

Krebsepigenetik

Dirk Prawitt und Bernhard Zabel

Molekulargenetisches Labor
der Universitäts-Kinderklinik Mainz

Zusammenfassung

Epigenetische Modifikationen stellen eine regulatorische Ebene der Erbinformation dar. Sie ermöglichen in teilweise komplexen Interaktionen, wie z.B. bei dem genomic imprinting, eine zellspezifische Nutzung des Genoms. Eine aberrante epigenetische Modifikation stört die regelhafte Nutzbarkeit der DNA und kann daher die tumoröse Entartung einer Zelle initiieren und unterstützen. Dieser Artikel schildert die mechanistischen Grundlagen der Krebsepigenetik auf molekularer Ebene und fasst den aktuellen Wissensstand auf diesem Gebiet, besonders im Hinblick auf medizinische Implikationen, zusammen.

Schlüsselwörter

DNA-Methylierung, Histonmodifikation, Krebs, Gen-Regulationsstörung/Inaktivierung

Summary

Epigenetic modifications represent a regulatory level of genetic information. Based on partly complex interactions – e.g. in genomic imprinting – they result in a cell specific usage of the genome. An aberrant epigenetic modification disturbs the defined usage of sequence information and thereby can initiate and support the tumorigenic degeneration of a cell. This article describes the mechanistic basis of cancer-epigenetics at the molecular level and recapitulates the current knowledge in this field particularly with regard to medical implications.

Keywords

DNA-Methylation, Histonmodification, Cancer, Gene dysregulation/silencing

Spätestens seit der Veröffentlichung der Gesamtsequenz des humanen Genoms wird deutlich, dass man trotz aller Möglichkeiten der Sequenzanalyse, die regelhafte Funktion des Genoms nicht alleine aus der Basenabfolge beurteilen kann. Vielmehr wird immer offensichtlicher, dass es neben der durch die Basen definierten „genetischen Ebene“ des Erbguts eine übergeordnete, die Genexpression regelnde „epigenetische Ebene“ der DNA gibt, die im Wesentlichen aus spezifischen Veränderungen des im Chromatinkontext vorliegenden Genoms besteht. Wie bereits mehrfach in diesem Heft angesprochen (u.a. Horsthemke), regeln epigenetische Mechanismen die lokale Zugänglichkeit von Abschnitten des Chromatins, wobei sie die transkriptionelle Regulation über Modifikation der DNA bzw. der Nukleosomen beeinflussen, ohne die primäre Nukleotidsequenz zu verändern. Damit gewährleistet der epigenetische Zustand einer Zelle die Zell- und Gewebespezifität ihres Transkriptoms im Sinne einer „Feinabstimmung“.

In Säugetieren kennt man zwei Haupttypen der epigenetischen Modifikation:

Histonmodifikationen

Sie bestehen aus Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung der N-terminalen Abschnitte der Kernhistone, wobei sie z.T. miteinander zusammenhängen bzw. sich auch gegenseitig bedingen. Generell haben diese chemischen Veränderungen eine Auswirkung auf die Chromatinstruktur. So werden Acetylierungen

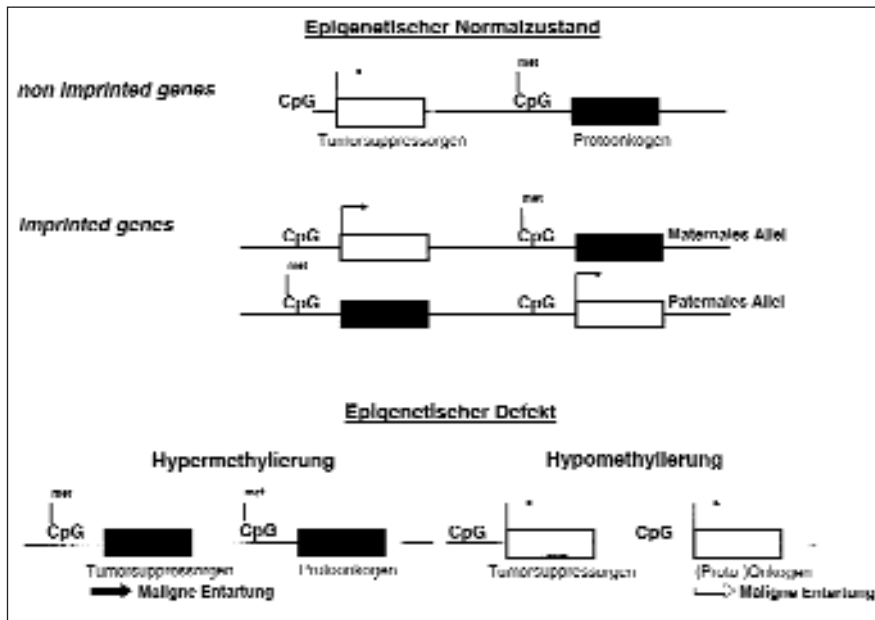


Abb 1 Schematische Effekte aberranter Methylierung

Epigenetische Mechanismen können mögliche Krebsgene aktivieren (Protoonkogene) oder Krebs verhindernde Gene inaktivieren (Tumorsuppressorgene). Der Mechanismus lässt sich dabei fast immer auf eine Hypermethylierung bei einer Gen-Inaktivierung oder eine Hypomethylierung bei einer Gen-Aktivierung zurückführen. Diese Mechanismen können für sich alleine wirken, oder aber in variablen Kombinationen zusammen mit weiteren epigenetischen Faktoren (wie dem hier dargestellten Imprinting) und/oder genetischen Mutationen wirken, um schließlich einen entsprechenden Effekt zu erzielen. Aktive Gene sind durch weiße Kästchen, inaktive durch schwarze Kästchen dargestellt.

durch Histon-Acetyltransferasen (HATs) gesetzt (mit der Folge einer lockeren Chromatinstruktur und transkriptioneller Aktivierung) und durch Histon-Deacetylasen (HDACs) entfernt. Analog dazu werden Histon-Phosphorylierungen durch Histonkinasen gesetzt und durch Histonphosphatasen entfernt. Die Histonmethylierung stellt die stabilste Form der epigenetischen Nucleosomenveränderung dar. Sie wird durch Methyltransferasen (wie z.B. die SET-Domäne Proteine) gesetzt und kann nicht ohne weiteres wieder entfernt werden. Inzwischen wurde aber ein erstes Histon-Demethylase-Enzym LSD1 beschrieben, welches dazu in der Lage ist. Schließlich sind auch noch komplexere Histonmodifikationen wie Ubiquitinylierung und Poly(ADP)-Ribosylierung zu nennen, denen jedoch z.Zt. noch keine signifikante Bedeutung bei der epigenetischen Transkriptionsregulation zugeschrieben wird.

