

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Elektrolyt- und Nährlösungen

LB (Luria-Bertani)-Medium

10 g Trypton

5 g Hefe-Extrakt

10 g NaCl

ad 950 ml Aqua destillata

nach Autoklavierung mit 50 µg/ml Ampicillin versetzen

(pH 7,0; Einstellung mit NaOH)

LB (Luria-Bertani)-Agar-Platten

LB-Medium

15 g/l Agar

nach Autoklavierung mit 50 µg/ml Ampicillin versetzen

IPTG-Lösung (100 mM)

238 mg IPTG

10 ml Aqua destillata

Natriumbisulfit-Lösung

4,753 g Natriumbisulfit

0,1376 g Hydroquinon

10 ml Aqua ad injectabilia

(pH 5,0; Einstellung mit NaOH)

2 x Sucrose-Lösung

218 g Sucrose

2,4 g TRIS

2,03 g MgCl₂

20 ml Triton X-100

ad 1000 ml Aqua destillata

(pH 7,6; Einstellung mit HCl)

1 x TE

10 ml TRIS (1 M)

2 ml Na₂EDTA (0,5 M)
ad 1000 ml Aqua destillata

10 x TBE

108 g TRIS Base
55 g Borsäure
40 ml 0,5 M EDTA

TuTNE

5 ml 1M TRIS Base
10 ml 5 M NaCl
2,1 g EDTA
ad 500 ml Aqua destillata
(pH 7,5; Einstellung mit NaOH)

10 x WARNER Lösung

81,1 g NaCl
3,7 g KCl
0,3 g MgCl₂
ad 1000 ml Aqua destillata

X-Gal Lösung (40 mg/ml)

400 mg X-Gal
10 ml Dimethylformamid

3.1.2. Gele

Agarosegel 1,7 % bzw. 1,3 %

1,7 g bzw. 1,3 g Agarose
100 ml 1xTBE
2 µl Ethidiumbromid

Polyacrylamidgel 30 %

7,5 ml Acrylamid/Bis-Lösung 30 % (29:1)
18 g Harnstoff
6 ml 10 x TBE
23 ml Aqua destillata
350 µl APS 10%
20 µl TEMED

APS 10 %

0,1 g APS

1 ml Aqua destillata

3.1.3. Chemikalien

Alconox, New York, USA

Alconox

Amresco, Ohio, USA

Formamid

Applied Biosystems, Forster City, USA

Ampli Taq DNA Polymerase

PCR Buffer II

MgCl₂ Solution

Baker J T, Phillipsburg, USA

Chloroform

Bio-Rad, Hercules, USA

Acrylamid/Bis-Lösung 30 % (29:1)

Boehringer GmbH, Mannheim

Na₂EDTA

Braun, Melsungen

Aqua destillata

Aqua ad injectabilia

MBI Fermentas, Vilnius, Litauen

PUC 19 DNA / Msp I (Hpa II) Marker 23 (1 kb Längenstandard)

Loading Dye Lösung

dNTP Mix; X-Gal

Merck, Darmstadt

Ethanol; Harnstoff

Natronlauge

Natriumchlorid

Natriumacetat-Trihydrat

Proteinase K

Perkin Elmer, Foster City, USA

Loading Buffer (Blue Dextran/EDTA)

Taq-DNA-Polymerase

ABI PRISM[®] Big Dye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v1.1

Princeton Separations, Adelphia, USA

Sephadex-Röhrchen

Promega, Madison, USA

BSA (Bovine Serum Albumin)

10 x Buffer

Buffer H

EcoR I

Roche, Mannheim

NONIDET-P-40

Serva, Heidelberg

Ethidiumbromid

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Agarose

Agarose Type III-A: Low Gelling Temperature

Ampicillin

APS

Borsäure

Bromphenolblau

Dimethylformamid

EDTA

Ethidiumbromid

Hämatoxylin-Eosin

Hydroquinon

IGEPAL

Kaliumchlorid

Mineralöl

Natriumacetat

Salzsäure

SDS

Sephadex DNA Grade, G-50 Fine

Sodium Metabisulfite

TEMED

Triton X-100

Trypton

USB Corp., Cleveland, USA

Phenol

3.1.4. Kits

Applied Biosystems, Forster City, USA

Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction

Invitrogen, Groningen, Niederlande

TOPO TA Cloning Kit

Qiagen, Hilden, Deutschland

QIAprep spin Miniprep Kit

QIAquick Gel Extraction Kit

Taq PCR Core Kit

3.1.5. Technische Geräte

Biometra GmbH, Göttingen

PCR-Gerät

Thermoblock T gradient

Bio-Rad, Hercules, USA

Elektrophoresekammern, horizontal, sub-cell GT

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Wasserstrahlpumpe

Cleaver Scientific, Rugby, GB

Spannungsgerät Microcomputer Electrophoresis, E802 300 V-2000 mA Power Supply

Eppendorf, Hamburg

Thermomixer comfort

Fronine, Riverstone, Australien

Cryostat, Microm HM 560 Cryo-star

Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

Wasserbad

Gibson Laboratories Inc., Lexington, USA

Pipetten, diverse

Heraeus instruments, Hanau

Brutschrank, function line

Sterile Werkbank, LaminAir HBB 2448

Zentrifugen (Megafuge, Biofuge fresco, Biofuge pico)

IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen

Vortex mixer

Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen

Transilluminator, UV-Systeme

Perkin Elmer, Weiterstadt

Sequenzierer, ABI Prism™ 377

Haifischkamm

Spacer

Sartorius, Göttingen

Schüttler, Certomat

Systemec GmbH, Wettenberg

Autoklav

3.1.6. Software (zur statistischen Auswertung)

SPSS Inc., München

SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) for Windows 10.0

3.2. Das untersuchte Patientenkollektiv

Die Methylierungsanalyse des *NF1*-Promotors basiert auf der Untersuchung der Nerven-scheidentumore von 9 *NF1*-Patienten (4 weiblich, 5 männlich), wobei die Auswahl der Patienten klinisch nach den NIH-Kriterien [61] erfolgte.

