

5. Diskussion

Der Stellenwert der DNA-Hypermethylierung im Prozess der neoplastischen Transformation ist mittlerweile gut charakterisiert und experimentell belegt. Es wird vermutet, dass die Hypermethylierung von CpG-Inseln in den Promotoren von Tumorsuppressorgenen zur Inaktivierung führen kann bzw. im Einklang mit klassischen genetischen Mechanismen wie Punktmutationen oder Deletionen zur Inaktivierung beider Allele führt. Diese Entdeckung der durch Methylierung vermittelten Tumorsuppressorgeninaktivierung in Tumoren führte daher zu einer Revision der „two-hit hypothesis“ nach Knudson [121].

Vor diesem Hintergrund war es das Ziel der vorliegenden Studie, die DNA-Methylierung des Promotors des Tumorsuppressorgens *NF1* in *NF1*-assoziierten Tumoren zu analysieren. Es sollte eine Antwort auf die Frage gefunden werden, ob epigenetische Modifikationen durch die Suppression des „Checkpoint“-Regulators Neurofibromin Zelltransformationen und somit die Bildung von *NF1*-assoziierten Tumoren initiieren können.

In unserer Studie untersuchten wir die für die *NF1*-Expression relevante Promotorregion von -256 bis +622 (in Korrelation zum Startcodon ATG), die einerseits neben dem Transkriptionsstartpunkt eine Reihe von putativen regulatorischen Elementen wie AP2-, SP1-Bindungsstellen sowie ein cAMP response element (CRE) [86] umfasst und andererseits einen Großteil der potenziell methylierbaren Cytosine beinhaltet (Abb. 3.2.). Unsere Strategie war es dabei, den Methylierungsstatus aller in diesem Bereich befindlichen Cytosine (CpG-Dinukleotide und non-CpG-Dinukleotide) zu evaluieren, mit besonderer Beachtung der für die *NF1*-Transkription funktionell relevanten Sequenzelemente.

5.1. Keine regionale *NF1*-Promotorhypermethylierung in *NF1*-assoziierten Nervenscheidentumoren

Die Analyse des *NF1*-Promotors in 21 Proben von Nervenscheidentumoren von 9 *NF1*-Patienten mittels der genomischen Bisulfitsequenzierung zeigte eine geringgradige Methylierung mehrerer Cytosinreste mit zufälliger Verteilung (Abb. 4.1. – 4.4.). Der mediane Prozentsatz der 5-Methylcytosine betrug 1,35 %. Keine Probe zeigte eine regionale *NF1*-Promotorhypermethylierung.

Um die Höhe des DNA-Methylierungsstatus beurteilen zu können, wurden Leukozyten von gesunden Kontrollprobanden als Referenzgewebe herangezogen (Abb. 4.7. – 4.10.). Auch in diesen Proben zeigte sich keine regionale *NF1*-Promotorhypermethylierung. Der mediane Prozentsatz der 5-Methylcytosine im *NF1*-Promotor in den Leukozyten von Kontrollprobanden betrug 1,39 % und unterschied sich somit nicht signifikant von dem medianen Prozentsatz der 5-Methylcytosine im *NF1*-Promotor in den Nervenscheidentumoren ($p = 0,144$; Abb. 4.6.D).

Obwohl gewebsspezifische Unterschiede in der Gesamtmenge der 5-Methylcytosine in humaner DNA bekannt sind [39], wurde in diesem Experiment auf Leukozyten als Referenzgewebe zurückgegriffen. Die Entnahme von gesundem peripheren Nervengewebe von *NF1*-Patienten oder Kontrollprobanden als Vergleichsproben zu ausschließlich wissenschaftlichen Zwecken ist aus ethischen Gründen nicht realisierbar.

Trotzdem lassen die Ergebnisse vermuten, dass die methylierungsvermittelte Inaktivierung des *NF1*-Gens kein relevanter Mechanismus für die Entstehung von *NF1*-assoziierten Tumoren ist. Dies steht im Kontrast zu Untersuchungen von Tumorsuppressorgenen bei anderen Tumorentitäten.

Das Prinzip der epigenetischen Geninaktivierung in Tumorzellen wurde erstmals am Retinoblastomgen *RB* beschrieben, dessen Promotor in einer signifikanten Gruppe von sporadischen und hereditären Retinoblastomen methyliert ist [38, 122]. Dieser Mechanismus der methylierungsvermittelten Inaktivierung des Tumorsuppressorgens konnte bestätigt werden, indem eine 92%ige Reduktion der *RB*-Expression in Tumoren mit Promotorhypermethylierung nachgewiesen wurde [123]. Das Retinoblastomgen *RB* stellt somit ein Paradigma für den transformierenden Effekt der DNA-Hypermethylierung dar. Der zweite wichtige Beleg für die transformierende Rolle dieses epigenetischen Mechanismus war die Identifikation der Hypermethylierung der CpG-Insel im Promotor von *INK4A*, dem Gen des Zellzyklusregulators Ink4a, und der Nachweis der damit verbundenen Ausschaltung des Gens. Die Inaktivierung dieses Gens wird mit der Entstehung von Melanomen und Gliomen assoziiert [124]. Ein weiteres interessantes Beispiel ist das Gen des „Mismatch“-Reparaturenzyms Mlh1. Sowohl in kolorektalen Karzinomen als auch in Endometriumkarzinomen von Patienten mit einem „Mutator“-Phänotyp war der Promotor von diesem Gen methyliert [125].

