

Aus dem Institut für Neuropathologie  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss epigenetischer Veränderungen  
auf die klinische Variabilität der  
Neurofibromatose Typ 1

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Sabrina Titze  
aus Berlin

Gutachter/in: 1. *Prof. Dr. med. G. Stoltenburg-Didinger*.....  
2. *Prof. Dr. med. T. Rosenbaum*.....  
3. *Prof. Dr. med. K. Wimmer*.....

Datum der Promotion: *18.11.2011*.....

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

S. Titze, H. Peters, S. Währisch, et al. Differential *MSH2* promoter methylation in blood cells of Neurofibromatosis type 1 (NF1) patients. *Eur J Hum Genet*, 18:81-87, 2010.

A. Harder, S. Titze, L. Herbst, et al. Monozygotic Twins With Neurofibromatosis Type 1 (NF1) Display Differences in Methylation of *NF1* Gene Promoter Elements, 5' Untranslated region, Exon and Intron 1. *Twin Res Hum Genet*, 13(6):582-94, 2010.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die Neurofibromatose Typ 1 . . . . .	1
1.1.1	Pathogenese und klinisches Erscheinungsbild . . . . .	1
1.1.2	Das Neurofibromin und seine Funktion . . . . .	2
1.1.3	Das <i>NFI</i> -Gen . . . . .	2
1.1.4	Genotyp-Phenotyp-Korrelation . . . . .	4
1.2	Das „Mismatch Repair“-System . . . . .	5
1.2.1	Die Funktion des „Mismatch Repair“-Systems . . . . .	5
1.2.2	Das „Constitutional Mismatch Repair-Deficiency Syndrome“ . . . . .	6
1.2.3	MMR-Gene als „Modifizierer“ der Neurofibromatose Typ 1 . . . . .	9
1.3	Die DNA-Methylierung . . . . .	9
1.3.1	Verteilung und Funktion der DNA-Methylierung im menschlichen Genom . . . . .	9
1.3.2	Aberrante DNA-Methylierung als Komponente der Tumorgenese . . . . .	10
1.3.3	DNA-Methylierung im <i>NFI</i> -Gen . . . . .	11
<b>2</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>15</b>
3.1	Material . . . . .	15
3.2	Patienten . . . . .	18
3.2.1	Untersuchung der Promotoren von MMR-Genen mittels MSP und Pyrosequenzierung	18
3.2.2	Untersuchung des Methylierungsmusters des <i>NFI</i> -Promotors bei eineiigen Zwillingen	19
3.3	Methoden . . . . .	19
3.3.1	Herstellung der verwendeten Lösungen . . . . .	19
3.3.2	Untersuchung der Promotoren von MMR-Genen mittels MSP und Pyrosequenzierung	21
3.3.2.1	Bisulfitmodifikation . . . . .	22
3.3.2.2	Kontroll-PCR . . . . .	22
3.3.2.3	Methylierungsspezifische PCR . . . . .	23
3.3.2.4	Pyrosequenzierung . . . . .	23
3.3.3	Untersuchung des Methylierungsmusters des <i>NFI</i> -Promotors bei eineiigen Zwillingen	25
3.3.3.1	DNA-Verdau mit EcoR I und DNA-Fällung . . . . .	25
3.3.3.2	Bisulfitbehandlung . . . . .	26
3.3.3.3	PCR und DNA-Extraktion . . . . .	26
3.3.3.4	Klonierung und Übernachtskultur . . . . .	27
3.3.3.5	Plasmidextraktion . . . . .	28

3.3.3.6	Kontrolle der extrahierten Plasmide . . . . .	29
3.3.3.7	Sequenzreaktion und DNA-Fällung . . . . .	29
3.3.3.8	Sequenzierung . . . . .	29
3.3.4	Statistik . . . . .	30
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>31</b>
4.1	Promotormethylierung der „Mismatch Repair“-Gene . . . . .	31
4.1.1	Methylierungsstatus der Promotoren von <i>MLH1</i> , <i>MSH6</i> und <i>PMS2</i> bei NF1-Patienten	31
4.1.2	Methylierung des <i>MSH2</i> -Promotors bei NF1-Patienten und Kontrollpersonen . . . .	32
4.1.2.1	Überblick über die untersuchte Region . . . . .	32
4.1.2.2	Methylierungsspezifische PCR . . . . .	33
4.1.2.3	Pyrosequenzierung . . . . .	36
4.1.3	MMR-Methylierung in NF1-assoziierten Tumoren . . . . .	40
4.2	Methylierungsmuster des <i>NF1</i> -Promotors bei eineiigen Zwillingen . . . . .	41
4.2.1	Überblick über die untersuchte Region . . . . .	41
4.2.2	Durchschnittliche Methylierung einzelner Abschnitte der untersuchten Region . . .	42
4.2.3	Unterschiede in der Methylierung innerhalb der Paare . . . . .	42
4.2.4	Methylierung spezifischer Promotorelemente . . . . .	46
4.2.5	Methylierungsunterschiede in Relation zur Anzahl der Neurofibrome . . . . .	46
4.2.6	Methylierung der Subregion -256 bis -234 in Relation zum Vorhandensein eines Optikusglioms . . . . .	48
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>49</b>
5.1	Promotormethylierung bei MMR-Genen als potentieller „Modifizierer“ der NF1 . .	49
5.1.1	Promotormethylierung der MMR-Gene <i>MLH1</i> , <i>MSH6</i> und <i>PMS2</i> in Leukozyten von NF1-Patienten . . . . .	49
5.1.2	Promotormethylierung des MMR-Gens <i>MSH2</i> in Leukozyten von NF1-Patienten und Kontrollpersonen . . . . .	49
5.1.2.1	Konstitutionelle MMR-Defekte und die Neurofibromatose Typ 1 . . . . .	49
5.1.2.2	Bedeutung des MMR-Gens <i>MSH2</i> für die Entstehung von Neurofibromen . . . . .	50
5.1.2.3	Einfluss der <i>MSH2</i> -Methylierung auf Genexpression und Tumorentstehung . . . . .	50
5.1.2.4	Zusammenhang zwischen der <i>MSH2</i> -Promotormethylierung und der Entstehung von Neurofibromen . . . . .	50
5.1.2.5	Bedeutung der <i>MSH2</i> -Promotormethylierung für den Umgang mit NF1-Patienten . .	51
5.1.2.6	<i>MSH2</i> -Promotormethylierung bei gesunden Kontrollpersonen . . . . .	52
5.1.3	Promotormethylierung der MMR-Gene in Tumoren von NF1-Patienten . . . . .	52
5.1.4	Limitierungen der Aussagekraft der Methylierungsspezifischen PCR . . . . .	53

5.2	Methylierung des <i>NF1</i> -Promotors als potenzieller „Modifizierer“ der NF1 . . . . .	54
5.2.1	Unterschiede in der DNA-Methylierung einzelner Regionen im <i>NF1</i> -Promotor . . .	54
5.2.1.1	Bedeutung der Methylierung der SP1-Bindungsstelle (CpG bei -138) . . . . .	55
5.2.1.2	Zusammenhang zwischen der Methylierung der TLF-Region und der Entstehung eines Optikusglioms bei NF1-Patienten . . . . .	55
5.2.2	Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Alter . . . . .	56
5.2.3	Limitierungen dieser Arbeit . . . . .	57
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>58</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>60</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>70</b>
	<b>Erklärung über Selbstständigkeit</b>	<b>71</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>72</b>

## Abbildungsverzeichnis

1.1	Das <i>NF1</i> -Gen . . . . .	3
1.2	DNA-Methylierung und Tumorentstehung . . . . .	11
4.1	Beispiel einer Fotodokumentation nach MSP und Gelelektrophorese . . . . .	31
4.2	Die untersuchte Region des <i>MSH2</i> -Promotors . . . . .	32
4.3	Methylierungsstatus des <i>MSH2</i> -Promotors in Abhängigkeit vom Geschlecht . . . . .	35
4.4	Beispielerggebnis einer Pyrosequenzierung . . . . .	36
4.5	Graphische Darstellung der Ergebnisse der Pyrosequenzierung . . . . .	40
4.6	Überblick über die untersuchte Region des <i>NF1</i> -Promotors . . . . .	41
4.7	Durchschnittliche Methylierung verschiedener Bereiche des <i>NF1</i> -Promotors . . . . .	42
4.8	Darstellung der Methylierung aller Cytosine im untersuchten Fragment . . . . .	43/44
4.9	Methylierung der TLF-Bindungsregion bei Vorliegen eines Optikusglioms . . . . .	48
5.1	<i>MLH1</i> -MSP mit Primern von Grady et al. . . . .	53
5.2	Grad der Methylierung des <i>NF1</i> -Promotors aller untersuchten Zwillingspaare . . . . .	56

## Tabellenverzeichnis

1.1	CMMR-D-Patienten mit NF1-Symptomen . . . . .	7/8
3.1	Klinische Daten der untersuchten NF1-Zwillinge . . . . .	20
4.1	Untersuchungsergebnisse der MSP für <i>MSH2</i> bei Kontrollprobanden . . . . .	33
4.2	Untersuchungsergebnisse der MSP für <i>MSH2</i> bei NF1-Patienten . . . . .	34
4.3	Untersuchungsergebnisse der Pyrosequenzierung bei Kontrollprobanden . . . . .	37
4.4	Untersuchungsergebnisse der Pyrosequenzierung bei NF1-Patienten . . . . .	38/39
4.5	Methylierung spezifischer Promotorelemente . . . . .	47

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AP1	„activating protein 1“ (analog AP2)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
Ca	Karzinom
ca.	circa
CALF	Café-au-lait-Flecken
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CML	chronisch-myeloische Leukämie
CMMR-D	„Constitutional Mismatch Repair-Deficiency“
CpG	über Phosphatbrücke miteinander verbundenes Cytosin und Guanin
CRE	„cAMP response element“
CREB	„cAMP response element-binding protein“
$\Delta Nf$	Vergleichswert für die Konkordanz hinsichtlich CALF- und NF-Anzahl innerhalb eines Zwillingspaars, wobei $\Delta Nf = (Nf_1 - Nf_2) / Nf_1$ ( $Nf_1$ = höhere Anzahl, $Nf_2$ = niedrigere Anzahl; $\Delta Nf = 0$ : völlige Konkordanz, $\Delta Nf = 1$ : maximale Diskordanz)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii/aliae/alia (und andere)
EVI2A	„ecotropic viral integration site“ 2A (analog EVI2B)
for	„forward“; hier als Namensteil des Vorwärts-Primers
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (Standardwert: $g = 9,80665 \text{ m/s}^2$ )
G	Guanin
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDNF	„Glial cell line-derived neurotrophic factor“ (Wachstumsfaktor)



## Abkürzungsverzeichnis

---

GDP	Guanosindiphosphat
GRD	„GAP-related domain“
GTP	Guanosintriphosphat
HNPCC	Hereditäres non-polipöses Kolonkarzinom-Syndrom (Lynch-Syndrom)
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
J.	Jahr(e)
$\kappa$	Kappa
kb	Kilobasen
kg	Kilogramm
l	Liter
LB	„lysogeny broth“; Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien
$\mu$	micro
m	milli
m	Meter
m	männlich
M	Stoffmengenkonzentration (Molarität)
MgCl	Magnesiumchlorid
min.	Minute(n)
MLH	MutL-Homolog
MMR	„Mismatch Repair“-System
mol	Mol (Stoffmenge)
MPNST	maligner peripherer Nervenscheidentumor
MSH	MutS-Homolog
MSP	Methylierungsspezifische PCR
N	Äquivalentkonzentration (Normalität)
NaOH	Natriumhydroxid
NF	Neurofibrom(e)
NF1	Neurofibromatose Typ 1 (von Recklinghausen)
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NIH	National Institute of Health
Nr.	Nummer
Nstr1	„nerve sheath tumor resistance 1“ (analog Nstr2)
OMGP	Oligodendrozytenmyelin-Glykoprotein
%	Prozent
p	pico
p-Wert	Signifikanzwert („p(robabiliy)-value“)
Pat.	Patient

PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PK A	Proteinkinase A
PMS	„postmeiotic segregation“
rev	„reverse“; hier als Namensteil des Rückwärts-Primers
rpm	Drehzahl („revolutions per minute“; Umdrehungen pro Minute)
sek.	Sekunde(n)
SNP	„single nucleotide polymorphism“ (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
SPNET	supratentorieller primitiver neuroektodermaler Tumor
SRE	„serum response element“
T	Thymin
T-ALL	akute T-Zell-Leukämie
T <sub>A</sub>	Annealing-Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TATA-Box	auch Goldberg-Hogness-Box; DNA-Abschnitt mit der Basen-Sequenz T(hymin)-A(denin)-T(hymin)-A(denin)
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TE	TRIS-EDTA-Puffer
TSG	Tumorsuppressorgen
U	Unit; Einheit der Enzymaktivität
UTR	„untranslated region“; untranslatierter DNA-Bereich
UV	ultraviolettes Licht
w	weiblich
$\chi^2$	Chi-Quadrat-(Test)

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Neurofibromatose Typ 1

### 1.1.1 Pathogenese und klinisches Erscheinungsbild

Die Neurofibromatose Typ 1 (NF1), erstmals beschrieben von Friedrich Daniel von Recklinghausen im Jahre 1882, ist eine autosomal-dominant vererbte monogene Erkrankung, die durch eine pathogene Mutation im *Neurofibromin*-Gen hervorgerufen wird [12]. Mit einer Inzidenz von etwa 1:3.500 gehört sie zu den häufigsten angeborenen Erkrankungen, wobei etwa die Hälfte der Fälle auf eine Neumutation zurückzuführen sind.

Obwohl in 85 bis 95 % der Fälle der Nachweis der zugrundeliegenden Mutation möglich ist, wird die Diagnose der NF1 klinisch gestellt (siehe Schaukasten). Weitere gehäuft mit der NF1 einherge-

**Die Diagnose der Neurofibromatose Typ 1 kann gestellt werden, wenn mindestens zwei der folgenden Kriterien erfüllt sind (NIH-Konsensus 1988 [68]):**

- mindestens 6 Café-au-lait-Flecken mit einem Durchmesser  $> 5$  mm (Kinder) beziehungsweise  $> 15$  mm (Erwachsene)
- mindestens 2 kutane oder subkutane Neurofibrome oder 1 plexiformes Neurofibrom
- axilläres oder inguinales Freckling
- Optikusgliom
- mindestens 2 Lisch-Knötchen (Irishamartome)
- Knochenmalformationen wie Keilbeindysplasie, Verdünnung langer Röhrenknochen, Pseudarthrose
- ein Verwandter 1. Grades mit NF1

hen Symptome sind neurologische Auffälligkeiten, wie Intelligenzminderung, Lernschwierigkeiten, Epilepsie und Aquäduktstenosen, orthopädische Erkrankungen, wie schwerwiegende Skoliose, sowie kardiovaskuläre Probleme, wie eine Pulmonalstenose oder arterielle Hypertonie, nicht selten bedingt durch eine Nierenarterienstenose oder ein Phäochromozytom. Auch das Risiko für die Entwicklung maligner Tumore, vor allem Gliome im Zentralnervensystem und maligne periphere Nervenscheidentumore (MPNST) ist bei NF1-Patienten erhöht. Im Gegensatz dazu kann sich die NF1 ebenso mit einem sehr milden Phänotyp präsentieren und auf das Vorhandensein kutaner Symptome beschränkt sein. Finden sich diese lediglich in einem begrenzten Areal des Körpers, sogenannte segmentale Neurofibromatose, ist das Vorliegen eines Mosaiks bedingt durch eine somatische *NF1*-Mutation in Betracht zu ziehen.

### 1.1.2 Das Neurofibromin und seine Funktion

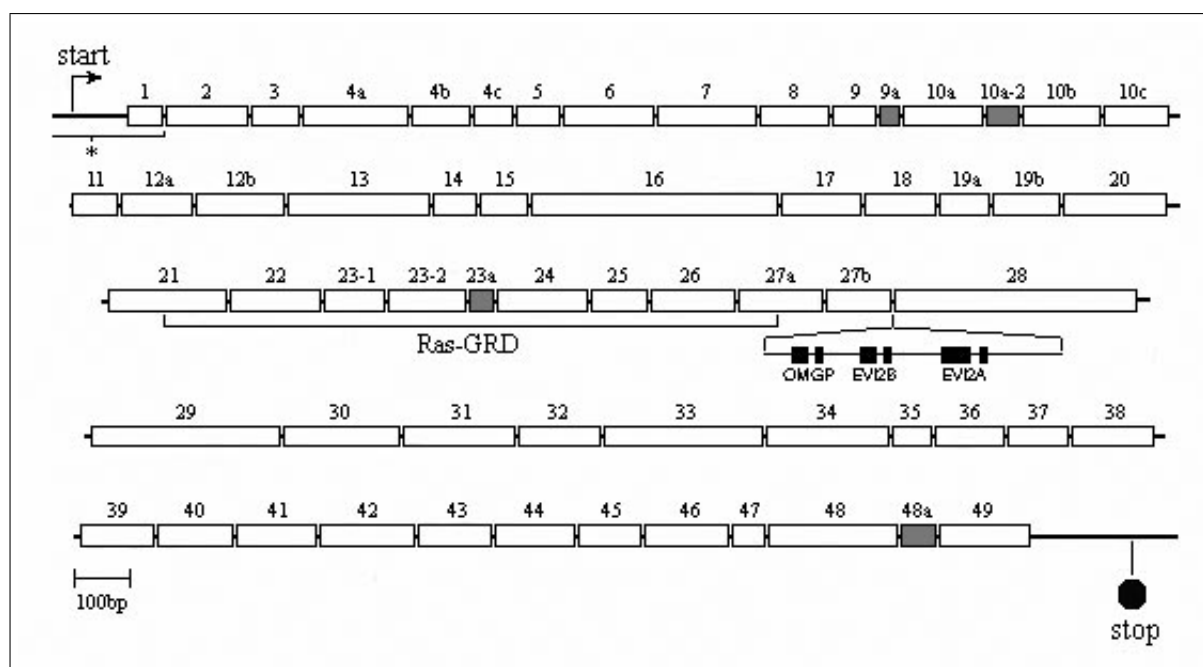
Das *NF1*-Gen kodiert für ein 2818 Aminosäuren umfassendes zytosolisches Protein, welches ubiquitär, vorrangig jedoch in Neuronen sowie Glia- und Schwannzellen, exprimiert wird [12]. Neurofibromin besitzt eine funktionelle Domäne, über die es an das Ras-Protein bindet und dessen GTPase-Aktivität stimuliert. Die dadurch katalysierte Hydrolyse von Guanosintriphosphat (GTP) zu Guanosindiphosphat (GDP) führt zu einer Inaktivierung von Ras und somit zu einer Hemmung der Zellproliferation und -differenzierung. Neben diesem scheint Neurofibromin auch in weitere, weniger gut charakterisierte, Signalwege integriert zu sein. So besitzt es zum Beispiel eine Cystein/Serin-reiche Domäne (CSRD) mit vermeintlichen ATP-Bindungsstellen und drei potentiellen cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PK A)-Erkennungssequenzen, die durch die PK A phosphoryliert werden [22]. Eine Interaktion mit dem Protein 14-3-3 im Anschluss an diese Phosphorylierung scheint die Funktion des Neurofibromins negativ zu beeinflussen [25]. Außerdem kann Neurofibromin die Heparansulfat-Proteoglykane Syndecan 1-4 binden, welche unter anderem als Kofaktoren in der Signaltransduktion fungieren [41]. Auch eine Wechselwirkung mit dem Amyloid-Precursor-Protein (APP), dem Vorläuferprotein des in die Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung involvierten  $\beta$ -Amyloids, wurde bereits nachgewiesen [16]. Nicht zuletzt besitzt Neurofibromin eine phospholipidbindende Sec14p-Domäne sowie eine Pleckstrin-homologe (PH)-Domäne [15].

Im Hinblick auf die Symptome der Neurofibromatose Typ 1 scheint Neurofibromin insbesondere in Geweben, die der Neuralleiste entspringen, von Bedeutung zu sein [12]. So enthalten Neurofibrome vor allem Schwannzellen und periphere Neurone, Phäochromozytome entstehen aus den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks und Café-au-lait-Flecken und Lisch-Knötchen gehen aus veränderten Melanozyten hervor. Auch die im Zusammenhang mit der NF1 gehäuft dysplastischen Schädelknochen sind Derivate der Neuralleiste.

Basierend auf der Beobachtung, dass in vielen Tumoren von NF1-Patienten ein Verlust der Expression beider Allele des *NF1*-Gens nachweisbar ist, wird Neurofibromin als Tumorsuppressor angesehen [12]. Für jene postuliert die „Two Hit“-Hypothese von Knudson, dass neben der krankheitsverursachenden Keimbahnmutation erst eine zusätzliche somatische Mutation des Wildtypallels zu einer Tumorentstehung führt [50].

### 1.1.3 Das *NF1*-Gen

Das *NF1*-Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosom 17 (17q11.2), beinhaltet 61 Exons und umfasst etwa 350 kb genomischer DNA [95]. Vier Exons mit alternativem Splicing wurden bisher beschrieben, die zu der Bildung verschiedener Isoformen des Genproduktes führen. Wie in der Abbildung 1.1 zu erkennen ist, befinden sich im Intron 27b drei weitere Gene, die auf dem reversen Strang kodiert sind und somit in entgegengesetzter Richtung abgelesen werden. Das



**Abbildung 1.1: Das *NFI*-Gen**

Dargestellt sind die Exons des *NFI*-Gens. Graue Boxen markieren Exons mit alternativem Splicing. Besonders hervorgehoben sind die Domäne, die an das Ras-Protein bindet (Ras-GRD) sowie die drei Gene auf dem reversen Strang im Intron 27b (*OMGP*, *EVI2A*, *EVI2B*). Der Stern kennzeichnet die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Region. Diese ist in der Abbildung 4.6 auf Seite 41 im Detail illustriert. Quellen: [49, 101]

Oligodendrozytenmyelin-Glykoprotein (OMGP) ist ein extrazelluläres Peptid, das mit der äußeren Zellmembran verbunden ist [102]. Es wird in Neuronen und Oligodendrozyten im Zentralnervensystem exprimiert und scheint in den Wachstumsprozess von Neuronen sowie die Ausbildung und Erhaltung von Myelinscheiden involviert zu sein [105]. Die beiden Gene *EVI2A* und *EVI2B* („ecotropic viral integration site“) kodieren mutmaßlich für Transmembran-Proteine, über deren Funktion bisher nur wenig bekannt ist [102]. Die entsprechenden Homologe der Maus spielen offenbar eine Rolle bei der Entstehung myeloischer Leukämien. Beim Menschen werden beide Gene im peripheren Blut und im Knochenmark exprimiert, *EVI2A* zusätzlich auch im Gehirn. *EVI2B* ist möglicherweise neben dem *NFI*-Gen an dem Prozess der Differenzierung von Melanozyten und Keratinozyten beteiligt [48].

Der Promotor, also das nicht kodierende 5'-Ende des *NFI*-Gens, ist zwischen Mensch und Maus hoch konserviert und enthält einige komplett identische Transkriptionsfaktor-Bindungselemente wie ein „cAMP response element“ (CRE), ein „serum response element“ (SRE) und mehrere AP2-Bindungsstellen [33]. Die Region von -33 bis +261 relativ zum Transkriptionsstartpunkt, welcher sich beim Menschen 484 Basenpaare stromaufwärts des Startkodons ATG befindet, stimmt bei beiden Spezies zu 95 % überein. Dies kann als Hinweis auf eine entscheidende Bedeutung dieses Bereichs für die Genexpression angesehen werden. Der Promoter des *NFI*-Gens beinhaltet eine sogenannte CpG-Insel, ist also sehr reich an Cytosin und Guanin, insbesondere in Form von

CpG-Dinukleotiden, und besitzt keine TATA-Box, was eine typische Konstellation für sogenannte Haushaltsgene („housekeeping genes“) ist [18]. Haushaltsgene werden konstitutiv in allen Zellen des Körpers unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert und kodieren typischerweise für Proteine mit essentieller Bedeutung für den Grundstoffwechsel der Zellen, wie zum Beispiel Enzyme des Energiestoffwechsels und viele Strukturproteine.

### 1.1.4 Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Seit der Identifizierung des *NF1*-Gens im Jahre 1990 wurden zahlreiche krankheitsverursachende Mutationen gefunden. Diese reichen vom Austausch einer einzelnen Base bis zum Verlust des gesamten Gens. Meist handelt es sich jedoch um kleine Mutationen, welche keine regionale Häufung zeigen, in den meisten Fällen aber zur Ausbildung eines verkürzten Proteins führen [55]. Insgesamt ist die *NF1*-Mutationsrate eine der höchsten im menschlichen Genom. Dies ist unter anderem durch die enorme Größe des Gens bedingt und führt dazu, dass etwa die Hälfte aller Erkrankungen nicht auf die Vererbung durch ein betroffenes Elternteil zurückzuführen ist.

Obwohl die Penetranz der Neurofibromatose Typ 1 praktisch 100 % beträgt, ist es aufgrund der erheblichen klinischen Variabilität jedoch nicht möglich, eine Aussage über den Verlauf oder die Schwere der Erkrankung zu treffen [55]. Zahlreiche Untersuchungen zu einem Zusammenhang bestimmter Mutationen mit einem Phänotyp blieben bisher ergebnislos und selbst Mitglieder einer Familie, deren Erkrankung die gleiche Mutation zugrunde liegt, zeigen mitunter sehr unterschiedliche stark ausgeprägte Symptome. Lediglich in zwei Fällen ließ sich eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation nachweisen: Zum Einen bedingen Mikrodeletionen, die das *NF1*-Gen und mehrere benachbarte Gene umfassen und bei 5-10 % aller Betroffenen vorkommen, einen „schwereren“ Phänotyp. Diese Patienten entwickeln charakteristischerweise frühzeitig eine hohe Anzahl an Neurofibromen, haben ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines MPNST und anderer bösartiger Tumore, leiden unter Dysmorphien, Lernschwierigkeiten und kardiovaskulären Malformationen und zeigen im Gegensatz zu *NF1*-Patienten mit kleinen Mutationen eine Tendenz zu übermäßigem Längenwachstum [72]. Andererseits ist eine 3-Basen-Deletion im Exon 17 (c.2970-2972delAAT) mit einem sehr milden Phänotyp assoziiert. Diese Patienten haben zwar Café-au-lait-Flecken und meist auch Freckling, jedoch keine kutanen Neurofibrome oder klinisch detektierbare plexiforme Neurofibrome [98]. Auch Lernschwierigkeiten, Makrozephalie, Minderwuchs und Brustkorbveränderungen werden bei ihnen deutlich seltener beobachtet.

### Variabler Phänotyp durch modifizierende Gene

Jedes benigne Neurofibrom sowie die malignen Tumore bei *NF1*-Patienten sind auf eine individuelle somatische *NF1*-Mutation im Wildtypallel und den damit verbundenen kompletten Verlust der Neurofibrominaktivität in der betroffenen Zelle zurückzuführen [91]. Auch in den Melanozy-

ten aus Café-au-lait-Flecken wurde die Inaktivierung des zweiten Allels nachgewiesen [17]. Da jedoch selbst NF1-Patienten mit der gleichen Keimbahnmutation mitunter sehr verschiedene klinische Phänotypen aufweisen, stellt sich die Frage, warum einige Betroffene offenbar mehr „second hits“ erleiden als andere. Zahlreiche Studien haben sich mit dieser Problematik beschäftigt und Hinweise auf die Existenz modifizierender Gene gefunden:

1) Untersuchungen an großen Kohorten von Familien mit mehreren NF1-Patienten haben gezeigt, dass eine signifikante familiäre Häufung nahezu aller Krankheitsmerkmale besteht. Dabei weisen monozygote Zwillinge, vor allem hinsichtlich der Anzahl von Café-au-lait-Flecken und benignen Neurofibromen, die stärkste Konkordanz auf, während sich die Ausprägung dieser Symptome mit abnehmender Verwandtschaftsnähe zweier Betroffener zunehmend unterscheidet [19, 81, 87].

Zusammen betrachtet sprechen diese Ergebnisse für einen oder mehrere genetisch determinierte „Modifizierer“ des Phänotyps der Neurofibromatose Typ 1, die vom *NF1*-Lokus unabhängig sind.

2) Unter der Annahme, dass bereits allein die Haploinsuffizienz des Neurofibromins einige der Charakteristika der NF1 bedingt, scheint eine veränderte Expression des Wildtypallels als Ursache für den variablen Phänotyp denkbar. Eine Analyse zur veränderten Expression durch SNPs („single nucleotide polymorphisms“) im Wildtypallel konnte jedoch keinen Zusammenhang zur Variabilität der NF1 nachweisen, was wiederum als Beleg für die Existenz anderer „Modifizierer“ gewertet werden kann [81]. Jedoch stellen auch epigenetische DNA-Modifikationen, wie die Methylierung von Cytosinen, eine Möglichkeit zur Beeinflussung der Genexpression dar und sind somit mögliche Ursachen für die klinische Variabilität der NF1 (Näheres hierzu im Kapitel 1.3.3).

Mehrere Gene wurden bereits als potenzielle „Modifizierer“ der NF1 identifiziert. So zeigten zum Beispiel die Gene *Nstr1* auf Chromosom 19 und *Nstr2* auf Chromosom 15 im Mausmodell einen schützenden Effekt hinsichtlich der Entwicklung von MPNSTs und Astrozytomen [106]. Desweiteren beeinflussen sogenannte „Mismatch Repair“-Gene die Tumorlast von NF1-Patienten (siehe hierzu auch Kapitel 1.2.3) und der Wachstumsfaktor GDNF modifiziert einen Phänotyp der NF1, der mit intestinaler neuronaler Dysplasie Typ B assoziiert ist [5]. Auch im Bereich der *NF1*-Mikrodeletion wurden mögliche modifizierende Gene nachgewiesen: *CENTA2*, *RAB11FIP4*, *C17orf79* und *UTP6* wirken auf die Entstehung von Neurofibromen [6].

