Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra antropologie a genetiky člověka

Bakalářská práce

Metylace DNA v genech ovlivňujících rozvoj nádorových onemocnění

Lenka Dušátková

Školitel: RNDr. Lucie Benešová, Ph.D.

Genomac International, s.r.o

Laboratoř molekulární genetiky a onkologie

Praha 2008

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Lucii Benešové, Ph.D. a RNDr. Markovi Minárikovi, Ph.D. za věnovaný čas a cenné rady při zpracování bakalářské práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím veškeré citované literatury.

V Praze dne 22.4.2008

Abstrakt

Metylace DNA je významný epigenetický proces, který se podílí na regulaci transkripce genů v lidském organismu. Během metylace dochází ke kovalentní modifikaci DNA navázáním metylové skupiny na cytozinové zbytky na tzv. CpG dinukleotidech. Ty se hojně nacházejí zejména v promotorových oblastech genů, známých jako CpG ostrůvky. Metylace v těchto oblastech zapříčiní transkripční inaktivaci příslušných genů. Zdá se, že epigenetické změny jsou zodpovědné za vznik a průběh nádorových onemocnění stejně jako genetické alterace. Abnormální metylace určitých genů byla nalezena v mnoha nádorových tkáních a to především u tzv. tumor-supresorových genů, jejichž inaktivace vede ke vzniku a rozvoji nádorového bujení. Tato práce se zabývá vlivem hypermetylace těchto genů na nádorová onemocnění, konkrétně na karcinomy plic a kolorekta. Sumarizuje dosavadní poznatky a směry v oblasti aplikovaného výzkumu, který se zabývá významem metylačních markerů a možností jejich využití v klinické praxi.

Klíčová slova: metylace DNA, rakovina plic, rakovina kolorekta, tumor-supresorové geny, metylační markery.

Abstract

DNA methylation is an important epigenetic mechanism involved in regulation of gene transcription. It is covalent modification of human DNA by addition of a methyl group to the cytosine residues at CpG dinucleotides. They are frequently located within the promoter regions of genes, known as CpG islands. Methylation within the islands has been shown to be associated with transcriptional inactivation of the corresponding genes. Epigenetic changes seem to be responsible for carcinogenesis like genetic alternations. Abberant methylation of some genes has been found in many types of tumor tissues, especially of the tumor-suppressor genes because their inactivation lead to tumor growth and development. This thesis is concerned with effect of hypermethylation these genes on cancer, especially on lung and colorectal carcinomas. It summarizes present knowledge and ways in research of methylation markers and the possibilities to use them in clinical practice.

Key words: DNA methylation, lung cancer, colorectal cancer, tumor suppressor genes, methylation markers.

Obsah

Seznam zkratek 5
1. Úvod 7
2. Metylace 8
2.1. Metylace ve zdravých tkáních 11
2.2. Metylace v nádorových tkáních 12
2.2.1. Globální hypometylace 12
2.2.2. Místně-specifická hypermetylace 12
3. Detekce metylace 13
4. Nádorová onemocnění 15
4.1. Rakovina plic 15
4.1.1. Nejčastěji hypermetylované geny v plicních karcinomech 15
4.2. Rakovina tlustého střeva a konečníku 17
4.2.1. CIMP 17
4.2.2. Nejčastěji hypermetylované geny v kolorektálních karcinomech 18
4.3. Funkce genů hypermetylovaných v nádorových tkáních 19
5. Hlavní směry aplikovaného výzkumu hypermetylací 20
5.1. Detekce hypermetylace genů a exprese proteinů 20
5.2. Asociace s mutacemi 21
5.3. Význam hypermetylovaných genů jako molekulárních markerů 22
5.4. Detekce hypermetylovaných genů v tělních tekutinách 24
5.5. Další zkoumané aspekty hypermetylovaných genů 25
5.6. Vliv hypermetylovaných genů na léčbu 26
6. Závěr 27
7. Seznam použité literatury 28

Seznam zkratek

5,10-CH_2-THF	5,10-metylentetrahydrofolát
5mC	5-metylcytozin
ACF	abnormální ohniska střevních krypt (aberrant crypt foci)
AD	adenokarcinom
BS	bisulfidické sekvenování
BSP	PCR pro bisulfidické sekvenování
BRA	bisulfidická restrikční analýza
CH_3	metylová skupina
CIMP	metylátorový fenotyp (CpG island methylator phenotype)
CpG	cytozin v sousedství guaninu
CT	počítačová tomografie
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DNMT	DNA (cytozin-5-)-metyltransferáza
FAP	familiární adenomatózní polypóza
FCC	familiární kolorektální karcinom
HDAC	histonová deacetyláza
HNPCC	hereditární nepolypózní kolorektální karcinom
MBD	vazebná doména pro metylovaný CpG (methyl-CpG-binding domain)
MeCP	vazebný protein pro metylovaný CpG (methyl-CpG-binding protein)
M-fáze	mitotická fáze buněčného cyklu
MMR	mismatch repair (typ opravy DNA)
MSI	mikrosatelitová nestabilita
MSP	metylačně-specifická PCR
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid)
MTHFR	(5,10)- metylentetrahydrofolát reduktáza
NSCLC	nemalobuněčný karcinom plic (non small cell lung cancer)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
QMSP	kvantitativní metylačně-specifická PCR
SAH	S-adenosylhomocystein
SAM	S-adenosylmetionin
SCLC	malobuněčný karcinom plic (small cell lung cancer)
SQ	skvamózní karcinom

Geny

APC	adenomatous polyposis coli
BRCA1	breast cancer 1, early onset
CDH1	cadherin 1, E-cadherin (epithelial)
CDH13	cadherin 13, H-cadherin (heart)
CDKN2A/p16	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16)
CDKN2A/p14	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p14)
CHFR	checkpoint with fork-head associated and ring finger
DAPK	death-associated protein kinase 1
FHIT	fragile histidine triad gene
GSTP1	glutathione S-transferase pi
hMLH1	mutL homolog 1
MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
THBS1	thrombospondin 1
TP53	tumor protein p53
RASSF1A	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 1
SFN	stratifin
RARβ	retinoic acid receptor, beta

1. Úvod

Nádorová onemocnění jsou velmi nebezpečná onemocnění, která spolu s kardiovaskulárními chorobami patří mezi nejčastější příčiny úmrtí u nás i ve světě. Vyznačují se nekontrolovatelným buněčným dělením a schopností nádorových buněk infiltrovat do okolních tkání. Za vznik rakoviny jsou zodpovědné změny na úrovni DNA způsobené genetickými a vnějšími faktory. Bylo zjištěno, že do nádorového bujení mohou být zapojeny také epigenetické mechanizmy. Jedná se o procesy, při kterých se nemění primární struktura DNA, tedy sekvence nukleotidů, ale dochází k modifikaci DNA nebo chromatinové struktury a to zapříčiní změnu v expresi genu. Mezi nejdůležitější epigenetické mechanizmy patří metylace DNA. Jde o chemickou modifikaci DNA, při které dojde k navázání CH_3 skupiny na cytozin na CpG dinukleotidech. Ty se vyskytují v zdravém lidském genomu zřídka a jsou téměř vždy metylované. Výjimku tvoří speciální oblasti s vysokou frekvencí CpG dinukleotidů, tzv. CpG ostrůvky, které jsou zpravidla nemetylované. CpG ostrůvky se nacházejí hlavně v promotorových oblastech genů a jejich metylace způsobí transkripční inaktivaci příslušného genu. V lidském organismu existují geny, o nichž se ví, že jejich poškození vede k nádorovému bujení, jde o tzv. tumor-supresorové geny. Předpokládá se tedy, že inaktivace těchto genů způsobená metylací je jednou z příčin vzniku a rozvoje nádorových onemocnění.

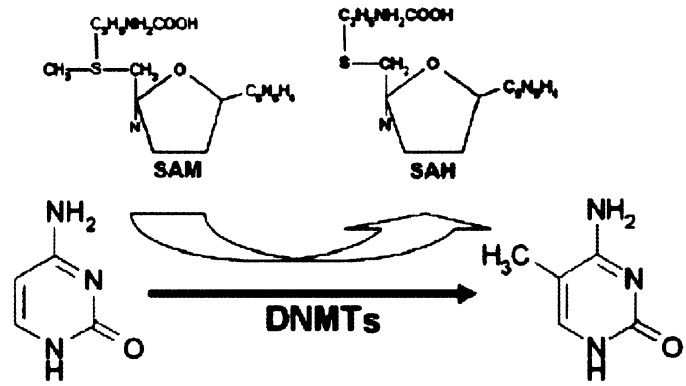
Tato práce se zabývá vlivem metylace DNA na nádorová onemocnění a zaměřuje se na geny, které jsou v nádorech nejčastěji metylovány a to speciálně v karcinomech plic a kolorekta. Jsou zde nastíněny směry současných výzkumů, které se zabývají významem metylace těchto genů a možností jejich dalšího využití v klinické praxi, jako je stanovení prognózy choroby, včasná diagnóza a možnost návratu rakoviny či předpověď účinnosti léčby.

2. Metylace

Metylace DNA patří mezi epigenetické procesy. Jedná se o děje, které jsou dědičné, ale ne podle klasických Mendelových zákonů. Jde o informace, které nevypovídají o základní struktuře DNA, ale o stupni genové exprese v jednotlivých částech DNA. K epigenetickým změnám dochází v průběhu ontogeneze a výsledkem jsou odlišné buněčné linie, tkáně i orgány. Jedná se o změny v chromatinové struktuře, v DNA a histonových proteinech. Mezi nejdůležitější epigenetické mechanizmy patří metylace DNA a modifikace histonů, především jejich deacetylace. Oba tyto jevy se podílejí na aktivitě genů i celých chromozomů a rozhodují o jejich transkripční aktivitě (Salozhin *et al*, 2004).

Metylací DNA se rozumí proces, při kterém dochází k připojení metylové skupiny CH_3 na cytozin. Metylová skupina je připojena kovalentní vazbou na uhlík v 5´pozici pyrimidinového kruhu a vzniká 5-metylcytozin (5mC). Metylace probíhá na cytozinech, které jsou v sousedství s guaninem, na tzv. CpG dinukleotidech. Ty se v lidském genomu nacházejí v poměrně malém množství, pravděpodobně proto, že může docházet ke spontánní deaminaci 5mC na tymin (Strathdee a Brown, 2002). CpG dinukleotidy bývají ve zdravém organismu metylovány asi ze 70% (Kress *et al*, 2001). Výjimkou jsou tzv. CpG ostrůvky, malé oblasti lidského genomu, velké od 0,5 do 5 kb a bohaté na CpG dinukleotidy. V lidském genomu se nachází přibližně 30 000 CpG ostrůvků a 50 až 60% z nich je asociováno s geny, především s jejich promotorovými oblastmi. CpG ostrůvky jsou ve zdravých tkáních nemetylované. Jejich abnormální metylace způsobí změny v transkripční aktivitě příslušných genů a to může být jedním z důvodů vzniku nádorového bujení (Strathdee a Brown, 2002).

