Published in final edited form as:

HNO. 2008 June ; 56(6): 594–602. doi:10.1007/s00106-008-1720-3.

Epigenetische Aspekte bei Karzinomen der Kopf-Hals-Region

Peter Schmezer and Christoph Plass

Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Abteilung Toxikologie und Krebsrisikofaktoren

Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (HNSCC) zählen seit Jahren zu den weltweit häufigsten Krebsarten. Trotz vieler Bemühungen hat sich das 5-Jahres-Überleben bei Patienten mit HNSCC kaum verbessert. Um einen Fortschritt zu erzielen, ist es notwendig, die der Erkrankung zugrunde liegenden biologischen Prozesse besser zu verstehen. Neben den bekannten genetischen Veränderungen haben molekular-zytogenetische Untersuchungen bei HNSCC gezeigt, dass es weitere Veränderungen gibt, die mit Vermehrung und Verlust chromosomaler Bereiche einhergehen, für die jedoch die krankheitsverursachenden Gene bisher nicht identifiziert wurden. Darüberhinaus haben jüngste Forschungsergebnisse verdeutlicht, dass epigenetische Modifikationen wie die DNA Methylierung eine wichtige Rolle spielen. So konnte gezeigt werden, dass bei HNSCC eine Reihe von Genen (z.B. das Tumorsuppressorgen *CDKN2A* sowie *DAPK1*, *MGMT*, *TIMP3*, *TCF21*, und *C/EBPα*) hypermethylierte Bereiche in regulatorischen DNA Sequenzen aufweisen, wodurch ihre Expression verringert oder unterbunden wird. Die Hypermethylierung solcher Gene könnte als Biomarker zur Früherkennung von HNSCC genutzt werden und nicht zuletzt dadurch zur Verbesserung von Prävention und Therapieerfolg beitragen.

Keywords

Schlüsselwörter: HNSCC; Epigenetik; DNA Methylierung; Promoter-Hypermethylierung; Biomarker

Keywords

HNSCC; epigenetic; DNA methylation; promoter hypermethylation; biomarker

Neunzig Prozent der Tumore in der Kopf-Hals-Region werden als Plattenepithelkarzinom (engl.: Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, HNSCC) klassifiziert [102]. Sie umfassen hauptsächlich Karzinome, die in der Plattenepithel-Auskleidung der Mundhöhle, des Pharynx und des Larynx lokalisiert sind. In den USA wurde für das Jahr 2005 die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen auf 29.370 und die der HNSCC-bedingten Todesfälle auf 7.320 geschätzt [58]. In 2006 lag die von der IARC (International Agency for Research on Cancer) für Europa berechnete Gesamtzahl der HNSCC-Fälle bei 147.500, was einem Anteil von knapp 5% aller Krebsfälle entspricht. Männer erkranken mehr als viermal häufiger als Frauen [39].

Korrespondenz an: Christoph Plass, Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Abteilung Toxikologie und Krebsrisikofaktoren, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg, Deutschland, Tel. 06221-423301, Fax. 06221-423359, c.plass@dkfz.de.

Interessenkonflikt: Es besteht kein Interessenkonflikt

Danksagung: Die Autoren danken Frau PD Dr. Odilia Popanda, Heidelberg, und Herrn Dr. Hardi Mundl, Basel, für die kritische Durchsicht des Manuskripts und die wertvollen Anregungen.

Ingesamt liegt das 5-Jahres-Überleben bei Patienten mit HNSCC bei nur etwa 50% und hat sich in den zurückliegenden 20 Jahren nicht signifikant verändert [13]. Tabak- und Alkoholkonsum werden in 85–90% der Fälle als Hauptursachen angesehen, was bedeutet, dass diese Tumoren in hohem Maße vermeidbar wären [11,48]. Zusätzlich werden noch andere Risikofaktoren mit dem Auftreten von HNSCC in Verbindung gebracht, wie z.B. bestimmte berufliche und ernährungsbedingte Faktoren sowie der Gebrauch von Mundwasser [48,106]. Hinzu kommen auch genetische Veränderungen wie zum Beispiel Basensequenzveränderungen in der Genfamilie der *Glutathione S-transferasen*, deren Proteine für die Entgiftung der Zelle verantwortlich sind [16,77,92].

Die Diagnose HNSCC und die damit verbundene Chemotherapie, Radiotherapie und/oder radikale chirurgische Tumorentfernung stellen eine starke physische und psychische Belastung für den Patienten dar. Gerade nach chirurgischer Intervention kommen Komplikationen wie Probleme beim Sprechen oder Schlucken dazu [2,10]. Bei weiter fortgeschrittenen Stadien III und IV zeigt sich nicht selten eine Resistenz gegenüber Standardtherapien, und die Patienten erliegen in 10–30% der Fälle einem zweiten Primärtumor, der aufgrund von mikroskopisch nicht nachweisbaren Tumorzellen im Randbereich des Primärtumors entsteht [63].

Obwohl HNSCC zu den häufigsten Krebsarten zählt, sind die biologischen Prozesse, die zu einer Erkrankung und deren Progression führen, noch weitgehend unverstanden. Das Ziel zukünftiger Forschung muss deshalb sein, Gene und spezifische Veränderung im Tumorgenom aufzuspüren, die für Entstehung und Fortschreiten von HNSCC verantwortlich sind. Die Übertragung der so gewonnenen Erkenntnisse vom Labor in die Klinik sollte zur Entwicklung verbesserter diagnostischer und prognostischer Biomarker führen. In dieser Übersichtsarbeit werden wir den gegenwärtigen Kenntnisstand beleuchten und das neue Forschungsgebiet der Epigenetik im Zusammenhang mit HNSCC diskutieren. Es besteht die beträchtliche Hoffnung, dass die Patientenversorgung von unserem wachsenden Kenntnisstand profitieren wird.

Genetische Veränderungen bei HNSCC

Krebs wird heute allgemein als genetische Erkrankung angesehen. Dabei führen Veränderungen im Genom einer Tumorzelle zur Fehlregulation Krebs-relevanter Gene. Für die Identifizierung neuer Tumormarker ist eine grundlegend molekulare Sichtweise der verschiedenen Erkrankungsstufen notwendig. Proto-Onkogene werden in der Regel aktiviert und führen so zu einem verstärkten Wachstum der Krebszelle. Tumorsuppressorgene, deren Funktion in einer normalen Zelle die Kontrolle des Zellwachstums ist, werden bei der Krebsentstehung hingegen inaktiviert und tragen so ebenfalls zu einem beschleunigten Wachstum der Krebszelle bei. Wie bei anderen Tumorarten wird auch bei HNSCC angenommen, dass die Entwicklung der Krebszelle über mehrere Schritte durch Anhäufung von Genexpressionsänderungen vorangetrieben wird, was zu einem Wachstumsvorteil und Überdauern der Zelle (oder Zellen) gegenüber ihren Nachbarzellen führt. Aufgrund der Exposition der gesamten Kopf-Hals-Region gegenüber Tabakrauch und anderen Risikofaktoren wird im tumorumgebenden Normalepithel häufig das Phänomen der „field cancerization“, d.h. der multifokalen, syn- und metachronen Kanzerogenese beobachtet.

