

Krebs-Epigenetik

DNA-Methylierungs-Biomarker für das humane Mammakarzinom

JÜRGEN VEECK

AG MOLEKULARE ONKOLOGIE, INSTITUT FÜR PATHOLOGIE, RWTH AACHEN

Diese Arbeit wurde ausgezeichnet mit dem **Elisabeth-Gateff-Promotionspreis der Gesellschaft für Genetik** und erstellt bei Prof. Dr. rer. nat. Edgar Dahl, Leiter der AG Molekulare Onkologie, RWTH Aachen.

Gen-Inaktivierung durch fehlerhafte Hypermethylierung spielt eine zentrale Rolle in der Tumorgenese. Dabei stellen methylierte Gene eine neue Quelle potenzieller Tumor-Biomarker dar, deren Detektion zu einem wertvollen Tool in der klinischen Diagnostik werden könnte.

Gene inactivation through aberrant hypermethylation plays a central role in tumorigenesis. Methylated genes provide a novel pool of potential tumor biomarkers, possibly becoming a valuable tool in clinical diagnostics.

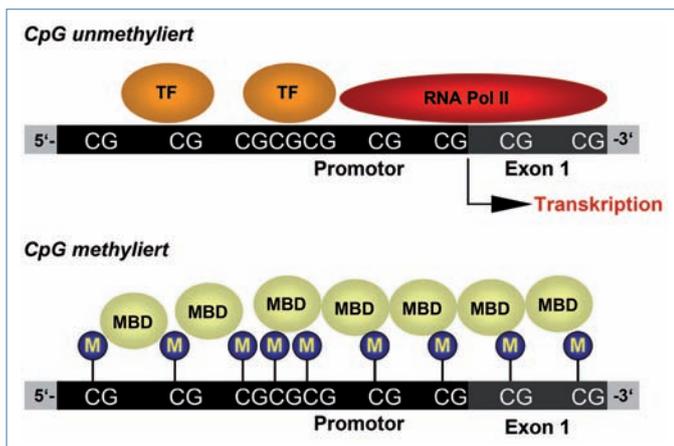
■ Krebs wurde lange Zeit als eine rein genetische Erkrankung verstanden, bis insbesondere im vergangenen Jahrzehnt auch Aspekte der Epigenetik eindeutig mit der Entstehung von Tumoren assoziiert werden konnten. Epigenetische Prozesse regulieren unter anderem präzise die Konformation des Chromatins und damit die konzertierte Aktivität von Genen während der gesamten Biogenese. Der bislang am besten untersuchte epigenetische Mechanismus ist die C5-ständige Methylierung von Cytosin-Basen in CpG-Dinukleotiden von Genpromotoren. Diese Modifikation führt fast immer zum Erliegen der

Transkription und wird daher auch als ein molekularer Schalter der Genexpression angesehen (**Abb. 1**). Tumorzellen weisen regelhaft Dysfunktionen in ihrer DNA-Methylierungsmaschinerie auf, wodurch besonders die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, wie z. B. *RB1*, *p14^{ARF}*, *p16^{INK4a}* oder *hMLH1*, fatale Folgen für die Zelle haben kann [1]. Neueren Erkenntnissen zufolge sind aberrant methylierte Gene in Tumoren sehr viel häufiger als genetische Läsionen. Die Methylierung wird zudem klonal vererbt und ist mit allen Stadien der Tumorentwicklung assoziiert. Daneben kann sie technisch robust detek-