## 1.2 Das „Mismatch Repair“-System

### 1.2.1 Die Funktion des „Mismatch Repair“-Systems

Das „Mismatch Repair“-System (MMR) ist ein evolutionär hoch konservierter DNA-Reparaturmechanismus. Es korrigiert Replikationsfehler, die dem Korrekturlesen der DNA-Polymerasen entgangen sind, sowie Fehlpaarungen bei der Rekombination und durch UV-Strahlung und andere DNA-schädigende Substanzen verursachte Defekte [43]. Ein Funktionsverlust der „Mismatch Repair“ erhöht die spontane Mutationsrate um das 50-1000fache und führt vor allem zum Austausch

einzelner Basen und zu „Frameshift“-Mutationen. Somatische MMR-Defizite sind somit Bestandteil der Tumorgenese vieler Gewebe, wohingegen eine heterozygote Keimbahnmutation Ursache des Lynch-Syndroms (Hereditäres non-polipöses Kolonkarzinom-Syndrom = HNPCC) ist.

Das am besten charakterisierte „Mismatch Repair“-System ist das von *Escherichia coli*, welches als Grundlage für die Einteilung und Benennung der einzelnen Komponenten dient. Die beim Menschen gefundenen MutS- und MutL-Homologe liegen in Heterodimeren vor. Ihre bedeutendsten Vertreter sind im Folgenden wiedergegeben:

MutS $\alpha$	MSH2 - MSH6	korrigiert Basenfehlpaarungen und Insertionen/Deletionen bis zu > 10 Basenpaare
MutS $\beta$	MSH2 - MSH3	korrigiert Insertionen/Deletionen von 2 bis 10 Basenpaaren
MutL $\alpha$	MLH1 - PMS2	unterstützt die Initiation der Reparatur durch MutS-Homologe
MutL $\beta$	MLH1 - PMS1	Funktion ungewiss

### 1.2.2 Das „Constitutional Mismatch Repair-Deficiency Syndrome“

In den letzten Jahren wurden zunehmend Fallberichte von Patienten veröffentlicht, die unter Keimbahnmutationen in beiden Allelen eines der „Mismatch Repair“-Gene litten. Während heterozygote MMR-Mutationen zum Lynch-Syndrom führen, erkrankten diese Patienten bereits in der frühen Kindheit an malignen Erkrankungen und präsentierten unter anderem klinische Zeichen der Neurofibromatose Typ 1. Wimmer und Etzler prägten für dieses Krankheitsbild den Begriff „Constitutional Mismatch Repair-Deficiency (CMMR-D) Syndrome“ [114]. Sie identifizierten in ihrer Literaturrecherche 78 betroffene Patienten aus 46 Familien, von denen 17 die NF1-Diagnosekriterien erfüllten. Eine *NF1*-Mutation konnte bisher jedoch erst bei einem Patienten mit CMMR-D-Syndrom nachgewiesen werden (Fall II-2) [2].

Die Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die bisher identifizierten Patienten mit CMMR-D-Syndrom und bestätigtem Vorhandensein klinischer Zeichen der NF1. Dies sind insgesamt 63 Patienten aus 38 Familien, von denen 18 die NF1-Diagnosekriterien erfüllen. Patienten mit Mutationen im *MLH1*-Gen erkranken bereits im frühen Kindesalter. Sie entwickeln hämatologische Erkrankungen sowie Hirn- und gastrointestinale Tumoren und weisen oftmals mehrere Merkmale der Neurofibromatose Typ 1 auf. Auch Patienten mit *MSH2*-Mutationen fallen frühzeitig durch maligne Erkrankungen auf, die NF1-Symptome beschränken sich meist jedoch auf das Vorhandensein von Café-au-lait-Flecken. Kinder mit konstitutionellem Verlust von MSH6 entwickeln besonders häufig Hirntumore und präsentieren Pigmentveränderungen wie Café-au-lait-Flecken und Freckling. Die größte Gruppe, die etwa die Hälfte der hier aufgeführten Fälle beinhaltet, bil-



## 1. Einleitung

Patient	Alter	Gen	maligne Erkrankung	NF1-Merkmale	Quelle	
I	1	2 J.	MLH1	NHL	multiple CALF, Pseudarthrose	[7],
	2	6 J.	MLH1	AML, Medulloblastom	9 CALF, multiple dermale NF	[107]
II	1	3 J.	MLH1	NHL	>10 CALF	[2],
	2	1 J.	MLH1	atypische CML	>10 CALF, 2 kutane NF	[78]
III	1	4 J.	MLH1	Gliom	CALF, Freckling	[99]
IV	1	11 J.	MLH1	Duodenum-Ca	mehrere CALF	[29]
	2	9 J.	MLH1	Kolon-Ca	3 CALF, Freckling, 1 Lisch	
	3	6 J.	MLH1	bisher keine	8 CALF, 1 Lisch, 1 plex. NF	
V	1	6 J.	MLH1	bisher keine	CALF, 1 NF	[77]
VI	1	4 J.	MLH1	Glio-, Nephroblastom	>6 CALF	[76]
VII	1	2 J.	MSH2	T-ALL	multiple CALF	[111]
VIII	1	11 J.	MSH2	Kolon-Ca	multiple CALF	[65]
	2	12 J.	MSH2	Kolon-Ca	multiple CALF	
IX	1	0,4 J.	MSH2	T-Zell-NHL	CALF	[83]
	2	2 J.	MSH2	T-Zell-NHL	CALF	
	3	2 J.	MSH2	T-Zell-NHL	CALF	
X	1	13 J.	MSH2	Astrozytom	vorhanden	[93]
	2	14 J.	MSH2	Astrozytom, Rektum-Ca	multiple CALF, Freckling	
XI	1	10 J.	MSH6	Oligodendrogliom, Rektum-Ca	6 CALF	[62]
XII	1	5 J.	MSH6	Lymphom, Kolon-Ca	8 CALF, Freckling	[37]
	2	8 J.	MSH6	Glioblastom	6-8 CALF, Freckling fraglich	
XIII	1	9 J.	MSH6	Astrozytom, Lymphom	>6 CALF, Freckling	[71]
	2	2 J.	MSH6	Glioblastom	multiple CALF, Freckling	
XIV	1	19 J.	MSH6	Rektum-Ca, Endometrium-Ca	wenige CALF	[75]
XV	1	7 J.	MSH6	Medulloblastom, AML, Kolon-Ca	CALF	[84]
XVI	1	8 J.	MSH6	Medulloblastom	multiple CALF	[76]
	2	4 J.	MSH6	NHL, Oligodendrogliom	multiple CALF	
XVII	1	7 J.	MSH6	Glioblastom	multiple CALF	[4]
	2	9 J.	MSH6	dysplast. Kolon-Polypen	multiple CALF, Lisch	
XVIII	1	6 J.	MSH6	Medulloblastom, AML	CALF	[21]
	2	9 J.	MSH6	Glioblastom	CALF	
XIX	1	8 J.	MSH6	T-Zell-Lymphom	CALF, Lisch fraglich	[73]
XX	1	4 J.	PMS2	Glioblastom, Kolon-Ca, B-Zell-Lymphom	CALF	[34], [90]
	2	14 J.	PMS2	Rektum-Ca	CALF	
XXI	1	16 J.	PMS2	Kolon-Ca, Ovarialtumor, Endometrium-Ca	6 CALF	[94]
	2	7 J.	PMS2	Astrozytom	multiple CALF	
	3	4 J.	PMS2	ALL	multiple CALF	
XXII	1	17 J.	PMS2	Kolon-Ca, Glioblastom	CALF	[1]
XXIII	1	10 J.	PMS2	B-Zell-NHL	CALF	[103], [104]
	2	8 J.	PMS2	SPNET	CALF	
	3	14 J.	PMS2	SPNET	CALF	

Patient	Alter	Gen	maligne Erkrankung	NF1-Merkmale	Quelle	
XXIV	1	2 J.	PMS2	Leukämie, Kolon-Ca	CALF	[104]
XXV	1	8 J.	PMS2	SPNET	CALF	[104]
	2	4 J.	PMS2	SPNET	CALF	
XXVI	1	15 J.	PMS2	Gliom	CALF	[104]
	2	15 J.	PMS2	ALL	CALF	
	3	6 J.	PMS2	Glioblastom	CALF	
XXVII	1	6 J.	PMS2	ALL	CALF	[104]
XXVIII	1	20 J.	PMS2	Kolon-Ca, Endometrium-Ca	CALF	[4]
XXIX	1	23 J.	PMS2	Kolon-, Duodenum-Ca	CALF, Dysmorphien, mentale Retardierung	[113]
XXX	1	10 J.	PMS2	Glioblastom	CALF	[21]
XXXI	1	14 J.	PMS2	Kolon-Ca	multiple CALF	[44]
XXXII	1	13 J.	PMS2	Kolon-Ca	multiple CALF, Freckling	[53]
	2	10 J.	PMS2	T-Zell-NHL, Kolon-Ca	multiple CALF	
XXXIII	1	6 J.	PMS2	Glioblastom, Urothel-, Dünndarm-, Kolon-Ca	multiple CALF	[53]
	2	6 J.	PMS2	Glioblastom	multiple CALF	
XXXIV	1	7 J.	PMS2	Medulloblastom, Kolon-Ca	vorhanden	[85]
XXXV	1	15 J.	PMS2	Kolon-Ca	multiple CALF	[89]
	2	8 J.	PMS2	Glioblastom	multiple CALF	
XXXVI	1	6 J.	PMS2	Lymphom, Kolon-Ca	multiple CALF	[51]
	2	9 J.	PMS2	SPNET	CALF	
XXXVII	1	3 J.	PMS2	Rhabdomyosarkom, Kolon-Ca	mehrere CALF	[52]
XXXVIII	1	22 J.	PMS2	Kolon-Ca	multiple CALF	[52]

**Tabelle 1.1: CMMR-D-Patienten mit NF1-Symptomen**

Römische Ziffern kennzeichnen Familien. Für jeden Patienten sind das Alter bei Diagnosestellung der ersten malignen Erkrankung beziehungsweise zum Zeitpunkt der Untersuchung in Jahren (J.), alle bei ihm diagnostizierten malignen Erkrankungen (ALL = akute lymphatische Leukämie; T-ALL = akute T-Zell-Leukämie; AML = akute myeloische Leukämie; CML = chronisch-myeloische Leukämie; NHL = Non-Hodgkin-Lymphom; SPNET = supratentorieller primitiver neuroektodermaler Tumor; Ca = Karzinom; dysplast. = dysplastische) sowie die dokumentierten NF1-Merkmale (CALF = Café-au-lait-Flecken; NF = Neurofibrom; plex. NF = plexiformes Neurofibrom) angegeben.

den jedoch diejenigen Patienten mit Veränderungen im *PMS2*-Gen. Sie erkranken im Durchschnitt später und nach erfolgreicher Therapie oft erneut an Tumoren anderer Entitäten, während Betroffene mit Mutationen in einem der anderen „Mismatch Repair“-Gene meist bereits an der ersten malignen Erkrankung versterben. Besonders auffällig ist das gehäufte und auf diese Gruppe beschränkte Auftreten supratentorieller primitiver neuroektodermaler Tumoren (SPNET).

### 1.2.3 MMR-Gene als „Modifizierer“ der Neurofibromatose Typ 1

Die Rolle des „Mismatch Repair“-Systems bei der Entstehung von Neurofibromen ist bisher nur wenig untersucht. Maertens et al. detektierten in Neurofibromen eine hohe Rate an „Frameshift“-Mutationen, was als Hinweis auf eine verminderte MMR-Funktion angesehen werden kann [60]. Darüber hinaus wiesen sie bei NF1-Patienten mit vielen Neurofibromen unerwartet häufig einen Polymorphismus im *MSH2*-Gen nach, der sich möglicherweise auf die Genexpression oder die Proteinaktivität auswirkt. Wiest et al. beobachteten ein vermehrtes Auftreten von Punktmutationen als „second hit“ in Neurofibromen, möglicherweise bedingt durch MMR-Defekte [112], und Wang et al. zeigten, dass das *NF1*-Gen in „Mismatch Repair“-defizienten Zellen ein bevorzugtes Ziel für Mutationen darstellt [108]. Bisher gibt es allerdings bis auf eine Ausnahme (II-2) keine Berichte über konstitutionelle MMR-Mutationen bei NF1-Patienten [2, 60, 108, 114].

## 1.3 Die DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung, also das Anhängen einer Methylgruppe an das C5 von Cytosin, ist neben der Histon-Modifizierung der bedeutendste Mechanismus der Epigenetik. Diese beschreibt Zelleigenschaften, die mitotisch und meiotisch vererbt werden, jedoch nicht in der Basensequenz der DNA kodiert sind.

### 1.3.1 Verteilung und Funktion der DNA-Methylierung im menschlichen Genom

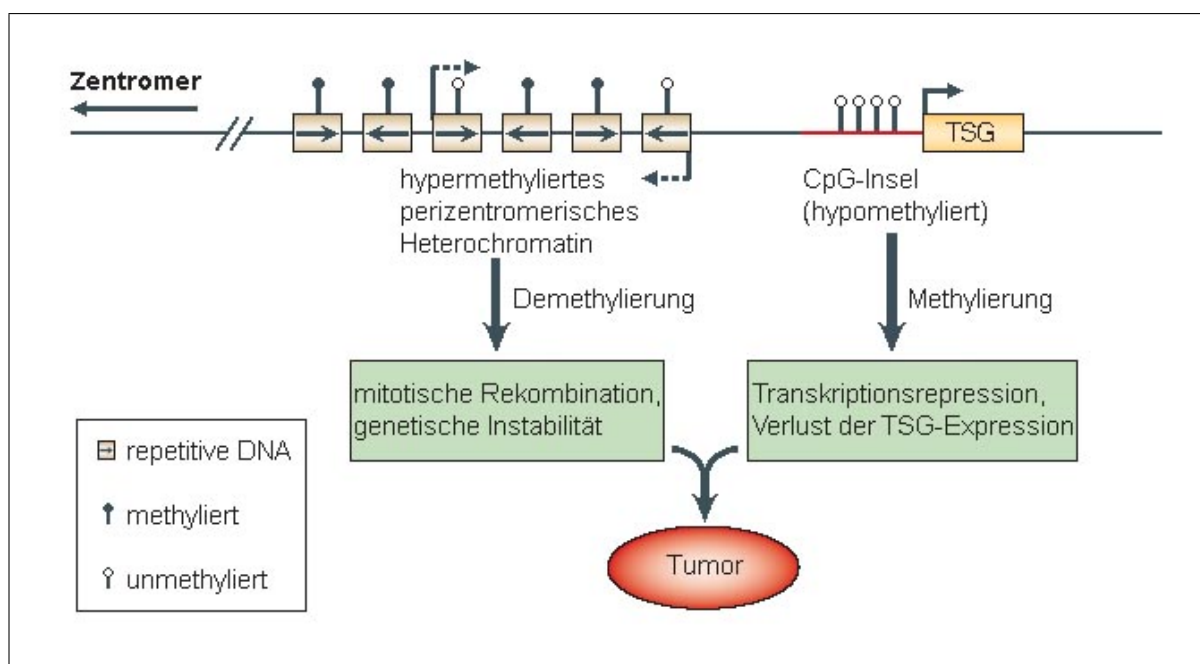
Beim Menschen findet DNA-Methylierung ausschließlich an Cytosinen, vorrangig an solchen in CpG-Dinukleotiden, statt [45]. Diese sind jedoch nicht wahllos über das Genom verteilt, sondern liegen häufig in Clustern vor. Diese sogenannten CpG-Inseln sind definiert als mehr als 500 Basenpaare umfassende DNA-Abschnitte mit einem Gehalt an Cytosin und Guanin von mindestens 55 % und einem beobachteten / erwarteten CpG-Anteil von 0,65 [88]. Etwa die Hälfte aller Gen-Promotoren sind Bestandteil einer CpG-Insel und in der Regel hypomethyliert. Im restlichen Genom sind CpG-Dinukleotide hingegen deutlich unterrepräsentiert und meist hypermethyliert. Epigenetische Mechanismen sind essentiell für die Entwicklung und Differenzierung eines Organismus. Denn obwohl der Genotyp in allen Zellen eines Organismus gleich ist, werden gewebsspezifisch sehr verschiedene Gene exprimiert, was zum Teil auf die Entdeckung unterschiedlicher Methylierungsmuster in Zellen differenzierter Gewebe zurückgeführt wird [70]. Durch Prozesse wie die X-Inaktivierung, das Imprinting und die Aktivierung beziehungsweise Inaktivierung einzelner Gene in den verschiedenen Geweben determiniert die DNA-Methylierung auch die Ausbildung eines bestimmten Phänotyps. Weiterhin spielt sie eine zentrale Rolle beim Erhalt genomischer Stabilität sowie der Fixierung von Retrotransposons.

Um den Einfluss epigenetischer Veränderungen auf die Ausbildung eines Phänotyps zu beurteilen,

eignen sich besonders Untersuchungen an Zwillingen. Denn obwohl monozygote Zwillinge genetisch identisch sind, unterscheiden sie sich in manchen Merkmalen, wie zum Beispiel in der Neigung zu bestimmten Erkrankungen [27]. Diese Diskordanz lässt sich möglicherweise durch abweichende epigenetische Veränderungen erklären. So konnte bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden, dass auch monozygote Zwillinge deutliche Unterschiede in der DNA-Methylierung und in der Histon-Modifikation aufweisen, was belegt, dass das epigenetische Profil zumindest teilweise unabhängig von der DNA-Sequenz determiniert wird [27, 47]. Dizygote Zwillinge unterscheiden sich dabei deutlicher voneinander als monozygote, wobei die Varianz auch bei monozygoten Zwillingen mit steigendem Lebensalter und bei längerer Trennung eines Paares zunimmt. Dies untermauert zum Einen die Plastizität des Epigenoms und zum Anderen seine Beeinflussbarkeit durch Umweltfaktoren. Auch geschlechtsspezifische Methylierungsunterschiede wurden bereits beobachtet [8]. Insgesamt zeigen funktionell bedeutsame DNA-Abschnitte größere Ähnlichkeit im Methylierungsmuster als Loci ohne eindeutig definierte regulatorische Funktion, was auf eine übergeordnete Rolle der Epigenetik hinweist [47]. So ließen sich beispielsweise bei einem monozygoten Zwillingpaar, das diskordant für das Syndrom der kaudalen Duplikation war, signifikante Methylierungsunterschiede im Promotor des an der Entstehung der Anomalie beteiligten *AXIN1*-Gens nachweisen [69]. In einem anderen Fall ergab sich ein Zusammenhang zwischen der vermehrten Expression von *PPIEL* durch Demethylierung und der Entwicklung einer bipolaren Persönlichkeitsstörung [54].

### 1.3.2 Aberrante DNA-Methylierung als Komponente der Tumorgenese

Entartete Zellen können gegenüber ihrem unveränderten Pendant eine globale Hypomethylierung mit regionaler Hypermethylierung von CpG-Inseln zeigen [45]. Beide Mechanismen, dargestellt in Abbildung 1.2, sind frühzeitige Ereignisse in der Karzinogenese und somit nicht als Folge, sondern vielmehr als Ursache dieser anzusehen [79]. Die verminderte Methylierung führt dabei zu genomischer Instabilität, was weitere DNA-Veränderungen nach sich zieht. Die Methylierung der Promotoren von Tumorsuppressorgen bedingt wiederum eine Reduktion von deren Expression und dadurch ein unkontrolliertes Zellwachstum. So konnte bereits gezeigt werden, dass die „Mismatch Repair“-Gene *MLH1* und *MSH2* in malignen Tumoren durch Promotormethylierung vermindert transkribiert werden [40, 97]. Weiterhin ist in Tumorzellen ein Verlust des auf DNA-Methylierung zurückzuführenden Imprintings, also der unterschiedlichen Expression mütterlicher und väterlicher Allele bestimmter Gene, zu beobachten. Dies kann einerseits über die Aktivierung eines ausgeschalteten Allels eines wachstumsfördernden Gens und andererseits durch Inaktivierung eines wachstumshemmenden Gens wiederum zu einer potenzierten Zellproliferation führen und damit die Tumorentstehung fördern [79].



**Abbildung 1.2: DNA-Methylierung und Tumorentstehung**

Die Abbildung zeigt einen hypermethylierten repetitiven DNA-Abschnitt sowie ein aktiv transkribiertes Tumorsuppressorgen (TSG) mit seinem hypomethylierten Promotor. In Tumorzellen wird repetitive DNA demethyliert, was zu genomischer Instabilität führt, und das Tumorsuppressorgen wird durch Methylierung seines Promotors vermindert exprimiert. Quelle: [79]

### 1.3.3 DNA-Methylierung im *NF1*-Gen

Der Promotor des *NF1*-Gens enthält eine konstitutionell hypomethylierte CpG-Insel, deren flankierende Regionen methyliert sind [61, 80]. Eine Untersuchung der Exons 28, 29 und 31 zeigte, dass die Methylierung hier fast ausschließlich an CpG-Dinukleotiden stattfindet und auch ein CpG betrifft, welches bereits bei mehreren Patienten krankheitsverursachend mutiert war (C5839T) [3]. Dies führte zu der Vermutung, dass methylierte CpG-Dinukleotide im *NF1*-Gen ein Reservoir für potentielle C→T-Mutationen darstellen und somit eine Erklärung für die hohe Rate an Neumutationen sein könnten. Schließlich entsteht durch oxidative Desaminierung eines methylierten Cytosins die Base Thymin, die von den DNA-Reparaturmechanismen in manchen Fällen nicht als Fehler erkannt wird. Demgegenüber wird das durch Desaminierung eines unmethylierten Cytosins gebildete Uracil im Regelfall schnell wieder durch ein Cytosin ersetzt.

Im *NF1*-Promotor wurden bereits mehrere methylierungssensitive Transkriptionsfaktorbindungsstellen identifiziert. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Methylierung der Erkennungssequenzen von CREB (Position -16 bis -9) und SP1 (Position -141 bis -136) die Bindung der entsprechenden Proteine behindert [61]. Methylierungen einzelner bedeutender Elemente im *NF1*-Promotor, wie CRE, SRE und AP2, wurden auch in *NF1*-assoziierten Tumoren gefunden [35]. Im Luziferase-Assay konnte sogar gezeigt werden, dass die Methylierung des proximalen *NF1*-Promotors die Genexpression inhibiert [115].

Da zur Entstehung NF1-assoziiierter Tumoren ein somatischer „second hit“ im *NF1*-Gen notwendig ist, jedoch nur in einem geringen Prozentsatz dieser Tumoren eine Mutation gefunden wurde, wird die Möglichkeit einer sogenannten Epimutation als Ursache diskutiert. Mehrere Untersuchungen konnten jedoch bisher keine Inaktivierung des *NF1*-Gens durch Hypermethylierung seines Promotors in NF1-assoziierten Tumoren nachweisen [20, 26, 35, 39, 58]. Man findet DNA-Methylierung hier lediglich an einzelnen Cytosinen wie auch im Bereich von Transkriptionsfaktorbindungsstellen, was zu einer verminderten Expression des *NF1*-Gens führen könnte [26, 35].

Die unterschiedliche DNA-Methylierung in bestimmten Regionen des *NF1*-Promotors, die zu einer veränderten Expression führt, stellt somit eine mögliche Erklärung für die enorme klinische Variabilität der Neurofibromatose Typ 1 dar.

## 2 Aufgabenstellung

Die Neurofibromatose Typ 1 (NF1) ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, die durch eine Mutation im *NF1*-Gen auf dem langen Arm des Chromosom 17 (17q11.2) verursacht wird und mit einer Inzidenz von etwa 1:3.500 zu den häufigsten genetischen Erkrankungen gehört. Pigmentauffälligkeiten wie Café-au-lait-Flecken, Freckling und Lisch-Knötchen sowie benigne und maligne Tumoren wie Neurofibrome, maligne periphere Nervenscheidentumore (MPNST) und Optikusgliome stellen die Hauptsymptome der NF1 dar. Trotz vollständiger Penetranz der Erkrankung ist bisher keine Prognose zu ihrem Schweregrad bei einem bestimmten Patienten möglich, da das klinische Erscheinungsbild einer enormen Variabilität unterliegt. Lediglich Patienten mit einer großen Deletion des gesamten *NF1*-Gens sowie angrenzender DNA-Abschnitte (Mikrodeletion) und jene mit einer 3-Basen-Deletion im Exon 17 (c.2970-2972delAAT) bilden hierbei Ausnahmen. Erstere leiden charakteristischerweise unter einem schwereren Phänotyp, während letztere durch ein sehr mildes Krankheitsbild auffallen. In der Mehrzahl der Fälle jedoch findet sich keine Genotyp-Phänotyp-Korrelation. Selbst bei Mitgliedern einer Familie, deren Erkrankung die gleiche Mutation zugrunde liegt, sind sehr unterschiedliche Verläufe zu beobachten. Monozygote Zwillinge zeigen dabei eine stärkere Konkordanz als entferntere Verwandte, was zu der Annahme geführt hat, dass die klinische Variabilität der Neurofibromatose Typ 1 durch modifizierende Gene verursacht wird. Als solche wurden Nahe des *NF1*-Gens bereits die Gene *CENTA2*, *RAB11FIP4*, *C17orf79* und *UTP6* identifiziert. Ungekoppelte potentielle „Modifizierer“ sind *Nstr1*, *Nstr2*, die „Mismatch Repair“-Gene (MMR) sowie der Wachstumsfaktor GDNF.

Das MMR-System ist ein DNA-Reparaturmechanismus, der die Fehler der DNA-Polymerasen korrigiert. Heterozygote MMR-Keimbahnmutationen verursachen das Lynch-Syndrom (Hereditäres non-polipöses Kolonkarzinom-Syndrom = HNPCC). Keimbahnmutationen, die zum Funktionsverlust beider Allele eines MMR-Gens führen, bedingen hingegen das erst in den letzten Jahren identifizierte „Constitutional Mismatch Repair-Deficiency (CMMR-D) Syndrome“, welches sich durch das Auftreten maligner Erkrankungen bereits im frühen Kindesalter und das Vorhandensein klinischer Merkmale der NF1 auszeichnet. Sowohl der Nachweis, dass das *NF1*-Gen bei MMR-Defizienz ein bevorzugtes Ziel für Mutationen darstellt, als auch die Beobachtung einer hohen Rate an für eine reduzierte DNA-Reparatur typischen Mutationen in Neurofibromen von NF1-Patienten haben zu der Ansicht geführt, dass MMR-Gene mögliche „Modifizierer“ des Phänotyps der NF1 sind. Eine konstitutionelle Keimbahnmutation in einem der MMR-Gene wurde bisher zwar nur bei einem NF1-Patienten gefunden, jedoch ist auch eine Geninaktivierung durch epigenetische Veränderungen denkbar.

Neben der Histon-Modifikation ist die DNA-Methylierung der bedeutenste Mechanismus der Epigenetik, also der erblichen DNA-Veränderungen, die nicht die Basensequenz betreffen. Sie findet beim Menschen ausschließlich an Cytosinen und bevorzugt an CpG-Dinukleotiden, welche im

Genom unterrepräsentiert sind, statt. Lediglich in sogenannten CpG-Inseln findet man die zu erwartende Menge an CpGs. Diese sind häufig im Bereich von Genpromotoren lokalisiert und im Gegensatz zum restlichen Genom hypomethyliert. Die DNA-Methylierung hat eine entscheidende Bedeutung für die X-Inaktivierung, das Imprinting, die Aktivierung beziehungsweise Inaktivierung einzelner Gene sowie für den Erhalt der genomischen Stabilität. Darüber hinaus wird sie als möglicher Mechanismus diskutiert, der bei monozygoten Zwillingen zur Ausprägung verschiedener Merkmale trotz identischer DNA-Sequenz führt. Auch in den Prozess der Entstehung maligner Erkrankungen scheint die DNA-Methylierung involviert zu sein. So findet sich in Tumoren häufig eine globale Hypomethylierung mit regionaler Hypermethylierung von CpG-Inseln. In einigen malignen Tumoren wurde sogar eine verminderte Transkription der MMR-Gene *MLH1* und *MSH2* bedingt durch die Methylierung ihrer Promotoren nachgewiesen. Auch im *NF1*-Promotor konnten bereits methylierungssensitive Transkriptionsfaktorbindungsstellen identifiziert und eine Reduktion der Genexpression durch Methylierung des proximalen Promotors belegt werden. In *NF1*-assoziierten Tumoren fand sich zwar keine Hypermethylierung des *NF1*-Promotors, dafür jedoch eine selektive Methylierung einzelner Cytosine im Bereich von Transkriptionsfaktorbindungsstellen, die eine verminderte Genexpression zur Folge haben könnten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte nun zum Einen untersucht werden, ob die konstitutionelle MMR-Promotormethylierung einen potentiellen „Modifizierer“ der *NF1* darstellt, indem es durch eine verminderte DNA-Reparatur zu einer vermehrten Anzahl an somatischen *NF1*-Mutationen und damit zur Entstehung vieler Neurofibrome kommt. Mittels Methylierungsspezifischer PCR und Pyrosequenzierung wurde hierfür ein möglicher Zusammenhang zwischen der Promotormethylierung der MMR-Gene *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* und *PMS2* und der Anzahl der Neurofibrome von *NF1*-Patienten geprüft. In einem zweiten Versuchsansatz sollte evaluiert werden, ob Methylierungen im *NF1*-Promotor Auswirkungen auf die klinische Variabilität der *NF1* haben. Um eine Verfälschung der Ergebnisse (Confounding) durch DNA-Sequenzvariationen auszuschließen wurde diese Untersuchung anhand der DNA von eineiigen Zwillingen, die an *NF1* erkrankt waren, durchgeführt.

