

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob eine Methylierung des *NF1*-Promotors als „second hit“ in die *NF1*-assoziierte Tumorigenese involviert ist. Mit Hilfe der genomischen Bisulfitsequenzierung erfolgte daher die Bestimmung des *NF1*-Promotormethylierungsmusters in 16 Neurofibromen und 5 MPNST sowie in Leukozyten von 20 Kontrollprobanden.

4.1. Methylierungsstatus des *NF1*-Promotors

4.1.1. Methylierungsstatus des *NF1*-Promotors in *NF1*-assoziierten Nervenscheidentumoren

Zur Ermittlung des Methylierungsstatus des *NF1*-Promotors im Tumorgewebe (16 Neurofibrome und 5 MPNST) der *NF1*-Patienten wurden 217 Klone für das 5'-Fragment und 224 Klone für das 3'-Fragment untersucht. Insgesamt zeigte sich mit einem Median von 1,35 % (Schwankungsbreite: 0,53 – 3,46 %; n = 21) eine geringgradige Methylierung der Cytosine in der untersuchten Region des *NF1*-Gens (Abb. 4.1. – 4.4.). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass der Methylierungsgrad des 5' Endes, das einen großen Teil der vermuteten minimalen proximalen Promotorregion (-270 bis +230) [115] beinhaltet, tendenziell höher ist als der des 3'-Endes (1,24 % versus 0,96 %; p = 0,056).

Die Verteilung der ^{5m}C erschien zufällig. Die Differenzierung der Cytosine ergab jedoch einen höheren Methylierungsgrad der CpG-Dinukleotide im Vergleich zu den „non-CpG“-Dinukleotiden (Abb. 4.5. A). Die Frequenz der methylierten Positionen war wie folgt:

CpG: 1,6 % (Schwankungsbreite: 0,54 – 5,21 %),

CpT: 0,98 % (Schwankungsbreite: 0,13 – 3,08 %),

CpC: 1,05 % (Schwankungsbreite: 0,26 – 2,79 %) und

CpA: 1,23 % (Schwankungsbreite: 0 – 3,41 %).

ERGEBNISSE

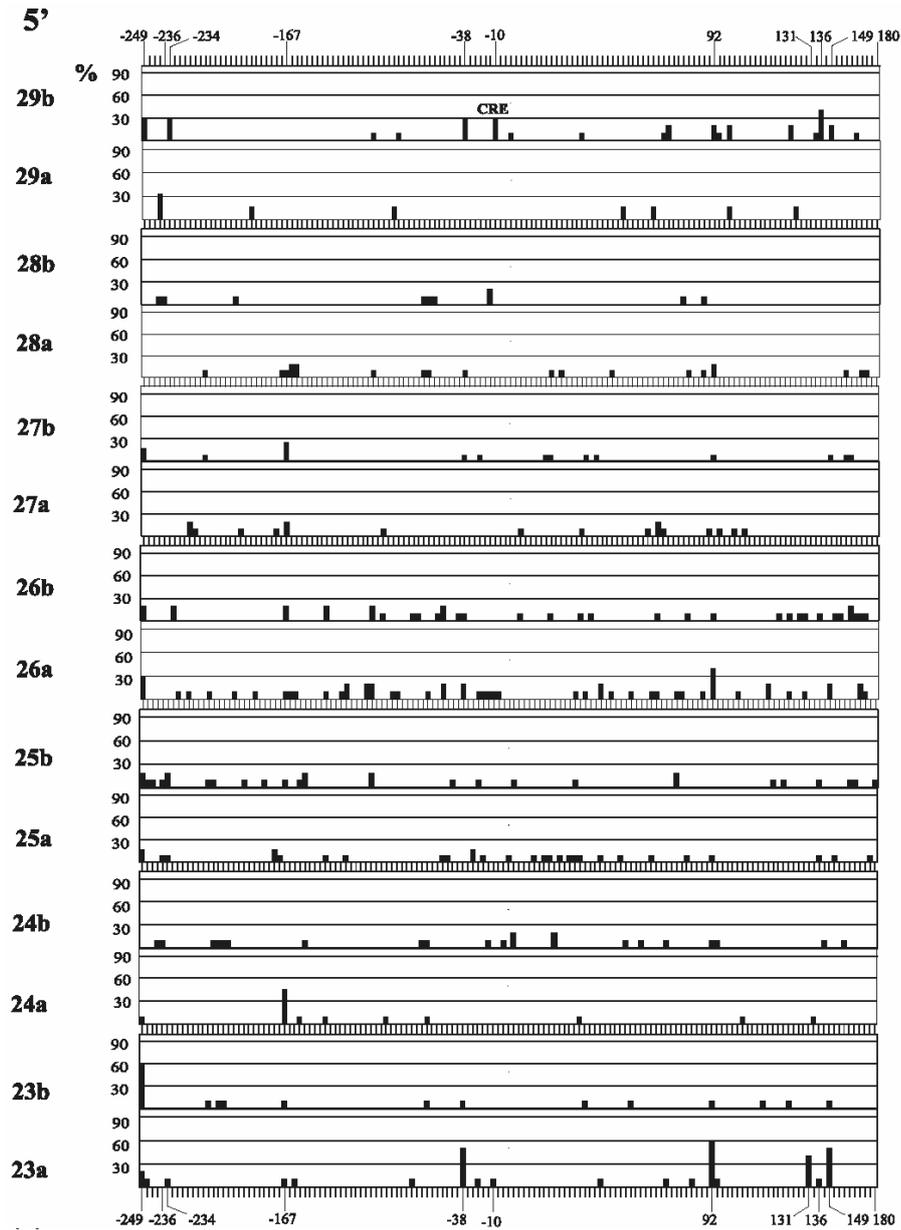


Abb. 4.1.: Methylierungsmuster des *NF1*-Promotors in dermalen (a) und plexiformen (b) Neurofibromen von den *NF1*-Patienten 23-29. Dargestellt ist das 5'-Fragment von Position -249 bis +180. Die horizontale Achse gibt die Sequenzposition der analysierten Cytosinreste im *NF1*-Promotor wieder und die vertikale Achse zeigt den Prozentsatz der methylierten Klone pro Cytosinrest an. Den Prozentsatz der methylierten Klone an dem jeweiligen Cytosin spiegeln die schwarzen Säulen wider. Die nummerierten Häkchen an der horizontalen Achse weisen außerdem auf positionsspezifisch methylierte Cytosine ($\geq 30\%$ der Klone) in den untersuchten Proben hin. Transkriptionsfaktorbindungsstellen, die von der positionsspezifischen Methylierung betroffen sind, wurden eingezeichnet.

ERGEBNISSE

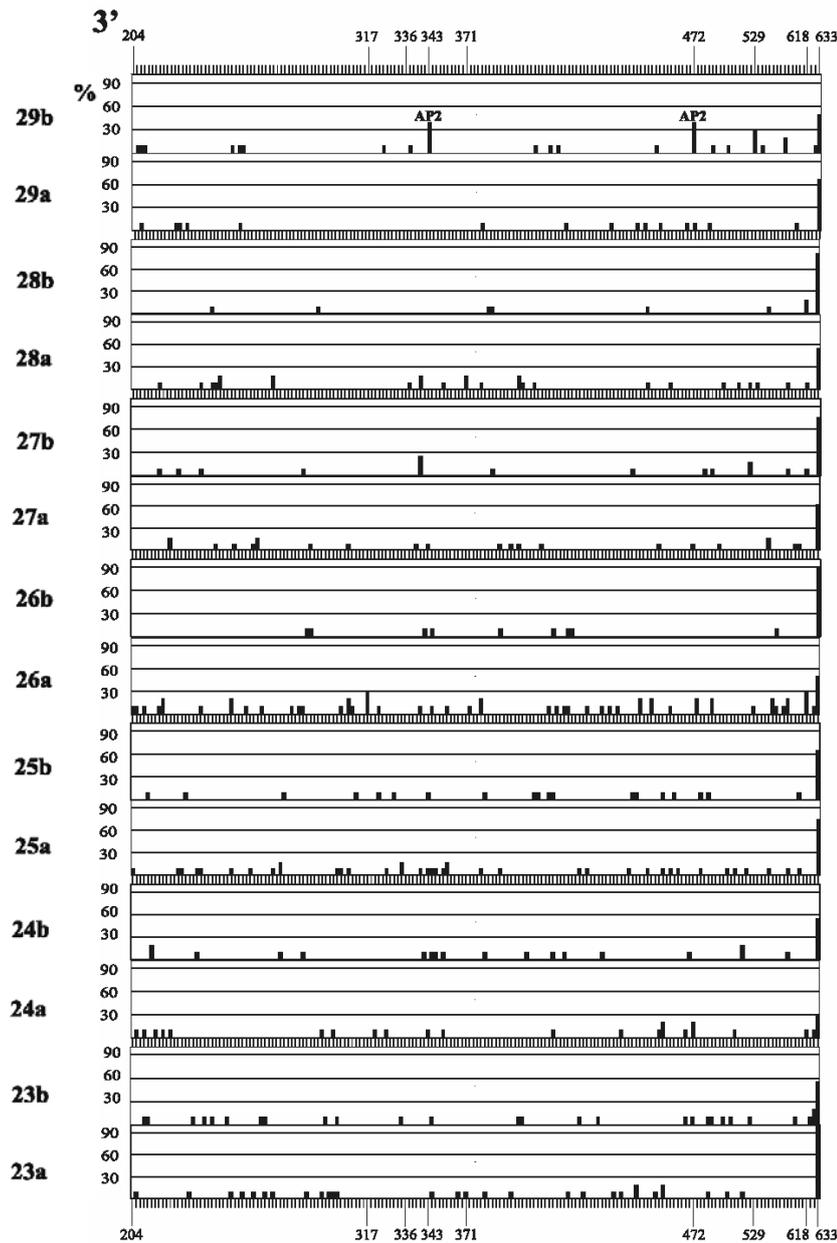


Abb. 4.2.: Methylierungsmuster des *NF1*-Promotors in dermalen (a) und plexiformen (b) Neurofibromen von den *NF1*-Patienten 23-29. Dargestellt ist das 3'-Fragment von Position +204 bis +633. Die horizontale Achse gibt die Sequenzposition der analysierten Cytosinreste im *NF1*-Promotor wieder und die vertikale Achse zeigt den Prozentsatz der methylierten Klone pro Cytosinrest an. Den Prozentsatz der methylierten Klone an dem jeweiligen Cytosin spiegeln die schwarzen Säulen wider. Die nummerierten Häkchen an der horizontalen Achse weisen außerdem auf positionsspezifisch methylierte Cytosine ($\geq 30\%$ der Klone) in den untersuchten Proben hin. Transkriptionsfaktorbindungsstellen, die von der positionsspezifischen Methylierung betroffen sind, wurden eingezeichnet.

