ($n = 4$).

5 Experimentelles

5.1 Zellkultur

Die Kultivierung der Krebszellen wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie der Universität Wien durchgeführt. Die benötigten Einrichtungen wie Brutschränke und Sterilbank wurden von Univ. Prof. Doris Marko zur Verfügung gestellt. Die MCF7 Zellen wurden von Ao. Univ. Prof. Christopher Gerner vom Institut für Krebsforschung der Medizinischen Universität Wien erhalten.

5.1.1 Arbeiten unter der sterilen Werkbank

Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter einer sterilen Werkbank, bzw. Laminar Flow Werkbank (Abbildung 104), durchgeführt, um Kontaminationen mit Mikroorganismen zu verhindern. Dieser Arbeitsbereich besitzt ein spezielles Lüftungssystem, welches sterilfiltrierte Luft von oben nach unten leitet. Dabei kann durch Herablassen der Frontscheibe geregelt werden, dass ein möglichst geringer Teil an Raumluft und damit auch darin enthaltene Partikel eingesaugt werden. Die Scheibenunterkante wurde immer in einem bestimmten Abstand von der Tischkante belassen und die Manipulation erfolgte einzig durch Hineinfahren mit den Händen bis höchstens zum Ellenbogen. Dabei mussten immer Handschuhe getragen werden, die vor jedem Eintritt in den Sterilbereich mit 70 %igem Ethanol (v/v) besprüht wurden, um etwaige Keime durch Dehydratation abzutöten. Eine Desinfektion mit Ethanol wirkt nur, wenn ein gewisser Anteil Wasser vorhanden ist, da absoluter Ethanol Bakteriensporen konserviert. Es könnten auch andere Mittel verwendet werden, doch wird im allgemeinen Alkohol seiner raschen Wirkung und des Verdampfens wegen bevorzugt. Vor dem Einbringen jeglichen Gegenstands wurde dieser besprüht und auch der Arbeitstisch selbst wurde vor und nach der Benützung ausgewischt. [122]



Abbildung 104: *Verwendete Sterilbank mit Frontscheibe in optimaler Höhe und Pumpe.*

Alle Flaschen und sonstigen Gefäße, wie Behälter für Pipetten und die Pipetten selbst, wurden am Deckelrand vor dem Öffnen kurz abgeflammt. Außerdem wurde in der Zellkultur nur steriles Material verwendet und daher auch alles, was mit den Zellen in Kontakt kam, gesondert gesammelt und vor der Wiederverwertung oder dem Entsorgen wiederum autoklaviert. Sämtliche Flüssigkeiten, wie Nährmedien oder Puffer, wurden mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und in einem eigenen, dichten Behälter gesammelt. Auch dies musste vor der fachgerechten Entsorgung im Autoklaven sterilisiert werden.

Beim Arbeiten unter der Laminar Flow Werkbank war noch besonders zu beachten, dass möglichst nur die benötigten Gegenstände im Sterilbereich standen. Flaschenhalse durften nicht mit Flüssigkeit benetzt werden, vor allem nicht mit Nährmedien, da sie einen bevorzugten Lebensraum für Mikroorganismen darstellen würden. Allgemein musste darauf geachtet werden, dass keine Flüssigkeiten ausgeschüttet wurden. In einem solchen Fall musste die Arbeitsfläche desinfiziert werden, bevorzugt durch Bestrahlung mit UV-Licht. [122]

5.1.2 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden in Kulturflaschen (175 cm² oder 75 cm² Bodenfläche) mit dem jeweils für die Zelllinie geeigneten Medium kultiviert.

5.1.2.1 HT29 Zelllinie

Die humane Zelllinie HT29 wurde 1964 von J. Fogh aus einem colorectalen Karzinom gewonnen. Es handelt sich dabei um ein Adenokarzinom einer 44-jährigen kaukasischen Frau, was bedeutet, dass es aus dem Drüsengewebe hervorgegangen ist. Diese adhärente Zelllinie wächst sowohl als Monolayer als auch in großen Kolonien (Abbildung 105). Die Zellen benötigen etwa 40 bis 60 Stunden, um sich zu verdoppeln und wurden daher ungefähr alle vier Tage passagiert. Die Zellen werden als heterotransplantabel beschrieben und bilden gut differenzierte Tumore 1. Grades aus. [123] [124] Kultiviert wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, mit 4,5 g/l Glukose, L-Glutamin; ohne Pyruvat), das mit 10 % Vol. FKS und 1 % Vol. Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep, 10.000 Einheiten/ 10000 µg/ml) versetzt wurde.

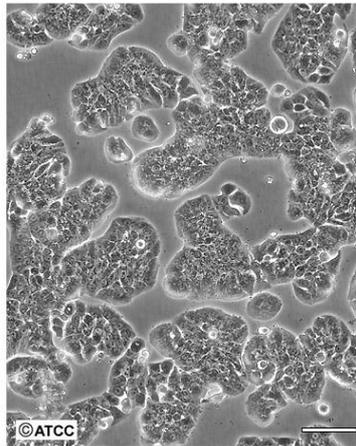


Abbildung 105: Beispiel für HT29 Zellen (aus [124])

5.1.2.2 MCF7 Zelllinie

Als MCF7 wird eine Linie epithelartiger Zellen aus einem Adenokarzinom der Brust bezeichnet. Gewonnen wurden die Zellen 1970 aus einem metastasierenden Brusttumor einer 69 Jahre alten Frau kaukasischer Herkunft. Die Patientin wurde zuvor mit Radio- und Hormontherapie behandelt. Die Zellen besitzen Östrogenrezeptoren im Cytoplasma und sind daher Östrogen-sensitiv. Außerdem besitzen sie andere Eigenschaften von Brustepithelzellen, so können sie zum Beispiel hügelartig wachsen. Grundsätzlich bilden sie Monolayer aus und zeigen adhärentes Wachstum (Abbildung 106). Die Zellen benötigen ungefähr 50 Stunden, um sich zu verdoppeln und wurden etwa alle vier Tage passagiert. [123] [124] Als

Experimentelles

Kulturmedium wurde RPMI 1640 (mit L-Glutamin) mit einem Zusatz von 10 % FKS und 1 % Pen/Strep verwendet. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert.

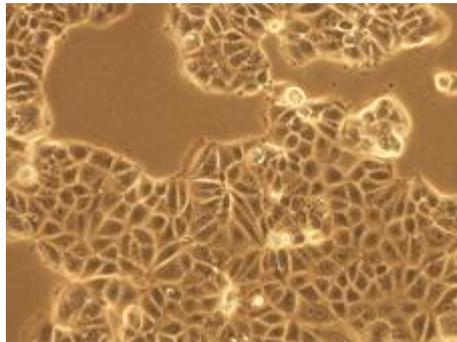


Abbildung 106: Beispiel für MCF7 Zellen (aus [125])

5.1.3 Mediumwechsel

In den Kulturmedien ist eine gewisse Menge an Nährstoffen vorhanden, die von den Zellen nach und nach abgebaut werden. Diese Abnahme ergibt zusammen mit der Anreicherung der Stoffwechselprodukte ein Sinken des pH-Werts. Deshalb ist das Basalmedium mit Phenolrot als Indikator versetzt, welches anzeigt, wann das Medium gewechselt werden sollte. Schlägt die Farbe von kirschrot auf gelb um, zeigt das einen pH-Wert von unter 7,2 an. Ein Anstieg auf über 7,6 wird durch eine dunkelrot bis violette Färbung sichtbar. [122]

Da die verwendeten Zellen als Monolayer wachsen, konnte das verbrauchte Medium einfach abgesaugt und durch frisches, auf 37 °C vorgewärmtes Medium ersetzt werden. Für eine Kulturflasche mit 175 cm² Bodenfläche wurden 40 ml Medium, für eine mit 75 cm² 20 ml verwendet.

5.1.4 Subkultivierung

Die Zelldichte ist neben den Inhaltsstoffen des Mediums ein entscheidender Faktor für das Wachstumsverhalten. Ist die gesamte Oberfläche der Kulturflasche mit Zellen bedeckt, so spricht man von Konfluenz. Die Zellen stehen in diesem Stadium in engem Kontakt, was bei gesunden Zellen einen Wachstumsstopp hervorrufen würde. Tumorzellen, die solche Einschränkungen nicht besitzen, wachsen als Polylyer weiter. Um dies zu vermeiden, werden die Zellen in gewissen Abständen vom Flaschenboden gelöst, entfernt und nur ein geringer Teil wieder weiterkultiviert, was als passagieren bezeichnet wird. Das Lösen wird

durch enzymatische Verdauung mit Trypsin, einer Peptidase, erreicht. Um nicht gleich die ganze Zelle zu lysieren, wird, sobald die Zellen nicht mehr haften, Medium zugegeben. Das Serum im Kulturmedium inhibiert nämlich das Trypsin und stoppt so den Verdau. [122]

5.1.4.1 Durchführung

Sowohl die MCF7- als auch die HT29-Zellen wurden alle drei bis vier Tage passagiert, wobei täglich die Zelldichte in der Kulturflasche überprüft wurde, um eine Konfluenz zu vermeiden. Alle verwendeten Flüssigkeiten wurden zuvor auf 37 °C erwärmt. Das verbrauchte Medium wurde vorsichtig abgesaugt, anschließend mit PBS gespült und wiederum abgesaugt, um Reste des Serums zu entfernen, die den anschließenden enzymatischen Verdau inhibieren würden. Es wurden 5 ml PBS für eine 175 cm² Kulturflasche und 2,5 ml für eine 75 cm² Kulturflasche verwendet. Besonders MCF7-Zellen zeigten bei hoher Zelldichte ein geringes Haftungsvermögen an der Flaschenoberfläche. Deshalb musste besonders darauf geachtet werden, dass kein PBS direkt auf den Zellrasen pipettiert und vorsichtig wieder abgezogen wurde. Anschließend wurde mit 2,5 ml (175 cm² Flasche) oder 1,5 ml (75 cm² Flasche) Trypsin (500 mg/l, mit 250 mg/l EDTA) beschichtet und für zwei bis drei Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Dies stellt nicht nur das Temperaturoptimum für die Zellen sondern auch das für die Trypsinwirkung dar. [122] Der Zellrasen wurde durch leichte Schläge an den Flaschenrand abgeklopft und zur Inaktivierung des Trypsins Kulturmedium zugegeben (10 ml in eine 175 cm² und 5 ml in eine 75 cm² Flasche). Mit einer Glaspipette wurden die restlichen Zellen abgespült und die Zellsuspension in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt. Etwa 0,5 ml wurden in der Flasche belassen und mit 40 oder 20 ml Medium versetzt (je nach Flaschengröße). Es wurde durchmischt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu gewährleisten. Die abgezogene Zellsuspension konnte für Inkubationsversuche verwendet werden.

Mit jeder Subkultivierung steigt die Passagennummer, welche immer auf der Flasche vermerkt wurde. Es wurden je drei bis vier Passagen in einer Flasche kultiviert, anschließend wurde eine neue Flasche verwendet. Die HT29-Zellen ließen sich oft recht schwer lösen, sodass das Wechseln der Flasche von großer Bedeutung war, da zu viele Zellen haften blieben und bereits nach ein bis zwei Tagen die Konfluenz erreicht war. Die Anzahl der Passagen, die verwendet werden können, hängt von der jeweiligen Zelllinie ab. HT29 wurde bis zu Passage 40 verwendet, für MCF7 war keine Einschränkung bekannt.

5.1.5 Ausstreuung der Zellen

Für die Inkubationsversuche wurden Zellen in Petrischalen überführt (ausgestreut) und dort kultiviert, bis die verschiedenen Substanzen zugegeben wurden. Um möglichst vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, musste jeweils dieselbe Anzahl an Zellen ausgestreut werden. Außerdem ist die anfänglich eingesetzte Zellmenge für das Wachstum von großer Bedeutung. Wird zu dünn ausgestreut, wachsen die Zellen nur sehr langsam, wohingegen bei zu vielen Zellen eine frühzeitige Konfluenz auftritt. In diesem Fall müsste subkultiviert werden, was bei Inkubationsversuchen allerdings nicht möglich ist. Daher ist es nötig, die Anzahl der Zellen zu bestimmen und eine gewisse Menge an Zellen zu verwenden. [122]

Die Zellzahlbestimmung erfolgte über ein Hämocytometer, eine sogenannte Neubauer-Zählkammer. Dabei handelt es sich um eine Spezialglasplatte, aus der Stege herausgefräst wurden. Durch Aufbringen der Zellen können sie, wie unten beschrieben gezählt werden. Dafür müssen die Zellen in Suspension sein, weshalb Monolayerkulturen mit Trypsin losgelöst werden. Um zusätzlich lebende von toten Zellen unterscheiden zu können, wird ein Trypanblau-Vitalitätstest durchgeführt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der als Anion leicht an Proteine binden kann. Während tote Zellen gefärbt werden, gelangt der Farbstoff bei lebenden Zellen nicht ins Zellinnere. Somit erscheinen diese als weiße Kreise unter dem Mikroskop und nur sie werden gezählt. [122]

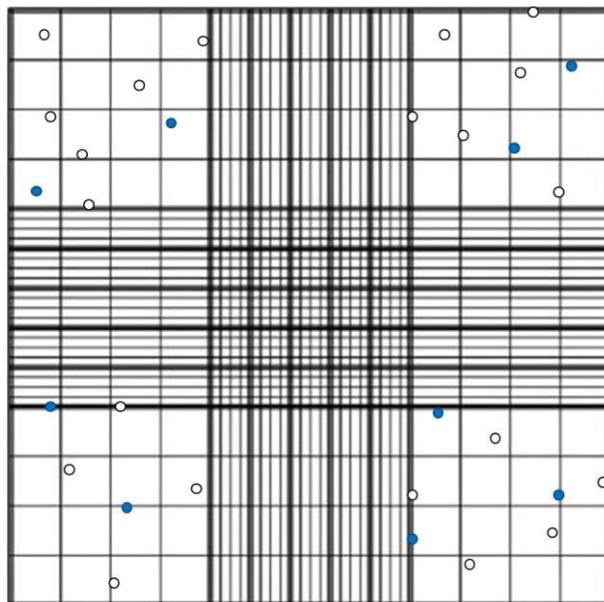


Abbildung 107: Beispiel für eine Neubauer-Zählkammer mit jeweils vier Zellen pro Eckquadrat. (Modifiziert nach [122])

Die Neubauer-Zählkammer ist derart präpariert, dass auf der Glasplatte neun Quadrate entstehen (siehe Abbildung 107), die durch das Auflegen eines Deckglases ein gewisses Volumen fassen können. Ist das Deckglas richtig angelegt, zeigt sich das durch sogenannte Newtonringe. Sie zeigen an, dass die Tiefe der Zählkammer auf 0,1 mm eingestellt ist. Die Fläche eines Quadrats beträgt 1 mm^2 , was ein Volumen von $0,1 \text{ }\mu\text{l}$ pro großes Quadrat ergibt. Die vier Eckquadrate werden jeweils in viermal vier kleinere Quadrate unterteilt und zur Bestimmung der Zellzahl berücksichtigt. Es wird in diesem Raster ausgezählt, wobei immer nur zwei Seitenlinien jedes kleinen Quadrats einbezogen werden, um zu vermeiden, dass Zellen doppelt erfasst werden. Aus den Ergebnissen der vier Eckquadrate wird der Durchschnitt genommen und so die Zellzahl pro $0,1 \text{ }\mu\text{l}$ erhalten. Eine Multiplikation mit 10.000 ergibt die Menge an Zellen in einem Milliliter. [122]

5.1.5.1 Durchführung

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 5.1.4.1 beschrieben mit Trypsin gelöst und in Suspension gebracht. $180 \text{ }\mu\text{l}$ Trypanblau-Lösung wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt. Die Zellen wurden gut gemischt und $20 \text{ }\mu\text{l}$ zur Lösung gegeben. Es wurde kurz gevortext und anschließend die Suspension auf die vorbereitete Neubauer-Zählkammer aufgebracht. Die Zellen in den Eckquadraten wurden gezählt und die Zellzahl folgendermaßen bestimmt:

$$\text{Zellzahl}/_{\text{ml}} = D * 10 * 10.000$$

D = Durchschnitt der Eckquadrate (in $0,1 \text{ }\mu\text{l}$ Zellsuspension)

Formel 3: Berechnung der Anzahl der Zellen pro Milliliter Suspension.

