

Identifizierung von Einflussfaktoren auf DNA-Schäden in weiblichem Brustgewebe



Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Benjamin Spielmann

aus Geislingen an der Steige

Würzburg 2017

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am

Gutachter der schriftlichen Arbeit:

1. Gutachter: _____

2. Gutachter: _____

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums:

1. Prüfer: _____

2. Prüfer: _____

3. Prüfer: _____

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums:

Danksagung

Mein Dank gilt:

Prof. Dr. Leane Lehmann für die Überlassung des interessanten Themas, das Vertrauen in mich und meine Arbeit, sowie wertvolle Diskussionen und Ideen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dr. Harald Esch für die Organisation der Gewebespenden, den Kontakt zu den Ärzten und für die wertvollen Ratschläge bei der DNA-Isolation.

Prof. Dr. Eckert, Prof. Dr. Meffert, Prof. Dr. Jakubietz, Priv.-Doz. Dr. Jakubietz, Priv.-Doz. Dr. Schmitt, Dr. Neshkova, Dr. Luttenberger, Dr. Waldhofen und Dr. Steinmetz für die Ermöglichung von Gewebespenden.

Dem RMCA-Team um Jan Fuchs, Dr. Katja Schmalbach und Anne Scheffler für die vielen Diskussionen zum Gelingen des RMCA.

Dem Isocross-Team um Daniela Pemp, Dr. Katja Schmalbach, Dr. Carolin Kleider und René Hauptstein für die vielen Diskussionen zum Gelingen der restlichen nicht-RMCA-assoziierten Themen.

Daniela Pemp für ihre Hilfe in Statistik- und R-Fragen.

René Hauptstein für die vielen anregenden Diskussionen während der Pausen.

Meinen WAAsis, Master- und Bacheloranden Manuela Rothacker, Silvia Frey, Harald Schuchardt, Sarah Hauenschild, Verena Titze-Schmitt, Lisa-Marie Orth, Fabian Sandgruber, Elisabeth Krojnewski und Vanessa Eisert für ihren engagierten Beitrag zu dieser Arbeit.

Johanna Loos für die erstklassigen Primer.

Annette Albrecht für die Unterstützung in der Zellkultur.

Allen aktuellen und früheren Mitarbeitern des Arbeitskreises für die gute Zeit im und außerhalb des Labors.

René Hauptstein, Miriam Macziol und André Zöllner für das fleißige Korrekturlesen.

Meinen Eltern für ihren Glauben an mich und ihre fortwährende Unterstützung.

Michi in schwierigen Phasen für die vielen Erinnerungen an bessere Zeiten.

Eine inoffizielle und zeitgleich unübliche Danksagung geht an meinen Bruder im Geiste, mein menschliches Vorbild und Seelenwohl, Ludwig Lochner.

Ein mindestens genauso großer Dank geht an Pete, Flippi, Almuth, Tobi, Harry und den Rest der Crew, für die tolle Zeit abseits der Uni. Haven't you heard about the word?

Und natürlich danke ich der wichtigsten Person, meiner Frau Gesche fürs Korrekturlesen, die liebevolle Unterstützung und einfach nur fürs da sein.

Inhalt

Abkürzungen	V
1. Einleitung.....	1
1.1. <i>Random Mutation Capture Assay</i>	1
1.1.1. Funktion und Aufbau von Mitochondrien.....	4
1.1.2. Mitochondriale Transkription und Replikation	5
1.1.3. Mitochondriale DNA-Reparatur	6
1.1.4. Generierung von Rho0-Zellen durch Inhibition der mtDNA-Replikation.....	7
1.1.5. Einflussfaktoren auf mitochondrialen genotoxischen Stress	8
1.2. Metabolische Netzwerkmodellierung	10
1.2.1. Polymorphismen	12
1.2.1.1. Bestimmung von <i>single nucleotide polymorphisms</i>	14
1.2.2. Weitere Einflussfaktoren auf die DNA-Adduktbildung.....	16
1.3. Oxidativer Stress	20
2. Problemstellung.....	29
3. Material und Methoden.....	33
3.1. Material	33
3.1.1. Geräte	33
3.1.2. Verbrauchsmaterialien	35
3.1.3. Chemikalien	37
3.1.4. Puffer und Lösungen.....	41
3.1.5. Programme	43
3.2. Methoden.....	43
3.2.1. Akquirierung des Gewebes	43
3.2.2. Präparation des Gewebes.....	43
3.2.3. DNA-Isolation aus Zellen und Gewebe	44
3.2.4. <i>Random Mutatin Capture Assay</i>	45
3.2.4.1. Primerdesign	46
3.2.4.2. <i>TaqI</i> -Verdau.....	46
3.2.4.3. Kopienzahlbestimmung	46
3.2.4.4. Mutantenzahlbestimmung	48
3.2.4.5. <i>TaqI</i> -Nachverdau von Mutantenbanden	49
3.2.4.6. Berechnung der Mutationsfrequenz	50
3.2.5. Photometrische Quantifizierung von DNA.....	50
3.2.5.1. Flourimetrische Quantifizierung von DNA Standards	50
3.2.6. Agarose-Gelelektrophorese	51
3.2.7. Gelbanden- und PCR-Produkt-Aufreinigung.....	51

3.2.8. Sanger-Sequenzierung	52
3.2.9. Zellkultur	52
3.2.9.1. Auftauen der Zellen	52
3.2.9.2. Mediumwechsel und Passage	53
3.2.9.3. Inkubation mit Ethidiumbromid, Tacrin und 2,4-Dinitrophenol	53
3.2.9.4. Überprüfung der Stabilität der Inkubationslösungen	53
3.2.9.5. Mikroskopie der Zellen	54
3.2.9.6. Zellzyklusbestimmung	54
3.2.9.7. Bestimmung der <i>Plating Efficiency</i>	55
3.2.9.8. Klonierung von Einzelzellen	55
3.2.9.9. Selektion von Rho0-Zellen	56
3.2.9.10. Überprüfung des Rho0-Status mittels PCR mit anschließender Gelelektrophorese	56
3.2.10. Polymorphismen	57
3.2.10.1. Verwendete Zelllinien als Positivkontrolle	57
3.2.10.2. <i>GSTT1</i> - und <i>GSTM1</i> - <i>copy number polymorphism</i> -Bestimmung	57
3.2.10.3. Allelische Diskriminierung	58
3.2.10.4. Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus-PCR	59
3.2.10.5. Berechnung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts	59
3.2.11. Statistik	60
3.2.12. Metabolische Netzwerkmodellierung	61
3.2.13. Multiple lineare Regression und Hauptkomponentenanalyse	61
3.2.14. Genexpression, <i>lobule type</i> , Estrogen-, Cholesterol- und Isoflavongewebsspiegelbestimmung	61
4. Ergebnisse und Diskussion	65
4.1. Charakterisierung der Studienkohorte	65
4.2. <i>Random Mutation Capture Assay</i>	67
4.2.1. Primerdesign	67
4.2.2. Kopienzahlbestimmung	69
4.2.2.1. Test der Primer für die Kopienzahlbestimmung	70
4.2.2.2. Quantifizierung des Standards für die Kopienzahlbestimmung	71
4.2.2.3. Vergleich 2- und 3- <i>step</i> -Temperaturprogramm	71
4.2.2.3.1. Optimierung der <i>Annealing</i> -Temperatur	72
4.2.2.4. Festlegung des Kalibrierbereiches	74
4.2.2.4.1. Richtigkeit und Präzision der Kopienzahlbestimmung	76
4.2.2.4.2. Ermittlung der Effizienz der Kopienzahlbestimmungs-PCR	78
4.2.2.5. Festlegung akzeptierter Schwankungen bei Realproben	79
4.2.3. Mutantenzahlbestimmung	80

4.2.3.1. Test der Primer für die Mutations-PCR	81
4.2.3.2. Generierung von Rho0-Zellen	83
4.2.3.2.1. Auswahl des Konzentrationsbereiches der Inkubationssubstanz	83
4.2.3.2.2. Inkubation der MCF-7-Zellen mit Ethidiumbromid, Tacrin und Dinitrophenol.....	84
4.2.3.2.3. Klonierung der inkubierten Zellen	87
4.2.3.2.4. Verifizierung des Rho0-Status	89
4.2.3.3. Ermittlung der nDNA-Verunreinigung der mtDNA-Isolate	90
4.2.3.4. Standardquantifizierung für die Mutations-PCR	92
4.2.3.5. Ermittlung der produktspezifischen Schmelztemperatur	92
4.2.3.6. Optimierung der Primerkonzentration.....	94
4.2.3.7. Nachweis einer Kopie.....	96
4.2.3.8. Exemplarische Bestimmung der Spontanmutationsfrequenz in humanem Brustdrüsengewebe.....	97
4.2.3.9. Methodische Schwankung der Spontanmutationsbestimmung	98
4.2.4. Ermittlung von Spontanmutationsfrequenzen	98
4.2.4.1. Vergleich Spontanmutationsfrequenzen Fett- und Drüsengewebe	98
4.2.4.2. Bestimmung der mitochondrialen Spontanmutationsfrequenz in humanem Brustfettgewebe.....	101
4.2.4.2.1. Reevaluierung der Schwankung der Kopienzahlbestimmung und Standard-Wiederfindungsrate bei Realproben.....	102
4.2.4.2.2. Verifizierung der Mutanten.....	106
4.2.4.2.3. Mutationsspektrum der Fettgewebeproben.....	107
4.2.5. Einflussfaktoren auf die mitochondriale Spontanmutationsfrequenz	110
4.3. Bioinformatische Netzwerkmodellierung.....	116
4.3.1. Polymorphismen	116
4.3.1.1. <i>Copy number polymorphism</i> -Genotypisierung	117
4.3.1.2. <i>Single nucleotide polymorphism</i> -Genotypisierung	120
4.3.1.2.1. Verifizierung der Positivkontrollen.....	122
4.3.1.2.2. Genotypisierung der vorhandenen Proben	124
4.3.1.3. Plausibilitätsprüfung der Allel-Frequenzen	125
4.3.1.4. Einfluss des Genotyps auf den mRNA-Spiegel	128
4.3.1.5. Optimierung von linearen Regressionsmodellen zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf Estrogen-Spiegel	131
4.3.2. Netzwerk Validierung	135
4.3.3. Identifizierung von Einflussfaktoren auf DNA-Adduktflüsse	138
4.4. Transkriptspiegel als Marker für oxidativen Stress	143
4.4.1. Hauptkomponentenanalyse zur Reduzierung der erklärenden Variablen.....	147

4.4.2. Multiple lineare Regressionsmodelle zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf Marker-Transkriptspiegel für oxidativen Stress	148
5. Zusammenfassung	159
6. Summary	165
Literaturverzeichnis	171
Abbildungsverzeichnis.....	187
Tabellenverzeichnis.....	197
Anhang	VIII

Abkürzungen

8-OH-dG	8-Hydroxy-deoxy-Guanosin
AHR	Aryl-Hydrocarbon Rezeptor
AP	<i>Activator protein</i>
ApE	<i>A plasmid Editor</i>
ARE	<i>Antioxidant responsive element</i>
AREG	Amphiregulin
ARNT	<i>Aryl hydrogen receptor nuclear translocator</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BACH1	Transkriptions Regulatorprotein BACH1
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>
BER	<i>Base excision repair</i>
BMF	<i>Proapoptotic BH3-only protein</i>
BMI	<i>Body mass index</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CCND1	Cyclin D1
CDKN	Cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor
CHK	<i>Checkpoint Kinase</i>
CNP	<i>Copy number polymorphism</i>
CO	Cytochrom C-Oxidase
COMT	Katechol-O-Methyltransferase
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CYP	Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase
CytB	Cytochrom B
DAPI	4',6-Diamin-2-Phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP	Dinitrophenol
DR	<i>Direct reversal</i>
E1	Estron
E1-G	Estron-Glucuronid
E1-S	Estron-Sulfat
E2	17 β -Estradiol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
EE	Ethinylestradiol
EGR1	<i>Early growth response protein 1</i>
ERD	<i>17β-Estradiol releasing drug</i>
ERK	<i>Extra cellular regulated kinase</i>
ESR	Estrogenrezeptor
EtBr	Ethidiumbromid
ExVars	<i>Explanatory variables</i>
FAM	6-Carboxyfluorescein

FI	Fluoreszenzintensität
GATA3	<i>GATA binding protein 3</i>
GCLC	γ -Glutamyl-Cystein Ligase
<i>GRC</i>	<i>GC rich consensus sequence</i>
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GUSB	Glucuronidase β
HiFKS	Hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum
HK	Hauptkomponente
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HS	<i>Heavy subunit</i>
HSD	Hydroxysteroid-Dehydrogenase
HWG	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
Ile	Isoleucin
IWF	Interne Wiederfindung
JNK	c-jun N-terminale Kinase
k.A.	Keine Angabe
Kap.	Kapitel
Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
Leu	Leucin
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
Lob	<i>Lobule type</i>
LOD	<i>Limit of detection</i>
LOQ	<i>Limit of quantification</i>
LS	<i>Light subunit</i>
MAPK	MAP Kinase
MeO	Methoxy
Met	Methionin
MKI67	Proliferations-assoziiertes Ki-67-Antigen
MMR	<i>Mismatch repair</i>
mtDNA	Mitochondriale DNA
mtTFA	Mitochondrialer Transkriptionsfaktor A
n_0	Anfangskopienzahl
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
ND5	NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase-Kern-Untereinheit 5
nDNA	Nukleäre DNA
NER	<i>Nucleotide excision repair</i>
nf Wasser	Nukleasefreies Wasser
NFE2L2	<i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
NF κ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NQO1	NADPH-Chinon Oxidoreduktase
NR11	<i>Nuclear receptor-sub family 1-group I-member</i>

NRF1	<i>Nuclear respiratory factor 1</i>
NTC	<i>No template control</i>
NUMT	<i>Nuclear sequence of mitochondrial origin</i>
OGG1	8-Oxoguanin DNA-Glykosylase 1
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	<i>Plating efficiency</i>
PGR	Progesteron-Rezeptor
PIK3CA	Phosphatidyl-Insiol-3-Kinase
PKC	Protein Kinase C
PM	Polymorphismus
Pro	Prolin
R ²	Korrelationskoeffizient
RER	<i>Recombinational repair</i>
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
RMCA	<i>Random Mutation Capture Assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
rRNA	Ribosomale RNA
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i>
Ser	Serin
SMF	Spontanmutationsfrequenz
SNF	14-3-3 σ
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
STS	Steroidsulfatase
SULT	Sulfotransferase
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBP	<i>TATA-Box binding protein</i>
TE	Tris-EDTA
TFF1	<i>Trefoil factor 1</i>
TGFB1	<i>Transforming growth factor β</i>
TLDA	<i>TaqMan® low density array</i>
T _m	Schmelztemperatur
TP53	Tumorsuppressorprotein 53
TRE	<i>Recognition site for AP-1 binding</i>
UGT	Uridin 5'-Diphospho-Glucuronosyltransferase
UV	Ultraviolett
Val	Valin
VSP	Verhältnis Standardzugabe-/Proben-Kopienzahl
WNT	<i>Wingless-related MMTV integration site</i>
XRE	<i>Xenobiotic response element</i>
ZZV	Zellzyklusverteilung

1. Einleitung

Die absolute Zahl der Brustkrebserkrankungen in Deutschland hat sich seit 1970 mehr als verdoppelt und ist nach wie vor die häufigste krebsbedingte Todesursache bei Frauen (RKI, 2016). So erkrankten 2013 etwa 72.000 Frauen an Brustkrebs (RKI, 2016). Nur ein kleiner Teil der Erkrankungen ist dabei auf vererbte genetische Defekte zurückzuführen (RKI, 2016). Als Risikofaktoren gelten hauptsächlich exogene Faktoren wie zum Beispiel Übergewicht, hoher Alkoholkonsum oder länger andauernde Hormonersatztherapie (RKI, 2016). Dabei spielt zum Beispiel durch Übergewicht oder Alkoholkonsum induzierter oxidativer Stress eine wichtige Rolle bei der Induktion von Mutationen, welcher somit prokarzinogen sein kann (zusammengefasst in Mena et al., 2009).

1.1. *Random Mutation Capture Assay*

Somatische Mutationen, die auf DNA-Schäden durch Exposition gegenüber Umwelt-Mutagenen oder durch spontane Fehler bei der DNA-Replikation zurückzuführen sind, spielen bei der Krebsentwicklung eine wichtige Rolle (zusammengefasst in Ning et al., 2014). Dabei spielt, neben nukleärer DNA (nDNA), die mitochondriale DNA (mtDNA) ebenso eine wichtige Rolle. So wurde in tumorigenen kultivierten humanen Brustgewebezellen, im Vergleich zu immortalisierten nicht tumorigenen kultivierten Brustgewebezellen, bereits eine signifikant höhere mitochondriale Spontanmutationsfrequenz (SMF) beschrieben (Ahn et al., 2016). SMF sind in gesundem Gewebe allerdings sowohl in mtDNA, als auch in nDNA äußerst niedrig und damit schwer zu quantifizieren. So liegt die SMF in mtDNA zwischen $8 \cdot 10^{-7}$ und $2 \cdot 10^{-4} \cdot \text{bp}^{-1}$ und in nDNA zwischen $1 \cdot 10^{-8}$ und $4 \cdot 10^{-7} \cdot \text{bp}^{-1}$ (Tabelle 1). Eine Methode die sensitiv genug ist, um eben jene SMF abzubilden, ist der von Bielas und Loeb (2005) entwickelte *Random Mutation Capture Assay* (RMCA). So gelang es bereits Schmalbach (2014) mittels RMCA die nukleäre SMF von gesundem humanem Brustdrüsengewebe im Intron des Tumorsuppressor-Gens P53 (*TP53*) zu bestimmen.

Da für die Anwendung des RMCA auf nDNA ein vorhergehender Restriktionsenzym-Verdau und eine Hybridisierung der Zielsequenz mit einer komplementären biotinylierten Sonde notwendig ist, erwies sich die Methode jedoch als zu zeitaufwendig und unwirtschaftlich. Wird der RMCA auf mtDNA angewendet, entfallen diese beiden

Schritte aufgrund der geringeren Größe des mitochondrialen Genoms (16 kbp im Vergleich zu 3 Mio kbp bei nDNA).

Tabelle 1: Übersicht über bereits publizierte SMF in gesundem humanem Gewebe (*in* und *ex vivo*) aufsteigend nach SMF. CDGE: *constant denaturing gel electrophoresis*, NGS: *Next Generation Sequencing*, PPKS: PCR-Produkt Klonierung und Sequenzierung.

nukleäre SMF (*bp ⁻¹)	Gewebe	Methodik	Studie
1*10 ⁻⁸	Fibroblasten	RMCA	Bielas und Loeb (2005)
7*10 ⁻⁸ – 4*10 ⁻⁷	Brustdrüsengewebe	RMCA	Schmalbach (2014)
3*10 ⁻⁷	Lungengewebe	RMCA	Zheng et al. (2007)
mitochondriale SMF (*bp ⁻¹)			
8*10 ⁻⁷ – 1,6*10 ⁻⁵	Kolon Mukosa	RMCA	Greaves et al. (2009)
3*10 ⁻⁶	Lungengewebe	CDGE	Coller et al. (1998)
3*10 ⁻⁶ – 2*10 ⁻⁵	Hirngewebe	Duplex-NGS	Kennedy et al. (2013)
3*10 ⁻⁵ – 1*10 ⁻⁴	Kolon Mukosa	RMCA	Ericson et al. (2012)
1*10 ⁻⁵	Stammzellen aus Brustgewebe	Duplex-NGS	Ahn et al. (2015)
5*10 ⁻⁵ – 4*10 ⁻⁴	Synovialmembran	RMCA	Biniecka et al. (2011)
5*10 ⁻⁶ – 7*10 ⁻⁵	Synovialmembran	RMCA	Harty et al. (2012)
2*10 ⁻⁴	Hirngewebe	PPKS	Lin et al. (2002)

Im Wesentlichen besteht der mitochondriale RMCA analog zu Vermulst et al. (2008) nach erfolgreicher DNA Isolation aus drei Schritten:

1. *TaqI*-Verdau:

Zunächst wird mit der mtDNA ein Restriktionsverdau mit *TaqI* durchgeführt. Dabei wird der Wildtyp geschnitten, mtDNA, auf der sich in der *TaqI*-Schnittstelle eine Mutation befindet, jedoch nicht (Abbildung 1). *TaqI* wird verwendet, da es nicht durch DNA-Schäden wie DNA-Ethylierung (Bielas und Loeb, 2005) oder DNA-Oxidation beeinflusst wird (Vermulst et al., 2007). Des Weiteren befinden sich in der *TaqI*-Schnittstelle alle vier DNA-Basen. So können alle zwölf möglichen Einzelbasenpaarsubstitutionen erfasst werden.

2. Gesamtkopienzahlbestimmung und 3. Mutantenzahlbestimmung:

Nach dem *TaqI*-Verdau wird die Gesamtkopienzahl mit Primern abseits der *TaqI*-Schnittstelle mittels quantitativer PCR und mit *TaqI*-Schnittstellen-flankierenden Primern die Mutantenzahl in einer separaten PCR ermittelt (Abbildung 1). Die Mutanten

werden am Ende nach Gelextraktion mittels Sanger-Sequenzierung verifiziert. Die SMF ergibt sich durch Division der detektierten Mutanten durch die Gesamtzahl der erfassten Basen, in diesem Fall vier, multipliziert mit der bei der Mutantenzahl eingesetzten Gesamtkopienzahl.

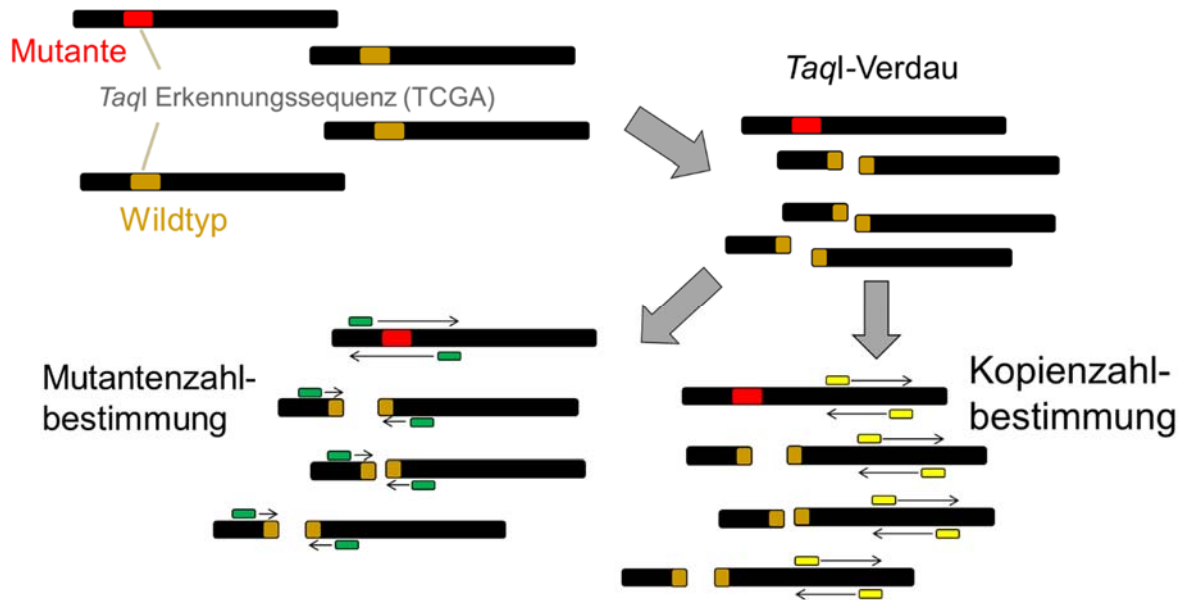


Abbildung 1: Schematische Darstellung des mitochondrialen *Random Mutation Capture Assays* modifiziert nach Vermulst et al. (2008).

Prinzipiell kann der mitochondriale RMCA bei einer Vielzahl von Geweben und Versuchsansätzen verwendet werden (Vermulst et al., 2008). So ermittelten Greaves et al. (2009), Gorman et al. (2010) und Ericson et al. (2012) bereits mitochondriale SMF mittels RMCA in gesunder humaner Kolon-Mukosa und Biniiecka et al. (2011) und Harty et al. (2012) in gesunder humaner Synovialmembran (Tabelle 1). Jedoch gibt es bei der Primerwahl Unterschiede zum nukleären RMCA. Aufgrund sogenannter *nuclear DNA sequences of mitochondrial origin* (NUMTs), mitochondriale Genabschnitte, die in der nDNA vorkommen, gibt es nach Ramos et al. (2009) und Ramos et al. (2011) zwei kritische Bereiche auf dem humanen mitochondrialen Genom beim Primer-Design (Abbildung 2). Der Bereich von bp 3.914-9.755 weist eine 98%ige und der Bereich von bp 9.582-14.479 eine 88%ige Sequenz-Homologie zur nDNA auf. Um nicht fälschlicherweise nDNA mit zu erfassen, müssen Primer für den mitochondrialen RMCA somit im Bereich zwischen bp 14.479 und 3.914 platziert werden, welcher im Wesentlichen die Gene, die für Cytochrom B (CytB), 12S rRNA und 16S rRNA kodieren, und die nicht kodierende d-Loop-Region umfasst (Abbildung 2).

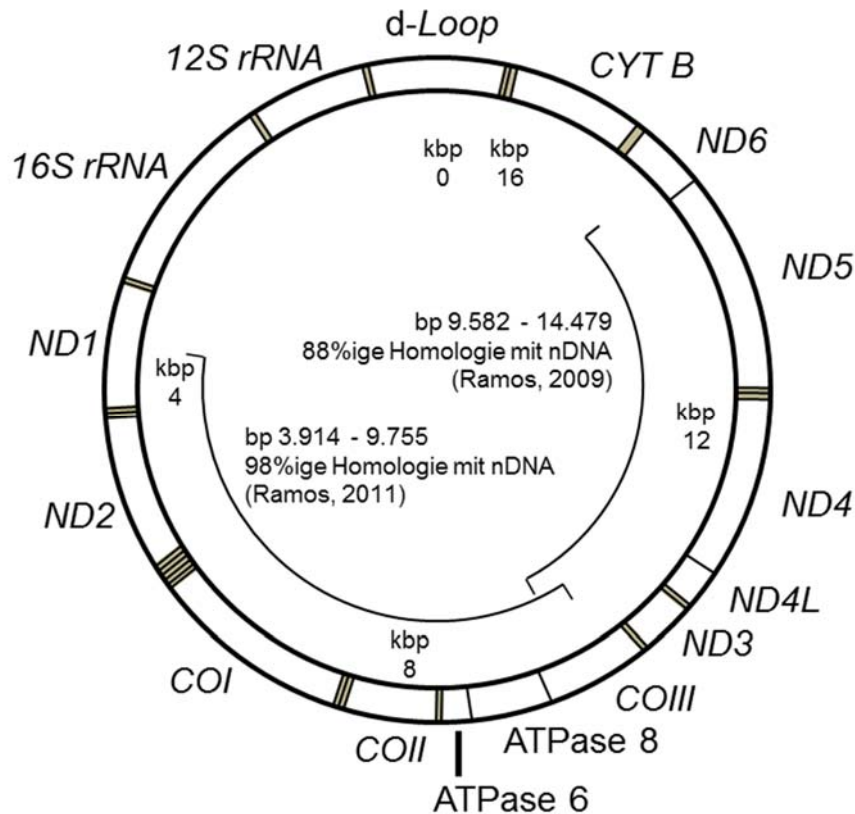


Abbildung 2: Schematische Darstellung des humanen mitochondrialen Genoms (NCBI GenBank® Accession no.: NC_012920). *CYT B*: Cytochrom B, *ND1-6*: Untereinheiten der NADH-Dehydrogenase, *COI-III*: Untereinheiten der Cytochrom C-Oxidase. ATPase 6/8: Untereinheiten der ATP-Synthase. **Grau hinterlegt**: für tRNA kodierende Abschnitte.

1.1.1. Funktion und Aufbau von Mitochondrien

Mitochondrien sind Zellorganellen, die von einer Doppelmembran umgeben sind. Die Lebensdauer eines Mitochondriums beträgt etwa 10 bis 20 Tage. Typischerweise kommen je nach Energiebedarf der Zelle bis zu 2000 Mitochondrien in einer Zelle vor. Auf der Innenmembran sitzen vier Enzymkomplexe der Atmungskette. Mittels einer Serie von Redoxreaktionen wird in den Mitochondrien ATP synthetisiert. Neben Teilen des Citratzyklus finden in der mitochondrialen Matrix noch weitere Stoffwechselforgänge wie die β -Oxidation, Ketonkörpersynthese und ein Teil des Harnstoffzyklus statt. Mitochondrien teilen sich unabhängig vom Zellzyklus (zusammengefasst in Falkenberg et al., 2007). Ihre ringförmige DNA wird dabei ständig repliziert und abgebaut (zusammengefasst in Falkenberg et al., 2007). In Säugerzellen befinden sich etwa 1000 bis 10.000 mtDNA Kopien (zusammengefasst in Falkenberg et al., 2007). Wie die mtDNA-Kopienzahl bzw. mtDNA-Synthese und -Abbau reguliert werden ist dabei größtenteils unklar (zusammengefasst in Clay Montier et al., 2009). Ein Signalweg zur Regulation der mitochondrialen Biogenese wird über das weibliche Sexualhormon 17β -Estradiol

(E2) gesteuert. E2 erhöhte im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe in Rattenbrust, in humanen MCF-7-Brustkrebszellen und humanen H1793-Lungenadenokarzinomzellen die *Nuclear Respiratory Factor* (NRF)-1-Transkription und eine darüber vermittelte mitochondriale mRNA-Transkription und Biogenese (Ivanova et al., 2013, Mattingly et al., 2008 und Chen et al., 2004). Indikativ für eine Biogenese ist das Verhältnis an mtDNA zu nDNA (Ivanova et al., 2013 und Mattingly et al., 2008).

1.1.2. Mitochondriale Transkription und Replikation

Das mitochondriale Genom besteht aus zwei Genen, die für rRNA kodieren, 13 Genen, die für mRNA für Proteine der oxidativen Phosphorylierung kodieren, 22 Genen, die für tRNA kodieren und dem nicht-kodierenden *d-Loop* (Abbildung 2). Introns existieren keine innerhalb der mtDNA. Verstärkt transkribiert wird mtDNA bei einem ATP-Mangel (zusammengefasst in Falkenberg et al., 2007). Initial findet bei der Transkription eine Bindung des mitochondrialen Transkriptionsfaktor A (mtTFA) an die Promotorregion statt und anschließend beginnt die mitochondriale RNA-Polymerase mit der Transkription (zusammengefasst in Clayton, 2000). Der Transkriptionsursprung (Promotorregion) aller mitochondrialen Gene liegt dabei innerhalb des *d-Loops* (zusammengefasst in Clayton, 2000). Im Gegensatz zu nDNA, bei der zwischen sense- und antisense-Strang unterschieden wird, wird bei mtDNA zwischen dem H-Strang (heavy strand) und dem L-Strang (light strand) differenziert. Dabei ist jedoch nicht klar, unter welcher Bedingung mtTFA an den H- oder den L-Strang bindet (zusammengefasst in Clayton, 2000). Die Transkription des H-Strangs startet am H-Strang-Promotor und verläuft bezogen auf Abbildung 2 gegen den Uhrzeigersinn (zusammengefasst in Clayton, 2000). Die 12S und 16S rRNAs, zwölf mRNAs der oxidativen Phosphorylierung und 14 der 22 mitochondrialen tRNAs werden auf dem H-Strang transkribiert (zusammengefasst in Clayton, 2000). Die Transkription des L-Stranges startet entsprechend am L-Strang-Promotor, verläuft allerdings im Uhrzeigersinn und transkribiert eine mRNA der Untereinheit 6 der NADH-Dehydrogenase (ND6) und die restlichen acht der 22 mitochondrialen tRNAs (zusammengefasst in Clayton, 2000).

Die Replikation der mtDNA startet am *d-Loop* durch Bindung der mitochondrialen Topoisomerase (Zhang und Pommier, 2008); anschließend wird der *d-Loop* abgelöst und formt so eine Schleife (zusammengefasst in Clayton, 2000). Danach bindet ein RNA-Primer an den Replikationsursprung auf dem L-Strang und die mitochondriale DNA-

Polymerase γ beginnt mit der Replikation des H-Strangs im Uhrzeigersinn (zusammengefasst in Clayton, 2000). Der Replikationsursprung des L-Stranges befindet sich zwischen den Genen, die für ND2 und Untereinheit I der Cytochrom C-Oxidase (COI) kodieren (zusammengefasst in Clayton, 2000). Sobald zwei Drittel der Replikation des H-Strangs abgeschlossen sind, beginnt die Replikation des L-Strangs gegen den Uhrzeigersinn (zusammengefasst in Clayton, 2000). Die Replikation verläuft dabei im Gegensatz zur nDNA Replikation kontinuierlich (zusammengefasst in Clayton, 2000). Am Ende wird die neue doppelsträngige mtDNA durch Entfernen der Primer, Lückenfüllung und Ringschließung geformt (zusammengefasst in Clayton, 2000).

Bei Säugern werden sowohl die mitochondriale RNA-Polymerase, mtTFA, als auch alle für die Replikation zuständigen Proteine vom Zellkern kodiert (zusammengefasst in Clayton, 2000). Fehler bei der mtDNA-Replikation können daher sowohl von Mutationen in mitochondrialen regulatorischen Sequenzen als auch von nDNA-Defekten herrühren (zusammengefasst in Clayton, 2000).

1.1.3. Mitochondriale DNA-Reparatur

In nDNA gibt es in Säugern im Gegensatz zu mtDNA mehrere DNA-Reparatursysteme. Zum einen gibt es ein post-replikatives Reparatursystem, auch unter dem Begriff *mismatch repair* (MMR) zu finden (zusammengefasst in Larsen et al., 2005). Des Weiteren gibt es ein *nucleotide excision repair* (NER)-System, welches durch Läsionen entstandene strukturelle DNA-Deformationen beseitigt, ein *direct reversal* (DR)-System, welches die ursprüngliche Basenstruktur nach kleinen Schäden wiederherstellt, ohne die Base zu entfernen, und ein *recombinational repair* (RER)-System, welches Doppelstrangbrüche wieder zusammenfügt (zusammengefasst in Larsen et al., 2005). In Säuger-Mitochondrien gibt es dagegen nur das *base excision repair* (BER)-System, welches ebenso bei nDNA vorkommt (zusammengefasst in Mandavilli et al., 2002). BER funktioniert in Mitochondrien ähnlich wie im Zellkern. Bei kleineren Schäden an der DNA, wie z.B. Methylierung, Depurinierung oder Desaminierung, wird die beschädigte Base herausgeschnitten und ersetzt (zusammengefasst in Larsen et al., 2005). Insbesondere bei oxidativen Schäden, welche durch Atmungsketten induzierte reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) entstehen können (Wu et al., 2004), spielt BER eine wichtige Rolle. Das durch ROS entstandene 8-Oxoguanin wird dabei durch die 8-Oxoguanin DNA-Glykosylase 1 (OGG1) entfernt (zusammengefasst

in Mandavilli et al., 2002). Irreparabel beschädigte Mitochondrien werden durch Lysosomen abgebaut (Chen und Chan, 2009).

1.1.4. Generierung von Rho0-Zellen durch Inhibition der mtDNA-Replikation

Neben dem Abbau von irreparabel beschädigten Mitochondrien, wird die mtDNA kontinuierlich repliziert und abgebaut (Kap. 1.1.1). Dies kann in Verbindung mit der Inhibition der mitochondrialen Replikation genutzt werden, um Rho0-Zellen zu generieren. Per Definition sind Rho0-Zellen Zellen ohne jegliches mitochondriales Genom (King und Attardi, 1989). Mitochondrien mit deformierten Cristae und verringertem mitochondrialem Membranpotential sind dabei noch in der Zelle vorhanden (Kukat et al., 2008 und Yu et al., 2007). Die mitochondriale Replikation kann dafür z.B. durch Ethidiumbromid (EtBr) inhibiert werden. EtBr akkumuliert in der mitochondrialen Matrix, interkaliert in mtDNA, inhibiert die Topoisomerase und die DNA-Synthese und führt so bei aktiver mitochondrialer Teilung zu einer mitochondrialen DNA-Depletion (Nass, 1970; Gentry et al., 2011 und Dakubo, 2010). Ohne intakte Mitochondrien sind Rho0-Zellen auf Glykolyse angewiesen und benötigen daher Pyruvat zur Energiegewinnung (Kukat et al., 2008). Aufgrund des Verlustes von Atmungsketten-Elektronentransfer benötigen sie außerdem Uridin zur Pyrimidinsynthese (Kukat et al., 2008). Vorwiegend wurden Rho0-Zellen durch Inkubation von Zellen mit 50 ng/ml EtBr über 14-20 Verdoppelungen mit anschließender Klonierung generiert (García et al., 2000, Armand et al., 2004, Felty et al., 2005 und Yu et al., 2007). Die Klonierung wurde hierbei verwendet, um mtDNA defiziente Einzelzell-Klone aus der entsprechenden Kultur zu isolieren. Aber auch eine Inkubation mit EtBr über einen längeren Zeitraum von 120 Tagen ohne Klonierung ist möglich (Binder et al., 2005 und Swerdlow et al., 1997). Generell reicht der zur Generierung von Rho0-Zellen verwendete EtBr Inkubationsbereich von 25-200 ng/ml (King und Attardi, 1989 und Naito et al., 2008).

Neben EtBr gibt es weitere Substanzen, die in der Lage sind, die mitochondriale Replikation zu inhibieren oder Mitochondrien generell zu schädigen. So zeigten Mansouri et al. (2003), dass Tacrin in Mitochondrien akkumuliert und einem Bereich von 6-23 µg/ml eine dosisabhängige Inhibition auf die DNA-Polymerase γ in mitochondrienhaltigen Extrakten induziert. Dinitrophenol (DNP) ist durch entkoppeln der Atmungskette imstande ein Anschwellen und eine Fission der Mitochondrien auszulösen (Lyamzaev et al., 2004). Tacrin und DNP wurden bisher noch nicht zur Generierung von Rho0-Zellen verwendet.

Prinzipiell gibt es neben der Inkubation mit chemischen Agenzien, wie z.B. EtBr, noch eine weitere Möglichkeit zur Generierung von Rho0-Zellen. Nach einer Transfektion der mtDNA mit einem für das Restriktionsenzym *EcoRI* kodierenden Gen führt die Expression von *EcoRI* zu einer Fragmentierung der mtDNA und einem anschließenden Abbau durch endogene Nukleasen (Kukat et al., 2008 und Heller et al., 2013).

1.1.5. Einflussfaktoren auf mitochondrialen genotoxischen Stress

Die mitochondriale Funktion ist bei verschiedenen Krebsarten inklusive Brustkrebs stark beeinträchtigt (zusammengefasst in Yadav und Chandra, 2013). Beteiligte Mechanismen und Einflussfaktoren sind dagegen weitestgehend unerforscht. Des Weiteren gibt es zahlreiche Einflussfaktoren auf eine initiale Schädigung der Mitochondrien durch Initiierung von mitochondrialen DNA Schäden wie z.B. Alter, Rauchen, ein erhöhter BMI oder oxidativer Stress.

Alter

Die mitochondriale SMF stieg in humanen Gehirnen signifikant mit dem Alter (Lin et al., 2002). Ebenso war die SMF in gesunden humanen Gehirnen bei Menschen, die älter als 75 Jahre waren, im Vergleich zu Menschen, die jünger als ein Jahr waren, um den Faktor fünf signifikant erhöht (Kennedy et al., 2013). Im gesunden Rattengehirn war die SMF bei 24 Monate alten Ratten im Vergleich zu 6 Monate alten Ratten um 66% erhöht (Khaidakov et al., 2005). In Nichtstammzellen war die mitochondriale SMF im Vergleich zu Stammzellen aus gesundem humanem Brustgewebe etwa um 20% bei zwei von drei untersuchten Proben signifikant erhöht (Ahn et al., 2015) und bei der Kultivierung von humanen B-Zellen (TK6-Zellen) stieg die SMF nach 300 Verdopplungen etwa um den Faktor fünf (Khrapko et al., 1997).

Rauchen

In Zigarettenrauch sind zahlreiche Mutagene enthalten (zusammengefasst in DeMarini, 2004 und in Talhout et al., 2011), von denen viele lipophil sind und somit in Brustfett eingelagert werden können (zusammengefasst in Mukherjee et al., 2006). Jedoch unterschied sich das mitochondriale Mutationsspektrum in Lungenbiopsien von Raucher/Nichtraucher-Zwillingen im Vergleich nicht (Coller et al., 1998). Des Weiteren induzierte Benzo(a)pyren, ein potentes im Zigarettenrauch enthaltenes Mutagen, bei der humanen Lymphoblastoid Zelllinie MT1 einen nDNA-Mutantenanteil von $9 \cdot 10^{-4}$

und im Gegensatz dazu in mtDNA keine Mutanten bzw. einen Anteil geringer als $5 \cdot 10^{-6}$ (Marcelino et al., 1998).

BMI

Ein hoher BMI führt zu einer Erhöhung proinflammatorischer Mediatoren bei übergewichtigen Frauen (zusammengefasst in Crujeiras et al., 2013). Inflammation führt zur vermehrten ROS-Produktion (zusammengefasst in Crujeiras et al., 2013). Wasserstoffperoxid schädigte die mtDNA humaner kultivierter Fibroblasten um den Faktor drei stärker als nDNA (Yakes und Van Houten, 1997).

Oxidativer Stress

ROS bzw. oxidativer Stress spielen potentiell eine wichtige Rolle bei der Schädigung von mtDNA. Indikativ für oxidativen Stress ist die γ -Glutamyl-Cystein Ligase (GCLC), das Schlüsselenzym bei der Glutathion (GSH)-Synthese (Richman und Meister, 1975). So bestand in apoptotischem Rattenbrust-Drüsengewebe und in Rattenfibroblasten nach induzierter Apoptose ein direkter Zusammenhang zwischen dem mtDNA-Schaden und dem GSSG/GSH Verhältnis, einem Marker für den GSH-Verbrauch (Esteve et al., 1999). Des Weiteren wird bei oxidativem Stress die Transkription von NADPH-Chinon Oxidoreduktase 1 (NQO1) und Glutathion-S-Transferasen (GSTs), Phase II Enzyme, die bei der Entgiftung von reaktiven Phase-I-Metaboliten eine wichtige Rolle spielen, über eine Bindung des *nuclear factors (erythroid-derived 2)-like 2* (NFE2L2) an die Promotorregion der entsprechenden Gene induziert (zusammengefasst in Xu et al., 2005).

Ein weiterer Indikator für oxidativen Stress sind Cholesterol-Oxidationsprodukte (zusammengefasst in Micheletta und Iuliano, 2006). Sie können durch Autoxidation unter Einfluss von ROS entstehen. Dabei entstehen hauptsächlich das 7α - und 7β -HO-Cholesterol, das α - und β -Epoxy-Cholesterol und das 7-Keto-Cholesterol (zusammengefasst in Otaegui-Arrazola et al., 2010, Murphy und Johnson, 2008 und in Niki et al., 2005).

17 β -Estradiol und Ethinylestradiol

Ein mutagenes Potential von E2 und Ethinylestradiol (EE) bei mtDNA ist in der Literatur nicht beschrieben. Des Weiteren zeigten weder E2, noch EE, *in vitro* im HPRT-, Ames- und SOS-Chromosomentest in V79 Rattenleberzellen, Salmonellen, Syrischen Hamster Emybryos und *E.coli* Bakterien mutagenes Potential für nDNA bzw. bakterielle DNA

(Drevon et al., 1981, Lang und Reimann, 1993, Hundal et al., 1997, Tsutsui et al., 2000 und Zaleska-Radziwill et al., 2016). In Mitochondrien aus Rattenlebern, in Ratten Hepatozyten und in HepG2 Zellen dagegen erhöhten E2 und EE mitochondriale Superoxid- (Chen et al., 1998 und Chen et al., 1999), GSH- und GSSG-Spiegel (Chen et al., 2003), also Marker für oxidativen Stress. Somit kommen E2 und EE als Auslöser von oxidativem Stress für eine Schädigung der mtDNA in Frage.

Estrogenchinone

Chinone können ebenfalls über sogenanntes *Redox-Cycling* zu oxidativem Stress führen (Sies, 1997). Des Weiteren können sie DNA-Schäden und damit verbundene Mutationen bei der Replikation induzieren. Die Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen (CYP)1A1 und CYP1B1 können E2 und Estron (E1) zu Katecholen hydroxylieren und anschließend weiter zu reaktiven Chinonen oxidieren (zusammengefasst in Blair, 2010). Estrogenchinone können mit isolierter mtDNA Addukte bilden (Roy und Abul-Hajj, 1997). Diethylstilbestrolchinone formten *in vivo* in der Rattenleber und -niere mit mtDNA siebenmal mehr Addukte als mit nDNA (Thomas und Roy, 2001) und in der Hamsterleber und -niere fünf- bis sechsmal mehr Addukte (Thomas und Roy, 2001). Benzol-Hydrochinon bildeten *in vitro* bei Mitoplasten, Mitochondrien ohne äußere Membran, mtDNA-Addukte (Rushmore et al., 1984).

1.2. Metabolische Netzwerkmodellierung

Ein wichtiger in der weiblichen Brust genotoxischen Stress initiiertender Faktor ist das weibliche Sexualhormon E2. Es kann einerseits eine estrogenrezeptorvermittelte, proliferationsinduzierte Erhöhung der Replikationsfehler bei der DNA-Synthese bewirken (zusammengefasst in Yue et al., 2013), andererseits über eine Katecholstruktur zum Chinon metabolisiert werden und so direkt zu DNA-Addukten führen (zusammengefasst in Yager, 2015). Estrogenkatechole wiederum können über *Redox-Cycling* zu genotoxischen Stress durch ROS führen (Tsuchiya et al., 2005). Der Estrogenmetabolismus ist ein komplexes System zahlreicher enzymatischer Reaktionen (Abbildung 3). So kann z.B. E1 zu E2 und E2 zu E1 durch Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSD) umgewandelt werden (Gaudet et al., 2008). CYPs können E1 und E2 zum Katechol hydroxylieren und die Katecholestrogene anschließend zum Chinon oxidieren (zusammengefasst in Cavalieri und Rogan, 2011). Das Estrogenchinon kann mittels GST konjugiert und so entgiftet werden (Dawling et al., 2004) oder mittels NQO1 zum Katechol reduziert werden (zusammengefasst in Chandrasena et al., 2008). Die Katechol-O-

Methyltransferase (COMT) katalysiert die Methylierung von Katecholestrogenen (Zimarina et al., 2004).

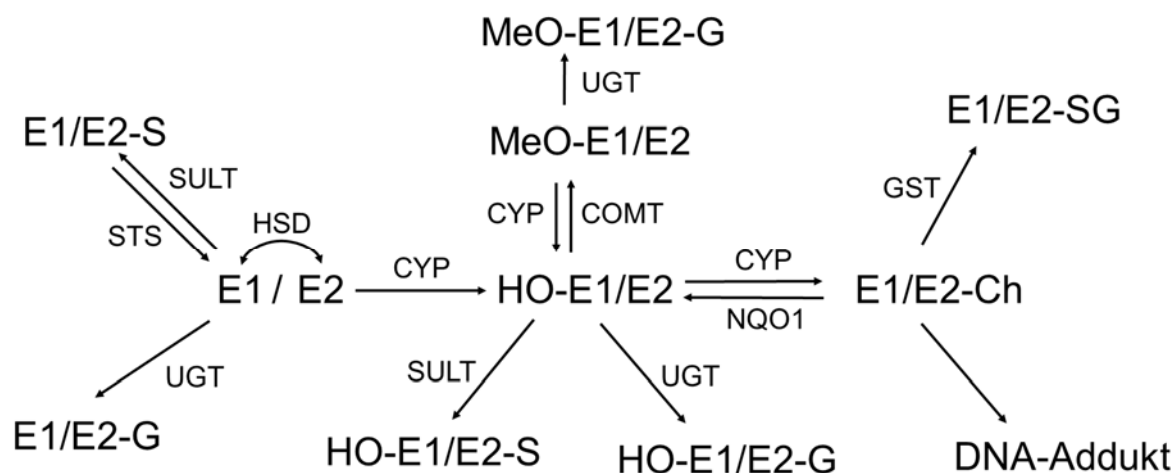


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung des Estrogenmetabolismus modifiziert nach Blair (2010) und Yue et al. (2013). Ch: Chinon, G: Glucuronid, MeO: Methoxy, S: Sulfat, SG: Glutathion-Addukt, STS: Steroidsulfatase. Gezeigt sind jeweils nur die Enzymklassen ohne Familien und Unter-Familien.

Eine indirekte Methode zur Abbildung des Estrogenmetabolismus stellt ein bereits am Lehrstuhl in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dandekar am Lehrstuhl für Bioinformatik in Würzburg, errechnetes bioinformatisches Estrogenmetabolismus-Netzwerkmodell dar. Die bioinformatische Netzwerkmodellierung wird zur Untersuchung komplexer zellulärer Metabolisierungswege innerhalb biologischer Systeme angewendet, um Vorhersagen über bisher unbeobachtete potentielle Reaktionswege zu treffen (zusammengefasst in Rezola et al., 2014). Innerhalb eines metabolischen Netzwerks werden Enzymsubstrate als Netzwerk-Knoten und die Verbindungen dazwischen als enzymkatalysierte Reaktion dargestellt (zusammengefasst in Barabasi und Oltvai, 2004). Die Verbindungen sind dabei entsprechend der jeweiligen Reaktion zum einen gerichtet und zum anderen in ihrer Ausprägung abhängig von der Aktivität des jeweiligen Enzyms (zusammengefasst in Barabasi und Oltvai, 2004). Das am Lehrstuhl errechnete Estrogen-Netzwerkmodell wurde auf einer stöchiometrischen Matrix fußend mittels *constraint-based* Netzwerkmodellierung errechnet. Dabei wird innerhalb des Netzwerks zwischen internen und externen Metaboliten unterschieden (zusammengefasst in Ruckerbauer et al., 2015): Interne Metabolite unterliegen innerhalb des Netzwerks einem Fließgleichgewicht (Cecil et al., 2011). Als Fluss-Beschränkung (engl.: *constraint*) akkumulieren interne Metabolite nicht und gehen nicht verloren

(Cecil et al., 2011). Externe Metabolite sind Flüsse in das Netzwerk hinein oder heraus (zusammengefasst in Rezola et al., 2014). Sowohl interne, als auch externe Flüsse nehmen bedingt durch ihre generelle thermodynamische Umsetzbarkeit aufgrund ihrer Gibbs-Energie nie einen negativen Wert an (zusammengefasst in Rezola et al., 2014). Als Startwerte für das Estrogen-Netzwerkmodell wurden E1- und E2-Drüsengewebespiegel und als Fluss-Beschränkung mRNA-Spiegel von 159 Reaktionen des Estrogenmetabolismus und 66 Reaktionen des Energiemetabolismus verwendet. Flüsse zu Estrogen-DNA-Addukten können als externer Metabolit genutzt werden um, den Estrogenmetabolismus mit allen beteiligten Enzymen innerhalb des Netzwerks abzubilden. Die DNA-Adduktflüsse berücksichtigen dabei nur genotoxischen Stress, der durch direkte Interaktion von Katecholen aus dem Estrogenmetabolismus mit der DNA entsteht, abgebildet wird. ROS, welche durch *Redox-Cycling* der Estrogenkatechole entstehen können, werden durch die Flüsse zu DNA-Addukten nicht direkt erfasst. Des Weiteren wird die Enzymaktivität innerhalb des Netzwerks nur indirekt über Transkriptspiegel abgebildet. Da die Enzymaktivität unter anderem allosterisch moduliert werden kann und die Genexpression weiteren Faktoren, die keinen Einfluss auf die Enzymaktivität nehmen, wie mRNA-Stabilität und translationaler Regulation unterliegt, ist die Verwendung von mRNA-Spiegeln als Surrogat für die Enzymaktivität eine Vereinfachung. Jedoch werden laut Cecil et al. (2011), welche den Metabolismus in *S. aureus* und *S. epidermidis* mit 197 bzw. 198 Reaktionen modellierten, die kombinierten Fehler, die durch die Verwendung von mRNA-Spiegeln als Surrogat für Enzymaktivitäten entstehen, durch die große Anzahl an Genexpressionsdaten als Fluss-Beschränkung stark minimiert. Dennoch gibt es in mehreren Genen, die für Enzyme des Estrogenmetabolismus kodieren Polymorphismen, die einen Einfluss auf die Enzymaktivität nehmen und somit positiv oder negativ zur DNA Adduktbildung beitragen könnten.

1.2.1. Polymorphismen

Ein *single nucleotide polymorphism* (SNP) innerhalb des Gens, das für NQO1 kodiert (Pro187Ser, Tabelle 2) führt zu einer verringerten Estrogenchinon-Reduzierung zu Katecholen (Singh et al., 2009). Das homozygote Ser/Ser-Enzym besitzt nur noch 2% der Aktivität des Pro/Pro-Enzyms (Traver et al., 1997). Die Aktivitätsverminderung rührt von einer verringerten Enzym-Halbwertszeit des Ser/Ser-Enzyms (1,2 h) im Vergleich zum Pro/Pro-Enzym (18 h, Siegel et al., 2001).

Ein SNP innerhalb des Gens, das für COMT kodiert (Val158Met, Tabelle 2) führt zu einer etwa um den Faktor zwei reduzierten E2-Katechol Umsetzung (Dawling et al., 2001 und Chen et al., 2004). Die verringerte Umsetzung des Met/Met-Allels fußt auf einer verringerten Thermostabilität (Syvanen et al., 1997). Der mRNA-Spiegel wurde dagegen in Hirngewebe nicht beeinflusst (Chen et al., 2004). Eine simultaner Pro187Ser *NQO1*-Polymorphismus, und eine COMT-Inhibition führten in humanen Drüsenepithel-Zellen zu einer um den Faktor drei erhöhten DNA-Adduktbildung im Vergleich zu Zellen ohne COMT-Inhibition mit einem Pro187Ser *NQO1*-Polymorphismus (Singh et al., 2009). Somit könnte die Kombination des niedrig-aktiven *NQO1*-Allels mit dem niedrig-aktiven *COMT*-Allel einen direkten Einfluss auf die DNA-Adduktbildung nehmen.

Ein SNP innerhalb des Gens, das für CYP1B1 kodiert (Leu432Val, Tabelle 2) führt zu einer um den Faktor drei erhöhten E2-Umsetzung zu 4-HO-E2 (Li et al., 2000). Die Aktivitätsänderung fußt auf einer Änderung der katalytischen Aktivität des Enzyms (zusammengefasst in Trubicka et al., 2010 und in Shimada et al., 1999). Der Polymorphismus hatte in keinen Einfluss auf die entsprechenden mRNA-Spiegel in Zellen aus Vollblut (Helmig et al., 2010).

Ein SNP innerhalb des Gens, das für GSTP1 kodiert (Ile105Val, Tabelle 2) führt zu einer drei bis vierfach niedrigeren Enzymaktivität (Ali-Osman et al., 1997 und Watson et al., 1998) und somit potentiell zu einer verringerten Estrogenchinon-Konjugation. Die Änderung der Enzymaktivität rührt dabei nicht von einer Änderung der katalytischen Aktivität her, sondern von einer erhöhten sterischen Restriktion (Ali-Osman et al., 1997) und dadurch resultierenden geringeren Konjugationsfähigkeit (Salazar 2009). Des Weiteren führte der homozygote Ile/Ile-Genotyp im Vergleich zum heterozygoten Ile/Val- und zum homozygoten Val/Val-Genotyp zu einer signifikanten Reduktion der Proteinexpression in Brustgewebe (Bhat et al., 2017).

GSTM1- und *GSTT1*-*copy number polymorphisms* (CNPs, Tabelle 2) führen zu einer Deletion und somit zu einem kompletten Verlust des Gens bei Nullizygotie oder dem Verlust eines der beiden Allele bei Hemizygotie. Sowohl der nullizygote *GSTM1*-, als auch der nullizygote *GSTT1*-Genotyp führen zu einem Verlust der Enzymaktivität (Kawai et al., 2005). Ebenso führte Nullizygotie bei beiden Genen zu einem Verlust der mRNA-Expression in Lungengewebe (*GSTT1* und *GSTM1*, Butler et al., 2011) und

in B-Lymphozyten (*GSTT1*, Moyer et al., 2007). Hemizygotie führte zu einer Verringerung der mRNA-Expression im Vergleich zu Homozygotie in Lungengewebe (Butler et al., 2011).

Ein SNP innerhalb des Gens das für *HSD17B1* kodiert (C150A, Tabelle 2) führt zu einem Basenaustausch von Cytosin zu Adenin. Der Polymorphismus liegt im Intron 4 des *HSD17B1*-Gens (Lee et al., 2012), also im nicht kodierenden Bereich und führt somit auch zu keiner Aminosäureveränderung. Bisher ist nicht klar welchen Einfluss der Polymorphismus auf das entsprechende Enzym nimmt. Allerdings ist der homozygote C/C-Genotyp im Vergleich zum homozygoten A/A-Genotyp mit einem 5% höheren Brustkrebsrisiko assoziiert (Zhang et al., 2011), und könnte somit zur DNA-Adduktbildung beitragen. Ebenso sind die SNPs in Genen, die für *NQO1*, *CYP1B1*, *HSD17B1*, *GSTP1* und die CNPs die für *GSTT1* und *GSTM1* kodieren, mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert (Zhang et al., 2011, Tabelle 2).

Tabelle 2: Zusammenfassung der in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen. rs#: *Reference SNP cluster ID*. Die Angabe Aktivitätsänderung bezieht sich auf die aus dem jeweiligen Polymorphismus resultierende Aktivitätsänderung der enzymatischen Umsetzung des jeweiligen Proteins im Vergleich zum Wildtyp. Das Brustkrebsrisiko ist jeweils auf den aus dem Polymorphismus resultierenden homozygoten Genotyp im Vergleich zum jeweiligen homozygoten Wildtyp bezogen. ¹: Dawling et al. (2001) und Chen et al. (2004), ²: Li et al. (2000), ³: Kawai et al. (2005), ⁴: Ali-Osman et al. (1997), und Watson et al. (1998), ⁵: Traver et al. (1997).

Gen/Enzym	rs#	Basenaustausch	Aminosäureaustausch	Aktivitätsänderung	Brustkrebsrisiko (Zhang et al., 2011)
<i>COMT</i>	4680	G>A	Val158Met	50% ¹	-
<i>CYP1B1</i>	1056836	C>G	Leu432Val	300% ²	-7%
<i>GSTM1</i>	-	Deletion	-	0% ³	+11%
<i>GSTP1</i>	1695	A>G	Ile105Val	25-33% ⁴	+7%
<i>GSTT1</i>	-	Deletion	-	0% ³	+11%
<i>HSD17B1</i>	676387	C>A	-	-	+5%
<i>NQO1</i>	1800566	C>T	Pro187Ser	2% ⁵	+27%

1.2.1.1. Bestimmung von *single nucleotide polymorphisms*

Eine Möglichkeit zu Bestimmung von SNPs ist, neben z.B. Next Generation Sequencing (NGS, Kumar et al., 2012) allelischer Diskriminierung (Livak, 1999), und allelspezifischer Primer-PCR (Kawai et al., 2005) die Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP)-PCR (Wilson et al., 2000).

Bei der RFLP-PCR wird zunächst der betreffende Genabschnitt amplifiziert. Das Amplifikat wird anschließend mittels Restriktionsenzym geschnitten, dessen Erkennungssequenz den Polymorphismus einschließt, und somit nur bei einer der beiden Allelvarianten schneidet (Abbildung 4). Nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung kann den Proben je nach Bandenlänge ein Genotyp zugeordnet werden.

Bei der allelspezifischen Primer-PCR wird mit einer Multiplex-PCR mit zwei Primersätzen gearbeitet. Ein Primersatz besteht hierbei aus einem *forward*-Primer abseits des Polymorphismus und einem *reverse*-Primer, dessen 3'-Ende eine der beiden allelspezifischen Basen trägt und somit nur bindet sofern die betreffende Base vorhanden ist (Abbildung 4). Der zweite Primersatz besteht aus einem *forward*-Primer, dessen 3'-Ende die jeweils allelspezifische Base des polymorphen Allels trägt und einem *reverse*-Primer abseits des Polymorphismus. Der *forward*-Primer des ersten Primerpaares ist dabei in einer unterschiedlichen, im Vergleich zum *reverse*-Primer des zweiten Primerpaares, Basenlängenenfernung vom Polymorphismus platziert. Je nach homozygotem Genotyp entsteht so ein nach gelelektrophoretischer Auftrennung anhand der Länge dem Genotyp zuordbares PCR-Produkt. Bei heterozygoten Proben entstehen entsprechend beide PCR-Produkte. Der *forward*-Primer des ersten und der *reverse*-Primer des zweiten Primerpaares ergeben unabhängig vom Genotyp immer ein gleich langes PCR-Produkt, welches als Reaktionskontrolle dienen kann.

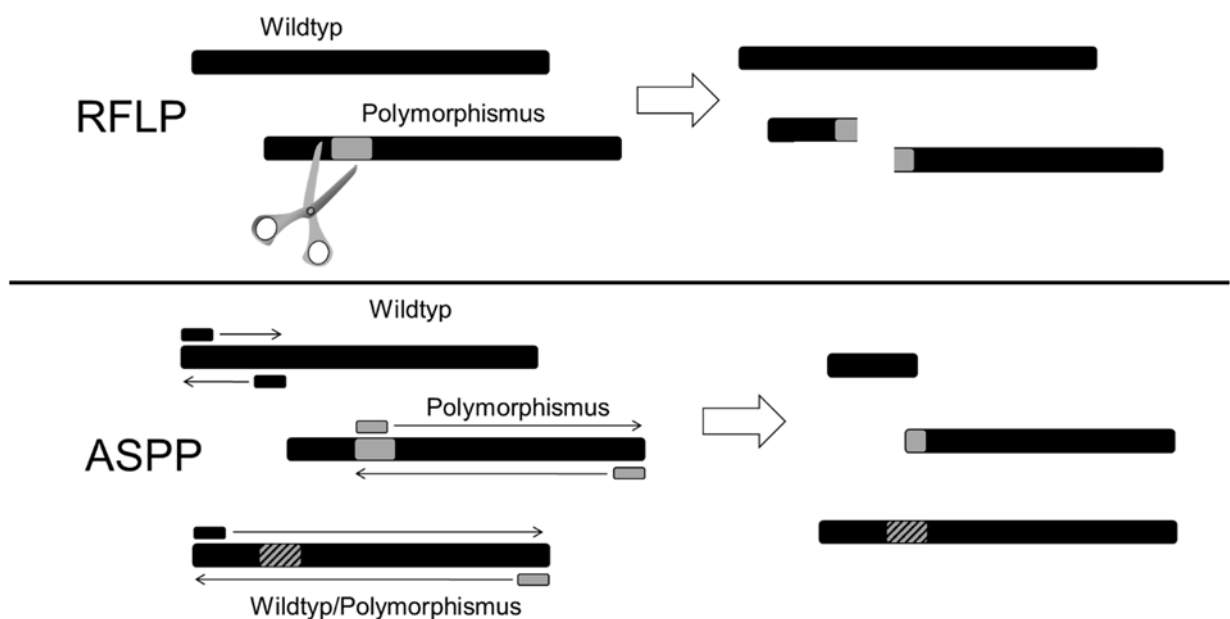


Abbildung 4: Schematische Darstellung der allelspezifischen Primer-PCR (ASPP, unten) und schematische Darstellung der Restriktionsfragmentlängen-PCR (oben).

Die allelische Diskriminierung basiert auf einer Multiplex-TaqMan®-Sonden basierten *realtime*-PCR. Dabei wird die Zielsequenz mit einem passenden Primerpaar amplifiziert. Zusätzlich sind im Reaktionsansatz zwei TaqMan®-Sonden, die jeweils an einen unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff gebunden sind. Jede der beiden TaqMan®-Sonden besteht dabei aus einer der Zielsequenz komplementären Basenabfolge, mit Ausnahme einer jeweils allelspezifischen Base, die etwa in der Mitte der TaqMan®-Sonde platziert ist. So wird je nach homozygotem Genotyp ein Signal bei der entsprechenden Wellenlänge des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffs detektiert (Abbildung 5). Bei heterozygoten Proben dementsprechend bei beiden Wellenlängen.



Abbildung 5: Schematische Darstellung der allelischen Diskriminierung. VIC und FAM: An die TaqMan®-Sonde gebundene Fluoreszenzfarbstoffe. Die Sonne steht indikativ für ein entstehendes Fluoreszenz-Signal bei Abbau der TaqMan®-Sonde.

1.2.2. Weitere Einflussfaktoren auf die DNA-Adduktbildung

Neben Polymorphismen in Genen, die für Enzyme kodieren, die am Estrogenmetabolismus beteiligt sind und potentiell einen Einfluss auf die Estrogen-DNA-Adduktbildung einnehmen können (Kap. 1.2), könnte die Einnahme von E2-freisetzenden Medikamenten zur Linderung postmenopausaler Beschwerden potentiell zur Bildung von estrogenassoziierten DNA-Addukten beitragen. Des Weiteren gibt es noch andere Faktoren wie die Einnahme von oralen Kontrazeptiva, der Konsum von isoflavonhaltigen Produkten und das Rauchverhalten, die in Zusammenhang mit jeweils substanzspezifisch induzierter DNA-Adduktbildung diskutiert werden:

17β-Estradiol und Ethinylestradiol

Bei mit 2 mg E2/kg/Tag über 14 Tage behandelten Ratten waren im Gegensatz zur Kontrollgruppe in der Leber mittels ^{32}P -*Postlabeling* substanzspezifische DNA-Addukte detektierbar (Feser et al., 1996). Dagegen waren in mit 5 µg/ml E2 und in mit 1 und 5 µg/ml EE über sechs Stunden inkubierten primären Humanleberzellen ebenso wie in der Kontrollgruppe mittels ^{32}P -*Postlabeling* keine substanzspezifischen DNA-Addukte detektierbar (Feser et al., 1998). In Lebern von Ratten, die mit 0,2 mg

EE/kg/Tag über 14 Tage behandelt wurden, waren ebenso wie bei der unbehandelten Kontrollgruppe mittels ^{32}P -*Postlabeling* keine substanzspezifischen DNA-Addukte detektierbar (Feser et al., 1996). Die DNA-Addukt Nachweisgrenze von ^{32}P -*Postlabeling* beträgt etwa 1 Addukt pro 10^9 - 10^{10} Basen (zusammengefasst in Randerath und Randerath, 1994). Substanzspezifisch bedeutet im Zusammenhang mit ^{32}P -*Postlabeling* jedoch nicht zwangsweise E2- oder EE-DNA-Addukte, sondern nur spezifisch durch die Substanz induzierte DNA-Addukte. ^{32}P -*Postlabeling* ist keine selektive Methode (Gu et al., 2012) und kann eine Vielzahl an verschiedenen DNA-Addukten erfassen (zusammengefasst in Randerath und Randerath, 1994).

Isoflavone

Eine Supplementierung mit 1 g Daidzein und Genistein pro kg Diät zeigte in der Rattenbrustdrüse und in Lymphozyten aus der Rattenmilz nach 16 bis 20 Wochen eine signifikant protektive Wirkung gegenüber durch eine einmalige Gabe von 80 mg/kg 1,3-Dimethylbutylamin zu Beginn der Supplementierung induzierten Mutationen (Manjanatha et al., 2006). Dagegen erhöhte Genistein in V79-Zellen die Mutationsfrequenz im *HPRT*-Lokus (Kulling und Metzler, 1997).

BMI und Rauchen

Mittels ^{32}P -*Postlabeling* gemessene aromatische DNA-Addukt-Spiegel in peripheren humanen Lymphozyten korrelierten signifikant negativ mit dem BMI und signifikant positiv mit der Anzahl an Zigaretten/Tag (Godschalk et al., 2002). Des Weiteren wurde CYP1A1 bei Rauchern in verschiedenen Geweben erhöht exprimiert (zusammengefasst in Pelkonen et al., 1998) und könnte so über die vermehrte Bildung von Katecholen und Chinonen ebenso zur Entstehung von DNA-Addukten beitragen.

Der Zusammenhang zwischen Rauchverhalten, einem erhöhtem BMI, dem Konsum von Isoflavonen, der Einnahme von EE und E2-freisetzenden Medikamenten mit der DNA-Adduktbildung in der humanen Brust ist dagegen nicht bekannt. Jedoch werden alle diese Faktoren, abgesehen von Isoflavon-Konsum, neben anderen wie der Menopause, Nulliparität und dem Alter im Zusammenhang mit Brustkrebs diskutiert. Estrogene könnten dabei eine wichtige Rolle spielen. Die Assoziation zwischen Serum-Estrogenspiegeln und Brustkrebsrisiko ist bei premenopausalen Frauen allerdings kontrovers diskutiert. So zeigten mehrere Studien eine signifikante Assoziation zwischen Serum E2-Spiegeln und dem Brustkrebsrisiko, mehrere Studien jedoch beobachteten keine signifikante Assoziation (zusammengefasst in Samavat und Kurzer, 2015). Bei

postmenopausalen Frauen dagegen gab es eine klare Assoziation zwischen E1-, E2- und E1-S-Serumspiegeln und dem Brustkrebsrisiko (zusammengefasst in Samavat und Kurzer, 2015). Ebenso waren Estrogen-Urinspiegel bei Frauen zwischen 40 und 74 stark mit dem Brustkrebsrisiko assoziiert (Moore et al., 2016).

Orale Kontrazeptiva und Hormonersatztherapie

Orale Kontrazeptiva werden im Zusammenhang mit dem Brustkrebsrisiko kontrovers diskutiert. Die Einnahme von oralen Kontrazeptiva ohne Differenzierung zwischen den einzelnen Formulierungen war bei mehreren Studien mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert (zusammengefasst Evans und Sutton, 2015). Ebenso führte Hormonersatztherapie mit konjugierten equinen Estrogenen, Progesteronen und EE zu einem erhöhten relativen Risiko von 1,2 bis 2,5 (zusammengefasst in Yager, 2015). Langzeit-Hormonersatztherapie über einen Zeitraum von 5,6 Jahren ohne Berücksichtigung der Wirkstoffe der Präparate führte zu einem erhöhten Brustkrebsrisiko; bei einer reinen Estrogen-Hormonersatztherapie wurde dagegen bei einer Langzeit-Einnahme kein erhöhtes Brustkrebsrisiko beobachtet (zusammengefasst in Marjoribanks et al., 2012). Bei multivariater Analyse wurde bei der Einnahme von oralen Kontrazeptiva kein erhöhtes Brustkrebsrisiko beobachtet (zusammengefasst in Kamińska et al., 2015).

Isoflavone

Alternativ zu einer Hormonersatztherapie zur Linderung postmenopausaler Beschwerden werden Phytoestrogene, zu denen unter anderem Isoflavone gehören, eingenommen (Limer und Speirs, 2004). Isoflavon-Supplementierung ist bei westlichen postmenopausalen Frauen wahrscheinlich nicht mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert (EFSA-Panel, 2015).

BMI

Bei einem erhöhten BMI hatten besonders postmenopausale Frauen ein erhöhtes Brustkrebsrisiko (zusammengefasst in Kamińska et al., 2015). Übergewicht führt bei postmenopausalen Frauen möglicherweise aufgrund höherer zirkulierender Estrogenspiegel, welche im Fettgewebe synthetisiert werden, zu einem erhöhten Brustkrebsrisiko (zusammengefasst in Samavat und Kurzer, 2015).

Menopause

Die Menopause führt zu Veränderungen der Insulin- und Leptin-Sensitivität und des Glukose- und Lipid-Metabolismus (zusammengefasst in Shapira, 2017). Der daraus

resultierende reduzierte Energieverbrauch kann zu Übergewicht und damit potentiell zu Brustkrebs beitragen (zusammengefasst in Shapira, 2017).

Rauchen

Rauchen war laut einer Meta-Analyse mit etwa 32.000 Brustkrebsfällen bei etwa 1 Mio Frauen bei aktuellen Rauchern mit einem um 12% und bei ehemaligen Rauchern mit einem 9% erhöhten erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert (Gaudet et al., 2013). Ein möglicher Mechanismus sind erhöhte Estrogen- und Androgen-Plasmaspiegel bei postmenopausalen Raucherinnen im Vergleich zu Nichtraucherinnen (Key et al., 2011).

Alter

Neben Risikofaktoren, die potentiell in Zusammenhang mit E2 stehen, ist ein erhöhtes Alter der größte Risikofaktor für die Entwicklung von Brustkrebs (zusammengefasst in Samavat und Kurzer, 2015). So sind 80% der Frauen, bei denen Brustkrebs diagnostiziert wird, älter als 50 und 50% aller Brustkrebsfälle bei Frauen treten im Alter zwischen 50 und 69 Jahren auf (zusammengefasst in Kamińska et al., 2015).

Nulliparität

Des Weiteren führte Nulliparität laut einer Meta-Analyse von etwa 27.000 Brustkrebsfällen unter etwa 1,2 Mio. Frauen zu einem 8-12% erhöhten Brustkrebsrisiko (Reeves et al., 2009). In Verbindung mit Parität und dem Brustgewebe steht der *lobule type*. Der histologisch bestimmte *lobule type* stellt ein Maß für die laktationsinduzierte Ausdifferenzierung des Gewebes dar. Bei nulliparen Frauen liegt *lobule type 1 nullipar* (Lob1np) vor (Russo und Russo, 2004). Während der Schwangerschaft steigt er über Typ 2/3 bis Typ 4 während der Laktation (Russo und Russo, 2004). Nach dem Abstillen findet direkt eine Regression zu Lob2/3 statt; die anschließende Involution bis hin zu *Lobule type 1 par* (Lob1p) kann dagegen bis zur Menopause dauern (Russo und Russo, 2004). Die Gewebe-Ausdifferenzierung könnte somit ein weiterer Faktor in Zusammenhang mit Brustkrebs sein.

1.3. Oxidativer Stress

Oxidativer Stress steht ebenso wie z.B. ein erhöhter BMI oder Rauchen und zahlreiche andere Faktoren (Kap. 1.2.2) in Verbindung mit Brustkrebs (zusammengefasst in Reuter et al., 2010). Oxidativer Stress kann zu DNA-Schäden führen (zusammengefasst in Kang, 2002) und ist somit potentiell ein weiterer wichtiger Faktor im Zusammenhang mit DNA-Schädigung im Brustgewebe. Oxidativer Stress kann die Transkription einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren wie z.B. Aryl-Hydrocarbon Rezeptor (AHR) und NFE2L2 induzieren (Park et al., 2009 und zusammengefasst in Reuter et al., 2010). AHR und NFE2L2 wiederum können über Bindung an ein responsives Element in der Promotorregion von Genen, die für die GCLC (NFE2L2, Lu, 2009), ein Schlüsselenzym bei der Glutathionsynthese (Kap. 1.1.5), und die NQO1 (AHR und NFE2L2, Xu et al., 2005) kodieren, binden und somit die *NQO1*- und *GCLC*-Genexpression, beides somit Marker für oxidativen Stress, induzieren (Abbildung 6).

Oxidativer Stress kann zu Zellzyklusarrest führen (zusammengefasst in Migliore und Coppedè, 2002). So sind humane mit Wasserstoffperoxid behandelte Fibroblasten apoptotisch oder zeigen einen G1- oder G2/M-Zellzyklusarrest (Juping und Merret, 2000). Indikativ für einen Zellzyklusarrest sind z.B. die Cyklin-abhängigen Kinaseinhibitoren (CDKN) 1A und CDKN1B, welche für den Cyklin-abhängigen Kinaseinhibitor p21 und p27 kodieren. p21 moduliert den Zellzyklus negativ (zusammengefasst in Gartel und Radhakrishnan, 2005). CDKN1B-Induktion führt zu G1-Zellzyklusarrest (zusammengefasst in Burhans und Heintz, 2009). Des Weiteren sind proliferationsassoziierte Ki-67 Antigen (MKI67)-Transkriptspiegel ein Marker für proliferierende Epithelzellen in Brustdrüsengewebe (Eigeliene et al., 2008). Cyklin D1 (CCND1) reguliert die Zellzyklus-Progression in der G1-Phase (Baldin et al., 1993). CCND1-Transkription kann dabei über E2-Bindung an den Estrogenrezeptor α (ESR1) induziert werden (Eigeliene et al., 2008).

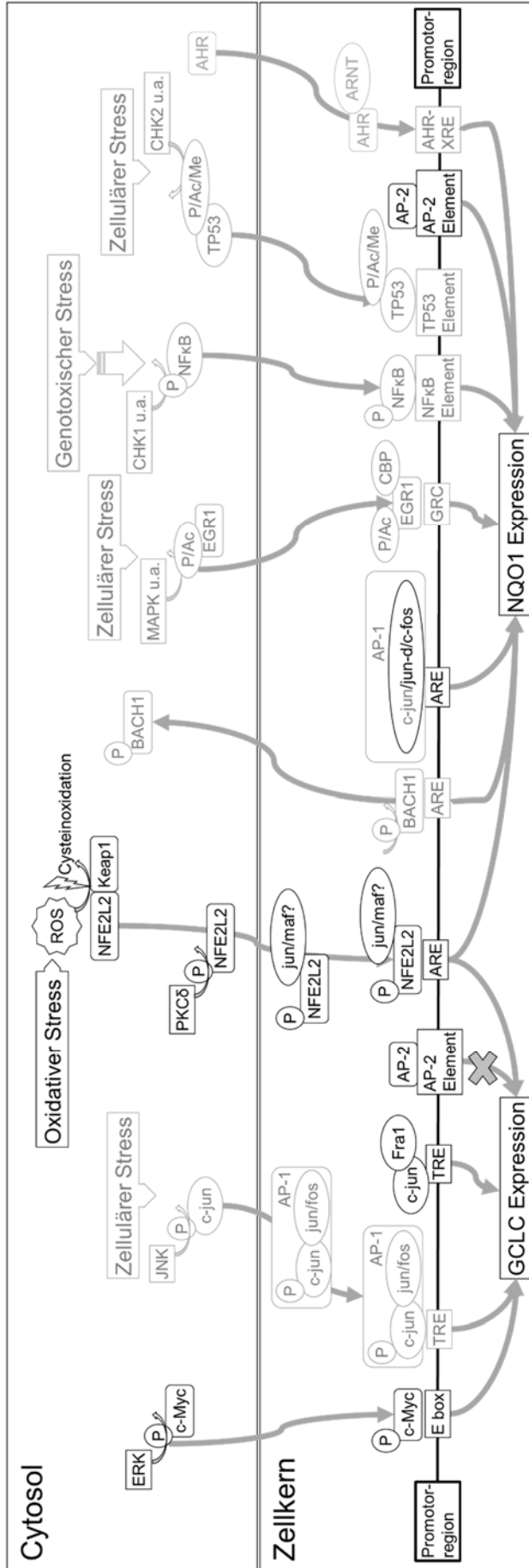


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Regulation der humanen GCLC- (links) und NQO1-Expression (rechts). Ac: Acetat, AP: activator protein, ARE: Antioxidant responsive element, ARNT: AHR nuclear translocator, BACH1: Transkriptions Regulatorprotein BACH1, CHK: Checkpoint Kinase, EGR1: Early growth response protein 1, ERK: Extra cellular regulated kinase, GRC: GC rich consensus sequence, JNK: c-jun N-terminale Kinase, Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1, MAPK: MAP Kinase, Me: Methyl, NFKB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, P: Phosphat, PKC: Protein Kinase C, ROS: reactive oxygen species, TRE: Recognition site for AP-1 Binding, XRE: Xenobiotic response element. Schwarze Schrift: Experimentelle Evidenz; Graue Schrift: Prädiktion über Bindungsvermögen von Transkriptionsfaktoren an die Promoterregion des jeweiligen Gens nach Datenbank „Sabiosciences“. Abbildung modifiziert nach Datenbanksuche „Promotor Database“ und Dickinson und Forman (2002), Dickinson et al. (2004), Gitenay und Baron (2009), Lu (2009), Perkins (2007), Riley et al. (2008), Shelton und Jaiswal (2013) und Xu et al. (2005).

Zu möglichen Einflussfaktoren auf oxidativen Stress und somit potentiell die Transkription von *GCLC*, *NQO1* und *NFE2L2* in der weiblichen Brust induzierenden Faktoren gehören neben dem Lebensstil wie Alkoholkonsum, dem BMI, Rauchverhalten und der Einnahme von estrogenaktiven Medikamenten, auch das Alter, die Menopause und der Konsum von Isoflavonen. Für einige dieser potentiellen Einflussfaktoren wurde in der Literatur bereits neben einem direkten Einfluss auf *GCLC*-, *NQO1*- und *NFE2L2*-Protein- oder Transkriptspiegel ein Einfluss auf andere Marker für oxidativen Stress in humanem Blut, Gewebe, Zellen oder im Tiermodell beschrieben:

Alkoholkonsum

Akuter und chronischer Alkoholkonsum erhöhte die Produktion von ROS und steigerte somit oxidativen Stress in vielen tierischen und humanen Geweben (zusammengefasst in Albano, 2006). Ein Einfluss des Alkoholkonsums auf oxidativen Stress in humanem Brustgewebe wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben, allerdings wurde ein Einfluss auf Marker für oxidativen Stress im Tierversuch und auf verschiedene Zelllinien beschrieben:

Nach täglicher Ethanolgabe (8-13 g/kg Körpergewicht) über neun Wochen verdoppelte sich in der Leber von Wistar-Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe die mRNA-Expression der katalytischen *GCLC heavy subunit (GCLC-HS)*, die Expression der regulatorischen *light subunit (LS)* dagegen blieb unverändert (Lu et al., 1999). Dagegen führte 20%iger Ethanol-Trinkwasserzusatz über acht Wochen bei Mäusen zu einer signifikant um 80% niedrigeren *NFE2L2*-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (Sueblinvong et al., 2014). *NQO1*-mRNA-Spiegel waren um den Faktor zwei nach Gabe von 9-16 g Ethanol/kg Körpergewicht über neun Wochen in Kupfferzellen von Wistar-Ratten und nach Inkubation mit 100 mM über acht Stunden in primären THP1-Zellen von Wistar-Ratten um den Faktor vier erhöht (Yeligar et al., 2010). Ethanolkonsum förderte die Bildung von 1-Hydroxyethyl-Radikalen und Superoxid-Anionen in humanen Leukozyten und Endothelzellen (zusammengefasst in Albano, 2006). Des Weiteren war die *GCLC*-mRNA-Expression in der primären Hepatozyten von ICR-Mäusen nach 24-stündiger Inkubation mit 100 mM Ethanol im Vergleich zu unbehandelten Zellen erhöht (Kimura et al., 2009). Bei primären Maus-Lungenfibroblasten führte die Inkubation mit 60 mM Ethanol zu signifikant halbierten *NFE2L2*-mRNA-Spiegeln im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Sueblinvong et al., 2014).

BMI

Ein hoher BMI führt zu einer Erhöhung proinflammatorischer Mediatoren bei übergewichtigen Frauen und Inflammation führt zur vermehrten ROS-Produktion (Kap. 1.1.5). Ein Einfluss des BMI auf oxidativen Stress in humanem Brustgewebe wurde bisher nicht beschrieben. Dagegen wurde ein Einfluss auf Marker für oxidativen Stress im humanen Plasma und im Tierversuch bereits beschrieben:

Peroxid-Plasmaspiegel waren bei übergewichtigen Menschen im Vergleich zu Normalgewichtigen erhöht (Wonisch et al., 2012). Plasmaspiegel von thiobarbitursäurereaktiven Substanzen, Marker für oxidativen Schaden, korrelierten im Menschen signifikant mit dem BMI und dem Hüftumfang; in übergewichtigen KKay-Mäusen waren Spiegel von eben jenen Markern im Vergleich zur Kontrollgruppe (C57BL/6J-Mäuse) signifikant erhöht (Furukawa et al., 2004). *GCLC*-mRNA-Spiegel waren im Fettgewebe von übergewichtigen C57BL/6J- und ob/ob-Mäusen im Vergleich zu normalgewichtigen signifikant erhöht (Kobayashi et al., 2009). Ebenso waren *NFE2L2*-mRNA-Spiegel in C57BL/6J-Mäusen, die über zwölf Wochen fettreich ernährt wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant um den Faktor drei erhöht (Kim et al., 2004).

Rauchen

Zigarettenrauch enthält viele in humanem Brustfett lösliche lipophile Bestandteile (Kap. 1.1.5). Ein Einfluss von Rauchen auf oxidativen Stress in humanem Brustgewebe wurde bisher nicht beschrieben. Dagegen wurde ein Einfluss von Rauchen und Zigarettenrauch auf Marker für oxidativen Stress im humanen Plasma, in der Lunge, im Pankreas, in der retinalen Pigment-Epithelschicht, im Tierversuch und auf humane Zelllinien bereits gezeigt:

Rauchen erhöhte den Malon-Dialdehyd-Spiegel, einem Marker für oxidativen Stress, im Humanplasma und -urin (Agarwal, 2005). In Lavagen von humanen Raucherlungen war ein etwa um den Faktor vier erniedrigter *GCLC-LS*-Transkriptspiegel im Vergleich zu Lavagen aus Nichtraucherlungen zu finden (Neurohr et al., 2003). *GCLC-HS*-Transkriptspiegel unterschieden sind in Lavagen von Raucherlungen im Vergleich zu Lavagen von Nichtraucherlungen nicht signifikant (Neurohr et al., 2003). *NQO1*-Transkriptspiegel waren in Kleine-Atemwege-Zellen von Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern um den Faktor 2,4 signifikant erhöht (Hübner et al., 2009) und im Pankreas von Rauchern um den Faktor fünf im Vergleich zu Nichtrauchern erhöht (Lyn-Cook et al., 2006). Des Weiteren erhöhte Rauchen und Zigarettenrauch Marker für

oxidativen Stress in der retinalen Pigment-Epithelschicht in Mensch, Maus und Ratte (zusammengefasst in Cano et al., 2010). Sprague-Dawley-Ratten, die über zwei Wochen für zwei Stunden pro Tag Zigarettenrauch ausgesetzt waren, zeigten in ihrer Bauchschlagader eine signifikante *NQO1*-mRNA-Spiegel Abnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe (Wang et al., 2016).

Die Inkubation von humanen A549-Epithelzellen mit 50 µg/ml Zigarettenrauchkondensat über 24 h führte zu vierfach erhöhten *GCLC*-mRNA-Spiegeln im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kaushik et al., 2008). Des Weiteren führte die Behandlung der humanen Makrophagen Zelllinie THP1 mit 0,1 und 10 µg/ml Zigarettenrauchkondensatlösung nach 6, 24 und 48 h im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu signifikant erhöhten und nach 72 h signifikant erniedrigten *NFE2L2*-mRNA-Spiegeln (Goven et al., 2009). Primäre bronchiale und tracheale humane Epithelzellen zeigten nach Inkubation mit elf verschiedenen Zigarettenrauchkondensaten (jeweils 4 µg/ml) über 18 Stunden bei neun der Zigarettenrauchkondensate einen um Faktor zwei bis fünf erhöhten *NQO1*-mRNA-Spiegel (Pickett et al., 2010). *NFE2L2*-Proteinspiegel in primären humanen alveolaren Epithelzellen waren nach 24-stündiger Exposition mit 1,5 und 10%igem Zigarettenrauchkondensat signifikant erhöht (Kosmider et al., 2011). In der humanen Makrophagen Zelllinie THP1 führte eine Exposition mit 0,1 und 10 µg/ml Zigarettenrauchkondensatlösung nach 48 und 72 Stunden zu einer signifikant niedrigeren *NFE2L2*-Proteinexpression im Vergleich zur Behandlung nach null Stunden (Goven et al., 2009). *NFE2L2*-Transkriptspiegel waren in 24 Stunden mit dem Kondensat einer Zigarette behandelten primären alveolaren Makrophagen von C57BL/6J-Mäusen signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe erhöht (Vecchio et al., 2010).

Estrogenaktive Medikamente

EE inhibiert die CYP1A1- und CYP1B1-Aktivität (Chang et al., 2009) und könnte so indirekt zur Reduzierung von reaktiven oxidativen Stress-induzierenden Estrogen-Metaboliten beitragen. Ein Einfluss estrogenaktiver Medikamente auf oxidativen Stress in humanem Brustgewebe wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Dagegen wurde ein Einfluss auf Marker für oxidativen Stress im humanen Plasma, im Tierversuch und auf humane Zelllinien bereits beschrieben:

EE als orales Kontrazeptivum eingenommen erhöhte in weiblichen Probandinnen die Spiegel an oxidiertem LDL und Lipid-Peroxiden im Blut signifikant (De Groote et al., 2009). ACI-Ratten, die über acht Monate ein Pellet mit 3 mg E2 in sich trugen, zeigten

eine signifikant erniedrigte NFE2L2-mRNA-Expression im Brustgewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Singh et al., 2014).

Eine 24-stündige Exposition von, mit einem Gen für ESR2 transfizierten, humanen MCF-7-Zellen mit 6 nM E2 führte zu einer um den Faktor drei erniedrigten *GCLC*-mRNA-Transkription im Vergleich zu unbehandelten Zellen (NURSA Datenbank: Chang et al., 2008). Bei ESR1 negativen humanen Brust-Adenokarzinom MDA-MB-231-Zellen führte eine Inkubation mit 10 nM E2 über 2-8 h zu einer zwei bis vierfach erhöhten *GCLC*-mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen (NURSA Datenbank: Stender et al., 2010). Des Weiteren führte eine Exposition von MCF-7-Zellen mit 100 nM E2 für 10, 40 und 160 min zu einer neunfachen Erhöhung der *NFE2L2*-mRNA-Expression (NURSA Datenbank: Hah et al., 2011). Über 12 h mit 100 nM E2 inkubierte und mit siRNA des Retinoid-Rezeptor α -transfizierte MCF-7-Zellen zeigten eine signifikante Abnahme des *NFE2L2*-Transkriptspiegels im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (NURSA Datenbank: Ross-Innes et al., 2010). Ebenso waren bei humanen MCF-10A-Brustkrebszellen bei einer Inkubation mit 10 nM E2 für 48 h NFE2L2-Proteinspiegel signifikant erniedrigt (Singh et al., 2014). Eine Inkubation von MCF-7-Zellen mit 10 nM E2 für 24 h und mit 60 pM für 48 h verringerte die *NQO1*-mRNA-Transkription um Faktor zwei bis drei (NURSA Datenbank: Coser et al., 2003, Creighton et al., 2006 und Wardell et al., 2012).

Menopause

Ein Einfluss der Menopause auf oxidativen Stress in humanem Brustgewebe wurde bisher nicht beschrieben. Dagegen waren Plasmaspiegel an Konformationsepitopen im apoB-100 Teil von LDL, einem Marker für oxidiertes LDL, in postmenopausalen Frauen signifikant höher als in prämenopausalen Frauen (Santo Signorelli et al., 2006).

Alter

Ein Einfluss des Alters auf oxidativen Stress in humanem Brustgewebe wurde bisher nicht beschrieben. Dagegen wurde ein Einfluss auf Marker für oxidativen Stress im humanen Frontal-Cortex, in Endothelzellen der Oberarmarterie, in der Leber und im Tierversuch bereits gezeigt:

Das Alter war im humanen Frontal-Cortex mit der Überexpression von Genen, die als Antwort auf zellulären Stress exprimiert werden, assoziiert (Lu et al., 2004). Nitrotyrosin, eine durch oxidativen Stress modifizierte Aminosäure, war bei alten Männern

(63±1 Jahre) im Vergleich zu jungen (23±1 Jahre) in Endothelzellen aus der Oberarm-Arterie und antekubitalen Venen signifikant erhöht (Donato et al., 2007). Die NQO1-Proteinexpression in der humanen Leber korrelierte negativ mit dem Alter (Rougee et al., 2016).

NQO1-mRNA-Spiegel von 15 bis 27 Monate alten C57BL/6J-Mäusen waren in der Leber, Lunge, Kleinhirn und im retinalen Pigmentepithelium im Vergleich mit drei bis neun Monate alten Mäusen um den Faktor zwei bis zehn höher (Fu et al., 2012, Sachdeva et al., 2014 und Zhang et al., 2012). NQO1-Transkriptspiegel waren in der Leber von eineinhalb bis zweijährigen Sprague-Dawley-Ratten im Vergleich zu zwei Monate alten Ratten um 62% niedriger (Shih und Yen, 2007). In der Leber, Lunge und Niere von zwölf und 24 Monate alten Ratten war signifikant um 20-62% weniger GCLC-mRNA zu finden als bei drei Monate alten Ratten (Liu und Choi, 2000). Des Weiteren war die GCLC-HS-Proteinexpression bei 17-Monate alten Ratten im Vergleich zu vier Monate alten Ratten in unterschiedlichen Gehirnregionen statistisch nicht verändert, die GCLC-LS-Proteinexpression dagegen signifikant erniedrigt (Zhu et al., 2006). NFE2L2-Proteinspiegel waren in der Leber von 24 bis 28 Monate alten Fisher-344-Ratten im Vergleich zu zwei bis fünf Monate alten Ratten etwa um 50% erniedrigt (Suh et al., 2004). Des Weiteren war die NFE2L2-Proteinexpression im Herz von C57BL/6J-Mäusen die älter als 23 Monate waren im Vergleich zu zwei Monate alten signifikant verringert (Gounder et al., 2012). In primären kultivierten Hepatozyten von 24-28 Monate alten Fisher-344-Ratten waren im Vergleich zu Hepatozyten von 6-8 Monate alten Ratten NFE2L2-Proteinspiegel signifikant um etwa 50% erniedrigt (Shih und Yen, 2007).

Isoflavone

Ein Einfluss von Isoflavonen auf oxidativen Stress in humanem Brustgewebe wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Dagegen wurde ein Einfluss auf Marker für oxidativen Stress in humanem Blut und im Tierversuch bereits gezeigt:

Die tägliche Supplementierung von 50 mg Isoflavonen über drei Wochen führte bei gesunden Frauen im Vergleich zu nicht-supplementierten Frauen zu einer Reduktion an 5-Hydroxymethyl-2-Deoxyuridin, ein Marker für oxidativen Stress, in DNA aus nukleären Blutzellen um 47% (Djuric et al., 2001). Dagegen zeigten postmenopausale Frauen nach einer sechswöchigen Supplementierung mit 40 g Sojaprotein/Tag keine signifikante Reduktion an Stressmarkern (Protein-Carbonyle, oxidiertes LDL und 8-

Isoprostaglandin-F_{2α}) im Blut (Engelman et al., 2005). Die Supplementierung mit 50 mg Novasoy-Isoflavon-Mix über drei Wochen führte bei gesunden Männern zu einer signifikanten Abnahme von 5-Hydroxymethyl-2'-Deoxyuridin, einem Marker für oxidativen DNA-Schaden, in peripheren Blut-Lymphozyten (Davis et al., 2001).