ERGEBNISSE

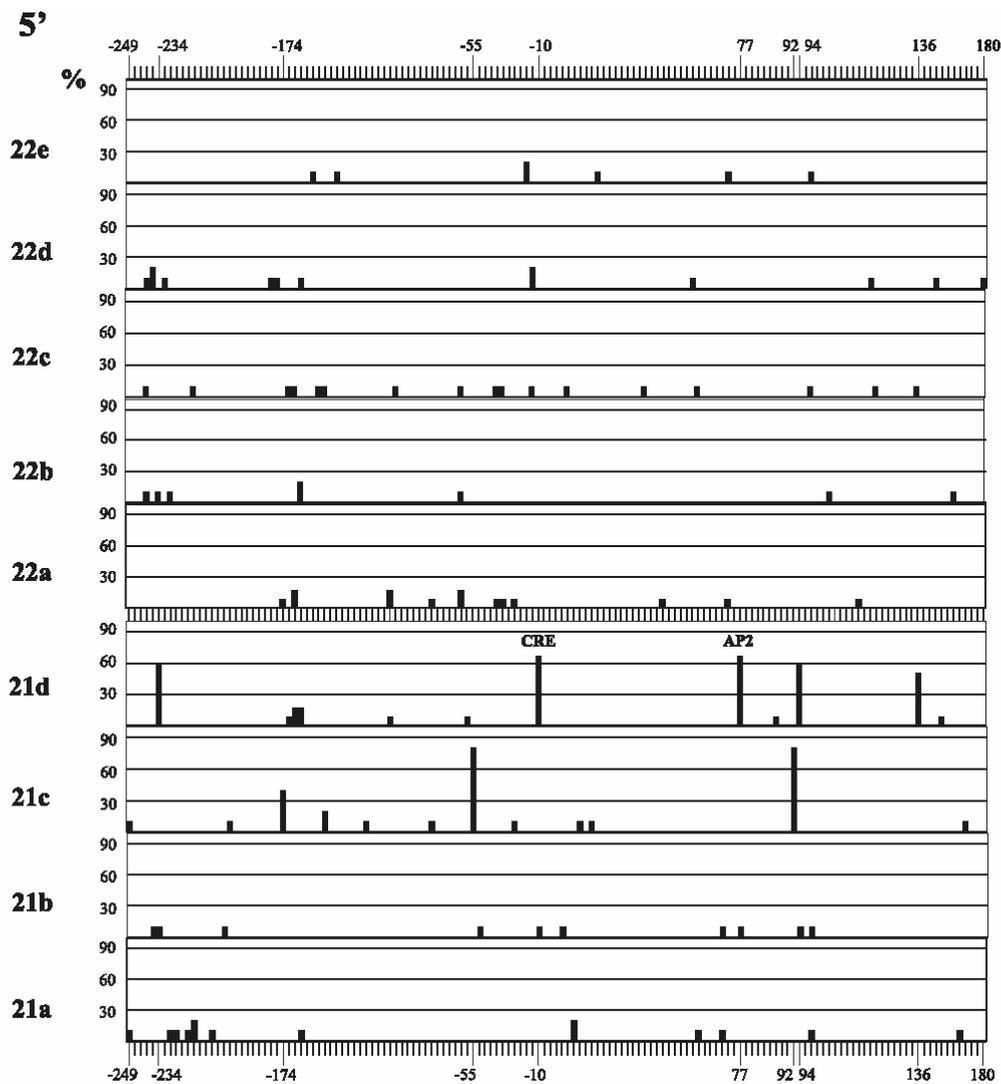


Abb. 4.3.: Methylierungsmuster des *NF1*-Promotors in Leukozyten und Tumoren mit unterschiedlicher Histologie von den *NF1*-Patienten 21 und 22: 21 a – Blut und 21 b, c, d – MPNST; 22 a – Blut, 22 b – Neurofibrom, 22 c – Neurofibrom mit erhöhter Proliferation und 22 d, e – MPNST. Dargestellt ist das 5'-Fragment von Position -249 bis +180. Die horizontale Achse gibt die Sequenzposition der analysierten Cytosinreste im *NF1*-Promotor wieder und die vertikale Achse zeigt den Prozentsatz der methylierten Klone pro Cytosinrest an. Den Prozentsatz der methylierten Klone an dem jeweiligen Cytosin spiegeln die schwarzen Säulen wider. Die nummerierten Häkchen an der horizontalen Achse weisen außerdem auf positionsspezifisch methylierte Cytosine ($\geq 30\%$ der Klone) in den untersuchten Proben hin. Transkriptionsfaktorbindungsstellen, die von der positionsspezifischen Methylierung betroffen sind, wurden eingezeichnet.

ERGEBNISSE

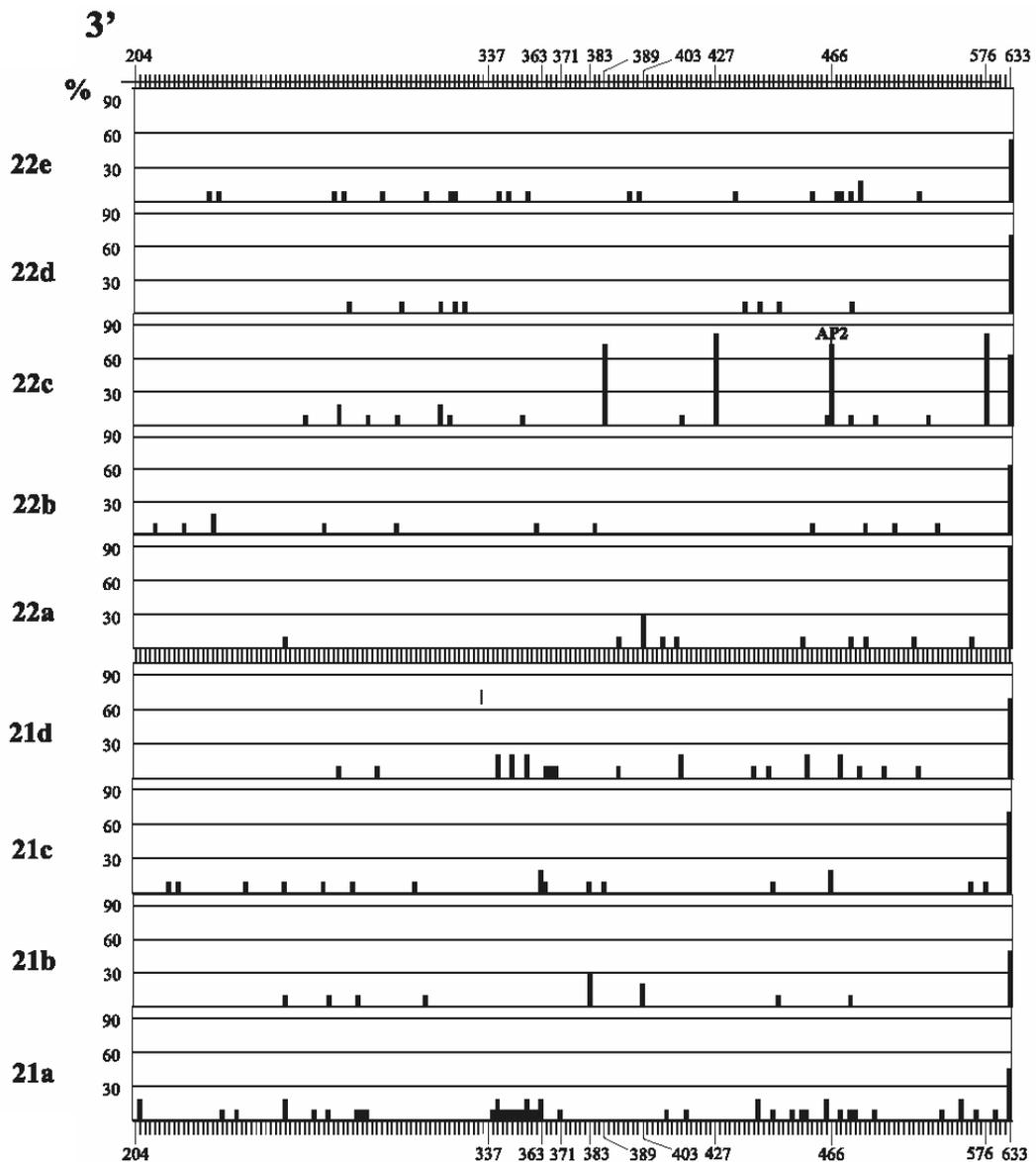


Abb. 4.4.: Methylierungsmuster des *NF1*-Promotors in Leukozyten und Tumoren mit unterschiedlicher Histologie von den *NF1*-Patienten 21 und 22: 21 a – Blut und 21 b, c, d – MPNST; 22 a – Blut, 22 b – Neurofibrom, 22 c – Neurofibrom mit erhöhter Proliferation und 22 d, e – MPNST. Dargestellt ist das 3'-Fragment von Position +204 bis +633. Die horizontale Achse gibt die Sequenzposition der analysierten Cytosinreste im *NF1*-Promotor wieder und die vertikale Achse zeigt den Prozentsatz der methylierten Klone pro Cytosinrest an. Den Prozentsatz der methylierten Klone an dem jeweiligen Cytosin spiegeln die schwarzen Säulen wider. Die nummerierten Häkchen an der horizontalen Achse weisen außerdem auf positionsspezifisch methylierte Cytosine ($\geq 30\%$ der Klone) in den untersuchten Proben hin. Transkriptionsfaktorbindungsstellen, die von der positionsspezifischen Methylierung betroffen sind, wurden eingezeichnet.