Die Suche nach potenziellen „Modifizierern“ der Neurofibromatose Typ 1 ist in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der *NF1*-Forschung gerückt. Durch ihre Identifizierung wären nicht nur genauere Aussagen hinsichtlich des zu erwartenden Schweregrades der Erkrankung bei einzelnen Patienten möglich, sondern auch eine damit einhergehende Individualisierung von Vorsorgeuntersuchungen bei Betroffenen. Zusätzlich ergäben sich vielleicht sogar neue Therapieansätze für Patienten mit einem zu erwartendem schwereren Phänotyp.



## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

*Chemikalien:*

<b>Produktname</b>	<b>Herstellerfirma</b>
Agarose, For Routine Use	Sigma
Agarose, Top Vision LM GQ	Fermentas
Ampicillin (100 mg/ml)	Sigma
Annealing Buffer	Biotage
Aqua ad iniectabilia	Braun
Bacto Agar	Difco Laboratories
Bacto Tryptone	Difco Laboratories
Bacto Yeast Extract	Difco Laboratories
Betaine Solution 5M	Sigma
Binding Buffer	Biotage
Borsäure	Merck
CpG Methylated Jurkat Genomic DNA	New England Biolabs
CpGenome Universal Unmethylated DNA Set	Chemicon
dATP (100 mM)	Fermentas
Denaturation Solution	Biotage
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Finnzymes
EDTA 99,9+%	Sigma
Ethanol 99,5%	Sigma
Ethidiumbromid Lösung 1% in Wasser	Serva Electrophoresis
Hydroquinone	Sigma
IPTG, Ultra Pure	Invitrogen
6x Loading Dye Solution	Fermentas
Mineralöl	Sigma
Natriumacetat wasserfrei 99,99 Suprapur	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid Plätzchen reinst	Merck
Natronlauge 1 mol/l (1N)	Merck
PCR-Mastermix 2x	Promega
peqGOLD PCR Master-Mix Y	Peqlab
Salzsäure 1M	Merck

### 3. Material und Methoden

Produktname	Herstellerfirma
Sodium Metabisulfite, ACS Reagent	Sigma
50x TAE-Puffer	AppliChem
Trizma base (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Sigma
X-Gal Solution (20 mg/ml)	Fermentas

#### Enzyme:

Produktname	Herstellerfirma
AmpliTaq DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	Applied Biosystems
EcoR I, NEBuffer EcoR I	New England Biolabs

#### DNA-Größenstandards:

Produktname	Herstellerfirma
<i>GeneRuler</i> <sup>TM</sup> 100 bp DNA Ladder	Fermentas
<i>GeneRuler</i> <sup>TM</sup> Express DNA Ladder	Fermentas
O'RangeRuler 20 bp DNA Ladder	Fermentas

#### Kits:

Produktname	Herstellerfirma
Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
EZ Methylation-Gold Kit	Zymo Research
HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen
Invisorb Spin Plasmid Mini Two	Invitek
Pyro Gold Reagents Kit	Biotage
QIAquick GEL Extraction Kit	Qiagen
Taq PCR Core Kit	Qiagen
TOPO TA Cloning Kit pCR 2.1-TOPO mit TOP 10F' -Zellen	Invitrogen

#### Verbrauchsmaterialien:

Produktname	Herstellerfirma
Drigalskispatel	neoLab
Einmal-Skalpelle, steril	neoLab
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems
MicroAmp Full Plate Cover	Applied Biosystems
Petrischalen	Satstedt
PQS 96 Plate Low	Biotage
Reagenz- und Zentrifugenröhren	Sarstedt
Reaktionsgefäße, verschiedene Größen	Biozym

### 3. Material und Methoden

<b>Produktname</b>	<b>Herstellerfirma</b>
PCR Tubes Ultradünn 0,2 ml (8er Strips), Deckel	Biozym
diverse Pipetten und Spitzen	Eppendorf
Transferpipetten	Sarstedt

#### Technische Geräte:

<b>Produktname</b>	<b>Herstellerfirma</b>
Analysewaage Analytical Plus AP250E	Ohaus
Biofuge <i>fresco</i>	Heraeus Instruments
Eismaschine	Ziegra
Elektrophoresekammer Sub-Cell GT	BioRad
Fireboy plus	INTEGRA Biosciences
Laboklav	SHP Steriltechnik AG
Magnetic Stirrer L-32	Labinco
Magnetic Shaker Monoshake	Variomag
Microcomputer Electrophoresis Power Supply E802	Consort
Mikrowelle	Sharp
Milli-Q Integral Water Purification System	Millipore
Multifuge 3SR Plus	Heraeus
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab
pH-meter HI 9321	Hanna Instruments
Präzisionswaage SBA 51	ScalTec
PyroMark Vakuum PrepTool	Biotage
Pyrosequencer PSQ96MA	Biotage
Reagenzglas-Rotator 3025	GFL
Reax Top	Heidolph
Sequencer 3730 DNA Analyzer	Applied Biosystems
Sterilbank LaminAir HBB 2448	Heraeus Instruments
Thermocycler $T_{GRADIENT}$	Biometra
Thermomixer comfort	Eppendorf
Transilluminator, UV-Systeme	INTAS
Universalschüttler SM30, Inkubationshaube TH30	Edmund Bühler GmbH
Waage SBA51	ScalTec
Wärmeschrank Function Line	Heraeus Instruments
Wasserbad 1002	GFL

Software:

Produktname	Herstellerfirma
Gene Tools	SynGene
PSQ 96 MA 2.1	Biotage
SeqMan	DNASTAR
SSPS für Windows 16.0	SSPS, München

## 3.2 Patienten

### 3.2.1 Untersuchung der Promotoren von MMR-Genen mittels MSP und Pyrosequenzierung

*NF1-Patienten:*

Insgesamt wurde die DNA von 79 erwachsenen, untereinander nicht verwandten NF1-Patienten (29 Männer und 50 Frauen) untersucht, die anhand der Anzahl ihrer Neurofibrome zwei Subgruppen zugeteilt wurden: 40 Patienten (14 Männer und 26 Frauen) mit wenigen Neurofibromen (0-60) und 39 Patienten (15 Männer und 24 Frauen) mit vielen Neurofibromen (112-2200).

Die Diagnose der Neurofibromatose Typ 1 wurde bei allen Patienten klinisch anhand der NIH-Kriterien gestellt. Die Auszählung der Neurofibrome erfolgte durch zwei Ärzte, die mit der Erkrankung sehr vertraut sind. Hierbei wurden am entkleideten Patienten alle sicht- oder tastbaren intrakutanen, subkutanen und plexiformen Neurofibrome gezählt und dokumentiert. Bis zu 100 Neurofibrome wurden einzeln gezählt; bei einer größeren Menge an Tumoren erfolgte die Berechnung der Neurofibromzahl nach Auszählung eines definierten Areals am Körperstamm. Vorder- und Rückseite des Stammes wurden dabei einzeln evaluiert; an den Extremitäten wurde stets exakt ausgezählt. Zusätzlich konnte bei 73 Patienten die zugrunde liegende Keimbahnmutation im *NF1*-Gen nachgewiesen werden. Patienten mit großen Deletionen wurden aus der Studie ausgeschlossen. Mosaik lagen klinisch nicht vor.

*Kontrollgruppe:*

Als Kontrollen dienten 79 erwachsene, nicht verwandte, gesunde Kontrollprobanden (40 Männer und 39 Frauen). Jeweils die Hälfte von ihnen diente als Kontrollgruppe für die Methylierungsspezifische PCR (20 Männer und 19 Frauen) und für die Pyrosequenzierung (20 Männer und 20 Frauen).

*Tumore von NF1-Patienten:*

Darüber hinaus wurde aus Tumoren von NF1-Patienten extrahierte DNA für das Screening mittels Methylierungsspezifischer PCR herangezogen. Insgesamt wurden 38 Proben aus 33 Tumoren (10 kutane Neurofibrome, 8 plexiforme Neurofibrome, 11 MPNSTs und 4 Astrozytome) von 25 Patienten untersucht.

#### 3.2.2 Untersuchung des Methylierungsmusters des *NF1*-Promotors bei eineiigen Zwillingen

Dieses Patientenkollektiv umfasste 9 von der *NF1* betroffene, eineiige Zwillingspaare. Alle Patienten bis auf Zwilling 14 (Paar G) erfüllten die *NF1*-Diagnosekriterien der NIH. Bei einem Patienten (Zwilling 12) genügte das zur Verfügung gestellte DNA-Material nicht, um den *NF1*-Promotor hinreichend zu untersuchen, so dass das Paar F aus der weiteren Auswertung herausgenommen wurde. Die klinischen Daten der verbliebenen Paare sind der Tabelle 3.1 zusammengestellt. Die Altersangabe gibt dabei das Alter der Zwillinge zum Zeitpunkt der Blutabnahme an. Für jedes Krankheitsmerkmal wurde notiert, ob es innerhalb eines Zwillingspaars konkordant (K) oder diskordant (D) ausgeprägt ist. Diskordanz hinsichtlich Lisch-Knötchen, Freckling, plexiformen Neurofibromen, Optikusgliom und Skoliose wurde definiert als Vorkommen des entsprechenden Merkmals bei nur einem Zwilling eines Paares. Bezüglich der Café-au-lait-Flecken (CALF) sowie der intrakutanen und subkutanen Neurofibrome (NF) wurde der Vergleichswert  $\Delta Nf = (Nf_1 - Nf_2) / Nf_1$  ( $Nf_1$ : höhere Anzahl an CALF beziehungsweise NF;  $Nf_2$ : niedrigere Anzahl an CALF beziehungsweise NF) definiert. Bei Fehlen des eines Merkmals wurde „0“ durch einen geringfügig größeren Wert ersetzt, um den Term berechnen zu können.  $\Delta Nf$ -Werte von 0 stehen für völlige Konkordanz, Werte von 1 für maximale Diskordanz bezüglich des betreffenden Merkmals.

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Herstellung der verwendeten Lösungen

##### *0,5 M EDTA, pH 8:*

186,1 g EDTA und 20 g NaOH Pellets werden mit Aqua bidest auf circa 700 ml aufgefüllt. Der pH wird gegebenenfalls auf 8,0 eingestellt und die Lösung mit Aqua bidest auf 1000 ml aufgefüllt.

##### *IPTG-Lösung:*

238 mg IPTG werden in 10 ml Aqua ad iniectabilia gelöst.

##### *Natriumacetat-Lösung (3mol/l):*

In einem 2ml-Reaktionsgefäß werden 0,246 g Natriumacetat abgewogen und mit Aqua ad iniectabilia auf 1ml aufgefüllt. Diese Lösung wird nur einen Tag lang verwendet.

##### *Natriumbisulfitlösung:*

Diese Lösung muss vor jedem Gebrauch frisch hergestellt werden. Pro zu modifizierender DNA-Probe werden 2,3765 g Natriumbisulfit und 0,0688 g Hydrochinon mit Aqua ad iniectabilia auf ein Volumen von 3 ml aufgefüllt, mit 2 ml 1N Natronlauge versetzt und im heißen Wasserbad vorsichtig erwärmt. Sind alle Bestandteile gelöst, wird der pH-Wert gegebenenfalls auf 5,0 eingestellt. Da Bisulfit durch Licht inaktiviert wird, ist die Lösung vor intensiver Beleuchtung zu schützen.

Paar	A		B		C		D		E		G		H		I	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	13	14	15	16	17	18
Zwilling																
<i>NF1</i> -Mutation	c.1541delAG		c.4839T>G		c.499delTGTT		c.3737delTGTT		n.b.		n.b.		c.499delTGTT		c.7699C>T	
Alter (Jahre)	17		33		18		8		15		9		6		43	
Geschlecht	w		w		m		w		m		w		w		m	
Lisch-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	n.b.	n.b.
Knötchen	K		D		K		K		D		K		K		n.b.	
Freckling	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Café-au-lait-	K		K		K		K		K		D		K		K	
Flecken	25	15	5	22	26	18	12	11	7	8	>7	1	61	42	9	1
	0,40		0,77		0,31		0,08		0,13		0,86		0,31		0,89	
intrakutane	60	40	10	8	18	26	7	5	0	0	0	0	10	0	30	>100
Neurofibrome	0,33		0,20		0,31		0,29		0		0		1		0,70	
subkutane	0	0	0	0	20	0	0	0	10	14	0	0	0	0	0	0
Neurofibrome	0		0		1		0		0,29		0		0		0	
plexiforme	0	2	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	2	2
Neurofibrome	D		K		D		K		K		K		K		K	
Optikusgliom	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Skoliose	D		K		K		D		D		K		D		K	
	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	D		D		D		D		K		K		K		K	

**Tabelle 3.1: Klinische Daten der untersuchten NF1-Zwillinge**

m-männlich, w = weiblich, + = Merkmal vorhanden, - = Merkmal nicht vorhanden, n.b. = nicht bekannt, D = Diskordanz, K = Konkordanz. Für Café-au-lait-Flecken und Neurofibrome ist der Vergleichswert  $\Delta$ Nf angegeben: 0 steht für völlige Konkordanz, 1 für maximale Diskordanz.

#### *LB-Agar-Platten:*

10 g Bacto-Tryptone, 5 g Bacto-Yeast Extract, 10 g Natriumchlorid und 15 g Agar wurden mit Aqua bidest auf 1 Liter aufgefüllt, gut vermengt und autoklaviert. Anschließend wurde die Lösung mit 500  $\mu$ l Ampicillin (100 mg/ml) versetzt und wenige mm dick in geeignete Petrischalen gegossen. Nach Abkühlen des Agars konnten die Platten bei 4 °C gelagert werden.

#### *LB-Medium:*

10 g Bacto-Tryptone, 5 g Bacto-Yeast Extract und 10 g Natriumchlorid wurden mit Aqua bidest auf 1 Liter aufgefüllt, gut vermengt und autoklaviert. Erst kurz vor Gebrauch wurde pro 1 ml Medium 0,5  $\mu$ l Ampicillin (100 mg/ml) hinzugegeben.

#### *10X TBE:*

540 g Trizma base und 275 g Borsäure werden mit 200 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) vermengt und mit Aqua bidest auf 5000 ml aufgefüllt.

#### *10X TE-Puffer (pH 7,5):*

372,2 mg EDTA werden mit 1 ml 1N Natronlauge versetzt und in Aqua bidest ad 100 ml gelöst. Anschließend wird die Lösung mit 12,114 g Trizma base versetzt und mit Aqua bidest auf 800 ml aufgefüllt. Durch die fraktionierte Zugabe von etwa 80 ml 1M Salzsäure wird der pH auf 7,5 eingestellt, die Lösung mit Aqua bidest auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert. Der Puffer wird bei Raumtemperatur gelagert und vor Gebrauch 1 : 10 mit autoklaviertem Aqua bidest verdünnt.

### **3.3.2 Untersuchung der Promotoren von MMR-Genen mittels MSP und Pyrosequenzierung**

#### *Prinzip der Methylierungsspezifischen PCR:*

Die Methylierungsspezifische PCR (MSP) ist eine besondere Art der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), die Aussagen hinsichtlich der Methylierung einer eng umschriebenen DNA-Region erlaubt. Hierzu wird die DNA zunächst mit Bisulfit behandelt, wodurch nicht methylierte Cytosine hydrolytisch zu Uracil desaminiert werden. Anschließend werden pro zu untersuchender DNA-Region zwei MSP angesetzt, eine mit Primern, die nur an nichtmethylierte bisulfitmodifizierte DNA binden, und eine mit Primern, die nur an methylierte bisulfitmodifizierte DNA binden. Je nachdem, welche dieser beiden Reaktionen ein nachweisbares Produkt in Form einer spezifischen Bande in der Gel-Elektrophorese liefert, kann entschieden werden, ob die CpG's in den Primerbindungsstellen methyliert oder unmethyliert waren. Um die Produkte der verschiedenen Primerpaare auch in der Gel-Elektrophorese voneinander unterscheiden zu können, werden die Primer für methylierte DNA in der Regel so gewählt, dass das PCR-Produkt zwischen 10 und 20 Basenpaare kürzer ist, als das PCR-Produkt der Primer für unmethylierte DNA.

#### *Prinzip der Pyrosequenzierung:*

Die Pyrosequenzierung ist ein modernes Verfahren zur DNA-Sequenzierung, das nicht nur eine Detektion von DNA-Methylierungen ermöglicht, sondern auch eine exakte Quantifizierung in der Gesamtprobe erlaubt. Dabei enthält der Ansatz der Sequenzreaktion neben dem Primer eine DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luziferase, Apyrase, Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS) sowie Luziferin. Die Nukleotide (dNTP) werden automatisch einzeln nacheinander hinzugegeben. Erfolgt der Einbau des gerade zugeführten dNTP in den neusynthetisierten DNA-Strang, so wird das dabei freigesetzte Pyrophosphat durch die ATP-Sulfurylase zu ATP umgesetzt, welches wiederum die Umwandlung von Luziferin zu Oxyluciferin katalysiert. Das dabei generierte sichtbare Licht wird nun von einem Detektor erfasst, wobei die Signalstärke proportional der Menge des eingebauten Nukleotids ist. Alle nicht eingebauten dNTPs sowie überschüssiges ATP werden durch die Apyrase abgebaut und der Zyklus kann von Neuem beginnen. So erfolgt die Verlängerung des DNA-Strangs und gleichzeitig seine Sequenzierung Nukleotid für Nukleotid durch kontrollierte Zugabe der einzelnen dNTPs.

#### **3.3.2.1 Bisulfitmodifikation**

Die Bisulfitbehandlung der DNA erfolgte mit dem EZ Methylation-Gold Kit von Zymo Research entsprechend den Herstellerangaben.

#### **3.3.2.2 Kontroll-PCR**

Zur Kontrolle der Bisulfitmodifikation, wurde eine PCR durchgeführt, bei der ein Fragment des *TP53*-Gens in nichtmodifizierter DNA amplifiziert wurde. Die hierfür verwendeten Primer und PCR-Bedingungen sind im Abschnitt 3.3.2.3 angegeben. Bei jeder Kontroll-PCR wurden eine Positivkontrolle mit nichtmodifizierter genomischer DNA und eine Leerprobe mitgeführt.

#### *Gel-Elektrophorese:*

Zur Auftrennung der PCR-Produkte wurde eine Gel-Elektrophorese mit 2,5 %-igem Agarosegel durchgeführt. Dieses wurde zuvor mit Ethidiumbromid versetzt, um die entstandenen Banden im UV-Licht sichtbar und somit einer Fotodokumentation zugänglich zu machen. Einzelne Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren dabei zwischen die Basen der DNA, wodurch die Fluoreszenz der Substanz bei Anregung mit ultraviolettem Licht stark erhöht wird. Die Auftrennung der Amplifikate erfolgt durch Anlegen einer elektrischen Spannung. Dank der negativen Ladung ihrer Phosphatgruppen werden die Nukleinsäuren entsprechend ihrer Molekülgröße unterschiedlich schnell durch das Gel bewegt. Aufgetragen wurden 4  $\mu$ l jedes PCR-Ansatzes, die zuvor mit 2  $\mu$ l 6x Loading Dye Solution versetzt wurden. Die darin enthaltenen Zuckermoleküle bewirken ein Absinken der Proben in die Geltaschen. Zur Längendifferenzierung der einzelnen Banden wurde der O'RangeRuler 20 bp DNA Ladder eingesetzt.



### 3.3.2.3 Methylierungsspezifische PCR

Im Anschluss an die Kontroll-PCR wurde jede DNA mit Hilfe der Methylierungsspezifischen PCR (MSP) hinsichtlich des Methylierungsstatus der Promotorregion der „Mismatch Repair“-Gene *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* und *PMS2* untersucht. Pro DNA waren hierzu zwei PCR-Ansätze für jedes der „Mismatch Repair“-Gene, insgesamt also acht MSP-Ansätze notwendig. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind auf Seite ?? angegeben.

Die PCR wurde in einem 10  $\mu$ l-Ansatz durchgeführt, der 5  $\mu$ l peqGOLD PCR Master-Mix Y, 3  $\mu$ l Wasser, je 0,5  $\mu$ l der Primer (10 pmol/ $\mu$ l) sowie 1  $\mu$ l bisulfitmodifizierte DNA enthielt. Um Pipettierfehler zu reduzieren, wurden Mastermixe hergestellt. Die DNA wurde separat pipettiert. Bei jeder MSP wurden je eine Kontrolle mit komplett methylierter DNA, eine mit komplett unmethylierter DNA sowie eine ohne DNA (Leerprobe) mitgeführt. Die Auftrennung und Fotodokumentation der Amplifikate erfolgte mittels Gel-Elektrophorese wie oben beschrieben.

*Thermocycler-Bedingungen für Kontroll-PCR und MSP:*

		Temperatur (°C)	Dauer
Vor-Denaturierung		95,0	5 min.
Denaturierung	35 Zyklen	95,0	30 sek.
Annealing		T <sub>A</sub>	40 sek.
Elongation		72,0	30 sek.
End-Elongation		72,0	10 min.

### 3.3.2.4 Pyrosequenzierung

Zur genaueren Untersuchung des Promotors des „Mismatch Repair“-Gens *MSH2* mittels Pyrosequenzierung wurde zunächst ein Fragment der bisulfitmodifizierten DNA amplifiziert. Dieses umfasste dem Bereich von -62 bis -101 relativ zum Startkodon [42]. Der Reaktionsansatz enthielt 12,5  $\mu$ l 2X PCR-Mastermix von Promega, 1,25  $\mu$ l Forward-Primer (10 pmol/ $\mu$ l), 1,25  $\mu$ l eines Gemisches aus vier Reverse-Primern (10 pmol/ $\mu$ l) aufgrund des Vorkommens von zwei CpGs innerhalb der Primerbindungsstelle, 7,5  $\mu$ l Aqua bidest sowie 2,5  $\mu$ l bisulfitmodifizierte DNA. Bei jeder PCR wurde eine Leerprobe mitgeführt.

*Thermocycler-Bedingungen:*

		Temperatur (°C)	Dauer
Vor-Denaturierung		95,0	5 min.
Denaturierung	45 Zyklen	94,0	30 sek.
Annealing		64,1	30 sek.
Elongation		72,0	30 sek.
End-Elongation		72,0	10 min.

## Primer für Kontroll-PCR:

Name	Sequenz (5' → 3')	bp	T <sub>A</sub> in °C	GenBank	Quelle
TP53-5b_for	GTG GGT TGA TTC CAC ACC CC	162	59,0	AH007667	[35]
TP53-5b_rev	AAC CAG CCC TGT CGT CTC TC				

## Primer für Methylierungsspezifische PCR:

Name	Sequenz (5' → 3')	bp	T <sub>A</sub> in °C	GenBank	Quelle
MLH1 unm-1_for	TTT TGA TGT AGA TGT TTT ATT AGG GTT GT	124	60,0	U83845	[23]
MLH1 unm-1_rev	ACC ACC TCA TCA TAA CTA CCC ACA				
MLH1 met-1_for	ACG TAG ACG TTT TAT TAG GGT CGC	115	61,0		
MLH1 met-1_rev	CCT CAT CGT AAC TAC CCG CG				
MSH2 unmet_for	GGT TGT TGT GGT TGG ATG TTG TTT	143	62,0	AH003235	[23]
MSH2 unmet_rev	CAA CTA CAA CAT CTC CTT CAA CTA CAC CA				
MSH2 met_for	TCG TGG TCG GAC GTC GTT C	132	61,0		
MSH2 met_rev	CAA CGT CTC CTT CGA CTA CAC CG				
MSH6 unmet_for	TTT GGG TTT TTT TGG TGG AGT GT	161	58,0	AH005068	[30]
MSH6 unmet_rev	CTT AAA AAA AAA ACT ATA CAA AAT ACT CTA TCA CA				
MSH6 met_for	TTT TTT CGG CGG AGC GC	151	60,0		
MSH6 met_rev	AAA AAA AAA CTA TAC AAA ATA CTC TAT CGC				
PMS2 unmet_for	GTA GGT GGG AAG TTT TAT ATG GAG	148	60,0	U24168	[96]
PMS2 unmet_rev	CCA ATC TTC ATC ATA ACC TCT AAC A				
PMS2 met_for	AGA GGC GCG TCG TTT TCG TG	121	60,0		
PMS2 met_rev	CTC CGT CGT AAC CTC TAA CG				

Primersequenzen:

Name	Sequenz (5' → 3')
Forward-Primer	TTT GGA AGT TGA TTG GGT GTG GT-biotin
Reverse-Primer	CCA CTT CTC CCA CAT ACC CTA AAA AAA AC CTA CTT CTC CCA CAT ACC CTA AAA AAA AC CCA CTT CTC CTA CAT ACC CTA AAA AAA AC CTA CTT CTC CTA CAT ACC CTA AAA AAA AC
Sequenzierprimer	CCA CAC CCA CTA AAC TAT T

Anschließend wurden pro Probe zwei verschiedenen Reaktionsansätze hergestellt. Ansatz 1 enthielt neben dem PCR-Produkt 3 µl Sepharose, 12 µl Aqua bidest sowie 40 µl Binding Buffer. Ansatz 2 setzte sich aus 1,6 µl Sequenzierprimer und 38,4 µl Annealing Buffer zusammen. Am Vakuum PrepTool wurden die in Sepharose gebettete DNA nun nacheinander mit 70 %-igem Ethanol, Denaturierungspuffer und Waschpuffer gereinigt und anschließend im Ansatz 2 gelöst. Nach einer zweiminütigen Denaturierung der Proben bei 85 °C konnte die Reaktionsplatte in den Pyrosequenzer eingesetzt werden. Alle verwendeten Reagenzien entstammen dem Pyro Gold Reagents-Kit.

### 3.3.3 Untersuchung des Methylierungsmusters des *NF1*-Promotors bei eineiigen Zwillingen

Die im folgenden beschriebene Methode wurde für diese Untersuchung gewählt, da sie im Gegensatz zu MSP und Pyrosequenzierung die quantitative Beurteilung der DNA-Methylierung eines langen DNA-Fragmentes erlaubt.

#### 3.3.3.1 DNA-Verdau mit EcoR I und DNA-Fällung

Vor der Bisulfitbehandlung muss die DNA in mehrere Fragmente geschnitten werden. Dies wurde mit dem Restriktionsenzym EcoR I realisiert, welches hydrolytisch die Phosphodiesterbindung der Sequenz



spaltet. Diese Sequenz ist im zu untersuchenden Abschnitt der DNA nicht enthalten. Der Reaktionsansatz enthielt circa 3 µg DNA in einem Volumen von 24 µl, 3 µl 10x NEBuffer EcoR I sowie 3 µl EcoR I. Nach einer vierstündigen Inkubation bei 37 °C erfolgte die Kontrolle des Spaltansatzes mittels Gel-Elektrophorese auf 1 %-iger Agarose, wobei zum Vergleich jeweils auch eine unverdaute Probe der gleichen DNA aufgetragen wurde. Als Längenstandard diente der GeneRuler Express DNA-Ladder von Fermentas. Anschließend wurde die verdaute DNA mit 2,7 µl Natriumacetat-Lösung (3 mol/l) und 59,4 µl 96 % Etahnol versetzt, kurz zentrifugiert und

über Nacht bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Am nächsten Tag wurden die Proben für 30 Minuten bei 12000 g und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das verbliebene DNA-Pellet wurde anschließend in  $20\text{ }\mu\text{l}$  70 % Ethanol gelöst, erneut für 15 Minuten bei 12000 g zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Nun folgte das Trocknen der Proben bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit geöffnetem Deckel für ca. 20 Minuten im Thermoblock. Abschließend wurde das Pellet in  $16,7\text{ }\mu\text{l}$  Aqua ad iniectabilia aufgenommen und gegebenenfalls bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 3.3.3.2 Bisulfitbehandlung

Zunächst musste die DNA in Agarosekugeln eingebettet werden, um eine Renaturierung der Einzelstränge während der Bisulfitmodifikation zu verhindern. Hierzu wurden pro Probe 11  $1,5\text{ ml}$  Reaktionsgefäße mit jeweils 7 Tropfen Mineralöl gefüllt und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  vorgekühlt. Die DNA wurde im Thermoblock für 5 Minuten bei  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  denaturiert und anschließend auf  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Nach Zugabe von  $8,3\text{ }\mu\text{l}$  1N Natronlauge folgte eine weitere Denaturierung bei  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 15 Minuten im Thermoblock. Jede Probe wurde nun mit  $225\text{ }\mu\text{l}$  autoklavierter,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ -warmer 2 %-iger low melting point-Agarose vermischt und bei einer Temperatur von  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  gehalten. Je  $20\text{ }\mu\text{l}$  dieser Mischung wurden dann zügig in ein ölgefülltes Gefäß pipettiert, wodurch sich im Öl schwimmende Kugeln ausbildeten. Diese können gegebenenfalls über Nacht bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

Zu jeder Kugel wurden  $400\text{ }\mu\text{l}$  der frisch hergestellten Natriumbisulfitlösung gegeben und das Ganze mit Alufolie abgedeckt für 5 Stunden bei  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Zum Beenden der Reaktion wurden alle Kugeln einer DNA-Probe in ein mit  $1\text{ ml}$  TE-Puffer je Kugel gefülltes Falcon-Röhrchen überführt und für 10 Minuten sanft geschüttelt. Der Überstand wurde abpipettiert und dieser Waschvorgang noch zweimal wiederholt. Im Anschluss wurde pro Kugel  $1\text{ ml}$  0,2M Natronlauge hinzugegeben und 15 Minuten sanft geschüttelt. Auch dieser Schritt zur Desulphonierung wurde einmal wiederholt, diesmal jedoch der Überstand belassen. Durch Zugabe von  $200\text{ }\mu\text{l}$  1N Salzsäure pro Kugel wurde das Gemisch neutralisiert und nach zweiminütigem Schwenken der Überstand abpipettiert. Schließlich folgten noch zwei je 10-minütige Waschvorgänge, einer mit  $1\text{ ml}$  TE-Puffer pro Kugel und einer mit  $1\text{ ml}$  autoklaviertem Aqua bidest pro Kugel. Einzeln und möglichst ohne Flüssigkeit konnten die Kugeln dann bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

#### 3.3.3.3 PCR und DNA-Extraktion

Für die Amplifikation der zu untersuchenden Region des *NFI*-Promotors wurden zwei Primerpaare verwendet, die an einander überlappende DNA-Abschnitte binden. Diese Bindung erfolgt spezifisch an bisulfitmodifizierte DNA, unabhängig von deren Methylierungsstatus. Primerpaar 1 vervielfältigt einen 489 Basenpaare umfassenden DNA-Abschnitt von Position  $-256$  bis  $+203$  in Bezug zum Transkriptionsstart, Primerpaar 2 ein Fragment von 469 Basenpaaren Länge (Position  $+182$  bis  $+650$ ). Die Sequenzen der Primer sowie die PCR-Bedingungen wurden von Harder et al. übernommen [35].