Für jeden Inkubationsansatz wurden 75.000 Zellen zu 5 ml Kulturmedium gegeben und gut gemischt. Es wurde in eine Petrischale mit 6 cm Durchmesser transferiert und leicht geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung zu erhalten. Die Zellen wurden für 72 Stunden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 im Trockenschrank kultiviert, bevor sie für die einzelnen Inkubationsversuche verwendet wurden.

5.1.6 Inkubationsversuche

Die Zellen wurden wie oben beschrieben ausgestreut und für 72 Stunden anwachsen gelassen. Es wurde für jede Substanz eine Negativkontrolle mitgeführt, in der nur das Lösungsmittel

Experimentelles

zugesetzt wurde, damit etwaige Effekte, die nicht von der Substanz herrühren, erkannt werden konnten. Als Lösungsmittel wurde PBS oder DMSO verwendet. Um eine Schädigung der Zellen zu vermeiden, wurde 1 % (v/v) DMSO verwendet. Daher wurden jeweils 50 µl der substanzhaltigen Lösung in 5 ml Medium verdünnt und in die Petrischalen überführt. Diese Inkubationslösung wurde alle 24 Stunden erneuert. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgezogen und durch die vorbereitete Mischung ersetzt. Die Zellen wurden 96 Stunden inkubiert, d.h. es wurde viermal das Medium erneuert. Die Aufarbeitung am Ende des Versuchs wird im folgenden Abschnitt beschrieben.



Abbildung 108: Inkubationslösungen, Kulturmedium, Petrischalen und eine Kulturflasche.

Unterschiedlich konzentrierte Lösungen der Substanzen wurden am Beginn jedes Versuchs hergestellt und bei -20 °C gelagert. Sie wurden vor der Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt und dann dem vorgewärmten Medium zugegeben. Die einzelnen Inkubationsversuche sind in Tabelle 14 aufgelistet, die verwendeten Konzentrationen der Substanz in Tabelle 15.

Tabelle 14: Übersicht über die einzelnen Inkubationsversuche mit beiden Zelllinien.

Substanz, Inkubationsversuch	Zelllinie	Passage	Lösungsmittel
5-Aza-dC, 3. Inkubation ¹	HT29	27	PBS
Genistein, 1. Inkubation	HT29	14	DMSO
Genistein, 2. Inkubation	HT29	22	DMSO
Quercetin, 1. Inkubation	HT29	25	DMSO
Quercetin, 2. Inkubation	HT29	30	DMSO
Quercetin, 3. Inkubation	HT29	23	DMSO
Quercetin, 4. Inkubation	HT29	24	DMSO

Experimentelles

5-Aza-dC, 1. Inkubation	MCF7	11	PBS
5-Aza-dC, 2. Inkubation	MCF7	17	PBS
Genistein, 1. Inkubation	MCF7	12	DMSO
Genistein, 2. Inkubation	MCF7	16	DMSO
Bisphenol A, 1. Inkubation	MCF7	13	DMSO
Daidzein, 1. Inkubation	MCF7	14	DMSO
Quercetin, 1. Inkubation	MCF7	15	DMSO

¹ Inkubation 1 und 2 durchgeführt von B. Druml

Tabelle 15: Verwendete Konzentrationen der Substanzen.

5-Aza-dC	Genistein	Quercetin, 1.+2. Inkubation	Quercetin, 3.+ 4. Inkubation	Daidzein	Bisphenol A
	100 µM	100 µM	20 µM	100 µM	100 µM
10 µM	50 µM	50 µM	10 µM	50 µM	50 µM
5 µM	10 µM	10 µM	5 µM	10 µM	10 µM
2,5 µM	5 µM	5 µM	2,5 µM	5 µM	5 µM
1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM
1 % PBS	1 % DMSO	1 % DMSO	1 % DMSO	1 % DMSO	1 % DMSO

5.2 DNA Isolierung

Die Gewinnung der DNA aus den Zellen erfordert das Zerstören dieser unter möglichst schonenden Bedingungen. Bevorzugt werden dazu die Zellwände enzymatisch aufgeschlossen und die Zellmembran mit Detergenzien aufgelöst. Dadurch werden DNA und RNA frei, wobei die RNA durch Behandlung mit Ribonuklease (RNase) entfernt werden kann. Bei der Aufarbeitung wird außerdem EDTA zugesetzt, welches vorhandene Mg^{2+} Ionen komplexiert. Diese dienen den zelleigenen Desoxyribonukleasen (DNasen), den DNA degradierenden Enzymen, als Coenzym. Proteine werden in den meisten Standardverfahren durch eine Phenol-Wasser oder Phenol-Chloroform Mischung denaturiert. Bei der Phasentrennung entsteht eine Zwischenphase aus denaturiertem Protein, welche mit der organischen Phase abgetrennt werden kann. Durch die anschließende Zugabe von absolutem Ethanol fällt die DNA aus, was sowohl einen weiteren Reinigungsschritt darstellt als auch eine Anreicherung

der DNA zulässt. Die so gewonnene DNA kann in Wasser wieder aufgenommen werden und in Lösung bei -20 °C gelagert werden. [83]

Wie oben beschrieben ist die Entfernung von DNasen für die Extraktion aber auch für das weitere Arbeiten mit DNA unablässig. Daher wurden grundsätzlich nur sterile Gefäße und Materialien verwendet. In allen Schritten wurde DNase und RNase freies Wasser verwendet. Die Isolation der DNA erfolgte mit dem QIAamp DNA Mini Kit von Qiagen nach den Vorschriften des Herstellers. [126] Dabei werden die Zellen mit Proteinase K lysiert und anschließend die DNA über eine sogenannte QIAamp Mini Spin Säule aufgereinigt. Diese Säule enthält eine Membran auf Silika-Basis, welche die DNA bindet. Es wird gewaschen und die DNA durch Absenken der Salzkonzentration eluiert.

5.2.1 Durchführung

Im Falle der unbehandelten Zellen wurden die Zellen wie oben beschrieben gelöst, ausgezählt und 2.000.000 in 3 ml Medium suspendiert. Bei den Inkubationsversuchen wurden die gesamten Zellen nach 96 Stunden aufgearbeitet. Das Medium wurde entfernt, der Zellrasen mit 2 ml PBS gewaschen und 500 µl Trypsin zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von zwei bis drei Minuten wurde der Verdau mit 2,5 ml Medium gestoppt. Die Zellen wurden mit einer Pipette abgespült und die Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt.

Es wurde für fünf Minuten bei 300 x g zentrifugiert und das Medium abgenommen. Das Zellpellet wurde mit 2 ml PBS gewaschen, kurz gevortext und wiederum für fünf Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Nachdem das PBS entfernt worden war, wurden die Zellen in 200 µl PBS suspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 20 µl Proteinase K Lösung zugegeben, suspendiert und 200 µl AL Puffer zugefügt. Die Zellen wurden für zehn Minuten bei 56 °C lysiert, anschließend 200 µl absoluter Ethanol zugegeben und gut gemischt. Um restliche Flüssigkeit vom Deckel zu entfernen, wurde kurz zentrifugiert und der Überstand in eine Spin Säule überführt. Es wurde für eine Minute bei 8.000 rpm zentrifugiert, das Filtrat verworfen und die Säule in ein neues Auffanggefäß gestellt. 500 µl AW1 Waschpuffer wurden auf die Säule pipettiert und wiederum für eine Minute bei 8.000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde entsorgt, ein neues Auffanggefäß verwendet, mit 500 µl AW2 Puffer gewaschen und für drei Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Es wurde das Filtrat verworfen, die Säule in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gestellt und für eine Minute bei 14.000 rpm zentrifugiert, um restliche Flüssigkeit zu entfernen. Die Säule wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben, 200 µl Wasser zugegeben, für fünf Minuten

eluiert und für eine Minute bei 8.000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt und so eine Probe A und eine Probe B (je 200 µl DNA-Lösung) erhalten. Von beiden Proben wurden die Konzentration und Reinheit überprüft.

5.2.2 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentration der DNA kann photometrisch bestimmt werden, da die Nukleinbasen stark bei 260 nm absorbieren. Eine Absorptions-Einheit entspricht 50 mg/ml DNA, weshalb die Konzentration in mg/ml durch Formel 4 erhalten werden kann.

$$C = A_{260} * V * 50$$

Formel 4: Berechnung der DNA-Konzentration in einer Lösung.

Die Reinheit der DNA wird über ihren Anteil an Proteinen überprüft. Da diese durch die aromatischen Seitenketten ein Absorptionsmaximum bei 280 nm aufweisen, kann das Verhältnis von A_{260}/A_{280} herangezogen werden. Bei einem Wert größer 1,8 spricht man von reiner DNA. [83] Praktisch wurde die Messung mit dem Nano Drop durchgeführt. Dieses Spektralphotometer benötigt nur einen kleinen Tropfen von ungefähr 1-2 µl auf der Linse, um die Konzentration bestimmen zu können. Es wurde dabei darauf geachtet, im linearen Bereich des Lambert Beer'schen Gesetzes zu bleiben.

5.3 Bisulfit-Konvertierung

Durch die Behandlung von DNA mit Natriumhydrogensulfit wird unmethyliertes Cytosin in Uracil umgewandelt, während methyliertes Cytosin unverändert bleibt. [86] Diese Änderung der Basenabfolge ist grundlegend für die Bestimmung des DNA-Methylierungsgrads mit PCR-basierten Methoden. Die aus den Zellen erhaltene DNA sowie die kommerziell erworbene Kontroll-DNA wurden mit dem EpiTect Bisulfite Kit von Qiagen der Bisulfit-Konvertierung unterzogen und aufgereinigt.

Es wurden in jedem Ansatz 2 µg DNA eingesetzt und Bisulfit-Mix und DNA-Schutzpuffer zugegeben. Der Bisulfit-Mix enthält Natriumhydrogensulfit und ist auf einen für die Reaktion optimalen sauren pH-Wert eingestellt. Dieser kann außerdem durch die Zugabe des DNA-Schutzpuffers überprüft werden, da dieser einen pH-Indikator enthält, welcher bei niedrigen

pH-Werten von Grün auf Blau umschlägt. Zusätzlich ist der DNA-Schutzpuffer dafür ausgelegt, eine Fragmentierung der DNA bei den verwendeten hohen Temperaturen und niedrigen pH-Werten zu vermeiden und eine effektive Denaturierung zu gewährleisten. Es wird also eine Trennung der Stränge für eine vollständige Cytosin-Konvertierung im folgenden Temperaturprogramm begünstigt. Das Temperaturprogramm besteht aus verschiedenen Inkubationsschritten, die für die Denaturierung, Sulfonierung und Desaminierung nötig sind. Anschließend kann über eine Festphasenextraktion die DNA abgetrennt und aufgereinigt werden. Zur besseren Bindung der DNA an die Membran der Säule wird ein spezieller Puffer (BL) und carrier-RNA zugegeben. Die Desulfonierung als letzter Schritt wird auf der Säule (engl.: on-column) durchgeführt, indem mit basischem Puffer mit Desulfonierungs-Reagenz (BD) inkubiert wird.

5.3.1.1 Durchführung

Die Bisulfit-Konvertierung wurde gemäß dem Protokoll des Kits durchgeführt. [127] Der Ansatz war aus den in Tabelle 16 angegebenen Komponenten zusammengesetzt. Es wurden dazu je 2 µg DNA eingesetzt, außer es lag eine zu geringe Konzentration vor, sodass mehr als 20 µl Volumen benötigt worden wären. In diesem Fall wurden 20 µl eingesetzt und vor der PCR durch eine entsprechende Verdünnung korrigiert.

Tabelle 16: Reagenzien und Volumina für einen Bisulfit-Konvertierungs Ansatz.

Komponente	Volumen [µl]
DNA-Lösung	x µl (höchstens 20 µl)
H ₂ O	20 – x µl
Bisulfit-Mix	85 µl
DNA-Schutzpuffer	35 µl
Gesamtvolumen	140 µl

Die einzelnen PCR-Tubes wurden kurz gevortext und anschließend in den Thermocycler gegeben. Das Temperaturprogramm ist in Tabelle 17 gezeigt.

Tabelle 17: Temperaturprogramm für die Bisulfit-Konvertierung.

Schritt	Zeit [min]	Temperatur [°C]
Denaturierung	5	95
Inkubation	25	60
Denaturierung	5	95
Inkubation	85	60
Denaturierung	5	95
Inkubation	175	60
Abkühlen	1	20

Das Reaktionsgemisch wurde sofort aufgearbeitet. Dazu wurde kurz gevortext und das Gemisch in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es wurden je Ansatz 620 µl Puffer BL mit 6,2 µl carrier-RNA versetzt, sodass eine Konzentration von 10 µg/ml erhalten wurde. 560 µl dieser Mischung wurden zur DNA-Lösung gegeben, gevortext und kurz zentrifugiert, um eventuelle Tropfen auf dem Deckel zu entfernen. Die Lösung wurde in eine Festphasenextraktions-Säule („EpiTect spin column“) überführt und für eine Minute bei 12.000 rpm zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen, mit 500 µl Puffer BW (Waschpuffer) gewaschen und für eine Minute bei 14.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 500 µl Puffer BD für die Desulfonierung zugegeben, 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann für eine Minute bei 14.000 rpm zentrifugiert. Es ist darauf zu achten, dass die Flasche und die Säulen mit Puffer sofort verschlossen werden, damit CO₂ aus der Luft den pH-Wert nicht senken kann. Das Zentrifugat wurde wiederum verworfen und es wurde zweimal mit Puffer BW gewaschen, um zu entsalzen. Dafür wurden je 500 µl Puffer BW zugesetzt und für eine Minute bei 14.000 rpm zentrifugiert, wobei das Zentrifugat entfernt wurde. Um restliche Flüssigkeit zu entfernen, wurde die Säule in ein neues Auffanggefäß gegeben und für eine Minute bei 14.000 rpm zentrifugiert. Zusätzlich hat es sich bewährt, eventuell noch vorhandenes Ethanol zu entfernen, indem die Säulen in ein leeres 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gestellt und für 15 Minuten bei 56 °C mit geöffnetem Deckel im Trockenschrank inkubiert wurden. [111] Daraufhin wurden die Säulen wiederum in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und 20 µl Elutionspuffer (Puffer EB) auf die Membran pipettiert. Es wurde für drei Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert, nochmal 20 µl Puffer EB zugegeben und für drei Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert.

Die so erhaltene DNA wurde anfangs bei -20 °C aufbewahrt. Da sich aber vereinzelt Probleme mit den Proben sowie der Kontroll-DNA zeigten, die nach einer längeren Lagerung auftraten, wurden die Lösungen später bei -80 °C tiefgekühlt. Diese Probleme werden kurz in Abschnitt 4.3.2 beschrieben.

5.4 Durchführung der PCR-Versuche

5.4.1 Vermeidung von Kontaminationen

Besonders beim Arbeiten mit menschlicher DNA kann es durch Nachlässigkeit zu Kontaminationen kommen, die später nicht mehr nachgewiesen werden und das Ergebnis verfälschen können. Wird die PCR allerdings durch nicht Bisulfit-konvertierte DNA verunreinigt, kommt es entweder gar nicht zur Amplifikation, oder die Fremd-DNA kann durch ihr abweichendes Schmelzverhalten erkannt werden. Trotzdem ist es wichtig, sorgfältig zu arbeiten, um optimale Ergebnisse erzielen zu können.

Grundsätzlich wurde immer mit Handschuhen gearbeitet. Die Arbeitsfläche für das Pipettieren der PCR wurde vor dem Beginn der Arbeit mit so genanntem DNA Exitus besprüht, einer Dekontaminationslösung zur Entfernung von DNA und RNA. Nach einer Einwirkungszeit von 15 Minuten wurde trockengewischt und es konnten die benötigten Materialien bereitgestellt werden. Es wurden für die PCR und die DNA-Isolierung sowie die Bisulfit-Konvertierung getrennte Arbeitsbereiche, als auch andere Pipetten verwendet. Die Pipetten wurden mit 70 % (v/v) Ethanol gereinigt und ausschließlich sterile Filterspitzen verwendet. Die Hände bzw. Handschuhe wurden zu Beginn und auch während der Arbeit regelmäßig mit 70 % Ethanol besprüht und auch die Racks damit abgewischt.