ERGEBNISSE

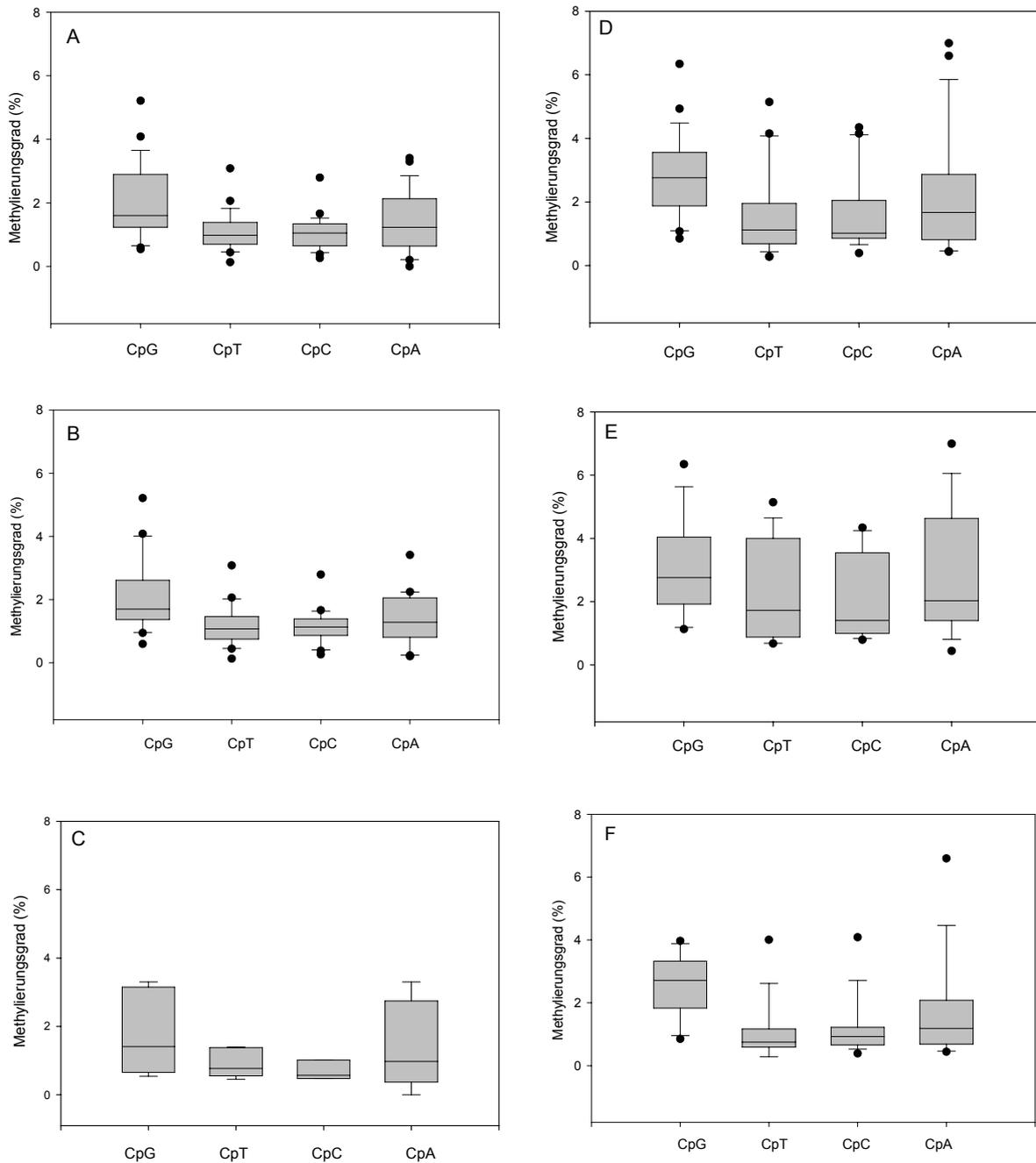


Abb. 4.5.: Methylierungsgrad der Cytosine im *NF1*-Promotor in *NF1*-assoziierten Tumoren und Leukozyten von Kontrollprobanden differenziert nach Dinukleotiden. A) Alle Nervenscheidentumore. B) Neurofibrome. C) MPNST. D) Leukozyten von Kontrollprobanden (gesamt). E) Leukozyten von weiblichen Kontrollprobanden. F) Leukozyten von männlichen Kontrollprobanden.

4.1.1.1. Methylierungsstatus des *NF1*-Promotors in Neurofibromen

Um den Methylierungsstatus des *NF1*-Promotors in benignen Tumoren zu erfassen, wurden 16 Tumore (Probennummer: 23-29 a; 23-29 b; 22 b und c) mit klinischen und histologischen Zeichen eines Neurofibroms von *NF1*-Patienten analysiert. Dazu wurden 165 Klone für das 5'-Fragment und 173 Klone für das 3'-Fragment in die Untersuchung einbezogen. Der *NF1*-Promotor zeigte mit 1,35 % (Schwankungsbreite: 0,53 – 3,46 %; n = 16) eine geringgradige Methylierung mit zufälliger Verteilung (Abb. 4.1. und 4.2.). Die Differenzierung der Cytosine ergab jedoch einen höheren Methylierungsgrad der CpG-Dinukleotide im Vergleich zu den „non-CpG“-Dinukleotiden (Abb. 4.5. B). Die Frequenz der methylierten Positionen war wie folgt:

CpG: 1,7 % (Schwankungsbreite: 0,59 – 5,21 %),

CpT: 1,08 % (Schwankungsbreite: 0,13 – 3,08 %),

CpC: 1,14 % (Schwankungsbreite: 0,26 – 2,79 %) und

CpA: 1,28 % (Schwankungsbreite: 0,2 – 3,41 %).

Um das Methylierungsmuster der unterschiedlichen Neurofibromtypen (kutan vs. plexiform) einander gegenüber zu stellen, wurden 7 Tumorpaare in die Analyse einbezogen. Hierbei handelte es sich um jeweils ein kutanes und ein plexiformes Neurofibrom desselben Patienten. Die Kennzeichnung der Proben erfolgte mit den Nummern 23 bis 29, die für die 7 behandelten Patienten stehen. Im Folgenden steht der Zusatz (a) für kutane und die Bezeichnung (b) für plexiforme Neurofibrome. Die Anzahl der untersuchten Klone betrug für das kutane Neurofibrom 71 für das 5'-Fragment und 77 für das 3'-Fragment bzw. jeweils 74 für das plexiforme Neurofibrom.

Der *NF1*-Promotor wies sowohl in kutanen Neurofibromen (Schwankungsbreite: 0,86 – 3,46 %; n = 7) als auch in plexiformen Neurofibromen (Schwankungsbreite: 0,53 – 1,94 %; n = 7) einen Methylierungsgrad von 1,35 % auf (Abb. 4.6. A). Die statistische Auswertung aller methylierten Positionen in beiden Neurofibromtypen ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,236$).

4.1.1.2. Methylierungsstatus des *NF1*-Promotors in MPNST

Um den Methylierungsstatus des *NF1*-Promotors in malignen Tumoren zu beschreiben, wurden 5 Tumore (Probennummer: 21 b, c, d; 22 d und e) mit klinischen und histologischen Zeichen eines MPNST von zwei *NF1*-Patienten analysiert. Zur Verfügung stan-

den 52 Klone für das 5'-Fragment und 51 Klone für das 3'-Fragment. Der *NF1*-Promotor war mit 0,82 % (Schwankungsbreite: 0,65 – 1,9 %; n = 5) geringgradig und zufällig methyliert (Abb. 4.2. – 4.4.). Die methylierten Cytosine befanden sich in folgenden Dinukleotiden (Abb. 4.5. C):

CpG: 1,41 % (Schwankungsbreite: 0,54 – 3,3 %),

CpT: 0,77 % (Schwankungsbreite: 0,46 – 1,39 %),

CpC: 0,57 % (Schwankungsbreite: 0,48 – 1,02 %) und

CpA: 0,98 % (Schwankungsbreite: 0 – 3,3 %).

4.1.1.3. Vergleich des *NF1*-Promotormethylierungsstatus in Neurofibromen und MPNST

Um die Bedeutung der *NF1*-Promotormethylierung in der Entstehung von benignen und malignen Nervenscheidentumoren zu evaluieren, wurde der *NF1*-Promotormethylierungsstatus von Neurofibromen und MPNST verglichen. Dazu wurden 165 Klone für das 5'-Fragment und 173 Klone für das 3'-Fragment von insgesamt 16 Neurofibromen von 9 *NF1*-Patienten in die Analyse eingeschlossen. Es handelte sich dabei sowohl um kutane als auch um plexiforme Neurofibrome. Demgegenüber wurde der *NF1*-Promotormethylierungsgrad von 5 MPNST von 2 *NF1*-Patienten mit 52 Klonen für das 5'-Fragment und 51 Klonen für das 3'-Fragment gestellt (Abb. 4.6. B). Die statistische Auswertung aller methylierter Positionen des *NF1*-Promotors in beiden Neurofibromtypen ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,409$).