Die Entwicklung von Hochdurchsatzverfahren für die Analyse von Gensequenzen, wie das MassARRAY von Sequenom, bei denen die Information über die komplette Sequenz des humanen Genoms genutzt werden kann, hat die Forschung auf diesem Gebiet wesentlich vorangebracht. Ein Beispiel hierfür ist das molekular-zytogenetische Verfahren der CGH (Comparative Genomic Hybridization). Diese Methode erlaubt nach einer einzigen Hybridisierungsreaktion auf bekannte DNA Sequenzen (Oligonukleotide oder größere genomische Klone) eine genomweite Bestimmung von Veränderungen in der Kopienzahl von DNA Sequenzen (z.B. Amplifikationen und Deletionen, d. h. Zugewinne und Verluste) sowie

eine Zuordnung dieser Veränderungen zu normalen Chromosomenabschnitten [17,40]. Hierbei gibt eine DNA-Amplifikation Hinweise auf den Lokus eines aktivierten Onkogens, während eine Deletion den Ort eines Tumorsuppressorgens anzeigt. Das CGH Verfahren nutzt eine Variante der FISH (fluorescent in situ hybridization)-Technik, ohne dass hierfür eine Präparation von Metaphasen normaler Zellen und von Tumorzellen benötigt wird. Es identifiziert chromosomale Bereiche mit Verlust oder Zugewinn von DNA-Sequenzen, erlaubt jedoch nicht die direkte Klonierung der Sequenzen eines bestimmten Lokus. In einer vor kurzem veröffentlichten Studie wurde Tumorgewebe von 50 HNSCC Patienten mittels CGH untersucht und die folgenden Veränderungen bei mehr als 50% der Proben festgestellt: Verluste in den chromosomalen Bereichen 1p, 4, 5q, 6q, 8p, 9p, 11, 13q, 18q, und 21q, sowie Zugewinne in den Bereichen 11q13, 3q, 8q, 16p, 17q, 19, 20q, und 22q [12]. Weitere Untersuchungen zum Verlust der Heterozygotie (LOH) ergaben sowohl bei histologisch unauffälligem, aber tumornahem Normalgewebe, als auch bei prämaligen Plattenepithel-Dysplasien sowie bei fortgeschrittenen, invasiven Karzinomen eine hohe LOH-Rate im Bereich 9p21, dem Genlokus für CDKN2A (p16) [103]. Dieser Befund legt den Schluss nahe, dass Aberrationen in prämaligen Läsionen für die Erkennung von Patienten genutzt werden könnten, die wahrscheinlich Karzinome oder nach Resektion eines Tumors ein Rezidiv oder einen Zweitumor entwickeln. Andere genetische Abweichungen sind für HNSCC beschrieben und umfassen DNA-Verluste in den chromosomalen Bereichen 3p, 5q, 17p, 8p, 13q, 18q, 22q, 6q, und 2q, sowie DNA-Amplifikationen in den Bereichen 11q13, 3q, 10q, 5p, 3q, 8q, 15q, und 22q [5,30,50,56,57,78,91,98,99,107]. Interessanterweise zeigen unsere eigenen Arbeiten, dass die Mehrzahl der untersuchten HNSCC Proben nur leicht erhöhte Kopienzahlen aufweisen und dadurch die Häufigkeit der Amplifikationen möglicherweise unterschätzt wird [66]. Einige der stärker ausgeprägten Befunde haben prognostischen Wert [25]. Beispielsweise ist die Amplifikation im Bereich 11q13 mit einer Überexpression des Zellzyklusgens Cyclin D1 verbunden, die eindeutig mit dem Fortschreiten der Tumorerkrankung und einer schlechten Überlebensprognose einhergeht [72]. Die Reihenfolge, in welcher die DNA-Verluste oder -Zugewinne auftreten, scheint dabei weniger wichtig als die insgesamt angehäuften Zahl der chromosomalen Veränderungen [18]. Für viele der betroffenen chromosomalen Bereiche bei HNSCC sind die verantwortlichen Gene jedoch noch nicht identifiziert.

Epigenetik

Die aus der Abfolge der vier Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin aufgebaute genomische DNA-Sequenz wurde für zahlreiche Spezies inklusive des Menschen vollständig aufgeklärt. Die Information über die humane Genomsequenz hat die biomedizinische Forschung enorm vorangetrieben. Sie hat die Identifizierung krankheitsverursachender Gene beschleunigt und unser Wissen über Struktur und Regulation von Genen gefördert [1]. Die Wissenschaft hat jedoch erkannt, dass zusätzliche Faktoren berücksichtigt werden müssen, um den genetischen Code richtig zu interpretieren. Diese Faktoren sind epigenetische Modifikationen wie DNA Methylierung, Histonmodifikation und microRNAs. Es gibt eine wachsende Zahl von Hinweisen, dass epigenetische Modifikationen in der Lage sind, die Genexpression dauerhaft zu ändern, ohne dabei die DNA Sequenz zu verändern. Unter DNA Methylierung versteht man das Anhängen einer Methylgruppe an das Kohlenstoffatom in Position 5 im Cytosinring, woraus das auch als „5. DNA Base“ bezeichnete 5-Methylcytosin entsteht (Abb.1). Im Genom von Säugetierzellen wird 5-Methylcytosin bevorzugt in CG Dinukleotiden angetroffen. Diese CG Dinukleotide sind nicht gleichmäßig im Genom verteilt. Sie treten vielmehr als Cluster entweder in langen repetitiven Sequenzen (rDNA, Satelliten-DNA, Centromer-Region) oder in kurzen CG reichen Abschnitten (CpG Inseln) auf, die sich in der Promoter-Region oder in anderen regulatorischen Bereichen einer codierenden Gensequenz befinden [8,9]. Im Regelfall sind CpG Inseln unmethyliert, während repetitive Sequenzen stark methyliert vorliegen.

Zur Ausführung der DNA Methylierung wird die Methylgruppe über S-Adenosyl-L-Methion (SAM) als Spendermolekül bereitgestellt und in einer enzymatischen Reaktion mit Hilfe einer Methyltransferase (DNMT) übertragen [7]. Die *de novo* Methyltransferasen (DNMT3a und DNMT3b) besitzen die Fähigkeit, zuvor unmethylierte DNA zu methylieren. Im Gegensatz hierzu heftet die Methyltransferase DNMT1 neue Methylgruppen an hemimethylierte DNA-Moleküle an, die während der DNA Replikation entstehen, und stellt auf diese Weise das DNA Methylierungsmuster wieder her (Abb. 1). Der Prozess der DNA Methylierung ist reversibel, entweder durch einen passiven Prozess, in dem die DNMT1 Aktivität blockiert wird, oder durch einen aktiven Prozess, in dem methylierte Sequenzen durch das Reparaturgen GADD45a gegen unmethylierte Sequenzen ausgetauscht werden [4]. Die Bedeutung, die DNMTs und das genomweite Methylierungsmuster bei der normalen Entwicklung spielen, wurde durch Untersuchungen bei Knock-out Mäusen aufgedeckt, bei denen diese Enzyme fehlen [65,76]. Das Fehlen von DNMTs verursacht frühe Entwicklungsstörungen, die zum Tode führen. Es ist inzwischen auch belegt, dass normale Methylierungsmuster in Tumorzellen verändert sind. Diese Veränderungen beinhalten die Methylierung von normalerweise unmethylierten CpG Inseln und die Demethylierung repetitiver DNA Sequenzen [34]. Um solche Veränderungen optimal zu untersuchen, ist eine genau Kenntnis der normalen DNA Methylierungsmuster notwendig und zwar für alle Gene und in allen Geweben. Dies ist das Ziel des Human-Epigenom-Projekts, das zuerst in einer Pilotstudie versucht, die komplexen und gewebespezifischen Methylierungsmuster der Gene für den Haupt-Histokompatibilitätskomplex des Menschen aufzuklären [31,80].

Inzwischen wird deutlich, dass die DNA Methylierung eng mit einer zweiten Klasse von epigenetischen Modifikationen, den Histonmodifikationen, verbunden ist [42,59]. Zu den zahlreichen Modifikationen, die vor allem die N- und C-terminalen Enden der Histonproteine betreffen, gehören Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinylierung, Sumoylierung und Biotinylierung. Man nimmt an, dass diese Histonmodifikationen ein Muster bilden, den sogenannten Histon Code, und auf diese Weise Veränderungen der Chromatinstruktur in bestimmten chromosomalen Bereichen herbeiführen, die zur Regulation von Genexpression beitragen [64] (Abb. 2). Das Chromatin liegt dabei entweder in einer offenen Form, die Genexpression ermöglicht, oder in einer geschlossenen Form vor, die mit der Stummschaltung der Genexpression einhergeht. Die Methylierung der Histone H3K9, H3K27 und H4K20 ist beispielsweise mit dem Stummschalten der Genexpression verbunden. Im Gegensatz hierzu führt die Methylierung von H3K4, H3K36 und H3K79 zu transkriptionell aktivem Chromatin [70]. Die Histonacetylierung, besonders an den Histonenden von H3 und H4, wird im Allgemeinen mit einer offenen Chromatinstruktur in Verbindung gebracht [88]. Interessanterweise können wir DNA Methylierung in Bereichen mit geschlossener Chromatinstruktur beobachten, was in der Regel mit dem Stummschalten der Genexpression verbunden ist [60].