5.4.2 Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse

Für die HRM-Versuche wurden die Methoden für die einzelnen Gene selbst entwickelt. Dafür wurden Primer entworfen und anschließend die Methode optimiert. Das Vorgehen dazu wird im Ergebnis-Teil beschreiben. Die Primer wurden von Sigma-Aldrich [128] synthetisiert und nach den Angaben des Herstellers mit Wasser auf eine Konzentration von 100 µM verdünnt.

Experimentelles

Die Primer wurden aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Ein Teil wurde auf eine Konzentration von $10\text{ }\mu\text{M}$ gebracht, welche die benötigte Konzentration für die PCR darstellt.

Als sogenannter Supermix wurde der EpiTect HRM PCR Mix von Qiagen verwendet, welcher die DNA-Polymerase, den interkalierenden Farbstoff, die dNTPs und einen für die Schmelzkurvenanalyse geeigneten Puffer enthält. Die verwendete HotStarTaq Plus DNA Polymerase wird erst durch einen fünf minütigen Inkubationsschritt bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ aktiviert, sodass es beim Pipettieren zu keinen Reaktionen kommen kann. Bei dem Farbstoff handelt es sich um EvaGreen. [129] Zusätzlich wurde jedem Ansatz MgCl_2 zugesetzt, um die Effizienz der Amplifikation zu steigern. [90] Dazu wurde MgCl_2 mit Wasser versetzt, sodass eine 40 mM Lösung erhalten wurde.

In der praktischen Durchführung wurde jeweils zuerst der Mastermix, bestehend aus dem Primerpaar, der MgCl_2 -Lösung und Wasser vorbereitet. Die Primer wurden meist in einer Konzentration von 250 nM eingesetzt, sodass $0,5\text{ }\mu\text{l}$ der oben genannten Verdünnung ($10\text{ }\mu\text{M}$) in einem $20\text{ }\mu\text{l}$ Ansatz verwendet wurden. Der Anteil des MgCl_2 ist abhängig von der optimierten, benötigten Konzentration und das Wasser dient der Ergänzung auf das gewünschte Volumen. In die PCR Tubes wurde der Supermix vorgelegt, anschließend der Mastermix zugegeben und dann die DNA als Probe oder Standard pipettiert. Ein Schema für den Mastermix und einen HRM-Ansatz ist in Tabelle 18 dargestellt. Die Bisulfit-konvertierte DNA wurde dafür auf eine Konzentration von $5\text{ ng}/\mu\text{l}$ verdünnt, sodass in jedem Well 10 ng für die Amplifikation vorhanden waren. Für jede Probe und Standard wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, jede Analyse wurde normalerweise einmal wiederholt.

Tabelle 18: Allgemeine Zusammensetzung eines MS-HRM Ansatzes.

Mastermix	
Komponente	Volumen [μl]
Primer Forwards	0,5
Primer Reverse	0,5
MgCl_2	x
H_2O	$7-x$
Gesamtvolumen	8

PCR-Ansatz	
Komponente	Volumen [μl]
Supermix	10
Mastermix	8
DNA	2
Gesamtvolumen	20

5.4.2.1 Temperaturprogramm

Als erster Schritt der PCR müssen die DNA-Polymerase wie oben beschrieben aktiviert und die Doppelstränge der DNA getrennt werden. Dazu wird bei 95 °C inkubiert. Anschließend erfolgt die eigentliche PCR in 45-50 Zyklen, wobei die Annealing-Temperatur vom jeweiligen Primerpaar abhängt. Für die ersten Zyklen wurde ein Touchdown-Verfahren verwendet, welches das spezifische Binden der Primer verbessert. Es wird dabei im ersten Zyklus eine Temperatur im Annealing-Schritt verwendet, welche höher ist als die eigentlich für die Anlagerung benötigte. Da die Primer bei höheren Temperaturen nicht an nicht-komplementäre Sequenzen binden, wird so gesichert, dass nur das gewünschte Produkt amplifiziert wird. Mit jedem Zyklus wird die Temperatur abgesenkt, da die Konzentration an Templat zunimmt und so ein Anlagern der Primer an eine falsche Sequenz unwahrscheinlich wird. Es wurde in den Methoden dieser Arbeit ein Touchdown über sieben Zyklen verwendet, wobei 6 °C über der eigentlichen Annealing-Temperatur begonnen und sie in 1 °C Schritten gesenkt wurde. Nach dem Annealing-Schritten folgte die Elongation bei 72 °C. Am Ende eines jeden Zyklus wurde die Fluoreszenz bei 510 nm gemessen (Anregung bei 470 nm).

Zwischen der Amplifikation und dem Schmelzen wurde ein Schritt bei 95 °C eingebaut, welcher wiederum ein vollständiges Denaturieren der DNA gewährleistete. Darauf folgte der Temperaturgradient für die Schmelzkurvenanalyse. Es wird dafür von 70 °C auf 90 °C erwärmt, wobei bei der Optimierung auf den eigentlichen Schmelzbereich eingegrenzt werden kann. Zu beachten ist allerdings, dass ein gewisser Abstand zur Schmelztemperatur gewahrt wird, um die Normalisierung durchführen zu können. Die Temperatur wurde in 0,05 °C Schritten erhöht, wobei es eine Verweilzeit von zwei Sekunden gab. Das Beispiel eines Temperaturprogramms ist in Abbildung 109 zu finden. Ausgeführt wurde die PCR und das HRM im Thermocycler Rotor Gene Q.

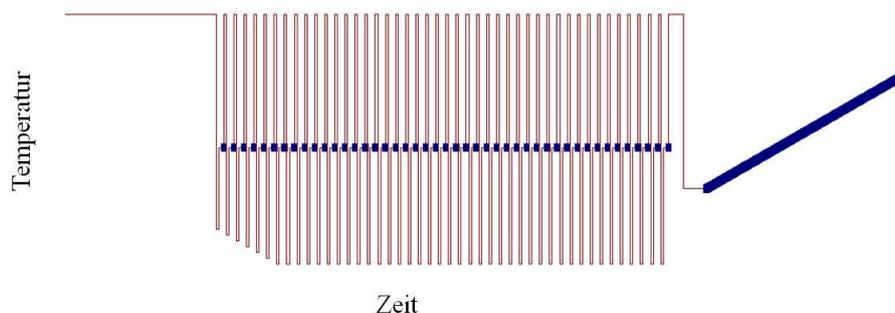


Abbildung 109: Beispiel für ein Temperaturprogramm eines MS-HRM.

5.4.2.2 HRM-Analyse der einzelnen Gene

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit die Gene CDKN2A, NTRK2, OSMR, GATA-4, APC und DAPK1 analysiert. Die Methoden für CDKN2A wurde selbst, jene für NTRK2 und GATA-4 von Barbara Druml und die für OSMR, APC und DAPK1 von Mag. Elisabeth Habla [111] entwickelt. Teilweise wurden einzelne Schritte im Laufe der Arbeit geringfügig geändert, bei DAPK1 war es nötig, die Annealing-Temperatur zu verändern. (Vergleiche 4.2.1) Im Folgenden werden die Zusammensetzung des Mastermixes und die verwendeten und eventuell angepassten Temperaturprogramme aufgelistet.

- CDKN2A

Tabelle 19: Zusammensetzung des Master Mix für CDKN2A.

Komponente	Volumen [µl]	Endkonzentration
Primer Forward	0,5 µl	250 nM
Primer Reverse	0,5 µl	250 nM
MgCl ₂	0,75 µl	1,5 mM
H ₂ O	6,25 µl	
Gesamtvolumen	8 µl	

Tabelle 20: Temperaturprogramm für CDKN2A.

	Schritt	Zeit	Temperatur
PCR in 45 Zyklen	Denaturierung	10 min	95 °C
	Denaturierung	10 sec	95 °C
	Annealing	10 sec	52 °C
	Elongation	20 sec	72 °C
HRM	Denaturierung	1 min	95 °C
	Schmelzen		67 °C – 85 °C
		2 sec halten	+ 0,05 °C pro Schritt

Experimentelles

- NTRK2

Tabelle 21: Zusammensetzung des Master Mix für NTRK2.

Komponente	Volumen [μ l]	Endkonzentration
Primer Forward	0,5 μ l	250 nM
Primer Reverse	0,5 μ l	250 nM
MgCl ₂	0,75 μ l	1,5 mM
H ₂ O	6,25 μ l	
Gesamtvolumen	8 μl	

Tabelle 22: Temperaturprogramm für NTRK2.

		Schritt	Zeit	Temperatur
		Denaturierung	10 min	95 °C
PCR in 46 Zyklen		Denaturierung	10 sec	95 °C
		Annealing	10 sec	54 °C
		Elongation	20 sec	72 °C
		Denaturierung	1 min	95 °C
HRM		Schmelzen		73 °C – 90 °C
			2 sec halten	+ 0,05 °C pro Schritt

- OSMR

Tabelle 23: Zusammensetzung des Master Mix für OSMR.

Komponente	Volumen [μ l]	Endkonzentration
Primer Forward	0,5 μ l	250 nM
Primer Reverse	0,5 μ l	250 nM
MgCl ₂	2 μ l	4 mM
H ₂ O	5 μ l	
Gesamtvolumen	8 μl	

Tabelle 24: Temperaturprogramm für OSMR.

	Schritt	Zeit	Temperatur
PCR in 45 Zyklen	Denaturierung	10 min	95 °C
	Denaturierung	10 sec	95 °C
	Annealing	10 sec	51 °C
	Elongation	20 sec	72 °C
	Denaturierung	1 min	95 °C
HRM	Schmelzen		68 °C – 85 °C
		2 sec halten	+ 0,05 °C pro Schritt

- GATA-4

Tabelle 25: Zusammensetzung des Master Mix für GATA-4.

Komponente	Volumen [µl]	Endkonzentration
Primer Forward	0,5 µl	250 nM
Primer Reverse	0,5 µl	250 nM
MgCl ₂	0,75 µl	1,5 mM
H ₂ O	6,25 µl	
Gesamtvolumen	8 µl	

Tabelle 26: Temperaturprogramm für GATA-4.

	Schritt	Zeit	Temperatur
PCR in 45 Zyklen	Denaturierung	10 min	95 °C
	Denaturierung	10 sec	95 °C
	Annealing	10 sec	55 °C
	Elongation	20 sec	72 °C
	Denaturierung	1 min	95 °C
HRM	Schmelzen		72 °C – 88 °C
		2 sec halten	+ 0,05 °C pro Schritt

Experimentelles

- APC

Tabelle 27: Zusammensetzung des Master Mix für APC.

Komponente	Volumen [μ l]	Endkonzentration
Primer Forward	1 μ l	500 nM
Primer Reverse	1 μ l	500 nM
MgCl ₂	1 μ l	2 mM
H ₂ O	5 μ l	
Gesamtvolumen	8 μl	

Tabelle 28: Temperaturprogramm für APC.

		Schritt	Zeit	Temperatur
PCR in 45 Zyklen		Denaturierung	10 min	95 °C
		Denaturierung	10 sec	95 °C
		Annealing	10 sec	53 °C
		Elongation	20 sec	72 °C
		Denaturierung	1 min	95 °C
HRM		Schmelzen		74 °C – 86 °C
			2 sec halten	+ 0,05 °C pro Schritt

- DAPK1

Tabelle 29: Zusammensetzung des Master Mix für DAPK1.

Komponente	Volumen [μ l]	Endkonzentration
Primer Forward	0,5 μ l	250 nM
Primer Reverse	0,5 μ l	250 nM
MgCl ₂	1,5 μ l	3 mM
H ₂ O	5,5 μ l	
Gesamtvolumen	8 μl	

Tabelle 30: Temperaturprogramm für DAPKI.

	Schritt	Zeit	Temperatur
PCR in 44 Zyklen	Denaturierung	10 min	95 °C
	Denaturierung	10 sec	95 °C
	Annealing	10 sec	55 °C
	Elongation	20 sec	72 °C
	Denaturierung	1 min	95 °C
HRM	Schmelzen		70 °C – 88 °C
		2 sec halten	+ 0,05 °C pro Schritt

5.4.2.3 Kalibration

Da bei der HRM-Analyse eine Kalibration nötig ist, wurde in jedem Lauf (jeder PCR mit anschließendem HRM) eine Standardreihe mitgeführt. Dafür wurde die Kontroll-DNA Bisulfit-konvertiert und verdünnt. Es wurde vollständig methylierte mit unmethylierter DNA gemischt, um Standards mit unterschiedlichem Methylierungsgrad zu erhalten. Es wurde in jedem Fall eine 100 %, 50 % und 0 % methylierte Kontrolle verwendet, um einen eventuellen Bias identifizieren zu können.

5.4.2.4 Auswertung einer HRM Analyse

Die Auswertung erfolgte über die Software des Thermocyclers, die Rotor Gene Q Software. Als erstes wurde die Amplifikation auf Besonderheiten hin überprüft. Anschließend wurde in der Darstellung $-dF/dT$ gegen die Temperatur der Bias bestimmt. Durch gleiche Höhe des Peaks bei der Schmelztemperatur für methylierte DNA und jenes der unmethylierten DNA beim 50 % methyliert Standard wurde ein Bias ausgeschlossen.

Die eigentliche Analyse wurde mit den Schmelzkurven wiederum mit der Rotor Gene Q Software gemacht (Darstellung der Fluoreszenzintensität gegen die Temperatur). Den ersten Schritt bildete die Normalisierung. Es wurde ein Bereich vor und nach dem Schmelzen der DNA gewählt, in dem die Kurven parallel zueinander verlaufen. Als Ergebnis wurden Kurven erhalten, die alle durch einen Punkt verlaufen. Durch die anschließende Erstellung der Differenzialkurven durch Auftragung gegen den 0 % methylierten Standard konnten die relativen Peakhöhen ermittelt werden. Aus den Werten für die Standards wurde mit dem

Programm Sigma Plot die Kalibriergerade erstellt, wobei logarithmisch aufgetragen wurde. Die DNA-Methylierung in % wurde für jedes Replikat einzeln bestimmt, durch die Wiederholung des Versuchs wurden so vier Ergebnisse pro Probe erhalten. Die Werte wurden anschließend einem Ausreißertest nach Nalimov unterzogen. Dazu wurden eine Prüfgröße PG für den größten und den kleinsten Wert berechnet und diese mit dem Tabellenwert für einen Ausreißer verglichen, siehe [130]

$$PG = \frac{|x_G - \bar{x}|}{s_x} \times \sqrt{\frac{N}{N-1}} \qquad PG = \frac{|\bar{x} - x_K|}{s_x} \times \sqrt{\frac{N}{N-1}}$$

x_G ausreißerverdächtiger Wert (größter Wert)

x_K ausreißerverdächtiger Wert (kleinster Wert)

\bar{x} Mittelwert

s_x Standardabweichung

N Anzahl der Stichproben

Formel 5: Ausreißertest nach Nalimov. [130]

5.4.3 MethyLight

MethyLight als Methode zur Validierung der hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse wurde nur für das Gen CDKN2A durchgeführt. Es wurde dafür ein kommerzieller Supermix, der EpiTect MethyLight PRC Kit verwendet, welcher speziell für MethyLight Anwendungen ausgelegt ist. Das Primer- und Sondenpaar wurden vom selben Hersteller speziell für den Supermix entwickelt, sodass eine bereits optimierte Methode erworben wurde. Dabei handelte es sich um den EpiTect MethyLight Assay: Hs_CDKN2A von Qiagen. Er enthält ein methylierungs-unspezifisches Primerpaar und zwei Sonden zur Unterscheidung des Methylierungsstatus. Die Sonde mit der Sequenz für methyliertes Templat ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM, jene für unmethyliertes Templat mit VIC gelabelt. Es wird ein Teil der Promotorregion mit 130 bp Länge amplifiziert, wobei die Sonden zwei CpG-Dinukleotide enthalten. Der Supermix enthält einen geeigneten Puffer, eine HotStarTaq Plus DNA-Polymerase und die dNTPs. [99] [131]

Die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes wird in Tabelle 31 dargestellt. Das zugehörige Temperaturprogramm wurde nach den Angaben des Herstellers angewandt. Nach dem

Experimentelles

anfänglichen Aktivierungs- und Denaturierungsschritt wurde die PCR in 45 Zyklen durchgeführt. Es handelte sich dabei um sogenannte Zwei-Schritt-Zyklen (engl.: two-step cycling), die einen kombinierten Annealing/Elongations-Schritt enthielten (Tabelle 32). Die Fluoreszenz wurde jeweils am Ende eines jeden Zyklus gemessen. Für FAM wurde bei 470 nm angeregt und bei 510 nm detektiert, also im grünen Bereich (engl.: green channel). Für VIC war eine Anregung bei 530 nm mit Detektion bei 555 nm im gelben Bereich nötig. Für die Durchführung der PCR wurde der Rotor Gene Q Thermocycler verwendet.