Über 8-24 Wochen mit Soja-Isoflavon-Extrakten (150-334 ppm Isoflavonsumme) supplementierte Sprague-Dawley-Ratten zeigten eine signifikante Abnahme an Superoxid-Dismutase- und Katalase-Aktivität in verschiedenen Organen (Liu et al., 2005). In humanen EA.hy926-Endothelzellen führte eine Inkubation mit 50 µM Genistein über 24 h zu einer NFE2L2-Translokation und so zu einer erhöhten *GCLC*-Transkription (Hernandez-Montes et al., 2006).

2. Problemstellung

Brustkrebs ist bei Frauen in Deutschland nach wie vor die häufigste Krebserkrankung. Nur ein kleiner Teil der Brustkrebs-Erkrankungen ist auf vererbte genetische Defekte zurückzuführen. Der überwiegende Anteil der Erkrankungen fußt auf spontan im Laufe des Lebens erworbenen Mutationen. Daher ist es wichtig, Einflussfaktoren auf die Mutationsrate in gesundem Brustgewebe zu kennen. Sowohl nukleäre, als auch mitochondriale DNA könnte dabei eine Rolle spielen.

Ein Zusammenhang zwischen mitochondrialen DNA-Schäden und Krebsrisiko wird gegenwärtig kontrovers diskutiert. So wurde in der Literatur bereits eine signifikant höhere mitochondriale Spontanmutationsfrequenz in tumorigenen kultivierten humanen Brustgewebezellen, im Vergleich zu immortalisierten, nicht tumorigenen, kultivierten Brustgewebezellen, beschrieben. Infolgedessen war das Ziel dieser Arbeit zunächst Einflussfaktoren auf mitochondriale DNA-Schäden in gesundem weiblichem Brustgewebe zu identifizieren. Dafür sollten Gewebeproben von gesunden Frauen, die sich aus kosmetischen Gründen einer Mammareduktion unterziehen, akquiriert und zusätzlich Informationen zu Variablen, die Einfluss auf die mitochondriale Spontanmutationsfrequenz haben könnten, gesammelt werden. Am Lehrstuhl sollten zudem weitere potentiell wichtige Variablen bestimmt werden. Dazu gehört zum einen der *lobule type* der Gewebeproben, ein Maß für schwangerschaftsabhängige Gewebeausdifferenzierung, zum anderen gehören dazu Estrogen- und Estrogenmetabolitspiegel und Transkriptspiegel von Genen, die für am Estrogen-Metabolismus beteiligte Enzyme, Transkriptionsfaktoren und Rezeptoren kodieren. Als weitere potentiell wichtige Variablen sollten am Lehrstuhl Oxycholesterolspiegel und am Max-Rubner-Institut in Karlsruhe Isoflavonspiegel im Gewebe der Probandinnen bestimmt werden.

Anschließend sollte die mitochondriale Spontanmutationsrate ermittelt werden. Da bei gesundem humanem Gewebe in mitochondrialer DNA eine äußerst niedrige Spontanmutationsfrequenz erwartet wird ($8 \cdot 10^{-7} - 4 \cdot 10^{-4} \text{bp}^{-1}$), ist es notwendig, mit einer Methode zu arbeiten, die sensitiv genug ist, um diese niedrige Spontanmutationsfrequenz abzubilden. Der *Random Mutation Capture Assay* stellt in dieser Hinsicht eine geeignete Methode dar. Er besteht, nach erfolgreicher DNA-Isolation und *TaqI*-Verdau, im Wesentlichen aus zwei Schritten: der Kopienzahlbestimmung und der Mutantenzahlbestimmung. Eine möglichst hohe Sensitivität der beiden Schritte ist dabei essentiell,

um niedrige Kopienzahlen und einzelne Mutanten erfassen zu können. Des Weiteren wird eine möglichst hohe Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Kopienzahlbestimmung angestrebt. Deshalb sollten zunächst, nach entsprechender Primer-Entwicklung, die einzelnen PCR-Schritte für eine möglichst hohe Sensitivität optimiert werden und hinsichtlich ihrer Leistungsstärke charakterisiert werden. Anschließend sollte die mitochondriale Spontanmutationsfrequenz aller geeigneten Gewebespenden bestimmt und Einflussfaktoren darauf mittels multipler linearer Regressionsanalyse identifiziert werden.

In Bezug auf nukleäre DNA gelang es am Lehrstuhl bereits mittels *Random Mutation Capture Assay* die Spontanmutationsfrequenz von gesundem humanem Brustdrüsengewebe im Intron des Tumorsuppressor-Gens P53 zu bestimmen. Da für die Anwendung des *Random Mutation Capture Assays* auf nukleäre DNA ein vorhergehender Restriktionsenzym-Verdau und eine Hybridisierung der Zielsequenz mit einer komplementären biotinylierten Sonde notwendig ist, erwies sich die Methode jedoch als zu zeitaufwendig und unwirtschaftlich für eine Spontanmutationsfrequenz-Bestimmung einer größeren Anzahl an Proben. Mutationen können aufgrund von DNA-Adduktbildung entstehen. Bei der Entstehung von reaktiven Verbindungen, die in der weiblichen Brustdrüse in der Lage sind DNA-Addukte zu bilden, wird derzeit von einer Rolle des Estrogenmetabolismus ausgegangen. In Kooperation mit Professor Dandekar vom Lehrstuhl für Bioinformatik der Universität Würzburg wurden am Lehrstuhl bereits DNA-Adduktflüsse in weiblichem Brustdrüsengewebe mittels bioinformatischer *constraint-based* Netzwerkmodellierung errechnet. In dieser Arbeit sollten daher Einflussfaktoren auf diese DNA-Adduktflüsse untersucht werden. Für das Netzwerk-Modell wurden Transkriptspiegel als Surrogat für die Enzymaktivität verwendet. Dies stellt allerdings eine Vereinfachung der Enzymaktivität dar. Daher sollten zunächst relevante Polymorphismen in Genen, die für am Estrogenmetabolismus beteiligte Enzyme kodieren, identifiziert werden. Daraufhin sollte eine geeignete Methode zur Genotypisierung ausgewählt, geeignete Positivkontrollen identifiziert und diese mit einer zweiten Methode verifiziert werden. Anschließend sollten alle vorhandenen Proben genotypisiert und die ermittelten Allelfrequenzen auf ihre Plausibilität hin überprüft werden. Um zu ermitteln, ob die Polymorphismen zur besseren Erklärung der jeweils abhängigen Variablen bei bereits am Lehrstuhl gerechneten multiplen linearen Regressionsmodellen zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf Estrogen-Gewebespiegel im Brustgewebe beitragen, sollten die bereits am Lehrstuhl gerechneten Modelle erneut unter

zusätzlicher Berücksichtigung der jeweiligen Polymorphismen gerechnet werden. Um die relative Aktivität der Allele im Netzwerkmodell zu korrigieren, sollten anschließend in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Bioinformatik der Universität Würzburg zusätzliche DNA-Adduktflüsse unter Berücksichtigung der Genotypen gerechnet werden. Daraufhin sollten beide Modelle durch Vergleich mit real gemessenen Daten validiert werden. Danach sollten mittels multipler linearer Regression Einflussfaktoren auf die errechneten DNA-Adduktflüsse ermittelt werden.

Die DNA-Adduktflüsse bilden genotoxischen Stress, der durch direkte Interaktion von Katecholen aus dem Estrogenmetabolismus mit der DNA entsteht, ab. Reaktive Sauerstoff-Spezies, die durch *Redox-Cycling* der Estrogenkatechole entstehen können, werden dabei nicht abgebildet. Zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf oxidativen Stress in der weiblichen Brust eignen sich Spiegel von Transkripten, deren Expression bei oxidativem Stress induziert wird, wie die der NADPH-Chinon-Oxidoreduktase 1, der γ -Glutamyl-Cystein-Ligase und des Transkriptionsfaktors *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*. Da eine Vielzahl an potentiellen Einflussfaktoren auf oxidativen Stress im weiblichen Brustdrüsen- und Brustfettgewebe in Frage kommt, sollten eben jene Einflussfaktoren mittels multipler linearer Regressionsanalyse ermittelt werden.

Zusammengefasst sollte die mitochondriale Spontanmutationsfrequenz erstmals in gesundem humanem Brustgewebe bestimmt und in Kombination mit bioinformatischer Netzwerkmodellierung und multipler linearer Regressionsanalyse ein umfassendes Bild der verschiedenen Einflussfaktoren auf mitochondrialen und estrogeninduzierten genotoxischen Stress in der gesunden weiblichen Brust dargestellt werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Analysenwaage	Mettler Analytical Balance AE 240 Dual Range Balance (Mettler-Toledo GmbH, Gießen)
Biofreezer	Typ 6483 (GFL – Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel)
Brutschrank	CO ₂ Inkubator CB 150 (Binder GmbH, Tuttlingen)
Digital-Kamera	Digital Sight DS-U3 (Nikon GmbH, Düsseldorf)
<i>Dounce Tissue Grinder</i>	15 ml <i>Dounce Tissue Grinder</i> (Wheaton, Millville NJ-USA)
Durchflusszytometer	Partec CyFlow Space (Partec GmbH, Münster)
Elektrophoresekammern	Modell 40-0911, PerfectBlue Gelsystem Mini M (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) Modell 40-1410, PerfectBlue Gelsystem Breitformat-Gelsystem Mini ExM (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) Modell 40-2314, PerfectBlue Gelsystem Breitformat-Gelsystem Mini ExW (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) Modell 41-1325, PerfectBlue Gelsystem Maxi S (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) VG-SYS UNIT COMPLETE, (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Feinwaage	AT21 Comparator (Mettler-Toledo GmbH, Gießen)
Geldokumentationssystem	Molecular Imager®, ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
Heizplatte mit Magnetrührer	IKA® RCT basic (IKA®-Werke GmbH, Staufen)
Hybridisierungsöfen	Perfect Blot (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
Inverses Phasenkontrastmikroskop	Axio Observer D1 (Carl Zeiss GmbH, Jena) Nikon Eclipse TS100 10x/0,25 Ph1 (Nikon GmbH, Düsseldorf) Wilovert S, Objektiv: A Ph 10/0,25 Ph I (Helmut Hund GmbH, Wetzlar)
Millipore-Anlage	Millipak® Millipore 0,22 µm (Millipore GmbH, Schwalbach)
Mörser für stickstoffgekühltes Gewebe	Eigenbau Werkstatt Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie Universität Würzburg
Lochplatte für das TECAN-Plattenlesegerät	NanoQuant Plate™, (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim)
Neubauer Zählkammer	0,100 mm Tiefe, 0,0025 mm ² (Laboroptik Ltd., Lancing, UK)
pH-Elektrode	SenTix-81 (WTW GmbH, Weilheim)
pH-Meter	inoLab pH 720 (WTW GmbH, Weilheim)
Photometer	UV-Vis Spectrophotometer UV-mini-1240 (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg)

Pipetten	0,5-10 µl Discovery Comfort DV10, (Abimed GmbH, Langenfeld) 5-50 µl Discovery Comfort DV 50C (Abimed GmbH, Langenfeld) 10-100 µl Discovery Comfort DV100, (Abimed GmbH, Langenfeld) 20-200 µl, Discovery Comfort DV 200C (Abimed GmbH, Langenfeld) 100-1000 µl Discovery Comfort DV 1000, (Abimed GmbH, Langenfeld) 1000-5000 µl Discovery Comfort DV 5000C (Abimed GmbH, Langenfeld) 8-Kanalpipette, Discovery+ Comfort 20-200 µl und 50-300 µl (Abimed GmbH, Langenfeld) Multipette® plus (Eppendorf AG, Hamburg) 10-100 µl Pipet lite RAININ, L100 (Mettler-Toledo GmbH, Gießen) 100-1000 µl Pipet lite RAININ L1000 (Mettler-Toledo GmbH, Gießen)
Pipettierhelfer	Accu-jet® pro (Brand GmbH + CO KG, Wertheim)
Plattenlesegerät	infinite F200 (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim)
Präzisionswaage	SI-2002 (Denver Instrument GmbH, Göttingen)
Rotationsmischer	Multi Bio RS-24 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
Spannungsgeber für Elektrophoreseapparatur	POWER PAC 1000, 200/240 V (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
Thermocycler	Primus 96 Thermal Cycler (MWG Biotech, Ebersberg) Primus 25 advanced (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt)
Sterile Werkbank	NU-480-600 (IBS Integra Biosciences, Fernwald)
Thermomixer	Thermomixer compact (Eppendorf AG, Hamburg)
Trockenschrank zur Heißsterilisation	FD 115 (Binder GmbH, Tuttlingen)
Ultraschallbad	Sonorex TK52 (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin)
UV-Tisch	Modell PHER01 (Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen)
Vakuumpumpe	PC 2002 VARIO/ PC 2004 VARIO (Vacuubrand GmbH & Co KG, Wertheim)
Wasserbad	NGW Lauda MS Gerätenummer: J16030 (Dr. R. Woboser KG, Königshofen) WNB 10 (Memmert, Schwabach)
Workstation	Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)

Zentrifugen	Tischzentrifuge: Combi-Spin mit Vortex (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) Kleinzentrifuge: EBA 12 (Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen) Zentrifuge für 96-well-Platten: Hereaus Multifuge 3SR+ (Thermo Scientific, Langenselbold) Cellspin I (THARMAC GmbH, Waldsolms)
--------------------	--

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Adhesiv-Folie für <i>realtime</i>-PCR 96- und 384-well-Platten	MicroAmp® Optical Adhesive Film, Art.-Nr.: 4313663 (Applied Biosystems, Darmstadt)
CellTrics®	CellTrics® 50 µm, Art.-Nr.: 04-0042-2317 (Partec GmbH, Münster)
Einmal-Injektionskanülen	100 Sterican® Ø 0,90 x 40 mm Gr. 1, Art.-Nr.: 4657519 (B. Braun Melsungen AG, Melsungen)
Fussel freie Tücher:	KIMCARE® 76 x 144, Art.-Nr.: 3020 (Kimberly-Clark Europe Limited/Professional Sector, Surrey, UK)
Glashaken	Eine Glaspasteurpipette wird in der Flamme eines Bunsenbrenners zu einem Haken geformt
Halb-Mikroküvette	Material: PS, Schichtdicke: 10 mm, Volumen: 1,6 ml, Art.-Nr.: 67746 (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)
Kryogefäß	Cryp_Pure Gefäß, 2,0 ml, weiß, Art.-Nr.: 72.379 (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)
Laborflaschen	Borosilikatglas 100 ml SCHOTT DURAN®, Art.-Nr.: 218012458 (Duran Group, Mainz) Borosilikatglas 250 ml SCHOTT DURAN®, Art.-Nr.: 218013651 (Duran Group, Mainz) Borosilikatglas 500 ml SCHOTT DURAN®, Art.-Nr.: 218014459 (Duran Group, Mainz) Borosilikatglas 1000 ml SCHOTT DURAN®, Art.-Nr.: 218015455 (Duran Group, Mainz)
Lochplatte für die Gelelektrophorese und Fluorimetrie	Microtest Plate 96-Well, Flat Bottom, Art.-Nr.: 82.1581 (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)
Lochplatten für die <i>realtime</i>-PCR	MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate, Art.-Nr.: 4346906 (Applied Biosystems, Darmstadt) 96 Well Multiply® Fast PCR-Platte, Art.-Nr.: 72.1981.202 (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) 384-well PCR-Platte für qPCR, Art.-Nr.: 78155 (Brand GmbH + CO KG, Wertheim)

	384 Well Multiply® PCR-Platte, Art.-Nr.: 72.1984.202 (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)
Lochplatte für die Zellkultur	Nunclon™ Δ Surface, Art.-Nr.: 734-0992 (Nunc A/S, Roskilde, Dänemark)
Mikroküvette	Uvette® 220-1600 nm (Eppendorf AG, Hamburg)
Pipettenspitzen	Pipettenspitze mit Filter, 0,1-10 µl, Art.-Nr.: 70.1131.210 (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)
	Pipettenspitze mit Filter, 0,1-20 µl, Art.-Nr.: 70.1116.210 (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)
	Pipettenspitze mit Filter, 2-100 µl, Art.-Nr.: 70.760.212 (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)
	Pipettenspitze mit Filter, 2-200 µl, Art.-Nr.: 70.760.211 (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)
	Pipettenspitze mit Filter, 50-1250 µl, Art.-Nr.: 70.1186.410 (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)
	Pipettenspitzen, 10 µl farblos, Art.-Nr.: 70.1130 (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)
	Pipettenspitzen, 20 µl farblos, Art.-Nr.: 70.1114 (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)
	Pipettenspitzen, 200 µl gelb, Art.-Nr.: 70.760.002 (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)
	Pipettenspitzen, 1000 µl farblos, Art.-Nr.: 70.762 (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)
	DISCOVERY Comfort DV 50C 5-50 µl, Art.-Nr.: 70.1114 (Abimed GmbH, Langenfeld)
	DISCOVERY Comfort DV 200C 20-200 µl, Art.-Nr.: 70.760.002 (Abimed GmbH, Langenfeld)
	DISCOVERY Comfort DV 1000C 100-1000 µl, Art.-Nr.: 70.762 (Abimed GmbH, Langenfeld)
	DISCOVERY Comfort DV 5000C 1000-5000 µl, Art.-Nr.: 0030000978 (Abimed GmbH, Langenfeld)
	RAININ Pipet Lite XLS 200 µl, Art.-Nr.: 17005864 (Mettler-Toledo GmbH, Gießen)
	RAININ Pipet Lite XLS 1000 µl, Art.-Nr.: 17007083 (Mettler-Toledo GmbH, Gießen)
	Combitips plus 0,1 ml, Art.-Nr.: 0030 069.200 (Eppendorf AG, Hamburg)
	Combitips plus 5,0 ml, Art.-Nr.: 0030 069.250 (Eppendorf AG, Hamburg)
Pasteurpipetten	Chemikalienausgabe, Fakultät für Chemie, Universität Würzburg

3.1 Material

Petrischalen	Cellstar® 35x10 mm, Art.-Nr.: 627840 (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) Cellstar® 100x20 mm, Art.-Nr.: 664160 (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)
Plastik Pasteur-Pipetten	Transferringpipette, Art.-Nr.: 861171.001 (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)
Reaktionsgefäße	Multiply®-pro Gefäß 0,2 ml, PP, Art.-Nr.: 72.737.002 (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) Safe Seal Micro Tube 1,5 ml, PP, Art.-Nr.: 72.690.001 (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) Micro Tube 2 ml, PP, Art.-Nr.: 72.695 (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)
Sterilfilter	Nalgene® Bottle Top Filter 500 ml, Porengröße 0,45 µm, Art.-Nr.: 595-3320 (Thermo Scientific, Langenselbold) Nalgene® Bottle Top Filter 500 ml, Porengröße 0,45 µm, Art.-Nr.: 295-3345 (Thermo Scientific, Langenselbold) Pyrogenfreie, Sterile-R, 20 µm, Art.-Nr.: 83.1828.001 (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)
Zellkulturflaschen	Cellstar®, 75 cm ² , PS, red standard cap, sterile, Art.-Nr.: 658175 (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) Cellstar®, 175 cm ² , PS, red standard cap, sterile, Art.-Nr.: 660175 (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)
Zentrifugenröhrchen	Röhre 15 ml mit Deckel, Art.-Nr. 62.554.502 (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) Röhre 50 ml mit Deckel, Art.-Nr. 62.547.254 (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)

3.1.3. Chemikalien

AhdI	AhdI, recombinant, Art.-Nr.: R0584S (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main)
Agarose	peqGOLD Universal, Art.-Nr.: 35-1020 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) Art.-Nr.: A9539-500G, (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Bromphenolblau	Art.-Nr.: B0126 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
BsmAI	recombinant 5000 units/ml, Art.-Nr.: R0529L (New England Biolabs® GmbH, Frankfurt am Main)
CaCl₂	Calciumchlorid dihydrat, Art.-Nr.: 22,350-6 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

3.1 Material

Chloroform p.A.	Trichlormethan, ISO, stabilisiert mit Ethanol, Art.-Nr.: 2445.2500 (Merck, Darmstadt)
Cut Smart™-Puffer (10x)	Art.-Nr.: B72045 (New England Biolabs® GmbH, Frankfurt am Main)
CyStain DNA 2 step High Resolution DNA Staining Kit	Art.-Nr.: 05-5005 (Partec GmbH, Münster)
Destilliertes Wasser	Hauseigene Versorgung
Dimethylsulfoxid	Reinheit ≥ 99,9%, Art.-Nr.: 154938 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
2,4-Dinitrophenol	Reinheit ≥97,0%, moistened with water, Art.-Nr.: D198501 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
DNA-Aufreinigungs-Kit	illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Art.-Nr.: 28-9034-70 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)
DNA-Leitern	50 bp DNA Ladder, Art.-Nr.: N3236L (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) 100 bp DNA Ladder Art.-Nr.: N3231L (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) 1 kb DNA Ladder, Art.-Nr.: N3232L (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Art.-Nr.: SM0311 (Fermentas Life Sciences, Waltham MA)
dNTPs	Art.-Nr.: DNTP10-1KT (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Eco57I	5000 units/ml, Art.-Nr.: ER0341 (Thermo Scientific, Langenselbold)
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat, Art.-Nr.: 8043.2 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) Ethylendiamintetraessigsäure, geeignet für Zellkultur, Art.-Nr.: E6758 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Ethanol	Ethanol absolute molecular biology grade, Art.-Nr.: A3678 (Applichem GmbH, Darmstadt)
Ethidiumbromid	Reinheit ≥98%, Art.-Nr.: 7870.1 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Fetales Kälberserum	Art.-Nr.: 10270-106 (GIBCO invitrogen, Darmstadt)
Flüssiger Stickstoff	Hauseigene Versorgung
Glukose	D-(+)-Glukose, Art.-Nr.: HN06.3 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Glycerin	Rotipuran® >99,5%, p.a., Art.-Nr.: 3783 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

3.1 Material

Glykogen	Typ IX; Art.-Nr.: G2885-1G (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
HCl 1 N	Salzsäure 1 N, Art.-Nr.: K025.1 (Carl Roth GmbH Karlsruhe)
Hinfl,	recombinant 5000 units/ml, Art.-Nr.: R0155S (New England Biolabs® GmbH, Frankfurt am Main)
Isopropanol	mind. 99,7%, Art.-Nr.: 07029.4000 (Bernd Kraft GmbH, Duisburg)
Kalbsthymus DNA	Deoxyribonucleic acid sodium salt, from calf thymus, Art.-Nr.: D1501-100MG (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
KCl	Kaliumchlorid, Reinheit $\geq 99\%$, geeignet für Zellkultur, Art.-Nr.: P5405 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat, Reinheit $\geq 99,0\%$, geeignet für Zellkultur, Art.-Nr.: P5655 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
NaCl	Sodium Chloride, Art.-Nr.: S5886-1KG (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat, geeignet für Zellkultur, Reinheit $\geq 99,5\%$, Art.-Nr.: S5761, (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Na₂HPO₄	Natriumhydrogenphosphat, geeignet für Zellkultur, Art.-Nr.: S5136 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
NaOH 1 N	1 N Maßlösung, Art.-Nr.: K021.1 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Natriumacetat	$\geq 98,5\%$, Art.-Nr.: X891.1 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Natrium-Pyruvat	100 mM Lösung, geeignet für Zellkultur, Art.-Nr.: S8636 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
NEB Puffer 3	Art.-Nr.: B7203S (New England Biolabs® GmbH, Frankfurt am Main)
NEB Puffer 4	Art.-Nr.: B7004S (New England Biolabs® GmbH, Frankfurt am Main)
Nuklease freies (nf) Wasser	Water molecular biology grade, Art.-Nr.: W4502-1L (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
MgCl₂-Lösung	25 mM, Art.-Nr.: M8787 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
PCR Master-Mix	GTXpress™ Master Mix, 2X, Art.-Nr.: 4403089 (Applied Biosystems, Darmstadt)
PCR-Puffer	10x PCR Buffer without MgCl ₂ , Art.-Nr.: P23170 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

	TEMPase Hotstart DNA Polymerase Buffer I, Art.-Nr.: A225107 (Genaxxon bioscience GmbH, Ulm)
	OneTaq® Standard Reaction Buffer (5x), Art.-Nr.: M0480 S (New England Biolabs® GmbH, Frankfurt am Main)
	Phusion® HF Reaction Buffer, Art.-Nr.: B0518S (New England Biolabs® GmbH, Frankfurt am Main)
Penizillin/Streptomycin	stabilisierte Lösung, geeignet für Zellkultur, Art.-Nr.: P4458, (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Polymerasen	2 U/µl Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase, Art.-Nr.: M0530S (New England Biolabs® GmbH, Frankfurt am Main)
	OneTaq® DNA Polymerase, 5 U/µl, Art.-Nr.: M0480 S (New England Biolabs® GmbH, Frankfurt am Main)
	Taq DNA Polymerase 5 U/µL von <i>Thermus aquaticus</i> , Art.-Nr. D4545-250UN (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
	Tempase Hotstart DNA Polymerase, Art.-Nr.: A225107 (Genaxxon bioscience GmbH, Ulm)
Primer	Kundenspezifische Anfertigung; entsalzt; gelöst in nf Wasser (100 mM) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Proteinase K	Proteinase, <i>Tritirachium album serine</i> , Art.-Nr.: A3830, 0500, (AppliChem GmbH, Darmstadt)
Realtime-Referenzfarbstoff	Reference Dye for Quantitative PCR, Art.-Nr. 4526-3ML (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Rinderserum Albumin	10 mg/ml Purified BSA 100x, Art.-Nr.: B9001S, (New England Biolabs® GmbH, Frankfurt am Main)
RNase A	20 mg/ml, Art.-Nr.: 732-3152 (PepLab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
Saccharose	≥ 99,5%, Art.-Nr.: S7903-1UG (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
SDS	Sodiumdodecylsulfate Ultra pure, Art.-Nr.: 2326.1 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Sheath Fluid for Flow Systems	Art.-Nr.: 04-4007 (Partec GmbH, Münster)
SYBR-Green®	SYBR® Green I nucleic acid gel stain 10.000x konzentriert in DMSO, Art.-Nr.: S-7563 (Molecular Probes, Darmstadt)
Tacrin	9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridinhydrochlorid Hydrat, Reinheit ≥99,0%, geeignet für Zellkultur, Art.-Nr.: A79922 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Tango Buffer 10x	Art.-Nr.: BY5 (Thermo Scientific, Langenselbold)
TaqI	20.000 U/ml <i>TaqI</i> , recombinant, Art.-Nr.: R0149L (New England Biolabs® GmbH, Frankfurt am Main)

	100.000 U/ml <i>TaqI</i> , recombinant, Art.-Nr.: R0149M (New England Biolabs® GmbH, Frankfurt am Main)
TaqMan®, Drug Metabolism Genotyping Assays Dye	COMT, rs4680, Assay ID: C__25746809_50, Art.-Nr.: 4362691 (Applied Biosystems, Darmstadt) CYP1B1, rs1056836 Assay ID: C__3099976_30, Art.-Nr.: 4362691 (Applied Biosystems, Darmstadt) GSTP1, rs1695 Assay ID: C__3237198_20, Art.-Nr.: 4362691 (Applied Biosystems, Darmstadt) HSD17B1, rs676387 Assay ID: C__2769181_1_, Art.-Nr.: 4351379 (Applied Biosystems, Darmstadt) NQO1, rs1800566 Assay ID: C__2091255_30, Art.-Nr.: 4362691 (Applied Biosystems, Darmstadt)
TaqMan®-Sonde	Kundenspezifische Anfertigung, gelöst in nf Wasser (100 mM), HPLC aufgereinigt (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Art.-Nr.: 154563-1KG (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Trypsin	10x Lösung, steril filtriert, Art.-Nr.: T4549 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Uridin	geeignet für Zellkultur, Art.-Nr.: U3003 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
Zellkulturmedium	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium – high glucose</i> , geeignet für Zellkultur, Art.-Nr.: D5648 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

3.1.4. Puffer und Lösungen

Agarose-Gel 1,5/3%ig (w/w)	1,5 bzw. 3 g Agarose werden mit 1x TAE-Puffer in einem 300 ml Erlenmeyerkolben auf 100 g aufgefüllt und in der Mikrowelle erhitzt.
0,5 M EDTA	186,12 g EDTA werden in 800 ml dest. Wasser gelöst, mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt und mit dest. Wasser auf 1 l aufgefüllt.
Hitzeinaktiviertes fetales Kalberserum (hiFKS)	Fetales Kalberserum wird 30 Minuten bei 56°C im Wasserbad erhitzt.
Homogenisationspuffer	109,5 g Saccharose, 3,7 g EDTA, 1,2 g Tris-HCl werden in 800 ml dest. Wasser gelöst, mit HCl auf pH 7,4 eingestellt, mit dest. Wasser auf 1 l aufgefüllt und steril filtriert.
Krebs-Henseleitpuffer	2 g Glukose, 0,14 g MgSO ₄ , 0,16 g KH ₂ PO ₄ , 0,35 g KCl und 6,9 g NaCl werden in 800 ml dest. Wasser gelöst, 0,37 g CaCl ₂

	hinzugefügt und gelöst, 2,1 g NaHCO ₃ hinzugefügt und gelöst, mit HCl auf pH 7,2 eingestellt und mit dest. Wasser auf 1 l aufgefüllt.
Loading Dye	10-20 mg Bromphenolblau 4 g Saccharose werden in 2 ml 0,5 M EDTA-Lösung und 0,5 ml 10%igem SDS (0,5 ml) gelöst und mit 50 mM Tris auf 10 ml aufgefüllt.
Lysepuffer	8,8 g NaCl, 18,6 g EDTA, 1,2 g Tris-HCl und werden in 750 ml dest. Wasser gelöst, 50 ml 10%iges SDS hinzugefügt, mit HCl auf pH 8,0 eingestellt und mit dest. Wasser auf 1 l aufgefüllt.
6 M NaCl-Lösung	350,4 g NaCl werden in 1 l dest. Wasser gelöst.
3M Natrium-Acetat-Lösung	24,6 g Na ₂ -Acetat werden in 100 ml dest. Wasser gelöst und mit HCl auf pH 5,2 eingestellt.
Passagemedium	DMEM-Pulver wird mit 800 ml Millipore-Wasser gelöst, 2,25 g NaHCO ₃ und 10 ml 100 mM Natrium-Pyruvatlösung zugegeben, mit HCl auf pH 7,1 eingestellt, mit Millipore-Wasser auf 1 l aufgefüllt, sterilfiltriert (0,2 µm) und 20 ml Penizillin/Streptomycin und 50 ml hiFKS zugegeben.
PBS-Puffer	80 g NaCl, 2 g KCl, 26,8 g Na ₂ HPO ₄ und 2 g KH ₂ PO ₄ werden in 800 ml dest. Wasser gelöst, mit HCl auf pH 8 eingestellt und auf 1 l mit dest. Wasser aufgefüllt; anschließend wird je nach Bedarf mit dest. Wasser 1:10 verdünnt.
SDS 10%ig	100 g SDS werden in 800 ml dest. Wasser bei 68°C gelöst, mit HCl auf pH 7,2 eingestellt und mit dest. Wasser auf 1 l aufgefüllt.
SYBR-Green Verdünnungen	
V I	1:100 in 1x TAE-Puffer verdünnt.
V II	V I 1:10 in 50% Glycerin/TAE-Puffer verdünnt.
V III	V I 1:100 in 1x TAE-Puffer verdünnt.
Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer	242 g Tris werden in 500 ml dest. Wasser gelöst, 100 ml 0,5 M Na ₂ EDTA (pH 8,0) und 57,1 ml Eisessig zugegeben und mit dest. Wasser auf 1 l aufgefüllt; anschließend wird je nach Bedarf mit dest. Wasser 1/50 verdünnt.
Tris-EDTA (TE)-Puffer	5 ml 1 M Tris-HCl und 0,1 ml 0,5 M EDTA werden mit dest. Wasser auf 400 ml aufgefüllt, mit HCl auf pH 8 eingestellt und mit dest. Wasser auf 500 ml aufgefüllt.
1 M Tris-HCl	121 g Tris werden in 800 ml dest. Wasser gelöst, mit HCl auf pH 8 eingestellt und mit dest. Wasser auf 1 l aufgefüllt.
Trypsin-EDTA-Lösung	200 mg EDTA werden in 800 ml dest. Wasser und 100 ml 10x PBS gelöst, mit HCl auf pH 7,4 eingestellt, autoklaviert und unter der sterilen Werkbank 100 ml Trypsin-Lösung (10x) zugegeben.

3.1.5. Programme

<i>A plasmid Editor (ApE)</i>	Version 2.0.47, M. Wayne Davis
ChemBioDraw Ultra	Version 12.0, PerkinElmer
GraphPad Prism	Version 6.04, GraphPad Software Inc.
HG-PUBL	Cariello et al. (1994)
Quantity One®	Version 4.6.8, Bio-Rad
i-control	Version 1.10, Tecan
LinRegPCR	Version 2013.0, Ruijter et al. (2009) und Tuomi et al. (2010)
OriginPro®	Version 9.3.2.303, OriginLab Corporation
R	Version 3.2.2, R Foundation
RStudio	Version 1.0.143, RStudio, Inc.
SDS sequence detection system	Version 2.4, Life Technologies

3.2. Methoden

3.2.1. Akquirierung des Gewebes

Das Brustdrüsen- und Fettgewebe wurde von 44 Frauen gespendet, die sich aus kosmetischen Gründen einer Mamma-Reduktion unterzogen. Zusätzlich füllte jede Spenderin einen Fragebogen zu ihrem Alter, BMI, Anzahl der Schwangerschaften, Einnahme von estrogenaktiven Medikamenten und Nahrungsergänzungsmitteln, Rauchverhalten sowie Alkoholkonsum aus. Des Weiteren erklärte sich ein Teil der Spenderinnen bereit an einer Interventionsstudie teilzunehmen, bei der in den sieben Tagen vor der OP täglich ein Isoflavon-Präparat (Dosis: $1\text{-}1,3 \text{ mg/kg Körpergewicht} \cdot \text{Tag}^{-1}$) eingenommen wurde. Jede Teilnehmerin gab eine schriftliche Einwilligung ab. Die Studie wurde vom Ethik-Komitee der medizinischen Fakultät der Universität genehmigt.

3.2.2. Präparation des Gewebes

Das Gewebe wird direkt nach der Entnahme im OP in eisgekühltem Krebs-Henseleit Puffer portioniert. Dabei wird das Fettgewebe vom Drüsengewebe separiert, optisch nach Fettgehalt eingeteilt, getrennt in flüssigen Stickstoff gegeben und später bei -80°C im Biofreezer aufbewahrt. Für Drüsengewebsaufarbeitungen wird nach optischer Beurteilung nur Gewebe mit einem maximalen Fettanteil von ca. 25% verwendet, für Fettgewebsaufarbeitungen nur Gewebe mit einem Fettgehalt von 100%.

3.2.3. DNA-Isolation aus Zellen und Gewebe

Ziel der DNA-Isolation ist es eine möglichst reine mtDNA für den RMCA zu generieren. Die nDNA wird ebenfalls aufgearbeitet und für die Polymorphismenbestimmung verwendet. Die Isolation wird modifiziert nach Vermulst et al. (2008) durchgeführt:

Mörsern des Gewebes

Das bei -80°C aufbewahrte Brustdrüsen- oder Fettgewebe wird dem Biofreezer entnommen und in flüssigem Stickstoff zwischengelagert. Anschließend werden ca. 6 g unter flüssigem Stickstoff mit Hammer und Mörser zerkleinert und zur Zwischenlagerung im Biofreezer in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Um eine Degradierung der DNA zu vermeiden, wird darauf geachtet, dass das Gewebe sich dabei stets in einem gefrorenen Zustand befindet. Ebenso werden alle weiteren Schritte im Kühlhaus durchgeführt.

Aufschluss des Gewebes

Das homogenisierte Gewebe wird in einen 15 ml *Wheaton Dounce Tissue Grinder* überführt und mit 4 ml eisgekühltem Homogenisationspuffer versetzt. Anschließend werden jeweils zunächst mit einem *loose*-Stößel und danach mit einem *tight*-Stößel so lange Auf- und Abbewegungen durchgeführt, bis sich ein gleichbleibender Widerstand einstellt und das Gewebe homogen ist. Im Anschluss wird die Suspension in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 1000 x g und 4°C zentrifugiert. Im Überstand befinden sich die Mitochondrien und im Pellet die Zellkerne. Der Überstand wird vorsichtig mit einer Transferpipette abgenommen, auf 2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und anschließend 10 min bei 13.000 x g und 4°C zentrifugiert. Im Präzipitat befinden sich die Mitochondrien. Der Überstand wird erneut vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und verworfen.

Lyse und RNase A Verdau

Die auf 2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilten mitochondrialen Zellpellets werden mit insgesamt 1 ml auf 55°C vortemperiertem Lysepuffer (Proteinase K-Konzentration: 0,2 mg/ml) versetzt und dabei vereinigt. Ebenso wird das nukleäre Präzipitat mit 10 ml Lysepuffer versetzt und beide Lösungen über Nacht bei 55°C im Hybridisierungssofen lysiert. Anschließend wird die Proteinase K 20 min bei 65°C im Wasserbad inaktiviert.

Die Lysate werden mit 20 µg RNase A versetzt und 60 min bei 37°C im Hybridisierungssofen inkubiert.

Aufreinigung und Fällung der DNA

Die Zellysate werden mit 0,4 ml 6 M NaCl Lösung pro ml Lysepuffer versetzt, durchmischt, anschließend mit 1,4 ml Chloroform pro ml Lysepuffer 30 s ausgeschüttelt und 5 min bei 1800 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Zentrifugenröhrchen bzw. Reagiergefäß überführt. Das Ausschütteln mit Chloroform wird so oft wiederholt, bis das Lysat klar ist.

Zur Fällung der DNA wird das Lysat nach Zugabe von 20 ng Glykogen langsam 1 ml Isopropanol pro ml Isolatlösung versetzt und gemischt. Sofern DNA ausfällt, wird diese mit einem Glashaken abgenommen, auf Pergaminpapier vorsichtig getrocknet und in 200 µl TE-Puffer gelöst. Wenn keine ausgefallene DNA sichtbar ist, wird die Lösung mehrere Tage bei 4°C in den Kühlschrank gestellt und am Ende 5 min bei 1800 x g und 4°C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird in 70%igem Ethanol resuspendiert, eine halbe Stunde im Kühlschrank aufbewahrt, erneut zentrifugiert und in 200 µl TE-Puffer gelöst. Die Konzentration der Lösung wird nach mehreren Tagen im Rotationsmischer photometrisch bestimmt (Kap. 3.2.5).

Bei der Isolation von DNA aus Zelllinien wird analog verfahren, nur werden die Zellen direkt ohne Mörsern in den *Wheaton Dounce Tissue Grinder* gegeben.

Zur Isolation von Gesamt-DNA aus MCF-7-Zellen fällt zusätzlich das Aufschließen im *Tissue Grinder* mit anschließender Zentrifugation weg. Die Zellen werden direkt mit Lysepuffer versetzt und inkubiert.

Die DNA-Isolation aus Brustdrüsengewebe wurde überwiegend von Manuela Rothacker im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit und die DNA-Isolation aus Fettgewebe hauptsächlich von Harald Schuchardt im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt.

3.2.4. Random Mutatin Capture Assay

Der RMCA besteht im Wesentlichen aus vier Teilen: *TaqI*-Verdau, Kopienzahlbestimmung, Mutantenzahlbestimmung und Verifizierung der Mutantenzahl.

3.2.4.1. Primerdesign

Die Primersuche erfolgt mittels des online frei verfügbaren Programms „Primer3Plus“ (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>, Stand: 29.04.2013). Anschließend werden eventuelle Primer-Sekundärstrukturen mit dem Programm „PrimerExpress3.0“ ermittelt. Ferner wird ein sogenannter „Primer-Blast“, das Identifizieren von potentiell möglichen unspezifischen Primer-Bindungsstellen auf der DNA des Zielorganismus, in diesem Fall der Mensch, durchgeführt. Dies geschieht über das frei verfügbare Online-Tool „Primer-Blast“ (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>; Stand 29.04.2013).

Die Primer für den mitochondrialen RMCA und die zugehörige TaqMan®-Sonde wurden von Johanna Loos im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Tätigkeit am Lehrstuhl designt.

3.2.4.2. TaqI-Verdau

50 ng mtDNA werden mit 10 µg BSA und 1x NEB Puffer 4 auf 195 µl eingestellt. Anschließend wird 1 µl TaqI (100 U) zugegeben und für 60 min bei 65°C im Thermomixer inkubiert. Die TaqI-Zugabe mit Inkubation wird viermal wiederholt. Anschließend wird der TaqI-Verdau á 10-15 µl aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

3.2.4.3. Kopienzahlbestimmung

Die Kopienzahlbestimmung wird mittels TaqMan®-Sonden basierter *realtime*-PCR nach Tabelle 3 und Tabelle 4 durchgeführt. Dabei wird ein Primer-Paar (*forward*: 5'-CGATCCGTCCTAACAAACT-3', *reverse*: 5'-TCTGCGGCTAGGAGTCAATA-3') mit entsprechender TaqMan®-Sonde (5'-6FAM-AGGCGTCCTTGCCCTATTACTATCC-BHQ1/OQA-3') verwendet, welches ein 149 bp langes Segment innerhalb der Zielsequenz (*CytB*) amplifiziert.

Tabelle 3: Pipettierschema für die Kopienzahlbestimmung mittels TaqMan®-Sonden-basierter *realtime*-PCR. Templat: Kopienzahl-Standard, nf Wasser (Blindwert) und Probe.

Reagenz	Konzentration	Endkonzentration	Volumen (µl)
Primer-Mix	5 µM	0,5 µM	2
Taq-PCR-Puffer	10x	1x	2
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	2
TaqMan®-Sonde	2 µM	0,05 µM	0,5
dNTPs Mix	10 mM	0,25 mM	0,5
Referenzfarbstoff	100x	1x	0,2
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,025 U/µl	0,1
Templat	0,06-144 fg/µl	0,015-36 fg/µl	5
nf Wasser			7,7

Tabelle 4: Temperaturprogramm für die Kopienzahlbestimmung mittels TaqMan®-Sonden-basierter *realtime*-PCR.

Zyklen	Schritt	Temperatur (°C)	Zeit
1	Denaturierung	95	2 min
	Denaturierung	95	15 s
40	<i>Annealing</i> /Elongation	58	1 min

Für die Kopienzahlbestimmung von nDNA (Primer für das *PIK3CA*-Gen, *forward*: 5'-TCAGCCCCTCTCTCCTCTGA-3', *reverse*: 5'-CCAGAAAAACCAAGGCAAGATTA-3') wird analog verfahren. Dabei wird TaqMan®-Sonde (5'-6FAM-TCAGCCCCTCTCTCCTCTGA-BHQ1-3') mit einer Endkonzentration von 0,1 µM (1 µl pro Ansatz) eingesetzt, die Denaturierungszeit beträgt 30 s und die *Annealing*-Temperatur 56°C.

Die Primer für die *PIK3CA*-Kopienzahlbestimmung und die zugehörige TaqMan®-Sonde wurden von Gesche Spielmann im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit am Lehrstuhl designt.

Die Kopienzahlbestimmungen von mitochondrialer DNA wurden hauptsächlich von Lisa-Marie Orth im Rahmen ihrer Masterarbeit und die Kopienzahlbestimmungen von nDNA vor allem von Vanessa Eisert im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt.

3.2.4.4. Mutantenzahlbestimmung

Die Mutantenzahl wird nach dem *TaqI*-Verdau (Kap. 3.2.4.2) mit Primern (*forward*: 5'-TGATCCTCCAATCACCACA-3', *reverse*: 5'-CAGGAGGATAATGCCGATGT-3') ermittelt, die die *TaqI*-Schnittstelle der Zielsequenz flankieren. Dabei wird mittels SYBR-Green® basierter *realtime*-PCR (Tabelle 5 und Tabelle 6) mit anschließender Schmelzkurven-PCR-Produktverifikation ein 239 bp langes Fragment amplifiziert. Das Probenemplat wird dabei mit Master-Mix in einem Reservoir gemischt und mittels Oktapette auf 80 *wells* einer 384-*well*-Platte aufgeteilt. Um falsch positive Mutanten-Produkte auszuschließen, werden alle Schmelzkurven-positiven Reaktionsansätze mit *TaqI* nachverdaut (Kap. 3.2.4.5), mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Geldokumentationsgerät detektiert. Falsch positive Mutanten (keine 239 bp lange Bande detektierbar) werden bei der Berechnung der SMF ausgeschlossen. Bei 15 Mutanten in 80 Reaktionen ist via Poisson-Verteilung sichergestellt, dass sich bei einer Wahrscheinlichkeit von 98% nicht mehr als eine Mutante in einem beliebigen *well* befindet. Entstehen mehr als 15 Mutanten, wird die PCR mit weniger Templat wiederholt. Um Zufallsverteilungen bei wenigen einzelnen Mutanten auszuschließen, wird die PCR ebenso bei weniger als 5 Mutanten wiederholt, bis in der Summe 5 oder mehr Mutanten detektiert wurden. Zusätzlich werden zur Verifikation der Mutanten bei jeder Probe zufällig drei Mutanten ausgewählt, gelaufgereinigt und mittels Kettenabbruch-Methode nach Sanger sequenziert (LGC Genomics, Berlin).

Tabelle 5: Pipettierschema für die Mutantenzahlbestimmung mittels SYBR-Green® basierter *realtime*-PCR. Templat: Mutantenstandard (Positivkontrolle), nf Wasser (Blindwert), Probe.

Reagenz	Konzentration	Endkonzentration	Volumen (µl)
Primer-Mix	5 µM	0,4 µM	0,8
Tempase-PCR-Puffer mit MgCl ₂	10x /7,5 mM	1x/1,5 mM	2
MgCl ₂	25 mM	1 mM	0,4
dNTPs Mix	10 mM	0,2 mM	0,2
Tempase-Polymerase	5 U/µl	0,05 U/µl	0,1
SYBR-Green ® V I	100x	0,1x	0,01
Templat	3,3 pg/µl	0,17 pg/µl	0,5
nf Wasser			6,99

Tabelle 6: Temperaturprogramm für die Mutantenzahlbestimmung mittels SYBR-Green® basierter *real-time*-PCR.

Zyklen	Schritt	Temperatur (°C)	Zeit
1	Denaturierung/Aktivierung Polymerase	95	15 min
47	Denaturierung	95	30 s
	<i>Annealing</i>	65	30 s
	Elongation	72	1 min
1	Elongation	72	5 min
1	Schmelzkurve	60-95	

3.2.4.5. *TaqI*-Nachverdau von Mutantenbanden

Im Anschluss an die Mutations-PCR (Kap. 3.2.4.4) werden alle PCR-Produkte, deren Schmelztemperatur sich innerhalb einer Spannweite von $\pm 2^\circ\text{C}$ (Kap. 4.2.3.7) der Positivkontrolle befindet, inklusive der Positivkontrolle und des Blindwertes, erneut *TaqI*-verdaut. Dazu werden die betreffenden Reaktionsansätze in eine 96-*well*-Platte überführt, 2 μl *TaqI*-Master-Mix (Tabelle 7) hinzugegeben und 60 min bei 65°C im PCR-cycler verdaut. Nach der anschließenden Gelelektrophorese (Kap. 3.2.6) werden alle Mutanten unter der UV-Bank aus dem Gel ausgeschnitten, drei zufällig ausgewählte sequenziert (Kap. 3.2.8) und die restlichen Mutanten bei -20°C im Gefrierschrank für spätere Untersuchungen gelagert.

Tabelle 7: Pipettierschema für den *TaqI*-Nachverdau von, bei der Mutations-PCR (Kap. 3.2.4.4) detektierten, potentiellen Mutanten.

Reagenz	Konzentration	Endkonzentration	Volumen (μl)
<i>TaqI</i>	20 U/ μl	1 U/ μl	0,1
BSA	10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0,1
NEB4-/Cut-Smart-Puffer	10x	1x	0,2
nf Wasser			1,6

3.2.4.6. Berechnung der Mutationsfrequenz

Die Mutationsfrequenz berechnet sich wie folgt:

$$MF = \frac{M}{(K * b)}$$

MF: Mutationsfrequenz

M: Anzahl Mutanten

K: Gesamtkopienzahltemplat in Mutantenzahlbestimmung

b: Anzahl Basen in der *TaqI*-Schnittstelle (b=4)

3.2.5. Photometrische Quantifizierung von DNA

Die Konzentration von DNA wird photometrisch mittels TECAN NanoQuant Plate™ ermittelt. Dazu wird mit 2 µl des jeweiligen Lösemittels (z.B. TE-Puffer) ein individuelles *Blanking* für jedes *well* der NanoQuant-Platte durchgeführt. Danach werden zur Messung der Extinktion bei 260 und 280 nm 2 µl der jeweiligen zu messenden Lösung in das entsprechende *well* pipettiert. Zur Reinheitsbestimmung wird das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm/280 nm gebildet. Eine hohe Reinheit zeigt sich bei einem Wert zwischen 1,8 und 2,0. Die Konzentration der DNA errechnet sich nach folgender Formel:

$$c = \frac{E}{(\varepsilon * d)}$$

c: Konzentration der DNA (ng/µl)

E: Extinktion bei 260 nm

d: Schichtdicke der Lösung (0,2 cm bei der NanoQuant Plate™, 1 cm bei 50 µl Küvetten)

ε: Extinktionskoeffizient von doppelsträngiger DNA (50 ng/µl)

Bei DNA-Konzentrationen kleiner 40 ng/µl (ausgeschlossen gelaufgereinigte PCR-Produkte, da zu wenig Lösung vorhanden) wird die Quantifizierung in einem Standard-Photometer mit 50 µl Küvetten vorgenommen. Dazu wird als Blindwert ebenso das entsprechende Lösemittel verwendet und ebenso eine Reinheitsbestimmung vorgenommen. Die Konzentration errechnet sich identisch nach obiger Formel.

3.2.5.1. Fluorimetrische Quantifizierung von DNA Standards

Die Quantifizierung von PCR-Produkten als Standard für die Kopienzahlbestimmung und der Mutantenzahlbestimmung erfolgt fluorimetrisch gegen einen Kalbsthymus-DNA Standard. Der Kalbsthymus-DNA-Standard wird zuvor nach Kap. 3.2.5 quantifiziert und auf eine Konzentration von 10 pg DNA/µl TE-Puffer eingestellt. Diese Lösung dient als Stammlösung. Von ihr ausgehend wird eine Verdünnungsreihe von 0,4 bis

2,0 pg/μl erstellt. Anschließend werden jeweils 100 μl der Kalbsthymus-DNA-Standardlösungen und der zu messenden Lösungen im Triplikat in ein *well* einer 96-*well*-Platte pipettiert. Mittels Multipette werden 100 μl SYBR-Green® (1x; V III Kap. 3.1.4) hinzugefügt. Zur Qualitätssicherung wird einem Teil der zu messenden Lösung Kalbsthymus-DNA-Standard im Verhältnis 1:1 hinzugefügt und am Ende daraus eine interne Wiederfindungsrate errechnet. Die fluorimetrische Messung im TECAN findet nach 1 min linearer Schüttelzeit bei einer Amplitude von 173,9 U/min und 4 min Wartezeit bei 535 nm (Anregungswellenlänge: 485 nm) statt. Der DNA-Gehalt wird anschließend über eine Kalibriergerade errechnet.

3.2.6. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird verwendet, um PCR-Produkte entsprechend ihrer Länge aufzutrennen. Dafür werden zunächst jeweils 2 μl SYBR-Green® und Lade-puffer zusammen mit 10 μl PCR-Produkt in einer 96-*well*-Platte gemischt. Für die DNA Leiter werden 4 μl SYBR-Green® (V II Kap. 3.1.4), 2 μl *loading dye*, 1 μl DNA-Leiter und 10 μl nf Wasser verwendet. Anschließend werden 10 μl der jeweiligen Lösung in eine Tasche des Agarose-Gels pipettiert und der angeschlossene Spannungsgeber entsprechend der jeweiligen Anwendung eingestellt (Tabelle 8).

Nach der Gelelektrophorese wird das Gel mittels Geldokumentationsgerät unter ultravioletttem Licht fotografiert. Die Belichtungszeit wird dabei automatisch vom Gerät bestimmt.

Tabelle 8: Gelelektrophorese-Bedingungen und Spannungsgeber-Einstellungen.

Anwendung	DNA-Leiter	Agarose (%)	Feldstärke (V/cm)	Laufzeit (h)
Mutanzahlbestimmung	50 bp	3	5	1
Standard-Aufreinigung	100 bp	1,5	5	1
Rho0-Statusbestimmung	MWM XV	0,4	7	2
<i>GSTM1/GSTT1</i> -Genotypisierung	1 kbp	1,5	7	1
SNP Positivkontrollen-Verifizierung	50 bp	3	5	1

3.2.7. Gelbanden- und PCR-Produkt-Aufreinigung

PCR-Produkte und Gelbanden werden mittels Gel-Extraktionskit (Kap. 3.1.2) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

3.2.8. Sanger-Sequenzierung

10 µl PCR-Produkt wird zusammen mit 4 µl des entsprechenden Primers (5 µM) von LGC Genomics (Berlin) nach Sanger sequenziert. Die Elektropherogramme werden mittels *A plasmid Editor* (ApE) ausgewertet.

Der *TaqI*-Verdau (Kap. 3.2.4.2), *TaqI*-Nachverdau (Kap. 3.2.4.5), die anschließende Gelelektrophorese (Kap. 3.2.7), Aufreinigung und Sequenzierung der Mutanten wurden hauptsächlich von Verena Titze-Schmitt und Lisa-Marie Orth im Rahmen ihrer Masterarbeiten durchgeführt. Die Sequenzierung von Mutanten wurde teilweise von Vanessa Eisert im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt.

3.2.9. Zellkultur

Zur Generierung von Rho0-Zellen, Zellen die keine mtDNA mehr enthalten, werden MCF-7-Zellen (Kap. 3.2.10.1) verwendet. Nach einer Anwachsphase von etwa 24 h beträgt die Verdoppelungszeit von MCF-7-Zellen etwa 24 h. Die Zellen werden in *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) high glucose (Kap. 3.1.4) bei 37°C, 5% CO₂ und einer mit Wasser gesättigten Atmosphäre im Brutschrank in Zellkulturflaschen (Fläche 75 cm²) kultiviert. Da mtDNA defiziente Zellen auf anaerobe Glykolyse angewiesen sind, werden dem Medium analog zu Felty et al. (2005) zusätzlich 50 µg/ml Uridin hinzugefügt. Alle Arbeiten in der Zellkultur erfolgen unter steriler Arbeitsatmosphäre.

3.2.9.1. Auftauen der Zellen

Etwa 3 Mio. Zellen werden jeweils in 1,5 ml Einfriermedium in Kryoröhrchen bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Dabei dient Zellkulturmedium unter Zusatz von 10% DMSO als Einfriermedium. Des Weiteren ist im Einfriermedium weder Penizilin/Streptomycin noch hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum enthalten.

Zum Auftauen wird zunächst das Kryoröhrchen vorsichtig im 37°C warmen Wasserbad angetaut. Anschließend werden in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen 10 ml Passagemedium vorgelegt und die angetaute Zellsuspension in das Zentrifugenröhrchen überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 272 x g wird der Überstand verworfen, das Zellpellet mit 2 ml Zellkulturmedium aufgeschlämmt, in eine Zellkulturflasche (Fläche 75 cm²) überführt und im Brutschrank bei 37°C kultiviert.

3.2.9.2. Mediumwechsel und Passage

Ein Mediumwechsel erfolgt sowohl bei der Kontrolle (Dimethylsulfoxid, DMSO), als auch bei allen Inkubationsansätzen (EtBr, Tacrin und DNP), alle 2-3 Tage. Sobald die Zellen nach 3-4 Tagen eine 70-80%ige Konfluenz erreicht haben, erfolgt eine Subkultivierung der Zellen. Dazu wird das Kulturmedium zunächst abgesaugt, anschließend wird der Zellrasen mit 20 ml 37°C warmem PBS gewaschen und mit etwa 10 ml Trypsin bedeckt. Nach 3 min Einwirkzeit wird das Trypsin unter Zugabe von 10 ml Kulturmedium inaktiviert und die Zellen vereinzelt. Die Zellzahl wird daraufhin mittels Neubauer-Kammerzählung bestimmt und anschließend eine Million Zellen in eine neue Zellkulturflasche mit 10 ml Kulturmedium-Vorlage weitergesetzt.

3.2.9.3. Inkubation mit Ethidiumbromid, Tacrin und 2,4-Dinitrophenol

Um einer eventuell vorhandenen mikrobiellen Kontamination der Inkubationssubstanzen (EtBr, Tacrin und DNP) vorzubeugen, werden eben jene zur Sterilisation in 100% DMSO gelöst. Um den Einfluss des Lösemittels der Inkubationssubstanzen (DMSO) möglichst gering zu halten, soll die Konzentration an DMSO in der Zellkulturflasche nicht größer 0,1% sein. Dazu werden Lösungen mit einer 1000fach höheren Konzentration, im Vergleich zur tatsächlichen Konzentration mit der inkubiert werden soll, präpariert. Die Zugabe von 10 µl der in 100% DMSO gelösten Inkubationssubstanz (bzw. reines DMSO als Kontrolle) erfolgt direkt in das Kulturmedium nach der Passage bzw. dem Mediumwechsel (Kap. 3.2.9.2).

3.2.9.4. Überprüfung der Stabilität der Inkubationslösungen

Die Stabilität der Inkubationslösungen wird mittels Aufnahme von Extinktionsspektren am Cary-Win UV Photometer überprüft (Tabelle 9). Dazu werden die Stammlösungen der Inkubationssubstanzen (Kap. 3.2.9.3) in 100% DMSO im Dunklen bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Zur Messung in Kunststoff-Halbmikroküvetten (EtBr und DNP) und Halbmikro-Quarzglasküvetten (Tacrin) werden vor jeder Messung frisch Verdünnungen mit DMSO hergestellt.

Tabelle 9: Einstellungen am Cary-Win UV Photometer zur Aufnahme von Extinktionsspektren zur Überprüfung der Stabilität der Inkubationslösungen zur Generierung von Rho0-Zellen.

<i>Instrument controls</i>		<i>Scan controls</i>			
<i>X-Mode</i>	<i>Start:</i> 800 nm	<i>Ave time (s)</i>	0,100	<i>Beam mode</i>	<i>Dual beam</i>
	<i>Stop:</i> 200 nm	<i>Data intervall (nm)</i>	1,000	<i>Baseline correction</i>	<i>Off</i>
<i>Y-Mode</i>	<i>Y-Min:</i> -0,05	<i>Scan rate (nm/min)</i>	Medium	<i>Cycle mode</i>	<i>Off</i>
	<i>Y-Max:</i> 2,00		600,000	<i>Accessory</i>	<i>Cell changer</i>
				<i>Cell</i>	1

3.2.9.5. Mikroskopie der Zellen

Zur Dokumentation der Morphologie der Zellen werden vor jeder Subkultivierung Fotos der Zellen am Lichtmikroskop gemacht (Tabelle 10). Dabei wird ein Übersichtsbild mit dem 10er-Objektiv und ein Bild für Detailaufnahmen mit dem 40er-Objektiv aufgenommen. Die Inkubationsansätze mit 25 ng/ml und 50 ng/ml EtBr werden zusätzlich unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert.

Tabelle 10: Einstellungen am Phasenkontrastmikroskop zur Dokumentation der mit DMSO (Kontrolle), EtBr, Tacrin und DNP inkubierten MCF-7-Zellen.

Licht	Objektiv	Phase	Belichtungszeit	Hintergrund
Durchlicht	10x	Hellfeld	20 ms	<i>Auto white</i>
Durchlicht	40x	Phase 2	40 ms	<i>Auto white</i>
Fluoreszenzanregung	40x	Phase 2	6 s	

3.2.9.6. Zellzyklusbestimmung

Bei der Passage mit Zellzahlbestimmung der Inkubationsansätze und der DMSO-Kontrolle (Kap. 3.2.9.2) werden der gründlich vereinzelter Zellsuspension 1,5 Millionen Zellen entnommen, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 272 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, und das Zellpellet mit 450 µl Lysepuffer resuspendiert. Nach fünfminütiger Lyse der Zellwände bei Raumtemperatur erfolgt die Färbung der Zellkerne durch Zugabe von 2,25 ml CyStain-Lösung. Darin enthalten ist der Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamin-2-Phenylindol (DAPI). Nach 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln wird die Lösung über einen 50 µm-Filter in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend werden 800 µl der filtrierten Lösung zur Analyse mittels Durchflusszytometer eingesetzt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Einstellungen am Durchflusszytometer zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung der Inkubationsansätze und der DMSO-Kontrolle.

Detektor	FL4
Filter	<i>Band Pass Filter 455 C</i>
Spiegel	<i>Long Pass Dichroic Mirror 560 A</i>
UV-Anregungswellenlänge	365 nm
Emissionswellenlänge	455 nm
Verstärkungsmodus	Linear
<i>Gain</i>	485
Durchflussgeschwindigkeit	3,8 µl/s

3.2.9.7. Bestimmung der *Plating Efficiency*

Zur Bestimmung der *Plating Efficiency* (PE), ein Maß für die Fähigkeit der Zellen aus Einzelzellen neue Kolonien zu bilden, werden der gründlich vereinzelt Zellsuspension der Lösemittelkontrolle nach der Passage und Zellzählung (Kap. 3.2.9.2) 1750 Zellen entnommen, in ein Becherglas mit 35 ml Kulturmedium gegeben und erneut gründlich durchmischt. Jeweils 10 ml der Lösung (500 Zellen) werden in drei Petrischalen gegeben und 14 Tage bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Anschließend wird das Medium abgegossen, der Zellrasen mit 0,9%iger NaCl Lösung gewaschen und 15 min mit 99%igem Ethanol überdeckt und dadurch fixiert. Die Färbung der Zellen erfolgt durch eine 30-minütige Inkubation mittels Überschichtung mit einer methanolischen Methylenblau-Lösung. Nach Abgießen der Färbelösung und Waschen unter fließendem Wasser werden die Kolonien gezählt. Die PE errechnet sich nach folgender Formel:

$$PE(\%) = \frac{\text{Anzahl Kolonien}}{\text{Anzahl ausgestreuter Zellen}} * 100$$

3.2.9.8. Klonierung von Einzelzellen

Zur Klonierung von Einzelzellen in einer 96-well-Platte werden der Zellsuspension bei der Passage mit Zellzahlbestimmung eine Million Zellen entnommen und in Kulturmedium auf 1,27 Zellen/ml (0,25 Zellen/200 µl) verdünnt. Die Zellen werden dabei bei allen Verdünnungsschritten durch Auf- und Abziehen der Pipette gründlich vereinzelt. Anschließend werden mittels Multipipette jeweils 200 µl in alle Löcher einer 96-well-Platte gegeben und fünf bis sieben Tage im Brutschrank kultiviert. Danach werden die

Zellen analog zur Passage (Kap. 3.2.9.2) nach Absaugen des Mediums mit 200 µl PBS-Puffer gewaschen, 3 min mit 25 µl Trypsin vom Plattenboden gelöst und mit 275 µl Medium vereinzelt. Das Wachstum der Zellen wird anschließend in regelmäßigen Abständen unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Sobald etwa 75% des Bodens eines Platten-*well*s bewachsen sind, werden die Zellen vereinzelt und zur Selektion (Kap. 3.2.9.9) weitergesetzt.

3.2.9.9. Selektion von Rho0-Zellen

Zur Selektion von Rho0-Zellen werden zunächst die Einzelzellklone (Kap. 3.2.9.8), wie in Kap. 3.2.9.2 beschrieben, abtrypsiniert, vereinzelt und jeweils 23 µl der Zellsuspension in zwei verschiedene 96-*well*-Platten mit einer 200 µl Kulturmediumsvorlage überführt. Nach einer Anwachsphase von 48 h im Brutschrank wird das Medium abgesaugt und mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend werden einem *well* 200 µl Kulturmedium und einem *well* mit dem identischen Klon 200 µl Selektionsmedium hinzugegeben. Das Selektionsmedium setzt sich aus den gleichen Bestandteilen wie das Kulturmedium zusammen (Kap. 3.2.9), nur dass es dialysiertes fetales Kälberserum enthält und kein Natriumpyruvat. Rho0-Zellen sind ohne Pyruvat nicht lebensfähig, da sie auf anaerobe Glykolyse angewiesen sind. Unter dem Lichtmikroskop wird über 14 Tage hinweg kontrolliert, ob die Klone in Selektionsmedium anwachsen. Ist dies nicht der Fall, werden die Zellen des betreffenden gespiegelten Klons in Kulturmedium zunächst in einer 8,7 cm² Petrischale und anschließend in einer 75 cm² Zellkulturflasche kultiviert, bis etwa 10 Mio. Zellen vorhanden sind. Daraufhin wird die Gesamt-DNA nach Kap. 3.2.3 isoliert und zur Nachweis-PCR eingesetzt (Kap. 3.2.9.10).

Die Arbeiten in der Zellkultur (Kap. 3.2.9.1-3.2.9.9) sowie die Literaturrecherche zu Rho0-Zellen wurde von Silvia Frey im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt.

3.2.9.10. Überprüfung des Rho0-Status mittels PCR mit anschließender Gelelektrophorese

Der Rho0-Status wird nach Tengan und Moraes (1996) mittels PCR mit anschließender Gelelektrophorese mit veränderter Denaturierungszeit (30s) *Annealing*-Temperatur (65°C) und veränderter Elongationszeit (7 min) durchgeführt. Des Weiteren wird Phusion® High-Fidelity Polymerase verwendet. Das Primer-Paar (*forward*: 5'-CGATCCGTCCCTAACAAACT-3'; *reverse*: 5'-CAGGAGGATAATGCCGATGT-3)

amplifiziert dabei ein 16,2 kbp langes Produkt, welches beinahe dem kompletten mitochondrialen Genom (16,6 kbp) entspricht. Anschließend wird eine Gelelektrophorese nach Kap. 3.2.6 durchgeführt.

3.2.10. Polymorphismen

Als Polymorphismus bezeichnet man das Auftreten einer Sequenzvariation im Genom, von der mindestens 1% einer entsprechenden Population betroffen ist. Dazu gehören unter anderem sogenannte SNPs, bei denen der Austausch einer Base zu einer Veränderung der Erbinformation führt, und CNPs, bei denen durch Insertion oder Deletion Teile der Erbinformation gar nicht oder in größerer Zahl vorhanden sind. SNPs werden mittels allelischer Diskriminierung und RFLP-PCR und CNPs mittels Multiplex-PCR ermittelt. Als Templat wird dabei nach Kap. 3.2.3 isolierte nDNA eingesetzt.

3.2.10.1. Verwendete Zelllinien als Positivkontrolle

Gesamt-DNA aus verschiedenen humanen Zelllinien wurde bereits am Lehrstuhl isoliert und in TE-Puffer im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Die Konzentration wird photometrisch bestimmt (Kap. 3.2.5) und mit TE-Puffer auf 50 ng/µl eingestellt. Dabei sind im Arbeitskreis folgende humane Zelllinien vorhanden:

- i. MCF-7-Zellen; Brust-Adenokarzinom-Zellen; freundlicherweise von Ana Soto (Tufts University, Boston, MA, USA) zur Verfügung gestellt
- ii. Ishikawa-Zellen; endometriale Adenokarzinom-Zellen, freundlicherweise von Ken Korch (National Institute of Environmental Health Sciences, NC, USA) zur Verfügung gestellt
- iii. HeLaS3-Zellen; cervikale Adenokarzinom-Zellen
- iv. MDA-Zellen; Brust-Adenokarzinom-Zellen; bei DMSZ, der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig) erworben
- v. HT-29-Zellen; kolorektrale Adenokarzinom-Zellen; beim DMSZ erworben
- vi. HCV (human chorion villi)-Zellen; im Arbeitskreis selbst isoliert
- vii. AG01522C-Zellen; Fibroblasten

3.2.10.2. *GSTT1*- und *GSTM1*- copy number polymorphism-Bestimmung

Die *GSTT1*- und *GSTM1*-CNP-Bestimmung wird analog zu Buchard et al. (2007) durchgeführt. Abweichend wird, da mit OneTaq®-DNA-Polymerase gearbeitet wird, die Endkonzentration der *GSTT1*-Deletionsprimer (Tabelle 12) von 0,04 µM auf 0,3 µM und die Elongationszeit von 90 s auf 5 min erhöht.

Tabelle 12: Primer der *GSTT1*- und *GSTM1*-CNP Bestimmung nach Buchard et al. (2007).

Bezeichnung des Primers	Sequenz in 5'→3' Richtung
<i>GSTT1</i> Gen <i>forward</i>	TCTTTTGCATAGAGACCATGACCAG
<i>GSTT1</i> Gen <i>reverse</i>	CTCCCTACTCCAGTAACTCCCGACT
<i>GSTT1</i> Deletion <i>forward</i>	GAAGCCCAAGAATGGGTGTGTGTG
<i>GSTT1</i> Deletion <i>reverse</i>	TGTCCCATGGCCTCCAACATT
<i>GSTM1</i> Gen <i>forward</i>	CAAATTCTGGATTGTAGCAGATCATGC
<i>GSTM1</i> Gen <i>reverse</i>	CACAGCTCCTGATTATGACAGAAGCC
<i>GSTM1</i> Deletion <i>forward</i>	AAGACAGAGGAAGGGTGCATTTGATA
<i>GSTM1</i> Deletion <i>reverse</i>	ACAGACATTCATTCCCAAAGCGACCA

3.2.10.3. Allelische Diskriminierung

Die SNPs *COMT* Val158Met (rs4680), *NQO1* Pro187Ser (rs1800566), *CYP1B1* Leu432Val (rs1056836), *GSTP1* Ile105Val (rs1695) und *HSB17B1* C150A (rs676387) werden mittels kommerziell erhältlichem allelische Diskriminierungs-Multiplex-Assay (Kap. 3.1.3) ermittelt. Das Assay enthält einen Primer-Satz (*forward* und *reverse*) und zwei TaqMan® Sonden. Eine Sonde ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff VIC, die andere mit FAM ausgestattet. Jede der beiden Sonden ist jeweils zu einem der beiden Allele komplementär und erzeugt dementsprechend nur ein Fluoreszenzsignal bei Vorhandensein des jeweiligen Allels.

1 µl einer auf 50 ng/µl eingestellten nDNA-Lösung werden zusammen mit 0,25 µl Assay, 2,5 µl TaqMan®GTXpress™ Mastermix und 1,25 µl nf Wasser in einer 364-well-Platte für die Reaktion eingesetzt. Dabei wird vor der Bestimmung ein „pre-read“ der Ursprungs-Fluoreszenzintensität am Kontrollprogramm des *Cyclers* durchgeführt. Nach der PCR (Tabelle 13) wird die Fluoreszenzintensität der betreffenden *wells* erneut gemessen und die Signale manuell über mitgeführte Positivkontrollen dem Genotyp zugeordnet.

Tabelle 13: Temperaturprogramm für die Allelische Diskriminierung mittels Multiplex-TaqMan®-Sonden-basierter *realtime*-PCR zur Ermittlung von SNPs.

Zyklen	Schritt	Temperatur (°C)	Zeit
1	Denaturierung	95	30 s
	Denaturierung	95	15 s
40	<i>Annealing</i> /Elongation	58	1 min

Die CNP- und SNP-Bestimmungen wurden teilweise von Sarah Hauenschild im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit durchgeführt.

3.2.10.4. Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus-PCR

Die Verifikation der Positivkontrollen erfolgt mittels RFLP-PCR. Die *GSTP1*-Bestimmung erfolgt analog zu Wilson et al. (2000), die *NQO1*-Bestimmung wird nach Sameer et al. (2010) und die *CYP1B1*-Bestimmung nach Zimarina et al. (2004) durchgeführt (Tabelle 14). Dabei wird abweichend mit *Taq*-Polymerase gearbeitet und dem Restriktionsverdau zusätzlich BSA hinzugefügt.

Tabelle 14: Primer für die RFLP-PCR zur Verifizierung der Positivkontrollen für die Allelische Diskriminierung.

Primerbezeichnung	Sequenz in 5'→3' Richtung
<i>GSTP1</i> Wilson <i>forward</i>	ACCCAGGGCTCTATGGGAA
<i>GSTP1</i> Wilson <i>reverse</i>	TGAGGGCACAAGAAGCCCCT
<i>NQO1</i> Sameer <i>forward</i>	TCCTCAGAGTGGCATTCTGA
<i>NQO1</i> Sameer <i>reverse</i>	TCTCCTCATCCTGTACCTCT
<i>CYP1B1</i> Zamarina <i>forward</i>	CCAGCCCAACCTGCCCTATG
<i>CYP1B1</i> Zamarina <i>reverse</i>	CCAGGATGGAGATGAAGA

3.2.10.5. Berechnung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht besagt, dass in einer großen Population, die Paarung ohne Selektion, Mutationen und Migration, unterläuft, die Allel- und Genotyp-Frequenz von Generation zu Generation konstant bleiben und dass diese durch eine einfache Abhängigkeit beschrieben werden kann (Guo und Thompson, 1992). Es wird herangezogen, um z.B. Fehler bei der Genotypisierung auszuschließen und um zu verifizieren, dass eine homogene Population vorliegt (zusammengefasst in Minelli et al., 2008). Das Gleichgewicht wird unter der Bedingung, dass nur zwei Allele mit einer jeweiligen Frequenz q und p und der folglich Abhängigkeit $q = 1 - p$ zueinander vorkommen, mit folgender Formel beschrieben:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Durch Umstellen der Gleichgewichts-Formel lässt sich über die analytisch ermittelte Genotyp-Verteilung die Allel-Frequenz berechnen mit

$$q = p^2 + 0,5 * 2pq$$

und davon ausgehend:

$$q = 1 - p$$

Anschließend werden daraus die Genotyp-Häufigkeiten (p^2 ; $2pq$ und q^2) errechnet und mit der Gesamtprobenanzahl multipliziert. Per χ^2 -Test wird die Anzahl der beobachteten mit den erwarteten Individuen verglichen:

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{beobachtet} - \text{erwartet})^2}{\text{erwartet}}$$

Der χ^2 -Grenzwert liegt in diesem Fall (zwei Freiheitsgrade, Signifikanzniveau 0,05) bei 5,991. Wenn der berechnete Wert größer als der Grenzwert ist, wird die Nullhypothese abgelehnt und die ermittelte Genotyp-Frequenz liegt folglich nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Die Positivkontrollenverifizierung (Kap. 3.2.10.4) sowie die Berechnungen zum Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurden von Sarah Hauenschild im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.

3.2.11. Statistik

Die Normalverteilung wird anhand eines Boxplots der entsprechenden Daten beurteilt. Beim Vergleich von zwei Stichproben wird bei gepaarten Stichproben und gleichzeitig normalverteilten Daten ein gepaarter t-Test und bei nicht-normalverteilten Daten ein Wilcoxon-Vorzeichenrangtest durchgeführt. Bei ungepaarten Stichproben wird bei nicht-normalverteilten Daten ein Mann-Whitney-U-Test angewendet. Bei ungepaarten, normalverteilten Daten wird bei varianzenhomogenen ein t-Test und bei nicht-varianzenhomogenen Daten ein t-Test mit Welch-Korrektur durchgeführt. Bei $n < 30$ wurde ein t-Test verwendet, da dieser bei einer kleinen Anzahl an Beobachtungen robust gegenüber nicht-normalverteilten Daten ist.

Um die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer zufälligen Signifikanz durch multiple Vergleiche zu minimieren, werden bei multiplen Vergleichen zweier Proben innerhalb einer Fragestellung die einzelnen p-Werte mittels Bonferoni-Holm-Korrektur adjustiert, sofern eine Signifikanz vorliegt ($p < 0,05$). Sofern keine Signifikanz vorliegt, wird nicht adjustiert. Adjustierte p-Werte sind im Fließtext bzw. den Abbildungen als solche gekennzeichnet.

Beim Vergleich von mehr als zwei Proben wird bei normalverteilten Daten die ANOVA und bei nicht-normalverteilten Daten der Kruskal-Wallis Test angewendet.

SMF errechnen sich aus einer gewissen Mutanten-Häufigkeit innerhalb einer definierten Kopienzahl und müssten insofern mittels Signifikanztestung auf der Grundlage von Kontingenztafeln (z.B. Fisher's-*exact*-Test) statistisch beurteilt werden. Jedoch wurde in anderen Studien die humane mtDNA mittels RMCA untersucht (Greaves et al., 2009, Ericson et al., 2012, Biniiecka et al., 2011 und Harty et al., 2012) die statistische Auswertung mittels parametrischer/nicht-parametrischer Verfahren vorgenommen. Daher wird, um eine gewisse Vergleichbarkeit in der statistischen Beurteilung zu gewährleisten, ebenfalls bei SMF betreffenden Beurteilungen nicht mit Signifikanztestungen auf Basis von Kontingenztafeln gearbeitet.

3.2.12. Metabolische Netzwerkmodellierung

Die metabolischen Netzwerkberechnungen wurden von Karin Tschiggfrei im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit unter Betreuung von Dr. Katja Schmalbach und Prof. Dr. Thomas Dandekar am Lehrstuhl für Bioinformatik Würzburg mithilfe von RStudio (Version 0.97.551), YANAsquare (Version 0.9.9) und METATOOL (Version 4.9.1) durchgeführt (beschrieben in Cecil et al., 2011).

3.2.13. Multiple lineare Regression und Hauptkomponentenanalyse

Die R-Skripte zur vorwärtsselektierenden multiplen linearen Regressionsanalyse und Hauptkomponentenanalyse wurden mit Hilfe von Helene König (Dipl. Statistikerin) und Claudia Köllmann (Dipl. Statistikerin) kompiliert. Die Skripte sind auf der beiliegenden Daten-CD zu finden.

Die multiplen linearen Regressionsmodelle zum Thema Transkriptspiegel als Marker für oxidativen Stress (GCLC, NQO1 NFE2L2) sowie die zugehörige Literatur- und Datenbankrecherche wurden größtenteils von Fabian Sandgruber im Rahmen seiner Masterarbeit errechnet und durchgeführt.

3.2.14. Genexpression, *lobule type*, Estrogen-, Cholesterol- und Isoflavongewebsspiegelbestimmung

Relative Genexpressionslevel verschiedener Enzyme (Tabelle 15) wurden im Arbeitskreis Lehmann von René Hauptstein und Dr. Katja Schmalbach in Fett und in Drüsen-gewebe mittels TaqMan® *low density array* (TLDA) und kommerziell erhältlicher

TaqMan®-Assays bestimmt. Die anfängliche Kopienzahl wurde dabei unter der Annahme, dass am jeweiligen *cycle threshold* (ct) $1 \cdot 10^{12}$ Kopien vorhanden sind und die Effizienz der Reaktion 100% bzw. 2,0 beträgt, mit der folgenden Formel errechnet:

$$n_0 = \frac{\text{Kopienzahl}^{ct}}{\text{Effizienz}^{ct}} = \frac{1 \cdot 10^{12}}{2^{ct}}$$

Anschließend wurde n_0 in Verhältnis mit n_0 des *housekeeping*-Gens Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) gesetzt.

Tabelle 15: Übersicht über die am Arbeitskreis von René Hauptstein und Katja Schmalbach bestimmten mRNA-Spiegel mit der jeweils verwendeten Methode (Kopfzeile). AHR: Aryl-Hydrogen-Rezeptor; AREG: Amphiregulin, ARNT: Aryl-hydrogen-Rezeptor *nuclear translocator*, BAX: BCL2-associated X Protein, BMF: *proapoptotic BH3-only* Protein, CCND1: Cyclin D1, CDKN: Cyclinabhängiger Kinase Inhibitor, COMT: Katechol-O-Methyltransferase, CYP: Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase, ESR: Estrogen-Rezeptor, GATA3: GATA *binding* Protein 3, GCLC: γ -Glutamyl-Cystein Ligase, GST: Glutathion-S-Transferase, GUSB: Glucuronidase β , HSD: Hydroxysteroid-Dehydrogenase, MKI67: Proliferations-assoziiertes Ki-67-Antigen, NFE2L2: *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*, NQO1: NADPH-Chinon Oxidoreduktase, NR11: *nuclear receptor-sub family 1-group 1-member*, PGR: Progesteron-Rezeptor, SNF: 14-3-3 σ , STS: Steroidsulfatase, SULT: Sulfotransferase, TBP: TATA-Box *binding* Protein, TFF1: *trefoil factor 1*, TGFB1: *transforming growth factor* β ; TP53: Tumorsuppressor Protein 53, UGT: Uridin 5'-Diphospho-Glucuronosyltransferase, WNT: *wingless-related MMTV integration site*.

TaqMan® <i>low density array</i>			TaqMan®-Assay
AHR	GATA3	SULT1A2	GSTM1
AREG	GCLC	SULT1E1	GSTP1
ARNT	GSTT1	SULT2A1	NQO1
BAX	GUSB	SULT1A3/4	UGT1A1
BMF	HSD17B1	TBP	UGT1A6
CCND1	HSD17B2	TFF1	UGT1A7
CDKN1A	MKI67	TGFB1	UGT1A9
CDKN1B	NFE2L2	TP53	UGT1A10
COMT	NR112	UGT1A3/4	
CYP1A1	NR113	UGT1A8	
CYP19A1	PGR	UGT2B7	
CYP1B1	SFN	WNT4	
ESR1	STS	WNT5A	
ESR2	SULT1A1		

Der *lobule type* wurde ebenfalls von René Hauptstein und Dr. Katja Schmalbach im Arbeitskreis Lehmann histologisch bestimmt.

E2-, E1- und 2/4-MeO-E1/2-Gewebespiegel wurden im Arbeitskreis Lehmann mittels GC-MS/MS von Daniela Pemp und E1-Sulfat (E1-S)- und E1-Glucuronid (E1-G)-Gewebespiegel mittels UHPLC-MS/MS von Dr. Carolin Kleider quantifiziert.

Der prozentuale Fett-Anteil des Drüsen- und Fettgewebes wurde von Daniela Pemp im Arbeitskreis Lehmann nach Chloroform-Extraktion gravimetrisch bestimmt.

Cholesterol, 7 α - und 7 β -HO-Cholesterol, α - und β -Epoxy-Cholesterol und 7-Keto-Cholesterol wurden von Maryam Mahdiani im Arbeitskreis Lehmann mittels GC-FID und GC-MS/MS quantifiziert.

Isoflavonspiegel (Daidzein- und Genistein-Agylcons, deren Konjugate und mikrobielle Metabolite) im Drüsengewebe wurden von Sebastian Soukup am Max Rubner Institut Karlsruhe mittels UHPLC-MS/MS nach Soukup et al. (2014) bestimmt. Messwerten unterhalb des *limit of detection* (LOD) wurde dabei ein Zahlenwert von 0,0, Messwerten zwischen dem LOD und dem *limit of quantification* (LOQ) ein Zahlenwert von 0,5 und Messwerten über dem LOQ ein Zahlenwert von 1 zugeordnet.

Eine Tabelle mit allen Messdaten befindet sich auf der beigelegten Daten-CD.

4. Ergebnisse und Diskussion

Um Einflussfaktoren auf DNA-Schäden in weiblichem Brustgewebe zu identifizieren, sollten zunächst humane Brustgewebeproben akquiriert werden (Kap. 4.1). Anschließend sollte der Umfang an genotoxischem Stress auf mitochondrialer Ebene ermittelt werden. Dafür sollte der RMCA als genotypselektive Methode zur Bestimmung der mitochondrialen SMF in humanem Brustgewebe etabliert (Kap. 4.2), die mitochondriale SMF in DNA aus allen geeigneten bisher am Lehrstuhl akquirierten Brustgewebeproben bestimmt (Kap. 4.2.4) und anschließend Einflussfaktoren auf die mitochondriale SMF mittels multipler linearer Regression identifiziert werden (Kap. 4.2.5). Des Weiteren sollten Einflussfaktoren auf bereits am Lehrstuhl mittels eines auf Brustdrüsen-gewebs-Transkript- und Estrogenspiegel der akquirierten Gewebeproben basierendem metabolischen Netzwerk-Modells errechnete DNA-Adduktflüsse mittels multipler linearer Regression ermittelt werden (Kap. 4.3). Oxidativer Stress kann ebenfalls zu DNA-Addukten führen, wird allerdings nicht durch das verwendete metabolische Netzwerk abgebildet. Daher sollten mittels multipler linearer Regression Einflussfaktoren auf bereits am Lehrstuhl bestimmte Transkriptspiegel in Brustgewebe der akquirierten Probandinnen von Genen, die bei oxidativem Stress exprimiert werden, ermittelt werden (Kap. 4.4).

4.1. Charakterisierung der Studienkohorte

Insgesamt wurden am Lehrstuhl 50 Brustgewebeproben von gesunden Frauen, die sich aus kosmetischen Gründen einer Mamma-Reduktion unterzogen hatten, akquiriert und optisch in Fett- und Drüsen-gewebe separiert (Kap. 3.2.2). In einem Fragebogen wurde das Alter, der BMI, der Alkoholkonsum, der Zigarettenkonsum, die Einnahme von estrogenaktiven Medikamenten und die Anzahl der bisherigen Schwangerschaften abgefragt. Das Alter der Probandinnen reichte von 18 bis 66 Jahren (Median: 44). Ein Großteil war zwischen 40 und 59 Jahren alt (Tabelle 16). In einer Studie mit 27.000 deutschen Frauen war keine postmenopausale Frau jünger als 45 und keine prämenopausale Frau älter als 53 Jahre (Tsilidis et al., 2011). Daher wurde der menopausale Status altersabhängig in ≤ 45 Jahre prä (54% der Probandinnen), ≥ 53 Jahre post (20% der Probandinnen) und die Spannweite dazwischen in peri (27% der Probandinnen) eingeteilt. Der Alkoholkonsum der Probandinnen reichte von null bis 233 g Ethanol/Woche (Median 10 g Ethanol/Woche); darunter waren 16 Probandin-

nen (32%) die angaben, keinen Alkohol zu konsumieren (Tabelle 16). 28% der Probandinnen waren Raucher mit einem Zigarettenkonsum von 2-25 Zigaretten pro Tag. Insgesamt acht Probandinnen (16%) nahmen an einer Intervention mit Isoflavon-Supplementierung (Kap. 3.2.1) teil und acht weitere nahmen estrogenaktive Medikamente (Tabelle 16). Der BMI der Probandinnen lag zwischen 22 und 46 (Median: 26). Nach WHO BMI-Einteilung hatten dabei 34% Normalgewicht, 52% Präadipositas und 14% Adipositas. 58% der Probandinnen waren nullipar und 38% par (Tabelle 16).

Tabelle 16: Verteilung der 50 akquirierten Brustgewebeproben hinsichtlich Alter, Menopausalstatus, Alkoholkonsum, Rauchen, Einnahme von estrogenaktiven Medikamenten, BMI und Schwangerschaften. ERD: *E2 releasing drug*, k.A.: keine Angabe.

	Kategorie	Probandinnen-Anzahl (-Anteil)
Alter	18-29	10 (20%)
	30-39	9 (18%)
	40-49	14 (28%)
	50-59	14 (28%)
	>60	3 (6%)
Menopausalstatus	prä	27 (54%)
	peri	13 (26%)
	post	10 (20%)
Alkoholkonsum	0 g/Woche	16 (32%)
	1-20 g/Woche	19 (38%)
	>20 g/Woche	11 (22%)
	k.A.	4 (8%)
Rauchen	ja	14 (28%)
	nein	36 (72%)
Einnahme von estrogenaktiven Medikamenten	EE	6 (12%)
	ERD	2 (4%)
	nein	40 (80%)
	k.A.	2 (4%)
BMI	Normalgewicht	17 (34%)
	Präadipositas	26 (52%)
	Adipositas	7 (14%)
Schwangerschaften	par	29 (58%)
	nullipar	19 (38%)
	k.A.	2 (4%)

Ein Faktor der, in Zusammenhang mit Schwangerschaften steht, ist der *lobule type* (Kap. 1.2.2), welcher bereits bei 47 Drüsengewebsproben am Lehrstuhl bestimmt wurde. Des Weiteren wurden am Lehrstuhl bereits Estrogen- und Estrogenmetabolit-spiegel, Transkriptspiegel von Genen die für am Estrogen-Metabolismus beteiligte Enzyme, Transkriptionsfaktoren und Rezeptoren kodieren im Drüsen- und Fettgewebe der Probandinnen bestimmt (Kap. 3.2.14). Oxysterolspiegel wurden am Lehrstuhl im Fettgewebe und Isoflavonspiegel im Drüsengewebe der Probandinnen am Max-Rubner-Institut in Karlsruhe bestimmt (Kap. 3.2.14).

4.2. Random Mutation Capture Assay

Mutationen sind die Manifestierung von genotoxischem Stress. Da bei gesundem humanem Gewebe in mtDNA eine äußerst niedrige SMF erwartet wurde ($8 \cdot 10^{-7} - 4 \cdot 10^{-4} \text{bp}^{-1}$, Kap. 1.1: Tabelle 1), war es notwendig mit einer Methode zu arbeiten, die sensitiv genug ist, um jene niedrige SMF abzubilden. Der RMCA stellte in dieser Hinsicht eine geeignete Methode dar (Kap. 1.1) und wurde deshalb zur mitochondrialen SMF-Bestimmung in weiblichem humanem Brustgewebe verwendet, um anschließend Einflussfaktoren auf die SMF zu ermitteln. Dabei besteht der mitochondriale RMCA, nach erfolgreicher DNA-Isolation und *TaqI*-Verdau, im Wesentlichen aus zwei Schritten: der Kopienzahlbestimmung und der Mutantenzahlbestimmung mittels PCR (Kap. 1.1). Eine möglichst hohe Sensitivität der beiden Schritte ist dabei essentiell, um sowohl niedrige Kopienzahlen und einzelne Mutanten, als auch um akkurat Unterschiede innerhalb verschiedener Gewebe und Individuen erfassen zu können. Deshalb sollte zunächst, nach der Auswahl einer Zielsequenz mit entsprechender Primer-Platzierung (Kap. 4.2.1), die Kopienzahlbestimmungs-PCR für eine möglichst hohe Sensitivität optimiert (Kap. 4.2.2), die Mutantenzahlbestimmungs-PCR auf ihre Eignung zur Amplifikation einer einzelnen Kopie für die Detektion von einzelnen Mutanten getestet (Kap. 4.2.3), und anschließend die mitochondriale SMF der akquirierten Gewebespenden bestimmt (Kap. 4.2.4) und Einflussfaktoren darauf mittels multipler linearer Regressionsanalyse identifiziert werden (Kap. 4.2.5).

4.2.1. Primerdesign

Der RMCA besteht, nach erfolgreicher DNA-Isolierung und *TaqI*-Verdau, im Wesentlichen aus zwei PCRs für die jeweils spezifische Primer benötigt werden: Eine PCR zur

Ermittlung der Gesamtanzahl der eingesetzten mtDNA-Kopien (Kopienzahlbestimmungs-PCR) mit einem Primersatz, der abseits der *TaqI*-Schnittstelle platziert wurde (Kopienzahlprimer) und einer PCR zur Ermittlung der Mutantenzahl (Mutations-PCR) mit Mutantenprimern, welche die *TaqI*-Schnittstelle flankieren (Kap. 1.1: Abbildung 1). Zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit war der RMCA bereits erfolgreich auf mtDNA aus humaner Synovialmembran (Biniecka et al., 2011) und mtDNA aus humanen Adenokarzinom-Zellen mit Kopienzahlprimern innerhalb des Gens, das für tRNA^{Phe} kodiert und mit Mutationsprimern innerhalb der 12S rRNA (Gorman et al., 2010) und auf mtDNA aus Kolon-Mukosa Biopsien mit Kopienzahlprimern innerhalb des *ND5*- und Mutationsprimer innerhalb des *CO*-Gens (Greaves et al., 2009; *ND5*-Primersequenzen unveröffentlicht) angewendet worden. Der NCBI-Blast der bereits publizierten Primersätze von Gorman et al. (2010), Greaves et al. (2009) und Biniecka et al. (2011) zeigte jedoch, dass je nach Primersatz, ein bis fünf Nebenprodukte mit nDNA möglich sind und diese Primersätze somit potentiell unspezifisch für mtDNA sind. Daher wurden neue Primersätze entwickelt. Nach Ausschluss von mtDNA-Bereichen, auf denen NUMTs vorhanden sind (Kap. 1.1), liegen im übrigen mitochondrialen Genom fünf *TaqI*-Schnittstellen. Drei im Bereich der 12S und 16S rRNA und zwei im Bereich der für CytB kodiert. Aufgrund vorangegangener schlechter Erfahrungen im Arbeitskreis mit rRNA-Primer-/TaqMan®-Sondenplatzierungen wurde der Bereich, der für CytB kodiert, als Zielsequenz der Primerplatzierung ausgewählt. Vermulst et al. (2008) bestimmten die Kopienzahl mittels schrittweiser Endpunkt-Verdünnung, welche nur die Quantifizierung einer Probe pro PCR-Ansatz ermöglicht. Um einen höheren Probendurchsatz zu gewährleisten, sollte die Kopienzahlbestimmung mittels TaqMan®-Sonden-basierter *realtime*-PCR mit externer Kalibrierung durchgeführt werden, bei der mehrere Proben gleichzeitig quantifiziert werden können. Generell sollten beim Primer-Design Sekundärstrukturen, Polypurin- und Pyrimidinbereiche vermieden werden (Mitsubishi, 1996). Um zum einen eine angemessene *Annealing*-Temperatur zu ermöglichen und zum anderen das Risiko einer unspezifischen Primerbindung zu minimieren, sollten die Primer der qualitativen Mutantenzahlbestimmung zwischen 18 und 25 bp lang sein (Theophilus und Rapley, 2002). Die errechnete Schmelztemperatur des *forward*- und des *reverse*-Primers sollte möglichst nahe aneinander liegen, da am PCR-Cycler nur eine Temperatur während des *Annealing*-Schrittes eingestellt werden kann. Für die quantitative TaqMan®-Sonden basierte Kopienzahlbestimmung soll-

ten die Primer um eine passende Primer/Sonden-Kombination zu ermöglichen dagegen 9-40 bp lang sein. Die Kopienzahlprimer-Produktlänge sollte innerhalb der üblichen TaqMan®-Sonden basierten *realtime*-PCR Amplikon-Länge von 60 bis 150 bp (Dorak, 2006) liegen. Des Weiteren sollte die TaqMan®-Sonde möglichst nahe am zugehörigen *forward*-Primer liegen ohne mit dessen Sequenz zu überlappen (Dorak, 2006) und 13-25 bp lang sein. Um die Primer-/TaqMan®-Sonden Templatbindung zu stabilisieren, sollte die *Annealing*-Temperatur der TaqMan®-Sonde 5-10°C höher als die der Primer sein (Dietmaier et al., 2013). Die TaqMan®-Sonde sollte kein Guanosin am 5'-Ende enthalten, da dies die Fluoreszenzintensität um 25% reduziert (Crockett und Wittwer, 2001). Zusätzlich sollten sowohl die Kopienzahl-, als auch die Mutantenzahlprimer möglichst wenig unspezifische Nebenprodukte mit nDNA ergeben und somit spezifisch an mtDNA binden.

