

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

DISSERTATION

Methylierungsanalyse des Neurofibromatose Typ 1-Promotors  
in Neurofibromatose Typ 1-assoziierten Tumoren

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin  
Berlin

von

Marleen Rosche

aus Prenzlau

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. von Deimling  
2. Prof. Dr. med. Pietsch  
3. PD Dr. med. Rosenbaum

Datum der Promotion: 23.09.2007

Ergebnisse dieser Arbeit wurden in der folgenden Originalarbeit veröffentlicht:

HARDER, A., ROSCHE, M., REUSS, D. et al. (2004) Methylation analysis of the neurofibromatosis type 1 (NF1) promoter in peripheral nerve sheath tumours, *Eur J Cancer*, 40, 2820-8.

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Die DNA-Methylierung	1
1.1.1.	DNA-Methylierungsmuster im menschlichen Genom	1
1.1.2.	DNA-Methylierung und transkriptionelle Aktivität	3
1.1.3.	DNA-Methylierung in Tumoren	3
1.1.4.	Detektion der DNA-Methylierung	4
1.1.5.	Klinische Relevanz der DNA-Methylierung	6
1.2.	Die Neurofibromatose Typ 1 (NF1)	6
1.2.1.	Das klinische Erscheinungsbild der NF1	6
1.2.2.	Das <i>NF1</i> -Gen	9
1.2.3.	Neurofibromin als Wachstumsregulator	10
1.2.4.	Der <i>NF1</i> -Promotor	11
1.2.5.	Pathogenese der NF1-assoziierten Nervenscheidentumore	11
1.2.6.	Therapeutische Optionen für NF1-assoziierte Nervenscheidentumore	13
<b>2.</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>14</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>15</b>
3.1.	Material	15
3.1.1.	Elektrolyt- und Nährlösungen	15
3.1.2.	Gele	16
3.1.3.	Chemikalien	17
3.1.4.	Kits	19
3.1.5.	Technische Geräte	19
3.1.6.	Software (zur statistischen Auswertung)	20
3.2.	Das untersuchte Patientenkollektiv	20
3.3.	Methoden	21
3.3.1.	Isolierung genomischer DNA aus Blut und Tumoren	21

---

3.3.1.1.	DNA-Extraktion aus Blut	21
3.3.1.2.	DNA-Extraktion aus Tumoren	22
3.3.1.3.	Phenol-Chloroform-Extraktion	22
3.3.1.4.	Ethanol-fällung der DNA	22
3.3.2.	Reinheits- und Konzentrationsbestimmung der DNA	22
3.3.3.	DNA-Restriktion mit <i>EcoR</i> I und DNA-Fällung	23
3.3.4.	Bisulfitbehandlung der DNA	23
3.3.5.	Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)	24
3.3.5.1.	Kontroll-PCR I	24
3.3.5.2.	Kontroll-PCR II	26
3.3.5.3.	Überblick über die untersuchte Region im <i>NF1</i> -Gen	27
3.3.5.4.	Amplifikation des <i>NF1</i> -Promotors	28
3.3.5.5.	Kontrolle der PCR-Produkte	30
3.3.6.	Isolierung und Aufreinigung der DNA aus dem Agarosegel	30
3.3.7.	Klonierung und Vermehrung der PCR-Produkte	30
3.3.7.1.	Ligation der PCR-Produkte	31
3.3.7.2.	Transformation	31
3.3.8.	Extraktion und Kontrolle der Plasmide	32
3.3.8.1.	Plasmidextraktion	32
3.3.8.2.	Restriktion der Plasmide mit <i>EcoR</i> I	33
3.3.9.	Sequenzierungsanalysen	33
3.3.9.1.	Sequenzierungs-PCR	34
3.3.9.2.	Sequenziergel	34
3.3.9.3.	Probenauftrag und Gellauf	35
3.3.9.4.	Auswertung der sequenzierten Proben	35
3.3.10.	Statistische Auswertung	35
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
4.1.	Methylierungsstatus des <i>NF1</i> -Promotors	37
4.1.1.	Methylierungsstatus des <i>NF1</i> -Promotors in <i>NF1</i> -assoziierten Nervenscheidentumoren	37
4.1.1.1.	Methylierungsstatus des <i>NF1</i> -Promotors in Neurofibromen	43
4.1.1.2.	Methylierungsstatus des <i>NF1</i> -Promotors in MPNST	43