4.1.2. Methylierungsstatus des *NF1*-Promotors in Leukozyten von Kontrollprobanden

Da die Entnahme von gesunden peripheren Nerven für wissenschaftliche Zwecke ethisch nicht vertretbar ist, wurde zur Einschätzung des Methylierungsstatus des *NF1*-Promotors im *NF1*-assoziierten Tumorgewebe als Referenzgewebe periphere Leukozyten herangezogen. Diese stammten von 20 Kontrollprobanden (Probennummer: 1 bis 20), die nicht an *NF1* erkrankt sind. Insgesamt wurden 209 Klone für das 5'-Fragment und 213 Klone für das 3'-Fragment untersucht.

ERGEBNISSE

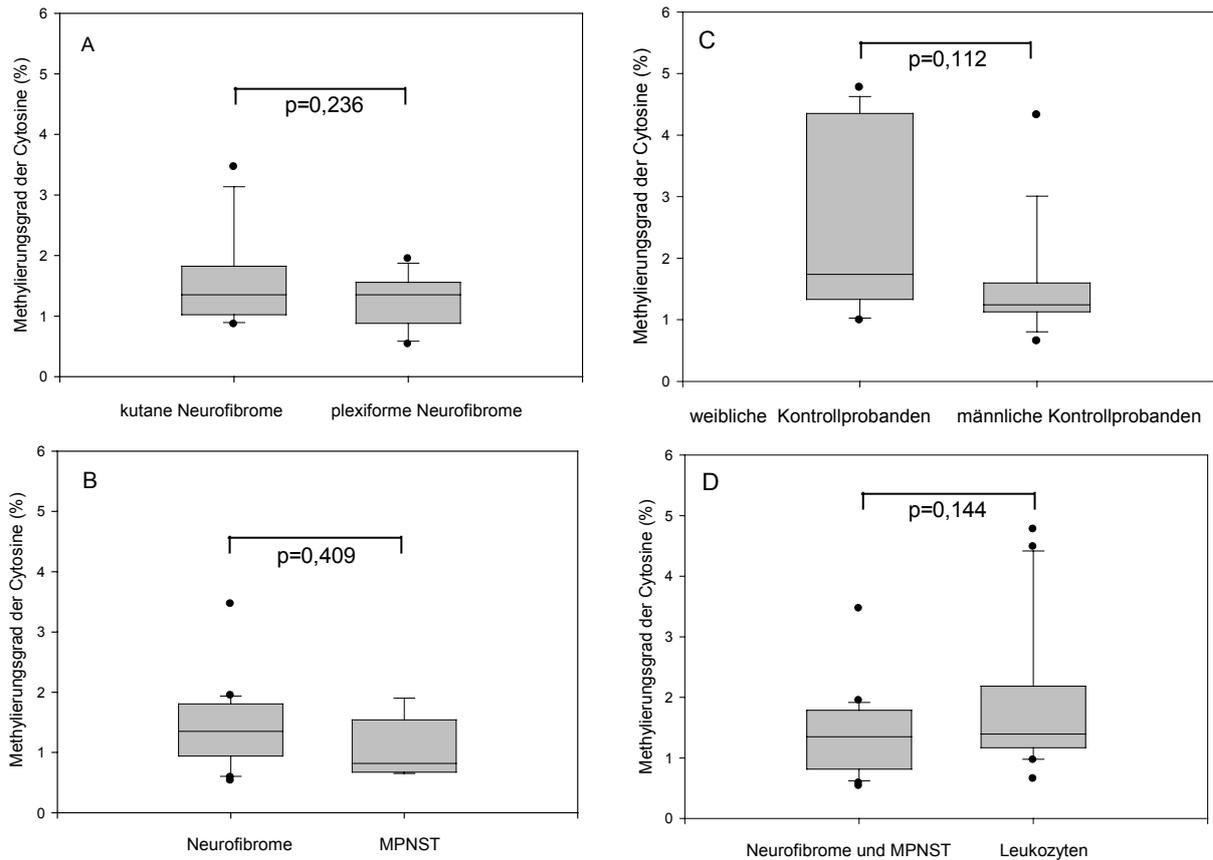


Abb. 4.6.: Vergleich des *NF1*-Promotormethylierungsstatus in den untersuchten Geweben. A) kutane versus plexiforme Neurofibrome. B) Neurofibrome versus MPNST. C) Leukozyten von weiblichen versus männlichen Kontrollprobanden. D) Nervenscheidentumore versus Leukozyten von Kontrollprobanden.

Die DNA der peripheren Leukozyten zeigte im *NF1*-Promotor einen geringen Methylierungsgrad der Cytosine (Abb. 4.5. – 4.10.). Der mediane Prozentsatz betrug 1,4 % für alle Kontrollproben (Schwankungsbreite: 0,65 – 4,77; n =20).

Die Verteilung der ^{5m}C erschien zufällig. Die Differenzierung der Cytosine ergab jedoch einen höheren Methylierungsgrad der CpG-Dinukleotide im Vergleich zu den „non-CpG“-Dinukleotiden (Abb. 4.12. C und D). Die Frequenz der methylierten Cytosine im Kontext mit den vier Nukleotiden Guanosin, Adenosin, Thymin und Cytosin war wie folgt (Abb. 4.5. D):

CpG: 2,76 % (Schwankungsbreite: 0,85 – 6,34 %),

CpT: 1,12 % (Schwankungsbreite: 0,28 – 5,14 %),

CpC: 1,02 % (Schwankungsbreite: 0,39 – 4,34 %) und

CpA: 1,67 % (Schwankungsbreite: 0,44 – 6,99 %).

ERGEBNISSE

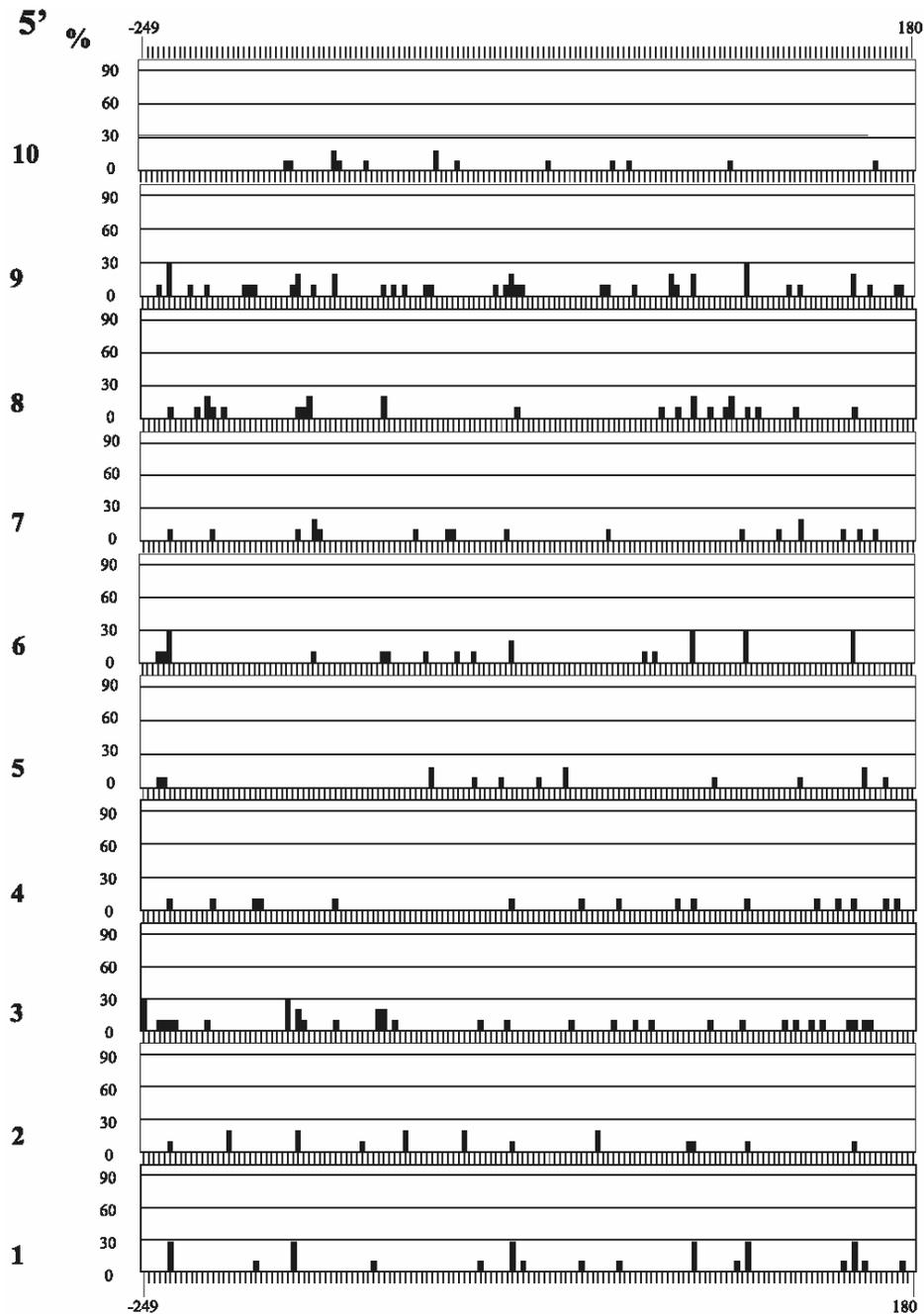


Abb. 4.7.: Methylierungsmuster des *NF1*-Promotors in Leukozyten von weiblichen Kontrollprobanden 1-10. Dargestellt ist das 5'-Fragment von Position -249 bis +180. Die horizontale Achse gibt die Sequenzposition der analysierten Cytosinreste im *NF1*-Promotor wieder und die vertikale Achse zeigt den Prozentsatz der methylierten Klone pro Cytosinrest an. Den Prozentsatz der methylierten Klone an dem jeweiligen Cytosin spiegeln die schwarzen Säulen wider. Die nummerierten Häkchen an der horizontalen Achse weisen außerdem auf positionsspezifisch methylierte Cytosine ($\geq 30\%$ der Klone) in den untersuchten Proben hin.