Unter Einhaltung aller Kriterien wurden mittels des Open-Source-Programms Primer3Plus Primer innerhalb der Zielsequenz (*CytB*) designt (Abbildung 7).

```

5'ATGACCCCAATACGCAAACTAACCCCTAATAAAATTAATTAACCACTCATTTCATCGA
CCTCCCACCCCATCCAACATCTCCGCATGATGAACTTCGGCTCACTCCTTGGCGCCT
GCCTGATCCTCCAAATCACCACAGGACTATTCCTAGCCATGCACTACTCACCAGACGCC
TCAACCGCCTTTTCATCAATCGCCACATCACTCGAGACGTAAATTATGGCTGAATCATC
CGCTACCTTCACGCCAATGGCGCCTCAATATTCTTTATCTGCCTCTTCCTACACATCGGG
CGAGGCCTATATTACGGATCATTCTCTACTCAGAAACCTGAAACATCGGCATTATCCTC
CTGCCTTGCAACTATAGCAACAGCCTTCATAGGCTATGTCCTCCCGTGAGGCCAAATATC
ATTCTGAGGGGCCACAGTAATTACAACTTACTATCCGCCATCCCATAACATTGGGACAG
ACCTAGTTCAATGAATCTGAGGAGGCTACTCAGTAGACAGTCCCACCCTCACACGATTC
TTTACCTTTCACTTCATCTTGCCCTTCATTATTGCAGCCCTAGCAACACTCCACCTCCTAT
TCTTGACGAAACGGGATCAAACAACCCCTAGGAATCACCTCCCATTCCGATAAAATC
ACCTTCCACCCTTACTACACAATCAAAGACGCCCTCGGCTTACTTCTCTTCTCTCTCC
TTAATGACATTAACACTATTCTCACAGACCTCCTAGGCGACCCAGACAATTATACCCTA
GCCAACCCCTTAAACACCCCTCCCCACATCAAGCCCGAATGATATTTCTATTTCGCCTA
CACAATTCTCCGATCCGTCCCTAACAACTTAGGAGGCGTCCCTTGCCCTATTACTATCCA
TCCTCATCCTAGCAATAATCCCCTCCTCCATATATCCAAACAACAAAGCATAATTTTCG
CCCACTAAGCCAATCACTTTATTGACTCCTAGCCGCAGACCTCCTCATTCTAACCTGAAT
CGGAGGACAACCAGTAAGCTACCCTTTTACCATCATTGGACAAGTAGCATCCGTAATAT
ACTTCACAACAATCCTAATCCTAATAACCAACTATCTCCCTAATTGAAAACAAAATACTCAA
ATGGGCCT-3'
    
```

Abbildung 7: Sequenz des humanen mitochondrialen Cytochrom B-Gens (bp: 14.747-15.887; NCBI GenBank® *Accession no.*: NC_012920) und die für den mitochondrialen RMCA nach Kap. 3.2.4.1 entwickelten Primer. **Fett**: TaqI-Schnittstelle, grau hinterlegt: Mutantenzahlprimer, umrahmt: Kopienzahlprimer, unterstrichen: TaqMan®-Sonde.

4.2.2. Kopienzahlbestimmung

Für die Kopienzahlbestimmung sollten die für *CytB* entwickelten Kopienzahlprimer (Kap. 4.2.1) in einer PCR mit anschließender Gelelektrophorese zunächst getestet

(Kap. 4.2.2.1), das Kopienzahlprimer-PCR-Produkt als Standard für die *realtime*-PCR zur Kopienzahlbestimmung fluorimetrisch quantifiziert (Kap. 4.2.2.2), die *realtime*-PCR zur Kopienzahlbestimmung zur Erhöhung der Sensitivität optimiert (Kap. 4.2.2.3), ein geeigneter Kalibrierbereich festgelegt (Kap. 4.2.2.4) und abschließend Kopienzahlbestimmungs-Qualitätskriterien festgelegt werden (Kap. 4.2.2.5).

4.2.2.1. Test der Primer für die Kopienzahlbestimmung

Die für die Kopienzahlbestimmung entwickelten Primer (Kap. 4.2.1) führten laut Primer-Blast zu keinerlei unspezifischen Nebenprodukten. Nach einer Gradienten-PCR mit anschließender Gelelektrophorese und Gel-Aufreinigung wurde bei allen zwölf getesteten *Annealing*-Temperaturen zwischen 50 und 65°C ausschließlich das erwartete Produkt mit einer Länge von 149 bp detektiert (Abbildung 8).

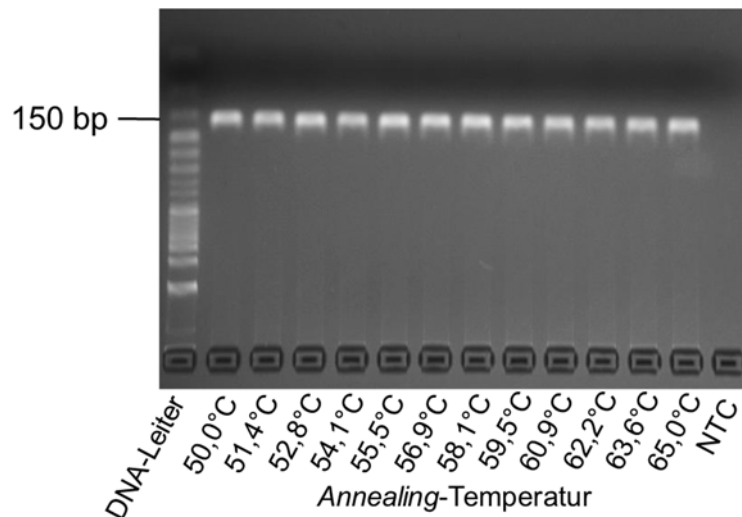


Abbildung 8: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) der PCR-Produkte der Gradienten-PCR nach Kap. 3.2.4.3 zur Überprüfung der Kopienzahlprimer auf eventuelle unerwünschte Nebenprodukte. NTC: Blindwert (nf Wasser). Templat: 50 ng mtDNA pro 25 µl PCR-Ansatz, isoliert nach Kap. 3.2.3 aus Probe Nr. 1. 3%iges Agarose-Gel. Laufzeit: 1 h bei 5 V/cm. DNA-Leiter: 50 bp.

Die Sanger-Sequenzierung zeigte ebenso eine 100%ige Übereinstimmung mit dem erwarteten Produkt (Abbildung 9), was die Ergebnisse des Primer-BLASTs bestätigt.

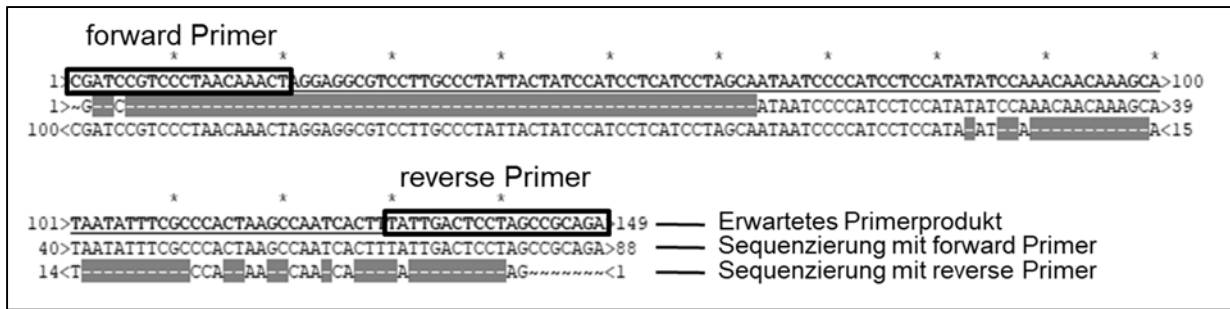


Abbildung 9: Vergleich des erwarteten Kopienzahlprimer-Produktes (oberste Zeile) mit den Ergebnissen aus der Sequenzierung mit dem *reverse*-Primer (mittlere Zeile) und dem *forward*-Primer (unter Zeile) nach Sanger-Sequenzierung (Kap. 3.2.8).

4.2.2.2. Quantifizierung des Standards für die Kopienzahlbestimmung

Das Kopienzahlprodukt (149 bp) aus Kap. 4.2.2.1 sollte als Standard für die externe Kalibrierung mittels *realtime*-PCR zur Kopienzahlbestimmung dienen. Der Standard wurde hierfür nach Gel-Aufreinigung fluorimetrisch mittels externer Kalbsthymus-DNA Kalibrierung dreimal unabhängig quantifiziert (Anhang: Abbildung 48).

Der DNA-Gehalt betrug $3,63 \pm 0,20$ pg/ μ l ($\pm 5,42\%$). Dies entspricht einer Kopienzahl von $1,9 \cdot 10^7$ Kopien/ μ l (errechnet über das Molekulargewicht der Produkt-Sequenz mittels http://bioinformatics.org/sms2/dna_mw.html). Die mittlere Wiederfindungsrate nach Standardzugabe (interne Wiederfindung) der drei Bestimmungen von $104 \pm 4\%$ bestätigte die Richtigkeit der Quantifizierung (am Lehrstuhl generierte Daten: 84-112% Wiederfindung; Standardabweichung $\leq 10\%$; n=31). Insgesamt wurden 37,5 ml, bzw. 136 ng Standard hergestellt, à 50 μ l aliquotiert und bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt. Somit wurde genug Standard für 750 Bestimmungen hergestellt und die Standardmenge war ausreichend für die Kopienzahlbestimmung von insgesamt 50 vorhandene Proben plus Vorversuche (Kap. 4.2.4, 4.2.2.3 und 4.2.2.4).

4.2.2.3. Vergleich 2- und 3-step-Temperaturprogramm

Die Kopienzahlprimer wurden ohne TaqMan®-Sonde mit einem 3-step Temperaturprogramm getestet (Kap. 4.2.2.1). Um eine ordnungsgemäße Funktion der TaqMan®-Sonde zu gewährleisten, wird bei der TaqMan®-Sonden basierten *realtime*-PCR üblicherweise ein 2-step-Temperaturprogramm, bei dem *Annealing* und Elongation in einem Schritt zusammengefasst werden, verwendet (zusammengefasst in Kubista et al., 2006). Daher sollte das 3-step Temperaturprogramm mit einem 2-step-Temperaturprogramm verglichen werden und hinsichtlich der Effizienz, als Qualitätskriterium, evaluiert werden. Der Gold-Standard für die Bestimmung der Effizienz ist das Errechnen

aus der Steigung einer Verdünnungsreihe (Rutledge und Stewart, 2008). Jedoch werden dafür bei einer Verdünnungsreihe bestehend aus n Verdünnungen pro Bestimmung n -mal so viele Reaktionen benötigt, wie bei der Bestimmung der Effizienz aus der Steigung der Amplifikationskurven mittels LinRegPCR. Deshalb wurde aus Gründen der Wirtschaftlichkeit jeweils dreifach unabhängig die Effizienz für beide Temperaturprogramme (*2-step* und *3-step*) mittels LinRegPCR bestimmt (Amplifikationskurven: Anhang Abbildung 49) und gemittelt (Abbildung 10 und Anhang: Tabelle 29). Da kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem *2-step*- ($1,93 \pm 4,97\%$) und dem *3-step*-Temperaturprogramm ($1,86 \pm 3,12\%$) besteht (einfacher t-Test, $p=0,28$) und bei der TaqMan®-Sonden basierten *realtime*-PCR ein *2-step*-Temperaturprogramm erforderlich ist (Kubista et al., 2006), wurde bei allen weiteren Bestimmungen mit einem *2-step* Temperaturprogramm gearbeitet.

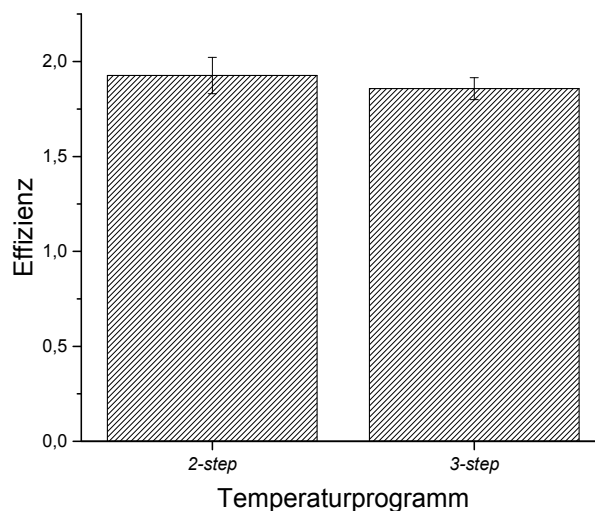


Abbildung 10: Vergleich der mittels LinRegPCR ermittelten Effizienz der Kopienzahlbestimmung bei verschiedenen Temperaturprogrammen (*Annealing*-Temperatur jeweils 65°C). Gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Bestimmungen. Statistisch besteht kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen (einfacher t-Test, $p=0,08$).

Zur weiteren Optimierung sollte darauf die optimale *Annealing*-Temperatur bestimmt werden.

4.2.2.3.1. Optimierung der *Annealing*-Temperatur

Um auch Proben mit einer geringen Kopienzahl zu quantifizieren, wurde für die *realtime*-PCR zur Kopienzahlbestimmung eine möglichst hohe Sensitivität angestrebt. Hierbei gilt, je höher die Effizienz einer PCR, desto sensitiver ist die Reaktion. Generell

kann eine zu hohe oder zu niedrige $MgCl_2$ -, dNTP- oder Primerkonzentration einen inhibitorischen Einfluss auf eine PCR nehmen. Jedoch lohnt eine Optimierung dieser Komponenten meist nur, wenn die Reaktion gar nicht erfolgreich ist oder eine zu geringe Produktausbeute erreicht wird (Mülhardt, 2009). Da bei einer TaqMan®-Sonden basierten *realtime*-PCR das Endprodukt nicht weiter benötigt wird, spielt die Ausbeute keine Rolle. Somit wurde darauf verzichtet Bestandteile des Reaktionsmixes zu optimieren. Die Zyklenzahl kann ebenso einen Einfluss auf die Ausbeute nehmen oder zu unspezifischem „Schmier“ führen. Unspezifische Produkte werden in der TaqMan®-Sonden basierten *realtime*-PCR nicht detektiert. Daher wurde auf eine Optimierung der Zyklenzahl ebenso verzichtet. Des Weiteren kann die *Annealing*-Temperatur zu Optimierung einer PCR verändert werden. Eine optimale *Annealing*-Temperatur kann zwar errechnet werden, muss aber immer empirisch bestimmt werden. Daher sollte um eine möglichst hohe Effizienz zu erreichen, die *realtime*-PCR zur Kopienzahlbestimmung hinsichtlich ihrer *Annealing*-Temperatur optimiert werden. Eine geeignete *Annealing*-Temperatur für eine *realtime*-PCR liegt zwischen 55 und 60°C (Dorak, 2006). Falls Primer-Dimere oder unspezifische Nebenprodukte ein Problem sind, sollte die Temperatur in 2°C-Schritten erhöht werden (Dorak, 2006). Da bereits gezeigt wurde, dass bei einer *Annealing*-Temperatur zwischen 55 und 65°C weder Nebenprodukte noch Primer-Dimere entstehen (Kap. 4.2.2), wurde, um die optimale *Annealing*-Temperatur für die TaqMan®-Sonden basierte *realtime*-PCR zu ermitteln, die Effizienz bei einer *Annealing*-Temperatur von 56, 58, 60 und 62°C jeweils dreifach unabhängig bestimmt (Amplifikationskurven: Anhang Abbildung 49) und gemittelt (Abbildung 11 und Anhang: Tabelle 29). Bei einem Signifikanz-Niveau von 0,05 (einfache ANOVA, $p=0,01$; Tukey-Test) unterschieden sich die Effizienzen bei 56 ($2,18\pm 5,10\%$), 58 ($2,19\pm 2,20\%$) und 60°C ($2,02\pm 4,37\%$) untereinander nicht signifikant (p -Werte: 0,09-1,00). Die Effizienz bei 56°C und 58°C war im Vergleich zur Effizienz bei 62°C ($1,96\pm 0,82\%$) signifikant erhöht ($p=0,03$ bzw. 0,02). Statistisch war somit keine klare Tendenz zu erkennen.

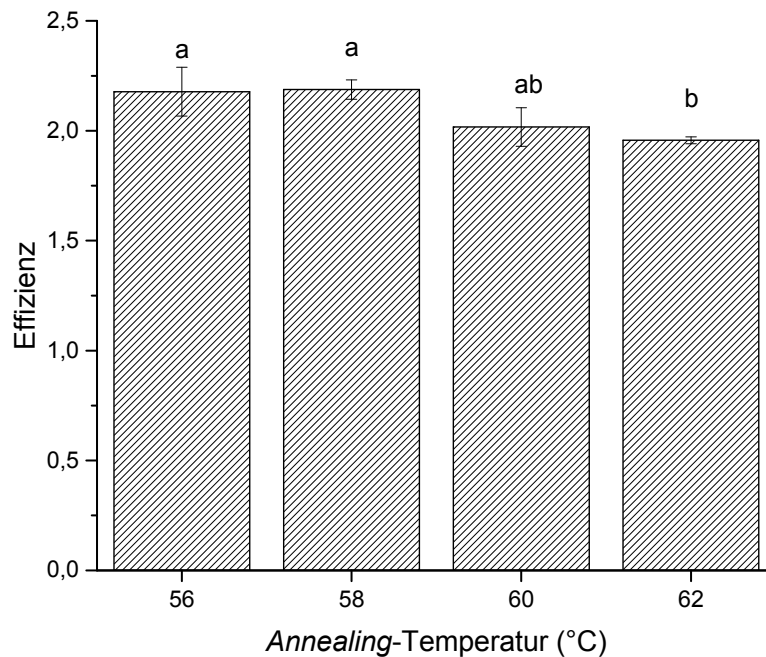


Abbildung 11: Vergleich der mittels LinRegPCR ermittelten Effizienz der Kopienzahlbestimmungs-PCR bei verschiedenen *Annealing*-Temperaturen. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert±Standardabweichung aus drei unabhängigen Bestimmungen. Gleiche Buchstaben zeigen die statistisch gleiche Datengruppe (einfache ANOVA, Tukey-Test, Signifikanzniveau: <0,05).

Da die Effizienz bei 58°C mit $2,19 \pm 2,20\%$ am höchsten war, wurde 58°C als optimale *Annealing*-Temperatur festgelegt. Für alle weiteren Bestimmungen wurde folglich mit einer *Annealing*-Temperatur von 58°C gearbeitet. Eine hier ermittelte Effizienz >2 würde zwar bedeuten, dass sich die Kopienzahl in jedem Zyklus mehr als verdoppelt, ist allerdings nicht ungewöhnlich und wurde schon in anderen Studien beobachtet (Skillman et al., 2006). Gleichwohl deutet eine Effizienz >2 auf eine Überschätzung der Effizienz hin (Dorak, 2006). Daher sollte die Effizienz später aus der Steigung einer Verdünnungsreihe errechnet werden (Kap. 4.2.2.4.2). Dafür sollte zunächst ein Kalibrierbereich festgelegt werden.

4.2.2.4. Festlegung des Kalibrierbereiches

Für humane mtDNA wurde eine SMF von $8 \cdot 10^{-7}$ bis $4 \cdot 10^{-4} \text{bp}^{-1}$ erwartet (Kap. 1.1: Tabelle 1). Da jeweils vier Basen pro Kopie untersucht werden, ist demnach für die Detektion einer Mutante eine Gesamtkopienzahl von $2 \cdot 10^7$ bis $1 \cdot 10^4$ Kopien notwendig. Da die Mutantenzahl später aus 10 µl-Aliquoten bestimmt werden sollte (Kap. 3.2.4.2), reicht somit eine Kopienzahlkonzentration von $2 \cdot 10^6$ bis $1 \cdot 10^3$ Kopien/µl aus.

Dafür sollte zunächst ein möglichst weit gefasster, $2 \cdot 10^6$ und $1 \cdot 10^3$ Kopien einschließender, varianzenhomogener, linearer Kalibrier-Bereich ohne Ausreißer ermittelt werden. Die Konzentration des höchsten Kalibrierpunktes war dabei nur durch die Konzentration des in Kap. 4.2.2.2 quantifizierten Standards limitiert. Es wurde dreimal unabhängig eine *realtime*-PCR mit einer Verdünnungsreihe von $9,5 \cdot 10^7$ - $9,5 \cdot 10^0$ Kopien im *well* durchgeführt. Anschließend wurde die Anfangskopienzahl im *well* gegen die gemittelten ct-Werte aufgetragen (Abbildung 12) und mit Valoo 2.5 die Linearität, Varianzenhomogenität und Ausreißer bestimmt. Nach Yang et al. (2009) wird zwischen Zyklus 3 und 15 die Basislinie gesetzt, so dass nur ct-Werte oberhalb von 15 bewertet wurden. Der gesamte bewertete Bereich von $9,5 \cdot 10^5$ - $9,5 \cdot 10^0$ Kopien war bei einem Signifikanzniveau von 0,01 linear, varianzenhomogen und enthielt keinen Ausreißer.

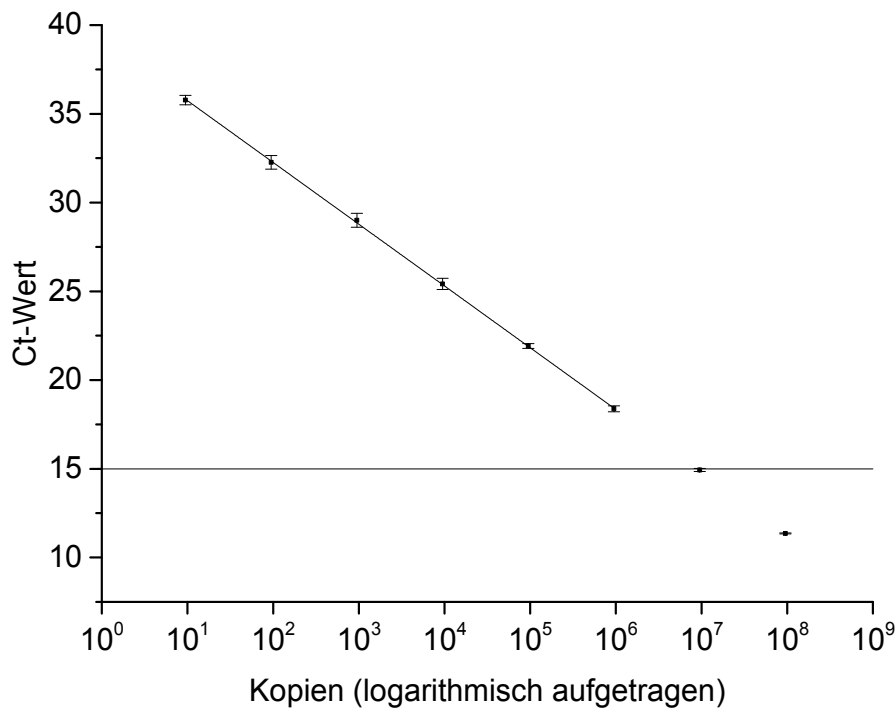


Abbildung 12: Festlegung des Kalibrierbereiches für die Kopienzahlbestimmung (Kap. 3.2.4.3). Logarithmische Auftragung der Anfangskopienzahlen gegen den ct-Wert. Da die Basislinie zwischen ct 3 und 15 gesetzt wird, wurden nur ct-Werte >15 (durchgezogene Linie) gewertet. Gezeigt sind jeweils die Werte aus drei unabhängigen Bestimmungen \pm Standardabweichung. Geradengleichung: $y = -3,48x + 39,22$. $R^2 = 0,999$.

Da ein Bereich von $2 \cdot 10^6$ bis $1 \cdot 10^3$ Kopien angestrebt wurde, eignete sich der Bereich jedoch unter Umständen nicht zur Bestimmung von Kopienzahlen. Daher sollte der Bereich zum einen nach oben hin erweitert werden und zum anderen die Richtigkeit

und Präzision der Methode mittels Standard-Wiederfindung ohne Matrix ermittelt werden.

4.2.2.4.1. Richtigkeit und Präzision der Kopienzahlbestimmung

Zur Ermittlung der Richtigkeit und Präzision der Kopienzahlbestimmung sollte zunächst die Wiederfindungsrate von Kopienzahlstandard ohne Matrix ermittelt werden. Später sollte die Wiederfindungsrate von Kopienzahlstandard in Realproben (interne Wiederfindung) ermittelt werden (Kap. 4.2.2.5). Um näher an der angestrebten Kopienzahl von $2 \cdot 10^6$ bis $1 \cdot 10^3$ Kopien (Kap. 4.2.2.4) zu liegen, sollte dabei der Bereich der Kalibriergeraden zum einen im Vergleich zum vorigen Kapitel (4.2.2.4) nach oben hin erweitert werden, ohne den kleinstmöglichen ct-Wert von 15 (Kap. 4.2.2.4) zu unterschreiten. Zum anderen sollte der Kalibrierbereich nach unten hin eingeeengt werden. Als Grenze für eine akzeptierbare Wiederfindung wurde dabei 95-105% festgelegt.

Zunächst wurde viermal unabhängig eine Wiederfindung einer Lösung bekannter Kopienzahl im oberen ($4,7 \cdot 10^5$ Kopien), mittleren ($4,7 \cdot 10^4$ Kopien) und im unteren Bereich ($4,7 \cdot 10^3$ Kopien) einer Kalibriergerade von $4,7 \cdot 10^6$ - $4,7 \cdot 10^2$ Kopien durchgeführt. Alle vier Kalibriergeraden waren linear und enthielten keine Ausreißer (Signifikanzniveau: 0,01, Anhang: Abbildung 50). Drei der vier Geraden waren varianzenhomogen. Bei einer der vier Geraden waren keine Daten für einen Varianzenhomogenitätstest vorhanden, da bei beiden äußeren Punkten nur jeweils zwei auswertbare Messwerte vorhanden waren. Somit wurde das obere Maximum des Kalibrierbereiches bis $4,7 \cdot 10^6$ Kopien erweitert. Die Wiederfindungsraten von $111 \pm 10\%$ im oberen, $113 \pm 11\%$ im mittleren und $103 \pm 14\%$ unterschieden sich zwar statistisch nicht signifikant vom Idealwert 100% (einfacher t-Test, $p=0,10-0,67$) lagen, aber alle über der vorher festgelegten Grenze von 95-105% (Abbildung 13).

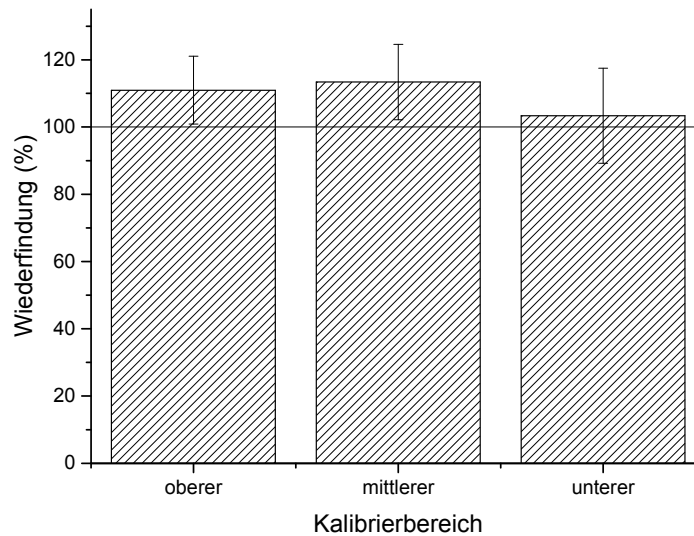


Abbildung 13: Wiederfindungen einer bekannten Standardlösung im oberen ($4,7 \cdot 10^5$ Kopien), mittleren ($4,7 \cdot 10^4$ Kopien) und unteren Bereich ($4,7 \cdot 10^3$ Kopien) des weitgefassten Kalibrierbereiches ($4,7 \cdot 10^6$ - $4,7 \cdot 10^2$ Kopien). Gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung aus vier unabhängigen Bestimmungen. Zwischen den einzelnen Datengruppen besteht kein statistisch signifikanter Unterschied (einfache ANOVA, $p=0,49$) und sie unterscheiden sich jeweils statistisch nicht signifikant von 100% (einfacher t-Test, $p=0,10$ - $0,67$). Durchgezogene Linie: Idealwert 100%.

Daher sollte im Folgenden überprüft werden, ob ein enger gefasster Kalibrierbereich Ergebnisse innerhalb der vorher definierten Grenzen liefert. Da Proben mit einer höheren SMF auch verdünnt werden können, sollte der Kalibrierbereich dabei nach unten hin eingengt werden.

Zur methodischen Charakterisierung eines enger gefassten Kalibrierbereiches ($4,7 \cdot 10^6$ - $1,8 \cdot 10^4$ Kopien) wurde jeweils dreimal unabhängig eine Wiederfindung einer Lösung mit bekannter Kopienzahl jeweils im oberen ($1,2 \cdot 10^6$ Kopien), mittleren ($2,9 \cdot 10^5$ Kopien) und unteren ($7,3 \cdot 10^4$ Kopien) durchgeführt (Anhang: Abbildung 51). Die Wiederfindungsraten von $99 \pm 2\%$ im oberen, $99 \pm 6\%$ im mittleren und $102 \pm 10\%$ im unteren Bereich des enggefassten Kalibrierbereiches unterschieden sich im Vergleich zum weitgefassten Kalibrierbereich bei einem Signifikanzniveau von 0,05 statistisch nicht signifikant (gepaarter t-Test, p-Wert: 0,14), lagen allerdings alle innerhalb der akzeptierten Grenze von 95-105% (Abbildung 14). Des Weiteren waren die Standardabweichungen der Wiederfindungsrate innerhalb des enggefassten Kalibrierbereiches signifikant kleiner (oberer Bereich: 7,73%, mittlerer: 5,40%, unterer: 4,57%) als im weit gefassten Kalibrierbereich (gepaarter t-Test, $p=0,02$).

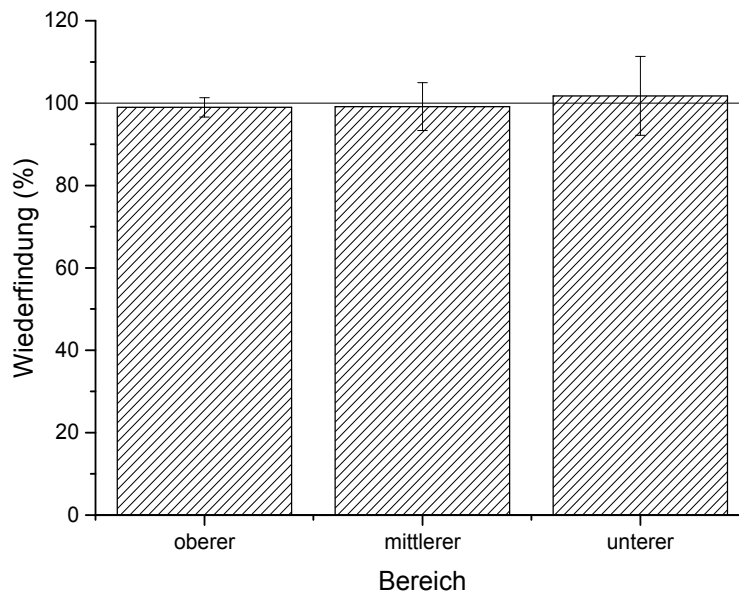


Abbildung 14: Wiederfindungen einer bekannten Standardlösung im oberen ($1,2 \cdot 10^6$ Kopien), mittleren ($2,9 \cdot 10^5$ Kopien) und unteren Bereich ($7,3 \cdot 10^4$ Kopien) des weitgefassten Kalibrierbereiches ($4,7 \cdot 10^6 - 1,8 \cdot 10^4$ Kopien). Gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Bestimmungen. Zwischen den einzelnen Datengruppen besteht kein statistisch signifikanter Unterschied (einfache ANOVA, $p=0,85$). Durchgezogene Linie: Idealwert 100%.

Deshalb wurde für alle weiteren Versuche mit einem enggefasstem Kalibrierbereich gearbeitet. Dabei war mit einer methodisch bedingten Richtigkeit (Wiederfindung des Standards) zwischen 99 und 102% und einer Schwankung zwischen 2 und 10% zu rechnen. Aus der zur Charakterisierung der methodischen Schwankung verwendeten Kalibriergerade kann die Effizienz der PCR abgeleitet werden.

4.2.2.4.2. Ermittlung der Effizienz der Kopienzahlbestimmungs-PCR

Da die in Kapitel 4.2.2.3.1 mittels LinReg ermittelte Effizienz ($2,19 \pm 2,20\%$) vermutlich eine Überschätzung der realen Situation darstellte, sollte die Effizienz mit Hilfe der Kalibriergeraden zur Festlegung eines varianzenhomogenen Bereichs (Kap. 4.2.2.4) neu berechnet werden. Aus der Steigung der Geraden lässt sich die Effizienz der Reaktion mit folgender Formel errechnen (Dorak, 2006):

$$Effizienz = 10^{\frac{-1}{Steigung}} - 1$$

Mit der hier ermittelten Steigung von -3,48 ergab sich eine Effizienz von $94 \pm 1,13\%$. Die mit dieser Methode bestimmte Effizienz liegt üblicherweise zwischen 60 und

>100% (Souaze et al., 1996). 90-100% sollten idealerweise erreicht werden (Dorak, 2006). Die hier ermittelte Effizienz von $94 \pm 0,56\%$ lag somit im idealen Bereich.

4.2.2.5. Festlegung akzeptierter Schwankungen bei Realproben

Um den Einfluss der Matrix der Realproben auf die Richtigkeit der Kopienzahl zu ermitteln, wurde bei jeder Probe eine dreifach abhängige interne Wiederfindung mitgeführt, bei der jeder Probe in einer separaten Reaktion Kopienzahlstandard hinzugefügt wurde. Bei der internen Wiederfindung spielt die Menge des zugefügten Standards eine nicht unerhebliche Rolle. Ist das Verhältnis zwischen Probe und Standard zu groß, überdeckt die Standardzugabe unter Umständen die Kopienzahl der Probe. Ist das Verhältnis zu gering, geht die Probenschwankung eventuell überproportional in die Wiederfindungsrate und die Schwankung der Wiederfindung ein. Daher wurden Proben ausgeschlossen, deren Verhältnis zwischen Standardzugabe- und Probenkopienzahl (VSP) unter 30% oder über 300% lag. Zur Ermittlung von Ausreißern, der probenbedingten Schwankung der Kopienzahlbestimmung bei Realproben und daraus abgeleiteten Akzeptanzgrenzen von Werten der Kopienzahlbestimmung, wurde die Wiederfindungsrate von internem Standard von dreifach abhängig ermittelter Kopienzahl von *TaqI*-verdauter humaner mtDNA aus 21 Probenmessungen von Fett-Drüsen-Mischengewebe aus Vorversuchen und 10 Bestimmungen von Drüsen- und Fettgewebe von Probe Nr. 8 ausgewertet. Die Standardabweichung der Proben und die der Wiederfindung wurden ebenfalls ausgewertet. Um maximal 20% der Messungen gegebenenfalls wiederholen zu müssen, wurde als Akzeptanzkriterium jeweils das 90. bzw. zusätzlich das 10. Perzentil bei der internen Wiederfindung gewählt. Dabei ergaben sich folgende Grenzen: Standard-Wiederfindungsrate von 56 bis 124% (Abbildung 15 links), Standardabweichung Probe: $\leq 11\%$ und Standardabweichung Standard-Wiederfindungsrate: ≤ 32 (Abbildung 15 rechts).

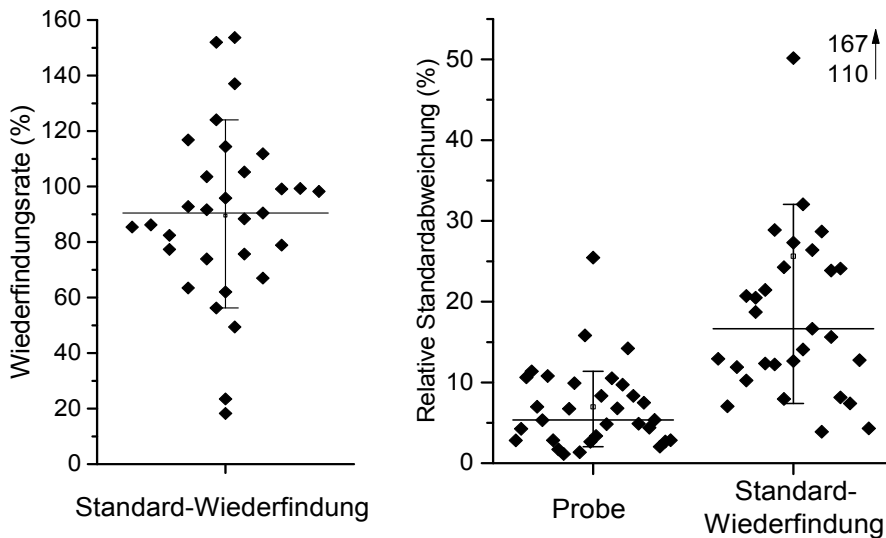


Abbildung 15: Verteilung der ermittelten Werte der Wiederfindungsrate des internen Standards (links) und der relativen Standardabweichung der Kopienzahl und der Wiederfindungsrate des internen Standards (rechts). Vertikale Linie: 10.-90. Perzentil. Horizontale Linie: Median; □: Mittelwert.

Bei allen folgenden Kopienzahlbestimmungen wurde die Bestimmung wiederholt, sobald einer der Werte (Standardabweichung Probe und Wiederfindungsrate und Wiederfindungsrate selbst) nicht innerhalb der festgelegten Grenzen lag. Des Weiteren sollte nach Abschluss der Probenmessungen die Kopienzahlbestimmung neu evaluiert und die angelegten Qualitätskriterien bewertet werden (Kap. 4.2.4.2.1).

4.2.3. Mutantenzahlbestimmung

Vermulst et al. (2008) ermittelten die Mutantenzahl mittels PCR mit anschließender Gelelektrophorese. Um kostensparender zu arbeiten, sollte die Mutantenzahlbestimmung (Mutations-PCR) als SYBR®-Green basierte *realtime*-PCR analog zu Schmalbach (2014) durchgeführt werden. Bei der Mutations-PCR ist für die Amplifikation von einzelnen Mutanten sowohl eine hohe Spezifität, als auch eine hohe Sensitivität notwendig. Daher sollten dafür zunächst überprüft werden, ob die in Kap. 4.2.1 designten Primer in der Theorie nach Primer-Blast zu unspezifischen Nebenprodukten mit nDNA führen können (Kap. 4.2.3.1), transformierte MCF-7-Zellen auf ihre Eignung für einen empirischen Primerspezifitäts-Nachweis getestet (Kap. 4.2.3.2), die Notwendigkeit einer spezifischen Primerbindung anhand der nDNA-Verunreinigung von *TaqI*-verdauten Proben evaluiert (4.2.3.3), Standard für Optimierungsversuche und den Nachweis einer Kopie quantifiziert (4.2.3.4), die Primer in Kombination mit quantifiziertem Standard auf Eignung zur Übertragung der Mutations-PCR auf ein SYBR-Green®

basiertes *realtime*-PCR System getestet (Kap. 4.2.3.5), die Mutations-PCR zur Erhöhung der Sensitivität optimiert (Kap. 4.2.3.6), die Reaktion auf Eignung zur Amplifikation einer einzelnen Kopie überprüft (Kap. 4.2.3.7), zur Plausibilitätsprüfung exemplarisch die SMF einer Realprobe bestimmt (Kap. 4.2.3.8), und die methodische Schwankung des kompletten RMCA-Testsystems bei Realproben ermittelt werden (Kap. 4.2.3.9).

4.2.3.1. Test der Primer für die Mutations-PCR

Die für die Mutations-PCR entwickelten Primer (Kap. 4.2.1) führten laut Primer-Blast potentiell zu einem gleich langem Nebenprodukt mit nDNA (Abbildung 16). Allerdings sind die Primersequenzen in insgesamt vier Basen nicht deckungsgleich mit der nDNA. Beim Vergleich der Sequenz die potentiell mit nDNA amplifiziert wird, fiel auf, dass sich an der Stelle, an der sich auf der mtDNA die *TaqI*-Schnittstelle befindet, anstatt eines Thymins, ein Cytosin befindet, was bedeuten würde, dass bei einer eventuellen Fehl-Amplifikation *TaqI* dort nicht schneiden würde. Allerdings existiert innerhalb der Sequenz an anderer Stelle eine *TaqI*-Schnittstelle, da sich dort anstatt eines Adenosins (in der mtDNA) ein Guanin in der nDNA befindet. Somit würde ein eventuelles unerwünschtes Amplifikationsprodukt, sofern sich dort keine Mutation befindet, dennoch durch *TaqI* geschnitten werden und zu einem 73 und einem 166 bp langen Produkt führen (90 und 149 bp bei mtDNA im Vergleich). Insgesamt waren 16 Basen des potentiellen unspezifischen nDNA Nebenproduktes nicht deckungsgleich mit dem mtDNA Mutationsprimer-Produkt. Somit ist bei einer Mutante eine eindeutige Differenzierung zwischen nDNA und mtDNA nach Sanger-Sequenzierung, der in der Mutations-PCR detektierten Mutanten, mittels Sequenzvergleich möglich.

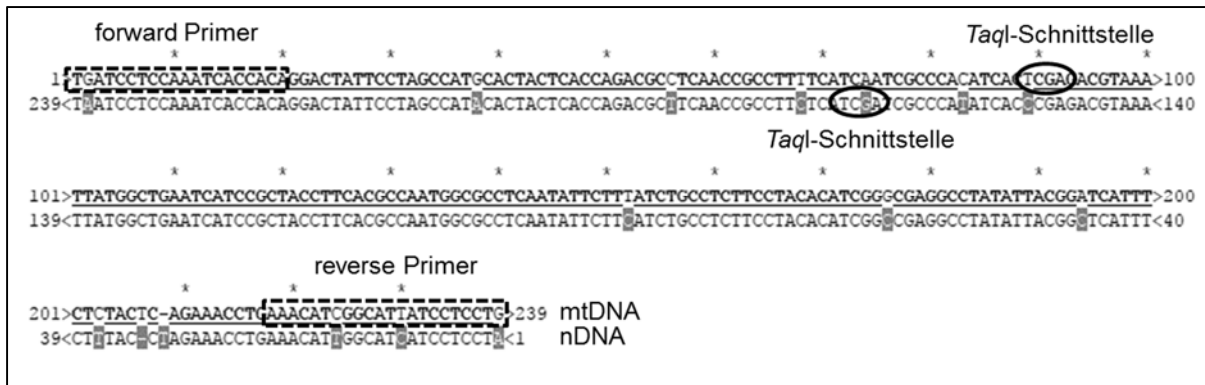


Abbildung 16: Vergleich der Sequenzen des Mutationsprimer-PCR-Produktes mit mtDNA als Templat (obere Zeile jeweils) mit dem potentiell möglichen, unerwünschten Nebenprodukt mit nDNA als Templat nach Primer-Blast (unten). Gestrichelt umrahmt: Mutationsprimer-Paar, oval umrahmt: TaqI-Schnittstelle auf der nDNA (links) und auf der mtDNA (rechts), grau hinterlegt: nicht übereinstimmende Basen.

Nach Test der Primer mittels einer Gradienten-PCR zur Bestimmung der optimalen *Annealing*-Temperatur, wurde bei jeder der getesteten *Annealing*-Temperaturen von 50-65°C nur das erwartete Produkt mit einer Länge von 239 bp detektiert und keine Nebenprodukte (Abbildung 17). Da zu niedrige *Annealing*-Temperaturen unspezifische Primer-Bindungen hervorrufen können (Rychlik et al., 1990), wurde 65°C als optimale *Annealing*-Temperatur festgelegt.

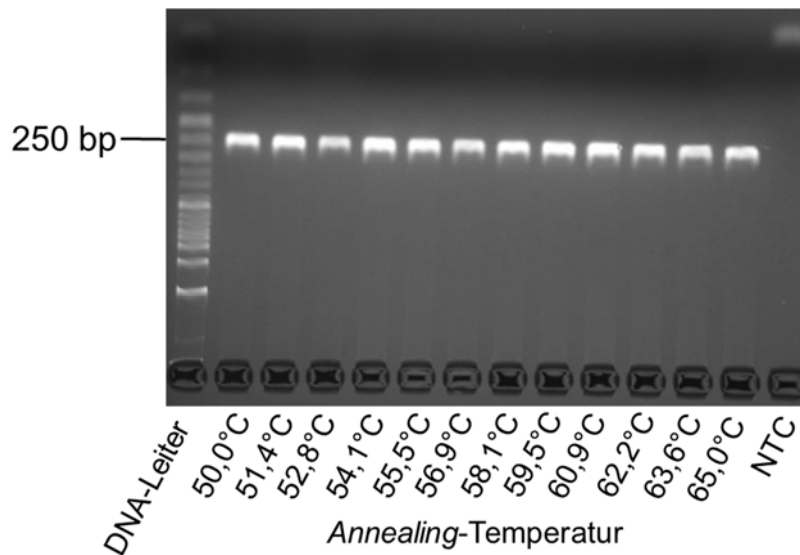


Abbildung 17: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) der PCR-Produkte der Gradienten-PCR zur Bestimmung der optimalen *Annealing*-Temperatur der Mutationsprimer (Kap. 3.2.4.4). Laufzeit: 1 h bei 5 V/cm. 3%iges Agarosegel. DNA-Leiter: 50 bp. NTC: Blindwert (nf Wasser). Als Templat wurden jeweils 50 ng mtDNA nach Kap. 3.2.3 von Probe Nr. 1 eingesetzt.

Nach anschließender Sequenzierung bestätigte sich, dass mit den Mutationsprimern kein unerwünschtes Nebenprodukt entstand (Anhang: Abbildung 52). Da als Templat

jedoch aufgereinigte mtDNA verwendet wurde, also mtDNA im Vergleich zu nDNA Überschuss vorlag, wurde um mit absoluter Sicherheit ausschließen zu können, dass durch den Primersatz keine Amplifikation von nDNA möglich ist, 100% reine nDNA benötigt. Dies ist insbesondere wichtig, da bei der PCR zur Bestimmung der Mutanzahl das Templat soweit verdünnt wird, dass eine einzelne Kopie eines amplifizierfähigen DNA-Fragments als Templat präsent ist (Kap. 3.2.4.4) und somit bei einer nDNA Mutante keine mtDNA vorläge, um die nDNA Mutante zu überdecken. Eine Möglichkeit zur Gewinnung von zumindest annähernd, jedoch nicht 100% reiner nDNA, ist neben zahlreichen kommerziell erhältlichen DNA-Aufreinigungs-Kits z.B. die Dichtegradientenzentrifugation (Flamm et al., 1966). Zur Gewinnung von absolut reiner nDNA eignet sich dagegen die Generierung von Rho0-Zellen. Per Definition sind Rho0-Zellen Zellen ohne jegliches mitochondriales Genom (King und Attardi, 1989).

4.2.3.2. Generierung von Rho0-Zellen

Zur Generierung von Rho0-Zellen gibt es prinzipiell zwei unterschiedliche Herangehensweisen: Zum einen durch eine Verringerung des mtDNA-Gehaltes durch chemische Agenzien wie EtBr; zum anderen über eine Transfektion der mtDNA mit einem für das Restriktionsenzym *EcoRI* kodierenden Gens (Kap. 1.1.4). MtDNA-Transfektion ist im Vergleich zur Inkubation mit chemischen Agenzien kostenintensiver. Um möglichst kostengünstig zu arbeiten, sollten deshalb humane Brustkrebs-MCF-7-BUS-Zellen mit chemischen Agenzien, die in der Lage sind die mitochondriale DNA-Replikation zu inhibieren (Tacrin und EtBr) oder durch Atmungskettenentkopplung Mitochondrien zu schädigen (DNP, Kap. 1.1.4), inkubiert werden. Da Tacrin und DNP bisher noch nicht zur Generierung von Rho0-Zellen verwendet wurden, sollte dafür zunächst ein geeigneter Konzentrationsbereich der jeweiligen Inkubationssubstanz ausgewählt werden (Kap. 4.2.3.2.1), die Zellen inkubiert (Kap. 4.2.3.2.2) und der vielversprechendste Inkubationsansatz durch Einzelzell-Klonierung (Kap. 4.2.3.2.3) auf die Eignung von MCF-7-Zellen zur Rho0-Zellen Generierung überprüft werden (Kap. 4.2.3.2.4).

4.2.3.2.1. Auswahl des Konzentrationsbereiches der Inkubationssubstanz

Der in der Literatur beschriebene Bereich zur Gewinnung von Rho0-Zellen mittels EtBr-Inkubation reicht von 20-200 ng EtBr/ml (Kap. 1.1.4). Um eventuelle Unterschiede in der Empfindlichkeit der in dieser Arbeit verwendeten MCF-7-BUS-Zellen

abzudecken, sollte der Bereich nach oben und unten hin erweitert und MCF-7-BUS-Zellen mit EtBr-Konzentrationen zwischen 10 und 250 ng/ml inkubiert werden.

Tacrin inhibiert in einem Bereich von 6-23 µg/ml die mitochondriale DNA-Polymerase γ in mitochondrienhaltigen Extrakten (Kap. 1.1.4). Da Tacrin bisher nicht zur Generierung von Rho0-Zellen verwendet wurden, sollten diese Konzentrationen als Anhaltspunkt dienen und der Konzentrationsbereich zur Inkubation der MCF-7-Zellen weitläufig nach oben und unten erweitert werden (0,01 µg/ml-100 µg/ml).

DNP wurde bisher weder zur Gewinnung von Rho0-Zellen verwendet, noch überhaupt verwendet, um den mtDNA Gehalt von kultivierten Zellen zu senken. Da für die Generierung von Rho0-Zellen eine aktive Zellteilung notwendig ist (Desjardins et al., 1985) und DNP in humanen pulmonaren Adenokarzinoma Calu-6 Zellen bereits ab einer Konzentration von 92 mg/ml Apoptose induzierte (Han et al., 2008), wurden 92 mg DNP/ml als Anhaltspunkt für eine obere Grenze genommen. Um eventuelle Unterschiede in der Empfindlichkeit der in dieser Arbeit verwendeten MCF-7-Zellen abzudecken, sollte der Bereich dabei etwas nach oben (184 mg/ml) und großzügig nach unten hin (0,02 mg/ml) erweitert werden.

4.2.3.2.2. Inkubation der MCF-7-Zellen mit Ethidiumbromid, Tacrin und Dinitrophenol

Bereits zu Beginn der Inkubation zeigte sich aufgrund des fehlenden adhärenen Zellrasens, dass die Zellen mit der höchsten getesteten Tacrin- (100 µg/ml) und der höchsten getesteten DNP-Konzentration (184 mg/ml) nach der ersten Passage nicht wieder anwachsen. Aufgrund der zytotoxischen Wirkung von 100 µg Tacrin/ml und 184 mg DNP/ml eigneten sich diese Konzentrationen nicht zur Gewinnung von Rho0-Zellen. Die Zellen aller übrigen getesteten Inkubationsansätze zeigten über einen Zeitraum von 88 (respektive 40) Tagen ein kontinuierliches, wenn auch teilweise im Vergleich zur Kontrolle vermindertem, Wachstum (Abbildung 18). Da Inkubationsansätze mit höheren Konzentrationen potentiell am ehesten den gewünschten Effekt induzieren, wurden die Ansätze mit den beiden geringsten Konzentration (jeweils 0,02 und 0,2 mg/ml DNP und 0,01 und 0,1 µg/ml Tacrin) nach 40 Tagen aus Kostengründen verworfen (Daten nicht gezeigt).

Im Inkubationsansatz mit der höchsten getesteten EtBr-Konzentration (250 ng/ml) war nach 27 Tagen ein Rückgang der Zellzahl um 66% zu beobachten (Abbildung 18). Da

eine aktive Zellteilung notwendig ist, um Rho0-Zellen zu generieren (Kap. 1.1.4), wurde dieser Ansatz (250 ng EtBr/ml) verworfen. Bei beiden anderen Inkubationsansätzen mit EtBr (10 und 50 ng/μl) war ein kontinuierliches, wenn auch im Vergleich zur Kontrolle (0,1% DMSO; im Folgenden als Kontrolle bezeichnet) verringertes Wachstum zu beobachten (Abbildung 18).

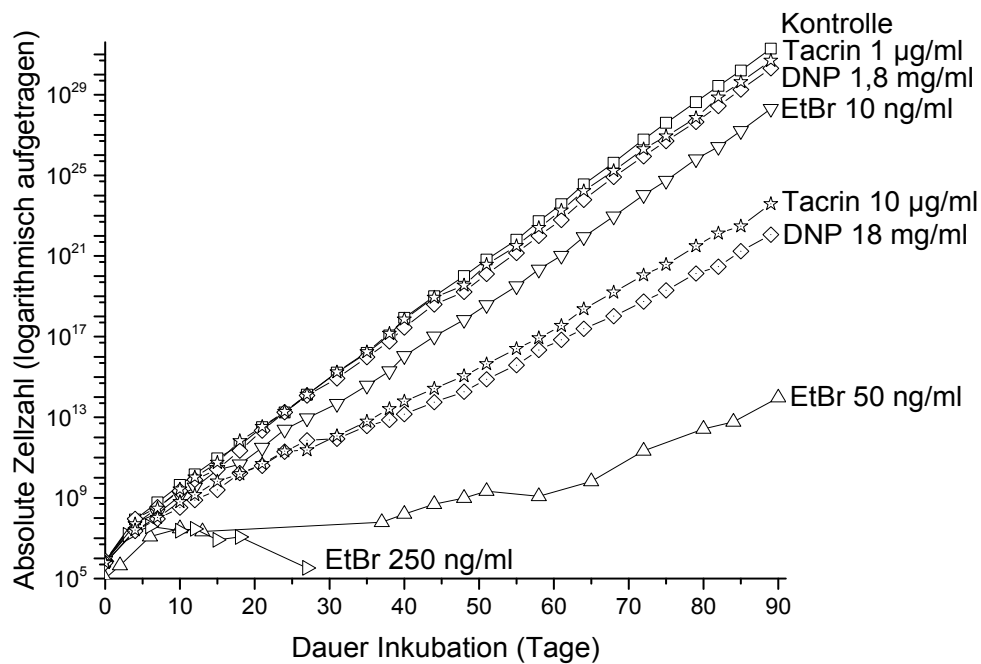


Abbildung 18: Logarithmische Auftragung der absoluten Zellzahl der mit Tacrin, DNP und EtBr inkubierten MCF-7-Zellen zur Generierung von Rho0-Zellen über die Inkubationsdauer von 88 Tagen. Kontrolle: 0,1% DMSO.

Da die Kulturen, die mit 10 µg/ml Tacrin, 18 mg/ml DNP und 50 ng/μl EtBr inkubiert wurden (im Folgenden nur noch Tacrin, DNP und EtBr bezeichnet), die Kulturen mit der jeweils höchsten getesteten Konzentration, bei der kein Rückgang der Zellzahl zu verzeichnen war, repräsentieren und somit potentiell den größten Einfluss auf die mtDNA nehmen, ohne die Lebensfähigkeit der Zellen auszumerzen, wurden diese Kulturen als vielversprechendste Ansätze erachtet und für weitere Untersuchungen verwendet. Da für eine Generierung von Rho0-Zellen eine aktive Teilung der Zellen notwendig ist (Kap. 1.1.4), wurde die Zellzyklusverteilung (ZZV) der betreffenden Ansätze (Kontrolle, DNP, Tacrin und EtBr) bestimmt. 64,1±3,5% der Zellen der Kontrolle befanden sich in der G0/G1-, 23,9±3,2% in der S- und 12,6±1,4% in der G2-/M-Phase (Abbildung 19). Die Ergebnisse unterschieden sich statistisch nicht signifikant (einfacher t-Test, adjustierte p-Werte=0,09-0,30) von bereits von Hammiche et al. (2005)

publizierten Daten von MCF-7-Zellen in unbehandeltem Kulturmedium. Das Ergebnis entsprach somit der Erwartung. Des Weiteren bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und den drei Inkubationsansätzen (einfache ANOVA, $p=0,12-0,52$). Somit verursachte keine der getesteten Substanzen in der entsprechenden Konzentration einen Zellzyklusarrest und die Voraussetzungen zur Züchtung von Rho0-Zellen waren erfüllt.

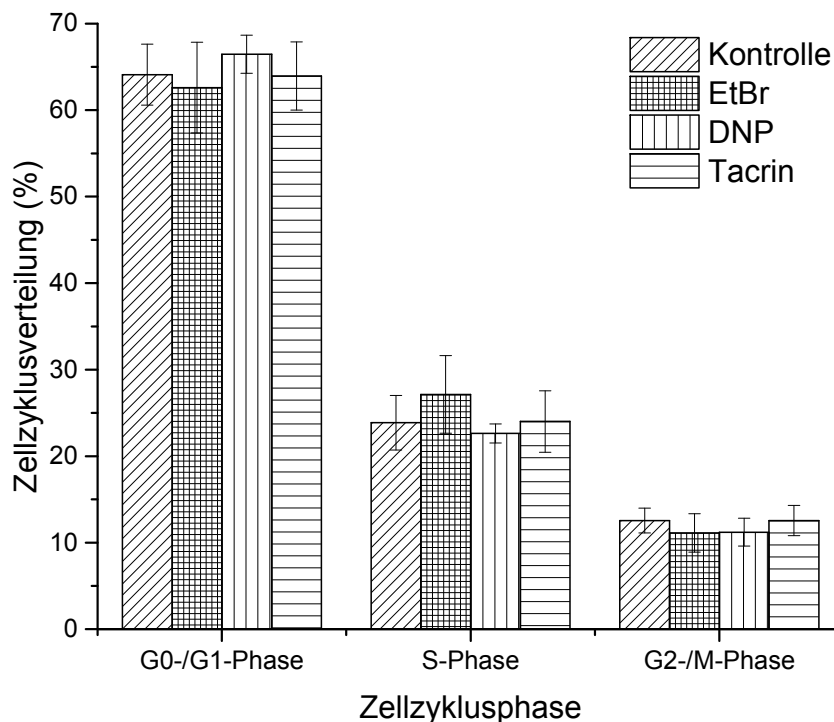


Abbildung 19: Zellzyklusverteilung (Kap. 3.2.9.6) der mit 50 ng/ml EtBr, 18 mg/ml DNP und 10 µg/ml Tacrin inkubierten MCF-7-Zellen. Gezeigt ist der Mittelwert±Standardabweichung einer dreifach unabhängig ermittelten Zellzyklusverteilung nach 89, 93 und 97 Tagen Inkubation der jeweiligen Kultur (Kap. 3.2.9.3). Statistisch besteht jeweils kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen in der jeweiligen Zellzyklusphase (einfache ANOVA, p -Werte 0,12-0,53). Kontrolle: 0,1% DMSO.

Um zu ermitteln, ob in den Inkubationsansätzen eine vollständige mtDNA-Depletion stattgefunden hatte, oder ob, bei nicht vollständiger mtDNA-Depletion innerhalb der gesamten Kultur, eine Einzelzellklonierung notwendig war, wurde nach 80 (DNP und Tacrin) bzw. 58 Tagen (EtBr) Inkubation Gesamt-DNA isoliert und mittels *realtime*-PCR der Gehalt an mtDNA und nDNA der einzelnen Kulturen im Vergleich zur Kontrolle ermittelt (Abbildung 20). Der Unterschied in der Anzahl der Inkubationszeiträume

rührte von einem anfänglichen Fehler bei der Kultivierung der mit EtBr inkubierten Zellen und einem daraus resultierenden Neubeginn der Inkubation. Bei keinem der Inkubationsansätze war ein Rückgang der mtDNA-Kopienzahlen im Vergleich zur Kontrolle festzustellen. Im Gegenteil zeigte sich im EtBr Ansatz eine Zunahme, welche möglicherweise durch die Kopienzahl-Methodenschwankung (Kap.4.2.2.5) verursacht wurde.

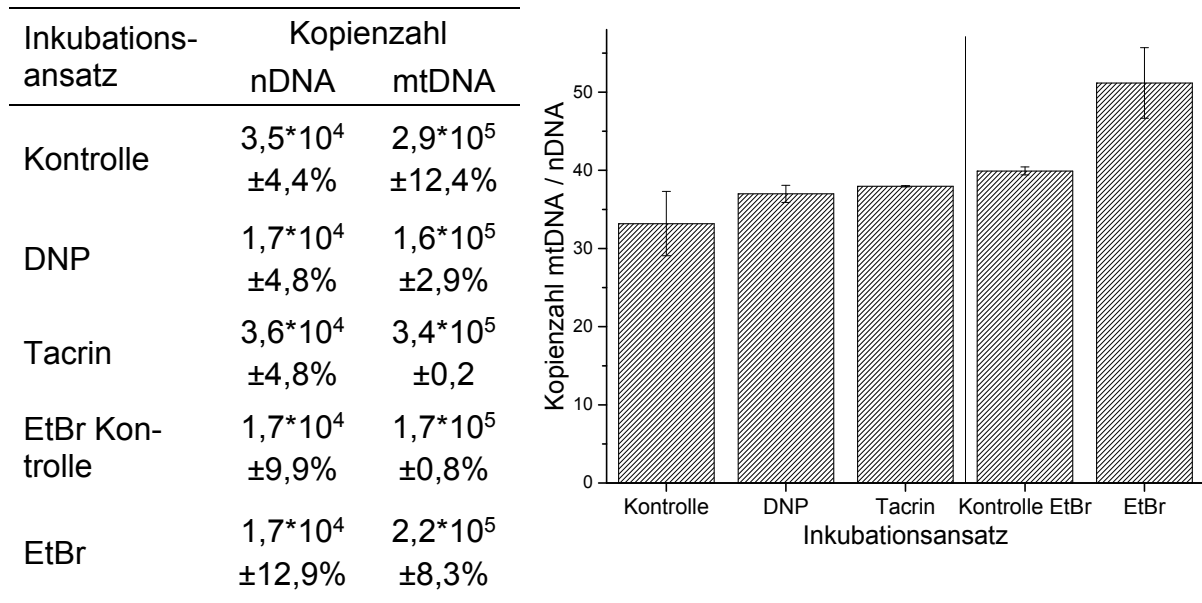


Abbildung 20: Links: nDNA und mtDNA Kopienzahlen aus DNA (isoliert nach Kap. 3.2.3) der einzelnen Inkubationsansätze zur Generierung von Rho0-Zellen und der Kontrolle nach 80 Tagen Inkubation (DNP und Tacrin) und 58 Tagen (EtBr). Angegeben ist die Kopienzahl/ $\mu\text{l} \pm$ Standardabweichung aus einer dreifach abhängigen Bestimmung nach Kap. 3.2.4.3. Rechts: Vergleich der mtDNA/nDNA-Kopienzahlverhältnisse der Inkubationsansätze zur Generierung von Rho0-Zellen mit der Kontrolle nach 80 Tagen Inkubation (DNP und Tacrin; links) und 58 Tagen (EtBr; rechts). Dargestellt ist das Verhältnis der Kopienzahl der mtDNA zu der nDNA Kopienzahl (Tabelle links). Um einen Rückschluss auf die Anzahl der pro Zelle vorhandenen Mitochondrien zu ziehen, wurde die ermittelte nDNA aufgrund der Tetraploidie der MCF-7-Zellen (Soule et al., 1973) durch vier geteilt und als Surrogat für einen Nukleus bzw. eine Zelle genommen. Links und rechts Inkubationssubstanz-Konzentrationen jeweils: DNP: 18 mg/ml, Tacrin: 10 $\mu\text{g/ml}$ und EtBr: 50 ng/ml. Kontrolle jeweils 0,1% DMSO.

Da keine vollständige mtDNA-Depletion innerhalb der Kulturen stattgefunden hatte, war somit eine Einzelzell-Klonierung notwendig.

4.2.3.2.3. Klonierung der inkubierten Zellen

Bei Zellkulturen handelt es sich meist um polyklonale Kulturen. Durch Einzelzell-Klonierung können einzelne Zellen mit definierten gewünschten Eigenschaften aus der betreffenden Zellkultur isoliert werden. So gelang es Delsite et al. (2002) Rho0-Zellen zu generieren, indem sie die humane Brustkrebszelllinie MDA-MB-435 nach 30 Tagen Inkubation mit 50 ng/ml EtBr klonierten.

Um Kosten zu sparen, sollte für die Einzelzellklonierung ein Inkubationsansatz ausgewählt werden. Im Inkubationsansatz mit 50 ng/ml EtBr war im Vergleich zur Kontrolle der stärkste Effekt auf das Wachstum (1,0 Verdoppelungen/24 h im Vergleich zu 2,5 Verdoppelungen/24 h) und auf die Morphologie der Zellen (Anhang: Abbildung 53), ohne die Teilungsfähigkeit zu beeinträchtigen (Kap. 4.2.3.2.2), zu sehen. Da des Weiteren die Generierung von Rho0-Zellen durch Inkubation mit EtBr, im Gegensatz zu Tacrin und DNP, bereits hinreichend beschrieben ist (u.a. Swerdlow et al., 1997, Chandel et al., 2000 und Arbini et al., 2013), wurde die mit 50 ng/ml EtBr inkubierte Kultur für eine Einzelzell-Klonierung ausgewählt. Da allerdings die Generierung von Rho0-Zellen mit MCF-7-BUS-Zellen im Speziellen noch nicht beschrieben wurde, wurde die Inkubation im Gegensatz zum in der Literatur beschriebenen Zeitraum für die Generierung von Rho0-Zellen großzügig auf insgesamt 84 Tage erweitert und die Zellen anschließend kloniert.

Insgesamt wurden in 40 96-*well*-Patten (insgesamt 3840 *wells*) 536 Klone ausgestreut. Dadurch war nach Poisson-Verteilung sichergestellt, dass sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,4% eine oder weniger Zellen in einem *well* befanden. 132 Klone wiesen ein deutlich verlangsamtes Wachstum auf. Da die Selektion auf einer zweiwöchigen Wachstumskontrolle beruht (Kap. 3.2.9.9), wurden diese Klone bereits vor der Selektion verworfen. Rho0-Zellen sterben aufgrund ihrer Pyruvat- und Uridinauxotrophie ohne einen Pyruvat- und Uridin-Mediumzusatz ab (Kukat et al., 2008). Daher wurden die Klone zur Selektion nach Wachstum zur Konfluenz jeweils in zwei separate Kulturflaschen weitergesetzt, jeweils eine mit Kulturmedium zur Weiterkultivierung und eine mit Selektionsmedium ohne Uridin und Pyruvat (Abbildung 21). Von den konfluenten 404 Klonen starben 71 Kulturen im Selektionsmedium ab und wurden somit als potentielle Rho0-Zellen identifiziert.

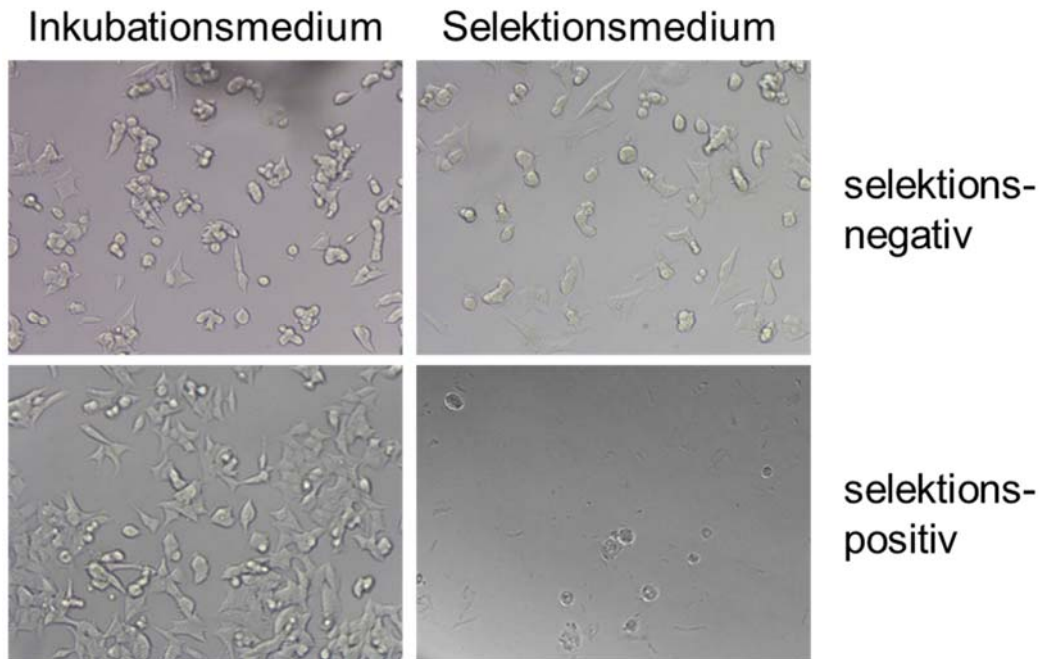


Abbildung 21: Selektion der Zellklone (Kap. 3.2.9.9) mit Kulturmedium ohne Pyruvat und Uridin zur Generierung von Rho0-Zellen. Gezeigt ist jeweils ein Beispiel für einen selektions-negativen Zellklon (oben) und einen selektions-positiven Zellklon (unten). Aufgenommen am Phasenkontrastmikroskop mit 10er Hellfeld Objektiv (Kap. 3.2.9.5) nach 14-tägiger Selektion (Kap. 3.2.9.9).

4.2.3.2.4. Verifizierung des Rho0-Status

Zur Verifizierung des Rho0-Status der 71 selektions-positiven Klonkulturen sollte der Rho0-Status der selektions-positiven Klone mittels einer PCR-basierten Methode bestätigt werden. Dabei sollte um kostensparender zu arbeiten als bei der ersten mtDNA-Depletions-Screening-PCR (PCR 4.2.3.2.2), eine PCR mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung ohne Verwendung einer TaqMan®-Sonde angewandt werden. Um das Abhandensein intakter mtDNA zweifelsfrei zu bestätigen, sollte dafür eine Methode angewandt werden, bei der nahezu das gesamte (16.185 bp), sofern vorhandene, mitochondriale Genom der Klon-Kulturen amplifiziert wird. Dafür wurde zunächst die Gesamt-DNA der Klone amplifiziert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Bei 66 der 71 selektions-positiven Klone wurde das mtDNA Amplifikat (16 kbp) detektiert (Abbildung 22, Anhang: Abbildung 54 und Abbildung 55) und somit bestand bei eben jenen kein Rho0-Status.

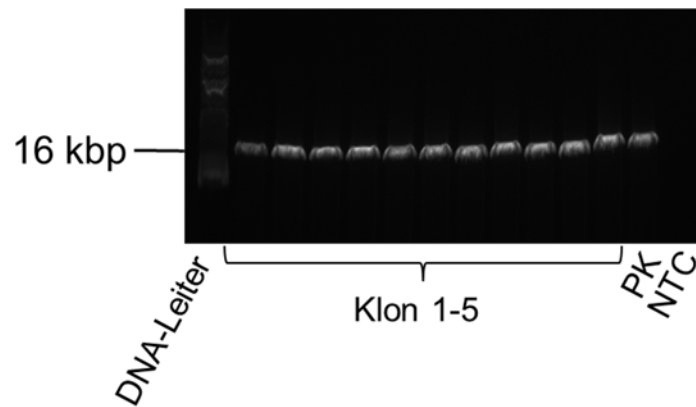


Abbildung 22: Aufnahme der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte der PCR zur Verifizierung des Rho0-Status (Kap. 3.2.9.10) von nach Kap. 3.2.3 isolierter DNA der mit EtBr inkubierten Zellklone (Kap. 3.2.9.3 und 3.2.9.9). PK: Positivkontrolle, Templat: MCF-7 Gesamt-DNA aus der Kontrollgruppe; NTC: Blindwert (nf Wasser); 0,4% Agarosegel, Laufzeit: 2 h bei 7 V/cm; Leiter: *DNA molecular weight marker XV*. Gezeigt ist jeweils eine Doppelbestimmung der Klone 1-5.

Da bei der DNA-Isolation eine Fragmentierung der DNA auftreten kann, wurde die DNA der sechs Klone bei denen kein 16 kbp langes mitochondriales Amplifikat detektiert wurde, in einer *realtime*-PCR mit den RMCA-Kopienzahlprimern für *CytB* als Templat eingesetzt. Bei allen 6 Klonen wurde dabei ein Signal detektiert (Anhang: Abbildung 56). Somit bestand bei keinem der 404 getesteten Klone ein Rho0-Status, bzw. lag der Anteil der durch Inkubation mit EtBr generierten Rho0-Zellen unter der Nachweisgrenze von 2,5%. Der hohe Anteil der Selektionsmedium-positiven Zellklone von 18% lässt sich durch das mutagene Potential von EtBr (King und Attardi, 1996) erklären.

Da eine Generierung von Rho0-Zellen mit der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 BUS nicht möglich war, sollte der Einfluss einer potentiellen nDNA-Mutanten-Erfassung durch die Mutationsprimer auf die Mutantenzahlbestimmung ermittelt werden. Dafür sollte zunächst mittels Kopienzahl-PCR für das mitochondriale *CytbB*-Gen und das nukleäre *PIK3CA*-Gen der Grad der Verunreinigung von *TaqI* verdauten mtDNA-Isolate bestimmt werden und darauf aufbauend der Einfluss von potentiell unspezifisch an nDNA bindenden Mutationsprimern evaluiert werden (Kap. 4.2.3.3).

4.2.3.3. Ermittlung der nDNA-Verunreinigung der mtDNA-Isolate

Um den Grad des Einflusses von potentiell unspezifischen Mutationsprimern zu ermitteln und um den Grad der Störung des mtDNA-*TaqI*-Verdaus durch nDNA zu ermitteln, sollte die nDNA Verunreinigung von RMCA-Proben bestimmt werden. Dafür wurde die

mt- und nDNA Kopienzahl von *TaqI*-verdauten mtDNA-Proben-mittels Kopienzahlbestimmungs-PCR von jeweils vier zufällig ausgewählten Fett- und Drüsenproben ermittelt (Anhang: Abbildung 57) und anschließend sowohl aus den Kopienzahlen, als auch aus der daraus errechneten Masse ein Verhältnis gebildet (Abbildung 23). Bezogen auf den mtDNA-Gehalt der jeweiligen Proben ergab sich im Median eine Verunreinigung von 1 Kopie nDNA auf 83 (Spannweite: 35-223) und 32,5 (Spannweite: 9-60) Kopien mtDNA für Fett und Drüse (Anhang: Tabelle 30). Umgerechnet auf die Masse der n- und mtDNA befand sich in den Fettgewebeproben im Median 0,04% (Spannweite 0,02-0,11%) mtDNA und in Drüsengewebeproben 0,02% (Spannweite: 0,01-0,03%) mtDNA (Anhang: Tabelle 30).

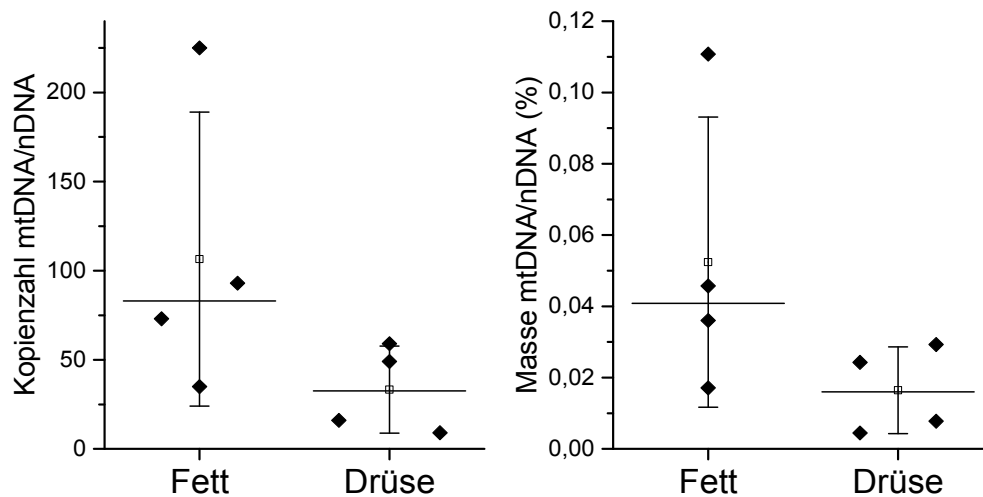


Abbildung 23: Verunreinigung des *TaqI*-Verdau von mtDNA (Kap. 3.2.4.2) mit nDNA bezogen auf die Kopienzahlen (links) und die Masse (rechts). Dargestellt ist jeweils das Verhältnis von 3 abhängig bestimmten und gemittelten Kopienzahlen (Kap. 3.2.4.3) von jeweils 4 Proben. Weder das Kopienzahlverhältnis, noch das Massenverhältnis von Fettgewebeproben unterscheidet sich signifikant von Drüsengewebeproben (gepaarter t-Test, $p=0,20$ und $0,21$). □: Mittelwert, Horizontale Linie: Median, vertikale Linie: Standardabweichung.

Somit ergab sich keine Notwendigkeit weitere Untersuchungen zur Spezifität der Mutantenprimer durchzuführen, da ein eventuell vorhandenes unspezifisches Binden der Primer nur zu einem vernachlässigbaren Fehler führen würde. In der humanen nDNA sind basierend auf Wahrscheinlichkeitsrechnung etwa 3,2 Mio. *TaqI*-Schnittstellen zu finden (Rechnung: Anhang). Die humane mtDNA dagegen besitzt 29 *TaqI*-Schnittstellen (NCBI GenBank® *Accession no.*: NC_012920). Somit kamen im Median etwa 1300 nDNA Schnittstellen auf eine mtDNA-Schnittstelle im Fettgewebe und 3400 im Drüsengewebe. Jedoch werden für den *TaqI*-Verdau etwa 50 ng DNA mit 100 U verdaut (Kap. 3.2.4.2). 1 U ist definiert als die Menge Enzym, die innerhalb einer Stunde 1 μ g

DNA schneidet. Somit konnte eine Störung des *TaqI*-Verdau durch nDNA sehr wahrscheinlich ausgeschlossen werden und mit der weiteren Etablierung der Mutations-PCR fortgeföhren werden.

4.2.3.4. Standardquantifizierung für die Mutations-PCR

Als Standard zu einem ersten Test der Primer in einer SYBR-Green® basierten *real-time*-PCR und gleichzeitigen Ermittlung der produktspezifischen Schmelztemperatur des Mutationsprimer-Produktes (Kap. 4.2.3.5), für Optimierungen der Mutations-PCR (Kap. 4.2.3.6) und zur Ermittlung der Sensitivität der Reaktion (Kap. 4.2.3.7) wurde Mutationsprimer-Produkt als Standard für die Mutations-PCR hergestellt (Kap. 4.2.3.1: Abbildung 17) und fluorimetrisch mittels externer Kalbsthymus-DNA-Kalibrierung quantifiziert (Anhang: Abbildung 58). Dabei wurde ein Gehalt von 3,3 pg/μl ermittelt, was einer Kopienzahl von $1,4 \cdot 10^7$ Kopien/μl (errechnet über das Molekulargewicht der Produkt-Sequenz mittels http://bioinformatics.org/sms2/dna_mw.html) entspricht. Insgesamt wurden abzüglich des zur Quantifizierung eingesetzten Standards 2 ml, bzw 6,6 ng Standard hergestellt und á 40 μl aliquotiert und bei -20°C im Gefrierschrank gelagert. Somit wurde genug Standard für 50 Bestimmungen hergestellt und die Standardmenge ausreichend für einen ersten Test der Mutationsprimer in einer SYBR-Green® basierten *realtime*-PCR (Kap. 4.2.3.5), die Optimierung der Reaktion (Kap. 4.2.3.6) und Sensitivitätsprüfung (Kap. 4.2.3.7).

4.2.3.5. Ermittlung der produktspezifischen Schmelztemperatur

Da bei einer SYBR-Green® basierten *realtime*-PCR auch unspezifische Nebenprodukte und Primer-Dimere zu Amplifikationskurven föhren können, erfolgt im Anschluss zur Identifizierung und Verifizierung der Amplifikationskurven eine Schmelzkurven-Analyse. Dabei besitzt jedes Amplifikat je nach GC-Gehalt und Länge eine individuelle Schmelztemperatur.

Die Schmelztemperatur (T_m) für das Mutationsprodukt lässt sich dabei mit folgender Formel errechnen:

$$S = c_{K^+} + 4 * (c_{Mg^{2+}})^{0,5}$$
$$T_m(^{\circ}C) = 81,5 + 16,6 \log \frac{S}{1,0 + 0,7 * S} + 0,41 * (\%GC) - \left(\frac{500}{L} \right)]$$

L = Anzahl aller Nukleotide der Sequenz, %GC: GC-Gehalt in %.

Die errechnete Schmelztemperatur des Mutationsproduktes betrug 86,5°C.

Zur experimentellen Verifizierung der der produktspezifischen Schmelztemperatur wurde eine *realtime*-PCR mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung mit $6,5 \cdot 10^5$ Kopien Mutations-PCR-Standard als Templat durchgeführt. Dabei wurde am *realtime cycler* eine Schmelzkurve mit einer, von der *realtime cycler* Software SDS 2.4 automatisch ermittelten, Schmelztemperatur von 86,3°C detektiert. Bei der anschließenden gelelektrophoretischen Auftrennung wurde ein Produkt mit der erwarteten Länge von 239 bp detektiert. Somit wurde eine spezifische Schmelzkurve eindeutig dem Mutationsprodukt zugeordnet (Abbildung 24).

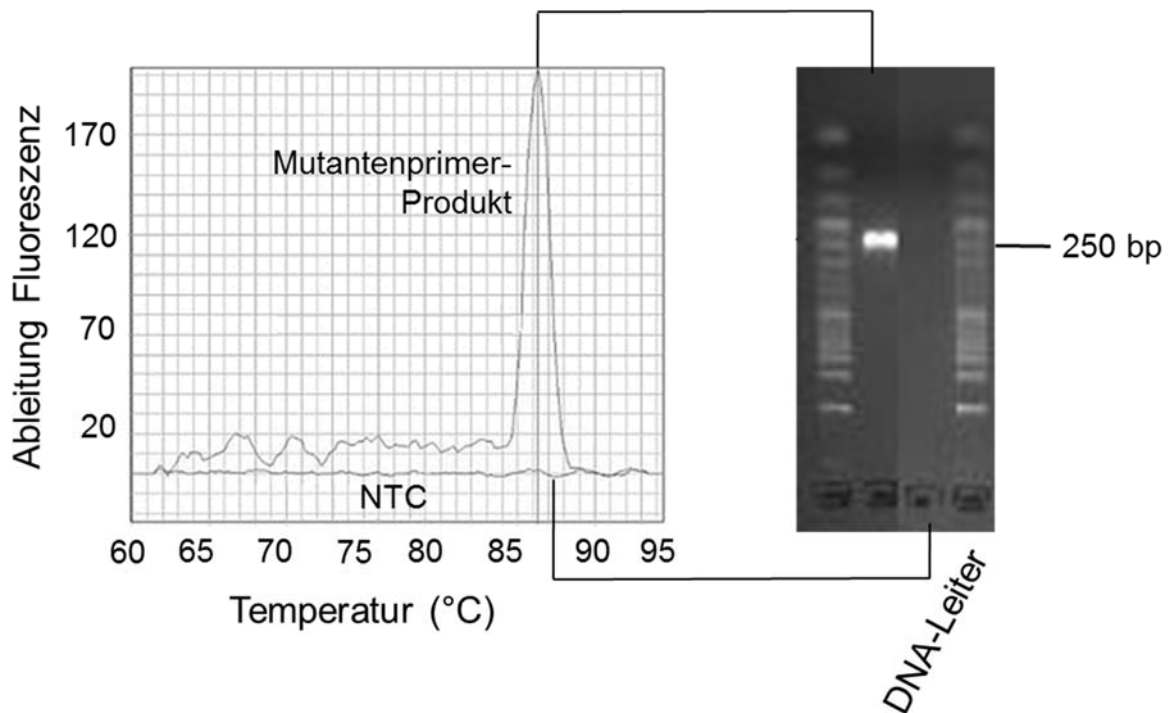


Abbildung 24: Links: Schmelzkurve der Positivkontrolle (Primerkonzentration: 0,4 µM; Templatmenge: $6,5 \cdot 10^5$ Kopien) der Mutations-PCR (Kap. 3.2.4.4) zur Ermittlung der optimalen Primerkonzentration: Auftragung der Temperatur gegen die Ableitung des Fluoreszenzsignals. Schmelztemperatur: 86,3°C. Rechts: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte der zugehörigen *realtime*-Mutations-PCR (Kap. 3.2.6). Agarosegel: 3%ig. Laufzeit: 1 h, 5 V/cm. DNA-Leiter: 50 bp, Mutantenprimer-Produkt: $5,6 \cdot 10^6$ Kopien (Kap. 4.2.3.4), NTC: Blindwert (nf Wasser).

Die empirisch ermittelte Schmelztemperatur liegt normalerweise innerhalb einer Spanne von $\pm 2^\circ\text{C}$ von der errechneten (Wittwer et al., 2001). Die hier experimentell ermittelte Schmelztemperatur (86,3°C) lag $0,2^\circ\text{C}$ unter der errechneten Schmelztemperatur und lag somit innerhalb dieser Spannweite. Für zukünftige Versuche wurden

Produkte mit einer Schmelztemperatur von $86,5 \pm 2^\circ\text{C}$ als Mutationsprimer-Produkt gewertet.

4.2.3.6. Optimierung der Primerkonzentration

Um einzelne Kopien bzw. Mutanten zu amplifizieren, wurde für die *realtime*-PCR zur Mutantenzahlbestimmung eine möglichst hohe Sensitivität angestrebt. Die *Annealing*-Temperatur wurde bereits beim Test der Primer optimiert (Kap. 4.2.3.1).

Zur weiteren Optimierung kann die Zyklenzahl angepasst werden. Sie kann, sofern zu niedrig, Einfluss auf die Ausbeute nehmen oder, sofern zu hoch, zu unspezifischem „Schmier“ führen. Allerdings ist eine Kopie etwa bei ct-Wert 34 detektierbar (Vermulst et al., 2008). Für eine ausreichende Ausbeute für den *TaqI*-Nachverdau und die anschließende Sequenzierung muss genügend Produkt vorhanden sein. Des Weiteren war in den ersten beiden Versuchen kein „Schmier“ zu sehen (Kap. 4.2.3.1 und 4.2.3.5). Daher sollten die von Schmalbach (2014) angewendeten 47 Zyklen zur SMF Bestimmung in nDNA aus humanem Brustgewebe übernommen und nicht weiter optimiert werden. Ebenso sollte die von Schmalbach (2014) optimierte SYBR-Green®-Konzentration von $0,2 \mu\text{M}$ übernommen und nicht weiter optimiert werden. Zu hohe oder zu niedrige MgCl_2 -, dNTP- oder Primerkonzentrationen können einen inhibitorischen Einfluss auf die PCR nehmen. Eine Optimierung der MgCl_2 - und dNTP-Konzentration ist allerdings nur notwendig, falls die Reaktion gar nicht stattfindet (Mülhardt, 2009). Die üblicherweise verwendete Primerkonzentration in einer PCR liegt bei $0,2 \mu\text{M}$. Bei zu geringer Ausbeute kann sie jedoch auf bis zu $4 \mu\text{M}$ erhöht werden. Vermulst et al. (2007) verwendeten in ihrer ursprünglichen Publikation zum mitochondrialen RMCA eine Konzentration von $0,8 \mu\text{M}$. Davon ausgehend sollte eine Primerkonzentration von $0,4 \mu\text{M}$, $0,8 \mu\text{M}$ und $1,2 \mu\text{M}$ getestet werden. Aus Gründen der Wirtschaftlichkeit sollten nur bei Nichtgelingen des Nachweises einer Kopie, weitere Optimierungen vorgenommen werden. Später sollte zwar eine Kopie amplifiziert werden, da allerdings einzelne Kopien einer Poisson-Zufallsverteilung unterworfen sind und somit eventuell nur durch Zufall nicht in der entsprechenden PCR präsent sind, wurde zur Optimierung der Primerkonzentration als unterste Templat-Kopienzahl 6,5 Kopien gewählt. Zur Ermittlung der optimalen Primerkonzentration und zur erneuten Verifizierung der experimentell detektierten produktspezifischen Schmelztemperatur mit der errechneten mit einer größeren Anzahl an Schmelzkurven wurden mit einer Verdün-

nungsreihe von $6,5 \cdot 10^5$ - $6,5 \cdot 10^0$ Kopien Mutations-PCR-Standard mit einer Primerkonzentration von 0,4, 0,8 und 1,2 μM jeweils drei PCRs mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung durchgeführt (Abbildung 25). Dabei wurde bei einem Ansatz mit einer Primerkonzentration von 0,8 μM und einer Kopienzahl von $6,5 \cdot 10^1$ eine Schmelzkurve von $76,0^\circ\text{C}$ und ein unspezifisches Nebenprodukt mit einer Länge von etwa 50 bp detektiert. Bei allen anderen Ansätzen wurde eine Schmelzkurve mit einer Schmelztemperatur zwischen $85,2$ und $88,5^\circ\text{C}$ und nach der gelelektrophoretischen Auftrennung ein Produkt mit der erwarteten Länge von 239 bp detektiert. Somit lagen alle Schmelztemperaturen der Mutationsprodukte innerhalb der erwarteten Spannweite von $84,5$ - $88,5^\circ\text{C}$ (Kap. 4.2.3.5).

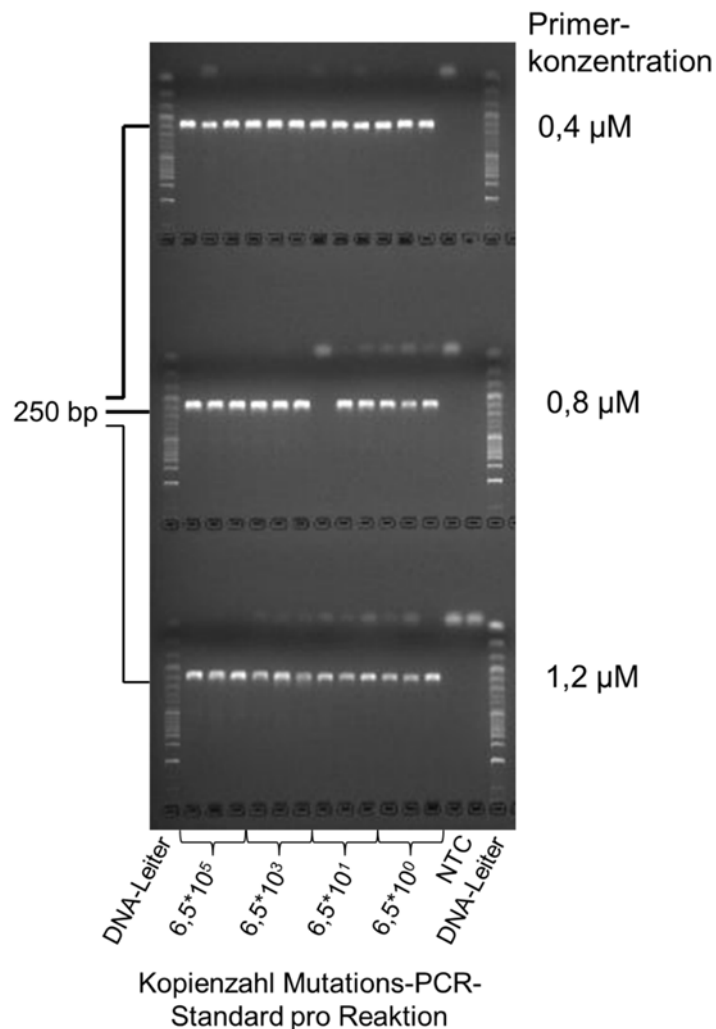


Abbildung 25: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) der PCR-Produkte der Mutations-PCR (Kap. 3.2.4.4) zur Ermittlung der optimalen Primerkonzentration (erwartete Länge jeweils: 239 bp). Agarosegel: 3%ig. Laufzeit: 1 h, 5 V/cm. Die Zahlen unterhalb der Abbildung geben die jeweils eingesetzte Kopienzahl an Mutations-PCR-Standard (Kap. 4.2.3.4) an. DNA-Leiter: 50 bp, Templat: $5,6 \cdot 10^6$ Kopien Mutantenprimer-PCR-Produkt (Kap. 4.2.3.4), NTC: Blindwert (nf Wasser).

Da bei einer Primerkonzentration von 0,4 μM ebenso wie bei einer Konzentration von 1,2 μM bei allen Ansätzen ein Produkt entstanden ist, wurde aus wirtschaftlichen Gründen 0,4 μM als optimale Primerkonzentration festgelegt.

4.2.3.7. Nachweis einer Kopie

Für die Bestimmung der Anzahl an Mutanten (Mutations-PCR) war es notwendig eine Kopie zu amplifizieren. Um zu ermitteln, ob die Mutations-PCR sensitiv genug war, wurde dreimal unabhängig eine Mutations-PCR mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung mit 13,6 Kopien Mutationsstandard als Templat durchgeführt. Dabei wurden 13,6 Kopien des Mutationsstandards jeweils auf etwa 85 Reaktionen aufgeteilt. So waren laut Poisson-Verteilung bei einer Wahrscheinlichkeit von 0,01% zwei oder mehr Kopien in einer Reaktion enthalten. Und somit war sichergestellt, dass jeweils maximal eine Kopie pro Reaktion als Templatmenge vorhanden war. Des Weiteren sollte in späteren Versuchen die Mutations-PCR ebenfalls mit etwa einer Mutantenanzahl von 5-15 in etwa 80 Reaktionen durchgeführt werden. Nach der Mutations-PCR zum Nachweis einer Kopie wurden im ersten Versuch neun Schmelzkurven mit einer Schmelztemperatur zwischen 86,3 und 86,6°C, im zweiten zwölf (T_m : 85,9-86,2°C) und im dritten ebenfalls zwölf (T_m : 86,0-86,4°C) detektiert. Um sowohl das Produkt zu verifizieren, als auch um zu überprüfen, ob ein *TaqI*-Nachverdau mit falsch positivem unmutiertem PCR-Produkt, also mtDNA, die im ursprünglichen *TaqI*-Verdau nicht verdaut wurde, bei späteren Proben möglich war, wurde mit den Mutationsprodukten ein *TaqI*-Nachverdau mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung durchgeführt. Dabei wurden bei allen Reaktionen (insgesamt 32) die erwarteten *TaqI* verdauten Produkte mit einer Länge von 90 und 149 bp detektiert (Anhang: Abbildung 59).