Schließlich wurde die DNA-Hypermethylierung in den Promotoren einer Reihe von Genen beobachtet, die in fast alle wichtigen Schritte der Karzinogenese involviert sind: Zellzyklusregulation, DNA-Reparatur, Zytostatikaresistenz, Apoptose, Differenzierung,

Angiogenese und Metastasierung. Einige *in vivo*- und *in vitro*-Beobachtungen lassen vermuten, dass in verschiedenen Tumortypen das DNA-Methylierungsprofil sowohl eine präkanzeröse Eigenschaft als auch ein Progressionsmerkmal darstellt [126].

Unser Ergebnis über die geringgradige Methylierung des *NF1*-Promotors in Nervenscheidentumoren steht in Einklang mit drei voneinander unabhängigen Arbeiten [127-129].

Horan et al. [127] untersuchten dabei mit Hilfe der genomischen Bisulfitsequenzierung eine 1,2 kb große Region des *NF1*-Promotors von -680 bis +520, die ebenfalls die für die *NF1*-Expression relevante Promotorregion enthielt und sich somit mit der in der vorliegenden Arbeit analysierten Promotorregion überschneidet. In die Auswertung einbezogen wurden jedoch nicht alle Cytosine, sondern nur 70 in der Region liegende CpG-Dinukleotide. In den 11 untersuchten Nervenscheidentumoren wurden 6 methylierte CpG-Dinukleotide gefunden, was 9 % der CpGs in dem untersuchten Bereich des *NF1*-Promotors entspricht. Um die Bedeutung der DNA-Methylierung im *NF1*-Promotor als geninaktivierenden Mechanismus zu evaluieren, verglichen die Autoren das Ergebnis mit repräsentativen Beispielen von Tumorsuppressorgenen (z. B. *RB1*, *vHL* und *CDKN2A*), bei denen eine Assoziation zwischen einer Promotorhypermethylierung und Tumorentwicklung demonstriert wurde. Transkriptionelle Inaktivierung schien bei den ausgewählten Genen dann aufzutreten, wenn 40 bis 100 % der CpG-Dinukleotide mit einer Methylgruppe modifiziert vorlagen. Horan et al. schlossen aus diesem Vergleich, dass die geringgradige *NF1*-Promotormethylierung in Nervenscheidentumoren wahrscheinlich insuffizient für eine transkriptionelle Repression ist. Gleichzeitig diskutierten sie jedoch prinzipiell die Vergleichbarkeit von DNA-Methylierungsstudien, bei denen unterschiedliche Untersuchungs- und Auswertungsmethoden angewandt wurden. So wurden die zum Vergleich herangezogenen Gene teilweise mittels Southern-Blot-Analyse, PCR-basierendem Test und MSP untersucht, die eine geringe Sensitivität besitzen und deren Ergebnisse jeweils nur auf der Analyse eines kleinen Teils der CpG-Dinukleotide basiert. Die daraus gezogenen Schlüsse über den Methylierungsstatus seien damit nicht zwangsläufig repräsentativ für den Methylierungsgrad der ganzen CpG-Insel.

Ebenso beobachteten Luijten et al. [128] und Fishbein et al. [129] in Studien über Nervenscheidentumore keine Hypermethylierung in der untersuchten *NF1*-Promotorregion (Tab. 5.1.).

Mit 16 untersuchten Neurofibromen und 5 MPNST stellt unsere Studie jedoch eine der umfangreichsten Analysen des *NF1*-Promotormethylierungsstatus dar. Die vorliegende Studie lässt somit die Zahl der Nervenscheidentumore, in denen keine regionale Hypermethylierung des *NF1*-Genpromotors nachgewiesen wurde, auf 65 wachsen. Interessanterweise erbrachte die Methylierungsanalyse des *NF1*-Promotors in pilozystischen Astrozytomen, ein häufig mit der Neurofibromatose Typ I assoziierter Tumortyp des Kindesalters, ähnliche Ergebnisse. Sowohl in 30 niedriggradigen als auch in 15 höhergradigen Astrozytomen (WHO II° und IV°) ließ sich keine *NF1*-Promotormethylierung finden [130].

Damit scheint die Methylierung des *NF1*-Promotors kein häufiger Mechanismus zu sein, der zur Bildung von *NF1*-assoziierten Tumoren führt. Letztlich lässt sich jedoch ein epigenetischer Einfluss in der *NF1*-Tumorigenese auch anhand der nun vorliegenden Daten von 4 Studien (Tab. 5.1.) nicht ausschließen, da die Promotorhypermethylierung trotzdem in einer begrenzten und zufällig nicht analysierten Untergruppe von *NF1*-assoziierten Tumoren zu einer *NF1* Inaktivierung beitragen könnte.

Obwohl die Tumorsuppressoreigenschaften des Neurofibromins und die im Promotor liegende CpG-Insel das *NF1*-Gen als Kandidatengen für eine hypermethylierungsvermittelte Inaktivierung vermuten lassen, ist es jedoch bemerkenswert, dass derzeit weder in einer *NF1*-assoziierten noch in einer *NF1*-unabhängigen Tumorentität eine Hypermethylierung des *NF1*-Promotors beschrieben wurde.

Bei anderen soliden Tumoren mehren sich die Hinweise, dass epigenetische Modifikationen früh im onkogenen Prozess auftreten. Beispielsweise wird die Hypermethylierung von *p16^{INK4a}* häufig während der metaplastischen Progression beim Barrett-Syndrom [131, 132], Lungen- [133], Zervix- [133] und Magenkarzinom [134, 135] beobachtet. Beim kolorektalen Karzinom konnte gezeigt werden, dass die Hypermethylierung einer Zahl von Genen in der normalen Mukosa und Pre- oder Frühneoplasien beginnt. Eine ausgeprägte Methylierung scheint somit das Risiko für ein Kolonkarzinom zu erhöhen [136 - 139].