Tabelle 31: Allgemeine Zusammensetzung eines MethyLight Ansatzes.

Komponente	Volumen [μ l]
2x Master Mix	10 μ l
Primer Probe Mix	2 μ l
H ₂ O	6 μ l
DNA	2 μ l
Gesamtvolumen	20 μl

Tabelle 32: Temperaturprogramm für MethyLight.

Schritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	95 °C	15 sec
Hybridisierung+ Elongation	60 °C	60 sec

} 45 Zyklen

Da es sich um eine absolute Methode handelt, ist eine Kalibration nicht nötig. Trotzdem wurden Versuche zur Richtigkeit der Ergebnisse gemacht, für die Standards verwendet wurden. Als Kontroll-DNA wurden sowohl selbst Bisulfit-konvertierte DNA als auch kommerzielle, vom Hersteller Bisulfit-konvertierte DNA eingesetzt. Die Proben und die Kontroll-DNA wurden auf 5 ng/ μ l verdünnt, sodass 10 ng pro PRC-Tube eingesetzt wurden. Es wurden immer Doppelbestimmungen gemacht und zusätzlich zwei Negativkontrollen (engl.: no template control, NTC) mitgeführt.

Die Auswertung erfolgte wie oben (3.3) beschrieben über den C_T-Wert. Es wurde dazu die Rotor Gene Q Software verwendet, welche anhand der NTC einen automatischen Cycle-Threshold bestimmt. Dieser konnte nach Belieben manuell verändert werden. Es wurden

somit für jeden Ansatz zwei C_T -Werte erhalten, einen für das Fluoreszenzsignal von FAM und einen für VIC. Das Ergebnis in % methyliert wird durch Einsetzen in Formel 1 erhalten.

5.5 Chemikalien

5-Aza-2'-Desoxycytidin	Sigma
Bisphenol A	Aldrich
CpGenome™ Universal Methylated DNA, 100 % methyliert	Millipore
Daidzein	Indofine
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich
DNA-Exitus Plus IF	GenX®press
EpiTect Control DNA, 100% methyliert, bisulfitkonvertiert	Qiagen
EpiTect Control DNA, unmethyliert	Qiagen
EpiTect Control DNA, unmethyliert, bisulfitkonvertiert	Qiagen
EpiTect HRM PCR Kit	Qiagen
EpiTect MethyLight Assay: Hs_CDKN2A	Qiagen
EpiTect MethyLight PCR+ROX Vial Kit	Qiagen
Ethanol	VWR
Genistein	Sigma
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck
Primer	Sigma
Quercetin	Sigma
Wasser ultrafiltriert und autoklaviert	Sigma

5.6 Verwendete Kits

EpiTect Bisulfite Kit	Qiagen
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen

5.7 Zellkulturbedarf

Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Gibco-Invitrogen
Fetales Kälberserum	Gibco-Invitrogen
Penicillin/Streptomycin	Gibco-Invitrogen
RPMI 1640	Gibco-Invitrogen
Trypanblau-Lösung	Sigma
Trypsin	Serva

5.8 Geräte

Absaugpumpe	Vacusaft comfort	IBS Integra Biosciences
Analysenwaage	TE2144S	Sartorius
Brutschrank	Heracell 240i	Thermo Scientific
Bunsenbrenner	Fuego basic	WLD-Tec
Mikroskop	Axiovert 40C	Zeiss
Neubauer-Zählkammer	Neubauer improved	Optik Labor
Pipetten		Eppendorf, Biorad
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschman Laborgeräte
Real-Time PCR Gerät	Rotor Gene Q	Qiagen
Spektralphotometer	Nano Drop 2000C	PeqLab
Sterilbank	Herasafe KS	Thermo Scientific
Trockenschrank	Memmert Modell 500	Memmert
Vortex	VV3	VWR
	VF2	Janke & Kunkel
Wasserbad	GD 100	Grant
Zentrifugen	Centrifuge 5424	Eppendorf
	4K10	Sigma

6 Zusammenfassung

Die DNA-Methylierung ist ein wichtiger epigenetischer Faktor für die Kanzerogenese. Im Rahmen dieser Masterarbeit sollte der Methylierungsstatus in HT29 und MCF7 Zellen mittels methylierungssensitiver hochauflösender Schmelzkurvenanalyse (MS-HRM) analysiert werden. Es wurden dafür spezielle Primerpaare entworfen, die eine Amplifikation eines Bereichs der Promotorregion von Tumorsuppressorgenen ermöglichen. Dafür wurden die Gene CDKN2A (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), HIC1 (Hypermethylated in cancer 1) und RASSF1 (Ras association domain-containing protein 1) ausgewählt. Nur für CDKN2A konnten geeignete Primer gefunden und die MS-HRM Methode optimiert werden.

Die MS-HRM Methode sollte im Rahmen dieser Arbeit validiert werden, wozu die quantitative MethyLight Methode ausgewählt wurde. Diese wurde kommerziell erworben und in einem ersten Schritt mittels Kontroll-Standards überprüft. Die Amplifikation der Real-Time PCR zeigte eine schlechte Effizienz und daraus ergaben sich stark abweichende Werte vom tatsächlichen Methylierungsgrad. Die Genauigkeit der Methode war damit unzureichend für eine Überprüfung der mit der MS-HRM Analyse erhaltenen Ergebnisse. Trotzdem wurden einige Proben aus Inkubationsversuchen mit Zellen analysiert und mit den Werten aus der MS-HRM verglichen. Während bei einem niedrigen Methylierungsgrad höhere Ergebnisse mit der MS-HRM Methode erzielt wurden, war es bei einem höheren Methylierungsgrad umgekehrt.

Der Methylierungsgrad der Promotorregionen der einzelnen Gene wurde *in vitro* in HT29 und MCF7 Zellen untersucht. Es wurden zusätzlich Inkubationsversuche mit verschiedensten lebensmittelrelevanten Substanzen durchgeführt, um eine etwaige Veränderung des DNA-Methylierungsgrads durch diese Stoffe zu untersuchen. Zusätzlich wurde die DNA aus Zellen von früher in der Arbeitsgruppe durchgeführten Inkubationsversuchen analysiert. Bei den Substanzen handelte es sich um Lebensmittel-Inhaltsstoffe wie Lignane ((+)-Lariciresinol und (-)-Matairesinol), Isoflavone (Genistein und Daidzein), Flavonole (Quercetin) oder bei der Zubereitung von Fleischwaren entstehende heterocyclische aromatische Amine (MeIQx und PhIP). Zusätzlich wurde die Wirkung von Kontaminanten wie Bisphenol A (BPA) und Mykotoxinen (Desoxynivalenol und Zearalenon) untersucht. Es wurde außerdem der demethylierende Arzneistoff 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-dC) als Positivkontrolle verwendet. Für jede Substanz wurde die Wirkung konzentrationsabhängig bestimmt.

Zusammenfassung

Untersucht wurde der Promotor einer Reihe von Genen, die Methoden dazu wurden von B. Druml und E. Habla entwickelt, abgesehen von jener für CDKN2A. Bei den zusätzlichen Tumorsuppressorgenen handelte es sich um APC, DAPK1, GATA-4, NTRK2 und OSMR. Die Promotorregionen von APC und DAPK1 waren in HT29 Zellen nicht methyliert, jene von OSMR lag in MCF7 Zellen unmethyliert vor. Da von den verwendeten Substanzen keine methylierende Wirkung erwartet wurde, wurde der Einfluss auf nicht methylierte Promotorregionen von Genen nicht untersucht. Für die Versuche mit der HT29 Zelllinie konnten keine Effekte beobachtet werden. Einzig 5-Aza-dC zeigte die erwartete Wirkung, mit einem konzentrationsabhängigen Effekt, der bei 1 μM am stärksten war und mit zunehmender Konzentration abnahm.

Die MCF7 Zellen wurden mit Genistein, Quercetin, Daidzein, BPA und 5-Aza-dC inkubiert. Allerdings wurden zum Screening nur wenige Versuche durchgeführt. Unter den verwendeten Substanzen waren auch einige endokrin wirksame, von denen eine Wirkung auf die MCF7 Zellen erwartet wurde. Tatsächlich konnte nur eine Inhibition des Wachstums durch Genistein, Quercetin und BPA beobachtet werden, eine Veränderung des Methylierungsstatus des Promotors kann für CDKN2A als Folge der Behandlung mit Genistein vermutet werden. Zusätzlich wurde auch hier bei der Inkubation mit 5-Aza-dC der stärkste demethylierende Effekt bei einer Konzentration von 1 μM erhalten.

Aus Zeitgründen wurden einige dieser Inkubationsversuche nur einmal durchgeführt. Für eine endgültige Aussage über eine signifikante Wirkung müssten noch weitere Inkubationsversuche gemacht werden. Die Zellen wurden jeweils für 96 Stunden mit der jeweiligen Substanz inkubiert, was für manche bioaktive Stoffe zu kurz sein könnte. Daher wäre es außerdem sinnvoll, einen etwaigen Einfluss bei längeren Inkubationsdauern zu untersuchen.

7 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

5-Aza-dC	5-Aza-2'-Desoxycytidin
A (Ad)	Adenin
APC	Adenomatous polyposis coli
B	Base
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
bp	Basenpaare
BPA	Bisphenol A
C	Cytosin
CDK	Zyclin-abhängige Kinase
CDKN2A	Zyclin-abhängige Kinase Inhibitor 2A
CpG	Cytosin – Phosphat – Guanin – Dinukleotid
CT	Cycle Treshold, Schwellenwertzyklus
Cys	Cystein
DAPK1	Death-associated protein kinase 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNMT	DNA-Methyltransferase
DON	Desoxynivalenol
EGCG	(-)-Epigallocatechin-3-Gallat
Enz	Enzym
ER	Östrogenrezeptor
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FKS	Fetales Kälberserum
G	Guanin
Glu	Glutaminsäure
HIC1	Hypermethylated in cancer 1
HPCE	High-performance capillary electrophoresis

Anhang

HPLC	High-performance liquid chromatography
HRM	Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse
MeCP2	Methyl CpG binding protein 2
MeIQx	2-Amino-3,8-dimethylimidazo-[4,5-f]chinoxalin
MIP	Methylierungs-unspezifische PCR
MS-HRM	Methylierungssensitive hochauflösende Schmelzkurvenanalyse
MSP	Methylierungs-spezifische PCR
MW	Mittelwert
NTC	Negativkontrolle (engl.: no template control)
NTRK2	Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2
OSM	Oncostatin M
OSMR	Oncostatin M Rezeptor
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Pen	Penicillin
PhIP	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridine
RASSF1	Ras association domain-containing protein 1
s	Standardabweichung
SAM	S-Adenosyl-L-methionin
Strep	Streptomycin
T	Thymin
Tm	Schmelztemperatur
U	Uracil
ZON	Zearalenon

Rohdaten

Einzelwerte zu den Inkubationsversuchen mit **HT29** Zellen mit Mittelwert (MW) und Standardabweichung (s). Die mit * gekennzeichneten Werte sind Ausreißer (bestimmt mit dem Ausreißertest nach Nalimov).

- CDKN2A, 5-Aza-dC:

Probe	1. Inkubation						3. Inkubation				MW	s	
	Methylierung [%]												
PBS	94,6	98,9	96,9	100,5	101,3	101,5	105,84	106,36	98,04	100,69	100,45	3,67	
1 µM	38,8	42,4	34,5	35,8	46,1	46,8	37,78	46,48	35,23	37,49	40,14	4,89	
2,5 µM	56,5	64,6	58,6	63,2	61,9	67,5	66,73	72,48	52,33	58,84	62,26	5,92	
5 µM	72,7	73,2	75,3	80,5	87,4	92,1	86,55	97,28	86,01	88,40	83,95	8,27	
10 µM	87,5	91,0	89,5	94,8	102,5	107,1	95,82	102,68	84,00	84,57	93,94	8,05	

Probe	2. Inkubation						MW	s	
	Methylierung [%]								
PBS	83,3	86,7	84,9	84,5	86,3	88,4	85,7	1,8	
1 µM	36,4	38,1	34,4	34,8	40,4	41,3	37,6	2,9	
2,5 µM	49,8	53,1	49,3	52,6	57,0	64,9*	52,3	3,1	
5 µM	58,7	67,7	70,5	71,9	70,8	80,8	70,1	7,1	
10 µM	69,9	78,1	78,2	87,6	84,1	73,7	78,6	6,5	

- CDKN2A, Lariciresinol, Matairesinol, MeIQx, PhIP, DON und ZON:

Lariciresinol					MW	s	
	Methylierung [%]						
DMSO	97,7	98,3	95,1	94,2	96,3	2,00	
10 µM	87,5	88,7	77,3*	85,7	87,3	1,48	
50 µM	97,7	100,1	92,3	95,5	96,4	3,32	
100 µM	99,4	101,5	95,1	95,3	97,8	3,15	

Matairesinol					MW	s	
	Methylierung [%]						
DMSO	95,1	94,2	97,7	98,3	96,3	2,00	
10 µM	93,6	95,5	98,4	98,7	96,6	2,46	
50 µM	92,3	94,7	95,9	99,3	95,5	2,93	
100 µM	95,7	95,7	100,5	102,4	98,6	3,38	

Anhang

MeIQx					MW	s	
	Methylierung [%]						
DMSO	98,5	99,7	101,1	99,5	99,7	1,09	
10 µM	98,9	100,0	102,3	99,8	100,2	1,44	
50 µM	99,0	103,9	103,2	101,8	102,0	2,18	
100 µM	95,8	103,1	98,6	100,4	99,5	3,05	

PhIP					MW	s	
	Methylierung [%]						
DMSO	98,5	99,7	101,1	99,5	99,7	1,09	
10 µM	98,6	101,5	100,1	100,1	100,1	1,22	
50 µM	98,1	100,0	103,5	105,4	101,8	3,28	

Desoxynivalenol					MW	s	
	Methylierung [%]						
DMSO	99,9	101,7	97,6	98,5	99,4	1,79	
10 µM	100,7	104,1	100,9	101,9	101,9	1,52	
50 µM	97,5	101,7	99,5	105,0	100,9	3,22	
100 µM	101,2	102,2	103,1	105,7	103,0	1,92	

Zearalenon					MW	s	
	Methylierung [%]						
DMSO	97,6	98,5	99,9	101,7	99,4	1,79	
10 µM	94,4	97,8	95,1	100,6	97,0	2,82	
50 µM	96,2*	102,9	100,8	102,4	102,0	1,10	
100 µM	100,4	101,5	98,3	101,3	100,4	1,49	

- NTRK2, Lariciresinol, Matairesinol, MeIQx, PhIP, DON und ZON:

Lariciresinol					MW	s	
	Methylierung [%]						
DMSO	74,5	77,1	73,9	76,8	75,6	1,60	
10 µM	70,1	72,2	70,0	71,0	70,8	1,06	
50 µM	73,1	73,4	74,3	75,9	74,2	1,27	
100 µM	74,2	75,7	72,8	74,8	74,4	1,22	

Matairesinol					MW	s	
	Methylierung [%]						
DMSO	74,5	77,1	73,9	76,8	75,6	1,60	
10 µM	78,0	78,7	72,2	72,6	75,4	3,47	
50 µM	75,0	79,8	71,0	71,9	74,4	3,97	
100 µM	63,5*	77,6	74,2	74,3	75,4	1,97	

MeIQx					MW	s	
	Methylierung [%]						
DMSO	73,0	77,7	70,4	73,1	73,5	3,01	
10 µM	66,5	73,1	70,3	72,6	70,6	2,99	
50 µM	69,2	72,8	70,6	71,7	71,1	1,54	
100 µM	73,0	73,4	71,5	70,3	72,0	1,41	

PhIP					MW	s	
	Methylierung [%]						
DMSO	73,0	77,7	70,4	73,1	73,5	3,01	
10 µM	66,3	72,6*	65,2	67,3	66,2	1,05	
50 µM	73,5	74,0	72,6	70,4	72,6	1,57	

Desoxynivalenol					MW	s	
	Methylierung [%]						
DMSO	66,3	68,3	70,2	74,3	69,8	3,43	
10 µM	70,3	72,6	73,9	75,1	73,0	2,06	
50 µM	69,3	73,1	70,7	74,0	71,8	2,15	
100 µM	67,4	70,8	68,9	70,1	69,3	1,49	