Somit wurden alle 32 Produkte als unmutiertes Mutationsprimer-Produkt verifiziert. Des Weiteren war ein *TaqI*-Nachverdau mit falsch positivem unmutiertem Mutationsprimer-Produkt möglich. Mittels Poisson-Verteilung wurde ermittelt, dass beim ersten Versuch (neun Produkte in 93 Reaktionen) mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,04%, beim zweiten Versuch (zwölf Produkte in 95 Reaktionen) mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,07% und beim dritten Versuch (zwölf Produkte in 91 Reaktionen) mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,08% zwei oder mehr Kopien in einer Reaktion enthalten waren. Im Mittel wurden somit 11,0 ($\pm 1,7$; 15,7%) anstatt der erwarteten 13,6 Kopien wiedergefunden. Die Anzahl der Wiedergefundenen Kopien wich dabei nicht vom Sollwert ab

(einfacher t-Test, $p=0,12$). Somit war sichergestellt dass mit dieser Methode eine Kopie amplifiziert werden kann. Des Weiteren war somit keine zusätzliche Optimierung der PCR notwendig. Daher wurde mit der mitochondrialen SMF Bestimmung einer exemplarischen Humanprobe zur Plausibilitätsprüfung der Spontanmutationsbestimmung begonnen.

4.2.3.8. Exemplarische Bestimmung der Spontanmutationsfrequenz in humanem Brustdrüsengewebe

Mit der in den vorigen Kapiteln (4.2.1-4.2.3.7) entwickelten und optimierten Methode zur Bestimmung der SMF aus humaner mtDNA sollte vor weiterer Probenmessung zunächst exemplarisch die SMF einer zufällig ausgewählten Probe (DNA aus Brustdrüsengewebe von Probe Nr. 1) ermittelt und auf Plausibilität hin überprüft werden. Dafür wurde zunächst mtDNA isoliert und mit *TaqI* verdaut. Anschließend wurde die Kopienzahl der Probe bestimmt (Anhang: Abbildung 60). Dabei wurde ein Gehalt von $2,5 \cdot 10^4 \pm 3,4\%$ Kopien/ μl und eine interne Wiederfindung von $95,86 \pm 12,65\%$ ermittelt. Die Werte lagen innerhalb der festgelegten Akzeptanzbereiche (Kap. 4.2.2.5) und waren somit nicht als Ausreißer und damit als richtig zu erachten.

Anschließend wurden 5 μl des *TaqI*-Verdau für eine Mutations-PCR eingesetzt und dabei auf 84 Reaktionen aufgeteilt. Dabei wurden 43 Schmelzkurven mit einer Schmelztemperatur zwischen 85,5 und 86,4°C detektiert. Bei dem nachfolgenden *TaqI*-Nachverdau mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung wurden 13 unverdaute Mutationsprimer-Produkte mit der erwarteten Länge von 239 bp detektiert (Anhang: Abbildung 61).

Die insgesamt 13 Mutationsprimer-Produkte wurden gelaufgereinigt und nach Sanger sequenziert. Die Sequenzen wurden mit der erwarteten unmutierten Sequenz des Mutationsprimer-Produktes verglichen (Anhang: Abbildung 62). Bei elf Mutanten wurde eine G>A und bei zwei eine T>C Transition detektiert. Somit wurden alle 13 Mutationsprimer-Produkte eindeutig als Mutant verifiziert.

Damit ergab sich für Probe Nr. 1 eine SMF von $2,6 \cdot 10^{-5} \cdot \text{bp}^{-1}$.

Die mitochondriale SMF in gesundem humanem Gewebe liegt zwischen $8 \cdot 10^{-7}$ und $4 \cdot 10^{-4} \cdot \text{bp}^{-1}$ (Kap. 1.1: Tabelle 1). Die hier ermittelte SMF von $2,6 \cdot 10^{-5} \cdot \text{bp}^{-1}$ lag innerhalb

dieses Rahmens und wurde somit als plausibel angenommen. Somit konnte mit der weiteren Probenmessung fortgefahren werden.

4.2.3.9. Methodische Schwankung der Spontanmutationsbestimmung

Um zu ermitteln, ob eine Einfach-SMF-Bestimmung ausreichend ist, sollte die methodische Schwankung der SMF-Bestimmung bestimmt werden. Dafür wurde die mtDNA eines Drüsengewebsaliquots nach der Homogenisierung in drei separaten Aufarbeitungen isoliert und anschließend daraus jeweils eine SMF von 1, 2 und $6 \cdot 10^{-5}$ bp⁻¹ ermittelt. Aufgrund des seltenen Auftretens von Mutanten und der Tatsache, dass die Anzahl an Mutanten logischerweise immer eine ganze unteilbare Zahl ist, muss von einer gewissen Zufallsschwankung der Mutantenanzahl ausgegangen werden. Da zusätzlich zur Bestimmung der Anzahl an Mutanten noch die Bestimmung der Kopienzahl als fehlerbehafteter Wert in die SMF eingeht, wurde die Verteilung der ermittelten Werte innerhalb weniger als einer Spannweite von 1-6 ($\cdot 10^{-5}$) als akzeptabel angesehen und im Folgenden auf eine Mehrfachbestimmung der SMF von einzelnen Proben aus Kostengründen verzichtet.

4.2.4. Ermittlung von Spontanmutationsfrequenzen

Da nur acht Proben aus reinem Drüsengewebe im Vergleich zu 44 reinen Fettgewebeproben von insgesamt 50 akquirierten Proben zur Verfügung standen (Anhang: Tabelle 31), sollten mit der entwickelten Methode zur Bestimmung der SMF in mtDNA aus humanem Brustgewebe zunächst die SMF von Fett- und Drüsengewebe verglichen werden, um zu ermitteln, ob Fettgewebe ebensogut die SMF in Brustgewebe abbildet (Kap. 4.2.4.1). Anschließend sollte die SMF von allen vom Lehrstuhl gesammelten geeigneten Proben bestimmt werden, die dabei ermittelten Kopienzahlen reevaluiert werden (Kap. 4.2.4.2.1), die ebenfalls dabei erhobenen Sequenzierungsergebnisse reevaluiert (Kap. 4.2.4.2.2) und auf ihre Plausibilität hin betrachtet (Kap. 4.2.4.2.3) und anschließend Einflussfaktoren auf die SMF ermittelt werden (Kap. 4.2.5).

4.2.4.1. Vergleich Spontanmutationsfrequenzen Fett- und Drüsengewebe

Die weibliche Brust besteht hauptsächlich aus Drüsen- und Fettgewebe (Ramsay et al., 2005). Reines Drüsengewebe ist allerdings selten. So stand nach Akquirierung von 50 Gewebespenden, Separation und optischer Einteilung nach Fettgehalt nur von acht Proben Drüsengewebe in ausreichender Menge (6 g, Kap. 3.2.3) zur Verfügung. Bei

insgesamt 29 Proben war genügend Drüsengewebe mit bis zu 25% anhaftendem Fett vorhanden. Dagegen stand von 44 Proben reines Fett zur Verfügung (Anhang: Tabelle 31). Über mitochondriale Spontanmutationsunterschiede innerhalb desselben Organs/Gewebe ist wenig bekannt. Aufgrund der größeren zur Verfügung stehenden Anzahl an Fettproben sollte untersucht werden, ob an Drüsengewebe anhaftendes Fett einen Einfluss auf die SMF nimmt und ob eventuell reines Fettgewebe für die Untersuchung von SMF in Brustgewebsproben herangezogen werden kann. Dafür wurde die SMF jeweils in drei nach optischer Einteilung reinen Fett- und jeweils drei reinen Drüsengewebs-Aliquoten von insgesamt vier Proben (Probe Nr. 8, 11, 13 und 38) ermittelt und zunächst die Mutationspektren der Mutantenverifizierung verglichen. Sequenzierungsergebnisse von einem Probenaliquot von Probe Nr. 1 wurden dabei zusätzlich berücksichtigt, da die SMF von Probe Nr. 1 ebenfalls von Fett- und Drüsengewebe bestimmt worden war. Vom Fettgewebe von Probe Nr. 1 standen nur fünf auswertbare Elektropherogramme zur Verfügung, da von sieben detektierten Mutanten zwei Elektropherogramme nicht auswertbar waren. Zum Vergleich der Mutationsspektren wurden die Ergebnisse von jeweils sieben (bzw. fünf) zufällig ausgewählten Sequenzierungsergebnissen der fünf Proben jeweils für Fett- und Drüsengewebe zusammengefasst (Abbildung 26). Statistisch unterschieden sich die Mutationsspektren von Fett- und Drüsengewebe nicht signifikant (multiple Fisher's-exact-Tests, $p=0,23$).

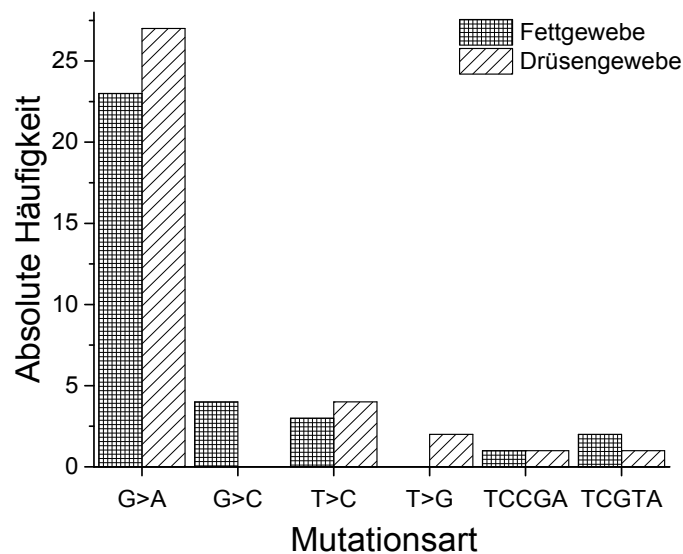


Abbildung 26: Art und absolute Häufigkeit von Mutationen in Fettgewebe (insgesamt 33 Mutanten detektiert in Gewebe von fünf Frauen) und Drüsengewebe (insgesamt 35 Mutanten detektiert in Gewebe von fünf Frauen) innerhalb der *TaqI*-Schnittstelle (Wildtyp: TCGA) des mitochondrialen *CytB*-Gens. Dargestellt sind die zusammengefassten Ergebnisse von jeweils 7 (bzw. 5) zufällig ausgewählten Sequenzierungsergebnissen (Kap. 3.2.8) von fünf Proben. Statistisch unterscheiden sich die Mutationsspektren von Fett- und Drüsengewebe nicht signifikant ($p=0,23$, Intervall: 0,22-0,25, multiple Fisher's exact test Iterationen nach Cariello et al., 1994).

Anschließend wurde die SMF von Fett- und Drüsengewebe von vier Proben sowohl individuell für jede Probe, als auch interindividuell die aufaddierte SMF aller Proben mittels t-Test verglichen (Abbildung 27). Beim individuellen Vergleich wurde Probe Nr. 38 ausgeschlossen, da die drei Messergebnisse einen Ausreißer (Drüsengewebe: $25 \cdot 10^{-5} \text{bp}^{-1}$, Grubbs-Test, $p=0,09$) enthielten. Alle anderen Ergebnisse enthielten keinen Ausreißer ($p < 0,05$). Zum interindividuellen Vergleich wurden die gescreenten Basenpaare und Mutanten der einzelnen Proben aufaddiert und daraus eine neue SMF errechnet. Dabei bestand weder einzeln betrachtet, noch auf die Gesamtheit der Proben bezogen ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der SMF in Fett- und Drüsengewebe (t-Test, $p=0,13-0,60$). Bei Betrachtung der individuellen Spannweiten der einzelnen SMF lagen die SMF von zwei Proben (Probe Nr. 11 Fett- und Probe Nr. 38 Drüsengewebe) mit einer Spannweite von 4-78 und $0,3-25 \cdot 10^{-5} \text{bp}^{-1}$ nicht innerhalb der Spannweite der Messunsicherheit des RMCA (Faktor 6, Kap. 4.2.3.9). Eine mögliche Erklärung für diese Abweichung ist die klonale Expansion von somatischen mtDNA Mutationen, welche zumindest intrazellulär ein häufig auftretendes Ereignis ist (Nekhaeva et al., 2002), zusammen mit der Proliferation des Gewebes. Alle

restlichen Proben lagen jeweils individuell und separat für Fett- und Drüsengewebe betrachtet innerhalb der Spannweite der Messunsicherheit des RMCAs.

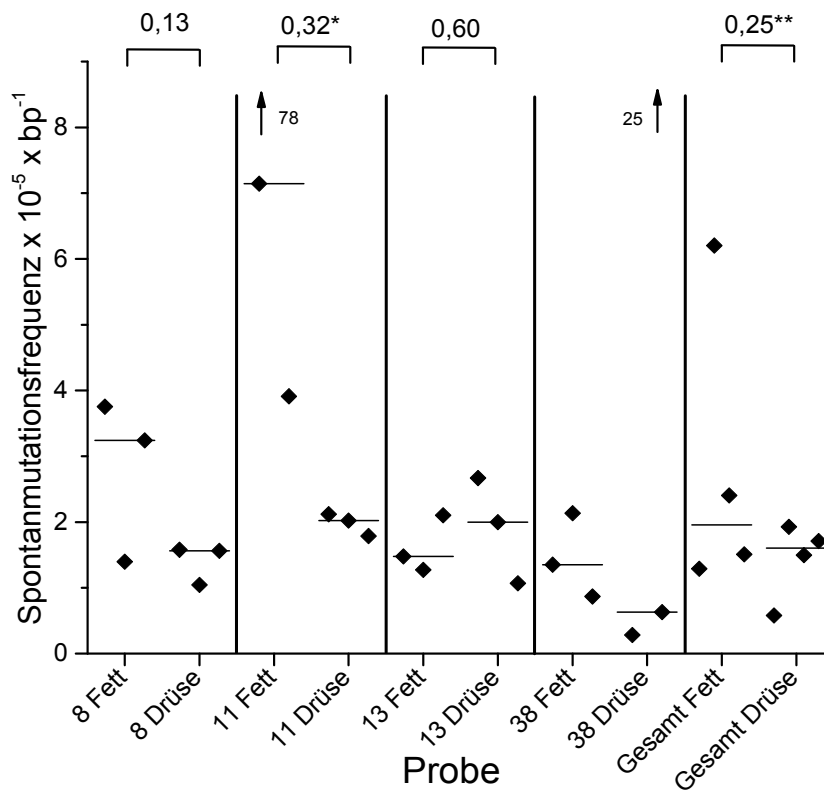


Abbildung 27: Mitochondriale SMF (Kap. 3.2.4) von 4 Brustgewebsproben zur Ermittlung eventuell vorhandener Unterschiede hinsichtlich der SMF in Fett und Drüsengewebe. Zahlen oberhalb des Diagramms geben den jeweiligen mittels t-Test ermittelten p-Wert an. *:Welch-Korrektur aufgrund nicht vorhandener Varianzenhomogenität; **: gepaarter t-Test. Horizontale Linie: Median.

Da mehr Fettgewebsproben als Drüsengewebsproben (44 im Vergleich zu acht reinen bzw. 29 mit maximal 25% anhaftendem Fett) zur Verfügung standen, bezüglich der SMF der beiden Gewebearten kein statistisch signifikanter Unterschied besteht (Abbildung 27) und das Fettgewebe eine höhere mtDNA-Reinheit als das Drüsengewebe aufweist (Kap. 4.2.3.3) und somit weniger Störungen des *TaqI*-Verdau zu erwarten sind, wurde im Folgenden aus Kostengründen darauf verzichtet die SMF in Drüsengewebe zu bestimmen. Anstatt dessen sollte die SMF in 44 Fettgewebsproben ermittelt (Kap. 4.2.4.2) und Einflüsse darauf bestimmt werden (Kap. 4.2.5).

4.2.4.2. Bestimmung der mitochondrialen Spontanmutationsfrequenz in humanem Brustfettgewebe

Zur Identifizierung der Einflussfaktoren auf die SMF in mtDNA aus humanen Brustfettgewebsproben wurde zunächst die SMF von insgesamt 44 Proben ermittelt. Nach

optischer Beurteilung lag bei den Daten eine leicht rechtschiefe Verteilung vor, dennoch werden die Daten als normalverteilt angesehen (Abbildung 28). Deshalb wurde die Datenauswertung mittels parametrischer Verfahren vorgenommen. Anschließend sollten zunächst die bei der SMF-Bestimmung erhobenen Teil-Daten (Kopienzahlen, Mutantenverifizierung und Mutationsspektren) einzeln evaluiert werden (Kap. 4.2.4.2.1, 4.2.4.2.2 und 4.2.4.2.3), bevor Einflussfaktoren auf die mitochondriale SMF bestimmt werden sollten (Kap. 4.2.5).

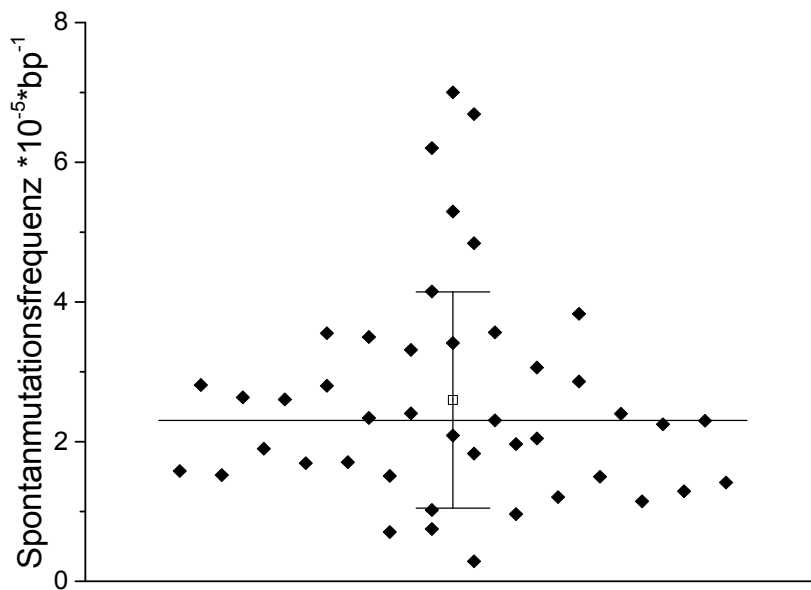


Abbildung 28: Verteilung der in mtDNA aus 44 humanen Brustfettgewebeproben ermittelten SMF (Kap. 3.2.4). □: Mittelwert, Horizontale Linie: Median, vertikale Linie: Standardabweichung.

4.2.4.2.1. Reevaluierung der Schwankung der Kopienzahlbestimmung und Standard-Wiederfindungsrate bei Realproben

Nach der abgeschlossenen Probenmessung (Kap. 4.2.4) sollten die erhobenen Kopienzahlen reevaluiert werden. Dabei sollte betrachtet werden, ob die in Kap. 4.2.2.5 auf Grundlage von 31 Messungen festgelegten Grenzen zur Identifizierung von Ausreißern mit nun 129 Messdaten aussagekräftig waren. Zusätzlich sollte, da bei der Standard-Wiederfindung in Realproben die Menge des zugefügten Standards eine nicht unerhebliche Rolle spielt (Kap. 4.2.2.5), ermittelt werden, ob die gewählte untere Grenze des Verhältnisses zwischen Standardzugabe- und der Probenkopienzahl (VSP) von 30% sinnvoll war. Dafür wurden sowohl alle ermittelten Kopienzahl-Standardabweichungen, als auch alle zugehörigen Standard-Wiederfindungsraten mit

Standardabweichungen grafisch bei verschiedenen VSP aufgetragen und jeweils das 90. bzw. zusätzlich das 10. Perzentil der Wiederfindungsrate ermittelt (Abbildung 29). Das VSP nahm nur einen marginalen Einfluss auf die Wiederfindungsrate (62%-116% bei 50% im Vergleich zu 59%-118% bei 10%), dagegen streute bei einem VSP von 10% die Standardabweichung der Wiederfindung um absolut 8% mehr im Vergleich zu 30% (41% zu 33%). Bei einem VSP von 50% war die Streuung vergleichbar zur Streuung bei 30% (32% zu 33%). Daher wird die in Kap. 4.2.2.5 festgelegte untere Grenze des VSP von 30% für zukünftige Probenmessungen empfohlen.

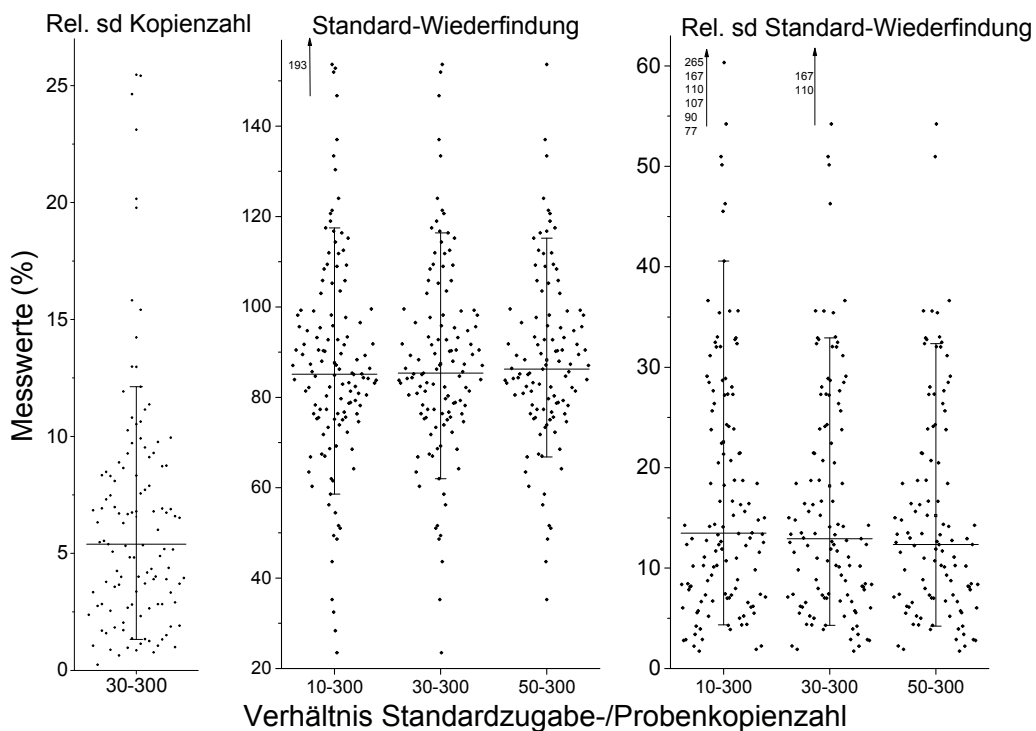


Abbildung 29: Verteilung der ermittelten Werte der relativen Standardabweichung (rel. sd) der Kopienzahl (links), der Wiederfindungsrate des internen Standards (mitte) und der relativen Standardabweichung der Wiederfindungsrate des internen Standards (rechts) bei verschiedenen VSP (Kopienzahlbestimmung nach Kap. 3.2.4.3). Vertikale Linie: 10.-90. Perzentil. Bei der rel. sd der Kopienzahl ist nur ein Verhältnis aufgetragen, da dort das Standard/Probenverhältnis keine Rolle spielt. Horizontale Linie innerhalb der Box: Median; □: Mittelwert.

Beim Vergleich mit den in Kap. 4.2.2.5 ermittelten Grenzen zur Identifizierung von Ausreißern fiel auf, dass das 90. Perzentil der Messwerte von 119 Proben (Ausschluss von 9 Proben $VSP < 30\%$), sowohl bei der Standardabweichung der Proben, als auch bei der Standardabweichung der Standard-Wiederfindungsrate um absolut 1% höher lagen (12 im Vergleich zu 11% und 33 im Vergleich zu 32%) und somit bereits die

Werte von 31 Proben genug Aussagekraft besessen hatten. Bei Betrachtung der Standard-Wiederfindungsrate dagegen, lag sowohl das 90., als auch 10. Perzentil der 119 Messwerte absolut um 6 bzw. 7% näher an 100% im Vergleich zu 31 Messwerten (62-117% im Vergleich zu 56-124%). Dies zeigte, dass die Wiederfindungsraten bei 31 Messwerten noch nicht repräsentativ für eine größere Anzahl an Proben gewesen waren.

Zusammengefasst lag das reevaluierte 90. Perzentil der Proben-Standardabweichung bei $\leq 12\%$, das 10.-90. Perzentil der Wiederfindungsrate bei 62%-117% und das 90. Perzentil der sd der Wiederfindung bei $\leq 33\%$ (Tabelle 17). Bei der Wiederfindung nach Standardaddition wird derselben Menge Probe, die zur Kopienzahlbestimmung verwendet wurde, zusätzlich Standard hinzugefügt. Daher war die Standardabweichung der Wiederfindung größer als die Standardabweichung der Proben, da hier die Methodenschwankung überproportional einging.

Tabelle 17: 90. Perzentile der Messwertverteilungen der reevaluierten Kopienzahlbestimmungen bei einem VSP von 30-300%. Rel. sd: Relative Standardabweichung.

90. Perzentil der Messwert-Verteilung	
Rel. sd Probe	$\leq 12\%$
Interne Wiederfindungsrate	62-117%
Rel. sd Interne Wiederfindungsrate	$\leq 33\%$

Insgesamt betrachtet waren mit den in Kap. 4.2.2.5 festgesetzten Grenzen 34 und mit den reevaluierten Grenzen 39 von 119 Messwerten, also jeweils etwa jede dritte Messung, zu wiederholen (detaillierte Auflistung in Tabelle 18).

Tabelle 18: Anzahl an jeweils zu wiederholenden Kopienzahlmessungen anhand der in Kapitel 4.2.2.5 ursprünglich festgelegten Qualitätskriterien und anhand der neu evaluierten Qualitätskriterien (Tabelle 17) von insgesamt 119 Messungen. Rel. sd: Relative Standardabweichung.

	Anzahl zu wiederholender Proben bei	
	Anfänglichen Grenzen	Re-evaluierten Grenzen
Rel. sd Probe	11	9
Interne Wiederfindungsrate	13	22
Rel. sd interne Wiederfindungsrate	13	11
Gesamtprobenanzahl	34	39

Insgesamt wurde die Kopienzahlbestimmung bei 17 Proben, die später zur SMF Bestimmung verwendet wurden, aufgrund der in Kap. 4.2.2.5 festgelegten Akzeptanzkriterien ein- oder mehrmals wiederholt. Darunter waren elf Proben deren Wiederfindung nach Standardzugabe oder deren zugehörige Standardabweichung nicht innerhalb der festgelegten Grenzen lag. Im Mittel wich die erneut gemessene Kopienzahl im Vergleich zur ursprünglichen Messung um 25% (Spannweite: 3-64%, Median: 15%) ab (Abbildung 30).

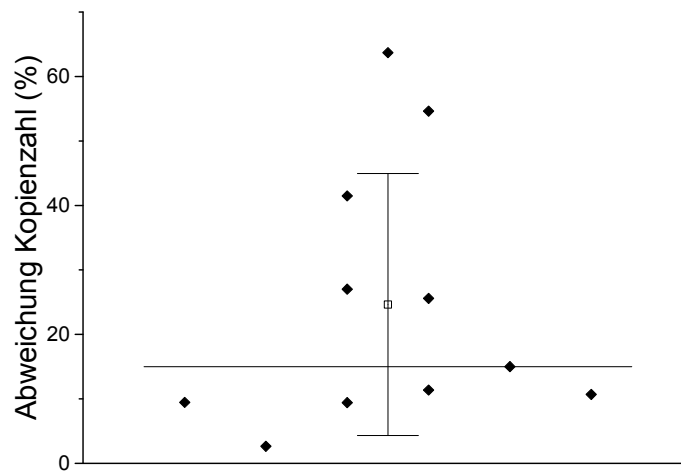


Abbildung 30: Abweichung von Kopienzahlen einer ersten Kopienzahlbestimmung (Kap. 3.2.4.3) von Proben deren Kopienzahlbestimmung aufgrund der in Kap. 4.1.2.5 festgelegten Akzeptanzkriterien ein- oder mehrmals wiederholt wurden vom letztendlich akzeptierten Wert innerhalb der Akzeptanzkriterien. □: Mittelwert, horizontale Linie: Median, vertikale Linie: Standardabweichung. Gezeigt sind die Abweichungen von elf Proben.

Über alle Proben, inklusive Proben deren Kopienzahlbestimmung nicht wiederholt wurde und deren Abweichung 0% gesetzt wurde, betrachtet, ergab sich im Mittel eine Abweichung der Kopienzahl von 4% im Vergleich zur ursprünglichen wiederholten Messung. Je nach Anforderung hinsichtlich zu erwartender Unterschiede zwischen den Proben und der erwarteten Effektgröße kann bei zukünftigen SMF Bestimmung anhand der hier ermittelten Kennzahl entschieden werden, ob eine Wiederfindung nach Standardaddition notwendig ist oder nicht. Ohne Wiederfindung nach Standardaddition wäre jede 13. anstatt jede 3. Probenmessung zu wiederholen.

Die Kopienzahl kann hierbei direkt als Surrogat der SMF dienen, da ein linearer Zusammenhang zwischen der Kopienzahl und dem sich daraus ergebenden Mutationsfrequenz besteht. Die SMF besteht im Wesentlichen aus zwei analytisch ermittelten

Größen: der Kopienzahl und der Mutantenzahl. Die Mutationsfrequenz errechnet sich dabei durch folgende Formeln (abgeändert nach Bielas und Loeb, 2005):

$$\text{Mutantenfrequenz} = \frac{\text{Mutanten}}{\text{Gesamtkopienzahl}}$$

$$\text{Mutationsfrequenz} = \frac{\text{Mutantenfrequenz}}{\text{Anzahl Basen}} = \left(\frac{\text{Mutanten}}{\text{Gesamtkopienzahl}} \right) / 4$$

Daraus lässt sich unter der Annahme einer gleichbleibenden Mutantenzahl (8 Mutanten im folgenden Beispiel), eine asymptotische Funktion $y = (8/x)/4 = 2/x$ ableiten. Aus jener Funktion ergibt sich z.B. bei einer Verdoppelung der Kopienzahl eine Halbierung der Mutationsfrequenz. Dabei ist die absolute Anzahl der Mutanten unerheblich, solange sie als konstant angesehen wird. Nach der Kopienzahl sollten nun die Sequenzierungsergebnisse evaluiert werden.

4.2.4.2.2. Verifizierung der Mutanten

Um den Anteil an falsch positiven Mutanten, also Wildtyp-PCR-Produkte die im *TaqI*-Nachverdau nicht geschnitten wurden, zu identifizieren und so die detektierten Mutanten zu verifizieren und um Gelbanden die nicht zweifelsfrei als Mutant identifiziert werden konnten ebenso eindeutig zuordnen zu können, wurden pro Probe exemplarisch jeweils zufällig drei Mutanten nach Sanger sequenziert. Nicht zweifelsfrei als Mutant identifizierbare Banden waren hierbei Banden mit einer extrem schwachen Intensität oder Banden die maximal 50 bp unterhalb der erwarteten Position lagen bzw. maximal 50 bp länger waren als erwartet. Diese Banden wurden dabei, im Gegensatz zum Rest der insgesamt drei jeweils sequenzierten Mutanten, gezielt ausgewählt.

Insgesamt wurden elf Banden gezielt ausgewählt. Zwei davon waren Banden unterhalb der erwarteten Position. Davon wurde eine Bande als Mutant verifiziert, bei einer Bande war kein auswertbares Elektropherogramm vorhanden. Neun gezielt ausgewählte Banden waren Banden mit einer extrem schwachen Intensität. Davon wurden fünf als Mutant verifiziert, drei waren ein unspezifisches Nebenprodukt, dessen Sequenz nicht mit dem Mutationsprodukt übereinstimmte und eine Mutante hatte kein auswertbares Elektropherogramm. Gezielt ausgewählte Mutanten die nicht als Mutant verifiziert werden konnten, wurden aus der Berechnung der SMF ausgeschlossen, da drei von fünf eindeutig keine Mutante waren. Daher wird für zukünftige Messungen empfohlen, weiterhin Banden etwas unterhalb der erwarteten Position und Banden mit

sehr schwacher Intensität gezielt zu sequenzieren und eben jene nicht als Mutante zu werten, sofern das Sequenzierungsergebnis nicht darauf hindeutet.

Von den 185 zufällig ausgewählten Banden waren sechs ohne auswertbares Elektropherogramm. Das Sequenzierungsergebnis deutete auf degradierte DNA hin, welche z.B. durch zu lange UV-Licht-Bestrahlung während des Ausschneidens der Mutanten aus dem Agarosegel unter der UV-Bank oder durch zu lange Lagerung z.B. beim Versenden der DNA zum Sequenzieren entstehen kann. Diese sechs Mutanten wurden zur Berechnung der SMF mit herangezogen, da sowohl ihre Schmelzkurve, als auch ihre Bande bei der gelelektrophoretischen Auftrennung dem Mutationsprodukt eindeutig zugeordnet werden konnte. Alle Mutanten ohne auswertbares Elektropherogramm wurden nicht erneut sequenziert, da jeweils die komplette geextrahierte DNA zur Sequenzierung eingesetzt wurde. Von allen 179 nicht gezielt ausgewählten Banden mit auswertbarem Elektropherogramm war kein PCR-Produkt ein unspezifisches Nebenprodukt. Somit wurde bei 96,6% der eindeutig der Mutations-PCR-Produktbande zuordenbaren Mutanten eine Mutation nachgewiesen und lediglich über 3,2% (sechs nicht erfolgreiche Sequenzierungen von 185) war keine zweifelsfreie Aussage möglich. Da bei keiner zufällig ausgewählten Bande zweifelsfrei der *TaqI*-Schnittstellen Wildtyp detektiert wurde, wird für zukünftige Messungen empfohlen, keine eindeutig zuordenbaren Banden mehr zu sequenzieren.

Insgesamt hatten 14 von 193 Sequenzierungen (Fettgewebe: 144 und Drüsengewebe 35) bzw. 7,3% kein auswertbares Elektropherogramm oder eine unspezifische Sequenz, die nicht mit dem Mutationsprodukt übereinstimmte.

Zusätzlich zum reinen Vorhandensein einer Mutation sollten die Sequenzierungsergebnisse nach Art der Mutation evaluiert werden.

4.2.4.2.3. Mutationsspektrum der Fettgewebeproben

Zur Plausibilitätsprüfung der erhobenen Sequenzierungsergebnisse sollten die Mutationsspektren mit anderen Studien verglichen werden. Aufgrund einzelner nicht-auswertbarer Elektropherogramme (Kap. 4.2.4.2.2) standen von einzelnen Proben nur zwei auswertbare Elektropherogramme zur Verfügung. Um einen gleichen Einfluss jeder einzelnen Probe auf das Ergebnis zu gewährleisten, wurden pro Probe zwei Mutanten zufällig ausgewählt und anschließend alle 88 Mutanten der 44 Fettgewebeproben zusammengefasst (Abbildung 31).

Überwiegend, mit einem Anteil von 72%, wurde eine G>A Transition detektiert. Als zweithäufigste Substitution wurde ein T>C Transition (20%) detektiert. Insgesamt lag der gerundete Anteil an Transitionen bei 92%, Transversionen bei 6% und Insertionen bei 2%.

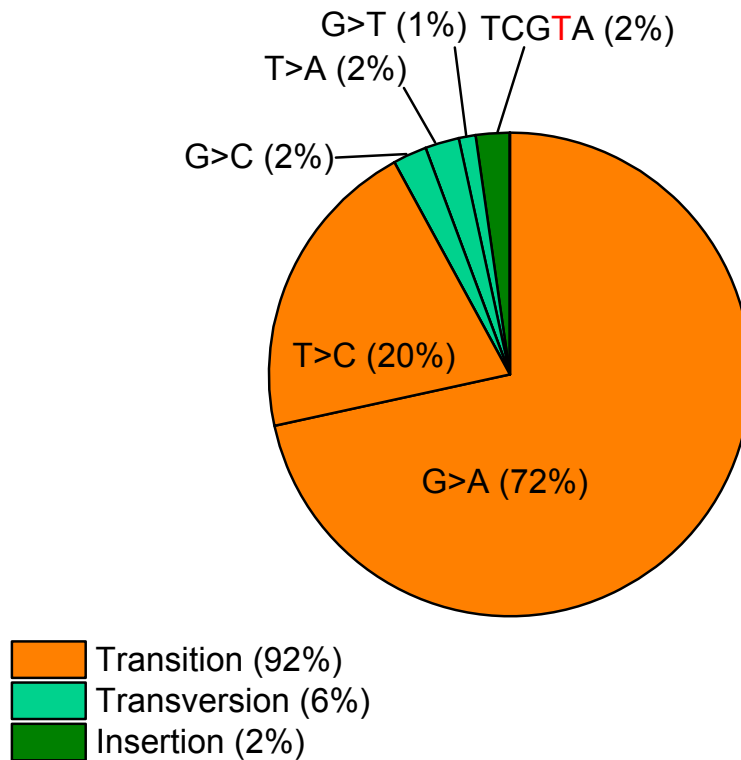


Abbildung 31: Sequenzierungsergebnisse der *TaqI*-Schnittstelle (Wildtyp: TCGA) der Mutantenverifizierung (Kap. 3.2.8). Dargestellt sind die Ergebnisse von 88 Sequenzierungen aus 44 Fettgewebeproben. In Klammern dargestellt ist jeweils der gerundete Anteil der jeweiligen Mutationsart. **Rot**: Insertion.

Der Anteil an C:G>T:A (72%) und der Anteil an T:A>C:G Transitionen (20%) lag innerhalb der Spannweite von Sequenzierungsergebnissen von Spontanmutanten aus humaner mtDNA anderer Studien (42-75% und 15-48%, Tabelle 19). Der Anteil an Transversionen (6%) und der Anteil an Insertionen (2%) lag ebenso innerhalb der Spannweite von Sequenzierungsergebnissen anderer Studien (4-21% und 2-16%).

Tabelle 19: Prozentuale Verteilung der ermittelten Mutationen nach Sequenzierung von Proben aus humaner mtDNA aus weiblichem Brustgewebe im Vergleich zu Sequenzierungsergebnissen aus humanen mtDNA-Proben anderer Studien. PKS: PCR-Produkt Klonierungs/Sequenzierungsstrategie, dNGS: duplex NGS.

Gewebe	Methodik	Mutationsart				
		C:G>T:A	T:A>C:G	Transversion	Insertion	
weibliche Brust	RMCA	72%	20%	6%	2%	
Synovialmembran	RMCA	~48%	~48%	~4%	-	Biniecka et al. (2011)
kolorektal	RMCA	60%	24%	~16%		Greaves et al. (2014)
kolorektal	RMCA	~75%	~15%	~4%	~6%	Ericson et al. (2012)
Gehirn	PKS	88%		10%	2%	Lin et al. (2002)
Gehirn	dNGS	~43%	~29%	~12%	~16%	Kennedy et al. (2013)
weibliche Brust	dNGS	~42%	~37%	~21%	-	Ahn et al. (2015)

C:G>T:A ist unabhängig von der Spezies die häufigste mtDNA Mutation (zusammengefasst in Kauppila und Stewart, 2015). Für die Entstehung dieser Mutation gibt es mehrere Mechanismen:

- Über eine hydrolytische oder oxidative Desaminierung von Cystein, welche zu Uracil bzw. 5-Hydroxy-Uracil führt, das als Templat für Adenin bei der Replikation dienen kann (Lindahl, 1993 und Thiviyathan et al., 2008).
- Über eine oxidative Desaminierung von Guanin auf dem komplementären Strang, welche zu Xanthin oder Oxanin führt, welches als Templat für Thymin dienen kann (Xia et al., 2014).
- Durch Einbau-Fehler der mitochondrialen Polymerase γ bei der Replikation (Zheng et al., 2006).

Eine G>A Transition kann zwar bei Läsionen, die Konformationsänderungen induzieren, vorkommen, z.B. bei der Oxidation von Guanin zu 8-Hydroxy-deoxy-Guanosin (8-OH-dG, Cooke et al., 2003). Jedoch werden G>A Transitionen hauptsächlich auf spontaninduzierte Entstehung zurückgeführt (zusammengefasst in Kauppila und Stewart, 2015).

Durch freie Radikale induzierte 8-OH-dG DNA-Läsionen führen überwiegend zu einer G:C>T:A Transversion (Wu et al., 2004).

Eine T:A>C:G Transversion kann durch spontane Desaminierung von Adenin entstehen. Dabei entsteht Inosin, welches als Templat für Guanin dienen kann (Nordmann

et al., 1988). Ebenso kann eine T:A>C:G Transversion durch eine T-dGTP-Misspaarung bei der Replikation durch ineffizientes *proofreading* der Polymerase entstehen (Song et al., 2005).

Alle anderen Mutationen (C:G>G:C und T:A>A:T) können über Basenfehlpaarungen und eine daraus entstehende Mutation bei der Replikation erklärt werden (Topal und Fresco, 1976 und Danilov et al., 2005).

Insertionen können durch „Verrutschen“ der Polymerase bei der Replikation, sogenanntes *strand slippage*, entstehen (Banavali, 2013). Ebenso können sie bei der Interkalation von exogenen Molekülen mit DNA und anschließender Replikation entstehen.

4.2.5. Einflussfaktoren auf die mitochondriale Spontanmutationsfrequenz

Um Einflussfaktoren auf die mitochondriale SMF in humanem Brustfettgewebe zu untersuchen, wurde eine Methode benötigt, die mehr als eine Variable berücksichtigt. Dafür wurde die multiple lineare Regression gewählt. Für eine multiple lineare Regression können nur komplette Datensätze verwendet werden. Des Weiteren müssen mehr Beobachtungen als erklärende Variablen (*explanatory variables*, exVars) vorhanden sein. Als Qualitätskriterium dienen der adjustierte Variationskoeffizient R^2 und das Verhältnis aus Beobachtungen und selektierten exVars (O/ExVar-Verhältnis). Das R^2 beschreibt wieviel Prozent der Varianz der abhängigen Variable durch die exVars erklärt werden. So bedeutet zum Beispiel, dass ein R^2 von 0,7 70% der Varianz der abhängigen Variable erklärt. Das O/ExVar-Verhältnis beschreibt wieviele Beobachtungen einer erklärenden Variable gegenüberstehen und sollte möglichst größer fünf sein (Bryant und Yarnold, 1995, Everitt, 1975, Garson, 2008 und Gorsuch, 1983). Als abhängige Variable wurde die mitochondriale SMF verwendet.

Als erklärende Variablen wurden aufgrund der in der Literatur bereits beschriebenen Altersabhängigkeit der mitochondrialen SMF in humanen Gehirnen und im Tierversuch (Kap. 1.1.5) das Alter verwendet. GCLC, NQO1 und GSTs sind Marker für oxidativen Stress (Kap. 1.1.5). Deswegen wurden die Transkriptspiegel der Gene die für GCLC, NQO1, GSTP1, GSTM1 und GSTT1 kodieren als erklärende Variablen berücksichtigt. Als Marker für die durch einen entsprechenden Polymorphismus veränderte Enzymaktivität von Enzymen, die oxidativen Stress verursachende Verbindungen konjugieren, wurden die Genotypen der *GSTP1*, *GSTM1* und *GSTT1* als erklärende Variablen berücksichtigt. Ein erhöhter BMI steht in Zusammenhang mit proinflammatorischen

Mediatoren im Fettgewebe (Kap. 1.1.5). Daher wurde der BMI und der gravimetrisch ermittelte Fettgehalt des Gewebes ebenso berücksichtigt. Oxysterolverbindungen entstehen bei oxidativem Stress spontan (Kap. 1.1.5). Die Fettgewebespiegel der Oxysterole 7α -HO-, 7β -HO-, 7Keto-, 5,6- α -Epoxy- und 5,6- β -Epoxy-Cholesterol der Brustgewebeproben korrelierten alle jeweils miteinander (Spearman, jeweils $p < 0,0001$). Dies kann dazu führen, dass einzelne Oxysterole aufgrund der Kollinearität nicht in das spätere Modell selektiert werden. Daher wurden die Oxysterole in einer Hauptkomponentenanalyse zu zwei Hauptkomponenten zusammengefasst (Anhang: Tabelle 34). Hauptkomponente 1 war hauptsächlich negativ durch 7α -HO-, 7β -HO-, 7Keto- und 5,6- α -Epoxy-Cholesterol und Hauptkomponente 2 hauptsächlich negativ durch 5,6- α - und 5,6- β -Epoxy-Cholesterol charakterisiert (Abbildung 32). Die Oxysterolgewebespiegel Hauptkomponenten wurden als exVars berücksichtigt.

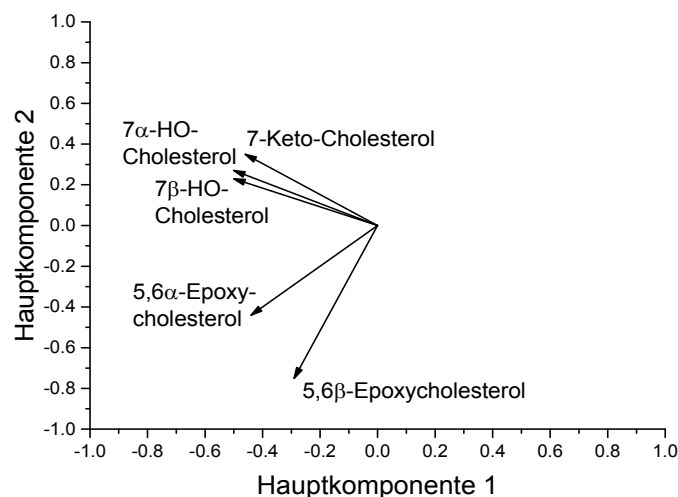


Abbildung 32: Beschreibung der zwei aus Oxysterol-Gewebespiegeln errechneten Hauptkomponenten. Die Richtung der Pfeile gibt den Einfluss der jeweiligen Verbindung auf die Hauptkomponenten an.

7α -HO- und 7Keto-Cholesterol können im Gegensatz zu 7β -HO-, 5,6- α -Epoxy- und 5,6- β -Epoxycholesterol auch enzymatisch gebildet werden (zusammengefasst in Niki et al., 2005). Deswegen wurde eine aus 7β -HO-, 5,6- α - und 5,6- β -Epoxycholesterolspiegeln gebildete Summe als Oxysterolsummen-Marker für oxidativen Stress ebenfalls als exVar berücksichtigt. Zusätzlich wurde ein Verhältnis der 7β -HO-, 5,6- α - und 5,6- β -Oxysterolspiegelsumme mit dem Cholesterolgewebespiegel als Maß

für den Anteil an nicht enzymatischer, oxidativer Umsetzung des Cholesterols gebildet und ebenfalls als exVar berücksichtigt.

Eine Induktion von oxidativem Stress im Tierversuch in Mitochondrien durch EE und E2 wurde in der Literatur bereits beschrieben (Kap. 1.1.5). E2 kann des Weiteren über einen NFE2L2-vermittelten Signalweg zu einer erhöhten Biogenese von Mitochondrien und somit potentiell zu einer erhöhten spontaninduzierten mtDNA-Mutationsrate führen (Kap. 1.1.1). Als Proliferationsmarker diene das Verhältnis zwischen n- und mtDNA (Kap. 1.1.1). CYP1A1 und 1B1 können über die Bildung von Estrogenchinonen zu DNA Addukten auf der mtDNA und über *Redox-Cycling* der Chinone zu oxidativem Stress beitragen (Kap. 1.1.5). Daher wurden E1- und E2-Gewebespiegel, die Transkriptspiegel von *CYP1A1* und *1B1* und der *CYP1B1*-Genotyp als kategoriale Variable, die *NFE2L2*-Transkriptspiegel und der mitochondriale Proliferationsmarker (Kopienzahl nDNA/Kopienzahl mtDNA) berücksichtigt (Tabelle 20). Zigarettenrauch enthält zahlreiche Mutagene, die in Fettgewebe löslich sind, auf mitochondriale DNA hatte das Rauchverhalten zumindest in humanem Lungengewebe jedoch keinen Einfluss (Kap. 1.1.5). Daher wurde Rauchen eingeteilt in Raucher/Nichtraucher ebenfalls als exVar berücksichtigt. *GSTT1*- und *CYP1A1*-Transkriptspiegel mehrerer Proben lagen unterhalb des LOD und deren Messwerte wurden durch eben jenen LOD ersetzt. Um den Einfluss der Ersetzungen auf das Ergebnis der Regressionsanalyse zu ermitteln wurde eine kategoriale \leq LOD/ $>$ LOD-Ersetzungsvariable der beiden Transkripte mit $>$ LOD als Bezugsgruppe ebenfalls berücksichtigt (Tabelle 20).

Tabelle 20: Berücksichtigte exVars für die multiple lineare Regression mit Vorwärtsselektion zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf die humane mitochondriale Spontanmutationsfrequenz in Brustfettgewebe. Enzymnamen stehen jeweils für die entsprechenden Transkriptspiegel bzw. den entsprechenden Polymorphismus (Polym.). In Klammern ist der Anteil an Werten unterhalb des LODs dargestellt. q: Ersetzungsspalte der jeweiligen exVar zur Ermittlung des Einflusses von Werten die unterhalb des LOD lagen, HK: Hauptkomponente.

Lebensstil- und physiologische Faktoren	Oxidativer Stress	Chinonbildung und mitochondriale Biogenese
Alter	<i>GCLC</i>	E2-Spiegel
Rauchen	<i>GSTP1</i>	E1-Spiegel
EE	<i>GSTT1</i> (8%)	<i>CYP1A1</i> (5%)
BMI	<i>GSTT1q</i>	<i>CYP1A1q</i>
Gewebe-Fettgehalt	<i>NQO1</i>	<i>CYP1B1</i>
	Polym. <i>GSTM1</i>	Polym. <i>CYP1B1</i>
	Polym. <i>GSTP1</i>	Kopienzahl nDNA/mtDNA
	Polym. <i>NQO1</i>	<i>NFE2L2</i>
	HK Oxycholesterolspiegel 1	
	HK Oxycholesterolspiegel 2	
	Summe Oxycholesterolspiegel	
	Summe Oxycholesterolspiegel/Cholesterolspiegel	

Das Alter beeinflusste die SMF signifikant positiv ($p=0,0001$, Tabelle 21). Dies wurde in der Literatur für mtDNA aus humanen Gehirnen und Gehirnen von Ratten beschrieben (Kap. 1.1.5), wurde jedoch noch nicht in humanem Brustfettgewebe gezeigt. Transkriptspiegel von *NQO1* beeinflussten die SMF signifikant positiv ($p=0,0002$, Tabelle 21). *NQO1*-Transkriptspiegel sind Marker für oxidativen Stress (Kap. 1.1.5). Ein Einfluss von oxidativem Stress auf mitochondrialen DNA-Schaden in der humanen Brust wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Der homozygote *GSTP1* Val/Val-Genotyp beeinflusste die SMF im Vergleich zum homozygoten Ile/Ile-Genotyp negativ ($p=0,0070$). Der homozygote Val/Val-Genotyp war sowohl mit einer erhöhten Genexpression, als auch mit einer erhöhten Enzymaktivität im Vergleich zum Ile/Ile-Genotyp assoziiert (Kap. 1.2.1). *GSTP1* konjugiert reaktive Chinone und führt so zu verminderem oxidativem Stress (Kap. 1.2.1). Dagegen wurden die Transkriptspiegel der *GSTP1*, *GSTT1*, *GSTM1* und die *GSTT1*- und *GSTM1*-Genotypen, welche in direktem Zusammenhang mit den entsprechenden Transkriptspiegeln stehen (Kap. 1.2.1), nicht

in das Modell selektiert. Die Oxysterol Hauptkomponente 2, welche hauptsächlich durch 5,6 α - und 5,6 β -Epoxy-Cholesterolspiegel in negativer Richtung charakterisiert war, beeinflusste die SMF signifikant negativ ($p=0,0002$). 5,6 α - und 5,6 β -Epoxy-Cholesterol sind Marker für oxidativen Stress (Kap. 1.1.5). Oxysterol Hauptkomponente 1, welche durch 7 α -HO-, 7 β -HO-, 7Keto- und 5,6- α -Epoxy-Cholesterolspiegel charakterisiert war, wurde nicht selektiert. 7 α -HO- und 7Keto-Cholesterol können auch enzymatisch gebildet werden (zusammengefasst in Niki et al., 2005) und somit sind deren Gewebespiegel sehr wahrscheinlich nicht ausschließlich auf oxidativen Stress zurückzuführen. Die 7 β -HO-, 5,6- α - und 5,6- β -Oxysterolspiegelsumme beeinflusste die SMF signifikant positiv ($p=0,0386$, Tabelle 21). Das 7 β -HO-, 5,6- α - und 5,6- β -Oxysterolspiegel/Cholesterolspiegel-Verhältnis wurde nicht selektiert. Da dies durch die potentiell vorhandene Kollinearität zwischen dem 7 β -HO-, 5,6- α - und 5,6- β -Oxysterol/Cholesterol Verhältnis und sowohl der selektierten Oxysterol Hauptkomponente 2, als auch der ebenfalls selektierten 7 β -HO-, 5,6- α - und 5,6- β -Oxysterolsumme, hervorgerufen worden sein kann (Spearman-Korrelation, p jeweils $<0,0001$), wurde das Modell erneut ohne Oxysterol Hauptkomponente 2 und die Oxysterolsumme gerechnet (Tabelle 21). Dabei beeinflusste das 7 β -HO-, 5,6- α - und 5,6- β -Oxysterol/Cholesterol Verhältnis signifikant positiv die SMF ($p=0,0006$). Das Alter, *NQO1*-Transkriptspiegel und der *GSTP1* Val/Val-Genotyp beeinflussten ebenso wie in der ersten Modell-Variante jeweils in derselben Richtung signifikant die SMF. Zusätzlich beeinflusste der *GSTP1* Ile/Val-Genotyp *borderline* signifikant positiv die SMF ($p=0,0942$). Variablen, die in Zusammenhang mit der mitochondrialen Proliferation stehen (Kopienzahl nDNA/mtDNA, E2- und *NFE2L2*-Spiegel), wurden in keiner der beiden Modell-Varianten selektiert. Ebenso wurden Faktoren, die mit der Bildung von reaktiven Chinonen (E1- und E2-Gewebespiegel, *CYP1A1*- und *1B1*-Transkriptspiegel und *CYP1B1*-Genotypen) in Verbindung stehen, nicht selektiert. Ein Einfluss von Estrogenchinonen auf mtDNA-Schädigung wurde in anderen Studien bisher nur für isolierte mtDNA und in mtDNA der Ratten- und Hamsterniere und –Leber beschrieben (Kap. 1.1.5). Für humanes Gewebe wurde bisher nichts beschrieben. Rauchen wurde ebenso bei beiden Modellvarianten nicht selektiert. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass sich das mitochondriale Mutationsspektrum von Raucher- und Nichtraucherzwillingen nicht unterschied. Der Fettgehalt des Gewebes wurde bei beiden Varianten nicht selektiert. Der BMI, der ebenso wie der Fettgehalt des Gewebes in Verbindung mit proinflammatorischen Mediatoren steht

(Kap. 1.1.5), wurde nur in der zweiten Variante ohne Oxycholesterol Hauptkomponente 2 und die 7 β -HO-, 5,6- α - und 5,6- β -Oxycholesterolsomme mit einem p-Wert von 0,1981 selektiert (Tabelle 21).

Tabelle 21: Ergebnisse der vorwärtsselektierenden multiplen linearen Regression (Kap. 3.2.13) zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf die humane mitochondriale SMF in Brustfettgewebe. Enzymnamen stehen jeweils für die entsprechenden Transkriptspiegel bzw. den entsprechenden Genotyp sofern angegeben. AB: auffällige Beobachtungen, HK: Hauptkomponente. Als Bezugsgruppe für den nach Genotyp eingeteilten *GSTP1*-Polymorphismus wurde der hochaktive Val/Val-Genotyp (Kap. 1.2.1) verwendet.

ExVars im selektierten Modell	AB=0; n=40; O/exVars=6,7; R ² =0,60		ohne Oxycholesterol- summe und HK als exVar	
	p-Wert	AB=0; n=40; O/exVars=6,7; R ² =0,57	p-Wert	
Alter	+	0,0001	+	0,0002
<i>NQO1</i>	+	0,0002	+	0,0022
<i>GSTP1</i> Ile/Val	-	0,4368	-	0,0942
<i>GSTP1</i> Val/Val	-	0,0070	-	0,0071
Oxycholesterol HK 2 ¹	-	0,0163		
Summe 7 β -HO-, 5,6- α - und 5,6- β - Oxycholesterole ²	+	0,0386		
Summe 7 β -HO-, 5,6- α - und 5,6- β - Oxycholesterole/Cholesterol ^{1,2}			+	0,0006
BMI			+	0,1981

¹Korrelation zwischen Oxycholesterol HK 2 und Summe Summe 7 β -HO-, 5,6- α - und 5,6- β -Oxycholesterole/Cholesterol (R=-0,70, p<0,0001).

²Korrelation zwischen Summe 7 β -HO-, 5,6- α - und 5,6- β -Oxycholesterole und Summe 7 β -HO-, 5,6- α - und 5,6- β -Oxycholesterole/Cholesterol (R=0,94, p<0,0001).

Die mitochondriale SMF in humanem Brustfettgewebe wurde somit hauptsächlich spontaninduziert über altersbedingte Mutagenese und über oxidativen Stress, jedoch nicht über chinoninduzierte DNA-Adduktbildung, Rauchen, den BMI, EE und Mitogenese beeinflusst. Berücksichtigt werden muss allerdings, dass die erklärenden Variablen mit einem R² von 0,60 bzw. 0,57 nur 60% bzw. 57% der Varianz der SMF erklärten und somit weitere Einflussfaktoren eine Rolle spielen könnten. Das O/ExVar-Verhältnis von betrug 6,7, also standen einer erklärenden Variable 6,7 Beobachtungen gegenüber, und lag damit im angestrebten Bereich >5.

4.3. Bioinformatische Netzwerkmodellierung

Der Estrogenmetabolismus in der weiblichen Brustdrüse spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von reaktiven Verbindungen, die in der Lage sind DNA-Addukte zu bilden. In Kooperation mit Prof. Dandekar vom Lehrstuhl für Bioinformatik der Universität Würzburg wurden am Lehrstuhl bereits DNA-Adduktflüsse in weiblichem Brustdrüsengewebe mittels bioinformatischer *constraint-based* Netzwerkmodellierung errechnet (Kap. 1.2). In dieser Arbeit sollten Einflussfaktoren auf diese DNA-Adduktflüsse untersucht werden. Für das Netzwerk-Modell wurden Transkriptspiegel als Surrogat für die Enzymaktivität verwendet (Kap. 1.2). Dies stellt allerdings nur eine Vereinfachung der Enzymaktivität dar. Daher sollten zunächst relevante Polymorphismen in Genen, die für am Estrogenmetabolismus beteiligte Enzyme kodieren, identifiziert und alle vorhandenen Proben genotypisiert werden (Kap. 4.3.1). Anschließend sollten um die relative Aktivität der Allele im Netzwerk-Modell zu korrigieren in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Bioinformatik der Universität Würzburg zusätzliche Adduktflüsse unter Berücksichtigung von auf den Genotyp angepassten Transkriptspiegeln errechnet werden und daraufhin beide Modelle durch Vergleich mit real gemessenen Daten validiert werden (Kap. 4.3.2). Daraufhin sollten mittels multipler linearer Regression Einflussfaktoren auf die errechneten DNA-Addukte ermittelt werden (Kap. 4.3.3).

4.3.1. Polymorphismen

Zur Untersuchung, ob die Berücksichtigung von polymorphismusabhängiger enzymatischer Umsetzung zu einer Verbesserung des Estrogenmetabolismus-Netzwerkmodells beiträgt, wurden Polymorphismen in Genen, die für Enzyme kodieren, welche am Estrogenmetabolismus beteiligt sind und mit einem erhöhten Krebsrisiko assoziiert sind und so potentiell zur DNA-Adduktbildung beitragen, ausgewählt. Dazu gehören die SNPs in Genen, die für NQO1 (rs1800566), CYP1B1 (rs1056836), HSD17B1 (rs676387) und GSTP1 (rs1695) sowie CNPs in Genen die für GSTT1 und GSTM1 kodieren (Kap. 1.2.1). Ein SNP innerhalb des *COMT*-Gens (rs4680) ist zwar nicht mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert, allerdings könnte die Kombination des niedrig-aktiven *NQO*-Allels mit dem niedrig-aktiven *COMT*-Allel ebenso einen Einfluss auf die DNA-Adduktbildung nehmen (Kap. 1.2.1).

Die CNPs (*GSTT1* und *GSTM1*) sollten nach Buchard et al. (2007) ermittelt werden (Kap. 4.3.1.1). Eine Möglichkeit zur Bestimmung von SNPs ist, neben z.B. NGS, allelspezifischer Primer-PCR und RFLP-PCR, die allelische Diskriminierung (Kap. 1.2.1.1). Um einen hohen Probendurchsatz gewährleisten zu können und gleichzeitig ein angemessenes Kosten-Nutzen-Verhältnis zu wahren, sollten alle vorhandenen Proben mittels allelischer Diskriminierung genotypisiert werden (Kap. 4.3.1.2). RFLP-PCR sollte lediglich als alternative Bestimmungsmethode zur Verifizierung der in der allelischen Diskriminierung verwendeten Positivkontrollen verwendet werden (Kap. 4.3.1.2.1). Die ermittelten Genotyp-Frequenzen sollten anschließend über Errechnung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts und über einen Vergleich mit bereits publizierten Allel-Frequenzen von, sofern verfügbar, gesunden deutschen Frauen, oder sofern nicht verfügbar, gesunden hellhäutigen Menschen¹ auf Plausibilität überprüft werden (Kap. 4.3.1.3).

Für einige der Polymorphismen ist in der Literatur bereits ein Einfluss auf mRNA-Spiegel in anderen Geweben beschrieben (Kap. 1.2.1). Um zu ermitteln, ob sich die betreffenden Polymorphismen auch im Brustgewebe auf die jeweils assoziierten mRNA-Spiegel auswirken, sollten die ermittelten Genotypen mit dem mRNA-Spiegel des betreffenden Enzyms verglichen werden (Kap. 4.3.1.4). Anschließend sollte ermittelt werden, inwieweit bei bereits am Lehrstuhl errechneten multiplen linearen Regressionsmodellen zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf Estrogen-Spiegel, die zusätzliche Berücksichtigung von Polymorphismen im Vergleich zu den bereits berechneten Modellen ohne Berücksichtigung von Polymorphismen, zu einer Verbesserung der Modelle beiträgt (Kap. 4.3.1.5).

4.3.1.1. Copy number polymorphism-Genotypisierung

Die *GSTM1*- und *GSTT1*-CNP-Bestimmung sollte analog zu Buchard et al. (2007) durchgeführt werden. Dabei entsteht bei einer Multiplex-PCR mit zwei Primersätzen jeweils bei einem homozygoten Genotyp ein 625 bp (*GSTM1*) bzw. ein 969 bp langes PCR-Produkt (*GSTT1*). Bei einem nullizygoten Genotyp entsteht ein 4748 bp (*GSTM1*)

¹„Hellhäutige Menschen“ wird hier gleichgesetzt mit dem im englischen Sprachraum geläufigen „caucasian“. Die wort-wörtliche Übersetzung „Kaukasier“ ist im Deutschen ein Begriff aus der Rassen-theorie (Vetsch, 2001), welcher eine Mitschuld am aufkommenden Antisemitismus Anfang des 20. Jahrhunderts zugeschrieben wird (Benz, 2004).

bzw. ein 3106 bp langes PCR-Produkt (*GSTT1*). Bei einem hemizygoten Genotyp entstehen jeweils beide Banden (Abbildung 33).

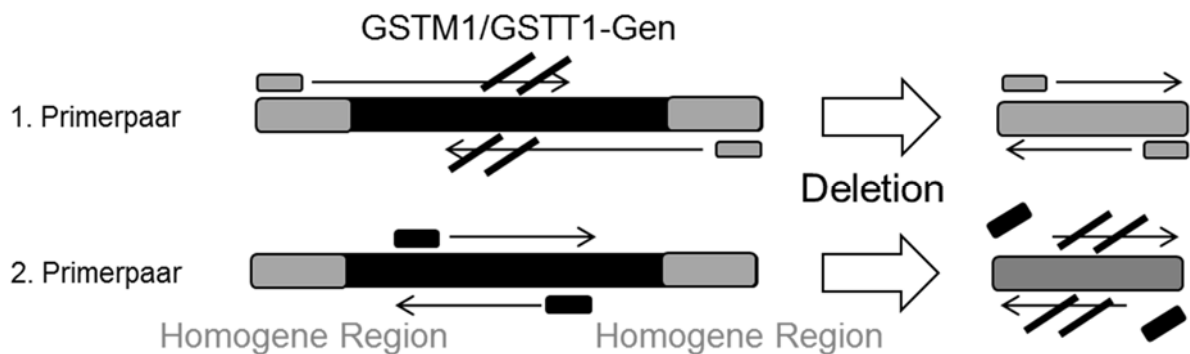


Abbildung 33: Prinzip der *GSTM1*-/*GSTT1*-Deletionsbestimmung nach Buchard et al. (2007). Bei Vorhandensein des *GSTM1*-/*GSTT1*-Gens entsteht durch Primer die außerhalb der Sequenz des Gens platziert sind kein Produkt, da sie zu weit voneinander entfernt sind. Bei einer Deletion liegen die Primer nah genug beieinander und es wird ein Produkt amplifiziert. Zusätzlich wird ein Primerpaar, das innerhalb des *GSTM1*-/*GSTT1*-Gens platziert ist, verwendet. Bei Vorhandensein des Gens entsteht entsprechend ein PCR-Produkt, bei einer Deletion verfügen die Primer über keine Bindungsstelle.

Die Primer für die *GSTT1*-Bestimmung wurden bereits von Schmalbach (2014) erfolgreich getestet. Folglich wurden zunächst nur die Primer der *GSTM1*-Genotypisierung getestet.

Bei Nullizygotie liegt der betreffende Genabschnitt nicht vor und somit findet auch keine Genexpression statt. Bei Hemi- oder Homozygotie liegt der betreffende Genabschnitt vor und es kann Genexpression stattfinden. Deswegen wurde zum Test der Primer DNA einer Humanprobe deren *GSTM1*-mRNA-Spiegel unterhalb der Detektionsgrenze lag (Probe Nr. 16) und einer Humanprobe, bei der der *GSTM1*-mRNA-Spiegel im Gewebe detektierbar war (Probe Nr. 17), als Templat für eine PCR mit anschließender Gelelektrophorese eingesetzt. Um die Primersätze einzeln und in Kombination zu testen, wurden in jeweils drei Ansätzen pro Probe, jeweils einmal der Primersatz innerhalb des *GSTM1*-Gens (im Folgenden als Gen-Primer bezeichnet), der Primersatz außerhalb des *GSTM1*-Gens (im Folgenden als Deletionsprimer bezeichnet) und einmal beide in Kombination verwendet.

Mit DNA von Probe Nr. 16 als Templat wurde mit *GSTM1*-Gen-Primern alleine wie erwartet keine Bande detektiert (Abbildung 34, A). Sowohl im Ansatz mit Deletionsprimern, als auch im Ansatz mit beiden Primersätzen (Gen und Deletion) wurde wie erwartet eine Bande mit einer Länge von 4748 bp detektiert. Mit DNA aus Probe Nr. 17

als Templat wurde mit Gen-Primern alleine wie erwartet eine Bande mit einer Länge von 625 bp und im Ansatz mit Deletionsprimern alleine zusätzlich eine Bande mit einer Länge von 4748 bp detektiert (Abbildung 34, A). Im Ansatz mit beiden Primersätzen (Gen und Deletion) wurde wie erwartet eine Bande mit einer Länge von 625 bp und zusätzlich eine Bande mit einer Länge von 4748 bp detektiert. Die 625 bp lange Bande (Probe Nr. 17) des *GSTM1*-Gens wurde gelaufgereinigt und sequenziert. Das Sequenzierungsergebnis bestätigte das Vorliegen des *GSTM1*-Gens (Anhang: Abbildung 65). Somit wurde die generelle Eignung der Methode bestätigt.

Um eine geeignete Positivkontrolle auszuwählen, wurden alle am Lehrstuhl vorhandenen Humanzelllinien (Kap. 3.2.10.1) genotypisiert (Abbildung 34, B). Zusammengekommen mit den Ergebnissen von Schmalbach (2014) wiesen Ag0-Zellen als einzige der vorhandenen Zelllinien, sowohl im *GSTT1*- als auch im *GSTM1*-Genotyp, Hemizygotie auf (Kap. 4.3.1.2: Tabelle 22). Da bei Hemizygotie jeweils beide PCR-Produkte entstehen (Gen- und Deletionsbande), eignet sich DNA aus Ag0-Zellen bei einer Zusammenführung der beiden Genotypisierungen in einem Multiplex-PCR-Ansatz mit vier Primersätzen (*GSTT1*-Gen und Deletion und *GSTM1*-Gen und Deletion) als einzelne Positivkontrolle für beide CNPs.

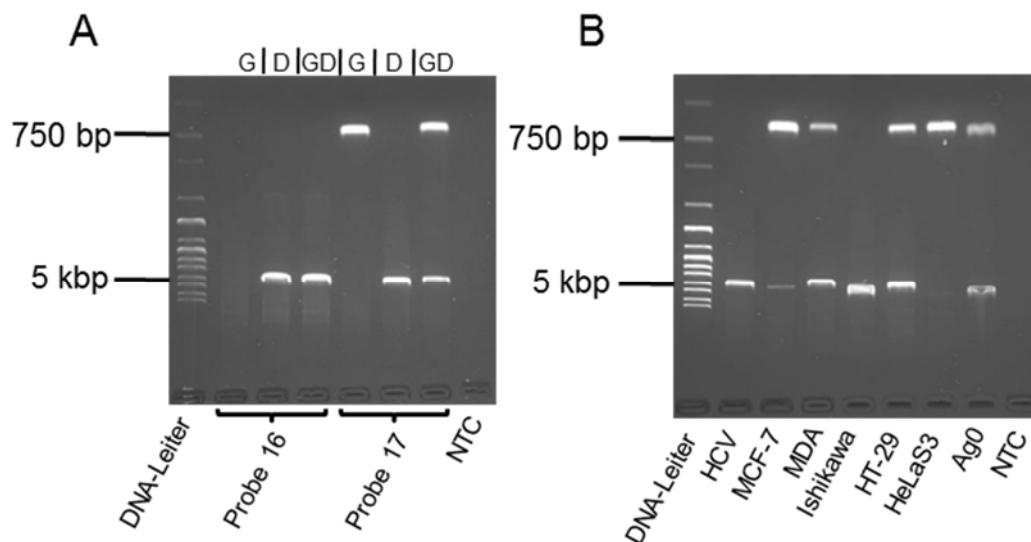


Abbildung 34: A: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) der Produkte der PCR zum Test der *GSTM1* Genotypisierungsprimer nach Kap. 3.2.10.2. G: Gen-Primer, D: Deletionsprimer, GD: Gen- und Deletionsprimer. Templat: DNA aus Humanproben. B: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) der PCR zur *GSTM1* Positivkontrollenidentifizierung nach Kap. 3.2.10.2. Templat: DNA aus Humanzelllinien (Kap. 3.2.10.1). A und B: DNA-Leiter: 1 kb (Fermentas), NTC: Blindwert (nf Wasser). Laufzeit: 1 h bei 7 V/cm. Agarosegel: 1,5%.

Die ersten 30, der in dieser Arbeit verwendeten Proben, wurden bereits von Schmalbach (2014), den *GSTT1* CNP betreffend, genotypisiert. Daher wurde von eben diesen Proben der *GSTM1*-Genotyp einzeln bestimmt (Anhang: Abbildung 66). Danach wurden beide Genotypisierungen analog zu Buchard et al. (2007) in einer gemeinsamen Multiplex-PCR mit vier Primersätzen (*GSTT1*-Gen und Deletion und *GSTM1*-Gen und Deletion) mit anschließender Gelelektrophorese zusammengeführt und alle weiteren vorhandenen Proben genotypisiert (Anhang: Abbildung 68 und Abbildung 69). Anschließend sollte mit der SNP-Genotypisierung fortgefahren werden.

4.3.1.2. *Single nucleotide polymorphism*-Genotypisierung

Für die SNP-Genotypisierung wurden zunächst Positivkontrollen für jeden Genotyp benötigt. DNA aus kultivierten humanen Zelllinien hat hierbei den Vorteil, dass sie Dank der Kultivierbarkeit der Zellen quasi unbegrenzt verfügbar ist. Deshalb wurden die SNPs in Genen, die für *COMT* (rs4680), *NQO1* (rs1800566), *CYP1B1* (rs1056836), *HSD17B1* (rs676387) und *GSTP1* (rs1695) kodieren, von sieben verschiedenen humanen Zelllinien (Kap. 3.2.10.1) und mehreren Humanproben bestimmt. Bei einem Teil der humanen Zelllinien konnten die Fluoreszenzintensitäten nicht eindeutig einem Genotyp zugeordnet werden (Abbildung 35 und Anhang: Abbildung 75). Diese Proben wurden dementsprechend nicht als Positivkontrolle herangezogen. Erklärt werden kann dies über Polyploidie der verwendeten Zelllinien. So können z.B. bei Triploidie des betreffenden Chromosoms ein Chromosom Genotyp a und zwei Chromosome dagegen Genotyp b besitzen. Dadurch liegen die betreffenden Proben bei Auftragung der Fluoreszenzintensitäten der beiden Allele gegeneinander bei der allelischen Diskriminierung zwischen homo- und heterozygoten Proben. So konnte der *NQO1*-Genotyp MCF-7-Zellen nicht eindeutig zugeordnet werden (Abbildung 15 in Schmalbach, 2014). Das humane *NQO1*-Gen liegt auf Chromosom 16 (NCBI GenBank® *Accession no.*: NC_000016.10). Chromosom 16 wurde von Whang-Peng et al. (1983) bei MCF-7-Zellen je nach Subpopulation bereits als tri-, tetra und pentaploid beschrieben. Des Weiteren konnte HeLaS3-Zellen kein *GSTP1*-Genotyp und HT-29-Zellen kein *GSTP1*-, *CYP1B1*-, *COMT*- und *HSD17B2*-Genotyp zugeordnet werden (Abbildung 35, Anhang: Abbildung 75 und Abbildung 14 in Schmalbach, 2014). Das *GSTP1*- und das *HSD17B2*-Gen liegen auf Chromosom 11 (NCBI GenBank® *Accession no.*: NC_000011.10), das *CYP1B1*-Gen auf Chromosom 2 (NCBI GenBank® *Ac-*

cession no.: NC_000002.12) und das *COMT*-Gen auf Chromosom 22 (NCBI GenBank® Accession no.: NC_000022.11). Chromosom 11 wurde von Landry et al. (2013) bei HeLaS3-Zellen bereits als triploid beschrieben. Bei HT-29-Zellen wurden von Kawai et al. (2002) bereits Chromosom 11 als tetraploid und Chromosom 2 und 22 jeweils als triploid beschrieben.

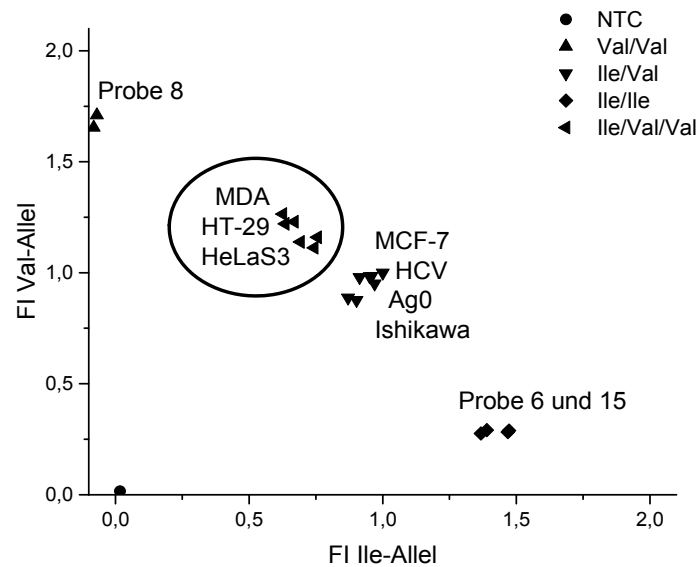


Abbildung 35: *GSTP1*-Genotypisierung (rs1695) der potentiellen Positivkontrollen mittels allelischer Diskriminierung (Kap. 3.2.10.3). Aufgetragen ist die auf die heterozygote Positivkontrolle (DNA aus MCF-7-Zellen) normierte Fluoreszenzintensität (FI) der beiden Allele gegeneinander. Umkreist sind Proben, die nicht eindeutig einem Genotyp zugeordnet werden konnten. NTC: Blindwert (nf Wasser).

Anschließend wurde für jedes Allel jeweils, wenn möglich, eine Zelllinie als Positivkontrolle ausgewählt. Stand keine Zelllinie für ein betreffendes Allel zur Verfügung, wurde eine entsprechende Brustgewebs-Probe ausgewählt (Tabelle 22).

Tabelle 22: Ergebnisse der Genotypisierung von verschiedenen Human-Zelllinien und Brustgewebeproben zur Identifizierung von Positivkontrollen für die Allelische Diskriminierung und CNP Bestimmung. **Fett markiert:** Jeweils ausgewählte Positivkontrollen.

Probe	GSTP1	CYP1B1	HSD17B1	GSTM1	Schmalbach (2014)		
					COMT	NQO1	GSTT1
MCF-7	Ile/Val	Leu/Leu	C/C	+/(-)	Met/Met	Pro/Ser/Ser	+/-
MDA	Ile/Val/Val	Leu/Leu	C/C	+/-	Val/Val	Ser/Ser	-/-
HCV	Ile/Val	Leu/Leu	C/C	-/-	Val/Met	Pro/Pro	+/-
HT-29	Ile/Val/Val	Leu/Leu/Val	C/A/A	+/-	Val/Met/Met	Pro/Pro	+/+
Ag0	Ile/Val	Val/Val	C/C	+/-	Val/Val	Pro/Pro	+/-
Ishikawa	Ile/Val	Leu/Leu	C/C	-/-	Val/Met	Pro/Pro	+/-
HeLaS3	Ile/Val/Val	Val/Val	C/C	+/+	Val/Val	Pro/Pro	+/-
Nr. 6	Ile/Ile	Leu/Leu	A/A	-/-	Met/Met	Pro/Pro	+/+
Nr. 8	Val/Val	Leu/Val	C/A	+/-	Val/Val	Pro/Pro	+/+
Nr. 15	Ile/Ile	Val/Val	C/C	-/-	Met/Met	Pro/Ser	+/-

Die für die allelische Diskriminierung ausgewählten Positivkontrollen sollten anschließend mit einer zweiten bereits publizierten Methode erneut genotypisiert und somit verifiziert werden (Kap. 4.3.1.2.1) und daraufhin alle vorhandenen Humanproben genotypisiert werden (Kap. 4.3.1.2.2).

4.3.1.2.1. Verifizierung der Positivkontrollen

Für den *HSD17B1*-Polymorphismus war keine weitere publizierte Methode zur Genotypisierung verfügbar. Daher wurden die *HSD17B1*-Positivkontrollen nicht mit einer zweiten Methode genotypisiert. In einer vorangegangenen Arbeit (Schmalbach, 2014) wurden bereits die Positivkontrollen der *COMT*-Genotypisierung mittels RFLP-PCR (Kap. 1.2.1.1) verifiziert. Daher sollten nun die Positivkontrollen der anderen SNPs (*GSTP1*, *CYP1B1* und *NQO1*) ebenfalls mittels RFLP-PCR verifiziert werden.

Die *NQO1*-Positivkontrollenverifizierung mittels RFLP-PCR wurde angelehnt an Sameer et al. (2010), die *GSTP1*-Positivkontrollenverifizierung angelehnt an Wilson et al. (2000) und die *CYP1B1*-Positivkontrollenverifizierung angelehnt an Zimarina et al. (2004) durchgeführt.

Bei der *GSTP1*-Positivkontrollenverifizierung wurden bei der anfänglichen PCR mit gelelektrophoretischer Auftrennung neben dem erwarteten PCR-Produkt mit einer Länge von 176 bp noch weitere unspezifische Produkte detektiert (Anhang: Abbildung 70).

Nach Änderung der *Annealing*-Temperatur von 60 auf 64°C (Anhang: Abbildung 70) und einer Verkürzung der *Annealing*- und Elongations-Zeit von 1 min auf jeweils 30 s wurde ausschließlich das erwartete Produkt (176 bp) detektiert (Anhang: Abbildung 71). Bei der *NQO1*- und der *CYP1B1*-Positivkontrollenverifizierung wurde bei der anfänglichen PCR mit gelelektrophoretischer Auftrennung jeweils das erwartete PCR-Produkt mit einer Länge von 230 bp bzw. 340 bp detektiert (Anhang: Abbildung 72 und Abbildung 73).

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung des *CYP1B1*-Restriktionsverdaus wurden bei den beiden homozygoten Proben jeweils die erwarteten Fragmente detektiert (Abbildung 36 und Tabelle 23). Bei der hemizygoten Probe wurde wie erwartet ein Fragment der Länge 340 bp und eines mit einer Länge von 177 bp detektiert. Das zusätzlich erwartete Fragment der Länge 163 bp wurde nicht detektiert. Da neben der unverdauten Bande (340 bp) zumindest eine der beiden erwarteten Verdaubanden detektierbar war (177 bp), konnte die Probe somit dennoch eindeutig dem heterozygoten Genotyp zugeordnet werden kann.

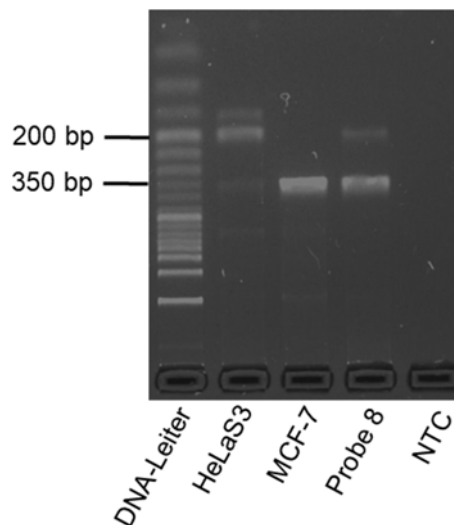


Abbildung 36: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) des *Eco57I*-Restriktionsverdaus der Positivkontrollenverifizierung des *CYP1B1*-Polymorphismus mittels RFLP-PCR nach Kap. 3.2.10.4. Agarosegel: 3%. Laufzeit: 1 h bei 5 V/cm. DNA-Leiter: 50 bp. NTC: Blindwert (nf Wasser). Templat: DNA aus HeLaS3- und MCF-7-Zellen (Kap. 3.2.10.1) und Humanewebe (Probe Nr. 8).

Bei der *NQO1*- und der *GSTP1*-Positivkontrollenverifizierung wurden nach der gelelektrophoretischen Auftrennung des jeweiligen Restriktionsverdaus jeweils die erwarteten Fragmente detektiert (Tabelle 23 und Anhang: Abbildung 74).

Tabelle 23: Ergebnisse der *GSTP1*-, *NQO1*- und *CYP1B1*-Positivkontrollenverifizierung der allelischen Diskriminierung mittels RFLP-PCR (Kap. 3.2.10.4). Bei der *GSTP1*-Positivkontrollenverifizierung wurde sehr wahrscheinlich aufgrund der zu geringen Trennleistung der hier angewandten Gelelektrophorese anstatt der erwarteten 85 und 91 bp langen Fragmente eine einzelne etwa 90 bp lange und, im Vergleich zum 176 bp langen Fragment, breitere Bande detektiert.

Polymorphismus	Genotyp	Probe	erwartete Fragmentlängen (bp)	detektierte Fragmentlängen (bp)
<i>NQO1</i>	Ser/Ser	MDA	151	151
	Pro/Ser	Nr. 15	151, 191	151, 191
	Pro/Pro	Ishikawa	191	191
<i>GSTP1</i>	Val/Val	Nr. 8	85, 91	~90
	Ile/Val	MCF-7	85, 91, 176	~90, 176
	Ile/Ile	Nr. 6	176	176
<i>CYP1B1</i>	Leu/Leu	MCF-7	163, 177	163, 177
	Leu/Val	Nr. 8	163, 177, 340	177, 340
	Val/Val	HeLaS3	340	340

Somit wurden die Positivkontrollen der *NQO1*-, *GSTP1*- und *CYP1B1*-Genotypisierung verifiziert. Anschließend sollten die vorhandenen Humanproben mittels allelischer Diskriminierung genotypisiert werden.

4.3.1.2.2. Genotypisierung der vorhandenen Proben

Bei der Genotypisierung der vorhandenen Humanproben mittels allelischer Diskriminierung wurden jeweils entsprechenden Positivkontrollen bei jedem Lauf mitgeführt und um eine Vergleichbarkeit der Messungen zu gewährleisten, die Fluoreszenzintensitäten der beiden Allele auf die jeweils heterozygote Positivkontrolle normiert und gegeneinander aufgetragen (Abbildung 37 und Anhang: Abbildung 64). Die ersten 30 Proben wurden bereits von Schmalbach (2014) hinsichtlich des *COMT*- und *NQO1*-Polymorphismus genotypisiert und sind in den gezeigten Daten enthalten.

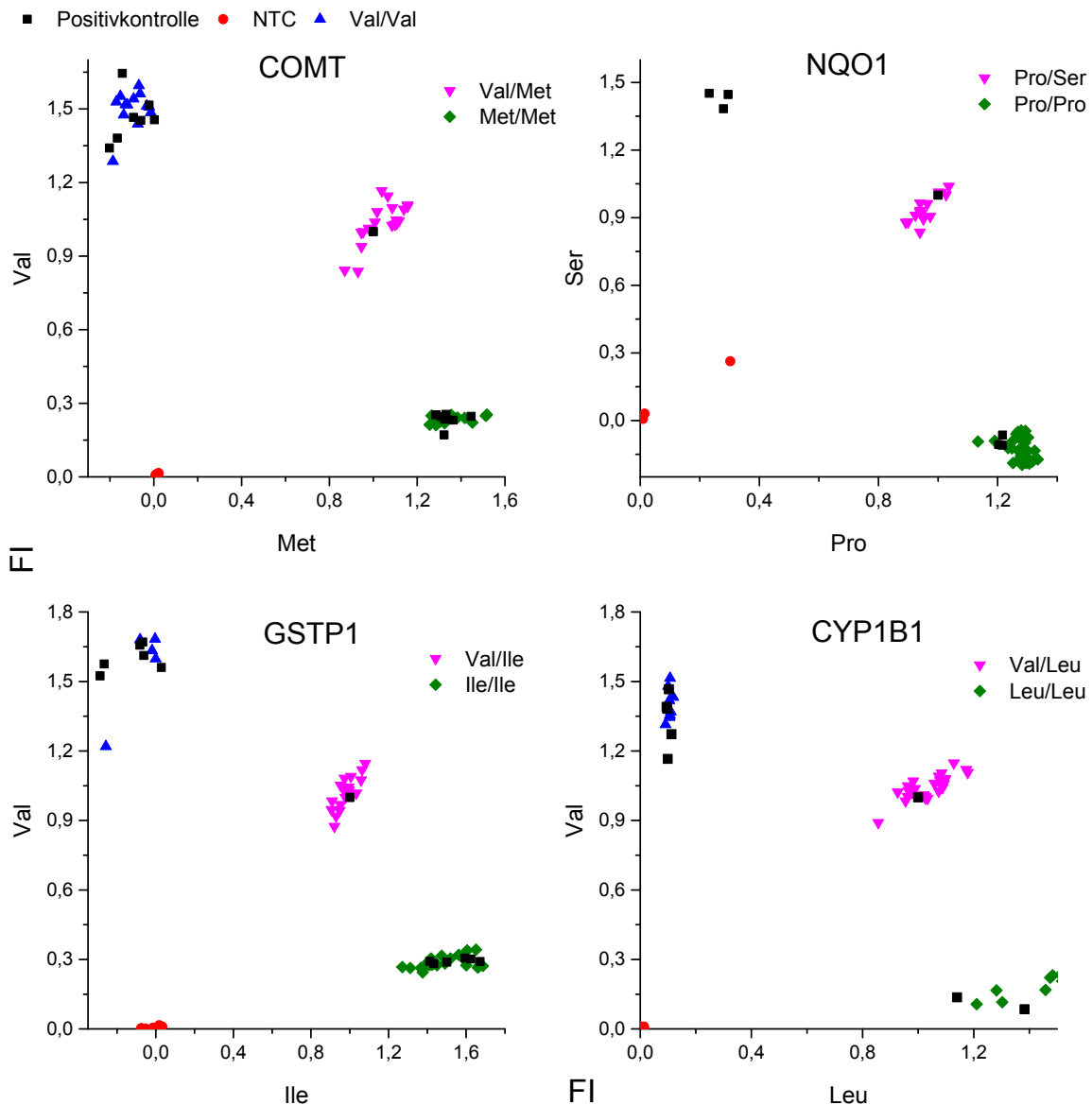


Abbildung 37: Genotypisierung aller Brustgewebeproben mittels allelischer Diskriminierung (Kap. 3.2.10.3). Aufgetragen ist jeweils die auf die heterozygote Positivkontrolle normierte Fluoreszenzintensität (FI) der beiden Allele gegeneinander. NTC: Blindwert (nf Wasser).

Anschließend sollten die Allelfrequenzen auf ihre Plausibilität hin überprüft werden.

4.3.1.3. Plausibilitätsprüfung der Allel-Frequenzen

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht besagt, dass in einer großen Population in der Paarung ohne Selektion, Mutationen und Migration unterläuft, die Allel- und Genotyp-Frequenz durch eine einfache Abhängigkeit beschrieben werden kann (Guo und Thompson, 1992). Es wird herangezogen, um z.B. Fehler bei der Genotypisierung auszuschließen und um zu verifizieren, dass eine homogene Population vorliegt (zusammengefasst in Minelli et al., 2008). Deshalb wurden zur Plausibilitätsprüfung der

Allel-Frequenzen mittels Hardy-Weinberg-Gleichgewicht erwartete Allel-Frequenzen errechnet (Anhang: Tabelle 36) und anschließend mittels χ^2 -Test mit den beobachteten verglichen. Das errechnete χ^2 lag bei allen Allel-Frequenzen der untersuchten Genomvariationen zwischen 0,3 und 3,6 (Tabelle 24). Bei einem Signifikanzniveau von 0,05 liegt der χ^2 -Grenzwert bei 5,9 (zwei Freiheitsgrade). Da alle errechneten χ^2 -Werte kleiner waren, wurde die Nullhypothese bei allen untersuchten Genomvariationen angenommen und die ermittelten Genotyp-Frequenzen liegen innerhalb des Hardy-Weinberg Gleichgewichts. Somit unterlag die untersuchte Population einer Zufallsverteilung.

Zur weiteren Plausibilitätsprüfung wurden die ermittelten Allel-Frequenzen mit bereits publizierten Daten, sofern verfügbar, gesunder deutscher Frauen, verglichen (zusammengefasst in Anhang: Tabelle 37). Für Genotyp-Frequenzen der *HSD17B1* standen keine Daten gesunder deutscher Frauen zur Verfügung. Bei der *HSD17B1* wurden anstattdessen Daten englischer, polnischer (Gaudet et al., 2008) und überwiegend hellhäutiger Amerikaner europäischen Typs (Feigelson et al., 2006) herangezogen. Die betrachteten *COMT*-, *NQO1*-, *CYP1B1*-, *GSTP1*- und *HSD17B1*-SNP- und *GSTM1*- und *GSTT1*-CNP-Studien bestanden in der Summe aus 3621, 744, 3279, 2320, 12605, 3509 und respektive 3508 Individuen und bildeten somit zuverlässig die Allel-Frequenzen der deutschen, respektive hellhäutigen europäischen, Bevölkerung ab.

Die homozygoten *COMT*-Val/Val- und *NQO1*-Pro/Pro-, *CYP1B1*-Leu/Leu- und *CYP1B1*-Val/Val-Genotypen lagen innerhalb der Frequenzen anderer Studien (Tabelle 24). Die *COMT*-Val/Met-, *COMT*-Met/Met-, *NQO1*-Ser/Ser-, *NQO1*-Pro/Ser- und *CYP1B1*-Val/Leu-Genotypen wichen von anderen Studien um etwa 5-7% ab. Des Weiteren wichen alle *GSTP1*-Genotypen (Ile/Ile, Ile/Val und Val/Val) und alle *GSTM1*- und *GSTT1*-Genotypen (homozygot, hemizygot und nullizygot) von anderen Studien um ca. 1-8% ab. Die Abweichungen können durch eine im Vergleich zu anderen Studien niedrige Populationsgröße erklärt werden. Die *HSD17B1*-Genotypen (C/C, C/A und A/A) wichen um etwa 5-15% von anderen Studien ab. Dies kann zum einen ebenso über eine vergleichsweise niedrige Populationsgröße erklärt werden. Des Weiteren wichen bei einer Meta-Studie mit insgesamt 12.500 Probanden, in der Allelfrequenzen innerhalb 13 europäischer Länder plus USA und Kanada von hellhäutigen Menschen untersucht wurden, die jeweils vier untersuchten Allelfrequenzen von vier

Polymorphismen zwischen den einzelnen Ländern um 6-15% voneinander ab (Garte et al., 2001). Da für die *HSD17B1*-Genotyp-Frequenzen keine Daten von deutschen Frauen oder Männern zur Verfügung standen und stattdessen Studien mit hellhäutigen Europäern zum Vergleich herangezogen wurden, lässt sich die Abweichung der gemessenen Genotyp-Frequenzen zu denen anderer Studien auch durch Genotyp-Frequenz Unterschiede innerhalb Europas erklären.