Von einem dieser Patienten wurden neben peripheren Leukozyten (21 a) drei MPNST (21 b, c, d) untersucht. Ein anderer *NF1*-Patient steuerte periphere Leukozyten (22 a), ein Neurofibrom (22 b), ein Neurofibrom mit gesteigerter Proliferation (22 c) und zwei MPNST (22 d, e) bei.

Von 7 weiteren NF1-Patienten wurde jeweils ein Tumorkörper bestehend aus einem kutanen und einem plexiformen Neurofibrom in die Analyse einbezogen. Die Kennzeichnung der Tumorkörper erfolgte mit den Nummern 23 bis 29, wobei der Zusatz (a) für kutane Neurofibrome und die Bezeichnung (b) für plexiforme Neurofibrome steht.

Da die Entnahme von gesunden peripheren Nerven für ausschließlich wissenschaftliche Zwecke ethisch nicht vertretbar ist, wurden zur Einschätzung des Methylierungsstatus des *NF1*-Promotors als Referenzgewebe periphere Leukozyten von 20 gesunden, nicht an NF1-erkrankten Kontrollprobanden (10 weiblich, 10 männlich) herangezogen. Die Kennzeichnung dieser Proben erfolgte mit den Nummern 1 bis 10 für die Leukozyten der weiblichen Kontrollprobanden und mit den Nummern 11 bis 20 für die Leukozyten der männlichen Kontrollprobanden.

3.3. Methoden

3.3.1. Isolierung genomischer DNA aus Blut und Tumoren

Für die DNA-Isolierung aus Blut bzw. aus Tumorgewebe wurde ein zweistufiges Verfahren angewandt. Im ersten Schritt wurden die Zellen lysiert und das Lysat über Nacht mit SDS und Proteinase K behandelt, um die Kernmembran aufzulösen und Proteine zu hydrolysieren. Im zweiten Schritt wurde die DNA durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion von den Proteinbestandteilen der Zelle getrennt und mittels Ethanolfällung gereinigt und konzentriert.

3.3.1.1. DNA-Extraktion aus Blut

Das EDTA-Blut wurde mit 1 x WARNER-Lösung und 2 x Sucrose-Lösung auf ein Volumen von 40 ml aufgefüllt. Die Sucrose-Lösung diente dabei der Schaffung eines Dichtegradienten zur Sedimentierung der Zellkerne. Außerdem wurden 100 µl NONIDET-P-40 (oder IGEPAL) zur Lyse der Zellen zugegeben. Nach einstündiger Zentrifugation bei 4°C und 4000 rpm wurde der Überstand verworfen und das zellkernhaltige Pellet in 2,5 ml Na-EDTA resuspendiert, mit einer Pasteur-Pipette zerkleinert und in ein phenolresistentes Röhrchen überführt. Das Gemisch wurde mit 3,5 ml eines TuTNE-SDS-Proteinase K-Gemisches (27 : 6 : 2) versetzt und die Lyse der Zellkerne sowie die Hydrolyse der Proteine mit einer Inkubation bei 55°C über Nacht abgeschlossen.

3.3.1.2. DNA-Extraktion aus Tumoren

Von den aufgeblockten, tiefgefrorenen Tumorproben wurden am Kryostaten ca. 20-50 Schnitte (Schnittdicke 15-20 μm) angefertigt. Der erste und der letzte Schnitt des jeweiligen Blockes wurde auf einen Objektträger aufgezogen und zur histopathologischen Begutachtung mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die so erhaltenen Tumorschnitte wurden mittels eines Skalpells wieder entfernt und in Falcon-Röhrchen überführt, wobei nur histologisch erkanntes Tumorgewebe weiterverarbeitet wurde, während Randbereiche, wie z. B. Hautanhangsgewebe, markiert und ausgespart wurden. Es erfolgte hiernach die DNA-Präparation nach dem o. g. Schema.

3.3.1.3. Phenol-Chloroform-Extraktion

Um die Proteine aus den Kernlysaten zu entfernen, wurde die Lösung 15 min lang mit dem gleichen Volumen äquilibrierten Phenols vorsichtig auf dem Rotator geschwenkt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei 4000 rpm, 5 min und 20°C. Die wässrige, DNA enthaltende Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und der Extraktionsschritt mit Phenol bzw. Phenol-Chloroform (1:1) zweimal wiederholt.

3.3.1.4. Ethanolfällung der DNA

Mit 60 μl 1M Kaliumchlorid und 2,5 Volumen 100%igem, eiskaltem Ethanol konnte die gereinigte DNA anschließend aus der wässrigen Phase gefällt werden. Die als weißes, fädiges Präzipitat in der Lösung sichtbare DNA wurde auf einem abgeflamten Glasstab aufgewickelt und nach Trocknung (je nach Menge DNA) in 1,0-1,8 ml Aqua destillata aufgenommen.

3.3.2. Reinheits- und Konzentrationsbestimmung der DNA

Um Qualität und Quantität der DNA-Proben zu bestimmen, wurde am Spektralphotometer die optische Dichte (Extinktion) bei 260 nm und 280 nm gemessen. Die DNA hat ein Absorptionsmaximum von 260 nm, Proteine von 280 nm. Die DNA-Konzentration und der Reinheitsgrad wurden mit folgender Formel berechnet:

DNA-Konzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$):	$(\text{OD}_{260} \times 47,5 \times 100) \times 1000^{-1}$ (1 A ₂₆₀ -Einheit \sim 50 μg DNA/ml)
Reinheitsgrad:	$(\text{OD}_{260} \times 50) \times (\text{OD}_{280} \times 40)^{-1}$

Der Quotient der Absorption von 260 nm und 280 nm musste immer größer als 1,6 sein, andernfalls war mit einer Kontamination durch Proteine zu rechnen. Bei einem kleineren Wert wurde die Chloroformextraktion wiederholt.