DNA-Methylierung

Die zweite, wahrscheinlich wichtigste epigenetische Markierung – mit Auswirkungen auf die Genomstabilität und Expressionsregulation – ist die DNA-Methylierung. Dabei handelt es sich nahezu ausschließlich um eine Cytosinmethylierung in CpG-Dinucleotiden (vgl. Doerfler). Sie erfolgt mittels *de novo* Methyltransferasen (DNMT3A, DNMT3B), bevorzugt an CpG-reichen DNA-Sequenzabschnitten. CpG-Methylierungen haben zusammen mit den bereits aufgeführten Nucleosomen-Modifikationen einen Effekt auf die Transkription aufgrund ihres Einflusses auf die Chromatin-

struktur. Methylgruppen-bindende-Domäne-Proteine (MDB-Proteine) wie MeCP1 und MeCP2 erkennen und binden Methylgruppen an den Nucleotiden und rekrutieren Korepressorproteine (z.B. Sin3, Mi-2/NuRD). Letztere können ihrerseits Kernhistondeacetylasekomplexe (HDAC1, HDAC2) rekrutieren, die dann in der Lage sind, eine H3-H4 Deacetylierung an acetylierten N-terminalen Lysinen vorzunehmen. Die Histondeacetylierung führt schließlich zur transkriptionellen Inaktivierung. Die DNA-Methylierung trägt auf diese Weise u.a. zur Genomstabilität bei, indem heterochromatische repetitive Satelliten-DNA hypermethyliert und damit kondensiert wird, wodurch auch Retrotransposons (Alu/Line1-Elemente) stillgelegt und damit zerstörerische Geninsertionen minimiert werden können.

Neben diesen indirekten Effekten ergibt sich mit der DNA-Methylierung auch ein direkter Einfluss auf die Transkriptionskontrolle: So kann durch die Bindung von Proteinen (z.B. die des CCCTC-Motiv bindenden Faktors CTCF) an regulatorische DNA-Abschnitte verhindert werden. Ferner beeinflusst DNA-Methylierung auch direkt die Chromatinstruktur, indem sie DNA-Gruben vergrößert und dadurch eine Helix-Entspiralisierung erleichtert.

Epigenetische Aberrationen und Krebs

Krebs ist umgangssprachlich die maligne Entartung einer Zelle, die durch Fehlfunktion bestimmter Gene verschiedene, definierte Eigenschaften

erwirbt (die sog. 'hallmarks of cancer': unendliche Teilungsfähigkeit, Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren, Unterdrückung der Apoptose, Induktion von Angiogenese, Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, invasives Wachstum/Metastasierung) (Hanahan & Weinberg, 2000). In aller Regel handelt es sich bei diesen fehlerhaft wirkenden Genen um deaktivierte Tumorsuppressorgene bzw. aktivierte Protoonkogene. Die klassische Krebsgenetik untersucht dabei das Auftreten von Änderungen der DNA-Sequenz durch Mutationen wie Nucleotidaustauschen, Deletionen oder Sequenzinsertionen, die zu einer Änderung des kodierenden Genbereichs mit folgender Genfunktionsänderung oder einer Änderung der Gentranskriptdosis führen. Wie in den letzten Abschnitten verdeutlicht, steuern die aufgeführten epigenetischen Modifikationen einzeln und in Interaktion miteinander die spezifische Verfügbarkeit der genetischen Information in einer Zelle zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt. Daher ist es einleuchtend, dass diese Modifikationen für eine regelhafte Zellentwicklung sehr exakt positioniert und stabil vorliegen müssen. Eine aberrante epigenetische Modifikation kann prinzipiell zu einer tumorerösen Entartung einer Zelle führen (Abb 1). Dabei können klassische Mutationen durchaus Auslöser epigenetischer Veränderungen sein. Wird durch eine klassische Mutation in einem methylierten CpG das Cytosin umgewandelt, wird diese Methylierung bei der Replikation ebenso in den entstehenden Tochterzellen verloren blei-

ben. Wenn also durch eine aberrante Methylierung aufgrund einer solchen Mutation oder wegen einer fehlerhaften Methylierungsregulation ein Tumorsuppressor stillgelegt, (Hypermethylierung) bzw. ein Protoonkogen aktiviert wird (Hypomethylierung), lässt sich damit schlüssig die Tumorentstehung darstellen. Seit den 80er Jahren (Feinberg & Vogelstein 1983) weiß man, dass Tumoren im Vergleich zu den normalen Gewebezellen unterschiedliche epigenetische Muster aufweisen. Initial fiel dies durch Methylierungsanalysen einzelner CpG-Inseln, bzw. bei Untersuchungen zum absoluten Methylierungsgehalt von Zellen im Vergleich zu Tumorzellen auf. Neuere Untersuchungen zeigen neben den Veränderungen der DNA in Tumoren auch Veränderungen der Histonmodifikationen. So weisen Krebszellen während des tumorösen Entartungsprozesses eine kontinuierliche Abnahme von monoacetyliertem und trimethyliertem Histon H4 auf (assoziiert mit Hypomethylierung repetitiver DNA-Sequenzen) (Fraga 2005). Auch weisen histonmodifizierende Enzyme im Tumor oft eine veränderte Aktivität auf. So sind z.B. Missensemutationen in der p300-Histonacetyltransferase in Verbindung mit dem Verlust des zweiten p300-Allels durch Verlust der Heterozygotie (LOH) assoziiert mit Brustkrebs und Glioblastomen. Histone können durch Veränderung solcher „Master“-Enzyme global in variierendem Maße modifiziert werden, was komplexe Expressionsveränderungen bewirken und dementsprechend auch eine maligne Entartung zur Folge haben kann. Bei den oben geschilderten Aufgaben der epigenetischen Modifikationsmaschinerie erscheint es naheliegend, dass eine Veränderung in dem komplizierten Zusammenspiel durch Mutation eines Faktors eine komplexe epigenetische Fehlregulation von Genen nach sich zieht. Wie in Mausmodellen gezeigt, führt ein Ausfall eines Schlüsselfaktors wie der *de novo* Methyltransferasen zu einem schweren Entwicklungsdefekt bis hin zu einem letalen Phänotyp. Subtilere Defekte in einzelnen DNMTs, die wahrscheinlich zu einer Dosisveränderung des jeweiligen Faktors führen, stören die epigenetische Modifikation in geringerem Maße, können jedoch

