

### 6. Zusammenfassung

Multiple periphere Nervenscheidentumore zählen zu den Hauptsymptomen der Neurofibromatose Typ 1 (NF1). Die benignen peripheren Nervenscheidentumore können in dermale und plexiforme Neurofibrome eingeteilt werden. Während dermale Neurofibrome umschrieben sind, können letztere das umliegende Gewebe diffus infiltrieren und besitzen das Potential zur Progression zum malignen peripheren Nervenscheidentumor (MPNST).

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war die Methylierungsanalyse des NF1-Promotors in NF1-assoziierten Tumoren. Dazu wurde das Methylierungsmuster des *NF1*-Promotors in 9 dermalen Neurofibromen, 7 plexiformen Neurofibromen und 5 MPNST von NF1-Patienten mittels genomischer Bisulfitsequenzierung untersucht. Zum Vergleich wurden Leukozyten von 20 Kontrollprobanden herangezogen. Die analysierte Region repräsentiert den Hauptteil der *NF1*-CpG-Insel und umfasst den Promotor, 5'UTR, Exon1 und einen Teil vom Intron 1. Die gesamte Basensequenz von Position -286 bis +650 wurde auf Methylierung der Cytosinreste überprüft.

In den 21 analysierten NF1-assoziierten Tumoren wurde keine globale Hypermethylierung im *NF1*-Promotor detektiert. Die methylierungsvermittelte Inaktivierung des *NF1*-Gens scheint somit kein häufiger Mechanismus in der NF1-Tumorigenese zu sein. Stattdessen könnte die geringgradige (Median 1,35 %) und zufällig verteilte Methylierung der Cytosinreste in der untersuchten Region eine globale Hypomethylierung widerspiegeln, wie sie häufig in Neoplasien beobachtet wird.

Vor dem Hintergrund der geringgradigen Methylierung zeigten individuelle Positionen in 10 von 21 Nervenscheidentumoren deutliche Methylierungsspitzen. Fünf der insgesamt 24 „site-specific“ methylierten Positionen liegen in vermutlichen Transkriptionsbindungsstellen für das „cAMP response element (CRE)“ (-10) und AP-2 (+77, +343, +466, +472). Die Methylierungssensitivität der *NF1*-Sequenz für CRE (-16) bindende Proteine wurde bereits *in vitro* gezeigt. Unsere Daten demonstrieren zum ersten Mal die *in vivo* Methylierung des -16 CRE Motivs an Position -10 in einem plexiformen Neurofibrom und einem MPNST. Da hohe Dosen von cAMP die *NF1*-Genexpression induzieren, scheint die Methylierung dieser Bindungsstelle eine regulatorische Rolle in der NF1-Tumorigenese zu spielen.

Außerdem lag die Region von Position +336 bis +370/71, die eine mutmaßliche AP-2 Bindungsstelle enthält, in den Leukozyten von 4 der 20 Kontrollprobanden bzw. von

einem NF1-Patienten methyliert vor. AP-2 Bindungsstellen sind methylierungssensitiv und stellen mögliche Kandidaten als Repressorsequenzen dar. Andererseits konnte für ein Reportergenkonstrukt von Position +144 bis +474, das diese AP-2 Sequenz enthält, eine unabhängige Promotoraktivität mit Repression eines *NF1*-Aktivators demonstriert werden. Die Methylierung dieses spezifischen AP-2 Motivs könnte daher die *NF1*-Promotoraktivität beeinflussen.

In unserer Studie war ein Teil der *NF1*-Methylierung in Tumoren und Leukozyten der „non-CpG“-Methylierung zuzuschreiben. Obgleich in eukaryontischen Zellen CpG-Dinukleotide als primäres Ziel der DNA-Methylasen bekannt sind, konnte auch die Existenz von „non-CpG“-Methylierung nachgewiesen werden. Unsere Ergebnisse lassen daher vermuten, dass die Rolle der „non-CpG“-Methylierung zur Zeit unterschätzt ist. Die CpG-Methylierung war signifikant höher als die „non-CpG“-Methylierung in Neurofibromen und Leukozyten, nicht jedoch in MPNST. Diese Beobachtung könnte widerspiegeln, dass im Gewebe ein spezifisches Muster an CpG-Methylierung besteht, das im Prozess der genomischen Hypomethylierung in malignen Tumoren verschwindet.