Zearalenon					MW	s	
	Methylierung [%]						
DMSO	66,3	71,9	70,2	74,3	70,7	3,38	
10 µM	70,3	72,6	70,2	73,7	71,7	1,75	
50 µM	66,9	71,6	72,4	72,8	70,9	2,71	
100 µM	71,4	67,9	68,4	76,7	71,1	4,05	

Anhang

- CDKN2A, BPA:

Probe	1. Inkubation			2. Inkubation			3. Inkubation			MW	s			
	Methylierung [%]													
DMSO	92,08	96,36	93,07	94,08	98,03	102,64	96,99	101,91	104,20	105,30	93,87	95,46	97,83	4,57
1 µM	98,22	99,05	98,17	94,08	97,06	103,82	98,29	98,02	104,20	103,97	94,86	95,66	98,78	3,48
5 µM	84,58	86,13	100,63	94,69	104,61	107,34	101,37	102,42	107,07	108,41	92,48	96,66	98,87	8,06
10 µM	86,54*	94,12	94,06	95,32	103,88	105,61	101,43	101,45	102,59	104,12	94,07	96,06	99,34	4,60
50 µM	87,32	88,13	102,73	104,67	99,70	108,40	100,89	104,02	105,66	106,09	94,71	96,49	99,90	6,93
100 µM	82,82	87,52	102,73	104,02	103,14	106,15	86,15	101,93	104,56	105,20	87,20	90,33	96,81	9,05

- CDKN2A, Daidzein:

Probe	1. Inkubation		2. Inkubation			MW	s	
	Methylierung [%]							
DMSO	91,65	94,13	106,48	105,02	94,91	96,51	98,12	6,13
1 µM	92,79	95,27	106,27	105,73	95,91	96,31	98,72	5,78
5 µM	95,65	92,64	103,43	105,22	92,31	96,06	97,55	5,49
10 µM	92,64	96,22	105,20	105,20	93,87	94,62	97,96	5,73
50 µM	82,64	90,21	106,97	106,97	95,06	95,66	96,25	9,52
100 µM	95,47	98,35	105,86	107,64	94,86	96,86	99,84	5,51

- CDKN2A, Genistein:

Probe	1. Inkubation			2. Inkubation			MW	s		
	Methylierung [%]									
DMSO	96,73	101,93	93,60	95,84	97,66	99,41	103,87	105,09	99,27	4,06
1 µM	100,28	102,41	95,34	99,35	95,69	99,14	113,7*	106,68	99,84	3,91
5 µM	103,62	101,71	97,84	98,60	96,98	97,43	103,25	104,88	100,54	3,17
10 µM	101,18	102,64	96,84	100,87	98,16	100,71	102,55	106,29	101,15	2,89
50 µM	106,40	108,15	98,34	100,87	99,89	105,44	106,00	107,12	104,03	3,73
100 µM	101,40	101,91	98,32	98,82	101,06	103,19	110,14	110,37	103,15	4,66

Anhang

- NTRK2, Genistein:

Probe	1. Inkubation				2. Inkubation				MW	s
	Methylierung [%]									
DMSO	72,14	75,32	71,84	74,36	78,93	83,01*	76,65	78,49	75,39	2,83
1 µM	72,51	74,09	78,23	71,90	78,19	82,65*	73,43	74,86	74,75	2,56
5 µM	77,81	74,62	69,34	73,19	81,70	81,70	77,24	77,54	76,64	4,19
10 µM	75,32	74,26	72,01	78,74	77,27	80,66	76,35	79,64	76,78	2,90
50 µM	76,75	76,56	75,66	77,39	77,83	78,95	79,87	81,63*	77,57	1,45
100 µM	74,26	77,09	74,19	75,37	79,15*	81,61*	73,09	74,68	74,78	1,36

- OSMR, Genistein:

Probe	1. Inkubation				2. Inkubation				MW	s
	Methylierung [%]									
DMSO	78,07	103,88	87,33	92,55	71,34	88,17	52,60	53,39	78,42	18,38
1 µM	97,76	104,27	98,73	82,02	61,06	64,37	46,54	54,08	76,10	22,47
5 µM	100,95	104,11	91,44	97,95	67,97	70,44	65,46	67,41	83,22	16,89
10 µM	89,84	96,71*	90,76	92,55	68,32	68,81	68,25	68,73	78,18	12,07
50 µM	85,27	89,84	97,05	101,63	59,91	75,74	68,79	70,61	81,10	14,68
100 µM	67,96*	87,18	94,35	91,44	85,69	92,47	84,93	90,04	89,44	3,59

- GATA-4, Genistein:

Probe	1. Inkubation				2. Inkubation				MW	s
	Methylierung [%]									
DMSO	75,56	79,44	78,71	82,65	78,73	84,73	80,81	84,62	80,66	3,19
1 µM	66,74*	73,77	75,94	87,61	81,67	85,30	85,93	88,60	82,69	5,81
5 µM	64,79	66,14	78,35	79,97	73,93	81,07	80,39	77,52	75,27	6,45
10 µM	96,68*	81,76	75,53	76,30	80,77	84,20	79,45	86,23	80,60	3,90
50 µM	75,44	84,59	71,05	81,94	72,48	71,72	67,00	72,92	74,64	5,86
100 µM	85,52	83,36	70,41	74,77	74,58	59,70*	71,48	73,00	76,16	5,90

Anhang

- CDKN2A, Quercetin:

Probe	3. Inkubation				4. Inkubation				MW	s
	Methylierung [%]									
DMSO	91,04*	101,51	102,17	103,32	102,69	104,39	99,96	107,43	103,07	2,38
1 µM	95,54	106,10	101,91	108,61	96,96	98,59	101,12	101,57	101,30	4,41
2,5 µM	100,35	101,94	98,73	106,56*	100,02	101,10	101,54	104,8*	100,61	1,17
5 µM	103,23	107,35	108,51	108,82	103,33	104,96	103,87	106,40	105,81	2,28
10 µM	99,77	103,44	107,08	107,29	101,01	101,28	100,73	103,15	102,97	2,87
20 µM	104,02	105,16	104,01	108,92	85,86*	100,43	95,55*	104,38	104,49	2,72

- NTRK2, Quercetin:

Probe	3. Inkubation				4. Inkubation				MW	s
	Methylierung [%]									
DMSO	71,09*	74,41	76,36	78,53	76,10	78,03	74,45	78,89	76,68	1,86
1 µM	76,74	76,10	74,78	75,95	74,01	75,14	68,20	74,95	74,48	2,68
2,5 µM	71,00	74,59	70,45	80,43	77,89	78,73	74,67	75,21	75,37	3,54
5 µM	65,36	67,26	69,86	74,47	74,23	78,14	76,43	77,40	72,89	4,81
10 µM	73,04	73,79	75,62	77,21	70,56	78,09	71,52	75,10	74,37	2,64
20 µM	75,98	76,16	73,39	77,31	71,80	73,06	69,53	77,83	74,38	2,91

- OSMR, Quercetin:

Probe	3. Inkubation				MW	s
	Methylierung [%]					
DMSO	95,57	99,57	82,88	83,37	90,35	8,50
1 µM	98,46	102,80	83,68	75,03	89,99	12,91
2,5 µM	96,17	101,68	82,40	82,58	90,71	9,75
5 µM	92,27	95,69	81,67	84,10	88,43	6,63
10 µM	97,27	99,87	80,53	82,95	90,16	9,83
20 µM	94,45	96,20	79,90	83,07	88,40	8,12

Anhang

Einzelwerte zu den Inkubationsversuchen mit **MCF7** Zellen mit Mittelwert (MW) und Standardabweichung (s). Die mit * gekennzeichneten Werte sind Ausreißer (bestimmt mit dem Ausreißertest nach Nalimov).

- CDKN2A, 5-Aza-dC:

Probe	1. Inkubation				2. Inkubation				MW	s
	Methylierung [%]									
PBS	70,55	70,62	67,93	73,60	79,99	61,44	80,22	79,66	73,00	6,73
1 µM	35,17	36,32	38,17	39,91	44,67	31,73	28,89	34,01	36,11	4,91
2,5 µM	40,78	48,57	39,02	51,43	60,47	52,64	42,94	55,18	48,88	7,49
5 µM	64,81	59,29	55,47	59,59	71,33	57,65	29,22*	73,91	63,15	7,10
10 µM	58,08	67,11	73,17	87,81*	76,79	66,80	71,25	72,39	69,37	6,07

- NTRK2, 5-Aza-dC:

Probe	1. Inkubation				2. Inkubation				MW	s
	Methylierung [%]									
PBS	87,53	89,70	84,87	89,93	85,76	88,65	89,39	91,69	88,44	2,27
1 µM	26,00	27,04	14,76	15,86	25,54	26,39	23,99	25,47	23,13	4,92
2,5 µM	45,35	48,94	21,71	26,39	38,04	39,67	36,70	45,28	37,76	9,49
5 µM	59,20	50,51	26,50*	37,73*	52,83	61,39	59,75	68,11	58,63	6,30
10 µM	71,99*	78,90	42,63*	56,15*	80,03	81,26	76,86	77,50	78,91	1,80

- APC, 5-Aza-dC:

Probe	1. Inkubation				2. Inkubation				MW	s
	Methylierung [%]									
PBS	24,59	30,28*	21,93	25,13	20,54	20,68	23,42	25,38	23,10	2,06
1 µM	11,62	14,33	8,50	12,72	9,39	10,62	5,29	7,24	9,96	2,97
2,5 µM	13,58	14,46	14,63	15,96	9,39*	15,73	13,82	14,56	14,68	0,89
5 µM	24,38	26,87	26,24	26,38	14,86	16,75	17,81	25,07	22,29	4,95
10 µM	26,29	28,74	21,19	30,46	18,74	23,45	22,87	24,74	24,56	3,87

Anhang

- DAPK1, 5-Aza-dC:

Probe	1. Inkubation				2. Inkubation				MW	s
	Methylierung [%]									
PBS	84,87	89,93	83,24	85,07	77,56	80,79	72,37	76,11	81,24	5,68
1 µM	14,76	15,86	19,91	23,71*	10,77	13,99	9,08	14,96	14,19	3,52
2,5 µM	21,71	26,39*	14,89	18,33	19,28	19,69	15,58	19,17	18,38	2,39
5 µM	26,50	37,73	34,25	36,21	20,47	31,93	25,15	29,33	30,20	5,94
10 µM	42,63	56,15	43,46	44,98	50,17	68,25	56,12	62,69	53,06	9,39

- CDKN2A, Genistein:

Probe	1. Inkubation				2. Inkubation				MW	s
	Methylierung [%]									
DMSO	70,33	76,80	70,64	77,24	73,65	71,58	66,87	75,19	72,79	3,58
1 µM	71,85	72,96	60,64	70,39	64,58	63,85	76,64	64,11	68,13	5,58
5 µM	67,93	70,69	59,20*	67,97	n. i.	n. i.	n. i.	n. i.	68,86	1,58
10 µM	63,40	63,87	64,35	60,56	68,02	66,05	67,63	75,38*	64,84	2,61
50 µM	67,45	69,03	68,67	75,06	72,60	71,06	61,37*	73,97	71,12	2,88

n. i.: nicht inkubiert

- NTRK2, APC, Genistein:

NTRK2						MW	s	APC						MW	s		
	Methylierung [%]									Methylierung [%]							
DMSO	85,13	87,51	84,63	86,67	85,98	1,34	DMSO	29,95*	23,12	22,52	22,67	22,77	0,31				
1 µM	83,15	84,59	81,52	82,93	83,05	1,26	1 µM	22,14	23,22	21,36	21,62	22,09	0,82				
5 µM	81,59	82,93	79,94	81,44	81,48	1,22	5 µM	22,19	25,21	21,17	24,21	23,19	1,84				
10 µM	81,35	83,17	79,76	79,99	81,07	1,57	10 µM	22,85	23,00	20,06	22,28	22,05	1,36				
50 µM	88,20	89,66	84,26	84,33	86,61	2,74	50 µM	23,85	26,96	23,09	27,24	25,29	2,12				

- DAPK1, Genistein:

Probe	1. Inkubation				2. Inkubation				MW	s
	Methylierung [%]									
DMSO	62,73*	74,93	53,51*	86,56	85,06	81,73	78,02	92,43	83,12	6,28
1 µM	73,06	78,47	64,17*	77,42	82,01	93,23	83,86	85,23	81,90	6,50
5 µM	84,24	85,29	70,53*	89,97	n. i.	n. i.	n. i.	n. i.	86,50	3,05
10 µM	80,40	83,24	73,72	81,46	87,87	81,12	72,05	74,83	79,34	5,37
50 µM	79,22	82,20	82,30	100,16*	81,40	92,28	87,27	88,30	84,71	4,65

n. i.: nicht inkubiert

Anhang

- BPA:

CDKN2A					MW	s
Methylierung [%]						
DMSO	71,88	81,13	67,21	67,37	71,90	6,52
1 µM	63,70	72,83	67,02	68,83	68,10	3,81
5 µM	66,39	72,65	65,74	74,30	69,77	4,34
10 µM	66,75	67,35	62,02*	68,64	67,58	0,97
50 µM	62,10	69,77	61,94	67,94	65,43	4,02

NTRK2					MW	s
Methylierung [%]						
DMSO	87,38	92,71	82,73	88,37	87,80	4,10
1 µM	84,51	88,39*	83,41	84,06	83,99	0,56
5 µM	98,35	84,29	80,78	82,09	86,38	8,11
10 µM	87,26	91,94	78,66	81,54	84,85	5,93
50 µM	87,26	85,05	80,58	82,31	83,80	2,95

APC					MW	s
Methylierung [%]						
DMSO	19,25	23,77	23,37	26,63	23,26	3,04
1 µM	20,98	21,61	23,34	23,83	22,44	1,36
5 µM	23,17	26,79	29,73	27,51	26,80	2,73
10 µM	22,46	24,56	21,67	24,90	23,40	1,58
50 µM	34,85	28,96	20,76	23,87	27,11	6,17

DAPK1					MW	s
Methylierung [%]						
DMSO	80,68*	91,24	91,58	94,26	92,36	1,65
1 µM	76,40	78,42	69,92	80,85	76,40	4,69
5 µM	82,42	97,99	63,70	65,54	77,41	16,10
10 µM	71,88	80,24	65,81	79,66	74,40	6,88
50 µM	79,70	88,84	76,25	86,81	82,90	5,91

- Daidzein:

CDKN2A					MW	s
Methylierung [%]						
DMSO	63,91	66,73	65,08	69,64	66,34	2,48
1 µM	61,19	64,33	67,93	67,93	65,35	3,25
5 µM	69,65	70,05	80,24*	70,47	70,06	0,41
10 µM	66,17*	78,00	79,16	78,25	78,47	0,61
50 µM	64,55	80,77	74,25	70,62	72,55	6,79
100 µM	66,39	66,73	78,44	74,37	71,48	5,93

NTRK2					MW	s
Methylierung [%]						
DMSO	89,93	92,54	85,59	91,90	89,99	3,14
1 µM	91,23	94,69	86,41	87,18	89,88	3,85
5 µM	92,65	98,22*	91,26	92,09	92,00	0,70
10 µM	100,12	89,76	88,77	94,22	93,22	5,17
50 µM	93,71	96,83	85,33	89,47	91,34	5,01
100 µM	94,36	95,12	90,22	91,59	92,82	2,30

APC					MW	s
Methylierung [%]						
DMSO	26,22	25,15	22,61	18,88	23,21	3,26
1 µM	24,81*	19,83	18,08	19,25	19,05	0,89
5 µM	24,11	22,40	15,28	19,10	20,22	3,89
10 µM	22,11	21,87	20,35	20,84	21,29	0,83
50 µM	21,88	19,44	15,98	19,43	19,18	2,43
100 µM	22,82	20,78	17,51	20,69	20,45	2,19

DAPK1					MW	s
Methylierung [%]						
DMSO	76,59	67,56*	78,23	79,63	78,15	1,52
1 µM	75,12	72,82	82,23	82,35	78,13	4,89
5 µM	85,57	88,94	73,59*	91,13	88,55	2,80
10 µM	71,14	91,71	80,73	85,45	82,26	8,67
50 µM	80,89	79,65	86,48	90,93	84,49	5,22
100 µM	97,10	85,43	84,37	97,10	91,00	7,06

Anhang

- Quercetin:

CDKN2A					MW	s
Methylierung [%]						
DMSO	63,06	67,94	65,23	73,90	67,53	4,69
1 µM	62,64	64,38	69,55	66,60	65,79	2,98
5 µM	52,92*	65,02	68,87	66,91	66,93	1,93
10 µM	62,37	63,99	67,27	66,82	65,11	2,33

NTRK2					MW	s
Methylierung [%]						
DMSO	93,04	94,22	80,88	85,43	88,39	6,34
1 µM	91,96	93,13	86,84	88,00	89,98	3,03
5 µM	92,68	92,76	82,20*	92,24	92,56	0,28
10 µM	83,69	93,47*	84,95	87,07	85,24	1,71

APC					MW	s
Methylierung [%]						
DMSO	25,86	22,66	25,91	19,59	23,51	3,02
1 µM	23,08	24,06	18,51	19,71	21,34	2,65
5 µM	25,22	24,50	17,87	20,64	22,06	3,44
10 µM	20,42	20,25	20,52	17,87*	20,40	0,14

DAPK1					MW	s
Methylierung [%]						
DMSO	92,85	74,65	86,54	93,14	86,80	8,65
1 µM	66,33	75,78	87,64	79,38	77,28	8,83
5 µM	78,69	85,21	80,30	82,48	81,67	2,83
10 µM	69,75	82,51	75,59	79,26	76,77	5,47

Einzelwerte zu den **MethyLight** Analysen mit den 5-Aza-dC Proben (HT29).