4.1.1.3.	Vergleich des <i>NF1</i> -Promotormethylierungsstatus in Neurofibromen und MPNST	44
4.1.2.	Methylierungsstatus des <i>NF1</i> -Promotors in Leukozyten von Kontrollprobanden	44
4.1.2.1.	Methylierungsstatus des <i>NF1</i> -Promotors in Leukozyten von weiblichen Kontrollprobanden	50
4.1.2.2.	Methylierungsstatus des <i>NF1</i> -Promotors in Leukozyten von männlichen Kontrollprobanden	50
4.1.2.3.	Vergleich des <i>NF1</i> -Promotormethylierungsstatus in Leukozyten von weiblichen und männlichen Kontrollprobanden	51
4.1.1.	Vergleich des <i>NF1</i> -Promotormethylierungsstatus in <i>NF1</i> -assoziierten Nervenscheidentumoren und in Leukozyten von Kontrollprobanden	51
4.2.	Positionsspezifische Methylierung im <i>NF1</i> -Promotor	52
4.2.1.	Positionsspezifische Methylierung im <i>NF1</i> -Promotor in <i>NF1</i> -assoziierten Nervenscheidentumoren	53
4.2.1.1.	Methylierung von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in <i>NF1</i> -assoziierten Nervenscheidentumoren	53
4.2.2.	Positionsspezifische Methylierung im <i>NF1</i> -Promotor in Leukozyten der Kontrollprobanden	54
4.2.2.1.	Methylierungsmuster der Region +336 bis +371	54
4.3.	„non-CpG“-Methylierung	56
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>59</b>
5.1.	Keine regionale <i>NF1</i> -Promotorhypermethylierung in <i>NF1</i> -assoziierten Nervenscheidentumoren	59
5.2.	Kein malignitätsabhängiger Unterschied im Methylierungsgrad des <i>NF1</i> -Promotors in <i>NF1</i> -assoziierten Nervenscheidentumoren	64
5.3.	Geringgradige <i>NF1</i> -Promotormethylierung in <i>NF1</i> -assoziierten Nervenscheidentumoren	65
5.4.	Positionsspezifische <i>NF1</i> -Promotormethylierung in <i>NF1</i> -assoziierten Nervenscheidentumoren	66
5.5.	Tumorzellspezifisches Methylierungsmuster des <i>NF1</i> -Promotors	70

## INHALTSVERZEICHNIS

---

iv

5.6.	„non-CpG“-Methylierung	72
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>76</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>78</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>95</b>
<b>9.</b>	<b>Erklärung</b>	<b>96</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AchE	Acetylcholinesterase
APS	Ammonium-Persulfat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CpA	über Phosphatbrücke gebundenes Cytosin und Adenin
CpC	über Phosphatbrücke gebundenes Cytosin und Cytosin
CpG	über Phosphatbrücke gebundenes Cytosin und Guanin
CpT	über Phosphatbrücke gebundenes Cytosin und Thymin
CRE	cAMP responsables Element
CREB	cAMP responsables Element bindendes Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA Methyltransferase
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
ERK	extracellular signal-regulated kinase, = MAPK
et al.	et alii (und andere)
f	forward
<sup>18</sup> FDG PET	18Fluorodeoxyglucose Positronenemissionstomographie
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GRD	GAP-related-domain
GTP	Guanosintriphosphat



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

H	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	hepatocyte growth factor
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LOH	„loss of heterozygosity“ (Verlust der Heterozygotie)
LB	Luria-Bertani-Komplexmedium
5mC	5-methyliertes Cytosin
m	Meter
m	milli
M	Molarität
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPKKK	mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MBD	Methyl-CpG-bindende Domäne
mCpG	Methyl-CpG
MeCP	Methyl-CpG-bindendes Protein
min	Minute
mol	Mol
MPNST	maligner peripherer Nervenscheidentumor
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie bzw. Kernspintomographie
MSP	Methylierungsspezifische PCR
NF1	Neurofibromatose Typ 1
NIH	National Institute of Health
OD <sub>xy</sub>	optische Dichte bzw. Absorption einer Lösung bei Wellenlänge xy (in nm)
o. g.	oben genannt
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
r	reverse
Raf	= MAPKKK
Ras	Ras-Protein

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

RDA	representational difference analysis
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RLGS	restriction landmark genomic scanning
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRE	Serum responsables Element
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermophilus aquaticus-DNA-Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
U	Units
U	Uracil
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolettes Licht
WHO	World Health Organisation
X-Gal	5-chloro-4-bromo-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel
$\mu$	mikro
%	Prozent

### **8. Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die immense Unterstützung der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Instituts für Neuropathologie der Charité Campus Virchow-Klinikum, die wesentlich zum Zustandekommen, zur Fortführung und zur Fertigstellung der Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt

- Herrn Prof. Dr. A. von Deimling, der mir diese Arbeit anvertraut und sie mit großer Sachkenntnis begleitet hat.
- Meiner Betreuerin Frau Dr. med. Anja Harder, die mir die Tätigkeit im Labor nahe- und beigebracht hat. Sie stand mir mit vielen fachlichen Ratschlägen zur Seite und hat diese Arbeit durch wertvolle Diskussionen vorangebracht.
- Herrn Metin Yenilmez, der mit großer Sorgfalt die Durchführung einiger Experimente unterstützte.
- Herrn Dr. med. Wolf Müller, der mir geduldig die Handhabung des Sequenzierers erklärte.
- Frau Ulrike Laß, die mir zu verschiedensten Fragen zahlreiche Tips und Anregungen gab.

### **9. Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne Hilfe Dritter verfasst wurde. Die Arbeit stellt keine Kopie, auch nicht in Teilen, anderer Arbeiten dar. Alle benutzten Hilfsmittel und die verwendete Literatur sind vollständig angegeben.