Hlavním donorem metylové skupiny je S-adenosylmetionin (SAM). Reakce je katalyzovaná enzymem DNA metyltransferázou (DNMTs) a vzniká 5mC a S-adenosylhomocystein (SAH) (obr.1).

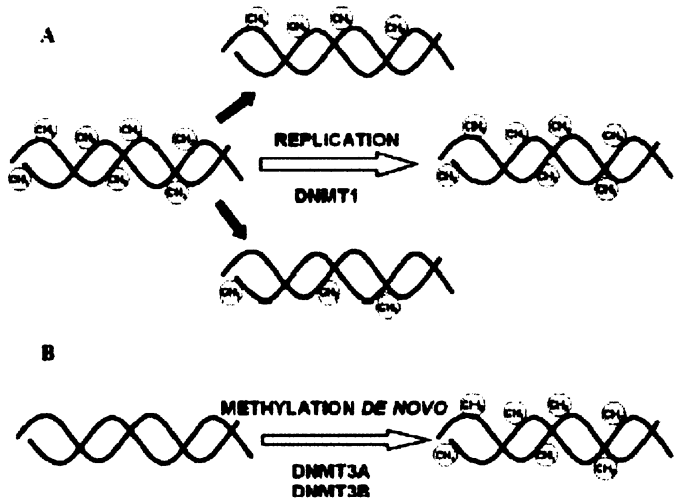


Obr.1: Metylace cytozinu na 5-metylcytozin (Luczak a Jagodziński, 2006).

Tato reakce je součástí řetězce reakcí metabolismu uhlíku 1, který zahrnuje syntézu purinu a tymidinu a také syntézu metioninu a SAM, který se podílí na metylačních reakcích. Hlavním enzymem, zprostředkovávajícím přenos metylové skupiny z jedné části cyklu do druhé, je metylentetrahydrofolát reduktáza (MTHFR), která konvertuje 5,10-metylentetrahydrofolát (5,10-CH_2-THF) na 5-metyl-THF a ten se stává donorem metylové skupiny pro přeměnu homocysteinu na metionin. Celý tento cyklus je závislý na bioaktivních látkách jako je kyselina listová (folát), vitamín B12 nebo metionin (Ulrey *et al*, 2005). Předpokládá se tedy, že i tyto látky mohou přispět ke vzniku rakoviny a to jak globální hypometylací, tak místně-specifickou hypermetylací. Příkladem je folát, kdy bylo prokázáno, že jeho nedostatek způsobuje globální hypometylaci, ale zároveň hypermetylaci regulační oblasti genu CDH13 (Jhaveri *et al*, 2001).

K metylačním změnám v lidském genomu dochází během embryonálního vývoje. Spermie i vajíčka mají genom téměř celý metylovaný. Oplodnění odstartuje proces globální demetylace a následné *de novo* metylace. Hlavní změny v metylaci DNA jsou dokončeny během uhnízdění embrya do děložní sliznice. O poznání méně metylačních změn probíhá v pozdních fázích vývoje zárodku. Jde především o změny během organogeneze, kdy dochází ke tkáňově-specifické expresi (Salozhin *et al*, 2004). K dalším metylačním modifikacím dochází v průběhu života už jen vzácně. Hovoří se o zvýšení metylace některých genů během stárnutí a o změnách v metylaci způsobených příjmem živin, které jsou klíčové pro metylační metabolismus. Defekty v rámci tohoto metabolismu mohou způsobit kardiovaskulární a nervové choroby (Ulrey *et al*, 2005). A v neposlední řadě může abnormální metylace DNA podnítit proces karcinogeneze (Salozhin *et al*, 2004).

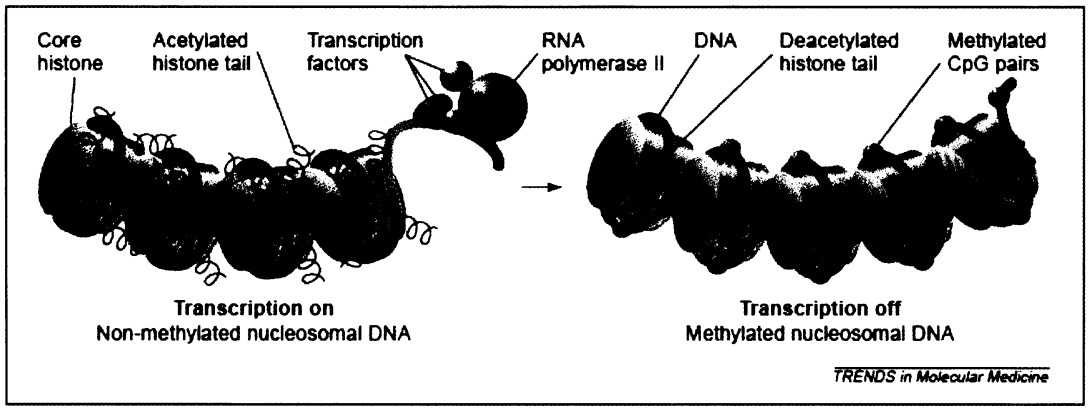
Předávání metylačních vzorů dalším buňkám během dělení probíhá prostřednictvím enzymů DNA metyltransferáz (DNMTs), které katalyzují přenos metylové skupiny na cytozinový zbytek. Jejich dvě hlavní funkce spočívají v rozpoznání specifických DNA sekvencí a katalýze samotného přenosu metylové skupiny. Existuje více typů DNMTs. Udržovací DNMT1 je zodpovědná za zachování metylačního vzoru během replikace DNA, kde katalyzuje metylaci na nově syntetizovaném řetězci DNA. DNMT3A a DNMT3B patří mezi *de novo* metyltransferázy, které zprostředkovávají *de novo* metylaci a jsou využívány především při opětovné metylaci v ranné fázi embryonálního vývoje (Obr.2) (Okano *et al*, 1998 v Salozhin *et al*, 2004).



Obr. 2: Rozdíl mezi DNA metyltransferázami DNMT1 a DNMT3A/B. A) Udržovací DNMT1 metyluje hemimetylovanou DNA v průběhu replikace. B) *de novo* DNMT3A, DNMT3B přidávají metylovou skupinu na nemetylovanou DNA (Luczak a Jagodziński, 2006).

Důležitost metylace spočívá v tom, že je to významný faktor při kontrole genové exprese. Genovou expresí rozumíme přeměnu genu (sekvence DNA) na genový produkt (protein), která zahrnuje děje jako je transkripce, translace i posttranslační modifikace. Metylace DNA způsobuje represi transkripce dvěma mechanizmy. Prvním z nich je přímé zabránění vazby transkripčních faktorů na sekvence DNA obsahující CpG dinukleotidy. Druhým způsobem je inhibice transkripce prostřednictvím speciálních transkripčních inhibitorů, které rozpoznají metylovanou DNA a naváží se na ni. Jedná se o tzv. MBD (methyl-DNA-binding domain) proteiny, které jsou schopny se specificky vázat na metylované CpG místa na DNA. Některé z těchto proteinů (MBD2, MBD3 a MeCP) vytváří komplexy s histonovými deacetylázami (HDACs) a společně se podílejí na deaktivaci chromatinu. HDACs katalyzují deacetylaci histonů

a tím obnovují pozitivní náboj lyzinových zbytků na N-koncových částech aminokyselin histonů. Dojde tak ke zpevnění vazby mezi DNA a histony a chromatin se stává transkripčně inaktivní (Obr. 3) (Brown a Strathdee, 2002).



Obr. 3: Změny chromatinové struktury po epigenetických modifikacích. Transkripčně aktivní chromatinová strukura má nemetylovanou nukleozomální DNA, histonové zbytky jsou acetylované. Na DNA se váží transkripční faktory a RNA polymeráza II může začít přepisovat geny. Po epigenetických modifikacích jsou CpG ostrůvky na nukleozomální DNA metylovány, s čímž souvisí i deacetylace histonů a to vede ke ztrátě transkripční aktivity chromatinu (Brown a Strathdee, 2002).

2.1. Metylace ve zdravých tkáních

Jak již bylo zmíněno, k metylačním změnám v lidském genomu dochází především v ranných fázích embryonálního vývoje, kde jsou nezbytné pro správné nastavení genové exprese ve vyvíjejícím se organismu. Pozdější změny jsou vzácné a často souvisí s patogenezí organismu. Výjimkou jsou úseky genomu, které je nutno udržet v inaktivním stavu, jako jsou introny, repetitivní sekvence či retrotranspozomy (Adams, 1990). Dále se metylace CpG ostrůvků vyskytuje ve zdravém lidském organismu ve dvou případech. Za prvé jde o inaktivaci samičího X-chromozomu metylací příslušných genů, protože je potřeba kompenzovat genovou výbavu obou pohlaví (Heard *et al*, 1997). Druhým případem je genový imprinting, kde jsou exprimovány pouze geny od otce nebo od matky a druhá alela je utišena právě díky metylaci (Bartoloměj a Tilghman, 1997).

2.2. Metylace v nádorových tkáních

2.2.1. Globální hypometylace

Ztráta metylace v normálně metylovaných oblastech lidského genomu se nazývá globální hypometylace. V nádorových tkáních byla hypometylace pozorována v sekvencích, které bývají normálně silně metylovány, ať už jde o heterochromatinové repetice, retrotranspozomy nebo endogenní retrovirové elementy. Zkoumá se možnost vlivu globální hypometylace na chromozomovou stabilitu. Chromozomální aberace jsou totiž také časté příčiny karcinogeneze. Hovoří se také o aktivaci potencionálních onkogenů, způsobenou jejich demetylací. Přes tyto poznatky je otázka hypometylace v nádorových onemocněních stále nejasná a je potřeba dalšího zkoumání k jejímu objasnění (Ehrlich, 2002).

2.2.2. Místně-specifická hypermetylace

Místně-specifická hypermetylace je prozkoumána mnohem více. Jedná se o metylaci CpG ostrůvků v regulačních oblastech genů, které bývají v normálních tkáních nemetylované. Dochází tak k transkripční inaktivaci a geny nemohou správně plnit svou funkci.

