

Diplomarbeit

**PTEN und LINE-1 Methylierungsanalyse von Brustkrebs-
stammzellen**

eingereicht von

Florian Obermair

Mat.Nr.: 0534197

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Klinischen Abteilung für Onkologie

Universitätsklinik für Innere Medizin

unter der Anleitung von

Priv. Doz. Mag. Dr.rer.nat. Nadia Dandachi

OA Priv. Doz. Dr.med.univ. Marija Balic

Eidesstaatliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 20.01.2011

Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich bei Priv. Doz. Mag. Dr. Nadia Dandachi und OA Priv. Doz. Dr. Marija Balic für die Möglichkeit bedanken, meine Diplomarbeit an der Klinischen Abteilung für Onkologie zu verfassen und meine Kenntnisse und Fertigkeiten im Bereich der onkologischen Forschung weiterzuentwickeln. Mein besonderer Dank gilt hierbei Priv. Doz. Mag. Dr. Nadia Dandachi, die mit der klaren Abgrenzung des Themas sowie ihrer fachlichen und didaktischen Kompetenz meine Diplomarbeit von Anfang an vorbildhaft betreut hat.

Ein großer Teil meiner Diplomarbeit wurde erst durch das Engagement von Jasmin Strutz möglich, die mich geduldig in die Laborarbeit eingeschult und immer ein offenes Ohr für meine Fragen gehabt hat.

Des Weiteren danke ich Dr. Mag. Stefanie Stanzer für ihre Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse.

Ich möchte diese Diplomarbeit auch dazu nutzen, meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung all die Jahre meiner Ausbildung zu danken.

Zusammenfassung

HINTERGRUND: Die Tumorstammzellhypothese geht davon aus, dass es innerhalb eines Tumors Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften gibt. Zu diesen Eigenschaften zählen die Fähigkeit sich selbst zu erneuern, Zellen hervorzubringen, die in unterschiedliche Richtungen differenzieren können sowie ein hohes Proliferationspotential. Durch die vermehrte Expression von Transportproteinen und ihre geringe Teilungsaktivität sollen Tumorstammzellen resistenter gegenüber momentan verwendeten Chemotherapeutika sein, was zu Therapieversagen, Rezidivierung und Metastasierung des Primärtumors führt. Aus diesem Grund ist es wichtig, molekulare Veränderungen, die zur Entstehung von Tumorstammzellen führen, zu identifizieren und dies für spätere Therapien zu nutzen. Mit dem Tumorsuppressorgen PTEN und dem von ihm regulierten PI3K/Akt/mTOR Signalweg wurde ein Signalweg entdeckt, dessen Deregulation zur Entstehung und Aufrechterhaltung von Tumorstammzellen führt. Eine gut beschriebene epigenetische Veränderung ist die Hypermethylierung von Cytosinbasen im Promotorbereich von Tumorsuppressorgen, wodurch es zu einer transkriptionellen Inaktivierung der entsprechenden Gene kommt. Neben der Hypermethylierung von Tumorsuppressorgen ist der genomweite Gehalt an Methylcytosinen in Tumorzellen erniedrigt. Diese Annahmen führten zu folgendem experimentellen Design unserer Studie. **MATERIAL/ METHODEN:** Die Fähigkeit von Tumorstammzellen unter nicht-adhärenenten Kulturbedingungen zu überleben wurde genutzt, um Tumorstammzellen der Brustkrebszelllinien MCF-7, SUM-159, SUM-1315, SK-BR-3, MDA-MB-231 zu kultivieren. Unter diesen Bedingungen proliferieren Tumorstammzellen und formen sphärische Kolonien, die als „Mammosphären“ bezeichnet werden. Mit Hilfe des MethyLight (ML) und High-Resolution Melting (HRM) Assays untersuchten wir den PTEN Promotor Methylierungsstatus dieser nicht-adhärenenten Zellkulturen und verglichen sie mit adhärenent wachsenden Krebszellen. Um Informationen über den genomweiten Methylierungsstatus zu bekommen, analysierten wir die repetitive Sequenz LINE-1, die in normalen Zellen stark methyliert ist und als Marker für den genomweiten Methylierungsstatus einer Zelle verwendet werden kann. Um eine fehlende PTEN Expression nachzuweisen, verwendeten wir zusätzlich eine immunzytochemische Färbemethode. **ERGEBNISSE:** Weder nicht-adhärenent noch adhärenent wachsende Krebszellen zeigten eine PTEN Promotormethylierung über 2%. Alle Zelllinien zeigten eine intensive immunzytochemischen PTEN Färbung. Die Zelllinie SK-BR-3 zeigte den geringsten LI-

LINE-1 Methylierungsgrad. Es wurden nur geringe Unterschiede im LINE-1 Methylierungsgrad von nicht-adhärennten und adhärennten Zellen festgestellt. KONKLUSION: Diese Daten deuten darauf hin, dass PTEN Promotorhypermethylierung keine Rolle in der Pathophysiologie von Krebsstammzellen der fünf untersuchten Zelllinien spielt und dass diese Zellen keine stärkere Hypomethylierung als adhärennte Zellen aufweisen. Außerdem erwies sich das HRM LINE-1 Assay als zuverlässige und schnelle Methode, um den genomweiten Methylierungszustand zu messen.

Abstract

BACKGROUND: The tumour stem cell hypothesis suggests that tumours arise from a small subcomponent of cells with stem cell like features, including self renewal, multilineage differentiation and high proliferation potential. Due to the expression of transmembrane exporter proteins and their quiescent state tumour stem cells are thought to be resistant against currently used chemotherapeutic agents. Therefore, a main task in improving cancer therapies is finding molecular alterations that are specifically deregulated in cancer stem cells. The tumour suppressor gene PTEN and its downstream signalling pathway PI3K/Akt/mTOR are thought to be the key regulators in the maintenance of normal stem cell function and its deregulation is thought to occur in the development of cancer stem cells. A well known epigenetic modification in cancer cells is hypermethylation of cytosine bases in the promoter region of tumour suppressor genes leading to transcriptional silencing of the affected gene. Beside aberrant hypermethylation of tumour suppressor genes, the genome wide content of methylcytosine is decreased in cancer cells. This background led to the following experimental design of our study. **MATERIAL/ METHODS:** The ability of cancer stem cells to survive and proliferate in anchorage independent conditions was used to enrich for putative cancer stem cells of the well established cancer cell lines MCF-7, SUM-159, SUM-1315, SK-BR-3 and MDA-MB-231. Under these conditions cancer stem cells proliferate and form spherical colonies that are termed mammospheres. Using the MethyLight (ML) and High-Resolution Melting (HRM) assay we evaluated the promoter methylation status of PTEN in these non-adherent cell cultures and compared them to cancer cells grown under adherent conditions. To get information about the genome wide methylation status of these cells we used the repetitive sequence LINE-1, which is highly methylated in normal cells and which can be used as a surrogate marker for the global methylation status of a cell. To get information about the PTEN protein expression

we used an immunocytochemical staining procedure. RESULTS: Neither the non-adherent nor the adherent cells showed PTEN methylation levels over 2%. No differences were found between the PTEN methylation level of non-adherent and adherent cells. Additionally, all cell lines showed intensive staining in the immunocytochemical PTEN assay. The cell line SK-BR-3 showed the lowest level of LINE-1 methylation. Small differences of the LINE-1 methylation status were detected between non-adherent and adherent growing cells, displayed in lower levels of LINE-1 methylation levels in non-adherent cells and vice versa. CONCLUSION: These data suggest that aberrant hypermethylation of PTEN does not play a specific role in the pathophysiology of putative breast cancer stem cells of the analysed cell lines and that genomic hypomethylation is not augmented in these cells. Aside from this, the HRM LINE-1 assay turned out to be a reliable and high throughput method to measure the methylation status of tumour cells.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	9
1.1	EPIDEMIOLOGIE VON BRUSTKREBS.....	9
1.2	KREBSSTAMMZELLHYPOTHESE UND BRUSTKREBSSTAMMZELLEN.....	9
1.3	PTEN UND SEINE ROLLE BEI BRUSTKREBSSTAMMZELLEN.....	11
1.4	DNA METHYLIERUNG.....	12
1.5	KERNFRAGEN DER STUDIE.....	14
2	MATERIAL UND METHODEN.....	15
2.1	VERWENDETE ZELLINIEN UND KULTURBEDINGUNGEN.....	15
2.1.1	<i>MCF-7.....</i>	<i>15</i>
2.1.2	<i>SUM-159.....</i>	<i>15</i>
2.1.3	<i>SUM-1315.....</i>	<i>15</i>
2.1.4	<i>SK-BR-3.....</i>	<i>16</i>
2.1.5	<i>MDA-MB-231.....</i>	<i>16</i>
2.1.6	<i>MDA-MB-231 ALDH +.....</i>	<i>16</i>
2.2	KULTIVIERUNG VON MAMMOSPHÄREN.....	18
2.3	DNA EXTRAKTION.....	19
2.4	BESTIMMUNG UND EINSTELLUNG DER DNA KONZENTRATION.....	19
2.5	BISULFITBEHANDLUNG UND AUFREINIGUNG DER DNA.....	20
2.6	METHYLIGHT ANALYSE.....	21
2.6.1	<i>Allgemeine Informationen.....</i>	<i>21</i>
2.6.2	<i>Optimierung der MethyLight Assays.....</i>	<i>21</i>
2.6.3	<i>Optimierte PCR Bedingungen.....</i>	<i>22</i>
2.6.4	<i>Primer und Sondensequenzen.....</i>	<i>23</i>
2.6.5	<i>Verdünnungsreihen.....</i>	<i>23</i>
2.6.6	<i>Berechnung des Methylierungsgrades.....</i>	<i>24</i>
2.7	HIGH-RESOLUTION MELTING ANALYSE.....	25
2.7.1	<i>Allgemeine Informationen.....</i>	<i>25</i>
2.7.2	<i>Optimierte PCR Bedingungen.....</i>	<i>25</i>
2.7.3	<i>Verdünnungsreihen.....</i>	<i>26</i>
2.7.4	<i>Primersequenzen und Amplikoninformationen.....</i>	<i>27</i>
2.7.5	<i>Bestimmung des Methylierungsgrades.....</i>	<i>27</i>
2.8	PTEN PROTEIN FÄRBUNG.....	30
2.9	STATISTISCHE ANALYSE.....	31
3	ERGEBNISSE.....	32
3.1	KULTIVIERUNG VON MAMMOSPHÄREN.....	32
3.2	PTEN HYPERMETHYLIERUNGSANALYSE.....	33

3.2.1	<i>MethyLight PTEN Assay</i>	33
3.2.2	<i>HRM PTEN Assay</i>	36
3.3	LINE-1 HYPOMETHYLIERUNGSANALYSE.....	38
3.3.1	<i>MethyLight LINE-1 Assay</i>	38
3.3.2	<i>HRM LINE-1 Assay</i>	42
3.4	PTEN PROTEIN FÄRBUNG.....	46
4	DISKUSSION	48
5	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	57
6	LITERATURVERZEICHNIS	59
7	GLOSSAR UND ABKÜRZUNGEN	70
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	72
9	TABELLENVERZEICHNIS	72

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie von Brustkrebs

Nach Schätzungen der WHO erkranken weltweit 1,2 Millionen Frauen pro Jahr an Brustkrebs (1). Damit stellt Brustkrebs mit 23% aller malignen Erkrankungen den häufigsten bösartigen Tumor der Frau dar (2). In den westlichen Ländern entwickelt ca. jede zehnte Frau im Laufe ihres Lebens Brustkrebs (1). In Österreich hat die Anzahl der jährlichen Neuerkrankungen in den letzten zehn Jahren leicht abgenommen und betrug im Jahr 2007 66,4/100.000 Frauen (3). Auch hinsichtlich der Mortalität nimmt Brustkrebs eine bedeutende Rolle ein. So stellt diese Erkrankung nach Lungenkrebs die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache der Frau dar. In Österreich betrug die Brustkrebsmortalität im Jahr 2007 17,8/100.000 Frauen und zeigte ähnlich der Inzidenz in den letzten Jahren einen leichten Abwärtstrend (4). Der Grund für diesen Rückgang liegt zum einen in verbesserten Früherkennungsprogrammen wie Mammographie Untersuchungen und zum anderen in Verbesserungen der verfügbaren Therapien. Im Gegensatz zu Tumoren im Frühstadium, hat sich die Prognose von fortgeschrittenen Mammakarzinomen in den letzten Jahren kaum verbessert. Ein Erklärungsmodell, weshalb die momentan angewandten Therapien häufig scheitern und es zu Rezidivierung und Metastasierung des Primärtumors kommt, liefert die Krebsstammzellhypothese.

1.2 Krebsstammzellhypothese und Brustkrebsstammzellen

Die Krebsstammzellhypothese geht davon aus, dass es innerhalb von Tumoren Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften gibt. Diese als Tumorstammzellen bezeichneten Zellen, die nur einen kleinen Anteil aller Tumorzellen darstellen, besitzen ein hohes Proliferationspotential, die Fähigkeit sich selbst zu erneuern und Zellen hervorzubringen, die in verschiedene Richtungen differenzieren können (1, 5–7). Diese Zellen sollen die Basis einer hierarchischen Gliederung der Tumorzellen darstellen und für die Aufrechterhaltung der verschiedenen Zellpopulationen innerhalb eines Tumors verantwortlich sein. Die Frage nach der Ursprungszelle, deren maligne Transformation zur Entstehung einer Tumorstammzelle führt, ist dabei nicht vollständig geklärt. Einerseits könnten normale Stammzellen die Ausgangszellen darstellen, da sie bereits die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen und lange genug überleben, um ausreichend Mutationen für eine maligne Entartung zu erlangen. Andererseits könnten auch differenziertere Zellen, die durch Mutationen die Ei-

genschaft der Selbsterneuerung zurückgewinnen, als Ursprungszellen dienen (8–11). Die Tatsache, dass nicht alle Zellen eines Tumors das gleiche Potential besitzen, einen neuen Tumor zu bilden, ist lange bekannt. Im Jahr 1977 untersuchten Hamburger und Salmon die Wachstumsfähigkeit von Tumorzellen auf Softagar und konnten dabei zeigen, dass nur eine von 10.000 Tumorzellen in der Lage ist als koloniebildende Einheit zu dienen (12). Die ersten *in vivo* Hinweise für die Stammzelltheorie lieferten Arbeiten aus dem Bereich der Hämatonkologie. Lapidot und Kollegen konnten zeigen, dass nur $CD34^+ CD38^-$ Leukämie Zellen das Potential besitzen nach Transplantation in NOD/SCID (= Non Obese Diabetes/Severe Combined Immunodeficiency) Mäuse erneut Leukämien zu induzieren (13). Es folgten darauf Studien, die Tumorstammzellen in soliden Tumoren identifizierten (14–17). Die erste Arbeit zu Stammzellen bei Brustkrebs stammt von Al-Hajj et al (18). Darin zeigten die Autoren, dass es innerhalb des heterogenen Gemisches von Brustkrebszellen einen kleinen Anteil mit dem Phänotyp $CD44^+ CD24^{-/low} Lineage^-$ gibt, von denen wenige Zellen reichen, um nach Transplantation in NOD/SCID Mäuse erneut einen Tumor, mit ähnlichem Phänotyp wie der Primärtumor, zu erzeugen. Auch nach seriellen Transplantationen konnten diese Zellen Tumore bilden, was für die Selbsterneuerungsfähigkeit dieses Zelltypus spricht. Im Gegensatz dazu konnten mehrere tausend Krebszellen ohne diesen Phänotyp keinen Tumor bilden. In der Folge wurden verschiedene Assays entwickelt, um Brustkrebsstammzellen entweder nach ihren Oberflächenmarkern zu isolieren oder nach ihren spezifischen Eigenschaften *in vitro* zu züchten (19). Ein von Dontu et al entwickelter Assay bezieht sich dabei auf die Fähigkeit von Stammzellen unter nicht-adhärenenten Kulturbedingungen zu überleben (20). Während differenzierte Epithelzellen in Apoptose gehen, können Stammzellen unter diesen Bedingungen proliferieren und Sphären bilden, die von Dontu et al dann in Folge als Mammosphären bezeichnet wurden. Nach diesem Prinzip gelang es Ponti et al Brustkrebsstammzellen von Primärtumoren und der etablierten Brustkrebszelllinie MCF-7 zu züchten (21). Sie zeigten in ihrer Arbeit, dass der oben beschriebene $CD44^+/CD24^-$ Brustkrebsstammzellphänotyp vermehrt innerhalb dieser Mammosphären zu finden ist. Krebsstammzellen werden in Zusammenhang mit Metastasierung, Rezidivierung und Therapieversagen gebracht. So konnten Balic et al in einer Arbeit zeigen, dass ein Großteil der metastasierten Brustkrebszellen den Stammzellphänotyp $CD44^+/CD24^-$ aufweist (22). Durch ihre geringe Proliferationsrate (23, 24) und die vermehrte Expression von membranständigen Transportproteinen (ATP binding cassette proteins: z.B. ABC-G2 = Breast Cancer Resistant Protein) (25–27) sollen Tumorstammzellen

resistenter gegenüber herkömmlichen Chemo- (28, 29) und Radiotherapien (30, 31) sein. Aus diesem Grund werden Signalwege gesucht, die spezifisch bei Krebsstammzellen verändert sind, um dadurch wirkungsvollere Therapien zu entwickeln. Die Ähnlichkeit zwischen normalen Stammzellen und Tumorstammzellen lassen allerdings Zweifel aufkommen, dass es möglich ist Therapien zu finden, die selektiv Tumorstammzellen zerstören und normale Stammzellen verschonen. Dennoch sind in den letzten Jahren diskrete Unterschiede zwischen normalen Stammzellen und Tumorstammzellen entdeckt worden, die Hoffnung auf neue Therapieansätze geben (32–38). Ein Signalweg der spezifisch bei Krebsstammzellen dereguliert ist, ist der PI3K/Akt/mTOR Signalweg, der vom Tumorsuppressorgen PTEN negativ reguliert wird.

1.3 PTEN und seine Rolle bei Brustkrebsstammzellen

PTEN (Phosphatase and Tensin homolog, lokalisiert auf Chromosom 10q23.3) zählt zu den meist mutierten Tumorsuppressorgenen (39, 40) und codiert für eine Lipidphosphatase, deren Hauptfunktion eine Dephosphorylierung von Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) zu Phosphatidylinositol-2-Phosphat (PI2P) ist. Bei einem Funktionsverlust von PTEN kommt es zu einer Akkumulation von PI3P und zu einer Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR Signalweges, der für eine Vielzahl von wichtigen Zellfunktionen, wie Zellzyklusregulation und Apoptose verantwortlich ist (39, 41). Ein Keimbahndefekt von PTEN führt zu angeborenen Tumorpredispositionssyndromen, wie dem Cowden Syndrom, dem Proteus Syndrom und dem Bannayan-Riley-Ruvalcaba Syndrom, die zusammengefasst als „PTEN Hamartoma Tumor Syndrome“ bezeichnet werden und deren Betroffene eine höhere Inzidenz von Brusttumoren zeigen (42–44). Bei sporadischen Brusttumoren kommt es in ca. 40% der Tumore zu einer Verminderung oder einem Verlust des PTEN Proteins (45) und ca. 40% der Brusttumore zeigen einen LOH (Loss Of Heterozygosity) für PTEN (46). Ein PTEN Protein Verlust soll mit einer schlechteren Prognose (47, 48) und mit einer Resistenz gegenüber Trastuzumab (49) korrelieren. In den letzten Jahren häuften sich die Hinweise, dass PTEN und der von ihm negativ regulierte PI3K/Akt/mTOR Signalweg eine zentrale Rolle in der Tumorstammzellbiologie spielen (50, 51). Yilmaz et al und Zhang et al konnten in einem Mausmodell zeigen, dass Knock-out von PTEN zu einem Verlust von normalen hämatopoetischen Stammzellen führte und sich darauffolgend Leukämien entwickelten, die von Tumorstammzellen ausgingen (52, 53). Durch den Einsatz von Rapamycin, einem mTOR Inhibitor, konnte dieser Effekt wie-

der rückgängig gemacht werden. Die Bedeutung von PTEN in der Aufrechterhaltung des normalen Stammzellpools wurde auch bei Hirn- (54), Prostata- (55) und Brusttumoren (51) gezeigt. Zwei Arbeiten von Zhou et al und Korkaya et al weisen auf die zentrale Rolle von PTEN und dem von ihm negativ regulierten PI3K/Akt/mTOR Signalweg in der Entstehung von Brustkrebsstammzellen hin. Zhou et al konnten bei der Brustkrebszelllinie MCF-7 mithilfe des Side Population Assays feststellen, dass ein Knockout von PTEN zu einer Vergrößerung des Tumorstammzellpools führt. Im Gegensatz dazu führte eine PTEN Überexpression zu einer verminderten in vivo Tumorigenität von MCF-7 Zellen (56). Zu einem ähnlichen Resultat gelangten Korkaya et al, die bei den Brustkrebszelllinien MCF-7 und SUM-159 zeigen konnten, dass ein PTEN Knockout durch eine Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges zu einer erhöhten Mammosphärenbildung führt und den Anteil der ALDH-high (= hohe Aldehyd Dehydrogenase Aktivität) Zellen (= vermeintliche Brustkrebsstammzellen) innerhalb dieser Mammosphären erhöht (57). Diese Studien weisen darauf hin, dass das Tumorsuppressorgen PTEN eine wesentliche Rolle in der Aufrechterhaltung des Brustkrebsstammzellpools spielt. Deshalb stellt sich die Frage, welche Mechanismen zu einer Veränderung der PTEN Expression führen.