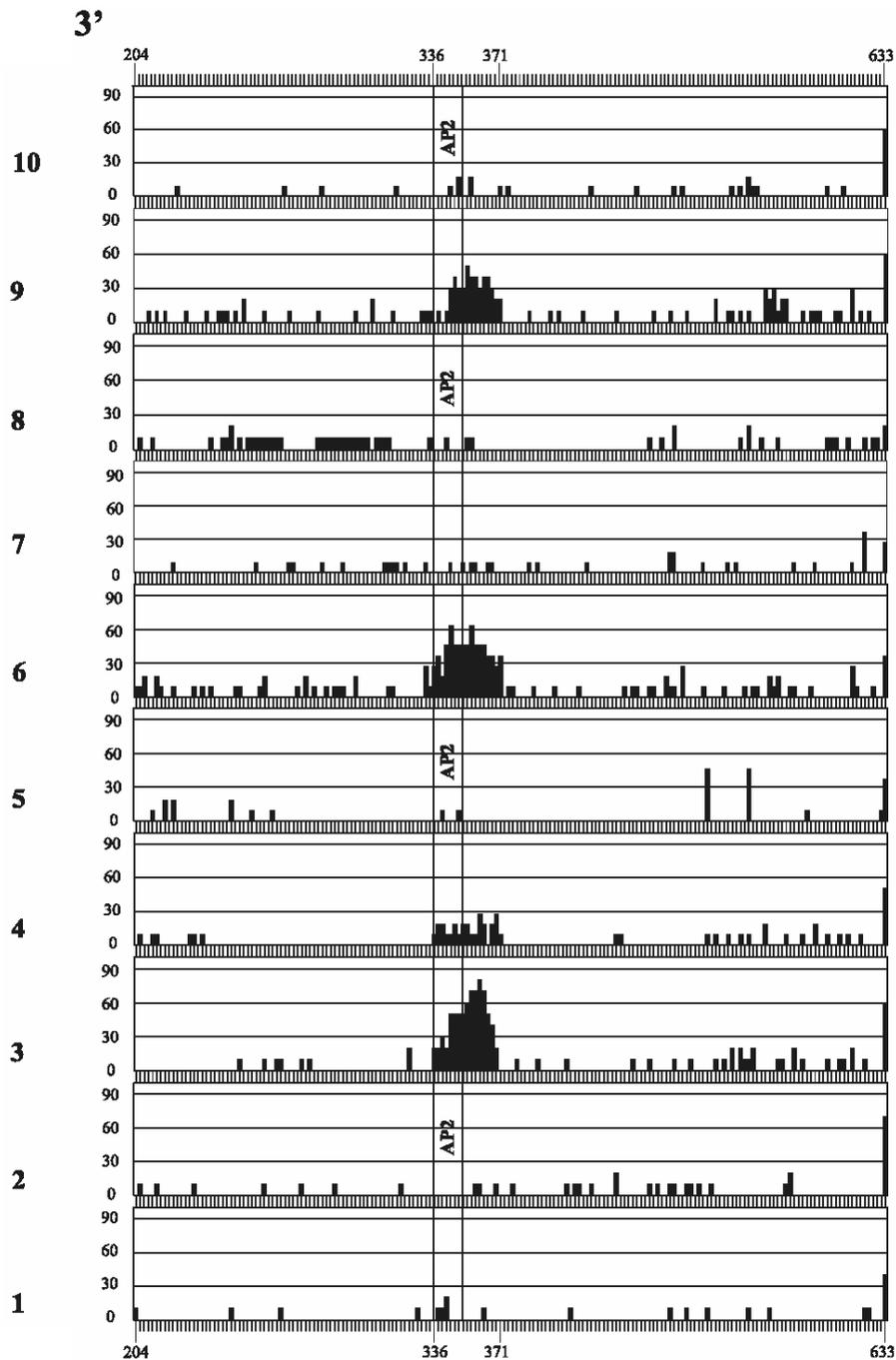


Abb. 4.8.: Methylierungsmuster des *NF1*-Promotors in Leukozyten von weiblichen Kontrollprobanden 1-10. Dargestellt ist das 3'-Fragment von Position +204 bis +633. Die horizontale Achse gibt die Sequenzposition der analysierten Cytosinreste im *NF1*-Promotor wieder und die vertikale Achse zeigt den Prozentsatz der methylierten Klone pro Cytosinrest an. Den Prozentsatz der methylierten Klone an dem jeweiligen Cytosin spiegeln die schwarzen Säulen wider. Die nummerierten Häkchen an der horizontalen Achse weisen außerdem auf positionsspezifisch methylierte Cytosine ($\geq 30\%$ der Klone) in den untersuchten Proben hin. Die Bindungsstelle für AP-2, die von der positionsspezifischen Methylierung betroffen ist, wurde eingezeichnet.

ERGEBNISSE

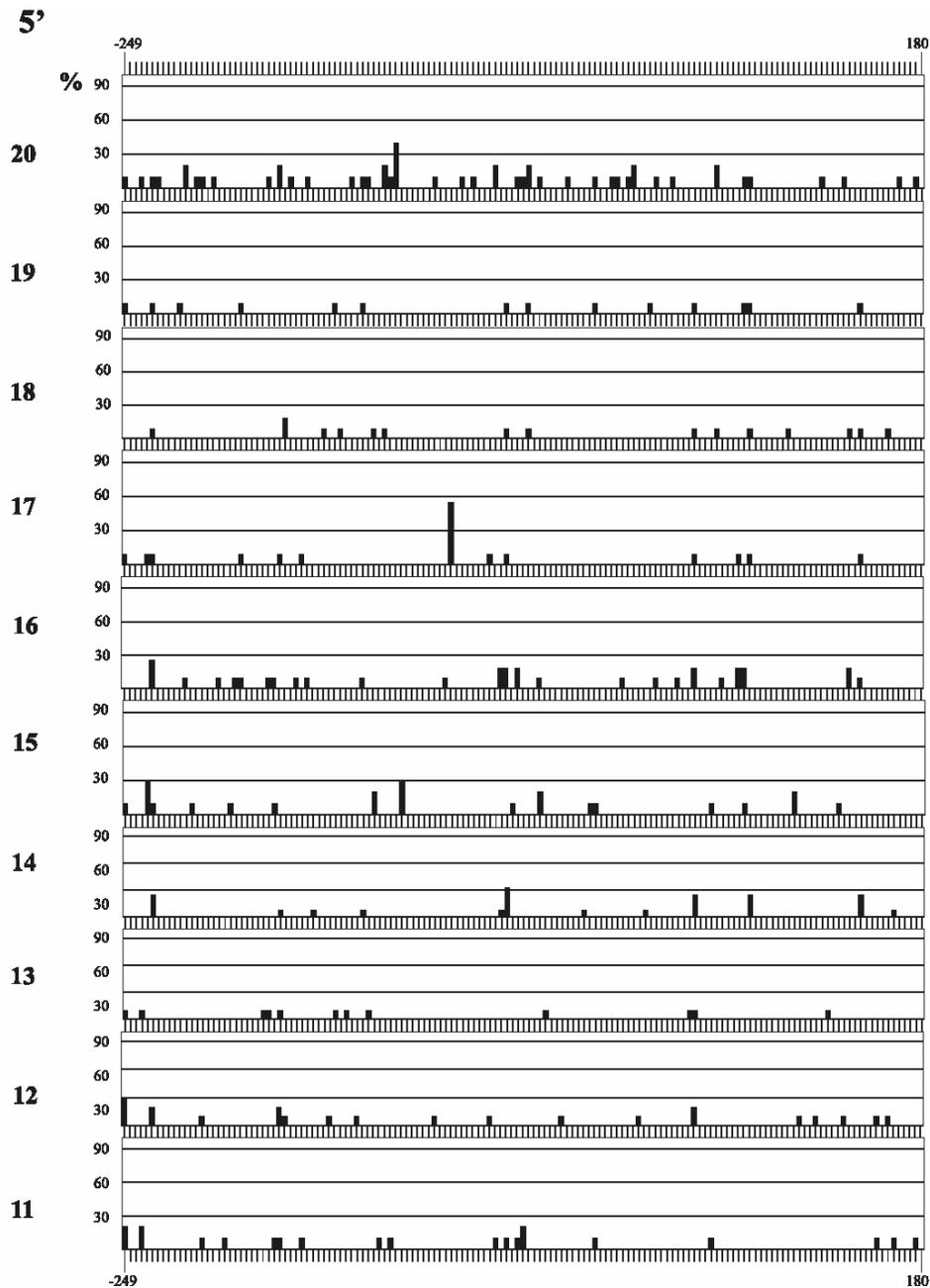


Abb. 4.9.: Methylierungsmuster des *NF1*-Promotors in Leukozyten von männlichen Kontrollprobanden 11-20. Dargestellt ist das 5'-Fragment von Position -249 bis +180. Die horizontale Achse gibt die Sequenzposition der analysierten Cytosinreste im *NF1*-Promotor wieder und die vertikale Achse zeigt den Prozentsatz der methylierten Klone pro Cytosinrest an. Den Prozentsatz der methylierten Klone an dem jeweiligen Cytosin spiegeln die schwarzen Säulen wider. Die nummerierten Häkchen an der horizontalen Achse weisen außerdem auf positionsspezifisch methylierte Cytosine ($\geq 30\%$ der Klone) in den untersuchten Proben hin.