3.3.3. DNA-Restriktion mit *EcoR* I und DNA-Fällung

Das Restriktionsenzym *EcoR* I spaltet hydrolytisch die Phosphodiesterbindung der Sequenz 5'...G[▼]AATTC...3' (reverse: 3'...CTTAA[▼]G...5') und ermöglicht somit eine Zerlegung der genomischen DNA in Fragmente unterschiedlicher Größe. Dies ist eine Voraussetzung für die Durchführung der Bisulfitreaktion. Die Spaltung der chromosomalen DNA erfolgte während einer 3-stündigen Inkubation bei 37°C in 30 μl Volumen. Ein Ansatz bestand aus folgender Zusammensetzung: 3 μg DNA; 1,5 μl bzw. 30 Units *EcoR* I; 3 μl 10 x Puffer; 0,3 μl BSA mit Aqua ad injectabilia auf ein Gesamtvolumen von 30 ml aufgefüllt. Nach der Restriktion wurden 5 μl Probenauftragspuffer zu 3 μl des Restriktionsansatzes gegeben. Die Fragmente wurden auf einem 1%igen Agarosegel parallel zu einem 1 kb Längenstandard elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Fällung der DNA aus dem Verdau wurde diese mit 59,4 μl 96%igem, eiskaltem Ethanol und 2,7 μl Natriumacetatlösung (3 M, pH 4) versetzt und über Nacht bei -20°C gefällt. Hiernach wurde die präzipitierte DNA 30 min bei 4°C und 12000 rpm abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol (20 ml) gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in einem Thermomixer bei 37°C für ca. 20 min getrocknet und in 16,7 μl Aqua ad injectabilia resuspendiert.

3.3.4. Bisulfitbehandlung der DNA

Zur Denaturierung wurden 3 μg der in 16,7 μl Aqua ad injectabilia gelösten DNA für 5 min bei 95°C erhitzt. Danach wurde die Probe sofort auf Eis abgekühlt, mit 8,3 ml 1N NaOH versetzt und auf 50°C für 15 min erwärmt. Nach der Zugabe von 225 μl 2%iger autoklavierter Agarose (low melting low gelling agarose) zur Probe wurde das Gemisch kontinuierlich weiter auf 50°C erwärmt. Aus diesem Mix wurden je 20 μl in 12 vorberei-

tete, tiefgekühlte, mit Mineralöl gefüllte Eppendorfgläser pipettiert, so dass sich Agarosekugeln bilden konnten. Durch die Fixierung der Einzelstränge wurde somit eine Renaturierung während der nachfolgenden Bisulfitbehandlung verhindert. Hierzu wurden 400 µl der 5 M Natriumbisulfitlösung in jedes Eppendorfglas gegeben. Dieser Reaktionsansatz wurde schließlich bei 50°C für 5 h lichtdicht inkubiert. Während dieser Reaktion wird durch die katalytische Wirkung von Bisulfit (HSO_3) jedes nicht methylierte Einzelstrang-Cytosin hydrolytisch zu Thymin deaminiert. Die methylierten Einzelstrang-Cytosine können nicht modifiziert werden und verbleiben als Cytosin-Reste (Abb. 3.1.). Nach 5 h wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml 1 x TE-Lösung pro Reaktionsansatz gestoppt. Die Agarosekugeln wurden in ein gemeinsames Gefäß überführt und dreimal in 1 x TE-Lösung für jeweils 10 min gewaschen. Zur Desulphonierung wurde zweimal 1 ml 0,2 M NaOH pro Agarosekugel zugegeben und 15 min geschwenkt. Danach erfolgte die Neutralisation durch Zugabe von 200 µl 1N HCl pro Kugel durch kurzes Schütteln. Nachfolgend wurde der Überstand abpipettiert. Nach zweimaligem Waschen durch Zugabe von 1 ml 1 x TE-Lösung pro Reaktionsansatz für jeweils 10 min wurden die Agarosekugeln in die Kontroll-PCR eingesetzt.

3.3.5. Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)

Zunächst wurde die Qualität der bisulfitmodifizierten DNA durch die Kontroll-PCR I und II gesichert. Hiernach schloss sich die Amplifikation der *NF1*-Promotorregion an.

3.3.5.1. Kontroll-PCR I

Zur Kontrolle, ob modifizierte DNA nach der Bisulfitbehandlung enthalten ist, wurde eine PCR mit den Primern TP53modex6f und TP53modex6r für ein kurzes Fragment (150 Basenpaare) außerhalb des *NF1*-Lokus durchgeführt (Tab. 3.1.). Diese Oligonukleotide binden nur an komplementäre DNA-Stränge, die entsprechend der Bisulfitbehandlung modifiziert wurden.

