



# Epigenetik und Biomarker

Welche Rolle können epigenetische Marker bei der Sekundärprävention spielen?

Georg Johnen, Peter Rozynek, Thomas Brüning

Biomarker sind Moleküle, die sich im menschlichen Körper nachweisen lassen und uns etwas über den Gesundheitszustand und die Gefährdung einer Person verraten. Sie spielen in allen Stadien der Entstehung und des Verlaufs von beruflich bedingten Erkrankungen eine wichtige Rolle. Biomarker können bei Krebserkrankungen als Indikatoren für die innere Belastung nach einer Schadstoffexposition, die individuelle Suszeptibilität, die initiale Schädigung an der Erbsubstanz, die frühen und späten Stadien der Tumorentwicklung und letztlich auch als Indikatoren für die Prognose dienen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, mit Biomarkern den Therapieverlauf zu überwachen. Von besonderer Bedeutung sind sie für die Sekundärprävention im Rahmen von nachgehenden Untersuchungen und anderen Vorsorgeprogrammen der Unfallversicherungsträger bei berufsbedingten Krebserkrankungen.

In der Sekundärprävention von berufsbedingten Krebserkrankungen – also der Tumorfrüherkennung – kann Biomarkern zukünftig eine zentrale Rolle bei der Verbesserung von Vorsorgeuntersuchungen zukommen. Da sie in der Regel in nicht- oder minimal-invasiv gewonnenen Körperflüssigkeiten ohne Belastungen für den Patienten bestimmt werden, kann mit ihnen unter anderem die Akzeptanz für entsprechende Vorsorgeuntersuchungen erhöht werden. Ziel des Einsatzes von Biomarkern in der Sekundärprävention von Krebserkrankungen ist die Diagnose von Tumoren in frühen Stadien, so dass die Therapieoptionen besser und die Erfolgsaussichten höher sind.

Biomarker stehen im besonderen Fokus des IPA-Projektes MoMar (Molekulare Marker zur Krebsfrüherkennung) und des europäischen Verbundprojektes PURE (Protein-Research Unit Ruhr within Europe), an dem das IPA maßgeblich beteiligt ist. Bei der Biomarker-Entwicklung gibt es zwei Hauptphasen, die so genannte „Entdeckungsphase“ und die „Validierungsphase“. In PURE steht derzeit vor allem die Entdeckung neuer Marker im Vordergrund. Hier liegt der Schwerpunkt auf den Protein-Biomarkern, daneben werden aber auch so genannte epigenetische Marker untersucht. Epigenetische Marker sind vererbare Faktoren, die nicht direkt in der Abfolge der „Buchstaben“ der DNA-Sequenz verankert sind.

In MoMar werden für Biomarker sowohl neue Nachweisverfahren entwickelt als auch in einer prospektiven Studie validiert. Dabei werden in MoMar grundsätzlich alle Formen von Biomarkern untersucht, also neben Protein-Biomarkern auch alle anderen molekularen Ebenen. Primäres Ziel von MoMar und PURE ist die Entwicklung von Biomarkern für die Früherkennung beruflich relevanter Krebserkrankungen wie Harnblasentumoren, Lungentumoren und Mesotheliome.

## Formen molekularer Biomarker

Als Biomarker können grundsätzlich alle molekularen Ebenen eines Organismus dienen. Schon früh wurden die „kleinen“ Moleküle, also beispielsweise Hormone, Zytokine, Neurotransmitter, Aminosäuren, Fette, Zucker etc. und deren Stoffwechselprodukte untersucht. Zwischenzeitlich traten sie etwas in den Hintergrund. Erst durch neuere technische Fortschritte bei den analytischen Verfahren sind diese für die Krebsfrüherkennung wieder interessant geworden.

Durch die Entdeckung von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen – und verstärkt durch die Entschlüsselung des menschlichen Genoms vor zehn Jahren – sind genetische Biomarker (DNA-Marker)

insbesondere bei der Krebsdiagnostik in den Vordergrund gerückt. Diese Marker zeichnen sich besonders gegenüber Protein-Biomarkern durch eine hohe Stabilität aus. Krebserzeugende Mutationen oder Marker der individuellen Empfindlichkeit gegenüber Erkrankung werden zum Beispiel auf der genomischen Ebene bestimmt.