1.4 DNA Methylierung

DNA Methylierung bezeichnet das kovalente Anfügen von Methylgruppen an DNA Basen. Dies wird von mehreren DNA Methyltransferasen (DNMTs) bewerkstelligt, die fast ausschließlich Cytosin unter Zuhilfenahme von S-Adenosylmethionin als Methylgruppenspendor in der Basenabfolge 5'-CpG-3' methylieren. Die Verteilung dieser CpG Dinukleotide variiert innerhalb des menschlichen Genoms (58). Während der Großteil der CpG Dinukleotide in Form von wenigen CpG Folgen über das gesamte Genom verstreut ist, kommt es zu einer Anhäufung von CpG Dinukleotiden (CpG Inseln) in der Promotorregion von ca. 50% der menschlichen Gene. Die über das Genom verteilten CpGs, von denen sich ein Großteil innerhalb von repetitiven Sequenzen wie LINEs (Long Interspersed Nucleotide Elements z.B. LINE-1), SINEs (Short Interspersed Nucleotide Elements z.B. ALU) oder Satelliten-DNA (z.B. SAT-alpha) befinden, sind in normalen Zellen gewöhnlich stark methyliert, wohingegen die CpG Inseln im Promotorbereich von transkribierten Genen unmethyliert sind. Dennoch kann es auch in normalen Zellen zu einer Hypermethylierung von bestimmten Genen kommen, was wichtige Aufgaben wie genomische Prägung, X-chromosomale Inaktivierung oder gewebsspezifische Expression

bestimmter Gene erfüllt (59). Die Methylierung von CpG Inseln im Promotorbereich bewirkt eine Aktivierung mehrerer Enzyme (Methylcytosinbindeprotein MeCP, Histondeacetylase, Histonmethyltransferase), die eine Verdichtung der Chromatinstruktur veranlassen. Dies führt konsekutiv zu einer Verminderung oder Abschaltung der Transkription des hypermethylierten Gens.

Im Vergleich zu normalen Zellen finden sich bei Krebszellen spezifische Veränderungen des Methylierungsmusters. Zum einen kommt es im Promotorbereich bestimmter Gene zu einer Hypermethylierung und anschließendem Verlust der Genexpression. Zum anderen ist der genomweite Gehalt an methylierten CpG Inseln herabgesetzt, was als genomweite Hypomethylierung von Krebszellen bezeichnet wird (60).

Es wird geschätzt, dass der Methylcytosingehalt einer Tumorzelle um ca. 20-60% erniedrigt ist (59). Diese genomweite Hypomethylierung soll schon früh in der Karzinogenese entstehen (61), mit Fortschreiten der Malignität zunehmen (62, 63) und unter anderem zur genomischen Instabilität von Tumoren beitragen (64–66). Die Demethylierung betrifft vor allem CpG Repeats innerhalb von repetitiven Sequenzen, die normalerweise stark methyliert sind. Da repetitive Sequenzen wie LINEs, SINEs oder Satelliten DNA mit ca. 45% einen Großteil des menschlichen Genoms ausmachen (67), kann ihr Methylierungsstatus als Surrogat für den genomweiten Methylierungsstatus dienen (68, 69). In unserer Studie analysierten wir aus diesem Grund die repetitive Sequenz LINE-1, um eine Hypomethylierung der untersuchten Zelllinien nachzuweisen.

Eine Hypermethylierung und darauffolgende transkriptionelle Inaktivierung wurde für eine Vielzahl von Tumorsuppressorgenen beschrieben und scheint einen bedeutenden Schritt in der Karzinogenese darzustellen. Die Hypermethylierung des Tumorsuppressorgens PTEN wurde bei einem weiten Spektrum von Tumoren der unterschiedlichsten Organe wie Hirn (70), Magen (71, 72), Dickdarm (73), Lunge (74), Schilddrüse (75), Ovarien (76) und Brust (77, 78) beschrieben und in Zusammenhang mit einer verminderten PTEN Expression gebracht.

Diese gut beschriebenen, veränderten Methylierungsmuster von Krebszellen und Hinweise, dass Veränderungen im PTEN/PI3K/Akt/mTOR Signalweg eine wichtige Rolle in der Biologie von Brustkrebsstammzellen spielen, führten zu folgenden Kernfragen unserer Studie.

1.5 Kernfragen der Studie

Nach Anlegen der nicht-adhärenenten Kultur zur Anreicherung von vermeintlichen Brustkrebsstammzellen aus den Zelllinien MCF-7, SK-BR-3, MDA-MB-231, SUM-159 und SUM-1315 mithilfe des Mammosphären Assays, verwendeten wir MethyLight (79) und High-Resolution Melting Assays (80), um folgende Fragen zu beantworten:

1. Ist die Hypermethylierung des PTEN Promotors in den nicht-adhärenenten MCF-7, SK-BR-3, MDA-MB-231, SUM-159 und SUM-1315 Kulturen detektierbar?
2. Gibt es Unterschiede im PTEN Methylierungsmuster zwischen nicht-adhärenent und adhärenent wachsenden Krebszellen?
3. Findet man in den nicht-adhärenenten MCF-7, SK-BR-3, MDA-MB-231, SUM-159 und SUM-1315 Kulturen eine Hypomethylierung der repetitiven Sequenz LINE-1?
4. Gibt es Unterschiede im LINE-1 Methylierungsmuster zwischen nicht-adhärenent und adhärenent wachsenden Krebszellen?

Mittels einer immunzytochemischen Färbung versuchten wir zusätzlich folgende Fragen zu beantworten:

5. Kommt es in den nicht-adhärenenten MCF-7, SK-BR-3, MDA-MB-231, SUM-159 und SUM-1315 Kulturen zu einem Verlust des PTEN Proteins?
6. Gibt es Unterschiede in der PTEN Expression zwischen nicht-adhärenent und adhärenent wachsenden Zellen?

Um beim MethyLight Assay die Menge an Input-DNA zu kontrollieren, benötigt man ein Referenzgen. Dafür verwendeten wir zum einen das Collagen 2a Gen (COL2a) und zum anderen die hochrepetitive Sequenz ALU. Dies führte zu folgender Frage:

7. Führt eine Verwendung von ALU als Referenzgen zu anderen Methylierungswerten als COL2a?

Um den Methylierungsstatus von PTEN und LINE-1 festzustellen, verwendeten wir sowohl den MethyLight als auch den High-Resolution Melting Assay, weshalb sich folgende Frage stellte:

8. Stimmen die Ergebnisse des MethyLight Assays mit jenen des High-Resolution Melting Assays überein?

2 Material und Methoden

2.1 *Verwendete Zelllinien und Kulturbedingungen*

2.1.1 MCF-7

Die Zelllinie MCF-7 stammt vom Pleuraerguss eines metastasierten Adenokarzinoms einer 69-jährigen Patientin. Als Charakteristika zeigt diese Zelllinie eine Expression des Östrogenrezeptors (ER), eine fehlende Expression des Progesteronrezeptors (PR), sowie eine fehlende HER2 Überexpression. Zusätzlich weist die Zelllinie eine Expression des WNT7B Onkogens und von Insulin Like Growth Factor Binding Proteinen (IGFBP 2, IGFBP 4, IGFBP 5) auf. Die Zellen wurden in MEM Medium mit dem Zusatz von 10% FBS, 1% Natrium Pyruvat und 1% Pen/Strep gezüchtet. Das Medium wurde zweimal pro Woche gewechselt und die Zellen einmal pro Woche gesplittet. Die Zelllinie wurde von der Firma ATCC (Manassas, USA) bezogen.

2.1.2 SUM-159

Die Zelllinie SUM-159 stammt von der Primärläsion eines anaplastischen Karzinoms der Brust. Die Zellen zeigen eine fehlende ER und PR Expression, sowie eine HER2 Überexpression und eine C-MYC Amplifikation. Als weiteres Charakteristikum zeigen die Zellen eine fehlende E-Cadherin Expression. Die Zellen wurden in Ham's F12 Medium mit dem Zusatz von 5% FBS, 5 µg/ml Insulin, 10 ng/ml EGF und 10 mM Hepes gezüchtet. Die Zellen wurden von der Firma Asterand (Detroit, USA) bezogen, das Medium wurde zweimal pro Woche gewechselt und die Zellen einmal pro Woche gesplittet.

2.1.3 SUM-1315

Die Zelllinie SUM-1315 stammt von der kutanen Metastase eines duktales Adenokarzinoms. Zu den Charakteristika zählen eine fehlende ER und PR Expression sowie eine HER2 Überexpression. Außerdem zeigt diese Zelllinie eine Überexpression des Epidermal Growth Factor Receptors (EGFR). Die Zellen wurden in Ham's F12 Medium mit dem Zusatz von 0,5% Insulin, 1% HEPES, 0,1% EGF und 5% FBS gezüchtet. Die Zelllinie wurde ebenfalls von der Firma Asterand bezogen. Das Medium wurde dreimal pro Woche gewechselt und die Zellen einmal pro Woche gesplittet.

2.1.4 SK-BR-3

Die Zelllinie SK-BR-3 stammt vom Pleuraerguss eines metastasierten Adenokarzinoms einer 43-jährigen Patientin. Die Zellen zeigen eine fehlende ER und PR Expression, sowie eine HER2 Überexpression. Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit Zusatz von 10% FBS gold und 1% Pen/Strep gezüchtet. Die Zellen wurden von der Firma ATCC bezogen, das Medium wurde zweimal pro Woche gewechselt und die Zellen einmal pro Woche gesplittet.

2.1.5 MDA-MB-231

Auch diese Zelllinie stammt vom Pleuraerguss eines metastasierten Adenokarzinoms einer 51-jährigen Patientin. Die Zellen zeigen eine fehlende ER, PR Expression und eine fehlende HER2 Überexpression. Außerdem zeigt diese Zelllinie eine EGF- und TGF-Rezeptor Expression und eine WNT7B Onkogen Expression. Die Zellen wurden in DMEM Medium mit dem Zusatz von 10% FBS gold und 1% Pen/Strep gezüchtet, wobei das Medium mindestens zweimal pro Woche gewechselt und die Zellen einmal pro Woche gesplittet wurden. Die Zellen wurden von der Firma ATCC bezogen.

2.1.6 MDA-MB-231 ALDH +

Aus der oben beschriebenen Zelllinie wurden unter Verwendung des ALDEFLUOR Assays (StemCell Technologies Inc., Grenoble, France) und der FACS Methode, Zellen mit erhöhter Aldehyd Dehydrogenase (ALDH) Aktivität gesammelt und unter denselben Bedingungen wie MDA-MB-231 gezüchtet. Eine erhöhte ALDH Aktivität stellt ein Charakteristikum von Brustkrebsstammzellen dar, weshalb diese Methode genutzt werden kann, um Brustkrebsstammzellen zu isolieren (81).

Alle Zellen wurden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ gezüchtet. Die Tabelle 1 auf Seite 18 dient der Übersicht der verwendeten Zelllinien und Kulturbedingungen.

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Zelllinien und Kulturmedien

<i>Zelllinie</i>	<i>Herkunft Tumor Metastase</i>	<i>Charakteristika</i>	<i>Medium</i>	<i>Zusätze</i>	<i>Vertreiber</i>
MCF-7	Mamma, 69a, w Adenokarzinom Pleuraerguss	ER+, PR-, HER2-, WNT7B	MEM	10% FBS, 1% Natrium Pyruvat, 1% Pen/Strep	ATCC
SUM-159	Mamma, w, Anaplastisches Karzinom	ER-, PR-, HER2 Überex- pression, C- MYC Amplifikation, EGFR +	Ham's F12	5% FBS, 5 µg/ml Insulin, 10 ng/ml EGF, 10 mM Hepes	Asterand
SUM-1315	Mamma, w, Duktales Karzinom Hautmetastase	ER-, PR-, HER2 Überex- pression, EGFR+	Ham's F12	5% FBS, 5 µg/ml Insulin, 1 µg/ml Hy- drocortison, 10mM Hepes	Asterand
SK-BR-3	Mamma, 43a, w Adenokarzinom Pleuraerguss	ER-, PR-. HER2 Überex- pression	RPMI 1640	10% FBS, 1% Pen/Strep	ATCC
MDA-MB- 231	Mamma, 51a, w, Adeno- karzinom Pleuraerguss	ER-, PR-, HER2-, EGFR+, TGFR+, WNT7B	DMEM	10% FBS, 1% Pen/Strep	ATCC

2.2 Kultivierung von Mammosphären

Die Kultivierung von Mammosphären ist ein spezielles Kulturverfahren, in welchem die Zellen unter nicht-adhärenenten Kulturbedingungen angezüchtet werden. Die folgende Beschreibung erfolgt in Anlehnung an die Arbeit von Dontu et al (20). Zunächst wurde der Überstand der adhärenenten Zelllinien, der frei schwebende Zellen enthält, abpipettiert und für 4 min bei 125 g zentrifugiert. Die Zellen wurden daraufhin zweimal mit PBS bei 125 g für 4 min gewaschen und in 5 ml serumfreien MEBM Medium (Lonza Bioscience, Basel, Schweiz) resuspendiert. Als Zusätze wurden 10 ng/ml FGF (Fibroblast Growth Factor, Peprotech, NY, USA), 20 ng/ml EGF (Epidermal Growth Factor, Peprotech), 20 ng/ml B27 (Invitrogen, Leek, Niederlande) und Heparin (1000 IE/ml, Invitrogen) verwendet. Nach der Bestimmung der Zellzahl mit dem CASY Cell Counter System (Innovatis, Reutlingen, Deutschland) wurden ca. $5 \cdot 10^4$ Zellen/ml Medium in Ultra Low Attachment Flasks (Corning, NY, USA) mit einer Größe von 25 cm² bzw. 75 cm² eingesetzt. Da ein antibiotikafreies Medium verwendet wurde, musste mit besonderer Vorsicht vorgegangen werden, um eine Kontamination der Zellen zu vermeiden. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und einmal pro Woche gesplittet bzw. das Medium gewechselt. Dazu wurden die Zellen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und wie oben beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und nach Zugabe von 1 ml TrypLE (Invitrogen) (25 cm² Flask) bzw. 2 ml (75 cm² Flask) wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C für 4 min inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 10 ml PBS resuspendiert, für 4 min bei 125 g zentrifugiert und der Überstand abpipettiert, um das Enzym zu inaktivieren. Zum Schluss wurden die Zellen mit MEBM Medium + Zusätze resuspendiert und in neues 25 cm² oder 75 cm² Ultra Low Attachment Flask gegeben bzw. bei einer Aufteilung der Zellen in zwei neue Fläschchen gegeben.

Die Mammosphären wurden nach unterschiedlichen Zeiten in Kultur (maximal acht Wochen) geerntet. Dazu wurde der gesamte Inhalt des Ultra Low Attachment Flask abpipettiert und für 4 min bei 125 g zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes und Zugabe von 1 ml (25 cm² Flask) bzw. 2 ml (75 cm²) TrypLE, wurden die Zellen für 4 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 2-10 ml PBS resuspendiert, für 4 min bei 125 g zentrifugiert und der Überstand abpipettiert, um das Enzym TrypLE zu inaktivieren. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mikroskopisch mittels der Fuchs Rosenthal Zählkammer (VWR, Wien, Österreich). Die Zellen wurden auf eine Zellzahl zwischen $1 \cdot 10^4$ - $1 \cdot 10^7$ eingestellt und in ein 1,5 ml Eppendorf Röhrchen transfe-

riert. Danach wurden die Zellen bei -20°C in PBS eingefroren oder gleich weiter verarbeitet. Die Abbildung 1 auf Seite 32 zeigt Bilder der unter nicht-adhärenenten Kulturbedingungen gezüchteten Zelllinien.

2.3 DNA Extraktion

Die DNA Extraktion erfolgte mit dem Gentra Puregene Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland). Dabei wurde nach den Anweisungen des mitgelieferten Protokolls vorgegangen. Zunächst wurden die Zellen für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abpipettiert und die Zellen in 200 μl PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 300 μl Cell Lysis Solution+ RNase A wurden die Zellen für zehn Sekunden gevortext. Um den Lyseprozess zu verbessern, wurde das Gemisch mithilfe einer 5 ml Spritze (BD, New Jersey, USA) mit Nadel (Größe 14, Braun, Melsungen, Deutschland) mehrfach aspiriert und resuspendiert. Nach Zugabe von 1,5 μl RNase A Solution und mehrmaligem Schwenken des Gefäßes wurde das Lysat zunächst für 5 min bei 37°C und anschließend für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 100 μl Protein Präzipitationslösung beigegeben und das Röhrchen für 20 Sekunden gevortext. Danach erfolgte ein einminütiger Zentrifugationsschritt bei 16.000 g. Der davon gewonnene Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Röhrchen mit 300 μl vorgelegtem Isopropanol pipettiert und das Röhrchen ca. 50mal geschwenkt. Nachfolgend wurde das Gemisch für eine Minute bei 16.000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen, 300 μl 70% Ethanol beigegeben und das Gefäß mehrmals geschwenkt, um das entstandene Pellet zu waschen. Danach erfolgte eine einminütige Zentrifugation bei 16.000 g. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet für 10-15 min bei Raumtemperatur getrocknet. Daraufhin wurden 50 μl TE pH 8 beigegeben und fünf Sekunden gevortext. Nach einer einstündigen Inkubation bei 65°C wurden die Röhrchen für eine bessere Lösung der DNA über Nacht bei Raumtemperatur auf einen Schüttelinkubator gestellt.

2.4 Bestimmung und Einstellung der DNA Konzentration

Die DNA Konzentration wurde mithilfe des Eppendorf Biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Es wurden dabei 3 μl auf eine Mikroliter Meßzelle (Implen, München, Deutschland) aufgetragen und die Extinktion bei 260 nm (OD260) gemessen. Um die Reinheit der gewonnenen DNA zu kontrollieren wurde die OD260/OD280 Ratio bestimmt. Proben, die eine OD260/OD280 Ratio unter 1,7 bzw. über 2,0 aufwiesen, wurden verworfen. Ebenso wurden Proben, die eine DNA Konzentration unter 50 ng/ μl aufwiesen,

nicht weiter verwendet. Die DNA Konzentration wurde für die nachfolgende Bisulfitbehandlung auf eine Konzentration von 100 ng/µl eingestellt.

2.5 Bisulfitbehandlung und Aufreinigung der DNA

Die Bisulfitbehandlung von DNA führt zu einer Umwandlung von unmethylierten Cytosinbasen in Uracil während methylierte Cytosinbasen bestehen bleiben. Durch diesen Schritt wird die epigenetische Information der DNA Methylierung in eine genetische Information in Form einer Basenänderung übertragen. Somit können durch Analyse der DNA Sequenz Informationen über den Methylierungszustand der DNA gewonnen werden. Die DNA Bisulfitbehandlung wurde mit Hilfe des Epiect Bisulfit Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Dabei wurde nach den Anweisungen des mitgelieferten Protokolls vorgegangen. In ein 250 µl PCR Röhrchen wurden 10 µl DNA (c = 100 ng/µl), 10 µl RNase freies Wasser, 85 µl Bisulfit Mix und 35 µl DNA Protect Buffer eingesetzt, kurz gevortext und danach unter folgenden Bedingungen in den Thermocycler (MyCycler, Biorad, Hercules, USA) gegeben: 5 min Denaturierung bei 95°C, 25 min Inkubation bei 60°C, 5 min Denaturierung bei 95°C, 85 min Inkubation bei 85°C, erneute Denaturierung für 5 min bei 95°C, 175 min Inkubation bei 60°C und am Ende durchgehend 20°C bis zur Entnahme der Röhrchen. Danach erfolgte die automatische Aufreinigung der Bisulfit-behandelten DNA mittels QIAcube von der Firma Qiagen. Dazu wurden die Proben kurz zentrifugiert, in ein 2 ml Microzentrifugen Röhrchen (Qiagen) transferiert und im QIAcube platziert. Danach erfolgte die Beladung der QIAcube Rotor Adapter mit den Epiect Spin Columns (Qiagen) und einem 1,5 ml Sarstedt Eluierungsröhrchen (Nümbrecht, Deutschland). Um den DNA Verlust zu vermindern, wurde zusätzlich ein 1,5 ml Sarstedt Röhrchen mit Carrier RNA (c = 250 ng/µl) eingesetzt. Die vom QIAcube automatisch durchgeführten Schritte umfassten zunächst die Beigabe von 560 µl Buffer BL. Anschließend erfolgte der Transfer auf die Epiect Spin Columns und eine einminütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit. Danach erfolgten die Beigabe von 500 µl Buffer BD und eine Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur. Daraufhin wurden 500 µl Buffer BW hinzugefügt und das Röhrchen für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Danach wurde die DNA in zwei Schritten mit jeweils 20 µl Buffer EB und einminütiger Zentrifugation bei 15.000 g gelöst. Das daraus gewonnene Eluat wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert.

2.6 MethyLight Analyse

2.6.1 Allgemeine Informationen

Zur Bestimmung des Methylierungsgrades wurde zunächst die MethyLight Methode verwendet. Es handelt sich hierbei um ein Fluoreszenz-basiertes, quantitatives Real-time PCR Verfahren. Für das Fluoreszenzsignal sorgt dabei ein Oligonukleotid, das sowohl an seinem 5`Ende (FAM) als auch an seinem 3`Ende (TAMRA) mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert ist. Ist die Sonde intakt entsteht kein Fluoreszenzsignal, weil das emittierte Signal des FAM Farbstoffes nach dem Reporter- Quencher Prinzip vom TAMRA Farbstoff absorbiert wird. Wird das Oligonukleotid durch die 5`- 3` Exonukleaseaktivität der Taq Polymerase zerstört, kann der TAM Farbstoff, der nun alleine vorliegt, ungehindert Licht mit einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Je mehr Proben also degradiert wurden bzw. je mehr DNA amplifiziert wurde, umso stärker wird das Fluoreszenzsignal.

Zur Bestimmung des Methylierungsgrades einer unbekanntes DNA Probe werden methylierungsspezifische Primer und Sonden verwendet. Diese Methylierungsspezifität wird erreicht, indem die Primer bzw. die Sonden so gewählt werden, dass sie mindestens einen CpG Abschnitt einschließen. Je größer die Menge an eingesetzter methylierter DNA, umso früher erhält man demnach ein Fluoreszenzsignal. Um den Anteil an methylierter DNA in der Probe zu quantifizieren, benötigt man bei jedem Lauf eine 100% methylierte Referenz DNA (Chemicon, Millipore, Billerica, MA, USA) und eine am entsprechenden Locus vollständig unmethylierte DNA (Leukozyten DNA für PTEN, universal unmethylierte DNA von Qiagen für LINE-1). Da unterschiedliche Mengen an Input-DNA zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen könnten, benötigt man zusätzlich ein Referenzgen, das bei jeder einzelnen Probe mituntersucht wird. Als Referenzgen wurde zunächst das Collagen 2a Gen (COL2a) gewählt. Als zweites Referenzgen wurde eine von Weisenberger et al (68) vorgestellte ALU Konsensussequenz genommen. Im Vergleich zu COL2a handelt es sich hierbei um eine hochrepetitive DNA Sequenz. Dies soll die Bestimmung der tatsächlichen DNA Input Menge verbessern, weil es stabiler gegenüber chromosomalen und genetischen Veränderungen ist, als ein pro Genom zweifach vorkommendes Referenzgen.

