



**ROZPRAWA DOKTORSKA**

**Aleksandra Majchrzak-Celińska**

**Analiza metylacji wybranych genów w DNA guzów ośrodkowego układu  
nerwowego - poszukiwanie nowych markerów epigenetycznych**

Praca wykonana w Katedrze Biochemii Farmaceutycznej  
pod kierownictwem **prof. dr hab. Wandy Baer-Dubowskiej**

Praca dofinansowana z grantu MNiSW nr NN405 683 240 oraz ze stypendium pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałania 8.2.2 „Regionalne Strategie Innowacji”, Działania 8.2, Priorytetu VIII, Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki.

**Poznań 2014**

**Słowa kluczowe:**

metylacja DNA, markery epigenetyczne, nowotwory OUN, MSP, pirosekwencjonowanie

**Pragnę złożyć najszczerze podziękowania**

*Pani prof. dr hab. Wandzie Baer-Dubowskiej  
za umożliwienie realizacji  
wymarzonego tematu pracy doktorskiej  
oraz wspianą pomoc  
na każdym etapie jej przygotowywania.*

*Prof. dr hab. med. Stanisławowi Nowakowi,  
dr n. med. Annie-Marii Barciszewskiej  
oraz Pracownikom Kliniki Neurochirurgii i Neurotraumatologii  
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu  
za udostępnienie materiału do badań  
oraz otwartość na współpracę.*

*Prof. dr hab. Ryszardowi Słomskiemu  
oraz dr Marlenie Szalacie  
za udostępnienie pirosekwenatora  
oraz pomoc w wykonaniu oznaczeń.*

*Wszystkim Pracownikom Katedry Biochemii Farmaceutycznej,  
a w szczególności dr n. farm. Jarosławowi Paluszczakowi  
za codzienną życzliwość, pomoc i wsparcie.*

*Mojej Rodzinie, za wszelką pomoc i wiarę w moje możliwości.*

***Pracę dedykuję mojej Rodzinie***

**Wykaz skrótów:**

5hmC – 5-hydroksymetylocytozyna

Anaplastic astrocytoma – gwiaździak anaplastyczny

Astrocytoma fibrillare – gwiaździak włókienkowy

Astrocytoma pilocyticum – gwiaździak włosianokomórkowy

Astrocytoma gemistocyticum – gwiaździak tucznomórkowy

*ATM* - ang. *ataxia – teleangiectasia mutated gene*

CT - tomografia komputerowa

Ependymoma - wyściółczak

*ERCC1* – ang. *excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence)*

Ganglioglioma - zwojakoglejak

*GATA6* – ang. *GATA binding protein 6 gene*

GBM – glejak wielopostaciowy

GBM recidivans – wznowa glejaka wielopostaciowego

Giant cell glioblastoma – glejak wielopostaciowy olbrzymiokomórkowy

Gliosarcoma – glejakomięsak

Gliosarcoma recidivans – wznowa glejakomięsaka

*hMLH1* – ang. *mutL homolog 1 gene*

Meningeoma angiomasum – oponiak naczyńniakowaty

Meningeoma cellulare – oponiak komórkowy

Meningeoma meningotheliale – oponiak meningotelialny

Meningeoma psammomasum – oponiak włosianokomórkowy

Meningeoma transitionale – oponiak przejściowy

Meningeoma fibrosum – oponiak włóknisty

MGMT - metylotransferaza O<sup>6</sup> - metyloguaniny

MMR - naprawa błędnie sparowanych zasad

MR - rezonans magnetyczny

MRA - angiografia rezonansu magnetycznego

MSP - metylospecyficzna reakcja PCR

NER – naprawa przez wycinanie nukleotydu

*NDRG2* – ang. *NDRG family member 2 gene*

Oligoastrocytoma anaplasticum – skąpodrzewiakogwiaździak anaplastyczny

Oligodendroglioma - skąpodrzewiak

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

*PTEN* – ang. *phosphatase and tensin homolog gene*

*RARβ* – ang. *retinoic acid receptor beta gene*

*RASSF1A* – ang. *Ras association (RaIGDS/AF-6) domain family member 1 gene*

*RUNX3* – ang. *runt-related transcription factor 3 gene*

WM - współczynnik metylacji

<b>I. Wstęp</b> .....	<b>8</b>
1. Wprowadzenie .....	8
2. Epigenetyczna regulacja ekspresji genów .....	8
3. Molekularne podstawy kancerogenezy.....	14
3.1 Genetyczne mechanizmy kancerogenezy .....	14
3.2 Epigenetyczne mechanizmy kancerogenezy .....	15
4. Nowotwory ośrodkowego układu nerwowego .....	19
5. Markery epigenetyczne .....	22
5.1 Metylacja DNA jako potencjalny epigenetyczny marker diagnostyczny, prognostyczny lub predykcyjny – nadzieje i ograniczenia.....	22
5.2 Charakterystyka genów mogących pełnić funkcję nowych markerów epigenetycznych w guzach OUN.....	27
5.2.1 Geny naprawy DNA: <i>MGMT</i> , <i>ERCC1</i> , <i>hMLH1</i> , <i>ATM</i> .....	28
5.2.2 Geny kontrolujące cykl komórkowy: Locus <i>INK4B-ARF-INK4A</i> ( <i>p15INK4B</i> , <i>p14ARF</i> , <i>p16INK4A</i> ), <i>RASSF1A</i> .....	34
5.2.3 Czynniki transkrypcyjne: <i>RUNX3</i> , <i>GATA6</i> .....	37
5.2.4 Geny <i>NDRG2</i> , <i>PTEN</i> , <i>RARβ</i> .....	39
<b>II. Założenia i cel pracy</b> .....	<b>47</b>
<b>III. Materiały i metody</b> .....	<b>48</b>
1. Pacjenci.....	48
2. Odczynniki.....	48
3. Izolacja DNA z materiału operacyjnego .....	50
4. Izolacja DNA wolnokrążącego z surowicy .....	50
5. Chemiczna konwersja DNA w reakcji z wodorosiarczanem (IV) sodu .....	51
6. Metylospecyficzna reakcja PCR (MSP) .....	51
7. Ocena metylacji genów techniką pirosekwencjonowania .....	55
7.1 Pirosekwencjonowanie <i>MGMT</i> .....	57
7.2 Pirosekwencjonowanie <i>NDRG2</i> .....	59
8. Analiza statystyczna .....	61
<b>IV. Wyniki</b> .....	<b>62</b>
1. Dane kliniczne .....	62
1.1 Charakterystyka guzów glejowych .....	62
1.2 Charakterystyka oponiaków .....	64
1.3 Dane na temat przeżycia pacjentów z glejakami i oponiakami oraz krzywe przeżycia Kaplana-Meiera.....	67
1.4 Charakterystyka guzów przerzutowych.....	68
2. Profil zmian metylacji w nowotworach OUN uzyskany techniką MSP .....	69
2.1 Profil metylacji badanych genów w guzach glejowych.....	70
2.1.1 Ocena częstości metylacji genów w powiązaniu z klasyfikacją guzów wg WHO .....	70

2.1.2 Ocena współwystępowania metylacji badanych genów na podstawie współczynnika metylacji i jego powiązanie ze stopniem złośliwości guzów i wiekiem pacjentów .....	72
2.1.3 Analiza wyników metylacji poszczególnych genów w powiązaniu z wiekiem pacjentów ....	73
2.1.4 Analiza wyników metylacji poszczególnych genów w powiązaniu z płcią pacjentów .....	74
2.1.5 Ocena statystycznej korelacji metylacji regionów promotorowych poszczególnych genów z rozpoznaniem histopatologicznym .....	74
2.2 Profil metylacji badanych genów w oponiakach.....	75
2.2.1 Ocena częstości metylacji genów w powiązaniu z klasyfikacją guzów wg WHO .....	75
2.2.2 Ocena współwystępowania metylacji badanych genów na podstawie współczynnika metylacji i jego powiązanie ze stopniem złośliwości guzów i wiekiem pacjentów .....	77
2.2.3 Analiza wyników metylacji poszczególnych genów w powiązaniu z wiekiem pacjentów ....	78
2.2.4 Analiza wyników metylacji poszczególnych genów w powiązaniu z płcią pacjentów .....	79
2.3 Porównanie wyników analizy metylacji metodą MSP w populacjach glejaków i oponiaków ..	79
3. Ocena metylacji genów <i>MGMT</i> i <i>NDRG2</i> w nowotworach OUN uzyskanej techniką pirosekwencjonowania .....	80
3.1 Analiza wyników metylacji <i>MGMT</i> na podstawie reakcji pirosekwencjonowania – guzy glejowe .....	82
3.1.1 Ocena częstości metylacji <i>MGMT</i> .....	82
3.1.2 Ocena korelacji metylacji <i>MGMT</i> ze stopniem złośliwości, wiekiem oraz płcią pacjentów .	83
3.1.3 Ocena korelacji metylacji <i>MGMT</i> z przeżyciem pacjentów i czasem wolnym od wznowy ..	86
3.1.4 Porównanie wyników uzyskanych metodą MSP i pirosekwencjonowania .....	87
3.2 Analiza wyników metylacji <i>NDRG2</i> na podstawie reakcji pirosekwencjonowania – guzy glejowe .....	87
3.2.1 Ocena częstości metylacji <i>NDRG2</i> .....	87
3.2.2 Ocena korelacji metylacji <i>NDRG2</i> ze stopniem złośliwości, wiekiem oraz płcią pacjentów	88
3.2.3 Ocena korelacji metylacji <i>NDRG2</i> z przeżyciem pacjentów i czasem wolnym od wznowy	91
3.2.4 Porównanie wyników uzyskanych metodą MSP i pirosekwencjonowania .....	92
3.3 Analiza wyników metylacji <i>NDRG2</i> na podstawie reakcji pirosekwencjonowania – oponiaki	92
3.3.1 Ocena częstości metylacji <i>NDRG2</i> .....	92
3.3.2 Ocena korelacji metylacji <i>NDRG2</i> ze stopniem złośliwości, wiekiem oraz płcią pacjentów	93
3.3.3 Ocena korelacji metylacji <i>NDRG2</i> z przeżyciem pacjentów i czasem wolnym od wznowy	96
3.3.4 Porównanie wyników uzyskanych metodą MSP i pirosekwencjonowania .....	97
3.4 Porównanie wyników pirosekwencjonowania <i>NDRG2</i> w populacjach glejaków i oponiaków	97
4. Profil zmian metylacji wybranych genów w wolnokrążącym DNA wyizolowanym z surowicy. ....	98
4.1 Ocena częstości metylacji genów analizowanych w wolnokrążącym DNA izolowanym z surowicy – grupa glejaków oraz grupa innych nowotworów OUN .....	98
4.2 Ocena współwystępowania metylacji badanych genów na podstawie współczynnika metylacji .....	99
4.3 Porównanie wyników metylacji w DNA wolnokrążącym oraz DNA guza .....	100
<b>V. Dyskusja .....</b>	<b>101</b>

<b>VI. Podsumowanie i wnioski .....</b>	<b>109</b>
<b>VII. Piśmiennictwo .....</b>	<b>110</b>
<b>VIII. Wykaz publikacji i komunikatów zjazdowych .....</b>	<b>130</b>
<b>IX. Streszczenie .....</b>	<b>132</b>
<b>X. Abstract.....</b>	<b>134</b>
<b>XI. Aneks.....</b>	<b>136</b>



## I. Wstęp

### 1. Wprowadzenie

Ostatnie lata dostarczyły przekonujących dowodów, że obok zmian genetycznych w patogenezie nowotworów istotną rolę odgrywają także mechanizmy związane z epigenetyczną kontrolą ekspresji genów. Zmiany epigenomu zachodzą na różnych etapach indukcji nowotworów i z tego powodu mogą być celem oddziaływania zarówno czynników chemoprewencyjnych, jak i chemioterapeutyków. Epigenetyczna kontrola transkrypcji związana jest z metylacją reszt cytozyny dinukleotydów 5'-CpG-3' w DNA przez enzymy z grupy metylotransferaz DNA, kowalencyjnymi modyfikacjami histonów (acetylacja, fosforylacja, metylacja, ubiquitynacja), rodzicielskim piętnem genomowym (ang. *genomic imprinting*), oddziaływaniem białek Polycomb i Trithorax oraz interferencją RNA [Chen et al., 2014]. W komórkach nowotworowych obserwuje się spadek całkowitej zawartości metylocytozyny, a obok tego lokalną hipermetylację wysp CpG w obrębie promotorów różnych genów, w tym niezwykle ważnych dla zachowania homeostazy komórkowej genów supresorowych i innych genów ochronnych, co prowadzi do ich funkcjonalnego wyciszenia.