einen „Mutatorgenotyp“ darstellen. So beeinflusst z.B. der DNMT3B -283T>C Promotor-Polymorphismus höchstwahrscheinlich die *DNMT3B* Expressionsrate und trägt damit zur genetischen Suszeptibilität für Lungenkrebs bei. Die „C“-Allelvariante generiert dabei wahrscheinlich eine neue funktionelle Sp1-Bindestelle und führt so zu einer erhöhten Transkription von DNMT3B mit möglicher Prädisposition zur Hypermethylierung anderer CpG-Bereiche. Kommt bei dem betreffenden Individuum dann ein externer Stimulus wie z.B. Zigarettenrauchen hinzu, führt dies wahrscheinlich zur Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen und damit zu einem erhöhten Lungenkrebs-Risiko.

An Beispielen wie diesen wird deutlich, dass die DNA-Methylierung die wichtigste epigenetische Modifikation darstellt. Aberrante DNA-Methylierungsmuster werden inzwischen als allgemeines Kennzeichen humaner Tumoren akzeptiert. Deshalb soll im Folgenden auf die beobachteten Methylierungsveränderungen in Tumoren und ihre Effekte näher eingegangen werden.

Hypermethylierung

Das Krebsgenom weist Regionen lokaler Hypermethylierung auf und diese Regionen betreffen vorwiegend CpG-Inseln. Dabei zeigt sich, dass verschiedene Tumortypen unterschiedliche Grade an Hypermethylierung besitzen. So haben Tumoren von Brust, Kopf, Hals, Hoden weniger als 1% Hypermethylierung aller getesteten CpG-Inseln, wohingegen bei akuter myeloischer Leukämie sowie bei Kolon- und Hirntumoren bis zu 10% aller getesteten CpG-Inseln hypermethyliert sind. Die beobachteten Hypermethylierungsmuster in den Tumoren scheinen nicht zufällig verteilt, sondern vielmehr mit bestimmten Chromatinregionen assoziiert zu sein. So finden sich z.B. CpG-Hypermethylierungen bei Medulloblastomen in der *breakpoint cluster*-Region auf Chromosom 17p11.2. Da also auch Hypermethylierung mittelbar zu vermehrten chromosomalen Brüchen führen kann, scheint es einen Zusammenhang zwischen veränderter epigenetischer Modifikation und zytogenetischen Befun-

den zu geben. Dies kann zum Einen mit einer Prädisposition der Region für eine solche Hypermethylierung zusammenhängen, oder aber andererseits mit Tumortyp-spezifischen Selektionsmechanismen. So werden z.B. bei Brustkrebs und Ovarialkrebs *BRCA1*-Promotormethylierungen gehäuft gefunden, demgegenüber bei klarzelligen Nierenkarzinomen und Hämangioblastomen eher *VHL*-Promotormethylierungen. In beiden Fällen werden also Tumortyp-spezifische Tumorsuppressorgene durch Promotorhypermethylierung selektiv beeinflusst (Abb. 2A). Dies kann zu gehäufte Gen-Inaktivierung führen, was zur Tumorentstehung beiträgt. Die durch die Methylierung induzierte Transkriptionssuppression wird dabei wahrscheinlich durch das Verhindern einer Transkriptionsfaktorbindung und/oder durch die Ausbildung von inaktiven Chromatinstrukturen verursacht. Neben der tumorspezifischen Hypermethylierung beobachtet man eine mehr generell in Malignomen auftretende Hypermethylierung in Promotoren der Tumorsuppressoren p16 und DAPK1, bzw. an DNA-Reparatur beteiligten Genen, wie der O6-Methyl-Guanin-DNA-Methyltransferase *MGMT*. Aber auch CpG-Inseln von Zielgenen, die nur mittelbar als Tumorsuppressoren gelten können, findet man hypermethyliert, wie z.B. den *suppressor of cytokine signaling 1* (*SOCS1*), der bei Ausfall zu einem konstitutiv aktiven JAK/STAT-Signalweg führt. So einleuchtend und suggestiv diese Zusammenhänge klingen, so ist es jedoch z.Zt. noch keineswegs bekannt, wie diese gezielt wirkenden Hypermethylierungen zustandekommen. Klar ist, dass die Hypermethylierung in Tumorzellen auch unter Verwendung der normalen zellulären epigenetischen Modifikationsproteine erfolgt. So führen APC-Mutationen zu intestinalen Neoplasien. In einem Mausmodell, wo neben einer funktionellen *Apc* Mutation entweder noch *Dnmt1* inaktivierend mutiert oder durch die Zugabe von 5-Aza-2'-Desoxycytidin inhibiert wurde, nimmt die Tumorfrequenz signifikant ab.