Tabelle 24: Vergleich der nach Kap. 3.2.10.3 und 3.2.10.2 ermittelten Ergebnisse der Genotypisierung (*COMT* rs680 Val158Met, *NQO1* rs1800566 Pro187Ser, *CYP1B1* rs1056836 Leu432Val, *GSTP1* rs1695 Ile105Val, *HSD17B1* rs676387 C>A, *GSTM1* Deletion und *GSTT1* Deletion; jeweils obere Zeile) mit bereits publizierten Daten gesunder deutscher Frauen bzw. hellhäutiger Menschen (*HSD17B1*, jeweils untere Zeile). HWG- χ^2 : Vergleich des errechneten Hardy-Weinberg-Gleichgewichts mit den gemessenen Allelfrequenzen mittels χ^2 -Test, Grenzwert bei einem Signifikanzniveau von 0,05: 5,9.

<i>COMT</i>	Val/Val	Val/Met	Met/Met	Referenz	HWG- χ^2
	13 (26,0%)	20 (40,0%)	17 (34,0%)		1,6
	22,0-28,0%	47,4-54,9%	24,0-29,6%	Schmahl et al. (2012), Rudolph et al. (2012), Reuter et al. (2006), Majic et al. (2011), Jawinski et al., 2016	
<i>NQO1</i>	Pro/Pro	Pro/Ser	Ser/Ser		
	34 (68,0%)	16 (32,0%)	0 (0,0%)		1,7
	67,7-73,4%	25,0-27,0%	1,6-5,3%	Zhang et al. (2003), Steinbrecher et al. (2010)	
<i>CYP1B1</i>	Leu/Leu	Val/Leu	Val/Val		
	15 (30,0%)	27 (54,0%)	8 (16,0%)		0,3
	29,9-52,7%	34,8-49,2%	12,5-20,9%	Justenhoven et al. (2008), Sasaki et al. (2003), Timofeeva et al. (2010), Justenhoven et al. (2008), Jaremko et al. (2005)	
<i>GSTP1</i>	Ile/Ile	Ile/Val	Val/Val		
	25 (50,0%)	18 (36,0%)	7 (14,0%)		1,7
	43,0-47,9%	41,7-46,3%	9,8-11,5%	Zirbs et al. (2013), Timofeeva et al. (2010), Eichholzer et al. (2012), Zirbs et al. (2013)	
<i>HSD17B1</i>	C/C	C/A	A/A		
	18 (36,0%)	26 (52,0%)	6 (12,0%)		0,4
	51,3-60,8%	34,0-40,2%	5,2-8,5%	Feigelson et al. (2006), Gaudet et al. (2008)	

<i>GSTM1</i>	+/+	+/-	-/-	
	0 (0,0%)	22 (44,0%)	28 (56,0%)	3,6
	7,0-9,6%	35,4-41,5%	51,5-55,0%	Rudolph et al. (2012), Timofeeva et al. (2010), Steinbrecher et al. (2010)
<i>GSTT1</i>	+/+	+/-	-/-	
	18 (36,0%)	28 (56,0%)	4 (8,0%)	2,6
	32,6-33,5%	49,4-51,2%	15,7-17,4%	Rudolph et al. (2012), Timofeeva et al. (2010), Steinbrecher et al. (2010)

Im Anschluss sollte ermittelt werden, ob die einzelnen Polymorphismen Einfluss auf den jeweiligen assoziierten mRNA-Spiegel nehmen.

4.3.1.4. Einfluss des Genotyps auf den mRNA-Spiegel

Die *COMT*-, *NQO1*- und *CYP1B1*-Polymorphismen hatten keinen Einfluss auf die jeweils assoziierten mRNA-Spiegel in Hirngewebe, HT-29-Zellen bzw. Zellen aus Vollblut (Kap. 1.2.1). Weder für humanes Brustdrüsen-, noch für Brustfettgewebe waren bisher Ergebnisse publiziert. Für den *HSD17B1*-Polymorphismus war bisher weder ein Einfluss auf den mRNA-Spiegel, noch auf die Enzymaktivität publiziert. Der *GSTP1*-Polymorphismus dagegen beeinflusste den *GSTP1*-Proteinspiegel in Brustgewebe (Kap. 1.2.1). Ein Einfluss auf den mRNA-Spiegel war bisher nicht publiziert, allerdings wahrscheinlich, da ein direkter Zusammenhang zwischen mRNA- und Proteinmenge plausibel ist. Die *GSTT1*- und *GSTM1*-Polymorphismen beeinflussten den mRNA-Spiegel in humanen B-Lymphozyten und Lungengewebe (Kap. 1.2.1); für humanes Brustgewebe dagegen war bisher nichts publiziert.

Um einen Einfluss des jeweiligen Genotyps auf den mRNA-Spiegel des entsprechenden Enzyms sowohl in Brustdrüsen-, als auch in Brustfettgewebe zu untersuchen, wurden die Brustdrüsen- und Brustfettgewebs-mRNA-Spiegel von Proben mit den einzelnen Genotypen verglichen (Abbildung 38). Um den Einfluss von Ausreißern gering zu halten und um vergleichbar zu arbeiten, wurden bei allen Vergleichen nicht-parametrischen Testverfahren angewendet. Bei zwei vorhandenen Genotypen wurde dabei der Mann-Whitney-U-Test und bei drei vorhandenen Genotypen die Kruskal-Wallis-ANOVA mit Dunn's Post-hoc-Test angewendet. Ein Unterschied zwischen Drüsen- und Fettgewebe und Unterschiede zu den Ergebnissen anderer Studien in anderen Geweben war zwar nicht auszuschließen, allerdings unwahrscheinlich, da die jeweiligen Polymorphismen nicht auf einzelne Gewebe oder Organe beschränkt sind.

Der mRNA-Spiegel des heterozygoten Val/Met-*COMT*-Genotyps war im Fettgewebe entgegen der Erwartung im Vergleich zum Val/Val-Genotyp signifikant erhöht (Dunn's Test, $p=0,04$), im Vergleich zum Met/Met-Genotyp jedoch nicht ($p=0,66$, Abbildung 38). Im Drüsengewebe bestand wie erwartet kein signifikanter Unterschied zwischen den mRNA-Spiegeln der *COMT*-Genotypen ($p=0,12$). Chen et al. (2004) zeigten, dass der *COMT*-Val158Met-Polymorphismus in Hirngewebe keinen Einfluss auf den *COMT*-mRNA-Spiegel nahm. Der *COMT*-Polymorphismus könnte somit im Brustfettgewebe zwar einen Einfluss auf den assoziierten mRNA-Spiegel nehmen, jedoch ist es sehr unwahrscheinlich, dass dies nur beim heterozygoten Genotyp und nur in Fettgewebe auftrat.

Sowohl im Drüsengewebe, als auch im Fettgewebe nahm wie erwartet weder der *CYP1B1*-, noch der *NQO1*-Genotyp einen Einfluss auf den mRNA-Spiegel (Drüsengewebe $p=0,28$ und $0,30$ und Fettgewebe $p=0,97$ und $0,58$).

Der *HSD17B1*-Genotyp nahm weder im Drüsen-, noch im Fettgewebe einen Einfluss auf den mRNA-Spiegel ($p=0,97$ und $0,34$, Abbildung 38).

Der *GSTP1*-Polymorphismus nahm sowohl im Drüsen-, als auch im Fettgewebe einen signifikanten Einfluss auf den mRNA-Spiegel (p jeweils $<0,01$, Abbildung 38). Dabei war der mRNA-Spiegel des Ile/Ile-Genotyps mit der höheren Enzymaktivität im Drüsengewebe sowohl im Vergleich zum Ile/Val-, als auch im Vergleich zum Val/Val-Genotyp signifikant erhöht ($p=0,01$ jeweils). Der Ile/Val-Genotyp war im Vergleich zum Val/Val-Genotyp nicht signifikant erhöht ($p=0,86$). Im Fettgewebe war der Ile/Ile-*GSTP1*-Genotyp im Vergleich zum Ile/Val- und im Vergleich zum Ile/Ile-Genotyp ebenfalls signifikant erhöht ($p<0,01$ jeweils). Der Ile/Val-Genotyp war im Vergleich zum Val/Val-Genotyp dagegen ebenso wie im Drüsengewebe nicht signifikant erhöht ($p=0,93$). Ein Einfluss des *GSTP1*-Ile105Val-Polymorphismus auf mRNA-Spiegel war bisher nicht publiziert, allerdings zeigten Bhat et al. (2017), dass der *GSTP1*-Val/Val-Genotyp mit *GSTP1*-Proteinverlust assoziiert war. Dies lässt auf einen direkten Zusammenhang zwischen mRNA- und Proteinspiegel schließen und somit war das Ergebnis plausibel.

Der mRNA-Spiegel von homozygoten *GSTT1*-Proben war im Drüsengewebe im Gegensatz zum Fettgewebe bei homozygoten Proben im Vergleich zu hemizygoten Proben erhöht ($p=0,01$ und $0,24$, Abbildung 38). Nullizygoten Proben wurden nicht mit in

die Auswertung einbezogen, da deren mRNA-Spiegel alle unter dem LOD lagen. Die mRNA-Spiegel aller homo- und hemizygoten Proben lagen dagegen sowohl im Drüsen-, als auch im Fettgewebe Proben über dem LOD. Das Ergebnis entsprach somit der Erwartung.

GSTM1-mRNA-Spiegel wurden nicht untersucht, da nur zwei Proben-Gruppen (hemi- und nullizygot) zur Verfügung standen und der mRNA-Spiegel aller nullizygoten Proben kleiner als das LOD war. Allerdings lag der mRNA-Spiegel von insgesamt sieben von 19 hemizygoten Proben über dem LOD (Anhang: Abbildung 76). Dieses Ergebnis entsprach somit der Erwartung.

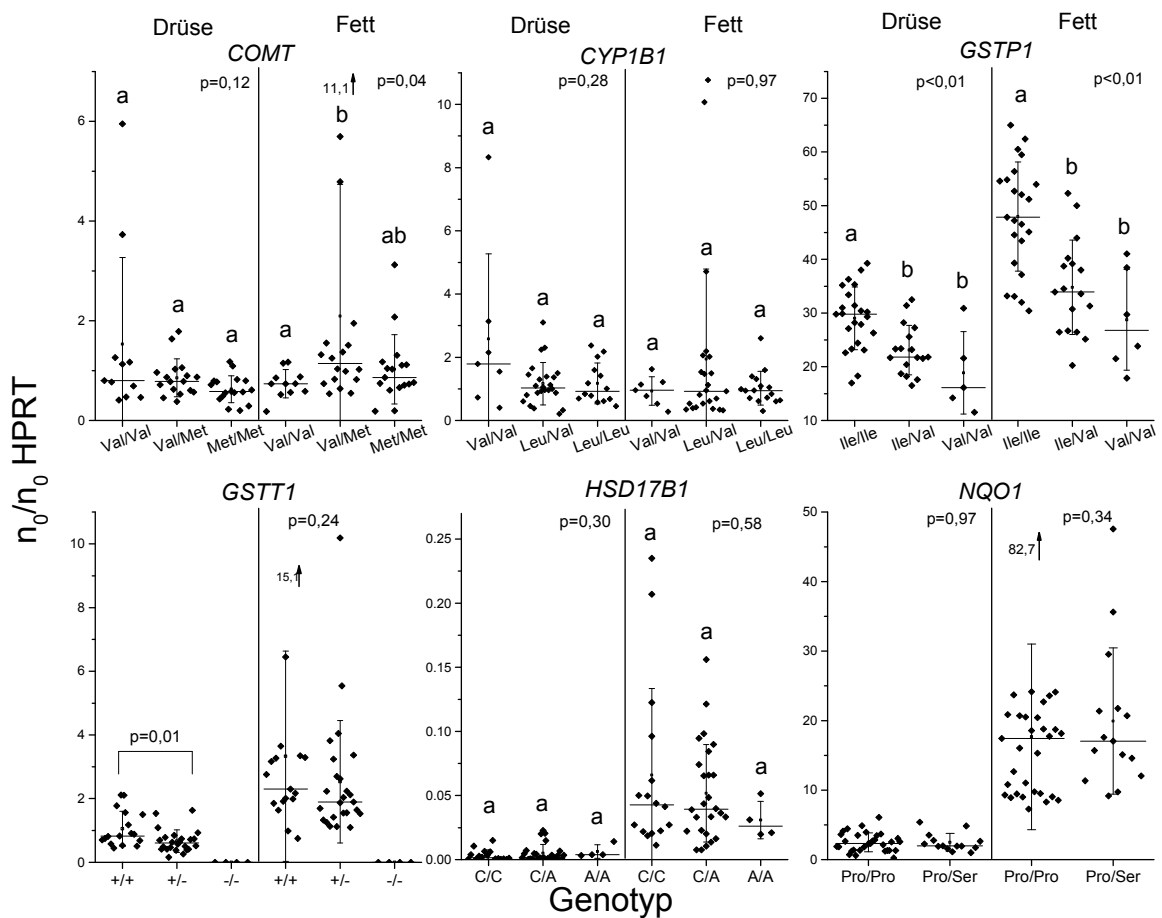


Abbildung 38: mRNA-Spiegel von *COMT*, *CYP1B1*, *GSTP1*, *GSTT1*, *HSD17B1* und *NQO1* im Drüsen- und Fettgewebe (jeweils links) von 45 Probandinnen und im Fettgewebe (jeweils rechts) von 46 Probandinnen nach Genotyp eingeteilt. Gleiche Signifikanzniveaus sind durch gleiche Buchstaben dargestellt (Dunn's test, $p < 0,05$). Nullizygoten *GSTT1*-Proben wurden nicht in die Auswertung einbezogen, da deren mRNA-Spiegel alle $< \text{LOQ}$ waren. *COMT*-, *CYP1B1*-, *GSTP1*- und *HSD17B1*-mRNA-Spiegel wurden jeweils mittels Kruskal-Wallis-ANOVA und *GSTT1*- und *NQO1*-mRNA-Spiegel jeweils mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen. Da eine Kruskal-Wallis-ANOVA einen adjustierten p-Wert errechnet, wurden die gezeigten p-Werte nicht adjustiert. Horizontale Linie: Median, \square : Mittelwert, vertikale Linie: Standardabweichung.

4.3.1.5. Optimierung von linearen Regressionsmodellen zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf Estrogen-Spiegel

Zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf Estrogen-Gewebespiegel im Brustdrüsen- und im Brustfettgewebe wurden am Lehrstuhl bereits multiple lineare Regressionsmodelle mit E1-, E2-, E1-S- und 2-MeO-E1- Gewebespiegel und den Verhältnissen der E2- zu E1-Gewebespiegel und der E1-S- zu E1-Gewebespiegel als abhängige Variable und den folgenden exVars gerechnet: Lebensstil- und physiologische Faktoren, Gewebespiegel der Vorläuferestrogene, Transformationsprodukte und Transkriptspiegel von Genen, die für metabolisierende und bildende Enzymen kodieren (Abbildung 39). Der menopausale Status wurde altersabhängig in ≤ 45 Jahre prä, ≥ 53 Jahre post und die Spannweite dazwischen in peri eingeteilt (Kap. 4.1) und prä als Bezugsgruppe verwendet. Um den Einfluss von Ersetzungen bei Variablen, bei denen mehr als ein Messwert unterhalb des LOD lag und durch den LOD ersetzt wurde, auf das Ergebnis zu ermitteln, wurden jeweils kategoriale $\leq \text{LOD} / > \text{LOD}$ -Ersetzungsvariablen mit $> \text{LOD}$ als Bezugsgruppe berücksichtigt. Dabei beeinflussten Vorläuferestrogene und Transformationsprodukte die E2-, E1- und 2-MeO-E1-Gewebespiegel signifikant positiv (Abbildung 39). Des Weiteren wurden die Gewebespiegel sowohl von Lebensstil und physiologischen Faktoren, als auch von Transkriptspiegeln beeinflusst. Dabei unterschieden sich die jeweils assoziierten Einflussfaktoren je nach Gewebe und erklärender Variable. Mit einem R^2 von jeweils 0,36-0,82 konnten jeweils 36% bis 82% der Varianz der entsprechenden abhängigen Variable erklärt werden.

Um zu ermitteln, ob die in dieser Arbeit ermittelten Polymorphismen zur besseren Erklärung der abhängigen Variablen beitragen, wurden die bereits am Lehrstuhl gerechneten Modelle erneut unter zusätzlicher Berücksichtigung der jeweiligen Polymorphismen gerechnet, sofern das entsprechende Transkript des Gens, in dem der Polymorphismus ermittelt wurde, bei den Modellen ohne Polymorphismen berücksichtigt worden war. Die Polymorphismen wurden dabei als kategoriale Genotyp-Variable mit dem jeweils hochaktiven bzw. dem Genotyp mit dem geringeren Brustkrebsrisiko (Kap. 1.2.1: Tabelle 2) als Bezugsgruppe verwendet.

Im folgenden Fließtext sind nur p-Werte von Modellen, bei denen Polymorphismen als exVar berücksichtigt wurden, angegeben, (*boarderline*) signifikante Assoziationen der bereits am Lehrstuhl gerechneten Modelle ohne Berücksichtigung von Polymorphismen sind in Abbildung 39 dargestellt.

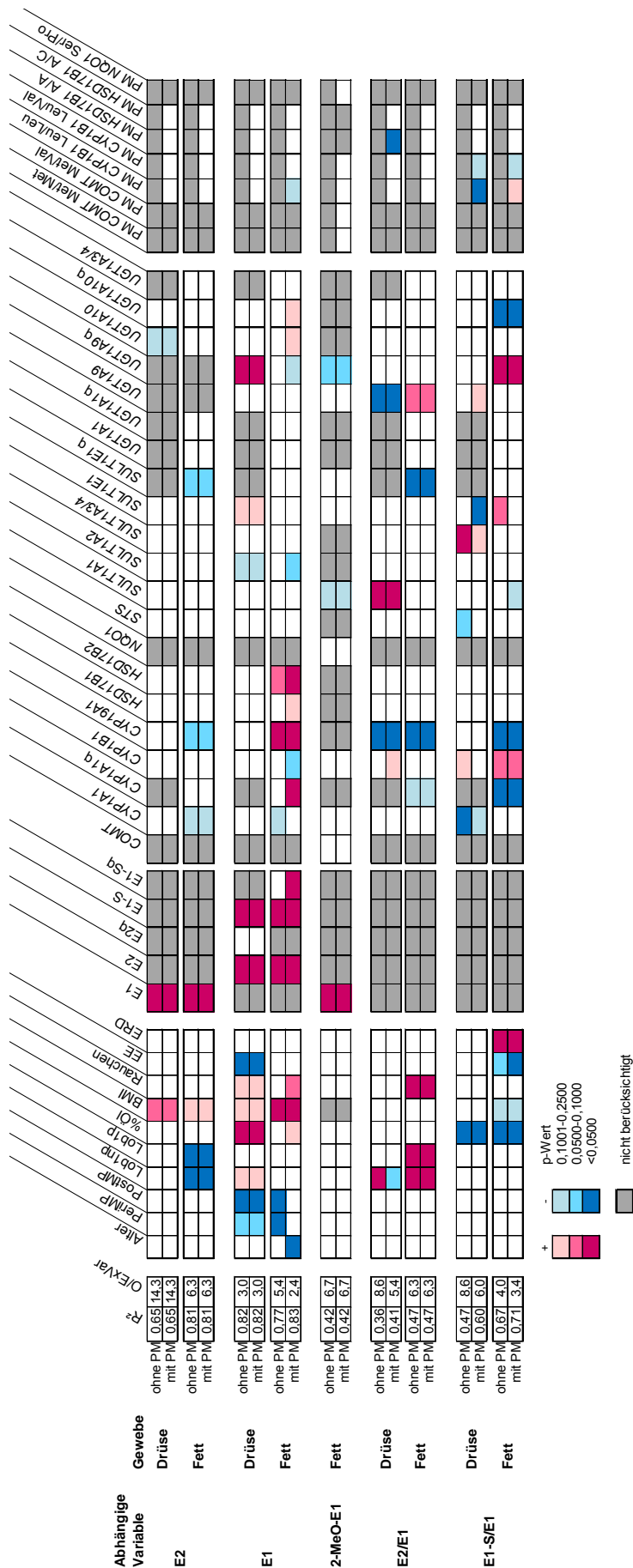


Abbildung 39: Multiple lineare Regressionsmodelle zu Identifizierung von Einflussfaktoren auf Estrogen-Gewebespiegel. Selektierte Variablen mit $p > 0,25$ sind aufgrund fehlender Signifikanz nicht dargestellt. %Öl: Fettanteil im Gewebe, MP: Menopausalstatus, PM: Polymorphismus eingeteilt nach Genotyp, S: Sulfat, STS: Steroidsulfatase, q: $\geq \text{LOD} / < \text{LOD}$ als Bezugsgruppe. Als Polymorphismus-Bezugsgruppe wurde jeweils der hochaktive Genotyp bzw. der Genotyp mit dem geringeren Brustkrebsrisiko nach Kap. 1.2.1 gewählt. Die in der Abbildung angegebenen homozygoten Genotypen repräsentieren dementsprechend das niedrigaktivitäts-Allel, bzw. den Genotyp, der mit dem höheren Brustkrebsrisiko assoziiert ist. Der menopausale Status wurde altersabhängig in ≤ 45 Jahre prä, ≥ 53 Jahre post und die Spannweite dazwischen in peri eingeteilt (Kap. 4.1) und prä als Bezugsgruppe verwendet. Beim *lobule type* wurde Lob2/3 als Bezugsgruppe verwendet.

Bei den Modellen mit E2-Spiegeln im Brustdrüsen und im Brustfettgewebe, mit E1-Brustdrüsen- und E1-Brustfettgewebsspiegeln, 2-MeO-E1 Brustfettgewebsspiegeln und mit dem E2/E1-Brustfettgewebsspiegel-Verhältnis als abhängige Variable, wurden keine Genotypen in das Modell selektiert und somit trugen Polymorphismen nicht zu einer Verbesserung dieser Modelle bei.

Im Modell mit E1-Brustfettgewebsspiegeln als abhängige Variable wurde der *CYP1B1*-Leu/Leu-Genotyp im Vergleich mit dem niedrigaktivitäts Val/Val-Genotyp in negativer Richtung in das Modell selektiert ($p=0,1173$, Abbildung 39 und Anhang: Tabelle 38). Der BMI, E2- und E1-S-Spiegel beeinflussten ebenso wie im Modell ohne Berücksichtigung der Polymorphismen als exVars den E1-Spiegel signifikant positiv ($p=0,0088$, $<0,0001$ und $0,0105$). Ebenso beeinflussten sowohl im Modell mit, als auch im Modell ohne Berücksichtigung von Polymorphismen als exVars, *CYP19A1*- und *HSD17B2*-Transkriptspiegel die E1-Spiegel (*boarderline*) signifikant positiv ($p=0,0003$ und $0,0414$). Unter Berücksichtigung von Polymorphismen als exVars wurde die Menopause nicht wie im Modell ohne Berücksichtigung der Polymorphismen in das Modell selektiert. Dagegen beeinflusste das Alter unter Berücksichtigung von Polymorphismen als exVars E1-Spiegel signifikant negativ ($p=0,0129$), Rauchen beeinflusste E1-Spiegel *boarderline* signifikant positiv ($p=0,0593$) und die E1-S-Ersetzungsvariable beeinflusste den E1-Spiegel signifikant positiv ($p=0,0498$). Dies kann entweder auf einen Effekt aufgrund der Ersetzungen hindeuten, andererseits ist die Ersetzungsvariable ebenso eine kategoriale E1-S-Spiegel-Variable. Unter Berücksichtigung von Polymorphismen war die *CYP1A1*-Transkriptspiegel-Ersetzungsvariable signifikant positiv mit E1-Spiegeln assoziiert ($p=0,0241$); *CYP1B1*- und *SULT1A2*-Transkriptspiegel beeinflussten die E1-Spiegel *boarderline* signifikant negativ ($p=0,0546$ und $0,0679$, Abbildung 39 und Anhang: Tabelle 38). Das R^2 lag unter Berücksichtigung von Polymorphismen als exVars bei 0,83 bei und das O/ExVar Verhältnis bei 2,4 und somit unterhalb des angestrebten Bereichs >5 (Kap. 4.2.5).

Im linearen Regressionsmodell mit dem E2/E1-Drüsen- und E1-Brustfettgewebsspiegel-Verhältnis als abhängige Variable unter Berücksichtigung von Polymorphismen beeinflusste der *HSD17B1*-A/A-Genotyp, welcher im Vergleich mit dem C/C-Genotyp mit einem niedrigeren Krebsrisiko assoziiert ist (Kap. 1.2.1), im Vergleich mit dem C/C-Genotyp das E2/E1-Verhältnis signifikant negativ ($p=0,0294$, Abbildung 39 und Anhang: Tabelle 39). Ein Einfluss des *HSD17B1*-Polymorphismus auf die Enzymaktivität wurde bisher

noch nicht beschrieben. *CYP19A1*-Transkriptspiegel beeinflussten sowohl ohne Berücksichtigung von Polymorphismen als exVars, als auch unter Berücksichtigung, das E2/E1-Verhältnis signifikant negativ ($p=0,0073$); *SULT1A1*-Transkriptspiegel waren signifikant positiv und *UGT1A9*-Transkriptspiegel signifikant negativ mit dem E2/E1-Verhältnis assoziiert ($p=0,0222$ und $0,0073$). *Lob1np* beeinflusste ohne Berücksichtigung von Polymorphismen als exVars signifikant positiv das E2/E1-Verhältnis. Im Gegensatz dazu beeinflusste *Lob1np* unter Berücksichtigung von Polymorphismen, das E2/E1-Verhältnis, wenn auch *borderline*, signifikant negativ ($p=0,0605$). Insgesamt verbesserte die Berücksichtigung von Polymorphismen das R^2 von 0,36 auf 0,41 und das O/ExVar-Verhältnis verschlechterte sich von 8,6 auf 5,4, lag aber immer noch im angestrebten Bereich von >5 (Kap. 4.2.5).

Im Modell mit dem E1-S/E1-Drüsengewebsspiegel-Verhältnis als abhängige Variable war der *CYP1B1*-Leu/Leu-Genotyp im Vergleich zum niedrigaktivitäts Val/Val Genotyp signifikant negativ mit dem E1-S/E1-Verhältnis assoziiert ($p=0,0039$, Abbildung 39 und Anhang: Tabelle 39). Der Fettanteil des Gewebes beeinflusste sowohl unter Berücksichtigung von Polymorphismen als exVars, als auch ohne signifikant negativ das E1-S/E1-Verhältnis ($p=0,0002$). Ohne Berücksichtigung von Polymorphismen als exVars beeinflussten *STS*- und *CYP1A1*-Transkriptspiegel das E1-S/E1-Verhältnis (*borderline*) signifikant negativ und *SULTA3/4*-Transkriptspiegel das E1-S/E1-Verhältnis signifikant positiv. Unter Berücksichtigung von Polymorphismen als exVars wurden *CYP1A1*-Transkriptspiegel zwar in negativer Richtung und *SULT1A3/4*-Transkriptspiegel in positiver Richtung ins Modell selektiert, jedoch nicht signifikant ($p=0,1268$ und $0,1010$). Unter Berücksichtigung von Polymorphismen als exVars waren *SULT1E1*-Transkriptspiegel signifikant negativ mit dem E1-S/E1-Verhältnis assoziiert ($p=0,0447$). Das R^2 lag unter Berücksichtigung von Polymorphismen bei 0,60 und das O/ExVar Verhältnis bei 6,0 und somit im angestrebten Bereich von >5 (Kap. 4.2.5).

Im Modell mit dem E1-S/E1-Fettgewebsspiegel-Verhältnis wurden beide *CYP1B1*-Genotypen (Leu/Leu und Leu/Val) im Vergleich zum Val/Val-Genotyp in positiver bzw. negativer Richtung selektiert, jedoch nicht signifikant ($p=0,2424$ und $0,2451$, Abbildung 39 und Anhang: Tabelle 39). Sowohl mit, als auch ohne Berücksichtigung von Polymorphismen als exVars beeinflusste der Fettgehalt des Gewebes signifikant negativ das E1-S/E1-Verhältnis ($p=0,0009$); die Einnahme von EE war (*borderline*) signifikant negativ und die Einnahme von E2-freisetzenden Medikamenten war signifikant positiv

mit dem E1-S/E1-Verhältnis assoziiert ($p=0,0302$ und $0,0002$, Anhang: Tabelle 39). Die *CYP1A1*- und die *UGT1A10*-Transkriptspiegel-Ersetzungsvariable war sowohl unter Berücksichtigung von Polymorphismen als exVars, als auch ohne, signifikant negativ mit dem E1-S/E1-Verhältnis assoziiert ($p=0,0014$ und $0,0148$), *CYP1B1*-Transkriptspiegel und die *UGT1A9*-Transkriptspiegelersetzungsvariable beeinflussten das E1-S/E1-Verhältnis *borderline* signifikant positiv ($p=0,0767$ und $0,0487$) und *CYP19A1*-Transkriptspiegel beeinflussten das E1-S/E1-Verhältnis signifikant negativ ($p<0,0001$). Insgesamt verbesserte sich das R^2 unter Berücksichtigung von Polymorphismen von $0,67$ auf $0,71$ und das O/ExVar Verhältnis verschlechterte sich von $4,0$ auf $3,4$, und lag somit in beiden Fällen unter dem angestrebten Bereich von >5 (Kap. 4.2.5).

In den Modellen waren mehrere Variablen (*borderline*) signifikant in einer Richtung mit der abhängigen Variable assoziiert, die nicht durch die enzymatische Umsetzung erklärt werden kann. Eine mögliche Erklärung ist ein bisher noch unbekannter Regulationsmechanismus.

Insgesamt wurden bei vier von neun Modellen Genotypen selektiert. In den Modellen unter Berücksichtigung von Polymorphismen wurden teilweise andere Variablen als in den Modellen ohne Berücksichtigung von Polymorphismen selektiert, jedoch nie signifikant in einer gegenläufigen Richtung.

4.3.2. Netzwerk Validierung

Nach Abschluss der Genotypisierung wurden am Lehrstuhl in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Bioinformatik der Universität Würzburg, zusätzlich zu den bereits errechneten Estrogen-DNA-Adduktflüssen (Kap. 1.2), Estrogen-DNA-Adduktflüsse unter Berücksichtigung der durch entsprechende Genotypen veränderten enzymatischen Umsatzrate des entsprechenden Enzyms errechnet. Dabei wurden die Transkriptspiegel je nach Genotyp mit der assoziierten Veränderung der enzymatischen Umsetzung multipliziert (Tabelle 25). Als Bezugsgruppe wurde dabei jeweils der Wild-Genotyp gewählt. Die *GSTM1*- und *GSTT1*-Polymorphismen wurden nicht mit in die Berechnung einbezogen, da der Genotyp einen direkten Einfluss auf den Transkriptspiegel und nicht auf die Enzymaktivität nimmt (Kap. 1.2.1 und 4.3.1.4). Ebenso wurde der *HSD17B1*-Polymorphismus nicht berücksichtigt, da er nicht im kodierenden Bereich liegt und nicht klar ist, welchen Einfluss er auf die Enzymaktivität nimmt (Kap. 1.2.1).

Tabelle 25: Polymorphismen, die zur Berechnung des metabolischen Netzwerks verwendet wurden. In Klammern gegeben ist der jeweilige auf der entsprechenden enzymatischen Umsetzungsrate (Kap. 1.2.1) fußende Multiplikationsfaktor, der bei der Netzwerkberechnung bei den entsprechenden Transkriptspiegeln verrechnet wurde.

Polymorphismus	Niedrigaktivitäts-Genotyp	Heterozygoter Genotyp	Hochaktivitäts-Genotyp
<i>COMT</i> (rs4680)	Met/Met (0,50)	Val/Met (0,75)	Val/Val (1,00)
<i>CYP1B1</i> (rs1056836)	Leu/Leu (1,00)	Leu/Val (2,00)	Val/Val (3,00)
<i>GSTP1</i> (rs1695)	Val/Val (0,33)	Ile/Val (0,67)	Val/Val (1,00)
<i>NQO1</i> (rs1800566)	Ser/Ser (0,02)	Pro/Ser (0,49)	Pro/Pro (1,00)

Die Berücksichtigung polymorphismusabhängiger enzymatischer Umsetzung führte sowohl bei Flüssen zu E1- und E2-Addukten, als auch bei der Summe beider im Vergleich zu Flüssen, die ohne die Berücksichtigung von Polymorphismen errechnet worden waren, zu einer signifikanten Erhöhung der Flüsse (gepaarter t-Test, adjustierte p-Werte jeweils <0,0001, Abbildung 40).

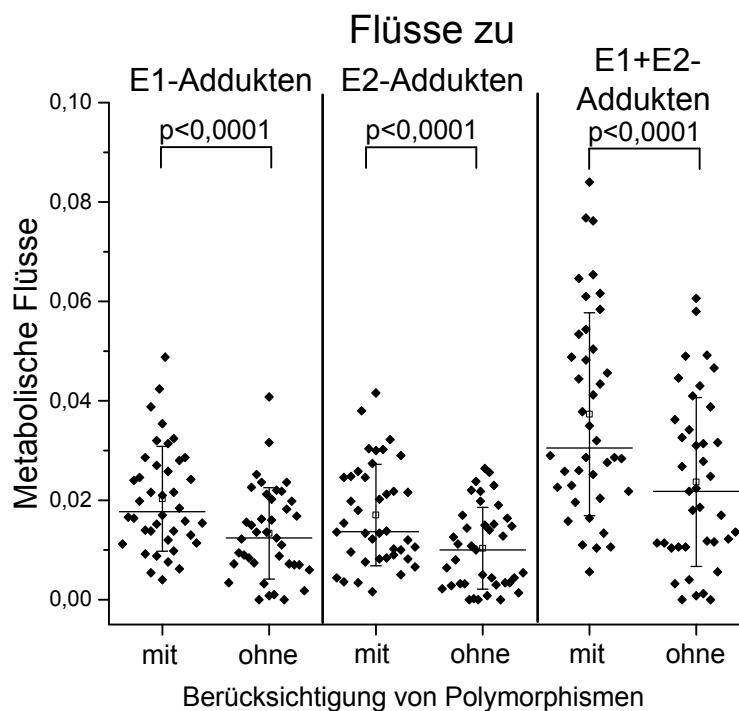


Abbildung 40: Vergleich der metabolischen Flüsse zu E1-, E2- und der Summe aus E1- und E2-DNA-Addukten unter Berücksichtigung von polymorphismusabhängiger enzymatischer Umsetzung und ohne (gepaarter t-Test, gezeigt sind die adjustierten p-Werte). Adjustiert mittels Holm-Korrektur wurde hierbei, um die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer zufälligen Signifikanz durch die multiplen Vergleiche zu minimieren. Horizontale Linie: Median, □: Mittelwert, vertikale Linie: Standardabweichung.

Zur Validierung der Netzwerkmodelle wurden einzelne Flüsse zu Metaboliten innerhalb des Netzwerks mit real bestimmten Metabolitspiegeln verglichen (Abbildung 41). Dabei waren Flüsse zu E1-G von Proben, deren real gemessener E1-G-Drüsengewebespiegel überhalb des LOD lag, im Vergleich zu Proben, deren real gemessener E1-G-Drüsengewebespiegel unterhalb des LOD lag, sowohl mit, als auch ohne Berücksichtigung von Polymorphismen signifikant erhöht (Mann-Whitney-U-Test, adjustierte p-Werte=0,0017 und 0,0046). Flüsse zu 2-MeO-E1 von Proben, deren real gemessener 2-MeO-E1-Drüsengewebespiegel überhalb des LOD lag, waren im Vergleich zu Proben, deren real gemessener 2-MeO-E1-Drüsengewebespiegel unterhalb des LOD lag, sowohl mit, als auch ohne Berücksichtigung von Polymorphismen (*boarderline*) signifikant erhöht (Mann-Whitney-U-Test, adjustierte p-Werte=0,0900 und 0,0170).

Der 2-MeO-E1-Drüsengewebespiegel von sieben von 45 Proben lag überhalb des LOD, der Drüsengewebespiegel von 4-MeO-E1, 2-MeO-E2 und 4-MeO-E2 bei allen Proben unterhalb des LOD. Ebenso waren die metabolischen Flüsse zu 2-MeO-E1 im Vergleich zu Flüssen zu 4-MeO-E1, 2-MeO-E2 und 4-MeO-E2 ohne Berücksichtigung von Polymorphismen signifikant (gepaarter t-Test, adjustierte p-Werte: 0,005, 0,0386 und 0,0046) und mit Berücksichtigung von Polymorphismen (*boarderline*) signifikant erhöht (gepaarter t-Test, adjustierte p-Werte: 0,0074, 0,0900 und 0,0177).

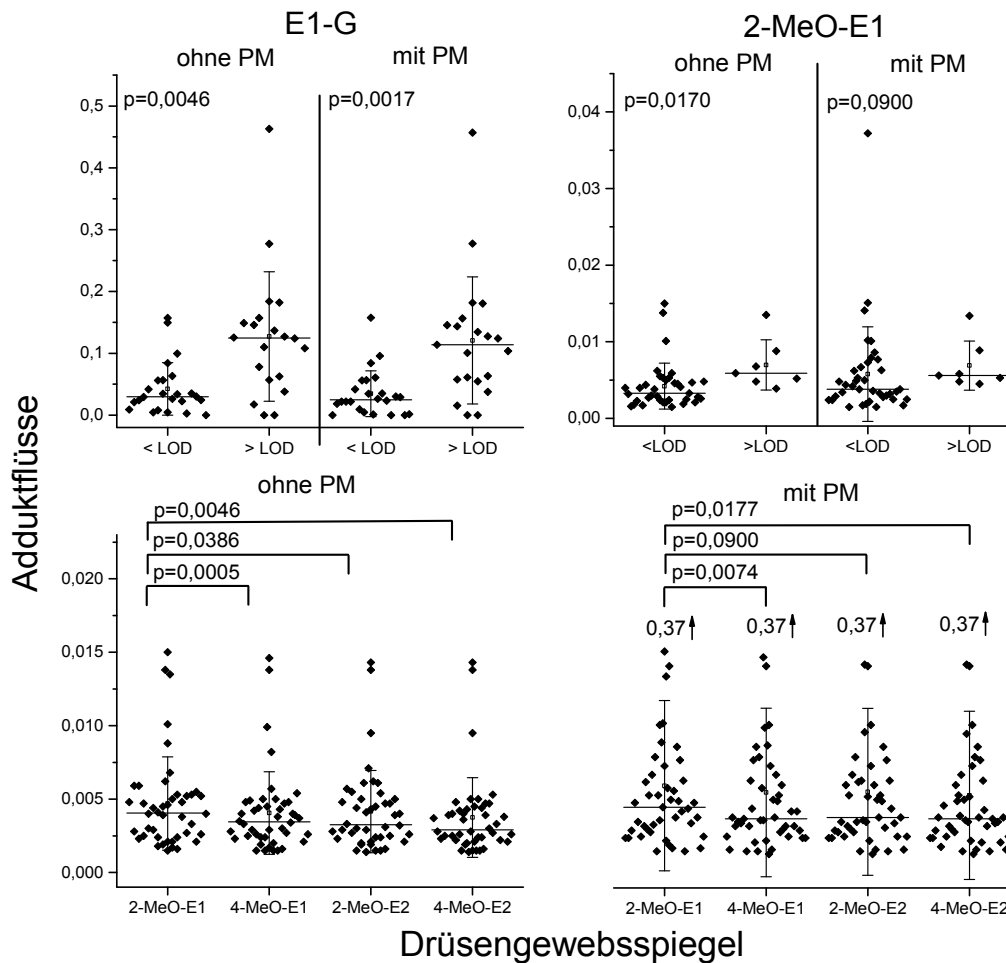


Abbildung 41: Vergleich von Drüsengewebespiegeln und Adduktflüssen (Kap. 3.2.12) zur Validierung der metabolischen Netzwerkmodellierung ohne und mit Berücksichtigung von polymorphismus (PM)-abhängiger enzymatischer Umsetzung (Kap. 3.2.12). Dargestellt sind die jeweils innerhalb der Vergleiche mit und innerhalb der Vergleiche ohne Polymorphismus-Berücksichtigung adjustierten p-Werte. Adjustiert mittels Holm-Korrektur wurde hierbei, um die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer zufälligen Signifikanz durch die multiplen Vergleiche (jeweils sieben) zu minimieren. Horizontale Linie: Median, □: Mittelwert, vertikale Linie: Standardabweichung.

Somit spiegelten die Adduktflüsse sowohl unter Berücksichtigung von polymorphismusabhängiger enzymatischer Umsetzung, als auch ohne, sehr wahrscheinlich die realen im E1-G- und MeO-Estrogenspiegelverhältnisse im Brustdrüsengewebe wider. Anschließend sollten Einflussfaktoren auf die DNA-Adduktflüsse ermittelt werden.

4.3.3. Identifizierung von Einflussfaktoren auf DNA-Adduktflüsse

Zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf Estrogen-DNA-Adduktflüsse sollte ebenso wie zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf die mitochondriale SMF und auf Estrogen-Gewebespiegel die multiple lineare Regression mit schrittweiser Vorwärtsselektion (Kap. 4.2.5) angewendet werden. Die Validierungsergebnisse beider errechneter

DNA-Adduktfluss-Varianten, mit und ohne Berücksichtigung von Polymorphismus-abhängiger enzymatischer Umsetzung, waren ähnlich (Kap. 4.3.2). Daher wurden als abhängige Variable jeweils Flüsse zu E1-, E2- und zur Summe aus E1- und E2-DNA-Adduktflüssen jeweils mit und ohne Berücksichtigung polymorphismusabhängiger enzymatischer Umsetzung verwendet. Transkriptspiegel von Estrogen-metabolisierenden Enzymen und E1- und E2-Brustdrüsengewebsspiegel wurden nicht als exVar berücksichtigt, da diese bereits zu Errechnung der DNA-Adduktflüsse verwendet wurden (Kap. 1.2). Einflussfaktoren auf die Estrogen-DNA-Adduktbildung im Brustgewebe wurden in der Literatur bisher nicht beschrieben. Allerdings können Estrogen-DNA-Addukte zu Mutationen führen und damit potentiell zur Initiation von Brustkrebs beitragen (zusammengefasst in Cavalieri et al., 2006). Daher wurden als exVar hauptsächlich Faktoren die mit einem Brustkrebsrisiko in Verbindung gebracht werden wie Übergewicht bzw. ein erhöhter BMI, Rauchen in Raucher/Nichtraucher eingeteilt, der menopausale Status, das Alter und die Einnahme von estrogenaktiven Medikamenten (Kap. 1.2.2). Der menopausale Status wurde altersabhängig in ≤ 45 Jahre prä, ≥ 53 Jahre post und die Spannweite dazwischen in peri eingeteilt (Kap. 4.1). Isoflavon-Supplementierung ist zwar nicht mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert, allerdings wurde im Tierversuch bereits eine protektive Wirkung gegenüber 1,3-Dimethylbutylamin induzierten Mutationen und *in vitro* eine Erhöhung der Mutationsfrequenz im *HPRT*-Lokus beobachtet (Kap. 1.2.2). Für humanes Gewebe wurde in der Literatur bisher nichts beschrieben. Deshalb wurden zum einen Isoflavongewebespiegel und die Einnahme von isoflavonhaltigen Sojaextrakten sieben Tage vor der OP (Kap. 3.2.1) ebenso als exVar berücksichtigt. Alle Isoflavongewebespiegel (Genistein- und Daidzein-Aglycons, deren Konjugate und mikrobielle Metabolite) waren untereinander kollinear (Spearman-Korrelation, $p < 0,001$). Aufgrund dessen wurden die Isoflavonspiegel im Arbeitskreis bereits in einer Hauptkomponentenanalyse zusammengefasst (Abbildung 42) und als exVar berücksichtigt. Der *lobule type* (Kap. 1.2.2) wurde zusätzlich als Marker für die Gewebeausdifferenzierung berücksichtigt.

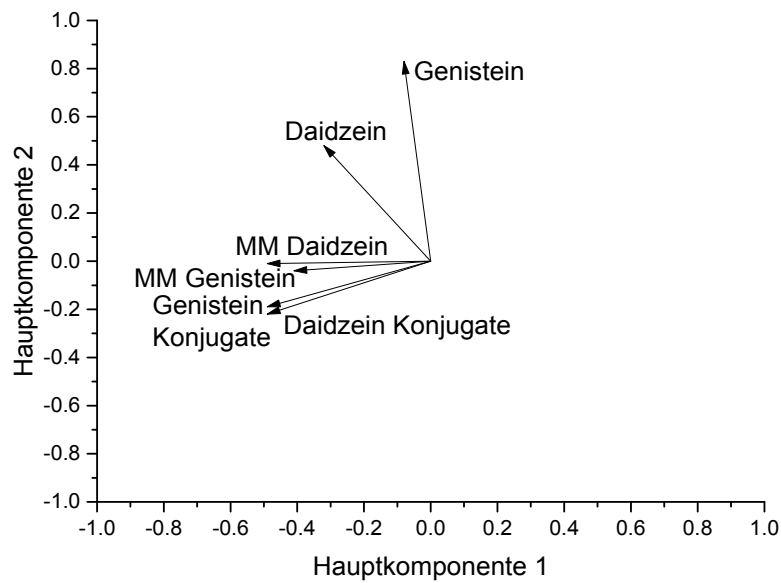


Abbildung 42: Beschreibung der zwei aus Isoflavon-Gewebespiegeln errechneten Hauptkomponenten. Die Richtung der Pfeile gibt den Einfluss der jeweiligen Verbindung auf die Hauptkomponenten an. MM: Mikrobielle Metabolite.

Der BMI beeinflusste alle DNA-Adduktvarianten (E1, E2 und Summe) ohne Berücksichtigung der polymorphismusabhängigen enzymatischen Umsetzung (*borderline*) signifikant positiv ($p=0,0070-0,0547$, Abbildung 43 und Anhang: Tabelle 41). Unter Berücksichtigung der polymorphismusabhängigen enzymatischen Umsetzung beeinflusste der BMI dagegen nur E2-DNA-Adduktflüsse *borderline* signifikant positiv ($p=0,0726$). Übergewicht führt bei postmenopausalen Frauen wahrscheinlich aufgrund höherer zirkulierender Estrogen-Spiegel, zu einem erhöhten Brustkrebsrisiko (Kap. 1.2.2). Dies könnte sich auf die estrogenassoziierte DNA-Adduktbildung in der humanen Brustdrüse ebenso auswirken.

Lob1p beeinflusste im Vergleich zu Lob2/3 bei beiden Summen und E2-Addukt Varianten (mit und ohne Polymorphismus Berücksichtigung) die jeweiligen Adduktflüsse signifikant negativ ($p=0,0011-0,0338$). E1-Adduktflüsse wurden nur ohne Berücksichtigung der polymorphismusabhängigen enzymatischen Umsetzung *borderline* signifikant negativ von Lob1p im Vergleich zu Lob2/3 beeinflusst ($p=0,0652$). Der postmenopausale Status beeinflusste im Vergleich zum prämenopausalen Status nur die Summe und die E1-Adduktflüsse ohne Berücksichtigung der polymorphismusabhängigen enzymatischen Umsetzung (*borderline*) signifikant negativ ($p=0,0783$ und $0,0411$). Obwohl alle Frauen mit Lob2/3 prämenopausal waren, war eine Kollinearität

zwischen Menopausalstatus und *lobule type* nicht sehr wahrscheinlich, da pare Frauen nach der altersbedingten Regression (Lob1p) und nullipare Frauen (Lob1np) pre-, peri und postmenopausal waren (Kap. 4.1: Tabelle 16). Dennoch ist Lob1p meist bei postmenopausalen Frauen, bzw. bei Frauen, die älter als 51 Jahre sind, vorzufinden (Russo und Russo, 2004). Daher sind Lob1p und der postmenopausale Status zumindest annähernd vergleichbar. Das Ende der Estrogen-Produktion in den Ovarien in der Menopause verringert Estrogen-Plasmaspiegel (Key et al., 2011) was sich ebenso auf das Brustgewebe auswirken könnte und zu einer verringerten Estrogen-DNA-Adduktbildung im Brustgewebe führen könnte. Das Alter dagegen beeinflusste keine der abhängigen Variablen signifikant.

Die Isoflavon-Hauptkomponenten beeinflussten keine der drei abhängigen Adduktfluss-Variablen ohne Berücksichtigung der polymorphismusabhängigen enzymatischen Umsetzung (*boarderline*) signifikant. Dagegen beeinflusste Isoflavon Hauptkomponente 1, welche hauptsächlich negativ durch Konjugat- und mikrobielle Metabolitspiegel charakterisiert war (Abbildung 42), alle drei abhängigen Adduktfluss-Variablen unter Berücksichtigung der polymorphismusabhängigen enzymatischen Umsetzung signifikant negativ ($p=0,0186-0,0364$). Ein Einfluss von Isoflavonen auf DNA-Adduktbildung in humanem Gewebe wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben.

Isoflavon Hauptkomponenten-1-Werte von Proben mit Intervention waren signifikant niedriger als Werte von Proben ohne Intervention (Mann-Whitney-U-Test, $p=0,0003$). Da die Interventions-exVar somit potentiell durch eine Kollinearität nicht selektiert worden sein könnte, wurden die linearen Regressionsmodelle mit Adduktflüssen unter Berücksichtigung der polymorphismusabhängigen enzymatischen Umsetzung als abhängige Variable erneut ohne die beiden Isoflavon Hauptkomponenten als exVar gerechnet. Dabei beeinflusste die Intervention die Adduktflussvariablen (E1, E2 und Summe) jeweils signifikant positiv ($p=0,0165-0,0496$, Abbildung 43 und Anhang: Tabelle 41). Im Modell mit der Adduktflusssumme als abhängige Variable ohne Berücksichtigung der Isoflavon-Hauptkomponenten als exVar beeinflusste Lob1p die Adduktflüsse nicht mehr. Im Modell mit E2-Adduktflüssen als abhängige Variable ohne Berücksichtigung der Isoflavon Hauptkomponenten als exVar beeinflusste Lob1p im Vergleich mit Lob2/3 die E2-Adduktflüsse signifikant negativ ($p=0,0266$). Rauchen beeinflusste bei keiner der Modellvarianten die jeweils abhängige Variable (*boarderline*) signifikant.

Rauchen führte in vielen humanen Geweben bereits zu einer erhöhten *CYP1A1*- und *CYP1B1*-Expression (Kap. 1.2.2), und könnte so potentiell zu mehr reaktiven Estrogenchinonen und damit auch DNA-Adduktbildung führen. Ein direkter Einfluss von Rauchen auf DNA-Adduktbildung wurde in der Literatur allerdings noch nicht beschrieben. Des Weiteren beeinflusste weder EE, noch ERD bei einer der Modellvarianten die jeweils abhängige Variable (*boarderline*) signifikant. Ein Einfluss von EE und ERD auf die Estrogen-DNA-Adduktbildung wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Das O/ExVar-Verhältnis lag bei allen Modellen im angestrebten Bereich >5 (Kap. 4.2.5).

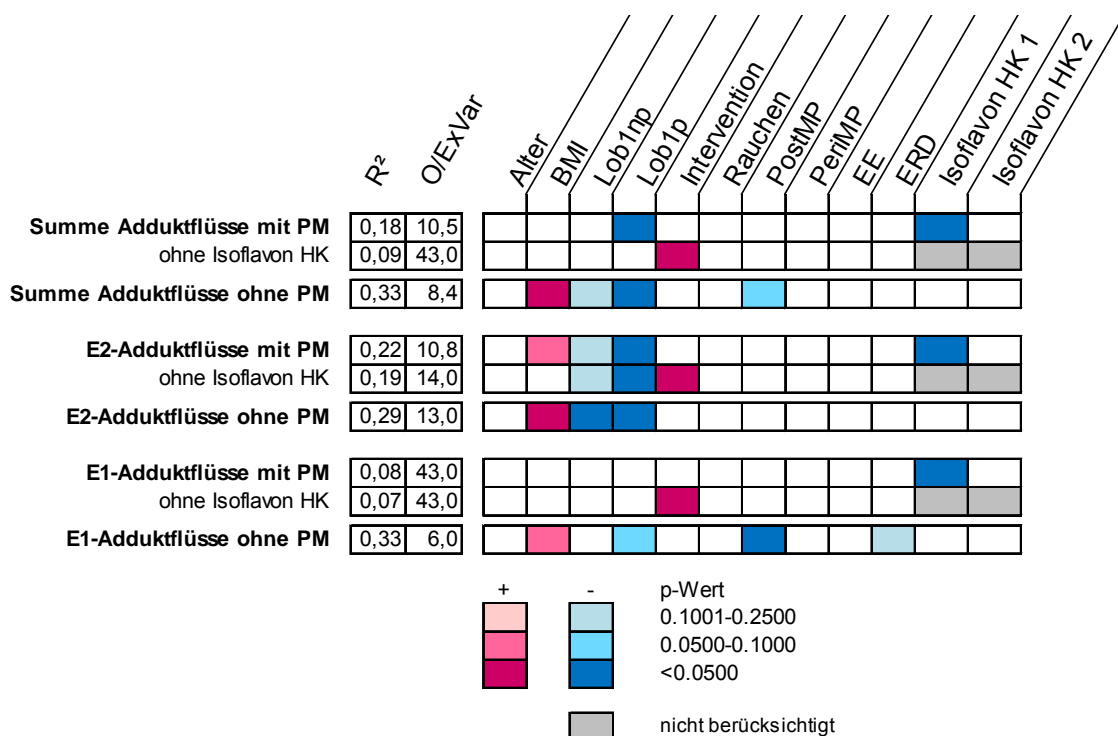


Abbildung 43: Lineare Regressionsmodelle zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf DNA-Adduktflüsse (Kap. 3.2.12 und 3.2.13) mit und ohne Berücksichtigung von Polymorphismus (PM)-abhängiger Enzymaktivität. MP: Menopausalstatus. Der menopausale Status wurde altersabhängig in ≤ 45 Jahre prä, ≥ 53 Jahre post und die Spannweite dazwischen in peri eingeteilt (Kap. 4.1) und prä als Bezugsgruppe verwendet. Beim *lobule type* wurde Lob2/3 als Bezugsgruppe verwendet.

Bezogen auf den *lobule type* deckten sich die Ergebnisse der beiden Adduktfluss-Varianten (mit und ohne Berücksichtigung von polymorphismusabhängiger enzymatischer Umsetzung), waren jedoch nicht identisch, widersprachen sich allerdings auch nicht. Da die Validierungsergebnisse der beiden Adduktflussvarianten ähnlich waren, aber dennoch ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden errechneten Adduktfluss-Varianten bestand (Kap. 4.3.2), besitzen die Ergebnisse beider Varianten sehr

wahrscheinlich eine gleichberechtigte Aussagekraft. Berücksichtigt werden muss dabei, dass die Modelle mit einem R^2 zwischen 0,09 und 0,33 nur 9-33% der Varianz der jeweiligen abhängigen Variable erklärten und vermutlich weitere Parameter zur vollständigen Erklärung benötigt werden.

4.4. Transkriptspiegel als Marker für oxidativen Stress

Die DNA-Adduktflüsse (Kap. 4.3) bilden nur genotoxischen Stress, der durch direkte Interaktion von Katecholen aus dem Estrogenmetabolismus mit der DNA entsteht, ab. ROS, die durch *Redox-Cycling* der Estrogenkatechole entstehen, werden dabei nicht abgebildet (Kap. 1.2). Zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf oxidativen Stress in der weiblichen Brust eignen sich Spiegel von Transkripten, deren Expression bei oxidativem Stress induziert wird, wie die der NQO1, der GCLC und des NFE2L2 (Kap. 1.3). Da eine Vielzahl an potentiellen Einflussfaktoren auf oxidativen Stress im weiblichen Brustdrüsen- und Brustfettgewebe in Frage kommt (Kap. 1.3), sollten eben jene Einflussfaktoren mittels multipler linearer Regressionsanalyse (Kap. 4.2.5) ermittelt werden. Dazu sollten jeweils *NQO1*-, *GCLC*- und *NFE2L2*-Transkriptspiegel im Brustdrüsen- und im Brustfettgewebe als abhängige Variable verwendet werden.

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass der Alkoholkonsum ebenso wie ein hoher BMI die Entstehung von ROS in verschiedenen Geweben förderte (Kap. 1.3). Im Brustgewebe ist die Situation dagegen unerforscht. Daher wurden der Alkoholkonsum und der BMI als exVars berücksichtigt (Tabelle 27). Rauchen, die Einnahme von oralen Kontrazeptiva sowie die Menopause erhöhten Spiegel an Markern für oxidativem Stress im humanen Plasma (Kap. 1.3). Daher wurde Rauchen in Raucher/Nichtraucher eingeteilt, die Einnahme von oralen Kontrazeptiva und der menopausale Status eingeteilt in prä-, peri- und postmenopausal (Kap. 4.1) als exVars berücksichtigt. Isoflavon-Supplementierung führte teilweise in Studien zu einer Erhöhung von Markern für oxidativem Stress in humanem Plasma (Kap. 1.3). Daher wurde eine Teilnahme an der Isoflavon-Intervention (Kap. 3.2.1) als exVar berücksichtigt. Des Weiteren sollten Isoflavon-Gewebespiegel als exVar berücksichtigt werden. Aufgrund der Kollinearität der einzelnen Gewebespiegel von Isoflavon-Metaboliten (Kap. 4.3.1.5) wurden stattdessen zwei aus den einzelnen Isoflavon-Gewebespiegeln errechnete Hauptkomponenten (Kap. 4.3.3: Abbildung 42) als exVar im Drüsengewebe berücksichtigt. Im Fettgewebe dagegen standen keine Isoflavongewebespiegel zur Verfügung.

In anderen Studien wurde bereits beschrieben, dass die Expression von Genen, die als Antwort auf oxidativen Stress exprimiert werden, im humanen Gehirn im Alter stieg, Marker für oxidativen Stress in humanen Venen und Arterien im Alter erhöht und im Plasma von postmenopausalen Frauen Marker für oxidativen Stress höher als in prämenopausalen Frauen waren (Kap. 1.3). Im Brustgewebe ist die Situation dagegen unerforscht. Daher wurde das Alter und der menopausale Status ebenso als exVar berücksichtigt (Tabelle 27).

Aus Estrogenen können reaktive Katechole gebildet werden, die über *Redox-Cycling* zu oxidativem Stress führen können (Kap. 1.2). Diese Katechole können durch CYPs und NQO1 gebildet werden und durch die COMT methyliert oder durch SULTs und UGTs konjugiert und somit entgiftet werden (Kap. 1.2). GSTs konjugieren aus Katecholestrogenen gebildete Chinone und tragen somit ebenfalls zur Entgiftung bei (Kap. 1.2). Daher wurden die *CYP1B1*-, *NQO1*- und *GSTP1*-Polymorphismen und die Transkriptspiegel von *COMT*, *CYP1A1* und *1B1*, *NQO1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *SULT1A1*, *1A2*, *1A3/4*, *1E1*, *UGT1A1*, *1A3/4*, *1A9* und *1A10* als exVar berücksichtigt. Die Wahl der Isoenzyme begründete sich dabei darauf, dass eben jene Isoenzyme jeweils E1, E2, Estrogenkatechole oder -chinone umsetzen können (Hachey et al., 2003, zusammengefasst in Adjei und Weinshilbom, 2002, Blair, 2010 und Lepine et al., 2004). Des Weiteren sollten Gewebespiegel von Vorläufern der Estrogenkatechole, also E2, E1 und E1-S berücksichtigt werden. Aufgrund der Kollinearität der E1-, E2- und E1-S-Gewebespiegel (Spearman-Korrelation, p jeweils $<0,0001$ in Fett- und Drüsengewebe), wurden diese in einer Hauptkomponente zusammengefasst (Tabelle 26).

Tabelle 26: Beschreibung der aus E1-, E2- und E1-S-Gewebespiegeln errechneten Hauptkomponente für die linearen Regressionsmodelle zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf oxidativen Stress. Je höher der Betrag, desto höher der Einfluss (maximal möglicher Betrag: 1,00). Das Plus oder Minus gibt die Richtung des Einflusses auf die jeweilige Hauptkomponente an.

	Drüsen- gewebe	Fett- gewebe
E1	+0,61	+0,62
E2	+0,62	+0,63
E1-S	+0,49	+0,48

Oxidativer Stress kann zu Zellzyklusarrest führen (Kap. 1.3). *CDKN1A* und *CDKN1B* können zur negativen Modulierung des Zellzyklus beitragen und sind daher indikativ

für einen Zellzyklusarrest (Kap. 1.3). Daher wurden *CDKN1A*- und *CDKN1B*-Transkriptspiegel als exVar berücksichtigt. Während der Schwangerschaft proliferiert und differenziert das weibliche Brustdrüsengewebe, bzw. verändert sich von Lob1np über Lob2/3 zu Lob4 und wieder zurück zu Lob1p (Kap. 1.2.2). Oxidativer Stress könnte in unterschiedlich differenziertem Gewebe unterschiedlich reguliert sein. Daher wurde der *lobule type* als exVar berücksichtigt und des Weiteren Transkriptspiegel der Proliferationsmarker *MKI67* und *CCND1* (Tabelle 27).

7 β -HO-, 5,6- α -Epoxy- und 5,6- β -Epoxycholesterol werden durch ROS (Kap. 1.1.5) gebildet und können im Gegensatz zu 7 α -HO- und 7Keto-Cholesterol nicht enzymatisch gebildet werden (Kap. 4.2.5). Deswegen wurde eine aus 7 β -HO-, 5,6- α - und 5,6- β -Epoxycholesterolsiegeln gebildete Summe als Marker für im Gewebe durch ROS-induzierten oxidativen Stress im Fettgewebe als exVar berücksichtigt (Tabelle 27). Im Drüsengewebe standen dagegen keine Oxysterolsiegel zur Verfügung.

Die *GCLC*- und die *NQO1*-Transkription kann durch *NFE2L2*- und die *NQO1*-Transkription zusätzlich durch die Transkriptionsfaktoren *AHR* und *ARNT* induziert werden (Kap. 1.3). Daher wurden in den Modellen mit *GCLC*-Transkriptspiegeln als abhängige Variable *NFE2L2*-Transkriptspiegel als exVar und im Modell mit *NQO1*-Transkriptspiegeln als abhängige Variable *AHR*-, *ARNT*- und *NFE2L2*-Transkriptspiegel als exVars berücksichtigt (Tabelle 27).

GSTT1- und *CYP1A1*-Transkriptspiegel zweier Proben lagen im Fettgewebe unterhalb des LOD und deren Messwerte wurden durch das LOD der entsprechenden Transkript-Bestimmung ersetzt. Die Kalkulation eines potentiellen Effekts ist extrem empfindlich gegenüber Ersetzungen von Werten, die unterhalb des LOD liegen (Arunajadai und Rauh, 2012), und kann zu Fehlern führen (Dinse et al., 2014). Um einen möglichen Einfluss der Ersetzungen auf das Ergebnis der Regressionsanalyse zu ermitteln, wurde eine kategoriale \leq LOD/ $>$ LOD-Ersetzungsvariable der beiden Transkriptspiegel mit $>$ LOD als Bezugsgruppe bei den Modellen mit Fettgewebs-Transkriptspiegeln als abhängige Variable ebenfalls berücksichtigt (Tabelle 27). Da im Drüsengewebe jeweils mehr als ein Drittel der *UGT1A1*- und *1A3/4*-Transkriptspiegel unterhalb des LOD lagen, wurden diese bei den Modellen mit Drüsengewebstranskriptspiegeln nicht berücksichtigt.

Tabelle 27: Berücksichtigte exVars für die multiple lineare Regression mit Vorwärtsselektion zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf Marker für oxidativen Stress in Brustgewebe. Enzyme und Proteine stehen jeweils für die entsprechenden Transkriptspiegel. q: Ersetzungsvariable der jeweiligen exVar zur Ermittlung des Einflusses von Werten die unterhalb LOD lagen. In Klammern ist der Anteil an Werten unterhalb des LODs im Fettgewebe dargestellt. ¹: Nur im Drüsengewebe berücksichtigt, da nur im Drüsengewebspiegel verfügbar waren, ²: nur im Fettgewebe berücksichtigt, da nur Fettgewebsspiegel verfügbar waren, ³: nur bei den Modellen mit *NQO1*-Transkriptspiegeln als abhängige Variable berücksichtigt, ⁴: nur bei den Modellen mit *GCLC*-Transkriptspiegeln als abhängige Variable berücksichtigt, ^{PM}: zusätzlich zum Transkriptspiegel wurde der entsprechende Polymorphismus als kategoriale Genotyp-Variable berücksichtigt. EAM: Einnahme von estrogenaktiven Medikamenten (EE und E2-freisetzende Medikamente), HK: Hauptkomponente.

Lebensstil- und physiologische Faktoren	Estrogenkatechol/-chinon Bildung und Entgiftung	Zellzyklus, Transkriptionsfaktoren und Sonstiges
Alter	Estrogenspiegel HK	<i>CDKN1A</i>
BMI	<i>COMT</i> ^{PM}	<i>CDKN1B</i>
Menopause	<i>CYP1A1</i> (5%)	<i>CCND1</i>
<i>Lobule type</i>	<i>CYP1A1</i> q ²	<i>MKI67</i>
EAM	<i>CYP1B1</i> ^{PM}	<i>AHR</i> ³
Alkoholkonsum	<i>GSTP1</i> ^{PM}	<i>ARNT</i> ³
Rauchen	<i>GSTT1</i> (5%)	<i>NFE2L2</i> ^{3,4}
Isoflavon HK 1 und 2 ¹	<i>GSTT1</i> q ²	Isoflavon Intervention
	<i>NQO1</i> ^{PM}	Summe Oxycholesterole ²
	<i>SULT1A1</i>	
	<i>SULT1A2</i>	
	<i>SULT1A3/4</i>	
	<i>SULT1E1</i>	
	<i>UGT1A1</i> ²	
	<i>UGT1A3/4</i> ²	
	<i>UGT1A9</i>	
	<i>UGT1A10</i>	

Bei der multiplen linearen Regression können zum einen nur vollständige Datensätze verwendet werden und zum anderen sollte die Anzahl an Beobachtungen immer höher sein als die Anzahl an exVars. Unter Berücksichtigung aller Variablen standen im Drüsengewebe 40 Beobachtungen 37 (*NFE2L2*-Transkriptspiegel als abhängige Variable) und 38 (*NQO1*- und *GCLC*-Transkriptspiegel als abhängige Variable) exVars gegenüber. Im Fettgewebe standen 39 Beobachtungen 41 (*NFE2L2*-Transkriptspiegel als abhängige Variable) und 42 (*NQO1*- und *GCLC*-Transkriptspiegel als abhängige Vari-

able) exVars gegenüber. Da auffällige Beobachtungen aus der Berechnung ausgeschlossen werden, kann die Anzahl an Beobachtungen in den letztendlichen Modellen sogar noch geringer sein als 40 bzw. 39. Daher sollten sowohl für die Modelle mit Drüsengewebs-, als auch mit Fettgewebs-Transkriptspiegeln als abhängige Variable, zur Reduktion der Anzahl der exVars, mehrere exVars in Hauptkomponenten zusammengefasst werden.

4.4.1. Hauptkomponentenanalyse zur Reduzierung der erklärenden Variablen

Zur Reduktion der exVars zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf oxidativen Stress mittels multipler linearer Regressionsanalyse sollten mehrere parametrische exVars in Funktionsgruppen-Hauptkomponenten zusammengefasst werden. Dafür wurden zunächst Drüsen- und Fettgewebs-Transkriptspiegel von Proteinen, die am Zellzyklus beteiligt sind (CDKN1A und 1B, CCND1 und MKI67, Kap. 1.3), jeweils in zwei Hauptkomponenten zusammengefasst (Abbildung 44 und Anhang Tabelle 42).

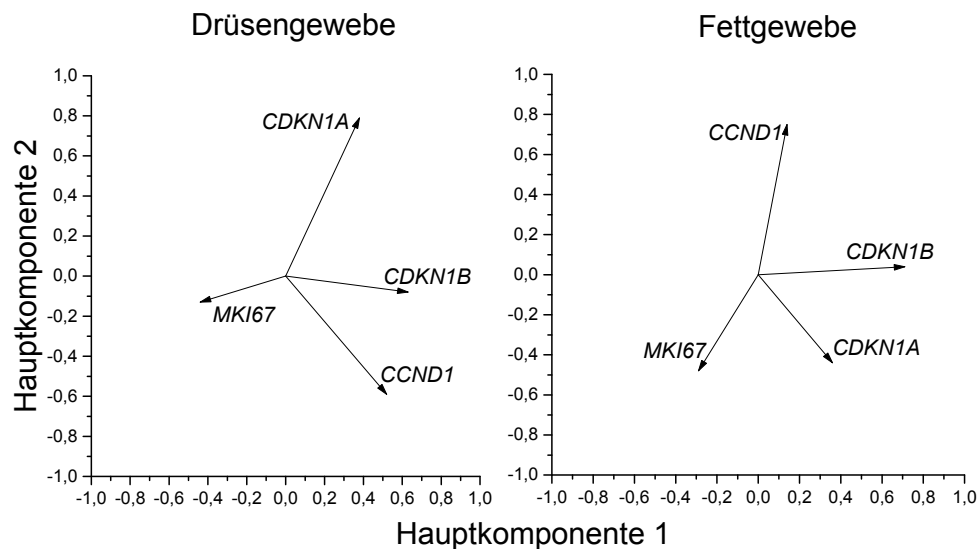


Abbildung 44: Beschreibung der zwei Hauptkomponenten, die aus Transkriptspiegeln von Zellzyklus-Markern errechnet wurden. Die Richtung der Pfeile gibt den Einfluss der jeweiligen Verbindung auf die Hauptkomponenten an.

Des Weiteren wurden Transkriptspiegel von an der Entgiftung von Estrogenkatecholen beteiligten Phase-II-Enzymen (*SULT1A1*, *1A2*, *1A3/4*, *1E1*, *1A9* und *1A10*) im Fettgewebe in drei Hauptkomponenten zusammengefasst (Tabelle 28). Die Transkriptspiegel von an der Entgiftung von Estrogenkatecholen beteiligten Phase-II-Enzymen (*SULT1A1*, *1A2*, *1A3/4*, *1E1*, *UGT1A9* und *1A10*) im Drüsengewebe wurden ebenfalls in drei Hauptkomponenten zusammengefasst (Tabelle 28).

Tabelle 28: Beschreibung der drei aus *SULT*- und *UGT*-Transkriptspiegeln errechneten Hauptkomponenten (HK) für die linearen Regressionsmodelle zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf oxidativen Stress. Je höher der Betrag, desto höher der Einfluss (**Fett**: Werte mit dem höchsten Einfluss bei einer Grenze von $\geq 0,46$, maximal möglicher Betrag: 1,00). Das Plus oder Minus gibt die Richtung des Einflusses auf die jeweilige Hauptkomponente an. *UGT1A1*- und *UGT1A3/4*-Transkriptspiegel wurden im Drüsengewebe nicht berücksichtigt, da mehr als ein Drittel der Werte unterhalb des LOD lagen.

Transkript	Drüsengewebe			Fettgewebe		
	HK1	HK2	HK3	HK1	HK2	HK3
<i>SULT1A1</i>	-0,43	+0,46	+0,10	+0,24	-0,04	+0,58
<i>SULT1A2</i>	-0,34	+0,54	+0,22	+0,56	+0,02	+0,21
<i>SULT1A3/4</i>	-0,07	+0,26	-0,96	+0,06	-0,20	-0,56
<i>SULT1E1</i>	-0,30	-0,53	-0,14	-0,11	+0,65	+0,04
<i>UGT1A1</i>				+0,55	+0,24	-0,20
<i>UGT1A3/4</i>				+0,54	+0,07	-0,20
<i>UGT1A9</i>	-0,60	-0,10	+0,02	-0,12	+0,67	+0,04
<i>UGT1A10</i>	-0,50	-0,38	-0,04	+0,01	-0,18	+0,47

Somit ergab sich eine Reduktion der exVars auf 33 bzw. 34 bei den Modellen mit Fettgewebs-Transkriptspiegeln als abhängige Variable und 32 bzw. 33 bei den Modellen mit Drüsengewebs-Transkriptspiegeln als abhängige Variable und somit zwischen 5-8 weniger als Beobachtungen.

Anschließend sollte mit den Hauptkomponenten anstatt der Transkriptspiegel als exVars, Einflussfaktoren auf Marker-Transkripte für oxidativen Stress identifiziert werden.

4.4.2. Multiple lineare Regressionsmodelle zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf Marker-Transkriptspiegel für oxidativen Stress

Zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf Markertranskriptspiegel für oxidativen Stress wurden mit den in den vorigen beiden Kapiteln (4.4 und 4.4.1) ausgewählten exVars und *GCLC*-, *NQO1*- und *NFE2L2*-Transkriptspiegeln als abhängige Variable jeweils multiple lineare Regressionsmodelle mit schrittweiser vorwärtsselektion gerechnet (Abbildung 45, Anhang: Tabelle 46 und Tabelle 47). Die jeweils signifikant mit den erklärenden Variablen assoziierten exVars unterschieden sich dabei zum einen abhängig von der jeweils erklärenden Variable zum anderen abhängig vom Gewebe. Einzig *COMT*- bzw. *GSTP1*-Transkriptspiegel beeinflussten *NFE2L2*- bzw. *NQO1*-Transkriptspiegel unabhängig vom Gewebe jeweils signifikant positiv.

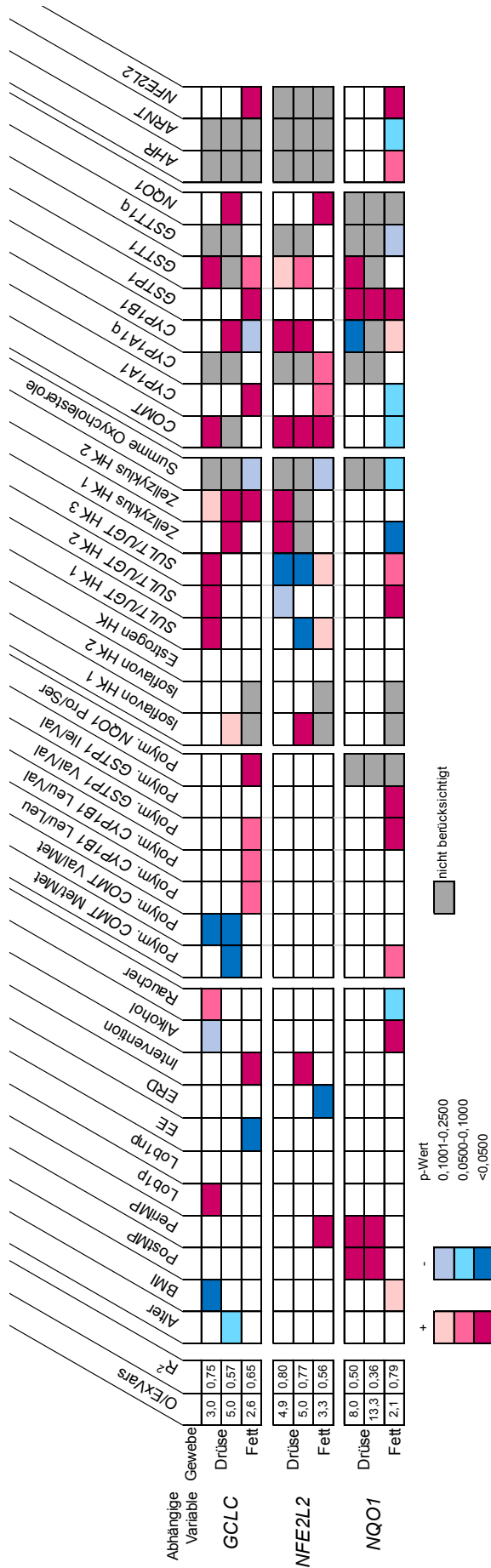


Abbildung 46: Ergebnisse der multiplen linearen Regressionsmodelle zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf Marker-Transkriptspiegel für oxidativen Stress. MP: Menopausalstatus, PM: Polymorphismus eingeteilt nach Genotyp, q: \geq LOD/ $<$ LOD-Ersetzungsvariable mit $<$ LOD als Bezugsgruppe. Als Polymorphismus-Bezugsgruppe wurde jeweils der hochaktive Genotyp nach Kap. 1.2.1 gewählt. Die in der Abbildung angegebenen homozygoten Genotypen repräsentieren dementsprechend das niedrigaktivitäts-Allel. Der menopausale Status wurde altersabhängig in \leq 45 Jahre prä, \geq 53 Jahre post und die Spannweite dazwischen in peri eingeteilt (Kap. 4.1) und prä als Bezugsgruppe verwendet. Beim *lobule* type wurde Lob2/3 als Bezugsgruppe verwendet. Die zweite Zeile der Modelle im Drüsengewebe stellt die erneut gerechneten Modelle zur Überprüfung von potentiell vorhandenen Kollinearitäten (Spearman-Korrelation, $p < 0,001$) zwischen COMT- und CYP1B1-, GSTT1- und NFE2L2-Transkriptspiegeln und Zellzyklus Hauptkomponente 2 und dem Alter dar.

Lifestyle-Faktoren und Gewebecharakteristika

Der BMI beeinflusste *GCLC*-Transkriptspiegel im Drüsengewebe signifikant negativ ($p=0,0009$) und wurde in positiver Richtung in das Modell mit *NQO1*-Transkriptspiegeln als abhängige Variable im Fettgewebe selektiert ($p=0,1506$). *GCLC*-mRNA-Spiegel waren im Fettgewebe von übergewichtigen Mäusen im Vergleich zu normalgewichtigen signifikant erhöht (Kap. 1.3). Des Weiteren führte ein erhöhter BMI im Menschen zu einer Erhöhung von Peroxid-Spiegeln und Spiegeln von thiobarbitursäurereaktiven Substanzen, Marker für oxidativen Stress, im Plasma und ebenso zu einer Erhöhung von Spiegeln von thiobarbitursäurereaktiven Substanzen im Plasma von übergewichtigen Mäusen (Kap. 1.3). Ein negativer Einfluss des BMI auf *GCLC*-Transkriptspiegel im Brustdrüsengewebe war somit entgegen der Erwartung, allerdings wurde für Brustgewebe in der Literatur bisher nichts beschrieben.

Der Alkoholkonsum beeinflusste *NQO1*-Transkriptspiegel im Fettgewebe signifikant positiv ($p=0,0156$) und wurde in negativer Richtung in das Modell mit *GCLC*-Transkriptspiegeln im Drüsengewebe als abhängige Variable selektiert ($p=0,1328$). *NQO1*-mRNA-Spiegel waren um den Faktor zwei nach Gabe von 9-16 g Ethanol/kg Körpergewicht über neun Wochen in Kupferzellen von Wistar-Ratten und nach Inkubation mit 100 mM über acht Stunden in primären THP1-Zellen von Wistar-Ratten um den Faktor vier erhöht (Kap. 1.3). Des Weiteren förderte Ethanolkonsum die Bildung von 1-Hydroxyethyl-Radikalen und Superoxid-Anionen in humanen Leukozyten und Endothelzellen und akuter und chronischer Alkoholkonsum erhöhte die Produktion von ROS und steigerte somit oxidativen Stress in vielen tierischen und humanen Geweben (Kap. 1.3). Für humanes Brustgewebe wurde bisher in der Literatur nichts beschrieben.

Rauchen beeinflusste die *GCLC*-Transkriptspiegel im Drüsengewebe *boarderline* signifikant positiv ($p=0,0715$) und *NQO1*-Transkriptspiegel im Fettgewebe *boarderline* signifikant negativ ($p=0,0676$). In der Literatur wurde eine Abnahme von *GCLC*-Transkriptspiegeln in Lavagen von Raucherlungen im Vergleich zu Nichtraucherlungen beschrieben und *NQO1*-Transkriptspiegel waren in Kleine-Atemwege-Zellen und im Pankreas von Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern signifikant erhöht (Kap. 1.3). Sprague-Dawley-Ratten, die über zwei Wochen für zwei Stunden pro Tag Zigarettenrauch ausgesetzt waren, zeigten in ihrer Bauchaorta eine signifikante *NQO1*-mRNA-Spiegel Abnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kap. 1.3). Die Inkubation

von humanen Epithelzellen mit Zigarettenrauchkondensat über 24 h führte zu erhöhten *GCLC*-mRNA-Spiegeln im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kap. 1.3). Primäre bronchiale und tracheale humane Epithelzellen zeigten nach Inkubation mit Zigarettenrauchkondensaten über 18 Stunden bei neun der elf getesteten Zigarettenrauchkondensate einen um Faktor zwei bis fünf erhöhten *NQO1*-mRNA-Spiegel (Kap. 1.3). Rauchen erhöhte den Malon-Dialdehyd-Spiegel, einem Marker für oxidativen Stress, im Humanplasma und -urin (Kap. 1.3). Für Brustgewebe wurde bisher nichts beschrieben.

EE beeinflusste *GCLC*-Transkriptspiegel im Fettgewebe signifikant negativ ($p=0,0122$). Im Drüsengewebe war EE bei keinem der Modelle mit der jeweils abhängigen Variable (*GCLC*-, *NFE2L2*- und *NQO1*-Transkriptspiegel) signifikant assoziiert. EE als orales Kontrazeptivum eingenommen erhöhte in weiblichen Probandinnen die Spiegel an oxidiertem LDL und Lipid-Peroxiden im Blut signifikant (Kap. 1.3).

Die aus Isoflavon-Gewebespiegeln errechneten Hauptkomponenten wurden in keines der Modelle selektiert. Die Isoflavon-Intervention beeinflusste *GCLC*-Transkriptspiegel im Fettgewebe signifikant positiv ($p=0,0360$). Die tägliche Supplementierung von 50 mg Isoflavonen über drei Wochen führte bei gesunden Frauen und Männern im Vergleich zu nicht-supplementierten Frauen und Männern zu einer Reduktion an 5-Hydroxymethyl-2-Deoxyuridin, einem Marker für oxidativen Stress (Kap. 1.3). In DNA aus nukleären Blutzellen und postmenopausale zeigten Frauen nach einer sechswöchigen Supplementierung mit 40 g Sojaprotein/Tag keine signifikante Reduktion an Stressmarkern (Protein-Carbonyle, oxidiertes LDL und 8-Isoprostaglandin- $F_{2\alpha}$) im Blut (Kap. 1.3). Über 8-24 Wochen mit Soja-Isoflavon-Extrakten supplementierte Ratten zeigten eine signifikante Abnahme an Superoxid-Dismutase- und Katalase-Aktivität in verschiedenen Organen (Kap. 1.3). In humanen Endothelzellen führte eine Inkubation mit 50 μ M Genistein über 24 h zu einer *NFE2L2*-Translokation und so zu einer erhöhten *GCLC*-Transkription (Kap. 1.3).

Lob1p beeinflusste im Vergleich zu Lob2/3 *GCLC*-Transkriptspiegel im Drüsengewebe signifikant positiv ($p<0,0001$). Im Fettgewebe war der *lobule type* in keinem der Modelle mit der jeweils abhängigen Variable (*GCLC*-, *NFE2L2*- und *NQO1*-Transkriptspiegel) signifikant assoziiert. Lob1p steht in Zusammenhang mit altersbedingter Regression des Brustgewebes (Kap. 1.2.2).

Das Alter wurde in keines der Modelle selektiert. Ein Einfluss des Alters auf oxidativen Stress in humanem Brustgewebe wurde bisher nicht beschrieben. Dagegen war das Alter im humanen Frontal-Cortex mit der Überexpression von Genen, die als Antwort auf zellulären Stress exprimiert werden, assoziiert (Kap. 1.3). Nitrotyrosin, eine durch oxidativen Stress modifizierte Aminosäure, war bei alten Männern im Vergleich zu jungen in Endothelzellen aus der Oberarm-Arterie und antekubitalen Venen signifikant erhöht (Kap. 1.3). Der perimenopausale Status dagegen beeinflusste im Vergleich zum prämenopausalen Status *NFE2L2*-Transkriptspiegel im Fettgewebe und *NQO1*-Spiegel im Drüsengewebe signifikant positiv ($p=0,0428$ und $0,0039$). Ein postmenopausaler Status dagegen beeinflusste im Vergleich zu einem prämenopausalen Status nur *NQO1*-Transkriptspiegel im Drüsengewebe signifikant positiv ($p=0,0061$). Ein Einfluss der Menopause auf *NFE2L2*- und *NQO1*-Transkriptspiegel wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben, jedoch waren Plasmaspiegel an Konformations-epitopen im apoB-100 Teil von LDL, einem Marker für oxidiertes LDL, im Plasma in postmenopausalen Frauen im Vergleich zu prämenopausalen Frauen signifikant erhöht (Kap. 1.3). Das Ende der Estrogen-Produktion in den Ovarien in der Menopause verringert Estrogen-Plasmaspiegel (Key et al., 2011), was sich ebenso auf das Brustgewebe auswirken könnte. Somit könnte der Einfluss der Menopause auf *NFE2L2*- und *NQO1*-Transkriptspiegel potentiell E2-induziert sein. In der Literatur wurde sowohl eine Abnahme, als auch eine Zunahme an *NFE2L2*-Transkriptspiegeln nach E2-Behandlung von humanen kultivierten Brustkrebszellen beschrieben (Kap. 1.3). Für *NQO1*-Transkriptspiegel wurde bisher nur eine Abnahme in mit E2 behandelten MCF-7-Zellen beschrieben (Kap. 1.3). Des Weiteren beeinflussten E2-freisetzende Medikamente *NFE2L2*-Transkriptspiegel im Fettgewebe signifikant negativ ($p=0,0113$). Im Drüsengewebe waren E2-freisetzende Medikamente in keinem der Modelle mit der jeweils abhängigen Variable (*GCLC*-, *NFE2L2*- und *NQO1*-Transkriptspiegel) signifikant assoziiert. Die aus Estrogen-Gewebespiegeln errechnete Hauptkomponente wurde dagegen in keines der Modelle selektiert. Berücksichtigt werden muss hierbei allerdings, dass die Estrogen-Hauptkomponente neben E2 ebenso durch E1- und E1-S-Gewebespiegel charakterisiert war (Kap. 4.4: Tabelle 26). E2, E1 und E1-S sind Vorläufer von Katecholen, welche über Redox-Cycling zu oxidativem Stress führen können (Kap. 1.3).

Transkriptspiegel und Polymorphismen in Zusammenhang mit Katecholbildung

Estrogenkatechole können durch CYPs und NQO1 gebildet werden (Kap. 1.2).

CYP1A1-Transkriptspiegel beeinflussten *GCLC*-, *NFE2L2*-, und *NQO1*-Transkriptspiegel im Fettgewebe (*boarderline*) signifikant positiv ($p=0,0053$, $0,0988$ und $0,0871$). Die *CYP1A1* \geq LOD/ $<$ LOD-Ersetzungsvariable (mit $<$ LOD als Bezugsgruppe) beeinflusste *NFE2L2*-Transkriptspiegel im Fettgewebe *boarderline* signifikant positiv ($p=0,0763$). Dies kann zum einen auf einen Einfluss der Ersetzungen hindeuten, zum anderen ist die Ersetzungsvariable auch eine kategoriale *CYP1A1*-Transkriptspiegelvariable. Im Drüsengewebe waren *CYP1A1*-Transkriptspiegel in keinem der Modelle mit der jeweils abhängigen Variable (*GCLC*-, *NFE2L2*- und *NQO1*-Transkriptspiegel) signifikant assoziiert.

CYP1B1-Transkriptspiegel beeinflussten *NFE2L2*- und *NQO1*-Transkriptspiegel im Drüsengewebe signifikant positiv ($p=0,0002$ und $0,0075$). Im Fettgewebe waren *CYP1B1*-Transkriptspiegel in keinem der Modelle mit der jeweils abhängigen Variable (*GCLC*-, *NFE2L2*- und *NQO1*-Transkriptspiegel) signifikant assoziiert. Sowohl der heterozygote *CYP1B1* Leu/Val-Genotyp, als auch der homozygote Val/Val-Genotyp beeinflussten im Fettgewebe im Vergleich zum hochaktivitäts-Leu/Leu-Genotyp *GCLC*-Transkriptspiegel *boarderline* signifikant positiv ($p=0,0547$ und $0,0982$). Im Drüsengewebe beeinflusste der *CYP1B1*-Polymorphismus in keinem der Modelle die jeweils abhängigen Variable (*GCLC*-, *NFE2L2*- und *NQO1*-Transkriptspiegel) signifikant.

NQO1-Transkriptspiegel beeinflussten *NFE2L2*-Transkriptspiegel im Fettgewebe signifikant positiv ($p=0,0045$). Der heterozygote *NQO1* Pro/Ser-Genotyp war im Fettgewebe im Vergleich zum hochaktivitäts-Pro/Pro-Genotyp *GCLC*-Transkriptspiegel signifikant positiv ($p=0,0029$). Im Drüsengewebe beeinflusste der *NQO1*-Polymorphismus in keinem der Modelle die jeweils abhängige Variable (*GCLC*- und *NFE2L2*-Transkriptspiegel) signifikant.

Transkriptspiegel und Polymorphismen in Zusammenhang mit Katecholentgiftung

Mehrere Transkriptspiegel von Genen, die für Enzyme kodieren, die durch Konjugation (*GSTs*, *SULTs* und *UGTs*) oder Methylierung (*COMT*) von Estrogenkatecholen zur Entgiftung von Estrogenkatecholen beitragen und Polymorphismen in eben jenen Ge-

nen, die mit einer Veränderung der enzymatischen Umsetzung assoziiert sind, beeinflussten *GCLC*-, *NQO1*- und *NFE2L2*-Transkriptspiegel sowohl im Drüsen-, als auch im Fettgewebe signifikant:

GSTT1-Transkriptspiegel beeinflussten *GCLC*- und *NQO1*-Transkriptspiegel im Drüsengewebe signifikant positiv ($p=0,0016$ und $0,0237$) und im Fettgewebe *GCLC*-Transkriptspiegel *borderline* signifikant positiv ($p=0,0977$). *GSTP1*-Transkriptspiegel beeinflussten im Drüsengewebe *NQO1*-Transkriptspiegel signifikant positiv ($p=0,0237$) und im Fettgewebe *GCLC*- und *NQO1*-Transkriptspiegel signifikant positiv ($p=0,0060$ und $<0,0001$). Der niedrigaktive *GSTP1* Val/Val-Genotyp beeinflusste im Vergleich zum Ile/Ile-Genotyp *GCLC*- und *NQO1*-Transkriptspiegel im Fettgewebe (*borderline*) signifikant positiv ($p=0,0893$ und $0,0045$). Der *GSTP1*-Polymorphismus war im Drüsengewebe mit keiner der jeweils abhängigen Variablen (*GCLC*-, *NFE2L2*- und *NQO1*-Transkriptspiegel) signifikant assoziiert.

Im Drüsengewebe beeinflusste die *SULT/UGT*-Hauptkomponente 1, welche hauptsächlich in negativer Richtung durch *UGT1A9*- und *1A10*-Transkriptspiegel charakterisiert war (Kap. 4.4.1: Tabelle 28), *GCLC*-Transkriptspiegel signifikant positiv ($p<0,0001$). Im Fettgewebe war *SULT/UGT* Hauptkomponente 1, welche hauptsächlich in positiver Richtung durch *SULT1A2*, *UGT1A1* und *1A3/4* charakterisiert war (Kap. 4.4.1: Tabelle 28), mit keiner der abhängigen Variablen (*GCLC*-, *NFE2L2*-, und *NQO1*-Transkriptspiegel) signifikant assoziiert.

Im Drüsengewebe beeinflusste *SULT/UGT* Hauptkomponente 2, welche hauptsächlich in positiver Richtung durch *SULT1A1*- und *1A2*- und in negativer Richtung durch *SULT1E1*-Transkriptspiegel charakterisiert war (Kap. 4.4.1: Tabelle 28), *GCLC*-Transkriptspiegel signifikant positiv ($p<0,0001$, Anhang: Tabelle 46). Im Fettgewebe beeinflusste *SULT/UGT* Hauptkomponente 2, welche hauptsächlich in positiver Richtung durch *SULT1E1*- und *UGT1A9*-Transkriptspiegel charakterisiert war (Kap. 4.4.1: Tabelle 28), *NQO1*-Transkriptspiegel signifikant positiv ($p=0,0001$).

Im Drüsengewebe beeinflusste *SULT/UGT* Hauptkomponente 3, welche hauptsächlich in negativer Richtung durch *SULT1A3/4*-Transkriptspiegel charakterisiert war (Kap. 4.4.1: Tabelle 28), *GCLC*-Transkriptspiegel signifikant positiv ($p<0,0358$) und *NFE2L2*-Transkriptspiegel signifikant negativ ($p=0,0015$). Im Fettgewebe beeinflusste *SULT/UGT* Hauptkomponente 3, welche im Fettgewebe hauptsächlich in positiver

Richtung durch *SULT1A1*- und *UGT1A10*- und in negativer Richtung durch *SULT1A3/4*-Transkriptspiegel charakterisiert war (Kap. 4.4.1: Tabelle 28), *NQO1*-Transkriptspiegel signifikant *borderline* positiv ($p=0,0744$).

COMT-Transkriptspiegel beeinflussten im Drüsengewebe *GCLC*- und *NFE2L2*-Transkriptspiegel signifikant positiv ($p=0,0170$ und $<0,0001$) und *NFE2L2*-Transkriptspiegel im Fettgewebe signifikant positiv ($p=0,0091$) und *NQO1*-Transkriptspiegel *borderline* signifikant negativ ($p=0,0588$). Der heterozygote *COMT* Val/Met-Genotyp beeinflusste im Drüsengewebe *GCLC*-Transkriptspiegel im Vergleich zum hochaktiven Val/Val-Genotyp signifikant negativ ($p=0,0098$, Anhang: Tabelle 46), der niedrigaktive Met/Met-Genotyp war dagegen im Vergleich zum Val/Val-Genotyp nicht signifikant mit den *GCLC*-Transkriptspiegeln assoziiert ($p=0,2635$). Im Fettgewebe beeinflusste der niedrigaktive Met/Met-Genotyp *NQO1*-Transkriptspiegel im Vergleich zum Val/Val-Genotyp *borderline* signifikant positiv ($p=0,0522$).

Estrogenkatechole können über *Redox-Cycling* zu oxidativem Stress führen (Kap. 1.2). Die Entgiftung von Katecholen ist daher ein wichtiger Mechanismus, um z.B. Zellorganellen und Proteine innerhalb der Zelle vor oxidativem Schaden zu schützen.

Oxycholesterolspiegel

Die 7 β -HO-, 5,6- α -Epoxy- und 5,6- β -Epoxycholesterolspiegelsumme, als Marker für durch ROS induzierten oxidativen Stress, beeinflusste im Fettgewebe *NQO1*-Transkriptspiegel entgegen der Erwartung *borderline* signifikant negativ ($p=0,0635$) und wurde in negativer Richtung in die Modelle mit *GCLC*- und *NFE2L2*-Transkriptspiegeln als abhängige Variable selektiert ($p=0,2339$ und $0,1479$).