QUELLE	UNTERSUCHTE NERVENSCHEIDENTUMORE	UNTERSUCHTE <i>NF1</i> -PROMOTOR-REGION	ANALYSIERTE CYTOSINE	METHYLIERTE CYTOSINE (%)	METHODE
Horan et al. [127]	9 kutane Neurofibrome 1 plexiformes Neurofibrom 1 MPNST	-680 bis +520	70	9	Bisulfitsequenzierung
Luijten et al. [128]	7 kutane Neurofibrome 4 plexiformes Neurofibrom 9 nicht näher charakterisierte Neurofibrome 3 MPNST	Sp1 Bindungsstelle (-141 bis -136) CRE (-16 bis -9)	2 1	0 0	Bisulfitsequenzierung MSP
Harder et al. [140]	7 kutane Neurofibrome 7 plexiformes Neurofibrom 2 nicht näher charakterisierte Neurofibrome 5 MPNST	-256 bis +622	324	1,35	Bisulfitsequenzierung
Fishbein et al. [129]	10 plexiforme Neurofibrome 8 Schwanzzelllinien, die aus plexiformen Neurofibromen stammen 2 normale Schwanzzelllinien	-286 bis +165	34	0-38 % der Klone zeigten wenigstens 1 methyliertes Cytosin*	Bisulfitsequenzierung

*47 % der mCpGs waren innerhalb der AP2-Bindungsstelle (bp-208) und die SP1-Bindungsstelle (-141 bis -136) besaß einen höheren Methylierungsgrad (6%) als alle anderen analysierten Klone

Zwar wurde in der vorliegenden Studie weder in benignen noch in malignen Nervenscheidentumoren eine regionale Methylierung des *NF1*-Promotors beobachtet. In diesem Zusammenhang warf sich jedoch die Frage auf, ob malignitätsabhängige Unterschiede in der DNA-Methylierung existieren. Dazu wurden die Methylierungsgrade des *NF1*-Promotors in den jeweiligen Typen der Nervenscheidentumore miteinander verglichen.

5.2. Kein malignitätsabhängiger Unterschied im Methylierungsgrad des *NF1*-Promotors in *NF1*-assoziierten Nervenscheidentumoren

Die Untersuchung der im *NF1*-Promotor gelegenen CpG-Insel erbrachte einen medianen Prozentsatz der 5-Methylcytosine von je 1,35 % für dermale und plexiforme Neurofibrome und von 0,82 % für MPNST. Die Gegenüberstellung der *NF1*-assoziierten Tumore mit gutartigem Wachstumsverhalten (dermale plus plexiforme Neurofibrome) mit den MPNST von an *NF1* erkrankten Patienten führte zu keinem statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,409$; Abb. 4.6.B). Ferner zeigte der Vergleich aller methylierter Positionen in dermalen und plexiformen Neurofibromen, die jeweils von einem Patienten stammten und somit den gleichen genetischen Hintergrund besaßen, ebenfalls keinen signifikanten Methylierungsunterschied im *NF1*-Promotor ($p = 0,236$; Abb. 4.6.A).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass beim Vergleich der Nervenscheidentumore kein statistisch signifikanter malignitätsassoziierter Unterschied im Methylierungsgrad des *NF1*-Promotors beobachtet wurde. Der Methylierungsstatus des *NF1*-Promotors ist somit nicht mit einem Subtyp der Nervenscheidentumore verbunden und differenziert nicht zwischen benignen oder malignen Tumoren. Dies ist insofern von Bedeutung, dass *NF1*-Patienten ein 10%iges Risiko besitzen, im Laufe ihres Lebens einen MPNST zu entwickeln, und dass diese bedeutende Komplikation schließlich zur kürzeren Lebenserwartung im Vergleich zur Gesamtbevölkerung beiträgt [58, 59]. Zusatzinformationen zur Prognose und Diagnose der Neurofibromatose wären daher zur optimalen Betreuung und Behandlung der Patienten wünschenswert.

5.3. Geringgradige *NF1*-Promotormethylierung in *NF1*-assoziierten Nervenscheidentumoren

Die in der vorliegenden Studie nachgewiesene geringgradige Methylierung der *NF1*-CpG-Insel in Nervenscheidentumoren könnte einer globalen genomischen Hypomethylierung entsprechen.

Die DNA-Hypomethylierung war die erste epigenetische Modifikation, die in Tumorzellen identifiziert wurde. Im Jahre 1982 wurde neben der spezifischen Hypomethylierung einer Reihe von CpG-Inseln [141] auch eine Reduktion des globalen 5'-Methylcytosinhalts [39] in Krebszellen im Vergleich zum Normalgewebe beschrieben. Die Rolle der DNA-Hypomethylierung in der Tumorigenese ist komplex. Sie scheint in mehrere wichtige pathologische Mechanismen involviert zu sein. Zu den in diesem Zusammenhang am besten charakterisierten Zellphänomenen zählen die Genaktivierung [142-144], die Expression von repetitiven Elementen [30] und die chromosomale Instabilität.

Eine besondere Bedeutung wird dabei der chromosomalen Instabilität zugeschrieben. Ein potenziell destabilisierender Effekt der Hypomethylierung von genomischer DNA wurde beispielsweise beim humanen ICF-Syndrom (Immundefizienz – Zentromerinstabilität – faziale Anomalien) beobachtet. Diese seltene Erkrankung wird durch Mutationen in der katalytischen Domäne des DNMT3b-Gens verursacht, die zum Funktionsverlust der DNA-Methyltransferase führen [7, 145, 146]. Unterstützt wurde diese Annahme außerdem durch tierexperimentelle Untersuchungen [147]. Zur Analyse der Wirkung der DNA-Hypomethylierung wurden Mäuse mit Mutationen sowohl im *NF1*-Gen (*NF1*^{+/-}) als auch im p53-Gen (*p53*^{+/-}) untersucht, die zur Entwicklung von Weichteilsarkomen neigten. Nachdem die Autoren ein hypomorphes *DNMT-1*-Allel in die *NF1*^{+/-}/*p53*^{+/-}-Mäuse einführten, wurde die Tumorbildung durch eine steigende Rate an LOH („loss of heterozygosity“) zusätzlich begünstigt [147].