Ważnym odkryciem była obserwacja, że profil zmian metylacji DNA jest charakterystyczny dla tkanki pochodzenia guza, a także rodzaju guza i jego stopnia zaawansowania [Esteller et al., 2001]. Fakt ten wykorzystać można do celów diagnostycznych, w celu wykrywania choroby nowotworowej i prognozowania. Z punktu widzenia terapii przeciwnowotworowej istotne jest, że nowe markery epigenetyczne wykorzystać można także do oceny skuteczności podejmowanego sposobu leczenia (racjonalizacja wyboru formy terapii). Najbardziej udokumentowany jest związek między metylacją genu metylotransferazy  $O^6$ -metyloguaniny - *MGMT*, a odpowiedzią na leki alkilujące DNA [Hegi et al., 2005]. W ostatnich latach zgromadzono także szereg innych dowodów na diagnostyczną użyteczność opracowywanych epigenetycznych markerów w przewidywaniu odpowiedzi na leczenie farmakologiczne lub radiologiczne nowotworów. Skłania to do dalszych poszukiwań nowych markerów epigenetycznych szczególnie w odniesieniu do nowotworów, co do których aktualne metody diagnostyczne są niewystarczające.

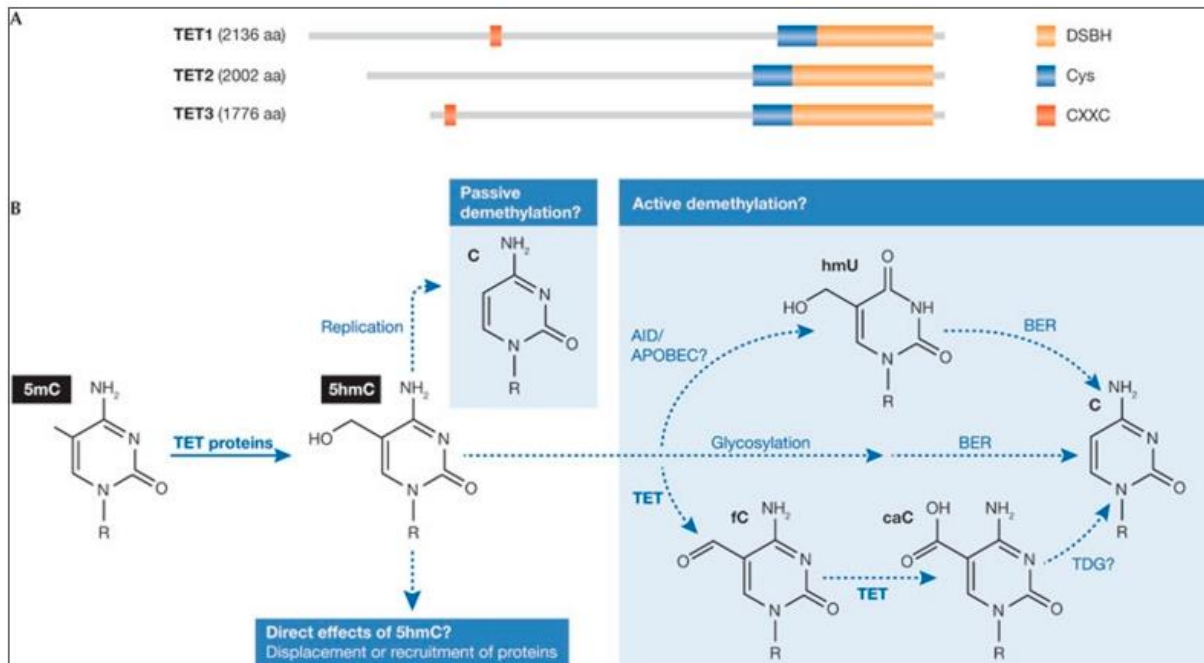
### 2. Epigenetyczna regulacja ekspresji genów

Komórki ludzkiego organizmu, mimo posiadania identycznego genomu wykazują ogromną różnorodność form i funkcji, co pozwala im na tworzenie odmiennych fenotypowo i funkcjonalnie tkanek i narządów. Za taki specyficzny dla danej tkanki profil ekspresji genów współodpowiedzialne są zjawiska epigenetyczne, które precyzyjnie regulują który gen w danym momencie ma ulec ekspresji. Samo pojęcie epigenetyka może być definiowane jako ogół dziedzicznych mechanizmów regulujących ekspresję genów, niewynikających bezpośrednio ze zmiany sekwencji nukleotydów w DNA. Dziedziczność, rozumiana jest tu zarówno jako utrwalenie zmian w kolejnych rundach replikacyjnych

(dziedziczność mitotyczna), ale również jako dziedziczność pokoleniowa (dziedziczność mejotyczna). Do podstawowych mechanizmów epigenetycznych zaliczamy metylację DNA, modyfikacje potranslacyjne białek histonowych oraz udział niekodujących RNA, takich jak miRNA czy siRNA. Istotną cechą modyfikacji epigenetycznych jest ich potencjalna odwracalność, co wykorzystane może być zarówno w chemoprewencji, jak i leczeniu różnych schorzeń, w tym raka.

## Metylacja DNA

Przeniesienie grupy metylowej z S-adenozylometioniny (SAM) na cytozynę w dinukleotydzie CpG katalizowane jest przez metylotransferazy DNA (DNMT) [Baylin, 2005]. Rolą DNMT1, jest utrwalenie wzoru metylacji podczas replikacji, natomiast DNMT3A i DNMT3B odpowiedzialne są za metylację *de novo*, a ich największa ekspresja ma miejsce podczas embriogenezy [Friedman et al., 2009]. DNMT3L nie ma właściwości metylotransferazy; jej rola sprowadza się do interakcji z metylotransferazami DNMT3a i DNMT3b, co ułatwia metylację retrotranspozonów [Deplus et al., 2002]. Zarówno funkcja wprowadzenia metylacji, jaki i jej podtrzymania są kluczowe dla rozwoju organizmu, co potwierdzają doświadczenia na myszach, u których zablokowanie ekspresji zarówno DNMT3B jak i DNMT1 podczas embriogenezy jest letalne, natomiast myszy bez funkcjonalnej DNMT3A umierają w okresie 4 tygodni od narodzin [Okano et al., 1999]. W utrzymywaniu prawidłowego statusu metylacji w odniesieniu do reprogramowania epigenetycznego w trakcie rozwoju zarodkowego, podczas różnicowania komórkowego, czy hematopoezy istotne jest również zjawisko demetylacji [Wu & Zhang, 2011]. O ile istnienie pasywnej demetylacji, polegającej na niepowieleniu wzoru metylacji w kolejnym cyklu replikacyjnym postulowało od lat, o tyle zjawisko aktywnej demetylacji poznano dopiero niedawno. Uważa się, że rolę w tym drugim procesie odgrywają białka z rodziny TET (ang. *ten-eleven translocation protein*). Badania ostatnich lat dowodzą, że hydroksylazy TET katalizują aktywną demetylację poprzez utlenienie 5mC (5-metylocytozyny) do 5hmC (5-hydroksymetylocytozyny), co ostatecznie prowadzi do zastąpienia 5hmC przez cytozynę, na drodze deaminacji przy udziale AID/APOBEC i naprawy przez wycinanie zasad (BER) [Bian et al., 2014]. Istnieją również doniesienia o możliwości dalszego przekształcania 5-hmC do 5fC (5-formylocytozyny) oraz 5-caC (5-karboksycytozyny), które są następnie rozpoznawane i wycinane przez glikozylazę TDG. Według Cortellino i wsp. demetylacja aktywna wymaga aktywności katalitycznej glikozylazy TDG bezpośrednio po deaminacji 5mC do tyminy, i/lub 5hmC do 5hmU [Cortellino et al.; 2011]. Podsumowując, badania te wskazują, że rola białek TET polega na zabezpieczeniu przed hipermetylacją i promowaniu demetylacji poprzez ścieżkę związaną z naprawą BER lub z udziałem glikozylazy TDG, co obrazuje poniższa rycina [Ryc. 1].



**Ryc. 1 Potencjalne role białek TET i 5hmC [Williams et al., 2011].** (A) Domeny strukturalne białek TET. TET1-3 zawierają region bogaty w cysteinę, poprzedzony niezbędną dla aktywności katalitycznej strukturą  $\beta$  heliksu (DSBH – ang. *double stranded  $\beta$  helix*). TET1 i TET3 zawierają ponadto domenę CXXC. (B) Konsekwencje biologiczne konwersji 5mC do 5hmC: 5hmC może ułatwić pasywną, poreplikacyjną demetylację lub może na drodze aktywnej zostać zamieniona na cytozynę. 5hmC może również w sposób bezpośredni oddziaływać z białkami.

Metylacji DNA ulegają cytozyny w obrębie dinukleotydów CpG, a te można podzielić zasadniczo na dwie grupy. Pierwszą stanowią dinukleotydy CpG w dużym rozproszeniu rozlokowane w genomie, drugą zaś dinukleotydy występujące w dużych skupiskach, tworzące tzw. wyspy CpG. Obecnie wyspę CpG definiuje się jako sekwencję nukleotydową długości powyżej 200pz, o zawartości GC >50% i współczynnikiem CpG obserwowanych/CpG oczekiwanych > 0,6 [Wang & Leung, 2004, Sandoval & Esteller, 2012]. Około 50-60% promotorów leży w obrębie wysp CpG i szacuje się, że ludzki genom zawiera około 29 000 sekwencji CpG [Kim et al., 2009]. Wyspy CpG, w szczególności te zlokalizowane w rejonach promotorowych są na ogół niezmetylowane w prawidłowych komórkach, zapewniając dostęp dla czynników transkrypcyjnych i białek remodelujących chromatynę, co umożliwia ekspresję genów odpowiedzialnych za podstawowe funkcje komórki, w tym jej metabolizm (ang. *housekeeping genes*), kontrolę cyklu komórkowego oraz zapewnia tkankowo specyficzną ekspresję genów. Z drugiej zaś strony, CpG leżące poza promotorami i niestanowiące wysp CpG, są w prawidłowych komórkach ssaków zmetylowane. Zapewnia to integralność genomu i uniemożliwia ekspresję sekwencji powtórzonych, pasożytniczych, czy retrotranspozonów.

Metylacja DNA może hamować ekspresję genów w sposób bezpośredni, poprzez uniemożliwienie przyłączenia się czynników transkrypcyjnych oraz polimerazy RNA I, jak i w sposób pośredni poprzez rekrutację białek MBD (ang. *methyl-CpG-binding domain proteins*). Białka MBD rekrutują z kolei kompleksy modyfikujące histony oraz remodelujące chromatynę, co utrudnia lub uniemożliwia aktywną transkrypcję [Bogdanovic et al., 2009]. Wyciszający efekt metylacji DNA często potęgowany

jest przez udział białek z rodziny Polycomb, np. EZH2 oraz CBX7, które mogą wchodzić w interakcję z DNMT [Viré et al., 2006, Mohammad et al., 2009]. EZH2, metylotransferaza histonów, katalizująca metylację H3K27, rekrutuje dodatkowe białka z rodziny PcG, co ostatecznie prowadzi do utworzenia nieaktywnej transkrypcyjnie heterochromatyny. Dowiedziono również, że EZH2 wchodzi w bezpośrednią interakcję z DNMT [Viré et al., 2006].