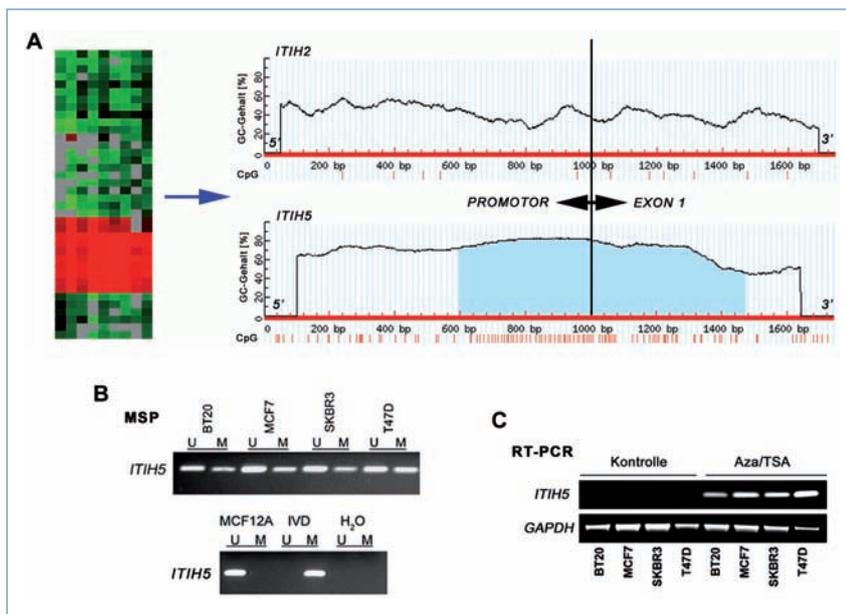
tiert werden, z. B. über eine Methylierungsspezifische PCR (MSP) von Bisulfit-konvertierter DNA. Dieses erlaubt nicht nur neue Einblicke in die molekularen Mechanismen der Tumorphagenese, sondern prädestiniert die DNA-Methylierung auch als vielversprechenden Pool für neue Tumor-Biomarker. Im Folgenden wird eine erfolgreiche Strategie zur Identifizierung solcher hypermethylierter Gene im Brustkrebs dargestellt.

Selektion von Kandidatengenen

Ausgehend von Array-basierten Expressionsprofilen aus mikrodisszierten gesunden Brustepithelien und gepaarten Mammakarzinomzellen [2] wurde ein Katalog von Kandidatengenen erstellt, deren Expression in Brusttumoren häufig (> 50 %) und substanzial (> 5fach) herabreguliert ist. Bioinformatische Analysen der Genpromotoren identifizierten solche Gene, welche als charakteristisches Substrat einer möglichen Methylierung eine dichte CpG-Insel proximal zum Transkriptionsstart aufwiesen (**Abb. 2A**). Sechs Gene wurden aufgrund ihrer biologischen Funktion priorisiert: *SFRP1*, *SFRP2*, *SFRP5*, *WIF1* und *DKK3* spielen allesamt eine inhibitorische Rolle im onkogenen Wnt-Signalweg, während *ITIH5* für ein extrazelluläres Adhäsionsprotein codiert, welches mutmaßlich an der Gewebestabilität beteiligt ist. Für alle Genprodukte wurden tumorsuppressive Eigenschaften vermutet oder bereits beschrieben [3–5]. Studien an benignen und malignen Brust-Zelllinien konnten bestätigen, dass der Expressionsverlust dieser Gene tatsächlich ein tumorspezifisches Ereignis ist (**Abb. 2B**), welches zudem signifikant mit der Methylierung des jeweiligen Genpromotors assoziiert war. Ebenfalls führte eine *in vitro*-DNA-Demethylierung mittels des Basenanalogs 5-Aza-2'-deoxycytidin (Aza) und des Histondeacetylase-Inhibitors Trichostatin A (TSA) zur Reexpression der abgeschalteten Gene in diesen Zellen (**Abb. 2C**). Somit ist in malignen Brust-Zelllinien die Promotormethylierung nachweislich für den Verlust der Genfunktion verantwortlich.



◀ **Abb. 1:** Epigenetische Modifikation des Promotors. Im Falle unmethylierter CpGs veranlassen gebundene Transkriptionsfaktoren (TF) und RNA-Polymerase II die Transkription. CpG-Methylierung (M) und Methyl-CpG-bindende Proteine (MBD) hingegen verhindern die Transkription.