In den letzten Jahren wurden kurze RNA Moleküle, sogenannte microRNAs, bei einigen Modellorganismen wie Würmern, Fliegen, Fischen und Mäusen, sowie beim Menschen nachgewiesen. Diese RNA Moleküle codieren nicht für ein Protein, sondern tragen zur Regulation wichtiger Gene bei [3,79]. Die microRNAs der Säugetierzelle weisen keine vollständige Homologie zur Sequenz ihrer Zielgene auf, was die Erkennung dieser Zielgene erschwert. Deshalb werden zu ihrer Identifizierung leistungsstarke Methoden der Bioinformatik benötigt [61]. Es wird angenommen, dass microRNAs entweder bei der Translation von mRNA eingreifen, oder dass sie ihre Zielsequenzen markieren, wodurch sogenannte Micro-Ribonukleoprotein-Komplexe (miRNPs) auf den Plan gerufen werden, die wiederum beim Abbau der entsprechenden mRNAs mitwirken [82]. Ursprünglich wurden microRNAs als Steuerelemente der Genexpression bei der normalen Entwicklung der Zelle entdeckt. Inzwischen ist jedoch deutlich geworden, dass sie in humanen Krebszellen fehlreguliert werden können und so zum Phänotyp der Erkrankung beitragen. Jüngste

Schätzungen weisen daraufhin, dass eine einzige microRNA möglicherweise mehrere hundert Gene zum Ziel hat, und machen so deutlich, dass die Fehlregulation von microRNAs katastrophale Folgen für das Transkriptionsprofil der Zelle haben kann [15]. Eine aktuelle Übersicht nennt 321 humane microRNAs, von denen 234 durch Experimente verifiziert sind [27]. Diese Zahl wird durch eine neue Untersuchungsmethode in Frage gestellt, die auf die Existenz von bis zu tausend microRNAs hindeutet [22,27]. Interessanterweise sind microRNAs an der Regulation wichtiger zellulärer Prozesse wie Apoptose, Proliferation, Differenzierung, Entwicklung und Stoffwechsel beteiligt [22]. Neuere Ergebnisse zeigen, dass die Expressionsprofile von microRNAs bei zahlreichen Krebserkrankungen (z.B. Brust- und Lungenkrebs, chronisch lymphatische Leukämie) verändert sind [19,32,52,67,73]. In HNSCC ist die Expression von HMGA2 durch miRNA-98 beeinflusst. HMGA2 ist mit verstärkter Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika wie zum Beispiel dem Topoisomerase II-Inhibitor Doxorubicin verbunden [53].

Darüber hinaus zeichnen sich Expressionsmuster ab, die charakteristisch für bestimmte Tumorarten oder Subgruppen einer Tumorart sein können. Leider ist derzeit nicht bekannt, wie microRNAs reguliert werden und welche Mechanismen an den massiven Veränderungen ihres Expressionsmusters in Krebszellen beteiligt sind. Kürzlich wurde jedoch berichtet, dass einige microRNAs offenbar nicht nur die Fähigkeit besitzen, Zielgene zu reprimieren, sondern dass sie diese in Abhängigkeit vom Zellzyklus auch aktivieren können [101].

Alle drei genannten epigenetischen Modifikationen (DNA Methylierung, Histonmodifikation und microRNAs) stehen sowohl untereinander als auch mit der DNA Sequenz in Verbindung. Störungen bei einer Modifikation können zu Veränderungen bei einer anderen führen. Beispielsweise bewirkt eine veränderte DNA Methylierung von CpG Inseln eine Histonmodifikation, so dass Proteine mit Methylbindungsdomäne sowie Histondeacetylasen rekrutiert werden [60]. Andererseits kann das Stummschalten von Genen zu einer Histonmodifikation führen, die wiederum DNA Methylierung nach sich zieht [75,84,86]. Es konnte auch gezeigt werden, dass die DNA Methylierung von CpG Inseln und Modifikation von Histonden zum Stummschalten von microRNA (miR-127) und zur vermehrten Expression von BCL6, einem mutmaßlichen Zielgen von miR-127, führen [87]. Vergleichbar ist die Situation bei der epigenetischen Steuerung der microRNA mir124a in Leukämiezellen (AML), die die Expression des Tumorsuppressorgens C/EBP α reguliert. So bestimmt das eng verzahnte Zusammenspiel aller epigenetischer und genetischer Faktoren wie eine Zelle auf äußere Einflüsse reagiert. Dieses Interaktionsnetzwerk ist in Krebszellen gestört und führt dort zu Fehlsteuerungen, die ein beschleunigtes Zellwachstum, eine ausbleibende Reaktion auf Apoptose-Signale, und eine Begünstigung von Angiogenese, Invasion und Metastasierung zur Folge haben [47].

Methoden zur Messung von DNA Methylierung

Das Forschungsgebiet der DNA Methylierung hat eine wahre Revolution bei der Entwicklung von neuen Methoden zur Methylierungsmessung erlebt [14] (Tabelle 1). Zu Anfang basierten diese Methoden auf dem Einsatz von methylierungsspezifischen Restriktionsenzymen, die nur unmethylierte Schnittstellen nicht jedoch methylierte Stellen in der DNA Sequenz erkennen. Ein Durchbruch gelang mit der Einführung der Natrium-Bisulfit-Konversion der DNA, wodurch unmethyliertes Cytosin in Uracil umgewandelt wird, während methylierte Cytosine unverändert bleiben [23]. Durch diese methylierungsspezifische Konversion ist es nun möglich, spezifische PCR Primer zu entwickeln, die zwischen methylierten und unmethylierten Sequenzen unterscheiden können. Hiermit konnten wiederum hoch sensitive Methoden zum Nachweis von methylierten Genen etabliert werden, wie sie beispielsweise für die Anwendung in Biomarker-Studien benötigt werden. Die meisten dieser Methoden erfordern Information über eine bekannte oder vermutete Zielsequenz in der DNA, erlauben

daher aber keine Angaben über eine globale DNA Methylierungshäufigkeit. Das erste Verfahren, das hierzu in der Lage war, ist RLGS (Resctriction Landmark Genomic Scanning) (Abb. 3), die derzeit beste Methode, um globale Methylierung zu untersuchen [51]. Die RLGS-Methode beinhaltet den Einsatz von methylierungsspezifischen Restriktionsenzymen, der Markierung der Schnittstellen mittels sogenanntem end-labeling', sowie einer zweidimensionalen Gelelektrophorese. Sie erlaubt die Suche nach Sequenzbereichen mit veränderter DNA Methylierung [94]. Die meisten GC reichen Sequenzbereiche, die von selten schneidenden Restriktionsenzymen erkannt werden, liegen in den 5'-Bereichen der Gene, was zu einem selektiven Aufzeigen dieser Sequenzbereiche und nicht von zufälligen genomischen Sequenzen führt. Die genaue DNA Sequenz der durch RLGS ermittelten Bereiche kann anschließend über Standard-PCR-Verfahren oder über direkte Klonierung ermittelt werden [93]. Ein einziges RLGS Profil kann bis zu 2000 markierte Schnittstellen von selten schneidenden Restriktionsenzymen aufweisen. Diese Profile können mit hoher Reproduzierbarkeit erstellt werden und ermöglichen so den Vergleich zwischen verschiedenen Geweben, z.B. Normal- versus Tumorgewebe oder Gewebe verschiedener Spender.