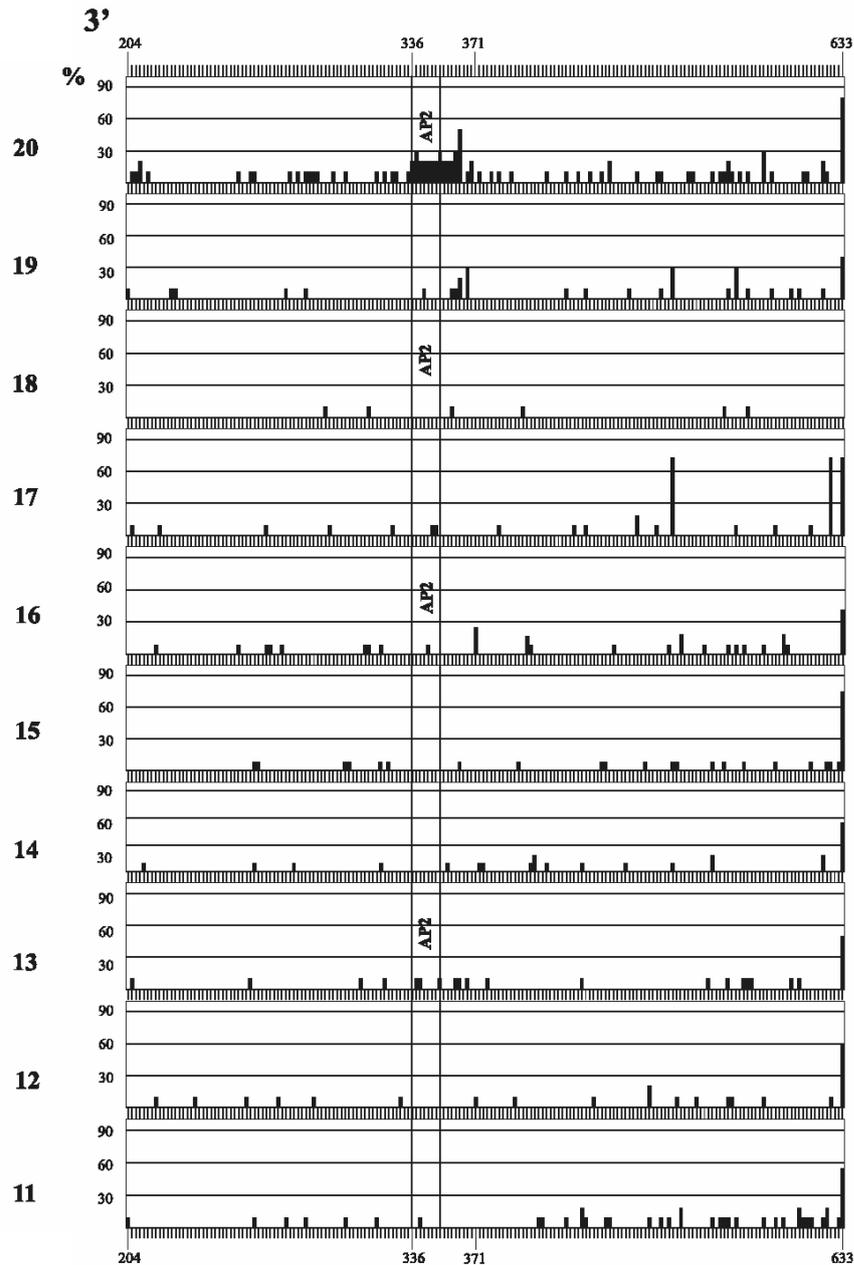


Abb. 4.10.: Methylierungsmuster des *NF1*-Promotors in Leukozyten von männlichen Kontrollprobanden 11-20. Dargestellt ist das 3'-Fragment von Position +204 bis +633. Die horizontale Achse gibt die Sequenzposition der analysierten Cytosinreste im *NF1*-Promotor wieder und die vertikale Achse zeigt den Prozentsatz der methylierten Klone pro Cytosinrest an. Den Prozentsatz der methylierten Klone an dem jeweiligen Cytosin spiegeln die schwarzen Säulen wider. Die nummerierten Häkchen an der horizontalen Achse weisen außerdem auf positionsspezifisch methylierte Cytosine ($\geq 30\%$ der Klone) in den untersuchten Proben hin. Die Bindungsstelle für AP-2, die von der positionsspezifischen Methylierung betroffen ist, wurde eingezeichnet.

Bei der Begutachtung des Methylierungsmusters fiel eine Häufung von 5-Methylcytosinen im *NF1*-Promotor der Leukozyten von vier weiblichen Probanden (Probennummer: 3, 4, 6 und 9; Abb. 4.8.) und einem männlichen Probanden (Probennummer: 20; Abb. 4.10.) auf. Um einen Unterschied des *NF1*-Promotormethylierungsstatus in Leukozyten von beiden Geschlechtern zu evaluieren, wurden beide Gruppen separat ausgewertet.

4.1.2.1. Methylierungsstatus des *NF1*-Promotors in Leukozyten von weiblichen Kontrollprobanden

Zehn der 20 Kontrollprobanden waren weiblichen Geschlechts. Insgesamt wurden 103 Klone für das 5'-Fragment und 106 Klone für das 3'-Fragment analysiert (Abb. 4.5., 4.7. und 4.8.).

In der DNA des *NF1*-Promotors waren im Median 1,74 % der Cytosine methyliert (Schwankungsbreite: 0,99 – 4,77; n =10). Die methylierten Cytosine befanden sich in folgenden Dinukleotiden (Abb. 4.5. E):

CpG: 2,76 % (Schwankungsbreite: 1,13 – 6,34 %),

CpT: 1,73 % (Schwankungsbreite: 0,67 – 5,14 %),

CpC: 1,41 % (Schwankungsbreite: 0,79 – 4,34 %) und

CpA: 2,03 % (Schwankungsbreite: 0,44 – 6,99 %).

4.1.2.2. Methylierungsstatus des *NF1*-Promotors in Leukozyten von männlichen Kontrollprobanden

Von den 10 Kontrollprobanden männlichen Geschlechts wurden 106 Klone für das 5'-Fragment und 107 Klone für das 3'-Fragment analysiert (Abb. 4.9. und 4.10.).

In der DNA des *NF1*-Promotors waren im Median 1,25 % der Cytosine methyliert (Schwankungsbreite: 0,65 – 4,32; n =10). Die methylierten Cytosine befanden sich in folgenden Dinukleotiden (Abb. 4.5. F):

CpG: 2,71 % (Schwankungsbreite: 0,85 – 3,97 %),

CpT: 0,75 % (Schwankungsbreite: 0,28 – 4,0 %),

CpC: 0,93 % (Schwankungsbreite: 0,39 – 4,08 %) und

CpA: 1,19 % (Schwankungsbreite: 0,44 – 6,59 %).

4.1.2.3. Vergleich des *NF1*-Promotormethylierungsstatus in Leukozyten von weiblichen und männlichen Kontrollprobanden

Um einen Unterschied des *NF1*-Promotormethylierungsstatus in Leukozyten von beiden Geschlechtern zu evaluieren, wurde der *NF1*-Promotormethylierungsgrad der Leukozyten von 10 weiblichen Kontrollprobanden dem von 10 männlichen Kontrollprobanden gegenübergestellt. Dazu wurden von den weiblichen Probanden 103 Klone für das 5'-Fragment und 106 Klone für das 3'-Fragment bzw. für die männlichen Probanden 106 Klone für das 5'-Fragment und 107 Klone für das 3'-Fragment ausgewertet (Abb. 4.7 – 4.10).

Bei der Begutachtung des Methylierungsmusters fiel eine Häufung von 5-Methylcytosinen im *NF1*-Promotor der Leukozyten von vier weiblichen Probanden (Probennummer: 3, 4, 6 und 9; Abb. 4.8.) und einem männlichen Probanden (Probennummer: 20; Abb. 4.10) auf. Die statistische Auswertung aller methylierten Positionen des gesamten *NF1*-Promotors in den Leukozyten beider Geschlechter ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,112$; Abb. 4.6. C).

4.1.1. Vergleich des *NF1*-Promotormethylierungsstatus in *NF1*-assoziierten Nervenscheidentumoren und in Leukozyten von Kontrollprobanden

Zur Einschätzung des Methylierungsstatus des *NF1*-Promotors im *NF1*-assoziierten Tumorgewebe im Vergleich mit nicht-tumorösem Gewebe wurden periphere Leukozyten von Kontrollprobanden, die nicht an *NF1* erkrankt waren, herangezogen. Dazu wurde der Methylierungsgrad des *NF1*-Promotors in 21 Tumoren (16 Neurofibrome und 5 MPNST) mit 217 Klonen für das 5'-Fragment und 224 Klonen für das 3'-Fragment und in Leukozyten von 20 Kontrollprobanden mit 209 Klonen für das 5'-Fragment und 213 Klonen für das 3'-Fragment untersucht (Abb. 4.1. –4.4 und 4.7. –4.10).

Bei der Evaluierung des Methylierungsmusters fiel eine Häufung von 5-Methylcytosinen im *NF1*-Promotor der Leukozyten von vier weiblichen Kontrollprobanden (Probennummer: 3, 4, 6 und 9; Abb. 4.8.) und einem männlichen Kontrollprobanden (Probennummer: 20; Abb. 4.10.) auf. Eine ähnliche Ansammlung von methylierten Cytosinen wurde im *NF1*-Promotor der *NF1*-assoziierten Tumore nicht beobachtet. Die statistische Auswertung aller methylierter Positionen des gesamten *NF1*-Promotors sowohl in den Leu-

kozyten der Kontrollprobanden als auch in den Nervenscheidentumoren ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,144$; Abb. 4.6. D).