Wie aber kommt es zu den häufig beobachteten und wie zu den spezifi-

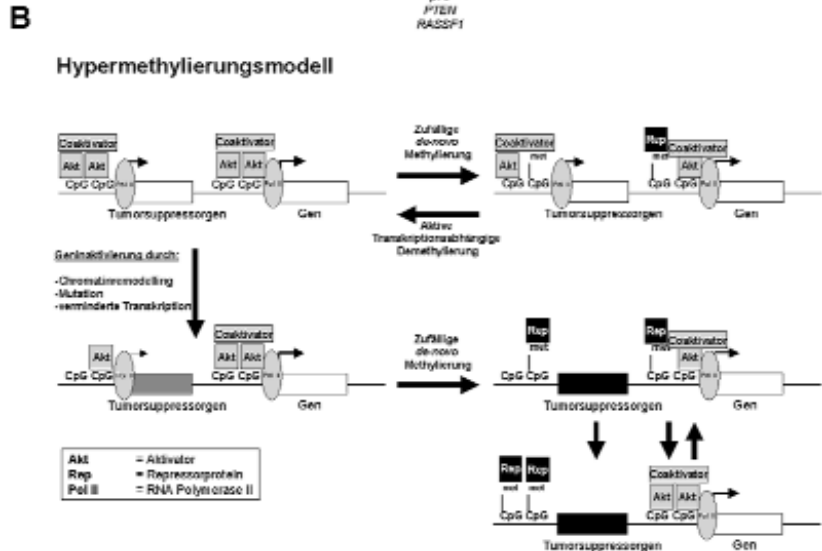
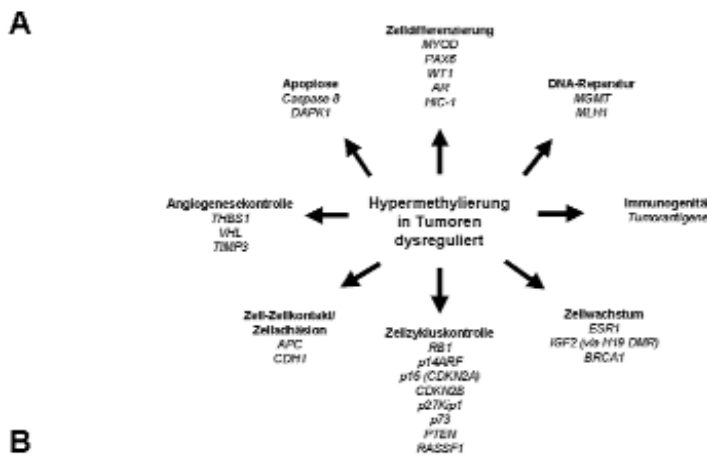


Abb 2 Hypermethylierungen in Tumoren Beobachtete Genhypermethylierungen in Tumoren und ihre Implikationen

Hypermethylierung von Promotorregionen resultieren in aberrantem Abschalten einer ganzen Reihe von Genen, was wiederum verschiedene zelluläre Konsequenzen mit sich bringt. Dies kann zu einer Initiierung/Förderung der malignen Entartung einer Zelle führen. In aller Regel sind die Hypermethylierungen der Promotoren direkt für dieses Abschalten verantwortlich, es gibt jedoch auch Ausnahmen, wie das aufgeführte IGF2, welches indirekt durch eine Hypermethylierung des benachbarten H19 Gens angeschaltet wird.

Hypermethylierungsmodell (nach Clark & Melki, 2002)

Zufällig auftretende *de novo* Methylierung einzelner CpG-Dinukleotide in normalen Zellen wird durch aktive Demethylierung wieder entfernt, besonders in Bereichen die aktiv transkribiert werden (durch Aktivatoren, Coaktivatoren und Polymerase II). Wird ein Gen inaktiviert oder in seiner Expression reduziert (exemplarisch hier ein Tumorsuppressorgen), kann eine sukzessive Hypermethylierung der CpG-Inseln in dem Genpromotorbereich durch Akkumulation der zufälligen CpG-Methylierungen über mehrere Zellpassagen erfolgen. Der inaktive Status des Gens wird so mit Hilfe bindender Chromatin-Repressorproteine aufrechterhalten.

Aktive Gene sind durch weiße Kästchen, reduziert aktive durch graue Kästchen und inaktiviert durch schwarze Kästchen dargestellt.

schen Hypermethylierungsmustern in den Tumoren? Das z.Zt. schlüssigste Modell zur Erklärung dieser Befunde geht von folgenden zwei exemplarischen Beobachtungen aus:

Tumore, die aus Brustepithelzellen hervorgehen, haben häufig das *p16*-Gen inaktiviert. Betrachtet man sich native HMEC-Brustepithelzellen, so zeigen sich nach mehreren Passagen unter selektiven Bedingungen einige Zellen, die keine *p16*-Expression mehr aufweisen und so einen *in vitro* Selektionsvorteil besitzen. In diesen Zellen ist der *p16*-Promotor noch wenig methyliert, erst nach mehreren weiteren Passagen liegt er extensiv hypermethyliert vor.

Anders als der *p16*-Promotor ist der Promotor des Glutathion-S-Transferase-Gens (*GSTP1*) spezifisch in 95% der Prostatakarzinome hypermethyliert, findet sich jedoch kaum hypermethyliert in anderen Tumortypen. Die Hypermethylierung ist assoziiert mit einem Verlust der *GSTP1*-Transkription. In der Regel liegen beide *GSTP1*-Allele in Prostatakarzinomen inaktiv und hypermethyliert vor, ohne durch Deletion oder Mutation stillgelegt worden zu sein. Reduziert man jedoch experimentell durch gezielte

Deletionen von Transkriptionsfaktorbinstellen (z.B. für SP1) die Transkription des Gens, kommt es nicht zu einer Hypermethylierung des *GSTP1*-Promotors. Erst wenn zusätzlich eine schwache *de novo* Methylierung an unspezifischen CpG-Dinukleotiden erfolgt, wird eine sukzessive Hypermethylierung der *GSTP1*-Hypermethylierung initiiert.