Powiązanie pomiędzy wzorem metylacji, a organizacją chromatyny i miejscami tworzenia nukleosomów jest wciąż mało poznanym obszarem badawczym. Dowiedziono, że odcinki DNA tworzące nukleosomy są zmetylowane w większym stopniu niż DNA łącznikowy (ang. *flanking DNA*) [Chodavarapu et al., 2010]. Może to odzwierciedlać fakt, że metylotransferazy preferencyjnie działają na DNA w obrębie nukleosomów, bo jest on topograficznie lepiej wyeksponowany i tym samym łatwiej dostępny [Chodavarapu et al., 2010]. Miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych, w tym również miejsce startu transkrypcji, są zlokalizowane poza odcinkiem DNA nawiniętym na nukleosom [Kaplan et al., 2009]. Pozycjonowanie nukleosomów jest jednym z najważniejszych mechanizmów kontrolujących ekspresję genów, ponieważ DNA w nukleosomie jest zdecydowanie mniej dostępny dla czynników transkrypcyjnych aniżeli DNA łącznikowy [Segal & Widom, 2009].

Fizjologiczną metylacją jest również metylacja jednego z dwóch chromosomów X (tzw. ciała Barra) u kobiet oraz udział w imprintingu genomowym.

### **Modyfikacje histonów**

Regulacja transkrypcji odbywa się również na poziomie białek histonowych, które tworząc oktamer stanowią rusztowanie dla nukleosomów. Łańcuchy aminokwasowe, zwane niekiedy „ogonami histonów” są miejscem przyłączania cząsteczek takich jak reszta metylowa, acetylowa, czy fosforanowa co znacząco wpływa na stopień kompaktacji chromatyny i reguluje jej dostępność transkrypcyjną. Jest to szczególnie ważne dla ekspresji genów, procesu naprawy DNA, replikacji DNA czy kontroli cyklu komórkowego [Sawan et al., 2008]. Zidentyfikowano kilkanaście rodzajów kowalencyjnych modyfikacji białek histonowych, włączając w to metylację, acetylację, fosforylację, ADP-rybozylację, sumoilację i ubikwitynację. Rolą tych modyfikacji jest regulowanie transkrypcji genów poprzez wpływ na stopień kompresji chromatyny lub poprzez rekrutację białek przebudowujących chromatynę [Brait & Sidransky, 2011]. Zależnie od rodzaju modyfikacji, oraz jej umiejscowienia w łańcuchu aminokwasowym kod histonowy może aktywować bądź represjonować transkrypcję [Sharma et al., 2010]. Generalnie acetylacja i fosforylacja aktywują transkrypcję, natomiast sumoilacja ją ogranicza [Sharma et al., 2010]. Mechanizm aktywującego oddziaływania acetylacji polega na tym, że neutralizuje ona pozytywnie naładowane podjednostki lizyny w ogonach histonów, co osłabia siłę wiązania pomiędzy histonem, a DNA i rozluźnia chromatynę, tym samym zwiększając dostępność transkrypcyjną tego regionu [Struhl, 1998]. Konsekwentnie deacetylacja wiąże się z represją transkrypcji. Enzymami odpowiedzialnymi za utratę acetylacji są deacetylazy histonów (HDAC), z kolei przyłączenie grupy acetylowej katalizują acetylotransferazy histonów (HAT).

Dobrze poznaną modyfikacją histonów jest też metylacja lizyny, której rola zależy od tego której lizyny dotyczy oraz jaka jest jej gęstość, tzn. czy mowa o mono, di- i lub tri- metylacji [Sharma et al., 2010]. Przykładowo H3K4me3 obserwowana jest często w pobliżu miejsca startu transkrypcji i związana jest z aktywacją transkrypcji, natomiast H3K27me3 wiąże się z wyciszeniem genu. Precyzyjna kontrola procesu metylacji i demetylacji histonów sprawowana jest odpowiednio przez metylotransferazy (HMT) oraz demetylazy histonów (HDM). Poniższa tabela zawiera zestawienie modyfikacji aktywujących oraz wyciszających transkrypcję.

**Tab.1 Modyfikacje histonów i ich wpływ na transkrypcję**

Modyfikacja aktywująca transkrypcję	Modyfikacja wyciszająca transkrypcję
<b>Acetylacja</b>	
H2A: K5, K9, K13	
H2B: K5, K12, K15, K20	
H3: K9, K14, K18, K23, K56	
H4: K5, K8, K13, K16	
<b>Metylacja</b>	<b>Metylacja</b>
H3: K4, K36, K79	H3: K9, K27
H3: R17, R23	H4: K20
H4: R3	
<b>Fosforylacja</b>	
H3: T3	
H3: S10, S28	
H3: Y41	
<b>Ubikwitynacja</b>	<b>Ubikwitynacja</b>
H2B: K120	H2A: K119
	<b>Sumoilacja</b>
	H4: K5, K8, K12, K16, K20

Na podstawie Choudhuri S et al., 2010.

(K – lizyna, R – arginina, T – treonina, S – seryna, Y – tyrozyna.)

Modyfikacje histonów i metylacja DNA współdziałają ze sobą na wielu płaszczyznach, warunkując prawidłowy status kompresji chromatyny i jej dostępność transkrypcyjną. Przykładem takiego oddziaływania może być fakt, że HMT, włączając w to G9a, SUV39H1 oraz PRMT5 mogą bezpośrednio rekrutować DNMT do określonej lokalizacji w genomie, co przyczynia się do wyciszenia epigenetycznego [Tachibana et al., 2008, Lehnertz et al., 2003, Zhao et al., 2009]. Co więcej HMT regulują stabilność DNMT [Estève et al., 2009]. Również DNMT mogą rekrutować HDAC i białka wiążące się do grup metylowych, co powoduje heterochromatyzację [Jones et al., 1998]. Zauważono, że metylacji DNA towarzyszy metylacja H3K9, najprawdopodobniej wynikająca z oddziaływania MeCP2 z HMT [Jones et al., 1998]. Przedstawione interakcje pomiędzy różnymi elementami maszynarii epigenetycznej obrazują wielką złożoność procesów warunkujących prawidłową ekspresję genów.

### Imprinting genetyczny

Okolo 1% genów kodowanych na autosomach podlega zjawisku imprintingu [Hamilton, 2011]. Polega ono na monoallelicznej, tzn. matczynej bądź ojcowskiej, ekspresji genu. Za taki właśnie model ekspresji odpowiada metylacja DNA oraz acetylacja histonów. Nieprawidłowości imprintingu leżą u podłoża takich zespołów chorobowych jak zespół Angelmana, Prader-Willi'ego lub Beckwith-Wiedemann'a.

## Niekodujące RNA

Odkrycie, że tylko około 1% genomu przepisywane jest na transkrypt RNA bezpośrednio kodujący białka, pozostawało przez pewien czas swoistym paradoksem, zważywszy na fakt, że powszechnej transkrypcji ulega wiele dodatkowych sekwencji w genomie. Rola tych transkryptów pozostawała nieznana, a koncepcje pojawiające się wśród badaczy oscylowały od hipotezy „transkrypcyjnego szumu” do potencjalnie istotnej maszynerii RNA o nieznanym funkcji. To drugie założenie okazało się słuszne, a owe transkrypty, dla odróżnienia od mRNA, nazwano niekodującymi RNA (ncRNA, ang. *non-coding RNA*). Do tej pory zidentyfikowano kilkanaście rodzajów takich niekodujących RNA, w tym microRNA (miRNA), małe interferencyjne RNA (siRNA, ang. *small interfering RNA*), piRNA (ang. *Piwi-interacting RNA*), PAR (ang. *promoter-associated RNA*), oraz snoRNA (ang. *small nucleolar RNA*) [Taft et al., 2010, Choudhuri, 2009]. Bazując na parametrze długości cząsteczki wyróżniono trzy główne klasy ncRNA, a mianowicie klasę małych niekodujących RNA (ang. *small ncRNA*), do których zalicza się miRNA, piRNA, siRNA i inne niekodujące transkrypty o długości mniejszej niż 200 nt, klasę długich ncRNA, które mają więcej niż 200 nt i stanowią transkrypty rejonów wewnątrzgenowych, lub są zorganizowane w pobliżu rejonów kodujących białka, oraz klasę bardzo długich ncRNA (ang. *very long ncRNA*), które mogą mieć wielkość nawet setek tysięcy zasad i są transkryptami sekwencji międzygenowych [Mitra et al., 2012].

W odróżnieniu od wcześniej omówionych zjawisk epigenetycznych, takich jak metylacja DNA oraz modyfikacje kowalencyjne histonów, ncRNA regulują ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym. Najlepiej poznanym ncRNA jest miRNA, którego rola polega na negatywnej regulacji ekspresji genów. miRNA są to ok. 22 nukleotydowe sekwencje RNA, powstałe przy użyciu Dicer, komplementarne do mRNA docelowego genu, mogące na dwa sposoby uniemożliwiać translację informacji z mRNA na białko. Pełna komplementarność obu sekwencji sprawia, że po przyłączeniu się miRNA do mRNA następuje degradacja mRNA przy pomocy kompleksu RISC, natomiast niecałkowita homologia obu sekwencji zaburza translację poprzez blokujący wpływ na tRNA [Gibney & Nolan, 2010]. siRNA to również ok. 21-22nt RNA powstałe po obróbce przez Dicer, regulujące ekspresję genów, kontrolujące transpozony oraz biorące udział w obronie przeciwwirusowej. piRNA, podobnie jak siRNA biorą udział w utrzymaniu integralności genomu poprzez wyciszanie transpozonów. Najliczniejszą klasę stanowią natomiast lncRNA. Ich komórkowo i tkankowo specyficzna ekspresja, która zmienia się w odpowiedzi na stres oraz inne sygnały środowiskowe sugeruje, że ich obecność w komórce wiąże się z konkretnym zapotrzebowaniem. Wykazano, że wiele z lncRNA posiada miejsca wiązania dla czynników transkrypcyjnych takich jak Sp1, c-Myc, p53 oraz Creb, co sugeruje możliwe poziomy ich regulacji [Cawley et al., 2004]. Rola lncRNA polega na udziale w transporcie subkomórkowym, rekrutacji czynników transkrypcyjnych, obróbce RNA oraz formowaniu kompleksów rybonukleoproteinowych [Mitra et al., 2012].

### 3. Molekularne podstawy kancerogenezy

#### 3.1 Genetyczne mechanizmy kancerogenezy

Kancerogeneza jest procesem wieloczynnikowym i wieloetapowym, w którym zmiany narastają w miarę zwiększania się liczby mutacji i pogłębiania niestabilności genomu. Nagromadzenie takich nieletalnych zmian w komórkach prowadzi do utraty kontroli nad procesami proliferacji, wzrostu i różnicowania. Czynniki kancerogenne takie jak np. promieniowanie jonizujące, kancerogeny chemiczne, czy wirusy onkogenne wpływając na genom komórki prowadzą do powstania nieletalnych mutacji, które utrwalone podczas replikacji skutkują nabyciem fenotypowych cech komórki nowotworowej. Cechy takie to, cytując Hanahan i Weinberg'a: a) wzrost uniezależniony od czynników wzrostu, b) niewrażliwość na sygnały hamujące proliferację, c) niereagowanie na sygnały proapoptotyczne d) nieograniczony potencjał replikacyjny e) nasilona angiogeneza oraz f) inwazyjność i zdolność do tworzenia przerzutów [Hanahan & Weinberg, 2011]. Do tej klasycznej listy cech ci sami autorzy dodali dwie nowe –zmieniony metabolizm energetyczny i unikanie immunologicznej destrukcji [Hanahan & Weinberg, 2011]. W modelach eksperymentalnych można wyróżnić co najmniej trzy etapy transformacji nowotworowej: inicjację, promocję i progresję. Z etapem inicjacji wiąże się powstanie pojedynczych, zmienionych genotypowo zainicjowanych komórek, które na etapie promocji pod wpływem sygnałów wzrostowych ulegają klonalnemu rozrostowi i prowadzą do powstania łagodnych form nowotworów. Progresja wiąże się z przekształceniem części z nich w formy o typowym fenotypie komórek rakowych [Trosko et al., 2004].