Unsere Arbeitsgruppe hat kürzlich Gewebeproben von HNSCC Patienten untersucht. Im Rahmen dieser Studie wurden einige wichtige Beobachtungen gemacht und publiziert: (1) In einem groß angelegten Vergleich, bei dem HNSCC Proben und andere menschliche Tumorgewebeproben untereinander verglichen wurden, fanden wir heraus, dass die beobachteten DNA Methylierungsmuster nicht zufällig sind [26]. Diese Tatsache wird dadurch unterstrichen, dass einige methylierte Sequenzen in mehreren Patientenproben auftreten, während andere niemals methyliert vorliegen. Die statistische Auswertung unserer Daten verdeutlicht, dass das häufige Auftreten des gleichen Methylierungsmusters in unterschiedlichen Tumormustern nicht zufälliger Natur ist. Ebenso bedeutsam ist die Beobachtung, dass bestimmte Methylierungsmuster tumorspezifisch sind und bestimmte Gene in einem Tumor häufiger methyliert sind als in anderen Tumoren [26]. (2) Unsere RLGS Ergebnisse zeigen auch, dass sowohl primäres als auch metastasierendes HNSCC einen relativ geringen Hypermethylierungsgrad an CpG Inseln aufweisen, wenn man sie mit anderen Krebsarten wie Leukämie, Kolonkrebs oder Glioblastom vergleicht. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte darin bestehen, dass das gesamte Spektrum der zur genomischen Instabilität führenden genetischen und epigenetischen Veränderungen beim HNSCC durch die Exposition gegenüber Alkohol und Tabak auf die Seite der genetischen Veränderungen verschoben ist. Interessanterweise findet sich nur ein kleiner Teil der Sequenzbereiche eines einzelnen Patienten im Gewebe des Primärtumors und der Metastasen gleichermaßen methyliert. Diese Beobachtung spricht gegen die Vorstellung, dass die Progression vom primären zum metastasierenden Tumor durch eine Verschlechterung des Methylierungsphänotyps zustande kommt. Diese Daten weisen im Gegenteil darauf hin, dass im metastasierenden Tumor andere Sequenzbereiche methyliert werden als im primären Tumor. Dabei ist ungeklärt, ob dieser Unterschied auf eine Heterogenität des Methylierungsphänotyps innerhalb des Primärtumors zurückgeführt werden kann. Aus einer Subpopulation des Tumors könnten sich nachfolgend, durch klonale Expansion und Progression, eine Gruppe von Zellen mit metastasierendem Phänotyp herausbilden, die schließlich ein anderes Methylierungsmuster aufweisen würden als die Mehrheit der Tumorzellen. Alternativ könnte der Befund auch dadurch erklärt werden, dass sich die Veränderungen des Methylierungsphänotyps erst dann ergeben, wenn sich der metastasierende Tumor entwickelt hat [95].

DNA Methylierung bei HNSCC

Bei einer Reihe von Krebsarten des Menschen wurde eine vom Normalen abweichende, extensive Hypo- und Hypermethylierung beschrieben. Die globale Hypomethylierung war eine der ersten Veränderungen, für die ein Zusammenhang mit der Tumorprogression aufgezeigt wurde. Die Bedeutung der Hypomethylierung für die Krebsentstehung ist dabei noch wenig

verstanden. Unlängst wurde jedoch postuliert, dass das Vermögen, durch Hypomethylierung Krebs hervorzurufen, aus der Aktivierung von wachstumsfördernden Genen und/oder aus der Induktion chromosomaler Instabilität hervorgeht.

Die Stummschaltung von Tumorsuppressorgenen ist ein gut dokumentierter Mechanismus, der entweder durch Mutation beider Allele, durch homozygote Deletion oder durch Verlust eines Allels (LOH) mit anschließender Mutation des verbliebenen Allels hervorgerufen werden kann. In jüngerer Zeit wurde auf überzeugende Weise belegt, dass die homozygote DNA Methylierung der Promoterregion einen weiteren Mechanismus zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen darstellt. Die Liste derjenigen Gene, die in Tumoren des Menschen hypermethyliert werden, wächst schnell und beinhaltet Tumorsuppressorgene wie die Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren *p15* und *CDKN2A (p16)*, das Retinoblastom-Gen, *RASSF1A*, das von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgen (36), und die Gene *MLH1* (37) und *HIC1* (hypermethylated in cancer 1) [29,35,38,45,46,49,55]. Es gibt auch Gene die durch genetische sowie epigenetische Mechanismen inaktiviert werden. Hierzu zählt der Transkriptionsfaktor *TCF21* [96]. Unter den mehr als 50 Genen, bei denen Hypermethylierung der Promoterregion in verschiedenen Tumorarten beobachtet wurde, befinden sich neben Tumorsuppressorgenen und Genen der Zellzykluskontrolle auch solche der DNA Reparatur [37]. Bei der Entstehung mancher Tumore wie z.B. beim Kolonkarzinom ist der Einfluss epigenetischer Mechanismen gut belegt. Bei anderen Tumorarten wie dem HNSCC gibt es bisher nur wenige Untersuchungen (Tabelle 2).

Marsit et al. untersuchten die Promoter-Methylierung von 16 Tumorsuppressorgenen und 3 *MINT* Genen in 346 HNSCC Patienten [68]. Bei 10 Genen zeigte sich in über 25% der Fälle eine Hypermethylierung. Franzmann et al. analysierten die Methylierung des Promoters des *CD44* Gens [41]. Sie beobachteten in DNA, die mit Hilfe von Mundspülungen gewonnen wurde, bei 9 von 11 HNSCC Patienten eine Hypermethylierung der Promoterregion, jedoch bei keinem von 10 Kontrollprobanden. Carvalho und Mitarbeiter verwendeten ebenfalls DNA, die sie aus Mundspülungen erhielten [20]. Sie untersuchten die Promoter-Methylierung des Gens *DCC* in DNA aus Tumorgewebe von 132 Patienten mit HNSCC im Vergleich zu DNA von 132 gesunden Probanden. In 75% der HNSCC Patienten wurde Hypermethylierung beobachtet. Diese Untersuchungen wurden um zusätzliche Gene, darunter das DNA-Reparaturgen O6-Methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*), und um zusätzliche Probanden erweitert (bis zu 211 HNSCC Patienten und 527 Kontrollprobanden [21]). Zusätzlich wurden Serumproben analysiert. Eine signifikante Korrelation zwischen Promoter-Hypermethylierung in Tumorgewebe und in Zellen aus Mundspülung wurde für 15 Gene darunter die Tumorsuppressorgene *DCC*, *DAPK1*, *CDH1*, *CDKN2A (p16)* und *RARB* sowie für *MGMT* beobachtet. Der Vergleich von DNA, die via Mundspülung gewonnen wurde, mit solcher aus Serumproben ergab zusätzlich noch Hinweise für ein Kompartiment-spezifisches Promoter-Methylierungsmuster. Unsere Arbeitsgruppe untersuchte die Promoter-Methylierung bei dem Tumorsuppressorgen *C/EBPα* in 28 Tumor- und 5 benachbarten Normalgewebeproben [6]. Wir konnten zeigen, dass *C/EBPα* durch LOH und DNA Methylierung herunterreguliert wird. In 68% der HNSCC Fälle lag eine spezifische regulatorische Gensequenz hypermethyliert vor.

Martone und Mitarbeiter analysierten bei 20 HNSCC Patienten den Promoter-Methylierungsstatus für die Gene *MGMT*, *DAPK1* und *CDKN2A (p16)* sowohl in Tumorgewebe als auch in Tumor-nahem, histologisch unauffälligem Normalgewebe [71]. Hypermethylierung im Tumorgewebe wurde in 50% bei *MGMT*, in 45% bei *DAPK1* und in 20% bei *CDKN2A* festgestellt. Die Übereinstimmung der Promoter-Hypermethylierung zwischen Tumorgewebe und Tumor-nahem Normalgewebe betrug im Falle von *MGMT* 63% sowie bei *DAPK1* und *CDKN2A (p16)* jeweils 90%. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf die sogenannte „Feldkanzerisierung“, d.h. molekulare Veränderungen wie sie im Tumor auftreten

können bereits im gesunden, Tumor-nahen Normalgewebe vorhanden sein. Daten zur DNA Methylierung von zwei weiteren DNA Reparaturgenen wurden von Sengupta und Mitarbeitern beschrieben [89]. Sie untersuchten die Promoter-Methylierung der Mismatch DNA Reparaturgene *MLH1* und *MSH2* in 123 gepaarten Proben (Tumorgewebe gegen Tumor-nahes Normalgewebe) von HNSCC Patienten. Zusätzlich wurde von 27 Patienten Gewebe aus Leukoplakien, d.h. präkanzerösen Schleimhautbereichen analysiert. In 63% der Leukoplakien und 50% der Tumore wurde Promoter-Hypermethylierung bei einem oder beiden Genen beobachtet. Auch im Tumor-nahen Normalgewebe wurde bei 25% der HNSCC Patienten für beide Gene Hypermethylierung in der Promoterregion festgestellt. Rauchgewohnheit und Promoter-Hypermethylierung waren in dieser Studie positiv miteinander korreliert.

