

DNA-Methylierung und Krebs

Früherkennung mittels modernster Plattformtechnologie am IPA

Heiko U. Käfferlein, Christina U. Köhler, Thomas Brüning

Die Entstehung von beruflich bedingten Krebserkrankungen zu vermeiden und, wo dies nicht mehr möglich ist, letztere frühzeitig zu erkennen, sind große Herausforderungen für die gesetzliche Unfallversicherung. Sowohl die Identifizierung und Validierung von Biomarkern zur Krebsfrüherkennung als auch deren Implementierung zur Sekundärprävention in die arbeitsmedizinische Vorsorge, zum Beispiel als freiwilliges Angebot für Beschäftigte in risikobehafteten Berufen, sind dabei zentrale Aufgaben, an denen auch das IPA mitarbeitet. Ein hochaktuelles Forschungsgebiet ist die Entwicklung und Nutzung von Biomarkern, die spezifische Veränderungen im Muster der DNA-Methylierung erfassen können, da solche Veränderungen mit der Krebsentstehung assoziiert werden.

Vier unterschiedliche Basen (Adenin, Cytosin, Thymin und Guanin) und deren Abfolge in der menschlichen Desoxyribonukleinsäure (DNA) kodieren sämtliche Abläufe in jeder einzelnen Zelle des Körpers und entscheiden letztendlich über ihren „Gesundheitszustand“. Die ausführenden „Organe“ der DNA sind die Proteine, deren Vorhandensein und Konzentration in der Zelle unter anderem auf Basis der DNA-Basenabfolge reguliert wird. Sowohl die DNA als Trägerin der kodierenden Information als auch die Proteine als „ausführende Organe“ entscheiden damit letztendlich über „Leben und Tod“. In einem ausgewachsenen und gesunden Organismus steht die Bildung von Zellen und deren Absterben im Gleichgewicht, das heißt pro Zeiteinheit sterben in einem beliebigen Organ wie zum Beispiel der Lunge genauso viele Zellen ab wie auch wieder neu gebildet werden. Durch endogene oder exogene Einflüsse verursachte Veränderungen in der Abfolge der DNA-Basen, aber auch Veränderungen an den DNA-Basen selbst können dieses sensible Gleichgewicht empfindlich stören und damit zur Krebsentstehung beitragen.

DNA-Methylierung und Krebs

Die DNA-Methylierung ist einer von mehreren Prozessen, die die Bildung von Proteinen beeinflussen können, ohne dass dabei die DNA-Basenabfolge geändert werden muss. Am häufigsten erfolgt die DNA-Methylierung am Cytosin von Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG)-Einheiten der DNA. Regionen mit erhöhter CpG-Dichte treten dabei vornehmlich an Promotorstellen der DNA auf, also denjeni-

gen Abschnitten, die die Genexpression und damit letztlich die Bildung eines Proteins steuern.

In der Regel gilt, dass bei Vorliegen eines (weitgehend) unmethylierten Promotorbereichs die Genexpression und damit die Bildung des entsprechenden Proteins frei geschaltet wird. Im Gegensatz dazu werden bei Vorliegen eines (größtenteils) methylierten Promotorbereichs die Genexpression und die Proteinbildung unterdrückt. Expressionsrelevante Veränderungen der DNA-Methylierung, die zur Krebsentstehung beitragen können, sind damit also die Hypo- und die Hypermethylierung, das heißt ein zu geringer oder ein zu hoher Methylierungsanteil im Promotorbereich (Baylin und Ohm 2006; Eden et al. 2003). So fördert im Falle von Onkogenen eine lokale Hypomethylierung die Freischaltung der Genexpression und damit die Bildung krebsfördernder Proteine, während eine lokale Hypermethylierung im Falle von Tumorsuppressorgenen die Bildung von an sich krebshemmenden Proteinen unterdrückt (s. Abb. 1).