Zellzyklus-Marker

Oxidativer Stress kann zu einem Zellzyklus-Arrest führen (Kap. 1.3). Die beiden aus *MKI67*- und *CCND1*-Transkriptspiegeln als Proliferationsmarker und *CDKN1A*- und *CDKN1B*-Transkriptspiegeln als Indikator für einen Zellzyklusarrest (Kap. 1.3) errechneten Hauptkomponenten beeinflussten *NFE2L2*-Transkriptspiegel im Brustdrüsengewebe und *GCLC*-, *NQO1*-Transkriptspiegel im Brustfettgewebe signifikant:

Im Drüsengewebe beeinflusste Zellzyklus-Hauptkomponente 1, welche hauptsächlich positiv durch *CDKN1B*- und *CCND1*- und in negativer Richtung durch *MKI67*-Transkriptspiegel charakterisiert war (Kap. 4.4.1: Abbildung 44), *NFE2L2*-

Transkriptspiegel signifikant positiv ($p=0,0017$). Zellzyklus-Hauptkomponente 2, welche im Drüsengewebe hauptsächlich in positiver Richtung durch *CDKN1A*- und in negativer Richtung durch *CCND1*-Transkriptspiegel charakterisiert war (Kap. 4.4.1: Abbildung 44), beeinflusste *NFE2L2*-Transkriptspiegel signifikant positiv ($p=0,0409$). Oxidativer Stress kann zu einem Zellzyklus-Arrest führen (Kap. 1.3). Ein positiver Einfluss von *CCND1*-Transkriptspiegeln in Hauptkomponente 1 auf *NFE2L2*-Transkriptspiegel war somit entgegen der Erwartung. Allerdings charakterisierten *CCND1*-Transkriptspiegel ebenso stark die mit *NFE2L2*-Transkriptspiegeln assoziierte Zellzyklus-Hauptkomponente 2 in negativer Richtung.

Im Fettgewebe beeinflusste Zellzyklus-Hauptkomponente 1, welche hauptsächlich in positiver Richtung durch *CDKN1B*-Transkriptspiegel charakterisiert war (Kap. 4.4.1: Abbildung 44), *NQO1*-Transkriptspiegel signifikant negativ ($p=0,0073$). Zellzyklus-Hauptkomponente 2, welche im Fettgewebe hauptsächlich in negativer Richtung durch *CDKN1A*- und *MKI67*- und in positiver Richtung durch *CCND1*-Transkriptspiegel charakterisiert war (Kap. 4.4.1: Abbildung 44), beeinflusste *GCLC*-Transkriptspiegel signifikant positiv ($p=0,0004$). Somit entsprach im Fettgewebe lediglich der negative Einfluss von *MKI67*-Transkriptspiegeln auf *GCLC*-Transkriptspiegel den Erwartungen.

Transkriptionsfaktoren

NFE2L2 kann die Transkription von *GCLC* und *NQO1* induzieren (Kap. 1.3). *NFE2L2*-Transkriptspiegel beeinflussten entsprechend der Erwartung im Fettgewebe *GCLC*- und *NQO1*-Transkriptspiegel signifikant positiv ($p=0,0114$ und $0,0156$). In den Modellen im Drüsengewebe mit *GCLC*- und *NQO1*-Transkriptspiegeln als abhängige Variable wurden *NFE2L2*-Transkriptspiegel nicht selektiert.

AHR und *ARNT* binden laut Prädiktionsmodell in der Promotorregion von *NQO1* und könnten so potentiell die *NQO1*-Transkription initiieren (Kap. 1.3). *AHR*-Transkriptspiegel beeinflussten *NQO1*-Transkriptspiegel im Fettgewebe *boarderline* signifikant positiv ($p=0,0984$) und *ARNT*-Transkriptspiegel beeinflussten *NQO1*-Transkriptspiegel im Fettgewebe *boarderline* signifikant negativ ($p=0,0679$). Die Richtung des Einflusses von *ARNT*-Transkriptspiegeln widersprach somit der Erwartung. *AHR*- und *ARNT*-Transkriptspiegel wurden im Modell mit *NQO1*-Transkriptspiegeln als abhängige Variable im Drüsengewebe nicht in das Modell selektiert.

Im Drüsengewebe besteht wahrscheinlich jeweils zwischen *COMT*- und *CYP1B1*-, und zwischen *GSTT1*- und *NFE2L2*-Transkriptspiegeln eine Kollinearität (Spearman-Korrelation, $p=0,0007$ und $0,0001$). Bei einer Kollinearität kann es vorkommen, dass nur eine der beiden entsprechenden exVars bei der schrittweisen Vorwärtselektion in das Modell selektiert wird, da beide die abhängige Variable annähernd equivalent erklären. Daher wurde das Modell mit *GCLC*-Transkriptspiegeln als abhängige Variable erneut ohne *COMT*- und *GSTT1*-Transkriptspiegel als exVar und das Modell mit *NQO1*-Transkriptspiegeln als abhängige Variable erneut ohne *CYP1B1*- und *GSTT1*-Transkriptspiegel als exVar gerechnet (Abbildung 47, Anhang: Tabelle 46 und Tabelle 47).

Im Modell mit *GCLC*-Transkriptspiegeln als abhängige Variable beeinflussten *CYP1B1*-Transkriptspiegel *GCLC*-Transkriptspiegel signifikant positiv ($p=0,0012$), *NFE2L2*-Transkriptspiegel dagegen wurden nicht selektiert und es bestand somit wahrscheinlich keine Kollinearität zwischen *NFE2L2*- und *GSTT1*-Transkriptspiegeln. Im Modell mit *NQO1*-Transkriptspiegeln als abhängige Variable wurden weder *COMT*-, noch *NFE2L2*-Transkriptspiegel selektiert.

Im Modell mit *NFE2L2*-Transkriptspiegeln als abhängige Variable war im Drüsengewebe Zellzyklus-Hauptkomponente 2 wahrscheinlich kollinear mit dem Alter (Spearman-Korrelation, $p=0,0002$). In ein erneut gerechnetes Modell mit *NFE2L2*-Transkriptspiegeln als abhängige Variable ohne Berücksichtigung der Zellzyklus-Hauptkomponente 2 als exVar wurde das Alter nicht in das Modell selektiert.

Das O/ExVar-Verhältnis lag bei beiden Modell-Varianten mit *NQO1*-Transkriptspiegeln als abhängige Variable im Drüsengewebe mit 8,0 und 13,3 im angestrebten Bereich >5 (Kap. 4.2.5). Bei allen anderen Modellen lag das O/ExVar-Verhältnis mit 2,1-5,0 dagegen nicht im angestrebten Bereich >5 (Kap. 4.2.5).

Insgesamt spielen sehr wahrscheinlich Lebensstil-Faktoren wie der BMI, Alkoholkonsum und Rauchen ebenso wie der menopausale Status, die Gewebedifferenzierung und Prozesse, die zur Katecholbildung und -entgiftung führen, eine Rolle im weiblichen Brustgewebe in Zusammenhang mit oxidativem Stress. Berücksichtigt werden muss dabei, dass die Modelle mit einem R^2 zwischen 0,36 und 0,80 nur 36-80% der Varianz der jeweiligen abhängigen Variable erklärten und vermutlich weitere Parameter zur vollständigen Erklärung benötigt werden.

5. Zusammenfassung

Spontanmutationen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Brustkrebs. Daher war das Ziel dieser Arbeit, Einflussfaktoren auf Mutationen in weiblichem Brustgewebe zu identifizieren.

Dafür wurden zunächst von 50 gesunden Frauen, die sich aus kosmetischen Gründen einer Mammareduktion unterzogen hatten, Brustgewebeproben akquiriert. Ein Teil der Spenderinnen nahm im Vorfeld der Operation an einer Isoflavon-Intervention teil. Das Gewebe wurde optisch in Fett- und Drüsengewebe separiert. Als potentielle Variablen, die die Mutationsfrequenz beeinflussen könnten, wurden am Lehrstuhl der *lobule type*, Estrogen- und Estrogenmetabolitspiegel und Transkriptspiegel von Genen, die für am Estrogen-Metabolismus beteiligte Enzyme, Transkriptionsfaktoren und Rezeptoren kodieren, im Gewebe der Probandinnen bestimmt. Des Weiteren wurden am Lehrstuhl Oxysterolspiegel im Fettgewebe und am Max-Rubner-Institut in Karlsruhe Isoflavonspiegel im Drüsengewebe der Probandinnen bestimmt.

Zunächst wurde der Umfang an genotoxischem Stress auf mitochondrialer Ebene ermittelt. Dafür wurde der *Random Mutation Capture Assay* als genotypselektive Methode, die sensitiv genug zur Bestimmung der mitochondrialen Spontanmutationsfrequenz ist, ausgewählt. Die erforderlichen Primer wurden für das Cytochrom-B-Gen designiert. Nach Optimierung der Reaktion zur Kopienzahlbestimmung wurde ein linearer und varianzenhomogener Kalibrierbereich festgelegt. Die Standard-Wiederfindungsrate lag, je nach Bereich der Kalibrierung, bei 99 bis 102% mit einer Schwankung von 2 bis 10%. Bei Realproben lag das 10.-90. Perzentil der Standardaddition-Wiederfindungsrate zwischen 62 und 117%. Das 90. Perzentil der Standardabweichung der Wiederfindungsrate lag bei 33% und das der Standardabweichung der Kopienzahl der Proben bei 12%. Um eine möglichst hohe Sensitivität der Mutantenzahlbestimmungs-PCR zu erreichen, wurde die Reaktion ebenfalls optimiert. Bei Mutationsstandard-Wiederfindungsexperimenten wurden in 91 bis 95 Reaktionen im Mittel $11,0 \pm 1,7$ PCR-Produkte detektiert, wobei kein statistisch signifikanter Unterschied zu den 13,6 erwarteten PCR-Produkten bestand. Die Spontanmutationsfrequenz in mitochondrialer DNA eines vor der DNA-Isolation aufgeteilten Brustdrüsengewebsaliquots lag bei $1, 2$ und $6 \cdot 10^{-5}$ bp^{-1} . Zwischen den Spontanmutationsfrequenzen im Fett- und im Drüsengewebe bestand sowohl individuell bei allen getesteten Proben, als auch interindividuell,

statistisch kein signifikanter Unterschied. Ebenso unterschieden sich die mittels Sanger-Sequenzierung der Amplifikationsprodukte der Mutantenzahlbestimmungs-PCR ermittelten Mutationsspektren im Fett- und Drüsengewebe statistisch nicht signifikant. Da mehr Fettgewebsproben als Drüsengewebsproben zur Verfügung standen, wurde die Spontanmutationsfrequenz anschließend in allen geeigneten Fettgewebsproben bestimmt.

Aufgrund der großen Anzahl an potentiellen Einflussfaktoren auf die mitochondriale Spontanmutationsfrequenz, wurden diese im Brustfettgewebe mittels multipler linearer Regressionsanalyse ermittelt. Die mitochondriale Spontanmutationsfrequenz in humanem Brustfettgewebe wurde dabei signifikant positiv durch das Alter beeinflusst. Dies wurde in der Literatur bereits für humane Gehirne und Gehirne von Ratten beschrieben, jedoch nicht für Brustgewebe. Variablen, die in Zusammenhang mit der mitochondrialen Proliferation stehen, beeinflussten die mitochondriale Spontanmutationsfrequenz dagegen nicht. Zudem wurde die mitochondriale Spontanmutationsfrequenz von Oxysterolspiegeln, als Marker für durch reaktive Sauerstoff-Spezies induziertem oxidativen Stress, und Transkriptspiegeln und Genotypen von Genen, die für Enzyme, die im Zusammenhang mit oxidativem Stress stehen, kodieren, beeinflusst. Ein Einfluss von oxidativem Stress auf die Spontanmutationsfrequenz in humanem Brustgewebe wurde in der Literatur noch nicht beschrieben. Im Gegensatz dazu beeinflussten Variablen, die mit der Bildung von reaktiven Estrogenchinonen in Verbindung stehen, die mitochondriale Spontanmutationsfrequenz nicht signifikant. Auch Rauchen beeinflusste die mitochondriale Spontanmutationsfrequenz nicht. In der Literatur wurde beschrieben, dass sich auch das mitochondriale Mutationsspektrum in Lungen von Raucher- und Nichtraucherzwillingen nicht unterschied. Ebenso beeinflussten der Fettgehalt des Gewebes und der BMI, welche in Verbindung mit proinflammatorischen Mediatoren gebracht werden, die Spontanmutationsfrequenz nicht signifikant. Berücksichtigt werden muss allerdings, dass mit einem Variationskoeffizienten von 0,60 nur 60% der Varianz der Spontanmutationsfrequenz erklärt werden konnte und somit weitere Einflussfaktoren eine Rolle spielen könnten.

In Bezug auf nukleäre DNA erwies sich der *Random Mutation Capture Assay* in einer vorangegangenen Arbeit als zu zeitaufwendig und unwirtschaftlich. Mutationen können aufgrund von DNA-Adduktbildung entstehen. Bei der Entstehung von reaktiven Verbindungen, die in der weiblichen Brustdrüse in der Lage sind, DNA-Addukte zu

bilden, wird derzeit von einer Rolle des Estrogenmetabolismus ausgegangen. Am Lehrstuhl wurden bereits DNA-Adduktflüsse in weiblichem Brustdrüsengewebe mittels bioinformatischer *constraint-based* Netzwerkmodellierung errechnet. Da die für das Netzwerk-Modell als Surrogat für die Enzymaktivität verwendeten Transkriptspiegel eine Vereinfachung der Enzymaktivität darstellen, wurden zunächst Polymorphismen, die Einfluss auf die Bildung und Entgiftung reaktiver Estrogen-Metabolite nehmen können, identifiziert. Mittels allelischer Diskriminierung wurden für die Genotypisierung der Proben geeignete Positivkontrollen ausgewählt und mittels Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus-PCR verifiziert. Die Allelfrequenzen der genotypisierten Brustgewebeproben lagen innerhalb des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts und auch innerhalb bereits publizierter Frequenzen gesunder deutscher bzw. hellhäutiger Frauen. Ebenso entsprach der Einfluss der Polymorphismen auf den jeweils assoziierten mRNA-Spiegel den Ergebnissen anderer Studien. Für den Polymorphismus innerhalb des Gens der Hydroxysteroid-Dehydrogenase 17 β 2 waren bisher keine Ergebnisse publiziert. In Brustgewebe nahm dieser Polymorphismus keinen signifikanten Einfluss auf den assoziierten mRNA-Spiegel.

Zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf Estrogen-Gewebespiegel im Brustdrüsen- und im Brustfettgewebe wurden am Lehrstuhl bereits multiple lineare Regressionsmodelle mit Estrogen-Gewebespiegeln und daraus errechneten Verhältnissen als abhängige Variablen gerechnet. Bei erneut gerechneten Modellen unter zusätzlicher Berücksichtigung von Polymorphismen, in Genen, die für am Estrogenmetabolismus beteiligte Enzyme kodieren, wurden bei vier von neun Modellen Genotypen in die Modelle selektiert. Anschließend wurde in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Bioinformatik der Universität Würzburg ein zusätzliches Netzwerkmodell erstellt, das die Transkriptspiegel um die relative Aktivität des entsprechenden Genotyps korrigierte. Die Validierungsergebnisse deuteten darauf hin, dass beide Addukt-Modelle (mit und ohne Polymorphismus-Berücksichtigung) äquivalent die reale Situation der jeweils evaluierten Estrogenmetabolitspiegel im Gewebe widerspiegeln.

Daraufhin wurden mittels multipler linearer Regression Einflussfaktoren auf die mit und ohne Genotypen errechneten DNA-Adduktflüsse ermittelt. Die Adduktflüsse wurden dabei vom BMI signifikant positiv beeinflusst. In der Literatur wurde beschrieben, dass Übergewicht, wahrscheinlich aufgrund erhöhter Plasma-Estrogenspiegel, mit dem Brustkrebsrisiko assoziiert ist. Dies könnte sich ebenso auf die DNA-Adduktbildung im

Brustgewebe auswirken. Des Weiteren wurden die Adduktflüsse, welche unter Berücksichtigung von polymorphismusabhängiger enzymatischer Umsetzung errechnet worden waren, positiv von einer Isoflavon-Intervention und Isoflavon-Gewebespiegeln beeinflusst. Ein Einfluss von Isoflavonen auf estrogenassoziierte DNA-Adduktbildung wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Des Weiteren beeinflusste *lobule type 1* nach altersbedingter Regression im Vergleich zu *lobule type 2/3* die DNA-Adduktflüsse signifikant negativ. Der postmenopausale Status beeinflusste im Vergleich zum prämenopausalen Status nur die Estron-DNA-Adduktflüsse ohne Berücksichtigung der polymorphismusabhängigen enzymatischen Umsetzung signifikant negativ. *Lobule type 1* nach altersbedingter Regression ist meist bei postmenopausalen Frauen vorzufinden. Daher sind *lobule type 1* nach altersbedingter Regression und der postmenopausale Status zumindest annähernd vergleichbar. Das Ende der Estrogen-Produktion in den Ovarien in der Menopause verringert Estrogen-Plasmaspiegel, was sich ebenso auf das Brustgewebe auswirken und zu einer verringerten Estrogen-DNA-Adduktbildung im Brustgewebe führen könnte. Das Alter dagegen beeinflusste keine der abhängigen Variablen signifikant. Obwohl bei Rauchern in vielen humanen Geweben bereits eine erhöhte Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase 1A1- und 1B1-Expression nachgewiesen wurde, die potentiell zu mehr reaktiven Estrogenchinonen und damit auch DNA-Adduktbildung führen könnte, beeinflusste Rauchen bei keiner der Modellvarianten die jeweils abhängige Variable signifikant. Des Weiteren beeinflussten weder Ethinylestradiol, noch 17 β -estradiol-freisetzende Medikamente bei einer der Modellvarianten die jeweils abhängige Variable signifikant.

Die Ergebnisse der multiplen linearen Regressionsanalyse der beiden Adduktfluss-Varianten (mit und ohne Berücksichtigung von polymorphismusabhängiger enzymatischer Umsetzung) waren nicht identisch, widersprachen sich allerdings auch nicht. Berücksichtigt werden muss dabei, dass die Modelle mit einem Variationskoeffizienten zwischen 0,09 und 0,33 nur 9-33% der Varianz der jeweiligen abhängigen Variable erklärten und vermutlich weitere Parameter zur vollständigen Erklärung benötigt werden.

Oxidativer Stress kann ebenfalls zu DNA-Addukten führen, wird allerdings nicht durch das verwendete metabolische Netzwerk abgebildet. Daher wurden mittels multipler linearer Regression Einflussfaktoren auf Brustgewebs-Transkriptspiegel von der

NADPH-Chinon Oxidoreduktase 1, der γ -Glutamyl-Cystein Ligase und des Transkriptionsfaktors *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*, Transkripten, deren Expression bei oxidativem Stress induziert wird, ermittelt. Die jeweils signifikant mit den abhängigen Variablen assoziierten erklärenden Variablen unterschieden sich dabei zum einen bezogen auf jeweils abhängigen Variable, zum anderen bezogen auf das Gewebe. Die Marker-Transkriptspiegel wurden vom BMI, Alkoholkonsum, Rauchen und vom menopausalen Status signifikant beeinflusst. Für diese Variablen wurde in der Literatur bereits ein Einfluss auf Marker für oxidativen Stress in humanem Blut oder Plasma und anderen Geweben, jedoch nicht in Brustgewebe beschrieben. Zellzyklus-Marker und Marker der Gewebedifferenzierung beeinflussten die abhängigen Variablen ebenso signifikant. Des Weiteren beeinflussten Transkriptspiegel und Genotypen von Genen, die für Enzyme kodieren, die zur Katecholbildung und -entgiftung führen können, die abhängigen Variablen signifikant. Estrogenspiegel selbst beeinflussten dagegen keine der abhängigen Variablen signifikant. Des Weiteren beeinflussten Oxysterolspiegel, als Marker für durch reaktive Sauerstoffspezies induzierten, oxidativen Stress, entgegen der Erwartung keine der abhängigen Variablen signifikant. Obwohl in der Literatur bereits ein Einfluss des Alters auf Marker für oxidativen Stress im humanen Frontal-Cortex, Endothelzellen der Oberarmarterie und in der humanen Leber beschrieben wurde, beeinflusste es keinen der Transkriptspiegel im Brustgewebe signifikant.

Zusammengefasst wurde zum ersten Mal die mitochondriale Spontanmutationsfrequenz in gesundem humanem Brustgewebe bestimmt und in Kombination mit bioinformatischer Netzwerkmodellierung und multipler linearer Regressionsanalyse ein umfassendes Bild der verschiedenen Einflussfaktoren auf mitochondrialen und estrogeninduzierten genotoxischen Stress in der gesunden weiblichen Brust dargestellt.

6. Summary

Spontaneous mutations play a major role in the development of breast cancer. Therefore, aim of the present work was to determine factors influencing mutations in female breast tissue.

For this purpose, breast tissue specimen of 50 healthy women who underwent mammary reduction surgery for cosmetical reasons were initially collected. A share of the women underwent isoflavone-intervention seven days prior to surgery. The tissue was separated optically into adipose and glandular tissue. As potential variables possibly affecting the mutation frequency, lobule type and estrogen- and estrogen-metabolite tissue levels were determined in mammary and adipose tissue at the chair. Also, transcript tissue levels of genes coding for enzymes involved in estrogen metabolism, transcript levels of transcription factors and of receptors were determined in mammary and adipose tissue at the chair. Furthermore, oxysterole levels were determined in adipose tissue and isoflavone levels were determined in glandular tissue at Max Rubner Institute in Karlsruhe.

At first, the extent of mitochondrial genotoxic stress was assessed via Random Mutation Capture Assay, a genotype selective method suitable to determine rare mutations. After DNA isolation, the Random Mutation Capture Assay mainly consists of two PCR-steps: copy number and mutant number determination. Requisite primers were designed for the cytochrome B gene. Following an optimized PCR regarding the maximum efficiency for the copy number determination, a linear calibration range of homogenous variances was established. Standard recovery rate was 99-102% with a variation of 2-10%, depending on the calibration section. The 10th-90th percentile of standard addition recovery in real specimen was between 62% and 117%. The 90th percentile of the recovery rate's standard deviation was 33% and the 90th percentile of the specimen copy number standard deviation was 12%. The PCR for the mutant number determination was also optimized and in subsequent mutant standard recovery experiments $11,0 \pm 1,7$ PCR products were detected in 91-95 reactions with no statistical difference to 13,6 expected products. Spontaneous mutation frequencies of a prior to DNA isolation apportioned glandular tissue aliquot were 1, 2 and $6 \cdot 10^{-5}$ bp⁻¹. There was no statistically significant difference between spontaneous mutation frequencies in glandular and adipose tissue; neither individually in every tested specimen,

nor interindividually. Moreover, there was no statistically significant difference in mutational spectra in glandular and adipose tissue of mutants obtained by sanger-sequencing of mutant number determination PCR products. Since there were more adipose tissue samples than glandular tissue samples available, spontaneous mutation frequencies were determined in all suitable adipose tissue samples.

Due to the great number of variables potentially influencing mitochondrial spontaneous mutation frequency, multiple linear regression analysis was applied. Mitochondrial spontaneous mutation frequency in human breast adipose tissue was significantly positively influenced by age. Similar observations concerning mitochondrial spontaneous mutations in human and rat brains have been reported in other studies, nonetheless, the present study is the first of its kind conducted in human breast tissue samples. On the other hand, variables associated with mitochondrial proliferation had no influence on mitochondrial spontaneous mutation frequency. Mitochondrial spontaneous mutation frequency was influenced by oxysterole levels, markers for oxidative stress, and transcript levels and genotypes of genes associated with oxidative stress. Such an influence of oxidative stress on mitochondrial spontaneous mutation frequency in human breast tissue has not been described in literature so far. In contrast to that, variables associated with formation of reactive estrogen quinones, for example transcript levels of cytochrome P450-dependent monooxygenases, did not influence mitochondrial mutation frequency significantly. Also, smoking had no significant influence on mitochondrial mutation frequency. Another study has already reported no difference of mutational spectra in lungs of smoker and non-smoker twins. Furthermore, fat content of the tissue and BMI both associated with proinflammatory mediators did not significantly influence spontaneous mutation frequency. However, it must be considered that a variation coefficient of 0.60 only explained 60% of the variance of the spontaneous mutation frequency; thus suggesting other influencing factors might play a role.

Concerning nuclear DNA, in a previous work Random Mutation Capture Assay was found to be time consuming and uneconomic. Mutations can arise from DNA adduct formation. Estrogen metabolism is currently considered to play a role in the formation of reactive compounds able to form DNA adducts in the female mammary gland. At the chair, estrogen-related DNA adduct fluxes in female mammary gland had already been determined by computerized bioinformatical constraint-based network modeling.

Because in the network model transcript levels were used as surrogates for enzyme activity, representing a simplification, polymorphisms possibly influencing the formation and/or detoxification of reactive estrogen metabolites by altering enzymatic conversion rates were identified. By means of allelic discrimination suitable positive controls for the genotyping of the specimen were chosen and verified via restriction fragment length polymorphism PCR. Allel frequencies of genotyped specimen were within Hardy-Weinberg equilibrium and also in accordance with previously published frequencies of healthy German or Caucasian women respectively. Moreover, influence of polymorphisms on their associated mRNA levels met the results of relevant studies in the past. No results for the polymorphism within the gene coding for hydroxysteroid dehydrogenase 17 β 2 have been published up to today. This polymorphism was found to have no significant influence on its associated mRNA levels in breast tissue. To identify factors influencing estrogen tissue levels in breast adipose and glandular tissue, multiple linear regression models had been calculated previously at the chair. In four out of nine re-calculated models in consideration of polymorphisms in genes coding for enzymes involved in estrogen metabolism, specific genotypes were selected into the respective models.

An additional network model in consideration of transcript levels adjusted to the relative genotype activity was compiled in cooperation with the chair of bioinformatics of the University of Würzburg. Validation results indicated that both adduct models (with and without consideration for polymorphisms) were reflecting the actual situation of the particular evaluated estrogen metabolite levels equivalently.

Thereupon, factors influencing calculated DNA adduct fluxes with and without consideration for polymorphisms were identified by means of multiple linear regression model analysis. Adduct fluxes were significantly positively influenced by BMI. In literature it has already been described that obesity is associated with breast cancer risk, possibly due to increased estrogen levels in plasma. Furthermore, adduct fluxes calculated in consideration of polymorphism-dependent enzymatic conversion were significantly influenced positively by isoflavone intervention and isoflavone levels in tissue. An influence of isoflavones on DNA adduct formation associated with estrogens in this manner has never been described in literature. Lobule type 1 after age-related regression in comparison to lobule type 2/3, influenced DNA adduct fluxes significantly negatively. In contrast, postmenopausal status in comparison to premenopausal status influenced

only estrone DNA adduct fluxes, calculated in consideration of polymorphism-dependent enzymatic conversion, significantly negatively. Lobule type 1 after age-related regression is predominantly found in postmenopausal women. Hence, lobule type 1 after age-related regression and postmenopause are roughly comparable. Cessation of ovarian estrogen production decreases estrogen levels in plasma, which might also affect breast tissue, thus leading to decreased estrogen DNA adduct formation in menopause. Neither dependent adduct flux variables were significantly influenced by age. Though increased expression of cytochrome P450-dependent monooxygenases 1A1 and 1B1, was already observed in a variety of human tissues due to smoking, which in turn might lead to an increased estrogen quinone and subsequent estrogen DNA adduct formation, smoking affected neither dependent variable. In addition, neither ethinylestradiol, nor 17β -estradiol-releasing drugs significantly influenced the respective dependent variable in any of the models.

The results of the multiple linear regression analysis of two adduct flux variants (with and without consideration for polymorphism dependent enzymatic conversion) were not identical, but also not contradictory. However, it must be considered that a variation coefficients of 0.09-0.33 only explained 9-33% of the variances of the DNA adduct fluxes; thus suggesting that other influencing factors might play a role.

Oxidative stress is also capable of inducing DNA adduct formation, which is not represented in the metabolic network model. Therefore multiple linear regression models were used to identify factors influencing transcript levels of NADPH quinone oxidoreductase 1, γ -glutamyl cysteine ligase and nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2, the expression of which is induced by oxidative stress. The respective explanatory variables significantly associated with the dependent variables (marker transcript levels for oxidative stress), differed concerning the respective dependent variable and concerning the tissue type. Marker transcript levels were significantly influenced by BMI, alcohol consumption, smoking and menopausal status. An influence on markers for oxidative stress has already been observed in human blood, plasma and other tissues for these variables, but not in human breast tissue so far. Also cell cycle markers and markers for tissue differentiation influenced the dependent variables significantly. Furthermore, transcript levels and genotypes of genes coding for enzymes involved in catechol-formation and -detoxification had a significant influence on the dependent variables. In contrast to that, estrogen levels themselves had no significant influence

on the dependent variables. Different than expected, oxysterole levels, also had no significant influence on neither dependent variable. Although other studies have reported an influence of age on markers for oxidative stress in human frontal cortex, endothelial cells of brachial artery and in human liver, in the present study age was not found to influence any dependent variable.

In conclusion, in the present work determining mitochondrial spontaneous mutation frequencies in healthy human breast tissue was achieved for the first time and, in combination with bioinformatic network modeling and multiple linear regression model analysis, a broad impression of different factors influencing mitochondrial and estrogen-induced genotoxic stress in the healthy human breast was portrayed.

Literaturverzeichnis

- Adjei, A. A. und Weinshilboum, R. M. (2002). Catecholestrogen sulfation: possible role in carcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, **292**(2), 402-408.
- Agarwal, R. (2005). Smoking, oxidative stress and inflammation: impact on resting energy expenditure in diabetic nephropathy. *BMC nephrology*, **6**(1), 13.
- Ahn, E. H., Hirohata, K., Kohn, B. F., Fox, E. J., Chang, C. C. und Loeb, L. A. (2015). Detection of Ultra-Rare Mitochondrial Mutations in Breast Stem Cells by Duplex Sequencing. *PLoS One*, **10**(8), e0136216.
- Ahn, E. H., Lee, S. H., Kim, J. Y., Chang, C. C. und Loeb, L. A. (2016). Decreased Mitochondrial Mutagenesis during Transformation of Human Breast Stem Cells into Tumorigenic Cells. *Cancer Res*, **76**(15), 4569-4578.
- Albano, E. (2006). Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proceedings of the nutrition society*, **65**(3), 278-290.
- Ali-Osman, F., Akande, O., Antoun, G., Mao, J. X. und Buolamwini, J. (1997). Molecular cloning, characterization, and expression in Escherichia coli of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J Biol Chem*, **272**(15), 10004-10012.
- Arbini, A. A., Guerra, F., Greco, M., Marra, E., Gandee, L., Xiao, G., Lotan, Y., Gasparre, G., Hsieh, J. T. und Moro, L. (2013). Mitochondrial DNA depletion sensitizes cancer cells to PARP inhibitors by translational and post-translational repression of BRCA2. *Oncogenesis*, **2**, e82.
- Armand, R., Channon, J. Y., Kintner, J., White, K. A., Miselis, K. A., Perez, R. P. und Lewis, L. D. (2004). The effects of ethidium bromide induced loss of mitochondrial DNA on mitochondrial phenotype and ultrastructure in a human leukemia T-cell line (MOLT-4 cells). *Toxicol Appl Pharmacol*, **196**(1), 68-79.
- Arunajadai, S. G. und Rauh, V. A. (2012). Handling covariates subject to limits of detection in regression. *Environmental and ecological statistics*, **19**(3), 369.
- Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M., Pagano, M. und Draetta, G. (1993). Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes & development*, **7**(5), 812-821.
- Banavali, N. K. (2013). Partial Base Flipping Is Sufficient for Strand Slippage near DNA Duplex Termini. *Journal of the American Chemical Society*, **135**(22), 8274-8282.
- Barabasi, A. L. und Oltvai, Z. N. (2004). Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat Rev Genet*, **5**(2), 101-113.
- Benz, W. (2004). Was ist Antisemitismus? *CH Beck*.
- Bhat, A., Masood, A., Wani, K. A., Bhat, Y. A., Nissar, B., Khan, N. S. und Ganai, B. A. (2017). Promoter methylation and gene polymorphism are two independent events in regulation of GSTP1 gene expression. *Tumour Biol*, **39**(4), 1010428317697563.
- Bielas, J. H. und Loeb, L. A. (2005). Quantification of random genomic mutations. *Nat Methods*, **2**(4), 285-290.
- Binder, D. R., Dunn Jr, W. H. und Swerdlow, R. H. (2005). Molecular characterization of mtDNA depleted and repleted NT2 cell lines. *Mitochondrion*, **5**(4), 255-265.
- Biniecka, M., Fox, E., Gao, W., Ng, C. T., Veale, D. J., Fearon, U. und O'Sullivan, J. (2011). Hypoxia induces mitochondrial mutagenesis and dysfunction in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*, **63**(8), 2172-2182.
- Biniecka, M., Kennedy, A., Ng, C. T., Chang, T. C., Balogh, E., Fox, E., Veale, D. J., Fearon, U. und O'Sullivan, J. N. (2011). Successful tumour necrosis factor (TNF) blocking therapy suppresses oxidative stress and hypoxia-induced mitochondrial mutagenesis in inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther*, **13**(4), R121.
- Blair, I. A. (2010). Analysis of estrogens in serum and plasma from postmenopausal women: past present, and future. *Steroids*, **75**(4-5), 297-306.
- Bryant, F. B. und Yarnold, P. R. (1995). Principal-components analysis and exploratory and confirmatory factor analysis.

- Buchard, A., Sanchez, J. J., Dalhoff, K. und Morling, N. (2007). Multiplex PCR detection of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 gene variants: simultaneously detecting GSTM1 and GSTT1 gene copy number and the allelic status of the GSTP1 Ile105Val genetic variant. *J Mol Diagn*, **9**(5), 612-617.
- Burhans, W. C. und Heintz, N. H. (2009). The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. *Free Radic Biol Med*, **47**(9), 1282-1293.
- Butler, M. W., Hackett, N. R., Salit, J., Strulovici-Barel, Y., Omberg, L., Mezey, J. und Crystal, R. G. (2011). Glutathione S-transferase copy number variation alters lung gene expression. *Eur Respir J*, **38**(1), 15-28.
- Cano, M., Thimmalappula, R., Fujihara, M., Nagai, N., Sporn, M., Wang, A. L., Neufeld, A. H., Biswal, S. und Handa, J. T. (2010). Cigarette smoking, oxidative stress, the anti-oxidant response through Nrf2 signaling, and Age-related Macular Degeneration. *Vision research*, **50**(7), 652-664.
- Cariello, N. F., Piegorsch, W. W., Adams, W. T. und Skopek, T. R. (1994). Computer program for the analysis of mutational spectra: application to p53 mutations. *Carcinogenesis*, **15**(10), 2281-2285.
- Cavalieri, E., Chakravarti, D., Guttenplan, J., Hart, E., Ingle, J., Jankowiak, R., Muti, P., Rogan, E., Russo, J., Santen, R. und Sutter, T. (2006). Catechol estrogen quinones as initiators of breast and other human cancers: Implications for biomarkers of susceptibility and cancer prevention. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, **1766**(1), 63-78.
- Cavalieri, E. L. und Rogan, E. G. (2011). Unbalanced metabolism of endogenous estrogens in the etiology and prevention of human cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **125**(3-5), 169-180.
- Cecil, A., Rikanovic, C., Ohlsen, K., Liang, C., Bernhardt, J., Oelschlaeger, T. A., Gulder, T., Bringmann, G., Holzgrabe, U., Unger, M. und Dandekar, T. (2011). Modeling antibiotic and cytotoxic effects of the dimeric isoquinoline IQ-143 on metabolism and its regulation in *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and human cells. *Genome Biol*, **12**(3), R24.
- Chandel, N., Heiden, M., Thompson, C. und Schumacker, P. (2000). Redox regulation of p53 during hypoxia. *Oncogene*, **19**, 3840-3848.
- Chandrasena, R. E. P., Edirisinghe, P. D., Bolton, J. L. und Thatcher, G. R. (2008). Problematic detoxification of estrogen quinones by NAD (P) H-dependent quinone oxidoreductase and glutathione-S-transferase. *Chemical research in toxicology*, **21**(7), 1324-1329.
- Chang, E. C., Charn, T. H., Park, S. H., Helferich, W. G., Komm, B., Katzenellenbogen, J. A. und Katzenellenbogen, B. S. (2008). Estrogen Receptors alpha and beta as determinants of gene expression: influence of ligand, dose, and chromatin binding. *Mol Endocrinol*, **22**(5), 1032-1043.
- Chang, S.-Y., Chen, C., Yang, Z. und Rodrigues, A. D. (2009). Further Assessment of 17 α -Ethinyl Estradiol as an Inhibitor of Different Human Cytochrome P450 Forms in Vitro. *Drug Metabolism and Disposition*, **37**(8), 1667-1675.
- Chen, H. und Chan, D. C. (2009). Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet*, **18**(R2), R169-176.
- Chen, J., Delannoy, M., Odwin, S., He, P., Trush, M. A. und Yager, J. D. (2003). Enhanced mitochondrial gene transcript, ATP, bcl-2 protein levels, and altered glutathione distribution in ethinyl estradiol-treated cultured female rat hepatocytes. *Toxicol Sci*, **75**(2), 271-278.
- Chen, J., Gokhale, M., Li, Y., Trush, M. A. und Yager, J. D. (1998). Enhanced levels of several mitochondrial mRNA transcripts and mitochondrial superoxide production during ethinyl estradiol-induced hepatocarcinogenesis and after estrogen treatment of HepG2 cells. *Carcinogenesis*, **19**(12), 2187-2193.
- Chen, J., Li, Y., Lavigne, J. A., Trush, M. A. und Yager, J. D. (1999). Increased mitochondrial superoxide production in rat liver mitochondria, rat hepatocytes, and HepG2 cells following ethinyl estradiol treatment. *Toxicol Sci*, **51**(2), 224-235.

- Chen, J., Lipska, B. K., Halim, N., Ma, Q. D., Matsumoto, M., Melhem, S., Kolachana, B. S., Hyde, T. M., Herman, M. M., Apud, J., Egan, M. F., Kleinman, J. E. und Weinberger, D. R. (2004). Functional Analysis of Genetic Variation in Catechol-O-Methyltransferase (COMT): Effects on mRNA, Protein, and Enzyme Activity in Postmortem Human Brain. *American Journal of Human Genetics*, **75**(5), 807-821.
- Clay Montier, L. L., Deng, J. J. und Bai, Y. (2009). Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number. *Journal of Genetics and Genomics*, **36**(3), 125-131.
- Clayton, D. A. (2000). Transcription and replication of mitochondrial DNA. *Human Reproduction*, **15**(suppl_2), 11-17.
- Coller, H. A., Khrapko, K., Torres, A., Frampton, M. W., Utell, M. J. und Thilly, W. G. (1998). Mutational spectra of a 100-base pair mitochondrial DNA target sequence in bronchial epithelial cells: a comparison of smoking and nonsmoking twins. *Cancer Res*, **58**(6), 1268-1277.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M. und Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, **17**(10), 1195-1214.
- Coser, K. R., Chesnes, J., Hur, J., Ray, S., Isselbacher, K. J. und Shioda, T. (2003). Global analysis of ligand sensitivity of estrogen inducible and suppressible genes in MCF7/BUS breast cancer cells by DNA microarray. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**(24), 13994-13999.
- Creighton, C. J., Cordero, K. E., Larios, J. M., Miller, R. S., Johnson, M. D., Chinnaiyan, A. M., Lippman, M. E. und Rae, J. M. (2006). Genes regulated by estrogen in breast tumor cells in vitro are similarly regulated in vivo in tumor xenografts and human breast tumors. *Genome Biology*, **7**(4), R28-R28.
- Crockett, A. O. und Wittwer, C. T. (2001). Fluorescein-labeled oligonucleotides for real-time PCR: using the inherent quenching of deoxyguanosine nucleotides. *Analytical biochemistry*, **290**(1), 89-97.
- Crujeiras, A. B., Diaz-Lagares, A., Carreira, M. C., Amil, M. und Casanueva, F. F. (2013). Oxidative stress associated to dysfunctional adipose tissue: a potential link between obesity, type 2 diabetes mellitus and breast cancer. *Free Radic Res*, **47**(4), 243-256.
- Dakubo, G. D. (2010). Mitochondrial Genetics and Cancer. *Springer Verlag*, Heidelberg Dordrecht London New York.
- Danilov, V. I., Anisimov, V. M., Kurita, N. und Hovorun, D. (2005). MP2 and DFT studies of the DNA rare base pairs: The molecular mechanism of the spontaneous substitution mutations conditioned by tautomerism of bases. *Chemical Physics Letters*, **412**(4), 285-293.
- Davis, J. N., Kucuk, O., Djuric, Z. und Sarkar, F. H. (2001). Soy isoflavone supplementation in healthy men prevents NF- κ B activation by TNF- α in blood lymphocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, **30**(11), 1293-1302.
- Dawling, S., Hachey, D. L., Roodi, N. und Parl, F. F. (2004). In vitro model of mammary estrogen metabolism: structural and kinetic differences between catechol estrogens 2- and 4-hydroxyestradiol. *Chem Res Toxicol*, **17**(9), 1258-1264.
- Dawling, S., Roodi, N., Mernaugh, R. L., Wang, X. und Parl, F. F. (2001). Catechol-O-methyltransferase (COMT)-mediated metabolism of catechol estrogens: comparison of wild-type and variant COMT isoforms. *Cancer Res*, **61**(18), 6716-6722.
- De Groote, D., d'Hauterive, S. P., Pintiaux, A., Balteau, B., Gerday, C., Claesen, J. und Foidart, J.-M. (2009). Effects of oral contraception with ethinylestradiol and drospirenone on oxidative stress in women 18–35 years old. *Contraception*, **80**(2), 187-193.
- Delsite, R., Kachhap, S., Anbazhagan, R., Gabrielson, E. und Singh, K. K. (2002). Nuclear genes involved in mitochondria-to-nucleus communication in breast cancer cells. *Mol Cancer*, **1**, 6.
- DeMarini, D. M. (2004). Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat Res*, **567**(2-3), 447-474.
- Desjardins, P., Frost, E. und Morais, R. (1985). Ethidium bromide-induced loss of mitochondrial DNA from primary chicken embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol*, **5**(5), 1163-1169.

- Dickinson, D. A. und Forman, H. J. (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical pharmacology*, **64**(5), 1019-1026.
- Dickinson, D. A., Levenon, A.-L., Moellering, D. R., Arnold, E. K., Zhang, H., Darley-Usmar, V. M. und Forman, H. J. (2004). Human glutamate cysteine ligase gene regulation through the electrophile response element. *Free Radical Biology and Medicine*, **37**(8), 1152-1159.
- Dietmaier, W., Wittwer, C. und Sivasubramanian, N. (2013). Rapid Cycle Real-Time PCR—Methods and Applications: Genetics and Oncology. *Springer Science & Business Media*.
- Dinse, G. E., Jusko, T. A., Ho, L. A., Annam, K., Graubard, B. I., Hertz-Picciotto, I., Miller, F. W., Gillespie, B. W. und Weinberg, C. R. (2014). Accommodating Measurements Below a Limit of Detection: A Novel Application of Cox Regression. *American Journal of Epidemiology*, **179**(8), 1018-1024.
- Djuric, Z., Chen, G., Doerge, D. R., Heilbrun, L. K. und Kucuk, O. (2001). Effect of soy isoflavone supplementation on markers of oxidative stress in men and women. *Cancer letters*, **172**(1), 1-6.
- Donato, A. J., Eskurza, I., Silver, A. E., Levy, A. S., Pierce, G. L., Gates, P. E. und Seals, D. R. (2007). Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans. *Circulation research*, **100**(11), 1659-1666.
- Dorak, M. (2006). Real-time PCR. *Taylor & Francis Group*, Abingdon.
- Drevon, C., Piccoli, C. und Montesano, R. (1981). Mutagenicity assays of estrogenic hormones in mammalian cells. *Mutat Res*, **89**(1), 83-90.
- EFSA-Panel (2015). Risk assessment for peri- and post-menopausal women taking food supplements containing isolated isoflavones. *EFSA Journal*, **13**(10), 4246-n/a.
- Eichholzer, M., Rohrmann, S., Barbir, A., Hermann, S., Teucher, B., Kaaks, R. und Linseisen, J. (2012). Polymorphisms in heterocyclic aromatic amines metabolism-related genes are associated with colorectal adenoma risk. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.*, **3**(2), 96-106.
- Eigeliene, N., Harkonen, P. und Erkkola, R. (2008). Effects of estradiol and medroxyprogesterone acetate on expression of the cell cycle proteins cyclin D1, p21 and p27 in cultured human breast tissues. *Cell Cycle*, **7**(1), 71-80.
- Engelman, H. M., Alekel, D. L., Hanson, L. N., Kanthasamy, A. G. und Reddy, M. B. (2005). Blood lipid and oxidative stress responses to soy protein with isoflavones and phytic acid in postmenopausal women. *The American journal of clinical nutrition*, **81**(3), 590-596.
- Ericson, N. G., Kulawiec, M., Vermulst, M., Sheahan, K., O'Sullivan, J., Salk, J. J. und Bielas, J. H. (2012). Decreased mitochondrial DNA mutagenesis in human colorectal cancer. *PLoS Genet*, **8**(6), e1002689.
- Esteve, J. M., Mompo, J., Garcia de la Asuncion, J., Sastre, J., Asensi, M., Boix, J., Vina, J. R., Vina, J. und Pallardo, F. V. (1999). Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies in vivo and in vitro. *FASEB J*, **13**(9), 1055-1064.
- Evans, G. und Sutton, E. L. (2015). Oral contraception. *Med Clin North Am*, **99**(3), 479-503.
- Everitt, B. (1975). Multivariate analysis: The need for data, and other problems. *The British Journal of Psychiatry*, **126**(3), 237-240.
- Falkenberg, M., Larsson, N.-G. und Gustafsson, C. M. (2007). DNA Replication and Transcription in Mammalian Mitochondria. *Annual Review of Biochemistry*, **76**(1), 679-699.
- Feigelson, H. S., Cox, D. G., Cann, H. M., Wacholder, S., Kaaks, R., Henderson, B. E., Albanes, D., Altshuler, D., Berglund, G., Berrino, F., Bingham, S., Buring, J. E., Burtt, N. P., Calle, E. E., Chanock, S. J., Clavel-Chapelon, F., Colditz, G., Diver, W. R., Freedman, M. L., Haiman, C. A., Hankinson, S. E., Hayes, R. B., Hirschhorn, J. N., Hunter, D., Kolonel, L. N., Kraft, P., LeMarchand, L., Linseisen, J., Modi, W., Navarro, C., Peeters, P. H., Pike, M. C., Riboli, E., Setiawan, V. W., Stram, D. O., Thomas, G., Thun, M. J., Tjonneland, A. und Trichopoulos, D. (2006). Haplotype analysis of the

- HSD17B1 gene and risk of breast cancer: a comprehensive approach to multicenter analyses of prospective cohort studies. *Cancer Res*, **66**(4), 2468-2475.
- Felty, Q., Singh, K. und Roy, D. (2005). Estrogen-induced G1/S transition of G0-arrested estrogen-dependent breast cancer cells is regulated by mitochondrial oxidant signaling. *Oncogene*, **24**, 4883-4893.
- Feser, W., Kerdar, R. S., Baumann, A., Korber, J., Blode, H. und Kuhn, W. (1998). DNA adduct formation of selected sex steroids in human liver slices in vitro. *Toxicol In Vitro*, **12**(4), 353-364.
- Feser, W., Kerdar, R. S., Blode, H. und Reimann, R. (1996). Formation of DNA-adducts by selected sex steroids in rat liver. *Hum Exp Toxicol*, **15**(7), 556-562.
- Flamm, W., Bond, H. und Burr, H. (1966). Density-gradient centrifugation of DNA in a fixed-angle rotor: a higher order of resolution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, **129**(2), 310-317.
- Fu, Z. D., Csanaky, I. L. und Klaassen, C. D. (2012). Effects of aging on mRNA profiles for drug-metabolizing enzymes and transporters in livers of male and female mice. *Drug Metab Dispos*, **40**(6), 1216-1225.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M. und Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*, **114**(12), 1752-1761.
- García, J. J., Ogilvie, I., Robinson, B. H. und Capaldi, R. A. (2000). Structure, Functioning, and Assembly of the ATP Synthase in Cells from Patients with the T8993G Mitochondrial DNA Mutation: Comparison with the Enzyme in Rho0 cells completely lacking mtDNA. *Journal of Biological Chemistry*, **275**(15), 11075-11081.
- Garson, D. (2008). Factor analysis: Statnotes. North Carolina State University Public Administration Program
- Garte, S., Gaspari, L., Alexandrie, A.-K., Ambrosone, C., Autrup, H., Autrup, J. L., Baranova, H., Bathum, L., Benhamou, S. und Boffetta, P. (2001). Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, **10**(12), 1239-1248.
- Gartel, A. L. und Radhakrishnan, S. K. (2005). Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res*, **65**(10), 3980-3985.
- Gaudet, M. M., Chanock, S., Dunning, A., Driver, K., Brinton, L. A., Lissowska, J., Peplonska, B., Pharoah, P. und Garcia-Closas, M. (2008). HSD17B1 genetic variants and hormone receptor-defined breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **17**(10), 2766-2772.
- Gaudet, M. M., Gapstur, S. M., Sun, J., Diver, W. R., Hannan, L. M. und Thun, M. J. (2013). Active smoking and breast cancer risk: original cohort data and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*, **105**(8), 515-525.
- Gentry, A. C., Juul, S., Veigaard, C., Knudsen, B. R. und Osheroff, N. (2011). The geometry of DNA supercoils modulates the DNA cleavage activity of human topoisomerase I. *Nucleic Acids Research*, **39**(3), 1014-1022.
- Gitenay, D. und Baron, V. T. (2009). Is EGR1 a potential target for prostate cancer therapy? *Future oncology*, **5**(7), 993-1003.
- Godschalk, R. W., Feldker, D. E., Borm, P. J., Wouters, E. F. und van Schooten, F. J. (2002). Body mass index modulates aromatic DNA adduct levels and their persistence in smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **11**(8), 790-793.
- Gorman, S., Fox, E., O'Donoghue, D., Sheahan, K., Hyland, J., Mulcahy, H., Loeb, L. A. und O'Sullivan, J. (2010). Mitochondrial mutagenesis induced by tumor-specific radiation bystander effects. *J Mol Med (Berl)*, **88**(7), 701-708.
- Gorsuch, R. L. (1983). Factor analysis. 2nd. Hillsdale, NJ: LEA.
- Gounder, S. S., Kannan, S., Devadoss, D., Miller, C. J., Whitehead, K. J., Odelberg, S. J., Firpo, M. A., Paine, R., 3rd, Hoidal, J. R., Abel, E. D. und Rajasekaran, N. S. (2012). Impaired transcriptional activity of Nrf2 in age-related myocardial oxidative stress is reversible by moderate exercise training. *PLoS One*, **7**(9), e45697.
- Goven, D., Boutten, A., Lecon-Malas, V., Boczkowski, J. und Bonay, M. (2009). Prolonged cigarette smoke exposure decreases heme oxygenase-1 and alters Nrf2 and Bach1

- expression in human macrophages: roles of the MAP kinases ERK(1/2) and JNK. *FEBS Lett*, **583**(21), 3508-3518.
- Greaves, L. C., Beadle, N. E., Taylor, G. A., Commane, D., Mathers, J. C., Khrapko, K. und Turnbull, D. M. (2009). Quantification of mitochondrial DNA mutation load. *Aging Cell*, **8**(5), 566-572.
- Greaves, L. C., Nooteboom, M., Elson, J. L., Tuppen, H. A., Taylor, G. A., Commane, D. M., Arasaradnam, R. P., Khrapko, K., Taylor, R. W., Kirkwood, T. B., Mathers, J. C. und Turnbull, D. M. (2014). Clonal expansion of early to mid-life mitochondrial DNA point mutations drives mitochondrial dysfunction during human ageing. *PLoS Genet*, **10**(9), e1004620.
- Gu, D., Turesky, R. J., Tao, Y., Langouet, S. A., Nauwelaers, G. C., Yuan, J. M., Yee, D. und Yu, M. C. (2012). DNA adducts of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and 4-aminobiphenyl are infrequently detected in human mammary tissue by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Carcinogenesis*, **33**(1), 124-130.
- Guo, S. W. und Thompson, E. A. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 361-372.
- Hachey, D. L., Dawling, S., Roodi, N. und Parl, F. F. (2003). Sequential action of phase I and II enzymes cytochrome p450 1B1 and glutathione S-transferase P1 in mammary estrogen metabolism. *Cancer Res*, **63**(23), 8492-8499.
- Hah, N., Danko, C. G., Core, L., Waterfall, J. J., Siepel, A., Lis, J. T. und Kraus, W. L. (2011). A Rapid, Extensive, and Transient Transcriptional Response to Estrogen Signaling in Breast Cancer Cells. *Cell*, **145**(4), 622-634.
- Hammiche, A., German, M. J., Hewitt, R., Pollock, H. M. und Martin, F. L. (2005). Monitoring Cell Cycle Distributions in MCF-7 Cells Using Near-Field Photothermal Microspectroscopy. *Biophysical Journal*, **88**(5), 3699-3706.
- Han, Y. H., Kim, S. W., Kim, S. H., Kim, S. Z. und Park, W. H. (2008). 2, 4-Dinitrophenol induces G1 phase arrest and apoptosis in human pulmonary adenocarcinoma Calu-6 cells. *Toxicology in Vitro*, **22**(3), 659-670.
- Harty, L. C., Binińska, M., O'sullivan, J., Fox, E., Mulhall, K., Veale, D. J. und Fearon, U. (2012). Mitochondrial mutagenesis correlates with the local inflammatory environment in arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, **71**(4), 582-588.
- Heller, S., Schubert, S., Krehan, M., Schafer, I., Seibel, M., Latorre, D., Villani, G. und Seibel, P. (2013). Efficient repopulation of genetically derived rho zero cells with exogenous mitochondria. *PLoS One*, **8**(9), e73207.
- Helmig, S., Seelinger, J. U., Philipp-Gehlhaar, M., Dohrel, J. und Schneider, J. (2010). Cyp1B1 mRNA expression in correlation to cotinine levels with respect to the Cyp1B1 L432V gene polymorphism. *Eur J Epidemiol*, **25**(12), 867-873.
- Hernandez-Montes, E., Pollard, S. E., Vauzour, D., Jofre-Montseny, L., Rota, C., Rimbach, G., Weinberg, P. D. und Spencer, J. P. E. (2006). Activation of glutathione peroxidase via Nrf1 mediates genistein's protection against oxidative endothelial cell injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **346**(3), 851-859.
- Hübner, R.-H., Schwartz, J. D., Bishnu, P. D., Barbara, F., Omberg, L., Mezey, J. G., Hackett, N. R. und Crystal, R. G. (2009). Coordinate Control of Expression of Nrf2-Modulated Genes in the Human Small Airway Epithelium is Highly Responsive to Cigarette Smoking. *Mol Med*.
- Hundal, B. S., Dhillon, V. S. und Sidhu, I. S. (1997). Genotoxic potential of estrogens. *Mutat Res*, **389**(2-3), 173-181.
- Ivanova, M. M., Radde, B. N., Son, J., Mehta, F. F., Chung, S. H. und Klinge, C. M. (2013). Estradiol and tamoxifen regulate NRF-1 and mitochondrial function in mouse mammary gland and uterus. *J Mol Endocrinol*, **51**(2), 233-246.
- Jaremko, M., Justenhoven, C., Abraham, B. K., Schroth, W., Fritz, P., Brod, S., Vollmert, C., Illig, T. und Brauch, H. (2005). MALDI-TOF MS and TaqMan assisted SNP genotyping of DNA isolated from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues (FFPET). *Hum. Mutat.*, **25**(3), 232-238.
- Jawinski, P., Tegelkamp, S., Sander, C., Häntzsch, M., Huang, J., Mauche, N., Scholz, M., Spada, J., Ulke, C. und Burkhardt, R. (2016). Time to wake up: No impact of COMT

- Val158Met gene variation on circadian preferences, arousal regulation and sleep. *Chronobiology international*, **33**(7), 893-905.
- Juping, L. und Merret, J. B. (2000). Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H₂O₂ response of normal human fibroblasts. *Biochemical Journal*, **347**(2), 543-551.
- Justenhoven, C., Hamann, U., Schubert, F., Zapatka, M., Pierl, C. B., Rabstein, S., Selinski, S., Mueller, T., Ickstadt, K., Gilbert, M., Ko, Y.-D., Baisch, C., Pesch, B., Harth, V., Bolt, H. M., Vollmert, C., Illig, T., Eils, R., Dippon, J. und Brauch, H. (2008). Breast cancer: a candidate gene approach across the estrogen metabolic pathway. *Breast Cancer Res. Treat.*, **108**(1), 137-149.
- Justenhoven, C., Pierl, C. B., Haas, S., Fischer, H.-P., Baisch, C., Hamann, U., Harth, V., Pesch, B., Bruening, T., Vollmert, C., Illig, T., Dippon, J., Ko, Y.-D. und Brauch, H. (2008). The CYP1B1_1358_GG genotype is associated with estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, **111**(1), 171-177.
- Kamińska, M., Ciszewski, T., Łopacka-Szatan, K., Miotła, P. und Starosławska, E. (2015). Breast cancer risk factors. *Przegląd menopauzalny= Menopause review*, **14**(3), 196.
- Kang, D.-H. (2002). Oxidative stress, DNA damage, and breast cancer. *AACN Advanced Critical Care*, **13**(4), 540-549.
- Kauppila, J. H. und Stewart, J. B. (2015). Mitochondrial DNA: Radically free of free-radical driven mutations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, **1847**(11), 1354-1361.
- Kaushik, G., Kaushik, T., Khanduja, S., Pathak, C. M. und Khanduja, K. L. (2008). Cigarette smoke condensate promotes cell proliferation through disturbance in cellular redox homeostasis of transformed lung epithelial type-II cells. *Cancer Lett*, **270**(1), 120-131.
- Kawai, K., Viars, C., Arden, K., Tarin, D., Urquidi, V. und Goodison, S. (2002). Comprehensive karyotyping of the HT-29 colon adenocarcinoma cell line. *Genes, Chromosomes and Cancer*, **34**(1), 1-8.
- Kawai, S., Nishio, K., Nakamura, S., Sekido, Y., Niwa, T. und Hamajima, N. (2005). Multiplex PCR with confronting two-pair primers for CYP1A1 Ile462Val, GSTM1, GSTT1, and NQO1 C609T. *Asian Pac J Cancer Prev*, **6**(3), 346-352.
- Kennedy, S. R., Salk, J. J., Schmitt, M. W. und Loeb, L. A. (2013). Ultra-sensitive sequencing reveals an age-related increase in somatic mitochondrial mutations that are inconsistent with oxidative damage. *PLoS Genet*, **9**(9), e1003794.
- Key, T. J., Appleby, P. N., Reeves, G. K., Roddam, A. W., Helzlsouer, K. J., Alberg, A. J., Rollison, D. E., Dorgan, J. F., Brinton, L. A., Overvad, K., Kaaks, R., Trichopoulou, A., Clavel-Chapelon, F., Panico, S., Duell, E. J., Peeters, P. H., Rinaldi, S., Fentiman, I. S., Dowsett, M., Manjer, J., Lenner, P., Hallmans, G., Baglietto, L., English, D. R., Giles, G. G., Hopper, J. L., Severi, G., Morris, H. A., Hankinson, S. E., Tworoger, S. S., Koenig, K., Zeleniuch-Jacquotte, A., Arslan, A. A., Toniolo, P., Shore, R. E., Krogh, V., Micheli, A., Berrino, F., Barrett-Connor, E., Laughlin, G. A., Kabuto, M., Akiba, S., Stevens, R. G., Neriishi, K., Land, C. E., Cauley, J. A., Lui, L. Y., Cummings, S. R., Gunter, M. J., Rohan, T. E. und Strickler, H. D. (2011). Circulating sex hormones and breast cancer risk factors in postmenopausal women: reanalysis of 13 studies. *Br J Cancer*, **105**(5), 709-722.
- Khaidakov, M., Chavannes-Turesky, N., Cooney, C. A., Dupont-Versteegden, E. E., Kennedy, R. H., Siegel, E. R., Khaidakova, G. und Shmookler Reis, R. J. (2005). Contribution of de novo point mutations to the overall mutational burden in mitochondrial DNA of adult rats. *Exp Gerontol*, **40**(5), 396-402.
- Khrapko, K., Coller, H. A., Andre, P. C., Li, X. C., Hanekamp, J. S. und Thilly, W. G. (1997). Mitochondrial mutational spectra in human cells and tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**(25), 13798-13803.
- Kim, S., Sohn, I., Ahn, J. I., Lee, K. H., Lee, Y. S. und Lee, Y. S. (2004). Hepatic gene expression profiles in a long-term high-fat diet-induced obesity mouse model. *Gene*, **340**(1), 99-109.

- Kimura, T., Kawasaki, Y., Okumura, F., Sone, T., Natsuki, R. und Isobe, M. (2009). Ethanol-induced expression of glutamate-cysteine ligase catalytic subunit gene is mediated by NF-kappaB. *Toxicol Lett*, **185**(2), 110-115.
- King, M. P. und Attardi, G. (1989). Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science*, **246**(4929), 500-503.
- King, M. P. und Attardi, G. (1996). Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods in Enzymology*. Giuseppe M. Attardi, A. C., *Academic Press*. **Volume 264**: 304-313.
- Kobayashi, H., Matsuda, M., Fukuhara, A., Komuro, R. und Shimomura, I. (2009). Dysregulated glutathione metabolism links to impaired insulin action in adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **296**(6), E1326-1334.
- Kosmider, B., Messier, E. M., Chu, H. W. und Mason, R. J. (2011). Human alveolar epithelial cell injury induced by cigarette smoke. *PLoS One*, **6**(12), e26059.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B. und Strömbom, L. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*, **27**(2), 95-125.
- Kukat, A., Kukat, C., Brocher, J., Schafer, I., Krohne, G., Trounce, I. A., Villani, G. und Seibel, P. (2008). Generation of rho0 cells utilizing a mitochondrially targeted restriction endonuclease and comparative analyses. *Nucleic Acids Res*, **36**(7), e44.
- Kulling, S. E. und Metzler, M. (1997). Induction of micronuclei, DNA strand breaks and HPRT mutations in cultured Chinese hamster V79 cells by the phytoestrogen coumestrol. *Food Chem Toxicol*, **35**(6), 605-613.
- Kumar, S., Banks, T. W. und Cloutier, S. (2012). SNP discovery through next-generation sequencing and its applications. *International Journal of Plant Genomics*, **2012**.
- Landry, J. J., Pyl, P. T., Rausch, T., Zichner, T., Tekkedil, M. M., Stütz, A. M., Jauch, A., Aiyar, R. S., Pau, G. und Delhomme, N. (2013). The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, **3**(8), 1213-1224.
- Lang, R. und Reimann, R. (1993). Studies for a genotoxic potential of some endogenous and exogenous sex steroids. I. Communication: examination for the induction of gene mutations using the Ames Salmonella/microsome test and the HGPRT test in V79 cells. *Environ Mol Mutagen*, **21**(3), 272-304.
- Larsen, N. B., Rasmussen, M. und Rasmussen, L. J. (2005). Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways? *Mitochondrion*, **5**(2), 89-108.
- Lee, J. H., Gurney, S., Pang, D., Temkin, A., Park, N., Janicki, S. C., Zigman, W. B., Silverman, W., Tycko, B. und Schupf, N. (2012). Polymorphisms in HSD17B1: Early Onset and Increased Risk of Alzheimer's Disease in Women with Down Syndrome. *Curr Gerontol Geriatr Res*, **2012**, 361218.
- Lepine, J., Bernard, O., Plante, M., Tetu, B., Pelletier, G., Labrie, F., Belanger, A. und Guillemette, C. (2004). Specificity and regioselectivity of the conjugation of estradiol, estrone, and their catecholestrogen and methoxyestrogen metabolites by human uridine diphospho-glucuronosyltransferases expressed in endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*, **89**(10), 5222-5232.
- Li, D. N., Seidel, A., Pritchard, M. P., Wolf, C. R. und Friedberg, T. (2000). Polymorphisms in P450 CYP1B1 affect the conversion of estradiol to the potentially carcinogenic metabolite 4-hydroxyestradiol. *Pharmacogenetics*, **10**(4), 343-353.
- Limer, J. L. und Speirs, V. (2004). Phyto-oestrogens and breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Res*, **6**(3), 119-127.
- Lin, M. T., Simon, D. K., Ahn, C. H., Kim, L. M. und Beal, M. F. (2002). High aggregate burden of somatic mtDNA point mutations in aging and Alzheimer's disease brain. *Hum Mol Genet*, **11**(2), 133-145.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, **362**(6422), 709-715.
- Liu, J., Chang, S. K. und Wiesenborn, D. (2005). Antioxidant properties of soybean isoflavone extract and tofu in vitro and in vivo. *J Agric Food Chem*, **53**(6), 2333-2340.
- Liu, R. und Choi, J. (2000). Age-associated decline in gamma-glutamylcysteine synthetase gene expression in rats. *Free Radic Biol Med*, **28**(4), 566-574.

- Livak, K. J. (1999). Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genetic analysis: biomolecular engineering*, **14**(5), 143-149.
- Lu, S. C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med*, **30**(1-2), 42-59.
- Lu, S. C., Huang, Z. Z., Yang, J. M. und Tsukamoto, H. (1999). Effect of ethanol and high-fat feeding on hepatic gamma-glutamylcysteine synthetase subunit expression in the rat. *Hepatology*, **30**(1), 209-214.
- Lu, T., Pan, Y., Kao, S.-Y. und Cheng, L. (2004). Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature*, **429**(6994), 883.
- Lyamzaev, K. G., Izyumov, D. S., Avetisyan, A. V., Yang, F., Pletjushkina, O. Y. und Chernyak, B. V. (2004). Inhibition of mitochondrial bioenergetics: the effects on structure of mitochondria in the cell and on apoptosis. *Acta Biochim Pol*, **51**(2), 553-562.
- Lyn-Cook, B. D., Yan-Sanders, Y., Moore, S., Taylor, S., Word, B. und Hammons, G. J. (2006). Increased levels of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in pancreatic tissues from smokers and pancreatic adenocarcinomas: A potential biomarker of early damage in the pancreas. *Cell Biol Toxicol*, **22**(2), 73-80.
- Majic, T., Rentzsch, J., Gudlowski, Y., Ehrlich, S., Juckel, G., Sander, T., Lang, U. E., Winterer, G. und Gallinat, J. (2011). COMT Val108/158Met genotype modulates human sensory gating. *NeuroImage*, **55**(2), 818-824.
- Mandavilli, B. S., Santos, J. H. und Van Houten, B. (2002). Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **509**(1), 127-151.
- Manjanatha, M. G., Shelton, S., Bishop, M. E., Lyn-Cook, L. E. und Aidoo, A. (2006). Dietary effects of soy isoflavones daidzein and genistein on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary mutagenesis and carcinogenesis in ovariectomized Big Blue transgenic rats. *Carcinogenesis*, **27**(12), 2555-2564.
- Mansouri, A., Haouzi, D., Descatoire, V., Demeilliers, C., Sutton, A., Vadrot, N., Fromenty, B., Feldmann, G., Pessayre, D. und Berson, A. (2003). Tacrine inhibits topoisomerases and DNA synthesis to cause mitochondrial DNA depletion and apoptosis in mouse liver. *Hepatology*, **38**(3), 715-725.
- Marcelino, L. A., Andre, P. C., Khrapko, K., Coller, H. A., Griffith, J. und Thilly, W. G. (1998). Chemically induced mutations in mitochondrial DNA of human cells: mutational spectrum of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Cancer Res*, **58**(13), 2857-2862.
- Marjoribanks, J., Farquhar, C., Roberts, H. und Lethaby, A. (2012). Long term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev*, **7**, CD004143.
- Mattingly, K. A., Ivanova, M. M., Riggs, K. A., Wickramasinghe, N. S., Barch, M. J. und Klinge, C. M. (2008). Estradiol stimulates transcription of nuclear respiratory factor-1 and increases mitochondrial biogenesis. *Mol Endocrinol*, **22**(3), 609-622.
- Mena, S., Ortega, A. und Estrela, J. M. (2009). Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **674**(1-2), 36-44.
- Micheletta, F. und Iuliano, L. (2006). Free radical attack on cholesterol: oxysterols as markers of oxidative stress and as bioactive molecules. *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine and Metabolic Agents)*, **6**(3), 305-316.
- Migliore, L. und Coppedè, F. (2002). Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, **512**(2), 135-153.
- Minelli, C., Thompson, J. R., Abrams, K. R., Thakkestian, A. und Attia, J. (2008). How should we use information about HWE in the meta-analyses of genetic association studies? *Int J Epidemiol*, **37**(1), 136-146.
- Mitsuhashi, M. (1996). Technical report: Part 2. Basic requirements for designing optimal PCR primers. *Journal of clinical laboratory analysis*, **10**(5), 285-293.
- Moore, S. C., Matthews, C. E., Ou Shu, X., Yu, K., Gail, M. H., Xu, X., Ji, B.-T., Chow, W.-H., Cai, Q. und Li, H. (2016). Endogenous estrogens, estrogen metabolites, and breast

- cancer risk in postmenopausal Chinese women. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, **108**(10).
- Moyer, A. M., Salavaggione, O. E., Hebring, S. J., Moon, I., Hildebrandt, M. A., Eckloff, B. W., Schaid, D. J., Wieben, E. D. und Weinshilboum, R. M. (2007). Glutathione S-transferase T1 and M1: gene sequence variation and functional genomics. *Clin Cancer Res*, **13**(23), 7207-7216.
- Mukherjee, S., Koner, B. C., Ray, S. und Ray, A. (2006). Environmental contaminants in pathogenesis of breast cancer. *Indian J Exp Biol*, **44**(8), 597-617.
- Mülhardt, C. (2009). Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics. *Springer*.
- Murphy, R. C. und Johnson, K. M. (2008). Cholesterol, reactive oxygen species, and the formation of biologically active mediators. *J Biol Chem*, **283**(23), 15521-15525.
- Naito, A., Carcel-Trullols, J., Xie, C. H., Evans, T. T., Mizumachi, T. und Higuchi, M. (2008). Induction of acquired resistance to antiestrogen by reversible mitochondrial DNA depletion in breast cancer cell line. *Int J Cancer*, **122**(7), 1506-1511.
- Nass, M. M. (1970). Abnormal DNA patterns in animal mitochondria: ethidium bromide-induced breakdown of closed circular DNA and conditions leading to oligomer accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **67**(4), 1926-1933.
- Nekhaeva, E., Bodyak, N. D., Kravtsov, Y., McGrath, S. B., Van Orsouw, N. J., Pluzhnikov, A., Wei, J. Y., Vijg, J. und Khrapko, K. (2002). Clonally expanded mtDNA point mutations are abundant in individual cells of human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**(8), 5521-5526.
- Neurohr, C., Lenz, A. G., Ding, I., Leuchte, H., Kolbe, T. und Behr, J. (2003). Glutamate-cysteine ligase modulatory subunit in BAL alveolar macrophages of healthy smokers. *Eur Respir J*, **22**(1), 82-87.
- Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y. und Noguchi, N. (2005). Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and biophysical research communications*, **338**(1), 668-676.
- Ning, B., Su, Z., Mei, N., Hong, H., Deng, H., Shi, L., Fuscoe, J. C. und Tolleson, W. H. (2014). Toxicogenomics and cancer susceptibility: advances with next-generation sequencing. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, **32**(2), 121-158.
- Nordmann, P. L., Makris, J. C. und Reznikoff, W. S. (1988). Inosine induced mutations. *Molecular and General Genetics MGG*, **214**(1), 62-67.
- Otaegui-Arrazola, A., Menendez-Carreño, M., Ansorena, D. und Astiasarán, I. (2010). Oxysterols: a world to explore. *Food and Chemical Toxicology*, **48**(12), 3289-3303.
- Park, J.-H., Mangal, D., Frey, A. J., Harvey, R. G., Blair, I. A. und Penning, T. M. (2009). Aryl hydrocarbon receptor facilitates DNA strand breaks and 8-oxo-2'-deoxyguanosine formation by the aldo-keto reductase product benzo [a] pyrene-7, 8-dione. *Journal of Biological Chemistry*, **284**(43), 29725-29734.
- Pelkonen, O., Maenpää, J., Taavitsainen, P., Rautio, A. und Raunio, H. (1998). Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica*, **28**(12), 1203-1253.
- Perkins, N. D. (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF-[kappa] B and IKK function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **8**(1), 49.
- Pickett, G., Seagrave, J., Boggs, S., Polzin, G., Richter, P. und Tesfaigzi, Y. (2010). Effects of 10 cigarette smoke condensates on primary human airway epithelial cells by comparative gene and cytokine expression studies. *Toxicol Sci*, **114**(1), 79-89.
- Ramsay, D. T., Kent, J. C., Hartmann, R. A. und Hartmann, P. E. (2005). Anatomy of the lactating human breast redefined with ultrasound imaging. *Journal of Anatomy*, **206**(6), 525-534.
- Randerath, K. und Randerath, E. (1994). 32P-Postlabeling Methods for DNA Adduct Detection: Overview and Critical Evaluation. *Drug Metabolism Reviews*, **26**(1-2), 67-85.
- Reeves, G. K., Pirie, K., Green, J., Bull, D., Beral, V. und Million Women Study, C. (2009). Reproductive factors and specific histological types of breast cancer: prospective study and meta-analysis. *Br J Cancer*, **100**(3), 538-544.

- Reuter, M., Kirsch, P. und Hennig, J. (2006). Inferring candidate genes for attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) assessed by the World Health Organization Adult ADHD Self-Report Scale (ASRS). *J Neural Transm*, **113**(7), 929-938.
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M. und Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*, **49**(11), 1603-1616.
- Rezola, A., Pey, J., Tobalina, L., Rubio, Á., Beasley, J. E. und Planes, F. J. (2014). Advances in network-based metabolic pathway analysis and gene expression data integration. *Briefings in bioinformatics*, **16**(2), 265-279.
- Richman, P. G. und Meister, A. (1975). Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem*, **250**(4), 1422-1426.
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P. und Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **9**(5), 402.
- RKI (2016). Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. *Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch Institut (Hrsg)*, **1. Ausgabe**.
- Ross-Innes, C. S., Stark, R., Holmes, K. A., Schmidt, D., Spyrou, C., Russell, R., Massie, C. E., Vowler, S. L., Eldridge, M. und Carroll, J. S. (2010). Cooperative interaction between retinoic acid receptor-alpha and estrogen receptor in breast cancer. *Genes Dev*, **24**(2), 171-182.
- Rougee, L. R., Riches, Z., Berman, J. M. und Collier, A. C. (2016). The Ontogeny and Population Variability of Human Hepatic NADPH Dehydrogenase Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1). *Drug Metab Dispos*, **44**(7), 967-974.
- Roy, D. und Abul-Hajj, Y. J. (1997). Estrogen-nucleic acid adducts: guanine is major site for interaction between 3,4-estrone quinone and COIII gene. *Carcinogenesis*, **18**(6), 1247-1249.
- Ruckerbauer, D. E., Jungreuthmayer, C. und Zanghellini, J. (2015). Predicting genetic engineering targets with Elementary Flux Mode Analysis: a review of four current methods. *N Biotechnol*, **32**(6), 534-546.
- Rudolph, A., Hein, R., Hoffmeister, M., Foersti, A., Hemminki, K., Risch, A., Brenner, H. und Chang-Claude, J. (2012). Copy number variations of GSTT1 and GSTM1, colorectal cancer risk and possible effect modification of cigarette smoking and menopausal hormone therapy. *Int. J. Cancer*, **131**(5), E841-E848.
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., van, d. H. M. J. B. und Moorman, A. F. M. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.*, **37**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), e45/41-e45/12.
- Rushmore, T., Snyder, R. und Kalf, G. (1984). Covalent binding of benzene and its metabolites to DNA in rabbit bone marrow mitochondria in vitro. *Chem Biol Interact*, **49**(1-2), 133-154.
- Russo, J. und Russo, I. H. (2004). Development of the human breast. *Maturitas*, **49**(1), 2-15.
- Rutledge, R. G. und Stewart, D. (2008). A kinetic-based sigmoidal model for the polymerase chain reaction and its application to high-capacity absolute quantitative real-time PCR. *BMC Biotechnol.*, **8**, No pp. given.
- Rychlik, W., Spencer, W. J. und Rhoads, R. E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res*, **18**(21), 6409-6412.
- Sachdeva, M. M., Cano, M. und Handa, J. T. (2014). Nrf2 signaling is impaired in the aging RPE given an oxidative insult. *Exp Eye Res*, **119**, 111-114.
- Samavat, H. und Kurzer, M. S. (2015). Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Lett*, **356**(2 Pt A), 231-243.
- Sameer, A. S., Shah, Z. A., Syeed, N., Rasool, R., Afroze, D. und Siddiqi, M. A. (2010). NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) Pro187Ser polymorphism and colorectal cancer predisposition in the ethnic Kashmiri population. *Asian Pac J Cancer Prev*, **11**(1), 209-213.
- Santo Signorelli, S., Neri, S., Sciacchitano, S., Di Pino, L., Costa, M. P., Marchese, G., Celotta, G., Cassibba, N., Pennisi, G. und Caschetto, S. (2006). Behaviour of some

- indicators of oxidative stress in postmenopausal and fertile women. *Maturitas*, **53**(1), 77-82.
- Sasaki, M., Tanaka, Y., Kaneuchi, M., Sakuragi, N. und Dahiya, R. (2003). Alleles of polymorphic sites that correspond to hyperactive variants of CYP1B1 protein are significantly less frequent in Japanese as compared to American and German populations. *Hum. Mutat.*, **21**(6), 616/611-616/616.
- Schmahl, C., Ludaescher, P., Greffrath, W., Kraus, A., Valerius, G., Schulze, T. G., Treutlein, J., Rietschel, M., Smolka, M. N. und Bohus, M. (2012). COMT val158met polymorphism and neural pain processing. *PLoS One*, **7**(1), e23658.
- Schmalbach, K. (2014). Identification of factors influencing 17beta-estradiol metabolism in female mammary gland. Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Shapira, N. (2017). The potential contribution of dietary factors to breast cancer prevention. *Eur J Cancer Prev*, **26**(5), 385-395.
- Shelton, P. und Jaiswal, A. K. (2013). The transcription factor NF-E2-related factor 2 (Nrf2): a protooncogene? *FASEB J*, **27**(2), 414-423.
- Shih, P. H. und Yen, G. C. (2007). Differential expressions of antioxidant status in aging rats: the role of transcriptional factor Nrf2 and MAPK signaling pathway. *Biogerontology*, **8**(2), 71-80.
- Shimada, T., Gillam, E. M., Oda, Y., Tsumura, F., Sutter, T. R., Guengerich, F. P. und Inoue, K. (1999). Metabolism of benzo[a]pyrene to trans-7,8-dihydroxy-7, 8-dihydrobenzo[a]pyrene by recombinant human cytochrome P450 1B1 and purified liver epoxide hydrolase. *Chem Res Toxicol*, **12**(7), 623-629.
- Siegel, D., Anwar, A., Winski, S. L., Kepa, J. K., Zolman, K. L. und Ross, D. (2001). Rapid polyubiquitination and proteasomal degradation of a mutant form of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. *Mol Pharmacol*, **59**(2), 263-268.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology*, **82**(2), 291-295.
- Singh, B., Shoulson, R., Chatterjee, A., Ronghe, A., Bhat, N. K., Dim, D. C. und Bhat, H. K. (2014). Resveratrol inhibits estrogen-induced breast carcinogenesis through induction of NRF2-mediated protective pathways. *Carcinogenesis*, **35**(8), 1872-1880.
- Singh, S., Zahid, M., Saeed, M., Gaikwad, N. W., Meza, J. L., Cavalieri, E. L., Rogan, E. G. und Chakravarti, D. (2009). NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 Arg139Trp and Pro187Ser polymorphisms imbalance estrogen metabolism towards DNA adduct formation in human mammary epithelial cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, **117**(0), 56-66.
- Skillman, L. C., Toovey, A. F., Williams, A. J. und Wright, A.-D. G. (2006). Development and validation of a real-time PCR method to quantify rumen protozoa and examination of variability between Entodinium populations in sheep offered a hay-based diet. *Applied and environmental microbiology*, **72**(1), 200-206.
- Song, S., Pursell, Z. F., Copeland, W. C., Longley, M. J., Kunkel, T. A. und Mathews, C. K. (2005). DNA precursor asymmetries in mammalian tissue mitochondria and possible contribution to mutagenesis through reduced replication fidelity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**(14), 4990-4995.
- Souaze, F., Ntodou-Thome, A., Tran, C. Y., Rostene, W. und Forgez, P. (1996). Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. *BioTechniques*, **21**(Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 280-285.
- Soukup, S. T., Al-Maharik, N., Botting, N. und Kulling, S. E. (2014). Quantification of soy isoflavones and their conjugative metabolites in plasma and urine: an automated and validated UHPLC-MS/MS method for use in large-scale studies. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **406**(24), 6007-6020.
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. und Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, **51**(5), 1409-1416.
- Steinbrecher, A., Rohrmann, S., Timofeeva, M., Risch, A., Jansen, E. und Linseisen, J. (2010). Dietary Glucosinolate Intake, Polymorphisms in Selected Biotransformation

- Enzymes, and Risk of Prostate Cancer. *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.*, **19**(1), 135-143.
- Stender, J. D., Kim, K., Charn, T. H., Komm, B., Chang, K. C., Kraus, W. L., Benner, C., Glass, C. K. und Katzenellenbogen, B. S. (2010). Genome-wide analysis of estrogen receptor alpha DNA binding and tethering mechanisms identifies Runx1 as a novel tethering factor in receptor-mediated transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, **30**(16), 3943-3955.
- Sueblinvong, V., Tseng, V., Smith, T., Saghafi, R., Mills, S. T., Neujahr, D. C. und Guidot, D. M. (2014). TGFbeta1 mediates alcohol-induced Nrf2 suppression in lung fibroblasts. *Alcohol Clin Exp Res*, **38**(11), 2731-2742.
- Suh, J. H., Shenvi, S. V., Dixon, B. M., Liu, H., Jaiswal, A. K., Liu, R. M. und Hagen, T. M. (2004). Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(10), 3381-3386.
- Swerdlow, R. H., Parks, J. K., Cassarino, D. S., Maguire, D. J., Maguire, R. S., Bennett, J. P., Jr., Davis, R. E. und Parker, W. D., Jr. (1997). Cybrids in Alzheimer's disease: a cellular model of the disease? *Neurology*, **49**(4), 918-925.
- Syvanen, A. C., Tilgmann, C., Rinne, J. und Ulmanen, I. (1997). Genetic polymorphism of catechol-O-methyltransferase (COMT): correlation of genotype with individual variation of S-COMT activity and comparison of the allele frequencies in the normal population and parkinsonian patients in Finland. *Pharmacogenetics*, **7**(1), 65-71.
- Talhout, R., Schulz, T., Florek, E., van Benthem, J., Wester, P. und Opperhuizen, A. (2011). Hazardous Compounds in Tobacco Smoke. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **8**(2), 613-628.
- Tengan, C. H. und Moraes, C. T. (1996). Detection and analysis of mitochondrial DNA deletions by whole genome PCR. *Biochemical and molecular medicine*, **58**(1), 130-134.
- Theophilus, B. D. und Rapley, R. (2002). PCR mutation detection protocols. *Springer Science & Business Media*.
- Thiviyanathan, V., Somasunderam, A., Volk, D. E., Hazra, T. K., Mitra, S. und Gorenstein, D. G. (2008). Base-pairing properties of the oxidized cytosine derivative, 5-hydroxy uracil. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **366**(3), 752-757.
- Thomas, R. D. und Roy, D. (2001). Base sequence-specific attack of stilbene estrogen metabolite(s) on the mitochondrial DNA: implications in the induction of instability in the mitochondrial genome in the kidney of Syrian hamsters. *Int J Mol Med*, **7**(4), 389-395.
- Thomas, R. D. und Roy, D. (2001). Stilbene estrogen produces higher levels of mitochondrial DNA adducts than nuclear DNA adducts in the target organ of cancer (liver) of male Sprague Dawley rats. *Oncol Rep*, **8**(5), 1035-1038.
- Timofeeva, M., Kropp, S., Sauter, W., Beckmann, L., Rosenberger, A., Illig, T., Jaeger, B., Mittelstrass, K., Dienemann, H., Bartsch, H., Bickeboeller, H., Chang-Claude, J., Risch, A. und Wichmann, H.-E. (2010). Genetic polymorphisms of MPO, GSTT1, GSTM1, GSTP1, EPHX1 and NQO1 as risk factors of early-onset lung cancer. *Int. J. Cancer*, **127**(7), 1547-1561.
- Timofeeva, M., Kropp, S., Sauter, W., Beckmann, L., Rosenberger, A., Illig, T., Jäger, B., Mittelstrass, K., Dienemann, H., The, L.-C., Bartsch, H., Bickeböller, H., Chang-Claude, J., Risch, A. und Wichmann, H.-E. (2009). CYP 450 polymorphisms as risk factors for early onset lung cancer: gender specific differences. *Carcinogenesis*.
- Topal, M. D. und Fresco, J. R. (1976). Complementary base pairing and the origin of substitution mutations. *Nature*, **263**(5575), 285-289.
- Traver, R. D., Siegel, D., Beall, H. D., Phillips, R. M., Gibson, N. W., Franklin, W. A. und Ross, D. (1997). Characterization of a polymorphism in NAD(P)H: quinone oxidoreductase (DT-diaphorase). *Br J Cancer*, **75**(1), 69-75.
- Trubicka, J., Grabowska-Kłujczko, E., Suchy, J., Masojć, B., Serrano-Fernandez, P., Kurzawski, G., Cybulski, C., Górski, B., Huzarski, T., Byrski, T., Gronwald, J., Złowocka, E., Kładny, J., Banaszkiwicz, Z., Wiśniowski, R., Kowalska, E., Lubinski,

- J. und Scott, R. J. (2010). Variant alleles of the CYP1B1 gene are associated with colorectal cancer susceptibility. *BMC Cancer*, **10**(1), 420.
- Tsilidis, K. K., Allen, N. E., Key, T. J., Dossus, L., Lukanova, A., Bakken, K., Lund, E., Fournier, A., Overvad, K., Hansen, L., Tjonneland, A., Fedirko, V., Rinaldi, S., Romieu, I., Clavel-Chapelon, F., Engel, P., Kaaks, R., Schutze, M., Steffen, A., Bamia, C., Trichopoulou, A., Zylis, D., Masala, G., Pala, V., Galasso, R., Tumino, R., Sacerdote, C., Bueno-de-Mesquita, H. B., van Duijnhoven, F. J., Braem, M. G., Onland-Moret, N. C., Gram, I. T., Rodriguez, L., Travier, N., Sanchez, M. J., Huerta, J. M., Ardanaz, E., Larranaga, N., Jirstrom, K., Manjer, J., Idahl, A., Ohlson, N., Khaw, K. T., Wareham, N., Mouw, T., Norat, T. und Riboli, E. (2011). Oral contraceptive use and reproductive factors and risk of ovarian cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Br J Cancer*, **105**(9), 1436-1442.
- Tsuchiya, Y., Nakajima, M. und Yokoi, T. (2005). Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett*, **227**(2), 115-124.
- Tsutsui, T., Tamura, Y., Yagi, E. und Barrett, J. C. (2000). Involvement of genotoxic effects in the initiation of estrogen-induced cellular transformation: studies using Syrian hamster embryo cells treated with 17beta-estradiol and eight of its metabolites. *Int J Cancer*, **86**(1), 8-14.
- Tuomi, J. M., Voorbraak, F., Jones, D. L. und Ruijter, J. M. (2010). Bias in the Cq value observed with hydrolysis probe based quantitative PCR can be corrected with the estimated PCR efficiency value. *Methods*, **50**(4), 313-322.
- Vecchio, D., Arezzini, B., Pecorelli, A., Valacchi, G., Martorana, P. A. und Gardi, C. (2010). Reactivity of mouse alveolar macrophages to cigarette smoke is strain dependent. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **298**(5), L704-713.
- Vermulst, M., Bielas, J. H., Kujoth, G. C., Ladiges, W. C., Rabinovitch, P. S., Prolla, T. A. und Loeb, L. A. (2007). Mitochondrial point mutations do not limit the natural lifespan of mice. *Nat Genet*, **39**(4), 540-543.
- Vermulst, M., Bielas, J. H. und Loeb, L. A. (2008). Quantification of random mutations in the mitochondrial genome. *Methods*, **46**(4), 263-268.
- Vetsch, M. (2001). Rassentheorien deutscher Anthropologen vor und während des 1. Weltkriegs.
- Wang, Z., Ni, L., Wang, J., Lu, C., Ren, M., Han, W. und Liu, C. (2016). The protective effect of melatonin on smoke-induced vascular injury in rats and humans: a randomized controlled trial. *J Pineal Res*, **60**(2), 217-227.
- Wardell, S. E., Kazmin, D. und McDonnell, D. P. (2012). Research Resource: Transcriptional Profiling in a Cellular Model of Breast Cancer Reveals Functional and Mechanistic Differences Between Clinically Relevant SERM and Between SERM/Estrogen Complexes. *Molecular Endocrinology*, **26**(7), 1235-1248.
- Watson, M. A., Stewart, R. K., Smith, G. B., Massey, T. E. und Bell, D. A. (1998). Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis*, **19**(2), 275-280.
- Whang-Peng, J., Lee, E. C., Kao-Shan, C.-S., Seibert, K. und Lippman, M. (1983). Cytogenetic studies of human breast cancer lines: MCF-7 and derived variant sublines. *Journal of the National Cancer Institute*, **71**(4), 687-695.
- Wilson, M. H., Grant, P. J., Hardie, L. J. und Wild, C. P. (2000). Glutathione S-transferase M1 null genotype is associated with a decreased risk of myocardial infarction. *Faseb j*, **14**(5), 791-796.
- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Gundry, C. N. und Elenitoba-Johnson, K. S. J. (2001). Real-Time Multiplex PCR Assays. *Methods*, **25**(4), 430-442.
- Wonisch, W., Falk, A., Sundl, I., Winklhofer-Roob, B. M. und Lindschinger, M. (2012). Oxidative stress increases continuously with BMI and age with unfavourable profiles in males. *Aging Male*, **15**(3), 159-165.
- Wu, L. L., Chiou, C.-C., Chang, P.-Y. und Wu, J. T. (2004). Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clinica Chimica Acta*, **339**(1-2), 1-9.

- Xia, B., Liu, Y., Li, W., Brice, A. R., Dominy, B. N. und Cao, W. (2014). Specificity and catalytic mechanism in family 5 uracil DNA glycosylase. *Journal of Biological Chemistry*, **289**(26), 18413-18426.
- Xu, C., Li, C. Y. und Kong, A. N. (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res*, **28**(3), 249-268.
- Yadav, N. und Chandra, D. (2013). Mitochondrial DNA mutations and breast tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, **1836**(2), 336-344.
- Yager, J. D. (2015). Mechanisms of Estrogen Carcinogenesis: The Role of E2/E1- Quinone Metabolites Suggests New Approaches to Preventive Intervention – A Review. *Steroids*, **99**(0 0), 56-60.
- Yakes, F. M. und Van Houten, B. (1997). Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**(2), 514-519.
- Yang, G., Erdman, D. D., Tondella, M. L. und Fields, B. S. (2009). Evaluation of tetramethylrhodamine and black hole quencher 1 labeled probes and five commercial amplification mixes in TaqMan® real-time RT-PCR assays for respiratory pathogens. *Journal of Virological Methods*, **162**(1–2), 288-290.
- Yeligar, S. M., Machida, K. und Kalra, V. K. (2010). Ethanol-induced HO-1 and NQO1 are differentially regulated by HIF-1alpha and Nrf2 to attenuate inflammatory cytokine expression. *J Biol Chem*, **285**(46), 35359-35373.
- Yu, M., Shi, Y., Wei, X., Yang, Y., Zhou, Y., Hao, X., Zhang, N. und Niu, R. (2007). Depletion of mitochondrial DNA by ethidium bromide treatment inhibits the proliferation and tumorigenesis of T47D human breast cancer cells. *Toxicology Letters*, **170**(1), 83-93.
- Yue, W., Yager, J. D., Wang, J.-P., Jupe, E. R. und Santen, R. J. (2013). Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis. *Steroids*, **78**(2), 161-170.
- Zaleska-Radziwill, M., Affek, K., Doskocz, N. und Affek, A. (2016). In vitro and in vivo genotoxicity assessment of selected pharmaceuticals in relation to Escherichia coli and Cyprinus carpio. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, **51**(12), 1053-1061.
- Zhang, B., Beeghly-Fadiel, A., Long, J. und Zheng, W. (2011). Genetic variants associated with breast-cancer risk: comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence. *The lancet oncology*, **12**(5), 477-488.
- Zhang, H., Liu, H., Davies, K. J., Sioutas, C., Finch, C. E., Morgan, T. E. und Forman, H. J. (2012). Nrf2-regulated phase II enzymes are induced by chronic ambient nanoparticle exposure in young mice with age-related impairments. *Free Radic Biol Med*, **52**(9), 2038-2046.
- Zhang, H. und Pommier, Y. (2008). Mitochondrial topoisomerase I sites in the regulatory D-loop region of mitochondrial DNA. *Biochemistry*, **47**(43), 11196-11203.
- Zhang, J., Schulz, W. A., Li, Y., Wang, R., Zotz, R., Wen, D., Siegel, D., Ross, D., Gabbert, H. E. und Sarbia, M. (2003). Association of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) C609T polymorphism with esophageal squamous cell carcinoma in a German Caucasian and a northern Chinese population. *Carcinogenesis*, **24**(5), 905-909.
- Zheng, L., Dai, H., Zhou, M., Li, M., Singh, P., Qiu, J., Tsark, W., Huang, Q., Kernstine, K., Zhang, X., Lin, D. und Shen, B. (2007). Fen1 mutations result in autoimmunity, chronic inflammation and cancers. *Nat Med*, **13**(7), 812-819.
- Zheng, W., Khrapko, K., Coller, H. A., Thilly, W. G. und Copeland, W. C. (2006). Origins of human mitochondrial point mutations as DNA polymerase γ -mediated errors. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **599**(1–2), 11-20.
- Zhu, Y., Carvey, P. M. und Ling, Z. (2006). Age-related changes in glutathione and glutathione-related enzymes in rat brain. *Brain Res*, **1090**(1), 35-44.
- Zimarina, T. C., Kristensen, V. N., Imianitov, E. N. und Bershtein, L. M. (2004). Polymorphisms of CYP1B1 and COMT in breast and endometrial cancer. *Mol Biol (Mosk)*, **38**(3), 386-393.