Wenn auch bisher nicht für HNSCC, so konnte bei einigen Tumorarten gezeigt werden, dass Promoter-Hypermethylierung mit einer schlechteren Überlebensprognose für die Patienten assoziiert ist. Beispiel ist eine Untergruppe von Patienten mit Kolonkarzinom, bei denen mehrere Gene gleichzeitig methyliert sind, so dass man von einem CpG island methylator phenotype" (CIMP) spricht [90]. Tumorproben von 188 Patienten mit Kolonkarzinom wurden auf DNA Methylierung in den Genen *MINT1*, *MINT31*, *MLH1*, *p14* und *CDKN2A (p16)* untersucht. Je nach Gen wurde bei 4 – 23% der Patienten Promoter-Hypermethylierung festgestellt. Jedes methylierte Gen für sich genommen war signifikant mit einer verkürzten Überlebensrate assoziiert. Bei den Patienten mit CIMP, bei denen gleichzeitig mehrere Gene methyliert vorlagen, war die Überlebensrate besonders stark verkürzt (hazard ratio: 3.22). In einer weiteren Studie wurde aus Blutplasma isolierte DNA von 138 Fällen mit Ovarialkarzinom zum Zeitpunkt als ein Rezidiv auftrat untersucht [44]. Promoter-Hypermethylierung im *MLH1* Gen war mit einer signifikant verkürzten Überlebenszeit verbunden (hazard ratio: 1.99).

DNA Methylierung als potentieller Biomarker zur Früherkennung von HNSCC

Eine frühzeitige Erkennung von HNSCC könnte zu einer deutlichen Verbesserung der klinischen Behandlungsergebnisse führen. Hierfür ist der Einsatz geeigneter Screening-Methoden und Biomarker erforderlich, die mit ausreichender Genauigkeit (Sensitivität, Spezifität) und möglichst kosteneffektiv eine Identifizierung von Probanden mit hohem Erkrankungsrisiko erlauben. Arbeiten von Sidransky, Califano und Kollegen haben gezeigt, dass der Nachweis eines fehlerhaften Promoter-Methylierungsmusters bei krebsrelevanten

Genen z. B. in DNA aus Speichel- oder Serumproben von Patienten mit HNSCC möglich ist [85] [21]. Dabei muss jedoch auf eine Kompartiment- bzw. Gewebespezifität des Methylierungsmusters geachtet werden. Righini et al. analysierten das Promoter-Methylierungsmuster von 11 relevanten Genen in DNA aus Tumorgewebe, Tumor-nahem Normalgewebe und Speichelproben von 90 HNSCC Patienten im Vergleich zu DNA aus Speichelproben von 30 gesunden Kontrollpersonen [83]. Von 6 Markergenen (*TIMP3*, *ECAD*, *CDKN2A*, *MGMT*, *DAPK1* und *RASSF1*) war zumindest ein Gen in über 75% der HNSCC Fälle hypermethyliert, während keines der 11 untersuchten Gene bei den Kontrollproben positiv war. Die Methylierungsmuster der DNA aus Tumorgewebe, tumornahem Normalgewebe und Speichelprobe desselben Patienten stimmten gut überein. Ebenso waren die Muster von neu diagnostizierten HNSCC und Patienten mit zweitem Primärtumor vergleichbar. In einer weiteren Studie beobachteten Martone et al. (2007) wenigstens für eines von 3 Markergenen (*MGMT*, *CDKN2A* und *DAPK1*) in über 80% der Fälle eine Übereinstimmung zwischen der Methylierung im Tumorgewebe im Vergleich zum tumornahen Normalgewebe [71]. Im Gegensatz hierzu konnten Dikshit et al. keine gute Übereinstimmung zwischen Promoter-Hypermethylierung von *CDKN2A*, *MGMT*, *DAPK1* und *ECAD* und der Mortalität von HNSCC Patienten feststellen [28]. Hier müssen neue Markergene identifiziert werden, um das Vorhersagepotential zu verbessern. Insgesamt sind die bisherigen Befunde jedoch ermutigend und die DNA Methylierung bestimmter Gene stellt

einen vielversprechenden Biomarker zur Früherkennung von HNSCC dar, der in weiterführenden Untersuchungen validiert werden sollte.

Fazit

Zusammenfassend können wir festhalten, dass die molekularen Veränderungen, die mit einem Fortschreiten der Erkrankung beim HNSCC verbunden sind, bisher nur unzureichend verstanden werden. Für einen molekularen „Steckbrief“ fehlen vor allem umfassende Studien, die neben genetischen Profilen und RNA Expressionsmustern auch epigenetische Aspekte wie z.B. DNA Methylierungsmuster mit einbeziehen. Nachdem die genannten Hinweise über hypermethylierte Gene bei HNSCC vorliegen, muss die Suche nach weiteren Zielgenen in breitem Umfang vorangetrieben werden. Dieses könnte durch den Einsatz von Methoden zur Erstellung von genom-weiten epigenetischen Profilen (zum Beispiel mit DNA Methylierungs-Arrays [105], RLGS oder Genreaktivierung nach Demethylierung) erfolgen [97]. Quantitative Hochdurchsatz-Analyseverfahren wie das MassARRAY von Sequenom erlauben eine schnelle Überprüfung der Ergebnisse und liefern damit Kandidatensequenzen für die Biomarkerentwicklung oder für funktionelle Studien mit dem Ziel, das neu erworbene Wissen für klinische Studien bereitzustellen (Abb. 4). In diesen Studien wird eine synergistische Kombination aus LOH Analysen und dem genomweiten Aufspüren von Veränderungen im Methylierungsmuster unsere Möglichkeiten zur Identifizierung relevanter Gene deutlich verbessern. Die Erkennung und genaue Charakterisierung solcher genetischer und epigenetischer Veränderungen ist eine fundamentale Voraussetzung, um individuelle Krebsempfindlichkeit und Prognose zu ermitteln. Letztendlich könnte dies dazu führen, eine individualisierte, auf die entsprechenden molekularen Veränderungen abgestimmte Präventionsstrategie zu ermöglichen und damit die Therapie von HNSCC zu verbessern.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich für die technische Unterstützung von Susanna Fuladdjusch und kritischen Kommentare von Odilia Popanda. Epigenetische Projekte in Kopf und Hals Tumoren in der Abteilung werden vom National Institute of Health (DE13123) unterstützt.