Do mutacji kluczowych dla procesu nowotworzenia należą mutacje protoonkogenów oraz genów supresorowych. Aktywacja protoonkogenów może nastąpić wskutek mutacji punktowej, amplifikacji genu, translokacji chromosomowej, bądź poddania protoonkogenu działaniu silnego promotora lub wzmacniacza. Efektem może być pojawienie się większej ilości białka onkogennego, zwiększonej jego aktywności enzymatycznej na skutek zmiany struktury umożliwiającej silniejsze oddziaływanie z receptorem, bądź zwiększenie jego stabilności. Takie onkoproteiny to przykładowo czynniki wzrostu lub receptory dla czynników wzrostu, białka przekaźnikowe zaangażowane w transdukcję sygnału do wnętrza komórki oraz białka jądrowe związane z regulacją proliferacji. Komórki nowotworowe oprócz wzmożonej autokrynej stymulacji czynnikami wzrostu cechuje również zdolność do pobudzania sąsiadujących komórek, które na drodze parakrynej przekazują sygnały komórkom sąsiadującym.

Drugą ważną cechą komórek nowotworowych jest utrata kontroli nad podziałami na skutek inaktywacji genów supresorowych. Geny supresorowe, sprawując kontrolę nad przebiegiem cyklu komórkowego warunkują przechodzenie przez kolejne punkty restrykcyjne tylko wtedy, gdy DNA nie jest uszkodzone, a maszyna niezbędna do replikacji, czy podziału mitotycznego jest gotowa i kompletna. Zgodnie z hipotezą Knudsona [Knudson, 1971], aby doszło do wyłączenia funkcji genu supresorowego konieczna jest inaktywacja obu jego alleli, co może przebiegać w ten sposób, że jeden z alleli wyłączany jest na drodze mutacji, podczas gdy drugi ulega inaktywacji epigenetycznej. W zdecydowanej większości genów supresorowych utrata heterozygotyczności (LOH) skutkuje pełną

utrata funkcji genu supresorowego. W większości nowotworów obserwowana jest inaktywacja *p53*, *pRB*, *p14ARF*, *p19ARF*, *p15INK4B* lub *p16INK4A*.

O funkcji supresora nowotworowego lub onkogenu możemy mówić również w przypadku miRNA, które spełnia tę funkcję kontrolując ekspresję docelowych białek [Deng et al., 2008]. Mutacje, polimorfizmy, zmiana liczby kopii genu kodującego sekwencję miRNA wpływają zatem na stabilność kontrolowanego transkryptu mRNA i przyczyniają się do nadmiernej lub niedostatecznej ekspresji odpowiednio onkogenów i genów supresorowych. Przykładowo w przewlekłej białaczce limfatycznej (CLL) 5 z 42 badanych genów kodujących miRNA ulegał mutacji [Calin et al., 2004].

Poza mutacjami protoonkogenów i genów supresorowych w indukcji kancerogenezy istotne są też mutacje innych genów związanych z utrzymaniem homeostazy komórkowej, przede wszystkim genów kodujących białka odpowiedzialne za naprawę DNA takich jak *hMLH1*, *hMLH2*, czy *ATM*.

Komórki nowotworowe wykorzystują różne strategie, by uniknąć apoptozy. Jedną z nich są mutacje genu kodującego białko p53, który jest krytycznym sensorem uszkodzeń DNA i podstawowym regulatorem zarówno szlaku zewnątrz- jak i wewnątrzpochodnego apoptozy. Często dochodzi również do nadekspresji białek proapoptotycznych Bid, Bad, PUMA, Noxa, lub obniżenia ekspresji czynników antyapoptotycznych Bcl-2 i Bcl-XL. Dodatkowo komórki nowotworowe pozostające pod wpływem niekorzystnego oddziaływania radio- lub chemioterapii uruchamiają proces autofagii, eliminując uszkodzone makromolekuły i zużywając uwolnione w tym procesie cząsteczki jako źródło energii.

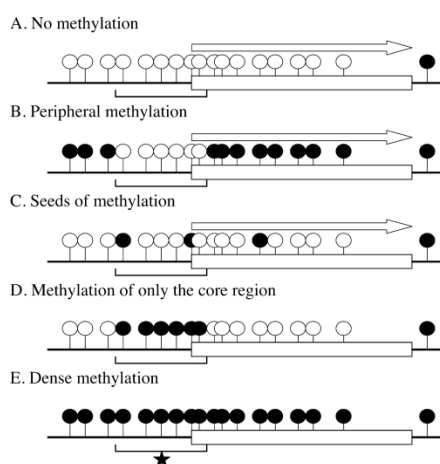
W procesie nowotworowym dochodzi również do mutacji w genach kontrolujących angiogenezę, naciekanie sąsiadujących tkanek oraz przerzutowanie. Proces nowotworzenia naczyń rozpoczyna się gdy guz składa się zaledwie z kilkudziesięciu komórek, a nowe naczynie powstaje gdy zawiera kilkaset komórek [Holash et al., 1999]. Angiogeneza zależy od wielu czynników, ale szczególnie ważny jest VEGF, bFGF, oraz metaloproteiny, angiopoetyny i integryny. Ekspresja VEGF pozostaje pod wpływem czynnika transkrypcyjnego HIF, który z kolei negatywnie regulowany jest przez supresor nowotworowy VHL. Delecja VHL prowadzi do rozpadu nieaktywnego kompleksu HIF-VHL, uwolnienia HIF i wzmożenia ekspresji VEGF. Ten zaś powoduje wzrost przepuszczalności i poszerzenie naczyń krwionośnych stymulując produkcję tlenu azotu przez śródbłonek naczyń. Pobudza on także enzymy proteolityczne oraz ekspresję receptorów ważnych dla powstawania nacieków komórkowych i przebudowy naczyń krwionośnych, wykazując zdolność ochrony komórek śródbłonna przed apoptozą [Ferrara et al., 1997].

### **3.2 Epigenetyczne mechanizmy kancerogenezy**

Pierwszą i do tej pory najlepiej opisaną zmianą epigenetyczną towarzyszącą transformacji nowotworowej jest nieprawidłowa metylacja DNA [Feinberg & Vogelstein, 1983]. Najnowsze dane mówią o tym, że niemal we wszystkich rodzajach nowotworów setki genów wykazują nieprawidłową metylację, obejmując 5-10% z tysięcy wysp CpG leżących w sekwencjach promotorowych, które w

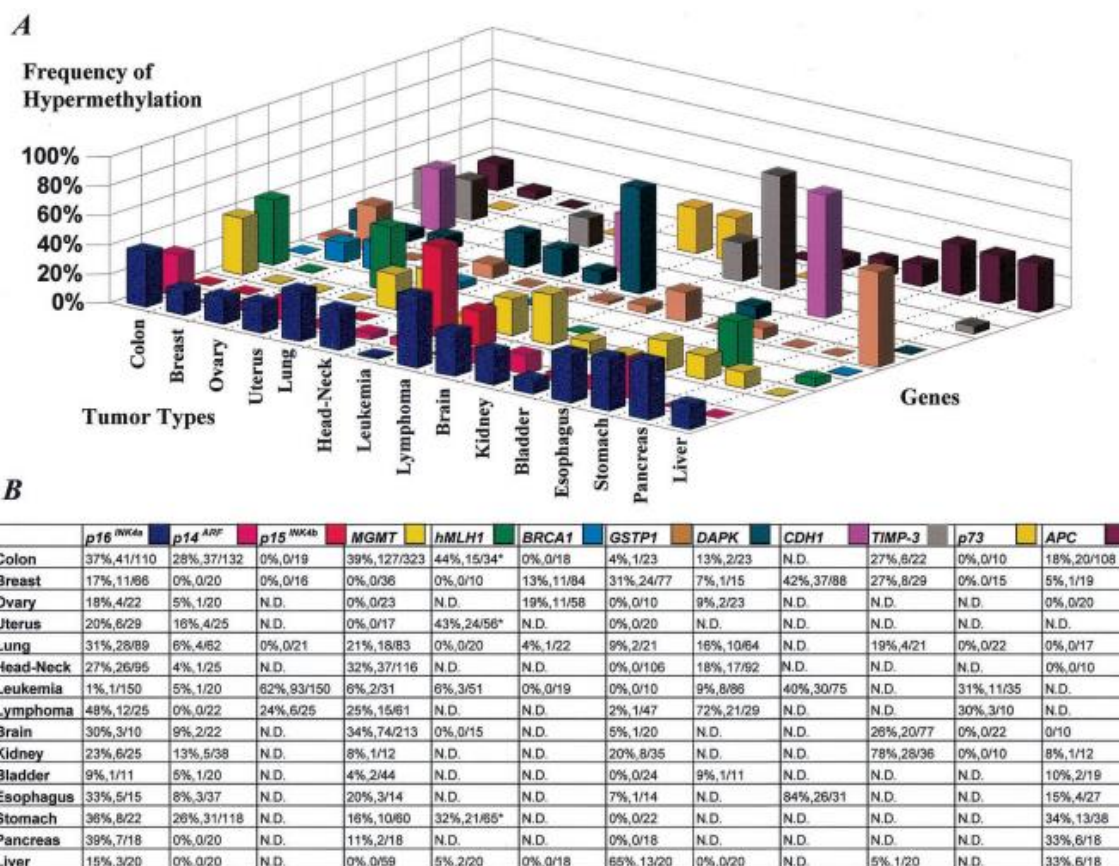


normalnych komórkach od momentu zakończenia rozwoju embrionalnego nigdy nie powinny być zmetylowane [Baylin et al., 2011]. Wiele procesów komórkowych zaburzonych jest na skutek nieprawidłowej metylacji wysp CpG. Są to m.in. naprawa DNA (*hMLH1*, *MGMT*), regulacja cyklu komórkowego (*p16INK4A*, *p15INK4B*, *p14ARF*), apoptoza (*DAPK*), czy detoksykacja (*GSTP1*) [Esteller, 2002]. Pod pojęciem nieprawidłowej metylacji w raku rozumiemy hipermetylację rejonów promotorowych genów supresorowych, globalną hipometylację oraz utratę imprintingu. Hipermetylacja określa obecność grup metylowych w pozycji C-5 cytozyny w dinukleotydach CpG zlokalizowanych w tzw. wyspach CpG, czyli obszarach o zwiększonej niż normalnie częstotliwości występowania dinukleotydów CpG. Zaobserwowano, że zjawisko nieprawidłowej metylacji wysp CpG dotyczy przede wszystkim genów supresorowych oraz wiąże się z wyciszeniem ich transkrypcji, a tym samym brakiem kodowanych przez te geny produktów białkowych. Molekularne mechanizmy indukcji nieprawidłowej metylacji nie są jasne, jednak sugeruje się powiązanie tego procesu ze starzeniem, stanem zapalnym, infekcjami wirusowymi lub działaniem substancji modulujących epigenom [Ushijima & Okochi-Takada, 2005]. Stan w którym obserwuje się wyciszenie epigenetyczne wynika z gęstej metylacji (ang. *dense methylation*) obszaru rdzeniowego, zauważono natomiast, że poprzedzony jest on pojawieniem się dwóch możliwych nieprawidłowości, mianowicie metylacji poza obszarem rdzeniowym (na Ryc. 2 punkt b), lub pojedynczych zmetylowanych miejsc CpG w obszarze rdzeniowym (ang. *seeds of methylation*) (na Ryc.2 punkt c) [Ushijima & Okochi-Takada, 2005]. I choć nie ma na to bezpośrednich dowodów, to jednak zakłada się, że taki stan metylacji genu ulegać może stopniowemu zagęszczeniu, co prowadzi do stopniowego spadku ekspresji genu. Wnioski takie wynikają z obserwacji, że nieprawidłowej metylacji obszaru rdzeniowego prawie zawsze towarzyszy metylacja poza obszarem rdzeniowym, a gęsta metylacja w komórkach raka jest często związana z metylacją obszarów nierdzeniowych w sąsiadujących komórkach prawidłowych. Obecnie postuluje się również istnienie funkcjonalnie istotnej metylacji w rejonie brzegowym wysp CpG (ang. *CpG Island shores*), leżących poza promotorem [Irizarry et al., 2009]. Różne możliwości rozkładu grup metylowych w promotorach ilustruje poniższa rycina.



**Ryc.2 Metylacja wysp CpG wg Ushijima & Okochi-Takada, 2005.** Kiedy obszar rdzeniowy wyspy (oznaczony klamrą) jest zmetylowany, transkrypcja genu jest zablokowana (D i E). Jeśli jednak metylacja dotyczy rejonu spoza obszaru rdzeniowego, obserwuje się brak wyciszenia genu (B). Sytuacja przedstawiona w pkt. C oznacza metylację rozszaniach CpG, co może być zaczątkiem gęstej metylacji i z czasem również może doprowadzić do zahamowania ekspresji genu (E). Białe kółka oznaczają brak metylacji, natomiast czarne metylację.