Parallel zu diesen Befunden wäre ein Zusammenhang zwischen der von uns beobachteten geringgradigen Methylierung der den Promotor und Exon 1 des *NF1*-Gens umfassenden CpG-Insel und dem häufig im gesamten *NF1*-Gen beschriebenen LOH [148-151] denkbar.

Ungeklärt ist derzeit auch die Frage, ob die generelle genomische Hypomethylierung in Tumorzellen eine erhöhte Aktivität eines DNA-demethylierenden Systems [152] wider-

spiegelt oder ob sie auf eine ineffektive Aktivität der Erhaltungsmethylase wie DNMT1 [153] hinweist.

Zur Entstehung einer Demethylierung werden aktuell aktive und passive Mechanismen diskutiert. Die Hinweise für eine aktive Demethylierung [154, 155] sind jedoch selten und der Nachweis aktiver Demethylasen erbrachte keine reproduzierbaren Ergebnisse [152]. Dahingegen wurden passive Mechanismen beschrieben, bei denen die DNMT sterisch von einer bestimmten Region entfernt werden können [156]. Außerdem wurde ein reziprokes Verhältnis zwischen der Promotormethylierung von Genen und der transkriptionellen Aktivität beschrieben [157], so dass ein konkurrierender Mechanismus für *de novo* Methyltransferasen und die Transkriptionsmaschinerie vermutet werden kann. Die von uns beobachtete geringgradige *NF1*-Promotormethylierung könnte aber auch durch die aktive Transkription des Gens bedingt sein, die nach der Knudson-Hypothese aufgrund von Mutationen oder posttranskriptionellen Veränderungen mit nicht funktionellem Neurofibromin bzw. stark reduzierter Neurofibrominexpression verbunden ist.

Die Koexistenz einer globalen genomischen Hypomethylierung und einer regionalen Hypermethylierung wurde in der DNA einer Reihe von neoplastischem Gewebe beschrieben [158-160]. Kürzlich zeigten Studien von Ehrlich et al. [161] und Pini et al. [162], dass diese beiden tumorassoziierten Mechanismen unabhängig voneinander auftreten können. Diese Ergebnisse lassen daher vermuten, dass beide epigenetischen Phänomene separat zur Tumorigenese beitragen, und schließen die Möglichkeit nicht aus, dass in der *NF1*-Tumorigenese die DNA-Hypermethylierung bei anderen Regulatorproteinen, die eventuell Ras nachgeschaltet sind, eine Rolle spielt.

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit [163] über Neurofibrome und MPNST wurde beispielsweise eine veränderte CpG-Insel-Methylierung von mehreren tumorassoziierten Genen demonstriert, die auf eine bedeutende Rolle dieser Gene in der Tumorigenese der Nervenscheidentumore schließen lassen.

5.4. Positionsspezifische *NF1*-Promotormethylierung in *NF1*-assoziierten Nervenscheidentumoren

CpG-Inseln umfassen häufig mehr als eine Kilobase und ihr Methylierungsstatus wird irrtümlicherweise manchmal als homogen, also entweder komplett methyliert oder unmethyliert, angenommen. In Wirklichkeit variiert der Methylierungsstatus zwischen den

Regionen der CpG-Insel und den einzelnen Cytosinen. Mehrere Studien lassen zudem die Methylierung sehr spezifischer Promotorregionen, die den Transkriptionsstartpunkt bzw. den minimalen Promotor einschließen, wichtiger in der Bestimmung der Genexpressionshöhe erscheinen als die Methylierung eines gesamten Gens oder großer Promotor-CpG-Inseln [164-168].

Zur Charakterisierung der funktionellen Elemente des proximalen *NF1*-Promotors nutzten Zou et al. [119] Luciferasereporterkonstrukte, um eine minimale proximale Promotorregion des *NF1*-Gens (-270 bis +230) zu definieren. Mit Hilfe von Deletionskonstrukten und EMSA-Studien konnte gezeigt werden, dass die putative SP1-Bindungsstelle bei -138 bp und das CRE bei bp -8 eine entscheidende Rolle in der Regulation der Transkription spielen. Methylierung kann eine Bindung von Transkriptionsfaktoren an diese Bindungsstellen *in vitro* verhindern [119, 120], die letztlich in der Reduktion der Genexpression resultiert [119].

Diese Daten lassen vermuten, dass epigenetische Effekte auf spezifische Subregionen innerhalb des *NF1*-Promotors fokussiert sind, mit besonderer Bedeutung der Transkriptionsfaktorenbindungsstellen in der *NF1*-regulatorischen Region, und dass die veränderte Methylierung an diesen Stellen *in vivo* eine komplementäre Rolle in der epigenetischen Inaktivierung des *NF1*-Gens in *NF1*-assoziierten Tumoren spielt.

In unserer Arbeit galt daher nach der Bestimmung des Methylierungsgrades des gesamten *NF1*-Promotors unsere besondere Aufmerksamkeit der Analyse des Methylierungsmusters.