Probe	1. Inkubation				MW	s
Methylierung [%]						
PBS	99,98	99,98	99,99	99,99	99,99	0,0
1 µM	15,11	7,24	12,18	7,82	10,59	3,7
2,5 µM	52,94	27,48	25,59	42,26	37,07	12,9
5 µM	46,02	93,26	91,29	75,58	76,54	21,8
10 µM	99,91	99,80	99,83	99,95	99,87	0,1

Probe	2. Inkubation				MW	s
Methylierung [%]						
PBS	99,99	99,99	100,00	100,00	99,99	0,0
1 µM	18,70	30,03	13,66	19,02	20,35	6,9
2,5 µM	41,59	65,89	31,66	47,75	46,72	14,4
5 µM	99,81	83,22	94,77	91,56	92,34	7,0
10 µM	95,74	99,87	99,94	99,93	98,87	2,1

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entstehung eines malignen Tumors aus einer mutierten Zelle. Modifiziert nach [6]	3
Abbildung 2: Cytosin und das in Position 5 des Pyrimidin Rings methylierte 5-Methyl-cytosin (modifiziert nach [11]).....	5
Abbildung 3: Ergänzung der DNA-Methylierung bei der Replikation (modifiziert nach [17]).	7
Abbildung 4: Mechanismus der enzymatischen Methylierung von Cytosin (Glu = Glutaminsäure; Cys = Cystein; Ad = Adenin; Enz = Enzym; B = Base). Bei dem Methyl-donor (rot) handelt es sich um SAM. Modifiziert nach [11]	9
Abbildung 5: Übersicht über den Zellzyklus mit den Kontrollpunkten der einzelnen Phasen. (modifiziert nach [30]).....	12
Abbildung 6: Struktur von Enterodiol und Enterolacton (nach [56])	19
Abbildung 7: Grundstruktur der Lignane (nach [61])	20
Abbildung 8: Struktur von (+)-Lariciresinol (nach [62])	20
Abbildung 9: Struktur von (-)-Matairesinol (nach [62])	21
Abbildung 10: Struktur von Genistein (nach [56])	22
Abbildung 11: Struktur von Daidzein (nach [56])	22
Abbildung 12: Struktur von Quercetin (nach [64])	23
Abbildung 13: Struktur von Bisphenol A (nach [67]).....	24
Abbildung 14: Schematischer Ablauf der Entstehung von heterocyclischen aromatischen Aminen (nach [59])	25
Abbildung 15: Struktur von MeIQx (nach [59])	25
Abbildung 16: Struktur von PhIP (nach [59]).....	26
Abbildung 17: Struktur von Desoxynivalenol (nach [55])	27
Abbildung 18: Struktur von Zearalenon (nach [55]).....	28
Abbildung 19: Struktur von 5-Aza-2'-Desoxycytidin (nach [75])	29
Abbildung 20: Schematischer Ablauf eines Zyklus der Polymerase Kettenreaktion. (Modifiziert nach [82])	32
Abbildung 21: Schema des Anstiegs der Menge an gebildetem Templat mit steigender Zyklenzahl. (Modifiziert nach [81])	35
Abbildung 22: Signalerzeugung in der Real-Time PCR mit TaqMan Sonden. In Schritt a lagert die Sonde an, b zeigt die Elongation. Die Polymerase baut die Sonde ab, es kommt zur räumlichen Entfernung des Quenchers und zum Fluoreszieren des Farbstoffs (c und d). [84]	38
Abbildung 23: Beispiel für eine Real-Time PCR mit Fluoreszenzmessung und Bestimmung des C _T -Wertes. (Modifiziert nach [81]).....	39
Abbildung 24: Mechanismus der Bisulfit-Konvertierung (nach [11]).....	40

Anhang

Abbildung 25: Änderung der Basenabfolge durch die Bisulfit-Konvertierung und Auswirkung auf die PCR.	40
Abbildung 26: Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleinbasen (nach [84]).....	42
Abbildung 27: Schmelzkurven verschiedener DNA Sequenzen (nach [91]).	43
Abbildung 28: Schmelzkurven von DNA Sequenzen verschiedenen Methylierungsgrads (nach [88]).	44
Abbildung 29: Beispiel für eine stark bevorzugte Amplifikation des methylierten Templates. Die normalisierten Schmelzkurven zeigen einen großen Unterschied zwischen 0,1 % und 1 % methylierter DNA und einen weitaus geringeren für 10 % und 100 %. [90]	46
Abbildung 30: Beispiel für den Schmelzpunkt unterschiedlich methylierter DNA Sequenzen. Modifiziert (nach [85])	47
Abbildung 31: Darstellung der Differenzialkurven verschiedener Standards (% methyliert) und der zugehörigen Kalibriergerade (nach [95]).	48
Abbildung 32: Ablauf der verwendeten MethyLight Methode. Schwarze Punkte auf dem Template zeigen methylierte, leere unmethylierte CpG-Dinukleotide an. (Modifiziert nach [99])	49
Abbildung 33: Vorschlag der Methyl Primer Express Software für mögliche Primerpaare. Die Pfeile geben die Primer, die vertikalen rosa Striche die CpG-Dinukleotide an.....	56
Abbildung 34: Mögliche Primerpaare für CDKN2A	58
Abbildung 35: Simulation der Sekundärstrukturen von Oligonukleotiden mit RNAfold. Primer Forward und Reverse entsprechen dem Versuchsprimerpaar 1. Zusätzlich ist ein Primer mit Wechselwirkung zwischen vier Basen dargestellt. [107].....	60
Abbildung 36: Simuliertes Schmelzverhalten des Amplikons für die Versuchsprimer 1 (nach [94])	61
Abbildung 37: Schmelzverhalten des Amplikons für das Versuchsprimerpaar 1.	61
Abbildung 38: Schmelzverhalten des Amplikons für das endgültige Primerpaar für CDKN2A nach POLAND. [94].....	63
Abbildung 39: Ergebnis des Vorversuchs mit dem Primerpaar für RASSF1.....	64
Abbildung 40: Normalisierte Schmelzkurven für RASSF1.	64
Abbildung 41: Normalisierte Schmelzkurven von RASSF1 nach Erhöhung der Temperatur.	65
Abbildung 42: Amplifikation von HIC1 bei einer Annealing-Temperatur von 54 °C.	66
Abbildung 43: Normalisierte Schmelzkurven für HIC1 nach Senkung der Annealing-Temperatur auf 50 °C.	66
Abbildung 44: Darstellung (-dF/dT) der Schmelzkurven für das Primerpaar 1 (Version 2) nach Inaktivierung eines CpG im forward Primer.	67
Abbildung 45: Erster Vorversuch zu CDKN2A bei 56 °C.....	68
Abbildung 46: Darstellung (-dF/dT) der Schmelzkurven für CDKN2A nach Absenken der Annealing-Temperatur auf 52 °C.....	69
Abbildung 47: Einfluss der MgCl ₂ -Konzentration auf die Amplifikation von CDKN2A.	70
Abbildung 48: Darstellung (-dF/dT) der Schmelzkurven von DAPK1 bei 57 °C.	70

Anhang

Abbildung 49: Darstellung (-dF/dT) der Schmelzkurven von DAPK1 bei einer Annealing-Temperatur von 55 °C.	71
Abbildung 50: Amplifikation von DAPK1 bei einer Annealing-Temperatur von 55 °C.....	71
Abbildung 51: Amplifikation von CDKN2A bei einer Annealing-Temperatur von 52 °C.	72
Abbildung 52: Doppelbestimmungen verschiedener Standards in Darstellung (-dF/dT).	72
Abbildung 53: Normalisierte Schmelzkurven zu Abbildung 52.	73
Abbildung 54: Kalibriergeraden der MS-HRM Methode für CDKN2A von drei verschiedenen Tagen.	74
Abbildung 55: Beispiel für nicht übereinstimmende methylierte Kontroll-DNA.	75
Abbildung 56: Erste Kalibration von MethyLight, grüner Kanal.	76
Abbildung 57: Erste Kalibration von MethyLight, gelber Kanal.....	76
Abbildung 58: Zweite Kalibration von MethyLight mit Verdünnungen der Kontroll-DNA, grüner Kanal.....	77
Abbildung 59: Zweite Kalibration von MethyLight, gelber Kanal.....	77
Abbildung 60: Kalibration für MethyLight mit neuer kommerzieller, bereits Bisulfit-konvertierter Standard-DNA, grüner Kanal (NTC = Negativkontrolle).	78
Abbildung 61: Kalibration für MethyLight mit neuer kommerzieller, bereits Bisulfit-konvertierter Standard-DNA, gelber Kanal (NTC = Negativkontrolle).....	78
Abbildung 62: Methylierungsgrad des Promotors von CDKN2A nach Behandlung mit 5-Aza-dC (1. Inkubation), bestimmt mittels MethyLight und der MS-HRM Methode.....	79
Abbildung 63: Methylierungsgrad des Promotors von CDKN2A nach Behandlung mit 5-Aza-dC (2. Inkubation), bestimmt mittels MethyLight und der MS-HRM Methode.....	80
Abbildung 64: Methylierungsgrad von CDKN2A in HT29 Zellen nach Behandlung mit 5-Aza-dC. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von fünf MS-HRM Bestimmungen (zwei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt (n = 10).	82
Abbildung 65: Methylierungsgrad von CDKN2A in HT29 Zellen nach Behandlung mit (+)-Lariciresinol und (-)-Matairesinol. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).	83
Abbildung 66: Methylierungsgrad von NTRK2 in HT29 Zellen nach Behandlung mit (+)-Lariciresinol und (-)-Matairesinol. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).	83
Abbildung 67: Methylierungsgrad von CDKN2A in HT29 Zellen nach Behandlung mit MeIQx und PhIP. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).....	84
Abbildung 68: Methylierungsgrad von NTRK2 in HT29 Zellen nach Behandlung mit MeIQx und PhIP. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).....	84
Abbildung 69: Methylierungsgrad von CDKN2A in HT29 Zellen nach Behandlung mit DON und ZON. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).....	85

Anhang

Abbildung 70: Methylierungsgrad von NTRK2 in HT29 Zellen nach Behandlung mit DON und ZON. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).....	86
Abbildung 71: Methylierungsgrad von CDKN2A in HT29 Zellen nach Behandlung mit BPA. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von sechs MS-HRM Bestimmungen (drei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt (n = 12).....	86
Abbildung 72: Methylierungsgrad von CDKN2A in HT29 Zellen nach Behandlung mit Daidzein. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von drei MS-HRM Bestimmungen (zwei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt (n = 6).....	87
Abbildung 73: Methylierungsgrad von CDKN2A in HT29 Zellen nach Behandlung mit Genistein. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (zwei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt (n = 8).....	88
Abbildung 74: Methylierungsgrad von NTRK2 in HT29 Zellen nach Behandlung mit Genistein. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (zwei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt (n = 8).....	88
Abbildung 75: Methylierungsgrad von GATA-4 in HT29 Zellen nach Behandlung mit Genistein. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (zwei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt (n = 8).....	89
Abbildung 76: Darstellung des starken Bias bei der Methode für GATA-4.	89
Abbildung 77: Normalisierte Schmelzkurven von Standards für die GATA-4 Methode.	90
Abbildung 78: Methylierungsgrad von OSMR in HT29 Zellen nach Behandlung mit Genistein. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (zwei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt (n = 8).....	90
Abbildung 79: Methylierungsgrad von CDKN2A in HT29 Zellen nach Behandlung mit Quercetin. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (zwei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt (n = 8).....	92
Abbildung 80: Methylierungsgrad von NTRK2 in HT29 Zellen nach Behandlung mit Quercetin. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (zwei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt (n = 8).....	92
Abbildung 81: Methylierungsgrad von OSMR in HT29 Zellen nach Behandlung mit Quercetin. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).....	93
Abbildung 82: MethyLight Analyse des Methylierungsgrads von CDKN2A in HT29 Zellen nach Behandlung mit 5-Aza-dC. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von zwei unabhängigen Inkubationsversuchen und zwei MethyLight Bestimmungen dargestellt (n = 4).....	93
Abbildung 83: Vergleich des Effekts von 5-Aza-dC auf den Promotor von CDKN2A in HT29 Zellen bei zwei unabhängigen Inkubationsversuchen.	94
Abbildung 84: Methylierungsgrad von CDKN2A in MCF7 Zellen nach Behandlung mit 5-Aza-dC. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (zwei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt (n = 8).....	96
Abbildung 85: Methylierungsgrad von NTRK2 in MCF7 Zellen nach Behandlung mit 5-Aza-dC. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (zwei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt (n = 8).....	96

Anhang

Abbildung 86: Methylierungsgrad von APC in MCF7 Zellen nach Behandlung mit 5-Aza-dC. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (zwei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt (n = 8).....	97
Abbildung 87: Methylierungsgrad von DAPK1 in MCF7 Zellen nach Behandlung mit 5-Aza-dC. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (zwei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt (n = 8).	97
Abbildung 88: Methylierungsgrad von CDKN2A in MCF7 Zellen nach Behandlung mit Genistein. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (zwei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt (n = 8).	99
Abbildung 89: Methylierungsgrad von NTRK2 in MCF7 Zellen nach Behandlung mit Genistein. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).....	99
Abbildung 90: Methylierungsgrad von APC in MCF7 Zellen nach Behandlung mit Genistein. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).....	100
Abbildung 91: Methylierungsgrad von DAPK1 in MCF7 Zellen nach Behandlung mit Genistein. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (zwei unabhängige Inkubationsversuche) dargestellt (n = 8).	100
Abbildung 92: Methylierungsgrad von CDKN2A in MCF7 Zellen nach Behandlung mit BPA. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).....	101
Abbildung 93: Methylierungsgrad von NTRK2 in MCF7 Zellen nach Behandlung mit BPA. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).....	101
Abbildung 94: Methylierungsgrad von APC in MCF7 Zellen nach Behandlung mit BPA. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).....	102
Abbildung 95: Methylierungsgrad von DAPK1 in MCF7 Zellen nach Behandlung mit BPA. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).....	102
Abbildung 96: Methylierungsgrad von CDKN2A in MCF7 Zellen nach Behandlung mit Daidzein. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).....	103
Abbildung 97: Methylierungsgrad von NTRK2 in MCF7 Zellen nach Behandlung mit Daidzein. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).....	103
Abbildung 98: Methylierungsgrad von APC in MCF7 Zellen nach Behandlung mit Daidzein. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).....	104
Abbildung 99: Methylierungsgrad von DAPK1 in MCF7 Zellen nach Behandlung mit Daidzein. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).....	104
Abbildung 100: Methylierungsgrad von CDKN2A in MCF7 Zellen nach Behandlung mit Quercetin. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).....	105