Literatur

1. International-Human-Genome-Sequencing-Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004;431:931–945. [PubMed: 15496913]
2. Aarstad, Hj; Aarstad, Ak; Birkhaug, Ej, et al. The personality and quality of life in HNSCC patients following treatment. *Eur J Cancer* 2003;39:1852–1860. [PubMed: 12932662]
3. Alvarez-Garcia I, Miska Ea. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development* 2005;132:4653–4662. [PubMed: 16224045]
4. Barreto G, Schafer A, Marhold J, et al. Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature* 2007;445:671–675. [PubMed: 17268471]
5. Beder, Lb; Gunduz, M.; Ouchida, M., et al. Genome-wide analyses on loss of heterozygosity in head and neck squamous cell carcinomas. *Lab Invest* 2003;83:99–105. [PubMed: 12533690]
6. Bennett, Kl; Hackanson, B.; Smith, Lt, et al. Tumor suppressor activity of CCAAT/enhancer binding protein alpha is epigenetically down-regulated in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2007;67:4657–4664. [PubMed: 17510391]
7. Bestor, Th; Verdine, Gl. DNA methyltransferases. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6:380–389. [PubMed: 7917329]
8. Bird A, Taggart M, Frommer M, et al. A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell* 1985;40:91–99. [PubMed: 2981636]
9. Bird, Ap. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986;321:209–213. [PubMed: 2423876]

10. Birkhaug, Ej; Aarstad, Hj; Aarstad, Ak, et al. Relation between mood, social support and the quality of life in patients with laryngectomies. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2002;259:197–204. [PubMed: 12064508]
11. Blot, Wj; Mclaughlin, Jk; Winn, Dm, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1988;48:3282–3287. [PubMed: 3365707]
12. Bockmuhl U, Wolf G, Schmidt S, et al. Genomic alterations associated with malignancy in head and neck cancer. *Head Neck* 1998;20:145–151. [PubMed: 9484946]
13. Boring, Cc; Squires, Ts; Tong, T. Cancer statistics, 1991. *Bol Asoc Med P R* 1991;83:225–242. [PubMed: 1930475]
14. Brena, Rm; Huang, Th; Plass, C. Quantitative assessment of DNA methylation: potential applications for disease diagnosis, classification, and prognosis in clinical settings. *J Mol Med* 2006;1–13.
15. Brennecke J, Stark A, Russell Rb, et al. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 2005;3:e85. [PubMed: 15723116]
16. Cabelguenne A, Lorient Ma, Stucker I, et al. Glutathione-associated enzymes in head and neck squamous cell carcinoma and response to cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy. *Int J Cancer* 2001;93:725–730. [PubMed: 11477586]
17. Cai, Ww; Mao, Jh; Chow, Cw, et al. Genome-wide detection of chromosomal imbalances in tumors using BAC microarrays. *Nat Biotechnol* 2002;20:393–396. [PubMed: 11923847]
18. Califano J, Van Der Riet P, Westra W, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996;56:2488–2492. [PubMed: 8653682]
19. Calin, Ga; Ferracin, M.; Cimmino, A., et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005;353:1793–1801. [PubMed: 16251535]
20. Carvalho, Al; Chuang, A.; Jiang, Ww, et al. Deleted in colorectal cancer is a putative conditional tumor-suppressor gene inactivated by promoter hypermethylation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2006;66:9401–9407. [PubMed: 17018594]
21. Carvalho, Al; Jeronimo, C.; Kim, Mm, et al. Evaluation of promoter hypermethylation detection in body fluids as a screening/diagnosis tool for head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008;14:97–107. [PubMed: 18172258]
22. Chen, Cz. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med* 2005;353:1768–1771. [PubMed: 16251533]
23. Clark, Sj; Harrison, J.; Paul, Cl, et al. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 1994;22:2990–2997. [PubMed: 8065911]
24. Colella S, Shen L, Baggerly Ka, et al. Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. *Biotechniques* 2003;35:146–150. [PubMed: 12866414]
25. Coon, Sw; Saveria, At; Zarbo, Rj, et al. Prognostic implications of loss of heterozygosity at 8p21 and 9p21 in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2004;111:206–212.
26. Costello, Jf; Fruhwald, Mc; Smiraglia, Dj, et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nature Genet* 2000;24:132–138. [PubMed: 10655057]
27. Cummins, Jm; He, Y.; Leary, Rj, et al. The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006
28. Dikshit, Rp; Gillio-Tos, A.; Brennan, P., et al. Hypermethylation, risk factors, clinical characteristics, and survival in 235 patients with laryngeal and hypopharyngeal cancers. *Cancer* 2007;110:1745–1751. [PubMed: 17786935]
29. Dong, Sm; Sun, Di; Benoit, Ne, et al. Epigenetic inactivation of RASSF1A in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:3635–3640. [PubMed: 14506151]
30. Dos Reis, Pp; Poli-Frederico, Rc; Dos Santos, Rm, et al. Distinct regions of loss of heterozygosity on 22q in different sites of head and neck squamous cell carcinomas. *Med Sci Monit* 2002;8:BR89–94. [PubMed: 11889455]
31. Eckhardt F, Lewin J, Cortese R, et al. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat Genet* 2006;38:1378–1385. [PubMed: 17072317]
32. Eder M, Scherr M. MicroRNA and lung cancer. *N Engl J Med* 2005;352:2446–2448. [PubMed: 15944431]

33. Ehrlich M, Nelson Mr, Stanssens P, et al. Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:15785–15790. [PubMed: 16243968]
34. Ehrlich, M. DNA hypomethylation and cancer. In: Ehrlich, M., editor. *DNA alterations in cancer*. Eaton Publishing; Natick, MA: 2000. p. 273-291.
35. El-Naggar, Ak; Lai, S.; Clayman, G., et al. Methylation, a major mechanism of p16/CDKN2 gene inactivation in head and neck squamous carcinoma. *Am J Pathol* 1997;151:1767–1774. [PubMed: 9403727]
36. Estecio, Mr; Youssef, Em; Rahal, P., et al. LHX6 is a sensitive methylation marker in head and neck carcinomas. *Oncogene* 2006;25:5018–5026. [PubMed: 16732332]
37. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 2007;8:286–298. [PubMed: 17339880]
38. Esteller M, Hamilton Sr, Burger Pc, et al. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 1999;59:793–797. [PubMed: 10029064]
39. Ferlay A, Martin B, Pradel P, et al. Influence of grass-based diets on milk fatty acid composition and milk lipolytic system in Tarentaise and Montbeliarde cow breeds. *J Dairy Sci* 2006;89:4026–4041. [PubMed: 16960079]
40. Forozan F, Karhu R, Kononen J, et al. Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends Genet* 1997;13:405–409. [PubMed: 9351342]
41. Franzmann, Ej; Reategui, Ep; Pedroso, F., et al. Soluble CD44 is a potential marker for the early detection of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:1348–1355. [PubMed: 17627000]
42. Freitas, Ma; Sklenar, Ar; Parthun, Mr. Application of mass spectrometry to the identification and quantification of histone post-translational modifications. *J Cell Biochem* 2004;92:691–700. [PubMed: 15211567]
43. Frigola J, Ribas M, Risques Ra, et al. Methylome profiling of cancer cells by amplification of inter-methylated sites (AIMS). *Nucleic Acids Res* 2002;30:e28. [PubMed: 11917034]
44. Gifford G, Paul J, Vasey Pa, et al. The acquisition of hMLH1 methylation in plasma DNA after chemotherapy predicts poor survival for ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004;10:4420–4426. [PubMed: 15240532]
45. Gonzalez, Mv; Pello, Mf; Ablanado, P., et al. Chromosome 3p loss of heterozygosity and mutation analysis of the FHIT and beta-cat genes in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol* 1998;51:520–524. [PubMed: 9797729]
46. Gonzalez, Mv; Pello, Mf; Lopez-Larrea, C., et al. Deletion and methylation of the tumour suppressor gene p16/CDKN2 in primary head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 1997;50:509–512. [PubMed: 9378820]
47. Hanahan D, Weinberg Ra. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57–70. [PubMed: 10647931]
48. Hart, Tc. Applications of molecular epidemiology to head and neck cancer. *Otolaryngol Clin North Am* 1997;30:21–34. [PubMed: 8995134]
49. Hasegawa M, Nelson Hh, Peters E, et al. Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncogene* 2002;21:4231–4236. [PubMed: 12082610]
50. Hashimoto Y, Oga A, Kawauchi S, et al. Amplification of 3q26 approximately qter correlates with tumor progression in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;129:52–56. [PubMed: 11520567]
51. Hatada I, Hayashizaki Y, Hirotsune S, et al. A genomic scanning method for higher organisms using restriction sites as landmarks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:9523–9527. [PubMed: 1946366]
52. He H, Jazdzewski K, Li W, et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:19075–19080. [PubMed: 16365291]
53. Hebert C, Norris K, Scheper Ma, et al. High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer* 2007;6:5. [PubMed: 1722355]
54. Herman, Jg; Graff, Jr; Myohanen, S., et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9821–9826. [PubMed: 8790415]