Vor dem Hintergrund einer geringgradigen Methylierung zeigten individuelle Positionen in 10 von 21 Nervenscheidentumoren deutliche Methylierungsspitzen (Abb. 4.1. – 4.4.). Eine solche „site-specific-methylation“ stimmt mit vorausgegangen Studien [127, 129] von 29 *NF1*-assoziierten Tumorproben überein, die im *NF1*-Promotor ebenfalls keine Hypermethylierung detektieren konnten, jedoch eine tumorspezifische Methylierung von Cytosinen beschreiben. Interessanterweise liegen in unserer Studie fünf der insgesamt 23 „site-specific“ methylierten Positionen in vermutlichen Transkriptionsbindungsstellen für SRE, CRE (-10) und AP-2 (+77, +343, +466, +472) [86, 120]. Dabei befinden sich die Bindungsstellen für SRE und CRE (-16) an Position -10 und für AP-2 an Position +77 innerhalb des postulierten minimalen Promotors des *NF1*-Gens.

In zwei Nervenscheidentumoren fanden wir eine *in vivo* Methylierung des -16 CRE-Motivs an Position -10. Gene mit einer cis-agierenden palindromischen „cAMP response element“ (CRE) Konsensussequenz (TGACGTCA) in der Promotorregion werden von dem nukleären Faktor CRE-bindendes Protein (CREB) aktiviert. Dabei führt ein Anstieg des intrazellulären Botenstoffs cAMP zur Phosphorylierung von CREB mit nachfolgender Stimulation der Transkription [169, 170]. Mutationen an der vermuteten CRE-Erkennungssequenz unmittelbar in 5'-Richtung zum Transkriptionsstartpunkt des *NF1*-Promotors haben dramatische Effekte mit 70-90%iger Abnahme der Reporteraktivität [119]. Diese Transkriptionsfaktorbindungsstelle scheint daher für die Expressionsregulation des *NF1*-Gens von Bedeutung zu sein. Eine Methylierungssensitivität der *NF1*-Bindungsstellen für CRE(-16)-bindende Proteine wurde bereits *in vitro* gezeigt [120].

Unsere Daten demonstrieren zum ersten Mal die *in vivo* Methylierung des -16 CRE-Motivs an Position -10 in einem plexiformen Neurofibrom (Probennummer 29b; Abb. 4.1.) und einem MPNST (Probennummer 21d; Abb. 4.3.). Da nachgewiesen werden konnte, dass hohe Dosen des cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP) auch in der Schwanzzelllinie (MT4H1) die *NF1*-Genexpression induzieren [171], lassen unsere Ergebnisse vermuten, dass die Methylierung dieses spezifischen Motivs durch Modulation der *NF1*-Genexpression eine Rolle in der Entstehung der Nervenscheidentumore spielt. Dieses Ergebnis steht in Kontrast zu einer anderen Studie [128], die das CRE-Motiv an Position -10 mit einer methylierungsspezifischen PCR in 20 Nervenscheidentumoren analysierte und keine Methylierung an dieser Position nachweisen konnte. Diese Diskrepanz lässt sich dadurch erklären, dass der o. g. Mechanismus eventuell nur in einer Subgruppe der Neurofibrome und der MPNST relevant ist. Möglicherweise wurde dieser Befund auch übersehen, da für die Bestimmung der Cytosinmethylierung nicht die genomische Bisulfitsequenzierung von Plasmiden als sensitivste Methode für die Bestimmung einzelner methylierter Cytosine angewandt wurde.

Außerdem wurde in unserer Studie eine *in vivo* Methylierung der AP-2-Motive an Position +77 (Probennummer 21d; Abb. 4.3.), +343 (Probennummer 29b; Abb. 4.2.), +466 (Probennummer 22c; Abb. 4.4.) und +472 (Probennummer 29b; Abb. 4.2.) in mehreren Nervenscheidentumoren beobachtet. In Leukozyten war die Region von Position +336 bis +370/71, die eine putative AP-2-Bindungsstelle enthält [86], in vier von 20 Kontrollprobanden (Probennummer 3, 6, 9, 20; Abb. 4.8. und 4.10.) und zu einem geringeren Grad in einem *NF1*-Patienten methyliert (Probennummer 21a; Abb. 4.4.). Diese Region war signifikant stärker in Leukozyten methyliert, verglichen mit Tumorproben ($p = 0,019$;

Abb. 4.11.A). Ebenfalls war diese Region signifikant häufiger in Leukozyten weiblicher Probanden als in denen von männlichen Probanden methyliert ($p = 0,09$; Abb. 4.11.B). Ein Teil dieser AP-2-Erkennungssequenzen liegen in der vermuteten Repressorregion (+144 bis +474 [172] bzw. +354 bis + 539 [119]) zwischen Transkriptions- und Translationspunkt des *NF1*-Promotors. Die AP-2-Bindungsstellen stellen dabei mögliche Kandidaten als Repressorsequenzen in dieser Region dar, ähnlich wie bei anderen Genen. So zeigten vorausgehende Transfektions- und *in vitro* Transkriptionsexperimente, dass AP-2 die Transkription des humanen und murinen Acetylcholinesterase-Gens (ACHE) unterdrückt [173]. Weiterhin könnte die AP-2-vermittelte Repression ein für die Regulation der „hepatocyte growth factor“ (HGF) Expression verantwortlicher molekularer Mechanismus sein [174].

Derzeit ist zwar unklar, ob die AP-2 Transkriptionsfaktorfamilie auch eine Rolle in der Regulierung der *NF1*-Genexpression spielt. Hingegen konnte jedoch nachgewiesen werden, dass bedingt durch Methylierung der Bindungsstelle die Affinität des Transkriptionsfaktors AP-2 zu seiner DNA-Erkennungssequenz *in vitro* reduziert ist [175]. Dies lässt annehmen, dass epigenetische Veränderung der o. g. AP-2-Bindungsstellen in ein komplexes Muster der Expressionsregulation einbezogen sind.

So könnte die Methylierung der AP-2-Erkennungssequenz zur verminderten Bindung des Transkriptionsfaktors mit nachfolgend fehlender Repression des *NF1*-Gens führen. Dies würde in einer erhöhten Expression des *NF1*-Gens in den Leukozyten gesunder Kontrollprobanden im Vergleich zu den Nervenscheidentumoren resultieren.