Anhang

Abbildung 101: Methylierungsgrad von NTRK2 in MCF7 Zellen nach Behandlung mit Quercetin. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).....	105
Abbildung 102: Methylierungsgrad von APC in MCF7 Zellen nach Behandlung mit Quercetin. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).....	106
Abbildung 103: Methylierungsgrad von DAPK1 in MCF7 Zellen nach Behandlung mit Quercetin. Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von einem Inkubationsversuch und zwei MS-HRM Bestimmungen dargestellt (n = 4).....	106
Abbildung 104: Verwendete Sterilbank mit Frontscheibe in optimaler Höhe und Pumpe. ...	108
Abbildung 105: Beispiel für HT29 Zellen (aus [124]).....	109
Abbildung 106: Beispiel für MCF7 Zellen (aus [125]).....	110
Abbildung 107: Beispiel für eine Neubauer-Zählkammer mit jeweils vier Zellen pro Eckquadrat. (Modifiziert nach [122]).....	112
Abbildung 108: Inkubationslösungen, Kulturmedium, Petrischalen und eine Kulturflasche.	114
Abbildung 109: Beispiel für ein Temperaturprogramm eines MS-HRM.....	122

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Darstellung der häufigsten Tumorlokalisationen nach dem Geschlecht. Modifiziert nach [1] und [2].....	2
Tabelle 2. Beispiele für Substanzen, welche die DNA-Methylierung beeinflussen können. (modifiziert nach [53]).....	17
Tabelle 3: Übersicht über die häufigsten Mykotoxine, ihre Produzenten und die befallenen Lebensmittel (nach [55]).....	27
Tabelle 4: Beispiel für ein Temperaturprogramm für eine PCR. (Modifiziert nach [81])	34
Tabelle 5: Sequenz und Eigenschaften des Versuchsprimerpaars 1 und des entsprechenden Amplikons.....	59
Tabelle 6: Sequenz und Schmelztemperatur des Primerpaars für CDKN2A, sowie Länge und Anzahl der CpG des Amplikons.....	62
Tabelle 7: Primer und Amplikon für RASSF1.....	63
Tabelle 8: Sequenzen für die entworfenen Primer für HIC1.....	65
Tabelle 9: Ergebnisse der ersten Kalibration von MethyLight mit Standards.....	76
Tabelle 10: Alternatives Temperaturprogramm für MethyLight.....	77
Tabelle 11: Ergebnisse der Kalibration von MethyLight mit bereits Bisulfit-konvertierter Kontroll-DNA.....	79
Tabelle 12: Methylierungsstatus der einzelnen Gene in HT29 Zellen.....	81
Tabelle 13: Methylierungsstatus der Promotorregion einzelner Gene in unbehandelten MCF7 Zellen.....	95
Tabelle 14: Übersicht über die einzelnen Inkubationsversuche mit beiden Zelllinien.....	114

Anhang

Tabelle 15: Verwendete Konzentrationen der Substanzen.	115
Tabelle 16: Reagenzien und Volumina für einen Bisulfit-Konvertierungs Ansatz.	118
Tabelle 17: Temperaturprogramm für die Bisulfit-Konvertierung.	119
Tabelle 18: Allgemeine Zusammensetzung eines MS-HRM Ansatzes.....	121
Tabelle 19: Zusammensetzung des Master Mix für CDKN2A.....	123
Tabelle 20: Temperaturprogramm für CDKN2A.....	123
Tabelle 21: Zusammensetzung des Master Mix für NTRK2.....	124
Tabelle 22: Temperaturprogramm für NTRK2.....	124
Tabelle 23: Zusammensetzung des Master Mix für OSMR.	124
Tabelle 24: Temperaturprogramm für OSMR.	125
Tabelle 25: Zusammensetzung des Master Mix für GATA-4.	125
Tabelle 26: Temperaturprogramm für GATA-4.	125
Tabelle 27: Zusammensetzung des Master Mix für APC.....	126
Tabelle 28: Temperaturprogramm für APC.....	126
Tabelle 29: Zusammensetzung des Master Mix für DAPK1.....	126
Tabelle 30: Temperaturprogramm für DAPK1.....	127
Tabelle 31: Allgemeine Zusammensetzung eines MethyLight Ansatzes.....	129
Tabelle 32: Temperaturprogramm für MethyLight.....	129

Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung des Methylierungsgrads in % für ein MethyLight Experiment. [99]...50	
Formel 2: Formel zur Abschätzung der Schmelztemperatur eines Oligonukleotids. [81]54	
Formel 3: Berechnung der Anzahl der Zellen pro Milliliter Suspension.	113
Formel 4: Berechnung der DNA-Konzentration in einer Lösung.....	117
Formel 5: Ausreißertest nach Nalimov. [130]	128

Literaturverzeichnis

- [1] R. W. Ruddon: Cancer biology; 4. Auflage; Oxford University Press; 4-16; 23; (2007)
- [2] Jahrbuch der Gesundheitsstatistik; Statistik Austria; 38-42; 44-51; (2010)
- [3] F.P. Perera: Molecular epidemiology: insights into cancer susceptibility, risk assessment, and prevention; Journal of the National Cancer Institute; 88; 496-509; (1996)

- [4] <http://www.who.int>; WHO
- [5] B. Alberts; D. Bray; K. Hopkin; A. Johnson; J. Lewis; M. Raff; K. Roberts; P. Walter: Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie; 3. Auflage; Wiley-VCH Verlag; 650-670; (2005)
- [6] http://careseng.ca/basic/basic_A12.html
- [7] J. Tost: DNA methylation: An introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker; Molecular biotechnology; 44; 71-81; (2010)
- [8] K. D. Robertson: DNA methylation, methyltransferases, and cancer; Oncogene; 20; 3139-3155; (2001)
- [9] E. N. Gal-Yam; Y. Saito; G. Egger; P. A. Jones: Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy; Annual Review of Medicine; 59; 267–280; (2008)
- [10] M. G. Goll; T. H. Bestor: Eukaryotic Cytosinemethyltransferases; Annual Review on Biochemistry; 74; 481–514; (2005)
- [11] A. Hermann; H. Gowher; A. Jeltsch: Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases; Cellular and Molecular Life Sciences; 61; 2571–2587; (2004)
- [12] E. Li: Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development; Nature reviews; Genetics; 3; 662-673; (2002)
- [13] M. Esteller: Impact of DNA methylation on health and disease; in M. Esteller (Editor(s)): DNA methylation - approaches, methods and applications; CRC Press; 1-10; (2005)
- [14] J. Y. Fang; S. D. Xiao: Alteration of DNA methylation in gastrointestinal carcinogenesis; Journal of Gastroenterology and Hepatology; 16; 960-968; (2001)
- [15] C. D. Allis; T. Jenuwein; D. Reinberg; M.-L. Caparros: Epigenetics; Cold Spring Harbor Laboratory Press; 17-18; (2007)
- [16] T. H. Bestor; G. L. Verdine: DNA methyltransferases; Current Opinion in Cell Biology; 6; 380-389; (1994)
- [17] V. Blust: Einfluss von Polyphenolen auf das Tumorsuppressorgen p16^{INK4a}; Diplomarbeit, Universität Karlsruhe; (2008)
- [18] D. Drahovsky: Enzymatische Methylierung chromosomaler DNS; Dissertation, Universität Frankfurt am Main; (1974)
- [19] J. K. Christman: 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy; Oncogene; 21; 5483-5495; (2002)
- [20] A. P. Feinberg; B. Vogelstein: Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts; Nature; 301; 89-92; (1983)
- [21] S. Gopalakrishnan; B. O. Van Emburgh; K. D. Robertson: DNA methylation in development and human disease; Mutation Research; 647; 30–38; (2008)
- [22] J. F. Costello; M. C. Frühwald; D. J. Smiraglia; L. J. Rush; G. P. Robertson; X. Gao; F. A. Wright; J. D. Feramisco; P. Peltomäki; J. C. Lang; D. E. Schuller; L. Yu; C. D. Bloomfield; M. A. Caligiuri; A. Yates; R. Nishikawa; H. Su Huang; N. J. Petrelli; X. Zhang; M. S. O'Dorisio; W. A. Held; W. K. Cavenee; C. Plass: Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns; Nature Genetics; 24; 132-138; (2000)

- [23] M. Esteller; P. G. Corn; S. B. Baylin; J. G. Herman: A gene hypermethylation profile of human cancer; *Cancer Research*; 61; 3225-3229; (2001)
- [24] 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*; 12; 39-47; (2012)
- [25] M. Verma; U. Manne: Genetic and epigenetic biomarkers in cancer diagnosis and identifying high risk populations; *Critical Reviews in Oncology/Hematology*; 60; 9-18; (2006)
- [26] J. Zhu; X. Yao: Use of DNA methylation for cancer detection: Promises and challenges; *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*; 41; 147-154; (2009)
- [27] M. Serrano; G. J. Hannon; D. Beach: A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4; *Nature*; 366; 704-707; (1993)
- [28] X. Jin; D. Nguyen; W. W. Zhang; A. P. Kyritsis; J. A. Roth: Cell cycle arrest and inhibition of tumor cell proliferation by the p16^{INK4} gene mediated by an adenovirus vector. *Cancer Research*; 55; 3250-3253; (1995)
- [29] B. N. Kim; H. Yamamoto; K. Ikeda; B. Damdinsuren; Y. Sugita; C. Y. Ngan; Y. Fujie; M. Ogawa; T. Hata; M. Ikeda; M. Ohue; M. Sekimoto; T. Monden; N. Matsuura; M. Monden: Methylation and expression of p16^{INK4} tumor suppressor gene in primary colorectal cancer tissues; *International Journal of Oncology*; 26; 1217-1226; (2005)
- [30] L. Pecorino: *Molecular Biology of Cancer*; 2. Auflage; Oxford University Press; 96; (2008)
- [31] H. Mitomi; N. Fukui; N. Tanaka; H. Kanazawa; T. Saito; T. Matsuoka; T. Yao: Aberrant p16^{INK4a} methylation is a frequent event in colorectal cancers: prognostic value and relation to mRNA expression and immunoreactivity; *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*; 136; 323-331; (2010)
- [32] C. M. Bender; M. M. Pao; P. A. Jones: Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines; *Cancer Research*; 58; 95-101; (1998)
- [33] C. M. Bender; M. M. Pao; P. A. Jones: Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines; *Cancer Research*; 58; 95-101; (1998)
- [34] P. A. Jones; S. B. Baylin: The Epigenomics of Cancer; *Cell*; 128; 683-692; (2007)
- [35] E. Passarge: *Color Atlas of Genetics*; 3. Auflage; Thieme Verlag; 330-332; (2007)
- [36] N. S. Fearnhead; M. P. Britton; W. F. Bodmer: The ABC of APC; *Human Molecular Genetics*; 10; 721-733; (2001)
- [37] P. W. Laird; L. Jackson-Grusby; A. Fazeli; S. L. Dickinson; W. E. Jung; E. Li; R. A. Weinberg; R. Jaenisch: Suppression of Intestinal Neoplasia by DNA Hypomethylation; *Cell*; 81; 197-205; (1995)
- [38] A. Tserga; N. V. Michalopoulos; G. Levidou; P. Korkolopoulou; G. Zografos; E. Patsouris; A. A. Saetta: Association of aberrant DNA methylation with clinicopathological features in breast cancer; *Oncology Reports*; 27; 1630-1638; (2012)

- [39] S. Pehlivan; M. Artach; T. Severa; H. Bozcuk; C. Kilincarslana; M. Pehlivan: Gene methylation of SFRP2, P16, DAPK1, HIC1, and MGMT and KRAS mutations in sporadic colorectal cancer; *Cancer Genetics and Cytogenetics*; 201; 128-132; (2010)
- [40] D. Kilinc; O. Ozdemir; S. Ozdemir; E. Korgali; B. Koksali; A. Uslu; Y. E. Gultekin: Alterations in Promoter Methylation Status of Tumor Suppressor HIC1, SFRP2, and DAPK1 Genes in Prostate Carcinomas; *DNA and cell biology*; 1-8; (2011)
- [41] X.-J. Luo; W. Li; L.-F. Yang; X.-F. Yu; L.-B. Xiao; M. Tang; X. Dong; Q.-P. Deng; A. M. Bode; J.-K. Liu; Y. Cao: DAPK1 mediates the G1 phase arrest in human nasopharyngeal carcinoma cells induced by grifolin, a potential antitumor natural product; *European Journal of Pharmacology*; 670; 427–434; (2011)
- [42] S. Vinci; G. Giannarini; C. Selli; J. Kuncova; D. Villari; F. Valent; C. Orlando: Quantitative methylation analysis of BCL2, hTERT, and DAPK promoters in urine sediment for the detection of non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: A prospective, two-center validation study; *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*; 29; 150–156; (2011)
- [43] R. Claus; B. Hackanson; A. R. Poetsch; M. Zucknick; M. Sonnet; N. Blagitko-Dorfs; J. Hiller; S. Wilop; T. H. Brümmendorf; O. Galm; U. Platzbecker; J. C. Byrd; K. Döhner; H. Döhner; M. Lübbert; C. Plass: Quantitative analyses of DAPK1 methylation in AML and MDS; *International Journal of Cancer*; 7; 1-6; (2011)
- [44] R. A. White; L. L. Dowler; L. M. Pasztor; L. L. Gatson; L. R. Adkison; S. V. Angeloni; D. B. Wilson: Assignment of the transcription factor GATA4 gene to human chromosome 8 and mouse chromosome 14: Gata4 is a candidate gene for Ds (disorganization); *Genomics*; 27; 20-26; (1995)
- [45] R. Zheng; G. A. Blobel: GATA Transcription Factors and Cancer; *Genes & Cancer*; 1; 1178–1188; (2011)
- [46] D. M. E. I. Hellebrekers; M. H. F. M. Lentjes; S. M. van den Bosch; V. Melotte; K. A. D. Wouters; K. L.J. Daenen; K. M. Smits; Y. Akiyama; Y. Yuasa; S. Sanduleanu; C. A. J. Khalid-de Bakker; D. Jonkers; M. P. Weijenberg; J. Louwagie; W. Criekinge; B. Carvalho; G. A. Meijer; S. B. Baylin; J. G. Herman; A. P. de Bruine; M. van Engeland: GATA4 and GATA5 are Potential Tumor Suppressors and Biomarkers in Colorectal Cancer; *Human Cancer Biology*; 15; 3990-3997; (2009)
- [47] L. Abuhatzira; K. Makedonski; Y. Kaufman; A. Razin; R. Shemer: MeCP2 deficiency in the brain decreases BDNF levels by REST/CoREST-mediated repression and increases TRKB production; *Epigenetics*; 2; 214-222; (2007)
- [48] Y. Yamada; M. Toyota; Y. Hirokawa; H. Suzuki; A. Takagi; T. Matsuzaki; Y. Sugimura; R. Yatani; T. Shiraishi; M. Watanabe: Identification of differentially methylated CpG islands in prostate cancer; *International Journal of Cancer*; 112; 840–845; (2004)
- [49] B. Kerr; C. Garcia-Rudaz; M. Dorfman; A. Paredes; S. R Ojeda: NTRK1 and NTRK2 receptors facilitate follicle assembly and early follicular development in the mouse ovary; *Reproduction*; 138; 131-140; (2009)