Werden die Gene abgelesen, entstehen temporäre Kopien, die RNA-Moleküle. Die wichtigste Klasse dieser Moleküle sind die messenger RNAs (mRNAs, Boten-RNA), die gut detektierbar und grundsätzlich auch als Marker geeignet sind, jedoch wegen ihrer meist geringen Stabilität für eine Anwendung in der Praxis der arbeitsmedizinischen Vorsorge in der Regel nicht eingesetzt werden können. Die mRNA stellt eine Zwischenform der genetischen Information dar, die letztendlich in Proteine übersetzt wird.

Proteine stehen in ihrer Stabilität zwischen RNA und DNA und stellen den funktionellen Endpunkt der genomischen Informationskette dar. Sie sind damit unmittelbar für die Effekte verantwortlich, die durch krankheitsbedingte Veränderungen im Genom entstehen, und in funktioneller Hinsicht besonders gut als Marker geeignet. Ein gewisser Nachteil gegenüber den DNA-Markern besteht hinsichtlich einer insgesamt geringeren Stabilität sowie im Allgemeinen bezüglich ihrer Nachweisempfindlichkeit. Proteine können noch nicht, wie die Nukleinsäuren DNA und RNA, durch Verfahren wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) massiv vervielfältigt und damit einfach und schnell nachgewiesen werden.

#### Epigenetische Veränderung als weitere Form von Biomarkern

Es gibt jedoch eine weitere molekulare Ebene, die als Quelle für potenzielle Biomarker in Frage kommt. Es handelt sich hierbei um die so genannte epigenetische Ebene. Die Epigenetik beschreibt diejenigen Informationen der Zellen, die nicht direkt durch die Sequenz der DNA kodiert aber dennoch vererbt werden können. Der Begriff Epigenom bezeichnet die Gesamtheit der epigenetischen Informationen, so wie der Begriff Genom die Gesamtheit der genetischen Informationen definiert. Das Informationsmuster des Epigenoms kann durch Schadstoffexpositionen und Krankheiten charakteristisch verändert werden. Krankheitsbedingte Veränderungen auf der epigenetischen Ebene vereinen die gute Stabilität und Detektierbarkeit von DNA mit einer hohen ursachenspezifischen Relevanz für die jeweilige Erkrankung. Jedes Gewebe, einschließlich Tumorgewebe, besitzt ein eigenes spezifisches epigenetisches Informationsmuster, das in seinen Zellen kodiert vorliegt. Dadurch können epigenetische Muster zur Identifizierung von Geweben und unterschiedlichen Tumoren genutzt werden. Veränderungen dieser Muster treten häufig bereits in frühen Erkrankungsstadien auf. Da die Ursache von Krebserkrankungen auf einer Fehlsteuerung des Genoms beruht, sind Veränderungen auf der epigenetischen Ebene prädestiniert, um als Biomarker für die (Früh-) Diagnose von Tumoren zu dienen.

#### Epigenetik steuert die Ein- und Ausschaltung von Genen

Der Zellkern ist die Steuerzentrale der Zelle. Darin sind 23 Chromosomen-Paare mit rund drei Milliarden Basenpaaren Information untergebracht. Als „Faden“ abgewickelt hätte die DNA in jedem

Zellkern eine Länge von fast drei Metern. Hinzu kommen unzählige Proteine zur Strukturierung/Organisation, Reparatur, Kopie, Ablesung und Steuerung der Informationen. All dies ist in einem kugelartigen Gebilde verstaut, dessen Durchmesser 100 Mal kleiner ist als der Punkt am Ende dieses Satzes. Die auf den ersten Blick chaotischen Strukturen sind jedoch wohlorganisiert. Die Organisation erfolgt für jede Entwicklungsstufe einer Zelle und für jedes Gewebe unterschiedlich. Die Epigenetik ist maßgeblich daran beteiligt, diese Ordnung aufrecht zu erhalten. Dies wird auch durch die Ergebnisse des ENCODE Consortiums verdeutlicht, über die wir hier bereits berichtet haben (► IPA Journal 03/2012).