Die PCR wurde in einem 50  $\mu$ l-Ansatz durchgeführt, der sich wie folgt zusammensetzte: 20  $\mu$ l bisulfidmodifizierte DNA (Agarose-Kugel), 5  $\mu$ l 10x PCR-Puffer, 10  $\mu$ l 5x Q-Solution, 3  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ l dNTP-Mix (12,5 mM), je 1  $\mu$ l der Primer (10 pmol/ $\mu$ l), 8,5  $\mu$ l Aqua ad iniectabilia sowie 0,5  $\mu$ l Taq-Polymerase (5 U/l). Um Pipettierfehler zu reduzieren, wurden Mastermixe hergestellt. Die verwendeten Reagenzien entstammen dem Taq PCR Core Kit.

Es wurde ein sogenannter „Hot Start“ durchgeführt, bei dem die Taq-Polymerase erst nach einer initialen Vordenaturierung zu jedem Ansatz hinzugegeben wurde. Bei jeder PCR wurde eine Kontrolle mit genomischer nicht-modifizierter DNA sowie eine Leerprobe mitgeführt.

*Primer:*

Name	Sequenz (5' → 3')	T <sub>A</sub>
P1-mod_for	AGT TTA AGT TGA GAG TAT AGT TTT TTT AGG	60°C
P1-mod_rev	TCT CCC CAC AAC CAT CAC AAT CC	
P2-mod_for	GAT TGT GAT GGT TGT GGG GAG	58°C
P2-mod_rev	CAA AAC CTA AAA CAA CC(AG) CAA AAA AAA C	

*Thermocycler:*

		Temperatur (°C)	Dauer
Vor-Denaturierung		98,0	5 min.
Denaturierung	50 Zyklen	95,0	1 min.
Annealing		T <sub>A</sub>	1 min.
Elongation		72,0	2 min.
End-Elongation		72,0	10 min.

*Gel-Elektrophorese und DNA-Extraktion:*

Zur Auftrennung der PCR-Produkte wurde eine Gel-Elektrophorese mit 2 %-igem Agarosegel durchgeführt. Dieses wurde zuvor mit Ethidiumbromid versetzt, um die entstandenen Banden im UV-Licht sichtbar zu machen. Aufgetragen wurde der gesamte Ansatz. Hierzu wurden die Low melting point-Agarose enthaltenden Proben zunächst auf 60 °C erhitzt. Zur Längendifferenzierung der Banden wurde der GeneRuler 100 bp DNA Ladder eingesetzt. Im Anschluss an die Fotodokumentation wurden die gewünschten Banden mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt.

#### 3.3.3.4 Klonierung und Übernachtskultur

Die Klonierung der PCR-Produkte erfolgte mit dem TOPO TA Cloning Kit und dem Vektor pCR2.1, der ein Gen für Ampicillin-Resistenz trägt. Zusätzlich enthält der Vektor das Gen für die  $\beta$ -Galaktosidase, welche die Hydrolyse von X-Gal katalysiert und somit zu einer Blaufärbung

führt. Bei korrekter Ligation des PCR-Produktes in den Vektor wird das  $\beta$ -Galktosidase-Gen inaktiviert, das Ampicillin-Resistenz-Gen bleibt erhalten. Nach erfolgreicher Transformation dieses Vektors in die Zellen entstehen auf ampicillinhaltigem Agar daher weiße Bakterienkolonien, die durch diese Färbung eine effiziente Klonierung anzeigen.

#### *Anhängen von dATPs:*

Da der verwendete linearisierte Vektor 3'-Desoxythymidin-Überhänge besitzt, wurden zur Steigerung der Klonierungseffizienz zunächst einzelne Desoxyadenosine an das 3'-Ende des PCR-Produktes angefügt. Dies erfolgte in einem Ansatz bestehend aus 25  $\mu$ l der nach der PCR extrahierten DNA, 5,15  $\mu$ l Aqua ad iniectionem, 3,5  $\mu$ l Puffer, 1  $\mu$ l 10 mM dATP sowie 0,35  $\mu$ l Ampli-Taq, der für 10 Minuten bei 72 °C inkubiert und anschließend sofort in die Ligation gegeben wurde.

#### *Ligation:*

Der Ligationansatz setzte sich aus 2,5  $\mu$ l dATP-Reaktionsprodukt, 1  $\mu$ l Salzlösung, 1  $\mu$ l Vektor pCR 2.1 und 1,5  $\mu$ l Aqua bidest zusammen. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion auf Eis gestoppt.

#### *Transformation:*

Der komplette Ligationansatz wurde in ein Gefäß mit chemisch kompetenten TOP10F'-Zellen überführt und vorsichtig mit ihnen vermenget. Nach 30 Minuten auf Eis wurde das Gefäß für 30 Sekunden in 42 °C warmes Wasser getaucht und dann sofort zurück auf Eis gestellt. Durch diesen Hitzeschock erfolgte die Aufnahme des Vektors in die Bakterienzellen. Anschließend wurden 250  $\mu$ l SOC-Medium zu den Zellen gegeben und alles für 60 Minuten im Thermomixer bei 37 °C und 225 rpm inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden die vorbereiteten Agarplatten im Brutschrank erwärmt und mit 40  $\mu$ l IPTG (100 mM) sowie 80  $\mu$ l X-Gal (20  $\mu$ g/ml) beschichtet. Nachfolgend wurden die Zellen auf diesen Platten mit Hilfe eines abgeflammteten Drigalskispatels vereinzelt und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank belassen. Am nächsten Tag wurden die weißen Klone mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und auf eine Masterplatte übertragen. Die Pipettenspitze wurde dann in ein mit 10 ml LB-Medium gefülltes Falconröhrchen eingebracht und über Nacht im Schüttler bei 37 °C und 225 rpm inkubiert.

#### **3.3.3.5 Plasmidextraktion**

Die Extraktion der Plasmide erfolgte mit dem Invisorb Spin Plasmid Mini Two-Kit der Firma Invitex entsprechend den Herstellerangaben.

### 3.3.3.6 Kontrolle der extrahierten Plasmide

Die Überprüfung der Plasmide auf korrekten Einbau der DNA in den Vektor erfolgte durch Restriktionsspaltung mit EcoR1. 0,5  $\mu$ l Plasmid-DNA wurden hierfür mit 0,5  $\mu$ l EcoR1, 1,0  $\mu$ l Puffer und 8,0  $\mu$ l Aqua bidest für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend parallel zu dem GeneRuler 100 bp DNA Ladder gelelektrophoretisch aufgetrennt.

### 3.3.3.7 Sequenzreaktion und DNA-Fällung

Die Sequenzierung der Plasmide erfolgte unter Verwendung des Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing-Kit von Applied Biosystems. Der Reaktionsansatz bestand aus 2  $\mu$ l Big Dye v3.1, 2,2  $\mu$ l Big Dye Puffer, 2,5  $\mu$ l 10  $\mu$ M Primer, 0,9  $\mu$ l DMSO, 3,6  $\mu$ l Betaine, 2,8  $\mu$ l Aqua bidest sowie 4  $\mu$ l Plasmid-DNA. Pro Plasmid wurden zwei Reaktionen mit jeweils einem der im TOPO TA Cloning-Kit enthaltenen M13-Primern angestzt.

*Primer:*

Name	Sequenz (5' → 3')
M13_for	GTA AAA CGA CGG CCA G
M13_rev	CAG GAA ACA GCT ATG AC

*Thermocycler:*

		Temperatur (°C)	Dauer
Vor-Denaturierung		96,0	2 min.
Denaturierung	35 Zyklen	96,0	15 sec.
Annealing		50,0	5 sec.
Elongation		60,0	4 min.
End-Elongation		60,0	10 min.

DNA-Fällung: Zu jeder Probe wurden 65  $\mu$ l Ethanol und 25  $\mu$ l Aqua bidest hinzugegeben. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 3000 rpm wurden die Überstände verworfen und zu jeder Probe 100  $\mu$ l 70 %-iges Ethanol pipettiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 3000 rpm wurden die Überstände erneut verworfen und diese Ethanol-Reinigung noch zweimal wiederholt. Anschließend wurde die Probenplatte kurz umgedreht zentrifugiert und zum vollständigen Trocknen der Proben für ein paar Minuten stehen gelassen. Zuletzt wurde jede Probe mit 16  $\mu$ l Aqua bidest versetzt und die Platte in den Sequenzierautomaten gegeben.

### 3.3.3.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgte anhand einer Weiterentwicklung der 1977 von Sanger et al. vorgestellten Strangabbruch-Methode [82]. Hierbei synthetisiert eine Polymerase wie bei ei-

ner PCR ausgehend von einem Primer einen neuen DNA-Strang komplementär zu dem bereits vorhandenen. In diesem Fall enthält der Reaktionsansatz zusätzlich zu den Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP) jedoch auch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP), die keine 3'-Hydroxygruppe besitzen und somit nach ihrem Einbau eine weitere Verlängerung der DNA-Kette verhindern. Im Sequenzer werden die verschieden langen DNA-Stränge nun kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und kurz vor der positiven Elektrode von einem Laser zur Fluoreszenz angeregt. Aufgrund ihrer speziellen Markierung fluoreszieren die vier ddNTPs verschiedenfarbig und können so von einem Detektor registriert werden, wobei die Reihenfolge der erfassten Farbsignale der Sequenz des untersuchten DNA-Strangs entspricht.

#### 3.3.4 Statistik

Für die Auswertung der Methylierung des *MSH2*-Promotors bei NF1-Patienten mit unterschiedlicher Schwere der Krankheitsausprägung wurden der exakte Fischer-Test und der  $\chi^2$ -Test eingesetzt. Der intraindividuelle Vergleich der Methylierung einzelner CpGs erfolgte per  $\kappa$ -Statistik. Für die Auswertung der Methylierung des *NF1*-Promotors bei eineiigen Zwillingspaaren wurde zum Einen ein zweiseitiger T-Test benutzt, um zu testen, ob sich die Differenz der Methylierung einer bestimmten Region des untersuchten Bereichs innerhalb der Paare signifikant von 0 unterschied. Unter Berücksichtigung des multiplen Testens wurde das Konfidenzintervall der Variable auf 99 % erweitert. Desweiteren wurde untersucht, ob das Auftreten eines Optikusglioms innerhalb eines diskordanten Paares in Zusammenhang mit Methylierungsunterschieden innerhalb einer bestimmten Region des Promotors steht. Hierzu wurde die Differenz der Methylierung innerhalb der Paare ermittelt und mithilfe des Mann-Whitney-U-Test die Gruppe der diskordanten Paare mit der Gruppe der konkordanten Paare verglichen. Um eine Korrelation des Vergleichswertes für die Anzahl der Neurofibrome ( $\Delta Nf$ ) mit Methylierungsunterschieden in Subregionen zu evaluieren, wurde die Rangkorrelation nach Spearman eingesetzt.

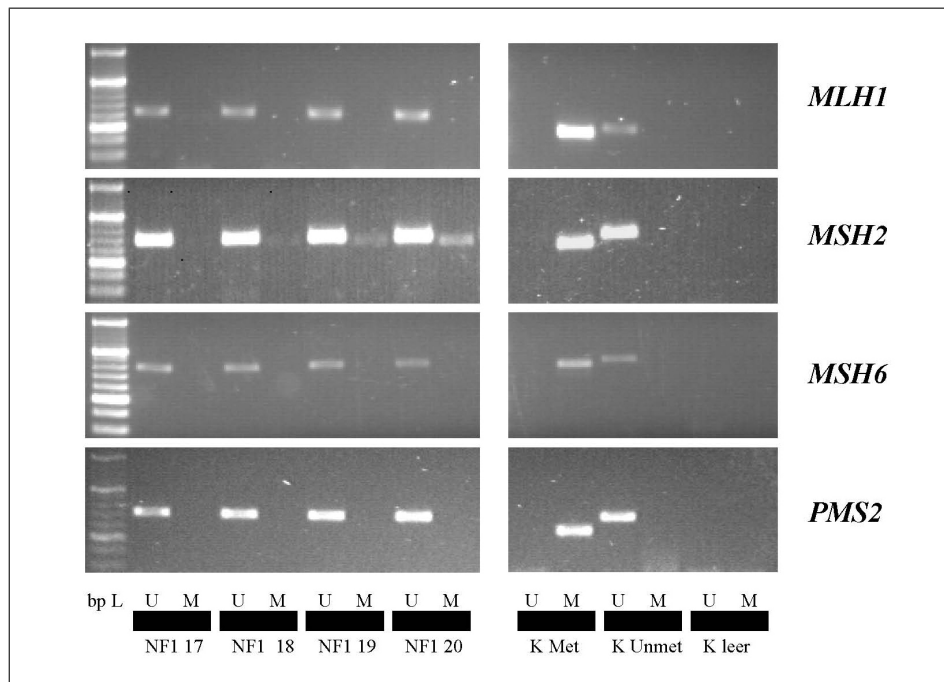


## 4 Ergebnisse

### 4.1 Promotormethylierung der „Mismatch Repair“-Gene

#### 4.1.1 Methylierungsstatus der Promotoren von *MLH1*, *MSH6* und *PMS2* bei NF1-Patienten

Die Promotoren der „Mismatch Repair“-Gene *MLH1*, *MSH6* und *PMS2* von 79 nicht verwandten NF1-Patienten wurden mittels Methylierungsspezifischer Polymerasekettenreaktion (MSP) hinsichtlich ihres Methylierungsstatus untersucht. Hierbei konnten in keiner der Proben Methylierungen in der untersuchten Region nachgewiesen werden (Abb. 4.1).



**Abbildung 4.1: Beispiel einer Fotodokumentation nach MSP und Gelelektrophorese**

Dargestellt sind die Ergebnisse der NF1-Patienten 17-20, sowie die bei jeder MSP mitgeführten Kontrollen: K Met = Kontrollreaktion mit komplett methylierter DNA, K Unmet = Kontrollreaktion mit vollständig unmethylierter DNA, K leer = Leerprobe. Zur Längendifferenzierung der Banden wurde der O'RangeRuler 20 bp DNA Ladder (bp L) eingesetzt. Je zu untersuchender DNA wurde eine Reaktion mit Primern, die nur an unmethylierte DNA binden (U) und eine Reaktion mit Primern, die nur an methylierte DNA binden (M) durchgeführt. Wie gewünscht zeigte die komplett methylierte DNA lediglich eine Reaktion mit den Primern für methylierte DNA. Die komplett unmethylierte DNA reagierte ausschließlich mit den Primern für unmethylierte DNA. Bei der Leerprobe waren keine Banden nachweisbar. In allen Patientenmaterialien ließ sich eine Reaktion mit den Primern für unmethylierte DNA nachweisen. Bei der Untersuchung des *MSH2*-Promotors zeigten sich zusätzlich unterschiedlich starke Banden bei der Reaktion mit den Primern für methylierte DNA, hier bei den Patienten 19 und 20.

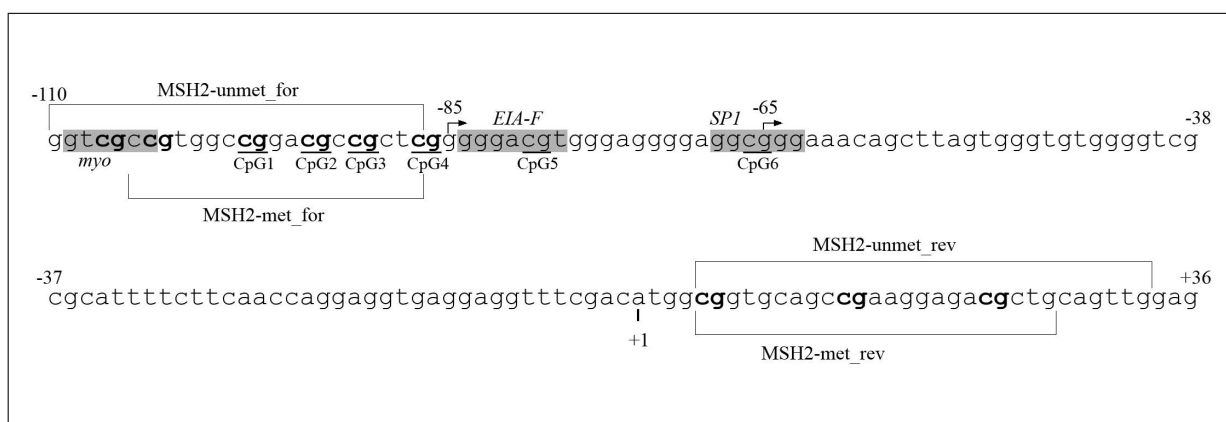
## 4.1.2 Methylierung des *MSH2*-Promotors bei NF1-Patienten und Kontrollpersonen

### 4.1.2.1 Überblick über die untersuchte Region

Der Promotor des *MSH2*-Gens beinhaltet eine CpG-Insel von 1,5 kb Länge und ist sehr CG-reich. Eine TATA-Box, wie sie bei vielen eukaryotischen Genen meist 25 bis 30 Basenpaare vor dem Transkriptionsstart zu finden ist, ist im Promotor des *MSH2*-Gens nicht nachweisbar. Diese Konstellation ist typisch für sogenannte Haushaltsgene („housekeeping genes“).

Zwei Transkriptionsstartpunkte, bei -85 und -65 in Relation zum Startkodon, konnten identifiziert werden [42]. In deren unmittelbarer Nähe befinden sich einige regulatorische Sequenzmotive (*cis*-wirkende Elemente), wie SP1 und AP1. Der Minimalpromotor des *MSH2*-Gens, also der kürzeste Bereich, der für die Expression eines Gens erforderlich ist, wurde in den 300 Basenpaaren stromaufwärts der kodierenden Sequenz lokalisiert.

Für diese Arbeit wurde ein Bereich von -110 bis +33 in Relation zum Startkodon des *MSH2*-Gens untersucht (Abb. 4.2). Zunächst wurde mittels Methylierungsspezifischer PCR (MSP) der Methylierungsstatus der CpGs bei -107, -104, -98, -94, -91, -87, +5, +14 und +23 ermittelt. Anschließend erfolgte eine exakte Bestimmung des Methylierungsgrades der CpGs bei -98, -94, -91, -87, -80 und -66 per Pyrosequenzierung.



**Abbildung 4.2: Die untersuchte Region des *MSH2*-Promotors**

Die großen Klammern zeigen die Bindungsstellen der für die Methylierungsspezifische PCR (MSP) verwendeten Primer an. Fett hervorgehobene CpGs wurden mittels MSP untersucht. Die per Pyrosequenzierung näher untersuchten CpGs sind unterstrichen dargestellt und nummeriert (CpGs 1 - 6). Die beiden Transkriptionsstartpunkte (Positionen -85 und -65) sind durch Pfeile oberhalb der Sequenz gekennzeichnet. Graue Boxen markieren die in der Region identifizierten *cis*-wirkenden Elemente [42]. +1 steht für die erste Base des Startkodons.

#### 4.1.2.2 Methylierungsspezifische PCR

Der Promotor des „Mismatch Repair“-Gens *MSH2* von 79 nicht verwandten NF1-Patienten (Tabelle 4.2) sowie von 39 gesunden Kontrollpersonen im Alter von 18 bis 74 Jahren (Tabelle 4.1) wurde ebenfalls zunächst mittels Methylierungsspezifischer PCR (MSP) untersucht. Jede MSP wurde mindestens zweimal wiederholt und die Ergebnisse aller Durchgänge für jede DNA-Probe zu einem Gesamtergebnis zusammengefasst. Als methyliert wurde jede Probe gewertet, die mindestens in einer MSP eine Reaktion mit den Primern für methylierte DNA zeigte (siehe zum Beispiel Patienten 19 und 20 in Abb. 4.1). Dabei ließ sich lediglich bei 20 von 79 NF1-Patienten (25 %) und 16 von 39 Kontrollpersonen (41 %) sicher keine Methylierung im untersuchten Bereich nachweisen. Der *MSH2*-Promotor in Blutzellen von NF1-Patienten war somit häufiger methyliert als bei gesunden Kontrollpersonen, statistisch signifikant war dieser Unterschied jedoch nicht ( $p = 0,093$ ; Fisher-Test). Zur Graduierung der Methylierung wurden die als methyliert eingestuft Proben entsprechend der Intensität der Banden mit den Primern für methylierte DNA den Gruppen „schwach methyliert“ und „stark methyliert“ zugeordnet. Hierbei ergab sich eine statistisch signifikant häufigere „starke Methylierung“ bei NF1-Patienten, während der *MSH2*-Promotor bei gesunden Kontrollpersonen häufiger unmethyliert war ( $p = 0,001$ ;  $\chi^2$ -Test).

Für die Beurteilung des Einflusses der *MSH2*-Promotor-Methylierung auf den Phänotyp der Neurofibromatose Typ 1 wurden die NF1-Patienten anhand der Anzahl ihrer intrakutanen und subkutanen Neurofibrome in zwei Gruppen eingeteilt. Die Neurofibromzahl der Patienten mit einen

Nr.	Alter (J.)	m/w	MSP	Nr.	Alter (J.)	m/w	MSP	Nr.	Alter (J.)	m/w	MSP
K01	70	m	0	K14	46	m	0	K27	62	m	1
K02	54	m	0	K15	60	w	1	K28	18	w	2
K03	62	m	0	K16	72	w	1	K29	50	w	0
K04	35	m	1	K17	66	w	1	K30	67	m	1
K05	72	w	0	K18	72	w	1	K31	64	m	1
K06	64	w	0	K19	68	w	1	K32	31	m	0
K07	37	m	1	K20	45	w	0	K33	67	m	0
K08	32	m	1	K21	60	w	1	K34	59	m	0
K09	68	w	1	K22	69	w	1	K35	49	m	1
K10	55	m	1	K23	39	w	1	K36	69	m	1
K11	63	w	1	K24	58	m	1	K37	60	m	0
K12	63	w	1	K25	72	w	0	K38	59	m	0
K13	74	w	1	K26	62	w	0	K39	74	m	0

**Tabelle 4.1: Untersuchungsergebnisse der MSP für *MSH2* bei Kontrollprobanden**

Das Alter der Probanden entspricht ihrem Alter zum Zeitpunkt der Blutentnahme. In der Spalte „MSP“ ist die Intensität der detektierten Bande mit den Primern für methylierte DNA angegeben: 0 = keine Bande, 1 = schwache Bande, 2 = starke Bande.

#### 4. Ergebnisse

Pat.-Nr.	Alter (J.)	m/w	NF	MSP	Pat.-Nr.	Alter (J.)	m/w	NF	MSP
1	56	m	2	1	41	44	w	1	0
2	27	w	2	1	42	29	w	1	0
3	32	w	2	2	43	58	m	2	1
4	33	m	2	1	44	49	m	2	1
5	31	w	2	0	45	48	w	1	2
6	41	m	2	2	46	49	w	1	0
7	33	m	1	1	47	32	w	1	2
8	42	w	1	2	48	30	w	2	2
9	41	w	1	0	49	28	w	1	1
10	47	m	2	2	50	26	m	1	1
11	32	m	2	0	51	26	m	1	0
12	31	w	2	1	52	25	m	1	1
13	49	w	2	1	53	28	m	1	0
14	32	m	2	1	54	64	m	1	2
15	54	w	2	0	55	30	w	1	2
16	32	w	2	0	56	49	w	1	1
17	31	w	2	1	57	26	w	1	2
18	45	w	2	1	58	36	w	1	2
19	49	m	2	2	59	47	m	1	2
20	53	m	2	2	60	38	w	1	0
21	47	w	2	2	61	39	m	1	1
22	37	w	2	0	62	24	w	1	1
23	38	w	2	1	63	36	m	1	1
24	40	m	2	0	64	40	w	1	1
25	58	m	2	2	65	24	w	1	2
26	58	w	2	1	66	29	w	1	2
27	62	w	2	2	67	25	m	1	1
28	71	w	2	2	68	34	w	1	0
29	49	w	2	0	69	37	w	1	1
30	48	m	2	2	70	41	w	1	2
31	65	w	2	2	71	29	w	1	0
32	61	w	2	2	72	32	m	1	1
33	39	w	2	1	73	53	w	1	1
34	43	w	2	1	74	26	m	1	0
35	59	w	2	2	75	23	m	1	0
36	49	m	2	2	76	48	w	1	1
37	39	m	2	0	77	46	w	1	1
38	41	w	2	1	78	37	w	2	1
39	45	w	1	1	79	31	w	1	0
40	29	m	1	1					

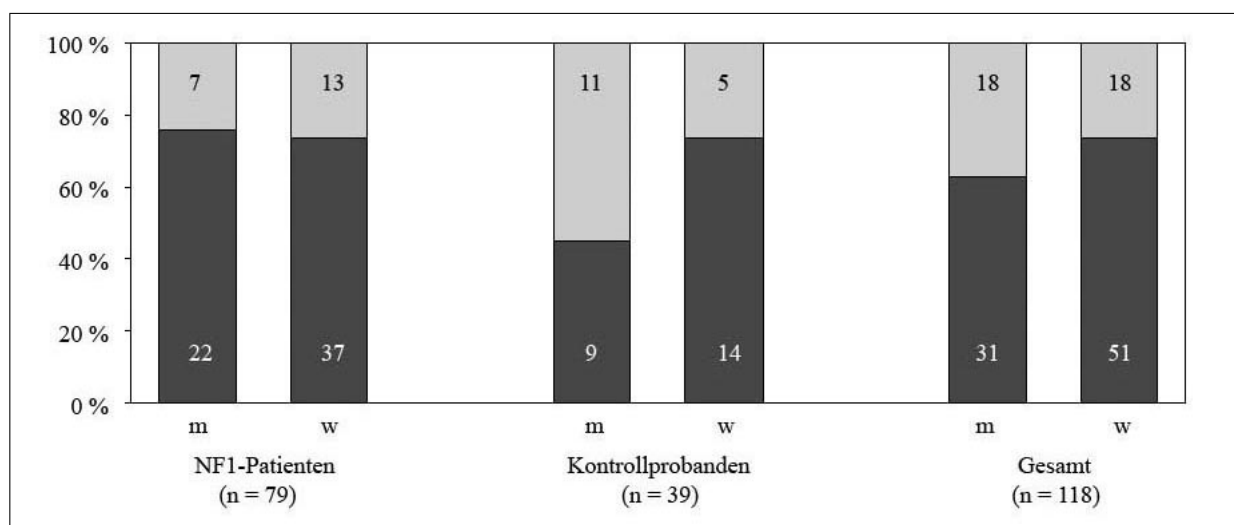
**Tabelle 4.2: Untersuchungsergebnisse der MSP für *MSH2* bei NF1-Patienten**

Angegeben ist das Alter der Patienten zum Untersuchungszeitpunkt sowie die Gruppeneinteilung anhand der Anzahl ihrer Neurofibrome (NF): 1 = 0-60 Neurofibrome (milder Phänotyp), 2 = >100 Neurofibrome (schwerer Phänotyp). In der Spalte „MSP“ ist die Intensität der detektierten Bande mit den Primern für methylierte DNA angegeben: 0 = keine Bande, 1 = schwache Bande, 2 = starke Bande.

milden Phänotyp betrug dabei zwischen null und 60, von denen knapp 80 % maximal 30 Neurofibrome aufwiesen. In der Gruppe der Patienten mit schwerem Phänotyp waren Neurofibromzahlen zwischen 112 und 2200 zu verzeichnen. Mehr als die Hälfte dieser Patienten wiesem mehr als 200, 20 % sogar mehr als 500 Neurofibrome auf. Hinsichtlich der Methylierung des *MSH2*-Promotors ließ sich zwischen diesen beiden Gruppen kein Unterschied nachweisen. 28 von 40 „leicht betroffenen“ (70 %) sowie 31 von 39 „schwer betroffenen“ Patienten (80 %) zeigten eine Reaktion mit den Primern für methylierte DNA ( $p = 0,44$ ; Fisher-Test).

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Lebensalter und der Methylierung des *MSH2*-Promotors zu untersuchen, erfolgte die Einteilung der NF1-Patienten in drei Altersgruppen (< 40 J., 40 - 50 J., > 50 J.). Innerhalb dieser Gruppen zeigte sich mit steigendem Patientenalter ein zunehmender Anteil an methylierten Proben von 66 % auf 93 % ( $p = 0,042$ ;  $\chi^2$ -Test). Auch der Anteil der Patienten mit mehr als 100 Neurofibromen nahm innerhalb dieser Gruppen von 34 % kontinuierlich auf 84 % zu ( $p = 0,034$ ;  $\chi^2$ -Test).