2.6.2 Optimierung der MethyLight Assays

Bevor mit der Analyse unbekannter Proben begonnen wurde, fand eine Optimierung der MethyLight Assays statt. Dabei wurden die idealen Primer- und Sondenkonzentration, die

Menge der einzusetzenden bisulfitierten DNA, die ideale Annealing-Temperatur und die Effizienzen der einzelnen PCR Reaktionen ermittelt. Für LINE-1 und ALU wurden fünf verschiedene Primerkonzentrationen zwischen 0,1 μM und 0,5 μM getestet. Als nächster Schritt fand eine Optimierung der idealen Sondenkonzentration statt. Dabei wurden für beide Marker drei verschiedene Sondenkonzentrationen von 0,1 μM bis 0,3 μM Endkonzentration getestet. Für ALU erfolgte zusätzlich die Optimierung der Annealing-Temperatur. Dabei wurden drei verschiedene Annealing-Temperaturen zwischen 50°C und 52°C getestet. Die optimalen PCR Bedingungen des MethyLight PTEN und COL2a Assays wurden schon für eine frühere Arbeit bestimmt und konnten deshalb übernommen werden. Als letzter Schritt erfolgte die Bestimmung der PCR Effizienz für jeden einzelnen Marker. Dazu wurde universal methylierte DNA (Chemicon) seriell verdünnt. Die Menge der eingesetzten DNA für PTEN und COL2a betrug danach 50 ng, 10 ng, 2 ng und 0,4 ng, für LINE-1 10 ng, 1 ng, 0,1 ng und 0,01 ng und für ALU 10 ng, 0,4 ng, 0,016 ng und 0,00064 ng. Um die Spezifität der LINE-1 PCR Reaktion zu überprüfen, wurde zusätzlich eine Gel Elektrophorese des PCR Produktes durchgeführt.

2.6.3 Optimierte PCR Bedingungen

Alle Versuche wurden am LightCycler 480 der Firma Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Der PCR Ansatz für PTEN beinhaltete folgende Komponenten: Gesamtvolumen 20 μl , eingesetzte DNA 2 μl mit einer Konzentration von 25 ng/ μl , 10 μl LightCycler 480 Probes Master 2x (Roche Applied Science) (enthält festgelegte Menge an FastStart Taq Polymerase, Reaction Buffer, dNTP und 6,4 mM MgCl_2), jeweils 1 μl Primer Forward (Fw) und Reverse (Rv) mit einer Endkonzentration von 0,5 μM , 0,4 μl Sonde mit einer Endkonzentration von 0,2 μM und Aqua destillata ad 20 μl .

LINE-1: Gesamtvolumen 20 μl , eingesetzte DNA 1 μl mit einer Konzentration von 10 ng/ μl , 10 μl LightCycler 480 Probes Master 2x, jeweils 0,8 μl Primer Fw und Rv mit einer Endkonzentration von 0,5 μM , 0,4 μl Sonde mit einer Endkonzentration von 0,2 μM und Aqua destillata ad 20 μl .

ALU: Gesamtvolumen 20 μl , eingesetzte DNA 1 μl mit einer Konzentration von 0,4 ng/ μl , 10 μl LightCycler 480 Probes Master 2x, jeweils 1 μl Primer Fw und Rv mit einer Endkonzentration von 0,5 μM , 0,4 μl Sonde mit einer Endkonzentration von 0,2 μM und 6,6 μl Aqua destillata.

COL2a: Gesamtvolumen 20 μl , eingesetzte DNA 2 μl mit einer Konzentration von 25 ng/ μl , 10 μl LightCycler 480 Probes Master 2x, jeweils 1 μl Primer Fw und Rv mit einer

Endkonzentration von 0,5 μM , 0,4 μl Sonde mit einer Endkonzentration von 0,2 μM und 5,6 μl Aqua destillata.

Alle Proben wurden als Duplikate angelegt. Bei jedem Lauf wurde eine Probe mit universal methylierter DNA, die zur späteren Berechnung des PMR (siehe Punkt 2.6.6 auf Seite 24) dient, mitgeführt. Weiters beinhaltete jeder Lauf eine Probe mit unmethylierter DNA, die als Kontrolle für eine spezifische Amplifikation von methylierter DNA diente, sowie zwei NTCs (= Non Template Controls), um eine Kontamination auszuschließen. Die einzelnen Komponenten wurden in eine LightCycler 480 Multiwell Plate 96 (weiss) pipettiert, die anschließend mit einer LightCycler 480 Sealing Foil bedeckt und 30 sec bei 900 g zentrifugiert wurde. Danach wurde die Platte im LightCycler 480 platziert und der Lauf unter folgenden Bedingungen gestartet: Detection Format: Monocolor Hydrolysis Probes Block Type 96, Reaction Volume 20 μl , Präinkubation 95°C, Amplifikation: 45 Zyklen mit 10 sec 95°C, Annealing 30 sec bei variabler Temperatur (siehe unten) und 1 sec 72°C, Cooling 10 sec bei 40°C.

Die Annealing Temperatur betrug für PTEN 63°C, für LINE-1 und COL2a 60°C und für ALU aufgrund der geringeren Sondenlänge 52°C.

2.6.4 Primer und Sondensequenzen

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die Primer bzw. Sondensequenzen, sowie die GenBank Nummer sind in Tabelle 2 auf Seite 29 ersichtlich. Die Primer für PTEN wurden so gewählt, dass das PTEN Pseudogene (Chr9p21) nicht amplifiziert wird (82, 83). Die LINE-1 Primer und Sonden wurden selbst designed. Die Sequenzen von COL2a wurden aus einem Paper von Widschwendter et al (84) übernommen. Die ALU Primer und Sonden Sequenzen wurden aus dem bereits oben angeführten Paper von Weisenberger et al (68) übernommen.

2.6.5 Verdünnungsreihen

Vor der Analyse unbekannter Proben, wurden Verdünnungsreihen von universal methylierter DNA gemischt mit unmethylierter DNA untersucht. Zum einen kann damit die Sensitivität der Methode, also die Fähigkeit methylierte DNA im Hintergrund von unmethylierter DNA zu entdecken, überprüft werden. Zum anderen kann die Linearität des Assays und damit die Genauigkeit der späteren Berechnung des PMR (= percentage of fully methylated reference, siehe Punkt 2.6.6 auf Seite 24) überprüft werden. Für PTEN wurde dabei universal methylierte DNA (Chemicon) mit Leukozyten DNA auf eine Kon-

zentration von 100%, 50%, 25%, 10%, 1%, 0,1% und 0% verdünnt. Für LINE-1 wurde universal methylierte DNA (Chemicon) mit universal unmethylierter DNA (Qiagen) auf eine Konzentration von 100%, 75%, 50%, 10% und 0% verdünnt. Die DNA-Konzentration der einzelnen Verdünnungsschritte, die in die PCR eingesetzt wurde, betrug dabei für PTEN 25 ng/ μ l und für LINE-1 10 ng/ μ l.

2.6.6 Berechnung des Methylierungsgrades

Zur Berechnung des Methylierungsgrades wurde zunächst der Cq Wert (= Quantification Cycle) der Proben bestimmt. Dieser Cq Wert entspricht dem PCR Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal der Probe das erste Mal signifikant über das Hintergrund-Fluoreszenzsignal steigt. Zur Berechnung der Cq Werte für PTEN und COL2a wurde die Absolute Quantification/Second Derivate Maximum Methode der LightCycler 480 Software (Version 1.5) verwendet. Der Cq Wert wird bei dieser Methode als jener Wert definiert, bei dem die zweite Ableitung der Fluoreszenzsignalkurve ein Maximum erreicht, d.h. jener PCR Zyklus bei dem die Steigung der Kurve am größten ist. Für die Cq Wert Bestimmung von LINE-1 und ALU wurde die Absolute Quantification Methode Fit Points verwendet. Wie sich bei einer vorher untersuchten Verdünnungsreihe zeigte, scheint diese Methode besser geeignet zu sein, um unterschiedliche Methylierungsgrade von LINE-1 als Veränderungen des Cq Wertes anzuzeigen. Zusätzlich kann bei der Fit Points Methode der Schwellenwert des Fluoreszenzsignals selbst gewählt werden.

Die daraus gewonnenen Cq Werte wurden zur weiteren Berechnung in das Tabellenprogramm Excel (Microsoft, Redmond, USA) transferiert. Die Berechnung des Methylierungsgrades einer unbekannt Probe erfolgte anschließend nach der $\Delta\Delta$ Cq Methode. Dabei wird zunächst der Cq Wert des Referenzgens (COL2a oder ALU) vom Cq Wert des Zielgens (PTEN oder LINE-1) subtrahiert (= Δ Cq). Anschließend wird eine Ratio aus 1 durch die Effizienz hoch delta Cq gebildet. Als Effizienz wurde dabei der Mittelwert der Effizienzen der beiden untersuchten Marker verwendet. Danach wurde die Ratio der unbekannt Probe durch die Ratio der 100% methylierten Probe dividiert, um den PMR (= percentage of fully methylated reference) Wert zu erhalten. Dieser Wert entspricht dem Anteil der Ratio der unbekannt Probe an der Ratio der 100% methylierten Referenz-DNA und spiegelt den Anteil der vollständig methylierten DNA Moleküle in der unbekannt Probe wider. Proben, bei denen der Cq Wert des Referenzgens deutlich über dem Wert der anderen Proben lag (> 3 Zyklen), wurden von der weiteren Analyse ausgeschlos-

sen, da dies auf eine zu geringe Menge an Input-DNA bzw. auf eine schlechte DNA Qualität hinweist.

2.7 High-Resolution Melting Analyse

2.7.1 Allgemeine Informationen

Bei der High-Resolution Melting Analyse handelt es sich um ein Post-PCR-Verfahren, das die Schmelzeigenschaften von DNA nutzt, um Sequenzunterschiede zu detektieren. In einem ersten Schritt wird die bisulfitierte DNA methylierungsunabhängig amplifiziert, d.h. es werden Primer verwendet, die sowohl an methylierte als auch an unmethylierte DNA binden. Dazu muss die Primersequenz so gewählt werden, dass sie keine bzw. nur wenige am 5' Ende befindliche CpG Sequenzen enthält. Der zweite Schritt dieses Verfahrens besteht aus einer Schmelzanalyse der amplifizierten DNA. Wie oben beschrieben, werden unmethylierte Cytosinbasen durch die Bisulfit-Behandlung in Uracil umgewandelt, wohingegen methylierte Cytosinbasen erhalten bleiben. Während der Amplifikation der PCR paart sich Uracil mit Adenin. Im Gegensatz zu Cytosin und Guanin sind Uracil (bzw. Thymin) und Adenin nur durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen verbunden. Dieser Unterschied spiegelt sich später in einem veränderten Schmelzverhalten des Amplikons wider. So schmilzt unmethylierte DNA (enthält keine Cytosine, sondern nur Thymine) nach der Bisulfitbehandlung früher als methylierte DNA (enthält auch Cytosine). Um diesen Prozess in Echtzeit zu verfolgen, werden DNA interkalierende Farbstoffe verwendet. Diese fluoreszierenden Farbstoffe binden nur an doppelsträngige DNA. Schmilzt diese doppelsträngige DNA, können die Farbstoffmoleküle nicht mehr binden und das Fluoreszenzsignal nimmt stark ab. Um Unterschiede in der Basensequenz des Amplikons zu detektieren, ist es notwendig die Änderungen des Fluoreszenzsignals möglichst genau, d.h. mit möglichst vielen Messungen pro Zeit- bzw. Temperatureinheit zu detektieren. Indem man die unbekannte Probe mit einer Verdünnungsreihe aus vollständig methylierter und unmethylierter DNA vergleicht, können semiquantitativ Informationen über den Methylierungsgrad der unbekannt Probe gewonnen werden.

2.7.2 Optimierte PCR Bedingungen

Alle Versuche wurden am LC480 der Firma Roche durchgeführt. Der PCR Ansatz für PTEN beinhaltete folgende Komponenten: Gesamtvolumen 20 µl, bestehend aus 2 µl DNA mit einer Konzentration von 25 ng/µl, 10 µl LightCycler 480 High-Resolution Melting

Master Mix 2x (beinhaltet FastStartTaq DNA Polymerase, Reaction Buffer, dNTP Mix und High-Resolution Melting Dye), jeweils 0,8 µl Forward und Reverse Primer mit einer Endkonzentration von 0,2 nmol/l, 25 nmol/l MgCl₂ und 4 µl AD.

Die Bedingungen für LINE-1 waren: Gesamtvolumen 20 µl, bestehend aus 1 µl DNA mit einer Konzentration von 10 ng/µl, 10 µl LightCycler 480 High-Resolution Melting Master Mix 2x, jeweils 0,8 µl Primer Forward und Reverse mit einer Endkonzentration von 0,2 nmol/l; 25 nmol/l MgCl₂ und 4 µl AD. Die Light Cyler 480 Multiwell Plate 96 (weiß) wurde mit einer LightCycler 480 Sealing Foil zugeklebt, für 30 sec bei 900 g zentrifugiert und in den LightCycler 480 gegeben. Die PCR Amplifikation fand für PTEN unter folgenden Bedingungen statt: Detection Format: SYBR Green One, Denaturierung 95°C für 10 min, Amplifikation 50 Zyklen mit 95°C für 10 sec, ein Touchdown Annealing mit 64-58°C für 10 sec (1°C/ Zyklus) und 72°C für 20 sec. Im Anschluss fand die Melting Phase unter folgenden Bedingungen statt: 95°C für 1 min, 40°C für 1 min, 74°C für 5 sec und danach kontinuierliche Anhebung auf 90°C mit 25 Fluoreszenzdetektionen pro Grad.

Die PCR Amplifikation fand für LINE-1 unter folgenden Bedingungen statt: Detection Format: SYBR Green One, Denaturierung 95°C für 10 min, Amplifikation 50 Zyklen mit 95°C für 10 sec, 63°C für 10 sec und 72°C für 20 sec. Im Anschluss fand die Melting Phase unter folgenden Bedingungen statt: 95°C für 1 min, 40°C für 1 min, 70°C für 5 sec und danach kontinuierliche Anhebung auf 90°C mit 25 Fluoreszenzdetektionen pro Grad.

Die Proben wurden jeweils als Duplikate angelegt, um die Variabilität innerhalb des Assays zu kontrollieren. Zusätzlich wurden bei jedem Lauf mindestens zwei NTCs (= Non Template Controls) mitgeführt.

2.7.3 Verdünnungsreihen

Bei jedem HRM Lauf wurde zusätzlich eine Verdünnungsreihe aus vollständig methylierter DNA (Chemicon) gemischt mit unmethylierter DNA (Leukozyten DNA für PTEN bzw. universal unmethylierte DNA von Qiagen für LINE-1) mituntersucht. Dabei erhält man einerseits eine Vergleichskurve für die unbekanntes Proben, andererseits kann die Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Assays überprüft werden. Indem exakt dieselbe Verdünnungsreihe bei mehreren unabhängigen HRM Läufen untersucht wurde, konnten auch Informationen über die Interassay Variabilität gewonnen werden. Universal methylierte DNA wurde für das PTEN Assay auf eine Konzentration von 100%, 50%, 25%, 10%, 1% 0,1% und 0% verdünnt. Für LINE-1 wurde eine Verdünnungsreihe mit 100%, 75%, 50%, 25%, 10% und 0% methylierter DNA erstellt.

2.7.4 Primersequenzen und Amplikoninformationen

Die Primersequenzen von PTEN (GenBank accession number AF143312) wurden wie bei MethyLight unter Berücksichtigung des PTEN Pseudogenes (82, 83) gewählt. Die Primersequenzen und die GenBank Nummer sind in Tabelle 3 auf Seite 29 ersichtlich.

2.7.5 Bestimmung des Methylierungsgrades

Die Bestimmung des Methylierungsgrades der unbekannt Proben erfolgte mithilfe des Gene Scanning bzw. Tm Calling Programms der LC 480 Software (Version 1.5). Für eine Normalisierung des Schmelzkurvensignals wurden die Grenzen des Pre- und Post-Melt-Sliders für PTEN auf eine Temperatur von 76,1-76,5°C bzw. 82,7-83,7°C und für LINE-1 auf eine Temperatur von 76,1-76,5°C bzw. 81-82°C eingestellt. Die Bestimmung des Methylierungsgrades einer unbekannt Probe erfolgte zunächst rein optisch, indem die Schmelzkurve der unbekannt Probe mit den Schmelzkurven der Verdünnungsreihe verglichen wurde. Um einen genaueren Wert des Methylierungsgrades zu erhalten wurde danach folgendermaßen vorgegangen: Zunächst wurden die Daten der Schmelzanalyse, die aus den bei den jeweiligen Temperaturen gemessenen Fluoreszenzsignalwerten bestehen, in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft) transferiert. Danach wurde ein Temperaturwert gewählt, bei dem sich die Verdünnungsreihe optisch gut auftrennte und die dazugehörigen Fluoreszenzwerte der Verdünnungsreihe zur weiteren Analyse herangezogen. Es wurde der Mittelwert der beiden Duplikate (= relatives Fluoreszenzsignal) gebildet und anschließend das Fluoreszenzsignal der vollständig unmethylierten DNA vom Fluoreszenzsignal der anderen Verdünnungsstandards abgezogen, um ein normiertes Fluoreszenzsignal zu erhalten. Danach wurde ein Diagramm erstellt, in dem die normierten Fluoreszenzsignalwerte gegen den Input an methylierter DNA eingetragen wurden. Diese Datenpunkte wurden einer Regressionsanalyse unterzogen und die daraus gewonnene Formel zur Berechnung der unbekannt Proben verwendet. Es kann vorkommen, dass der Abfall des Fluoreszenzsignals besser durch eine polynomische als durch eine lineare Regression beschrieben wird. Bei den von uns verwendeten HRM PTEN und LINE-1 Assays wurde der Abfall des Fluoreszenzsignals allerdings am besten durch eine lineare Regression beschrieben (siehe Abbildung 4 und Abbildung 8). Den Methylierungsgrad einer unbekannt Probe erhält man daraufhin, indem man den normierten Fluoreszenzwert der Probe in die Formel einsetzt, die man aus der Regressionsanalyse erhalten hat. Voraussetzung für diese Berechnung ist, dass der Schmelzkurvenverlauf der unbekannt Probe jenen der

Verdünnungsstandards gleicht. Ist dies nicht der Fall, muss von einer heterogenen Methylierung ausgegangen werden und es kann nur eine optische Beschreibung der Schmelzkurve erfolgen. Proben, die eine zu geringe Menge an Input-DNA enthielten, was sich in Form eines deutlich höheren C_q Wertes (> 3 Zyklen) widerspiegelte, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Tabelle 2: MethyLight Primer- und Sondensequenzen und GenBank Nummer

Name	Primer- und Sondensequenz (5' - 3')	GenBank No
PTEN	FW ATTTGGAGTTCGAGGGGAAAGATG RV TATAAATAAAAACGCACCCCGCAAAC Sonde TCTCCTACGCCCGCTCCGATACCC	AF406618
LINE-1	FW GTTAGATAGTGGGCGTAGGTTATTG RV TTACGCTTCCCAAATAAAACAATACC Sonde CCTACTTCGACTCGCGCACGATACG	X52235
ALU	FW GGTTAGGTATAGTGGTTTATATTTGTAATTTTAGTA RV ATTAACTAACTAATCTTAAACTCCTAACCTCA Sonde CCTACCTTAACCTCCC	Konsensussequenz (68)
COL2a	FW TCTAACAATTATAAACTCCAACCACCAA RV GGGAAGATGGGATAGAAGGGAATAT Sonde CCTTCATTCTAACCCAATACCTATCCCACCTCTAAA	L10347 (84)

Tabelle 3: HRM Primersequenzen und GenBank Nummer

Name	Primersequenz (5' -3')	GenBank No
PTEN	FW TCGGTTGGGTTTTTGGGTAGAGG RV CGCAAACCTACTAAACATACCCAATAT	AF406618
LINE-1	FW GGGGGAGGAGTTAAGATGGT RV AAATACAAAAATCACCCGTCTTCTA	X52235

2.8 PTEN Protein Färbung

Zur Herstellung eines Paraffin-Zelllinien-Blocks wurden humanes Citrat Plasma und Thromborel S (Siemens, Deerfield, USA) zum Zellpellet gegeben. Danach wurden die Zellen mit 3,7% Formaldehyd fixiert, automatisch im Histokinet (Tissue Tek, Sanova, Wien, Österreich) entwässert und in Paraffin eingebettet. Die mit dem Mikrotom HM 360 (Olympus, Tokyo, Japan) erzeugten 3 µm Schnitte wurden auf einen Objektträger aufgezogen und anschließend bei +70°C über Nacht zum Antrocknen inkubiert. Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte anschließend für 20 min in Xylol eingelegt, danach je 2 min in eine absteigende Alkoholreihe mit 100%, 96%, 70% und 50%. Anschließend wurden die Schnitte 3*3 min in PBS gewaschen und die Position der Zellen mit einem Stift markiert. Ein Antigen Retrieval erfolgte im Wasserbad bei 98°C für 30 min. Daraufhin wurden die Objektträger 20 min bei Raumtemperatur abgekühlt, kurz mit Aqua destillata gespült und danach wieder 3*3 min in PBS gewaschen. Nach einer Blockierung der endogenen Peroxidase in 1% H₂O₂ (mit Methanol verdünnt), und erneutem Waschschrift in PBS, erfolgte der Serumblock mit 6% BSA-PBS mit 1:50 Horse Serum (Biochrom AG, Berlin, Deutschland). Dabei wurden pro Schnitt 300 µl für 20 min aufgebracht. Danach wurde das Serum abgeleert, 80 µl 1:70 verdünnter Primär Antikörper (Rb pAB to PTEN; ab31392-100; Firma Abcam, Cambridge, UK) aufgetragen und für eine Stunde bei RT inkubiert. Zur Herstellung von negativ Kontrollen, wurde 1:70 verdünnte Universal Negative Control For Rabbit Antibodies (#N1699, Dako Envision, Glostrup, Dänemark) auf die Schnitte aufgebracht und ebenfalls für eine Stunde inkubiert. Die Antikörper wurden mit einem Antibody Diluent (Dako Envision) verdünnt. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Schnitte 3*3 min in PBS gewaschen und 3 Tropfen DAKO EnVision HRP (= Horseradish Peroxidase) auf die Schnitte aufgetragen und 30 min bei RT inkubiert. Nach einem neuerlichen Waschschrift mit PBS für 3*3 min, wurden 150 µl 1:50 in Substratbuffer verdünntes DAB Chromogen (Dako) auf die Schnitte aufgetragen und für 8 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit PBS gestoppt, die Schnitte für 7 Sekunden in Hämatoxylin nach Mayer eingelegt und eine Minute mit Leitungswasser gebläut. Danach erfolgte ein Entwässerungsschritt mit je 2 min in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 96%, 100%). Am Ende wurden die Schnitte für ca. 2 min in Butylacetat gegeben und mit Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

Die Beurteilung der Intensität der Färbung erfolgte mikroskopisch. Dabei wurde die negativ Kontrolle der jeweiligen Zelllinie als Referenz genommen. Die Stärke der Färbung wurde mit + bis ++++ angegeben. Zusätzlich wurden der Prozentsatz der angefärbten Zellen und die Lokalisation (zytoplasmatisch oder nukleär) dokumentiert. Die Fotos der Immunzytochemie wurden mithilfe des Olympus BX51 Mikroskops und der Cell D Foto-software (Olympus) erstellt.