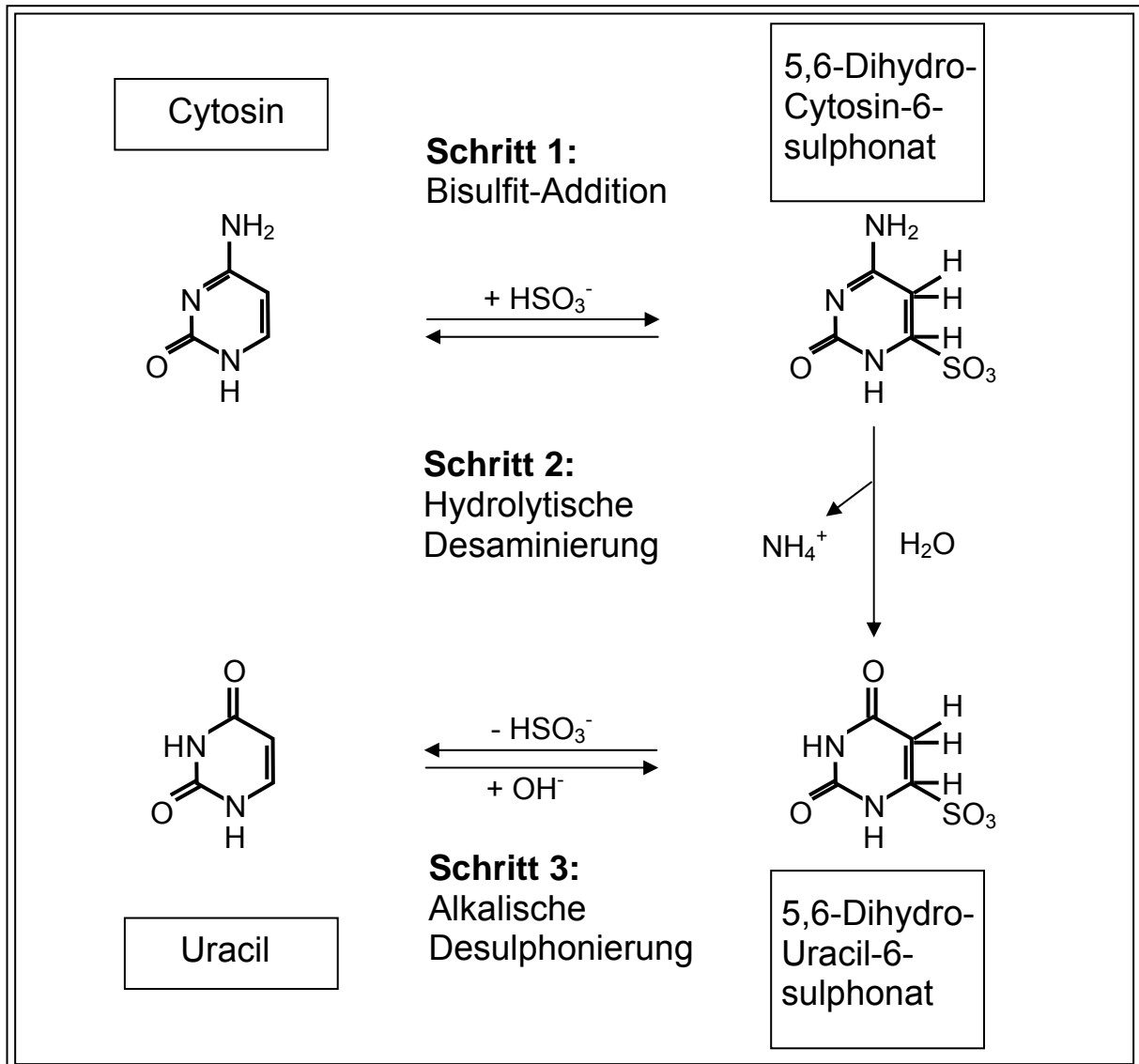


Abb. 3.1.: Desaminierung von Cytosin durch Bisulfit

Tab. 3.1.: Sequenz der in der Kontroll-PCR I genutzten Primer

Primer	Sequenz
TP53-mod-ex6f	5' - TTT TAT TGA TTG TTT TTA GGT TTG G - 3'
TP53-mod-ex6r	5' - CTC CTC CCA AAA ACC CCA ATT ACA - 3'

Zur Amplifikation wurde eine Taq-Polymerase genutzt. Jeder Reaktionsansatz enthielt etwa 10-20 µl bisulfitmodifizierte DNA, die in einer Agarosekugel enthalten war, 5 µl 2mM dNTP-Mix, 5 µl 10 x PCR-Puffer II, 2 µl 25mM MgCl₂, jeweils 1 µl der o. g. Primer und Aqua destillata in einem Endvolumen von 30 µl. Die Amplifikation des Ansatzes

wurde in einem Thermocycler nach folgendem optimierten Thermoprofil (Tab. 3.2.) durchgeführt:

Tab. 3.2.: Thermoprofil für Kontroll-PCR I

	TEMPERATUR (°C)	ZEIT (MIN)
Vor-Denaturierung	98.0	10.0
Denaturierung	95.0	1.0
Annealing 35 Zyklen	58.0	1.5
Elongation	72.0	2.0
End-Elongation	72.0	10.0

Um eine Polymerisation an unspezifisch hybridisierenden Primern bei niedrigen Temperaturen zu unterdrücken, wurde eine „hot start PCR“ durchgeführt. Hierzu wurden 0,5 µl Taq-Polymerase zu jedem einzelnen Reaktionsansatz während der anfänglichen 98°C Inkubationsperiode zugegeben. Außerdem wurden in jedem PCR-Ansatz eine Negativkontrolle (Wasserprobe, keine DNA enthaltend) mitgeführt, so dass Kontaminationen ausgeschlossen werden konnten.

3.3.5.2. Kontroll-PCR II

Zur Kontrolle, ob noch normale bzw. nicht modifizierte DNA nach der Bisulfitbehandlung in der Probe enthalten war, wurde eine PCR mit den Primern TP53-5bf und TP53-5br zur Amplifikation eines kleinen, außerhalb des *NF1*-Lokus gelegenen Fragmentes (162 Basenpaare) durchgeführt (Tab. 3.3.). Diese Oligonukleotide binden nur an komplementäre DNA-Stränge, die nicht bisulfitmodifiziert wurden.

Tab. 3.3.: Sequenz der in der Kontroll-PCR II genutzten Primer

Primer	Sequenz
TP53-5bf	5'-GTGGGTTGATTCCACACCCC-3'
TP53-5br	5'-AACCAGCCCTGTCGTCTCTC-3'

Zur Amplifikation wurden die o. g. Taq-Polymerase sowie dieselben Reagenzien genutzt. Jeder Reaktionsansatz enthielt 10-20 µl bisulfitmodifizierte DNA, 5 µl dNTP-Mix, 5 ml 10 x PCR-Puffer II, 2,5 µl MgCl₂, 0,5 µl Taq-Polymerase und jeweils 2,5 µl der Primer sowie Aqua destillata in einem Endvolumen von 30 µl. Die Amplifikation des Ansatzes wurde im Thermocycler nach folgendem optimierten Thermoprofil (Tab. 3.4.) durchgeführt:

Tab. 3.4.: Thermoprofil für Kontroll-PCR II

	TEMPERATUR (°C)	ZEIT
Vor-Denaturierung	94.0	5.0 min
Denaturierung	94.0	30 sec
Annealing 50 Zyklen	59.0	40 sec
Elongation	72.0	30 sec
End-Elongation	72.0 °C	10.0 min

Da in der Regel eine minimale oder negative PCR-Ausbeute zu erwarten war, wurde in jedem PCR-Ansatz eine Positivkontrolle (genomische DNA enthaltend) mitgeführt. Außerdem wurde zusätzlich eine Negativkontrolle mitgeführt, so dass Kontaminationen ausgeschlossen werden konnten.