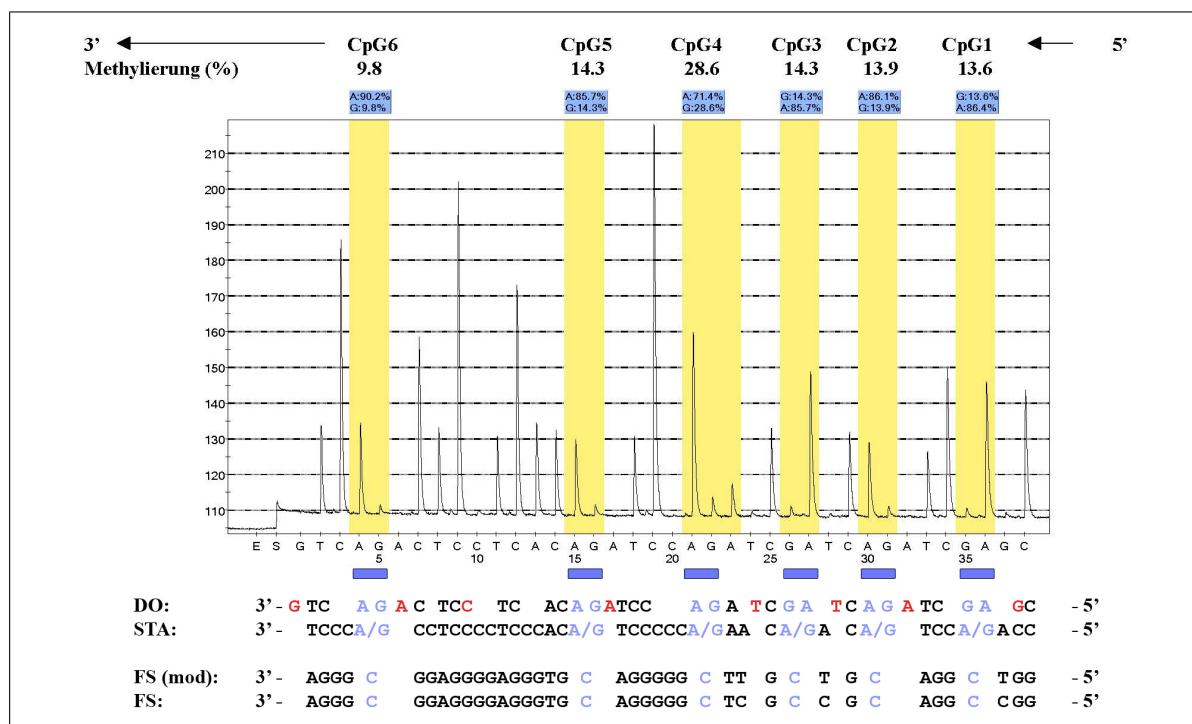
Die Abbildung 4.3 zeigt eine häufigere Methylierung des *MSH2*-Promotors in gesunden Frauen (73,7 %) gegenüber gesunden Männern (45,0 %). Dieser Unterschied ist zwar nicht statistisch signifikant ( $p = 0,10$ ;  $\chi^2$ -Test), jedoch bei den NF1-Patienten überhaupt nicht zu beobachten (74,0 % versus 75,9 %;  $p = 1,0$ ;  $\chi^2$ -Test).



**Abbildung 4.3: Methylierungsstatus des *MSH2*-Promotors in Abhängigkeit vom Geschlecht**

Dargestellt sind die Ergebnisse der Methylierungsspezifischen PCR für Männer (m) und Frauen (w) im Vergleich. Die dunklen Balken geben die Menge der Probanden mit methylierten *MSH2*-Promotoren wieder. Helle Balken stehen für Individuen, bei denen sich keine Methylierung nachweisen ließ. Die Nummern in den Balken entsprechen der Anzahl der Probanden in der jeweiligen Gruppe.

## 4.1.2.3 Pyrosequenzierung



**Abbildung 4.4: Beispielergebnis einer Pyrosequenzierung**

Die prozentuale Methylierung jedes CpGs ist oberhalb der Grafik angegeben. Da mit einem reversen Primer gearbeitet wurde, erfolgte die Sequenzierung in 5'→3'-Richtung. Unter der Grafik sind die Reihenfolge, in der die Nukleotide vom Sequenzierer pipettiert wurden (DO = dispensation order), die zu analysierende Sequenz (STA = sequence to analyze), die Sequenz des Forward-Stranges nach Bisulfidmodifikation (FS (mod)) sowie die genomische Forward-Sequenz (FS = forward sequence) angegeben. Blaue Buchstaben = untersuchte CpGs; rote Buchstaben = Nukleotide, die als Kontrollen dienen.

Um den Methylierungsstatus des Promotors des *MSH2*-Gens genauer und zusätzlich quantitativ beurteilen zu können, wurde die gleiche Region der DNA von 70 der 79 NF1-Patienten (27 Männer und 43 Frauen, Tabelle 4.4) sowie 40 gesunden Kontrollpersonen (20 Männer und 20 Frauen, Tabelle 4.3) mittels Pyrosequenzierung untersucht. Pro DNA-Probe erfolgten im Durchschnitt acht Pyrosequenzierungs-Durchgänge, deren Resultate (Abb. 4.4) für jede Probe zu einem Mittelwert zusammengefasst wurden. Anhand dieser Mittelwerte erfolgte die Graduierung der Methylierung in 0-10 %, >10-20 %, 20-30 % und >30 %.

Bei dem Vergleich des Methylierungsgrades des *MSH2*-Promotors konnte für vier von sechs CpGs (CpG1, CpG3, CpG4 und CpG5) eine signifikant stärkere Methylierung bei NF1-Patienten gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.5 a). Die größten Gruppenunterschiede zeigte dabei das CpG4 an Position -87.

Der Vergleich des Methylierungsgrades innerhalb der Gruppe der NF1-Patienten ergab eine signifikant stärkere Methylierung der CpGs 3 und 4 bei stark betroffenen Patienten gegenüber den leichter betroffenen (siehe Abb. 4.5 b). Da auch in dem hier untersuchten Patientenkollektiv eine Zunahme der NF-Zahl mit steigendem Patientenalter zu beobachten war ( $p = 004$ ;  $\chi^2$ -Test), wurde

#### 4. Ergebnisse

Nr.	Alter (J.)	m/w	Ergebnisse der Pyrosequenzierung (%)						MW
			CpG1	CpG2	CpG3	CpG4	CpG5	CpG6	
K01	54	m	9,55	10,15	7,23	25,65	7,23	2,53	10,39
K02	62	m	8,03	8,98	7,95	13,70	6,68	4,25	8,26
K03	72	w	7,03	14,23	6,10	24,60	5,08	3,30	10,05
K04	72	w	5,15	11,63	5,58	21,65	4,38	2,80	8,53
K05	64	w	6,55	8,45	7,10	14,33	6,98	5,48	8,15
K06	37	m	0,00	7,00	0,00	10,08	0,00	1,28	3,06
K07	32	m	4,90	4,75	5,23	7,63	4,15	1,45	4,68
K08	68	w	3,08	8,90	5,70	14,38	4,30	1,73	6,35
K09	46	m	3,05	8,13	3,33	15,18	8,55	4,00	7,04
K10	60	w	6,85	6,53	3,58	15,98	7,05	5,90	7,65
K11	72	w	8,07	6,68	9,63	16,63	5,50	2,27	8,13
K12	66	w	6,55	13,90	7,00	16,43	7,00	5,35	9,37
K13	72	w	2,35	11,15	2,20	11,08	7,55	6,45	6,80
K14	68	w	0,00	12,13	0,00	10,83	2,20	1,70	4,48
K15	45	w	3,40	7,97	5,67	9,80	6,20	4,70	6,29
K16	60	w	0,00	2,80	0,00	7,13	0,00	1,67	1,93
K17	39	w	2,15	13,15	2,18	11,05	4,93	3,05	6,08
K18	58	m	6,55	5,78	8,55	19,35	4,55	2,58	7,89
K19	72	w	2,18	13,53	2,15	10,78	2,18	0,00	5,13
K20	62	w	0,00	15,17	0,00	13,60	0,00	0,00	4,79
K21	62	m	0,00	17,10	5,90	10,68	4,60	1,60	6,55
K22	18	w	2,90	12,20	2,50	11,90	3,13	10,23	7,14
K23	50	w	0,00	9,75	1,98	10,85	0,00	0,00	3,76
K24	67	m	0,00	10,08	0,00	17,45	0,00	0,00	4,59
K25	36	w	3,80	14,00	7,43	16,40	6,48	4,95	8,84
K26	64	m	0,00	11,55	2,38	8,88	2,45	0,00	4,21
K27	62	w	3,45	17,45	3,93	20,20	5,48	2,83	8,89
K28	61	w	2,80	13,77	2,60	23,88	13,48	3,40	9,99
K29	31	m	0,00	9,65	2,40	10,28	3,00	0,00	4,22
K30	51	w	7,95	13,03	8,28	17,58	6,45	5,08	9,73
K31	31	m	0,00	8,83	3,77	13,60	3,20	0,00	4,90
K32	49	m	0,00	12,50	0,00	4,20	1,85	1,43	3,33
K33	69	m	2,70	12,38	0,00	11,13	5,93	0,00	5,35
K34	59	m	0,00	10,03	0,00	8,13	4,65	0,00	3,80
K35	74	m	0,00	11,57	0,00	11,70	0,00	0,00	3,88
K36	70	m	0,00	9,38	0,00	9,65	1,93	0,00	3,49
K37	66	m	3,43	16,05	5,15	9,90	5,13	1,93	6,93
K38	43	m	3,93	17,23	3,40	20,28	3,83	0,93	8,26
K39	74	m	5,53	4,93	2,90	7,30	5,03	1,63	4,56
K40	60	m	5,15	8,38	5,65	20,23	4,88	4,20	8,08

**Tabelle 4.3: Untersuchungsergebnisse der Pyrosequenzierung bei Kontrollprobanden**

Alter = vollendete Lebensjahre zum Untersuchungszeitpunkt. Die Ergebnisse der Pyrosequenzierung sind für jedes CpG als Mittelwert aus allen Sequenzierungen angegeben; MW ist der Mittelwert der CpGs 1-6 eines Patienten.

#### 4. Ergebnisse

Pat.- Nr.	Alter (J.)	m/w	NF	Ergebnisse der Pyrosequenzierung (%)						
				CpG1	CpG2	CpG3	CpG4	CpG5	CpG6	MW
1	56	m	2	4,10	8,30	4,02	17,51	5,89	1,36	6,86
2	27	w	2	11,55	17,25	14,60	25,89	11,79	7,64	14,79
3	32	w	2	9,06	11,68	11,31	24,01	11,46	5,03	12,09
4	33	m	2	12,69	18,25	12,36	28,47	12,74	9,31	15,64
5	31	w	2	3,37	6,80	0,00	23,20	10,43	0,00	7,30
6	41	m	2	5,59	8,57	7,30	27,14	1,86	2,60	8,84
7	33	m	1	7,70	8,36	7,67	33,54	10,49	3,91	11,94
9	41	w	1	8,98	24,53	8,57	28,33	12,14	3,36	14,32
10	47	m	2	5,28	8,22	7,32	22,95	9,02	1,55	9,05
11	32	m	2	6,13	13,29	6,06	27,94	6,21	1,81	10,24
12	31	w	2	32,46	43,62	36,27	53,76	34,16	25,20	37,58
13	49	w	2	3,05	7,74	2,55	18,83	1,11	0,00	5,55
14	32	m	2	15,61	32,02	13,83	39,60	15,69	9,67	21,07
15	54	w	2	11,52	17,56	10,83	32,08	11,00	6,87	14,98
16	32	w	2	24,58	31,12	27,05	45,75	23,48	19,28	28,54
17	31	w	2	17,35	27,84	12,16	24,00	16,05	13,81	18,54
18	45	w	2	3,28	5,00	6,60	13,48	2,39	1,26	5,33
19	49	m	2	14,38	16,82	13,19	33,49	13,07	11,73	17,11
20	53	m	2	15,84	19,81	18,23	35,33	14,69	12,06	19,33
21	47	w	2	5,84	4,05	5,46	21,54	8,54	3,49	8,15
22	37	w	2	9,34	13,17	14,09	27,47	6,79	5,77	12,77
23	38	w	2	7,95	25,08	7,50	25,44	5,26	3,88	12,52
24	40	m	2	7,47	28,50	9,20	18,20	4,23	3,57	11,86
25	58	m	2	7,27	26,98	7,83	33,05	5,67	1,32	13,69
26	58	w	2	4,56	5,90	7,10	16,20	1,50	3,43	6,45
27	62	w	2	2,66	2,85	4,73	10,03	2,95	1,63	4,14
28	71	w	2	3,11	4,60	1,98	16,64	1,32	1,82	4,91
30	48	m	2	4,22	23,13	1,30	19,30	1,28	0,80	8,34
32	61	w	2	5,06	0,00	5,38	20,80	12,10	2,90	7,71
33	39	w	2	3,71	24,07	1,53	14,02	0,90	0,57	7,46
34	43	w	2	1,59	9,00	0,00	10,13	0,00	0,00	3,45
35	59	w	2	4,88	0,00	10,87	10,08	10,02	3,18	6,50
37	39	m	2	2,69	3,80	1,82	25,46	1,15	0,00	5,82
38	41	w	2	4,19	2,83	3,83	20,13	9,00	1,76	6,96
39	45	w	1	13,74	21,65	10,90	34,40	18,73	7,67	17,85
40	29	m	1	6,61	23,05	4,13	19,85	11,73	1,05	11,07
41	44	w	1	10,94	23,63	6,55	24,20	13,92	6,62	14,31
42	29	w	1	3,67	3,60	0,00	1,53	0,00	4,67	2,25
43	58	m	2	4,43	11,00	2,60	17,60	1,88	1,28	6,47
44	49	m	2	7,33	6,13	2,94	18,30	15,22	6,28	9,37
45	48	w	1	5,35	5,72	7,52	14,37	6,79	3,50	7,21
46	49	w	1	3,66	7,70	0,00	24,15	4,88	0,00	6,73
47	32	w	1	12,57	19,38	13,40	25,98	9,10	10,07	15,08
48	30	w	2	7,04	15,23	2,20	30,33	14,00	1,23	11,67
49	28	w	1	3,25	7,20	2,85	19,66	9,28	0,00	7,04



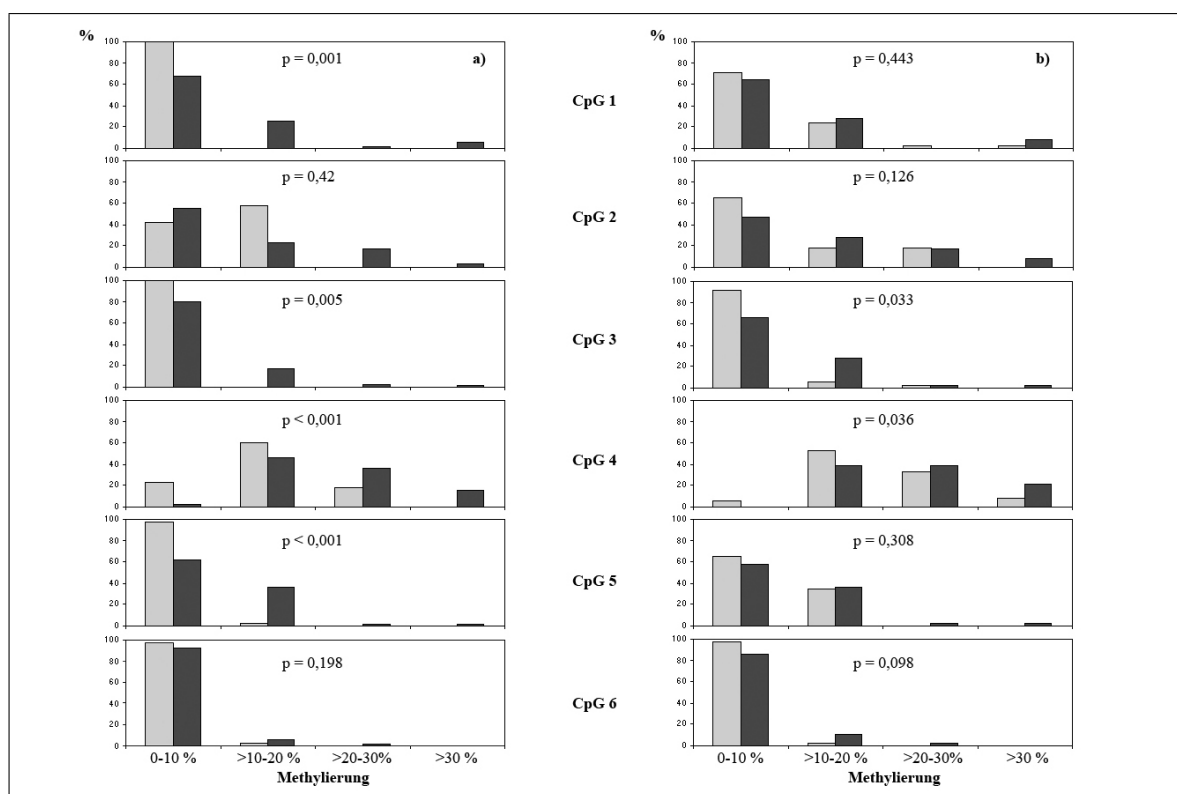
Pat.-Nr.	Alter (J.)	m/w	NF	Ergebnisse der Pyrosequenzierung (%)						MW
				CpG1	CpG2	CpG3	CpG4	CpG5	CpG6	
50	26	m	1	4,11	3,67	8,68	17,72	13,76	0,78	8,12
51	26	m	1	4,87	3,80	5,26	16,92	11,87	2,44	7,53
52	25	m	1	4,87	7,37	5,38	29,82	1,30	2,08	8,47
54	64	m	1	14,29	15,88	24,45	35,26	14,74	7,26	18,65
55	30	w	1	5,68	6,33	7,44	20,44	8,46	1,79	8,35
57	26	w	1	3,82	4,98	0,00	26,94	6,52	0,00	7,04
58	36	w	1	3,45	0,00	0,00	6,58	6,08	4,10	3,37
59	47	m	1	3,23	1,02	6,80	19,54	4,11	0,47	5,86
60	38	w	1	2,88	4,15	3,16	12,88	6,00	0,00	4,84
61	39	m	1	3,40	2,65	4,74	14,16	1,64	2,32	4,82
63	36	m	1	4,00	11,00	2,25	13,60	17,54	0,00	8,07
64	40	w	1	6,53	20,08	6,14	18,54	1,94	2,74	9,33
65	24	w	1	7,00	6,90	9,64	15,52	13,08	4,92	9,51
66	29	w	1	10,49	18,10	8,53	27,68	13,10	5,88	13,96
67	25	m	1	6,05	6,57	8,03	24,50	8,86	2,86	9,48
68	34	w	1	2,37	6,23	4,30	12,60	5,25	0,00	5,12
69	37	w	1	5,39	7,16	7,32	26,15	3,94	2,36	8,72
70	41	w	1	4,13	9,03	7,84	10,54	6,57	1,68	6,63
71	29	w	1	5,46	8,22	5,77	14,08	3,81	2,86	6,70
72	32	m	1	5,44	5,25	5,90	15,60	5,45	3,80	6,91
73	53	w	1	4,21	21,57	0,00	16,03	7,85	0,73	8,40
74	26	m	1	7,75	10,43	4,48	21,60	3,44	6,52	9,04
75	23	m	1	3,73	6,53	2,14	12,34	3,41	2,90	5,18
76	48	w	1	3,20	10,13	1,04	15,80	11,42	0,00	6,93
78	37	w	2	3,04	4,68	0,74	19,68	6,04	0,76	5,82

**Tabelle 4.4: Untersuchungsergebnisse der Pyrosequenzierung bei NF1-Patienten**

Alter = vollendete Lebensjahre zum Untersuchungszeitpunkt. Anzahl der Neurofibrome (NF): 1 = 0-60 NF (milder Phänotyp), 2 = >100 NF (schwerer Phänotyp). „MSP“ ≙ Intensität der detektierten Bande mit den Primern für methylierte DNA: 0 = keine Bande, 1 = schwache Bande, 2 = starke Bande. Die Ergebnisse der Pyrosequenzierung sind für jedes CpG als Mittelwert aus allen Sequenzierungen angegeben; MW ist der Mittelwert der CpGs 1-6 eines Patienten.

auf eine mögliche Altersabhängigkeit der Methylierung dieser CpGs hin untersucht. Hierbei fand sich kein Zusammenhang (CpG3:  $p = 0,99$ ; CpG4:  $p = 0,89$ ;  $\chi^2$ -Test), so dass nicht davon auszugehen ist, dass das Alter die beschriebene Korrelation zwischen der Methylierung der CpGs 3 und 4 und der Gruppe der stark betroffenen Patienten beeinflusst.

Wie in Abb. 4.5 ersichtlich, zeigt das CpG4 insgesamt eine stärkere Methylierung. Um dies statistisch zu belegen, wurden  $\kappa$ -Koeffizienten für die Konkordanz der Methylierung ( $\leq 20\%$  versus  $> 20\%$ ) bestimmt. Der Vergleich der CpGs 1, 2, 3 und 5 ergab  $\kappa$ -Koeffizienten zwischen 0,10 und 0,79 ( $p < 0,05$ ), was auf eine hohe Konkordanz der Methylierung hinweist. Im Gegensatz dazu resultierte der Vergleich des CpG4 mit den anderen CpGs in  $\kappa$ -Koeffizienten zwischen 0,03 und 0,14 ( $p > 0,05$ ). Dies belegt, dass sich die Methylierung des CpG4 von der der anderen unterscheidet.



**Abbildung 4.5: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Pyrosequenzierung**

a) CpG-Methylierung bei NF1-Patienten (dunkle Balken) und Kontrollpersonen (helle Balken).

b) CpG-Methylierung bei NF1-Patienten mit > 100 NF (dunkle Balken) und < 60 NF (helle Balken).

#### 4.1.3 MMR-Methylierung in NF1-assoziierten Tumoren

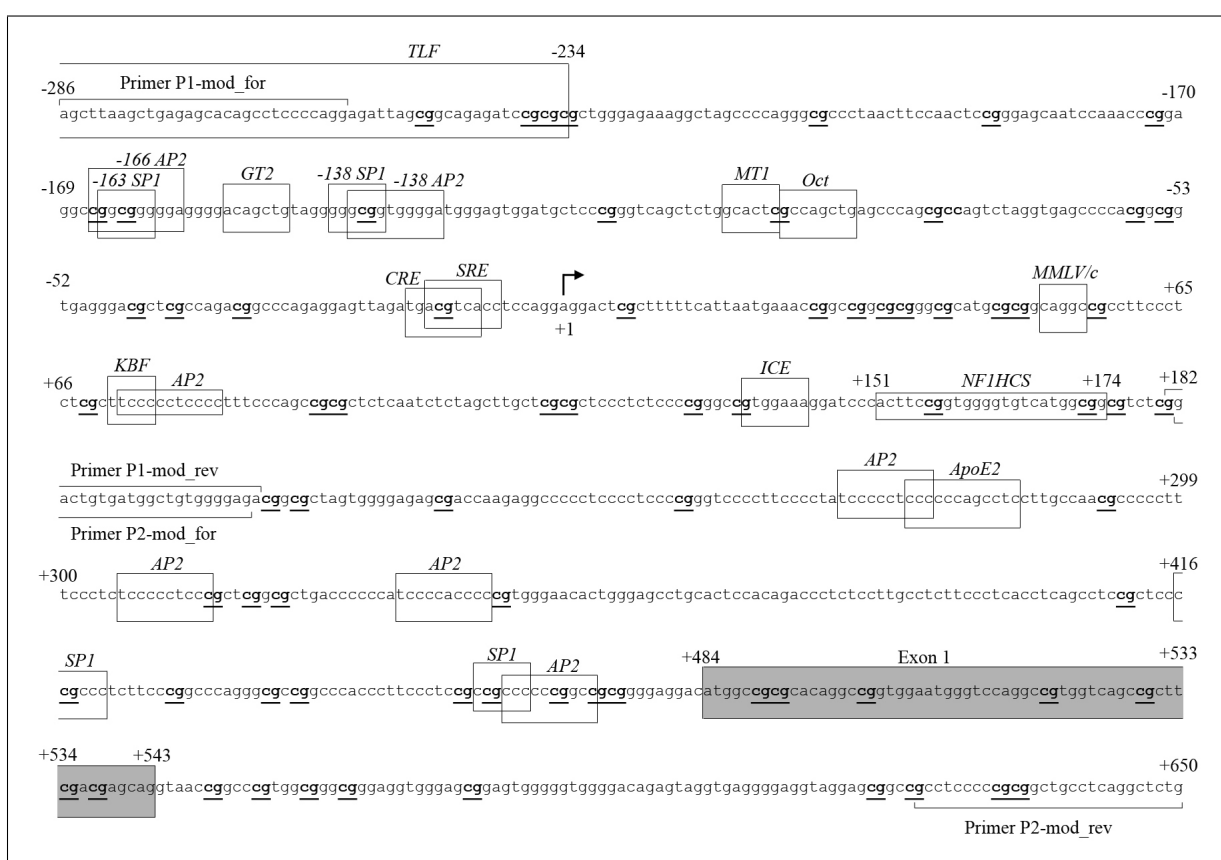
Insgesamt wurden 38 DNA-Proben aus 33 Tumoren von 25 NF1-Patienten hinsichtlich der Promotormethylierung der „Mismatch Repair“-Gene (MMR) *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* und *PMS2* mittels Methylierungsspezifischer PCR (MSP) untersucht. Für die Promotoren von *MSH6* und *PMS2* ließ sich hierbei in keiner der Proben eine Methylierung nachweisen. Bei der Untersuchung der Promotoren von *MLH1* und *MSH2* zeigten sich bei lediglich vier Proben extrahiert aus zwei MPNSTs von zwei Patienten Reaktionen mit den Primern für methylierte DNA. Nachfolgend ist für jedes der MMR-Gene die Anzahl der methylierten Proben pro untersuchter Tumorentität angegeben:

	MLH1	MSH2	MSH6	PMS2
kutane Neurofibrome	0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
plexiforme Neurofibrome	0 / 8	0 / 8	0 / 8	0 / 8
maligne periphere Nervenscheidentumore	<b>2 / 11</b> <b>(18 %)</b>	<b>4 / 14</b> <b>(29 %)</b>	0 / 9	0 / 14
pilozytische Astrozytome	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4

## 4.2 Methylierungsmuster des *NF1*-Promotors bei eineiigen Zwillingen

### 4.2.1 Überblick über die untersuchte Region

Für diese Arbeit wurde ein Bereich von -286 bis +650 in Relation zum Transkriptionsstart entsprechend der Nummerierung von Hajra et al. untersucht (Abb. 4.6) [33]. Nach Ausschluss der Primerbindungsstellen blieben für die weitere Auswertung ein Bereich von -256 bis +180 und ein Bereich von +204 bis +622, die insgesamt 327 Cytosinreste enthielten. Diese verteilten sich auf 72 CpGs (davon 20 CCGs, 5 CCCGs, 3 CCCCCGs, 1 CCCCCG und 1 CCCCCCG) sowie 255 Non-CpGs (43 CpAs, 148 CpCs und 64 CpTs).



**Abbildung 4.6: Überblick über die untersuchte Region des *NF1*-Promotors**

Die Klammern ober- und unterhalb der Sequenz kennzeichnen die Bindungsstellen der für die PCR verwendeten Primer. Alle untersuchten CpGs sind Fett hervorgehoben und unterstrichen. Der Transkriptionsstartpunkt ist durch einen Pfeil oberhalb der Sequenz markiert und entsprechend Hajra et al. mit +1 nummeriert [33]. Die grau unterlegte Box entspricht dem Exon 1. Wichtige Promotorelemente wurden mit schwarzen Rahmen versehen.

#### 4.2.2 Durchschnittliche Methylierung einzelner Abschnitte der untersuchten Region

Pro zu untersuchender DNA wurden zwischen 8 und 46 Klone (durchschnittlich 25) sequenziert und anschließend die prozentuale Methylierung für jeden Cytosinrest ermittelt. Waren beispielsweise 5 von 25 sequenzierten Klonen an einer Position methyliert, so betrug die prozentuale Methylierung an dieser Position 20 %. Insgesamt schwankte der Methylierungsgrad der einzelnen Cytosinreste im untersuchten Patientenkollektiv zwischen 0 % und 40,5 %. Zur Berechnung des Methylierungsgrades eines bestimmten Fragmentes innerhalb der untersuchten Region wurde die Summe aller Prozentwerte dieses Fragmentes durch die Anzahl der enthaltenen Cytosinreste beziehungsweise CpGs dividiert. Abbildung 4.7 zeigt die durchschnittliche Methylierung verschiedener Bereiche der untersuchten Region unter Einbeziehung der Daten aller Zwillinge. Dabei zeigt sich, dass das Exon 1 durchschnittlich am stärksten methyliert war. Ebenso zeigen die CpGs im Mittel eine höhergradigere Methylierung als die Non-CpGs.