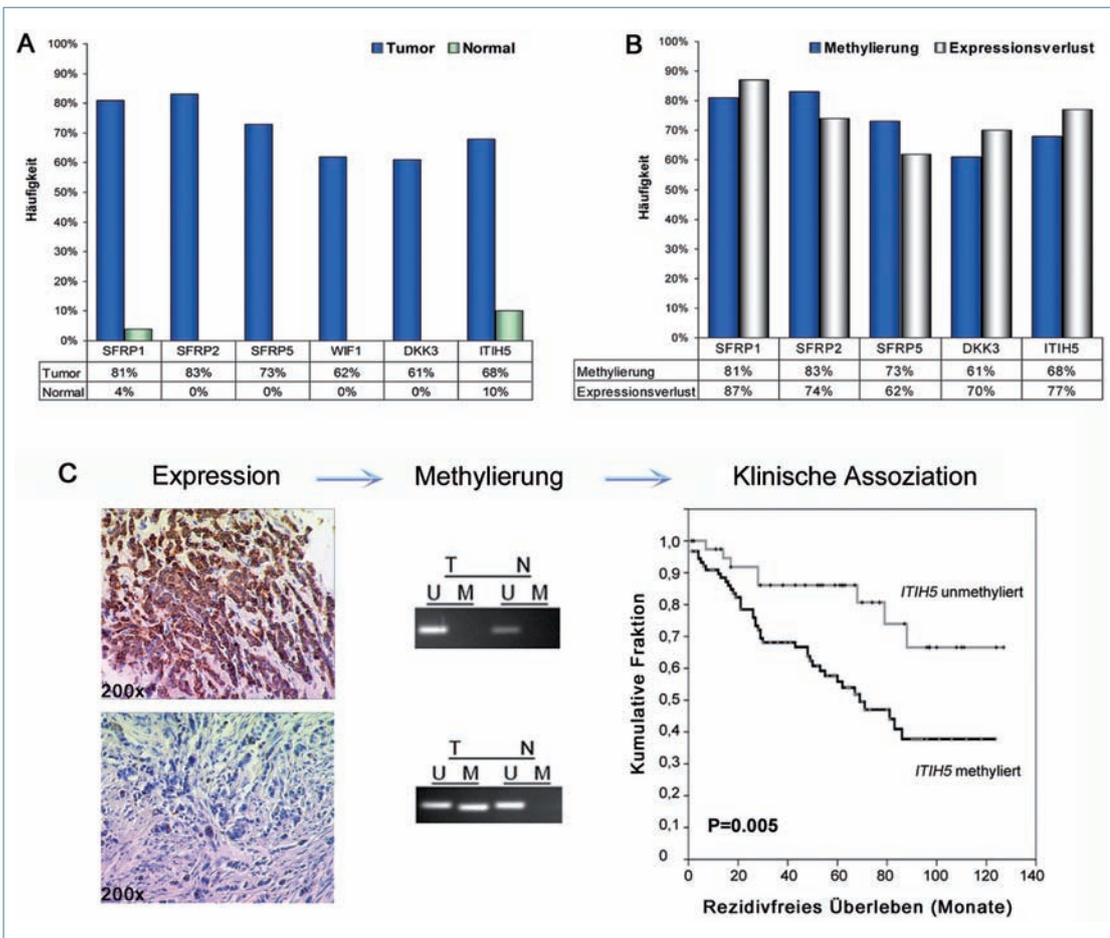
▲ **Abb. 2:** Schematischer Ablauf der Kandidatengenen-Selektion. **A**, Die Array-basierte Transkriptom-Analyse identifizierte Kandidatengene mit einem Expressionsverlust im Tumor. Bioinformatische Untersuchungen der relevanten Gensequenzen unterschieden solche Gene ohne CpG-Insel (*ITIH2*) von Genen mit einer CpG-Insel im Promotorbereich (*ITIH5*, blau schattiert). **B**, Die anschließende Methylierungs-spezifische PCR (MSP) ermittelte den Methylierungszustand des *ITIH5*-Promotors in Zelllinien (maligne: BT20, MCF7, SKBR3 und T47D; benigne: MCF12A, IVD, H₂O). **C**, Abschließend stellte eine RT-PCR nach DNA-Demethylierung (Aza/TSA) der Zellen fest, ob der Verlust der Genexpression (Kontrolle) tatsächlich reversibel ist [3]. IVD: *in vitro* methylierte DNA; M: methylierte DNA; U: unmethylierte DNA.