Genomweite Identifizierung potenzieller Marker

Die heutzutage vorliegenden Screening-Technologien auf Mikro-Array-Basis (siehe Infokasten) ermöglichen in einem ersten Schritt die genomweite Identifizierung hypo- und hypermethylierter CpG-Regionen. Um DNA-Abschnitte mit im Krankheitsfall stärkerer beziehungsweise geringerer DNA-Methylierung zu identifizieren, werden die Ergebnisse dieser Analysen von an Krebs erkrankten Patienten sowie gesunden Personen miteinander verglichen. Oftmals liegen

hierbei zwischen Kranken und Gesunden in hunderten CpG-Stellen Methylierungsunterschiede vor.

Verifizierung ist „erste Pflicht“

Da Methylierungs-Arrays schnell und simultan Messergebnisse (im beschriebenen Fall zum Beispiel Methylierungswerte) für tausende von Nukleinsäure-Stellen liefern, eignen sie sich hervorragend, um einen Überblick über das „Methylierungsprofil“ einer Probe zu erhalten und damit solche Stellen auszuwählen, die für eine weitere Analyse interessant sein könnten. Die Vergangenheit zeigte jedoch, dass bei diesen eher auf Quantität angelegten Profilanalysen gelegentlich für einzelne Stellen Fehler auftreten können (Zhang et al. 2012). Daher ist es mittlerweile wissenschaftliche Praxis, interessante Array-Ergebnisse – wie zum Beispiel Methylierungsunterschiede von Gesunden und Krebskranken – für individuelle DNA-Stellen mit einem unabhängigen und quantitativen Verfahren zu verifizieren. Im Hinblick auf die DNA-Methylierung bieten sich hier aufgrund der hohen Sensitivität und Massenauflösung Verfahren auf Basis der Flugzeit-Massenspektrometrie (TOF-MS) an, mit denen die DNA-Methylierung absolut und Einzel-CpG aufgelöst im Hochdurchsatz quantifiziert werden kann (siehe Abbildung 2). Neben geringeren Kosten ist dabei ein wesentlicher Vorteil im Vergleich zur Verifizierung durch DNA-Sequenzierungstechnologien, dass die Auswertung und Interpretation der massenspektrometrischen Daten keine besondere Ausbildung in Statistik oder Bioinformatik erfordern.

Modernste Plattformtechnologie am IPA

Für die genannte Verifizierung von Marker Kandidaten und deren Analyse in Patientenproben wurde ein hochmodernes TOF-MS-System am IPA zur Analyse von DNA-Probenmaterial etabliert. Mit Hilfe dieser Technik ist es möglich, potenzielle Methylierungsmarker nicht nur zu verifizieren, sondern die einmal verifizierten Marker auch im Rahmen molekular-epidemiologischer Studien an unabhängigen Probandenkollektiven zu validieren. Das System arbeitet im Hochdurchsatz in einem 384er-Plattenformat und ermöglicht somit die Analyse mehrerer hundert Proben in wenigen Tagen.

Mikro-Array

Der generelle Begriff „Mikro-Array“ bezeichnet Technologien, mit denen unter Verwendung meist sehr kleiner „Biochips“ das Vorliegen von DNA-Abschnitten oder Proteinen nachgewiesen beziehungsweise die Häufigkeiten bestimmter Veränderungen an der DNA (z.B. Mutationen, CpG-Methylierungen) erfasst werden können. Auf einem einzigen Biochip können dabei in einer Messung Tausende von DNA-Regionen oder Proteinen analysiert werden. In der Regel sind Biochips gerade einmal fingernagelgroß und – je nach untersuchten Zielmolekül – spricht man von DNA-Mikroarrays, DNA-Methylierungsarrays oder auch Protein-Mikroarrays.