55. Herman, Jg; Merlo, A.; Mao, L., et al. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995;55:4525–4530. [PubMed: 7553621]
56. Hoa M, Davis SI, Ames SJ, et al. Amplification of wild-type K-ras promotes growth of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2002;62:7154–7156. [PubMed: 12499248]
57. Hogg, Rp; Honorio, S.; Martinez, A., et al. Frequent 3p allele loss and epigenetic inactivation of the RASSF1A tumour suppressor gene from region 3p21.3 in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 2002;38:1585–1592. [PubMed: 12142046]
58. Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005;55:10–30. [PubMed: 15661684]
59. Jenuwein T, Allis Cd. Translating the histone code. *Science* 2001;293:1074–1080. [PubMed: 11498575]
60. Jones, Pa; Baylin, Sb. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3:415–428. [PubMed: 12042769]
61. Kim, Vn; Nam, Jw. Genomics of microRNA. *Trends Genet* 2006;22:165–173. [PubMed: 16446010]
62. Kraunz, Ks; Hsiung, D.; Mcclean, Md, et al. Dietary folate is associated with p16(INK4A) methylation in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2006;119:1553–1557. [PubMed: 16646054]
63. Leemans, Cr; Tiwari, R.; Nauta, Jj, et al. Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor. *Cancer* 1994;73:187–190. [PubMed: 8275423]
64. Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 2002;3:662–673. [PubMed: 12209141]
65. Li E, Bestor Th, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992;69:915–926. [PubMed: 1606615]
66. Lin M, Smith Lt, Smiraglia Dj, et al. DNA copy number gains in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2006;25:1424–1433. [PubMed: 16247453]
67. Lu J, Getz G, Miska Ea, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435:834–838. [PubMed: 15944708]
68. Marsit, Cj; Houseman, Ea; Christensen, Bc, et al. Examination of a CpG island methylator phenotype and implications of methylation profiles in solid tumors. *Cancer Res* 2006;66:10621–10629. [PubMed: 17079487]
69. Marsit, Cj; Liu, M.; Nelson, Hh, et al. Inactivation of the Fanconi anemia/BRCA pathway in lung and oral cancers: implications for treatment and survival. *Oncogene* 2004;23:1000–1004. [PubMed: 14647419]
70. Martin C, Zhang Y. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:838–849. [PubMed: 16261189]
71. Martone T, Gillio-Tos A, De Marco L, et al. Association between hypermethylated tumor and paired surgical margins in head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 2007;13:5089–5094. [PubMed: 17785562]
72. Masuda M, Suzui M, Yasumatu R, et al. Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclin D1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2002;62:3351–3355. [PubMed: 12067972]
73. Meltzer, Ps. Cancer genomics: small RNAs with big impacts. *Nature* 2005;435:745–746. [PubMed: 15944682]
74. Nayak, Cs; Carvalho, Al; Jeronimo, C., et al. Positive correlation of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and death-associated protein kinase hypermethylation in head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2007;117:1376–1380. [PubMed: 17592394]
75. Ng, Hh; Bird, A. DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev* 1999;9:158–163. [PubMed: 10322130]
76. Okano M, Bell Dw, Haber Da, et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999;99:247–257. [PubMed: 10555141]

77. Oude Ophuis, Mb; Manni, Jj; Peters, Wh. Glutathione S-transferase T1 null polymorphism and the risk for head and neck cancer. *Acta Otolaryngol* 2006;126:311–317. [PubMed: 16618661]
78. Patel, Am; Incognito, Ls; Schechter, Gl, et al. Amplification and expression of EMS-1 (cortactin) in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Oncogene* 1996;12:31–35. [PubMed: 8552396]
79. Pillai, Rs. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *Rna* 2005;11:1753–1761. [PubMed: 16314451]
80. Rakyan, Vk; Hildmann, T.; Novik, Kl, et al. DNA methylation profiling of the human major histocompatibility complex: a pilot study for the human epigenome project. *PLoS Biol* 2004;2:e405. [PubMed: 15550986]
81. Rauch T, Pfeifer Gp. Methylated-CpG island recovery assay: a new technique for the rapid detection of methylated-CpG islands in cancer. *Lab Invest* 2005;85:1172–1180. [PubMed: 16025148]
82. Rehwinkel J, Behm-Ansmant I, Gatfield D, et al. A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *Rna* 2005;11:1640–1647. [PubMed: 16177138]
83. Righini, Ca; De Fraipont, F.; Timsit, Jf, et al. Tumor-specific methylation in saliva: a promising biomarker for early detection of head and neck cancer recurrence. *Clin Cancer Res* 2007;13:1179–1185. [PubMed: 17317827]
84. Robertson K, Keymars K, Gonzales F, et al. Differential mRNA expression of the human DNA methyltransferase (DNMTs)1, 3a and 3b during the Go/G₁ to S phase transition in normal and tumor cells. *Nucleic Acids Research* 2000;28:2108–2113. [PubMed: 10773079]
85. Rosas, Sl; Koch, W.; Da Costa Carvalho, Mg, et al. Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 2001;61:939–942. [PubMed: 11221887]
86. Rountree, Mr; Bachman, Ke; Baylin, Sb. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* 2000;25:269–277. [PubMed: 10888872]
87. Saito Y, Liang G, Egger G, et al. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 2006;9:435–443. [PubMed: 16766263]
88. Santos-Rosa H, Caldas C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer* 2005;41:2381–2402. [PubMed: 16226460]
89. Sengupta S, Chakrabarti S, Roy A, et al. Inactivation of human mutL homolog 1 and mutS homolog 2 genes in head and neck squamous cell carcinoma tumors and leukoplakia samples by promoter hypermethylation and its relation with microsatellite instability phenotype. *Cancer* 2007;109:703–712. [PubMed: 17219447]
90. Shen L, Catalano Pj, Benson Ab 3rd, et al. Association between DNA methylation and shortened survival in patients with advanced colorectal cancer treated with 5-fluorouracil based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2007;13:6093–6098. [PubMed: 17947473]
91. Singh B, Stoffel A, Gogineni S, et al. Amplification of the 3q26.3 locus is associated with progression to invasive cancer and is a negative prognostic factor in head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Pathol* 2002;161:365–371. [PubMed: 12163360]
92. Singh M, Shah Pp, Singh Ap, et al. Association of genetic polymorphisms in glutathione S-transferases and susceptibility to head and neck cancer. *Mutat Res* 2008;638:184–194. [PubMed: 18035380]
93. Smiraglia, Dj; Fruhwald, Mc; Costello, Jf, et al. A new tool for the rapid cloning of amplified and hypermethylated human DNA sequences from restriction landmark genome scanning gels. *Genomics* 1999;58:254–262. [PubMed: 10373323]
94. Smiraglia, Dj; Plass, C. The study of aberrant methylation in cancer via restriction landmark genomic scanning. *Oncogene* 2002;21:5414–5426. [PubMed: 12154404]
95. Smiraglia, Dj; Smith, Lt; Lang, Jc, et al. Differential targets of CpG island hypermethylation in primary and metastatic head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *J Med Genet* 2003;40:25–33. [PubMed: 12525538]
96. Smith, Lt; Lin, M.; Brena, Rm, et al. Epigenetic regulation of the tumor suppressor gene TCF21 on 6q23-q24 in lung and head and neck cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:982–987. [PubMed: 16415157]

97. Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, et al. A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genet* 2002;31:141–149. [PubMed: 11992124]
98. Takebayashi S, Hickson A, Ogawa T, et al. Loss of chromosome arm 18q with tumor progression in head and neck squamous cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;41:145–154. [PubMed: 15287027]
99. Tan D, Wiseman S, Zhou Y, et al. Definition of a region of loss of heterozygosity at chromosome 11q23.3–25 in head and neck squamous cell carcinoma using laser capture microdissection technique. *Diagn Mol Pathol* 2004;13:33–40. [PubMed: 15163007]
100. Taylor, Kh; Kramer, Rs; Davis, Jw, et al. Ultradeep bisulfite sequencing analysis of DNA methylation patterns in multiple gene promoters by 454 sequencing. *Cancer Res* 2007;67:8511–8518. [PubMed: 17875690]
101. Vasudevan S, Tong Y, Steitz Ja. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 2007;318:1931–1934. [PubMed: 18048652]
102. Vokes, Ee; Weichselbaum, Rr; Lippman, Sm, et al. Head and neck cancer. *N Engl J Med* 1993;328:184–194. [PubMed: 8417385]
103. Waber P, Dlugosz S, Cheng Qc, et al. Genetic alterations of chromosome band 9p21-22 in head and neck cancer are not restricted to p16INK4a. *Oncogene* 1997;15:1699–1704. [PubMed: 9349503]
104. Weber A, Hengge Ur, Bardenheuer W, et al. SOCS-3 is frequently methylated in head and neck squamous cell carcinoma and its precursor lesions and causes growth inhibition. *Oncogene* 2005;24:6699–6708. [PubMed: 16007169]
105. Weber M, Davies Jj, Wittig D, et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet* 2005;37:853–862. [PubMed: 16007088]
106. Winn, Dm; Blot, Wj; McLaughlin, Jk, et al. Mouthwash use and oral conditions in the risk of oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1991;51:3044–3047. [PubMed: 2032242]
107. Woenckhaus J, Steger K, Werner E, et al. Genomic gain of PIK3CA and increased expression of p110alpha are associated with progression of dysplasia into invasive squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2002;198:335–342. [PubMed: 12375266]
108. Xiong Z, Laird Pw. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* 1997;25:2532–2534. [PubMed: 9171110]
109. Yan, Ps; Wei, Sh; Huang, Th. Differential methylation hybridization using CpG island arrays. *Methods Mol Biol* 2002;200:87–100. [PubMed: 11951657]

Abbildung 1. Chemische Formeln des Cytosins und 5-Methylcytosins, sowie Enzyme die für die DNA Methylierung und Demethylierung mitverantwortlich sind
Siehe Text für weitere Erklärungen.

A.

Offenes Chromatin:
Keine DNA Methylierung
Transkriptions aktiv

B.

Kondensiertes Chromatin:
DNA Methylierung
Transkriptions negative

Abbildung 2. Schematische Darstellung der epigenetischen Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens durch DNA Methylierung und Histon Modifikationen

A. Offenes Chromatin co-lokalisiert mit unmethylierter DNA und erlaubt eine aktive Transkription von Gensequenzen.

B. Kondensiertes Chromatin co-lokalisiert mit methylierter DNA und verhindert die Anbindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA. Dieses führt zu einer Inaktivierung von Genen.

Unmethylierte Sequenz

NotI
Restriktionsverdau

Endmarkierung

Gel-
elektrophoresen

Methylierte Sequenz

Normal ↔ Tumor

Abbildung 3. Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS) Analyse von Tumorgenomen für DNA Methylierung

Genomische DNA wird mit dem Restriktionsenzym NotI geschnitten und die Restriktionsüberhänge radioaktiv markiert. Nach einem weiteren Restriktionsverdau werden die DNA Fragmente nach Größe mittels einer Agarose-Gelelektrophorese (1. Dimension) aufgetrennt. Hiernach erfolgt ein weiterer Restriktionsverdau und eine Polyacrylamid Gelelektrophorese (2. Dimension). Die Gele werden getrocknet und auf Röntgenfilmen exponiert. Unten rechts und links sind kleine Ausschnitte aus repräsentativen Gelen von Normalgewebe und Tumorgewebe gezeigt. Die Pfeile deuten auf Unterschiede hin, die auf DNA Methylierung im Tumorgewebe zurückzuführen sind.

Abbildung 4. Übersicht einer umfassenden epigenetischen Studie

In diesem Diagramm ist eine mögliche Strategie für ein epigenetisches Projekt dargestellt, mit dem Biomarker für den klinischen Einsatz identifiziert werden können.

Tabelle 1**Gebräuchliche Methoden zur Messung von DNA Methylierung**

DNA Methylierung	Methode	Messprinzip	Ausgewählte Literatur
Global	RLGS (Restriction Landmark Genomic Scanning)	Verdau mit selten schneidenden, methylierungsspezifischen Restriktionsenzymen und Markierung der Schnittstellen, zweidimensionale Gelelektrophorese der Produkte	[94]
	DMH (Differential Methylation Hybridization)	PCR Amplifikation methylierter DNA Fragmente nach Behandlung genomischer DNA mit methylierungsspezifischen Restriktionsenzymen, Hybridisierung der PCR Produkte auf Arrays mit Sonden für CpG-reiche genomische Sequenzen	[109]
	MIRA (Methylated CpG Island Recovery Assay)	Methylierte CpG Inseln werden aus genomischer DNA über Matrix-fixierte Proteine mit Methyl-CpG-bindenden Domänen isoliert und durch PCR detektiert	[81]
	MeDIP (methylated DNA immunoprecipitation)	Methylierte DNA wird mittels 5- Methylcytosin-spezifischen Antikörpern aufgespürt, via Immunpräzipitation isoliert und durch PCR detektiert	[105]
	Large-scale bisulfite sequencing	Direkte Sequenzierung von Bisulfit- vorbehandelten PCR-Produkten	[100]
	AIMS (Amplification of Inter-methylated Sites)	Differentielles Schneiden durch isoschizomere Restriktionsenzyme mit unterschiedlicher Methylierungs- sensitivität, Ligation von spezifischen Adaptersequenzen an die daraus entstehenden methylierten DNA-Enden, PCR Amplifikation der ligierten Fragmente	[43]
Genspezifisch	COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis)	Bisulfit-behandelte DNA wird mit methylierungsspezifischen Restriktionsenzymen verdaut, Verlust der Schnittstelle bei Umwandlung von unmethyliertem Cytosin in Thymidin, Agarosegel zur Analyse von Restriktionsfragmenten	[108];[14]
	Bisulfit Sequenzierung	Direkte Sequenzierung von Bisulfit- behandelten PCR-Produkten	[100]
	MassARRAY	Aus Bisulfit-behandelter genomischer DNA werden durch Basen-spezifisches Schneiden Fragmente hergestellt und massenspektrometrisch (MALDI-TOFF) analysiert	[33]
	MSP (Quantitative methylation-specific PCR)	Sequenzunterschiede aus Bisulfit- Behandlung werden für PCR mit methylierungsspezifischen Primern genutzt	[54]
	Pyrosequencing	Nach Bisulfit-Behandlung der DNA erfolgt Pyrosequenzierung, ein Verfahren bei dem von einem Primer aus die Strangverlängerung Nukleotid um Nukleotid erfolgt und die Zugabe des komplementären Nukleotids ein Chemilumineszenz-Signal auslöst	[24]

Tabelle 2

Gene mit hypermethylierten CpG Inseln bei HNSCC

Studien	Anzahl der analysierten HNSCC	Beobachtete Fälle mit Hypermethylierung	Gene*
[69]	89	15%	<i>FANCF</i>
[104]	94	11 – 90%	<i>SOCS3, SOCS1</i>
[68]	346	bei 10 Genen $\geq$ 25%	<i>APC, DAPK1, RARB, RASSF1, SFRP1, SFRP2, SFRP4, SFRP5, CDH1, CDKN2A</i>
[36]	32	66%	<i>LHX6</i>
[20,21]	35–36	15 Gene mit signifikantem Befund	<i>DCC, DAPK1, TIMP3, ESR, CCNA1, CCND2, MINT1, MINT31, CDH1, AIM1, MGMT, CDKN2A, PGP9.5, RARB, HIC1</i>
[96]	21	62%	<i>TCF21</i>
[62]	169	31%	<i>CDKN2A</i>
[41]	11	82%	<i>CD44</i>
[6]	28	68%	<i>C/EBPα</i>
[83]	90	20 – 46%	<i>TIMP3, ECAD, CDKN2A, MGMT, DAPK1, RASSF1</i>
[89]	123	50 – 65%	<i>MLH1, MSH2</i>
[74]	124	72 – 74%	<i>TIMP3, DAPK1</i>
[28]	235	27 – 44%	<i>CDKN2A, MGMT, DAPK1, ECAD</i>
[71]	20	20 – 50%	<i>CDKN2A, DAPK1, MGMT</i>

* Gene mit positivem Befund in mehr als einer Studie sind unterstrichen