Das gesamte Genom kann in aktive, teilweise inaktive und dauerhaft inaktive Bereiche unterteilt werden. Die Aktivität des Genoms, insbesondere die mittel- und langfristige Ein- und Ausschaltung von Genen, die dieser Aktivität zu Grunde liegt, wird zu einem großen Teil durch die Epigenetik gesteuert. Deutliche Unterschiede im epigenetischen Programm sieht man beispielsweise zwischen Stammzellen und hochspezialisierten, differenzierten Zellen wie Nerven- oder Muskelzellen (Abb. 1). Vollständig ausdifferenzierte Zellen teilen sich nicht mehr und haben einen weitgehend festgelegten Satz an aktiven Genen, die jeweils für ihre spezialisierte Funktion notwendig sind. Die meisten anderen Gene sind dabei inaktiviert und die zugehörige DNA liegt in kompakter, unzugänglicher Form vor. Dagegen sind Stammzellen weitaus wandlungsfähiger. Sie sind wenig differenziert, können sich unbegrenzt teilen und zu verschiedenen Gewebetypen entwickeln. Große Teile der Stammzell-DNA sind zugänglich und können daher abgelesen werden. Hier bestehen viele Parallelen zu Tumorzellen, die oft Stammzell-ähnliche Eigenschaften aufweisen und dabei viele Gene irregulär aktiviert haben. Die epigenetischen Mechanismen steuern unter anderem die „Verpackung“ des Genoms und somit die Zugänglichkeit zu den Genen.

Die epigenetischen Informationen sind meist in Form von kleinen chemischen Modifikationen kodiert. Sie „sitzen“ entweder auf dem DNA-Strang selbst (z.B. durch Anheftung von Methylgruppen) oder

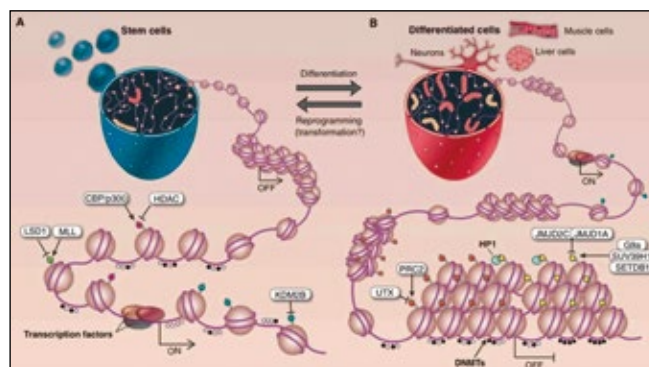


Abb. 1: Zellkern einer Stammzelle (A) und einer differenzierten Zelle (B) mit unterschiedlicher „Verpackung“ der DNA-Stränge. Die DNA ist wie ein Bindfaden auf die Histon-Proteine aufgewickelt. Je dichter gepackt, desto weniger zugänglich ist die DNA und somit die Ablesung der Gene. Krebszellen sind epigenetisch umprogrammiert und ähneln den Stammzellen (aus: Suva et al., Science 2013)

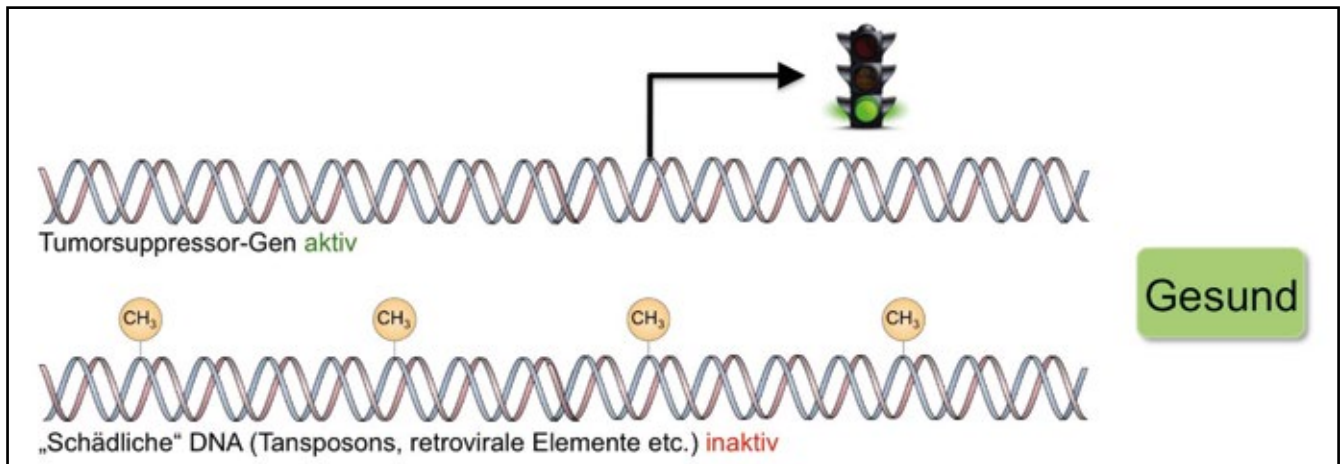


Abb. 2 (links) und Abb. 3 (rechts): Die DNA-Methylierung in gesunden Zellen und in Krebszellen. Generell ist bei Krebs die Methylierung im Genom erniedrigt, jedoch spezifisch ▶