Jones i Laird postulują, że epigenetyczne wyciszenie genu supresorowego to zgodnie z hipotezą Knudsona druga zmiana, która obok mutacji powoduje całkowite wyłączenie genu supresorowego [Jones & Laird, 1999]. Metylacja DNA wycisza ekspresję poprzez stanowanie zawady przestrzennej dla czynników transkrypcyjnych, jak również dzięki rekrutacji białek MBD oraz represorów transkrypcji, które remodelują chromatynę czyniąc ją mniej dostępną dla maszyny transkrypcyjnej. Nowotwory różnych narządów cechują się charakterystycznym profilem nieprawidłowej metylacji, co obrazuje poniższa rycina [Esteller et al., 2001].



**Ryc.3** Profile metylacji wybranych genów w nowotworach jelita grubego, piersi, jajnika, macicy, płuc, głowy i szyi, białaczkach, chłoniakach, nowotworach mózgu, nerek, pęcherza moczowego, przelyku, żołądka, trzustki oraz wątroby. [Esteller et al., 2001].

Cechą komórek nowotworowych jest również to, że lokalnej hipermetylacji genów supresorowych towarzyszy też globalna hipometylacja całego genomu. Hipometylacja może dotyczyć także konkretnych sekwencji [Sandoval & Esteller, 2012]. Hipometylacja elementów powtórzonych, retrotranspozonów, oraz intronów prowadzi do niestabilności genomowej, co skutkować może zwiększoną predyspozycją do rearanżacji chromosomalnych, delecji lub translokacji retrotranspozonów [Eden et al., 2003]. Przypisuje się jej również rolę w uaktywnianiu protoonkogenów, takich jak c-Jun, c-Myc czy c-Ha-Ras [Calvisi et al., 2007]. Podczas progresji raka obserwuje się nasilenie zjawiska globalnej hipometylacji DNA (demetylacji DNA) [Fraga et al., 2004]. Przykładowo w raku wątroby obserwuje się hipometylację sekwencji powtórzonych takich jak SAT2, LINE1 oraz ALU, co koreluje z gorszym rokowaniem [Lee et al., 2009].

Utrata imprintingu jest definiowana jako utrata monoallelicznej, matczynej lub ojcowskiej ekspresji genów, na skutek hipometylacji jednego z dwóch alleli tychże genów, co skutkuje bialleliczną ekspresją genu. O utracie imprintingu mowa również, gdy dochodzi do utraty ekspresji obu alleli. Przykładowo utrata imprintingu genu IGF2 wiąże się ze zwiększonym ryzykiem raka, w tym raka okrężnicy [Lim & Maher, 2010].

Ekspresja genów w komórkach nowotworowych jest zmieniona również na skutek błędnej informacji kodowanej przez kod histonowy. Pod pojęciem tym rozumieć należy różnice w ilości i jakości modyfikacji potranslacyjnych białek histonowych takich jak metylacja, acetylacja, fosforylacja, ADP-rybozylacja, ubikwitynacja czy sumoilacja. Poprzez zmiany wzoru modyfikacji histonów zmianie ulega organizacja chromatyny, co uniemożliwia prawidłową ekspresję genów supresorowych oraz zahamowanie ekspresji onkogenów. Jest to w dużej mierze efektem zmiany ekspresji HDAC oraz HAT, co skutkuje zachwianiem precyzyjnej kontroli pomiędzy katalizowanymi przez nie procesami [Lucio-Eterovic et al., 2008, Isharwal et al., 2008]. Zaobserwowano na przykład, że powszechną cechą ludzkich komórek nowotworowych jest utrata acetylacji H4K16ac oraz trimetylacji H4K20me<sub>3</sub>, co powoduje represję transkrypcji [Fraga et al., 2005]. Jako, że HDAC ulegają częstej nadeskresji w raku, są one jednym z głównych celów terapii epigenetycznej. Oprócz nieprawidłowego wzoru acetylacji histonów, częstą cechą komórek nowotworowych są też zmiany metylacji histonów. Zmiany wzoru metylacji H3K9 oraz H3K27 na skutek nieprawidłowej ekspresji lub aktywności HMT są częstą przyczyną utraty ekspresji genów supresorowych [Nguyen et al., 2002, Valk-Lingbeek et al., 2004]. Przykładowo, EZH2, będąca HMT odpowiedzialną na metylację H3K27 ulega częstej nadeskresji w raku piersi i prostaty [Valk-Lingbeek et al., 2004], z kolei podwyższony poziom G9a, będąca HMT warunkująca prawidłową metylację H3K9 obserwowany jest w raku wątroby [Kondo et al., 2008]. Translokacja chromosomalna genu *MLL*, o funkcji HMT dla H3K4 prowadzi do nieprawidłowej ekspresji genów homeotycznych, co odgrywa rolę w progresji białaczki [Krivtsov & Armstrong, 2007].

Podobnie jak geny kodujące białka, ncRNA mogą funkcjonować jako onkogeny lub geny supresorowe. Badania porównawcze tkanek zdrowych i nowotworowo zmienionych wykazały różnice w ekspresji ponad 200 różnych lncRNA. Zidentyfikowano kilkanaście lncRNA których ekspresja lub status epigenetyczny jest bezpośrednio związany z rakiem. Reaktywacja lub brak supresji lncRNA typowych dla procesu embriogenezy mogą być krytyczne dla nabycia przez komórki cech pluripotencji oraz zdolności do niekontrolowanego wzrostu, co skutkować może procesem nowotworowym [Mitra et al., 2012].

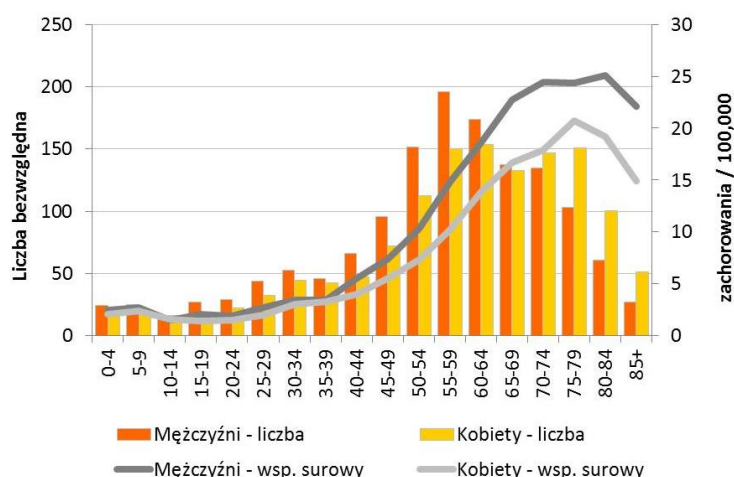
Ciekawym odkryciem była obserwacja, że miRNA będące częścią maszyny epigenetycznej, same przez tę maszynę są kontrolowane. Mogą one zatem na skutek nieprawidłowych mechanizmów epigenetycznych ulec zwiększonej lub zmniejszonej ekspresji w raku. Gdy miRNA kodowane są przez sekwencje leżące w obrębie wyspy CpG, mogą ulec zjawisku wyciszenia epigenetycznego, podobnie jak klasyczne geny supresorowe [Deng et al., 2008]. Istnieją również doniesienia o udziale modyfikacji histonów i ich roli w ekspresji miRNA [Deng et al., 2008]. Z uwagi na fakt udziału miRNA w regulacji potranskrypcyjnej genów zaangażowanych w kontrolę cyklu komórkowego, proliferację lub apoptozę,

ich odmienna ekspresja może promować kancerogenezę. Przykładowo rodzina miRNA let-7 ulega downregulacji w raku piersi i płuc, co skutkuje aktywacją onkogennej ścieżki z udziałem białka RAS [Peter, 2009]. Podobnie miR-15 i miR-16 są wyhamowane w chronicznej białaczce limfatycznej (CLL), czego rezultatem jest aktywacja protoonkogenu BCL2 [Cimmino et al., 2005]. Przykładem nadmiernej ekspresji miRNA jest kluster miR17-92, które odgrywają rolę w patogenezie raka piersi, płuc oraz przewlekłej białaczce szpikowej (CML), poprzez wpływ na czynnik transkrypcyjny E2F1, biorący udział w regulacji cyklu komórkowego [Olive et al., 2010].

#### 4. Nowotwory ośrodkowego układu nerwowego

##### Epidemiologia

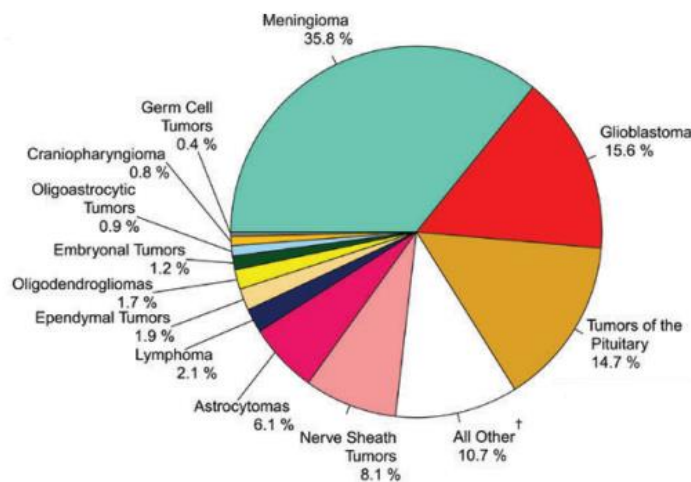
W Polsce zgodnie z danymi Krajowego Rejestru Nowotworów (KRN) guzy mózgu stanowią 2% zachorowań na nowotwory złośliwe, co w perspektywie roku daje 2700 nowych zachorowań (dane za 2010 rok) [www1]. W ciągu ostatnich trzech dekad liczba zachorowań wzrosła około 2-krotnie. Zapadalność na złośliwe glejaki oraz oponiaki, będące najczęstszymi pierwotnymi nowotworami OUN wrasta wraz z wiekiem [Fijuth & Dziadziuszko, 2013]. Zachorowalność na guzy nowotworowe mózgu na świecie wynosi w ciągu roku średnio 3,7/100 000 osób dla mężczyzn i 2,6/100 000 osób dla kobiet [Barciszewska, 2010]. Najwięcej zachorowań odnotowuje się między 50 a 64 rokiem życia, zaś w u dzieci nowotwory OUN stanowią drugi, po białaczkach, najczęstszy typ raka. Nowotwory mózgu stanowią 3% zgonów spowodowanych chorobą nowotworową u osób dorosłych obu płci oraz ok. 30% u dzieci (0-19 lat) [www1].



Ryc. 4 Zachorowalność na nowotwory mózgu w Polsce w latach 2008-2010 w zależności od wieku [www1]

Zgodnie z amerykańskim raportem CBTRUS guzy opon mózgowych oraz guzy glejowe stanowią dwa najliczniejsze typy guzów OUN (odpowiednio ok. 35% i 26%), co obrazuje Ryc. 5 [Ostrom et al., 2013]. Dane polskie mówią o ok. 40% udziale glejaków i 30% udziale oponiaków w grupie pierwotnych

nowotworów OUN [Fijuth & Dziadziuszko, 2013]. Wśród guzów glejowych, ponad połowę stanowią glejaki wielopostaciowe (GBM) [Barciszewska, 2010]. Oponiaki są ok. 2-krotnie częściej rozpoznawane u kobiet, zaś nowotwory pochodzenia neuroepitelialnego występują nieznacznie częściej u mężczyzn [Fijuth & Dziadziuszko, 2013]. Przerzuty do OUN są ponad 10-krotnie częstsze niż pierwotne zmiany i występują u 20-40% wszystkich chorych na nowotwory [Żyromska & Makarewicz, 2004, Barciszewska, 2010].



Ryc. 5 Procentowy udział poszczególnych typów pierwotnych nowotworów OUN wg Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS 2006-2010) [Ostrom et al., 2013].