Auf diesen Beobachtungen fußt das Hypermethylierungsmodell von Clark & Melki (2002) (Abb. 2B). Es geht zunächst von einer zufällig auftretenden *de novo* Methylierung einzelner CpG-Dinukleotide aus. In normalen Zellen wird diese neu aufgetretene Methylierung durch aktive Demethylierung wieder entfernt, besonders in Bereichen die aktiv transkribiert werden, bzw. die in aktiven Chromatinbereichen liegen. Mit anderen Worten: Aktive Transkription / Chromatinstruktur hält Gene unmethyliert. Wird ein Gen durch Chromatin-remodelling, Mutation oder dem Mangel an für die spezifische Transkription notwendigen Faktoren inaktiviert, so erfolgt eine sukzessive Hypermethylierung der CpG-Inseln in dem Genpromotorbereich durch Akkumulation der zufälligen CpG-Methylierungen. Die Tumortyp-spezifischen Methylierungsmuster

reflektieren nach diesem Modell also die zunächst zufällige Methylierung einzelner CpG-Inseln, die durch Wegfall aktiver Transkription dann über mehrere Zellpassagen akkumulieren und so den inaktiven Status des Gens aufrechterhalten. Dieses Modell erklärt somit die Befunde sowohl von tumortypspezifischer Hypermethylierung, wie auch mehr generell in Malignomen auftretender Hypermethylierungen.

Hypomethylierung

Im Gegensatz zu der lokal anzutreffenden Hypermethylierung in Tumoren kann man in einer Vielzahl solider Tumoren eine globale Hypomethylierung beobachten, vielleicht wegen der erhöhten Zellteilungsaktivität, bei der die Methylierung nicht vollständig an die Tochterzellen weitergegeben werden kann. Diese Hypomethylierung kann zum Einen die Genexpression verändern, indem sie normalerweise durch Promotormethylierung stillgelegte Gene wieder für die Transkriptionsmaschinerie zugänglich macht, oder aber andererseits u.a. durch Auftreten in zentromeren Regionen zur Chromosomeninstabilität (und z.B. zum Non-disjunction) führen. Dass diese Beobachtungen kein nachgeschalteter Effekt einer bereits erfolg-

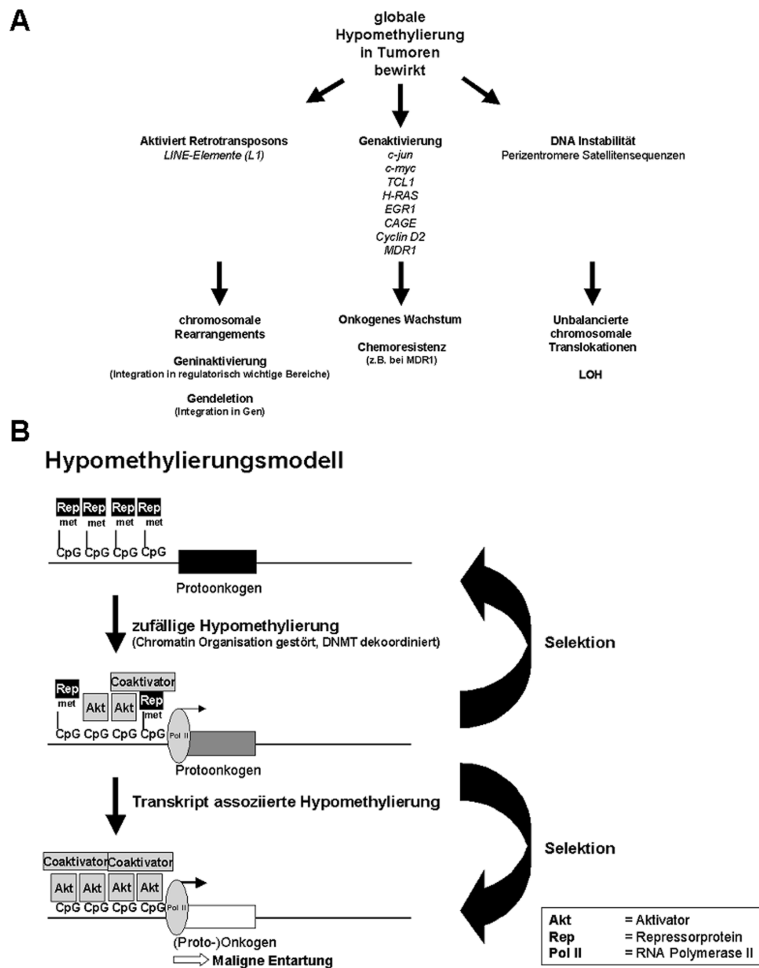


Abb 3 Hypomethylierungen in Tumoren Beobachtete Genhypermethylierungen in Tumoren und ihre Implikationen

Hypomethylierungen sind in Tumoren eher global zu beobachten und führen zur schädlichen Aktivierung retrotransposabler Elemente wie den Line-Elementen und zu erhöhter DNA-Instabilität. Aber auch verschiedene Gene, wie (Proto-) Onkogene, bzw. wachstums- und resistenzfördernde Gene finden sich in Tumoren hypomethyliert mit den jeweils dargestellten Konsequenzen.

Hypomethylierungsmodell (nach Hoffmann & Schulz, 2005)

Zufällig auftretende Hypomethylierung einzelner CpG-Dinukleotide in normalen Zellen resultiert in einer verminderten Transkriptrepression eines durch Methylierung und damit von assoziierten Repressorproteinen stillgelegten Gens (hier ein Protoonkogen). Durch Selektionsmechanismen kann entweder der normale methylierte Zustand wieder hergestellt werden, oder der Promotor wird durch die aktive Transkription (mittels Aktivatoren, Coaktivatoren und Polymerase II) über weitere Zellpassagen weiter demethyliert.

Aktive Gene sind durch weiße Kästchen, reduziert aktive durch graue Kästchen und inaktive durch schwarze Kästchen dargestellt.