an den Molekülen, die mit der DNA assoziiert sind (z.B. Modifikationen an den sogenannten Histon-Proteinen, s.u.). Hinzugezählt werden zudem die nicht-(protein)kodierenden RNAs (ncRNAs), die entweder an Proteine, DNA oder mRNA binden und so deren Funktion beeinflussen. Die genauen Funktionsweisen der ncRNAs im menschlichen Organismus sind bisher nur wenig erforscht. Generell können ein erhöhter Methylierungsgrad der DNA und eine erniedrigte Acetylierung von Histonen mit einer Ausschaltung von Genen assoziiert werden. Geringe Methylierung in den regulatorischen Bereichen der Gene beziehungsweise acetylierte Histone sind dagegen mit aktiven Genen verbunden. DNA-Methylierung und Histon-Acetylierung sind dabei meist eng miteinander verbunden.

### Modifikation von Histon-Proteinen

Vereinfacht betrachtet, ist die inaktive DNA im Zellkern auf Histon-Proteine aufgewickelt wie ein Bindfaden auf einer Abfolge von Spindeln, die dicht zusammengepackt sind (Abb. 1). Dadurch liegt die DNA in kompakter Form vor und kann nicht mehr abgelesen werden. Dies spart Platz im aktiven Zellkern und ermöglicht es den langen DNA-Fäden zudem, sich bei der Zellteilung in kompakte Chromosomen zu kondensieren, die sich so besser in die neu entstandene Zelle verschieben lassen. Gesteuert wird dies durch eine umkehrbare chemische Modifizierung von elektrisch positiv geladenen Aminosäuren der Histone. Die gezielte Entfernung beziehungsweise Anheftung von Acetyl- und Methylgruppen führt zu einer vermehrten beziehungsweise verminderten Bindung des elektrisch negativ geladenen DNA-Fadens.

Die Bestimmung des Aktivitätszustandes der DNA auf der Histon-Ebene ist technisch noch relativ aufwendig und daher sind Histonmodifikationen spezifischer Genbereiche derzeit weniger gut in brauchbare Assays zur Biomarkerbestimmung umsetzbar. Die Ermittlung der DNA-Methylierung ist hier weitaus besser geeignet.

### DNA-Methylierung

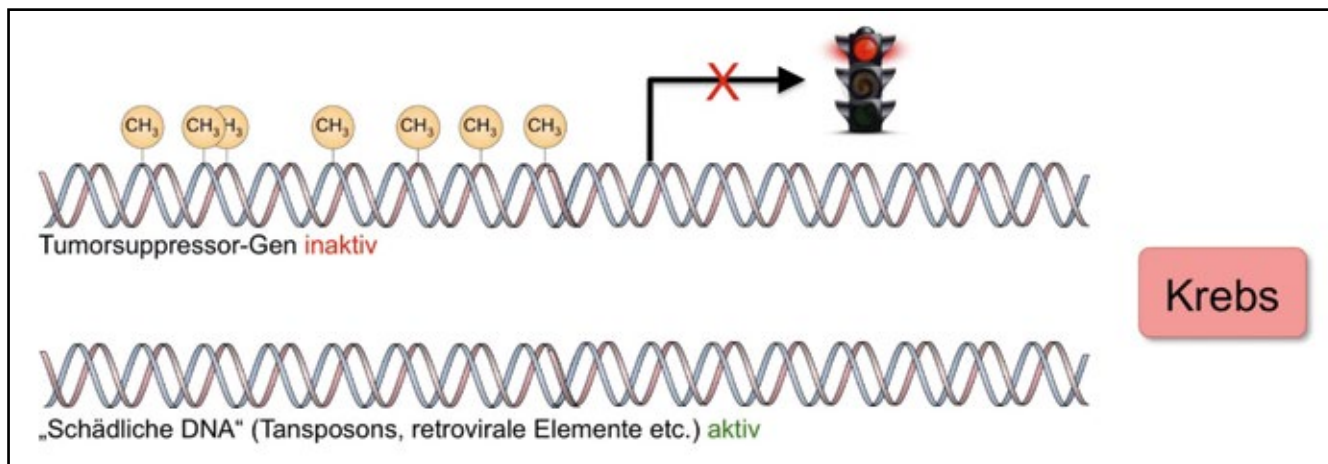
Eine zentrale epigenetische Modifizierung stellt die Methylierung von DNA dar. Bei der DNA-Methylierung handelt es sich um biochemische Veränderungen direkt an der DNA, die eine Ein- und Ausschaltung von Genen bewirken. Hierbei wird eine Methylgruppe an die DNA-Base Cytosin angehängt. Die Methylierung betrifft nur bestimmte Cytosine in der DNA-Sequenz, vorwiegend CpG-Dinukleotide, die oft in so genannten „CpG-Inseln“ gehäuft auftreten.