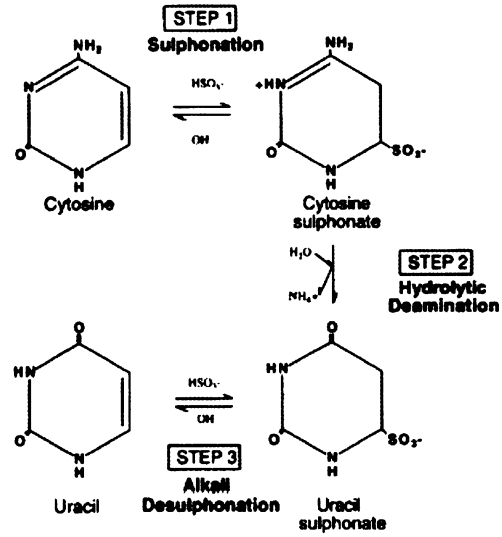
V nádorových tkáních bylo objeveno velké množství genů s abnormální metylací. Jsou to především tzv. tumor-supresorové geny, jejichž inaktivace, ať už je dána mutací či epigenetickou změnou, vede k nádorovému bujení. Tyto geny se účastní regulace buněčného cyklu (CDKN2A/p14, CDKN2A/p16), reparace DNA (MGMT, hMLH1, BRCA1), apoptózy (DAPK), adheze a metastáze (CDH1, CDH13), biotransformace (GSTP1), signální transdukce (RARβ, APC), rezistence vůči lékům, diferenciace, detoxifikace a dalších (Das a Singal, 2004).

Hypermetylace je děj místně-specifický, to znamená, že probíhá pouze v místech CpG ostrůvků. Jedná se ale také o jev tkáňově-specifický. Existují geny, které byly nalezeny metylovány v téměř všech nádorových tkáních, ale i geny, které jsou typické pouze pro určitý nádor. Příkladem je gen CDKN2A/p16, regulátor buněčného cyklu, jehož aberantní metylace byla nalezena ve více nádorových tkáních (Herman *et al*, 1995). Naopak hypermetylace genu GSTP1 je úzce spojena s karcinomem prostaty (Singal *et al*, 2001).

3. Detekce metylace

V současné době existuje několik metod používaných k odhalení metylovaných CpG ostrůvků v promotorových oblastech genů. Z dnešního pohledu již klasickou a překonanou metodou je analýza pomocí restrikčních enzymů. Restriktáza specificky štěpí nemetylovanou DNA a metylovanou DNA nechává neporušenou. Ta je pak detekována pomocí PCR. Nevýhodou této metody je, že DNA může být neúplně rozdělena a vede tak k falešně pozitivním výsledkům (Steigerwald, 1990).

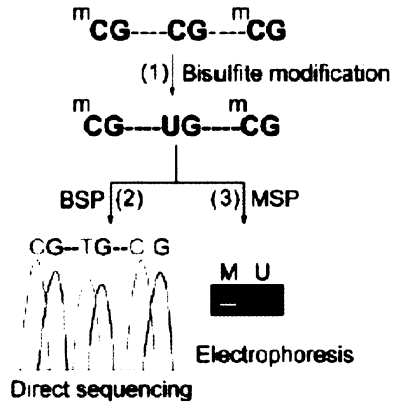
Nejznámější a nejpoužívanější metodou je analýza DNA po konverzi bisulfidem sodným. Jedná se o chemickou modifikaci DNA, během které sledem chemických reakcí dojde k deaminaci cytozinu na uracil, přičemž metylovaný cytozin zůstává nezměněn (Obr.4) (Wang *et al*, 1980).



Obr. 4: Schéma bisulfidické konverze. 1.krok: sulfonace, 2.krok: hydrolytická deaminace, 3.krok: alkalická desulfonace (Clark *et al*, 1994).

Dalším krokem je samotná analýza konvertované DNA a to nejčastěji dvěma způsoby. První se nazývá metylačně-specifická PCR (MSP). Pomocí vhodně navržených primerů se rozliší metylovaný a nemetylovaný úsek DNA. Jsou tedy potřeba dvě sady primerů, které obsahují co nejblíže svého 3´ konce CpG páry pro metylovanou DNA a pro nemetylovanou DNA na stejném místě TpG páry. Podle toho, s jakými primery vznikne produkt, se zjistí, zda je daný úsek metylovaný nebo nemetylovaný (Obr. 5). Oba tyto primery také musí amplifikovat stejné místo na DNA, jinak by to nevedlo k optimálním výsledkům. (Herman *et al*, 1996).

Druhou metodou je bisulfidické sekvenování, kde je přímo detekován cytozin v případě jeho metylace v původní DNA nebo tymin, pokud nebyl cytozin v původní DNA metylován (Obr.5). Primery pro sekvenování nesmí na rozdíl od MSP nasedat na oblast s CpG dinukleotidy, aby PCR fungovala v případě metylované i nemetylované DNA. Vzniklý PCR produkt by měl ideálně pokrývat úsek s co největším početm CpG míst. Bisulfidické sekvenování má oproti MSP tu výhodu, že umožňuje sledovat delší sekvence DNA s větším počtem CpG dinukleotidů. Naopak nevýhodou je potřeba většího množství vstupní DNA, jelikož během konverze bisulfidem sodným dochází často ke ztrátám (Frommer *et al*, 1992). Nejkritičtějším bodem analýz metylací je navržení vhodných primerů. Optimálně by měl mít PCR produkt velikost kolem 200 bp a primery 25 bp (Li a Dahiya, 2002).



Obr. 5: Schéma bislufidického sekvenování a MSP. 1) Modifikace DNA bisulfidem sodným. 2) PCR pro bisulfidické sekvenování (BSP). 3) Metylačně-specifická PCR (MSP), M-metylovaná DNA, U-nemetylovaná DNA (Li a Dahiya, 2002).

Dále se používají variace techniky konverze, uzpůsobené ke kvantitativní analýze metylací jako je MethylLight, využívající fluorescenčně značenou real-time PCR (Eads *et al*, 2000). Na podobném principu funguje i MethylQuant (Thomassin, 2004) či HeavyMethyl (Cottrell, 2004).

Pracuje se na dalších metodách, které by umožnily přesnou a snadnou detekci metylovaných CpG ostrůvků. Jednou z možností je využití rekombinantních proteinů nesoucích MBD domény, což umožní snazší detekci metylované DNA (Gebhard, 2006; Rauch a Pfeifer, 2005). Metoda COMPARE-MS kombinuje využití těchto proteinů s restrikčními enzymy (Yegnasubramanian *et al*, 2006).

4. Nádorová onemocnění

4.1. Rakovina plic

Rakovina plic je jedním z nejrozšířenějších nádorových onemocnění u obou pohlaví a u nás i ve světě představuje velmi závažný celospolečenský problém. Podle mezinárodních statistik z roku 2006 byla nejčastěji se vyskytujícím nádorovým onemocněním rakovina prsu (13,5% ze všech typů rakoviny), následovala rakovina tlustého střeva (12,9%) a rakovina plic (12,1%), která byla zároveň nejčastější příčinou úmrtí (až pětina ze všech úmrtí na nádory). I v České republice se rakovina plic řadí na třetí místo v incidenci (98,4/100.000 u mužů a 24,9/100.000 u žen) a na první místo v počtu úmrtí na nádorová onemocnění (Ferlay *et al*, 2006).

Objevuje se především u mužů, ale i u žen výskyt v poslední době prudce stoupá. Hlavní příčina je všeobecně známá, jedná se o kouření. To, že je rakovina plic často smrtelná, je v důsledku stanovení diagnózy až v pokročilých stádiích nemoci, kdy už jsou šance na uzdravení velmi nízké. V brzkých stádiích choroby je odhaleno pouze 15 až 20% případů. Vyšetření se provádí hlavně využitím rentgenových snímků, mezi modernější a přesnější metody patří počítačová tomografie (CT) (Votruba, 2007). Nyní se uvažuje o molekulárně-genetických metodách, které by umožnily detekci přítomnosti nádoru záchytem specifických nádorových markerů z tělních tekutin, především z krve, v počátcích rozvoje nádorového onemocnění nebo u rekurentního karcinomu. Jednou z cest by mohla být právě přítomnost metylovaných genů, které by sloužily jako markery k detekci karcinomu.

Karcinomy plic jsou děleny do 2 histologických skupin: na nemalobuněčné karcinomy plic (non small cell lung cancer, NSCLC) a malobuněčné karcinomy plic (small cell lung cancer, SCLC), které jsou méně časté. Nemalobuněčné karcinomy se dále dělí na karcinomy skvamózní, adenokarcinomy a velkobuněčné karcinomy. Všechny tyto typy mají různé biologické vlastnosti a proto se i jejich zkoumané markery mohou lišit (Šimíčková, 2005).

4.1.1. Nejčastěji hypermetylované geny v plicních karcinomech

U rakoviny plic bylo objeveno více než 40 hypermetylovaných genů. Mezi nejčastěji studované geny patří: CDKN2A/p16, RASSF1A, DAPK, RARβ, MGMT, FHIT, APC a geny z rodiny cadherinů (CDH1, CDH13). Všechny tyto geny se v tumorech vyskytují obvykle metylované

z více jak 20% (Tab.1). Zkoumají se i další geny, které zatím nejsou tak často zmiňované a jejichž aberantní hypermetylace by mohla mít také význam v nádorovém procesu, například CHFR a SFN (Corn *et al*, 2003; Mizuno *et al*, 2002; Osada *et al*, 2002; Ramirez *et al*, 2005).