2.9 Statistische Analyse

Für die deskriptive Statistik wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Excel 2003 (Microsoft) verwendet. Für die PMR- (MethyLight) bzw. Methylierungswerte (HRM) wurde zunächst der Mittelwert der beiden Duplikate gebildet und danach der Mittelwert der beiden PCR Läufe. Die Korrelationsanalysen und der Levene Test auf Varianzhomogenität wurden unter Zuhilfenahme des Statistikprogramms SPSS (Version 16.0, SPSS, Chicago, USA) durchgeführt, wobei ein p-Wert unter 5% als statistisch signifikant angesehen wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Kultivierung von Mammosphären

Von den fünf untersuchten Zelllinien bildeten lediglich die Zelllinien MCF-7 und SUM-159 nach ca. 5 Tagen unter nicht adhärenen Kulturbedingungen Mammosphären (siehe Abbildung 1). Die Fähigkeit Mammosphären zu formen, blieb dabei bis zur achten und somit letzten Passage (= 8 Wochen in Kultur) erhalten. Die übrigen vier Zelllinien, SK-BR-3, MDA-MB-231, MDA-MB-231 ALDH+ und SUM-1315 zeigten zwar eine Proliferation unter nicht adhärenen Kulturbedingungen, es bildeten sich allerdings keine Mammosphären, sondern nur Zellaggregate (siehe Abbildung 1).

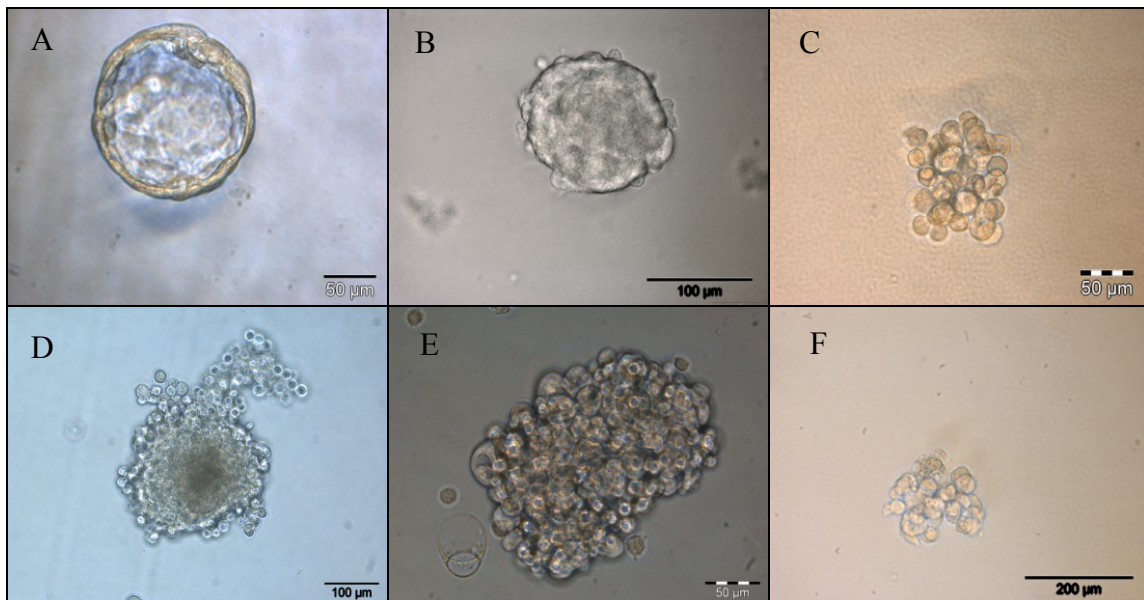


Abbildung 1: Nicht-adhärenente Kultur der fünf verwendeten Zelllinien. Die Abbildungen A und B zeigen Mammosphären, wogegen die Abbildungen C-F lediglich Zellaggregate darstellen. (A) MCF-7 in 400facher Vergrößerung, (B) SUM-159 in 400facher Vergrößerung, (C) SK-BR-3 in 400facher Vergrößerung, (D) MDA-MB-231 in 200facher Vergrößerung, (E) MDA-MB-231 ALDH+ in 400facher Vergrößerung und (F) SUM-1315 in 200facher Vergrößerung

3.2 PTEN Hypermethylierungsanalyse

3.2.1 MethyLight PTEN Assay

Wie oben beschrieben wurden zunächst Verdünnungsreihen analysiert, um zum einen die Linearität (d.h. eine lineare Abnahme der Ratio) und zum anderen die Sensitivität des Assays zu überprüfen. Zur Überprüfung der Linearität wurden die berechneten Ratio Werte gegen den Einsatz an vollständig methylierter DNA in ein Diagramm eingetragen und eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt (siehe Abbildung 2). Mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,9302 konnte für die nachfolgenden Berechnungen von einem linearen Modell ausgegangen werden. Außerdem zeigte der Assay eine hohe Sensitivität. So konnte 1% methylierte Input-DNA detektiert und deutlich gegen 0% methylierte DNA abgegrenzt werden. Ein Verdünnungsschritt mit 0,1% methylierter DNA konnte allerdings nicht mehr von der unmethylierten Probe unterschieden werden (Abbildung 2).

Als nächstes erfolgte die Analyse der fünf Zelllinien (Abbildung 3). Sowohl adhärent als auch nicht adhärent wachsende Zellen zeigten einen errechneten PMR zwischen 0% und 2%. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen adhärent und nicht-adhärent wachsenden Zellen. Die Verwendung von ALU als Referenzgen führte zu ähnlichen PMR Werten wie COL2a (durchschnittlich um 0,7% höher). Um die Streuung der ALU und COL2a Cq Werte zu überprüfen, wurden zunächst die Standardabweichungen miteinander verglichen und anschließend der Levene Test auf Varianzhomogenität angewandt. Die Cq Werte von COL2a und ALU zeigten dabei eine ähnliche Standardabweichung (1,045 bzw. 0,978). Der Levene Test war nicht signifikant ($F = 0,162$; $p = 0,689$), weshalb davon ausgegangen werden kann, dass Varianzhomogenität zwischen den beiden Gruppen besteht.

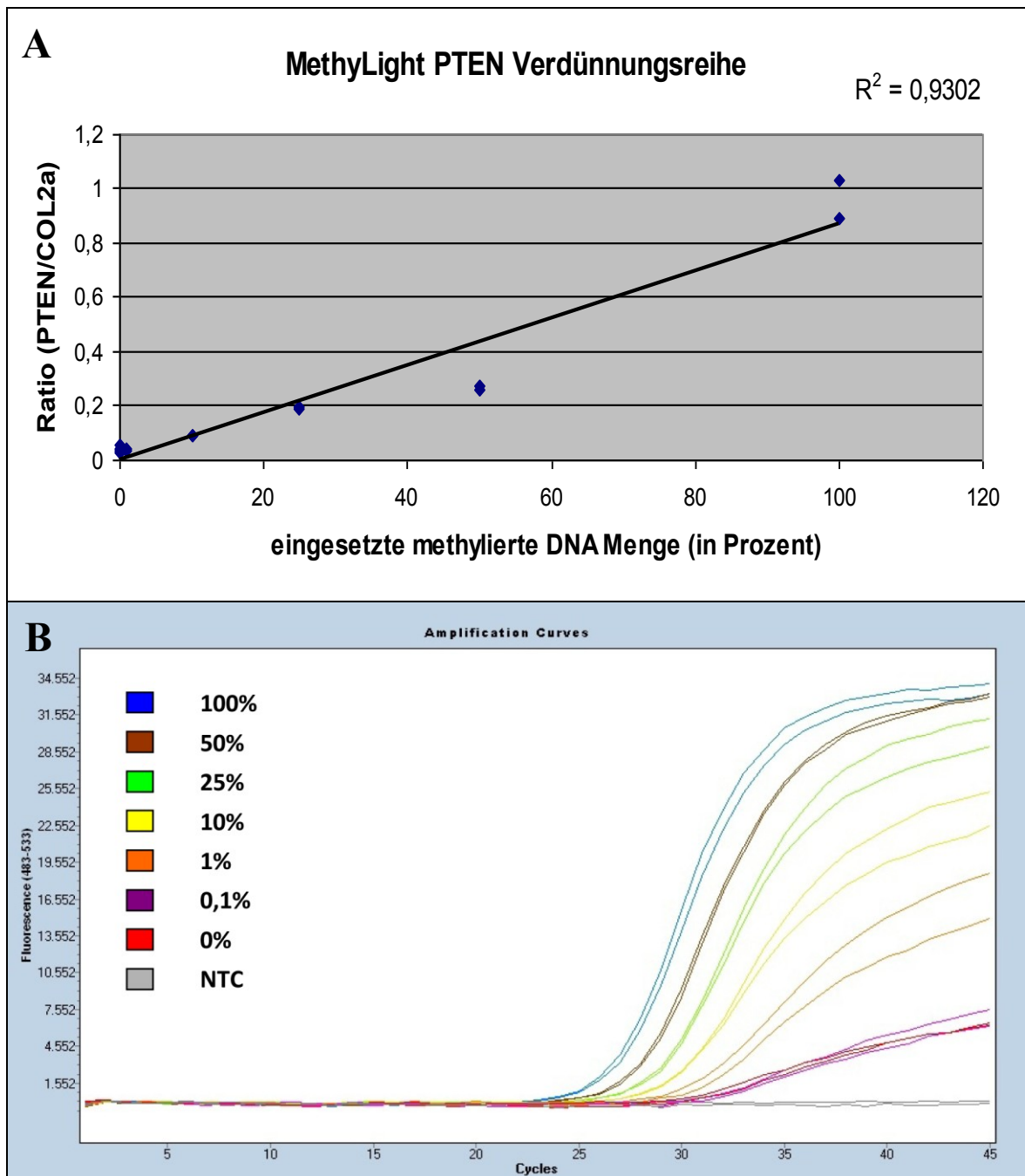


Abbildung 2: MethyLight PTEN Optimierung: Zur Überprüfung der Sensitivität und Linearität des MethyLight PTEN Assays wurde vollständig methylierte DNA auf eine Konzentration von 100%, 50%, 25%, 10%, 1%, 0,1% und 0% verdünnt. **Abbildung A:** Im Diagramm wurde die Ratio der Cq Werte von PTEN/COL2a gegen die eingesetzte Menge an methylierter DNA eingetragen. Die danach durchgeführte lineare Regressionsanalyse zeigt ein Bestimmtheitsmaß von 0,9302. **Abbildung B** zeigt das Ergebnis des MethyLight PTEN PCR Laufes (Absolute Quantification/2nd Derivate Maximum Darstellung). Dabei sind die unterschiedlichen Verdünnungsschritte (jeweils in Duplikaten) mit unterschiedlichen Farben gekennzeichnet (siehe Legende). Eine Auftrennung zwischen 0% und 0,1% methylierter DNA war nicht möglich.

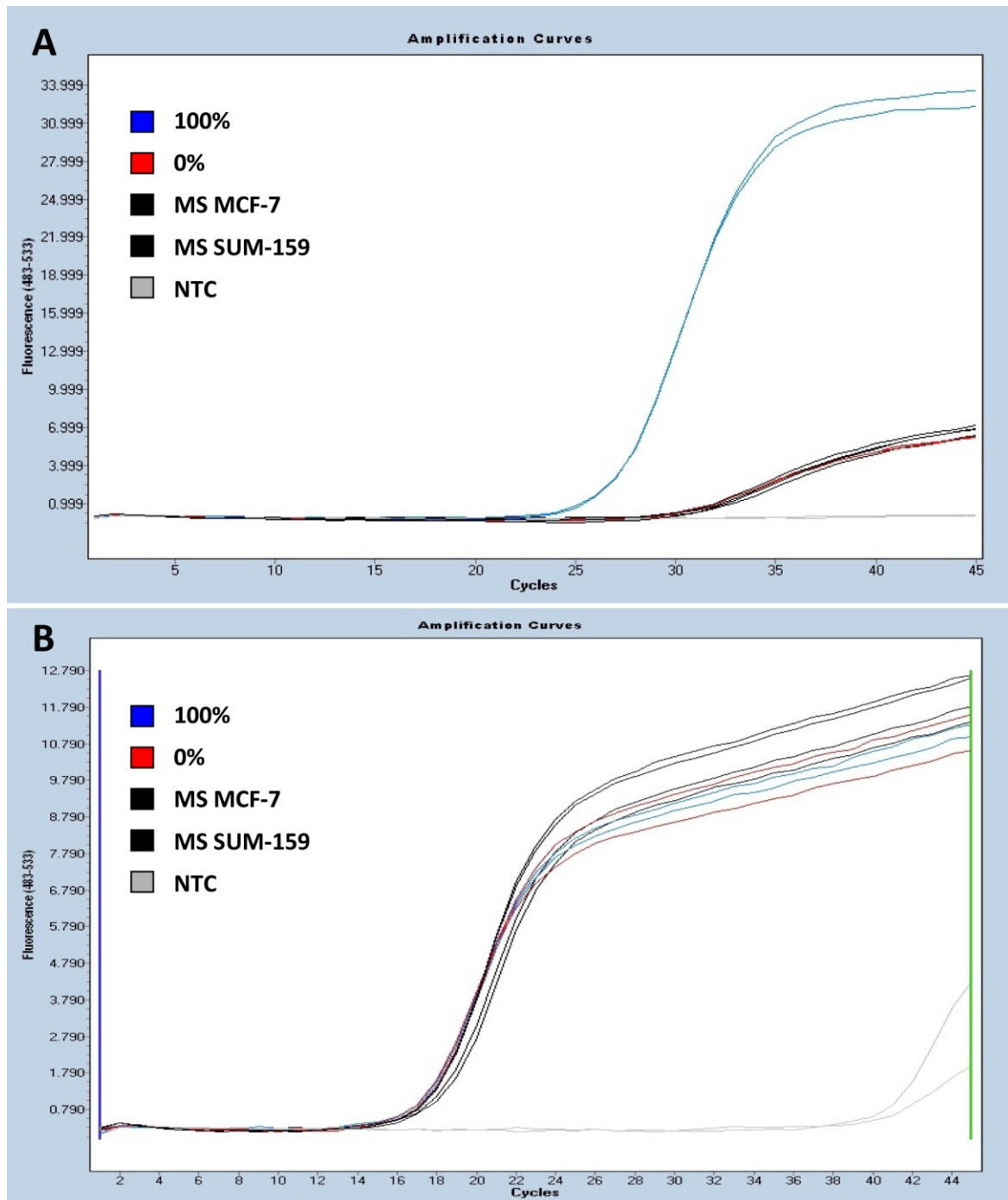


Abbildung 3: Bestimmung des PTEN Methylierungsgrades zweier unbekannter Proben mittels MethyLight. Abbildung A: Ergebnis eines MethyLight PTEN PCR Laufes (Absolute Quantification/ 2nd Derivate Maximum Darstellung): blau = 100% methylierte DNA, rot = 0% methylierte DNA, schwarz = MS MCF-7 und MS SUM-159, grau = NTC (jeweils als Duplikate). Beide Proben liegen im Bereich des 0% methylierten Verdünnungsstandards. Abbildung B: Dieselben Proben in der COL2a PCR Reaktion, die zur Kontrolle der Input-DNA dient. Alle Proben weisen einen ähnlichen Cq Wert auf. Dies spricht für eine ähnliche Menge an Input-DNA.

3.2.2 HRM PTEN Assay

Zur Überprüfung der Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Interassay Variabilität, sowie zur Berechnung des Methylierungsgrades der unbekanntenen Proben wurde bei jedem HRM Lauf eine Verdünnungsreihe mituntersucht. Bei allen vier untersuchten Verdünnungsreihen war eine Auftrennung bis zum 1% Verdünnungsstandard möglich (Abbildung 4). Eine Unterscheidung zwischen 0,1% und 0% methylierter Input-DNA war bei keinem der Läufe möglich. Zur Bestimmung der Interassay Variabilität wurde exakt dieselbe Verdünnungsreihe in vier aufeinanderfolgenden HRM Läufen analysiert. Die Schmelzkurven waren dabei sowohl in der Form als auch in den relativen Fluoreszenzwerten zwischen den Läufen konstant (Abbildung 4).

Die Schmelzkurven der untersuchten nicht-adhären und adhären wachsenden Zelllinien lagen zwischen der 0% und 1% Verdünnungsreihe (Abbildung 4). Es bestand kein Unterschied zwischen nicht-adhären und adhären wachsenden Zellen. Dementsprechend decken sich die Ergebnisse mit jenen des PTEN MethyLight Assays.

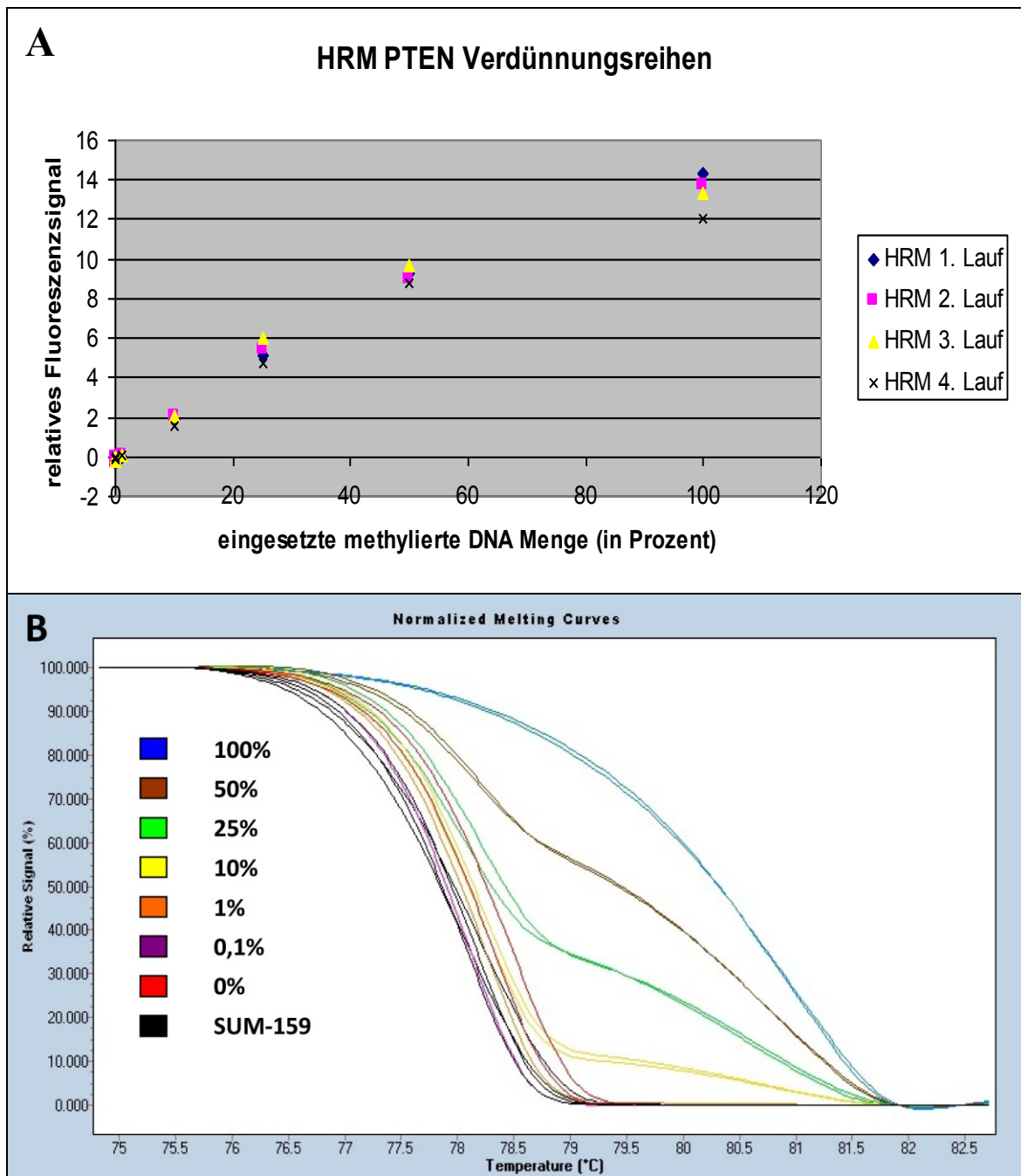


Abbildung 4: HRM PTEN Verdünnungsreihe und Versuchslauf: In der oberen Abbildung sind die relativen Fluoreszenzwerte von vier Verdünnungsreihen gegen den Input an methylierter DNA in ein Diagramm eingetragen. Man sieht, dass zur Berechnung des PTEN Methylierungsgrades ein lineares Modell angenommen werden kann und dass die relativen Fluoreszenzwerte der Verdünnungsstandards nur geringen Schwankungen unterworfen sind. Die Abbildung B zeigt das Ergebnis der HRM Gene Scanning Analyse für PTEN: Die Grafik zeigt den Abfall des Fluoreszenzsignals mit zunehmender Temperatur. Je nach dem Anteil an vollständig methylierter DNA zeigen die einzelnen Verdünnungsstandards (siehe Legende, jeweils als Duplikate) unterschiedliche Schmelzkurven. Eine Unterscheidung zwischen 1% und 0,1% methylierter DNA war nicht möglich. Die Schmelzkurve der Probe SUM-159 (schwarz, dargestellt als Duplikat) gleicht jener des 0% Verdünnungsstandards.