Validierung der Kandidatengene an primären Mammageweben

Eine anschließende Analyse von 200 humanen Mammakarzinomen und 26 gepaarten Normalgeweben zeigte, dass diese Gene häufig auch in primären Tumoren durch Promotormethylierung abgeschaltet werden (61–83 %) [3,6–10], während sie in gesunden Brustepithelien unmethyliert sind (0–10 %) und exprimiert werden (**Abb. 3A**). Die hohe Übereinstimmung zwischen dem jeweiligen Expressionsverlust auf der RNA- bzw. Proteinebene (62–87 %) und der Methylierung des Promotors (61–83 %) deutet darauf hin, dass die ausgewählten Gene in Brusttumoren nahezu ausschließlich über diesen Mechanismus inaktiviert werden (**Abb. 3B**). Für *SFRP1* wurde diese Hypothese belegt, da trotz eines frequenten Verlusts der Heterozygotie im Mammakarzinom (33 %) keine weiteren Genmutationen im *SFRP1*-Locus detektiert werden konnten [6]. Für alle untersuchten Gene bestand darüber hinaus eine signifikante Assoziation zwischen der Methylierung des Promotors und einem jeweiligen Expressionsverlust im Tumor ($p < 0,001$).

Klinische Relevanz der epigenetischen Inaktivierung

Im Folgenden war es besonders interessant, Zusammenhänge der Methylierung mit kliniko-pathologischen Parametern zu analysieren. Gene, deren Produkte den Wnt-Signalweg inhibieren, waren häufig bereits in frühen, nicht-progredienten Tumorstadien methyliert. Im Gegensatz dazu zeigte *ITIH5*-Methylierung eine signifikante Häufung in solchen Tumoren, welche in Lymphknoten und ferne Gewebe metastasiert waren oder einen hohen Malignitätsgrad trugen. Für *SFRP1* und *SFRP5* detektierten wir einen Zusammenhang zwischen der Methylierung und einem verkürzten Überleben der Patientinnen [6, 8], welches jedoch erheblich stärker mit einer Methylierung von *DKK3* [10] oder *ITIH5* [3] ausgeprägt war (**Abb. 3C**). Patientinnen mit Methylierung in diesen Genen waren einem höheren relativen Risiko ausgesetzt, ein frühes Tumor-Rezidiv zu erleiden (*DKK3*: 3fach; *ITIH5*: 4fach) bzw. eher an den Folgen der Erkrankung zu versterben (*DKK3*: 14fach; *ITIH5*: 11fach). Somit war die prognostische Wertigkeit der Methylierung dieser Gene nach



◀ **Abb. 3:** Validierung und klinische Relevanz der Ergebnisse. **A,** Frequenz und Spezifität der Gen-Methylierung in Brusttumoren (n = 200). **B,** hohe Übereinstimmung von Methylierung und Expressionsverlust in Brusttumoren. **C,** Ablauf der Validierung am Beispiel von *ITIH5*. Expressionsanalysen, hier am Beispiel immunohistochemischer Färbungen, ergaben, dass die Mehrheit der Mammakarzinome *ITIH5* reduziert exprimiert (unten) und nur ein geringerer Anteil der Tumore *ITIH5* stark exprimiert (oben). In anschließenden Methylierungsanalysen zeigten *ITIH5*-methylierte (M) Tumore (T) im Vergleich zu *ITIH5*-unmethylierten (U) Tumoren ein deutlich schlechteres Überleben der Patientinnen an. In gesundem Brustepithel (N) ist *ITIH5* unmethyliert [3].

multivariaten Regressionsmodellen nicht nur unabhängig von bekannten pathologischen Prognosefaktoren (wie der Tumorgröße, dem Lymphknoten-Status und dem histologischen Grad), sondern auch stärker als diese in der Vorhersage eines ungünstigen Krankheitsverlaufs.