Nejčastěji hypermetylované geny v plicních karcinomech					
gen	**%metylace[1]**	**počet pacientů**	**typ nádoru[2]**	**technika[3]**	**reference**
APC	72	90	NSCLC (stage I)	QMSP	Harden *et al*, 2003
	24	105	NSCLC	MSP	Safar *et al*, 2005
CDH1	58	224	NSCLC	MSP	Nakata *et al*, 2006
	18	107	NSCLC	MSP	Zöchbauer-Müller *et al*, 2001
	66	105	NSCLC	MSP	Safar *et al*, 2005
CDH13	43	305	NSCLC	MSP	Kim J.S. *et al*, 2005
	42	335	NSCLC	MSP	Kim *et al*, 2006
	44	63	NSCLC(AD+SQ)	nested MSP	Hsu *et al*, 2007
CDKN2A/ p16	21,9	224	NSCLC	MSP	Nakata *et al*, 2006
	51	237	NSCLC (AD)	MSP	Divine *et a*l, 2005
	35	335	NSCLC	MSP	Kim *et al*, 2006
	17	90	NSCLC (stage I)	QMSP	Harden *et al*, 2003
	25	107	NSCLC	MSP	Zöchbauer-Müller *et al*, 2001
	53	63	NSCLC(AD+SQ)	nested MSP	Hsu *et al*, 2007
	39	105	NSCLC	MSP	Safar *et al*, 2005
DAPK	36	206	NSCLC (AD)	MSP	Divine *et al*, 2005
	17	90	NSCLC (stage I)	QMSP	Harden *et a*l, 2003
	19	107	NSCLC	MSP	Zöchbauer-Müller *et al*, 2001
	23	105	NSCLC	MSP	Safar *et al*, 2005
FHIT	52,2	224	NSCLC	MSP	Nakata *et al*, 2006
	21	335	NSCLC	MSP	Kim *et al*, 2006
	39	63	NSCLC(AD+SQ)	nested MSP	Hsu *et al*, 2007
MGMT	16	90	NSCLC (stage I)	QMSP	Harden *et al*, 2003
	21	107	NSCLC	MSP	Zöchbauer-Müller *et al*, 2001
	10	105	NSCLC	MSP	Safar *et al*, 2005
	38	90	NSCLC	MSP	Brabender *et al*, 2003
RASSF1A	33	242	NSCLC	MSP	Kim *et al*, 2003
	38	209	NSCLC (AD)	MSP	Divine *et al*, 2005
	48	63	NSCLC(AD+SQ)	nested MSP	Hsu *et al*, 2007
	15	105	NSCLC	MSP	Safar *et al*, 2005
RARβ	39	335	NSCLC	MSP	Kim *et al*, 2006
	40	107	NSCLC	MSP	Zöchbauer-Müller *et a*l, 2001
	54	63	NSCLC(AD+SQ)	nested MSP	Hsu *et al*, 2007

Tab. 1: Nejčastější hypermetylované geny v plicních karcinomech. 1) Procento výskytu hypermetylovaného genu ve sledovaných tkáních pacientů. 2) Histologický typ nádorové tkáně: nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC), adenokarcinom (AD), skvamózní karcinom (SQ). 3) Technika použitá k detekci metylace: metylačně-specifická PCR (MSP), fluorogenní real-time MSP (QMSP).

4.2. Rakovina tlustého střeva a konečníku

Kolorektální karcinom je druhé nejčastěji se vyskytující nádorové onemocnění u nás i v Evropě a patří i mezi druhou nejčastější příčinu úmrtí na nádory. Česká republika se dokonce řadí na 2. místo v Evropě co do výskytu tohoto nádorového onemocnění (Ferlay *et al*, 2006). Na rozdíl od karcinomu plic je zde hlavním rizikovým faktorem strava a většinou toto onemocnění vzniká až po 50. roce života. Přibližně 15% kolorektálních karcinomů je dědičných. Jedná se o familiární adenomatózní polypózu (FAP), hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC) a tzv. familiární kolorektální karcinom (FCC). Většina kolorektálních karcinomů je ale sporadická, což znamená, že vzniká na základě působení vnějších faktorů, nikoliv kvůli dědičným předpokladům (Kiss a Tomášek, 2007).

Naprostou většinu nádorů tlustého střeva tvoří sporadické adenokarcinomy, což jsou nádory vznikající ze žlaznatých buněk střevní sliznice. Některé adenokarcinomy mohou vznikat z adenomových polypů, výrustků stěn střeva a posléze metastázovat do dalších orgánů (Kiss a Tomášek, 2007).

Jako u všech nádorových onemocnění jsou největší šance na uzdravení při záchytu nemoci v časných stádiích, u kolorektálních karcinomů tomu bývá asi u poloviny případů. Detekce není tak obtížná jako u karcinomu plic, k vyšetření se používá řada metod jako je kolonoskopie, CT či ultrazvuk břicha. (Kiss a Tomášek, 2007). A podobně jako u karcinomu plic se nyní zkoumá i možnost využití molekulárně-genetických markerů k diagnostice.

4.2.1. CIMP

U kolorektálních tumorů byl v souvislosti s metylací zaveden pojem metylátorový fenotyp (CpG island methylator phenotype, CIMP). Nádorové tkáně s CIMP+ vykazují vysoký stupeň metylace ve vybraných modelových genech. Pozitivní metylátorový fenotyp se vyskytuje přibližně u 30% kolorektálních karcinomů (Van Rijnsoever, 2003). Naopak CIMP- značí takové tumory, u kterých se metylace vyskytuje jen výjimečně. Studie zabývající se metylátorovým fenotypem si zvolí paletu genů, na základě kterých stanoví metylační stav nádorové tkáně (Toyota *et al*, 1999). Následně se zjišťují souvislosti s tím spojené, jako je možnost detekce ranných stádií nádoru z krve, prognózu choroby, vliv na léčbu nebo asociace s obvyklými kolorektálními mutacemi. Geny, které určují CIMP, se mírně liší, hlavním kritériem je, aby byly v normální tkáni

nemetylované. Nejčastěji to bývají klasické tumor-supresorové geny CDKN2A/p16, MGMT, hMLH, CDKN2A/p14 a DAPK (Anacleto *et al*, 2005, Marsit *et al*, 2006). CIMP byl vyšetřován i v dalších nádorových tkáních, ale nefungoval stejně jako u kolorektálních tumorů. Jelikož je metylační proces specifický, nelze jej aplikovat obecně na jakoukoliv nádorovou tkáň (Marsit *et al*, 2006).

4.2.2. Nejčastěji hypermetylované geny v kolorektálních karcinomech

Nejčastější hypermetylované geny, které byly objeveny v kolorektálních tumorech jsou CDKN2A/p16, hMLH1 a MGMT a v o něco menším zastoupení CDKN2A/p14, APC a DAPK (Tab.2). Uplatňují se nejen ke stanovení CIMP, jak je uvedeno výše, nebo k vyšetřování účinků metylovaných genů jednotlivě. A jsou objevovány další geny, například CHFR, který byl nalezen metylovaný v plicních i kolorektálních tumorech (Corn *et al*, 2003).

Nejčastěji hypermetylované geny v kolorektálních karcinomech

gen	% metylace[1]	počet pacientů	typ nádoru[2]	technika[3]	reference
APC	18	39	karcinom	MethyLight	Chen *et al*, 2005
	18	108	karcinom	MSP, BS	Esteller *et al*, 2000
	18	48	adenom	MSP, BS	Esteller *et al*, 2000
CDKN2A/p16	21	66	karcinom	MSP	Bazan *et al*, 2006
	36	206	karcinom (T3,T4)	MSP	Van Rijnsoever *et al*, 2003
	18	106	karcinom	MSP	Anacleto *et al*, 2005
	51	47	karcinom	MSP	Krtolica *et al*, 2007
	30	57	karcinom	MSP	Prall *et al*, 2006
	17	188	karcinom	BRA	Shen *et al*, 2007
CDKN2A/p14	16	106	karcinom	MSP	Anacleto *et al*, 2005
	11	188	karcinom	BRA	Shen *et al*, 2007
DAPK	19	106	karcinom	MSP	Anacleto *et al*, 2005
	81	22	karcinom (T1)	MSP	Mittag *et al*, 2006
hMLH1	14	21	karcinom	MSP	Strazzullo *et al*, 2003
	17	106	karcinom	MSP	Anacleto *et al*, 2005
	4	188	karcinom	BRA	Shen *et al*, 2007
MGMT	29	106	karcinom	MSP	Anacleto *et al*, 2005
	40,7	27	adenom	MSP	Qi *et al*, 2005
	43,5	62	karcinom	MSP	Qi *et al*, 2005
	29	90	karcinom	MSP	Nagasaka *et al*, 2003
	53,8	26	ACF	MSP	Menigatti *et al*, 2007
	77,8	9	karcinom	MSP	Menigatti *et al*, 2007
	43	47	karcinom	MSP	Krtolica *et al*, 2007
	40	314	karcinom(249), adenom (65)	MSP	Esteller *et al*, 2001

Tab. 2: Nejčastější hypermetylované geny v kolorektálních karcinomech. 1) Procento výskytu hypermetylovaného genu ve sledovaných tkáních pacientů. 2) Je zde uveden kolorektální karcinom, benigní adenom

a premaligní stádia karcinomu tzv. abnormální ohniska střevních krypt (ACF, aberrant crypt foci). V závorce je uvedena pokročilost nádoru (tumor: T). 3) Technika použitá k detekci metylace: metylačně-specifická PCR (MSP), bisulfidická restrikční analýza (BRA), kvantitativní metoda real-time MSP: MethylLight, bisulfidické sekvenování (BS).

4.3. Funkce genů hypermetylovaných v nádorových tkáních

Studie zabývající se hypermetylací se zaměřují na geny, u kterých se předpokládá, že jejich inaktivace vede ke vzniku a rozvoji nádorových onemocnění. Je proto důležité znát jejich funkci, která prozradí možné následky pro buňky, které by měly daný gen inaktivován v důsledku hypermetylace. Jedná se především o pozitivní regulaci apoptózy nebo negativní regulaci buněčného růstu a dělení (Tab.3).

Funkce nejvýznamnějších genů, zahrnutých ve výzkumu metylací		
gen	**celý název**	**funkce**
APC	adenomatous polyposis coli	tumor supresor, signální transdukce
CDH1	cadherin 1, E-cadherin (epithelial)	buněčná adheze, pohyb a proliferace epiteliálních buněk
CDH13	cadherin 13, H-cadherin (heart)	buněčná adheze
CDKN2A/p16	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16)	tumor supresor, regulace buněčného cyklu v G1 a G2 fázi, zahrnut i v proliferaci a apoptóze - vyváří alterantivní transkripty (p16)
CHFR	Checkpoint with fork-head associated and ring finger	kontrolní bod pro vstup DNA do metafáze buněčného dělení při mitotickém stresu
DAPK	death-associated protein kinase 1	pozitivní regulátor apoptózy
FHIT	fragile histidine triad gene	možný tumor supresor , kontrola buněčného cyklu a apoptózy
GSTP1	glutathione S-transferase pi	detoxifikace (biotransformace elektrofilních látek)
hMLH1	mutL homolog 1	opravy DNA (mismatch repair systém)
MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	opravy DNA (odstranění alkylové skupiny z O^6-pozice guaninového zbytku)
RASSF1A	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 1	potencionální tumor supresor, inhibice proliferace, kóduje homolog Ras efektoru
RARβ	retinoic acid receptor, beta	kontrola buněčného cyklu a růstu buněk
SFN (14-3-3 sigma)	stratifin	kontrola buněčného cyklu, vstup buňky do M-fáze
THBS1	thrombospondin 1	interakce buněk a matrix

Tab. 3: Souhrn funkcí všech genů, které jsou zmiňovány v následujícím textu o výzkumu hypermetylovaných genů (http://www.genecards.org).

5. Hlavní směry aplikovaného výzkumu hypermetylací

5.1. Detekce hypermetylace genů a exprese proteinů

Cílem mnoha prací zaměřených na problematiku metylace v nádorech je dosáhnout co nejpřesnějších poznatků o vlivu hypermetylovaných genů na nádorová onemocnění. Samotný výzkum se proto provádí přímo na pacientech s tímto onemocněním, kdy se detekcí hypermetylovaných genů v nádorových tkáních hledá konkrétní význam těchto genů pro pacienty. Některé z takových studií sledují i stupeň exprese příslušných proteinů, který by potvrdil asociaci hypermetylace promotorových oblastí genů s jejich transkripční inaktivací.