	Promotor (-256 bis -1)	5'UTR (+1 bis +483)	Exon 1 (+484 bis +543)	Intron 1 (+544 bis +622)	gesamt (-256 bis +622)
Methylierung der Cytosine	<b>2,91 %</b> ± 2,78 %	<b>2,50 %</b> ± 1,63 %	<b>5,55 %</b> ± 6,01 %	<b>2,36 %</b> ± 2,14 %	<b>2,76 %</b> ± 1,98 %
Methylierung der CpGs	<b>3,69 %</b> ± 2,74 %	<b>3,17 %</b> ± 1,96 %	<b>5,53 %</b> ± 6,08 %	<b>2,52 %</b> ± 2,27 %	<b>3,47 %</b> ± 2,26 %

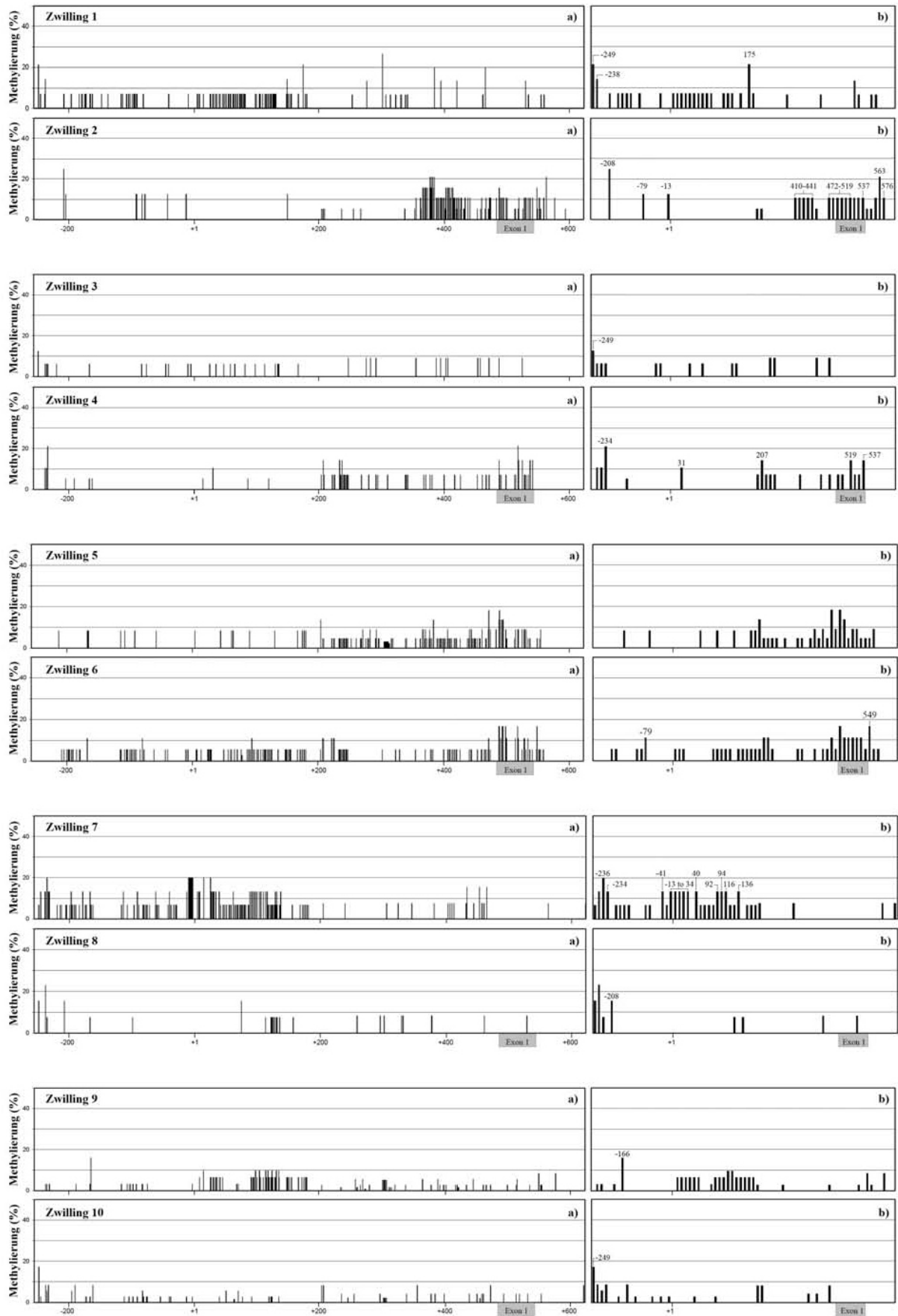
**Abbildung 4.7: Durchschnittliche Methylierung verschiedener Bereiche des *NFI*-Promotors**

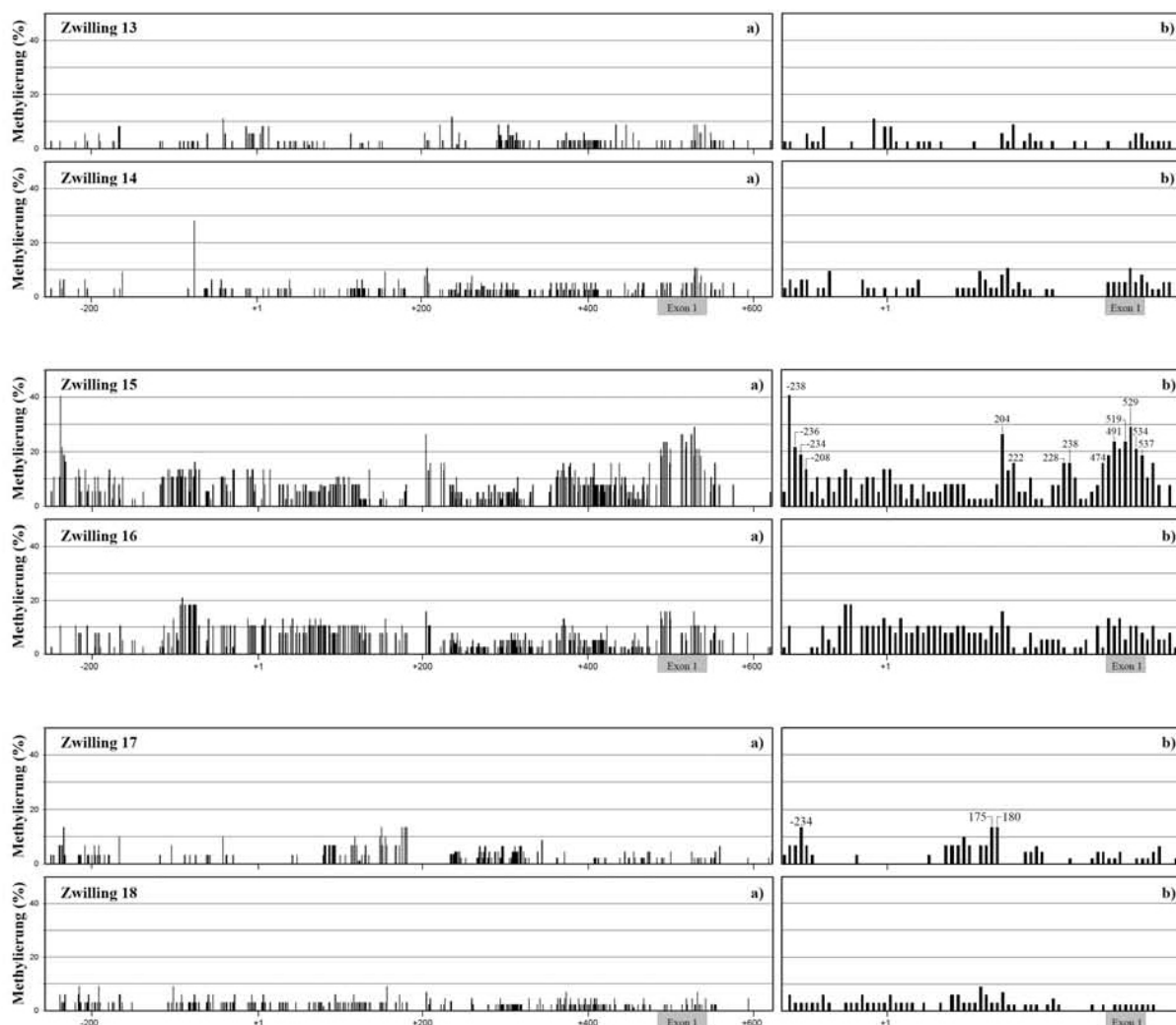
Angegeben sind die Mittelwerte der Methylierung aller Cytosinreste (obere Reihe) beziehungsweise aller CpGs (untere Reihe) der jeweiligen Region des *NFI*-Promotors plusminus der Standardabweichung. Die unterschiedlich dunkle Einfärbung der Boxen gibt die Stärke der Methylierung wieder: von hell- nach dunkelgrau zunehmende Methylierung.

#### 4.2.3 Unterschiede in der Methylierung innerhalb der Paare

In Abbildung 4.8 ist die Methylierung aller Cytosinreste und CpGs im untersuchten Fragment graphisch dargestellt. Innerhalb der Zwillingspaare erkennt man deutliche Unterschiede im Methylierungsgrad einzelner Cytosine sowie längerer DNA-Abschnitte. Um regionale Unterschiede in der Methylierung zwischen den Zwillingen zu detektieren, wurden zunächst alle Positionen notiert, an denen sich die Methylierung zweier Geschwister um mindestens 10 Prozentpunkte unterschied. Diese werden im Folgenden für die einzelnen Paare beschrieben. Die Paare A, B und H zeigten deutliche Methylierungsunterschiede in Exon 1, das Paar D im Promotor. Die größte Differenz der Methylierung in einer Region ließ sich bei Paar D für die CRE-Position (0 gegenüber 16,67 %) nachweisen.

## 4. Ergebnisse





#### Abbildung 4.8: Darstellung der Methylierung aller Cytosine im untersuchten Fragment

Auf der linken Seite (a) ist der Methylierungsgrad aller Cytosine im untersuchten Bereich dargestellt. Rechts (b) findet dich eine Darstellung nur der CpGs in der gleichen Region. Für diejenigen CpGs, deren Methylierung sich zwischen den Geschwistern um mindestens 10 Prozentpunkte unterscheidet wurde ihre Positionsnummer entsprechend Hajra et al. angegeben [33].

#### Zwillingspaar A (Zwillinge 1 und 2)

Das Zwillingspaar A wies die meisten Cytosine und CpGs mit unterschiedlichem Methylierungsgrad auf. Zwilling 2 zeigte vor allem in naher Umgebung zum Exon 1 auffällig starke Methylierungen, insbesondere zwischen den Positionen +355 und +441. In dieser Region befinden sich mutmaßliche Bindungsstellen für SP1 und AP2 (+336 bis +345, +416 bis +421 und + 460 bis 465). Im restlichen untersuchten Fragment ließen sich dagegen nur geringe Methylierungen nachweisen. Klinisch hervorzuheben ist bei dieser Patientin das Vorhandensein von zwei plexiformen Neurofibromen. Bei Zwilling 1 hingegen zeigte sich die Region um das Exon 1 nur geringfügig methyliert. Bemerkenswert ist jedoch die relativ starke Methylierung der TLF-Bindungsregion (-249 bis -234) in Zusammenhang mit dem Vorhandensein eines Optikusglioms (siehe hierzu auch Kapitel 4.2.6).

### **Zwillingspaar B (Zwillinge 3 und 4)**

Das Zwillingspaar B, das sich phänotypisch diskordant bezüglich der Pignentierung sowie des Vorhandenseins einer Skoliose präsentierte, wies insgesamt eine deutlich geringere Methylierung und weniger Unterschiede im Methylierungsgrad einzelner Cytosine auf. Eine deutlich unterschiedliche Methylierung zeigte sich jedoch im Exon 1.

### **Zwillingspaar C (Zwillinge 5 und 6)**

Bei Zwillingspaar C zeigten sich zwar regionale Unterschiede in der Methylierung. Jedoch waren nur wenige Cytosinreste mehr als zu 10 % methyliert. Lediglich das Exon 1 war bei beiden Patienten etwas stärker methyliert.

### **Zwillingspaar D (Zwillinge 7 und 8)**

Das Zwillingspaar D wies deutliche Unterschiede in der Methylierung im gesamten untersuchten Fragment auf. Während Zwilling 7, klinisch auffällig durch das Vorhandensein eines Optikusglioms, besonders im Bereich der TLF-Bindung sowie um den Transkriptionsstart Methylierungsgrade von bis zu 20 % aufwies, zeichnete sich Zwilling 8 durch die im gesamten untersuchten Patientenkollektiv geringste Methylierung aus.

### **Zwillingspaar E (Zwillinge 9 und 10)**

In der *NFI*-Promotorregion von Zwillingspaar E ließ sich nur eine sehr geringe Methylierung nachweisen. Bei jedem zeigte lediglich ein CpG eine Methylierung größer als 10 %. Dieses war bei Patient 10, der unter einem Optikusgliom litt, im TLF-Bindungsbereich (Position -249) gelegen.

### **Zwillingspaar G (Zwillinge 13 und 14)**

Zwillingspaar G, welches von allen eingeschlossenen Patienten den mildesten *NF1*-Phänotyp aufwies, präsentierte von allen Paaren die geringsten Methylierungsunterschiede. Allein an Position -76 zeigte Zwilling 14 eine stärkere Methylierung (28,13 % gegenüber 0 %).

### **Zwillingspaar H (Zwillinge 15 und 16)**

Bei dem in dieser Untersuchung jüngsten Zwillingspaar ließ sich die stärkste Methylierung des *NFI*-Promotors nachweisen, wobei die Unterschiede innerhalb des Paares nur gering waren. Zwilling 15, symptomatisch vor allem durch ein Optikusgliom und einzelne Neurofibrome, zeigte jedoch im Bereich der TLF-Bindung sowie im Exon 1 eine deutlich stärkere Methylierung.

### **Zwillingspaar I (Zwillinge 17 und 18)**

Das älteste Zwillingspaar wies nur eine sehr geringe Methylierung des *NFI*-Promotors mit wenigen Unterschieden innerhalb des Paares auf. Lediglich ein eng umschriebener Bereich von +150 bis +180 war bei Zwilling 17 etwas stärker methyliert.

### 4.2.4 Methylierung spezifischer Promotorelemente

Da einige der Zwillinge eine verstärkte Methylierung in umschriebenen Abschnitten des untersuchten Fragmentes aufwiesen, wurde auch die durchschnittliche Methylierung verschiedener bisher identifizierter Promotorelemente bestimmt. Um ein Maß für die „Epigenetische Distanz“ zu erhalten, welches eine Quantifizierung der Methylierungsunterschiede innerhalb der Zwillingspaare erlaubt, wurden zunächst die Differenzen der Werte der durchschnittlichen Methylierung für jedes Paar berechnet. Anschließend wurden die erhaltenen Werte aller Paare für verschiedene Regionen mithilfe eines t-Tests gegen 0 verglichen. Die Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 4.5 dargestellt.

Sowohl für die CpG- als auch die Cytosin-Methylierung ergaben sich dabei für fast alle untersuchten Subregionen und Promotorelemente p-Werte, die auf statistisch signifikante Differenzen in der Methylierung schließen lassen. Lediglich die SP1-Bindungsstelle an Position -141 (CpG bei -138) zeigte überhaupt keine Methylierungsunterschiede. Bezüglich des Intron 1, des minimalen proximalen Promotors, des tax-Elements sowie der „CRE site“ an Position -13/-10 waren nur die Werte für die CpG-Methylierung signifikant.

Nach Erweiterung des Konfidenzintervalls der Variable auf 99 % zur Berücksichtigung des multiplen Testens blieben für die Region, welche die 5'UTR sowie Exon und Intron 1 umfasst (+1 bis +622) und für den Repressor (+144 bis +474) statistisch signifikante Resultate sowohl für CpG- als auch Cytosin-Methylierung erhalten. Der neudefinierte Promotor (-228 bis +373), eine mutmaßliche AP2-Bindungsstelle (+463 bis +472) und die NF1HCS (+151 bis +174) zeigten weiterhin statistisch signifikante Unterschiede hinsichtlich der Cytosin-Methylierung, wohingegen ein Kernpromotor (+248 bis +399) nur signifikante Unterschiede in der CpG-Methylierung aufwies. Auch die mutmaßliche SP1/AP2-Bindungsstelle (CpGs bei -166 und -163) zeigte eine statistisch signifikante Differenz in der Methylierung bei einem Konfidenzintervall von 99 %.

### 4.2.5 Methylierungsunterschiede in Relation zur Anzahl der Neurofibrome

Zunächst wurde der Vergleichswert  $\Delta Nf$  als Maß für die Diskordanz der Paare bezüglich der Anzahl der Neurofibrome definiert, wobei Werte von 0 für völlige Konkordanz und Werte von 1 für maximale Diskordanz standen (siehe hierzu auch Kapitel 3.2.2 und Tabelle 3.1). Dieser wurde dann für jedes Paar anhand des Spearman Rangkorrelationskoeffizienten mit den Methylierungsunterschieden in den analysierten Subregionen verglichen. Dabei ließ sich jedoch kein Zusammenhang zwischen der Diskordanz bezüglich der Anzahl der Neurofibrome und Methylierungsunterschieden innerhalb der Zwillingspaare beziehungsweise dem Grad der Methylierung nachweisen. Auch hinsichtlich anderer NF1-Merkmale zeigte sich kein derartiger Zusammenhang.



	Quelle	C Met (%)	C Diff (%)	P (95%)	CpG Met (%)	CpG Diff (%)	P (95%)
gesamtes Fragment (-256 bis +622)	[33]	2,76 ± 0,50	0,99 ± 0,37	0,030	3,47 ± 0,57	1,23 ± 0,42	0,022
5'UTR, Exon 1, Intron 1 (+1 bis +622)	[33]	2,71 ± 0,47	1,01 ± 0,26	<b>0,006*</b>	3,39 ± 0,57	1,46 ± 0,35	<b>0,004*</b>
Promotor (-256 bis -1)	[33]	2,91 ± 0,70	1,77 ± 0,07	0,004	3,69 ± 0,69	1,75 ± 0,52	0,012
5'UTR (+1 bis +483)	[33]	2,50 ± 0,41	0,81 ± 0,31	0,034	3,17 ± 0,49	1,21 ± 0,51	0,049
Exon 1 (+484 bis +543)	[33]	5,55 ± 1,51	4,14 ± 1,44	0,024	5,53 ± 1,52	4,44 ± 1,54	0,024
Intron 1 (+544 bis +622)	[33]	2,36 ± 0,54	1,55 ± 0,73	0,071	2,52 ± 0,67	2,06 ± 0,61	0,012
min. prox. Promotor (-249 bis +230)	[115]	3,12 ± 0,68	1,83 ± 0,81	0,058	3,71 ± 0,64	1,83 ± 0,66	0,027
neudefinierter Promotor (-228 bis +373)	[56]	1,79 ± 0,33	0,83 ± 0,21	<b>0,005*</b>	3,19 ± 0,57	1,61 ± 0,64	0,390
Kernpromotor (-21 bis +131)	[56]	3,22 ± 0,83	3,02 ± 1,10	0,028	3,44 ± 0,79	2,99 ± 1,14	0,035
Kernpromotor (+248 bis +399)	[56]	1,89 ± 0,37	0,97 ± 0,29	0,012	1,73 ± 0,38	1,20 ± 0,22	<b>0,001*</b>
TLF (-249 bis -234)	[11]	5,17 ± 1,29	5,57 ± 1,75	0,015	6,58 ± 1,50	5,99 ± 2,07	0,023
tax cis element (-236 bis -3)	[24]	2,79 ± 0,69	1,63 ± 0,74	0,064	3,23 ± 0,64	1,49 ± 0,57	0,036
CRE (-16 bis -9)	[33, 61]	4,43 ± 1,28	4,23 ± 1,82	0,053	4,37 ± 1,42	4,66 ± 1,91	0,045
SP1 / AP2 (CpG bei -138)	[33, 61]	0,95 ± 0,55	1,24 ± 0,91	0,216	0,95 ± 0,55	1,24 ± 0,91	0,216
AP2 (CpGs bei -166 und -163)	[33]	3,91 ± 0,77	4,02 ± 0,75	<b>0,001*</b>	3,91 ± 0,77	4,02 ± 0,75	<b>0,001*</b>
Repressor (+144 bis +474)	[100]	2,25 ± 0,39	1,12 ± 0,24	<b>0,003*</b>	3,03 ± 0,49	1,17 ± 0,31	<b>0,007*</b>
NFIHCS (+151 bis +174)	[56]	3,41 ± 0,71	4,12 ± 0,69	<b>0,001*</b>	3,38 ± 0,77	3,59 ± 1,03	0,010
Repressor (+231 bis +539)	[115]	2,43 ± 0,50	1,39 ± 0,47	0,022	3,33 ± 0,79	2,08 ± 0,83	0,040
AP2 (+463 bis +472)	[33]	2,11 ± 0,39	1,14 ± 0,28	<b>0,004*</b>	3,43 ± 0,85	1,93 ± 0,62	0,018

**Tabelle 4.5: Methylierung spezifischer Promotorelemente**

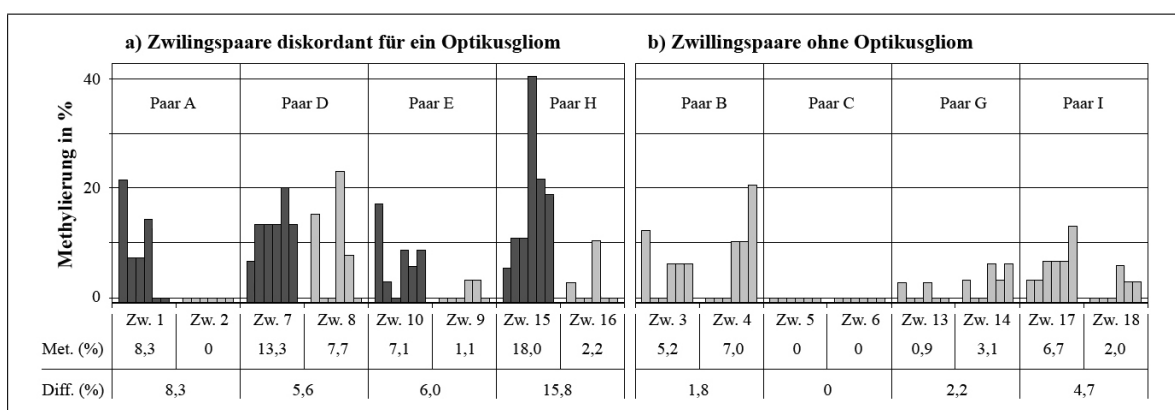
Angabe sind die Werte der durchschnittlichen Cytosin- (C Met) und CpG-Methylierung (CpG Met) der Subregionen plusminus des Standardfehlers, die Differenz der Methylierung (C Diff, CpG Diff) plusminus des Standardfehlers sowie die P-Werte der statistischen Analyse mit einem Konfidenzintervall von 95 % (P (95 %)). Fett geschrieben und mit einem Stern (\*) gekennzeichnet wurden diejenigen Werte, die nach Erweiterung des Konfidenzintervalls auf 99 % statistisch signifikant blieben. min. prox. Promotor = minimaler proximaler Promotor.

#### 4.2.6 Methylierung der Subregion -256 bis -234 in Relation zum Vorhandensein eines Optikusglioms

Um zu untersuchen, ob sich die *NFI*-Promotor-Methylierung bei Zwillingspaaren, die diskordant für bestimmte Krankheitsmerkmale sind, von konkordanten Paaren unterscheidet, war es nötig, das Patientenkollektiv in gleich große Gruppen zu teilen. Wie aus Tabelle 3.1 auf Seite 20 ersichtlich ist, waren jeweils vier Paare konkordant und vier Paare diskordant für das Vorhandensein eines Optikusglioms beziehungsweise einer Skoliose. Für diese beiden Merkmale erfolgte daher der Vergleich konkordanter und diskordanter Paare, wobei insgesamt 26 Regionen mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests untersucht wurden. Für alle anderen erfassten Krankheitsmerkmale konnte keine statistische Analyse vorgenommen werden, da aufgrund der begrenzten Patientenzahl, die Gruppengrößen zu asymmetrisch ausgefallen wären.

Bezüglich des Optikusglioms fanden sich hierbei statistisch signifikante Unterschiede ( $p = 0,021$ ) in der Methylierung des Bereichs von -249 bis -234, welcher ein Teil der TLF-Bindungsregion darstellt. Wie die Abbildung 4.9 zeigt, weisen Paare, die konkordant für das Fehlen eines Optikusglioms sind, nicht nur geringere Unterschiede in der Methylierung dieser Region auf sondern auch insgesamt ein deutlich geringere Methylierung. Paare, die diskordant für das Vorhandensein eines Optikusglioms sind, zeigen hingegen größere Unterschiede in der Methylierung bedingt durch eine stärkere Methylierung bei dem Zwilling mit Optikusgliom.

Ähnliche Unterschiede konnten für keine weitere Region gefunden werden. Auch der Vergleich von Paaren, die diskordant für das Vorhandensein einer schweren Skoliose waren, mit denjenigen ohne Skoliose, erbrachte keine signifikanten Gruppenunterschiede.



**Abbildung 4.9: Methylierung der TLF-Bindungsregion bei Vorliegen eines Optikusglioms**

Für jeden Patienten ist die Methylierung der sechs Cytosinreste der Region -256 bis -234 dargestellt. Die Grafiken beider Zwillinge eines Paares sind jeweils nebeneinander abgebildet und durch vertikale Linien von denen der anderen Paare getrennt. In der linken Abbildung (a) sind die Zwillingspaare dargestellt, die diskordant für ein Optikusgliom sind, wobei die dunklen Balken den Zwilling mit Optikusgliom kennzeichnen. Die rechte Abbildung (b) zeigt die Daten für die Paare, in denen kein Optikusgliom aufgetreten ist. Unter der Grafik sind für jeden Patienten die durchschnittliche Methylierung der Region (Met. (%)) und für jedes Paar die Differenz der Methylierung (Diff. (%)) angegeben.

## 5 Diskussion

### 5.1 Promotormethylierung bei MMR-Genen als potentieller „Modifizierer“ der NF1

#### 5.1.1 Promotormethylierung der MMR-Gene *MLH1*, *MSH6* und *PMS2* in Leukozyten von NF1-Patienten

Für diese Arbeit wurde die DNA aus Leukozyten von insgesamt 79 NF1-Patienten untersucht, wobei sich keine Methylierung in den Promotoren der „Mismatch Repair“-Gene *MLH1*, *MSH6* und *PMS2* nachweisen ließ.

In anderen Studien wurde jedoch bei bisher 25 Individuen eine konstitutionelle Methylierung im Promotor des *MLH1*-Gens gefunden [14]. Diese sogenannte Epimutation führte auch ohne nachweisbare Veränderung in der DNA-Sequenz zu einem Verlust der Expression des betroffenen Allels. Die meisten dieser Patienten entwickelten multiple Tumore und bei einigen konnte die Diagnose eines Lynch-Syndroms gestellt werden. In einer Studie an transgenen NF1-Mäusen erhöhte eine *MLH1*-Defizienz die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung von Leukämien, was als Hinweis auf eine entscheidende Bedeutung der DNA-Reparatur für die Entstehung NF1-assoziiierter Tumoren gedeutet werden kann [32].

Desweiteren konnte eine reduzierte Expression von „Mismatch Repair“-Genen in T-Zell-Leukämiezellen nachgewiesen werden [64]. *PMS1* und *MSH2* waren dabei in allen Fällen supprimiert, wobei sich im Gegensatz zu *PMS1* die *MSH2*-Suppression nicht durch Demethylierung aufheben ließ, was gegen eine Reduktion der Expression durch Methylierung spricht. Bei fünf gesunden Kontrollprobanden zeigten die „Mismatch Repair“-Gene eine normale Aktivität.

#### 5.1.2 Promotormethylierung des MMR-Gens *MSH2* in Leukozyten von NF1-Patienten und Kontrollpersonen

##### 5.1.2.1 Konstitutionelle MMR-Defekte und die Neurofibromatose Typ 1

Obwohl sich in den letzten Jahren Berichte über Kinder mit konstitutionellen „Mismatch Repair“-Defekten und Merkmalen der Neurofibromatose Typ 1 häufen, konnte bisher lediglich in einem Fall auch eine *NF1*-Mutation nachgewiesen werden. Es handelte sich dabei um ein Kind, das im Alter von 12 Monaten an einer atypischen chronisch-myeloischen Leukämie erkrankte und darüber hinaus mehr als 10 Café-au-lait-Flecken sowie zwei kutane Neurofibrome aufwies [2]. Genetische Untersuchungen identifizierten schließlich eine homozygote Mutation im *MLH1*-Gen sowie eine heterozygote *NF1*-Mutation, die zur Ausbildung eines verkürzten Neurofibromins (p.R1241X) ohne GTPase-aktivierende Funktion führte.

Zahlreiche weitere Berichte von Kindern mit homozygoten Mutationen in einem der „Mismatch

Repair“-Gene und Merkmalen der NF1 finden sich in der Literatur (siehe auch Tabelle 1.1 auf Seite 8). *NF1*-Mutationen ließen sich in den meisten Fällen jedoch nicht nachweisen. Wimmer und Etzler prägten für dieses Phänomen den Begriff des „Constitutional Mismatch Repair-Deficiency (CMMR-D) Syndrome“ und führten die NF1-Merkmale auf ein möglicherweise bestehendes *NF1*-Mosaik zurück [114].

### 5.1.2.2 Bedeutung des MMR-Gens *MSH2* für die Entstehung von Neurofibromen

Bisher gibt es nur wenige Untersuchungen zu einem möglichen Zusammenhang zwischen Veränderungen in einem der „Mismatch Repair“-Gene und der Entstehung von Neurofibromen. Maertens et al. konnten jedoch ein gehäuftes Auftreten einer Variante des *MSH2* bei NF1-Patienten mit vielen Neurofibromen nachweisen [60]. Diese Variante (p.G322D) führt zu einer verminderten Effizienz der DNA-Reparatur im *Saccharomyces cerevisiae*-Modell, wodurch die Hypothese gestützt wird, dass MMR-Defekte zu einer verstärkten Neurofibromentstehung prädisponieren.