Hinsichtlich einer verbesserten Tumor-Früherkennung konnte durch die analytische Kombination der Methylierung von zwei Genen (*SFRP1/SFRP2*) ein Mammakarzinom in 96 % aller Fälle auf der Gewebeebene detektiert werden. In Vorversuchen gelang dieser Nachweis anhand ausgewählter Gene mit einer niedrigeren Frequenz auch im Blutserum von Tumorpatientinnen, mutmaßlich aufgrund disseminierter oder lysierter Tumorzellen, deren zellfreie DNA generell im Blutserum detektiert werden kann.

Zusammenfassend ist es mit diesem rationalen Kandidatenansatz gelungen, neue potenzielle Biomarker für das humane Mammakarzinom zu identifizieren, zu charakterisieren und geeignete Kandidaten für weitergehende Studien vorzuschlagen. Durch eine ideale Kombination solcher Marker könnte es zukünftig vielleicht möglich sein, ein Panel

aus prognostisch und diagnostisch wertvollen Methylierungsmarkern in einem Bluttest für Brustkrebs zu vereinen.

Literatur

[1] Esteller M (2008) Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 358:1148–1159
 [2] Dahl E, Kristiansen G, Gottlob K et al. (2006) Molecular profiling of laser-microdissected matched tumor and normal breast tissue identifies karyopherin alpha2 as a potential novel prognostic marker in breast cancer. *Clin Cancer Res* 12:3950–3960
 [3] Veeck J, Chorovicer N, Naami A et al. (2008) The extracellular matrix protein ITIH5 is a novel prognostic marker in invasive node-negative breast cancer and its aberrant expression is caused by promoter hypermethylation. *Oncogene* 27:865–876
 [4] Schlange T, Matsuda Y, Lienhard S et al. (2007) Autocrine WNT signaling contributes to breast cancer cell proliferation via the canonical WNT pathway and EGFR transactivation. *Breast Cancer Res* 9:63
 [5] Suzuki H, Toyota M, Carraway H et al. (2008) Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer. *Br J Cancer* 98:1147–1156
 [6] Veeck J, Niederacher D, An H et al. (2006) Aberrant methylation of the WNT antagonist SFRP1 in breast cancer is associated with unfavourable prognosis. *Oncogene* 25:3479–3488
 [7] Veeck J, Noetzel E, Bektas N et al. (2008) Promoter hypermethylation of the SFRP2 gene is a high-frequent alteration and tumor-specific epigenetic marker in human breast cancer. *Mol Cancer* 7:83
 [8] Veeck J, Geisler C, Noetzel E et al. (2008) Epigenetic inactivation of the Secreted frizzled-related protein-5 (SFRP5) gene in human breast cancer is associated with unfavorable prognosis. *Carcinogenesis* 29:991–998

[9] Veeck J, Bektas N, Hartmann A et al. (2008) Wnt signaling in human breast cancer: expression of the putative Wnt inhibitor Dickkopf-3 (DKK3) is frequently suppressed by promoter hypermethylation in mammary tumours. *Breast Cancer Res* 10:82
 [10] Veeck J, Wild PJ, Fuchs T et al. (2009) Prognostic relevance of Wnt-inhibitory factor-1 (WIF1) and Dickkopf-3 (DKK3) promoter methylation in human breast cancer. *BMC Cancer* 9:217

Korrespondenzadresse:



Dr. Jürgen Veeck
 Cancer Epigenetics and Biology Program
 Bellvitge Institute for Biomedical Research
 Av. Gran Via de L'Hospitalet 199–203
 E-08907 Barcelona
 jveeck@iconcologia.net
 juergen.veeck@rwth-aachen.de