Diese liegen üblicherweise in den regulatorischen Abschnitten vieler Gene, den sogenannten Gen-Promotoren. Die DNA-Methylierung bewirkt, dass Gene nicht mehr abgelesen werden können (Abb. 2+3). So können Gene, die gerade nicht benötigt werden, gezielt abgeschaltet werden. Zu den abgeschalteten Genen gehören auch diejenigen, die während der Embryogenese eine Rolle bei Wachstum und Entwicklung gespielt haben aber deren Fehlaktivierung im erwachsenen Gewebe zu unkontrolliertem Wachstum führen würde. Daher bezeichnet man diese Gene auch als Proto-Onkogene. Methylierungen finden sich aber auch gehäuft in Bereichen des Genoms, in denen keine Gene vorliegen. Diese Bereiche bestehen oft aus sich wiederholende DNA-Sequenzen und enthalten häufig schädliche, parasitäre DNA-Elemente, die durch eine Methylierung inaktiviert und unschädlich gemacht werden. Wenn aktiviert, können diese DNA-Elemente das Genom destabilisieren, was letztlich zur Entwicklung von Tumoren führen kann.

Das Methylierungsmuster des Genoms kann durch Schadstoffexpositionen und Krankheiten charakteristisch verändert werden. Man kann sich nun leicht vorstellen, dass durch den Wegfall der schützenden Methylierung in schädlichen DNA-Elementen oder in den normalerweise ausgeschalteten (Proto-)Onkogenen Fehlregulationen und Chaos im Genom entstehen. Der Wegfall der Methylierung (Hypomethylierung) ist somit vergleichbar mit Mutationen im Genom, durch die Onkogene aktiviert werden. Andererseits kann auch eine übermäßige Methylierung (Hypermethylierung) in normalerweise aktiven Genen zu schädlichen Effekten führen. Die Gruppe der sog. Tumorsuppressorgene hat schützende Funktionen, wie die Kontrolle des Wachstums oder die Einleitung von Reparaturprozessen. Werden diese Gene in ihren Promotorbereichen hypermethyliert, ist der Effekt ähnlich wie bei einer inaktivierenden Mutation im Genom.

### Nachweismethoden

Wie werden die epigenetischen Veränderungen nun nachgewiesen? Für den Nachweis und die Quantifizierung von DNA-Methylierungen im menschlichen Genom stehen am IPA verschiedene Verfahren zur Verfügung. Lange Zeit war es sehr schwierig, das gesamte Genom nach möglichen neuen epigenetischen Biomarkern zu durchsuchen. Die rasante Entwicklung bei der Rechenleistung von Computern sowie auf dem Gebiet des so genannten Next Generation Sequencing, also dem Hochdurchsatz-Sequenzieren des menschlichen Genoms mit neuartigen Technologien, ermöglicht



► in Tumorsuppressorgenen erhöht. Dadurch werden letztere abgeschaltet. Dagegen werden potenziell schädliche DNA-Elemente durch die geringe Methylierung aktiviert.

es inzwischen, derartige Analysen auch außerhalb der großen Rechen- und Sequenzierungszentren durchzuführen.