3.3.5.3. Überblick über die untersuchte Region im *NF1*-Gen

Für die Analyse des Methylierungsmusters wurde die für die *NF1*-Gen-Expression kritische Region in unmittelbarer Nähe des Transkriptionsstartpunktes gewählt.

Der untersuchte Bereich des *NF1*-Gens (Abb. 3.2.), der sich zwischen Position -256 bis +180 und +203 bis +622 (in Korrelation zum Startcodon ATG) erstreckt, umfasst den Promotor, 5'UTR, Exon 1 und teilweise Intron 1. Der Promotor und die 5'-nichtkodierende Sequenz (5'UTR) enthalten potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie AP-2, SP-1 und CRE. Der untersuchte Abschnitt zeichnet sich durch seinen CpG-Reichtum (21.9% der vorhandenen Cytosinreste sind CpGs; 45.4% CpC; 20.1% CpT und 12.7% CpA) aus und repräsentiert den größten Teil der CpG-Insel innerhalb des *NF1*-Gens. Alle 324 Cytosinreste (Abb. 4.) einschließlich 119 CpNpGs (71 CpGs, 30

CCpGs, 10 CCCpGs, 5 CCCCPpGs, 2 CCCCCpGs und 1 CCCCCCpG) ebenso wie 253 non-CpGs (147 CpCs, 41 CpAs und 65 CpTs) wurden einer Untersuchung des Methylierungsmusters durch Vergleich mit der Originalsequenz [85] unterzogen.

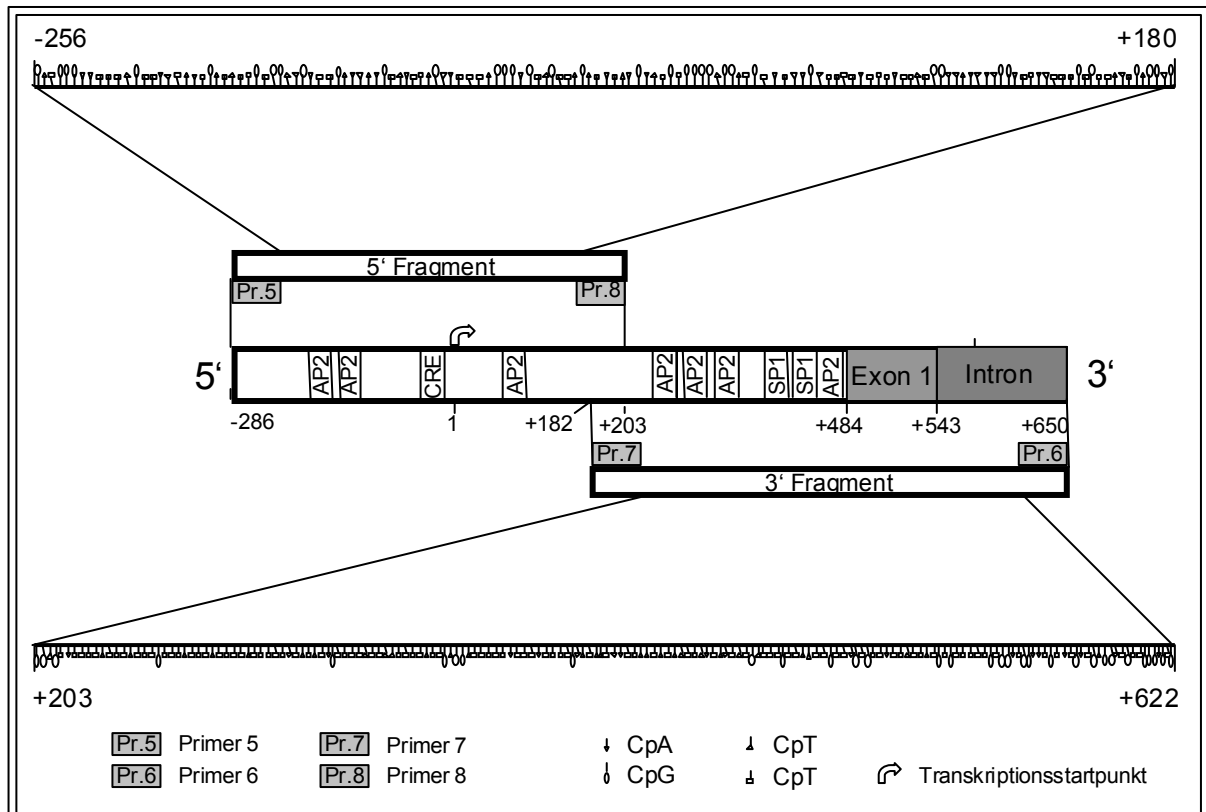


Abb.3.2.: Untersuchte Region im *NF1*-Gen

3.3.5.4. Amplifikation des *NF1*-Promotors

Um die Vervielfältigung der 856 bp großen untersuchten *NF1*-Region zu erleichtern, wurde diese in zwei Fragmente geteilt. Dazu dienten folgende, sich überlappende, spezifische Primer (Tab. 3.5.), die auf der von Hajira et al. [86] veröffentlichten *NF1*-Sequenz basieren:

Tab. 3.5: Sequenz der zur Amplifikation des *NF1*-Promotors genutzten Primer

Primer	Sequenz
Primer 5	5'-AGT TTA AGT TGA GAG TAT AGT TTT TTT AGG- 3'

MATERIAL UND METHODEN

Primer 6	5'-CAA AAC CTA AAA CAA AA(A oder G) CAA AAA AAA C- 3'
Primer 7	5' –GAT TGT GAT GGT TGT GGG GAG –3'
Primer 8	5' –TCT CCC CAC AAC CAT CAC AAT CC –3'

Zur Amplifikation wurde der „Taq PCR Core Kit“ verwendet, der eine Taq-Polymerase enthält. Jeder Reaktionsansatz enthielt 10-20 µl bisulfitmodifizierte DNA, 1 µl 10 mM dNTPs, 5 µl 10 x PCR-Puffer, 10 µl 5x Q-Lösung, 3 µl 25 mM MgCl₂, jeweils 1 µl der o. g. Primer und Aqua destillata in einem Endvolumen von 30 µl. Die Amplifikation des Ansatzes wurde im Thermocycler nach folgendem optimierten Thermoprofil (Tab. 3.6. und 3.7.) durchgeführt:

Tab. 3.6.: Thermoprofil für Primer 5 und 8 (Position -268 bis +205)

	TEMPERATUR (°C)	ZEIT (MIN)
Vor-Denaturierung	98.0	5
Denaturierung	95.0	1
Annealing max. 50 Zyklen	60.6	1
Elongation	72.0	2
End-Elongation	72.0	10

Tab. 3.7.: Thermoprofil für Primer 6 und 7 (Position +182 to +653)

	TEMPERATUR (°C)	ZEIT (MIN)
Vor-Denaturierung	98.0	5
Denaturierung	95.0	1
Annealing max. 50 Zyklen	59.6	1
Elongation	72.0	2
End-Elongation	72.0	10

Es wurde ein „hot start“ durchgeführt. Dazu wurden 0,5 µl der Taq-Polymerase zu jedem einzelnen Reaktionsansatz während der anfänglichen 98°C Inkubationsperiode dazugegeben. In jedem PCR-Ansatz wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Für jedes Amplifikat erfolgte eine Optimierung der PCR-Bedingungen, um ein Fragment ohne Nebenprodukte zu erhalten.

3.3.5.5. Kontrolle der PCR-Produkte

Zur präparativen Auftrennung der Amplifikate wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Diese erfolgte auf einem 1,7%igen Agarosegel, das mit Ethidiumbromid versetzt war. Parallel zu einem DNA-Längenstandard wurden schließlich 15 µl der mit Bromphenolblau-Auftragspuffer versetzten PCR-Proben elektrophoretisch aufgetrennt. Durch den Längenstandard konnte somit die Fragmentgröße bestimmt werden. Hiernach erfolgte die Fotodokumentation.

3.3.6. Isolierung und Aufreinigung der DNA aus dem Agarosegel

Die Amplifikate wurden auf dem UV-Transilluminator lokalisiert und mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Darauf folgte eine Aufreinigung und Konzentrierung der DNA-Fragmente aus dem isolierten, in TE gepufferten Agarosestückchen unter Benutzung des „QIAquick Gel Extraction Kit“. Die Durchführung folgte laut Angaben des Herstellers. Letztlich wurde die isolierte DNA in 30 µl Aqua destillata aufgenommen und tiefgefroren.

3.3.7. Klonierung und Vermehrung der PCR-Produkte

Für die Klonierung der PCR-Produkte wurde der „TOPO TA Cloning® Kit“ verwendet. Der verwendete Vektor „pCR® 2.1 TOPO®“ trägt dabei sowohl das Gen für Ampicillin-Resistenz als auch das Gen für die β-Galactosidase. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse des Substrates X-Gal, was zu einer sichtbaren Blaufärbung führt. Bei korrekter Ligation des PCR-Produkts in den Vektor ist der Promotor für das Gen β-Galactosidase zur X-Gal-Verwertung inaktiviert, das Gen für die Ampicillin-Resistenz bleibt jedoch unberührt. Weiße Kolonien auf LB-Platten mit Ampicillin werden somit von Zellen gebildet, die einen Vektor enthalten und ampicillinresistent sind, in denen also das PCR-Produkt

erfolgreich integriert worden ist. Blau gefärbte Kolonien zeigen eine inkorrekte Ligation oder fehlende Aufnahme des Plasmids in die Zellen an.

3.3.7.1. Ligation der PCR-Produkte

Bei der Ligation werden zwei DNA-Fragmente zu einem durchgehenden Doppelstrang verknüpft. Dabei katalysiert die Topoisomerase die Ausbildung einer kovalenten Phosphodiesterbindung zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen. Der linearisierte Vektor, der in dem benutzten Kit zur Verfügung gestellt wurde, besitzt überhängende 3' Thymidinreste. Um die Klonierungseffizienz zu optimieren, wurden einzelne Adenosine an das 3' Ende des PCR-Produkts angefügt. Dazu wurden 27 µl des gereinigten PCR-Produkts mit 0,35 µl Taq-Polymerase, 1 µl dATPs (10 mM), 3,5 Taq-Polymerase-Puffer und 3,15 µl Aqua destillata bei 72 °C über 10 Minuten inkubiert und sofort in die Ligation eingesetzt.

Für die Ligation wurden je nach Bandenstärke der aufgetragenen und eluierten PCR-Produkte 0,5 bis 4,0 µl des PCR-Produkts, 1 µl Salzlösung und 1 µl Vektor zu einem Gesamtansatz von 6 µl mit sterilem Wasser aufgefüllt. Nach einer exakt 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Insertion gestoppt, indem der Ligationsansatz auf Eis abgekühlt wurde.