Příkladem je studie genu MGMT u kolorektálního karcinomu, kde z 28 karcinomů vykazujících ztrátu exprese MGMT mělo 24 karcinomů tento gen hypermetylovaný (Qi *et al*, 2005). Podobně tomu bylo u genu APC, kde všech 20 kolorektálních adenomů bez hypermetylovaného APC ukázalo expresi mRNA, zatímco žádný ze 4 metylovaných adenomů mRNA neexprimoval (Esteller *et al*, 2000). Studie z roku 2006 sledovala metylační stav a expresi proteinu u genů CDH1, CDKN2A/p16 a FHIT u 224 pacientů s karcinomem plic. Souvislost hypermetylace promotoru s genovou expresí byla nalezena pouze u genu CDKN2A/p16, kde byla ztráta exprese u 63,3% případů s hypermetylací tohoto genu. U CDH1 a FHIT nebyla nalezena signifikantní asociace. Oba tyto geny jsou tedy kromě metylace inaktivovány ještě jinými faktory nebo mechanizmy (Nakata *et al*, 2006). Podle Denga *et al* hypermetylace CpG ostrůvků v oblasti promotoru nesouvisí komplexně se ztrátou genové exprese. Dokládají to na studii genu hMLH1 u rakoviny kolorekta. Promotor zde byl rozdělen na části A, B, C a D a pomocí bisulfidického sekvenování analyzován. Bylo zjištěno, že oblast C (-248 až –178) hraje významnou roli v inhibici exprese hMLH1. Všechny nádorové buněčné linie, které exprimovaly hMLH1 byly v této oblasti nemetylované, zatímco ty, které hMLH1 neexprimovaly měly tuto oblasti kompletně metylovanou. Naopak oblast A (-711 až –577) není kritická pro inaktivaci genové exprese. Je proto důležité vědět, že ne vždy metylace CpG ostrůvků souvisí se ztrátou genové exprese (Deng *et al*, 1999). Studie genu SFN dokázala, že hypermetylace a exprese genového produktu je nejen genově-specifická, ale závisí i na povaze histologické tkáně, ve které je daný gen hypermetylován. Hypermetylace byla nalezena u malobuněčných karcinomů a karcinomů velkých buněk, zatímco u ostatních typů NSCLC se hypermetylace a ztráta exprese genů téměř neobjevila. Překvapivě se našla hypermetylace SFN i v normální plicní tkáni a to konkrétně v tkáni neepiteliální (stroma) obsahující fibroblasty a lymfocyty (Osada *et al*, 2002). Tento jev

není úplně ojedinělý, studie metylace SFN u karcinomu prsu také ukázala aberantní metylaci v normální neepiteliální tkáni (Umbricht *et al*, 2001).

5.2. Asociace s mutacemi

Mutace jsou častou příčinou vzniku nádorových onemocnění, proto se zkoumá i možná souvislost s metylacemi a to u genů, jejichž funkce by tomu napovídala. Z nejznámějších hypermetylovaných genů to jsou RASSF1A u karcinomu plic a opravné geny MGMT a hMLH1 u kolorektálních karcinomů.

Hledaná souvislost hypermetylace promotoru RASSF1A s mutací v KRAS onkogenu nebyla potvrzena. To vede k závěru, že inaktivace genu v důsledku metylace RASSF1A je jinak zahrnuta v patogenezi plicních karcinomů než v signalizační dráze Ras (Kim *et al*, 2003; Divine *et al*, 2005; Liu *et al*, 2007).

I u genu MGMT se hledá spojitost s bodovou mutací v onkogenu KRAS, častou u kolorektálních tumorů. Hlavní funkcí MGMT je odstranění škodlivé alkylové skupiny z O^6-pozice guaninového zbytku na DNA. Pokud na guaninu zůstane alkylová skupina (nejčasněji metylová), pak se O^6-metylguanin chybně páruje s tyminem během replikace, což vede ke konverzi G-C párů na A-T páry. Bylo prokázáno, že 13 z 19 kolorektálních tumorů s bodovou mutací (G→A) v KRAS onkogenu mělo metylovaný MGMT (Qi *et al*, 2005). I v americké studii ze stejného roku, kde se na 95 pacientech zkoumala hypermetylace MGMT, bylo odhaleno, že u 46% metylovaných nádorů byla signifikantní asociace s tranzicí KRAS (Shen *et al*, 2005). Bodové mutace jsou časté i u tumor-supresorového genu TP53 a i u něj byla nalezena asociace s hypermetylací promotoru MGMT (Esteller *et al*, 2001).

Výzkum genu hMLH1 se nezaměřuje přímo na somatické mutace, ale na tzv. mikrosatelitovou nestabilitu (MSI). MSI se vyskytuje u 15% sporadických kolorektálních tumorů a většiny hereditárních nepolypózních kolorektálních karcinomů (HNPCC). MSI je charakterizována násobnými chybami v repetitivních sekvencích DNA (mikorsatelitech) v důsledku nefunkčního mismatch repair (MMR) systému. To znamená že inaktivace MMR genů, mezi které patří právě hMLH1, vede k ukládání chyb během replikace a tím mikrosatelitové nestabilitě. Bylo prokázáno, že hypermetylace promotoru hMLH1 úzce souvisí s MSI v kolorektálních tumorech (Anacleto *et al*, 2005; Herman *et al*, 1998; Kim H.C. *et al*, 2005).

5.3. Význam hypermetylovaných genů jako molekulárních markerů

Jedním z hlavních cílů studia metylací jsou poznatky o zahrnutí hypermetylovaných genů v procesu karcinogeneze. Sledují se nádorové tkáně i okolní normální tkáň. Geny, které jsou v nádorech výrazně hypermetylované značí důležité markery. Metylační markery mohou být pak využitelné k možnosti detekce karcinomu, pokud by byly zachyceny i v krvi či jiných tělních tekutinách nebo mohou sloužit k předpovědi prognózy choroby a možnosti jejího návratu. Výzkum diagnostických markerů se zaměřuje buď na jednotlivé kandidátní geny nebo na skupinu více genů a na základě jejich funkce předpokládá jejich zahrnutí v procesu nádorového bujení.

Většina zkoumaných genů u karcinomu plic se ve studiích opakuje, mezi nejčastěji zařazované patří CDKN2A/p16, CDH13, RASSF1A, GSTP1, RARβ, FHIT, MGMT a DAPK a všechny tyto výzkumy ukazují, že metylace a následná inaktivace těchto genů je častým fenoménem v NSCLC a tyto geny jsou potencionálně využitelné k diagnóze (Ehrich *et al*, 2006; Safar *et al*, 2005; Tsou *et al*, 2007; Zöchbauer-Müller *et al*, 2001).

Vývoj sporadického kolorektálního karcinomu je několikastupňový proces, charakterizovaný podle Vogelsteina výskytem somatických mutací u několika onkogenů a tumor-supresorových genů (Fearon a Vogelstein, 1990). Mutace genu APC je přítomna až u 80% sporadických kolorektálních karcinomů a souvisí s rannými stádii nádorové progrese, proto se uvažuje i o roli inaktivace genu APC v důsledku hypermetylace. Hypermetylace promotoru APC byla nalezena u 20 ze 108 (18%) kolorektálních karcinomů. Pro potvrzení, že je tento proces zahrnut v časných stádiích tumorgeneze, bylo vyšetřováno i 48 benigních adenomů a metylace byla objevena opět u 18% z nich (Esteller *et al*, 2000). Kim *et al* studovali nádorovou progresi na paletě 5 genů, kromě APC i THBS1, MGMT, hMLH1 a GSTP1 a nejméně jeden z těchto genů byl hypermetylován u 60% adenomů a 75% karcinomů. Dále byla uvažována možnost odlišení karcinomu a adenomu podle metylačního profilu, to se ale dokázat nepodařilo (Kim H.C. *et al*, 2005). S tumorgenezí kromě APC souvisí i gen MGMT. Zabývali se jím Menigatti *et al* a nalezli hypermetylaci promotoru MGMT jak u kolorektálních karcinomů, tak v premaligních stádiích karcinomu nazývaných abnormální ohniska střevních krypt (ACF, aberrant crypt foci) (Menigatti *et al*, 2007).

Po prokázání přítomnosti metylačních markerů v nádorových tkáních se uvažuje nad možností jejich praktického využití. A jednou z nich může být odhad prognózy choroby a možnosti jejího

návratu. U rakoviny plic je příkladem studie opravného genu MGMT. Pacienti bez hypermetylovaného MGMT měli větší šance na přežití oproti pacientům s metylací v tomto genu. MGMT by tak mohl být důležitým biomarkerem k zjištění agresivnějšího průběhu NSCLC (Brabender *et al*, 2003). Gen CDH13, který je často hypermetylován i u rakoviny prsu, se také zdá být vhodným genetickým markerem plicního karcinomu. V této studii byla prokázána asociace hypermetylace genu CDH13 s invazivitou nádoru a metastázemi (Kim J.S. *et al*, 2005). Dále i současná metylace genů DAPK a APC v plicní nádorové tkáni je spojena s těžším průběhem nemoci (Harden *et al*, 2003).

Velké naděje se vkládají do sledování pacientů po léčbě rakoviny. U karcinomu plic je častá recidiva po odstranění nádoru, proto by bylo praktické opět pomocí vhodně zvolených genetických markerů vysledovat možnou přítomnost zbytkových nádorových tkání, případně časný záchyt metastáz. Harden *et al* vyšetřovali hypermetylaci promotorů u genů CDKN2A/p16, MGMT, GSTP1, APC a DAPK v nádorové tkáni a následně v lymfatických uzlinách, které mohou ukázat přítomnost skrytých metastáz. 81% z 90 pacientů mělo hypermetylovaný nejméně jeden z těchto genů v nádorové tkáni a u 15% z nich byla objevena stejná alterace v lymfatické uzlině (Harden *et al*, 2003). Nebezpečí návratu choroby sledovali i Kim *et al*, kteří k detekci využili geny CDKN2A/p16, GSTP1, FHIT, CDH13 a RARβ. Měli k dispozici velký soubor 335 pacientů s NSCLC po odstranění nádoru. Bylo zjištěno, že geny nesouvisí s možností recidivy samostatně, ale teprve současná metylace genů FHIT a CDKN2A/p16 v nádorové tkáni výrazně zvyšuje možnost návratu rakoviny (Kim *et al*, 2006). To dokládá, že ke zvýšení efektivity studií metylačních markerů je dobré sledovat více genů najednou, protože teprve jejich kooperace může poskytnout důležité informace. Jedním z nejnovějších přírůstků k těmto poznatkům je studie zveřejněná 13. března 2008 v New England Journal of Medicine. Brock *et al* hodnotili hypermetylaci 7 genů a objevili, že CDKN2A/p16, CDH13, APC a RASSF1A byly vysoce hypermetylovány u pacientů, kterým se rakovina plic vrátila. Praktický výsledek těchto objevů je, že by lékaři na základě těchto informací zvolili agresivnější metody chemoterapie (Brock *et al*, 2008).