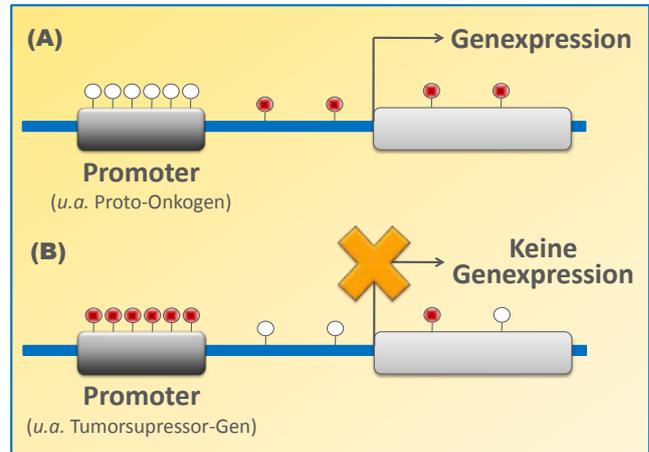


Abbildung 1: Vereinfachter Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und der Entstehung von Krebs. (A) Ist der Promotorbereich krebsfördernder Gene (Proto-Onkogene) größtenteils unmethyliert ist die Genexpression und damit die Bildung krebsfördernder Proteine frei geschaltet. (B) Ist der Promotorbereich krebshemmender Gene (Tumorsuppressorgene) größtenteils methyliert, ist deren Genexpression reduziert (teilweise vollständig blockiert) und damit werden auch nur vermindert (bzw. keine) krebshemmenden Proteine gebildet.

Zur Analyse spezifischer DNA-Regionen bis zu einer Länge von circa 500 Basenpaaren können jederzeit maßgeschneiderte Assays entwickelt und angewendet werden. Die durch den Hochdurchsatz mögliche Analyse mehrerer DNA-Abschnitte beim gleichen Probanden erhöht dabei oft die Aussagekraft im Hinblick auf die Detektion einer Erkrankung.

Neue Methylierungsmarker für Harnblasenkrebs

Am IPA wurden in Zusammenarbeit mit dem durch das Wissenschaftsministerium des Landes Nordrhein-Westfalen geförderten Projektes PURE (Protein Research Unit Ruhr within Europe) neue nicht-invasive DNA-Methylierungsmarker im Urin zur Erkennung von Harnblasenkrebs verifiziert, welche zuvor in genomweiten Analysen mittels Mikroarrays als Marker Kandidaten identifiziert worden waren (Köhler et al. 2014). Harnblasenkrebs stellt neben Pleura-, Lungen- und Hautkrebs eine der wichtigsten berufsbedingten Krebsformen dar; unter anderem kann Harnblasenkrebs durch eine Exposition gegen aromatische Amine am Arbeitsplatz verursacht werden. Der Nachweis von Harnblasenkrebs mittels spezifischer DNA-Methylierungsmuster erwies sich in den Untersuchungen am IPA als sehr stabil. Das am IPA identifizierte DNA-Methylierungsmuster wird derzeit in weiteren, unabhängigen Kollektiven auf seine Eignung zur Harnblasenkrebsfrüherkennung getestet. Zukünftig ist geplant, das Verfahren sowohl bei der Rezidiv-Überwachung von Harnblasenkrebspatienten als auch in prospektiven Studien bei zu Studienbeginn gesunden Probanden einzusetzen, unter anderem in Risikokollektiven wie vormals beruflich gegenüber krebs erzeugenden Gefahrstoffen exponierten Beschäftigten.

Anwendungsmöglichkeiten auch in (prä)klinischer Forschung

Der Einsatz des Systems ist selbstverständlich nicht auf den Nachweis von Methylierungsmustern zur nicht-invasiven Früherkennung