3.3.7.2. Transformation

Die Transformation chemisch kompetenter Bakterienzellen (TOP10F' Zellen; E. coli) basiert auf dem Prinzip, dass durch Kalziumchloride die Aufnahme von Plasmid-DNA gefördert wird. Dazu wurden 2 µl des Ligationsansatzes in eine entsprechende, kompetente E.coli-Zellen enthaltende Ampulle pipettiert und mit der Pipettenspitze vorsichtig umgerührt. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz für 40 sec auf 42°C erwärmt und sofort wieder auf Eis abgekühlt. Dieser Hitzeschock ermöglichte die Aufnahme der Plasmide durch die kompetenten E. coli-Zellen. Nach der Zugabe von 250 µl SOC-Medium in die E. coli- Ampulle wurde diese Suspension für 1 Stunde bei 37°C und 200 rpm horizontal geschüttelt.

Um eine Unterscheidung von rekombinanten und nicht-rekombinanten Klonen zu ermöglichen, wurden Indikatorplatten hergestellt. Dazu wurden LB-Agar-Platten unter Zusatz von Ampicillin gegossen, die mit 40 µl IPTG (100 mM) und X-Gal (40 mg/ml) be-

schichtet wurden. Die Transformanten wurden dann auf den Selektionsplatten mittels eines abgeflamnten Drigalskispatels vereinzelt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach der Auswahl transformierter Zellen über die Blau-Weiß-Färbung der Kolonien wurde jeweils ein Teil der Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher in 2 ml ampicillinhaltiges LB-Medium überführt. Die Suspension wurde unter Schütteln bei 200 rpm und 37°C für 12-14 h bebrütet.

3.3.8. Extraktion und Kontrolle der Plasmide

3.3.8.1. Plasmidextraktion

Zur Gewinnung der Plasmide steht die alkalische Lyse zur Verfügung. Alle hierzu verwendeten Reagenzien waren im „QIAprep Spin Plasmid Kit“ (Qiagen) enthalten. Ein Teil der „Übernachtkulturen“ wurde schockgefroren. Etwa 1 ml der Suspension wurde schließlich sedimentiert und in 250 µl EDTA- und RNAase-haltigem Puffer P1 resuspendiert, um die Zellwand zu destabilisieren und die bakterielle RNA zu degradieren. Die vollständige Lyse erfolgte durch Zugabe von 250 µl Puffer P 2 zur Bakteriensuspension; dabei wurde die Dauer der Inkubation mit 5 min so gewählt, dass einerseits viel Plasmid-DNA, andererseits jedoch noch keine chromosomale DNA freigesetzt wurde. Das Lysat wurde dann mit 350 µl Neutralisationspuffer N 3 neutralisiert, um die denaturierten Proteine, hochmolekulare RNA, denaturierte chromosomale DNA und bakterielle Zelldebris zusammen mit dem Salz zu präzipitieren. Diese unlöslichen Komponenten wurden bei 13000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf die QIAprep-Säule mit Sammelgefäß gegeben und für 1 min zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und das Sammelröhrchen anschließend mit 500 µl Puffer PB gewaschen, um Nuklease-Aktivität oder gebundene Kohlenhydrate aus E. coli-Stämmen zu entfernen. In einem zweiten Reinigungsschritt mit 750 µl Puffer PE erfolgte die Reinigung der Plasmid-DNA. Der Waschpuffer wurde durch eine zusätzliche Zentrifugation (13000 rpm, 1min) entfernt. Zur Elution der DNA wurden 30 µl steriles Wasser auf die Säule pipettiert und nach einer 1-minütigen Inkubation in ein Eppendorfgefäß zentrifugiert.

3.3.8.2. Restriktion der Plasmide mit *EcoR* I

Die Analyse der Plasmid-DNA auf richtige Insertion der Fragmente in den Vektor erfolgte mittels Restriktionsspaltung. Der Restriktionsansatz enthielt 1 µl Plasmid, 0,5 µl bzw. 10 U *EcoR* I, 1 µl Puffer H, 0,1 µl BSA und 7,4 µl Aqua destillata. Nach einer 1,5-stündigen Inkubation bei 37°C wurden 4 µl des Ansatz mit 5 µl Probenauftragspuffer auf einem 1,3%igem Agarosegel elektrophoretisch zusammen mit einem 1 kb-Längenstandard bei 180 mA aufgetrennt. Die positiven Klone wurden bis zur weiteren Sequenzierung tiefgefroren, Plasmide ohne entsprechendes Insert wurden verworfen.

3.3.9. Sequenzierungsanalysen

Das ursprüngliche Prinzip der DNA-Sequenzierung beruht auf der Kettenabbruch-Methode, welche von Sanger und Kollegen [117] entwickelt wurde. Hierbei ermittelt man die DNA-Sequenzen durch die kontrollierte Unterbrechung der enzymatischen Replikation. Eine moderne Variante dieser früher radioaktiv durchgeführten Methode stellt die computergestützte DNA-Sequenzierung dar, bei der die als Terminatoren wirkenden Didesoxynukleotide fluoreszenzmarkiert sind [118]. Doppelsträngige DNA wird denaturiert und ein Einzelstrang nach Anlagerung eines sequenzspezifischen Primers durch eine DNA-Polymerase aufgefüllt. Sobald eines der vier mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten ddNTPs eingebaut wird, bricht jedoch die DNA-Synthese ab, da der DNA-Polymerase die 3'-Hydroxylgruppe für die Ausbildung der nächsten Phosphodiesterbindung fehlt. Wird jeweils ein Didesoxyanalogon einer Base in geringerer Konzentration als die dNTPs zu einem Ansatz gegeben, erhält man durch statistisch verteilte Kettenabbrüche unterschiedlich lange DNA-Fragmente. Während der gelelektrophoretischen Auftrennung der Stränge, bei der dünne denaturierende Polyacrylamidgеле eingesetzt werden, wird im unteren Bereich des Gels die Fluoreszenz der jeweils eingebauten Farbstoffe durch einen langwelligen 50 mW Argon-Laserstrahl (488 nm und 514 nm) angeregt und die Emission der jeweiligen Bande durch das Detektorsystem registriert. Die vier verschiedenen ddNTPs können differenziert werden, da sie bei unterschiedlichen Wellenlängen fluoreszieren (ddGTP: 540nm, ddATP: 570 nm, ddTTP: 600 nm, ddCTP: 630 nm). Die Sequenz wird mit dem Programm Collection (ABI PrismTM 377 Collection Version 2.1) in Chromatogrammform dargestellt.