Zusammenfassend lässt sich der Methylierungsgrad des *NF1*-Promotors in Nervenscheidentumoren und Leukozyten von Kontrollprobanden als niedrig einschätzen. Der Vergleich des Methylierungsstatus im gesamten *NF1*-Promotor

- von Nervenscheidentumoren mit Kontrollprobanden-Leukozyten,
- von Leukozyten von weiblichen mit männlichen Kontrollprobanden,
- von benignen mit malignen Nervenscheidentumoren und
- von dermalen mit plexiformen Neurofibromen

brachte keinen signifikanten Unterschied. Der dabei untersuchte Bereich des *NF1*-Gens (Abb. 3.2.) repräsentierte den größten Teil der CpG-Insel, der den Promotor, 5'UTR, Exon 1 und teilweise Intron 1 umfasst. Es ist jedoch bekannt, dass spezifische Subregionen des *NF1*-Promotors entscheidend die Genexpression beeinflussen [119]. Andererseits konnte gezeigt werden, dass die Methylierung von Erkennungssequenzen die Bindung von Transkriptionsfaktoren *in vitro* verhindern kann [119, 120]. In unserer Arbeit galt daher nach der Bestimmung des Methylierungsgrads des gesamten *NF1*-Promotors der Analyse des Methylierungsmusters mit der Verteilung der 5'-Methylcytosine unsere besondere Aufmerksamkeit.

4.2. Positionsspezifische Methylierung im *NF1*-Promotor

Vor dem Hintergrund einer geringgradigen *NF1*-Promotormethylierung zeigten individuelle Positionen deutliche Methylierungsspitzen (Abb. 4.1. – 4.4 und 4.7. – 4.10.), die nachfolgend als positionsspezifische Methylierung beschrieben werden. Zur Definition dieses Begriffs wurde eine willkürlich gewählte Grenze von mindestens 30%iger Methylierung eines individuellen Cytosins herangezogen, da es bisher in der Literatur dazu keine eindeutigen Definitionen gibt. Dies bedeutet, dass mindestens 3 von 10 Klonen an dem jeweiligen Cytosin eine Methylgruppe getragen haben müssen.

4.2.1. Positionsspezifische Methylierung im *NF1*-Promotor in *NF1*-assoziierten Nervenscheidentumoren

Das spezifische Methylierungsmuster wurde im *NF1*-Promotor in 10 von 21 Nervenscheidentumoren detektiert. Insgesamt betraf es 24 Positionen in den *NF1*-assoziierten Tumoren (Abb. 4.1. – 4.4.). Davon bildeten:

- 11 Cytosine ein Dinukleotid mit Guanosin (-249, -234, -55, +92, 94, +131, +136, +472, +529, +576, +618),
- 7 Cytosine ein Dinukleotid mit Cytosin (-174, -167, +149, +343, +383, +427, +466),
- 3 Cytosine ein Dinukleotid mit Adenosin (-38, -10, +403) und
- 3 Cytosine ein Dinukleotid mit Thymin (+77, +317, +389).

Position +633 wurde aufgrund der Lage im degenerierten Primer von der Evaluation ausgeschlossen. Die positionsspezifische Methylierung wurde dabei in 7 von 14 Neurofibromen (Probennummer: 23a, 23b, 24a, 26a, 29a, 29b und 22c; Abb. 4.1., 4.2. und 4.4.) und in 3 von 5 MPNST (Probennummer 21b, c und d; Abb. 4.3. und 4.4.) beobachtet. Einige Positionen lagen in mehreren Tumoren von verschiedenen Patienten spezifisch methyliert vor :

- Position -249 in 3 unterschiedlichen Tumoren (Probennummer: 23b, 26a, 29b)
- Position +92 in 3 unterschiedlichen Tumoren (Probennummer: 23a, 26a, 21c)
- Position -234 in 2 unterschiedlichen Tumoren (Probennummer: 29b, 21d)
- Position -38 in einem kutanen und einem plexiformen Neurofibrom (Probennummer: 23a und 29b)
- Position -10 in 2 unterschiedlichen Tumoren (Probennummer: 29b, 21d)
- Position +136 in 2 unterschiedlichen Tumoren (Probennummer: 29b, 21d)

4.2.1.1. Methylierung von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in *NF1*-assoziierten Nervenscheidentumoren

Das Methylierungsmuster des *NF1*-Promotors in Nervenscheidentumoren wies eine positionsspezifische Methylierung an 5 Transkriptionsfaktorbindungsstellen auf. Betroffen waren davon die Erkennungssequenz von SRE und CRE an Position -10, die in einem plexiformen Neurofibrom (Probennummer: 29b; Abb. 4.1.) und einem MPNST (Probennummer: 21d; Abb. 4.3.) methyliert war bzw. die Erkennungssequenz von AP-2

an Position +77 in einem MPNST (Probennummer: 21d; Abb. 4.3.), an Position +343 in einem plexiformen Neurofibrom (Probennummer: 29b; Abb. 4.2.), an Position +466 in einem Neurofibrom (Probennummer: 22c; Abb. 4.4.) und an Position +472 in einem plexiformen Neurofibrom (Probennummer: 29b; Abb. 4.2.).

4.2.2. Positionsspezifische Methylierung im *NF1*-Promotor in Leukozyten der Kontrollprobanden

In den Leukozyten von 11 der 20 Kontrollprobanden wurde das spezifische Methylierungsmuster im *NF1*-Promotor ebenfalls beobachtet (Abb. 4.7 – 4.10.). Von den 20 positionsspezifischen Methylierungen waren

- 15 CpG (-249, -236, -234, -173, -79, -45, +94, +136, +458, +472, +489, +519, +554, +577 und +621)
- 0 CpC
- 3 CpA (-82, -10 und +493) und
- 2 CpT (+77 und +368) betroffen.

Position +633 wurde aufgrund der Lage im degenerierten Primer von der Evaluation ausgeschlossen. Einige Positionen lagen in den Leukozyten von verschiedenen Kontrollprobanden spezifisch methyliert vor:

- Position -249 in Leukozyten von 2 Kontrollprobanden (Probennummer: 3 und 12)
- Position -234 in Leukozyten von 2 Kontrollprobanden (Probennummer: 6 und 9)
- Position +94 in Leukozyten von 2 Kontrollprobanden (Probennummer: 6 und 9)
- Position +458 in Leukozyten von 3 Kontrollprobanden (Probennummer: 5, 17 und 19)
- Position +493 in Leukozyten von 2 Kontrollprobanden (Probennummer: 9 und 19)

4.2.2.1. Methylierungsmuster der Region +336 bis +371

Methylierte Positionen waren im *NF1*-Promotor mit einer Ausnahme zufällig verteilt: In der Region von Position +336 bis +371 zeigten einzelne Cytosine eine 30-100%ige Methylierung in den Leukozyten von vier der 20 Kontrollprobanden (Abb. 4.8. und 4.10.). Drei der betroffenen Proben stammten von weiblichen Probanden (Probennummer: 3, 6, 9) und eine Probe von einem männlichen Proband (Probennummer: 20). Au-

ßerdem waren die Cytosine in dieser Region geringgradig bis zu 30 % in den Leukozyten einer weiblichen Kontrollprobandin (Probenummer: 4) und eines männlichen NF1-Patienten (Probenummer: 21a) methyliert. Diese Region befindet sich in der 5' UTR (+1 bis +483) und enthält die potenzielle AP-2 Bindungsstelle von +335 bis +344 mit der Erkennungssequenz TCCCCACCCC.

Um die Methylierung der Region von Position +336 bis +371 der unterschiedlichen Gewebe miteinander vergleichen zu können, wurde der mediane Methylierungsgrad ermittelt. In die Analyse des Methylierungsmusters der Region +336 bis +371 in den Leukozyten der 20 Kontrollprobanden wurden 213 Klone einbezogen. Im Median besaßen 2,55 % der Cytosine eine Methylgruppe (Schwankungsbreite: 0,52 bis 43,75; n = 20). Ebenfalls wurde von 21 NF1-assoziierten Tumoren (16 Neurofibrome und 5 MPNST) in 224 Klonen der Methylierungsstatus in der Region +336 bis +371 untersucht und ein 1,25%iger Methylierungsgrad detektiert (Schwankungsbereich: 0,0 bis 5,0; n = 21). Die statistische Auswertung aller methylierter Positionen der Region +336 bis +371 in den Leukozyten der Kontrollprobanden und den Nervenscheidentumoren zeigte einen signifikant höheren Methylierungsgrad in den Leukozyten ($p = 0,019$; Abb. 4.11. A).

In der Region +336 bis +371 wiesen 4 der 10 weiblichen Kontrollprobanden bzw. einer der 10 männlichen Kontrollprobanden eine erhöhte Methylierung der Cytosine auf. Um einen geschlechtsspezifischen Unterschied des Methylierungsstatus in dieser Region zwischen weiblichen und männlichen Kontrollprobanden zu evaluieren, wurden beide Gruppen separat ausgewertet. In den 106 Klonen der Leukozyten von 10 weiblichen Kontrollprobanden trugen 3,13 % der Cytosine in der Region +336 bis +371 eine Methylgruppe (Schwankungsbreite: 1,88 bis 43,75; n = 10). In den 107 Klonen der Leukozyten von 10 männlichen Kontrollprobanden waren 0,89 % der Cytosine mit einer Methylgruppe in der Region +336 bis +371 versehen (Schwankungsbreite: 0,52 bis 21,88; n = 10). Die statistische Auswertung aller methylierter Positionen der Region +336 bis +371 in den Leukozyten beider Geschlechter zeigte einen signifikant höheren Methylierungsgrad in den Leukozyten der weiblichen Kontrollprobanden ($p = 0,09$; Abb.4.11. B).