Prinzipiell ist das Hypomethylierungsmodell die konsequente Übertragung des in Abb. 2 vorgestellten Hypermethylierungsmodells, indem die aktive Transkription mit einer Hypomethylierung assoziiert wird.

ten Tumorgenese sind, sondern selbst eine tumoröse Eigenschaft vermitteln, zeigen Arbeiten im Maussystem, wo die Inaktivierung von *Dnmt3b* (der zentralen Methyltransferase für die Methylierung nach der DNA-Replikation) in murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) DNA-Hypomethylierung, chromosomale Instabilität (Aneuploidien, Polyploidien, chromosomale Brüche und Fusionen) und spontane Immortalisierung bewirkt (Dodge et al., 2005). Es bleibt jedoch abzuwarten, ob die immortalisierten *Dnmt3b*^{-/-} MEFs anfällig für eine maligne Transformation sind. Da *DNMT3B* in den meisten humanen somatischen Geweben in sehr niedriger Dosis exprimiert wird, liegt der Verdacht nahe, dass eine Reduktion des Proteins unter einem kritischen Grenzwert zu genomweiter Hypomethylierung und chromosomaler Instabilität führt. Unklar ist z.Zt. auch noch, ob eine onkogene Transformation von normalen Zellen zu einer reduzierten *DNMT3B*-Expression und DNA-Hypomethylierung führt. Die bereits erwähnten Zusammenhänge zwischen Expressionserhöhung von *DNMT3B* durch einen Promotor-Polymorphismus und Hypermethylierungsereignissen, bzw. Expressionsreduktion der *de novo* Methyltransferasen DNMT1 und DNMT3B

deuten darauf hin, dass eine Störung der Balance der Methylierung mit einem erhöhten Krebsrisiko assoziiert ist. Obwohl diese globalen Effekte eher auf eine gestörte Interaktion von (fehlender) Methylierung und Histonmodifikationen und den daraus resultierenden strukturellen Chromatinaberrationen hinweisen, lassen sich die Hypomethylierungseffekte auch auf Einzelgenebene beobachten (vgl. Abb. 3A). So werden im Laufe der Tumorentstehung einzelne Gene wie die Protoonkogene *c-jun* (z.B. in murinen Lebertumoren), *c-myc* (z.B. in humanen hepatozellulären Karzinomen), *TCL1* (z.B. in chronisch lymphozytischen Leukämien) durch eine Hypomethylierung in ihrem Promotorbereich reaktiviert und wirken auf diese Weise onkogen. Analog zu dem im letzten Kapitel vorgestellten Hypermethylierungsmodell haben Hoffmann & Schulz (2005) ein Modell vorgestellt, welches die tumorspezifische Genpromotor-Hypomethylierung in Tumoren mechanistisch zu erklären versucht (Abb. 3B). Prinzipiell ist dieses Modell die konsequente Anwendung des Hypermethylierungsmodells, da auch hier aktive Transkription Promotorbereiche hypomethyliert hält. Anders als bei den im Modell von Clark & Melki vorgestellten Tumorsuppressorgenen,

gehen die Autoren hier von einem in der Normalzelle durch CpG-Hypermethylierung stillgelegten Protoonkogen aus. Durch eine gestörte Chromatinorganisation oder falsch koordinierte DNMT-Expression kommt es dann als Präzision zu einer zufälligen Promotor-Hypomethylierung, die eine geringe Transkriptionsaktivität des Protoonkogens bewirkt. Ausgehend von dieser Kombination von zufälliger Hypomethylierung und aktiver Transkription kann es dann zu einer Transkriptions-assoziierten vollständigen Promotorhypomethylierung kommen, die zur onkogenen Aktivierung des Protoonkogens führt. Zelluläre Selektionsmechanismen ermöglichen prinzipiell in dem Stadium der teilweisen Demethylierung die Wiederherstellung des hypermethylierten Normalzustandes, wie auch die maligne Entartung zum komplett hypomethylierten Zustand.

Verändertes „genomic imprinting“ bei Tumoren

Neben den genannten zwei epigenetischen Modifikationen (Histon- bzw. DNA-Modifikation) gibt es auch einen komplexeren epigenetischen Mechanismus mit möglicher Tumorrelevanz, das „genomic imprinting“ (Reik & Walter, 2001). In DNA-Abschnitten,

die einem „genomic imprinting“ unterliegen (bisher wurden ca. 50 Bereiche im Säuger-genom identifiziert) werden Gene – in bestimmten Geweben und zu definierten Zeiten – nur spezifisch von einem elterlichen Allel transkribiert. Ein allelspezifisches Imprinting wird dabei mittels cis-regulatorischer Elemente vermittelt (z.B. ADS, DNS bei IGF2R). Die epigenetische Modifikation von Imprintingbereichen im Genom ist ebenfalls spezifisch für die einzelnen elterlichen Allele und äußert sich in differentiell/allelspezifisch methylierten Regionen (DMRs). Die Methylierung eines DMR-Allels wird während der Gametogenese mittels DNMT3L etabliert, einem Protein mit Homologie zu den *de novo* Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B aber ohne deren enzymatische Aktivität. Neben den bereits geschilderten Effekten einer DNA-Methylierung kann man bei geprägten („imprinted“) Genen auch weitere Einflüsse der Methylierung und/oder epigenetisch bedingten Modifikationen auf das Verhalten der DNA im Zellkern beobachten. Da man bei Imprinting-Bereichen direkt Sequenz-identische und Positions-identische Genombereiche zweier homologer Chromosomen vergleichen kann, zeigen sich Phänomene wie die asynchrone Replikation der beiden Allele.

In den bisherigen Ausführungen wurden die epigenetischen Veränderungen, die sich in Tumoren beobachten, bzw. die sich direkt mit der Tumorduktion/-progression in Verbindung bringen lassen, vor dem Hintergrund einer „normalen“ Genexpression betrachtet. Im Falle von „imprinted genes“, deren eine elterliche Allelversion durch eine epigenetische Modifikation zumindest in einzelnen Geweben und zu spezifischen Zeiten stillgelegt ist, kann ein Verlust dieses Imprintings (LOI) in bestimmten Fällen bei bestimmten Genen ebenfalls in einem Tumor resultieren. So wird häufig ein LOI des für einen Wachstumsfaktor kodierenden Gens *IGF2* eine biallelische *IGF2*-Expression (also einer Aktivierung des normalerweise nicht exprimierten maternalen Allels) zur Folge haben. Dies wird in verschiedenen Tumoren beobachtet, z.B. Hepatoblastom, Wilms-Tumor, Zervixkarzinom,