Eine erst kürzlich veröffentlichte Arbeit erbrachte den Nachweis von Mikrosatelliteninstabilität (MSI) als typisches Zeichen einer reduzierten DNA-Reparatur in 21 von 89 Neurofibromen (24 %) von drei NF1-Patienten mit einer hohen Anzahl an Tumoren [92]. Mutationen in den „Mismatch Repair“-Genen fanden sich jedoch nicht, so dass die MSI möglicherweise auf epigenetische Veränderungen zurückzuführen ist.

### 5.1.2.3 Einfluss der *MSH2*-Methylierung auf Genexpression und Tumorentstehung

Kürzlich konnte in einer Untersuchung an primären Brust-Tumoren von 232 indischen Frauen gezeigt werden, dass die Methylierung des *MSH2*-Promotors zu DNA-Reparaturdefekten führt [67]. Dabei ließ sich ein starker Zusammenhang zwischen der *MSH2*-Promotormethylierung, detektiert durch eine Methylierungsspezifische PCR mit den gleichen Primern wie die für diese Arbeit verwendeten, und der Expression des *MSH2*-Gens nachweisen. Daraus lässt sich schließen, dass die Hypermethylierung des *MSH2*-Promotors eine mögliche Ursache für die eingeschränkte DNA-Reparatur in Tumorzellen darstellt.

### 5.1.2.4 Zusammenhang zwischen der *MSH2*-Promotormethylierung und der Entstehung von Neurofibromen

Da bisher keine konstitutionellen Mutationen im *MSH2*-Gen bei NF1-Patienten nachgewiesen werden konnten, es aber Hinweise auf eine reduzierte DNA-Reparatur als Ursache für die Entstehung von Neurofibromen gibt, könnten epigenetische Veränderungen, wie die Methylierung des *MSH2*-Promotors, eine mögliche Erklärung für einen „Mismatch Repair“-Defekt darstellen.

In dieser Arbeit konnte zunächst durch zwei verschiedene Methoden, die Methylierungsspezifische PCR (MSP) und die Pyrosequenzierung, gezeigt werden, dass der Promotor des *MSH2*-Promotors

im Blut von NF1-Patienten stärker methyliert ist als bei gesunden Kontrollprobanden. Zusätzlich belegen die Ergebnisse der Pyrosequenzierung eine positive Korrelation zwischen der Stärke der Methylierung zweier CpGs im *MSH2*-Promotor und der Anzahl der Neurofibrome. Somit kann angenommen werden, dass die Reduktion der DNA-Reparatur durch Methylierung des *MSH2*-Promotors ein potentieller „Modifizierer“ des Phänotyps der Neurofibromatose Typ 1 ist und sich insbesondere auf die Entstehung von Neurofibromen durch eine Neigung zu „second hits“ auswirkt.

Bei den Untersuchungen für diese Arbeit zeigten sich für einige der CpGs Unterschiede in der Methylierung beim Vergleich von NF1-Patienten mit vielen beziehungsweise wenigen Neurofibromen (CpG3 und CpG4) sowie beim Vergleich von NF1-Patienten mit Kontrollprobanden (MSP, CpG1, CpG3, CpG4, CpG5). Daraus ergibt sich die Frage nach der Bedeutung einzelner CpGs. Das CpG5 an Position -80, das bei NF1-Patienten im Vergleich zu Kontrollprobanden signifikant stärker methyliert war, liegt inmitten einer potentiellen E1AF-Bindungsstelle [42]. Ob die Bindung des E1AF an dieser Stelle methylierungssensitiv ist und welche Auswirkungen eine Methylierung des CpG5 auf die Genexpression von *MSH2* hat, wurde bisher zwar noch nicht untersucht. Shin et al. konnten jedoch im Luziferase-Assay zeigen, dass die Insertion eines Adenin an Position -80 zu einem 82 %-igen Rückgang der Promotoraktivität des *MSH2* führt [86]. Diese Insertion wurde bei einigen HNPCC-Patienten gefunden und wies eine neue Fähigkeit zur Bindung von Transkriptionsfaktoren auf. Diese Ergebnisse lassen zumindest vermuten, dass die E1AF-Bindungsstelle eine besondere Bedeutung für die Genexpression des *MSH2* hat.

Auch das CpG4, welches klare Gruppenunterschiede in der Methylierung im Vergleich von NF1-Patienten mit Kontrollprobanden sowie im Vergleich von NF1-Patienten mit vielen beziehungsweise wenigen Neurofibromen aufweist, liegt in einer potentiell bedeutsamen Region, nämlich in unmittelbarer Nähe zum Transkriptionsstartpunkt bei Position -85. Die Untersuchung des tatsächlichen Einflusses der Methylierung an dieser Stelle auf die Genexpression steht jedoch noch aus.

### 5.1.2.5 Bedeutung der *MSH2*-Promotormethylierung für den Umgang mit NF1-Patienten

Da die Untersuchungen für diese Arbeit sich auf Leukozyten beschränkten, können lediglich Vermutungen über die tatsächliche Bedeutung dieser Ergebnisse für die Rolle des *MSH2* bei der Entstehung der klinischen Variabilität der Neurofibromatose Typ 1 angestellt werden. Weitere Untersuchungen wie die Analyse der *MSH2*-Expression in Schwannzellen und anderen Geweben sind notwendig. Sollte sich die *MSH2*-Expression jedoch als „Modifizierer“ der NF1 bestätigen, so könnte die *MSH2*-Promotormethylierung als diagnostischer Marker für den zu erwartenden Schweregrad der Erkrankung bei betroffenen Patienten genutzt und Vorsorgeuntersuchungen entsprechend individuell gestaltet werden.

### 5.1.2.6 *MSH2*-Promotormethylierung bei gesunden Kontrollpersonen

Soweit bekannt, konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals eine *MSH2*-Promotormethylierung in Leukozyten gesunder Probanden nachgewiesen werden. In weiteren Untersuchungen gilt es nun zu erforschen, wie sich dies auf die Effizienz der DNA-Reparatur in den verschiedenen Geweben auswirkt. Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob die beobachtete Methylierung eine konstitutionelle Modifikation darstellt oder ob sich diese Veränderung im Laufe des Lebens in einzelnen Geweben einstellt.

Chan et al. identifizierten eine Epimutation im *MSH2*-Promotor, die bei einer Familie mit gehäuftem Auftreten kolorektaler Karzinome in drei Generationen nachgewiesen werden konnte, unter anderem anhand einer Methylierungsspezifischen PCR mit Primern wie auch in der vorliegenden Arbeit [10]. Die Methylierung zeigte sich dabei in den verschiedenen Geweben unterschiedlich stark ausgeprägt, am geringsten in Leukozyten. Im Blut von vier gesunden Kontrollprobanden ließ sich jedoch keine Methylierung nachweisen.

### 5.1.3 Promotormethylierung der MMR-Gene in Tumoren von NF1-Patienten

38 DNA-Proben aus 33 Tumoren von 25 NF1-Patienten wurden mittels Methylierungsspezifischer PCR hinsichtlich des Methylierungsstatus der „Mismatch Repair“-Gene *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* und *PMS2* untersucht. Dabei ließ sich lediglich in 2 von 9 MPNSTs eine Methylierung der Promotoren von *MLH1* und *MSH2* nachweisen. Maligne periphere Nervenscheidentumore (MPNST) gehen im Rahmen der Neurofibromatose Typ 1 oft durch Entartung aus plexiformen Neurofibromen hervor und führen zu einer erhöhten Mortalität.

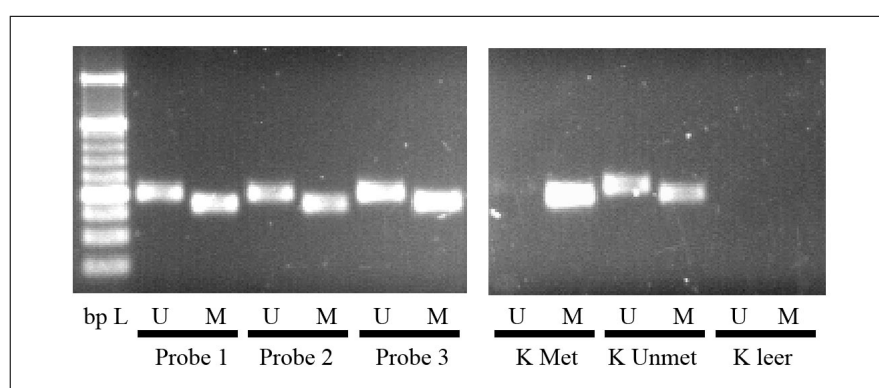
In einer Untersuchung an Tumorgewebe von 232 indischen Brustkrebspatientinnen konnte ein Zusammenhang zwischen der Methylierung der Promotoren von *MLH1* und *MSH2* und dem Verlust der Expression dieser Gene nachgewiesen werden [67]. Die Evaluation des Methylierungsstatus erfolgte dabei mittels Methylierungsspezifischer PCR unter Verwendung der gleichen Primer wie für diese Arbeit. Darüber hinaus fanden sich die Methylierungen besonders häufig in Zellen aus fortgeschrittenen Tumoren, was darauf schließen lässt, dass die Inaktivierung von „Mismatch Repair“-Genen durch Promotormethylierung ein Ereignis ist, welches erst später in der Tumorprogression auftritt. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit lediglich in MPNSTs MMR-Methylierungen nachweisbar waren. Andererseits bestehen brenne Neurofibrome aus einer Mischung neoplastischer Schwannzellen, perineuriumartiger Zellen und Fibroblasten in einer Matrix von kollagenen Fasern und mukoider Substanz. Es ist folglich durchaus denkbar, dass eventuell existierende Methylierungen in Schwannzellen durch die anderen Zelltypen maskiert werden.

### 5.1.4 Limitierungen der Aussagekraft der Methylierungsspezifischen PCR

Die Methylierungsspezifische PCR (MSP) ist eine einfache und kostengünstige Methode zur Untersuchung des Methylierungsstatus begrenzter Regionen der DNA. Erfasst werden dabei stets nur wenige CpGs, nämlich jene, die im Bereich der Primerbindung lokalisiert sind. Die Bindung der Primer für methylierte DNA soll dabei nur dann erfolgen, wenn alle erfassten CpGs methyliert sind. Die Primer für unmethylierte DNA binden entsprechend nur an vollständig unmethylierte DNA. Sind lediglich einige der CpGs im Primerbindungsbereich methyliert, erfolgt keine Amplifizierung eines PCR-Produktes. Eine Differenzierung der Methylierung einzelner CpGs und somit eine Evaluation des Methylierungsgrades sind folglich nicht möglich.

In verschiedenen Versuchsdurchläufen für eine Probe lassen sich unterschiedlich stark ausgeprägte Banden mit den Primern für methylierte DNA detektieren. Die Beurteilung des Methylierungsstatus einer Probe erfordert aus unserer Sicht daher zwingend mehrere Versuchsdurchgänge und ist gegebenenfalls untersucherabhängig, was den Einsatz der MSP als Screeningmethode in der Diagnostik erheblich einschränkt.

Unabhängig von der Beurteilung des qualitativen Methylierungsstatus stellt sich die Frage, worauf die Schwankung der Intensität der Banden zurückzuführen ist. Bei Tumorgewebe ist es denkbar, dass Zellen verschiedener Gewebe mit unterschiedlichem Methylierungsmuster in einer Probe enthalten sind. Die hier festgestellten Abweichungen in der Bandenstärke bei der Untersuchung konstitutioneller Veränderungen lassen sich so jedoch nicht hinreichend erklären. Es ist daher auch denkbar, dass die Primer in geringerem Umfang auch an DNA binden, die lediglich teilweise methyliert ist. Ein Beispiel für unspezifische Primerbindung stellen die MSP-Primer dar, die aus der Literatur übernommen und zunächst für die Untersuchung des *MLH1*-Promotors verwendet wurden [31]. Wie die Abbildung 5.1 zeigt, amplifizierten die Primer für methylierte DNA in Versuchen



**Abbildung 5.1: *MLH1*-MSP mit Primern von Grady et al. [31]**

Dargestellt ist die Geldokumentation der Methylierungsspezifischen PCR des *MLH1*-Promotors der Proben 1 bis 3 mit unbekanntem Methylierungsstatus sowie der mitgeführten Kontrollen. K Met = Kontrollreaktion mit komplett methylierter DNA, K Unmet = Kontrollreaktion mit komplett unmethylierter DNA, K leer = Leerprobe, U = Produkt mit den Primern spezifisch für komplett unmethylierte DNA, M = Produkt mit den Primern spezifisch für komplett methylierte DNA.

für die vorliegende Arbeit auch mit vollständig unmethylierter DNA ein Produkt. Daher erfolgten die nachfolgenden Versuchsreihen für unsere Studie mit anderen Primern (siehe Seite ??).

Nicht zuletzt stellt auch der sogenannte PCR-Bias, der insbesondere bei bisulfitbehandelter DNA zu einer unterschiedlichen Amplifikationseffizienz verschiedener DNA-Fragmente führt, eine mögliche Erklärung für die variierende Bandenstärke in den einzelnen MSP-Durchläufen dar [109].

## 5.2 Methylierung des *NF1*-Promotors als potenzieller „Modifizierer“ der NF1

### 5.2.1 Unterschiede in der DNA-Methylierung einzelner Regionen im *NF1*-Promotor

Für diese Arbeit wurde ein mehr als 900 Basenpaare umfassendes Fragment der Promotorregion des *NF1*-Gens bei 8 monozygoten Zwillingspaaren hinsichtlich der Methylierung der Cytosine untersucht. Sowohl in der örtlichen Verteilung als auch in der Stärke der Methylierung in bestimmten Subregionen zeigten sich dabei deutliche Unterschiede innerhalb der Paare. Für die Mehrzahl der untersuchten Regionen und Promotorelemente ließen sich dabei signifikante Unterschiede der Methylierung in allen Zwillingspaaren nachweisen. Diese Signifikanz blieb für einige Regionen, die eine wichtige Rolle für die *NF1*-Gentranskription spielen und zum Teil erwiesenermaßen methylierungssensitiv sind, auch nach Erweiterung des Konfidenzintervalls erhalten.

Für das „cAMP response element“ (CRE, -16 bis -9) konnte bereits gezeigt werden, dass die Bindung des CREB-Proteins *in vitro* stark methylierungsabhängig ist [61]. Da die Bindung des CREB-Proteins eine verstärkte Transkription bewirkt und somit eine wichtige Rolle in der Genexpression spielt, ist der Nachweis nur geringer Methylierungsunterschiede in diesem Bereich des *NF1*-Promotors nicht verwunderlich. Demgegenüber fanden sich in einer Region, die eine identische Sequenz von 24 Basenpaaren in Mensch, Maus und Ratte und lediglich eine Base Abweichung in Fugu aufweist (NF1HCS, +151 bis +174), deutliche Unterschiede hinsichtlich der Cytosinmethylierung. Die genaue Funktion dieses Segmentes ist zwar bisher nicht geklärt. Aufgrund der beachtlichen Homologie und seiner Lage in der Nähe des Transkriptionsstartpunktes, ist jedoch eine entscheidende Bedeutung für die Genexpression denkbar [56]. Weitere Untersuchungen zur Methylierungssensitivität dieses Promotorelementes sowie seiner potentiellen Bedeutung als „Modifizierer“ der NF1 sind somit notwendig.

Bereits in früheren Untersuchungen konnten deutliche Unterschiede im Grad und der Verteilung epigenetischer Modifikationen bei Zwillingen nachgewiesen werden [27, 47]. Unterschiede in der Methylierung einzelner Gene werden folglich als mögliche Erklärung für das Auftreten diskordanter Phänotypen bei monozygoten Zwillingen angesehen. Zusätzlich gestützt wird diese Vorstellung durch Untersuchungen der Gene *DRD2*, *COMT*, *DLX1* und *KCNQ1OT1*. Bei monozygoten Zwillingen, die diskordant für bestimmte Merkmale waren, ließen sich im Bereich dieser Gene epigenetische Differenzen nachweisen [46, 63, 74, 110].



### 5.2.1.1 Bedeutung der Methylierung der SP1-Bindungsstelle (CpG bei -138)

Bei genauerer Untersuchung der bedeutsamen SP1-Bindungsstelle (CpG bei -138) konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Methylierung festgestellt werden. Lediglich bei drei von 16 Patienten ließ sich an dieser Stelle überhaupt eine Methylierung nachweisen: bei Zwilling 1 in 7,1 %, bei Zwilling 15 in 5,4 % und bei Zwilling 16 in 2,6 % der Klone.

SP1 ist ein basaler Transkriptionsfaktor, der in verschiedene Prozesse der Zellproliferation sowie der Tumorentstehung involviert ist [57]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass SP1 die CpG-Insel des *APRT*-Gens der Maus vor *de novo*-Methylierung schützt und somit möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Verhinderung der Zellentartung spielt [9, 59].

Frühere Untersuchungen detektierten eine um fast 50 % verminderte SP1-Bindung, wenn das äußere C des reversen Stranges methyliert war [13, 61]. Dieser Effekt wurde durch die zusätzliche Methylierung des benachbarten Cytosins sogar noch verstärkt. Demgegenüber hat die Methylierung des zentralen CpG des Vorwärtsstranges scheinbar nur einen geringen Einfluss auf die Bindung von SP1 [36, 38].

Da für die vorliegende Arbeit ausschließlich der Vorwärtsstrang der DNA untersucht wurde, können keine allgemeinen Aussagen bezüglich der Bedeutung der nur geringen nachgewiesenen Methylierung des CpG bei Position -138 getroffen werden. Jedoch scheinen DNA-Methylierungen an dieser Stelle im *NF1*-Promotor generell eher ein seltenes Ereignis zu sein, denn auch bei einer früheren Untersuchung an *NF1*-assoziierten Tumoren fanden sich keine nennenswerten Methylierungen [35].

### 5.2.1.2 Zusammenhang zwischen der Methylierung der TLF-Region und der Entstehung eines Optikusglioms bei *NF1*-Patienten

In der Region von -249 bis -234 zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede in der Methylierung bei dem Vergleich von Zwillingspaaren, die kein Optikusgliom aufwiesen, mit den Paaren die diskordant für das Vorhandensein dieses Tumors waren. Patienten ohne Optikusgliom wiesen dabei eine deutlich geringe DNA-Methylierung in diesem Bereich auf als Patienten, die an einem Optikusgliom erkrankt waren (siehe auch Abbildung 4.9 auf Seite 48).

Diese Region ist Teil der von Chong et al. identifizierten TLF-Bindungsstelle („TATA-Binding Protein-Like Factor“; -337 bis -234) [11]. Der basale Transkriptionsfaktor TLF wird in verschiedenen Geweben, einschließlich dem Gehirn, exprimiert und stimuliert durch Bindung an das *NF1*-Gen dessen Transkription. Über die gewebespezifische Rolle von TLF ist bisher jedoch nur wenig bekannt, so dass hinsichtlich seiner Bedeutung für den Phänotyp der *NF1* lediglich Spekulationen möglich sind. Sollte die Bindung von TLF jedoch methylierungssensitiv sein, könnte dadurch die Transkription des *NF1*-Gens beeinflusst werden. Die Entstehung eines Optikusglioms, getriggert durch eine epigenetische Herabsetzung der *NF1*-Transkription in Astrozyten oder aber auch in

Zellen des umliegenden Gewebes, wäre vorstellbar.

In einer Untersuchung eines 119 Basenpaare umfassendes Fragmentes um den *NF1*-Transkriptionsstartpunkt (-45 bis +63) mittels Methylierungsspezifischer PCR konnte zwar keine Methylierung in Astrozytomen, einschließlich Optikusgliomen, nachgewiesen werden [20]. Allerdings war in diesem Fragment die TLF-Bindungsstelle nicht enthalten, so dass hierüber Aussagen fehlen.

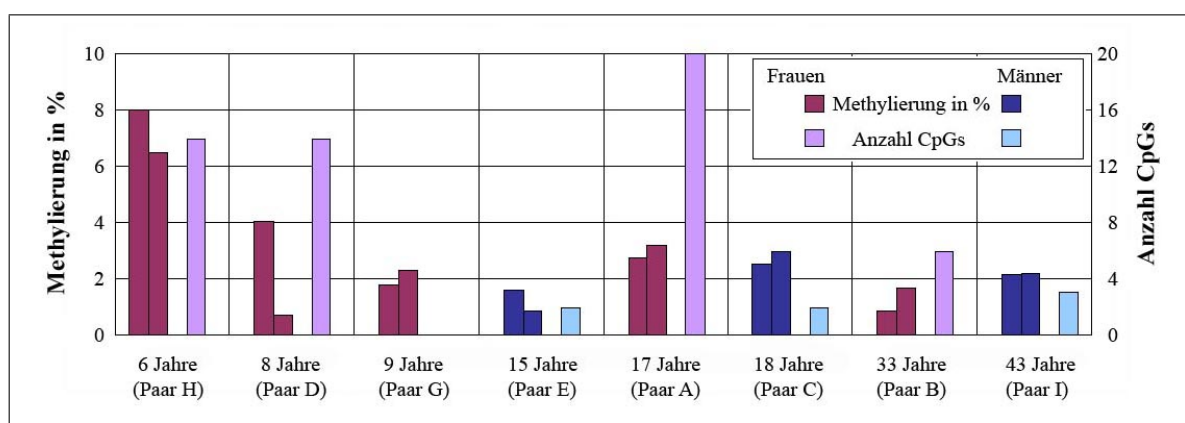
Weitere Untersuchungen zu der Bedeutung von TLF für die Entstehung von Tumoren sowie zu den Auswirkungen von DNA-Methylierungen auf die Genexpression von TLF sind somit notwendig, um den hier beschriebenen Zusammenhang zwischen der Methylierung der TLF-Region im *NF1*-Promotor und der Entstehung eines Optikusglioms im Rahmen der NF1-Erkrankung besser beurteilen und gegebenenfalls diagnostisch oder therapeutisch nutzen zu können.

### 5.2.2 Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Alter

Hinsichtlich eines Zusammenhanges zwischen der DNA-Methylierung und dem Alter des Patienten finden sich in der Literatur unterschiedliche Aussagen. Sowohl eine Zunahme als auch eine Abnahme der generellen DNA-Methylierung mit steigendem Alter wurde bisher beschrieben [27, 28].

In dieser Arbeit zeigte das jüngste Paar (Paar H, 6 Jahre) insgesamt die stärkste Methylierung sowie viele Positionen mit Unterschieden im Grad der Methylierung. An 14 CpGs unterschied sich bei ihnen die Methylierung um mindestens 10 %, während das älteste Paar (Paar I, 43 Jahre) eine geringe Methylierung und lediglich an 3 CpGs deutliche Methylierungsunterschiede aufwies. Die meisten Unterschiede im Grad der Methylierung ließen sich bei Paar A (17 Jahre, 20 CpGs) nachweisen. Die Stärke der Methylierung aller Paare ist in der Graphik 5.2 dargestellt.

Aufgrund der nur geringen Fallzahl in dieser Untersuchung lässt sich hierbei zwar kein statisti-



**Abbildung 5.2: Grad der Methylierung des *NF1*-Promotors aller untersuchten Zwillingspaare**  
 Dargestellt ist die durchschnittliche Stärke der Methylierung in % über das gesamte Fragment für jeden Patienten sowie die Anzahl der CpGs, an denen sich die Methylierung des jeweiligen Zwillingspaars um mindestens 10 % unterschied. Die Anordnung der Paare erfolgte entsprechend des Alters der Patienten zum Untersuchungszeitpunkt.

scher Zusammenhang zwischen der DNA-Methylierung und dem Patientenalter herstellen. Jedoch deuten die Ergebnisse eher auf eine Abnahme der Methylierung in Leukozyten mit steigendem Alter hin, was den Resultaten von Fuke et al. entspricht [28].

### 5.2.3 Limitierungen dieser Arbeit

Zum Einen wurden für diese Arbeit lediglich Leukozyten hinsichtlich ihrer Methylierung untersucht, obwohl die DNA-Methylierung vermutlich gewebsspezifisch variiert. Weitere Untersuchungen an verschiedenen Geweben sind somit notwendig, um eventuelle Unterschiede in der Methylierung und deren Bedeutung für die Genexpression zu evaluieren. Eine Studie konnte zwar bereits zeigen, dass die Promotormethylierung des *COMT*-Gens in Blutzellen und Hirngewebe nahezu identisch ist [66]. Für das *NFI*-Gen fehlen derartige Untersuchungen jedoch bisher ganz. Trotz dieser Limitierung konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durchaus epigenetische Unterschiede bei monozygoten Zwillingen bestehen und diese somit exemplarisch eine mögliche Erklärung für die Variabilität des Phänotyps darstellen.

Zum Anderen war es nicht möglich, die Bedeutung der Methylierung für die Genexpression zu eruieren, da lediglich DNA als Untersuchungsmaterial vorlag. Erst weitere Untersuchungen, wie *in vitro* Luziferase-Reportergen-Analysen an Gen-Konstruktion mit eng umschriebenen methylierten Regionen können zeigen, ob die Methylierung scheinbar bedeutsamer DNA-Bereiche zu einer veränderten Transkription führt. Derartige Versuche sind technisch jedoch noch sehr limitiert. Auch *in vivo* ist die Beurteilung der Auswirkungen von Methylierungen in bestimmten DNA-Bereichen auf die Transkription anspruchsvoll. Hierfür ist die Gewinnung von DNA und RNA aus einem bestimmten Gewebe zu einem definierten Zeitpunkt erforderlich, da sich die DNA-Methylierung und damit eventuell auch die Gentranskription über die Zeit verändern kann.

## 6 Zusammenfassung

Die Neurofibromatose Typ 1 (NF1) ist eine sehr häufige genetische Erkrankung, die durch das Auftreten von Café-au-lait-Flecken, intertriginösem Freckling, Irishamartomen, Neurofibromen, malignen peripheren Nervenscheidentumoren (MPNST), Optikusgliomen und Knochenmalformationen charakterisiert ist. Zahlreiche krankheitsverursachende Mutationen wurden bereits detektiert, eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation ließ sich bis auf wenige Ausnahmen jedoch nicht nachweisen, so dass von der Existenz weiterer „Modifizierer“ ausgegangen wird.

Untersuchungen zu verschiedenen möglichen modifizierenden Genen deuteten unter anderem auf einen Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der NF1 und einer Beeinträchtigung der DNA-Reparatur („Mismatch Repair“ = MMR). So ließ sich bereits nachweisen, dass das *NF1*-Gen bei Vorliegen einer MMR-Defizienz ein bevorzugtes Ziel für Mutationen darstellt und in NF1-assoziierten Tumoren gehäuft solche Mutationen auftreten, die typisch für eine eingeschränkte DNA-Reparatur sind. Darüber hinaus finden sich bei dem sogenannten „Constitutional Mismatch Repair-Deficiency (CMMR-D) Syndrome“, bedingt durch eine biallelische Keimbahnmutation in einem der MMR-Gene, oftmals mehrere NF1-assoziierte Krankheitsmerkmale. Eine konstitutionelle MMR-Mutation konnte bisher jedoch lediglich bei einem NF1-Patienten nachgewiesen werden.

Ziel dieser Arbeit war es daher den potentiellen Einfluss epigenetischer DNA-Veränderungen auf den Phänotyp der NF1 zu untersuchen. Die Epigenetik beschreibt Modifikationen des Erbgutes, die nicht die Basensequenz betreffen und dennoch zu einer veränderten Genexpression führen können. Einen der bedeutendsten Mechanismen stellt hierbei die Methylierung des C5-Atoms des Cytosins dar.

Zunächst erfolgte die Untersuchung des Methylierungsstatus der Promotoren der MMR-Gene *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* und *PMS2* aus verschiedenen Geweben mittels Methylierungsspezifischer PCR (MSP) und Pyrosequenzierung. DNA-Proben aus 33 Tumoren verschiedener Entitäten von 25 NF1-Patienten wurden untersucht, wobei sich Methylierungen an den Genen *MLH1* und *MSH2* in MPNSTs nachweisen ließen. Bei der Analyse der DNA aus Leukozyten von insgesamt 79 NF1-Patienten und 79 Kontrollprobanden fanden sich lediglich für das *MSH2*-Gen Promotormethylierungen, wobei sich bei NF1-Patienten signifikant häufiger stärkere Methylierungen fanden. Das *MSH2*-Gen der Kontrollprobanden war hingegen häufiger unmethyliert. Mittels Pyrosequenzierung ließ sich sogar eine signifikant stärkere Methylierung zweier CpGs bei NF1-Patienten mit einem schweren Phänotyp gegenüber leichter betroffenen nachweisen.