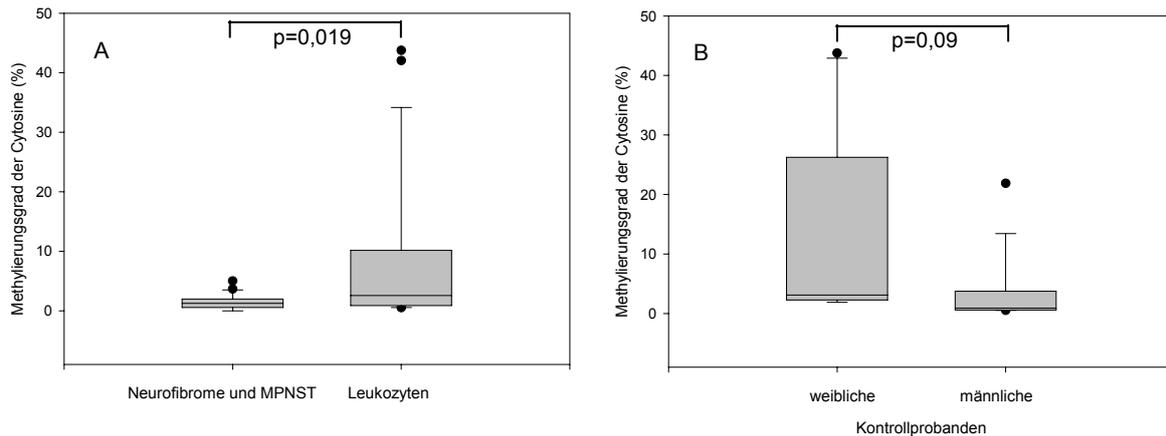


Abb. 4.11.: Methylierungsgrad der Cytosine in der Region +336 bis +371 des *NF1*-Promotors in *NF1*-assoziierten Nervenscheidentumoren und Leukozyten von Kontrollprobanden. A) Nervenscheidentumore versus Leukozyten von Kontrollprobanden. B) Leukozyten von weiblichen versus männlichen Kontrollprobanden.

4.3. „non-CpG“-Methylierung

Die Rolle der „non-CpG“-Methylierung in eukaryontischen Zellen wird derzeit diskutiert, da einerseits zwar CpG-Dinukleotide als primäres Ziel der DNA-Methylasen bekannt sind, andererseits jedoch die Existenz von „non-CpG“-Methylierung nachgewiesen werden konnte [7]. In unserer Studie trat in Tumoren und Leukozyten im gesamten *NF1*-Promotor ein Teil der 5'-Methylcytosine in einem Dinukleotid mit Adenosin, Cytosin oder Thymin auf und war somit ebenfalls der „non-CpG“-Methylierung zuzuschreiben. Um einen Unterschied zwischen der CpG-Methylierung und der „non-CpG“-Methylierung in den verschiedenen Geweben zu evaluieren, wurden beide Gruppen separat ausgewertet.

Von 16 Neurofibromen wurden 165 Klone für das 5'-Fragment und 173 Klone für das 3'-Fragment in die Analyse einbezogen. Im gesamten *NF1*-Promotor waren 1,70 % (Schwankungsbreite: 0,59 bis 5,21; n = 16) der mit einem Guanosin verbundenen Cytosine (CpG) bzw. 1,17 % (Schwankungsbreite: 0,13 bis 3,41; n = 16) der Cytosine, die mit einem Adenosin, einem Cytosin oder einem Thymin in einem Dinukleotid auftraten, methyliert. Die statistische Auswertung zeigte, dass im *NF1*-Promotor in den 16 Neurofibromen die CpG-Methylierung signifikant höher war ($p = 0,001$; Abb. 4.12. A).

Von 5 MPNST wurden 52 Klone für das 5'-Fragment und 51 Klone für das 3'-Fragment in die Analyse einbezogen. Im gesamten *NF1*-Promotor waren 1,41 % (Schwankungs-

breite: 0,54 bis 3,30; n = 5) der mit einem Guanosin verbundenen Cytosine (CpG) bzw. 0,77 % (Schwankungsbreite: 0 bis 3,3; n = 5) der Cytosine, die mit einem Adenosin, einem Cytosin oder einem Thymin in einem Dinukleotid auftraten, methyliert. Die statistische Auswertung ergab jedoch in den 5 MPNST keinen signifikanten Unterschied zwischen CpG-Methylierung und „Non-CpG“-Methylierung im *NF1*-Promotor ($p = 0,225$; Abb. 4.12. B).

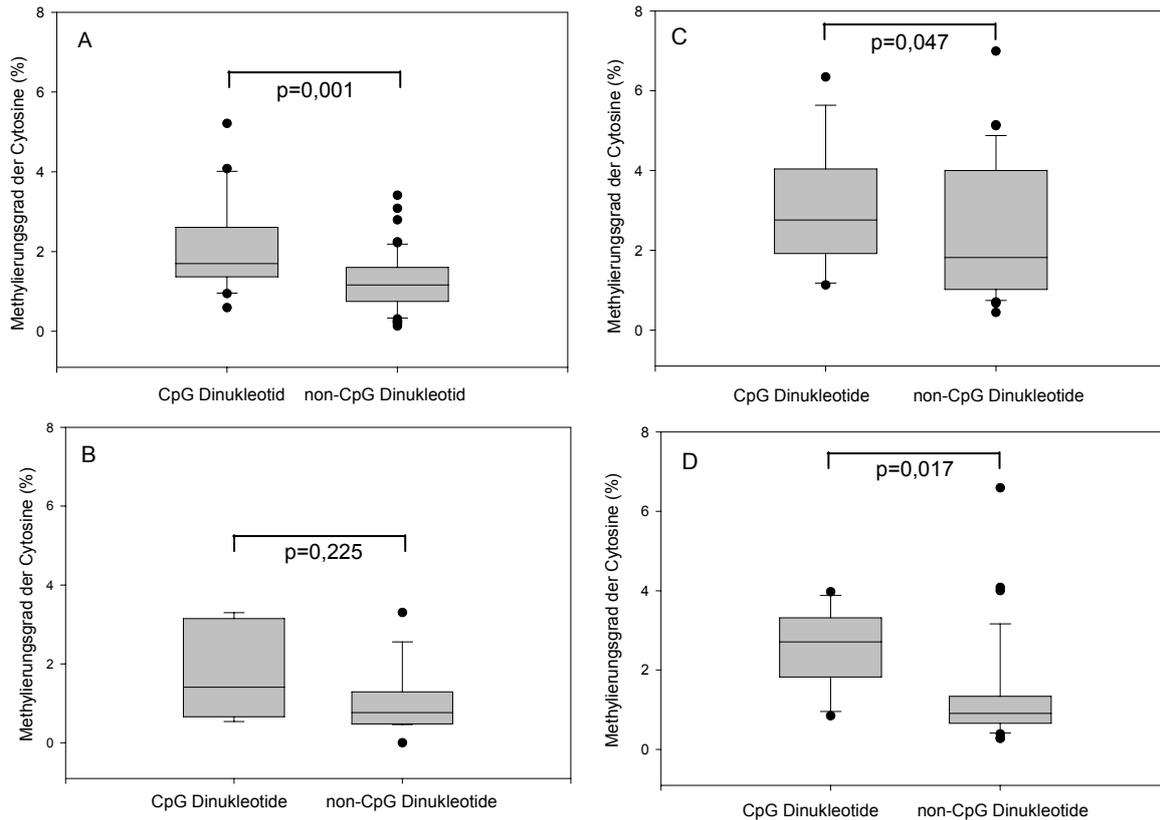


Abb. 4.12.: Vergleich der CpG-Methylierung mit der „non-CpG“-Methylierung im *NF1*-Promotor in *NF1*-assoziierten Nervenscheidentumoren und in Leukozyten von Kontrollprobanden. A) Neurofibrome. B) MPNST. C) Leukozyten von weiblichen Kontrollprobanden. D) Leukozyten von männlichen Kontrollprobanden.

Von den Leukozyten der 10 weiblichen Kontrollprobanden wurden 103 Klone für das 5'-Fragment und 106 Klone für das 3'-Fragment in die Analyse einbezogen. Im gesamten *NF1*-Promotor waren 2,76 % (Schwankungsbreite: 1,13 bis 6,34; n = 10) der mit einem Guanosin verbundenen Cytosine (CpG) bzw. 1,82 % (Schwankungsbreite: 0,44 bis 6,99; n = 10) der Cytosine, die mit einem Adenosin, einem Cytosin oder einem Thymin in einem Dinukleotid auftraten, methyliert. Die statistische Auswertung zeigte, dass im

NF1-Promotor in den Leukozyten der 10 weiblichen Kontrollprobanden die CpG-Methylierung signifikant höher war als die „non-CpG“-Methylierung ($p = 0,047$; Abb. 4.12. C). Von den Leukozyten der 10 männlichen Kontrollprobanden wurden 106 Klone für das 5'-Fragment und 107 Klone für das 3'-Fragment in die Analyse einbezogen. Im gesamten *NF1*-Promotor waren 2,71 % (Schwankungsbreite: 0,85 bis 3,97; $n = 10$) der mit einem Guanosin verbundenen Cytosine (CpG) bzw. 0,91 % (Schwankungsbreite: 0,28 bis 6,59; $n = 10$) der Cytosine, die mit einem Adenosin, einem Cytosin oder einem Thymin in einem Dinukleotid auftraten, methyliert. Die statistische Auswertung zeigte, dass im *NF1*-Promotor in den Leukozyten der 10 männlichen Kontrollprobanden die CpG-Methylierung signifikant höher war als die „non-CpG“-Methylierung ($p = 0,017$; Abb. 4.12. D).