Rhabdomyosarkom, Leiomyosarkom, Nierenzellkarzinom, Dickdarmkarzinom. Die erhöhte *IGF2*-Transkriptmenge scheint entweder die proliferative Kapazität von präneoplastischen Läsionen zu fördern oder das Tumorstromwachstum selbst zu stimulieren. Dabei ist es keineswegs so, dass der LOI von *IGF2* erst in Tumoren auftritt, sondern auch in normalen Patientengeweben gefunden werden kann. Damit lässt sich auch die Vermutung entkräften, dass es sich bei den epigenetischen Veränderungen in Tumoren nur um sekundäre Ereignisse der Tumorgenese handelt. Dennoch ist es nicht so, dass der *IGF2*-LOI automatisch zu einem Malignom führt, da es auch Personen mit biallelischer *IGF2*-Expression, aber ohne Tumorentstehung gibt (bis zu 10% der Bevölkerung). Der LOI scheint vielmehr eine Tumorprädisposition zu bedingen, die durch Folgeereignisse auf genetischer/epigenetischer Ebene dann zur Tumorgenese führt. Epidemiologische Untersuchungen legen nahe, dass zumindest in Dickdarmkarzinomen LOI von *IGF2* kein über die Umwelteinflüsse erworbenes Phänomen im Tumor ist, sondern vielmehr einen erblichen Risikofaktor für diesen Tumortyp darstellt (Cui et al., 2003).

Einen Ansatzpunkt zur Aufklärung dieses Wirkmechanismus liefert das Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS), ein kongenitales Überwuchersyndrom mit Makroglossie, abdominalen Bauchwanddefekten (Exomphalos), fazialen Auffälligkeiten und evtl. Hypoglykämie sowie einem drastisch erhöhten Risiko für embryonale Tumoren (4-21%). Phänotypisch gibt es eine Varianz in der Ausprägung einzelner Merkmale, die mit Ausnahme des Exomphalos insbesondere bei *CDKN1C*-Mutationen, bisher nicht auf konkrete Genmutationen zurückgeführt werden konnte. Genomisch findet man eine Kopplung von BWS mit der Chromosomenregion 11p15.5, einer Region mit mindestens zwei Gruppen von „imprinted genes“ (IC1 und IC2). Das eine Imprintingcluster (IC2) hat dabei *KCNQ1OT1* und *CDKN1C* als zentrale Gene, und das zweite, distal liegende Cluster (IC1), die bereits erwähnten Gene *H19* und *IGF2*. In den seltensten Fällen lassen sich chromo-

somale Aberrationen bzw. funktionelle Genmutationen (im *CDKN1C*-Gen) beobachten. Die überwiegende Zahl der Patienten weist epigenetische Veränderungen der beiden Imprintingcluster (LOI) auf. So findet man Hypomethylierungen im Promotorbereich des *KCNQ1OT1*-Gens mit resultierendem LOI der Gene *KCNQ1OT1* und *CDKN1C*. Neuere Arbeiten zeigen, dass es eine starke Assoziation von IC1-Regulationsstörungen wie *H19*-LOI und der Tumorentstehung (insb. Wilms-Tumoren) bei BWS-Patienten gibt. Dabei scheint weniger die alleinige Fehlregulation der *H19*-Expression als vielmehr die damit verbundene gestörte Regulation weiterer Gene für die Tumorbildung verantwortlich zu sein. So ist die epigenetische Expressionsregulation von *H19* mit der von *IGF2* gekoppelt und ein LOI von *H19* resultiert in einem funktionellen Verlust von *H19* bei gleichzeitigem LOI von *IGF2* mit folgender biallelischer Expression des Wachstumsfaktors. Bei BWS-Patienten kann die Ursache für den LOI von *IGF2* eine Hypermethylierung der *H19* DMR sein, eine Mikrodeletion in der *H19* DMR (die beide eine regelhafte CTCF-Bindung auf einem Allel verhindern), oder aber eine uniparentale paternale Disomie (patUPD) für große Teile von 11p15 (in dem auch *IGF2* liegt). Auch hier führt eine biallelische *IGF2*-Expression nicht zwangsläufig zur Tumorbildung, was die oben genannte Vorstellung von einer Multi-Ereignis-Ätiologie der Tumorbildung unterstützt. Weitere Schritte könnten dabei die reduzierte Expression von *H19* selbst, die Hochregulation paternal-exprimierter 11p15-Gene oder auch somatische Mutationen in anderen Genen sein. Diese komplexen Zusammenhänge lassen sich detaillierter untersuchen und werden in Zukunft zu einem besseren Verständnis der epigenetisch bedingten Tumorentstehung beitragen (Prawitt et al., 2005).

Medizinische Bedeutung der Tumorepigenetik

Mit der zunehmenden Aufklärung der epigenetischen Mechanismen, die in die Tumorentstehung/-progression involviert sind, lassen sich die gewonnenen Erkenntnisse in absehbarer Zeit in der medizinischen Praxis um-