### Klasyfikacja nowotworów OUN wg WHO

Zgodnie ze skróconą wersją klasyfikacji histopatologicznej pierwotnych nowotworów OUN wg WHO z 2007 roku wyróżnia się [Fijuth & Dziadziuszko, 2013]:

- nowotwory neuroepitelialne:

- astrocytarne
- skąpowypustkowe
- wyściółkowe
- glejowe mieszane
- pochodzące ze splotu naczyniówkowego
- inne nowotwory glejowe
- neuronalne i mieszane neuronalno-glejowe
- pochodzące z mięszu szyszynki
- zarodkowe z tkanki neuroepitelialnej

- nowotwory nerwów czaszkowych i rdzeniowych

- nerwiaki osłonkowe
- nerwiakowłókniki

- złośliwe nowotwory osłonek nerwów obwodowych
- nowotwory opon mózgowych
- chłoniaki i nowotwory układu krwiotwórczego
- nowotwory pochodzące z pierwotnych komórek rozrodczych
  - zarodczaki
  - raki zarodkowe
  - guzy zatoki endodermalnej
  - raki kosmówkowe
  - potworniaki
  - mieszane nowotwory z pierwotnych komórek rozrodczych
- nowotwory okolicy siodła tureckiego
  - czaszkogardlaki
  - nowotwory przysadki
- nowotwory przerzutowe.

Szczegółowa klasyfikacja histologiczna nowotworów OUN wraz z przyporządkowanymi stopniami złośliwości wg klasyfikacji WHO zamieszczona została w Aneksie do niniejszej pracy (Tab. 2 oraz Tab. 3)

Klasyfikacja wg WHO, lokalizacja guza oraz wiek pacjenta należą do najważniejszych czynników rokowniczych w guzach OUN [Louis et al., 2007b]. Kryterium do oceny stopnia złośliwości stanowią takie cechy jak polimorfizm i atypia komórek, aktywność mitotyczna, gęstość komórek w tkance guza, zaburzenie architektury tkankowej, wzrost naciekowy, obecność ognisk martwicy, oraz neoangiogeneza [Walecki & Chojnacka, 2007]. Określony na tej podstawie stopień złośliwości pozwala orientacyjnie ocenić medianę czasu przeżycia chorych, która wynosi odpowiednio dla I stopnia złośliwości w kategorii WHO <10 lat, dla stopnia II – 5-10 lat, stopnia III – 2-5 lat, zaś dla stopnia IV < 2lat [Fijuth & Dziadziuszko, 2013].

### **Etiopatogeneza**

Jedynym czynnikiem o udowodnionym znaczeniu w etiologii pierwotnych nowotworów złośliwych OUN jest promieniowanie jonizujące. Nie udowodniono związku z innymi czynnikami: chemicznymi (np. pestycydy, herbicydy, nitrozoaminy), fizycznymi (np. pole elektromagnetyczne), oraz urazami mózgu, czy zakażeniem wirusem Epsteina-Barra [Fijuth & Dziadziuszko, 2013]. Najczęstsze są przypadki sporadyczne guzów OUN; przypadki rodzinne stanowią zaledwie 5% wszystkich diagnozowanych nowotworów OUN [Blumenthal & Cannon-Albright, 2008]. Niektóre choroby dziedziczne (np. neurofibromatoza typu 1 i 2, stwardnienie guzowate, zespół Li-Fraumeni) predysponują do rozwoju nowotworów OUN [Barciszewska, 2010]. Postuluje się, że u podłoża wszystkich chorób nowotworowych, w tym również w guzach OUN, leżą przede wszystkim zaburzenia genetyczne i epigenetyczne.

## Diagnostyka

Do metod diagnostycznych wykorzystywanych w diagnostyce nowotworów OUN zalicza się tomografię komputerową (CT – *computed tomography*), rezonans magnetyczny (MR – *magnetic resonance*), angiografię rezonansu magnetycznego (*magnetic resonance angiography*), tomografię komputerową pojedynczego fotonu (SPECT – *single photon emission-computed tomography*), oraz pozytonową tomografię emisyjną (PET – *positron emission tomography*) [Walecki & Chojnacka, 2007, Barciszewska, 2010]. Metody te w zasadniczy sposób zmieniły możliwości rozpoznawania i różnicowania guzów OUN. Niemniej jednak metody obrazowe, pomimo wysokiej rozdzielczości liniowej i kontrastowej, możliwości oceny charakteru tkanki, jej unaczynienia, metabolizmu czy innych cech złośliwości, nie zawsze pozwalają na jednoznaczną i trafną diagnozę guzów OUN. Co więcej, badania molekularne wykazują, że identyczne morfologicznie guzy różnią się na poziomie zmian genetycznych i epigenetycznych, co może wpływać na przebieg choroby i odpowiedź na leczenie. Dlatego też coraz częściej wykorzystuje się markery genetyczne i epigenetyczne, które pozwalają na pełniejszą charakterystykę nowotworu konkretnego pacjenta oraz zindywidualizowanie jego leczenia. Do markerów o największym znaczeniu w kontekście nowotworów OUN zalicza się metylację *MGMT*, mutacje *IDH1/2*, oraz kodelecję 1p/19q [Gupta & Salunke, 2012]. Metylacja *MGMT* wskazuje na lepszą odpowiedź pacjentów z glejakiem na leczenie lekami alkilującymi, szczególnie w połączeniu z radioterapią, mutacje *IDH1/2* są natomiast dobrym czynnikiem rokowniczym w grupie glejaków. Z powodu występowania głównie w tej grupie guzów OUN mutacje *IDH1/2* mogą mieć też znaczenie diagnostyczne. Kodelecja 1p/19q jest użytecznym markerem diagnostycznym, prognostycznym i predykcyjnym w grupie skąpodrzewiaków i skąpodrzewiakogwiaździaków [Gupta & Salunke, 2012]. Fuzja i mutacje genu *BRAF* są ważnym markerem diagnostycznym dla gwiaździaków włosowatokomórkowych; postuluje się również, iż analiza fuzji *BRAF* oraz mutacji *IDH1* może być użyteczna do klasyfikowania i oceny stopnia złośliwości w grupie glejaków [Gupta & Salunke, 2012].

### 5. Markery epigenetyczne

#### 5.1 Metylacja DNA jako potencjalny epigenetyczny marker diagnostyczny, prognostyczny lub predykcyjny – nadzieje i ograniczenia

Co najmniej 10% wszystkich genów ulegających ekspresji jest kontrolowanych przez metylację, a 60% genów posiada lokalne wyspy CpG, dlatego też założyc można, iż w wielu, jeśli nie we wszystkich ścieżkach sygnałowych co najmniej jeden gen kontrolowany jest przez metylację [Lorincz, 2011]. Jeśli gen ten jest kluczowy dla regulacji danej ścieżki, to jego wyciszenie może wyłączyć cały szlak przekazywania sygnału. Licząc, że z 25 000 ludzkich genów 10% jest regulowanych przez metylację, istnieje potencjalnie 2 500 możliwych markerów metylacji [Lorincz, 2011]. Dodatkowo, metylacja rejonów niekodujących również może wpływać na ekspresję genów, tak więc liczba potencjalnych markerów może być znacznie wyższa.

Z biologicznego punktu widzenia, markerem nazywamy możliwą do oceny cechą charakteryzującą prawidłowe, bądź patologiczne zjawisko biologiczne, bądź odpowiedź pacjenta na interwencję terapeutyczną [Hodgson et al., 2010]. Z klinicznego punktu widzenia, to cecha lub zmienna, która opisuje funkcjonowanie chorego, bądź długość jego życia. Koncepcja wykorzystania markerów metylacji do określania grup ryzyka, wczesnego diagnozowania, przewidywania odpowiedzi pacjenta na leczenie, czy prognozowania długości przeżycia zrodziła się w latach 90'. Użycie zmetylowanych genów jako markerów ma bowiem wiele zalet [Mulero-Navarro & Esteller, 2008, Levenson, 2010]. Zmiany statusu metylacji są charakterystyczne dla komórek nowotworowych, zatem ich wykrycie może być pomocne w diagnozowaniu oraz klasyfikowaniu guzów. Metylacja DNA jest chemicznie i biologicznie dużo bardziej stabilna, tym samym wygodniejsza dla diagnostyki molekularnej, aniżeli analiza RNA czy białek [Laird, 2003]. Dla wielu typów nowotworów nie istnieją specyficzne markery białkowe, natomiast zmiany epigenetyczne praktycznie zawsze towarzyszą procesowi nowotworowemu. Co więcej, zmiany te pojawiają się już na najwcześniejszych etapach nowotworzenia, często wyprzedzając objawy kliniczne charakterystyczne dla danego typu guza, dlatego ich wykrycie może być pomocne we wczesnej diagnostyce osób chorych lub o zwiększonej predyspozycji do danego typu raka. DNA może być pozyskane z szeregu tkanek, np. tkanki guza, ale również z krwi, moczu, płwociny etc. Badania można przeprowadzić na długo po pobraniu tkanki, uwzględniając odpowiednie jej przechowywanie. Istnieje również szereg wygodnych, szybkich i czułych metod, takich jak MSP, HPLC, czy HPCE, które można wykorzystać do rutynowych badań.

Wysoce specyficzne i czułe okazały się markery metylacji oznaczane we krwi i kale pacjentów wskazujące ryzyko rozwoju oraz diagnozujące raka okrężnicy [Glöckner et al., 2009, Lofton-Day et al., 2008], jak również metylacja *GSTP1* oznaczana w próbkach moczu i tkankach z biopsji raka prostaty [Cairns et al., 2001, Rosenbaum et al., 2005]. Istnieją już zestawy do komercyjnego oznaczania tych markerów, aczkolwiek nie są one jeszcze zaaprobowane przez instytucje takie jak U.S. Food and Drug Administration (FDA). Niemniej jednak nadzieje związane z możliwością rutynowego wykorzystania metylacji *GSTP1* w diagnostyce są ogromne, gdyż wykazano, że analiza profilu metylacji tego genu pozwala na odróżnienie tkanki w której rozwija się nowotwór, spośród innych o podobnej lokalizacji. Metylacja *GSTP1* jest bowiem charakterystyczna dla raka prostaty (występuje u 90% chorych), natomiast rzadko pojawia się u pacjentów z rakiem pęcherza moczowego lub nerki (10% chorych). Swoistość testu z wykorzystaniem surowicy lub moczu jest równa 100%, natomiast czułość waha się w granicach 27- 40% dla moczu i ponad 40% dla surowicy. Wykazano jednak, że dodatkowe oznaczenie *p16INK4A*, *p14ARF* oraz *MGMT* podnosi czułość oznaczenia w moczu do 87%, nie wpływając negatywnie na swoistość [Cairns, 2007, Brait & Sidransky, 2011]. Innym przykładem jest hipermetylacja *APC*, *p16INK4A* oraz *DAPK* oznaczana w surowicy lub osoczu pacjentek z wczesnym stadium raka jajnika, która określana jest jako potencjalny nowy marker wczesnego wykrywania tego nowotworu [Maldonado & Hoque, 2010]. Metylacja promotorów genów *p16INK4a*, *BRCA1*, *BRCA2*, *ERα* oraz *RARβ2*, *APC* i *RASSF1A* związana jest natomiast z wczesnym stadium raka piersi i sugerowane jest, aby przynajmniej część tych genów była włączona do modelowego zestawu szacującego indywidualne ryzyko raka piersi u kobiet predysponowanych [Dumitrescu, 2012]. Istotną kwestią praktyczną rozpatrywaną w kontekście markerów wczesnej



diagnozy lub określających istnienie predyspozycji do danego typu raka, jest potencjalna odwracalność zmian epigenetycznych, poprzez wpływ substancji zawartych w diecie oraz leków. Wydaje się bowiem, że poprzez zmianę diety można zatrzymać lub odwrócić proces nowotworowy. Do znanych substancji pochodzenia naturalnego modulujących epigenom, a zawartych w codziennej diecie, należą polifenole i flawonoidy zawarte w zielonej herbacie, fitoestrogeny, likopen, oraz związki zaangażowane w metabolizm grup jednowęglowych, w szczególności kwas foliowy, który jako donor grupy metylowej jest bezpośrednio zaangażowany w proces metylacji DNA, oraz cholina i betaina [Lim & Song, 2012, Paluszczak & Baer-Dubowska, 2014]. W kontekście markerów optymalizujących terapię największe znaczenie praktyczne zdaje się odgrywać metylacja *MGMT*. Utrata ekspresji *MGMT* jest często obserwowana w wielu typach nowotworów, co zwykle jest konsekwencją wyciszenia transkrypcji indukowanego przez hipermetylację wyspy CpG promotora genu *MGMT*. Glejaki wykazujące metylację *MGMT* są bardziej wrażliwe na temozolomid, będący lekiem alkilującym, co wydłuża przeżycie chorych. Konsekwencją tego są próby wykorzystania badań metylacji *MGMT* w przewidywaniu odpowiedzi pacjenta na leczenie oraz jako czynnika prognostycznego. Pomocne w ustalaniu strategii terapeutycznej okazało się również określanie metylacji grupy genów, w tym *p16INK4A* oraz *CDH13* u pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuc, w stopniu zaawansowania I, u których metylacja tych genów korelowała z wcześniejszą wznową i większym ryzykiem śmierci [Brock et al., 2008]. Z kolei metylacja genów *HLTF* oraz *HPP1* w surowicy pacjentów z rakiem okrężnicy jest niezależnym czynnikiem prognostycznym wskazującym na istnienie przerzutów [Philipp et al., 2012]. W kontekście markerów epigenetycznych świadczących o zaawansowanym stadium raka lub przerzutach, zasadnym wydaje się rozważenie włączenia leków wpływających na epigenom. Obecnie zaaprobowane przez FDA są dwie grupy tego typu leków, a mianowicie inhibitory metylotransferaz DNA oraz inhibitory deacetylaz histonów. Zastosowanie znalazły one do leczenia zespołów mielodysplastycznych, trwają natomiast badania kliniczne nad zastosowaniem tych leków do leczenia nowotworów litych.