Zirbs, M., Puerner, C., Buters, J. T. M., Effner, R., Weidinger, S., Ring, J. und Eberlein, B. (2013). GSTM1, GSTT1 and GSTP1 gene polymorphism in polymorphous light eruption. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, **27**(2), 157-162.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des mitochondrialen <i>Random Mutation Capture Assays</i> modifiziert nach Vermulst et al. (2008).	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung des humanen mitochondrialen Genoms (NCBI GenBank® <i>Accession no.</i> : NC_012920). <i>CYT B</i> : Cytochrom B, <i>ND1-6</i> : Untereinheiten der NADH-Dehydrogenase, <i>COI-III</i> : Untereinheiten der Cytochrom C-Oxidase. ATPase 6/8: Untereinheiten der ATP-Synthase. Grau hinterlegt : für tRNA kodierende Abschnitte.	4
Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung des Estrogenmetabolismus modifiziert nach Blair (2010) und Yue et al. (2013). Ch: Chinon, G: Glucoronid, MeO: Methoxy, S: Sulfat, SG: Glutathion-Addukt, STS: Steroidsulfatase. Gezeigt sind jeweils nur die Enzymklassen ohne Familien und Unter-Familien.	11
Abbildung 4: Schematische Darstellung der allelspezifischen Primer-PCR (ASSP, unten) und schematische Darstellung der Restriktionsfragmentlängen-PCR (oben).	15
Abbildung 5: Schematische Darstellung der allelischen Diskriminierung. VIC und FAM: An die TaqMan®-Sonde gebundene Fluoreszenzfarbstoffe. Die Sonne steht indikativ für ein entstehendes Fluoreszenz-Signal bei Abbau der TaqMan®-Sonde.	16
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Regulation der humanen GCLC- (links) und NQO1-Expression (rechts).Ac: Acetat, AP: <i>activator protein</i> , ARE: <i>Antioxidant responsive element</i> , ARNT: <i>AHR nuclear translocator</i> , BACH1: Transkriptions Regulatorprotein BACH1, CHK: <i>Checkpoint Kinase</i> , EGR1: <i>Early growth response protein 1</i> , ERK: <i>Extra cellular regulated kinase</i> , GRC: <i>GC rich consensus sequence</i> , JNK: c-jun N-terminale Kinase, Keap1: <i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i> , MAPK: MAP Kinase, Me: Methyl, NFκB: <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> , P: Phosphat, PKC: Protein Kinase C, ROS: <i>reactive oxygen species</i> , TRE: <i>Recognition site for AP-1 Binding</i> , XRE: <i>Xenobiotic response element</i> . Schwarze Schrift: Experimentelle Evidenz; Graue Schrift: Prädiktion über Bindungsvermögen von Transkriptionsfaktoren an die Promoterregion des jeweiligen Gens nach Datenbank „Sabiosciences“. Abbildung modifiziert nach Datenbanksuche „Promotor Database“ und Dickinson und Forman (2002), Dickinson et al. (2004), Gitenay und Baron (2009), Lu (2009), Perkins (2007), Riley et al. (2008), Shelton und Jaiswal (2013) und Xu et al. (2005).	21
Abbildung 7: Sequenz des humanen mitochondrialen Cytochrom B-Gens (bp: 14.747-15.887; NCBI GenBank® <i>Accession no.</i> : NC_012920) und die für den mitochondrialen RMCA nach Kap. 3.2.4.1 entwickelten Primer. Fett : <i>TaqI</i> -Schnittstelle, grau hinterlegt : Mutantenzahlprimer, umrahmt : Kopienzahlprimer, unterstrichen: TaqMan®-Sonde.	69
Abbildung 8: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) der PCR-Produkte der Gradienten-PCR nach Kap. 3.2.4.3 zur Überprüfung der Kopienzahlprimer auf eventuelle unerwünschte Nebenprodukte. NTC: Blindwert (nf Wasser). Templat: 50 ng mtDNA pro 25 µl PCR-Ansatz, isoliert nach Kap. 3.2.3 aus Probe Nr. 1. 3%iges Agarose-Gel. Laufzeit: 1 h bei 5 V/cm. DNA-Leiter: 50 bp.	70
Abbildung 9: Vergleich des erwarteten Kopienzahlprimer-Produktes (oberste Zeile) mit den Ergebnissen aus der Sequenzierung mit dem <i>reverse</i> -Primer (mittlere Zeile) und dem <i>forward</i> -Primer (unter Zeile) nach Sanger-Sequenzierung (Kap. 3.2.8).	71
Abbildung 10: Vergleich der mittels LinRegPCR ermittelten Effizienz der Kopienzahlbestimmung bei verschiedenen Temperaturprogrammen (<i>Annealing</i> -Temperatur jeweils 65°C). Gezeigt ist jeweils der Mittelwert±Standardabweichung aus drei unabhängigen Bestimmungen. Statistisch besteht kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen (einfacher t-Test, p=0,08).	72
Abbildung 11: Vergleich der mittels LinRegPCR ermittelten Effizienz der Kopienzahlbestimmungs-PCR bei verschiedenen <i>Annealing</i> -Temperaturen. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert±Standardabweichung aus drei unabhängigen Bestimmungen. Gleiche	

Buchstaben zeigen die statistisch gleiche Datengruppe (einfache ANOVA, Tukey-Test, Signifikanzniveau: <math><0,05</math>).	74
Abbildung 12: Festlegung des Kalibrierbereiches für die Kopienzahlbestimmung (Kap. 3.2.4.3). Logarithmische Auftragung der Anfangskopienzahlen gegen den ct-Wert. Da die Basislinie zwischen ct 3 und 15 gesetzt wird, wurden nur ct-Werte >15 (durchgezogene Linie) gewertet. Gezeigt sind jeweils die Werte aus drei unabhängigen Bestimmungen \pm Standardabweichung. Geradengleichung: $y = -3,48x + 39,22$. $R^2 = 0,999$.	75
Abbildung 13: Wiederfindungen einer bekannten Standardlösung im oberen ($4,7 \cdot 10^5$ Kopien), mittleren ($4,7 \cdot 10^4$ Kopien) und unteren Bereich ($4,7 \cdot 10^3$ Kopien) des weitgefassten Kalibrierbereiches ($4,7 \cdot 10^6 - 4,7 \cdot 10^2$ Kopien). Gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung aus vier unabhängigen Bestimmungen. Zwischen den einzelnen Datengruppen besteht kein statistisch signifikanter Unterschied (einfache ANOVA, $p = 0,49$) und sie unterscheiden sich jeweils statistisch nicht signifikant von 100% (einfacher t-Test, $p = 0,10 - 0,67$). Durchgezogene Linie: Idealwert 100%.	77
Abbildung 14: Wiederfindungen einer bekannten Standardlösung im oberen ($1,2 \cdot 10^6$ Kopien), mittleren ($2,9 \cdot 10^5$ Kopien) und unteren Bereich ($7,3 \cdot 10^4$ Kopien) des weitgefassten Kalibrierbereiches ($4,7 \cdot 10^6 - 1,8 \cdot 10^4$ Kopien). Gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Bestimmungen. Zwischen den einzelnen Datengruppen besteht kein statistisch signifikanter Unterschied (einfache ANOVA, $p = 0,85$). Durchgezogene Linie: Idealwert 100%.	78
Abbildung 15: Verteilung der ermittelten Werte der Wiederfindungsrate des internen Standards (links) und der relativen Standardabweichung der Kopienzahl und der Wiederfindungsrate des internen Standards (rechts). Vertikale Linie: 10.-90. Perzentil. Horizontale Linie: Median; \square : Mittelwert.	80
Abbildung 16: Vergleich der Sequenzen des Mutationsprimer-PCR-Produktes mit mtDNA als Templat (obere Zeile jeweils) mit dem potentiell möglichen, unerwünschten Nebenprodukt mit nDNA als Templat nach Primer-Blast (unten). Gestrichelt umrahmt: Mutationsprimer-Paar, oval umrahmt: TaqI-Schnittstelle auf der nDNA (links) und auf der mtDNA (rechts), grau hinterlegt: nicht übereinstimmende Basen.	82
Abbildung 17: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) der PCR-Produkte der Gradienten-PCR zur Bestimmung der optimalen <i>Annealing</i> -Temperatur der Mutationsprimer (Kap. 3.2.4.4). Laufzeit: 1 h bei 5 V/cm. 3%iges Agarosegel. DNA-Leiter: 50 bp. NTC: Blindwert (nf Wasser). Als Templat wurden jeweils 50 ng mtDNA nach Kap. 3.2.3 von Probe Nr. 1 eingesetzt.	82
Abbildung 18: Logarithmische Auftragung der absoluten Zellzahl der mit Tacrin, DNP und EtBr inkubierten MCF-7-Zellen zur Generierung von Rho0-Zellen über die Inkubationsdauer von 88 Tagen. Kontrolle: 0,1% DMSO.	85
Abbildung 19: Zellzyklusverteilung (Kap. 3.2.9.6) der mit 50 ng/ml EtBr, 18 mg/ml DNP und 10 μ g/ml Tacrin inkubierten MCF-7-Zellen. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung einer dreifach unabhängig ermittelten Zellzyklusverteilung nach 89, 93 und 97 Tagen Inkubation der jeweiligen Kultur (Kap. 3.2.9.3). Statistisch besteht jeweils kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen in der jeweiligen Zellzyklusphase (einfache ANOVA, p-Werte 0,12-0,53). Kontrolle: 0,1% DMSO.	86
Abbildung 20: Links: nDNA und mtDNA Kopienzahlen aus DNA (isoliert nach Kap. 3.2.3) der einzelnen Inkubationsansätze zur Generierung von Rho0-Zellen und der Kontrolle nach 80 Tagen Inkubation (DNP und Tacrin) und 58 Tagen (EtBr). Angegeben ist die Kopienzahl/ μ l \pm Standardabweichung aus einer dreifach abhängigen Bestimmung nach Kap. 3.2.4.3. Rechts: Vergleich der mtDNA/nDNA-Kopienzahlverhältnisse der Inkubationsansätze zur Generierung von Rho0-Zellen mit der Kontrolle nach 80 Tagen Inkubation (DNP und Tacrin; links) und 58 Tagen (EtBr; rechts). Dargestellt ist das Verhältnis der Kopienzahl der mtDNA zu der nDNA Kopienzahl (Tabelle links). Um einen Rückschluss auf die Anzahl der pro Zelle vorhandenen Mitochondrien zu ziehen, wurde die ermittelte	

nDNA aufgrund der Tetraploidie der MCF-7-Zellen (Soule et al., 1973) durch vier geteilt und als Surrogat für einen Nukleus bzw. eine Zelle genommen. Links und rechts Inkubationssubstanz-Konzentrationen jeweils: DNP: 18 mg/ml, Tacrin: 10 µg/ml und EtBr: 50 ng/ml. Kontrolle jeweils 0,1% DMSO.....	87
Abbildung 21: Selektion der Zellklone (Kap. 3.2.9.9) mit Kulturmedium ohne Pyruvat und Uridin zur Generierung von Rho0-Zellen. Gezeigt ist jeweils ein Beispiel für einen selektionsnegativen Zellklon (oben) und einen selektions-positiven Zellklon (unten). Aufgenommen am Phasenkontrastmikroskop mit 10er Hellfeld Objektiv (Kap. 3.2.9.5) nach 14-tägiger Selektion (Kap. 3.2.9.9).....	89
Abbildung 22: Aufnahme der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte der PCR zur Verifizierung des Rho0-Status (Kap. 3.2.9.10) von nach Kap. 3.2.3 isolierter DNA der mit EtBr inkubierten Zellklone (Kap. 3.2.9.3 und 3.2.9.9). PK: Positivkontrolle, Templat: MCF-7 Gesamt-DNA aus der Kontrollgruppe; NTC: Blindwert (nf Wasser); 0,4% Agarosegel, Laufzeit: 2 h bei 7 V/cm; Leiter: <i>DNA molecular weight marker XV</i> . Gezeigt ist jeweils eine Doppelbestimmung der Klone 1-5.....	90
Abbildung 23: Verunreinigung des <i>TaqI</i> -Verdau von mtDNA (Kap. 3.2.4.2) mit nDNA bezogen auf die Kopienzahlen (links) und die Masse (rechts). Dargestellt ist jeweils das Verhältnis von 3 abhängig bestimmten und gemittelten Kopienzahlen (Kap. 3.2.4.3) von jeweils 4 Proben. Weder das Kopienzahlverhältnis, noch das Massenverhältnis von Fettgewebeproben unterscheidet sich signifikant von Drüsengewebeproben (gepaarter t-Test, p=0,20 und 0,21). □: Mittelwert, Horizontale Linie: Median, vertikale Linie: Standardabweichung.....	91
Abbildung 24: Links: Schmelzkurve der Positivkontrolle (Primerkonzentration: 0,4 µM; Templatmenge: 6,5*10 ⁵ Kopien) der Mutations-PCR (Kap. 3.2.4.4) zur Ermittlung der optimalen Primerkonzentration: Auftragung der Temperatur gegen die Ableitung des Fluoreszenzsignals. Schmelztemperatur: 86,3°C. Rechts: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte der zugehörigen <i>realtime</i> -Mutations-PCR (Kap. 3.2.6). Agarosegel: 3%ig. Laufzeit: 1 h, 5 V/cm. DNA-Leiter: 50 bp, Mutantenprimer-Produkt: 5,6*10 ⁶ Kopien (Kap. 4.2.3.4), NTC: Blindwert (nf Wasser).	93
Abbildung 25: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) der PCR-Produkte der Mutations-PCR (Kap. 3.2.4.4) zur Ermittlung der optimalen Primerkonzentration (erwartete Länge jeweils: 239 bp). Agarosegel: 3%ig. Laufzeit: 1 h, 5 V/cm. Die Zahlen unterhalb der Abbildung geben die jeweils eingesetzte Kopienzahl an Mutations-PCR-Standard (Kap. 4.2.3.4) an. DNA-Leiter: 50 bp, Templat: 5,6*10 ⁶ Kopien Mutantenprimer-PCR-Produkt (Kap. 4.2.3.4), NTC: Blindwert (nf Wasser).	95
Abbildung 26: Art und absolute Häufigkeit von Mutationen in Fettgewebe (insgesamt 33 Mutanten detektiert in Gewebe von fünf Frauen) und und Drüsengewebe (insgesamt 35 Mutanten detektiert in Gewebe von fünf Frauen) innerhalb der <i>TaqI</i> -Schnittstelle (Wildtyp: TCGA) des mitochondrialen <i>CytB</i> -Gens. Dargestellt sind die zusammengefassten Ergebnisse von jeweils 7 (bzw. 5) zufällig ausgewählten Sequenzierungsergebnissen (Kap. 3.2.8) von fünf Proben. Statistisch unterscheiden sich die Mutationsspektren von Fett- und Drüsengewebe nicht signifikant (p=0,23, Intervall: 0,22-0,25, multiple Fisher's exact test Iterationen nach Cariello et al., 1994).	100
Abbildung 27: Mitochondriale SMF (Kap. 3.2.4) von 4 Brustgewebeproben zur Ermittlung eventuell vorhandener Unterschiede hinsichtlich der SMF in Fett und Drüsengewebe. Zahlen oberhalb des Diagramms geben den jeweiligen mittels t-Test ermittelten p-Wert an. *: Welch-Korrektur aufgrund nicht vorhandener Varianzenhomogenität; **: gepaarter t-Test. Horizontale Linie: Median.....	101
Abbildung 28: Verteilung der in mtDNA aus 44 humanen Brustfettgewebeproben ermittelten SMF (Kap. 3.2.4). □: Mittelwert, Horizontale Linie: Median, vertikale Linie: Standardabweichung.....	102

Abbildung 29: Verteilung der ermittelten Werte der relativen Standardabweichung (rel. sd) der Kopienzahl (links), der Wiederfindungsrate des internen Standards (mitte) und der relativen Standardabweichung der Wiederfindungsrate des internen Standards (rechts) bei verschiedenen VSP (Kopienzahlbestimmung nach Kap. 3.2.4.3). Vertikale Linie: 10.-90. Perzentil. Bei der rel. sd der Kopienzahl ist nur ein Verhältnis aufgetragen, da dort das Standard/Probenverhältnis keine Rolle spielt. Horizontale Linie innerhalb der Box: Median; □: Mittelwert.	103
Abbildung 30: Abweichung von Kopienzahlen einer ersten Kopienzahlbestimmung (Kap. 3.2.4.3) von Proben deren Kopienzahlbestimmung aufgrund der in Kap. 4.1.2.5 festgelegten Akzeptanzkriterien ein- oder mehrmals wiederholt wurden vom letztendlich akzeptierten Wert innerhalb der Akzeptanzkriterien. □: Mittelwert, horizontale Linie: Median, vertikale Linie: Standardabweichung. Gezeigt sind die Abweichungen von elf Proben.	105
Abbildung 31: Sequenzierungsergebnisse der <i>TaqI</i> -Schnittstelle (Wildtyp: TCGA) der Mutantenverifizierung (Kap. 3.2.8). Dargestellt sind die Ergebnisse von 88 Sequenzierungen aus 44 Fettgewebsproben. In Klammern dargestellt ist jeweils der gerundete Anteil der jeweiligen Mutationsart. Rot: Insertion.	108
Abbildung 32: Beschreibung der zwei aus Oxysterol-Gewebespiegeln errechneten Hauptkomponenten. Die Richtung der Pfeile gibt den Einfluss der jeweiligen Verbindung auf die Hauptkomponenten an.	111
Abbildung 33: Prinzip der <i>GSTM1</i> / <i>GSTT1</i> -Deletionsbestimmung nach Buchard et al. (2007). Bei Vorhandensein des <i>GSTM1</i> / <i>GSTT1</i> -Gens entsteht durch Primer die außerhalb der Sequenz des Gens platziert sind kein Produkt, da sie zu weit voneinander entfernt sind. Bei einer Deletion liegen die Primer nah genug beieinander und es wird ein Produkt amplifiziert. Zusätzlich wird ein Primerpaar, das innerhalb des <i>GSTM1</i> / <i>GSTT1</i> -Gens platziert ist, verwendet. Bei Vorhandensein des Gens entsteht entsprechend ein PCR-Produkt, bei einer Deletion verfügen die Primer über keine Bindungsstelle.	118
Abbildung 34: A: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) der Produkte der PCR zum Test der <i>GSTM1</i> Genotypisierungsprimer nach Kap. 3.2.10.2. G: Gen-Primer, D: Deletionsprimer, GD: Gen- und Deletionsprimer. Templat: DNA aus Humanproben. B: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) der PCR zur <i>GSTM1</i> Positivkontrollenidentifizierung nach Kap. 3.2.10.2. Templat: DNA aus Humanzelllinien (Kap. 3.2.10.1). A und B: DNA-Leiter: 1 kb (Fermentas), NTC: Blindwert (nf Wasser). Laufzeit: 1 h bei 7 V/cm. Agarosegel: 1,5%.	119
Abbildung 35: <i>GSTP1</i> -Genotypisierung (rs1695) der potentiellen Positivkontrollen mittels allelischer Diskriminierung (Kap. 3.2.10.3). Aufgetragen ist die auf die heterozygote Positivkontrolle (DNA aus MCF-7-Zellen) normierte Fluoreszenzintensität (FI) der beiden Allele gegeneinander. Umkreist sind Proben, die nicht eindeutig einem Genotyp zugeordnet werden konnten. NTC: Blindwert (nf Wasser).	121
Abbildung 36: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) des <i>Eco57I</i> -Restriktionsverdaus der Positivkontrollenverifizierung des <i>CYP1B1</i> -Polymorphismus mittels RFLP-PCR nach Kap. 3.2.10.4. Agarosegel: 3%. Laufzeit: 1 h bei 5 V/cm. DNA-Leiter: 50 bp. NTC: Blindwert (nf Wasser). Templat: DNA aus HeLaS3- und MCF-7-Zellen (Kap. 3.2.10.1) und Humangewebe (Probe Nr. 8).	123
Abbildung 37: Genotypisierung aller Brustgewebsproben mittels allelischer Diskriminierung (Kap. 3.2.10.3). Aufgetragen ist jeweils die auf die heterozygote Positivkontrolle normierte Fluoreszenzintensität (FI) der beiden Allele gegeneinander. NTC: Blindwert (nf Wasser). .	125
Abbildung 38: mRNA-Spiegel von <i>COMT</i> , <i>CYP1B1</i> , <i>GSTP1</i> , <i>GSTT1</i> , <i>HSD17B1</i> und <i>NQO1</i> im Drüsengewebe (jeweils links) von 45 Probandinnen und im Fettgewebe (jeweils rechts) von 46 Probandinnen nach Genotyp eingeteilt. Gleiche Signifikanzniveaus sind durch gleiche Buchstaben dargestellt (Dunn's test, p<0,05). Nullizygote <i>GSTT1</i> -Proben wurden nicht mit in die Auswertung einbezogen, da deren mRNA-Spiegel alle <LOQ waren. <i>COMT</i> -, <i>CYP1B1</i> -, <i>GSTP1</i> - und <i>HSD17B1</i> -mRNA-Spiegel wurden jeweils mittels Kruskal-Wallis-ANOVA und	

GSTT1- und *NQO1*-mRNA-Spiegel jeweils mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen. Da eine Kruskal-Wallis-ANOVA einen adjustierten p-Wert errechnet, wurden die gezeigten p-Werte nicht adjustiert. Horizontale Linie: Median, □: Mittelwert, vertikale Linie: Standardabweichung. 130

Abbildung 39: Multiple lineare Regressionsmodelle zu Identifizierung von Einflussfaktoren auf Estrogen-Gewebespiegel. Selektierte Variablen mit $p > 0,25$ sind aufgrund fehlender Signifikanz nicht dargestellt. %Öl: Fettanteil im Gewebe, MP: Menopausalstatus, PM: Polymorphismus eingeteilt nach Genotyp, S: Sulfat, STS: Steroidsulfatase, q: $\geq \text{LOD} / < \text{LOD}$ -Ersetzungsvariable mit $< \text{LOD}$ als Bezugsgruppe. Als Polymorphismus-Bezugsgruppe wurde jeweils der hochaktive Genotyp bzw. der Genotyp mit dem geringeren Brustkrebsrisiko nach Kap. 1.2.1 gewählt. Die in der Abbildung angegebenen homozygoten Genotypen repräsentieren dementsprechend das niedrigaktivitäts-Allel, bzw. den Genotyp, der mit dem höheren Brustkrebsrisiko assoziiert ist. Der menopausale Status wurde altersabhängig in ≤ 45 Jahre prä, ≥ 53 Jahre post und die Spannweite dazwischen in peri eingeteilt (Kap. 4.1) und prä als Bezugsgruppe verwendet. Beim *lobule type* wurde *Lob2/3* als Bezugsgruppe verwendet. 132

Abbildung 40: Vergleich der metabolischen Flüsse zu E1-, E2- und der Summe aus E1- und E2-DNA-Addukten unter Berücksichtigung von polymorphismusabhängiger enzymatischer Umsetzung und ohne (gepaarter t-Test, gezeigt sind die adjustierten p-Werte). Adjustiert mittels Holm-Korrektur wurde hierbei, um die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer zufälligen Signifikanz durch die multiplen Vergleiche zu minimieren. Horizontale Linie: Median, □: Mittelwert, vertikale Linie: Standardabweichung. 136

Abbildung 41: Vergleich von Drüsengewebespiegeln und Adduktflüssen (Kap. 3.2.12) zur Validierung der metabolischen Netzwerkmodellierung ohne und mit Berücksichtigung von polymorphismus (PM)-abhängiger enzymatischer Umsetzung (Kap. 3.2.12). Dargestellt sind die jeweils innerhalb der Vergleiche mit und innerhalb der Vergleiche ohne Polymorphismus-Berücksichtigung adjustierten p-Werte. Adjustiert mittels Holm-Korrektur wurde hierbei, um die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer zufälligen Signifikanz durch die multiplen Vergleiche (jeweils sieben) zu minimieren. Horizontale Linie: Median, □: Mittelwert, vertikale Linie: Standardabweichung. 138

Abbildung 42: Beschreibung der zwei aus Isoflavon-Gewebespiegeln errechneten Hauptkomponenten. Die Richtung der Pfeile gibt den Einfluss der jeweiligen Verbindung auf die Hauptkomponenten an. MM: Mikrobielle Metabolite. 140

Abbildung 43: Lineare Regressionsmodelle zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf DNA-Adduktflüsse (Kap. 3.2.12 und 3.2.13) mit und ohne Berücksichtigung von Polymorphismus (PM)-abhängiger Enzymaktivität. MP: Menopausalstatus. Der menopausale Status wurde altersabhängig in ≤ 45 Jahre prä, ≥ 53 Jahre post und die Spannweite dazwischen in peri eingeteilt (Kap. 4.1) und prä als Bezugsgruppe verwendet. Beim *lobule type* wurde *Lob2/3* als Bezugsgruppe verwendet. 142

Abbildung 44: Beschreibung der zwei Hauptkomponenten, die aus Transkriptspiegeln von Zellzyklus-Markern errechnet wurden. Die Richtung der Pfeile gibt den Einfluss der jeweiligen Verbindung auf die Hauptkomponenten an. 147

Zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf Markertranskriptspiegel für oxidativen Stress wurden mit den in den vorigen beiden Kapiteln (4.4 und 4.4.1) ausgewählten exVars und *GCLC*-, *NQO1*- und *NFE2L2*-Transkriptspiegeln als abhängige Variable jeweils multiple lineare Regressionsmodelle mit schrittweiser vorwärtsselektion gerechnet (Abbildung 45, Anhang: Tabelle 46 und Tabelle 47). Die jeweils signifikant mit den erklärenden Variablen assoziierten exVars unterschieden sich dabei zum einen abhängig von der jeweils erklärenden Variable zum anderen abhängig vom Gewebe. Einzig *COMT*- bzw. *GSTP1*-Transkriptspiegel beeinflussten *NFE2L2*- bzw. *NQO1*-Transkriptspiegel unabhängig vom Gewebe jeweils signifikant positiv. 148

Abbildung 46: Ergebnisse der multiplen linearen Regressionsmodelle zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf Marker-Transkriptspiegel für oxidativen Stress. MP: Menopausalstatus, PM: Polymorphismus eingeteilt nach Genotyp, q: \geq LOD/ $<$ LOD-Ersetzungsvariable mit $<$ LOD als Bezugsgruppe. Als Polymorphismus-Bezugsgruppe wurde jeweils der hochaktive Genotyp nach Kap. 1.2.1 gewählt. Die in der Abbildung angegebenen homozygoten Genotypen repräsentieren dementsprechend das niedrigaktivitäts-Allel. Der menopausale Status wurde altersabhängig in ≤ 45 Jahre prä, ≥ 53 Jahre post und die Spannweite dazwischen in peri eingeteilt (Kap. 4.1) und prä als Bezugsgruppe verwendet. Beim *lobule type* wurde Lob2/3 als Bezugsgruppe verwendet. Die zweite Zeile der Modelle im Drüsengewebe stellt die erneut gerechneten Modelle zur Überprüfung von potentiell vorhandenen Kollinearitäten (Spearman-Korrelation, $p < 0,001$) zwischen *COMT*- und *CYP1B1*-, *GSTT1*- und *NFE2L2*-Transkriptspiegeln und Zellzyklus Hauptkomponente 2 und dem Alter dar. 149

Im Drüsengewebe besteht wahrscheinlich jeweils zwischen *COMT*- und *CYP1B1*-, und zwischen *GSTT1*- und *NFE2L2*-Transkriptspiegeln eine Kollinearität (Spearman-Korrelation, $p = 0,0007$ und $0,0001$). Bei einer Kollinearität kann es vorkommen, dass nur eine der beiden entsprechenden exVars bei der schrittweisen Vorwärtselektion in das Modell selektiert wird, da beide die abhängige Variable annähernd equivalent erklären. Daher wurde das Modell mit *GCLC*-Transkriptspiegeln als abhängige Variable erneut ohne *COMT*- und *GSTT1*-Transkriptspiegel als exVar und das Modell mit *NQO1*-Transkriptspiegeln als abhängige Variable erneut ohne *CYP1B1*- und *GSTT1*-Transkriptspiegel als exVar gerechnet (Abbildung 47, Anhang: Tabelle 46 und Tabelle 47). 157

Abbildung 48: Fluorimetrische Quantifizierung des Standards (Kopienzahlprodukt) für die Kopienzahlbestimmung mittels externer Kalbsthymus DNA-Kalibrierung nach Kap. 3.2.5.1. Gezeigt sind drei unabhängigen Bestimmungen. Auftragung der doppelsträngigen (ds)DNA-Konzentration gegen die Fluoreszenzintensität. Gezeigt sind jeweils die Werte aus drei abhängigen Bestimmungen \pm Standardabweichung. Links: Geradengleichung: $y = 7532x + 916$. $R^2 = 0,999$. Mitte: $y = 8260x + 1155$. $R^2 = 0,997$. Rechts: $y = 7469x + 1208$. $R^2 = 0,996$. Links: Unverdünnte Probenlösung, Mitte und rechts Verdünnungsfaktor 1:1,5. Blindwert: dest. Wasser. VIII

Abbildung 49: Amplifikationskurven PCR zur Optimierung der Kopienzahlbestimmung (Kap. 3.2.4.3). Auftragung der Zyklen gegen die normalisierte Fluoreszenzintensität (ΔR_n , SDS 2.4). Gezeigt sind jeweils drei abhängige Bestimmungen aus drei unabhängigen Bestimmungen. NTC: Blindwert (nf Wasser). IX

Abbildung 50: *Realtime*-PCR nach Kap. 3.2.4.3 zur Bestimmung der Richtigkeit und Präzision der RMCA-Kopienzahlbestimmung in einem weit gefasstem Kalibrierbereich ($4,7 \cdot 10^6 - 4,7 \cdot 10^2$ Kopien). Gezeigt sind jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung aus jeweils drei abhängigen Bestimmungen. Links oben: Bestimmung 1 ($y = -3,65x + 39,80$, $R^2 = 0,999$), rechts oben: Bestimmung 2 ($y = -3,57x + 39,84$, $R^2 = 0,999$), links unten: Bestimmung 3 ($y = -3,75x + 40,52$, $R^2 = 0,998$), rechts unten: Bestimmung 4 ($y = -3,54x + 39,40$, $R^2 = 0,999$). X

Abbildung 51: *Realtime*-PCR nach Kap. 3.2.4.3 zur Bestimmung der Richtigkeit und Präzision der RMCA-Kopienzahlbestimmung in einem eng gefasstem Kalibrierbereich ($4,7 \cdot 10^6 - 1,8 \cdot 10^4$ Kopien). Gezeigt sind jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung aus jeweils drei abhängigen Bestimmungen. Links oben: Bestimmung 1 ($y = -3,36x + 38,36$, $R^2 = 0,999$), rechts oben: Bestimmung 2 ($y = -3,37x + 38,35$, $R^2 = 0,999$), links unten: Bestimmung 3 ($y = -3,61x + 39,05$, $R^2 = 0,999$). X

Abbildung 52: Vergleich des erwarteten Mutationsprimer-Produktes (oberste Zeile) mit den Ergebnissen aus der Sequenzierung mit dem *forward*-Primer (mittlere Zeile) und dem *reverse*-Primer (untere Zeile) nach Sanger-Sequenzierung (Kap. 3.2.8). XI

Abbildung 53: Aufnahmen der mit Tacrin, 2,4-Dinitrophenol (DNP) und Ethidium-Bromid (EtBr) nach Kap. 3.2.9.3 inkubierten Zellen zur Generierung von Rho0-Zellen aus MCF-7-Zellen. Gezeigt ist jeweils eine Beispielaufnahme von Zellen, die mit der jeweiligen Substanz

- in der jeweiligen Konzentration inkubiert wurden. Obere Reihe jeweils: 10er Hellfeld Objektiv. Untere Reihe jeweils: 40er Phase 2 Objektiv (Kap. 3.2.9.5). Kontrolle: 0,1% DMSO. Kontrolle, Tacrin 10 µg/ml, DNP 18 mg/ml und EtBr 10 ng/ml: Aufnahme nach 152 Tagen Inkubation. Tacrin 1 µg/ml und DNP 1,8 mg/ml: Aufnahme nach 113 Tagen Inkubation. EtBr 25 und 50 ng/ml: Aufnahme nach 40 Tagen Inkubation..... XII
- Abbildung 54: Aufnahme der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte der PCR zur Verifizierung des Rho0-Statuses (Kap. 3.2.9.10) von nach Kap. 3.2.3 isolierter DNA der mit Ethidium-Bromid inkubierten selektions-positiven Zellklone (Kap. 3.2.9.3 und 3.2.9.9). PK: Positivkontrolle, Templat: MCF-7 Gesamt-DNA aus der Kontrollgruppe; NTC: Blindwert (nf Wasser); 0,4% Agarosegel, Laufzeit: 2 h bei 7 V/cm; Leiter: *DNA molecular weight marker XV*. Gezeigt ist jeweils eine Einfachbestimmung der Klone 6-53. Erwartete PCR-Produktlänge: 16,2 kbp..... XII
- Abbildung 55: Aufnahme der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte der PCR zur Verifizierung des Rho0-Status (Kap. 3.2.9.10) von nach Kap. 3.2.3 isolierter DNA der mit Ethidium-Bromid inkubierten selektions-positiven Zellklone (Kap. 3.2.9.3 und 3.2.9.9). PK: Positivkontrolle, Templat: MCF-7 Gesamt-DNA aus der Kontrollgruppe; NTC: Blindwert (nf Wasser); 0,4% Agarosegel, Laufzeit: 2 h bei 7 V/cm; Leiter: *DNA molecular weight marker XV*. Gezeigt ist jeweils eine Einfachbestimmung der Klone 54-71 und der Wiederholungs Rho0-Status-Verifizierungs-PCR von DNA aus Klonen, ohne detektierbares PCR-Produkt (Klon 14, 16, 24, 28, 29, 62, 63 und 65). Erwartete PCR-Produktlänge: 16,2 kbp..... XIII
- Abbildung 56: Amplifikationskurven PCR zur Verifizierung des Rho0-Status von nach Gesamt-DNA aus nach Kap. 3.2.9.9 selektions-positiven Zellklonen. Auftragung der Zyklen gegen die normalisierte Fluoreszenzintensität (ΔR_n , SDS 2.4). Gezeigt sind jeweils zwei abhängige Bestimmungen aus einer PCR. NTC: Blindwert (nf Wasser). XIII
- Abbildung 57: Realtime-PCR nach Kap. 3.2.4.3 zur Quantifizierung der nDNA Verunreinigung von RMCA-Proben. Gezeigt sind jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung aus jeweils drei abhängigen Bestimmungen. Links oben: $y=-3,17x+41,01$, $R^2=0,998$, rechts oben: $y=-3,48x+43,57$, $R^2=0,999$, links unten: $y=-3,44x+42,73$, $R^2=0,999$, rechts unten: $y=-3,63x+44,17$, $R^2=0,999$ XIV
- Abbildung 58: Fluorimetrische Quantifizierung des Standards (Mutationsprodukt) mittels externer Kalbsthymus-DNA-Kalibrierung nach Kap. 3.2.5.1 für die Optimierung der Mutations-PCR. Auftragung der doppelsträngiger (ds)DNA-Konzentration gegen die Fluoreszenzintensität. Gezeigt sind jeweils die Werte aus drei abhängigen Bestimmungen \pm Standardabweichung. Geradengleichung: $y=8990x+896$. $R^2: 0,991$. Blindwert: dest. Wasser..... XV
- Abbildung 59: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) der PCR-Produkte des *TaqI*-Nachverdaus (Kap. 3.2.4.5) der *realtime*-Mutations-PCR (Kap. 3.2.4.4) zum Nachweis einer Kopie (erwartete Länge jeweils 90 und 149 bp). Erwartet waren jeweils 13,6 Produkte. Agarosegel: 3%ig. Laufzeit: 1 h, 5 V/cm. Templat: 1 Kopie Mutantenprimer-Produkt (Kap. 4.2.3.4), DNA-Leiter: 50 bp, PK: Positivkontrolle ($5,6 \cdot 10^6$ Kopien Mutantenprimer-Produkt, Kap. 4.2.3.4), NTC: Blindwert (nf Wasser). Erwartete verdaute PCR-Produktlängen: 90 und 149 bp. XV
- Abbildung 60: Kalibriergerade zur Ermittlung der Kopienzahl der *TaqI* verdauten mtDNA Frau 1 nach Kap. 3.2.4.3. Auftragung der gemittelten ct-Werte des Standards (■, Kopienzahlprimer Produkt) und der ct-Werte der Probe und der zugehörigen internen Wiederfindung (Wiederfindung von Standardzugabe, ●) gegen die logarithmisch aufgetragene Anzahl der Kopien. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert aus drei abhängigen Bestimmungen \pm Standardabweichung. Geradengleichung: $y=-3,5x+39,6$. $R^2: =0,998$ XVI
- Abbildung 61: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) des *TaqI*-Nachverdaus der PCR-Produkte der *realtime*-Mutations-PCR (Kap. 3.2.4.4) zur Mutantenzahl-Bestimmung der Probe Nr. 1 (erwartete Länge jeweils 239 bp). Agarosegel: 3%ig. Laufzeit: 1 h, 5 V/cm.

Weißgrau eingekreist: Mutanten. Ansätze, bei denen kein Mutationsprodukt entstanden ist oder falsch positive Mutanten (*TaqI*-nachverdaute Produkte) sind nicht beschriftet. PK: Positivkontrolle (5,6*10⁶ Kopien Mutantenprimer-Produkt, Kap. 4.2.3.4), DNA-Leiter: 50 bp, NTC: Blindwert (nf Wasser). Erwartete Mutanten-PCR-Produktlänge: 239 bp. XVI

Abbildung 62: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung (Kap. 3.2.8) von Mutanten der SMF Bestimmung von mtDNA von Frau 1. Vergleich des im Elektropherogramm auswertbaren Bereichs der Mutationsprodukte der Probe Nr. 1 (jeweils Zeile 2-14) mit der Mutationsproduktsequenz des Sense-Stranges (oberste Zeile). Darstellung in 5'→3' Richtung. Zahlen zeigen die bp-Position innerhalb der Sequenz an. Schwarz markiert: keine Übereinstimmung der Sequenzen. Eingerahmt ist die *TaqI*-Schnittstelle. XVII

Abbildung 63: Darstellung der Residuen der linearen Regressions-Modelle zur Ermittlung von Einflussfaktoren auf die mitochondriale SMF. XXI

Abbildung 64: *HSD17B1*-Genotypisierung aller Brustgewebeproben mittels allelischer Diskriminierung. Aufgetragen ist jeweils die auf die heterozygote Positivkontrolle normierte Fluoreszenzintensität (FI) der beiden Allele gegeneinander. NTC: Blindwert (nf Wasser). XXII

Abbildung 65: Vergleich der erwarteten Produktsequenz (NCBI-GenBank®, oben) mit dem Sequenzierungsergebnis (nach Kap. 3.2.8) der *GSTM1*-Gen Gelbande. XXII

Abbildung 66: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) der PCR-Produkte der PCR zur *GSTM1*-Genotypisierung von Humanproben nach Kap. 3.2.10.2. Templat: DNA aus Humanproben. Positivkontrolle: DNA aus Ag0-Zellen (Kap. 3.2.10.1). DNA-Leiter: 1 kb (Fermentas), NTC: Blindwert (nf Wasser). Laufzeit: 1 h bei 7 V/cm. Agarosegel: 1,5%. Erwartete PCR-Produktlänge bei vorhandensein des *GSTM1*-Gens: 625 bp. Erwartete PCR-Produktlänge bei einer *GSTM1*-Deletion: 4748 bp. XXIII

Abbildung 67: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) der PCR-Produkte der PCR zur *GSTT1*-Genotypisierung von Humanproben nach Kap. 3.2.10.2. Templat: DNA aus Humanproben. Positivkontrolle: DNA aus Ag0-Zellen (Kap. 3.2.10.1). DNA-Leiter: 1 kb (Fermentas), NTC: Blindwert (nf Wasser). Laufzeit: 1 h bei 7 V/cm. Agarosegel: 1,5%. Erwartete PCR-Produktlänge bei vorhandensein des *GSTT1*-Gens: 969 bp. Erwartete PCR-Produktlänge bei einer *GSTT1*-Deletion: 3106 bp. XXIII

Abbildung 68: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) der PCR-Produkte der PCR zur Zusammenführung der *GSTM1*- und *GSTT1*-Genotypisierung nach Kap. 3.2.10.2. Templat: DNA aus Humanproben und Humanzelllinien (Kap. 3.2.10.1). DNA-Leiter: 1 kb (Fermentas), NTC: Blindwert (nf Wasser). Laufzeit: 1 h bei 7 V/cm. Agarosegel: 1,5%. Erwartete PCR-Produktlänge bei Vorhandensein des *GSTM1*-Gens: 625 bp. Erwartete PCR-Produktlänge bei einer *GSTM1*-Deletion: 4748 bp. Erwartete PCR-Produktlänge bei einer *GSTT1*-Deletion: 3106 bp. XXIV

Abbildung 69: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) der PCR-Produkte der PCR zur *GSTM1*- und *GSTT1*-Genotypisierung von Humanproben nach Kap. 3.2.10.2. Templat: DNA aus Humanproben. Positivkontrolle: DNA aus Ag0-Zellen (Kap. 3.2.10.1). DNA-Leiter: 1 kb (Fermentas), NTC: Blindwert (nf Wasser). Laufzeit: 1 h bei 7 V/cm. Agarosegel: 1,5%. Links und Mitte: *GSTM1*-Genotypisierung. Da bei Positivkontrolle die *GSTM1*-Deletionsbande nicht zu sehen war, wurde die *GSTM1*-Bestimmung alleine wiederholt (rechts). Erwartete PCR-Produktlänge bei vorhandensein des *GSTM1*-Gens: 625 bp. Erwartete PCR-Produktlänge bei einer *GSTM1*-Deletion: 4748 bp. Erwartete PCR-Produktlänge bei einer *GSTT1*-Deletion: 3106 bp. XXIV

Abbildung 70: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) der PCR-Produkte der PCR der Positivkontrollenverifizierung des *GSTP1*-Polymorphismus mittels RFLP-PCR nach Kap. 3.2.10.4. Jeweils Agarosegel: 3%. Laufzeit: 1 h bei 5 V/cm. DNA-Leiter: 50 bp. NTC: Blindwert (nf Wasser). Templat: DNA aus MCF-7-Zellen (Kap. 3.2.10.1). Links: Erster Primer-Test. Rechts: Temperaturgradient zur Optimierung der *Annealing*-Temperatur. Beschriftet sind die Ansätze mit der niedrigsten (56°C) und der höchsten (66°C) getesteten *Annealing*-

Temperatur. Dazwischen befinden sich Ansätze in aufsteigender *Annealing*-Temperatur Reihenfolge in äquidistanten Abständen. Erwartete PCR-Produktlänge: 176 bp.XXV

Abbildung 71: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) der PCR-Produkte der PCR zur Positivkontrollenverifizierung des *GSTP1*-Polymorphismus mittels RFLP-PCR nach Kap. 3.2.10.4. Agarosegel: 3%. Laufzeit: 1 h bei 5 V/cm. DNA-Leiter: 50 bp. NTC: Blindwert (nf Wasser). Templat: DNA aus Human-Zellen (Kap. 3.2.10.1) und Humangewebe (Frau 6, 8 und 15). Erwartete PCR-Produktlänge: 230 bp. Erwartete PCR-Produktlänge: 176 bp.XXV

Abbildung 72: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) der PCR-Produkte der PCR zur Positivkontrollenverifizierung des *NQO1*-Polymorphismus mittels RFLP-PCR nach Kap. 3.2.10.4. Agarosegel: 3%. Laufzeit: 1 h bei 5 V/cm. DNA-Leiter: 50 bp. NTC: Blindwert (nf Wasser). Templat: DNA aus Human-Zellen (Kap. 3.2.10.1) und Humangewebe (Frau 6, 8 und 15). Erwartete PCR-Produktlänge: 230 bp.....XXVI

Abbildung 73: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) der PCR-Produkte der PCR zur Positivkontrollenverifizierung des *CYP1B1*-Polymorphismus mittels RFLP-PCR nach Kap. 3.2.10.4. Agarosegel: 3%. Laufzeit: 1 h bei 5 V/cm. DNA-Leiter: 50 bp. NTC: Blindwert (nf Wasser). Templat: DNA aus Human-Zellen (Kap. 3.2.10.1) und Humangewebe (Frau 6 und 8). Erwartete PCR-Produktlänge: 340 bp.....XXVI

Abbildung 74: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) des *Hinfl*-Restriktionsverdaus der Positivkontrollenverifizierung des *NQO1*-Polymorphismus und des *BsmAI*-Restriktionsverdaus der Positivkontrollenverifizierung des *GSTP1*-Polymorphismus mittels RFLP-PCR nach Kap. 3.2.10.4. Agarosegel: 3%. Laufzeit: 1 h bei 5 V/cm. DNA-Leiter: 50 bp. NTC: Blindwert (nf Wasser). Templat: DNA aus MCF-7, MDA- und Ishikawazellen (Kap. 3.2.10.1) und Humangewebe (Probe Nr. 6, 8 und 15).XXVII

Abbildung 75: *CYP1B1*-(rs1056836, links) und *HSD17B1*-Genotypisierung (rs676387, rechts) der potentiellen Positivkontrollen mittels allelischer Diskriminierung (Kap. 3.2.10.3). Aufgetragen ist die auf die heterozygote Positivkontrolle (DNA aus Probe Nr. 8 jeweils) normierte Fluoreszenzintensität (FI) der beiden Allele gegeneinander. Umkreist sind Proben, die nicht eindeutig einem Genotyp zugeordnet werden konnten. NTC: Blindwert (nf Wasser).XXVII

Abbildung 76: Boxplots der *GSTM1*-mRNA-Spiegel (Kap. 3.2.14) eingeteilt nach Genotyp (Kap. 3.2.10.2) der entsprechenden Probandinnen. □: Mittelwert, horizontale Linie: Median, vertikale Linie: Standardabweichung.....XXXII

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über bereits publizierte SMF in gesundem humanem Gewebe (<i>in</i> und <i>ex vivo</i>) aufsteigend nach SMF. CDGE: <i>constant denaturing gel electrophoresis</i> , NGS: <i>Next Generation Sequencing</i> , PPKS: PCR-Produkt Klonierung und Sequenzierung.	2
Tabelle 2: Zusammenfassung der in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen. rs#: <i>Reference SNP cluster ID</i> . Die Angabe Aktivitätsänderung bezieht sich auf die aus dem jeweiligen Polymorphismus resultierende Aktivitätsänderung der enzymatischen Umsetzung des jeweiligen Proteins im Vergleich zum Wildtyp. Das Brustkrebsrisiko ist jeweils auf den aus dem Polymorphismus resultierenden homozygoten Genotyp im Vergleich zum jeweiligen homozygoten Wildtyp bezogen. ¹ : Dawling et al. (2001) und Chen et al. (2004), ² : Li et al. (2000), ³ : Kawai et al. (2005), ⁴ : Ali-Osman et al. (1997), und Watson et al. (1998), ⁵ : Traver et al. (1997).	14
Tabelle 3: Pipettierschema für die Kopienzahlbestimmung mittels TaqMan®-Sonden-basierter <i>realtime</i> -PCR. Templat: Kopienzahl-Standard, nf Wasser (Blindwert) und Probe. .	47
Tabelle 4: Temperaturprogramm für die Kopienzahlbestimmung mittels TaqMan®-Sonden-basierter <i>realtime</i> -PCR.	47
Tabelle 5: Pipettierschema für die Mutantenzahlbestimmung mittels SYBR-Green® basierter <i>realtime</i> -PCR. Templat: Mutantenstandard (Positivkontrolle), nf Wasser (Blindwert), Probe.	48
Tabelle 6: Temperaturprogramm für die Mutantenzahlbestimmung mittels SYBR-Green® basierter <i>realtime</i> -PCR.	49
Tabelle 7: Pipettierschema für den <i>TaqI</i> -Nachverdau von, bei der Mutations-PCR (Kap. 3.2.4.4) detektierten, potentiellen Mutanten.	49
Tabelle 8: Gelelektrophorese-Bedingungen und Spannungsgeber-Einstellungen.	51
Tabelle 9: Einstellungen am Cary-Win UV Photometer zur Aufnahme von Extinktionsspektren zur Überprüfung der Stabilität der Inkubationslösungen zur Generierung von Rho0-Zellen.	54
Tabelle 10: Einstellungen am Phasenkontrastmikroskop zur Dokumentation der mit DMSO (Kontrolle), EtBr, Tacrin und DNP inkubierten MCF-7-Zellen.	54
Tabelle 11: Einstellungen am Durchflusszytometer zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung der Inkubationsansätze und der DMSO-Kontrolle.	55
Tabelle 12: Primer der <i>GSTT1</i> - und <i>GSTM1</i> -CNP Bestimmung nach Buchard et al. (2007).	58
Tabelle 13: Temperaturprogramm für die Allelische Diskriminierung mittels Multiplex-TaqMan®-Sonden-basierter <i>realtime</i> -PCR zur Ermittlung von SNPs.	58
Tabelle 14: Primer für die RFLP-PCR zur Verifizierung der Positivkontrollen für die Allelische Diskriminierung.	59
Tabelle 15: Übersicht über die am Arbeitskreis von René Hauptstein und Katja Schmalbach bestimmten mRNA-Spiegel mit der jeweils verwendeten Methode (Kopfzeile). AHR: Aryl-Hydrogen-Rezeptor; AREG: Amphiregulin, ARNT: Aryl-hydrogen-Rezeptor <i>nuclear translocator</i> , BAX: BCL2-associated X Protein, BMF: <i>proapoptotic BH3-only</i> Protein, CCND1: Cyclin D1, CDKN: Cyclinabhängiger Kinase Inhibitor, COMT: Katechol-O-Methyltransferase, CYP: Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase, ESR: Estrogen-Rezeptor, GATA3: GATA <i>binding</i> Protein 3, GCLC: γ -Glutamyl-Cystein Ligase, GST: Glutathion-S-Transferase, GUSB: Glucuronidase β , HSD: Hydroxysteroid-Dehydrogenase, MKI67: Proliferations-assoziiertes Ki-67-Antigen, NFE2L2: <i>nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i> , NQO1: NADPH-Chinon Oxidoreduktase, NR11: <i>nuclear receptor-sub family 1-group 1-member</i> , PGR: Progesteron-Rezeptor, SNF: 14-3-3 σ , STS: Steroidsulfatase, SULT: Sulfotransferase, TBP: TATA-Box <i>binding</i> Protein, TFF1: <i>trefoil factor 1</i> , TGFB1: <i>transforming growth factor</i> β ; TP53: Tumorsuppressor Protein 53, UGT: Uridin 5'-Diphospho-Glucuronosyltransferase, WNT: <i>wingless-related MMTV integration site</i>	62

Tabelle 16: Verteilung der 50 akquirierten Brustgewebsproben hinsichtlich Alter, Menopausalstatus, Alkoholkonsum, Rauchen, Einnahme von estrogenaktiven Medikamenten, BMI und Schwangerschaften. ERD: <i>E2 releasing drug</i> , k.A.: keine Angabe.	66
Tabelle 17: 90. Perzentile der Messwertverteilungen der reevaluierten Kopienzahlbestimmungen bei einem VSP von 30-300%. Rel. sd: Relative Standardabweichung.....	104
Tabelle 18: Anzahl an jeweils zu wiederholenden Kopienzahlmessungen anhand der in Kapitel 4.2.2.5 ursprünglich festgelegten Qualitätskriterien und anhand der neu evaluierten Qualitätskriterien (Tabelle 17) von insgesamt 119 Messungen. Rel. sd: Relative Standardabweichung.....	104
Tabelle 19: Prozentuale Verteilung der ermittelten Mutationen nach Sequenzierung von Proben aus humaner mtDNA aus weiblichem Brustgewebe im Vergleich zu Sequenzierungsergebnissen aus humanen mtDNA-Proben anderer Studien. PKS: PCR-Produkt Klonierungs/Sequenzierungsstrategie, dNGS: duplex NGS.	109
Tabelle 20: Berücksichtigte exVars für die multiple lineare Regression mit Vorwärtsselektion zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf die humane mitochondriale Spontanmutationsfrequenz in Brustfettgewebe. Enzymnamen stehen jeweils für die entsprechenden Transkriptspiegel bzw. den entsprechenden Polymorphismus (Polym.). In Klammern ist der Anteil an Werten unterhalb des LODs dargestellt. q: Ersetzungsspalte der jeweiligen exVar zur Ermittlung des Einflusses von Werten die unterhalb des LOD lagen, HK: Hauptkomponente.	113
Tabelle 21: Ergebnisse der vorwärtsselektierenden multiplen linearen Regression (Kap. 3.2.13) zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf die humane mitochondriale SMF in Brustfettgewebe. Enzymnamen stehen jeweils für die entsprechenden Transkriptspiegel bzw. den entsprechenden Genotyp sofern angegeben. AB: auffällige Beobachtungen, HK: Hauptkomponente. Als Bezugsgruppe für den nach Genotyp eingeteilten <i>GSTP1</i> -Polymorphismus wurde der hochaktive Val/Val-Genotyp (Kap. 1.2.1) verwendet.	115
Tabelle 22: Ergebnisse der Genotypisierung von verschiedenen Human-Zelllinien und Brustgewebsproben zur Identifizierung von Positivkontrollen für die Allelische Diskriminierung und CNP Bestimmung. Fett markiert: Jeweils ausgewählte Positivkontrollen.	122
Tabelle 23: Ergebnisse der <i>GSTP1</i> -, <i>NQO1</i> - und <i>CYP1B1</i> -Positivkontrollenverifizierung der allelischen Diskriminierung mittels RFLP-PCR (Kap. 3.2.10.4). Bei der <i>GSTP1</i> -Positivkontrollenverifizierung wurde sehr wahrscheinlich aufgrund der zu geringen Trennleistung der hier angewandten Gelelektrophorese anstatt der erwarteten 85 und 91 bp langen Fragmente eine einzelne etwa 90 bp lange und, im Vergleich zum 176 bp langen Fragment, breitere Bande detektiert.....	124
Tabelle 24: Vergleich der nach Kap. 3.2.10.3 und 3.2.10.2 ermittelten Ergebnisse der Genotypisierung (<i>COMT</i> rs680 Val158Met, <i>NQO1</i> rs1800566 Pro187Ser, <i>CYP1B1</i> rs1056836 Leu432Val, <i>GSTP1</i> rs1695 Ile105Val, <i>HSD17B1</i> rs676387 C>A, <i>GSTM1</i> Deletion und <i>GSTT1</i> Deletion; jeweils obere Zeile) mit bereits publizierten Daten gesunder deutscher Frauen bzw. hellhäutiger Menschen (<i>HSD17B1</i> , jeweils untere Zeile). HWG- χ^2 : Vergleich des errechneten Hardy-Weinberg-Gleichgewichts mit den gemessenen Allelfrequenzen mittels χ^2 -Test, Grenzwert bei einem Signifikanzniveau von 0,05: 5,9.	127
Tabelle 25: Polymorphismen, die zur Berechnung des metabolischen Netzwerks verwendet wurden. In Klammern gegeben ist der jeweilige auf der entsprechenden enzymatischen Umsatzrate (Kap. 1.2.1) fußende Multiplikationsfaktor, der bei der Netzwerkberechnung bei den entsprechenden Transkriptspiegeln verrechnet wurde.....	136
Tabelle 26: Beschreibung der aus E1-, E2- und E1-S-Gewebespiegeln errechneten Hauptkomponente für die linearen Regressionsmodelle zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf oxidativen Stress. Je höher der Betrag, desto höher der Einfluss	

(maximal möglicher Betrag: 1,00). Das Plus oder Minus gibt die Richtung des Einflusses auf die jeweilige Hauptkomponente an. 144

Tabelle 27: Berücksichtigte exVars für die multiple lineare Regression mit Vorwärtsselektion zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf Marker für oxidativen Stress in Brustgewebe. Enzyme und Proteine stehen jeweils für die entsprechenden Transkriptspiegel. q: Ersetzungsvariable der jeweiligen exVar zur Ermittlung des Einflusses von Werten die unterhalb LOD lagen. In Klammern ist der Anteil an Werten unterhalb des LODs im Fettgewebe dargestellt. ¹: Nur im Drüsengewebe berücksichtigt, da nur im Drüsengewebe Spiegel verfügbar waren, ²: nur im Fettgewebe berücksichtigt, da nur Fettgewebsspiegel verfügbar waren, ³: nur bei den Modellen mit *NQO1*-Transkriptspiegeln als abhängige Variable berücksichtigt, ⁴: nur bei den Modellen mit *GCLC*-Transkriptspiegeln als abhängige Variable berücksichtigt, ^{PM}: zusätzlich zum Transkriptspiegel wurde der entsprechende Polymorphismus als kategoriale Genotyp-Variable berücksichtigt. EAM: Einnahme von estrogenaktiven Medikamenten (EE und E2-freisetzende Medikamente), HK: Hauptkomponente. 146

Tabelle 28: Beschreibung der drei aus *SULT*- und *UGT*-Transkriptspiegeln errechneten Hauptkomponenten (HK) für die linearen Regressionsmodelle zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf oxidativen Stress. Je höher der Betrag, desto höher der Einfluss (**Fett**: Werte mit dem höchsten Einfluss bei einer Grenze von $\geq 0,46$, maximal möglicher Betrag: 1,00). Das Plus oder Minus gibt die Richtung des Einflusses auf die jeweilige Hauptkomponente an. *UGT1A1*- und *UGT1A3/4*-Transkriptspiegel wurden im Drüsengewebe nicht berücksichtigt, da mehr als ein Drittel der Werte unterhalb des LOD lagen. 148

Tabelle 29: Mittels LinReg PCR ermittelte Effizienzen der PCR zur Optimierung der Kopienzahlbestimmung. Ein Großteil der Werte wurde manuell basislinienkorrigiert. XI

Tabelle 30: Ermittelte Kopienzahlen der PCR zu Quantifizierung von nDNA Verunreinigungen nach Kap. 3.2.4.3. Gezeigt sind jeweils Mittelwert Kopienzahl \pm Standardabweichung aus jeweils drei abhängigen Bestimmungen. XIV

Tabelle 31: Einordnung der Brustgewebeproben nach Fettgehalt. Das Gewebe wurde nach der Entnahme in Fett und Drüsengewebe separiert und dabei nach Fettgehalt in Kategorien eingeordnet (Kap. 3.2.1 und 3.2.2). Gezeigt ist jeweils die Kategorie des jeweiligen Aliquots mit dem niedrigsten Fettgehalt (Drüsengewebe) und dem höchsten Fettgehalt (Fettgewebe) in ausreichender Menge für eine DNA-Isolation (6 g, Kap. 3.2.3). Kategorien: A: 0-1%, B: 2-10%, C: 11-25%, D: 26-50%, E: 51-99%, F: 100% Fett. XVII

Tabelle 32: Übersicht über alle ermittelten Kopienzahlen (KoZa), interne Wiederfindungsraten nach Standardzugabe (IWF) jeweils \pm relative Standardabweichung (rel. sd) aus einer dreifach abhängigen Bestimmung, des Verhältnisses der Standard-Zugabe- zu Probenzahl-Kopienzahl (VSP), der Gesamtanzahl an jeweils detektierten Mutanten und der Spontanmutationsfrequenz (SMF). XIX

Tabelle 33: Links: Standard-Abweichung (Std.-Abw.) und Varianzenanteil der einzelnen Oxycholesterolspiegel-Hauptkomponenten. Rechts: *Scree-Plot* der Hauptkomponentenanalyse. XX

Tabelle 34: Beschreibung der zwei Oxy-Cholesterols-Hauptkomponenten (HK). Je höher der Betrag, desto höher der Einfluss (**Fett**: Werte mit dem höchsten Einfluss bei einer Grenze von $\geq 0,44$, maximal möglicher Betrag: 1,00). Das Plus oder Minus gibt die Richtung des Einflusses auf die jeweilige Hauptkomponente an. XXI

Tabelle 35: Ergebnisse der Genotypisierung aller Humanproben nach Kap. 3.2.10.3 und Kap. 3.2.10.2. XXVIII

Tabelle 36: Ergebnisse der Berechnung der erwarteten Allel-Frequenzen mittels Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Kap. 3.2.10.5) und beobachtete Allel-Frequenzen der *COMT* Val158Met-, *NQO1* Pro187Ser-, *CYP1B1* Leu462Val-, *GSTP1* Ile105Val-, *HSD17B1* C150A-, *GSTT1*- und *GSTM1*-Genotypen XXX

Tabelle 37: Detaillierte Auflistung von bereits publizierten Genotypisierungen deutscher Probanden der *COMT*- (rs680 Val158Met), *NQO1*- (rs1800566 Pro187Ser), *CYP1B1*- (rs1056836 Leu432Val), *GSTP1*- (rs1695 Ile105Val) und *HSD17B1*-SNPs (rs676387 C>A) und *GSTM1*- und *GSTT1*-CNPs. Eine Ausnahme bildet die *HSD17B1*, da keine Daten deutscher Probanden publiziert waren: Gaudet et al., 2008 PCBS (Polish Breast Cancer Study) repräsentiert eine polnische, Gaudet et al., 2008 SEARCH (Studies of Epidemiology and Risk Factors in Cancer Heredity) eine englische und Feigelson et al., 2006 eine überwiegend aus hellhäutigen Europäern bestehende Englische und US-Amerikanische Population. Die Zahl gibt jeweils die Anzahl an Probanden mit dem entsprechenden Allel und die Zahl in Klammer den prozentualen Anteil an.....XXXI

Tabelle 38: Ergebnisse der multiplen linearen Regressionsmodelle zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf Estrogen-Spiegel unter Berücksichtigung von Polymorphismen. Der menopausale Status (MP) wurde altersabhängig in ≤ 45 Jahre prä, ≥ 53 Jahre post und die Spannweite dazwischen in peri eingeteilt (Kap. 4.1) und prä als Bezugsgruppe verwendet. Die oberste Zeile zeigt jeweils die abhängige Variable. Beim *lobule type* wurde Lob2/3 als Bezugsgruppe verwendet. AB: Auffällige Beobachtungen, q: $\geq \text{LOD} / < \text{LOD}$ -Ersetzungsvariable mit $< \text{LOD}$ als Bezugsgruppe.XXXIII

Tabelle 39: Ergebnisse der multiplen linearen Regressionsmodelle zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf Estrogen-Spiegel unter Berücksichtigung von Polymorphismen. Der menopausale Status (MP) wurde altersabhängig in ≤ 45 Jahre prä, ≥ 53 Jahre post und die Spannweite dazwischen in peri eingeteilt (Kap. 4.1) und prä als Bezugsgruppe verwendet. Die oberste Zeile zeigt jeweils die abhängige Variable. Beim *lobule type* wurde Lob2/3 als Bezugsgruppe verwendet. AB: Auffällige Beobachtungen, q: $\geq \text{LOD} / < \text{LOD}$ -Ersetzungsvariable mit $< \text{LOD}$ als Bezugsgruppe.XXXIV

Tabelle 40: Validierung der metabolischen Netzwerkmodellierung ohne und mit Berücksichtigung von polymorphismus (PM)-abhängiger enzymatischer Umsetzung. Dargestellt sind jeweils die adjustierten p-Werte.....XXXV

Tabelle 41: Lineare Regressionsmodelle zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf DNA Adduktfüsse ohne Berücksichtigung von Polymorphismen. AB: Auffällige Beobachtung, PM: Polymorphismus abhängige Veränderung der enzymatischen Umsetzung. Der menopausale Status (MP) wurde altersabhängig in ≤ 45 Jahre prä, ≥ 53 Jahre post und die Spannweite dazwischen in peri eingeteilt (Kap. 4.1) und prä als Bezugsgruppe verwendet. Beim *lobule type* wurde Lob2/3 als Bezugsgruppe verwendet.XXXVI

Tabelle 42: Beschreibung der zwei Zellzyklus-Marker-Transkriptspiegel Hauptkomponenten (HK) für die linearen Regressionsmodelle zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf oxidativen Stress. Je höher der Betrag, desto höher der Einfluss (**Fett**: Werte mit dem höchsten Einfluss bei einer Grenze von $\geq 0,44$, maximal möglicher Betrag: 1,00). Das Plus oder Minus gibt die Richtung des Einflusses auf die jeweilige Hauptkomponente an....XXXVII

Tabelle 43: Links: Standard-Abweichung (Std.-Abw.) und Varianzenanteil der einzelnen *SULT/UGT*-Transkriptspiegel Hauptkomponenten. Rechts: *Scree-Plot* der Hauptkomponentenanalyse.....XXXVII

Tabelle 44: Links: Standard-Abweichung (Std.-Abw.) und Varianzenanteil der einzelnen Zellzyklus-Marker-Transkriptspiegel Hauptkomponenten. Rechts: *Scree-Plot* der Hauptkomponentenanalyse.....XXXVIII

Tabelle 45: Links: Standard-Abweichung (Std.-Abw.) und Varianzenanteil der einzelnen Estrogenspiegel (E2, E1 und E1-S)-Hauptkomponenten. Rechts: *Scree-Plot* der Hauptkomponentenanalyse.....XXXIX

Tabelle 46: Ergebnisse der multiplen linearen Regressionsmodelle zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf Marker-Transkriptspiegel für oxidativen Stress. Enzymnamen stehen jeweils für die entsprechenden Transkriptspiegel bzw. den entsprechenden Polymorphismus In Klammern ist der Anteil an Werten unterhalb des LODs dargestellt. AB: Auffällige Beobachtungen, q: $\geq \text{LOD} / < \text{LOD}$ -Ersetzungsvariable mit $< \text{LOD}$ als Bezugsgruppe. Als

Polymorphismus-Bezugsgruppe wurde jeweils der hochaktive Genotyp nach gewählt. Beim *lobule type* wurde Lob2/3 als Bezugsgruppe verwendet und beim menopausalen Status (MP) peri. XL

Tabelle 47: Ergebnisse der multiplen linearen Regressionsmodelle zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf Marker-Transkriptspiegel für oxidativen Stress. Enzymnamen stehen jeweils für die entsprechenden Transkriptspiegel bzw. den entsprechenden Polymorphismus In Klammern ist der Anteil an Werten unterhalb des LODs dargestellt. AB: Auffällige Beobachtungen, q: \geq LOD/ $<$ LOD-Ersetzungsvariable mit $<$ LOD als Bezugsgruppe. Als Polymorphismus-Bezugsgruppe wurde jeweils der hochaktive Genotyp nach gewählt. Beim *lobule type* wurde Lob2/3 als Bezugsgruppe verwendet und beim menopausalen Status (MP) peri. XLI

Anhang

Random Mutation Capture Assay

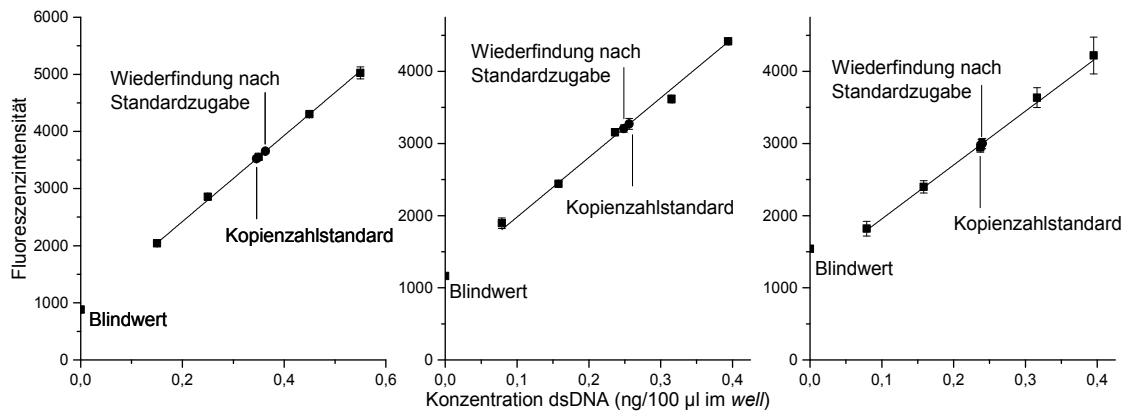


Abbildung 48: Fluorimetrische Quantifizierung des Standards (Kopienzahlprodukt) für die Kopienzahlbestimmung mittels externer Kalbthymus DNA-Kalibrierung nach Kap. 3.2.5.1. Gezeigt sind drei unabhängigen Bestimmungen. Auftragung der doppelsträngigen (ds)DNA-Konzentration gegen die Fluoreszenzintensität. Gezeigt sind jeweils die Werte aus drei unabhängigen Bestimmungen \pm Standardabweichung. Links: Geradengleichung: $y = 7532x + 916$. R^2 : 0,999. Mitte: $y = 8260x + 1155$. R^2 : 0,997. Rechts: $y = 7469x + 1208$. R^2 : 0,996. Links: Unverdünnte Probenlösung, Mitte und rechts Verdünnungsfaktor 1:1,5. Blindwert: dest. Wasser.

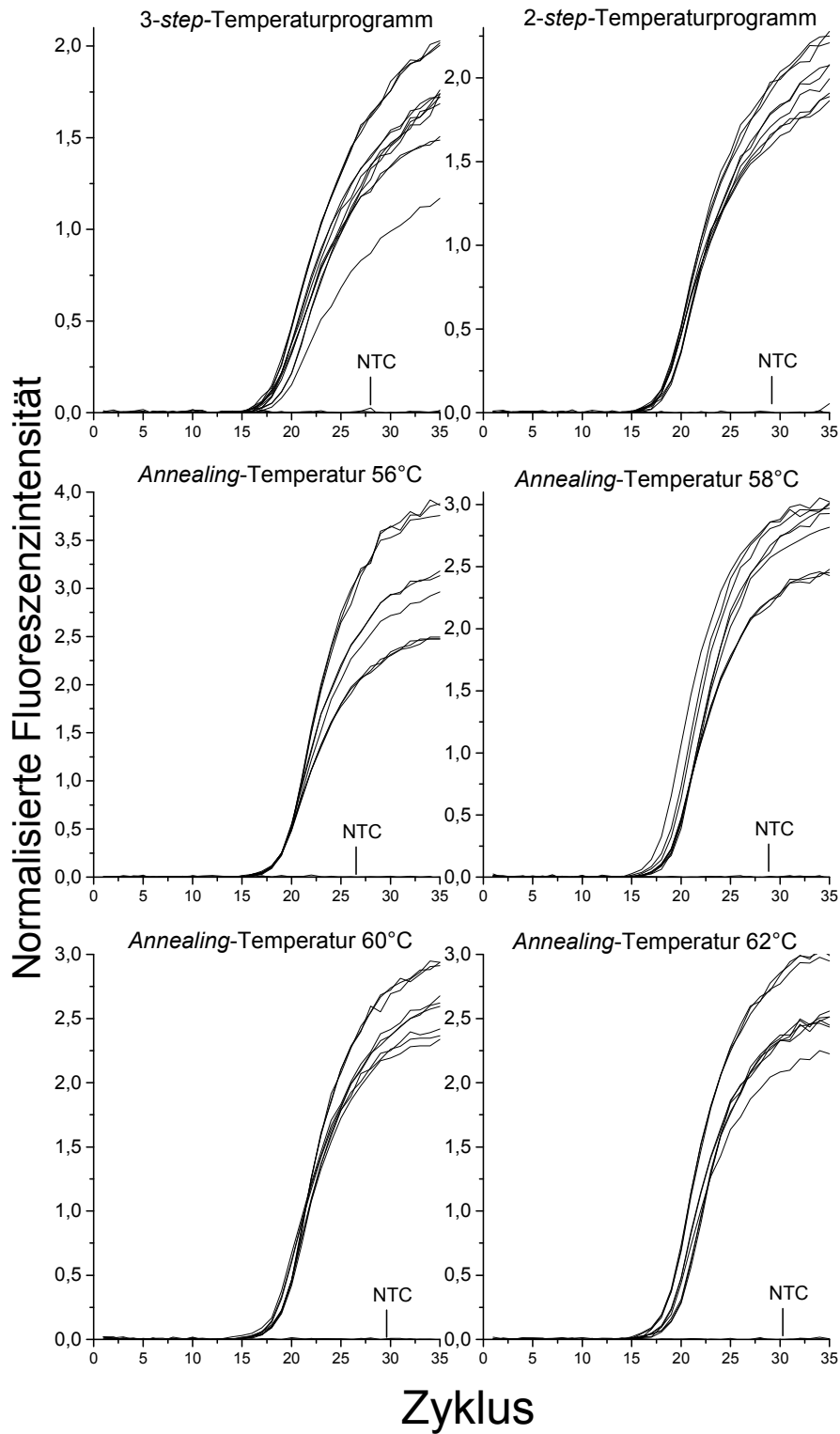


Abbildung 49: Amplifikationskurven PCR zur Optimierung der Kopienzahlbestimmung (Kap. 3.2.4.3). Auftragung der Zyklen gegen die normalisierte Fluoreszenzintensität (ΔR_n , SDS 2.4). Gezeigt sind jeweils drei abhängige Bestimmungen aus drei unabhängigen Bestimmungen. NTC: Blindwert (nf Wasser).

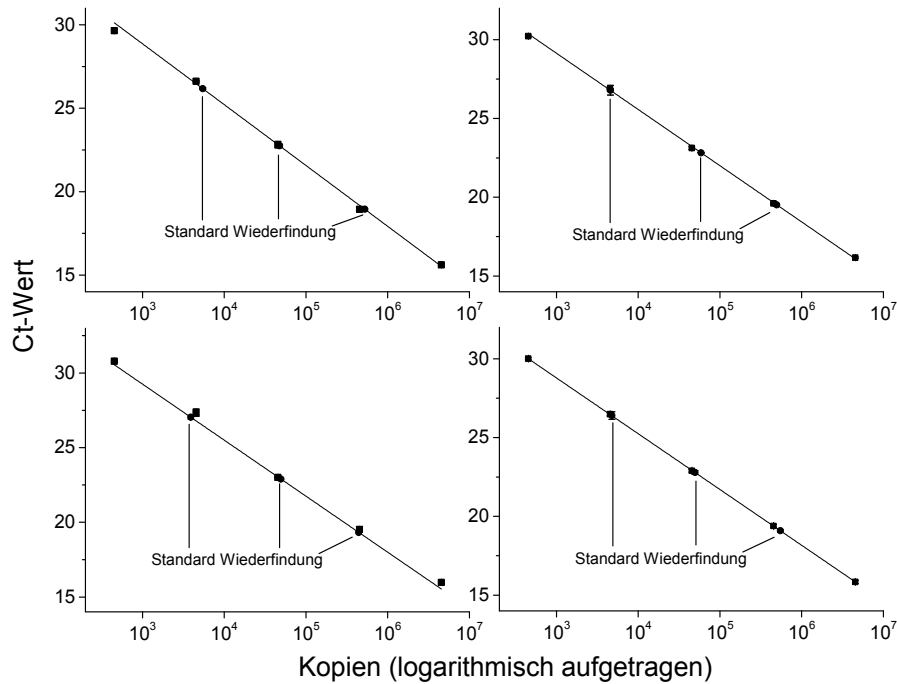


Abbildung 50: *Realtime*-PCR nach Kap. 3.2.4.3 zur Bestimmung der Richtigkeit und Präzision der RMCA-Kopienzahlbestimmung in einem weit gefasstem Kalibrierbereich ($4,7 \cdot 10^6$ - $4,7 \cdot 10^2$ Kopien). Gezeigt sind jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung aus jeweils drei abhängigen Bestimmungen. Links oben: Bestimmung 1 ($y = -3,65x + 39,80$, $R^2 = 0,999$), rechts oben: Bestimmung 2 ($y = -3,57x + 39,84$, $R^2 = 0,999$), links unten: Bestimmung 3 ($y = -3,75x + 40,52$, $R^2 = 0,998$), rechts unten: Bestimmung 4 ($y = -3,54x + 39,40$, $R^2 = 0,999$).

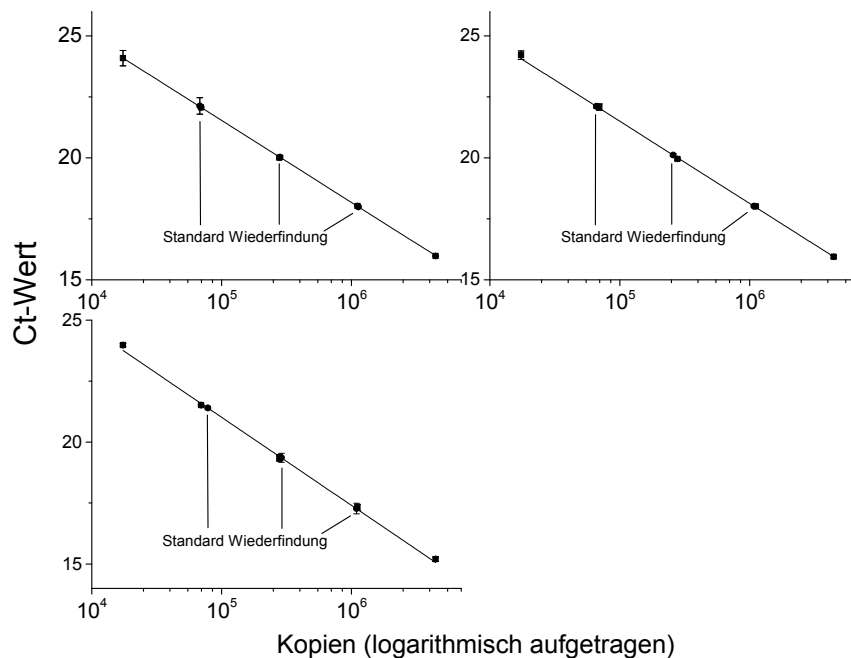


Abbildung 51: *Realtime*-PCR nach Kap. 3.2.4.3 zur Bestimmung der Richtigkeit und Präzision der RMCA-Kopienzahlbestimmung in einem eng gefasstem Kalibrierbereich ($4,7 \cdot 10^6$ - $1,8 \cdot 10^4$ Kopien). Gezeigt sind jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung aus jeweils drei abhängigen Bestimmungen. Links oben: Bestimmung 1 ($y = -3,36x + 38,36$, $R^2 = 0,999$), rechts oben: Bestimmung 2 ($y = -3,37x + 38,35$, $R^2 = 0,999$), links unten: Bestimmung 3 ($y = -3,61x + 39,05$, $R^2 = 0,999$).

Tabelle 29: Mittels LinReg PCR ermittelte Effizienzen der PCR zur Optimierung der Kopienzahlbestimmung. Ein Großteil der Werte wurde manuell basislinienkorrigiert.

Versuch	Effizienz Versuch 1	Effizienz Versuch 2	Effizienz Versuch 3	Effizienz Versuch 4	Mittelwert (±Std.-Abw.)
3-step-Temperaturprogramm	1,88	1,93	1,79	1,84	1,86 (±3,1%)
2-step-Temperaturprogramm	1,91	1,84	2,03		1,93 (±5,0%)
Annealing-Temperatur 56°C	2,07	2,29	2,18		2,18 (±5,1%)
Annealing-Temperatur 58°C	2,17	2,16	2,24		2,19 (±2,0%)
Annealing-Temperatur 60°C	2,06	2,08	1,92		2,02 (±4,4%)
Annealing-Temperatur 62°C	1,95	1,98	1,95		1,96 (±0,8%)

```

* * * * *
1>TGATCCTCCAAATCACCACAGGACTATTCCTAGCCATGCACTACTCACCAGACGCCTCAACCGCCTTTTCATCAATCGCCACATCACTCGAGACGTAAA>100
1>~~~~~GACGCCTCAACCGCCTTTTCATCAATCGCCACATCACTCGAGACGTAAA>50
192<TGATCCTCCAAATCACCACAGGACTATTCCTAGCCATGCACTACTCACCAGACGCCTCAACCGCCTTTTCATCAATCGCCACATCACTCGAGACGTAAA<93

* * * * *
101>TTATGGCTGAATCATCCGCTACCTTCACGCCAATGGCGCCTCAATATTCTTTATCTGCCTCTTCCTACACATCGGGCGAGGCCTATATTACGGATCATT>200
51>TTATGGCTGAATCATCCGCTACCTTCACGCCAATGGCGCCTCAATATTCTTTATCTGCCTCTTCCTACACATCGGGCGAGGCCTATATTACGGATCATT>150
92<TTATGGCTGAATCATCCGCTACCTTCACGCCAATGGCGCCTCAATATTCTTTATCTGCCTCTTCCTACACATCGGGCGAGGCCTATATTACG-----<2

* * *
201>CTCTACTCAGAAACCTGAAACATCGGCATTATCCTCCTG>239
151>CTCTACTCAGAAACCTGAAACATCGGCATTATCCTCCTG>189
1<-----G<1

```

Abbildung 52: Vergleich des erwarteten Mutationsprimer-Produktes (oberste Zeile) mit den Ergebnissen aus der Sequenzierung mit dem *forward*-Primer (mittlere Zeile) und dem *reverse*-Primer (untere Zeile) nach Sanger-Sequenzierung (Kap. 3.2.8).

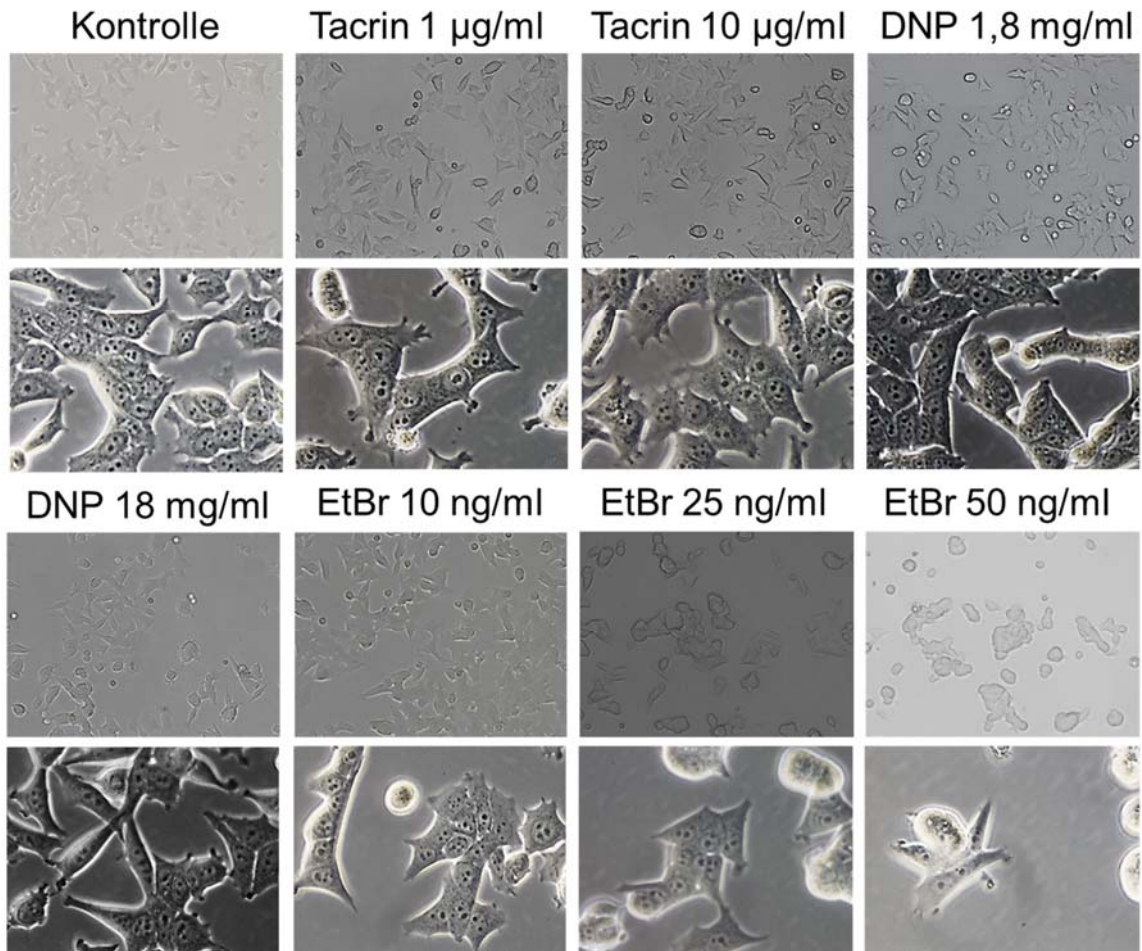


Abbildung 53: Aufnahmen der mit Tacrin, 2,4-Dinitrophenol (DNP) und Ethidium-Bromid (EtBr) nach Kap. 3.2.9.3 inkubierten Zellen zur Generierung von Rho0-Zellen aus MCF-7-Zellen. Gezeigt ist jeweils eine Beispielaufnahme von Zellen, die mit der jeweiligen Substanz in der jeweiligen Konzentration inkubiert wurden. Obere Reihe jeweils: 10er Hellfeld Objektiv. Untere Reihe jeweils: 40er Phase 2 Objektiv (Kap. 3.2.9.5). Kontrolle: 0,1% DMSO. Kontrolle, Tacrin 10 µg/ml, DNP 18 mg/ml und EtBr 10 ng/ml: Aufnahme nach 152 Tagen Inkubation. Tacrin 1 µg/ml und DNP 1,8 mg/ml: Aufnahme nach 113 Tagen Inkubation. EtBr 25 und 50 ng/ml: Aufnahme nach 40 Tagen Inkubation.

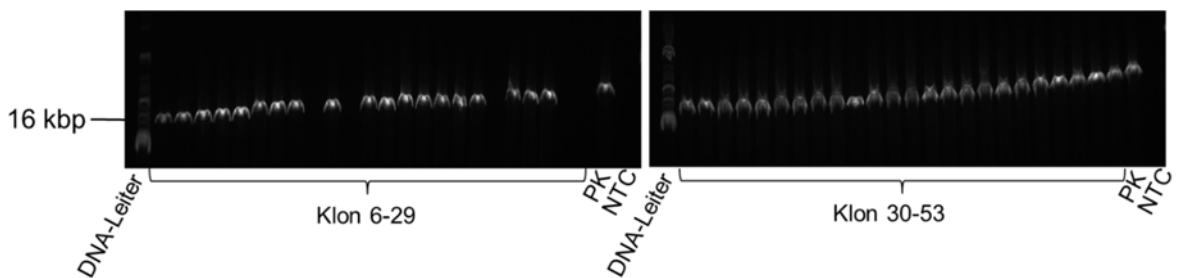


Abbildung 54: Aufnahme der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte der PCR zur Verifizierung des Rho0-Statuses (Kap. 3.2.9.10) von nach Kap. 3.2.3 isolierter DNA der mit Ethidium-Bromid inkubierten selektions-positiven Zellklone (Kap. 3.2.9.3 und 3.2.9.9). PK: Positivkontrolle, Templat: MCF-7 Gesamt-DNA aus der Kontrollgruppe; NTC: Blindwert (nf Wasser); 0,4% Agarosegel, Laufzeit: 2 h bei 7 V/cm; Leiter: *DNA molecular weight marker XV*. Gezeigt ist jeweils eine Einfachbestimmung der Klone 6-53. Erwartete PCR-Produktlänge: 16,2 kbp.

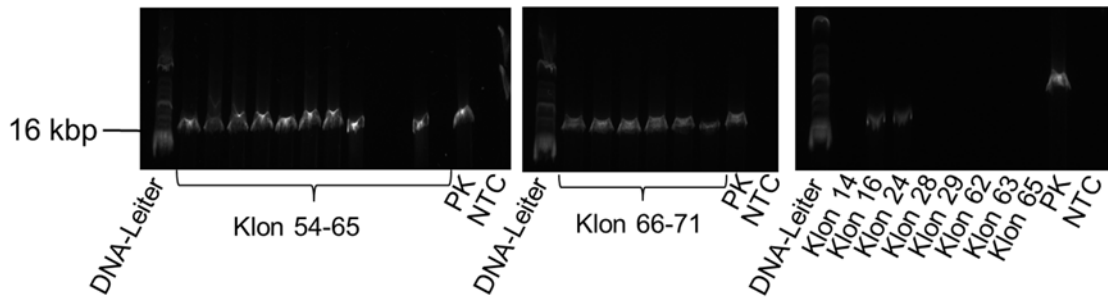


Abbildung 55: Aufnahme der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte der PCR zur Verifizierung des Rho0-Status (Kap. 3.2.9.10) von nach Kap. 3.2.3 isolierter DNA der mit Ethidium-Bromid inkubierten selektions-positiven Zellklone (Kap. 3.2.9.3 und 3.2.9.9). PK: Positivkontrolle, Templat: MCF-7 Gesamt-DNA aus der Kontrollgruppe; NTC: Blindwert (nf Wasser); 0,4% Agarosegel, Laufzeit: 2 h bei 7 V/cm; Leiter: *DNA molecular weight marker XV*. Gezeigt ist jeweils eine Einfachbestimmung der Klone 54-71 und der Wiederholungs Rho0-Status-Verifizierungs-PCR von DNA aus Klonen, ohne detektierbares PCR-Produkt (Klon 14, 16, 24, 28, 29, 62, 63 und 65). Erwartete PCR-Produktlänge: 16,2 kbp.

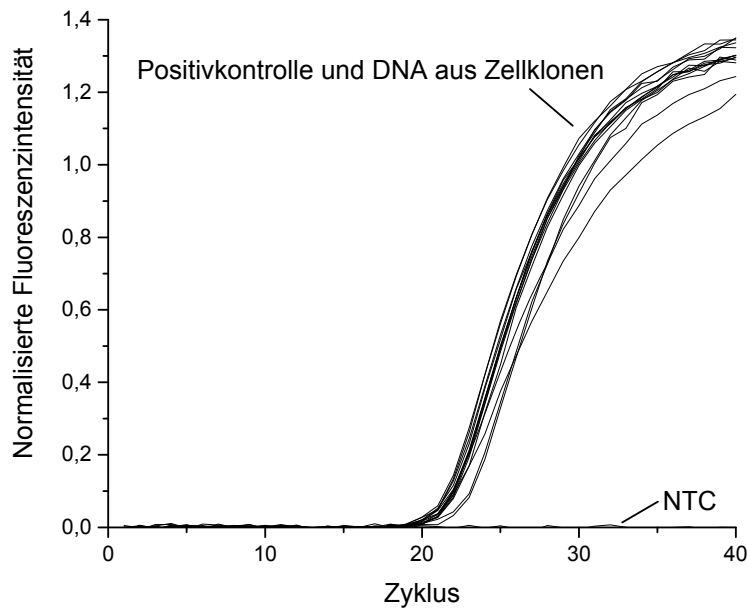


Abbildung 56: Amplifikationskurven PCR zur Verifizierung des Rho0-Status von nach Gesamt-DNA aus nach Kap. 3.2.9.9 selektions-positiven Zellklonen. Auftragung der Zyklen gegen die normalisierte Fluoreszenzintensität (ΔR_n , SDS 2.4). Gezeigt sind jeweils zwei abhängige Bestimmungen aus einer PCR. NTC: Blindwert (nf Wasser).

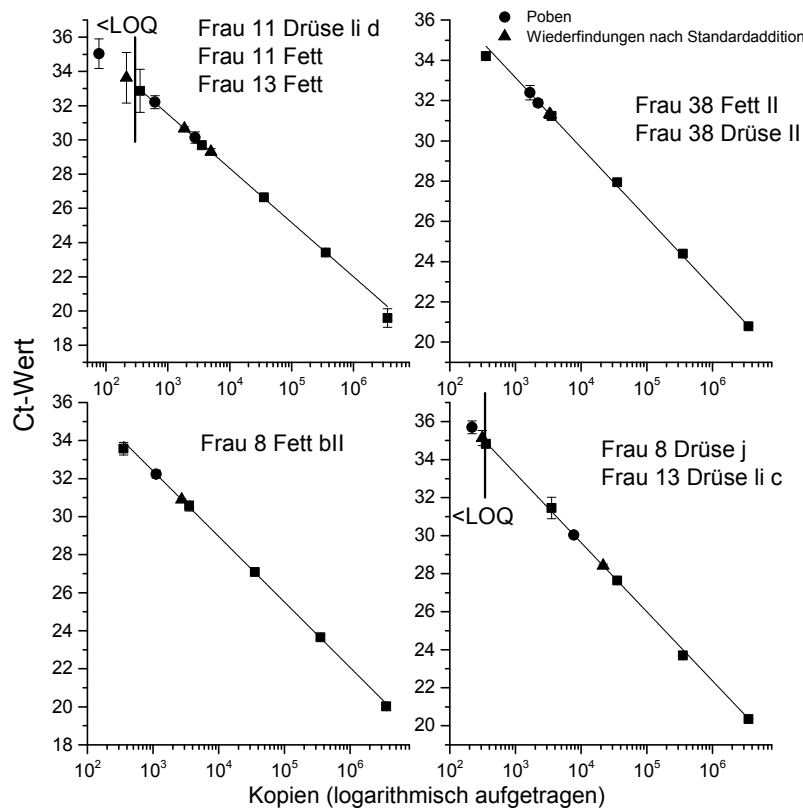


Abbildung 57: Realtime-PCR nach Kap. 3.2.4.3 zur Quantifizierung der nDNA Verunreinigung von RMCA-Proben. Gezeigt sind jeweils Mittelwert±Standardabweichung aus jeweils drei abhängigen Bestimmungen. Links oben: $y=-3,17x+41,01$, $R^2=0,998$, rechts oben: $y=-3,48x+43,57$, $R^2=0,999$, links unten: $y=-3,44x+42,73$, $R^2=0,999$, rechts unten: $y=-3,63x+44,17$, $R^2=0,999$.

Tabelle 30: Ermittelte Kopienzahlen der PCR zu Quantifizierung von nDNA Verunreinigungen nach Kap. 3.2.4.3. Gezeigt sind jeweils Mittelwert Kopienzahl±Standardabweichung aus jeweils drei abhängigen Bestimmungen.