Um den Effekt der Methylierung der AP-2-Erkennungssequenz auf die transkriptionelle Aktivität zu untersuchen, wäre eine Analyse der Neurofibrominhöhe in den betroffenen Leukozyten im Vergleich zu den nicht betroffenen Leukozyten nötig.

Die potenzielle Rolle der Methylierung der AP-2-Erkennungssequenz als Trigger einer Enhancerfunktion der *NF1*-Promotoraktivität ist in sofern von Bedeutung, als dass eine Funktion des Transkriptionsfaktors AP-2 als negativer Regulator der Schwanzzellentwicklung gezeigt werden konnte [176]. Die maximale AP-2 α und γ mRNA-Expression tritt am Embryonaltag (E) 12/13 der Maus und E 14/15 der Ratte auf, welche mit der Präsenz der Schwanzzellvorläuferzellen in den Nerven korreliert. In beiden Nagerspezies fiel sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die Herunterregulierung von AP-2 α mRNA und Protein zeitlich mit einem der wichtigsten Schritte der Schwanzzellentwicklung zusammen, der Precursor-Schwanzzell-Transition. Ferner war die Schwanzzellentwicklung verzögert, wenn diese Herunterregulierung durch eine erzwungene Expression von AP-

2 α in Vorläuferzellen aufgehalten wurde. AP-2 scheint daher in die Kontrolle des zeitlichen Ablaufs der Schwanzzellentwicklung involviert zu sein.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es derzeit unklar ist, ob AP-2 eine Rolle in der Regulierung der *NF1*-Genexpression spielt. In unserer Studie beobachteten wir zum ersten Mal eine Methylierung der AP-2-Bindungsstellen im *NF1*-Promotor, vorrangig in Leukozyten von gesunden weiblichen Probanden, was auf eine mögliche regulatorische Funktion in der *NF1*-Expression hinweisen könnte.

Ähnliche Ergebnisse wurden von Fishbein et al. veröffentlicht [129], die in plexiformen Neurofibromen eine veränderte Methylierung von potenziellen Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren AP-2 und SP1 im minimalen *NF1*-Promotor detektierten.

Epigenetische Modifikationen scheinen somit eine Bedeutung in Subregionen des *NF1*-Promotors zu haben, die direkt mit der Regulation der Genexpression in Zusammenhang gebracht werden können.

Die Störung der Proteinbindung an eine methylierte Zielsequenz [177] wird derzeit als ein Modell für die durch DNA-Methylierung verursachte Transkriptionsrepression herangezogen. Parallel zu diesem Mechanismus wird vermutet, dass die methylierten Cytosine durch die Rekrutierung eines „transcriptional silencing complex“ mit „methyl-binding proteins“ und Histondeacetylasen einen Heterochromatin-Abschnitt, also eine transkriptionell nicht aktive Region, kreieren können [177].

Letztendlich ungeklärt bleibt jedoch die Frage, ob die DNA-Methylierung der initiale Schritt oder die Konsequenz der Geninaktivierung ist [178]. Beispielsweise zeigte sich, dass die Aktivierung von *MHL1* durch 5-Azacytidine rasch spontan umkehrbar ist [179]. Die Methylierungsveränderungen könnten somit sekundär nach anderen epigenetischen Modulationen wie Chromatinmodifikationen eintreten und dann aber bei der Erhaltung des inaktiven Zustandes assistieren. Wie von Bestor und Baylin [180] bereits diskutiert, bleibt daher die Bedeutung und die präzise Rolle der Dysregulierung der DNA-Methylierung in der Entwicklung und Erhaltung eines malignen Phänotypes unklar.

5.5. Tumorzellspezifisches Methylierungsmuster des *NF1*-Promotors

Das in unserer Studie gefundene, variable Methylierungsmuster des *NF1*-Promotors mit zufälliger Verteilung der 5-Methylcytosine wurde in ähnlicher Weise auch von anderen

Arbeitsgruppen in Nervenscheidentumoren gefunden [127, 129]. Diese tumorzellspezifische epigenetische Information könnte dabei zwei verschiedene Faktoren reflektieren, die wesentliche Charakteristika der Nervenscheidentumore darstellen.

So könnte die klonale Variabilität des DNA-Methylierungsmusters die Gewebsheterogenität der NF1-assoziierten Nervenscheidentumore widerspiegeln. Bekannterweise enthalten Neurofibrome neben der extrazellulären Matrix jeden Zelltyp, der auch in normalen peripheren Nerven präsent ist (Schwannzellen, Fibroblasten und Perineuralzellen), sind zusätzlich mit Mastzellen infiltriert und enthalten Axone sowie Gefäße [181]. Die zelluläre Vielfalt und die Interaktion der verschiedenen Komponenten bestimmt schließlich das stark variable Erscheinungsbild der Tumore, wobei den Schwannzellen in der Tumorentstehung die Schlüsselrolle eingeräumt wird [182].

Um einen möglichen Verdünnungseffekt zu eliminieren, untersuchten Fishbein et al. [129] den *NF1*-Promotormethylierungsstatus in Schwannzelllinien, die aus Neurofibromen isoliert wurden. Der Methylierungsgrad von 5 der insgesamt 8 aus NF1-assoziierten plexiformen Neurofibromen stammenden Schwannzelllinien ähnelte dem Methylierungsstatus des *NF1*-Promotors in normalen Schwannzelllinien; nur in den verbleibenden 3 Tumorkulturen zeigte sich ein höherer Methylierungsgrad. Vier der Schwannzellkulturen waren dabei zu jeweils 4 der Primärtumoren zuordenbar. Diese zeigten jedoch ein zu dem Primärtumor differentes Methylierungsmuster in Anzahl und Verteilung der methylierten CpG-Inseln. Die Ergebnisse weisen somit auf die Problematik hin, dass der Methylierungsstatus durch Kulturbedingungen beeinflusst werden kann und Schlüsse über die DNA-Methylierung von Zellkulturexperimenten schwierig sind. Die Kultivierung der unterschiedlichen zellulären Komponenten eines Nervenscheidentumors zur Identifizierung eines zelltypspezifischen Methylierungsmusters scheint daher keine validen Ergebnisse zu bringen.