3.3 LINE-1 Hypomethylierungsanalyse

3.3.1 MethyLight LINE-1 Assay

Um die Linearität und Sensitivität des MethyLight LINE-1 Assays zu überprüfen, wurde wiederum eine Verdünnungsreihe analysiert. Die Bestimmung der Linearität erfolgte nach derselben Methode wie für PTEN (siehe Kapitel 3.2.1). Mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,8492 konnte für die nachfolgenden Berechnungen annähernd von linearen Verhältnissen ausgegangen werden (siehe Abbildung 5). Die einzelnen Verdünnungsschritte konnten mithilfe der Fit Points Methode klar voneinander abgegrenzt werden (siehe Abbildung 5). Als nächstes wurden LINE-1, ALU sowie COL2a PCR-Läufe der unbekanntenen Proben durchgeführt (siehe Abbildung 6). Aus den daraus gewonnenen Cq Werten erfolgte die Berechnung der PMR Werte der adhären und nicht-adhären wachsenden Zellen (Ergebnisse zusammengefasst in Abbildung 7). Die Zelllinie SK-BR-3 wies dabei den niedrigsten PMR Wert auf (nicht adhären Zellen PMR = 18%), während die anderen Zelllinien einen PMR Wert zwischen 40% und 70% aufwiesen. Die gefundenen Methylierungswerte zeigten eine gute Übereinstimmung zwischen adhären und nicht-adhären wachsenden Zellen (Korrelation nach Pearson 0,886; $p = 0,019$). Für die untersuchten nicht-adhären Zellen erfolgte die Berechnung des PMR sowohl mit ALU und als auch mit COL2a als Referenzgen. Dabei war auffällig, dass die mit COL2a errechneten PMR Werte stets über jenen von ALU lagen (siehe Abbildung 7).

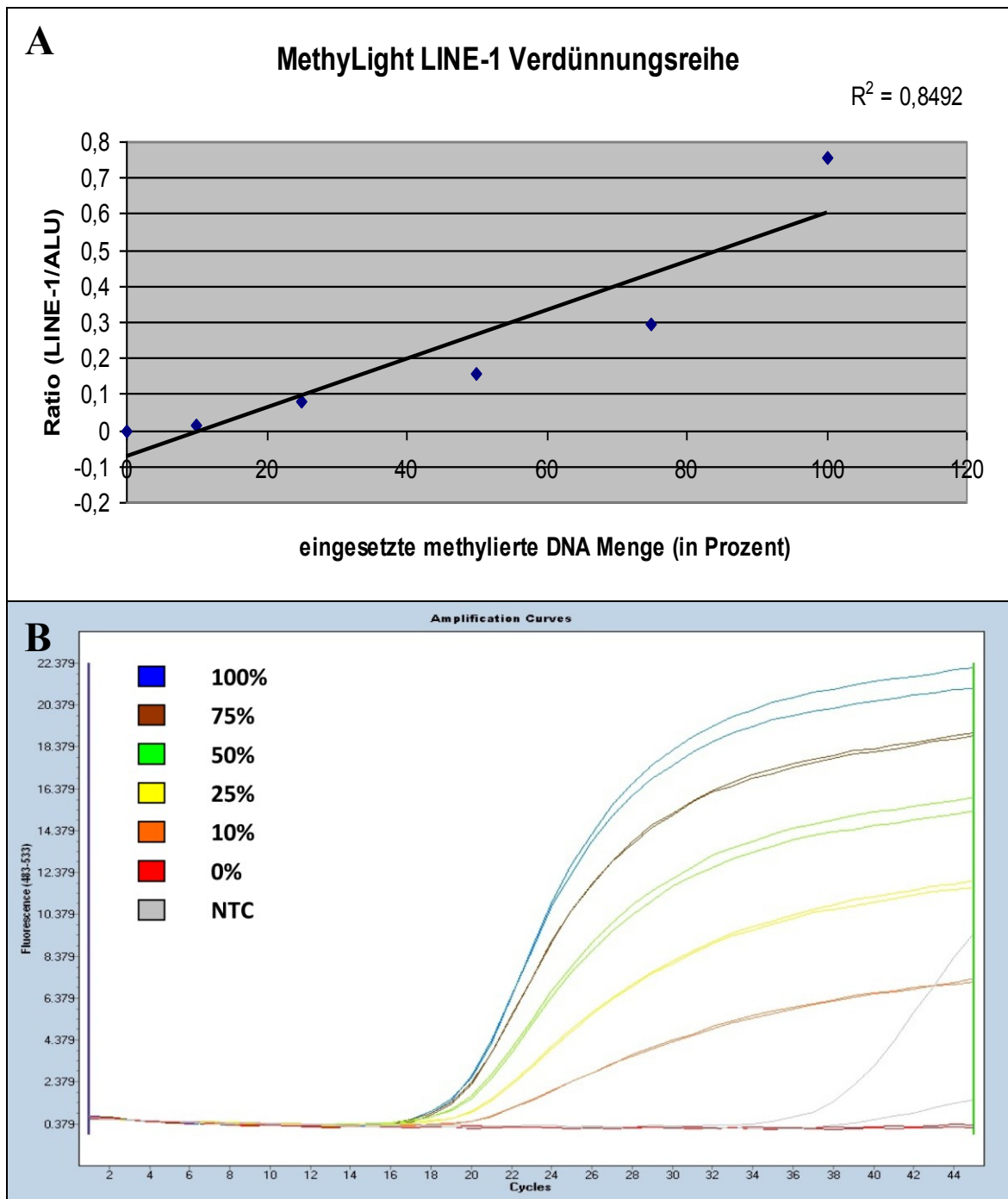


Abbildung 5: MethyLight LINE-1 Optimierung: Zur Überprüfung der Sensitivität und Linearität des MethyLight LINE-1 Assays wurde vollständig methylierte DNA (Chemicon) auf eine Konzentration von 100%, 75%, 50%, 25%, 10% und 0% verdünnt: Im oberen Diagramm (A) sind die Rationen von LINE-1/ALU gegen den Einsatz an methylierter DNA eingetragen. Die lineare Regressionsanalyse zeigt ein Bestimmtheitsmaß von 0,8492. Die Abbildung B zeigt den MethyLight LINE-1 PCR Lauf einer Verdünnungsreihe (Absolute Quantification/Fit Points Darstellung): Die einzelnen Verdünnungsschritte (jeweils als Duplikate, siehe Legende) konnten klar voneinander abgegrenzt werden. Der 0% methylierte Verdünnungsstandard wurde nicht amplifiziert. Grau zeigt eine NTC.

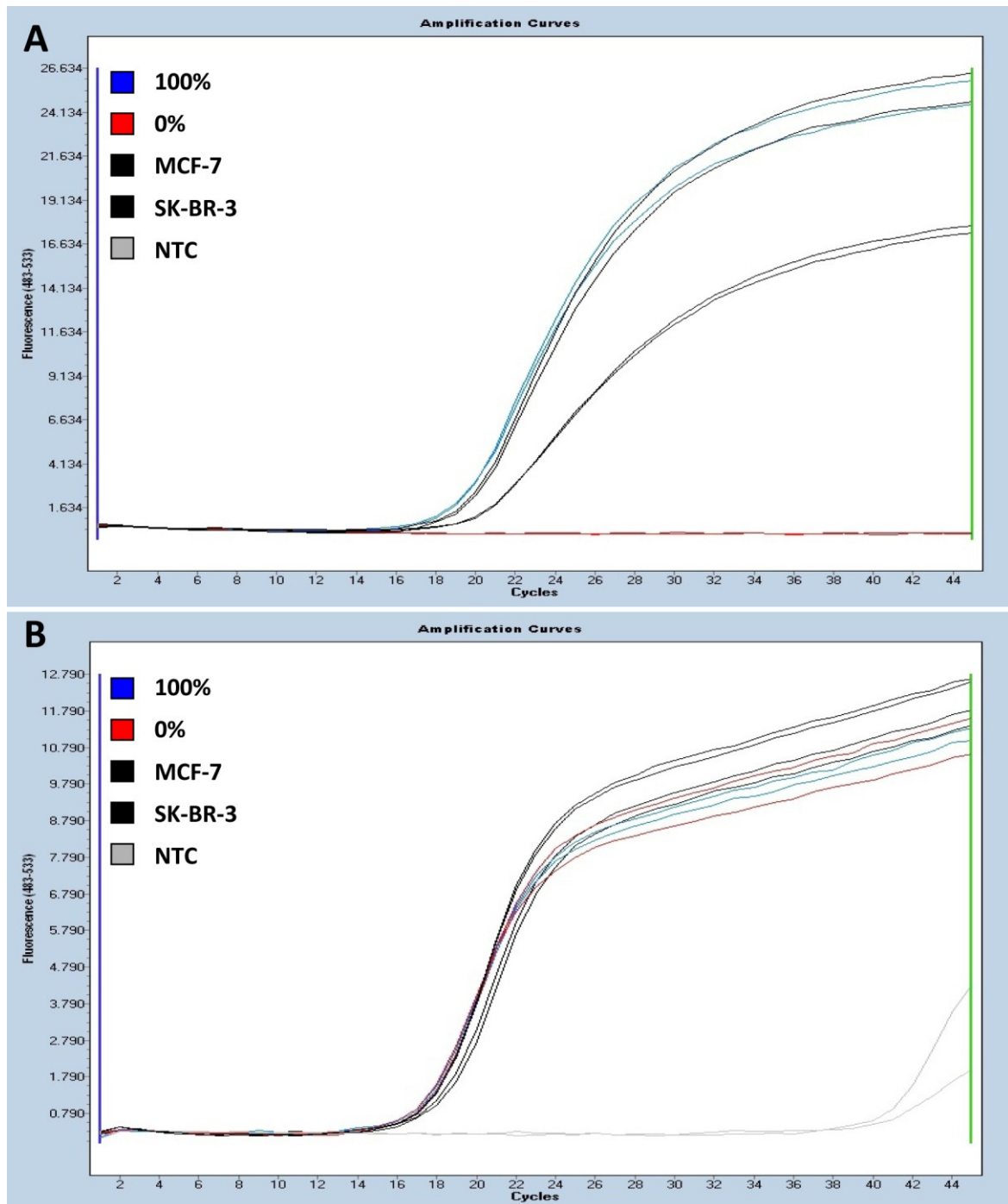


Abbildung 6: Analyse des LINE-1 Methylierungsstatus von unbekannt Proben mittels MethyLight. In Abbildung A ist das Ergebnis eines MethyLight LINE-1 PCR Laufes zu sehen (Absolute Quantification/Fit Points Methode): Die Zelllinie MCF-7 (schwarz) liegt dabei beim 100% methylierten Verdünnungsstandard (blau), das Fluoreszenzsignal der Zelllinie SK-BR-3 (ebenfalls schwarz) erscheint um drei Zyklen später, was für einen geringeren Methylierungsgrad spricht. Die unmethylierte Probe (rot) wurde wie erwartet nicht amplifiziert. Die Abbildung B zeigt die MethyLight ALU Kontrollreaktion derselben Proben, die benötigt wird, um die Menge an Input-DNA zu kontrollieren: Alle Proben weisen einen ähnlichen Cq Wert auf. Dies spricht für eine ähnliche Menge an Input-DNA.

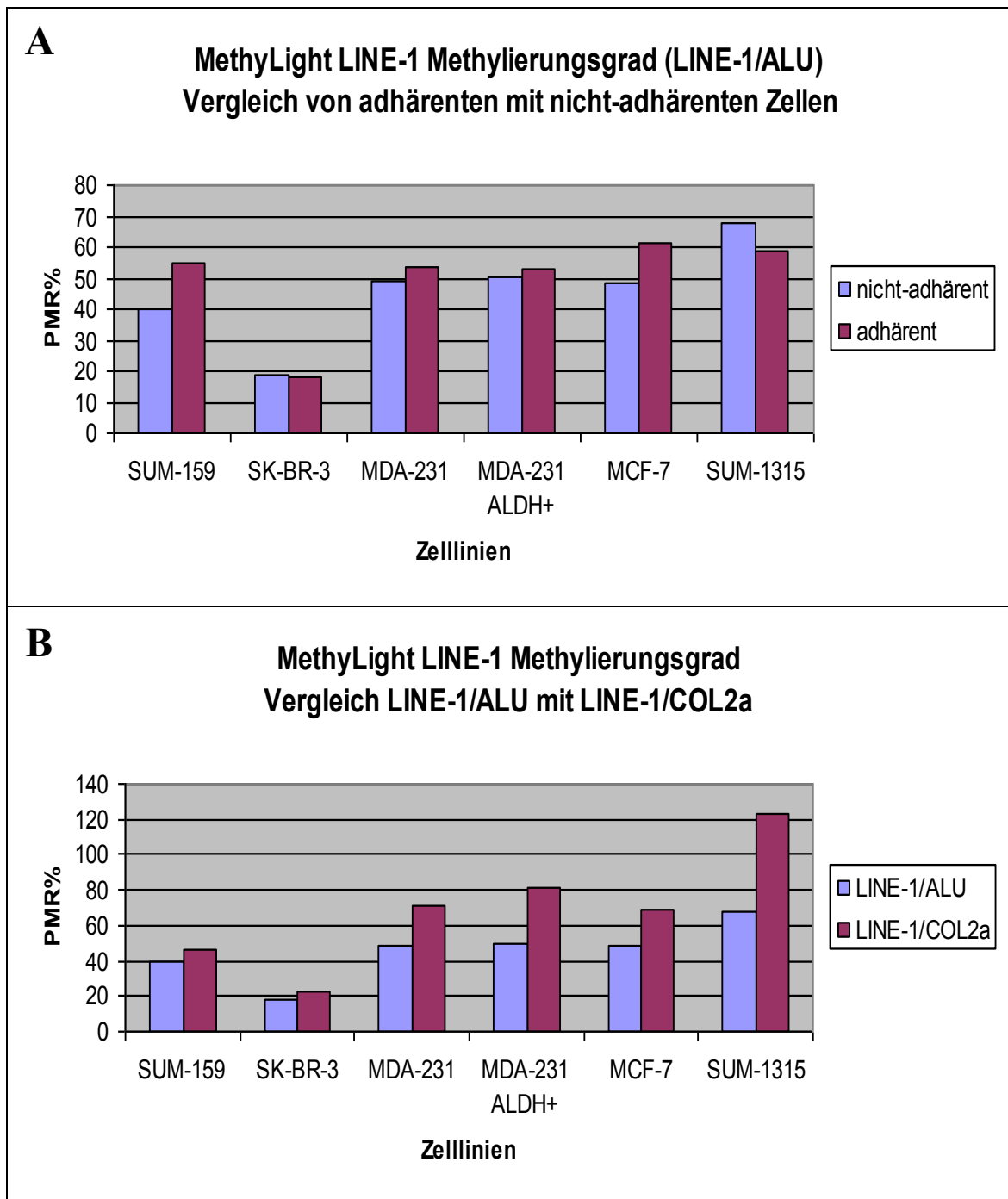


Abbildung 7: Ergebnisse der MethyLight LINE-1 Hypomethylierungsanalyse: Abbildung A zeigt die errechneten PMR Werte der adhärennten in Vergleich zu den nicht-adhärennten wachsenden Zellen. Die Zelllinie SK-BR-3 wies den geringsten LINE-1 Methylierungsgrad auf. Abbildung B: Für die nicht adhärennten wachsenden Zellen erfolgte die Berechnung des PMR sowohl mit ALU als auch mit COL2a als Referenzen. Dabei war auffällig, dass die mit COL2a errechneten PMR Werte stets über jenen von ALU lagen.

3.3.2 HRM LINE-1 Assay

Auch beim HRM LINE-1 Assay wurde bei jedem PCR Lauf eine Verdünnungsreihe mitgeführt, um die Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Interassay Variabilität zu überprüfen und Vergleichskurven für die unbekanntes Proben zu erhalten. Die einzelnen Verdünnungsschritte konnten bei allen vier untersuchten Verdünnungsreihen klar voneinander abgegrenzt werden (siehe Abbildung 8). Als Temperaturwert, bei dem sich die Verdünnungsstandards klar voneinander abgrenzen ließen, wurde 77°C gewählt. Die entsprechenden Fluoreszenzsignalwerte wurden gegen den Input an methylierter DNA in ein Diagramm eingetragen. Die so gewonnenen Datenpunkte wurden einer Regressionsanalyse unterzogen, um eine Formel für die Berechnung der unbekanntes Proben zu erhalten. Dabei konnte der Abfall des Fluoreszenzsignals am besten durch eine lineare Regression beschrieben werden (siehe Abbildung 8). Da sich die Schmelzkurven der unbekanntes Proben und der Verdünnungsstandards in ihrer Form glichen, konnte der Methylierungsgrad nach der in Kapitel 2.7.5 beschriebenen Methode berechnet werden. Von den untersuchten Proben zeigte die Zelllinie SK-BR-3 den geringsten Methylierungsgrad (nicht adhärenz Zellen 35%, adhärenz Zellen 54%). Alle anderen Zelllinien wiesen einen Methylierungsgrad zwischen 68% und 97% auf (Ergebnisse zusammengefasst in Tabelle 4 und Abbildung 9). Alle Proben wurden in zwei unabhängigen Läufen analysiert. Dabei zeigte sich eine geringe Interassay Variabilität im berechneten Methylierungsgrad (Tabelle 4). Es zeigten sich Unterschiede im Methylierungsgrad von nicht-adhärenz und adhärenz Zellen (Tabelle 4 bzw. Abbildung 9). Dabei konnte jedoch kein Trend in eine bestimmte Richtung festgestellt werden. Die aus dem HRM LINE-1 Assay gewonnenen Methylierungswerte zeigten eine hohe Korrelation mit den PMR Werten des MethyLight LINE-1/ALU Assays (Korrelation nach Pearson 0,837; $p < 0,001$, siehe Abbildung 10).

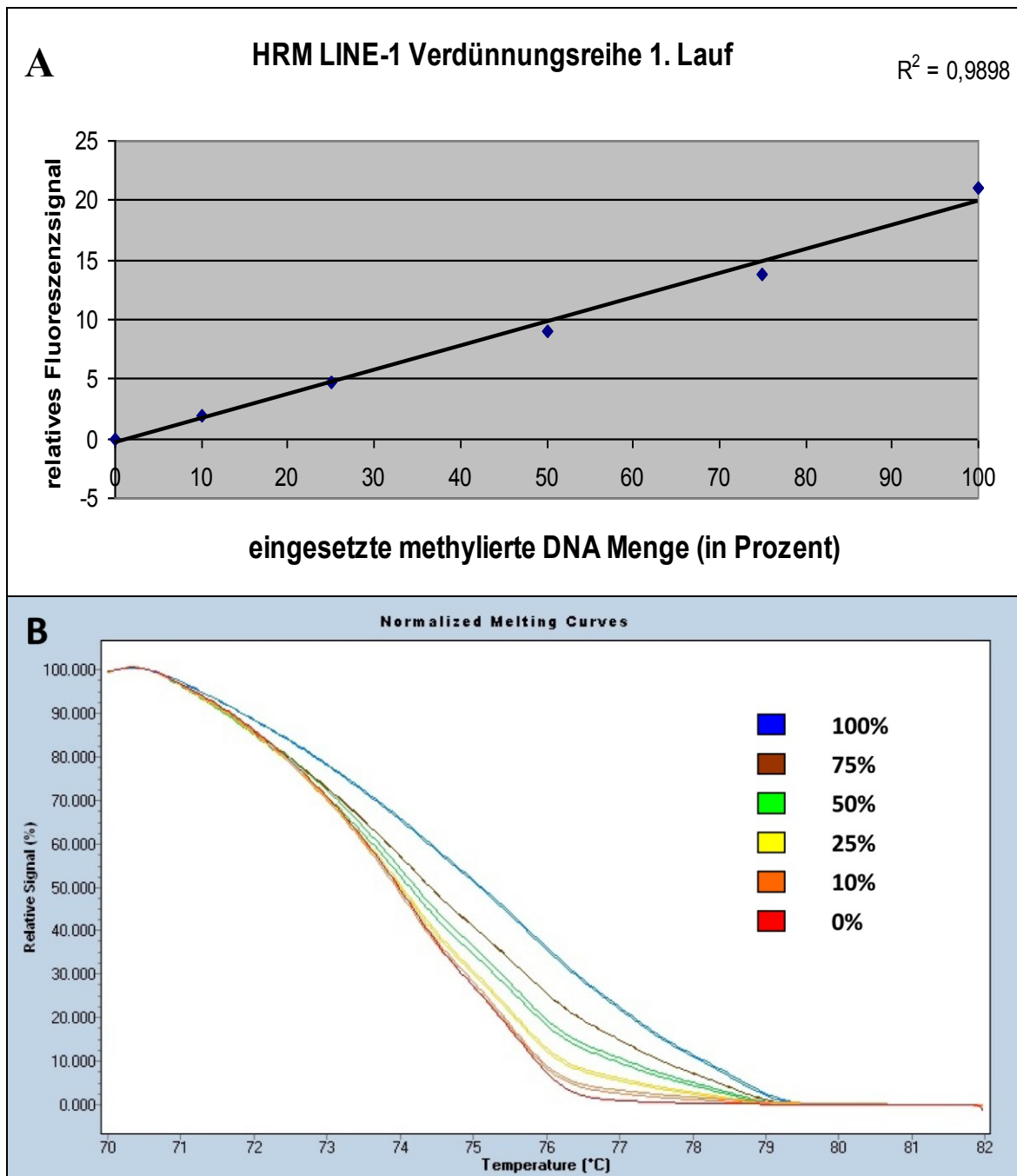


Abbildung 8: HRM LINE-1 Verdünnungsreihe: In Abbildung A wurden die relativen Fluoreszenzsignalwerte einer Verdünnungsreihe gegen den Input an methylierter DNA in ein Diagramm eingetragen. Die daraufhin durchgeführte lineare Regressionsanalyse zeigt ein Bestimmtheitsmaß von 0,9898. Abbildung B zeigt die Verdünnungsreihe eines HRM LINE-1 Laufes in der Gene Scanning Darstellung: Man sieht den Abfall des Fluoreszenzsignals mit zunehmender Temperatur. Je nach dem Anteil an vollständig methylierter DNA zeigen die einzelnen Verdünnungsstandards (siehe Legende, jeweils als Duplikate) unterschiedliche Schmelzkurven. Die einzelnen Verdünnungsschritte konnten klar voneinander abgegrenzt werden.