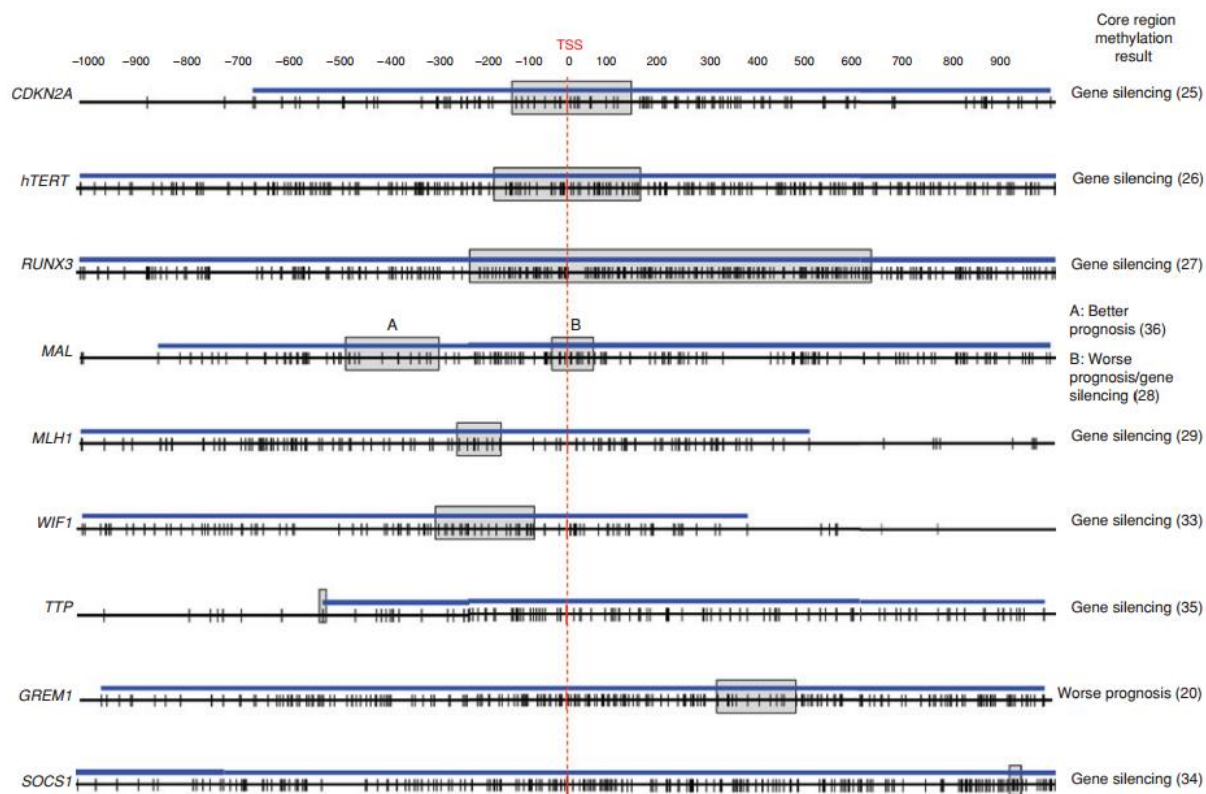
Dla praktycznego i wygodnego wykorzystania markerów metylacji kluczowa jest możliwość pozyskania DNA guza z tkanki obwodowej, jaką jest krew. Krew stanowi bowiem szybką i małoinwazyjną alternatywę dla biopsji lub materiału operacyjnego, co w przypadku trudno dostępnych guzów, takich jak np. guzy mózgu jest niewątpliwie wielką zaletą. Istnienie w krążeniu obwodowym kwasów nukleinowych pozostających w przestrzeni pozakomórkowej (ang. *extracellular nucleic acid*) zostało po raz pierwszy zaobserwowane w 1947 roku przez zespół Mandel i Métails [Mandel & Métails, 1947]. Trzydzieści lat później wykazano, że u pacjentów cierpiących na nowotwory wolnokrążącego DNA jest zdecydowanie więcej, aniżeli u pacjentów chorych na choroby nienowotworowe [Leon et al., 1977]. Ponadto, po skutecznej terapii przeciwnowotworowej poziom wolnokrążącego DNA obniżał się [Leon et al., 1977]. Dokładna geneza pojawienia się wolnokrążącego DNA we krwi nie jest jasna, jednak przeważa pogląd, że pochodzi ono z komórek guza ulegających apoptozie lub nekrozie i jako forma mocno pofragmentowana przenika do krążenia ogólnego [Nagarajan & Costello, 2009 a]. Wolnokrążące DNA pochodzące z guza jest obecne w bardzo małej ilości we krwi obwodowej, może bowiem stanowić mniej niż 0,01% całości krążących we krwi kwasów nukleinowych (ang. *total circulating nucleic acids*) [Chan & Lo, 2007, Diehl et al., 2005, Lavon et al., 2010]. Sugeruje się, że

pewnym ograniczeniem w możliwości pozyskania DNA guza z krwi obwodowej pacjentów cierpiących na nowotwory mózgu może być bariera krew-mózg, jednak obecnie uważa się, że nie blokuje ona całkowicie transferu DNA guza do osocza [Nagarajan et al., 2009 a, Weaver et al., 2006]. Obecnie doniesień literaturowych na temat możliwości pozyskania i wykorzystania DNA do badań metylacji z surowicy lub osocza jest wiele [Lavon et al., 2010, Gautschi et al., 2004, Hoque et al., 2006, Bazan et al., 2006]. Przykładowo badania porównawcze przeprowadzone na DNA izolowanym z osocza i tkanki guzów glejowych wskazywały na możliwość wykrycia metylacji *p16INK4A*, *MGMT*, *p73* oraz *RARβ* w obu analizowanych przypadkach. Gautschi i wsp. wskazuje natomiast, że poziom osoczowy wolnokrążącego DNA koreluje ze stopniem zaawansowania niedrobnokomórkowego raka płuc [Gautschi et al., 2004]. Krew można pobrać już na najwcześniejszym etapie, u osób narażonych lub rodzinie predysponowanych, lub jako uzupełnienie diagnostyki opartej na analizie histopatologicznej u pacjentów już zdiagnozowanych. Sama obecność wolnokrążącego DNA może, lecz nie musi być wyznacznikiem choroby nowotworowej, bowiem jego poziom zwiększa się również w stanach zapalnych, toczeniu rumieniowatym, zapaleniu wątroby lub w ciąży, jednak obecność metylacji specyficznych locus może sugerować rozwój lub predyspozycję do określonego typu nowotworu [Skvortsova et al., 2006]. Co więcej markery w surowicy utrzymują się nawet do 12 m-cy po zabiegu operacyjnym, na co wskazują badania Lavon'a i wsp. [Lavon et al., 2010]. Pobieranie krwi w interwałach czasowych w trakcie kursu leczenia może ułatwić monitorowanie terapii, w szczególności jeśli mowa o terapii epigenetycznej, z użyciem inhibitorów DNMT lub HDAC, ale również w przypadku standardowych cytostatyków. Fiegl i wsp. analizując metylację *RASSF1A* w surowicy kobiet cierpiących na raka piersi zaobserwował, że wykrycie metylacji tego genu w rok po operacji (z wdrożonym leczeniem adiuwantowym tamoxifenem) było niezależnym czynnikiem prognostycznym sugerującym gorsze rokowanie i wskazywało na relatywnie zwiększone ryzyko wznowy [Fiegl et al., 2005]. Kontrolowanie zmian metylacji DNA w surowicy pozwalało na monitorowanie efektywności terapii adiuwantowej. Utrata metylacji *RASSF1A* podczas leczenia tamoxifenem wskazywała na dobrą odpowiedź pacjentki, natomiast utrzymywanie się lub nowe pojawienie się zmetylowanego statusu metylacji tego genu wskazywało na lekooporność [Fiegl et al., 2005].

Na dzień dzisiejszy istnieje jednak również szereg ograniczeń rutynowego zastosowania markerów metylacji, które dotyczą przede wszystkim ustalenia dokładnej lokalizacji analizowanej sekwencji, wyboru metody i jej walidacji, opracowania jednoznacznego sposobu interpretacji uzyskanych danych oraz potwierdzenia uzyskanych wyników przez wieloosrodkowe zespoły realizujące program badań klinicznych. W przypadku zastosowania wolnokrążącego DNA do badania markerów metylacji istotnym problemem jest dobór odpowiedniej metody izolacji DNA, która umożliwi izolację tak małej frakcji silnie pofragmentowanego DNA guzowego. Brak standardowego protokołu izolacji, który byłby najbardziej optymalny dla tego typu reakcji sprawia, że różni autorzy stosują różne metody, co czasem jest przyczyną niejednoznaczności w wynikach i wnioskach. W artykule Fong'a i wsp. autor wskazuje na istotną stratę fragmentów wielkości 200 - 400 pz w trakcie izolacji metodą kolumnkową, z użyciem np. „Puregene DNA purification System Cell and Tissue Kit”, czy „ZR serum DNA kit”, ale również metodą „Guanidine-resin method” [Fong et al. 2009]. Doniesienia o istnieniu, obok wolnokrążącego DNA, również frakcji DNA guza związanego z komórkami krwi (ang *cell-surface-*

*bound cirDNA*) wnosi nowe możliwości badawcze [Skvortsova et al., 2006], ale jednocześnie wątpliwość, która z frakcji DNA jest najdogodniejsza do poszukiwania markerów metylacji.