- [50] G. Deng; S. Kakar; K. Okudiara; E. Choi; M. H. Sleisenger, Y. S. Kim: Unique methylation pattern of oncostatin M receptor gene in cancers of colorectum and other digestive organs; *Clinical Cancer Research*; 15; 1519-1526; (2009)
- [51] K. Hibi; T. Goto; K. Sakuraba; A. Shirahata; M. Saito; K. Ishibashi; G. Kigawa; H. Nemoto; Y. Sanada: Methylation of OSMR gene is frequently observed in non-invasive colorectal cancer; *Anticancer Research*; 31; 1293-1295; (2011)
- [52] M. S. Kim; J. Louwagie; B. Carvalho; J. S. Terhaar sive Droste; H. L. Park; Y. K. Chae; K. Yamashita; J. Liu; K. L. Ostrow; S. Ling; R. Guerrero-Preston; S. Demokan; Z. Yalniz; N. Dalay; G. A. Meijer; W. V. Crieckinge; D. Sidransky: Promoter DNA Methylation of Oncostatin M receptor- β as a Novel Diagnostic and Therapeutic Marker in Colon Cancer; *PLoS One*; 4; e6555; (2009)
- [53] S. Choi; R. Corrocher; S. Friso: Nutrients and DNA methylation; in S. Choi; S. Friso (Editor(s)): *Nutrients and epigenetics*; CRC Press; 105-125; (2009)
- [54] M. Z. Fang; Y. Wang; N. Ai; Z. Hou; Y. Sun; H. Lu; W. Welsh; C. S. Yang: Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Inhibits DNA Methyltransferase and Reactivates Methylation-Silenced Genes in Cancer Cell Lines; *Cancer Research*; 63; 7563-7570; (2003)
- [55] J. Gilbert; H. Z. Senyuva (Editor(s)): *Bioactive compounds in foods*; Blackwell Publishing Ltd; 134-154; 173-180; 358-363; (2008)
- [56] G. F. Fuhrmann: *Toxikologie für Naturwissenschaftler*; B. G. Teubner Verlag; 338-339; (2006)
- [57] W. G. Helferich; C. D. Allred; Y.-H. Ju: Dietary Estrogens and Antiestrogens; in W. Helferich; C. K. Winter: *Food toxicology*; CRC Press; (2001)
- [58] M. Cotterchio; B. A. Boucher; M. Manno; S. Gallinger; A. Okey; P. Harper: Dietary phytoestrogen intake is associated with reduced colorectal cancer risk; *The Journal of Nutrition*; 136; 3046-3053; (2006)
- [59] H.-D. Belitz; W. Grosch; P. Schieberle: *Food Chemistry*; 4. Auflage; Springer Verlag Berlin; 26-30; 472-475; 762-763; 832-835; (2009)
- [60] I. E. J. Milder; E. J. M. Feskens; I. C. W. Arts; H. B. Bueno de Mesquita; P. C. H. Hollman; D. Kromhout: Intake of the Plant Lignans Secoisolariciresinol, Matairesinol, Lariciresinol, and Pinoresinol in Dutch Men and Women; *The Journal of Nutrition*; 135; 1202-1207; (2005)
- [61] R. Hänsel; O. Sticher: *Pharmakognosie – Phytopharmazie*; 9. Auflage; Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1088-1123; (2010)
- [62] L. P. Meagher; G. R. Beecher; V. P. Flanagan; B. W. Li: Isolation and Characterization of the Lignans, Isolariciresinol and Pinoresinol, in Flaxseed Meal; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 47; 3173-3180; (1999)
- [63] S. T. Omaye: *Food and nutritional toxicology*; CRC Press; Kapitel 12 (2004)
- [64] M. Russo; C. Spagnuolo; I. Tedesco; S. Bilotto; G. L. Russo: The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: Facts and fancies; *Biochemical Pharmacology*; 83; 6–15; (2012)

- [65] H.-J. Kim; S.-K. Kim; B.-S. Kim; S.-H. Lee; Y.-S. Park; B.-K. Park; S.-J. Kim; J. Kim; C. Choi; J.-S. Kim; S.-D. Cho; J.-W. Jung; K.-H. Roh; K.-S. Kang; J.-Y. Jung: Apoptotic Effect of Quercetin on HT-29 Colon Cancer Cells via the AMPK Signaling Pathway; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 58; 8643–8650; (2010)
- [66] G. S. Kelly: Quercetin; *Alternative Medicine Review*; 16; 172-194; (2011)
- [67] C. C. Willhite; G. L. Ball; C. J. McLellan: Derivation of a Bisphenol a Oral Reference Dose (RfD) and Drinking-Water Equivalent Concentration; *Journal of Toxicology and Environmental Health*; 11; 69-146; (2008)
- [68] J.-H. Kang; K. Kito; F. Kondo: Factors influencing the migration of bisphenol A from cans; *Journal of Food Protection*; 66; 1444-1447; (2003)
- [69] A.M. Calafat; Z. Kuklennyik; J. A. Reidy; S. P. Caudill; J. Ekong; L.L. Needham: Urinary concentrations of bisphenol A and 4-Nonylphenol in a human reference population; *Environmental Health Perspectives*; 113; 391-395; (2005)
- [70] J. H Duffus; D. M Templeton; M. Nordberg: *Concepts in Toxicology*; RSC Publishing; 162-163; (2009)
- [71] S. Manabe; N. Kurihara; O. Wada; K. Tohyama; T. Aramaki: Formation of PhIP in a mixture of creatinine, phenylalanine and sugar or aldehyde by aqueous heating; *Carcinogenesis*; 13; 827-830; (1992)
- [72] D. V. Santi; A. Norment; C. E. Garrett: Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 81; 6993-6997; (1984)
- [73] J. C. Cheng; C. B. Yoo; D. J. Weisenberger; J. Chuang; C. Wozniak; G. Liang; V. E. Marquez; S. Greer; T. F. Orntoft; T. Thykjaer; P. A. Jones: Preferential response of cancer cells to zebularine; *Cancer Cell*; 6; 151-158; (2004)
- [74] P.A. Jones; S. M. Taylor: Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation; *Cell*; 20; 85-93; (1980)
- [75] M. Fojtova; A. Piskala; I. Votruba; M. Otmar; E. Bartova; A. Kovarik: Efficacy of DNA hypomethylating capacities of 5-aza-2'-deoxycytidine and its alpha anomer; *Pharmacological Research*; 55; 16–22; (2007)
- [76] A. Cihák: Biological effects of 5-azacytidine in eukaryotes; *Oncology*; 30; 405-422; (1974)
- [77] P.G. Constantinides; P. A. Jones; W. Gevers: Functional striated muscle cells from non myoblast precursors following 5 azacytidine treatment; *Nature*; 267; 364-366; (1977)
- [78] G. Liang; F. A. Gonzales; P. A. Jones; T. F. Orntoft; T. Thykjaer: Analysis of Gene Induction in Human Fibroblasts and Bladder Cancer Cells Exposed to the Methylation Inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine; *Cancer Research*; 62; 961-966; (2002)
- [79] J. Y. Fang; J. Lu; Y. X. Chen; L. Yang: Effects of DNA methylation on expression of tumor suppressor genes and proto-oncogene in human colon cancer cell lines; *World Journal of Gastroenterology*; 9; 1976-1980; (2003)
- [80] M. Esteller: Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps; *Nature reviews; Genetics*; 8; 286-298; (2007)

- [81] M. J. McPherson; S. G. Moller: PCR; 2. Auflage; Taylor & Francis Group; 1-43; 209-220; (2006)
- [82] W. J. Lennarz; M. D. Lane: Encyclopedia of Biological Chemistry; Volume 3; Academic Press; 209 (2004)
- [83] J. M Walker; R. Raply: Molecular Biology and Biotechnology; 5. Auflage; RSC Publishing; 3-5; 15-17; 81-84; 88-89; 122-126; (2009)
- [84] A. Manz; N. Pamme; D. Iossifidis: Bioanalytical chemistry; Imperial College Press; 19; 155; (2004)
- [85] L. S. Kristensen; L. L. Hansen: PCR-Based Methods for Detecting Single-Locus DNA Methylation Biomarkers in Cancer Diagnostics, Prognostics, and Response to Treatment; Clinical Chemistry; 55; 1471–1483; (2009)
- [86] M. Frommer; L. E. McDonald; D. S. Millar; C. M. Collis; F. Watt; G. W. Grigg; P. L. Molloy; C. L. Paul: A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; 89; 1827-1831; (1992)
- [87] O. Ammerpohl; J.I. Martín-Subero; J. Richter; I. Vater; R. Siebert: Hunting for the 5th base: Techniques for analyzing DNA methylation; Biochimica et Biophysica Acta; 1790; 847–862; (2009)
- [88] T. K. Wojdacz; A. Dobrovic: Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation; Nucleic Acids Research; 35; e41; (2007)
- [89] T. K. Wojdacz; A. Dobrovic; L. L. Hansen: Methylation-sensitive high-resolution melting; Nature Protocols; 3; 1903-1908; (2008)
- [90] T. K. Wojdacz, A. Dobrovic: Melting curve assays for DNA methylation analysis; in J. Tost (Editor(s)): DNA methylation: Methods and protocols; Second Edition; Humana Press; Springer Science + Business Media; 229-240; (2009)
- [91] R. H. Vossen; E. Aten; A. Roos; J. T. den Dunnen: High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening; Human Mutation; 30; 860-866; (2009)
- [92] M. Erali; K. V. Voelkerding; C. T. Wittwer: High resolution melting applications for clinical laboratory medicine; Experimental and Molecular Pathology; 85; 50–58; (2008)
- [93] P. M. Warnecke; C. Stirzaker; J. R. Melki; D. S. Millar; C. L. Paul; S. J. Clark: Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA; Nucleic Acids Research; 25; 4422–4426; (1997)
- [94] <http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/local/POLAND//poland.html>; POLAND
- [95] F. Malentacchi; G. Forni; S. Vinci; C. Orlando: Quantitative evaluation of DNA methylation by optimization of a differential-high resolution melt analysis protocol; Nucleic Acids Research; 37; e86; (2009)

- [96] S. Ogino; T. Kawasaki; M. Brahmandam; M. Cantor; G. J. Kirkner; D. Spiegelman; G. M. Makrigiorgos; D. J. Weisenberger; P. W. Laird; M. Loda; C. S. Fuchs: Precision and performance characteristics of bisulfite conversion and real-time PCR (MethyLight) for quantitative DNA methylation analysis; *Journal of Molecular Diagnostics*; 8; 209-217; (2006)
- [97] B. N. Trinh; T. I. Long; P. W. Laird: DNA methylation analysis by MethyLight technology; *Methods*; 25; 456-462; (2001)
- [98] G. Schock: Standardised Tools for Epigenetics Research; *Pharmaceutical Technology Journal*; 27; 52-57; (2008)
- [99] QIAGEN: EpiTect MethyLight PCR Handbook; (2008)
- [100] T. Swift-Scanlan; A. Blackford; P. Argani; S. Sukumar; M. J. Fackler: Two-color quantitative multiplex methylation-specific PCR; *Bio Techniques*; 40; 210-219; (2006)
- [101] C. A. Eads; K. D. Danenberg; K. Kawakami; L. B. Saltz; C. Blake; D. Shibata; P. V. Danenberg; P. W. Laird: MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Research*; 28; e32; (2000)
- [102] K. J. Archer; V. R. Mas; D. G. Maluf; R. A. Fisher: High-throughput assessment of CpG site methylation for distinguishing between HCV-cirrhosis and HCV-associated hepatocellular carcinoma; *Molecular genetics and genomics*; 283; 341-349; (2010)
- [103] T. K. Wojdacz, A. Dobrovic: Melting curve assays for DNA methylation analysis; in J. Tost (Editor(s)): *DNA methylation: Methods and protocols*; Second Edition; Humana Press; Springer Science + Business Media; 229-240; (2009)
- [104] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>; NCBI
- [105] T. K. Wojdacz; L. L. Hansen; A. Dobrovic: A new approach to primer design for the control of PCR bias in methylation studies; *BMC Research Notes*; 1:54; (2008)
- [106] <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>; Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator
- [107] <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>; RNAfold WebServer
- [108] <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>; OligoAnalyzer
- [109] M. S. Kim; J. Lee; D. Sidransky: DNA methylation markers in colorectal cancer; *Cancer Metastasis Review*; 29; 181-206; (2010)
- [110] M. Rasti; P. Tavasoli; A. Monabati; M. Entezam: Association between HIC1 and RASSF1A promoter hypermethylation with MTHFD1 G1958A polymorphism and clinicopathological features of breast cancer in Iranian patients; *Iranian Biomedical Journal*; 13; 133-140; (2009)
- [111] E. Habla: Bestimmung des Grades der Genpromotormethylierung mittels methylierungs-sensitiver hochauflösender Schmelzkurvenanalyse; Diplomarbeit, Universität Wien; (2011)
- [112] T. K. Wojdacz; T. Borgbo; L. L. Hansen: Primer design versus PCR bias in methylation independent PCR amplifications; *Epigenetics*; 4; 231 - 234; (2009)

- [113] A. R. Karpf; P. W. Peterson; J. T. Rawlins; B. K. Dalley; Q. Yang; H. Albertsen; D. A. Jones: Inhibition of DNA methyltransferase stimulates the expression of signal transducer and activator of transcription 1, 2, and 3 genes in colon tumor cells; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 96; 14007–14012; (1999)
- [114] J. C. Chuang; C. B. Yoo; J. M. Kwan; T. W. H. Li; G. Liang; A. S. Yang; P. A. Jones: Comparison of biological effects of non-nucleoside DNA methylation inhibitors versus 5-aza-2'-deoxycytidine; *Molecular Cancer Therapeutics*; 4; 1515-1520; (2005)
- [115] J. H. Kouadio; S. D. Dano; S. Moukha; T. A. Mobio; E. E. Creppy: Effects of combination of Fusarium mycotoxins on the inhibition of macromolecular synthesis, malondialdehyde levels, DNA methylation and fragmentation, and viability in Caco-2 cells; *Toxicol*; 49; 306-317; (2007)
- [116] J. G. Bromer; Y. Zhou; M. B. Taylor; L. Doherty; H. S. Taylor: Bisphenol-A exposure in utero leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response; *The FASEB Journal*; 24; 2273-2280; (2010)
- [117] D. C. Dolinoy; D. Huang; R. L. Jirtle: Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 104; 13056–13061; (2007)
- [118] M. Fang; D. Chen; C. S. Yang: Dietary polyphenols may affect DNA methylation; *The Journal of Nutrition*; 137; 223-228; (2007)
- [119] M. Z. Fang; D. Chen; Y. Sun; Z. Jin; J. K. Christman; C. S. Yang: Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RAR β , and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy; *Clinical Cancer Research*; 11; 7033-7041; (2005)
- [120] C.-Y. Hsieh; R. C. Santoli; S. Z. Haslam; W. G. Helferich: Estrogenic Effects of Genistein on the Growth of Estrogen Receptor-positive Human Breast Cancer (MCF-7) Cells in Vitro and in Vivo; *Cancer Research*; 58; 3833-3838; (1998)
- [121] K. Jawaid; S. R. Crane; J. L. Nowers; M. Lacey; S. A. Whitehead: Long-term genistein treatment of MCF-7 cells decreases acetylated histone 3 expression and alters growth responses to mitogens and histone deacetylase inhibitors; *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*; 120; 164–171; (2010)
- [122] T. Lindl: *Zell- und Gewebekultur*; 4. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag; 1-50; 84-105; 127-153; (2000)
- [123] <http://www.dsmz.de>; DSMZ: Leibniz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
- [124] <http://www.lgcstandards-atcc.org>; ATCC: The Global Bioresource Center
- [125] <http://www.tgrbio.com/cancer-cell-lines-primary-cell-cultures/cell-models-mcf7-cells.html>; TGR BioSciences
- [126] QIAGEN: QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook; (2010)
- [127] QIAGEN: EpiTect Bisulfite Handbook; (2009)
- [128] www.sigmaaldrich.com; Sigma Aldrich

Anhang

[129] QIAGEN: EpiTect HRM PCR Handbook; (2009)

[130] W. Gottwald: Statistik für Anwender; Wiley-VCH Verlag; 70-71; 209; (2000)

[131] QIAGEN: EpiTect MethyLight Assay: Hs_CDKN2A Handbook. Feb; (2008)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Bettina Werner
Geburtsdatum	31.10.1988
Geburtsort	Meran, Italien
Familienstand	Ledig
Eltern	Helmut Werner Ingrid Hilpert Werner

Ausbildung

1994 - 1999	Volksschule Tscherms
1999 - 2002	Mittelschule Lana
2002 - 2007	2002-2007 Realgymnasium Meran (Wissenschaftliches Lyzeum)
2007 - 2010	Bakkalaureatsstudium der Chemie an der Universität Wien
2010 - 2012	Masterstudium der Chemie an der Universität Wien

Bisherige Tätigkeiten

Sommer	2004, 2005 und 2006	Mitarbeit und Kinderbetreuung bei den Sommerkreativwochen im Ultental	
Sommer	2008	Sechswöchiges Praktikum im Analytiklabor der Firma Ladurner Umwelt – Ambiente, Lana	
Wintersemester	2011, Sommersemester	2012	Tätigkeit als Tutorin am Institut für analytische Chemie der Universität Wien, Betreuung des Grundpraktikums II für Chemiker und des lebensmittelanalytischen Praktikums für Ernährungswissenschaftler

Anhang

Wissenschaftliche Arbeiten

- 2010 Bachelorarbeit zum Thema „Untersuchungen zur Modulation der DNA-Methylierung in humanen Kolonkarzinomzellen“
- Seit August 2011 Masterarbeit im Bereich der lebensmittelanalytischen Chemie mit Schwerpunkt DNA Analytik und Krebsforschung, betreut von Dr. Margit Cichna-Markl