setzen. Die naheliegendste Anwendung ist die Nutzung der Methylierungsveränderungen als diagnostische Methode, die z.B. eine Aussage über mögliche Chemotherapieresistenz erlaubt (bereits angewandt bei *WIT-1*-Hypermethylierung in AML, Plass et al., 1999). Globale Histonmodifikationsmuster können in ähnlicher Weise dazu verwendet werden, z.B. eine Risikovorhersage für das erneute Auftreten eines Prostatakarzinoms zu erstellen (Seligson et al., 2005). Ebenfalls bereits in klinischen Studien umgesetzt, zeigen globale Hypomethylierungsassays einen Zusammenhang zwischen dem Grad der globalen Hypomethylierung und steigender Malignität des Tumors. In Zukunft wird man durch eine Methylierungsuntersuchung relevanter Genbereiche Tumore frühzeitig erkennen und bereits diagnostizierte Tumore besser einschätzen können. Aber auch die Hypermethylierung einzelner Genpromotoren kann diagnostisch genutzt werden. Da Tumorzellen zerfallen, kann ihr Erbmateriale im Blut zirkulieren und z.B. Tumorzell-DNA aus einfachen Serenproben gewonnen und analysiert werden (Leung et al., 2005). Bei der Betrachtung mehrerer tumorrelevanter Genpromotoren, wie *APC*, *p16*, *GSTP1* oder *TIMP3* lassen sich aus dem Methylierungsgrad der einzelnen Promotoren Rückschlüsse auf den Tumortyp des Patienten treffen. So haben z.B. Magenkarzinome bevorzugt Hypermethylierungen in den Promotoren von *APC*, *E-Cadherin*, *hMLH1* und *TIMP3*. Andere Tumortypen – wie z.B. das Prostatakarzinom – haben andere spezifische Promotor-Hypermethylierungen (*GSTP1*, vgl. oben). Weiterhin ermöglicht dieser Hypermethylierungsmuster-Ansatz auch Aussagen über das Tumorstadium und die Therapieprognose. Magenkarzinome im Stadium III/IV haben z.B. höhere Konzentrationen von Hypermethylierungen in den Promotoren von *APC*, *hMLH1* und *TIMP3* im Serum und die mittlere Überlebenszeit von Magenkarzinompatienten korreliert mit den Befunden der kombinierten Methylierungsgrade von *APC* und *E-Cadherin*.

Ein weiterer Aspekt der epigenetischen Befunde, den man sich immer

wieder vor Augen führen sollte, ist die Tatsache, dass Methylierung – wie auch die anderen epigenetischen Modifikationen – dynamisch ist und nicht wie eine DNA-Sequenz notwendigerweise statisch, d.h. epigenetische Modifikationen können entfernt werden. Dies lässt für die gezielte Tumorthherapie epigenetisch veränderter Zielgene hoffen und wird auch in einem Artikel dieser Ausgabe detailliert vorgestellt (Lyko). Hier sei daher nur kurz angesprochen, dass bereits demethylierende Substanzen wie 5-Aza-2-desoxy Cytidin, der Histon-Deacetylase-Inhibitor Trichostatin A oder Derivate dieser Substanzen klinisch in Therapieansätzen getestet werden, um eine Reaktivierung epigenetisch stillgelegter Tumorsuppressoren zu erreichen. Diese Agenzien haben z.Zt. noch den Nachteil, dass sie wenig gezielt wirksam sind. Eine fokussiertere Therapieanwendung wird jedoch durch eine genauere Aufklärung der Mechanismen epigenetischer Modifikationen und der damit besser abschätzbaren Effekte von Veränderungen dieser Umgestaltungen möglich werden. So ist es wichtig, die *in cis* agierenden Signale für eine korrekte Methylierung zu kennen, damit eine gezielte und geregelte therapeutische Methylierungsänderung entwickelt werden kann. Ein idealer Ausgangspunkt für diese Fragestellungen stellen dabei Patienten mit epigenetischen Erkrankungen wie dem BWS dar, denn anders als bei allgemeinen genetischen Fragestellungen ist der beste „Modellorganismus“ für epigenetische Veränderungen im humanen System der Mensch selbst (Egger et al., 2004).

Gefördert aus Mitteln des DFG SPP 1129 (Projekt PR688/1-2) für D.P und B.Z. Wir danken Dr. C. Spangenberg und L. Brixel für das kritische Lesen des Manuskripts.

Literatur

Clark SJ, Melki J (2002) DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene* 21:5380-7

Cui H, Cruz-Correa M, Giardiello FM, Hutcheon DF, Kafonek DR, Brandenburg S, Wu Y, He X, Powe NR, Feinberg AP (2003) Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science* 299:1753-5

Dodge JE, Okano M, Dick F, Tsujimoto N, Chen T, Wang S, Ueda Y, Dyson N, Li E (2005) Inactivation of *Dnmt3b* in mouse embryonic fibroblasts results in DNA hypomethylation, chromosomal instability, and spontaneous immortalization. *J Biol Chem* 280:17986-91

Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429:457-63

Feinberg AP, Vogelstein B (1983) Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301:89-92

Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Perez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenwein T, Esteller M (2005) Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* 37:391-400

Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*. 100:57-70

Hoffmann MJ, Schulz WA (2005) Causes and consequences of DNA hypomethylation in human cancer. *Biochem Cell Biol* 83:296-321

Leung WK, To KF, Chu ES, Chan MW, Bai AH, Ng EK, Chan FK, Sung JJ (2005) Potential diagnostic and prognostic values of detecting promoter hypermethylation in the serum of patients with gastric cancer. *Br J Cancer* 92:2190-4.

Plass C, Yu F, Yu L, Strout MP, El-Rifai W, Elonen E, Knuutila S, Marcucci G, Young DC, Held WA, Bloomfield CD, Caligiuri MA (1999) Restriction landmark genome scanning for aberrant methylation in primary refractory and relapsed acute myeloid leukemia; involvement of the *WIT-1* gene. *Oncogene* 18:3159-65

Prawitt D, Enklaar T, Gaertner-Rupprecht B, Spangenberg C, Oswald M, Lausch E, Schmidtke P, Reutzel D, Fees S, Lucito R, Korzon M, Brozek I, Limon J, Housman DE, Pelletier J, Zabel B (2005) Microdeletion of target sites for insulator protein CTCF in a chromosome 11p15 imprinting center in Beckwith-Wiedemann syndrome and Wilms' tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:4085-90

Reik W, Walter J (2001) Genomic imprinting: parental influence on the genome *Nat Rev Genet* 2:21-32

Seligson DB, Horvath S, Shi T, Yu H, Tze S, Grunstein M, Kurdistani SK (2005) Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature* 435:1262-6

Korrespondenzadresse

Dr. Dirk Prawitt / Prof. Dr. Bernhard Zabel
Univ.-Kinderklinik
Molekulargenetisches Labor
Langenbeckstr. 1
55101 Mainz
Tel. 06131 17 6826
Fax 06131 17 5528
prawitt@molgen.medizin.uni-mainz.de
zabel@molgen.medizin.uni-mainz.de