Außerdem ist theoretisch eine Kontamination der gewonnenen Proben mit umliegendem Gewebe möglich. In unserer Studie wurden alle Randzonen der eingesetzten Tumorproben vor der DNA-Extraktion histologisch begutachtet und nicht-tumoröses Gewebe eliminiert, so dass eine solche Kontamination ausgeschlossen werden konnte.

Andererseits könnte die sowohl in unserer Arbeit als auch in den Schwannzellkulturen inter- und intratumoröse Variabilität des *NF1*-Promotormethylierungsstatus als Zeichen für die „multi-stage“- und „multi-hit“-Progression in der NF1-Tumorigenese gedeutet werden, wie sie für andere Tumorentitäten angenommen wird [183]. So würden sich

aus einer Progenitorzelllinie durch diverse Mutationen und „Epimutationen“ von für die Onkogenese entscheidenden Genen spezifische Tumorsubklone entwickeln, die eine Erklärung für die phänotypische Varianz der Nervenscheidentumore wären. Diese Variabilität der *NF1*-Promotormethylierungsmuster könnte somit als Tumorzellspezifität gedeutet werden.

Es ergibt sich jedoch auch die Möglichkeit, dass die allelspezifische Methylierung innerhalb der individuellen Tumorzelle zu diesem Methylierungsmosaik beiträgt. Da Methylierungsveränderungen nach Knudsons „two-hit“-Theorie nicht auf dem von der Keimbahnmutation betroffenen Allel erwartet werden würden, könnten theoretisch nicht mehr als 50 % der Klone eine Methylgruppe an einem bestimmten Cytosin tragen.

Unser experimentelles Design erlaubt uns keine Unterscheidung der Methylierung zwischen dem *NF1*-Wildtyp-Promotor (erwarteter „second hit“) und dem Promotor des mutierten Keimbahn-*NF1*-Allels („first hit“), welcher möglicherweise nicht durch Allelverlust komplett deletiert ist. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die zufällige Selektion von 10 Klonen die potenziell nicht-methylierten Sequenzen von dem erhaltenen Promotor der mutierten Keimbahn-*NF1*-Genkopie einschließen. Deshalb ist das Ausmaß der DNA-Methylierung eventuell unterschätzt. Dieses Problem könnte nur durch eine Zuordnung der Promotorsequenzen zu den *NF1*-Genkopien gelöst werden. Aufgrund der Größe des *NF1*-Gens und der großen Anzahl an untersuchten Proben in unserer Studie würden solche Analysen den Rahmen dieser Studie sprengen.

Sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in den o. g. Studien [127-129] wurde der DNA-Methylierungsstatus durch die genomische Bisulfitsequenzierung von klonierten PCR-Produkten [43] detektiert. Diese Methode bietet detaillierte Informationen über das Muster der 5-Methylcytosinverteilung eines individuellen DNA-Strangs und lässt somit auf den Methylierungsstatus einer Einzelzelle schließen. Im Gegensatz dazu sind sowohl die auf Restriktionsenzymen basierenden Methoden als auch die MSP-Methoden, die keine quantitative Analyse erlauben und nur kurze DNA-Abschnitte erfassen, für eine ausführliche Bestimmung des Methylierungsmusters nicht denkbar.

5.6. „non-CpG“-Methylierung

Ein hoher Prozentsatz der *NF1*-Promotormethylierung in unserer Studie war der „non-CpG“-Methylierung zuzuschreiben. So traten sowohl in Tumoren als auch in Leukozyten

ein Teil der 5'-Methylcytosine in einem Dinukleotid mit Adenosin, Cytosin oder Thymin auf (Abb. 4.5.A-F).

Die Rolle der „non-CpG“-Methylierung wird derzeit kontrovers diskutiert. Nach dem traditionellen Konzept der DNA-Methylierung wird angenommen, dass in Säugetierzellen vorrangig oder sogar ausschließlich nur solche Cytosine methyliert sind, die über eine Phosphatbrücke mit einem Guanosin verknüpft sind und somit in einem CpG-Dinukleotid vorliegen [184, 185].

Bedingt durch die Benutzung spezialisierter Sequenziermethoden mehrten sich jedoch die Hinweise für die Existenz einer „non-CpG“-Methylierung. Anfänglich wurde von „non-CpG“-Methylierung in Studien über viral oder stabil integrierte Plasmid-DNA-Sequenzen [186, 187] berichtet. Die genomische Sequenzierung eines integrierten Adenovirusvektors in der Zelllinie HE2 demonstrierte beispielsweise auch 5'-Methylcytosine in der CpA- oder CpT-Dinukleotidsequenz [180] und suggeriert daher eine Bedeutung der „non-CpG“-Methylierung bei der *de novo* Methylierungsreaktion gegenüber einem invadierenden viralen Genom. Die Präsenz von „non-CpG“-Methylierung in Säugerzellen wurde schließlich durch die Bisulfitsequenzierung eines LINE-1-Retroelements [187] und einer stabil integrierten Plasmid-DNA [182] bestätigt. Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die „non-CpG“-Methylierung zur Markierung von DNA in Säugerzellen dient.