U kolorektálního karcinomů, narozdíl od karcinomu plic, kde byla metylace MGMT spojována s horší prognózou, současná metylace genů CDKN2A/p16 a MGMT predikuje pacientům méně agresivní průběh choroby (Krtolica *et al*, 2007). Gen MGMT je velmi významný i v souvislosti s možností rekurence karcinomu a odpovědí na léčbu. Pacienti s kolorektálním karcinomem po operaci a prodělané chemoterapii byli vyšetřováni na hypermetylaci genu MGMT. Rekurentní

karcinom se objevil během 3 let mnohem častěji u pacientů bez metylace MGMT na rozdíl od pacientů s hypermetylovaným genem (Nagasaka *et al*, 2003).

5.4. Detekce hypermetylovaných genů v tělních tekutinách

Jak již bylo zmíněno, hlavním problémem většiny nádorových onemocnění je zachycení až v pozdních stádiích, kdy už jsou šance na uzdravení velmi nízké. Geny vyskytující se metylované v nádorové tkáni i v tělních tekutinách by mohly sloužit jako markery k detekci časných stádií karcinomu nebo rekurentního nádoru. Pozornost je zaměřena především na tumor-supresorové geny, které se podílejí na nádorovém bujení. Detekce hypermetylace v tělních tekutinách, jako je krev, sliny a další, by byla neinvazivní a snadnou metodou ke sledování rizikových osob. Většina studií se zaměřuje na detekci z periferní krve. Bylo zjištěno, že pacienti s nádorovým onemocněním mají zvýšenou hladinu volné DNA v krvi (Leon *et al*, 1977). Proto se začalo uvažovat i nad jejím využitím k detekci aberantních metylovaných genů.

Esteller *et al* jako první testovali hypermetylaci promotorů u genů CDKN2A,/p16, DAPK, GSTP1 a MGMT v plicním karcinomu a periferní krvi. 15 z 22 pacientů s NSCLC mělo hypermetylovaný alespoň jeden z těchto genů a u 11 z nich byla nalezena hypermetylace i v periferní krvi (Esteller *et al*, 1999). V roce 2005 byla publikována studie, která sledovala hypermetylaci v krvi u 200 osob, které prodělaly bronchoskopické vyšetření a u 91 z nich byla diagnostikována rakovina plic. Hypermetylace nejméně jednoho z vyšetřovaných genů byla nalezena téměř u poloviny pacientů s rakovinou a byla mnohonásobně vyšší než u ostatních pacientů bez rakoviny. Pro srovnání se vyšetřovala i nádorová tkáň a zde byla ze 30 vzorků nalezena metylace v 77% případech (Fujiwara *et al*, 2005). Hsu *et al* vedli svůj výzkum pomocí 6 genů a podobně jako v předchozí studii hledali spojitost mezi hypermetylací genů v nádorové tkáni a periferní krvi. Detekce proběhla u 63 pacientů s NSCLC a u 36 zdravých jedinců a ukázalo se, že nejlepšími genetickými markery jsou CDKN2A/p16 a RASSF1A (Hsu *et al*, 2007). Přesto je potřeba ještě mnohých vylepšení, aby se detekce z periferní krve dala využívat v praxi. Problémem většiny studií je totiž nízká citlivost, malý počet vzorků nebo nepřítomnost zdravých kontrol pro srovnání, což výsledky znehodnocuje.

Detekce aberantní metylace ze slin je zatím v začátcích. Belinsky *et al* sledovali metylaci ve slinách a v plazmě u 3 skupin probandů: pacientů s prodělanou rakovinou plic, silných kuřáků a nekuřáků. Objevili, že pacienti, kteří prodělali rakovinu, měli šestkrát častěji hypermetylované

více jak 3 z 6 zkoumaných genů ve srovnání s kuřáky a tím pádem nesli vyšší riziko návratu choroby (Belinsky *et al*, 2005). K podobnému závěru došel i v další studii, kde se poprvé zabýval touto problematikou na širší paletě genů a sledoval citlivost a specifitu predikce vzniku rakoviny plic. Výsledky ukázaly, že hypermetylace více jak 3 zkoumaných genů je asociována s 6,5-krát vyšším rizikem vzniku rakoviny, přičemž citlivost a specifita metody byla 64% (Belinsky *et al*, 2006).

U kolorektálních karcinomů se studie detekce hypermetylovaných genů z tělních tekutin neobjevují tak často jako u karcinomů plic. Zde je v popředí zájmu možnost vývoje karcinomů z premaligních stádií polypů a adenomů, jak bylo vysvětleno výše. Výzkumy detekce z periferní krve se zaměřují především na gen CDKN2A/p16. Nakayama *et al* detekovali hypermetylaci promotoru v tomto genu u 44 z 96 nádorových tkání a u 30% z nich byla nalezena hypermetylace i v DNA z periferní krve (Nakayama *et al*, 2002). To by mohlo přinést velké výhody zejména ve sledování pacientů po odstranění nádoru a prodělané chemoterapii. V roce 2003 Nakayama zopakoval pokus na pacientech, kteří prodělali rakovinu a potvrdil, že detekce metylace genu CDKN2A/p16 z periferní krve může být dostatečně citlivá a použitelná metoda k predikci výskytu reziduální choroby (Nakayma *et al*, 2003). Bazan *et al* detekovali pro kolorektální tumory charakteristické mutace genů TP53 a KRAS a hypermetylaci CDKN2A/p16 v nádorové tkáni a volné DNA z plazmy periferní krve. Objevili, že 50 z 60 pacientů mělo alespoň jednu z těchto alterací v nádoru a u 18-ti z nich byla objevena i v plazmě (Bazan *et al*, 2006).

5.5. Další zkoumané aspekty hypermetylovaných genů

Jelikož se výzkum aplikuje přímo na pacienty, sledují se a statisticky vyhodnocují i další klinické aspekty, jako jsou možné závislosti hypermetylovaných genů na pohlaví, věku a klinickém stavu pacientů. Většina zde zmíněných studií hodnotila i tyto hlediska, ale nenašla žádnou signifikantní asociaci. Výjimkou je studie genu CHFR, kde byla nalezena asociace s věkem u pacientů s kolorektálními tumory, u rakoviny plic se podobná souvislost nenašla (Corn *et al*, 2003). U karcinomů plic si studie často všímaly, zda metylační stav nádorové tkáně nesouvisí s tím, jestli pocházela od kuřáka či nekuřáka. Souvislost s kouřením byla nalezena pouze u genu CDKN2A/p16 s hypermetylovaným promotorem (Divine *et al*, 2005; Nakata *et al*, 2006).

5.6. Vliv hypermetylovaných genů na léčbu

Jedna z důležitých vlastností hypermetylace je, že se jedná o vratný děj a proto lze genovou expresi obnovit pomocí speciálních inhibitorů. Hlavním z nich je 5-Aza-2′-deoxycytidin, inhibitor DNA metyltransferázy (DNMT), zvaný též jako Decitabin (Momparler *et al*, 1997). Jeho schopností využívají studie, které se zabývají sledováním genové exprese. Příkladem toho, že 5-Aza-2′-deoxycytidin dokáže demetylovat tkáň, je již zmíněná studie genu hMLH1, kde vyšetřovali 4 části jeho promotoru a sledovali, jak se mění exprese genu po podání 5-Aza-2′-deoxycytidinu (Deng *et al*, 1999) či studie genu CDH13 a CHFR (Toyooka *et al*, 2001; Mizuno *et al*, 2002).

Zkoumá se možnost využití demetylace při léčbě nádorových onemocnění, jelikož se předpokládá, že vhodné metylační inhibitory mohou překonat rezistenci vůči chemoterapeutikům a docílit tak účinnější léčby. Rezistence k chemoterapii se vyskytuje u pacientů se všemi typy nádorů, ale její příčiny jsou stálé málo známé. Uvažuje se, že jednou z příčin by mohla být inaktivace genů v důsledku hypermetylace. Účinky Decitabinu podrobně zkoumala studie z roku 2007, ve které se hledala nejúčinnější dávka chemoterapeutického léku Karboplatiny právě s Decitabinem. Ten zde potvrdil svou schopnost redukce metylace DNA, čímž bylo docíleno větší efektivity léčby Karboplatinou (Appleton *et al*, 2007). Candelaria *et al* dokázali, že použití metylačního inhibitoru (Hydralazinu) spolu s inhibitorem histonové deacetylázy (valproan hořečnatý) vede k překonání rezistence vůči chemoterapeutikům a tím zlepšení stavu pacientů, které bylo prokázáno u 80% z nich, bez ohledu na druh chemoterapeutik a typ tumoru (Candelaria *et al*, 2007).

Nemusí se využívat pouze inhibitorů k obnovení účinnosti chemoterapeutik. I hypermetylovaný gen může být přínosný v léčbě, záleží na funkci daného genu a typu léku. Příkladem je gen SFN (14-3-3σ), který sice nepatří mezi nejčastější metylačně-specifické geny, ale i u něj byla nalezena metylace a také důležité klinické účinky pro pacienty. Jeho inaktivace vede k poruchám buněčného cyklu a zvyšuje tak citlivost k lékům indukujícím apoptózu. Studie prokázala, že u pacientů s hypermetylovaným SFN v krevním séru byl delší medián přežití než u pacientů s nemetylovaným SFN při léčbě kombinací Cisplatina/Gemicitabin v pokročilých stádiích NSCLC (Ramirez *et al*, 2005).

6. Závěr

Je zřejmé, že metylace DNA ve vybraných genech hraje důležitou roli ve vzniku a průběhu nádorových onemocnění. Hypermetylace promotorových oblastí klíčových genů, zejména s tumor-supresorovou funkcí (CDKN2A/p16, APC, RASSF1A) a opravnou funkcí DNA (hMLH1, MGMT) se vyskytuje v mnoha nádorových tkáních, což má za následek transkripční utišení těchto genů a tím odchylku od normálního stavu ve zdravé tkáni. Aberantní metylace byla nalezena i v periferní krvi pacientů s nádorovým onemocněním, což by mohla být jedna z možností sledování účinnosti léčby či detekce reziduální choroby.