Probe Nr.	nDNA-Kopienzahl	mtDNA Kopienzahl	Kopien mtDNA/Kopien nDNA	nDNA Masse (ng)	mtDNA Masse (ng)	Masse mtDNA/nDNA (%)
8 b II Fett	561±14,1%	5,2*10 ⁴ ±11,4%	93	2,00	0,09	0,05
8 j Drüse	3871±2,9%	2,3*10 ⁵ ±10,6%	59	13,82	0,41	0,03
11 Fett	<178	1,3*10 ⁴ ±3,9%	73	0,64	0,02	0,04
11 li d Drüse	1381±24,7%	6,8*10 ⁴ ±5,5%	49	4,93	0,12	0,02
13 Fett	307±27,3%	6,9*10 ⁴ ±1,5%	225	1,10	0,12	0,11
13 li c Drüse	<178	2,8*10 ³ ±6,0%	16	0,64	0,05	0,01
38 Fett II	835±25,0%	2,9*10 ⁴ ±3,8%	35	2,98	0,05	0,02
38 Drüse II	1107±11,8%	1,0*10 ⁴ ±6,9%	9	3,95	0,02	0,005

Rechenweg zum Abschätzen wieviele *TaqI*-Schnittstellen im Humangenom vorhanden sind:

Wahrscheinlichkeit, dass T an einer beliebigen Stelle vorkommt = $\frac{1}{4}$. Wahrscheinlichkeit, dass T dann C dann G dann A an einer beliebigen Stelle vorkommt = $\frac{1}{4} * \frac{1}{4} * \frac{1}{4} * \frac{1}{4} = 4^{-4}$

Länge Humangenom: 3,3 Mrd. Basen. Betrachtet werden 4er Basenfolgen, also insgesamt $3,3 \text{ Mrd.} / 4 = 825 \text{ Mio.}$ 4er Basenfolgen. Wahrscheinlichkeit für das auftreten von *TaqI*-Schnittstellen = $825 \text{ Mio} * 4^{-4} = 3222656$.

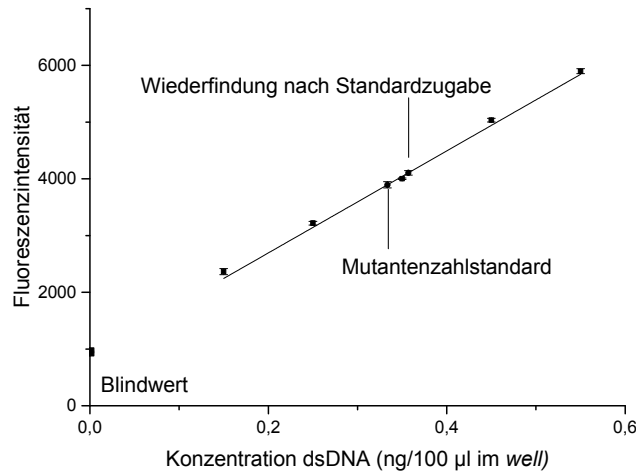


Abbildung 58: Fluorimetrische Quantifizierung des Standards (Mutationsprodukt) mittels externer Kalbsthymus-DNA-Kalibrierung nach Kap. 3.2.5.1 für die Optimierung der Mutations-PCR. Auftragung der doppelsträngiger (ds)DNA-Konzentration gegen die Fluoreszenzintensität. Gezeigt sind jeweils die Werte aus drei abhängigen Bestimmungen \pm Standardabweichung. Geradengleichung: $y=8990x+896$. $R^2: 0,991$. Blindwert: dest. Wasser.

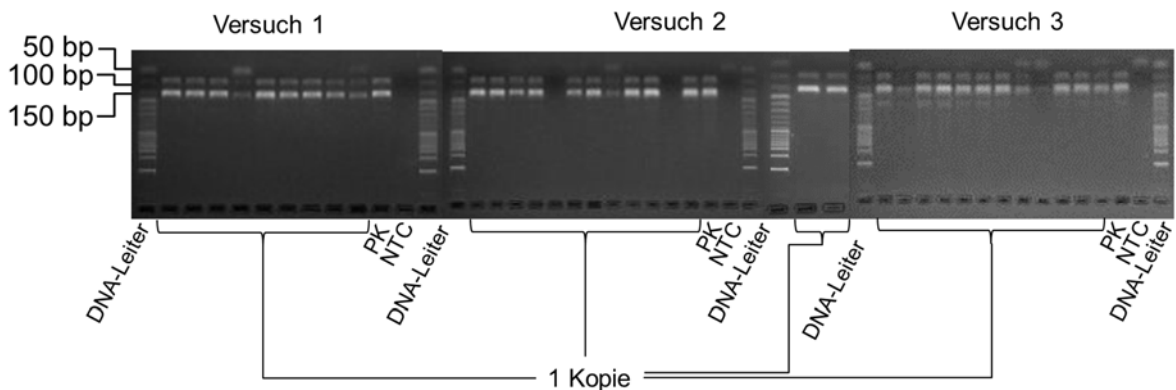


Abbildung 59: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) der PCR-Produkte des *TaqI*-Nachverdaus (Kap. 3.2.4.5) der *realtime*-Mutations-PCR (Kap. 3.2.4.4) zum Nachweis einer Kopie (erwartete Länge jeweils 90 und 149 bp). Erwartet waren jeweils 13,6 Produkte. Agarosegel: 3%ig. Laufzeit: 1 h, 5 V/cm. Templat: 1 Kopie Mutantenprimer-Produkt (Kap. 4.2.3.4), DNA-Leiter: 50 bp, PK: Positivkontrolle ($5,6 * 10^6$ Kopien Mutantenprimer-Produkt, Kap. 4.2.3.4), NTC: Blindwert (nf Wasser). Erwartete verdaute PCR-Produktlängen: 90 und 149 bp.

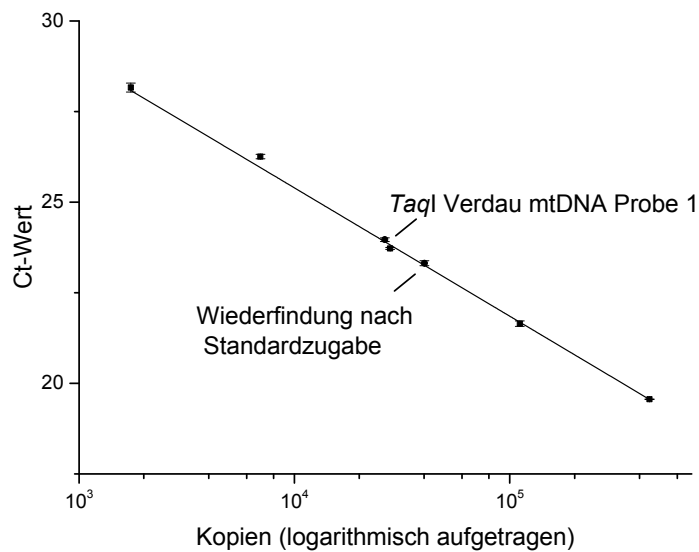


Abbildung 60: Kalibriergerade zur Ermittlung der Kopienzahl der *TaqI* verdauten mtDNA Frau 1 nach Kap. 3.2.4.3. Auftragung der gemittelten ct-Werte des Standards (■, Kopienzahlprimer Produkt) und der ct-Werte der Probe und der zugehörigen internen Wiederfindung (Wiederfindung von Standardzugabe, ●) gegen die logarithmisch aufgetragene Anzahl der Kopien. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert aus drei abhängigen Bestimmungen ± Standardabweichung. Geradengleichung: $y = -3,5x + 39,6$. $R^2 = 0,998$.

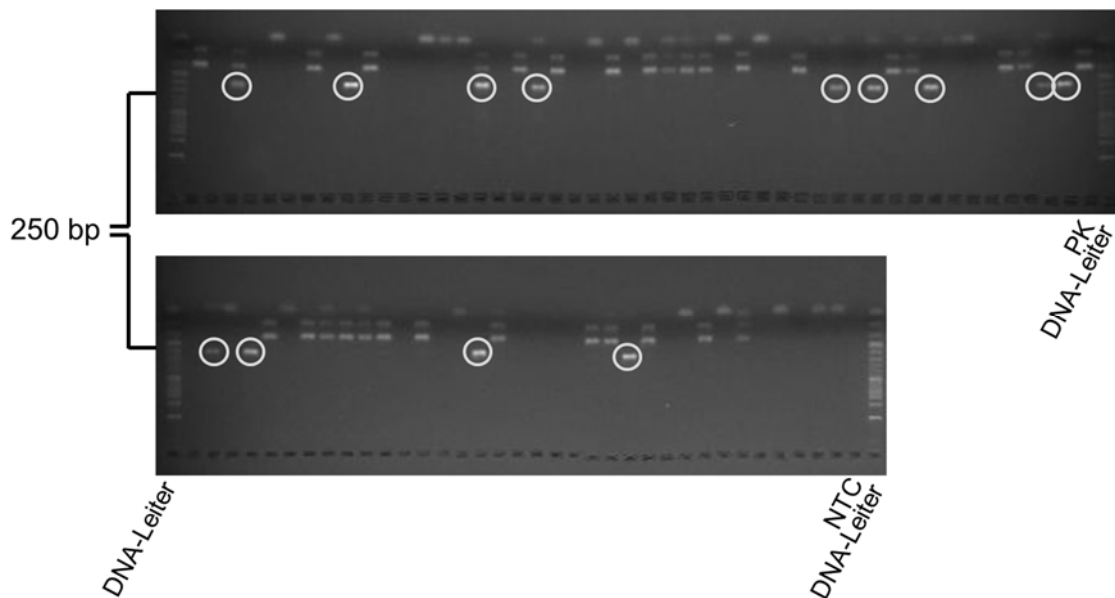


Abbildung 61: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) des *TaqI*-Nachverdaus der PCR-Produkte der *realtime*-Mutations-PCR (Kap. 3.2.4.4) zur Mutantenzahl-Bestimmung der Probe Nr. 1 (erwartete Länge jeweils 239 bp). Agarosegel: 3%ig. Laufzeit: 1 h, 5 V/cm. Weißgrau eingekreist: Mutanten. Ansätze, bei denen kein Mutationsprodukt entstanden ist oder falsch positive Mutanten (*TaqI*-nachverdaute Produkte) sind nicht beschriftet. PK: Positivkontrolle ($5,6 \cdot 10^6$ Kopien Mutantenprimer-Produkt, Kap. 4.2.3.4), DNA-Leiter: 50 bp, NTC: Blindwert (nf Wasser). Erwartete Mutanten-PCR-Produktlänge: 239 bp.

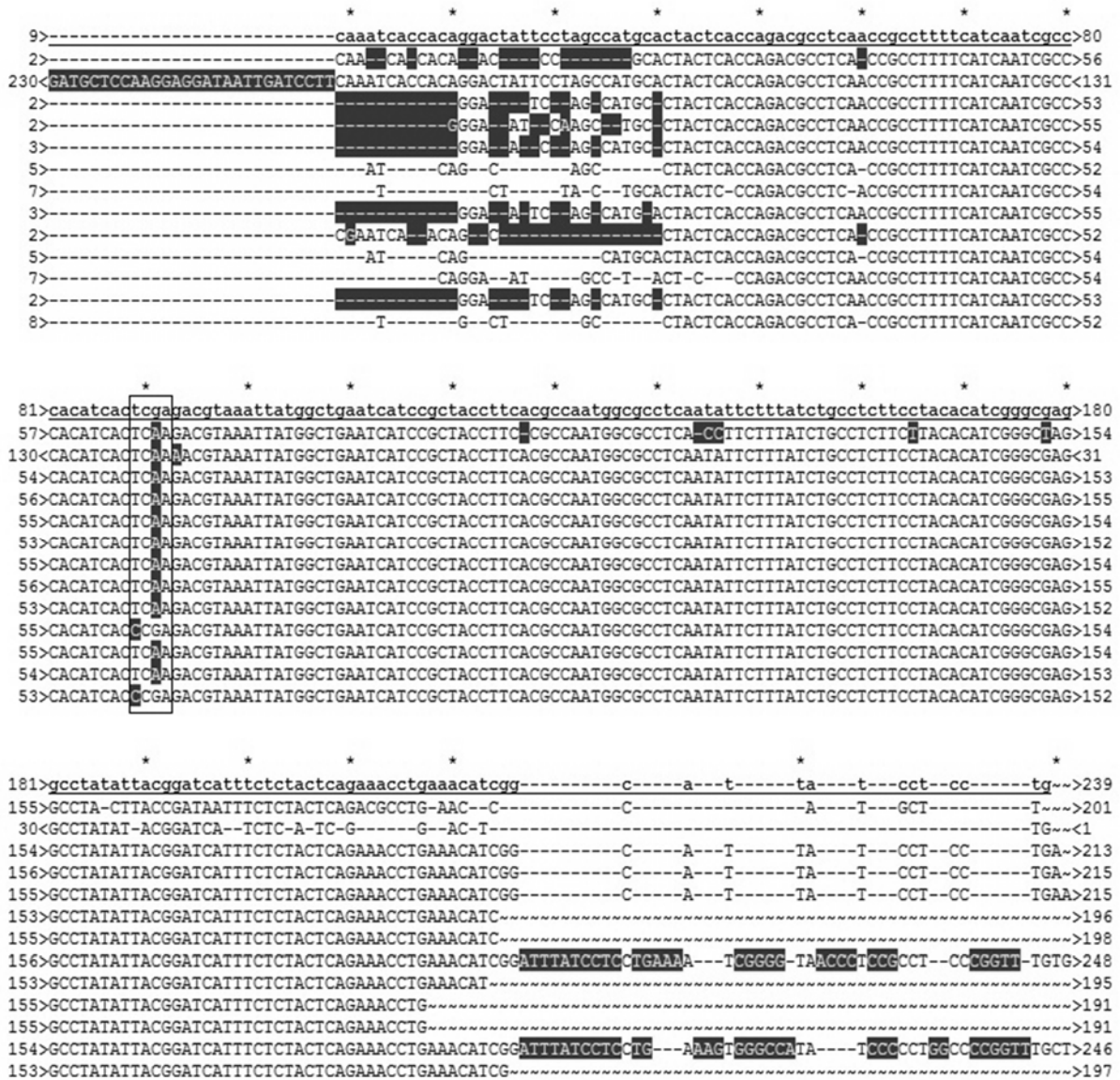


Abbildung 62: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung (Kap. 3.2.8) von Mutanten der SMF Bestimmung von mtDNA von Frau 1. Vergleich des im Elektropherogramm auswertbaren Bereichs der Mutationsprodukte der Probe Nr. 1 (jeweils Zeile 2-14) mit der Mutationsproduktsequenz des Sense-Stranges (oberste Zeile). Darstellung in 5'→3' Richtung. Zahlen zeigen die bp-Position innerhalb der Sequenz an. Schwarz markiert: keine Übereinstimmung der Sequenzen. Eingrahmt ist die TaqI-Schnittstelle.

Tabelle 31: Einordnung der Brustgewebsproben nach Fettgehalt. Das Gewebe wurde nach der Entnahme in Fett und Drüsengewebe separiert und dabei nach Fettgehalt in Kategorien eingeordnet (Kap. 3.2.1 und 3.2.2). Gezeigt ist jeweils die Kategorie des jeweiligen Aliquots mit dem niedrigsten Fettgehalt (Drüsengewebe) und dem höchsten Fettgehalt (Fettgewebe) in ausreichender Menge für eine DNA-Isolation (6 g, Kap. 3.2.3). Kategorien: A: 0-1%, B: 2-10%, C: 11-25%, D: 26-50%, E: 51-99%, F: 100% Fett.

Probenr.	Kategorie Drüsengewebe	Kategorie Fettgewebe
0	D	D
1	A	F
2	D	F

Probennr.	Kategorie Drüsengewebe	Kategorie Fettgewebe
3	B	F
4	B	F
5	B	F
6	B	F
7	E	F
8	A	F
10	B	F
11	A	F
12	D	F
13	A	F
14	D	F
15	B	F
16	C	F
17	B	F
18	A	F
19	A	F
20	C	F
21	D	F
22	E	E
24	D	F
25	D	F
26	B	F
27	B	F
28	B	F
29	A	F
30	B	F
31	E	F
32	E	F
33	B	F
34	E	F
35	E	E
36	B	F
37	D	E
38	A	F
39	D	E
40	E	F
41	E	F
42	E	F
43	E	F
44	C	F
45	B	F
46	B	F
47	B	F
48	D	F
49	C	F
50	E	E
51	C	F

Tabelle 32: Übersicht über alle ermittelten Kopienzahlen (KoZa), interne Wiederfindungsraten nach Standardzugabe (IWF) jeweils \pm relative Standardabweichung (rel. sd) aus einer dreifach abhängigen Bestimmung, des Verhältnisses der Standard-Zugabe- zu Probenzahl-Kopienzahl (VSP), der Gesamtanzahl an jeweils detektierten Mutanten und der Spontanmutationsfrequenz (SMF).

Probenr. und Gewebe	Mittelwert KoZa \pm rel. sd	Mittelwert IWF \pm rel. sd	VSP	Mutanten	SMF
1 Fett	101575 \pm 8,1%	116,4 \pm 2,9%	133	7	2,09*10 ⁻⁵
2 Fett	75690 \pm 8,5%	105,8 \pm 4,2%	178	7	7,00*10 ⁻⁵
3 Fett	27323 \pm 2,6%	93,2 \pm 5,2%	123	11	1,83*10 ⁻⁵
4 Fett	29031 \pm 3,6%	95,4 \pm 4,3%	116	15	1,02*10 ⁻⁵
5 Fett	6790 \pm 1,6%	91,7 \pm 5,5%	198	8	6,69*10 ⁻⁵
6 Fett	19964 \pm 4,2%	82,3 \pm 27,3%	68	6	3,41*10 ⁻⁵
7 Fett	150239 \pm 1,1%	83,9 \pm 14,3%	90	13	1,97*10 ⁻⁵
8-I Fett	56890 \pm 4,4%	99,3 \pm 8,1%	237	7	1,40*10 ⁻⁵
8-II Fett	108892 \pm 7%	85,4 \pm 23,9%	124	9	3,75*10 ⁻⁵
8-III Fett	49041 \pm 11,4%	63,5 \pm 7,4%	275	7	3,24*10 ⁻⁵
8-I Drüse	152178 \pm 2%	67,0 \pm 20,7%	89	7	1,04*10 ⁻⁵
8-II Drüse	215941 \pm 10,6%	111,8 \pm 7,0%	62	15	1,58*10 ⁻⁵
8-IIIa Drüse	189817 \pm 2,7%	77,3 \pm 24,1%	71	22	1,05*10 ⁻⁵
8-IIIb Drüse	29220 \pm 4,3%	78,8 \pm 12,7%	115	15	5,83*10 ⁻⁵
8-IIIc Drüse	222247 \pm 2,8%	98,2 \pm 4,3%	61	15	1,53*10 ⁻⁵
10 Fett	23984 \pm 4,8%	87,2 \pm 7,0%	56	7	3,31*10 ⁻⁵
11-I Fett	12777 \pm 3,9%	97,7 \pm 5,2%	105	11	3,91*10 ⁻⁵
11-II Fett	5564 \pm 5,5%	66,8 \pm 14,8%	242	7	7,14*10 ⁻⁵
11-III Fett	8730 \pm 0,9%	112,6 \pm 16,4%	154	6	7,81*10 ⁻⁴
11-I Drüse	134865 \pm 9,1%	67,4 \pm 9,3%	100	12	2,02*10 ⁻⁵
11-II Drüse	64315 \pm 5,5%	83,8 \pm 8,4%	210	6	2,12*10 ⁻⁵
11-III Drüse	355786 \pm 1,9%	103,0 \pm 15,0%	152	14	1,79*10 ⁻⁵
12 Fett	57341 \pm 6,6%	109,2 \pm 18,4%	235	9	3,56*10 ⁻⁵
13-I Fett	65349 \pm 1,5%	79,3 \pm 9,8%	206	11	1,27*10 ⁻⁵
13-II Fett	7691 \pm 3,9%	83,2 \pm 6%	175	10	1,48*10 ⁻⁵
13-III Fett	10803 \pm 9,3%	84,7 \pm 25,6%	125	8	2,10*10 ⁻⁵
13-I Drüse	113623 \pm 6,8%	83,3 \pm 7,3%	119	5	2,00*10 ⁻⁵
13-II Drüse	2665 \pm 6,0%	85,1 \pm 32,8%	126	13	2,67*10 ⁻⁵
13-III Drüse	190905 \pm 9,3%	92,7 \pm 7,3%	71	9	1,07*10 ⁻⁵
14 Fett	78816 \pm 7,3%	85,2 \pm 5,6%	171	8	2,31*10 ⁻⁵
15 Fett	17155 \pm 8,8%	64,2 \pm 6,2%	196	6	5,30*10 ⁻⁵
16 Fett	121314 \pm 6,7%	112 \pm 27,7%	111	10	2,88*10 ⁻⁶
17 Fett	46586 \pm 2,4%	91,8 \pm 2,9%	289	10	7,50*10 ⁻⁶
18 Fett	7790 \pm 6,7%	68,5 \pm 6,1%	173	12	3,50*10 ⁻⁵
19 Fett	38853 \pm 10,3%	82,9 \pm 10,1%	87	6	2,34*10 ⁻⁵
20 Fett	100493 \pm 5,1%	109,4 \pm 23,8%	134	8	1,21*10 ⁻⁵
21 Fett	147975 \pm 10%	115,2 \pm 12,5%	91	8	2,05*10 ⁻⁵
24 Fett	129854 \pm 11,2%	77,3 \pm 14,1%	104	8	2,80*10 ⁻⁵
25 Fett	20648 \pm 8,3%	94,8 \pm 13,0%	163	11	4,84*10 ⁻⁵
26 Fett	62131 \pm 1,0%	109,0 \pm 10,7%	54	7	1,71*10 ⁻⁵

Probennr. und Gewebe	Mittelwert KoZa±rel. sd	Mittelwert IWF±rel. sd	VSP	Mutanten	SMF
27 Fett	22226±5,4%	82,2±1,7%	152	7	2,86*10 ⁻⁵
28 Fett	60214±3,3%	76,4±1,9%	224	11	4,15*10 ⁻⁵
29 Fett	17811±6,9%	81,4±13,5%	189	6	3,06*10 ⁻⁵
30 Fett	14747±4,0%	90,2±18,8%	91	5	9,63*10 ⁻⁶
31 Fett	50544±6,8%	98,2±21,4%	267	10	1,50*10 ⁻⁵
32 Fett	53686±2,8%	74,6±11,6%	251	12	1,69*10 ⁻⁵
33 Fett	69350±6,9%	84,3±3,4%	194	7	1,15*10 ⁻⁵
34 Fett	23439±2,8%	80,9±3,9%	144	11	3,55*10 ⁻⁵
36 Fett	59800±0,2%	80,5±8,2%	225	5	1,90*10 ⁻⁵
38 Fett I	26609±6,3%	89,3±10,2%	203	5	2,13*10 ⁻⁵
38 Fett II	28012±3,8%	78,3±32,4%	192	10	1,35*10 ⁻⁵
38 Fett III	52287±1,8%	90,3±8,8%	103	5	8,69*10 ⁻⁶
38 Drüse I	3125±7,9%	88,0±5,0%	108	7	2,54*10 ⁻⁴
38 Drüse II	9668±6,9%	87,3±6,7%	139	7	6,33*10 ⁻⁶
38 Drüse III	4079±3,7%	89,7±16,7%	83	7	2,81*10 ⁻⁶
40 Fett	305173±0,9%	76,4±22,4%	44	7	2,60*10 ⁻⁵
41 Fett	67147±3,9%	76,4±28,5%	201	9	1,52*10 ⁻⁵
42 Fett	47328±1,0%	78,2±29,1%	285	5	2,40*10 ⁻⁵
43 Fett	172440±6,7%	75±11,7%	78	10	2,63*10 ⁻⁵
44 Fett	30829±8,9%	93,4±8,8%	109	13	3,83*10 ⁻⁵
45 Fett	48147±3,7%	90,5±2,2%	280	6	1,42*10 ⁻⁵
46 Fett	141437±0,8%	71,8±6,7%	95	7	2,25*10 ⁻⁵
47 Fett	48471±1,3%	79,7±10,3%	70	9	2,81*10 ⁻⁵
48 Fett	12936±6,3%	78,7±13,4%	104	9	1,58*10 ⁻⁵
49 Fett	9120±5,2%	75,3±6,6%	148	6	2,30*10 ⁻⁵
51 Fett	48321±3,3%	99,6±12,3%	279	9	7,05*10 ⁻⁶

Tabelle 33: Links: Standard-Abweichung (Std.-Abw.) und Varianzenanteil der einzelnen Oxysterolspiegel-Hauptkomponenten. Rechts: *Scree-Plot* der Hauptkomponentenanalyse.

Hauptkomponente	Std.- Abw.	Anteil Varianz	Kumulativer Anteil
1	1,88	0,71	0,71
2	1,06	0,23	0,93
3	0,46	0,04	0,98
4	0,30	0,02	0,99
5	0,17	0,01	1,00

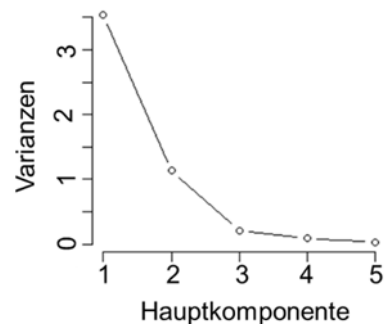


Tabelle 34: Beschreibung der zwei Oxy-Cholesterin-Hauptkomponenten (HK). Je höher der Betrag, desto höher der Einfluss (**Fett**: Werte mit dem höchsten Einfluss bei einer Grenze von $\geq 0,44$, maximal möglicher Betrag: 1,00). Das Plus oder Minus gibt die Richtung des Einflusses auf die jeweilige Hauptkomponente an.

	HK1	HK2
7-Keto-Cholesterin	-0,46	+0,35
7 α -HO-Cholesterin	-0,50	+0,27
7 β -HO-Cholesterin	-0,50	+0,23
5,6 α -Epoxy-Cholesterin	-0,44	-0,44
5,6 β -Epoxy-Cholesterin	-0,29	-0,75

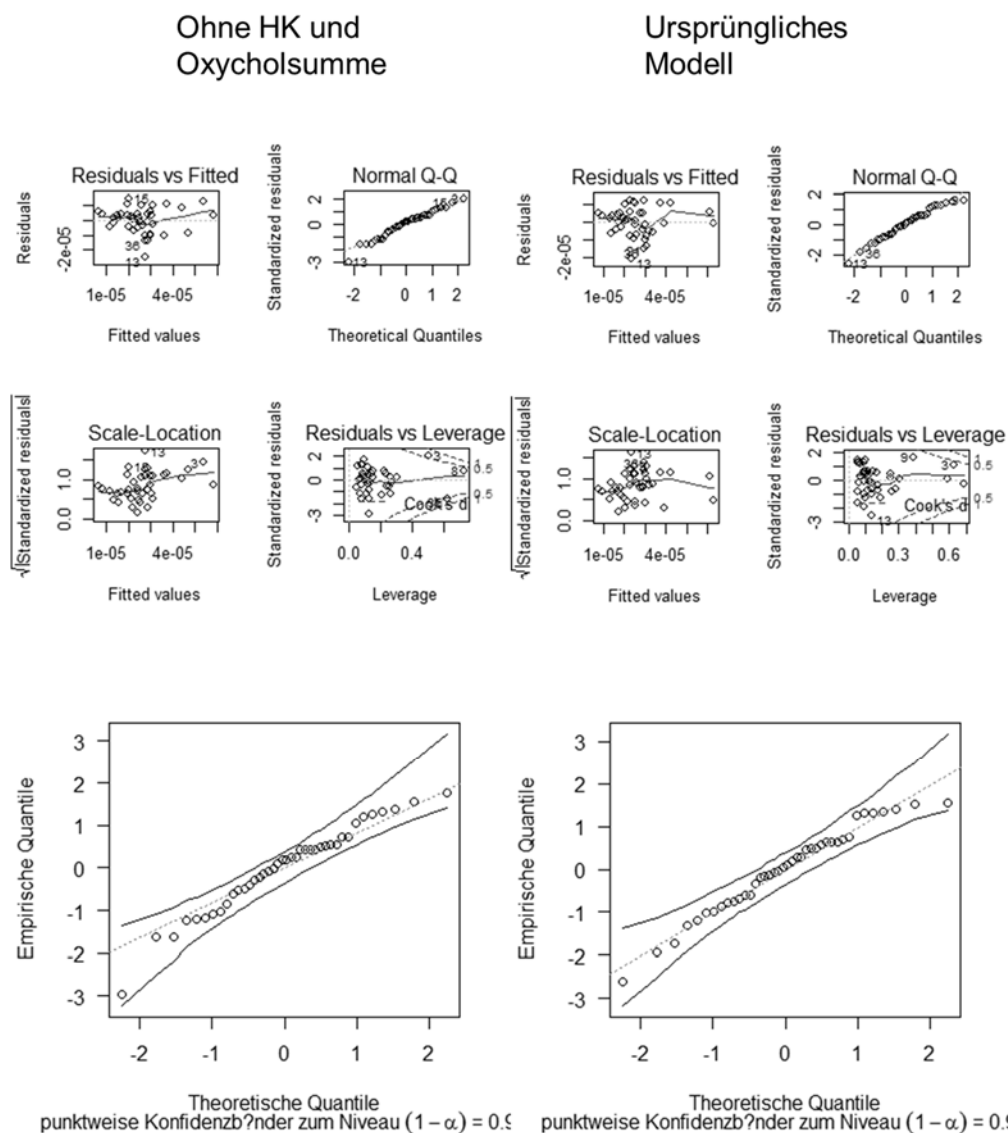


Abbildung 63: Darstellung der Residuen der linearen Regressions-Modelle zur Ermittlung von Einflussfaktoren auf die mitochondriale SMF.

Bioinformatische Netzwerkmodellierung

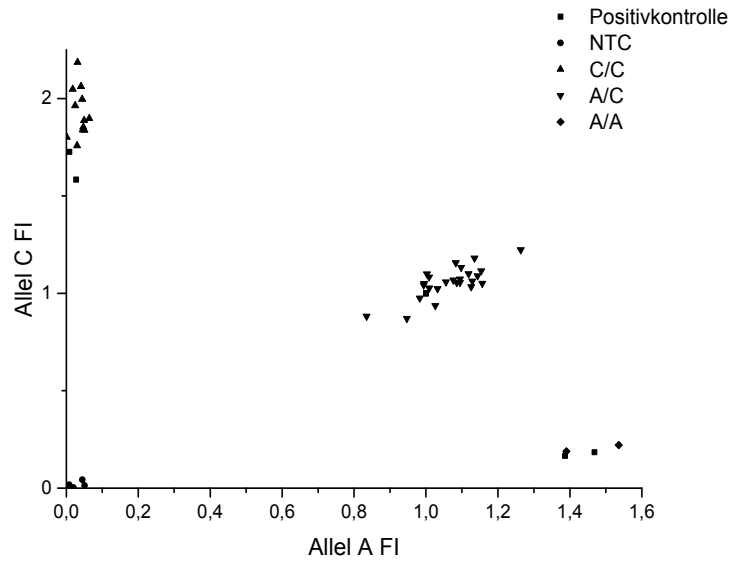


Abbildung 64: *HSD17B1*-Genotypisierung aller Brustgewebeproben mittels allelischer Diskriminierung. Aufgetragen ist jeweils die auf die heterozygote Positivkontrolle normierte Fluoreszenzintensität (FI) der beiden Allele gegeneinander. NTC: Blindwert (nf Wasser).

```

      *           *           *           *           *           *           *           *           *
1>CAAATICTGGATTGTAGCAGATCATGCCAGCTGCATATGGTTGTCATGGTCTGGTCTCTCCAA--AATGTCCACACGAATCTTCTCCTCTTCTGTCTCCC>99
1>-----TGGTCTGGTCTCTCCAA--AATGTCCACACGAATCTTCTCCTCTTCTGTCTCCC>52

      *           *           *           *           *           *           *           *           *
100>CACCTGCCACCCACAAAACACAGACTCAATCTCAGCATCACAGCCCAGCCAAGGAGGAGGCCACCTTCCCCCACCACATTGCAGCCACCCACACTCACAC>199
53>CACCTGCCACCCACAAAACACAGACTCAATCTCAGCATCACAGCCCAGCCAAGGAGGAGGCCACCTTCCCCCACCACATTGCAGCCACCCACACTCACAC>152

      *           *           *           *           *           *           *           *           *
200>AGGTTGTGCTTGCAGGCAATGTAGCACAAGATGGCGTTGCTCTGGGTGATCTTGTGAGCCCCATCAATCAAGTAGGGCAGCTGGATGGATGGGAAACCGG>299
153>AGGTTGTGCTTGCAGGCAATGTAGCACAAGATGGCGTTGCTCTGGGTGATCTTGTGAGCCCCATCAATCAAGTAGGGCAGCTGGATGGATGGGAAACCGG>252

      *           *           *           *           *           *           *           *           *
300>CGAAGCTCAGTTGGGCCACCAGGCTCCCCAGCATCCCCTTCCATAAGCAAGAGCAGAGAGGAGACCAGGGCACTCACTGTGCCTGCTCATGGCAGGACTG>399
253>CGAAGCTCAGTTGGGCCACCAGGCTCCCCAGCATCCCCTTCCATAAGCAAGAGCAGAGAGGAGACCAGGGCACTCACTGTGCCTGCTCATGGCAGGACTG>352

      *           *           *           *           *           *           *           *           *
400>AAATAAGAATACTGTCACATGAACGAATGCAGGTGGACACAGAACATCATGGAAGGACTGTTTAGACAGCCAGGAGTGAGAGGAATTGGGCAGAAGACTC>499
353>AAATAAGAATACTGTCACATGAACGAATGCAGGTGGACACAGAACATCATGGAAGGACTGTTTAGACAGCCAGGAGTGAGAGGAATTGG----->441

      *           *           *           *           *           *           *           *           *
500>CTGATCTTAACACCTCTAAGCTGGGGAGAGGAGATGCAGTCAGAGACACGTTGCACCTTCCCCCAAACCGCCCTTCCCTGCACCTACATTGGGAAAC>599
441>----->441

      *           *           *           *           *           *           *           *           *
600>TCCAGGCCAGCTTGAATTTTCAITTCAGCCACTGGCTTCTGTGTCATAATCAGGAGCTGTG>659
441>----->441
    
```

Abbildung 65: Vergleich der erwarteten Produktsequenz (NCBI-GenBank®, oben) mit dem Sequenzierungsergebnis (nach Kap. 3.2.8) der *GSTM1*-Gen Gelbande.

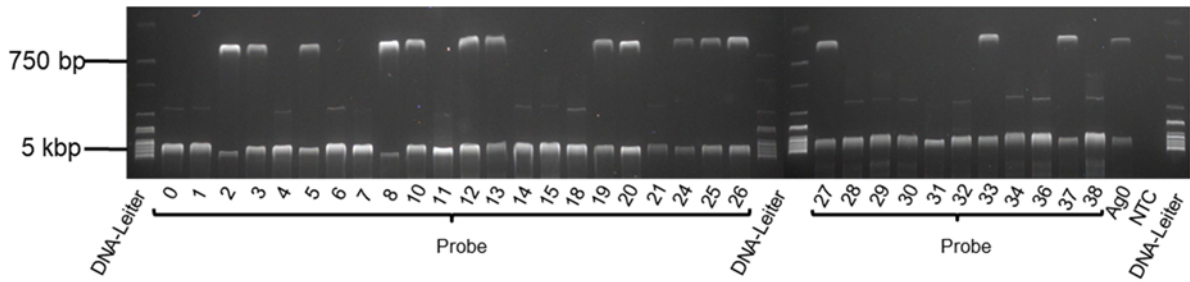


Abbildung 66: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) der PCR-Produkte der PCR zur *GSTM1*-Genotypisierung von Humanproben nach Kap. 3.2.10.2. Templat: DNA aus Humanproben. Positivkontrolle: DNA aus Ag0-Zellen (Kap. 3.2.10.1). DNA-Leiter: 1 kb (Fermentas), NTC: Blindwert (nf Wasser). Laufzeit: 1 h bei 7 V/cm. Agarosegel: 1,5%. Erwartete PCR-Produktlänge bei vorhandensein des *GSTM1*-Gens: 625 bp. Erwartete PCR-Produktlänge bei einer *GSTM1*-Deletion: 4748 bp.

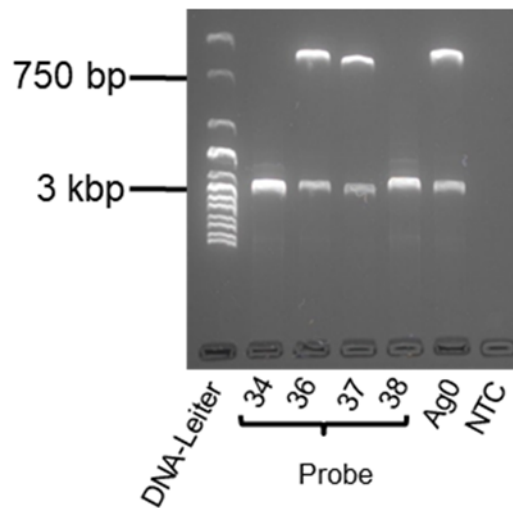


Abbildung 67: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) der PCR-Produkte der PCR zur *GSTT1*-Genotypisierung von Humanproben nach Kap. 3.2.10.2. Templat: DNA aus Humanproben. Positivkontrolle: DNA aus Ag0-Zellen (Kap. 3.2.10.1). DNA-Leiter: 1 kb (Fermentas), NTC: Blindwert (nf Wasser). Laufzeit: 1 h bei 7 V/cm. Agarosegel: 1,5%. Erwartete PCR-Produktlänge bei vorhandensein des *GSTT1*-Gens: 969 bp. Erwartete PCR-Produktlänge bei einer *GSTT1*-Deletion: 3106 bp.

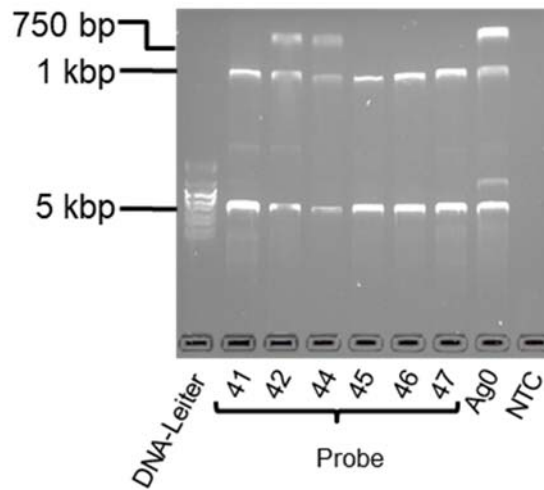


Abbildung 68: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) der PCR-Produkte der PCR zur Zusammenführung der *GSTM1*- und *GSTT1*-Genotypisierung nach Kap. 3.2.10.2. Templat: DNA aus Humanproben und Humanzelllinien (Kap. 3.2.10.1). DNA-Leiter: 1 kb (Fermentas), NTC: Blindwert (nf Wasser). Laufzeit: 1 h bei 7 V/cm. Agarosegel: 1,5%. Erwartete PCR-Produktlänge bei Vorhandensein des *GSTM1*-Gens: 625 bp. Erwartete PCR-Produktlänge bei einer *GSTM1*-Deletion: 4748 bp. Erwartete PCR-Produktlänge bei einer *GSTT1*-Deletion: 3106 bp.

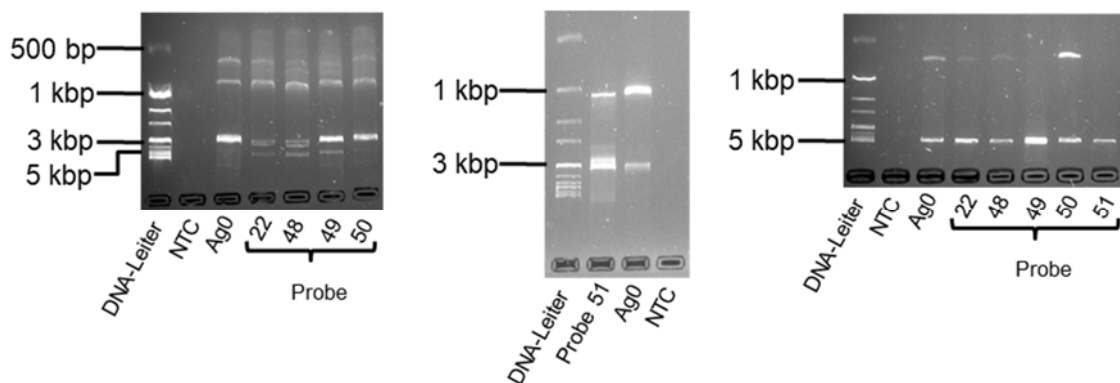


Abbildung 69: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) der PCR-Produkte der PCR zur *GSTM1*- und *GSTT1*-Genotypisierung von Humanproben nach Kap. 3.2.10.2. Templat: DNA aus Humanproben. Positivkontrolle: DNA aus Ag0-Zellen (Kap. 3.2.10.1). DNA-Leiter: 1 kb (Fermentas), NTC: Blindwert (nf Wasser). Laufzeit: 1 h bei 7 V/cm. Agarosegel: 1,5%. Links und Mitte: *GSTM1*-Genotypisierung. Da bei Positivkontrolle die *GSTM1*-Deletionsbande nicht zu sehen war, wurde die *GSTM1*-Bestimmung alleine wiederholt (rechts). Erwartete PCR-Produktlänge bei vorhandensein des *GSTM1*-Gens: 625 bp. Erwartete PCR-Produktlänge bei einer *GSTM1*-Deletion: 4748 bp. Erwartete PCR-Produktlänge bei einer *GSTT1*-Deletion: 3106 bp.

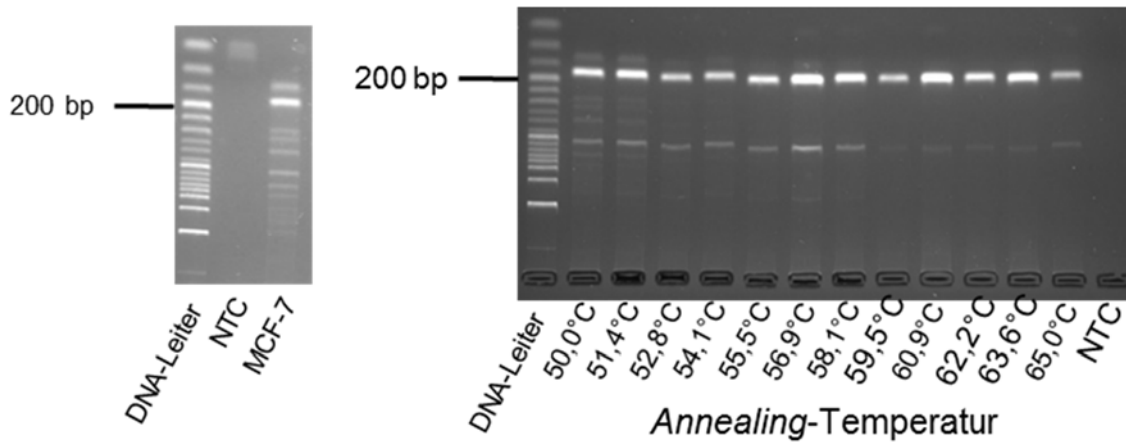


Abbildung 70: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) der PCR-Produkte der PCR der Positivkontrollenverifizierung des *GSTP1*-Polymorphismus mittels RFLP-PCR nach Kap. 3.2.10.4. Jeweils Agarosegel: 3%. Laufzeit: 1 h bei 5 V/cm. DNA-Leiter: 50 bp. NTC: Blindwert (nf Wasser). Templat: DNA aus MCF-7-Zellen (Kap. 3.2.10.1). Links: Erster Primer-Test. Rechts: Temperaturgradient zur Optimierung der *Annealing*-Temperatur. Beschriftet sind die Ansätze mit der niedrigsten (56°C) und der höchsten (66°C) getesteten *Annealing*-Temperatur. Dazwischen befinden sich Ansätze in aufsteigender *Annealing*-Temperatur Reihenfolge in äquidistanten Abständen. Erwartete PCR-Produktlänge: 176 bp.

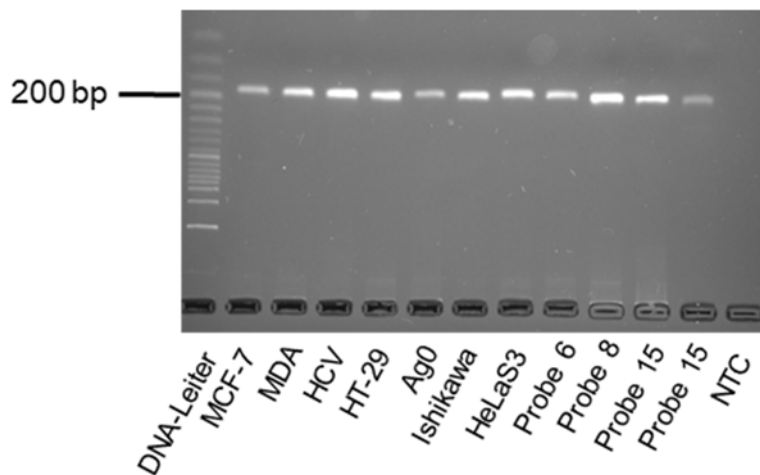


Abbildung 71: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) der PCR-Produkte der PCR zur Positivkontrollenverifizierung des *GSTP1*-Polymorphismus mittels RFLP-PCR nach Kap. 3.2.10.4. Agarosegel: 3%. Laufzeit: 1 h bei 5 V/cm. DNA-Leiter: 50 bp. NTC: Blindwert (nf Wasser). Templat: DNA aus Human-Zellen (Kap. 3.2.10.1) und Humangewebe (Frau 6, 8 und 15). Erwartete PCR-Produktlänge: 230 bp. Erwartete PCR-Produktlänge: 176 bp.

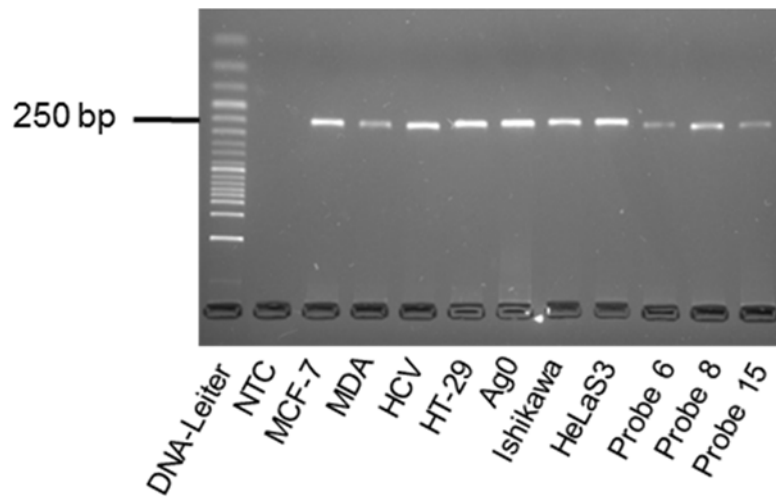


Abbildung 72: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) der PCR-Produkte der PCR zur Positivkontrollenverifizierung des *NQO1*-Polymorphismus mittels RFLP-PCR nach Kap. 3.2.10.4. Agarosegel: 3%. Laufzeit: 1 h bei 5 V/cm. DNA-Leiter: 50 bp. NTC: Blindwert (nf Wasser). Templat: DNA aus Human-Zellen (Kap. 3.2.10.1) und Humangewebe (Frau 6, 8 und 15). Erwartete PCR-Produktlänge: 230 bp.

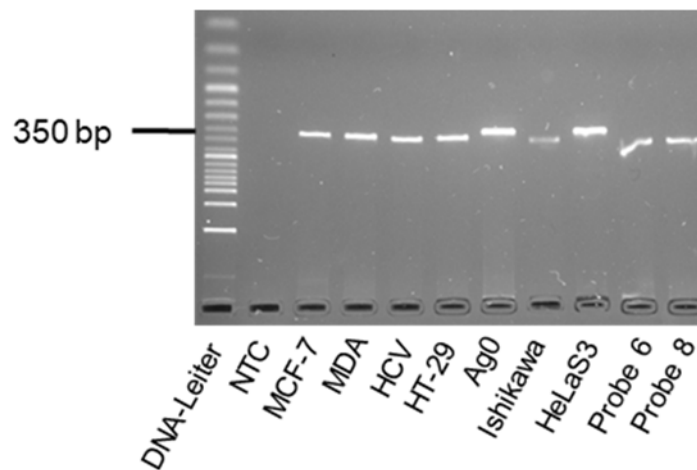


Abbildung 73: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) der PCR-Produkte der PCR zur Positivkontrollenverifizierung des *CYP1B1*-Polymorphismus mittels RFLP-PCR nach Kap. 3.2.10.4. Agarosegel: 3%. Laufzeit: 1 h bei 5 V/cm. DNA-Leiter: 50 bp. NTC: Blindwert (nf Wasser). Templat: DNA aus Human-Zellen (Kap. 3.2.10.1) und Humangewebe (Frau 6 und 8). Erwartete PCR-Produktlänge: 340 bp.

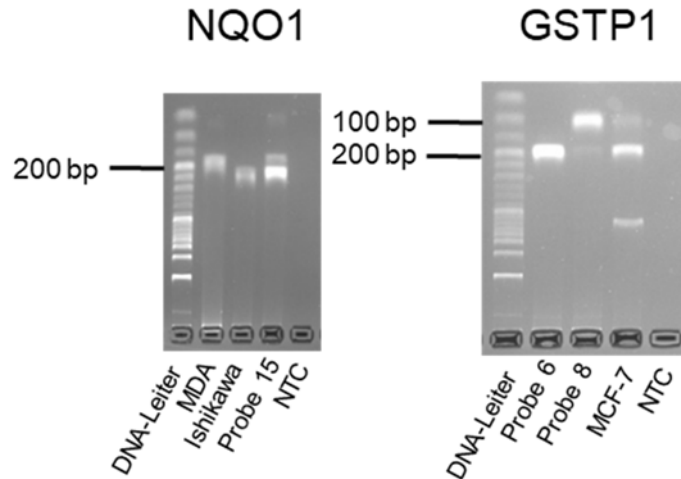


Abbildung 74: Gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) des *HinfI*-Restriktionsverdaus der Positivkontrollenverifizierung des *NQO1*-Polymorphismus und des *BsmAI*-Restriktionsverdaus der Positivkontrollenverifizierung des *GSTP1*-Polymorphismus mittels RFLP-PCR nach Kap. 3.2.10.4. Agarosegel: 3%. Laufzeit: 1 h bei 5 V/cm. DNA-Leiter: 50 bp. NTC: Blindwert (nf Wasser). Templat: DNA aus MCF-7, MDA- und Ishikawazellen (Kap. 3.2.10.1) und Humangewebe (Probe Nr. 6, 8 und 15).

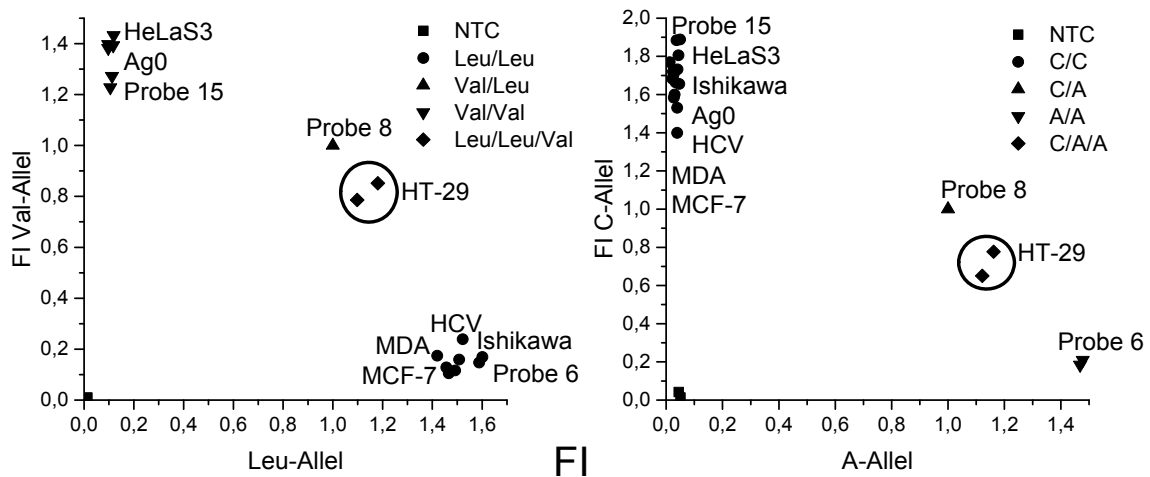


Abbildung 75: *CYP1B1*-(rs1056836, links) und *HSD17B1*-Genotypisierung (rs676387, rechts) der potentiellen Positivkontrollen mittels allelischer Diskriminierung (Kap. 3.2.10.3). Aufgetragen ist die auf die heterozygote Positivkontrolle (DNA aus Probe Nr. 8 jeweils) normierte Fluoreszenzintensität (FI) der beiden Allele gegeneinander. Umkreist sind Proben, die nicht eindeutig einem Genotyp zugeordnet werden konnten. NTC: Blindwert (nf Wasser).

Tabelle 35: Ergebnisse der Genotypisierung aller Humanproben nach Kap. 3.2.10.3 und Kap. 3.2.10.2.

Probennr.	COMT	GSTT1	NQO1	CYP1B1	GSTP1	HSD17B1	GSTM1
0	Val/Met	+/+	Pro/Pro	Leu/Val	Val/Val	C/C	-/-
1	Met/Met	+/-	Pro/Pro	Val/Val	Ile/Val	C/C	-/-
2	Val/Val	+/+	Pro/Pro	Leu/Val	Ile/Ile	C/A	+/-
3	Val/Met	+/+	Pro/Pro	Leu/Leu	Ile/Ile	C/C	+/-
4	Met/Met	+/-	Pro/Pro	Leu/Val	Ile/Val	C/A	-/-
5	Met/Met	+/-	Pro/Pro	Leu/Val	Ile/Ile	C/A	+/-
6	Met/Met	+/+	Pro/Pro	Leu/Leu	Ile/Ile	A/A	-/-
7	Val/Val	+/-	Pro/Pro	Leu/Leu	Ile/Ile	C/C	-/-
8	Val/Val	+/+	Pro/Pro	Leu/Val	Val/Val	C/A	+/-
10	Val/Val	+/-	Pro/Pro	Leu/Leu	Ile/Val	C/C	+/-
11	Met/Met	+/-	Pro/Pro	Val/Val	Ile/Ile	C/A	-/-
12	Val/Val	+/-	Pro/Ser	Leu/Leu	Val/Val	C/A	+/-
13	Met/Met	+/-	Pro/Ser	Leu/Leu	Ile/Ile	C/C	+/-
14	Val/Met	+/-	Pro/Ser	Leu/Val	Ile/Val	C/A	-/-
15	Met/Met	+/-	Pro/Ser	Val/Val	Ile/Ile	C/C	-/-
16	Met/Met	+/+	Pro/Pro	Leu/Val	Ile/Ile	C/A	-/-
17	Val/Met	-/-	Pro/Ser	Leu/Leu	Val/Val	C/A	+/-
18	Met/Met	+/-	Pro/Pro	Leu/Val	Ile/Val	C/C	-/-
19	Val/Val	+/-	Pro/Pro	Leu/Val	Val/Val	C/C	+/-
20	Val/Val	-/-	Pro/Pro	Leu/Leu	Ile/Val	C/A	+/-
21	Met/Met	+/-	Pro/Ser	Leu/Leu	Ile/Ile	C/A	-/-
22	Val/Met	+/-	Pro/Pro	Leu/Val	Ile/Val	A/A	+/-
24	Met/Met	+/+	Pro/Ser	Leu/Val	Ile/Val	C/A	+/-
25	Met/Met	+/-	Pro/Pro	Leu/Leu	Ile/Ile	C/C	+/-
26	Met/Met	+/-	Pro/Pro	Val/Val	Ile/Ile	C/A	+/-
27	Val/Met	+/+	Pro/Ser	Leu/Val	Ile/Val	C/A	+/-
28	Met/Met	+/+	Pro/Pro	Val/Val	Ile/Ile	C/C	-/-
29	Val/Met	+/+	Pro/Pro	Leu/Val	Ile/Ile	C/A	-/-
30	Val/Met	+/-	Pro/Pro	Leu/Val	Ile/Val	C/A	-/-
31	Val/Met	+/-	Pro/Pro	Leu/Leu	Ile/Ile	C/A	-/-
32	Val/Met	+/-	Pro/Pro	Leu/Leu	Ile/Val	C/C	-/-
33	Val/Met	+/-	Pro/Ser	Leu/Val	Ile/Ile	C/A	+/-
34	Val/Met	-/-	Pro/Pro	Leu/Val	Ile/Ile	C/A	-/-
35	Met/Met	+/+	Pro/Pro	Leu/Val	Ile/Val	C/C	-/-
36	Val/Met	+/-	Pro/Ser	Leu/Val	Ile/Ile	A/A	-/-
37	Val/Val	+/-	Pro/Pro	Leu/Val	Ile/Ile	A/A	+/-
38	Met/Met	-/-	Pro/Ser	Leu/Val	Ile/Val	C/A	-/-
39	Val/Met	+/-	Pro/Pro	Leu/Val	Ile/Val	C/A	+/-
40	Val/Met	+/-	Pro/Ser	Leu/Leu	Val/Val	C/A	-/-
41	Val/Met	+/+	Pro/Ser	Leu/Leu	Ile/Ile	A/A	-/-
42	Val/Val	+/+	Pro/Pro	Leu/Val	Ile/Ile	C/C	+/-
43	Val/Met	+/+	Pro/Pro	Leu/Leu	Ile/Val	C/A	-/-
44	Val/Val	+/+	Pro/Ser	Leu/Val	Ile/Ile	C/C	+/-
45	Met/Met	+/+	Pro/Pro	Val/Val	Ile/Val	C/C	-/-

Probennr.	COMT	GSTT1	NQO1	CYP1B1	GSTP1	HSD17B1	GSTM1
46	Val/Val	+/+	Pro/Pro	Leu/Val	Ile/Ile	C/A	-/-
47	Val/Met	+/+	Pro/Pro	Leu/Val	Ile/Val	C/A	-/-
48	Val/Met	+/-	Pro/Pro	Leu/Val	Val/Val	C/A	+/-
49	Val/Val	+/-	Pro/Ser	Leu/Val	Ile/Val	C/C	-/-
50	Val/Val	+/-	Pro/Ser	Val/Val	Ile/Ile	C/C	+/-
51	Val/Met	+/-	Pro/Pro	Val/Val	Ile/Ile	A/A	-/-

Mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (beschrieben in Kap. 3.2.10.5) wurden die Allel-Frequenzen berechnet (Beispielhaft für COMT gezeigt):

$$\text{Frequenz von Val} = p^2 + 0,5 * 2pq = 0,26 + 0,5 * 0,4 = 0,46$$

$$\text{Frequenz von Met} = q = 1 - p = 1 - 0,46 = 0,54$$

Mit den Allel-Frequenzen wurde die erwartete Genotyp-Häufigkeit berechnet:

$$\text{Val/Val} = p^2 = 0,46^2 = 0,21 \text{ oder } 11 \text{ Individuen}$$

$$\text{Val/Met} = 2pq = 2 * 0,46 * 0,54 = 0,50 \text{ oder } 25 \text{ Individuen}$$

$$\text{Met/Met} = q^2 = 0,54^2 = 0,29 \text{ oder } 15 \text{ Individuen}$$

Tabelle 36: Ergebnisse der Berechnung der erwarteten Allel-Frequenzen mittels Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Kap. 3.2.10.5) und beobachtete Allel-Frequenzen der *COMT* Val158Met-, *NQO1* Pro187Ser-, *CYP1B1* Leu462Val-, *GSTP1* Ile105Val-, *HSD17B1* C150A-, *GSTT1*- und *GSTM1*-Genotypen

	Genotyp	erwartet	beobachtet
<i>COMT</i> Val158Met	Val/Val	11	13
	Val/Met	25	20
	Met/Met	15	17
<i>NQO1</i> Pro187Ser	Pro/Pro	35	34
	Pro/Ser	13	16
	Ser/Ser	1	0
<i>CYP1B1</i> Leu462Val	Leu/Leu	16	15
	Leu/Val	25	27
	Val/Val	9	8
<i>GSTP1</i> Ile105Val	Ile/Ile	23	25
	Ile/Val	22	18
	Val/Val	5	7
<i>HSD17B1</i> C150A	C/C	19	18
	C/A	24	26
	A/A	7	6
<i>GSTT1</i>	+/+	20	18
	+/-	23	28
	-/-	7	4
<i>GSTM1</i>	+/+	2	0
	+/-	17	22
	-/-	30	28

Mit den beobachteten und erwarteten Individuen wird nun χ^2 berechnet (beispielhaft für *COMT* gezeigt):

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{beobachtet} - \text{erwartet})^2}{\text{erwartet}} = \frac{(13 - 11)^2}{11} + \frac{(20 - 25)^2}{25} + \frac{(17 - 15)^2}{15} = 1,63$$

Tabelle 37: Detaillierte Auflistung von bereits publizierten Genotypisierungen deutscher Probanden der *COMT*- (rs680 Val158Met), *NQO1*- (rs1800566 Pro187Ser), *CYP1B1*- (rs1056836 Leu432Val), *GSTP1*- (rs1695 Ile105Val) und *HSD17B1*-SNPs (rs676387 C>A) und *GSTM1*- und *GSTT1*-CNPs. Eine Ausnahme bildet die *HSD17B1*, da keine Daten deutscher Probanden publiziert waren: Gaudet et al., 2008 PCBS (Polish Breast Cancer Study) repräsentiert eine polnische, Gaudet et al., 2008 SEARCH (Studies of Epidemiology and Risk Factors in Cancer Heredity) eine englische und Feigelson et al., 2006 eine überwiegend aus hellhäutigen Europäern bestehende Englische und US-Amerikanische Population. Die Zahl gibt jeweils die Anzahl an Probanden mit dem entsprechenden Allel und die Zahl in Klammer den prozentualen Anteil an.

<i>COMT</i>	Val/Val (G/G)	Val/Met (G/A)	Met/Met (A/A)	
	171 (25,3%)	343 (50,7%)	162 (24,0%)	Rudolph et al. (2012)
	12 (24%)	26 (52,0%)	12 (24,0%)	Schmahl et al. (2012)
	45 (22,0%)	99 (49,0%)	59 (29,0%)	Reuter et al. (2006)
	79 (28,0%)	155 (54,9%)	79 (28,0%)	Majic et al. (2011)
	547 (23,0%)	1127 (47,4%)	705 (29,6%)	Jawinski et al. (2016)
<i>NQO1</i>	Pro/Pro (C/C)	Pro/Ser (C/T)	Ser/Ser (T/T)	
	333 (67,7%)	133 (27,0%)	26 (5,3%)	Steinbrecher et al. (2010)
	185 (73,4%)	63 (25,0%)	4 (1,6%)	Zhang et al. (2003)
<i>CYP1B1</i>	Leu/Leu (C/C)	Val/Leu (G/C)	Val/Val (G/G)	
	59 (52,7%)	39 (34,8%)	14 (12,5%)	Sasaki et al. (2003)
	424 (33,6%)	604 (47,8%)	234 (18,5%)	Timofeeva et al. (2009)
	314 (31,0%)	496 (49,0%)	203 (20,0%)	Justenhoven et al. (2008)
	94 (34,8%)	124 (45,9%)	52 (19,3%)	Jaremko et al. (2005)
	186 (29,9%)	306 (49,2%)	130 (20,9%)	Justenhoven et al. (2008)
<i>GSTP1</i>	Ile/Ile (A/A)	Ile/Val (A/G)	Val/Val (G/G)	
	540 (43,0%)	581 (46,2%)	136 (10,8%)	Timofeeva et al. (2010)
	69 (47,9%)	60 (41,7%)	15 (10,4%)	Zirbs et al. (2013)
	216 (43,9%)	228 (46,3%)	48 (9,8%)	Steinbrecher et al. (2010)
	196 (45,9%)	182 (42,6%)	49 (11,5%)	Eichholzer et al. (2012)
<i>HSD17B1</i>	C/C	C/A	A/A	
	1442 (60,8%)	805 (34,0%)	123 (5,2%)	Gaudet et al. (2008) PCBS
	2407 (52,9%)	1787 (39,3%)	352 (7,7%)	Gaudet et al. (2008) SEARCH
	3740 (51,3%)	2931 (40,2%)	618 (8,5%)	Feigelson et al. (2006)
<i>GSTM1</i>	+/+	+/-	-/-	
	88 (7,0%)	519 (41,5%)	644 (51,5%)	Timofeeva et al. (2010)
	47 (9,6%)	174 (35,4%)	270 (55,0%)	Steinbrecher et al. (2010)
	157 (8,9%)	687 (38,9%)	923 (52,2%)	Rudolph et al. (2012)
<i>GSTT1</i>	+/+	+/-	-/-	
	163 (33,1%)	252 (51,2%)	77 (15,7%)	Steinbrecher et al. (2010)
	576 (32,6%)	883 (50,0%)	308 (17,4%)	Rudolph et al. (2012)
	418 (33,5%)	617 (49,4%)	214 (17,1%)	Timofeeva et al. (2010)

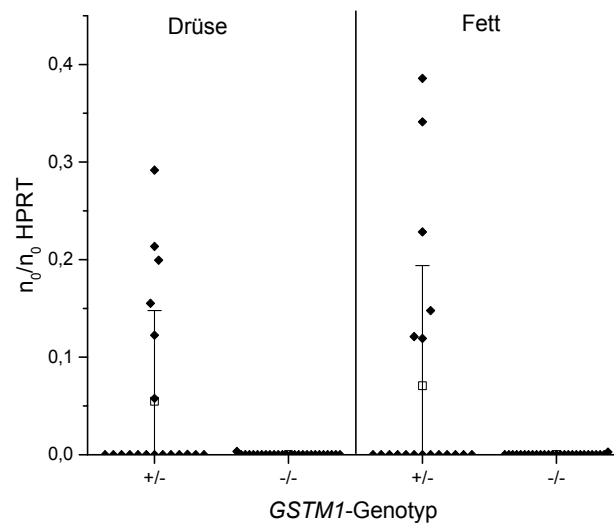


Abbildung 76: Boxplots der *GSTM1*-mRNA-Spiegel (Kap. 3.2.14) eingeteilt nach Genotyp (Kap. 3.2.10.2) der entsprechenden Probandinnen. □: Mittelwert, horizontale Linie: Median, vertikale Linie: Standardabweichung.

Tabelle 38: Ergebnisse der multiplen linearen Regressionsmodelle zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf Estrogen-Spiegel unter Berücksichtigung von Polymorphismen. Der menopausale Status (MP) wurde altersabhängig in ≤ 45 Jahre prä, ≥ 53 Jahre post und die Spannweite dazwischen in peri eingeteilt (Kap. 4.1) und prä als Bezugsgruppe verwendet. Die oberste Zeile zeigt jeweils die abhängige Variable. Beim *lobule type* wurde Lob2/3 als Bezugsgruppe verwendet. AB: Auffällige Beobachtungen, q: \geq LOD/ $<$ LOD-Ersetzungsvariable mit $<$ LOD als Bezugsgruppe.

E2 Drüsengewebe		E2 Fettgewebe		E1 Drüsengewebe		E1 Fettgewebe		2Meo-E1 Fettgewebe	
ExVARs (%<LOQ)	p-Wert	ExVARs (%<LOQ)	p-Wert	ExVARs (%<LOQ)	p-Wert	ExVARs (%<LOQ)	p-Wert	ExVARs (%<LOQ)	p-Wert
AB=0; n=43; O/exVARs=14,3; R ² =0,65		AB=0; n=44; O/exVARs=6,3; R ² =0,81		AB=0; n=43; O/exVARs=3,0; R ² =0,82		AB=1; n=43; O/exVARs=2,4; R ² =0,83		AB=0; n=20; O/exVARs=6,7; R ² =0,42	
E1	+ <0,0001	E1	+ <0,0001	E2 (7%)	+ <0,0001	E2	+ <0,0001	E1	+ 0,0307
Alter		Alter		E2q		E1S (21%)	+ 0,0105	Alter	
PeriMP		PeriMP		E1S	+ 0,0173	E1Sq	+ 0,0498	Lob1np	
PostMP		PostMP		Alter		Alter	- 0,0129	Lob1p	
Lob1np		Lob1np	- 0,0487	PeriMP	- 0,0873	PeriMP		%Öl	
Lob1p		Lob1p	- 0,0008	PostMP	- 0,0019	PostMP		PeriMP	
%Öl		%Öl		Lob1np	+ 0,1642	Lob1np		PostMP	
BMI	+ 0,0906	BMI	+ 0,1456	Lob1p	+ 0,8356	Lob1p		Rauchen	
Rauchen		Rauchen		%Öl	+ 0,0001	%Öl	+ 0,2241	EE	
EE		EE		BMI	+ 0,0223	BMI	+ 0,0088	ERD	
ERD		ERD		Rauchen	+ 0,1055	Rauchen	+ 0,0593	SULT1A1	- 0,1276
CYP1A1		CYP1A1 (5%)	- 0,1970	EE	- 0,0462	EE		SULT1E1 (30%)	
CYP1B1		CYP1A1q		ERD	+ 0,2950	ERD		SULT1E1q	
CYP19A1		CYP1B1		CYP1A1		CYP1A1 (5%)		UGT1A9 (10%)	
HSD17B1		CYP19A1	- 0,0534	CYP1B1		CYP1A1q	+ 0,0241	UGT1A9q	- 0,0521
HSD17B2		HSD17B1		CYP19A1		CYP1B1	- 0,0546	COMT Met/Met	
STS		HSD17B2		HSD17B1		CYP19A1	+ 0,0003	COMT Val/Met	
SULT1A1		STS		HSD17B2		HSD17B1	+ 0,1364	NQO1 Pro/Ser	
SULT1A2		SULT1A1		STS		HSD17B2	+ 0,0414	CYP Leu/Leu	
SULT1A3/4		SULT1A2		SULT1A1		STS		CYP Leu/Val	
SULT1E1		SULT1A3/4		SULT1A2	- 0,2270	SULT1A1			
UGT1A10 (14%)	- 0,1736	SULT1E1 (32%)	- 0,0681	SULT1A3/4		SULT1A2	- 0,0679		
UGT1A10q		SULT1E1q		SULT1E1	+ 0,2232	SULT1A3/4			
HSD A/A		UGT1A1 (14%)		UGT1A9 (16%)		SULT1E1 (33%)			
HSD C/A		UGT1A1q		UGT1A9q	- 0,0184	SULT1E1q			
CYP Leu/Leu		UGT1A10 (20%)		UGT1A10 (14%)		UGT1A1 (12%)			
CYP Leu/Val		UGT1A10q		UGT1A10q		UGT1A1q			
		HSD A/A		HSD A/A		UGT1A9 (21%)			
		HSD C/A		HSD C/A		UGT1A9q	- 0,1251		
		CYP Leu/Leu		CYP Leu/Leu		UGT1A10 (21%)	+ 0,1557		
		CYP Leu/Val		CYP Leu/Val		UGT1A10q	+ 0,1347		
						UGT1A3/4			
						HSD A/A			
						HSD C/A			
						CYP Leu/Leu	- 0,1173		
						CYP Leu/Val	+ 0,7884		

Tabelle 39: Ergebnisse der multiplen linearen Regressionsmodelle zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf Estrogen-Spiegel unter Berücksichtigung von Polymorphismen. Der menopausale Status (MP) wurde altersabhängig in ≤ 45 Jahre prä, ≥ 53 Jahre post und die Spannweite dazwischen in peri eingeteilt (Kap. 4.1) und prä als Bezugsgruppe verwendet. Die oberste Zeile zeigt jeweils die abhängige Variable. Beim *lobule type* wurde Lob2/3 als Bezugsgruppe verwendet. AB: Auffällige Beobachtungen, q: $\geq \text{LOD}/< \text{LOD}$ -Ersetzungsvariable mit $< \text{LOD}$ als Bezugsgruppe.

E2/E1 Drüsengewebe		E2/E1 Fettgewebe		E1S/E1 Drüsengewebe		E1S/E1 Fettgewebe	
ExVARs (%<LOQ)	p-Wert	ExVARs (%<LOQ)	p-Wert	ExVARs (%<LOQ)	p-Wert	ExVARs (%<LOQ)	p-Wert
CO=0; n=43; O/exVARs=5,4; R ² =0,41		AB=0; n=44; O/exVARs=6,3; R ² =0,47		AB=1; n=42; O/exVARs=6,0; R ² =0,60		AB=0; n=44; O/exVARs=3,4; R ² =0,71	
Alter		Alter		Alter		Alter	
PeriMP		PeriMP		PeriMP		PeriMP	
PostMP		PostMP		PostMP		PostMP	
Lob1np	- 0,0605	Lob1np	- 0,0012	Lob1np		Lob1np	
Lob1p	+ 0,6762	Lob1p	- <0,0001	Lob1p		Lob1p	
%Öl		%Öl		%Öl	- 0,0002	%Öl	- 0,0009
BMI		BMI		BMI		BMI	- 0,2021
Rauchen		Rauchen	- 0,0351	Rauchen		Rauchen	
EE		EE		EE		EE	- 0,0302
ERD		ERD		ERD		ERD	+ 0,0002
CYP1A1		CYP1A1 (5%)		CYP1A1	- 0,1268	CYP1A1 (5%)	
CYP1B1	+ 0,1752	CYP1A1q	- 0,1742	CYP1B1		CYP1A1q	- 0,0014
CYP19A1	- 0,0073	CYP1B1		CYP19A1		CYP1B1	+ 0,0767
HSD17B1		CYP19A1	- 0,0045	HSD17B1		CYP19A1	- <0,0001
HSD17B2		HSD17B1		HSD17B2		HSD17B1	
STS		HSD17B2		STS		HSD17B2	
SULT1A1	+ 0,0222	STS		SULT1A1		STS	+ 0,5494
SULT1A2		SULT1A1		SULT1A2		SULT1A1	- 0,1504
SULT1A3/4		SULT1A2		SULT1A3/4	+ 0,1010	SULT1A2	
SULT1E1		SULT1A3/4		SULT1E1	- 0,0447	SULT1A3/4	
UGT1A9 (16%)	- 0,0006	SULT1E1 (32%)		UGT1A9 (17%)	+ 0,1464	SULT1E1 (32%)	
UGT1A9q		SULT1E1q	- 0,0021	UGT1A9q		SULT1E1q	
UGT1A10 (14%)		UGT1A1 (14%)		UGT1A10 (14%)		UGT1A1 (14%)	
UGT1A10q		UGT1A1q		UGT1A10q		UGT1A1q	
UGT1A3/4		UGT1A9 (20%)	+ 0,0705	HSD A/A		UGT1A9 (20%)	
HSD A/A	- 0,0294	UGT1A9q		HSD C/A		UGT1A9q	+ 0,0487
HSD C/A	- 0,9508	UGT1A10 (20%)		CYP Leu/Leu	- 0,0039	UGT1A10 (20%)	
CYP Leu/Leu		UGT1A10q		CYP Leu/Val	- 0,2074	UGT1A10q	- 0,0148
CYP Leu/Val		UGT1A3/4				UGT1A3/4	
		HSD A/A				HSD A/A	
		HSD C/A				HSD C/A	
		CYP Leu/Leu				CYP Leu/Leu	+ 0,2424
		CYP Leu/Val				CYP Leu/Val	- 0,2451

Tabelle 40: Validierung der metabolischen Netzwerkmodellierung ohne und mit Berücksichtigung von polymorphismus (PM)-abhängiger enzymatischer Umsetzung. Dargestellt sind jeweils die adjustierten p-Werte.

	ohne PM	mit PM	Test
E1-G Flüsse mit E1-G Gewebespiegeln < und > LOD	0,0046	0,0017	Mann Whitney U
2-MeO-E1 Flüsse mit Gewebespiegeln < und > LOD	0,0170	0,0900	Mann Whitney U
2-MeO-E1 mit 4-MeO-E1 Flüssen	0,0005	0,0074	gepaarter t-Test
2-MeO-E1 mit 2-MeO-E2 Flüssen	0,0386	0,0900	gepaarter t-Test
2-MeO-E1 mit 4-MeO-E2 Flüssen	0,0046	0,0177	gepaarter t-Test

Tabelle 41: Lineare Regressionsmodelle zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf DNA Adduktflüsse ohne Berücksichtigung von Polymorphismen. AB: Auffällige Beobachtung, PM: Polymorphismus abhängige Veränderung der enzymatischen Umsetzung. Der menopausale Status (MP) wurde altersabhängig in ≤ 45 Jahre prä, ≥ 53 Jahre post und die Spannweite dazwischen in peri eingeteilt (Kap. 4.1) und prä als Bezugsgruppe verwendet. Beim *lobule type* wurde Lob2/3 als Bezugsgruppe verwendet.

Abhängige Variable	Summe Adduktflüsse		E2-Adduktflüsse		E1-Adduktflüsse		Summe Adduktflüsse mit PM		E2-Adduktflüsse mit PM		E1-Adduktflüsse mit PM			
	ohne HK		ohne HK		ohne HK		ohne HK		ohne HK		ohne HK			
	AB=0; n=42; O/exVars=8,4; R ² =0,33	AB=0; n=42; O/exVars=13,0; R ² =0,29	AB=0; n=42; O/exVars=6,0; R ² =0,33	AB=0; n=43; O/exVars=10,5; R ² =0,18	AB=0; n=43; O/exVars=43,0; R ² =0,09	AB=0; n=43; O/exVars=10,8; R ² =0,22	AB=1; n=42; O/exVars=14,0; R ² =0,19	AB=0; n=43; O/exVars=43,0; R ² =0,08	AB=0; n=43; O/exVars=43,0; R ² =0,07					
ExVars	p-Wert	p-Wert	p-Wert	p-Wert	p-Wert	p-Wert	p-Wert	p-Wert	p-Wert					
Isoflavon HK 1 ¹				-	0,0293			-	0,0186			-	0,0364	
Isoflavon HK 2														
Alter														
BMI	+	0,0086	+	0,0070	+	0,0547	+	0,0921	+	0,0726				
Lob1np	-	0,2119	-	0,0475	-	0,3963	-	0,2866	-	0,2237	-	0,1354		
Lob1p	-	0,0338	-	0,0011	-	0,0652	-	0,0370	-	0,0319	-	0,0266		
Intervention ¹							+	0,0282		+	0,0165		+	0,0496
Raucherin														
PeriMP	-	0,8093			-	0,3810								
PostMP	-	0,0783			-	0,0411								
EE					-	0,2852								
ERD				+	0,1277									

¹Kollinearität zwischen Isoflavon HK1 und Intervention. Intervention: ja HK Werte sind signifikant niedriger als Intervention: nein HK Werte (Mann-Whitney-U-Test, p=0,0003).

Oxidativer Stress

Tabelle 42: Beschreibung der zwei Zellzyklus-Marker-Transkriptspiegel Hauptkomponenten (HK) für die linearen Regressionsmodelle zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf oxidativen Stress. Je höher der Betrag, desto höher der Einfluss (**Fett**: Werte mit dem höchsten Einfluss bei einer Grenze von $\geq 0,44$, maximal möglicher Betrag: 1,00). Das Plus oder Minus gibt die Richtung des Einflusses auf die jeweilige Hauptkomponente an.

Transkript	Drüsengewebe		Fettgewebe	
	HK1	HK2	HK1	HK2
<i>CDKN1A</i>	+0,38	+0,79	+0,36	-0,44
<i>CDKN1B</i>	+0,63	-0,08	+0,71	+0,04
<i>CCND1</i>	+0,52	-0,59	+0,14	+0,75
<i>MKI67</i>	-0,44	-0,13	-0,29	-0,48

Tabelle 43: Links: Standard-Abweichung (Std.-Abw.) und Varianzenanteil der einzelnen *SULT/UGT*-Transkriptspiegel Hauptkomponenten. Rechts: *Scree-Plot* der Hauptkomponentenanalyse.

Hauptkomponente	Std.-Abw.	Anteil Varianz	Kumulativer Anteil
Drüsengewebe			
1	1,59	0,41	0,42
2	1,31	0,28	0,70
3	0,97	0,16	0,86
4	0,68	0,08	0,94
5	0,52	0,05	0,99
6	0,30	0,01	1,00
Fettgewebe			
1	1,50	0,28	0,28
2	1,26	0,20	0,48
3	1,12	0,16	0,64
4	0,97	0,12	0,75
5	0,93	0,11	0,86
6	0,79	0,08	0,94
7	0,55	0,04	0,98
8	0,44	0,02	1,00

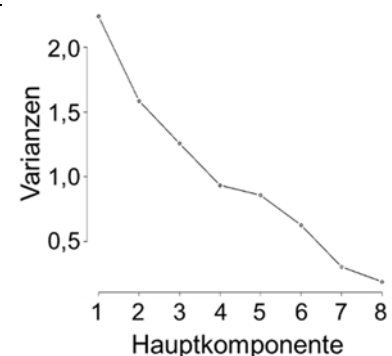
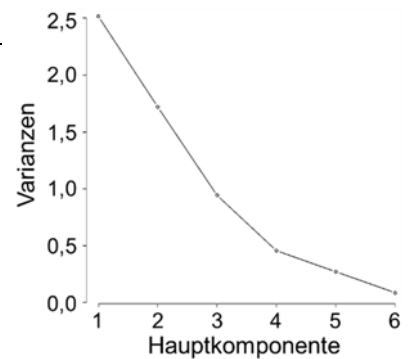
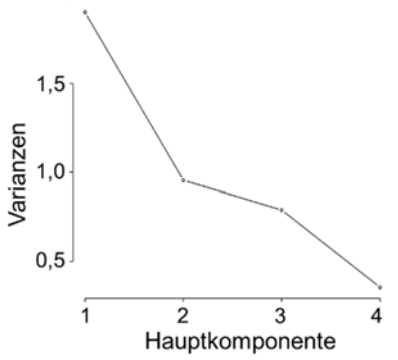


Tabelle 44: Links: Standard-Abweichung (Std.-Abw.) und Varianzenanteil der einzelnen Zellzyklus-Marker-Transkriptspiegel Hauptkomponenten. Rechts: *Scree-Plot* der Hauptkomponentenanalyse.

Hauptkomponente	Std.-Abw.	Anteil Varianz	Kumulativer Anteil
Drüsengewebe			
1	1,38	0,48	0,48
2	0,98	0,24	0,71
3	0,89	0,20	0,91
4	0,60	0,09	1,00



Fettgewebe			
1	1,25	0,39	0,39
2	1,06	0,28	0,68
3	0,95	0,23	0,90
4	0,63	0,10	1,00

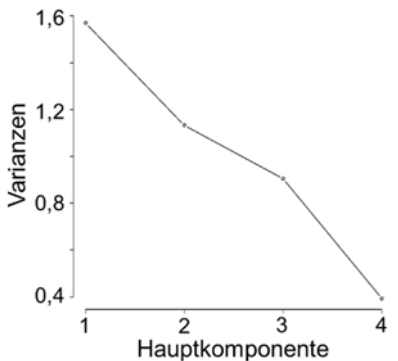
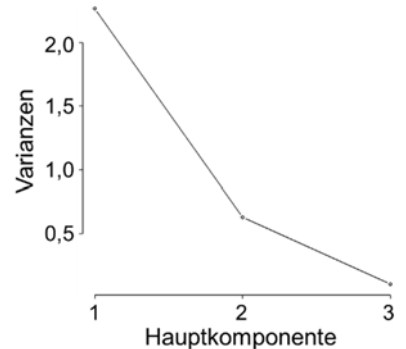
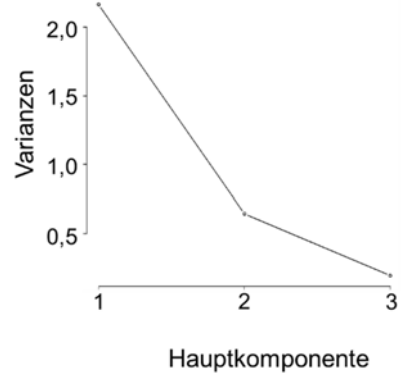


Tabelle 45: Links: Standard-Abweichung (Std.-Abw.) und Varianzenanteil der einzelnen Estrogenspiegel (E2, E1 und E1-S)-Hauptkomponenten. Rechts: *Scree-Plot* der Hauptkomponentenanalyse.

Hauptkomponente	Std.-Abw.	Anteil Varianz	Kumulativer Anteil
Drüsengewebe			
1	1,47	0,72	0,72
2	0,80	0,21	0,94
3	0,44	0,06	1,00

Hauptkomponente	Std.-Abw.	Anteil Varianz	Kumulativer Anteil
Fettgewebe			
1	1,51	0,76	0,76
2	0,79	0,21	0,97
3	0,32	0,03	1,00



Anhang

Tabelle 46: Ergebnisse der multiplen linearen Regressionsmodelle zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf Marker-Transkriptspiegel für oxidativen Stress. Enzymnamen stehen jeweils für die entsprechenden Transkriptspiegel bzw. den entsprechenden Polymorphismus In Klammern ist der Anteil an Werten unterhalb des LODs dargestellt. AB: Auffällige Beobachtungen, q: \geq LOD/ $<$ LOD-Ersetzungsvariable mit $<$ LOD als Bezugsgruppe. Als Polymorphismus-Bezugsgruppe wurde jeweils der hochaktive Genotyp nach gewählt. Beim *lobule type* wurde Lob2/3 als Bezugsgruppe verwendet und beim menopausalen Status (MP) peri.

Abhängige Variable	p-Wert		Abhängige Variable	p-Wert		Abhängige Variable	p-Wert		Abhängige Variable	p-Wert	
	GCLC Drüsengewebe			GCLC Fettgewebe			NFE2L2 Drüsengewebe				
ExVARs (%<LOQ)	AB=1; n=39; O/exVars=3, 0; R ² =0,75	ExVARs (%<LOQ)	AB=0; n=40; O/exVars=5, 0; R ² =0,57	ExVARs (%<LOQ)	AB=0; n=39; O/exVars=2,6 ; R ² =0,65	ExVARs (%<LOQ)	AB=6; n=34; O/exVars=4,9 ; R ² =0,80	ExVARs (%<LOQ)	AB=5; n=35; O/exVars=5,0 ; R ² =0,77		
Alter		Alter	- 0,0880	Alter		Alter		Alter			
BMI	- 0,0009	BMI		BMI		BMI		BMI			
PostMP		PostMP		PostMP		PostMP		PostMP			
PeriMP		PeriMP		PeriMP		PeriMP		PeriMP			
Lob1np	+ 0,3591	Lob1np		Lob1np		Lob1np		Lob1np			
Lob1p	+ <0,0001	Lob1p		Lob1p		Lob1p		Lob1p			
EE		EE		EE	- 0,0122	EE		EE			
ERD		ERD		ERD	+ 0,7026	ERD		ERD			
Intervention		Intervention		Intervention	+ 0,0360	Intervention		Intervention	+ 0,0076		
Alkohol	- 0,1328	Alkohol		Alkohol		Alkohol		Alkohol			
Rauchen	+ 0,0715	Rauchen		Rauchen		Rauchen		Rauchen			
COMT	+ 0,0170			COMT		COMT	+ <0,0001	COMT	+ <0,0001		
CYP1A1		CYP1A1		CYP1A1 (5%)	+ 0,0053	CYP1A1		CYP1A1			
				CYP1A1q							
CYP1B1		CYP1B1	+ 0,0012	CYP1B1	- 0,1307	CYP1B1	+ 0,0002	CYP1B1	+ 0,0014		
GSTP1		GSTP1		GSTP1	+ 0,0060	GSTP1		GSTP1			
GSTT1	+ 0,0016			GSTT1 (5%)	+ 0,0977	GSTT1	+ 0,1204	GSTT1	+ 0,0605		
				GSTT1q							
NQO1		NQO1	+ 0,0045	NQO1		NQO1		NQO1			
COMT Met/Met	- 0,2635	COMT Met/Met	- 0,0018	COMT Met/Met		COMT Met/Met		COMT Met/Met			
COMT Val/Met	- 0,0098	COMT Val/Met	- 0,0056	COMT Val/Met		COMT Val/Met		COMT Val/Met			
CYP1B1 Leu/Leu		CYP1B1 Leu/Leu		CYP1B1 Leu/Leu	+ 0,0982	CYP1B1 Leu/Leu		CYP1B1 Leu/Leu			
CYP1B1 Leu/Val		CYP1B1 Leu/Val		CYP1B1 Leu/Val	+ 0,0547	CYP1B1 Leu/Val		CYP1B1 Leu/Val			
GSTP1 Val/Val		GSTP1 Val/Val		GSTP1 Val/Val	+ 0,0893	GSTP1 Val/Val		GSTP1 Val/Val			
GSTP1 Ile/Val		GSTP1 Ile/Val		GSTP1 Ile/Val	- 0,3310	GSTP1 Ile/Val	- 0,1294	GSTP1 Ile/Val			
NQO1 Pro/Ser		NQO1 Pro/Ser		NQO1 Pro/Ser	+ 0,0029	NQO1 Pro/Ser		NQO1 Pro/Ser			
Isoflavon HK 1		Isoflavon HK 1				Isoflavon HK 1		Isoflavon HK 1	+ 0,0449		
Isoflavon HK 2		Isoflavon HK 2	+ 0,1059			Isoflavon HK 2		Isoflavon HK 2			
Estrogen HK		Estrogen HK		Estrogen HK		Estrogen HK		Estrogen HK			
SULT/UGT HK 1	+ <0,0001	SULT/UGT HK 1		SULT/UGT HK 1		SULT/UGT HK 1		SULT/UGT HK 1	- 0,0338		
SULT/UGT HK 2	+ <0,0001	SULT/UGT HK 2		SULT/UGT HK 2		SULT/UGT HK 2	- 0,0015	SULT/UGT HK 2			
SULT/UGT HK 3	+ 0,0358	SULT/UGT HK 3		SULT/UGT HK 3		SULT/UGT HK 3		SULT/UGT HK 3	- 0,0028		
Zellzyklus HK 1		Zellzyklus HK 1	+ 0,0013	Zellzyklus HK 1		Zellzyklus HK 1	+ 0,0017	Zellzyklus HK 1			
Zellzyklus HK 2	+ 0,1174	Zellzyklus HK 2	+ 0,0044	Zellzyklus HK 2	+ 0,0004	Zellzyklus HK 2	+ 0,0409	Zellzyklus HK 2			
				Oxycholesterolsomme	- 0,2339						
NFE2L2		NFE2L2		NFE2L2	+ 0,0114						

Anhang

Tabelle 47: Ergebnisse der multiplen linearen Regressionsmodelle zur Identifizierung von Einflussfaktoren auf Marker-Transkriptspiegel für oxidativen Stress. Enzymnamen stehen jeweils für die entsprechenden Transkriptspiegel bzw. den entsprechenden Polymorphismus In Klammern ist der Anteil an Werten unterhalb des LODs dargestellt. AB: Auffällige Beobachtungen, q: \geq LOD/ $<$ LOD-Ersetzungsvariable mit $<$ LOD als Bezugsgruppe. Als Polymorphismus-Bezugsgruppe wurde jeweils der hochaktive Genotyp nach gewählt. Beim *lobule type* wurde Lob2/3 als Bezugsgruppe verwendet und beim menopausalen Status (MP) peri.

Abhängige Variable		p-Wert	Abhängige Variable		p-Wert	Abhängige Variable		p-Wert
NFE2L2 Fett			NQO1 Drüse			NQO1 Fett		
ExVARs (%<LOQ)	AB=0; n=39; O/exVars=3,3; R ² =0,56		ExVARs (%<LOQ)	AB=0; n=40; O/exVars=8,0; R ² =0,50	ExVARs (%<LOQ)	AB=0; n=40; O/exVars=13,3; R ² =0,36	ExVARs (%<LOQ)	AB=0; n=39; O/exVars=2,1; R ² =0,79
Alter			Alter		Alter		Alter	
BMI			BMI		BMI		BMI	+ 0,1506
PostMP	+ 0,8834		PostMP	+ 0,0061	PostMP	+ 0,0067	PostMP	
PeriMP	+ 0,0428		PeriMP	+ 0,0039	PeriMP	+ 0,0043	PeriMP	
Lob1np			Lob1np		Lob1np		Lob1np	
Lob1p			Lob1p		Lob1p		Lob1p	
EE	+ 0,7006		EE		EE		EE	
ERD	- 0,0113		ERD		ERD		ERD	
Intervention			Intervention		Intervention		Intervention	
Alkohol			Alkohol		Alkohol		Alkohol	+ 0,0156
Rauchen			Rauchen		Rauchen		Rauchen	- 0,0676
COMT	+ 0,0091		COMT		COMT		COMT	- 0,0588
CYP1A1 (5%)	+ 0,0988		CYP1A1		CYP1A1		CYP1A1 (5%)	- 0,0871
CYP1A1q	+ 0,0763						CYP1A1q	
CYP1B1			CYP1B1	- 0,0075			CYP1B1	+ 0,2298
GSTP1			GSTP1	+ 0,0014	GSTP1	+ 0,0067	GSTP1	+ <0,0001
GSTT1 (5%)			GSTT1	+ 0,0237			GSTT1 (5%)	
GSTT1q							GSTT1q	- 0,1936
NQO1	+ 0,0045							
COMT Met/Met			COMT Met/Met		COMT Met/Met		COMT Met/Met	+ 0,0522
COMT Val/Met			COMT Val/Met		COMT Val/Met		COMT Val/Met	+ 0,6813
CYP1B1 Leu/Leu			CYP1B1 Leu/Leu		CYP1B1 Leu/Leu		CYP1B1 Leu/Leu	
CYP1B1 Leu/Val			CYP1B1 Leu/Val		CYP1B1 Leu/Val		CYP1B1 Leu/Val	
GSTP1 Val/Val			GSTP1 Val/Val		GSTP1 Val/Val		GSTP1 Val/Val	+ 0,0045
GSTP1 Ile/Val			GSTP1 Ile/Val		GSTP1 Ile/Val		GSTP1 Ile/Val	+ 0,0474
NQO1 Pro/Ser								
			Isoflavon HK 1		Isoflavon HK 1			
			Isoflavon HK 2		Isoflavon HK 2			
Estrogen HK			Estrogen HK		Estrogen HK		Estrogen HK	
SULT/UGT HK 1	+ 0,2484		SULT/UGT HK 1		SULT/UGT HK 1		SULT/UGT HK 1	
SULT/UGT HK 2			SULT/UGT HK 2		SULT/UGT HK 2		SULT/UGT HK 2	+ 0,0001
SULT/UGT HK 3	+ 0,1465		SULT/UGT HK 3		SULT/UGT HK 3		SULT/UGT HK 3	+ 0,0744
Zellzyklus HK 1	+ 0,9332		Zellzyklus HK 1		Zellzyklus HK 1		Zellzyklus HK 1	- 0,0073
Zellzyklus HK 2			Zellzyklus HK 2		Zellzyklus HK 2		Zellzyklus HK 2	
Oxycholesterol-Summe	- 0,1479						Oxycholesterol-Summe	- 0,0635
			AHR		AHR		AHR	+ 0,0984
			ARNT		ARNT		ARNT	- 0,0679
			NFE2L2		NFE2L2		NFE2L2	+ 0,0156

Weitere Ergänzungsdaten finden sich auf der beigelegten Daten-CD