Abgesehen davon wurde eine hochgradige CCTGG-Methylierung aber auch in einem endogenen Gen, dem *MYF-3*-Gen, detektiert [189]. Ramsahoye et al. [8] berichteten schließlich von einer 15-20%igen „non-CpG“-Methylierung in embryonalen Stammzellen der Maus und schlugen zusammen mit anderen Untersuchern [190, 191] eine Bedeutung der „non-CpG“-Methylierung in frühen Entwicklungsphasen vor.

Aber auch in Neoplasien wurden 5'-Methylcytosine nachgewiesen, die nicht mit einem Guanosin, sondern einer anderen der vier Basen über eine Phosphatbrücke verbunden waren. Malone et al. [192] beschreiben eine signifikante Zahl von methylierten CCWGG-Sequenzen in der *B29*-Promotorregion in einem Lymphom und einer Myelomzelllinie. Kürzlich wurde in einer Studie [193] über nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome eine „non-CpG“-Cytosinmethylierung im Exon 5 des Tumorsuppressorgens *p53* gezeigt und als Quelle für C- zu T-Transitionen diskutiert. Dabei wies die DNA in den Tumorenproben mehr „non-CpG“-Cytosinmethylierung auf als die DNA in nicht-tumorösen Proben. Die DNA, die aus humanen Leukozyten isoliert wurde, war sogar frei von „non-

CpG“-Methylierung. Die Autoren vermuten daher, dass die „non-CpG“-Cytosinmethylierung eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Bronchialkarzinomen spielt. Insbesondere durch die Präsenz von „non-CpG“-Cytosinmethylierung in einer beträchtlichen Zahl von nicht-tumorösen Proben deuten sie es als einen frühen Prozess in der Lungenkarzinogenese und nehmen an, dass die „non-CpG“-Cytosinmethylierung ein nützlicher Marker für die frühe Detektion von Lungenkrebs sein könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine „non-CpG“-Cytosinmethylierung sowohl in Tumorproben als auch in den Leukozyten von Kontrollprobanden im *NF1*-Promotor gefunden. Dabei wurden neben den ^mCpA-Dinukleotiden auch ^mCpT- oder ^mCpC -Dinukleotide nachgewiesen (Abb. 4.5.A-F). Zusammengefasst zeigten sich jedoch weder zwischen Tumorproben und Leukozyten noch zwischen den Typen der Nervenscheidentumore (MPNST versus Neurofibrome, dermale versus plexiforme Neurofibrome) signifikante Unterschiede in der Verteilung der methylierten Cytosine in CpA-, CpT-, CpC- oder CpG-Dinukleotiden. Die einzige Ausnahme war, dass in Neurofibromen mehr methylierte Cytosine in einem CpC-Dinukletid vorlagen als in MPNST ($p = 0,039$).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die „non-CpG“-Cytosinmethylierung im *NF1*-Promotor in Nervenscheidentumoren und Leukozyten von Kontrollprobanden nicht tumorassoziiert ist. Die „non-CpG“-Cytosinmethylierung im *NF1*-Promotor eignet sich daher im Gegensatz zum Exon 5 des Tumorsuppressorgens *p53* in nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen [193] nicht als Marker für die frühe Detektion von Nervenscheidentumoren.

Mit Hilfe der nach Olek modifizierten und verbesserten Methode für die Bisulfitsequenzierung konnte ausgeschlossen werden [194], dass die in unserer Studie nachgewiesene „non-CpG“-Methylierung ein Artefakt darstellt. Diese Methode gewährt durch den Einschluss von DNA-Einzelsträngen in Agarosekugeln eine komplette Bisulfitkonversion. Dabei wurde außerdem auf die strenge Einhaltung der Denaturierungs- und Konversionsbedingungen geachtet. Ferner wurde die effiziente Bisulfitkonversion mittels Kontroll-PCR verifiziert, deren Protokoll den etablierten Protokollen der MSP [45] gleicht.

Der Grad der CpG-Methylierung im *NF1*-Promotor in benignen Nervenscheidentumoren ($p = 0,001$; Abb. 4.12.A) und Leukozyten ($p = 0,047$ für die Leukozyten der weiblichen Kontrollprobanden und $p = 0,017$ für die Leukozyten der männlichen Kontrollprobanden; Abb. 4.12.C und D) war signifikant höher als der der „non-CpG“ Methylierung. Eine

Ausnahme bilden die MPNST ($p = 0,225$; Abb. 4.12.B), für die diese Aussage nicht zutrifft. Diese Beobachtung könnte widerspiegeln, dass im Gewebe ein spezifisches Muster an CpG-Methylierung besteht, das im Prozess der genomischen Hypomethylierung in malignen Tumoren verschwindet. In diesem Zusammenhang erscheint es von Bedeutung, dass Vorrang der DNA-Methyltransferase DNMT3B, aber auch der Variante DNMT3A, eine „non-CpG“-methylierende Aktivität zugeschrieben wird [8, 195].

Aktuell weisen Ergebnisse von verschiedenen Gruppen auf eine Bedeutung der „non-CpG“-Methylierung bei der transkriptionellen Geninaktivierung [192, 196, 197]. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass „non-CpG“-Methylierung die Bindung des murinen *trans*-agierenden Faktors Ctcf an *Tsix* verhindert [197].

Letztlich bleibt die biologische Relevanz der „non-CpG“-Cytosinmethylierung im Genom von Tumoren aber unklar. Dies ist vor allem der Tatsache geschuldet, dass die meisten Arbeitsgruppen sich bei der Suche nach DNA-Methylierung auf die CpG-Dinukleotide fokussierten und daher weder die Prävalenz noch die genomische Verteilung der „non-CpG“-Cytosinmethylierung systematisch untersucht wurden.