Studium hypermetylace se zaměřuje především na hledání vhodných genetických markerů, které by poskytly důležité poznatky použitelné v boji proti nádorovým onemocněním. Bylo prokázáno, že se metylované geny podílejí na nádorovém bujení a že mohou ovlivnit vznik příslušného proteinu. Studium metylace těchto genů může sloužit ke stanovení rizika vzniku a návratu choroby a může předpovídat účinnost chemoterapeutické léčby nebo odhalit přítomnost dalších metasáz. U rakoviny plic i kolorektálního karcinomu byly nalezeny klíčové geny, jejichž metylace je charakteristická pro danou nádorovou tkáň. Četné studie na tato témata dokazují, že se jedná o velmi významný a aktuální směr ve výzkumu nádorových onemocnění. Přestože si studium hypermetylovaných genů žádá dalšího podrobného zkoumání a ověřování, než se bude moci uplatnit v praxi, už nyní je zřejmé, že se jedná o zásadní prostředek, využitelný v boji s nádorovým onemocněním.

Cílem této bakalářské práce bylo zpracovat dostupnou literaturu zabývající se metylací DNA v genech ovlivňujících rozvoj nádorových onemocnění, zejména u rakoviny plic a kolorekta. V diplomové práci bych ráda navázala na toto téma praktickou studií metylace vybraných genů v nádorových tkáních u pacientů s karcinomem plic a kolorekta.

7. Seznam použité literatury

- Adams R.L. (1990) DNA methylation. The effect of minor bases on DNA-protein interactions. Biochem J 265, 309-20.
- Anacleto C., Leopoldino A.M., Rossi B., Soares F.A., Lopes A., Rocha J.C., Caballero O., Camargo A.A., Simpson A.J., Pena S.D. (2005) Colorectal cancer "methylator phenotype": fact or artifact? Neoplasia 7, 331-5.
- Appleton K., Mackay H.J., Judson I., Plumb J.A., McCormick C., Strathdee G., Lee C., Barrett S., Reade S., Jadayel D., Tang A., Bellenger K., Mackay L., Setanoians A., Schätzlein A., Twelves C., Kaye S.B., Brown R. (2007) Phase I and pharmacodynamic trial of the DNA methyltransferase inhibitor decitabine and carboplatin in solid tumors. J Clin Oncol 25, 4603-9.
- Bartolomei M.S., Tilghman S.M. (1997) Genomic imprinting in mammals. Annu Rev Genet. 31, 493-525.
- Bazan V., Bruno L., Augello C., Agnese V., Calò V., Corsale S., Gargano G., Terrasi M., Schirò V., Di Fede G., Adamo V., Intrivici C., Crosta A., Rinaldi G., Latteri F., Dardanoni G., Grassi N., Valerio M.R., Colucci G., Macaluso M., Russo A.; Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale. (2006) Molecular detection of TP53, Ki-Ras and p16INK4A promoter methylation in plasma of patients with colorectal cancer and its association with prognosis. Results of a 3-year GOIM (Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale) prospective study. Ann Oncol 17, 84-90.
- Belinsky S.A., Klinge D.M., Dekker J.D., Smith M.W., Bocklage T.J., Gilliland F.D., Crowell R.E., Karp D.D., Stidley C.A., Picchi M.A. (2005) Gene promoter methylation in plasma and sputum increases with lung cancer risk. Clin Cancer Res 11, 6505-11.
- Belinsky S.A., Liechty K.C., Gentry F.D., Wolf H.J., Rogers J., Vu K., Haney J., Kennedy T.C., Hirsch F.R., Miller Y., Franklin W.A., Herman J.G., Baylin S.B., Bunn P.A., Byers T. (2006) Promoter hypermethylation of multiple genes in sputum precedes lung cancer incidence in a high-risk cohort. Cancer Res 66, 3338-44.
- Brabender J., Usadel H., Metzger R., Schneider P.M., Park J., Salonga D., Tsao-Wei D.D., Groshen S., Lord R.V., Takebe N., Schneider S., Hölscher A.H., Danenberg K.D., Danenberg P.V. (2003) Quantitative O(6)-methylguanine DNA methyltransferase methylation analysis in curatively resected non-small cell lung cancer: associations with clinical outcome. Clin Cancer Res 9, 223-7.

- Brock M.V., Hooker C.M., Ota-Machida E., Han Y., Guo M., Ames S., Glöckner S., Piantadosi S., Gabrielson E., Pridham G., Pelosky K., Belinsky S.A., Yang S.C., Baylin S.B., Herman J.G. (2008) DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer. N Engl J Med 358, 1118-28.
- Brown R., Strathdee G. (2002) Epigenomics and epigenetic therapy of cancer. Trends Mol Med 8, s43-8.
- Candelaria M., Gallardo-Rincón D., Arce C., Cetina L., Aguilar-Ponce J.L., Arrieta O., González-Fierro A., Chávez-Blanco A., de la Cruz-Hernández E., Camargo M.F., Trejo-Becerril C., Pérez-Cárdenas E., Pérez-Plasencia C., Taja-Chayeb L., Wegman-Ostrosky T., Revilla-Vazquez A., Dueñas-González A. (2007) A phase II study of epigenetic therapy with hydralazine and magnesium valproate to overcome chemotherapy resistance in refractory solid tumors. Ann Oncol 18, 1529-38.
- Chen J., Röcken C., Lofton-Day C., Schulz H.U., Müller O., Kutzner N., Malfertheiner P., Ebert M.P. (2005) Molecular analysis of APC promoter methylation and protein expression in colorectal cancer metastasis. Carcinogenesis 26, 37-43.
- Clark S.J., Harrison J., Paul C.L., Frommer M. (1994) High sensitivity mapping of methylated cytosines. Nucleic Acids Res 22, 2990-7.
- Corn P.G., Summers M.K., Fogt F., Virmani A.K., Gazdar A.F., Halazonetis T.D., El-Deiry W.S. (2003) Frequent hypermethylation of the 5' CpG island of the mitotic stress checkpoint gene Chfr in colorectal and non-small cell lung cancer. Carcinogenesis 24, 47-51.
- Cottrell S.E., Distler J., Goodman N.S., Mooney S.H., Kluth A., Olek A., Schwope I., Tetzner R., Ziebarth H., Berlin K. (2004) A real-time PCR assay for DNA-methylation using methylation-specific blockers. Nucleic Acids Res 32, e10.
- Das P.M., Singal R. (2004) DNA methylation and cancer. J Clin Oncol 22, 4632-42.
- Deng G., Chen A., Hong J., Chae HS., Kim Y.S. (1999) Methylation of CpG in a small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression. Cancer Res 59, 2029-33.
- Divine K.K., Pulling L.C., Marron-Terada P.G., Liechty K.C., Kang T., Schwartz A.G., Bocklage T.J., Coons T.A., Gilliland F.D., Belinsky S.A. (2005) Multiplicity of abnormal promoter methylation in lung adenocarcinomas from smokers and never smokers. Int J Cancer 114, 400-5.
- Eads C.A., Danenberg K.D., Kawakami K., Saltz L.B., Blake C., Shibata D., Danenberg P.V. and Laird P.W. (2000) MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. Nucleic Acids Res 28, e32.

- Ehrlich M. (2002) DNA methylation in cancer: too much, but also too little. Oncogene 21, 5400-13.
- Ehrich M., Field J.K., Liloglou T., Xinarianos G., Oeth P., Nelson M.R., Cantor C.R., van den Boom D. (2006) Cytosine methylation profiles as a molecular marker in non-small cell lung cancer. Cancer Res 66, 10911-8.
- Esteller M., Sanchez-Cespedes M., Rosell R., Sidransky D., Baylin S.B., Herman J.G. (1999) Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. Cancer Res 59, 67-70.
- Esteller M., Sparks A., Toyota M., Sanchez-Cespedes M., Capella G., Peinado M.A., Gonzalez S., Tarafa G., Sidransky D., Meltzer S.J., Baylin S.B., Herman J.G. (2000) Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. Cancer Res 60, 4366-71.
- Esteller M., Risques R.A., Toyota M., Capella G., Moreno V., Peinado M.A., Baylin S.B., Herman J.G. (2001) Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. Cancer Res 61, 4689-92.
- Fearon E.R., Vogelstein B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis, Cell 61, 759 – 67.
- Ferlay J., Autier P., Boniol M., Heanue M., Colombet M., Boyle P. (2007) Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. Ann Oncol18, 581-92.
- Frommer M., McDonald L.E., Millar D.S., Collis C.M., Watt F., Grigg G.W., Molloy P.L., Paul C.L. (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. Proc Natl Acad Sci USA 89, 1827-31.
- Fujiwara K., Fujimoto N., Tabata M., Nishii K., Matsuo K., Hotta K., Kozuki T., Aoe M., Kiura K., Ueoka H., Tanimoto M. (2005) Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lung cancer. Clin Cancer Res 11, 1219-25.
- Gebhard C., Schwarzfischer L., Pham T.H., Andreesen R., Mackensen A., Rehli M. (2006) Rapid and sensitive detection of CpG-methylation using methyl-binding (MB)-PCR. Nucleic Acids Res 34, e82.
- Harden S.V., Tokumaru Y., Westra W.H., Goodman S., Ahrendt S.A., Yang S.C., Sidransky D. (2003) Gene promoter hypermethylation in tumors and lymph nodes of stage I lung cancer patients. Clin Cancer Res 9, 1370-5.

- Heard E, Clerc P, Avner P. X-chromosome inactivation in mammals. Annu Rev Genet. 1997;31:571-610.
- Herman J.G., Merlo A., Mao L., Lapidus R.G., Issa J.P., Davidson N.E., Sidransky D., Baylin S.B. (1995) Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. Cancer Res 55, 4525-30.
- Herman J.G., Graff J.R., Myohanen S., Nelkin B.D, Baylin S.B. (1996) Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci USA 93, 9821-6.
- Herman J.G., Umar A., Polyak K., Graff J.R., Ahuja N., Issa J.P., Markowitz S., Willson J.K., Hamilton S.R., Kinzler K.W., Kane M.F., Kolodner R.D., Vogelstein B., Kunkel T.A., Baylin S.B. (1998) Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA 95, 6870-5.
- Hsu H.S., Chen T.P., Hung C.H., Wen C.K., Lin R.K., Lee H.C., Wang Y.C. (2007) Characterization of a multiple epigenetic marker panel for lung cancer detection and risk assessment in plasma. Cancer 110, 2019-26.
- http://www.genecards.org
- Jhaveri M.S., Wagner C., Trepel J.B. (2001) Impact of extracellular folate levels on global gene expression. Mol Pharmacol 60, 1288-95.
- Kim D.H., Kim J.S., Park J.H., Lee S.K., Ji Y.I., Kwon Y.M., Shim Y.M., Han J., Park J. (2003) Relationship of Ras association domain family 1 methylation and K-ras mutation in primary non-small cell lung cancer. Cancer Res 63, 6206-11.
- Kim H.C., Roh S.A., Ga I.H., Kim J.S., Yu C.S., Kim J.C. (2005) CpG island methylation as an early event during adenoma progression in carcinogenesis of sporadic colorectal cancer. J Gastroenterol Hepatol 20, 1920-6.
- Kim J.S., Han J., Shim Y.M., Park J., Kim D.H. (2005) Aberrant methylation of H-cadherin (CDH13) promoter is associated with tumor progression in primary nonsmall cell lung carcinoma. Cancer 104, 1825-33.
- Kim J.S., Kim J.W., Han J., Shim Y.M., Park J., Kim D.H. (2006) Cohypermethylation of p16 and FHIT promoters as a prognostic factor of recurrence in surgically resected stage I non-small cell lung cancer. Cancer Res 66, 4049-54.
- Kiss I., Tomášek J. (2007) http://www.linkos.cz/pacienti/traveni_clanek.php?t1=1&t2=1&t3=1&t=1.
- Kress C., Thomassin H., Grange T. (2001) Local DNA demethylation in vertebrates: how could it be performed and targeted? FEBS Lett 494, 135-40.