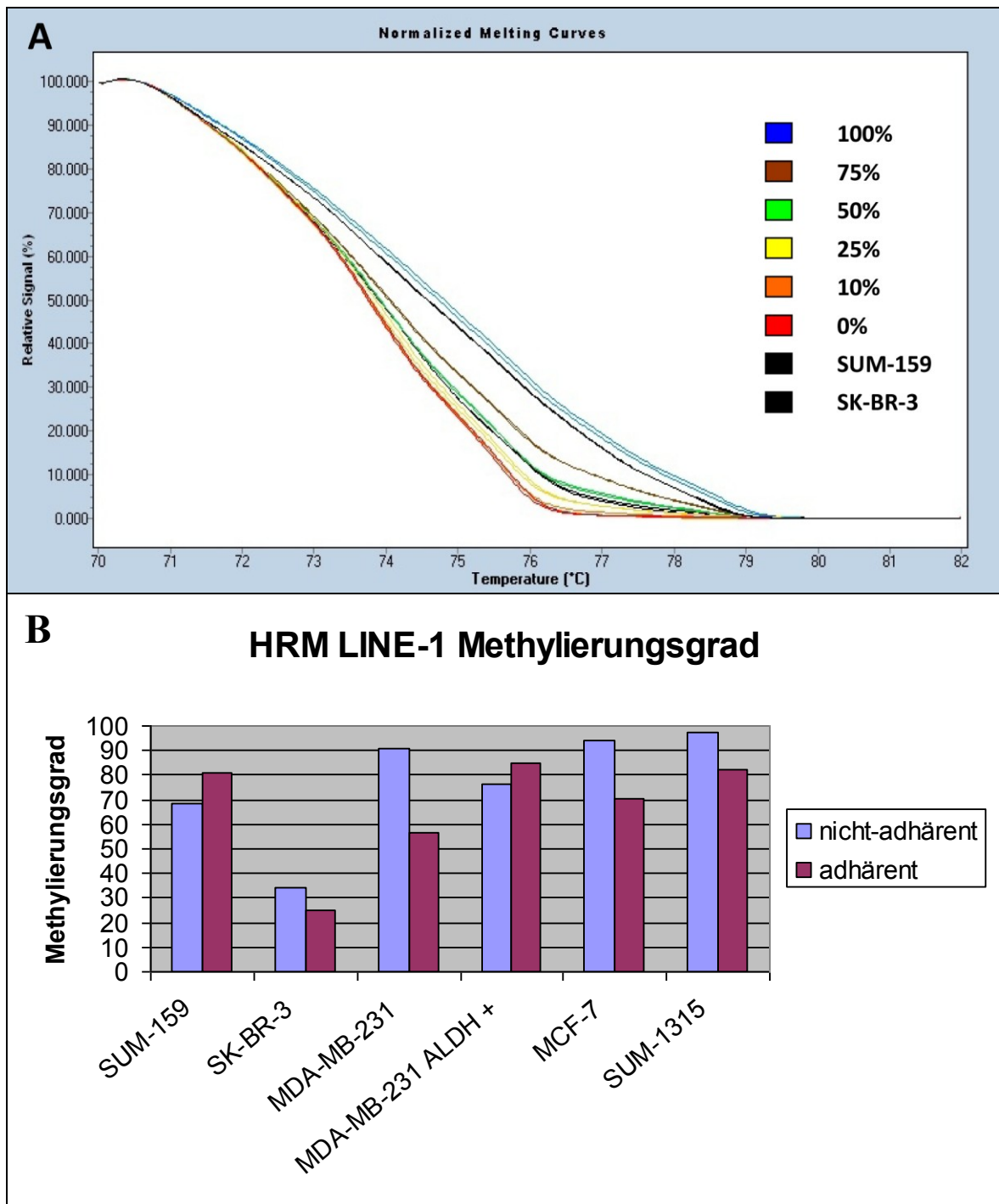


Abbildung 9: HRM LINE-1 Versuchslauf und Ergebnis des HRM LINE-1 Assays: In Abbildung A sind die Schmelzkurven der Verdünnungsreihe und zweier Proben dargestellt. Nicht-adhärent wachsende Zellen der Zelllinie SUM-159 liegen im Bereich des 100% Verdünnungsstandards. Nicht-adhärent wachsende Zellen der Zelllinie SK-BR-3 liegen zwischen dem 25% und 50% Verdünnungsstandard. Die Abbildung B zeigt die Methylierungsgrade der nicht-adhären und adhären wachsenden Zelllinien im Vergleich. Bei zwei Zelllinien (SUM-159 und MDA-MB-231 ALDH+) lag der Methylierungsgrad der adhären wachsenden Zellen über jenen der nicht-adhären wachsenden.

Tabelle 4: Interassay Variabilität des HRM LINE-1 Assays: Zur Beurteilung der Interassay Variabilität wurden die Proben in zwei unabhängigen HRM Läufen analysiert. In der Tabelle sind die errechneten Methylierungswerte des ersten (HRM 1) und zweiten (HRM 2) HRM LINE-1 Laufes sowie der daraus berechnete Mittelwert und die Standardabweichung dargestellt.

Zelllinie	HRM 1	HRM 2	Mittelwert	SD
MS SUM-159	61	76	68	11
MS SK-BR-3	33	36	34	2
MS MDA-MB-231	90	93	91	2
MS MDA-MB-231 ALDH+	74	78	76	3
MS MCF-7	99	89	94	7
MS SUM-1315	94	100	97	4
SUM-159	75	86	81	7
MCF-7	68	73	70	4
SK-BR-3	23	28	25	3
MDA-MB-231	53	61	57	6
SUM-1315	75	90	83	10
MDA-MB-231 ALDH+	92	77	85	11

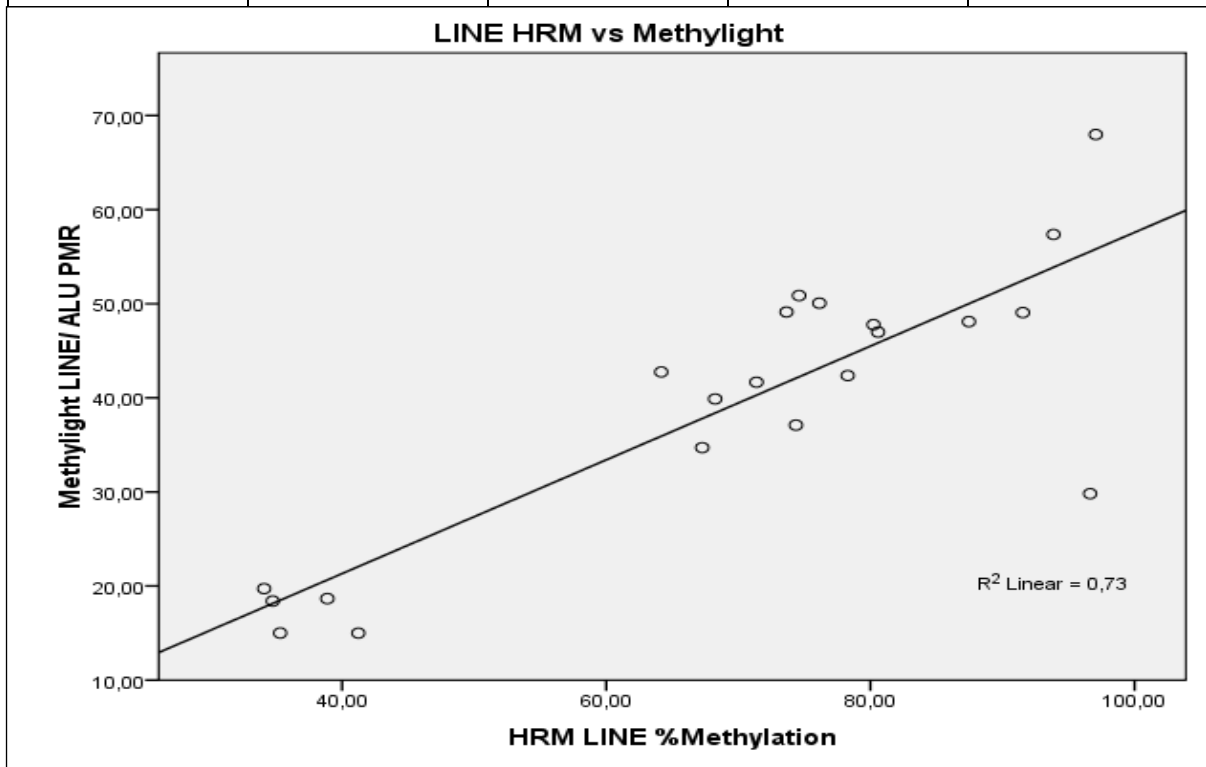


Abbildung 10: Vergleich des MethyLight LINE-1/ALU Assays mit dem HRM LINE-1 Assay: Die berechneten PMR Werte des MethyLight Assay und die Methylierungswerte des HRM Assays zeigen eine hohe Korrelation (Korrelation nach Pearson 0.837, $p < 0.001$).

3.4 PTEN Protein Färbung

Alle untersuchten nicht-adhärenenten und adhärenenten Zelllinien zeigten nach unserer Färbemethode eine stark positive PTEN Proteinexpression (siehe Tabelle 5). Alle Zelllinien außer MDA-MB-231 nicht-adhärenent und MDA-MB-231 adhärenent zeigten sowohl eine Färbung des Zytoplasmas als auch des Kernes. Alle Negativkontrollen zeigten eine fehlende Färbung (siehe Abbildung 11).

Tabelle 5: Übersicht über die PTEN Färbeergebnisse: Alle Zelllinien zeigten eine positive PTEN Expression (von ++ bis ++++), die meisten Zelllinien wurden sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch angefärbt. Die Prozentzahl gibt den Anteil der gefärbten Zellen wieder.

Zelllinie	Nicht-adhärenent	Adhärenent
SUM-159	++++ nukleär, zytoplasmatisch, 100%	+++ nukleär, zytoplasmatisch, 90%
SK-BR-3	++++ nukleär, zytoplasmatisch 100%	Nicht untersucht
MDA-MB-231	+++ nukleär, zytoplasmatisch, 100%	++ zytoplasmatisch 100%
MDA-MB-231 ALDH+	+++ (+) nukleär, zytoplasmatisch 100%	+++ zytoplasmatisch 100%
MCF-7	++++ (+), nukleär, zytoplasmatisch 100%	+++ nukleär, zytoplasmatisch 80%
SUM-1315	Nicht untersucht	+++ nukleär, zytoplasmatisch 100%

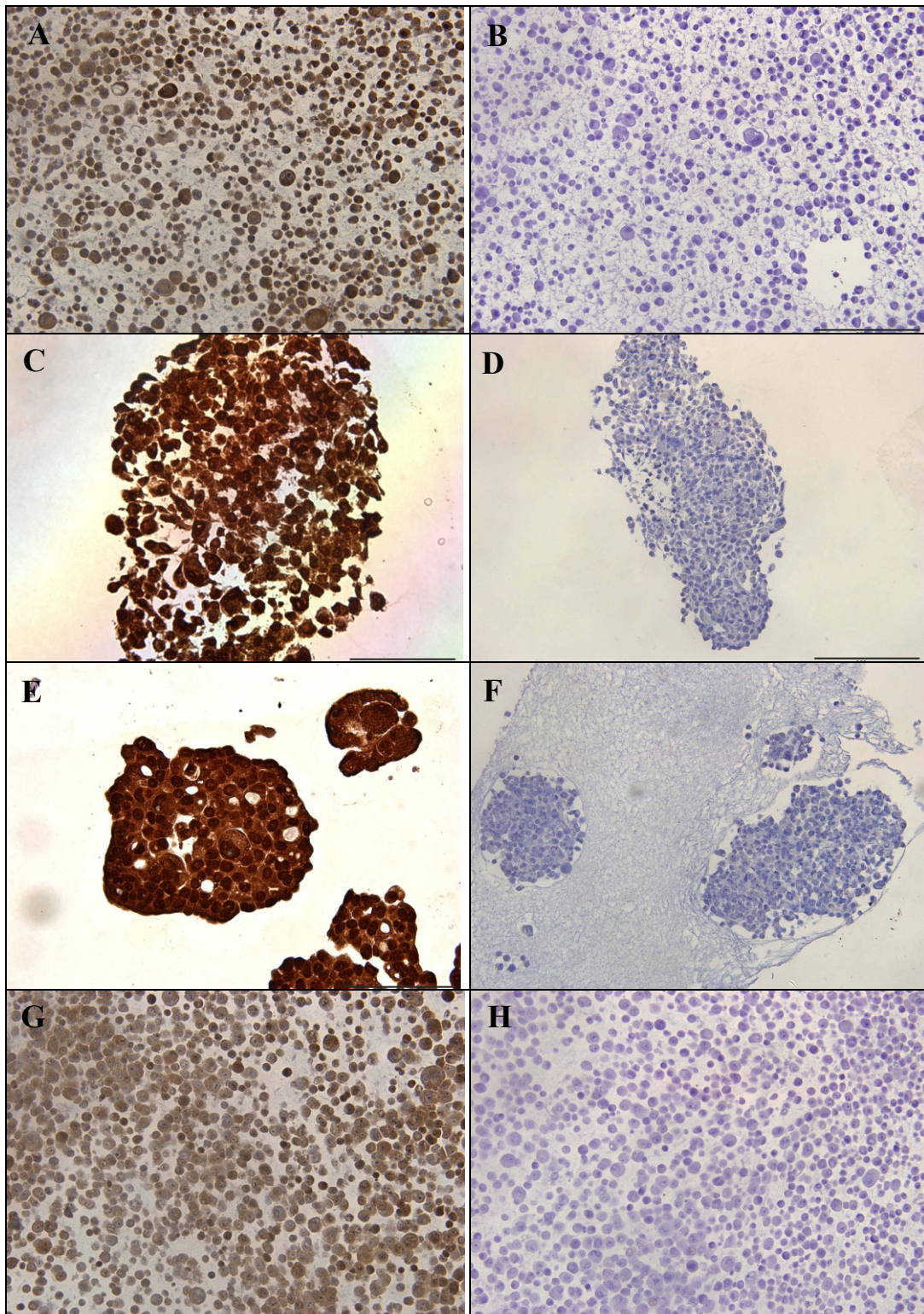


Abbildung 11: Ergebnis der PTEN Immunzytochemie: A: adhärenente Zellen von MDA-MB-231 ALDH+ (200fache Vergrößerung) B: negativ Kontrolle derselben Zelllinie (200fache Vergrößerung) C: Mammosphären von SUM-159 (400fache Vergrößerung) D: negativ Kontrolle derselben Zelllinie (200fache Vergrößerung) E: Mammosphären von MCF-7 (400fache Vergrößerung) F: negativ Kontrolle derselben Zelllinie (200fache Vergrößerung) G: adhärenente Zellen von SUM-1315 (200fache Vergrößerung) H: negativ Kontrolle derselben Zelllinie (200fache Vergrößerung)

4 Diskussion

Die Tumorstammzellhypothese geht davon aus, dass ein Tumor hierarchisch gegliedert ist, mit Tumorstammzellen an der Spitze und darunter, davon abgeleitet, differenziertere Tumorzellen. Nach dieser Hypothese sind nur diese Tumorstammzellen für das Wachstum des Tumors verantwortlich. Für eine genauere Untersuchung dieser Zellen ist es notwendig, geeignete in vitro Modelle zu finden, um Tumorstammzellen im Labor anzuzüchten. Ein von Dontu et al entwickelter Assay bezieht sich dabei auf die Fähigkeit von Stammzellen unter nicht-adhärenenten Kulturbedingungen zu überleben (20). Während differenzierte Epithelzellen in Apoptose gehen, können Stammzellen unter diesen Bedingungen proliferieren und Sphären bilden, die von Dontu et al dann in Folge als Mammosphären bezeichnet wurden. Nach diesem Prinzip gelang es Ponti et al Brustkrebsstammzellen von Primärtumoren und der etablierten Brustkrebszelllinie MCF-7 zu züchten (21). Sie zeigten in ihrer Arbeit, dass der vermeintliche $CD44^+/CD24^-$ Brustkrebsstammzellphänotyp vermehrt innerhalb dieser Mammosphären zu finden ist. Wie von mehreren Gruppen festgestellt, befinden sich auch in lang etablierten Brustkrebszelllinien, Krebszellen mit stammzellähnlichem Charakter (85, 86). Aus diesem Grund verwendeten wir den Mammosphären Assay, um aus den Zelllinien MCF-7, SUM-159, SK-BR-3, MDA-MB-231, MDA-MB-231 ALDH⁺ und SUM-1315 Brustkrebsstammzellen anzureichern. Dabei kam es allerdings nur bei den Zelllinien MCF-7 und SUM-159 zu einer Mammosphärenbildung. Bei den übrigen vier Zelllinien (SK-BR-3, SUM 1315, MDA-MB-231 und MDA-MB-231 ALDH⁺) kam es zwar zu einer Proliferation der Zellen unter nicht adhärenenten Kulturbedingungen, es bildeten sich jedoch keine Mammosphären sondern nur Zellaggregate (siehe Abbildung 1). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass verschiedene Zelllinien und die in ihnen enthaltenen Stammzellen verschiedene Kulturbedingungen benötigen um Sphären zu formen. Eine andere Erklärung wäre, dass abhängig vom Ausgangstumor nur bestimmte molekulare Subgruppen (z.B. Tumore vom luminalen Zelltypus) geeignet sind, Mammosphären auszubilden. Dontu et al beschreiben in ihrer Arbeit, dass unter nicht adhärenenten Kulturbedingungen differenzierte Epithelzellen absterben, wohingegen Stammzellen überleben und Mammosphären formen. Bei den vier Zelllinien, die keine Mammosphären bildeten, kam es allerdings nicht zum Absterben der Zellen, sondern zu einer Proliferation, die bis zur letzten Passage (nach 8 Wochen in Kultur) erhalten werden konnte. Auch bei Grimshaw et al, die in ihrer Arbeit Pleurapunktate verwendeten, um Mammosphären anzuzüchten, zeig-

ten Zellen mit dem vermeintlichen Brustkrebsstammzellphänotyp CD44+/CD24- teilweise keine Mammosphärenbildung (87). Somit kann nicht mit Sicherheit beurteilt werden, ob sich in den Zellkulturen, die keine Mammosphären bildeten, Brustkrebsstammzellen befanden oder nicht. Weitere Untersuchungen, wie z.B. in vivo Transplantationen in NOD/SCID Mäuse wären notwendig, um Unterschiede in der Tumorigenität zwischen adhärent wachsenden Zellen und nicht-adhärent wachsenden Zellen, die keine Mammosphären bilden, nachzuweisen. Übereinstimmend mit anderen Autoren zeigte bei uns die Zelllinie MCF-7 (21, 87–90) Mammosphärenbildung. Wie Grimshaw et al (87) konnten auch wir in der Zelllinie MDA-MB-231 keine Mammosphärenbildung nachweisen. Allerdings gelang dieser Forschungsgruppe eine Mammosphärenbildung in der Zelllinie SK-BR-3. Auch Phillips et al (30) und To et al. (91) berichten widersprüchlich zu unseren Ergebnissen von einer Mammosphärenbildung der Zelllinie MDA-MB-231, zeigen in ihrer Arbeit aber keine Bilder.

Gegenüber anderen Assays bietet der Mammosphärenassay den Vorteil, dass er keine spezifischen Oberflächenmarker benötigt und zudem ein relativ unkompliziertes Verfahren ist, um Tumorstammzellen im Labor zu züchten. Zudem kann dieser Assay auch auf andere Tumorentitäten, wie bspw. Prostata- (92) oder Dickdarmtumore (93) ausgedehnt werden. Er weist jedoch auch gewisse Nachteile auf. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die vorgegebenen Kulturbedingungen das Wachstum eines bestimmten Progenitors begünstigt wird und somit eine Selektion eines bestimmten Zelltyps erfolgt. Zudem stellen Mammosphären immer ein Gemisch aus Zellen dar. Unter den ca. 400 Zellen einer Mammosphäre befinden sich wahrscheinlich nur wenige Krebsstammzellen, aber viele Progenitorzellen. Somit hat man bei den nachfolgenden Untersuchungen immer eine Kontamination mit weiter differenzierten Zellen, was vor allem für unsere Fragestellungen problematisch ist.

Für verbesserte Tumorthérapien wäre es notwendig, molekulare Mechanismen, die zur Entstehung von Krebsstammzellen führen, aufzufindig zu machen. Epigenetische Veränderungen wie veränderte Methylierungsmuster spielen in der Tumorentstehung eine zentrale Rolle. Diese epigenetischen Veränderungen können u.a. Gene betreffen, die für Pluripotenz und Selbsterneuerung entscheidend sind und somit Tumorzellen einen stammzellähnlichen Phänotyp verleihen können. In den letzten Jahren häuften sich die Hinweise, dass das Tumorsuppressorgen PTEN und der von ihm negativ regulierte PI3K/Akt/mTOR Signalweg eine Schlüsselfunktion in der Entstehung von Tumorstammzellen einnehmen.