3.3.9.1. Sequenzierungs-PCR

Die Sequenzierungsreaktionen wurden mit Hilfe des „ABI PRISM[®] Big Dye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v1.1“ durchgeführt. Dazu wurden 20-50 ng Plasmid-DNA mit 2 µl „Big Dye-Terminator-Mix“, 0,5 µl Primer M13 reverse bzw. Primer 5 und 8 und 2 µl 5 x Sequenzierungspuffer versetzt und auf ein Volumen von 10 µl mit Aqua destillata aufgefüllt. Dabei enthielt der „Big Dye-Terminator V1.1-Mix“ neben den dNTPs auch mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte ddNTPs, eine temperaturstabile Taq-DNA-Polymerase sowie Reaktionspuffer. Die Kettenabbruchreaktion wurde als PCR („cycle sequencing“) in einem Thermocycler nach folgendem Programm (Tab. 3.8.) durchgeführt:

Tab. 3.8.: Thermoprofil für die Sequenzierungs-PCR

	TEMPERATUR (°C)	ZEIT (SEC)
Vor-Denaturierung	93.0	5
Denaturierung	96.0	3
Annealing max. 50 Zyklen	49.6	15
Elongation	60.0	240

Nach dem Abschluss der Reaktion wurden die Proben auf 4°C abgekühlt. Hiernach wurde das sequenzierte Produkt von überschüssigen DyeTerminatoren befreit. Dazu wurden Sephadex-Röhrchen vorbereitet, indem man 55 mg Sephadex in 700 µl Wasser für mindestens 30 min in Sephadex-Röhrchen quellen ließ. Um überschüssiges Wasser zu entfernen, wurde das Röhrchen für 2 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Sequenzierungsprodukt wurde dann durch Zentrifugation durch das Sephadex-Röhrchen für 2 min bei 30000 rpm aufgereinigt, danach luftgetrocknet und in 1 µl Formamid-Mix aufgenommen.

3.3.9.2. Sequenziergel

Für die elektrophoretische Auftrennung der entstandenen Fragmente wurde eine 30%ige, denaturierende Polyacrylamidgellösung vorbereitet und mit einer Wasser-

strahlpumpe entgast. Das Sequenziergel wurde nach der Zugabe von 20 µl TEMED und 350 µl 10%igem APS mit einem Endvolumen von 30 ml zwischen zwei zuvor mit dem Detergens Alconox[®] behandelte und mit destilliertem Wasser gespülte Glasplatten luftblasenfrei gegossen. Diese Glasplatten wurden durch zwei dicke Spacer getrennt, mit einem Haifischkamm versehen und durch Klammern abgedichtet. Nach der 2-stündigen Polymerisation wurden die Glasplatten von außen erneut mit dem Detergens Alconox[®] und mit Wasser gründlich gesäubert. Die Reinheit des Polyacrylamidgels wurde anschließend im Sequenzierungsgerät mit dem Laserstrahl überprüft (Funktion „plate check“).

3.3.9.3. Probenauftrag und Gellauf

Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mit einem automatischen Sequenzierer. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer des Sequenzierungsgerätes eingespannt und während eines Vorlaufs auf 51°C vorgeheizt, wobei ein 1 x TBE-Puffer zur Verwendung kam. Der Probenauftrag auf das 30%ige Polyacrylamidgel erfolgte nach einer 2-minütigen Denaturierung der in Ladepuffer suspendierten Sequenzierreaktionen bei 95°C. Der Trennlauf erfolgte in 1 x TBE-Puffer über einen Zeitraum von 5 h.

3.3.9.4. Auswertung der sequenzierten Proben

Die Signalverstärkung, die Analyse der Bandenmuster und die Sequenzbestimmung erfolgte im Anschluss an den Gellauf mit dem systemeigenen Programm (ABI Prism[™] 377 Collection Version 2.1). Die automatisch bestimmten Sequenzen wurden stets manuell kontrolliert.

3.3.10. Statistische Auswertung

Zur Quantifizierung der Ergebnisse der Methylierungsanalysen im *NF1*-Promotor der untersuchten NF1-assoziierten Tumore wurden folgende Methoden benutzt:

- Der gesamte Methylierungsgrad einer Probe repräsentiert die Menge der methylierten Cytosine aller Klone in dem untersuchten DNA-Fragment, angegeben als prozentualer Anteil der methylierten Positionen von allen potentiell methylierbaren Cytosinen sowie als Medianwert mit Schwankungsbreite.

- Der Methylierungsgrad einzelner Cytosine (Methylierungsmuster) bezieht sich auf die durchschnittliche Belegung einzelner Cytosine mit einer Methylgruppe in allen untersuchten Klonen der Probe, angegeben als prozentualer Anteil der methylierten Positionen von allen potentiell methylierbaren Cytosinen.

Um die Gruppen der Nervenscheidentumore zu vergleichen wurden aufgrund der kleinen Stichprobenumfänge und der somit nicht garantierten Normalverteilung nichtparametrische Tests genutzt. Abhängige Stichproben (wie kutane versus plexiforme Neurofibrome desselben Patienten bzw. CpG- versus nicht-CpG-Methylierung) wurden mit Hilfe des Wilcoxon-Tests analysiert. Für die Gegenüberstellung von unabhängigen Stichproben (Neurofibrome versus MPNST, Leukozyten weiblicher versus männlicher Kontrollprobanden, Nervenscheidentumore versus Leukozyten von Kontrollprobanden) wurde der U-Test nach Mann und Whitney angewandt. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS (Social Package for the Social Sciences for Windows 10.0).