- Krtolica K., Krajnovic M., Usaj-Knezevic S., Babic D., Jovanovic D., Dimitrijevic B. (2007) Comethylation of p16 and MGMT genes in colorectal carcinoma: correlation with clinicopathological features and prognostic value. World J Gastroenterol 13, 1187-94.
- Leon S.A., Shapiro B., Sklaroff D.M., Yaros M.J. (1977) Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. Cancer Res 37, 646-50.
- Li L.C., Dahiya R. (2002) MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. Bioinformatics 18, 1427-31.
- Liu Y., Gao W., Siegfried J.M., Weissfeld J.L., Luketich J.D., Keohavong P. (2007) Promoter methylation of RASSF1A and DAPK and mutations of K-ras, p53, and EGFR in lung tumors from smokers and never-smokers. BMC Cancer 7, 74.
- Luczak M.W., Jagodziński P.P. (2006) The role of DNA methylation in cancer development. Folia Histochem Cytobiol 44, 143-54.
- Marsit C.J., Houseman E.A., Christensen B.C., Eddy K., Bueno R., Sugarbaker D.J., Nelson H.H., Karagas M.R., Kelsey K.T. (2006) Examination of a CpG island methylator phenotype and implications of methylation profiles in solid tumors. Cancer Res 66, 10621-9.
- Menigatti M., Pedroni M., Verrone A.M., Borghi F., Scarselli A., Benatti P., Losi L., Di Gregorio C., Schär P., Marra G., Ponz de Leon M., Roncucci L. (2007) O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter hypermethylation in colorectal carcinogenesis. Oncol Rep 17, 1421-7.
- Mittag F., Kuester D., Vieth M., Peters B., Stolte B., Roessner A., Schneider-Stock R. (2006) DAPK promotor methylation is an early event in colorectal carcinogenesis. Cancer Lett 240, 69-75.
- Mizuno K., Osada H., Konishi H., Tatematsu Y., Yatabe Y., Mitsudomi T., Fujii Y., Takahashi T. (2002) Aberrant hypermethylation of the CHFR prophase checkpoint gene in human lung cancers. Oncogene 21, 2328-33.
- Momparler R.L., Bouffard D.Y., Momparler L.F., Dionne J., Belanger K., Ayoub J. (1997) Pilot phase I-II study on 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) in patients with metastatic lung cancer. Anticancer Drugs 8, 358-68.
- Nagasaka T., Sharp G.B., Notohara K., Kambara T., Sasamoto H., Isozaki H., MacPhee D.G., Jass J.R., Tanaka N., Matsubara N. (2003) Hypermethylation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter may predict nonrecurrence after chemotherapy in colorectal cancer cases. Clin Cancer Res 9, 5306-12.
- Nakata S., Sugio K., Uramoto H., Oyama T., Hanagiri T., Morita M., Yasumoto K. (2006) The methylation status and protein expression of CDH1, p16(INK4A), and fragile histidine

triad in nonsmall cell lung carcinoma: epigenetic silencing, clinical features, and prognostic significance. Cancer 106, 2190-9.

- Nakayama H., Hibi K., Taguchi M., Takase T., Yamazaki T., Kasai Y., Ito K., Akiyama S., Nakao A. (2002) Molecular detection of p16 promoter methylation in the serum of colorectal cancer patients. Cancer Lett 188, 115-9.
- Nakayama H., Hibi K., Takase T., Yamazaki T., Kasai Y., Ito K., Akiyama S., Nakao A. (2003) Molecular detection of p16 promoter methylation in the serum of recurrent colorectal cancer patients. Int J Cancer 105, 491-3.
- Osada H., Tatematsu Y., Yatabe Y., Nakagawa T., Konishi H., Harano T., Tezel E., Takada M., Takahashi T. (2002) Frequent and histological type-specific inactivation of 14-3-3sigma in human lung cancers. Oncogene 21, 2418-24.
- Prall F., Ostwald C., Weirich V., Nizze H. (2006) p16(INK4a) promoter methylation and 9p21 allelic loss in colorectal carcinomas: relation with immunohistochemical p16(INK4a) expression and with tumor budding. Hum Pathol 37, 578-85.
- Qi J., Zhu Y.Q., Huang M.F., Yang D. (2005) Hypermethylation of CpG island in O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene was associated with K-ras G to A mutation in colorectal tumor. World J Gastroenterol 11, 2022-5.
- Ramirez J.L., Rosell R., Taron M., Sanchez-Ronco M., Alberola V., de Las Peñas R., Sanchez J.M., Moran T., Camps C., Massuti B., Sanchez J.J., Salazar F., Catot S.; The Spanish Lung Cancer Group. (2005) 14-3-3sigma methylation in pretreatment serum circulating DNA of cisplatin-plus-gemcitabine-treated advanced non-small-cell lung cancer patients predicts survival: The Spanish Lung Cancer Group. J Clin Oncol 23, 9105-12
- Rauch T., Pfeifer G.P. (2004) Methylated-CpG island recovery assay: a new technique for the rapid detection of methylated-CpG islands in cancer. Cancer Res 64, 6002-9.
- Safar A.M., Spencer H. 3rd, Su X., Coffey M., Cooney C.A., Ratnasinghe L.D., Hutchins L.F., Fan C.Y. (2005) Methylation profiling of archived non-small cell lung cancer: a promising prognostic system. Clin Cancer Res 11, 4400-5.
- Salozhin S.V., Prokhorchuk E.B., Georgiev G.P. (2005) Methylation of DNA - one of the major epigenetic markers. Biochemistry (Mosc) 70, 525-32.
- Shen L., Kondo Y., Rosner G.L., Xiao L., Hernandez N.S., Vilaythong J., Houlihan P.S., Krouse R.S., Prasad A.R., Einspahr J.G., Buckmeier J., Alberts D.S., Hamilton S.R., Issa J.P. (2005) MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer. J Natl Cancer Inst 97, 1330-8.

- Shen L., Catalano P.J., Benson A.B. 3rd, O'Dwyer P., Hamilton S.R., Issa J.P. (2007) Association between DNA methylation and shortened survival in patients with advanced colorectal cancer treated with 5-fluorouracil based chemotherapy. Clin Cancer Res 13, 6093-8.
- Singal R., van Wert J., Bashambu M. (2001) Cytosine methylation represses glutathione S-transferase P1 (GSTP1) gene expression in human prostate cancer cells. Cancer Res 61, 4820-6.
- Steigerwald S.D., Pfeifer G.P., Riggs A.D. (1990) Ligation-mediated PCR improves the sensitivity of methylation analysis by restriction enzymes and detection of specific DNA strand breaks. Nucleic Acids Res 18, 1435-9.
- Strathdee G., Brown R. (2002) Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. Expert Rev Mol Med 4, 1-17.
- Strazzullo M., Cossu A., Baldinu P., Colombino M., Satta M.P., Tanda F., De Bonis M.L., Cerase A., D'Urso M., D'Esposito M., Palmieri G. (2003) High-resolution methylation analysis of the hMLH1 promoter in sporadic endometrial and colorectal carcinomas. Cancer 98, 1540-6.
- Šimíčková M. (2005) http://www.rochediagnostics.cz/download/la/0105/tumory.pdf.
- Thomassin H., Kress C., Grange T. (2004) MethylQuant: a sensitive method for quantifying methylation of specific cytosines within the genome. Nucleic Acids Res 32, e168.
- Toyooka K.O., Toyooka S., Virmani A.K., Sathyanarayana U.G., Euhus DM, Gilcrease M., Minna J.D., Gazdar A.F. (2001) Loss of expression and aberrant methylation of the CDH13 (H-cadherin) gene in breast and lung carcinomas. Cancer Res 61, 4556-60.
- Toyota M., Ahuja N., Ohe-Toyota M., Herman J.G., Baylin S.B., Issa J.P. (1999) CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. Proc Natl Acad Sci USA 96, 8681-6.
- Tsou J.A., Galler J.S., Siegmund K.D., Laird P.W., Turla S., Cozen W., Hagen J.A., Koss M.N., Laird-Offringa I.A. (2007) Identification of a panel of sensitive and specific DNA methylation markers for lung adenocarcinoma. Mol Cancer 6, 70.
- Ulrey C.L., Liu L., Andrews L.G., Tollefsbol T.O. (2005) The impact of metabolism on DNA methylation. Hum Mol Genet 14, 139-47.
- Umbricht C.B., Evron E., Gabrielson E, Ferguson A., Marks J., Sukumar S. (2001) Hypermethylation of 14-3-3 sigma (stratifin) is an early event in breast cancer. Oncogene 20, 3348-53.

- Van Rijnsoever M., Elsaleh H., Joseph D., McCaul K., Iacopetta B. (2003) CpG island methylator phenotype is an independent predictor of survival benefit from 5-fluorouracil in stage III colorectal cancer. Clin Cancer Res 9, 2898-903.
- Votruba J. (2007) http://www.lpr.cz/down/publikace/plice.doc.
- Wang R. Y.-H., Gehrke C. W., Ehrlich M. (1980) Comparison of bisulphite modification of 5-methyldeoxycytidin and deoxycytidine. Nucleic Acids Res 8, 4777-90.
- Yegnasubramanian S., Lin X., Haffner M.C., DeMarzo A.M., Nelson W.G. (2006) Combination of methylated-DNA precipitation and methylation-sensitive restriction enzymes (COMPARE-MS) for the rapid, sensitive and quantitative detection of DNA methylation. Nucleic Acids Res 34, e19.
- Zöchbauer-Müller S., Fong K.M., Virmani A.K., Geradts J., Gazdar A.F., Minna J.D. (2001) Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. Cancer Res 61, 249-55.