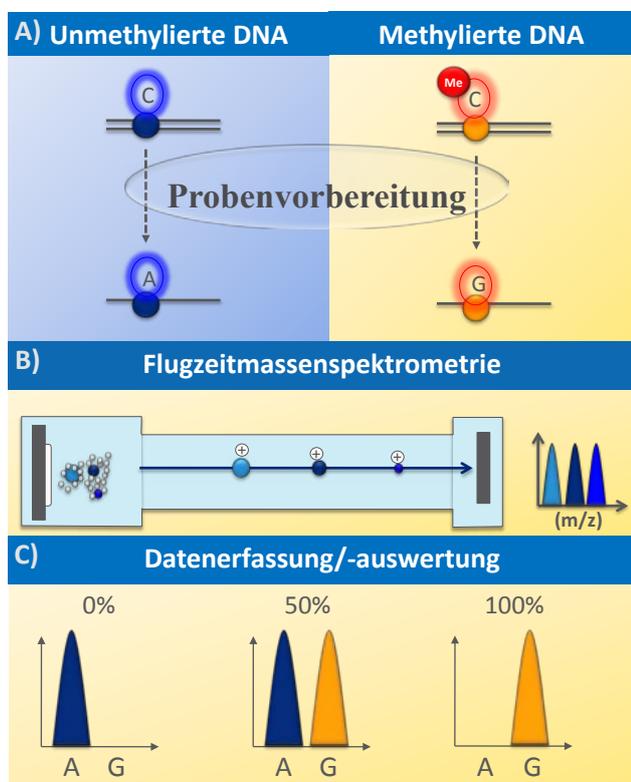


Abbildung 2: Analyseprinzip der DNA-Methylierung mittels Massenspektrometrie. (A) Im Rahmen der Probenvorbereitung werden die Cytosinbasen (C) bei unmethylierter DNA zu Adenin (A), bei methylierter DNA zu Guanin (G) umgewandelt. (B) Nach Spaltung der am Ende der „Umwandlung“ vorliegenden Nukleinsäure werden die Fragmente aufgrund ihres unterschiedlichen Massen/Ladungsverhältnisses (m/z) mittels Flugzeit-Massenspektrometrie aufgetrennt. (C) Das auf diese Weise quantitativ erfassbare A/G-Verhältnis lässt dabei einen Rückschluss auf den ursprünglich vorliegenden Anteil methylierter Cytosinbasen in der Probe zu.

von Harnblasenkrebs in Urinproben beschränkt. Hiermit können jederzeit auch Methylierungsmarker bei anderen Krebserkrankungen verifiziert und auch auf andere Matrizes, wie etwa DNA aus Blut und Gewebe angewendet werden. Da der Einsatz nicht auf Humanproben beschränkt ist, ist das Verfahren auch für Fragestellungen im Bereich der präklinischen Forschung von hohem Interesse, unter anderem in Zellkultur- oder tierexperimentellen Untersuchungen bei der zielgerichteten Entwicklung von Medikamenten oder der Analyse von deren Nebenwirkungen (Pharmazie) beziehungsweise gesundheitsschädlicher Effekte von Gefahrstoffen (Toxikologie). Insgesamt steht dem IPA eines der derzeit modernsten Verfahren zum Nachweis der DNA-Methylierung zur Verfügung, welches auf Wunsch allen Unfallversicherungsträgern sowie deren Mitgliedsunternehmen aber auch externen Kooperationspartnern zu Forschungszwecken zur Verfügung gestellt werden kann.

Die Autoren:
Prof. Dr. Thomas Brüning,
Dr. Heiko U. Käfferlein, Dr. Christina U. Köhler
 IPA

Literatur

01. Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat. Clin. Pract. Oncol* 2005; 2: 4-11.
02. Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 107-116.
03. Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 2003; 300: 455.
04. Köhler CU, Ahrens M, Behrens B, Eisenacher M, Braun K, Jöckel KH, Erbel R, Tannapfel A, Brüning T, Käfferlein HU. Identification of a specific and sensitive urinary DNA hypermethylation signature for bladder cancer diagnosis. *Eur J Cancer* 2014; 50: S105.
05. Laird PW. Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. *Nature Reviews Genetics* 2010; 11:191-203
06. Zhang X, Mu, W, Zhang W. On the analysis of the illumina 450k array data: probes ambiguously mapped to the human genome. *Frontiers in Genetics* 2012; 3: 73

Beitrag als PDF