Da man die eigentliche DNA-Methylierung nicht direkt sequenzieren kann, wird ein indirektes Verfahren verwendet. Dazu wird von Patienten und gesunden Kontrollen gewonnene DNA zerkleinert und dann die methylierten gegenüber den unmethylierten Bruchstücken mit Antikörpern angereichert, die spezifisch nur methylierte DNA binden (MeDIP: Methylated DNA ImmunoPrecipitation). Anschließend erfolgt dann die Vervielfältigung und Auslesung der Sequenzen der methylierten Bruchstücke. Mit speziellen bioinformatischen Computerprogrammen werden dann die Bruchstücke dem normalen menschlichen Genom zugeordnet (Mapping). Beim Vergleich zwischen Patienten und Kontrollen errechnen die Programme dann die relativen Häufigkeiten der methylierten Stellen im Genom. Dabei werden pro Probe typischerweise um sieben Millionen Bruchstücke sequenziert und zugeordnet.

Sobald mit der Hochdurchsatz-Sequenzierung methylierte Genbereiche gefunden wurden, die als epigenetische Marker in Frage kommen, werden diese mit einem unabhängigen Verfahren verifiziert. Für diese auf einzelne Genbereiche zugeschnittenen Nachweisverfahren wird am IPA das sogenannte Pyrosequencing eingesetzt. Das Pyrosequencing ist im Gegensatz zu den Hochdurchsatzverfahren besser für eine quantitative Analyse einzelner Methylierungsstellen geeignet und auch hinreichend empfindlich, um kleinste Mengen an DNA, zum Beispiel aus Plasmaproben, zu bestimmen. Als preiswerte Methode steht schließlich die Methylierungsspezifische PCR (MSP) zur Verfügung, eine Nachweismethode, die später vor allem bei der breiteren Anwendung eine Rolle spielen könnte.

### Biomarker im Kontext der Epigenetik

Die wissenschaftlichen Erkenntnisse der letzten Jahre haben immer deutlicher gezeigt, dass es sinnvoll ist, einzelne molekulare Aspekte der Krebsforschung nicht isoliert zu betrachten, sondern im Kontext mit möglichst vielen anderen verfügbaren Informationen zu interpretieren. Konkret bedeutet dies beispielsweise, bei Protein-Markerkandidaten auch deren Genregulation sowie mögliche Interaktionen mit anderen Proteinen und anderen Biomolekülen sowie die Einbindung in Signalwege und Netzwerke zu betrachten.

Zahlreiche „vielversprechende“ Biomarker haben sich im Nachhinein als Artefakte der Hochdurchsatzmethoden des Marker-Screenings

herausgestellt. Charakteristisch für diese Marker Kandidaten war häufig ein Mangel an biologischer Plausibilität, das heißt eine mechanistisch sinnvolle Rolle bei der Krankheitsentstehung war nicht erkennbar. Würde man parallel auf mehreren molekularen Ebenen, insbesondere auch einschließlich der epigenetischen, nach neuen Markern suchen, kann ein Überlappen bei mechanistisch zusammenhängenden Kandidaten zu weitaus valideren Biomarkern führen. Diese Synergien gilt es zu nutzen. Daher werden in den Projekten MoMar und PURE neben der Protein-Ebene auch die epigenetische und andere Ebenen berücksichtigt. Die Epigenetik erweitert das Feld der Biomarker erheblich und dies nicht nur bezogen auf Einzelmarker, sondern auch auf Kombinationen in sogenannten Marker-Panels, in denen sich Marker gegenseitig ergänzen. Das Feld der Epigenetik ist gegenüber den anderen molekularen Ebenen noch relativ jung, so dass hier noch mit zahlreichen Entdeckungen und somit neuen Markerkandidaten zu rechnen ist.

### Fazit für die Praxis

Epigenetik beschreibt vererbare Informationen der Zellen, die nicht direkt durch die Sequenz der DNA kodiert sind, aber dennoch regulierend auf grundlegende Prozesse der Zellen Einfluss nehmen können. Epigenetische Faktoren können damit auch als Biomarker für die Früherkennung von Erkrankungen eingesetzt werden. Es besteht durch die Bestimmung epigenetischer Parameter also gute Möglichkeiten, die im Rahmen von nachgehenden Untersuchungen und anderen Vorsorgeprogrammen der Unfallversicherungsträger dringend benötigte (früh)diagnostische Untersuchungsmethoden durch validierte Marker zu ergänzen. Die mechanistischen Erkenntnisse aus der Epigenetik können darüberhinaus auch zu einem besseren Verständnis von Schadstoffwirkungen und somit auch zur Beurteilung der Gefährdung durch Gefahrstoffe beitragen.

Die Autoren

Prof. Dr. Thomas Brüning, Dr. Georg Johnen, Peter Rozynek  
IPA

Beitrag als PDF