In einer zweiten Studie sollte evaluiert werden, ob DNA-Methylierungen in der Promotorregion des *NF1*-Gens selbst zu einer Haploinsuffizienz und somit zu einem bestimmten Phänotyp führen können. Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Unterschiede in der DNA-Sequenz auszuschließen, wurde hierfür die DNA aus Leukozyten von acht monozygoten Zwillingspaaren mit NF1 untersucht, die für einige der krankheitstypischen Symptome diskordant waren. Mittels

DNA-Sequenzierung nach Bisulfitmodifikation („bisulfite genomic sequencing“) wurde der Methylierungsgrad aller Cytosinreste eines mehr als 900 Basenpaare umfassenden Fragments des *NF1*-Promotors bestimmt. Hierbei ließ sich insgesamt zwar lediglich eine geringe Methylierung nachweisen, jedoch fanden sich deutliche Methylierungsunterschiede innerhalb der Paare für fast alle untersuchten Promotorelemente. Besonders hervorzuheben ist die statisch signifikante unterschiedliche Methylierung im Bereich der TLF-Bindungsregion bei Diskordanz für das Vorhandensein eines Optikusglioms, wobei Patienten mit diesem Tumor eine stärkere Methylierung im genannten Bereich aufwiesen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig die Existenz von DNA-Methylierungen im Promotorbereich des *MSH2*-Gens bei *NF1*-Patienten nachgewiesen werden. Die Methylierung dieses ungekoppelten modifizierenden Gens (*MSH2*) könnte, unter der Voraussetzung, daß sich solche Veränderungen auch in anderen Geweben finden, über eine verminderte Gen-Expression zu einem DNA-Reparaturdefekt führen, was eine mögliche Erklärung für die hohe Tumoranzahl einiger *NF1*-Patienten darstellen könnte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Unterschiede in der DNA-Methylierung im Bereich des *NF1*-Promotors, also einer intragenischen Modifikation, bei monozygoten Zwillingen mit Neurofibromatose Typ 1 bestehen, welche über die daraus resultierende unterschiedliche Expression des gesunden *NF1*-Allels die Diskordanz bezüglich einiger Krankheitsmerkmale erklären können.

Epigenetische Veränderungen ungekoppelter Gene, wie der MMR-Gene, oder aber auch der gesunden *NF1*-Genkopie stellen somit potenzielle „Modifizierer“ der Neurofibromatose Typ 1 dar und sollten in zukünftigen Studien näher untersucht werden. Fortschritte bei der Suche nach „Modifizierern“ der *NF1* würden nicht nur zum besseren Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankung beitragen, sondern womöglich auch neue Ansatzpunkte für die Diagnostik und Therapie bieten.

## Literaturverzeichnis

- [1] M. Agostini, M. G. Tibiletti, E. Lucci-Cordisco, et al. Two *PMS2* mutations in a turcot syndrome family with small bowel cancers. *Am J Gastroenterol*, 100(8):1886–1891, 2005.
- [2] H. Alotaibi, M. D. Ricciardone, and M. Ozturk. Homozygosity at variant *MLH1* can lead to secondary mutation in *NF1*, neurofibromatosis type 1 and early onset leukemia. *Mutat Res*, 637(1-2):209–214, 2008.
- [3] J. D. Andrews, D. N. Mancini, S. M. Singh, and D. I. Rodenhiser. Site and sequence specific DNA methylation in the neurofibromatosis (*NF1*) gene includes C5839T: the site of the recurrent substitution mutation in exon 31. *Hum Mol Genet*, 5(4):503–507, 1996.
- [4] J. Auclair, D. Leroux, F. Desseigne, et al. Novel biallelic mutations in *MSH6* and *PMS2* genes: Gene conversion as a likely cause of *PMS2* gene inactivation. *Hum Mutat*, 28(11):1084–1090, 2007.
- [5] M. Bahuau, A. Pelet, D. Vidaud, et al. *GDNF* as a candidate modifier in a type 1 neurofibromatosis (*NF1*) enteric phenotype. *J Med Genet*, 38(9):638–643, 2001.
- [6] B. Bartelt-Kirbach, M. Wuepping, M. Dodrimont-Lattke, and D. Kaufmann. Expression analysis of genes lying in the *NF1* microdeletion interval points to four candidate modifiers for neurofibroma formation. *Neurogenetics*, 10(1):79–85, 2009.
- [7] J. Bertholon, Q. Wang, C. M. Galmarini, and A. Puisieux. Mutational targets in colorectal cancer cells with microsatellite instability. *Fam Cancer*, 5(1):29–34, 2006.
- [8] M. P. Boks, E. M. Derks, D. J. Weisenberger, et al. The relationship of DNA methylation with age, gender and genotype in twins and healthy controls. *PLoS One*, 4(8):e6767, 2009.
- [9] M. Brandeis, D. Frank, I. Keshet, et al. Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature*, 371(6496):435–438, 1994.
- [10] T. L. Chan, S. T. Yuen, C. K. Kong, et al. Heritable germline epimutation of *MSH2* in a family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet*, 38(10):1178–1183, 2006.
- [11] J. A. Chong, M. M. Moran, M. Teichmann, J. S. Kaczmarek, R. Roeder, and D. E. Clapham. TATA-binding protein (TBP)-like factor (TLF) is a functional regulator of transcription: Reciprocal regulation of the neurofibromatosis type 1 and *c-fos* genes by TLF/TRF2 and TBP. *Mol Cell Biol*, 25(7):2632–2643, 2005.

- [12] K. Cichowski and T. Jacks. *NF1* tumor suppressor gene function: Narrowing the gap. *Cell*, 104(4):593–604, 2001.
- [13] S. J. Clark, J. Harrison, and P. L. Molloy. Sp1 binding is inhibited by <sup>m</sup>Cp<sup>m</sup>CpG methylation. *Gene*, 195(1):67–71, 1997.
- [14] J. E. Cropley, D. I. K. Martin, and C. M. Suter. Germline epimutation in humans. *Pharmacogenomics*, 9(12):1861–1868, 2008.
- [15] I. D’Angelo, S. Welti, F. Bonneau, and K. Scheffzek. A novel bipartite phospholipid-binding module in the neurofibromatosis type 1 protein. *EMBO Rep*, 7(2):174–179, 2006.
- [16] S. De Schepper, J. M. A. Boucneau, W. Westbroek, et al. Neurofibromatosis type 1 protein and amyloid precursor protein interact in normal human melanocytes and colocalize with melanosomes. *J Invest Dermatol*, 126(3):653–659, 2006.
- [17] S. De Schepper, O. Maertens, T. Callens, J.-M. Naeyaert, J. Lambert, and L. Messiaen. Somatic mutation analysis in NF1 café au lait spots reveals two *NF1* hits in the melanocytes. *J Invest Dermatol*, 128(4):1050–1053, 2008.
- [18] W. S. Dynan. Promoters for housekeeping genes. *Trends Genet*, 2:196–197, 1986.
- [19] D. F. Easton, M. A. Pondert, S. M. Huson, and B. A. J. Ponder. An analysis of variation in expression of neurofibromatosis (nf) type 1 (NF1): Evidence for modifying genes. *Am J Hum Genet*, 53:305–13, 1993.
- [20] M. Ebinger, L. Senf, O. Wachowski, and W. Scheurlen. No aberrant methylation of neurofibromatosis 1 gene (*NF1*) promoter in pilocytic astrocytoma in childhood. *Pediatr Hematol Oncol*, 22(1):83–87, 2005.
- [21] J. Etzler, A. Peyrl, A. Zatkova, et al. RNA-based mutation analysis identifies an unusual *MSH6* splicing defect and circumvents *PMS2* pseudogene interference. *Hum Mutat*, 29(2): 299–305, 2008.
- [22] R. Fahsold, S. Hoffmeyer, C. Mischung, et al. Minor lesion mutational spectrum of the entire *NF1* gene does not explain its high mutability but points to a functional domain upstream of the GAP-related domain. *Am J Hum Genet*, 66(3):790–818, 2000.
- [23] J. Y. Fang, R. Lu, J. A. Mikovits, Z. H. Cheng, H. Y. Zhu, and Y. X. Chen. Regulation of h*MSH2* and h*MLH1* expression in the human colon cancer cell line sw1116 by DNA methyltransferase 1. *Cancer Lett*, 233(1):124–130, 2006.

- [24] L. Feigenbaum, K. Fujita, F. S. Collins, and G. Jay. Repression of the *NF1* gene by tax may explain the development of neurofibromas in human t-lymphotropic virus type 1 transgenic mice. *J Virol*, 70(5):3280–3285, 1996.
- [25] L. Feng, S. Yunoue, H. Tokuo, et al. PKA phosphorylation and 14-3-3 interaction regulate the function of neurofibromatosis type 1 tumor suppressor, neurofibromin. *FEBS Lett*, 557(1-3):275–282, 2004.
- [26] L. Fishbein, B. Eady, N. Sanek, D. Muir, and M. R. Wallace. Analysis of somatic *NF1* promoter methylation in plexiform neurofibromas and schwann cells. *Cancer Genet Cytogenet*, 157(2):181–186, 2005.
- [27] M. F. Fraga, E. Ballestar, M. F. Paz, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(30):10604–10609, 2005.
- [28] C. Fuke, M. Shimabukuro, A. Petronis, et al. Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study. *Ann Hum Genet*, 68(Pt 3):196–204, 2004.
- [29] S. Gallinger, M. Aronson, K. Shayan, et al. Gastrointestinal cancers and neurofibromatosis type 1 features in children with a germline homozygous *MLH1* mutation. *Gastroenterology*, 126(2):576–585, 2004.
- [30] M. Goldberg, C. Rummelt, S. Foja, L. M. Holbach, and W. G. Ballhausen. Different genetic pathways in the development of periocular sebaceous gland carcinomas in presumptive muir-torre syndrome patients. *Hum Mutat*, 27(2):155–162, 2006.
- [31] W. M. Grady, A. Rajput, J. D. Lutterbaugh, and S. D. Markowitz. Detection of aberrantly methylated *hMLH1* promoter DNA in the serum of patients with microsatellite unstable colon cancer. *Cancer Res*, 61(3):900–902, 2001.
- [32] D. H. Gutmann, E. Winkeler, O. Kabbarah, et al. *Mlh1* deficiency accelerates myeloid leukemogenesis in neurofibromatosis 1 (NF1) heterozygous mice. *Oncogene*, 22(29):4581–4585, 2003.
- [33] A. Hajra, A. Martin-Gallardo, S. Tarlé, et al. DNA sequences in the promoter region of the *NF1* gene are highly conserved between human and mouse. *Genomics*, 21:649–52, 1994.
- [34] S. R. Hamilton, B. Liu, R. E. Parsons, et al. The molecular basis of turcot’s syndrome. *N Engl J Med*, 332(13):839–847, 1995.



- [35] A. Harder, M. Rosche, D. E. Reuss, et al. Methylation analysis of the neurofibromatosis type 1 (*NF1*) promoter in peripheral nerve sheath tumours. *Eur J Cancer*, 40(18):2820–2828, 2004.
- [36] M. A. Harrington, P. A. Jones, M. Imagawa, and M. Karin. Cytosine methylation does not affect binding of transcription factor sp1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(7):2066–2070, 1988.
- [37] M. R. Hegde, B. Chong, M. E. Blazo, et al. A homozygous mutation in *MSH6* causes turcot syndrome. *Clin Cancer Res*, 11(13):4689–4693, 2005.
- [38] M. Höller, G. Westin, J. Jiricny, and W. Schaffner. Sp1 transcription factor binds DNA and activates transcription even when the binding site is CpG methylated. *Genes Dev*, 2(9):1127–1135, 1988.
- [39] M. P. Horan, D. N. Cooper, and M. Upadhyaya. Hypermethylation of the neurofibromatosis type 1 (*NF1*) gene promoter is not a common event in the inactivation of the *NF1* gene in NF1-specific tumours. *Hum Genet*, 107(1):33–39, 2000.
- [40] H.-S. Hsu, C.-K. Wen, Y.-A. Tang, et al. Promoter hypermethylation is the predominant mechanism in *hMLH1* and *hMSH2* deregulation and is a poor prognostic factor in nonsmoking lung cancer. *Clin Cancer Res*, 11(15):5410–5416, 2005.
- [41] Y. P. Hsueh, A. M. Roberts, M. Volta, M. Sheng, and R. G. Roberts. Bipartite interaction between neurofibromatosis type 1 protein (neurofibromin) and syndecan transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *J Neurosci*, 21(11):3764–3770, 2001.
- [42] Y. Iwahashi, E. Ito, Y. Yanagisawa, et al. Promoter analysis of the human mismatch repair gene *hMSH2*. *Gene*, 213(1-2):141–147, 1998.
- [43] R. R. Iyer, A. Pluciennik, V. Burdett, and P. L. Modrich. DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem Rev*, 106(2):302–323, 2006.
- [44] C.-C. Jackson, S. Holter, A. Pollett, et al. Café-au-lait macules and pediatric malignancy caused by biallelic mutations in the DNA mismatch repair (MMR) gene *PMS2*. *Pediatr Blood Cancer*, 50(6):1268–1270, 2008.
- [45] R. Jaenisch and A. Bird. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*, 33 Suppl:245–254, 2003.
- [46] Z. Kaminsky, A. Petronis, S.-C. Wang, et al. Epigenetics of personality traits: an illustrative study of identical twins discordant for risk-taking behavior. *Twin Res Hum Genet*, 11(1):1–11, 2008.

- [47] Z. A. Kaminsky, T. Tang, S.-C. Wang, et al. DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins. *Nat Genet*, 41(2):240–245, 2009.
- [48] D. Kaufmann, S. Gruener, F. Braun, et al. *EVI2B*, a gene lying in an intron of the neurofibromatosis type 1 (*NF1*) gene, is as the *NF1* gene involved in differentiation of melanocytes and keratinocytes and is overexpressed in cells derived from NF1 neurofibromas. *DNA Cell Biol*, 18(5):345–356, 1999.
- [49] D. Kaufmann, R. Müller, O. Kenner, et al. The n-terminal splice product NF1-10a-2 of the *NF1* gene codes for a transmembrane segment. *Biochem Biophys Res Commun*, 294(2):496–503, 2002.
- [50] A. G. Knudson. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68(4):820–823, 1971.
- [51] C. P. Kratz, C. M. Niemeyer, E. Jüttner, et al. Childhood t-cell non-hodgkin's lymphoma, colorectal carcinoma and brain tumor in association with café-au-lait spots caused by a novel homozygous *PMS2* mutation. *Leukemia*, 22(5):1078–1080, 2008.
- [52] C. P. Kratz, S. Holter, J. Etzler, et al. Rhabdomyosarcoma in patients with constitutional mismatch-repair-deficiency syndrome. *J Med Genet*, 46(6):418–420, 2009.
- [53] S. Krüger, M. Kinzel, C. Walldorf, et al. Homozygous *PMS2* germline mutations in two families with early-onset haematological malignancy, brain tumours, HNPCC-associated tumours, and signs of neurofibromatosis type 1. *Eur J Hum Genet*, 16(1):62–72, 2008.
- [54] G. Kuratomi, K. Iwamoto, M. Bundo, et al. Aberrant DNA methylation associated with bipolar disorder identified from discordant monozygotic twins. *Mol Psychiatry*, 13(4):429–441, 2008.
- [55] M.-J. Lee and D. A. Stephenson. Recent developments in neurofibromatosis type 1. *Curr Opin Neurol*, 20(2):135–141, 2007.
- [56] T. K. B. Lee and J. M. Friedman. Analysis of *NF1* transcriptional regulatory elements. *Am J Med Genet A*, 137(2):130–135, 2005.
- [57] L. Li and J. R. Davie. The role of sp1 and sp3 in normal and cancer cell biology. *Ann Anat*, 192(5):275–283, 2010.
- [58] M. Luijten, S. Redeker, M. M. van Noesel, D. Troost, A. Westerveld, and T. J. Hulsebos. Microsatellite instability and promoter methylation as possible causes of *NF1* gene inactivation in neurofibromas. *Eur J Hum Genet*, 8(12):939–945, 2000.

- [59] D. Macleod, J. Charlton, J. Mullins, and A. P. Bird. Sp1 sites in the mouse *aprt* gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes Dev*, 8(19):2282–2292, 1994.
- [60] O. Maertens, H. Brems, J. Vandesompele, et al. Comprehensive *NF1* screening on cultured schwann cells from neurofibromas. *Hum Mutat*, 27(10):1030–1040, 2006.
- [61] D. N. Mancini, S. M. Singh, T. K. Archer, and D. I. Rodenhiser. Site-specific DNA methylation in the neurofibromatosis (*NF1*) promoter interferes with binding of CREB and SP1 transcription factors. *Oncogene*, 18(28):4108–4119, 1999.
- [62] F. H. Menko, G. L. Kaspers, G. A. Meijer, K. Claes, J. M. van Hagen, and J. J. P. Gille. A homozygous *MSH6* mutation in a child with café-au-lait spots, oligodendroglioma and rectal cancer. *Fam Cancer*, 3(2):123–127, 2004.
- [63] J. Mill, E. Dempster, A. Caspi, B. Williams, T. Moffitt, and I. Craig. Evidence for monozygotic twin (MZ) discordance in methylation level at two CpG sites in the promoter region of the catechol-o-methyltransferase (*COMT*) gene. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 141B(4):421–425, 2006.
- [64] H. Morimoto, J. Tsukada, Y. Kominato, and Y. Tanaka. Reduced expression of human mismatch repair genes in adult t-cell leukemia. *Am J Hematol*, 78(2):100–107, 2005.
- [65] A. Müller, H. K. Schackert, B. Lange, et al. A novel *MSH2* germline mutation in homozygous state in two brothers with colorectal cancers diagnosed at the age of 11 and 12 years. *Am J Med Genet A*, 140(3):195–199, 2006.
- [66] B. C. Murphy, R. L. O’Reilly, and S. M. Singh. Site-specific cytosine methylation in S-COMT promoter in 31 brain regions with implications for studies involving schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 133B(1):37–42, 2005.
- [67] R. A. Naqvi, A. Hussain, S. S. V. Deo, et al. Hypermethylation analysis of mismatch repair genes (*hMLH1* and *hMSH2*) in locally advanced breast cancers in indian women. *Hum Pathol*, 39(5):672–680, 2008.
- [68] NIH Consensus Development Conference Statement. Neurofibromatosis. *Arch Neurol*, 45: 575–78, 1988.
- [69] N. A. Oates, J. van Vliet, D. L. Duffy, et al. Increased DNA methylation at the *AXIN1* gene in a monozygotic twin from a pair discordant for a caudal duplication anomaly. *Am J Hum Genet*, 79(1):155–162, 2006.

- [70] J. Ohgane, S. Yagi, and K. Shiota. Epigenetics: the DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions in cells. *Placenta*, 29 Suppl A:S29–S35, 2008.
- [71] J. R. Ostergaard, L. Sunde, and H. Okkels. Neurofibromatosis von Recklinghausen type 1 phenotype and early onset of cancers in siblings compound heterozygous for mutations in *MSH6*. *Am J Med Genet A*, 139A(2):96–105; discussion 96, 2005.
- [72] E. Pasmant, A. Sabbagh, G. Spurlock, et al. *NFI* microdeletions in neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype. *Hum Mutat*, 31(6):E1506–E1518, 2010.
- [73] A. Peters, H. Born, R. Ettinger, P. Levonian, and K. B. Jedele. Compound heterozygosity for *MSH6* mutations in a pediatric lymphoma patient. *J Pediatr Hematol Oncol*, 31(2):113–115, 2009.
- [74] A. Petronis, I. I. Gottesman, P. Kan, et al. Monozygotic twins exhibit numerous epigenetic differences: clues to twin discordance? *Schizophr Bull*, 29(1):169–178, 2003.
- [75] J. Plaschke, M. Linnebacher, M. Kloor, et al. Compound heterozygosity for two *MSH6* mutations in a patient with early onset of HNPCC-associated cancers, but without hematological malignancy and brain tumor. *Eur J Hum Genet*, 14(5):561–566, 2006.
- [76] J.-W. Poley, A. Wagner, M. M. C. P. Hoogmans, et al. Biallelic germline mutations of mismatch-repair genes: a possible cause for multiple pediatric malignancies. *Cancer*, 109(11):2349–2356, 2007.
- [77] T. E. Raevaara, A.-M. Gerdes, K. E. Lönnqvist, et al. HNPCC mutation *MLH1* P648S makes the functional protein unstable, and homozygosity predisposes to mild neurofibromatosis type 1. *Genes Chromosomes Cancer*, 40(3):261–265, 2004.
- [78] M. D. Ricciardone, T. Ozçelik, B. Cevher, et al. Human *MLH1* deficiency predisposes to hematological malignancy and neurofibromatosis type 1. *Cancer Res*, 59(2):290–293, 1999.
- [79] K. D. Robertson. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*, 6(8):597–610, 2005.
- [80] D. I. Rodenhiser, M. B. Coulter-Mackie, and S. M. Singh. Evidence of DNA methylation in the neurofibromatosis type 1 (*NFI*) gene region of 17q11.2. *Hum Mol Genet*, 2(4):439–444, 1993.
- [81] A. Sabbagh, E. Pasmant, I. Laurendeau, et al. Unravelling the genetic basis of variable clinical expression in neurofibromatosis 1. *Hum Mol Genet*, 18(15):2768–2778, 2009.

- [82] F. Sanger, S. Nicklen, and A. R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12):5463–5467, 1977.
- [83] R. H. Scott, T. Homfray, N. L. Huxter, et al. Familial t-cell non-hodgkin lymphoma caused by biallelic *MSH2* mutations. *J Med Genet*, 44(7):e83, 2007.
- [84] R. H. Scott, S. Mansour, K. Pritchard-Jones, D. Kumar, F. MacSweeney, and N. Rahman. Medulloblastoma, acute myelocytic leukemia and colonic carcinomas in a child with biallelic *MSH6* mutations. *Nat Clin Pract Oncol*, 4(2):130–134, 2007.
- [85] L. Senter, M. Clendenning, K. Sotamaa, et al. The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germ-line *PMS2* mutations. *Gastroenterology*, 135(2):419–428, 2008.
- [86] K.-H. Shin, J.-H. Shin, J.-H. Kim, and J.-G. Park. Mutational analysis of promoters of mismatch repair genes *hMSH2* and *hMLH1* in hereditary nonpolyposis colorectal cancer and early onset colorectal cancer patients: identification of three novel germ-line mutations in promoter of the *hMSH2* gene. *Cancer Res*, 62(1):38–42, 2002.
- [87] J. Szudek, H. Joe, and J. Friedman. Analysis of intrafamilial phenotypic variation in neurofibromatosis 1 (NF1). *Genet Epidemiol*, 23:150–64, 2002.
- [88] D. Takai and P. A. Jones. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(6):3740–3745, 2002.
- [89] T. Y. Tan, L. M. Orme, E. Lynch, et al. Biallelic *PMS2* mutations and a distinctive childhood cancer syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol*, 30(3):254–257, 2008.
- [90] M. D. Taylor, J. Perry, M. C. Zlatescu, et al. The *hPMS2* exon 5 mutation and malignant glioma. case report. *J Neurosurg*, 90(5):946–950, 1999.
- [91] A. Theos and B. Korf. Pathophysiology of neurofibromatosis type 1. *Ann Intern Med*, 144:842–49, 2006.
- [92] L. Thomas, L. Kluwe, N. Chuzhanova, V. Mautner, and M. Upadhyaya. Analysis of *NF1* somatic mutations in cutaneous neurofibromas from patients with high tumor burden. *Neurogenetics*, 11(4):391–400, 2010.
- [93] H. Toledano, Y. Goldberg, I. Kedar-Barnes, et al. Homozygosity of *MSH2* c.1906G→C germline mutation is associated with childhood colon cancer, astrocytoma and signs of neurofibromatosis type 1. *Fam Cancer*, 8(3):187–194, 2009.
- [94] J. D. Trimbath, G. M. Petersen, S. H. Erdman, M. Ferre, M. C. Luce, and F. M. Giardiello. Café-au-lait spots and early onset colorectal neoplasia: a variant of HNPCC? *Fam Cancer*, 1(2):101–105, 2001.

- [95] A. B. Trovó-Marqui and E. H. Tajara. Neurofibromin: a general outlook. *Clin Genet*, 70(1): 1–13, 2006.
- [96] K. Truninger, M. Menigatti, J. Luz, et al. Immunohistochemical analysis reveals high frequency of PMS2 defects in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 128(5):1160–1171, 2005.
- [97] C. Tzao, H.-S. Hsu, G.-H. Sun, et al. Promoter methylation of the *hMLH1* gene and protein expression of human mutL homolog 1 and human mutS homolog 2 in resected esophageal squamous cell carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 130(5):1371, 2005.
- [98] M. Upadhyaya, S. M. Huson, M. Davies, et al. An absence of cutaneous neurofibromas associated with a 3-bp inframe deletion in exon 17 of the *NF1* gene (c.2970-2972 delAAT): evidence of a clinically significant NF1 genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet*, 80(1):140–151, 2007.
- [99] S. Vilkki, J. L. Tsao, A. Loukola, et al. Extensive somatic microsatellite mutations in normal human tissue. *Cancer Res*, 61(11):4541–4544, 2001.
- [100] D. Viskochil. Gene structure and expression. In M. Upadhyaya and D. Cooper, editors, *Neurofibromatosis type 1: From genotype to phenotype*, pages 39–63. Oxford: BIOS Scientific Publishers., 1998.
- [101] D. Viskochil. Neurofibromatosis 1. *Am J Med Genet*, 89(1):V–VIII, 1999.
- [102] D. Viskochil, R. Cawthon, P. O’Connell, et al. The gene encoding the oligodendrocyte-myelin glycoprotein is embedded within the neurofibromatosis type 1 gene. *Mol Cell Biol*, 11(2):906–912, 1991.
- [103] M. D. Vos, B. E. Hayward, S. Picton, E. Sheridan, and D. T. Bonthron. Novel *PMS2* pseudogenes can conceal recessive mutations causing a distinctive childhood cancer syndrome. *Am J Hum Genet*, 74(5):954–964, 2004.
- [104] M. D. Vos, B. E. Hayward, R. Charlton, et al. *PMS2* mutations in childhood cancer. *J Natl Cancer Inst*, 98(5):358–361, 2006.
- [105] P. Vourc’h and C. Andres. Oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp): evolution, structure and function. *Brain Res Brain Res Rev*, 45(2):115–124, 2004.
- [106] J. C. Walrath, K. Fox, E. Truffer, W. G. Alvord, O. A. Quinones, and K. M. Reilly. Chr 19(A/J) modifies tumor resistance in a sex- and parent-of-origin-specific manner. *Mamm Genome*, 20(4):214–223, 2009.
- [107] Q. Wang, C. Lasset, F. Desseigne, et al. Neurofibromatosis and early onset of cancers in *hMLH1*-deficient children. *Cancer Res*, 59(2):294–297, 1999.

- [108] Q. Wang, G. Montmain, E. Ruano, et al. Neurofibromatosis type 1 gene as a mutational target in a mismatch repair-deficient cell type. *Hum Genet*, 112(2):117–123, 2003.
- [109] P. M. Warnecke, C. Stirzaker, J. R. Melki, D. S. Millar, C. L. Paul, and S. J. Clark. Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA. *Nucleic Acids Res*, 25(21):4422–4426, 1997.
- [110] R. Weksberg, C. Shuman, O. Caluseriu, et al. Discordant *KCNQ1OT1* imprinting in sets of monozygotic twins discordant for Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet*, 11(11):1317–1325, 2002.
- [111] D. Whiteside, R. McLeod, G. Graham, et al. A homozygous germ-line mutation in the human *MSH2* gene predisposes to hematological malignancy and multiple café-au-lait spots. *Cancer Res*, 62(2):359–362, 2002.
- [112] V. Wiest, I. Eisenbarth, C. Schmegner, W. Krone, and G. Assum. Somatic *NF1* mutation spectra in a family with neurofibromatosis type 1: toward a theory of genetic modifiers. *Hum Mutat*, 22(6):423–427, 2003.
- [113] O. Will, L. G. Carvajal-Carmona, P. Gorman, et al. Homozygous *PMS2* deletion causes a severe colorectal cancer and multiple adenoma phenotype without extraintestinal cancer. *Gastroenterology*, 132(2):527–530, 2007.
- [114] K. Wimmer and J. Etzler. Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome: have we so far seen only the tip of an iceberg? *Hum Genet*, 124(2):105–122, 2008.
- [115] M.-X. Zou, D. T. Butcher, B. Sadikovic, T. C. Groves, S.-P. Yee, and D. I. Rodenhiser. Characterization of functional elements in the neurofibromatosis (*NF1*) proximal promoter region. *Oncogene*, 23(2):330–339, 2004.

## Danksagung

Zunächst danke ich allen Mitarbeitern der Institute für Neuropathologie, insbesondere Prof. Dr. Frank Heppner und Prof. Dr. Gisela Stoltenburg-Didinger, sowie für Medizinische Genetik der Charité, hier insbesondere Prof. Dr. Stefan Mundlos und Dr. Hartmut Peters, für die Übertragung des interessanten Themas und die Bereitstellung der notwendigen Arbeitsmaterialien.

Mein besonderer Dank gilt Dr. med. Anja Harder für die engagierte Betreuung, Lena Herbst für die Einarbeitung im Labor sowie Kathrin Guse und Claire Gehlhaar für die kompetente Hilfestellung bei Problemen.

Dr. med. Thomas Harder danke ich für die Beratung hinsichtlich der statistischen Berechnungen.

Prof. Dr. Katharina Wimmer danke ich für ihre unermüdliche Suche nach Mutationen. Für das Zusammentragen und die Bereitstellung von Untersuchungsmaterialien und Patientendaten bedanke ich mich bei Prof. Dr. Andreas von Deimling, Prof. Dr. Sigrid Tinschert, PD Dr. Dieter Kaufmann, Prof. Dr. Thorsten Rosenbaum, Prof. Dr. Viktor-Felix Mautner, Dr. med. Ute Wahlländer-Danek und Dr. med. Elke Windt. Frau Windt möchte ich insbesondere auch dafür danken, dass sie sich neben der hingebungsvollen Betreuung ihrer Patienten die Zeit genommen hat, mir einen eindrucksvollen Einblick in ihren klinischen Alltag zu gewähren.

Nicht zuletzt danke ich meinem Bruder für seine fachkundige Hilfestellung bei EDV-Problemen und dem Rest meiner Familie für ihre ausdauernde Unterstützung.



## Erklärung über Selbstständigkeit

Ich, Sabrina Titze, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Einfluss epigenetischer Veränderungen auf die klinische Variabilität der Neurofibromatose Typ 1“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

# Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.