Diskussion

So konnten Yilmaz et al (52) sowie Zhang et al (53) in ihren Arbeiten zeigen, dass PTEN für die Aufrechterhaltung des normalen Stammzellpools notwendig ist. In einem Mausmodell, bei dem PTEN abgeschaltet wurde, kam es nach anfänglicher Proliferation zum Abbau von normalen hämatopoetischen Stammzellen und es entwickelten sich von Tumorstammzellen ausgehende Leukämien. Die Rolle von PTEN in Brustkrebsstammzellen wurde von Zhou und Kollegen untersucht (56). Sie verwendeten die Zelllinie MCF-7, um molekulare Unterschiede zwischen Side Population Zellen (eine Population, die Tumorstammzellen enthält) und nicht Side Population Zellen nachzuweisen und konnten zeigen, dass unter anderem der PI3K/Akt/mTOR/STAT Signalweg, der von PTEN negativ reguliert wird, für das Überleben von vermeintlichen Brustkrebsstammzellen wichtig ist. Eine Verminderung der PTEN Expression führte zu einer Zunahme des Side Population Anteils, eine PTEN Überexpression zu einer verminderten in vivo Tumorigenität von MCF-7 Zellen. Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangten Korkaya und Kollegen, die in ihrer Arbeit unter anderem die Zelllinien MCF-7 und SUM-159 untersuchten und zeigten, dass ein Knockout von PTEN zu einer erhöhten Mammosphärenbildung führt und den Anteil an ALDH-high Zellen (vermeintliche Brustkrebsstammzellen) innerhalb dieser Mammosphären erhöht (57). Diese Studien weisen darauf hin, dass PTEN als negativer Regulator des PI3K/Akt/mTOR Signalwegs eine zentrale Rolle in der Biologie von Krebsstammzellen einnimmt. Aus diesem Grund stellten wir die Hypothese auf, dass eine Hypermethylierung des PTEN Promotors zu einem Verlust der PTEN Expression in Brustkrebsstammzellen führt. Weder beim MethyLight noch beim HRM PTEN Assay zeigten sich PTEN Methylierungswerte (PMR bzw. Methylierungswert) über 2%. Außerdem gab es keine Unterschiede zwischen nicht-adhären und adhären wachsenden Zellen. Diese sehr niedrigen PTEN Methylierungswerte lassen zwei mögliche Interpretationen zu: Entweder ist der PTEN Promotor bei den untersuchten Zellen unmethyliert oder es gibt nur einzelne Zellen innerhalb der untersuchten Population die eine Methylierung des PTEN Promotors aufweisen. Ogino et al (95), Eads et al (96) und Weisenberger et al (97) bezeichnen einen PMR unter 4% bzw. 10% als unmethyliert. Diese Definition unterstützt die erste Annahme, dass der PTEN Promotor bei den untersuchten Zellen unmethyliert ist. Die zweite Interpretationsmöglichkeit, nämlich dass wenige Zellen eine Methylierung des PTEN Promotors aufweisen, wird durch die hohe Sensitivität der Assays gestützt. Bei der HRM Analyse konnte bei allen untersuchten Verdünnungsreihen 1% methylierte Input-DNA von unmethylierter DNA abgegrenzt werden. Somit können die Ergebnisse nicht

Diskussion

durch zu niedrige Sensitivität des Assays erklärt werden. Der geringe Grad der Methylierung und die Tatsache, dass es keine Unterschiede zwischen nicht-adhärennten und adhärennten Zellen gab, lässt deshalb eine untergeordnete Rolle der PTEN Methylierung bei den nicht-adhärennten und adhärennten Kulturen der fünf untersuchten Zelllinien vermuten. Nach unserem Wissen gibt es keine weitere Arbeit, die den Methylierungsstatus von PTEN bei vermeintlichen Brustkrebsstammzellen untersucht. Es gibt lediglich zwei Studien, die den Methylierungsstatus von PTEN bei sporadischen Brusttumoren und adhärennt wachsenden Zelllinien untersuchten (77, 78). Dabei konnten Khan et al bei 15 von 44 (= 34%) und Garcia et al bei 43 von 90 (= 48%) untersuchten Tumoren eine PTEN Promotor Methylierung feststellen. Khan et al untersuchten zusätzlich die Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 und konnten mit unseren Ergebnissen übereinstimmend keine Methylierung feststellen. Die von uns verwendeten Assays MethyLight und HRM weisen gewisse Nachteile in der Hypermethylierungsanalyse auf. Beide Verfahren können keine Auskunft über den Methylierungszustand einzelner Zellen geben, sondern spiegeln immer nur den Prozentsatz methylierter Moleküle in einem DNA Pool wider. Außerdem analysieren beide Verfahren lediglich den Methylierungszustand eines kleinen Teils des Promotors. Methylierungsveränderungen, die außerhalb der analysierten Sequenzen liegen, bleiben damit verborgen. Der MethyLight Assay hat zusätzlich den Nachteil, dass nur die von Primer und Sonde abgedeckten CpG Dinukleotide analysiert werden (98). Somit bestimmt der von uns verwendete MethyLight Assay nur den Anteil an vollständig methylierten DNA Molekülen in der Probe (79, 99). Es werden nur diejenigen Moleküle amplifiziert, die eine vollständige Methylierung aufweisen. Heterogene Veränderungen im Methylierungsmuster bleiben somit unentdeckt. Die Analyse von beiden Assays wird auch dadurch erschwert, dass bei unserer Kultivierung der Mammosphären eine DNA Verunreinigung durch abgestorbene oder weiter differenzierte Zellen nicht ausgeschlossen werden kann und dadurch die Unterschiede noch geringer erscheinen können. Es wäre somit wichtig, künftig die Kultivierung der Mammosphären dahingehend zu optimieren, dass gezielter vermeintliche Brustkrebsstammzellen auf epigenetische Veränderungen analysiert werden können.

Weitere Mechanismen, die ebenfalls zu einem Verlust des PTEN Proteins führen können, sind Mutationen und/oder Deletionen. Dies festzustellen war allerdings nicht das Ziel dieser Diplomarbeit, weshalb in diese Richtung keine Untersuchungen durchgeführt wurden.

Eine Promotorhypermethylierung bekommt vor allem dann biologische Relevanz, wenn es zu einem Verlust der Proteinexpression kommt. Aus diesem Grund verwendeten wir eine

Diskussion

immunzytochemische Färbung, um die PTEN Expression zu analysieren und mit dem PTEN Methylierungsstatus zu korrelieren. Alle untersuchten nicht-adhären und adhären wachsenden Zellen zeigten eine stark positive PTEN Färbung. Dieses Ergebnis korreliert somit mit den Methylierungsanalysen. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen konnten auch Sakr et al eine PTEN Expression in der Zelllinie MCF-7 feststellen (100). Generell ist es allerdings schwierig in einer immunzytochemischen Färbung die PTEN Expression genau zu quantifizieren und diskrete Unterschiede zwischen nicht-adhären und adhären wachsenden Zellen zu finden. Andere Methoden wie quantitative RT-PCR oder Western Blot wären für diese Fragestellung eventuell besser geeignet.

Neben lokaler Hypermethylierung von spezifischen Genen, kommt es bei Tumorzellen häufig zu einer genomweiten Hypomethylierung (60, 101, 102), die zur chromosomalen Instabilität von Krebszellen beitragen soll (64–66, 103, 104). Der Methylierungsgrad von repetitiven DNA Sequenzen, die einen Großteil des menschlichen Genoms ausmachen (67) und normalerweise stark methyliert sind, kann dabei repräsentativ für den genomweiten Methylierungszustand verwendet werden (68, 69). Aus diesem Grund analysierten wir den Methylierungszustand der repetitiven Sequenz LINE-1, um eine mögliche Hypomethylierung von nicht-adhären und adhären wachsenden Zellen nachzuweisen. Nicht-adhären Kulturen der Zelllinie SK-BR-3 wiesen dabei den niedrigsten LINE-1 Methylierungsgrad auf (PMR = 18% aus dem MethyLight LINE-1/ALU Assay bzw. Methylierungswert = 34% aus dem HRM LINE-1 Assay). Alle anderen nicht-adhären und adhären Zelllinien wiesen einen PMR von 40% - 68% bzw. einen Methylierungswert von 54% - 92% im HRM LINE-1 Assay auf (Abbildung 7 bzw. Abbildung 9). Es zeigten sich Unterschiede zwischen nicht-adhären und adhären Zelllinien, jedoch bestand kein Trend in eine bestimmte Richtung. Bei einzelnen Zelllinien war der Methylierungsgrad von adhären wachsenden Zellen höher (z.B.: SUM-159 adhären = 81%, nicht-adhären = 68% aus dem HRM LINE-1 Assay), bei anderen Zelllinien fand sich hingegen eine umgekehrte Situation (z.B.: MCF-7 adhären = 70%, nicht-adhären = 94% aus dem HRM LINE-1 Assay). Diese Ergebnisse lassen mit allen Einschränkungen, die bereits oben für die Hypermethylierung erwähnt wurden, vermuten, dass bei den untersuchten Zelllinien Hypomethylierung kein spezifisches Charakteristikum von nicht-adhären Kulturen und somit fraglichen Brustkrebstammzellen ist. Nach unserem Wissen gibt es keine Arbeit, die die genomweite Hypomethylierung bei Tumorstammzellen beschreibt. Der direkte Vergleich mit anderen Arbeiten wird außerdem durch die Tatsache

Diskussion

erschwert, dass die meisten Arbeitsgruppen Pyrosequencing oder Restriktionsanalysen verwenden, um eine LINE-1 Hypomethylierung nachzuweisen. Da diese Methoden auf anderen Prinzipien beruhen als die von uns verwendeten Assays MethyLight und HRM, können die daraus gewonnenen LINE-1 Methylierungswerte nicht direkt mit unseren Methylierungswerten verglichen werden.

Eine Interpretation der von uns gefundenen LINE-1 Methylierungswerte ist schwierig, da es keine Definition gibt, ab wann Tumorzellen als hypomethyliert bezeichnet werden können. Die LINE-1 Methylierung scheint unabhängig von Alter und Geschlecht zu sein und wie von Aparicio et al für Plasma DNA gezeigt, zeitlich konstant zu sein (99). Allerdings scheint es gewebsspezifische bzw. organspezifische Methylierungsmuster von LINE-1 zu geben (63, 105, 106). Außerdem weisen die LINE-1 Sequenzen von unterschiedlichen Loci eines Genoms unterschiedliche Methylierungsmuster auf, sodass für die Bestimmung wichtig ist, LINE-1 Sequenzen derselben Loci zu analysieren (107). Unter diesen Voraussetzungen könnten Tumorzellen nur dann als hypomethyliert bezeichnet werden, wenn sie mit angrenzendem, normalem Gewebe verglichen würden oder es allgemeine Angaben über den genauen Methylierungszustand von LINE-1 Sequenzen bestimmter Loci in einem bestimmten Organ gibt. Somit kann für unsere untersuchten Proben nicht beurteilt werden, welche Zelllinien hypomethyliert sind, da keine Referenzwerte von normalem Brustgewebe vorliegen. Eine Beurteilung kann nur untereinander erfolgen. Auch die Frage inwieweit die gefundenen Methylierungswerte biologische Relevanz (z.B. im Sinne von chromosomaler Instabilität) haben, kann von uns nicht beantwortet werden, da wir dahingehend keine Untersuchungen durchführten.

Um den Methylierungszustand von PTEN und LINE-1 nachzuweisen, wurden von uns zwei verschiedene Assays verwendet. Für den MethyLight Assay verwendeten wir die repetitive Sequenz ALU als Referenzgen, um die Menge an Input-DNA zu kontrollieren. Diese hoch repetitive Sequenz soll gegenüber einem diploid vorkommenden Gen wie COL2a, MYOD oder ACTB, die normalerweise für das MethyLight Assay verwendet werden, den Vorteil haben, dass sie stabiler gegenüber chromosomalen Alterationen, wie Deletionen oder Amplifikationen von DNA Abschnitten ist und dadurch eine genauere Berechnung des Methylierungsgrades im MethyLight Assay ermöglicht (68). Um dies zu überprüfen, verglichen wir die Varianz der beiden Referenzgene ALU und COL2a. Beide Varianzen waren jedoch sehr ähnlich, (COL2a SD = 1,045 bzw. ALU SD = 0,978; Levene Test der Varianzhomogenität $F = 0,162$; $p = 0,689$) sodass der angegebene Vorteil von

Diskussion

Weisenberger et al (68) natürlich mit der Einschränkung unserer begrenzten Stichprobenanzahl nicht bestätigt werden konnte. Außerdem werden für den PTEN und ALU PCR Ansatz unterschiedliche Mengen an DNA benötigt, wohingegen für PTEN und COL2a jeweils 50 ng eingesetzt werden. Dies bringt für das PTEN/ALU Assay den Nachteil, dass zwischen den PCR Läufen die unbekannte Probe verdünnt werden muss, was eine mögliche Fehlerquelle darstellen könnte. Der von Weisenberger et al zusätzlich beschriebene Vorteil, dass für den ALU Kontrollansatz viel weniger Input-DNA benötigt wird, konnte auch von uns beobachtet werden (ALU 0,4 ng im Gegensatz zu COL2a 50 ng). Diese Eigenschaft könnte insbesondere in der DNA Analyse von FFPE-Gewebe oder Serum von Bedeutung sein.

Die Methylierungswerte der unbekanntenen Proben wurden mit zwei unterschiedlichen Verfahren untersucht, von denen jedes seine individuellen Vor- und Nachteile hat. Es handelt sich bei beiden um relativ leicht durchzuführende, hoch sensitive, Hochdurchsatz-Verfahren, bei denen kein Post-PCR-Handling notwendig ist (79, 80, 98). HRM bietet gegenüber MethyLight die Vorteile, dass keine teuren Sonden benötigt werden und man Informationen über den Methylierungszustand des gesamten, von den Primern eingeschlossenen Amplikons erhält, wohingegen MethyLight nur die von Primern und Sonde abgedeckten CpG Inseln analysiert. Somit können aus Formveränderungen der Schmelzkurve auch heterogene Methylierungsmuster festgestellt werden (80, 98). Außerdem benötigt man beim HRM Assay im Gegensatz zum MethyLight Assay kein Referenzgen, um die Mengen an Input-DNA zu kontrollieren. Um die Übereinstimmung der gewonnenen Methylierungswerte zu überprüfen, wurden der aus dem MethyLight Assay gewonnene PMR Wert und der Methylierungswert des HRM Assays einer Korrelationsanalyse unterzogen. Der PMR Wert gibt den Prozentsatz der vollständig methylierten Sequenzen in einem Pool von DNA an (95). Falls der Kurvenverlauf von unbekannter Probe und Standardverdünnung gleich ist, gibt der Methylierungswert des HRM Assays ebenfalls den Prozentsatz an vollständig methylierten DNA Sequenzen an. Unter diesen Bedingungen würden beide Verfahren denselben Wert angeben und die Ergebnisse könnten direkt miteinander verglichen werden. Beide PCR Verfahren basieren allerdings auf unterschiedlichen Prinzipien. Für den MethyLight Assay werden für die Lage der Primer und Sonde CpG reiche DNA Abschnitte gewählt, um eine methylierungsspezifische Amplifikation zu erreichen. Beim HRM Assay werden im Gegensatz dazu die Primer in CpG arme DNA Abschnitte gelegt, um sowohl methylierte als auch unmethylierte DNA zu amplifizieren. Aus

Diskussion

diesem Grund ist es schwierig die beiden Assays so zu gestalten, dass sie den Methylierungsstatus desselben DNA Abschnitts bestimmen. Da sich bei unseren Assays weder die untersuchten Sequenzen vom PTEN noch von LINE-1 überschneiden, ist ein direkter Vergleich der gewonnenen Methylierungswerte nur bedingt zulässig.

Wir führten dennoch Korrelationsanalysen durch, da eine biologisch relevante Hyper- oder Hypomethylierung viele benachbarte CpG Inseln treffen würde (108, 109) und man die Ergebnisse somit vergleichen kann. Die Ergebnisse des MethyLight LINE-1/ALU Assays zeigten eine hohe Korrelation mit jenen des HRM LINE-1 Assays (Korrelation nach Pearson 0,837; $p < 0,001$), jedoch lagen die errechneten PMR Werte des MethyLight Assay deutlich unter jenen des HRM Assays. Ein möglicher Grund dafür könnte die mangelnde Linearität des MethyLight LINE-1/ALU Assays sein. Die von uns verwendete Berechnungsmethode setzt einen linearen Abfall der Ratio (LINE-1/ALU) voraus. Wird der Abfall der Ratio allerdings besser durch eine polynomische Funktion beschrieben, erhält man mit einer linearen Berechnungsart falsch niedrige PMR Werte. Dies konnte auch anhand der Verdünnungsreihe gezeigt werden. So betrug der berechnete PMR der 75% methylierten Standard DNA lediglich 39%. Da der PMR allerdings den Anteil an DNA angeben soll, der an den von Primern und Sonde abgedeckten CpG Stellen vollständig methyliert ist (95), sollte der berechnete PMR möglichst genau dem bekannten Methylierungsgrad des Verdünnungsstandards entsprechen. Somit führt die von uns verwendete Berechnungsart zu falsch niedrigen PMR Werten, was sich in der hohen Korrelation aber mangelnden Übereinstimmung der MethyLight und HRM Ergebnisse widerspiegelt. Um aus einer Regressionsanalyse eine optimale Formel für die Berechnung des PMR zu erhalten, wäre es besser, vorher viele Verdünnungsreihen zu analysieren und die so gewonnenen Daten einer Regressionsanalyse zu unterziehen.

Sowohl im präklinischen als auch im klinischen Bereich gibt es viele Arbeiten, die die LINE-1 Hypomethylierung bei Krebszellen beschreiben. Die meisten Arbeitsgruppen verwenden dabei COBRA (= Combined Bisulfit Restriction Analysis) oder Pyrosequencing, um den Methylierungsgrad der unbekanntenen Proben zu ermitteln. Nach unserem Wissen gibt es keine Arbeit, die eine LINE-1 Hypomethylierung mittels HRM untersucht. Unser HRM LINE-1 Assay wies eine hohe Sensitivität und Reproduzierbarkeit auf. So konnten alle Verdünnungsstandards klar voneinander unterschieden werden und es zeigte sich lediglich eine geringe Variabilität innerhalb eines PCR Laufes bzw. zwischen zwei PCR Läufen. Da die Unterschiede im LINE-1 Methylierungsgrad zwischen normalem

Diskussion

Gewebe und Tumoren nur sehr diskret sein können, sollte allerdings noch überprüft werden, ob das HRM LINE-1 Assay in der Lage ist, noch kleinere Methylierungsunterschiede (<5%) und dies vor allem im oberen Bereich zwischen 75% und 100% zu detektieren. Dazu müssten einfach kleinere Verdünnungsschritte angefertigt werden, um die Sensitivität der HRM im oberen Bereich zu überprüfen.

5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Tumorstammzellhypothese gibt Hoffnung auf ein besseres Verständnis und damit eine bessere Therapie von Tumorerkrankungen. Seit dem erstmaligen Beschreiben von vermeintlichen Krebsstammzellen bei Brustkrebs durch Al-Hajj et al im Jahr 2003 (18) sind viele Assays und Marker untersucht worden, die zu einer Identifizierung und Anreicherung von Brustkrebsstammzellen führen sollten. Dennoch wurden bis jetzt keine Assays bzw. Oberflächenmarker gefunden, die zu einer definitiven Isolierung von Brustkrebsstammzellen führen und es finden sich in der Literatur viele, oft widersprüchliche Angaben dazu. Um die molekularen Entstehungsmechanismen zu identifizieren und ein besseres Verständnis vom hierarchischen Aufbau von Tumoren zu bekommen, wäre es daher essentiell bessere Isolierungsmethoden für Brustkrebsstammzellen zur Verfügung zu haben. Erst dann können Fragen, wie sie in dieser Diplomarbeit gestellt wurden, nämlich welche Unterschiede zwischen Tumorstammzellen und normalen Tumorzellen bestehen, zufriedenstellend beantwortet werden.

Dass Tumorzellen neben genetischen auch epigenetische Veränderungen aufweisen, ist lange bekannt, allerdings wird ihre entscheidende Rolle in der Karzinogenese erst in den letzten Jahren deutlich. Hypermethylierung zählt sicherlich zu den am besten beschriebenen epigenetischen Veränderungen und es konnten mit der Markteinführung von Azacytidin (Handelsname Vidaza)- einem Medikament, das direkt in die Methylierung von Zellen eingreift- auch schon erste klinische Erfolge auf diesem Gebiet erzielt werden. Trotz dieser Erfolge gibt es noch viele ungeklärte Fragen und die der Methylierung zugrundeliegenden Mechanismen sind bisher nur wenig verstanden. Aus diesem Grund ist es wichtig qualitativ hochwertige und stabile Assays zu entwickeln, die helfen präklinische und klinische Fragestellungen zu beantworten. Nach unserem Wissen gibt es keine weiteren Arbeitsgruppen, die die High Resolution Melting Analyse zur Bestimmung der LINE-1 Methylierung einsetzen. Wie von uns unter anderem mit dieser Diplomarbeit gezeigt, ist der HRM LINE-1 Assay ein sensitives, einfaches, und kosten-günstiges Hochdurchsatzverfahren, um den Methylierungszustand von LINE-1 zu detektieren und somit eine mögliche Hypomethylierung von Krebszellen nachzuweisen. Außerdem kann dieser Assay wie von uns erst kürzlich gezeigt auch erfolgreich für die Analyse von FFPE Gewebe genutzt werden (110). Somit stellt der HRM LINE-1 Assay eine geeignete Me-

Schlussfolgerung und Ausblick

thode für weitere Methylierungsanalysen dar und kann dazu beitragen bisher noch ungeklärte Fragen in der Methylierung von Tumorzellen zu klären.

6 Literaturverzeichnis

1. Alison MR. The cancer handbook. 2. ed. Chichester: Wiley; 2007.
2. Hiddemann W, Hiddemann-Huber-Bartram. Die Onkologie. Berlin: Springer; 2004.
3. Statistik Austria. Inzidenz von Brustkrebs Österreich. URL: http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/brust/index.html (Stand: 11/08/10)
4. Statistik Austria. Mortalität von Brustkrebs in Österreich. URL: http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/brust/index.html (Stand: 11/08/10)
5. Dean M. Cancer stem cells: redefining the paradigm of cancer treatment strategies. *Mol Interv* 2006; 6(3):140–8. Available from: URL: doi:10.1124/mi.6.3.5.
6. O'Brien CA, Kreso A, Jamieson CH. Cancer stem cells and self-renewal. *Clin Cancer Res* 2010; 16(12):3113–20. Available from: URL: doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2824.
7. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355(12):1253–61. Available from: URL: doi:10.1056/NEJMra061808.
8. Rapp UR, Ceteci F, Schreck R. Oncogene-induced plasticity and cancer stem cells. *Cell Cycle* 2008; 7(1):45–51.
9. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; 133(4):704–15. Available from: URL: doi:10.1016/j.cell.2008.03.027.
10. Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med* 2004; 351(7):657–67. Available from: URL: doi:10.1056/NEJMoa040258.
11. Krivtsov AV, Twomey D, Feng Z, Stubbs MC, Wang Y, Faber J et al. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* 2006; 442(7104):818–22. Available from: URL: doi:10.1038/nature04980.
12. Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 1977; 197(4302):461–3.
13. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; 367(6464):645–8. Available from: URL: doi:10.1038/367645a0.

14. Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 2004; 23(43):7267–73. Available from: URL: doi:10.1038/sj.onc.1207946.
15. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007; 445(7123):111–5. Available from: URL: doi:10.1038/nature05384.
16. Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Biffoni M, Di VA et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* 2008; 15(3):504–14. Available from: URL: doi:10.1038/sj.cdd.4402283.
17. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005; 65(23):10946–51. Available from: URL: doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2018.
18. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003; 100(7):3983–8. Available from: URL: doi:10.1073/pnas.0530291100.
19. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Birnbaum D. Breast cancer stem cells: tools and models to rely on. *BMC Cancer* 2009; 9:202. Available from: URL: doi:10.1186/1471-2407-9-202.
20. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* 2003; 17(10):1253–70. Available from: URL: doi:10.1101/gad.1061803.
21. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 2005; 65(13):5506–11. Available from: URL: doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0626.
22. Balic M, Lin H, Young L, Hawes D, Giuliano A, McNamara G et al. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer Res* 2006; 12(19):5615–21. Available from: URL: doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0169.
23. Guan Y, Gerhard B, Hogge DE. Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2003; 101(8):3142–9. Available from: URL: doi:10.1182/blood-2002-10-3062.

24. Holyoake T, Jiang X, Eaves C, Eaves A. Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1999; 94(6):2056–64.
25. Dean M. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2009; 14(1):3–9. Available from: URL: doi:10.1007/s10911-009-9109-9.
26. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(1):48–58. Available from: URL: doi:10.1038/nrc706.
27. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(4):275–84. Available from: URL: doi:10.1038/nrc1590.
28. Costello RT, Mallet F, Gaugler B, Sainty D, Arnoulet C, Gastaut JA et al. Human acute myeloid leukemia CD34+/CD38- progenitor cells have decreased sensitivity to chemotherapy and Fas-induced apoptosis, reduced immunogenicity, and impaired dendritic cell transformation capacities. *Cancer Res* 2000; 60(16):4403–11.
29. Dave B, Chang J. Treatment resistance in stem cells and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2009; 14(1):79–82. Available from: URL: doi:10.1007/s10911-009-9117-9.
30. Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(24):1777–85. Available from: URL: doi:10.1093/jnci/djj495.
31. Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Alfaro MP, Buchholz TA, Rosen JM. WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(2):618–23. Available from: URL: doi:10.1073/pnas.0606599104.
32. Kakarala M, Wicha MS. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *J Clin Oncol* 2008; 26(17):2813–20. Available from: URL: doi:10.1200/JCO.2008.16.3931.
33. Morrison BJ, Schmidt CW, Lakhani SR, Reynolds BA, Lopez JA. Breast cancer stem cells: implications for therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2008; 10(4):210. Available from: URL: doi:10.1186/bcr2111.
34. Zhang M, Rosen JM. Stem cells in the etiology and treatment of cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2006; 16(1):60–4. Available from: URL: doi:10.1016/j.gde.2005.12.008.

35. Massard C, Deutsch E, Soria J. Tumour stem cell-targeted treatment: elimination or differentiation. *Ann Oncol* 2006; 17(11):1620–4. Available from: URL: doi:10.1093/annonc/mdl074.
36. Tu LC, Foltz G, Lin E, Hood L, Tian Q. Targeting stem cells-clinical implications for cancer therapy. *Curr Stem Cell Res Ther* 2009; 4(2):147–53.
37. Schulenburg A, Ulrich-Pur H, Thurnher D, Erovic B, Florian S, Sperr WR et al. Neoplastic stem cells: a novel therapeutic target in clinical oncology. *Cancer* 2006; 107(10):2512–20. Available from: URL: doi:10.1002/ncr.22277.
38. Takebe N, Ivy SP. Controversies in cancer stem cells: targeting embryonic signaling pathways. *Clin Cancer Res* 2010; 16(12):3106–12. Available from: URL: doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2934.
39. Keniry M, Parsons R. The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy. *Oncogene* 2008; 27(41):5477–85. Available from: URL: doi:10.1038/onc.2008.248.
40. Di CA, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* 2000; 100(4):387–90.
41. Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JF. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets* 2008; 8(3):187–98.
42. Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang SI, Zheng Z et al. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet* 1997; 16(1):64–7. Available from: URL: doi:10.1038/ng0597-64.
43. Eng C, Peacocke M. PTEN and inherited hamartoma-cancer syndromes. *Nat Genet* 1998; 19(3):223. Available from: URL: doi:10.1038/897.
44. Lopiccolo J, Ballas MS, Dennis PA. PTEN hamartomatous tumor syndromes (PHTS): rare syndromes with great relevance to common cancers and targeted drug development. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 63(3):203–14. Available from: URL: doi:10.1016/j.critrevonc.2007.06.002.
45. Bose S, Crane A, Hibshoosh H, Mansukhani M, Sandweis L, Parsons R. Reduced expression of PTEN correlates with breast cancer progression. *Hum Pathol* 2002; 33(4):405–9.

46. Bose S, Wang SI, Terry MB, Hibshoosh H, Parsons R. Allelic loss of chromosome 10q23 is associated with tumor progression in breast carcinomas. *Oncogene* 1998; 17(1):123–7. Available from: URL: doi:10.1038/sj.onc.1201940.
47. Tsutsui S, Inoue H, Yasuda K, Suzuki K, Higashi H, Era S et al. Reduced expression of PTEN protein and its prognostic implications in invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncology* 2005; 68(4-6):398–404. Available from: URL: doi:10.1159/000086981.
48. Shoman N, Klassen S, McFadden A, Bickis MG, Torlakovic E, Chibbar R. Reduced PTEN expression predicts relapse in patients with breast carcinoma treated by tamoxifen. *Mod Pathol* 2005; 18(2):250–9. Available from: URL: doi:10.1038/modpathol.3800296.
49. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 2004; 6(2):117–27. Available from: URL: doi:10.1016/j.ccr.2004.06.022.
50. Ito K, Bernardi R, Pandolfi PP. A novel signaling network as a critical rheostat for the biology and maintenance of the normal stem cell and the cancer-initiating cell. *Curr Opin Genet Dev* 2009; 19(1):51–9. Available from: URL: doi:10.1016/j.gde.2009.01.004.
51. Hill R, Wu H. PTEN, stem cells, and cancer stem cells. *J Biol Chem* 2009; 284(18):11755–9. Available from: URL: doi:10.1074/jbc.R800071200.
52. Yilmaz OH, Valdez R, Theisen BK, Guo W, Ferguson DO, Wu H et al. Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature* 2006; 441(7092):475–82. Available from: URL: doi:10.1038/nature04703.
53. Zhang J, Grindley JC, Yin T, Jayasinghe S, He XC, Ross JT et al. PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention. *Nature* 2006; 441(7092):518–22. Available from: URL: doi:10.1038/nature04747.
54. Zheng H, Ying H, Yan H, Kimmelman AC, Hiller DJ, Chen AJ et al. p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. *Nature* 2008; 455(7216):1129–33. Available from: URL: doi:10.1038/nature07443.
55. Dubrovskaya A, Kim S, Salamone RJ, Walker JR, Maira SM, Garcia-Echeverria C et al. The role of PTEN/Akt/PI3K signaling in the maintenance and viability of prostate

- cancer stem-like cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(1):268–73. Available from: URL: doi:10.1073/pnas.0810956106.
56. Zhou J, Wulfkühle J, Zhang H, Gu P, Yang Y, Deng J et al. Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(41):16158–63. Available from: URL: doi:10.1073/pnas.0702596104.
57. Korkaya H, Paulson A, Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Brown M, Dutcher J et al. Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/beta-catenin signaling. *PLoS Biol* 2009; 7(6):e1000121. Available from: URL: doi:10.1371/journal.pbio.1000121.
58. Knippers R. *Molekulare Genetik: 68 Tabellen. 9., komplett überarb. Aufl.* Stuttgart: Thieme; 2006. Available from: URL: <http://www.thieme.de/ebooklibrary/inhalte/3134770094/index.html>.
59. Esteller M. *Epigenetics in biology and medicine.* Boca Raton, Fla.: CRC Press; 2009. (Biological sciences).
60. Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 2002; 21(35):5400–13. Available from: URL: doi:10.1038/sj.onc.1205651.
61. Cho NY, Kim JH, Moon KC, Kang GH. Genomic hypomethylation and CpG island hypermethylation in prostatic intraepithelial neoplasm. *Virchows Arch* 2009; 454(1):17–23. Available from: URL: doi:10.1007/s00428-008-0706-6.
62. Kim MJ, White-Cross JA, Shen L, Issa JP, Rashid A. Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 in hepatocellular carcinomas. *Mod Pathol* 2009; 22(3):442–9. Available from: URL: doi:10.1038/modpathol.2008.203.
63. Chalitchagorn K, Shuangshoti S, Hourpai N, Kongruttanachok N, Tangkijvanich P, Thong-ngam D et al. Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. *Oncogene* 2004; 23(54):8841–6. Available from: URL: doi:10.1038/sj.onc.1208137.
64. Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW et al. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 2003; 300(5618):489–92. Available from: URL: doi:10.1126/science.1083558.
65. Daskalos A, Nikolaidis G, Xinarianos G, Savvari P, Cassidy A, Zakopoulou R et al. Hypomethylation of retrotransposable elements correlates with genomic instability in

- non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2009; 124(1):81–7. Available from: URL: doi:10.1002/ijc.23849.
66. Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 2003; 300(5618):455. Available from: URL: doi:10.1126/science.1083557.
67. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409(6822):860–921. Available from: URL: doi:10.1038/35057062.
68. Weisenberger DJ, Campan M, Long TI, Kim M, Woods C, Fiala E et al. Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(21):6823–36. Available from: URL: doi:10.1093/nar/gki987.
69. CYang AS, Estecio MR, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa JP. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res* 2004; 32(3):e38. Available from: URL: doi:10.1093/nar/gnh032.
70. Wiencke JK, Zheng S, Jelluma N, Tihan T, Vandenberg S, Tamguney T et al. Methylation of the PTEN promoter defines low-grade gliomas and secondary glioblastoma. *Neuro Oncol* 2007; 9(3):271–9. Available from: URL: doi:10.1215/15228517-2007-003.
71. Kang YH, Lee HS, Kim WH. Promoter methylation and silencing of PTEN in gastric carcinoma. *Lab Invest* 2002; 82(3):285–91.
72. Liu S, Yu J, Fu P, Yu H. Relationship between promoter methylation and mRNA expression of PTEN gene and gastric carcinoma. *The Chinese-German Journal of Clinical Oncology* 2008; 7(10):580–3. Available from: URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s10330-008-0081-4>.
73. Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Carethers JM, Dowell JM, Wasserman L et al. Frequent inactivation of PTEN by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal cancers. *Cancer Res* 2004; 64(9):3014–21.
74. Soria JC, Lee HY, Lee JI, Wang L, Issa JP, Kemp BL et al. Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clin Cancer Res* 2002; 8(5):1178–84.
75. Hou P, Ji M, Xing M. Association of PTEN gene methylation with genetic alterations in the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in thyroid tumors. *Cancer* 2008; 113(9):2440–7. Available from: URL: doi:10.1002/cncr.23869.

76. Tam KF, Liu VW, Liu SS, Tsang PC, Cheung AN, Yip AM et al. Methylation profile in benign, borderline and malignant ovarian tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133(5):331–41. Available from: URL: doi:10.1007/s00432-006-0178-5.
77. Garcia JM, Silva J, Pena C, Garcia V, Rodriguez R, Cruz MA et al. Promoter methylation of the PTEN gene is a common molecular change in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 41(2):117–24. Available from: URL: doi:10.1002/gcc.20062.
78. Khan S, Kumagai T, Vora J, Bose N, Sehgal I, Koeffler PH et al. PTEN promoter is methylated in a proportion of invasive breast cancers. *Int J Cancer* 2004; 112(3):407–10. Available from: URL: doi:10.1002/ijc.20447.
79. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(8):E32.
80. Wojdacz TK, Dobrovic A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(6):e41. Available from: URL: doi:10.1093/nar/gkm013.
81. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 2007; 1(5):555–67. Available from: URL: doi:10.1016/j.stem.2007.08.014.
82. Dahia PL, FitzGerald MG, Zhang X, Marsh DJ, Zheng Z, Pietsch T et al. A highly conserved processed PTEN pseudogene is located on chromosome band 9p21. *Oncogene* 1998; 16(18):2403–6. Available from: URL: doi:10.1038/sj.onc.1201762.
83. Zysman MA, Chapman WB, Bapat B. Considerations when analyzing the methylation status of PTEN tumor suppressor. *Am J Pathol* 2002; 160(3):795–800.
84. Widschwendter M, Siegmund KD, Muller HM, Fiegl H, Marth C, Muller-Holzner E et al. Association of breast cancer DNA methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen. *Cancer Res* 2004; 64(11):3807–13. Available from: URL: doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3852.
85. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Wicinski J, Cervera N, Finetti P et al. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res* 2009; 69(4):1302–13. Available from: URL: doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2741.

86. Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res* 2008; 10(2):R25. Available from: URL: doi:10.1186/bcr1982.
87. Grimshaw MJ, Cooper L, Papazisis K, Coleman JA, Bohnenkamp HR, Chiapero-Stanke L et al. Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic. *Breast Cancer Res* 2008; 10(3):R52. Available from: URL: doi:10.1186/bcr2106.
88. Cariati M, Naderi A, Brown JP, Smalley MJ, Pinder SE, Caldas C et al. Alpha-6 integrin is necessary for the tumorigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line. *Int J Cancer* 2008; 122(2):298–304. Available from: URL: doi:10.1002/ijc.23103.
89. Huang M, Zhang F, Zhang Y. [Influence factors on the formation of mammospheres from breast cancer stem cells]. *Beijing Da Xue Xue Bao* 2008; 40(5):500–4.
90. Kok M, Koornstra RH, Margarido TC, Fles R, Armstrong NJ, Linn SC et al. Mammosphere-derived gene set predicts outcome in patients with ER-positive breast. *J Pathol* 2009; 218(3):316–26. Available from: URL: doi:10.1002/path.2544.
91. To K, Fotovati A, Reipas KM, Law JH, Hu K, Wang J et al. Y-box binding protein-1 induces the expression of CD44 and CD49f leading to enhanced self-renewal, mammosphere growth, and drug resistance. *Cancer Res* 2010; 70(7):2840–51. Available from: URL: doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3155.
92. Guzman-Ramirez N, Voller M, Wetterwald A, Germann M, Cross NA, Rentsch CA et al. In vitro propagation and characterization of neoplastic stem/progenitor-like cells from human prostate cancer tissue. *Prostate* 2009; 69(15):1683–93. Available from: URL: doi:10.1002/pros.21018.
93. Fang DD, Kim YJ, Lee CN, Aggarwal S, McKinnon K, Mesmer D et al. Expansion of CD133(+) colon cancer cultures retaining stem cell properties to enable cancer stem cell target discovery. *Br J Cancer* 2010; 102(8):1265–75. Available from: URL: doi:10.1038/sj.bjc.6605610.
94. Warnecke PM, Stirzaker C, Melki JR, Millar DS, Paul CL, Clark SJ. Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(21):4422–6.
95. Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, Cantor M, Kirkner GJ, Spiegelman D et al. Precision and performance characteristics of bisulfite conversion and real-time PCR

- (MethyLight) for quantitative DNA methylation analysis. *J Mol Diagn* 2006; 8(2):209–17.
96. Eads CA, Lord RV, Kurumboor SK, Wickramasinghe K, Skinner ML, Long TI et al. Fields of aberrant CpG island hypermethylation in Barrett's esophagus and associated adenocarcinoma. *Cancer Res* 2000; 60(18):5021–6.
97. Weisenberger D, Campan M, Long T, Laird P. Determination of the CpG Island Methylator Phenotype (CIMP) in colorectal cancer using MethyLight [cited 2010 Jul 3]. Available from: URL: http://www.natureprotocols.com/2006/06/30/determination_of_the_cpg_islan.php.
98. Balic M, Pichler M, Strutz J, Heitzer E, Ausch C, Samonigg H et al. High quality assessment of DNA methylation in archival tissues from colorectal cancer patients using quantitative high-resolution melting analysis. *J Mol Diagn* 2009; 11(2):102–8. Available from: URL: doi:10.2353/jmoldx.2009.080109.
99. Aparicio A, North B, Barske L, Wang X, Bollati V, Weisenberger D et al. LINE-1 methylation in plasma DNA as a biomarker of activity of DNA methylation inhibitors in patients with solid tumors. *Epigenetics* 2009; 4(3):176–84.
100. Sakr RA, Barbashina V, Morrogh M, Chandarlapaty S, Andrade VP, Arroyo CD et al. Protocol for PTEN Expression by Immunohistochemistry in Formalin-fixed Paraffin-embedded Human Breast Carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2010. Available from: URL: doi:10.1097/PAI.0b013e3181d50bd5.
101. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983; 301(5895):89–92.
102. Ehrlich M. Cancer-linked DNA hypomethylation and its relationship to hypermethylation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 310:251–74.
103. Holm TM, Jackson-Grusby L, Brambrink T, Yamada Y, Rideout W3, Jaenisch R. Global loss of imprinting leads to widespread tumorigenesis in adult mice. *Cancer Cell* 2005; 8(4):275–85. Available from: URL: doi:10.1016/j.ccr.2005.09.007.
104. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(6):2545–50.
105. Figueiredo JC, Grau MV, Wallace K, Levine AJ, Shen L, Hamdan R et al. Global DNA hypomethylation (LINE-1) in the normal colon and lifestyle characteristics and dietary and genetic factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18(4):1041–9. Available from: URL: doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0926.

106. Estecio MR, Gharibyan V, Shen L, Ibrahim AE, Doshi K, He R et al. LINE-1 hypomethylation in cancer is highly variable and inversely correlated with microsatellite instability. *PLoS ONE* 2007; 2(5):e399. Available from: URL: doi:10.1371/journal.pone.0000399.
107. Phokaew C, Kowudtitham S, Subbalekha K, Shuangshoti S, Mutirangura A. LINE-1 methylation patterns of different loci in normal and cancerous cells. *Nucleic Acids Res* 2008; 36(17):5704–12. Available from: URL: doi:10.1093/nar/gkn571.
108. Cameron EE, Baylin SB, Herman JG. p15(INK4B) CpG island methylation in primary acute leukemia is heterogeneous and suggests density as a critical factor for transcriptional silencing. *Blood* 1999; 94(7):2445–51.
109. Hsieh CL. Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density. *Mol Cell Biol* 1994; 14(8):5487–94.
110. Stanzer S, Balic M, Strutz J, Heitzer E, Obermair F, Hauser-Kronberger C et al. Rapid and reliable detection of LINE-1 hypomethylation using high-resolution melting analysis. *Clin Biochem* 2010. Available from: URL: doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.09.013.

7 Glossar und Abkürzungen

ABC- G2	ATP Binding Cassette Protein- G2
ACTB Gen	Actin Beta Gen
Akt	Aktivierte Proteinkinase B
ALDH	Aldehyddehydrogenase
ALU	Repetitive DNA Sequenz benannt nach dem Restriktionsenzym AluI (aus <i>Arthrobacter luteus</i>)
CD	Cluster of Differentiation
COBRA	Combined Bisulfit Restriction Analysis
COL2a (eigentlich COL1A2 Gen)	Collagen, Typ I, alpha 2 Gen
CpG	Cytosin- phosphat- Guanin
Cq	Quantification Cycle
DNA	Desoxyribonucleinacid
HRM	High-Resolution Melting
LINE	Long Interspersed Nucleotide Elements
LOH	Loss of heterozygosity
ML	MethyLight
MS	Mammosphären
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MYOD1 Gen	Myogenic Differentiation 1 Gen
NOD/ SCID	Non-Obese Diabetic/ Severe Combined Immunodeficiency
NTC	Non Template Control
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI3K	Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
PI2P	Phosphatidyl Inositol 2 Phosphat
PI3P	Phosphatidyl Inositol 3 Phosphat
PMR	Percent of fully Methylated Reference
PTEN	Phosphate and Tensin Homolog
SAT alpha	Satellite Alpha Sequence

Glossar und Abkürzungen

SD	Standard Deviation (= Standardabweichung)
SINE	Short Interspersed Nucleotid Elements
RT-PCR	Real- Time PCR

8 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: NICHT-ADHÄRENTE KULTUR DER FÜNF VERWENDETEN ZELLINIEN.	32
ABBILDUNG 2: METHYLIGHT PTEN OPTIMIERUNG	34
ABBILDUNG 3: BESTIMMUNG DES PTEN METHYLIERUNGSGRADES ZWEIER UNBEKANNTER PROBEN MITTELS METHYLIGHT.	35
ABBILDUNG 4: HRM PTEN VERDÜNNUNGSREIHE UND VERSUCHSLAUF	37
ABBILDUNG 5: METHYLIGHT LINE-1 OPTIMIERUNG	39
ABBILDUNG 6: ANALYSE DES LINE-1 METHYLIERUNGSSTATUS VON UNBEKANNTEN PROBEN MITTELS METHYLIGHT	40
ABBILDUNG 7: ERGEBNISSE DER METHYLIGHT LINE-1 HYPOMETHYLIERUNGSANALYSE	41
ABBILDUNG 8: HRM LINE-1 VERDÜNNUNGSREIHE	43
ABBILDUNG 9: HRM LINE-1 VERSUCHSLAUF UND ERGEBNIS DES HRM LINE-1 ASSAYS	44
ABBILDUNG 10: VERGLEICH DES METHYLIGHT LINE/ALU ASSAYS MIT DEM HRM LINE-1 ASSAY	44
ABBILDUNG 11: ERGEBNIS DER PTEN IMMUNZYTOCHEMIE	47

9 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN ZELLINIEN UND KULTURMEDIEN.....	17
TABELLE 2: METHYLIGHT PRIMER- UND SONDENSEQUENZEN UND GENBANK NUMMER	29
TABELLE 3: HRM PRIMERSEQUENZEN UND GENBANK NUMMER	29
TABELLE 4: INTERASSAY VARIABILITÄT DES HRM LINE-1 ASSAYS	45
TABELLE 5: ÜBERSICHT ÜBER DIE PTEN FÄRBEERGEBNISSE.....	46