Dużą uwagę przywiązuje się obecnie również do precyzyjnego wskazania regionu, którego metylacja stanowi potencjalny marker diagnostyczny, terapeutyczny, czy rokowniczy. Chodzi mianowicie o wskazanie, które dinukleotydy CpG w obrębie danej wyspy mają największy udział w regulacji transkrypcji, a co za tym idzie, których wyciszenie w największym stopniu wpływać będzie na wyciszenie ekspresji. Wykazano, że do wyciszenia transkrypcji nie potrzeba metylacji całej wyspy CpG, a jedynie kilku-kilkunastu dinukleotydów. Badanie wysp CpG wielu genów wykazało, że rejony rdzeniowe (ang. *core regions*), czyli obszary o największym znaczeniu dla regulacji transkrypcji obejmują zazwyczaj sekwencję w okolicy miejsca startu transkrypcji (TSS), ale również mogą być obserwowane powyżej lub poniżej tego miejsca [van Vlodrop et al., 2011]. Zjawisko to ilustruje poniższa rycina (Ryc.6) Na przykład rejon rdzeniowy dla genu *p16INK4A* został określony w lokalizacji -121 do 123 względem TSS (TSS = punkt O), podczas gdy dla genu *MLH1* mieści się on w rejonie -248 do -178 względem TSS [van Vlodrop et al., 2011]. Hipermetylacja poza rejonem rdzeniowym obserwowana jest w komórkach nowotworowych, ale również w prawidłowych, co związane jest z procesem starzenia i stanem zapalnym. Sugeruje się również możliwość progresji metylacji z obszarów bardziej oddalonych do obszaru rdzeniowego, co wpływa na wyciszenie ekspresji. Przykładowo hipermetylacja *RASSF1A* w egzonie 1 jest obserwowana w zdrowych komórkach piersi, natomiast w komórkach raka piersi, oprócz metylacji egzonu 1 pojawia się też metylacja górnego rejonu promotorowego (ang. *upstream promoter region*) [Yan et al., 2003]. Skrajnym przykładem jest obserwacja, że w raku wątroby metylacja pojedynczego dinukleotydu CpG wycisza ekspresję genu *TTP* (ang. *transforming growth factor beta 1*) [Sohn et al., 2010]. Ciekawą jest obserwacja metylacji dwóch fragmentów promotora genu *MAL* w próbkach guzów żołądka. Wykazano, że metylacja obu regionów była częsta, aczkolwiek tylko metylacja w rejonie najbliższym względem TSS korelowała z dłuższym czasem przeżycia bez objawów choroby [Buffart et al., 2008]. Analiza trzech fragmentów promotora genu *GREM1* wykazała natomiast, że metylacja tylko jednego z nich jest wyznacznikiem złego rokowania [van Vlodrop et al., 2010]. Precyzyjne wskazanie krytycznych rejonów hipermetylacji jest zatem kluczowe dla poszukiwania nowych markerów metylacji oraz wprowadzenia tych już odkrytych do rutynowej praktyki klinicznej. I chociaż nie zawsze klinicznie istotna metylacja specyficznego locus jest powiązana z wyciszeniem ekspresji, to jednak sugeruje się, że najlepiej zwalidowane markery metylacji to te, których metylacja warunkuje epigenetyczne wyciszenie [van Vlodrop et al., 2011].



**Ryc. 6 Lokalizacja istotnych biologicznie miejsc metylacji w wyspach CpG różnych genów [van Vludrop et al., 2011].** Wskazany obszar obejmuje -1000 do + 1000 pz względem TSS, które wskazane jest czerwoną kreską, wyspa CpG zaś zaznaczona jest na niebiesko. Pionowe kreski oznaczają poszczególne dinukleotydy CpG. Szare prostokąty obejmują obszary, których metylacja jest krytyczna dla ekspresji genu, lub prognozowania przebiegu choroby.

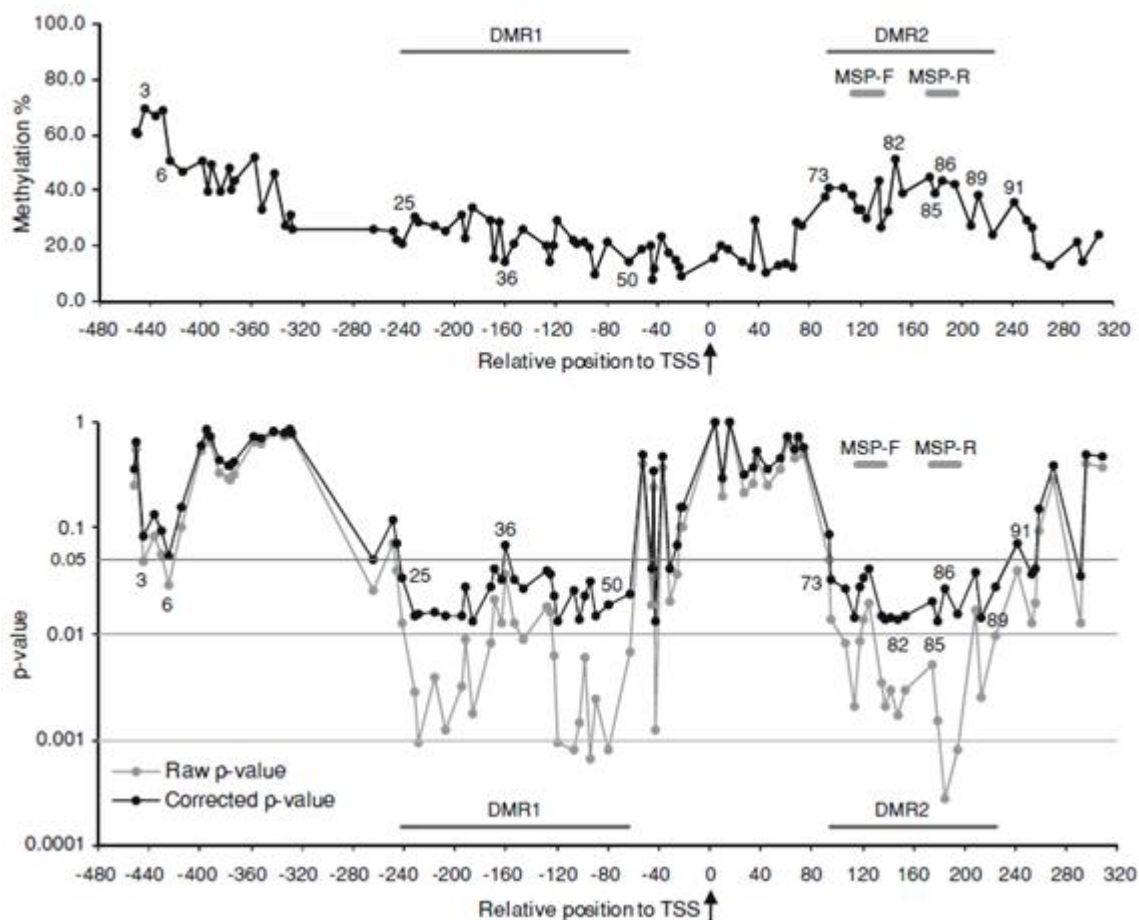
## 5.2 Charakterystyka genów mogących pełnić funkcję nowych markerów epigenetycznych w guzach OUN

W niniejszej pracy wybrano do oceny metylacji 13 genów, mogących potencjalnie pełnić z powodu swojej budowy i funkcji, rolę nowych markerów epigenetycznych. Jako kryterium ich selekcji przyjęto fakt, że ich ekspresja jest regulowana epigenetycznie na drodze metylacji promotora i że mogą one pełnić istotną, z punktu widzenia kancerogenezy i ewentualnego leczenia przeciwnowotworowego, funkcję. Poniższy rozdział przedstawia zatem opis doniesień literaturowych na temat organizacji locus, w którym zlokalizowane są badane geny, ze szczególnym uwzględnieniem danych dotyczących budowy promotora, oraz mechanizmów regulujących ich ekspresję. Rozdział prezentuje również funkcję białkowych produktów tych genów, szczególnie aktywności, które dotyczą OUN oraz potencjalnie ingerują w mechanizmy działania leków cytostatycznych.

### 5.2.1 Geny naprawy DNA: *MGMT*, *ERCC1*, *hMLH1*, *ATM*

Gen *MGMT* składa się ze 170 kpz i zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 10 (10q26). Zawiera 26 egzonów, z czego pierwszy nie ulega translacji. W promotorze zlokalizowana jest wyspa CpG, zawierająca 97 dinukleotydów CpG, z czego większość zlokalizowana jest ~300 nt w kierunku 5' względem miejsca startu transkrypcji i w obrębie pierwszego egzonu [Silber et al., 2012]. W sekwencji promotora znajdują się miejsca wiązania czynnika Sp1, który zawiaduje transkrypcją genu w odpowiedzi na uszkodzenie DNA wykryte przez p53 [Silber et al., 2012]. Promotor zawiera również miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych Jun, oraz Fos, jak również miejsca odpowiedzi na glukokortykosteroidy [Silber et al., 2012]. Tak więc ekspresja *MGMT* jest regulowana zarówno przez status metylacji promotora genu, jak i przez czynniki transkrypcyjne aktywujące ekspresję w odpowiedzi na substancje alkilujące, promieniowanie X oraz terapię glikokortykosteroidami.

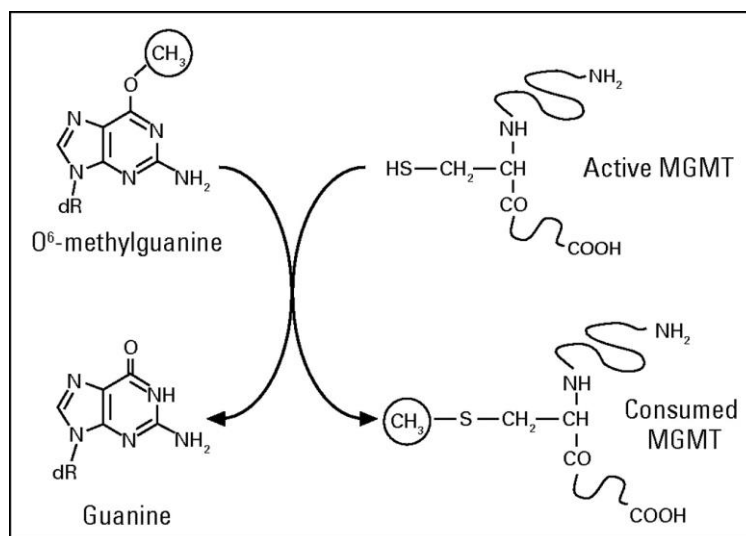
Do tej pory nie zostało w pełni wyjaśnione, czy region wyspy CpG genu *MGMT* zwyczajowo analizowany przez większość badaczy jest regionem krytycznym w kontroli transkrypcji tego genu. Cennych informacji na ten temat dostarczają badania Mulholland i wsp., którzy przeanalizowali poziom metylacji każdego dinukleotydu CpG w obrębie całej wyspy CpG genu *MGMT*, co w znaczący sposób przyczyniło się do poznania roli i znaczenia metylacji poszczególnych CpG tego genu w kontroli transkrypcji. Użyto do tego celu metody pirosekwencjonowania, po uprzedniej reakcji z wodorosiarczanem IV sodu, i porównano te poziomy z poziomami mRNA odzwierciedlającymi ekspresję *MGMT* w liniach komórkowych glejaka, ksenograftach i tkankach zdrowego mózgu. Wykryto dwa rejony krytyczne dla regulacji ekspresji, nazwane DMR1 i DMR2 (odpowiednio ang. *Differentially methylated region 1 i 2*). Region DMR2 obejmuje obszar najczęściej analizowany przez poprzednich badaczy. Dowiedziono również, że metylacji DMR2 zawsze towarzyszyła metylacja rejonu DMR1. Kolejne badanie z użyciem genu reporterowego lucyferazy pozwoliło na wyłonienie kilku dinukleotydów CpG w obrębie rejonu DMR2, które odgrywają kluczową rolę w kontroli transkrypcji *MGMT*, w wyniku czego uznano, że DMR2 jest optymalnym rejonem do badania metylacji tego genu. Warta uwagi jest także obserwacja dużej heterogenności metylacji w obrębie poszczególnych dinukleotydów CpG, co sprawia, że dopiero badanie serii CpG, a nie pojedynczych dinukleotydów daje wiarygodną informację o wyciszeniu transkrypcji i wrażliwości na czynniki alkilujące [Malley et al., 2011].



**Ryc. 7** Zależność pomiędzy częstością metylacji dinukleotydów CpG w regionie promotorowym *MGMT*, a jego ekspresją [Malley et al., 2011]. DMR1, DMR2 (ang. *differentially methylated regions 1 and 2*); Górny wykres – procentowy poziom metylacji dinukleotydów CpG określonych numerycznie w odniesieniu do ich odległości od TSS (miejsce startu transkrypcji, pozycja 0); Dolny wykres – zależność pomiędzy dinukleotydami CpG zmetylowanymi i niezmetylowanymi w kontekście wpływu na ekspresję *MGMT*. Im większe, wynikające z użycia testów statystycznych, różnice wychyleń linii czarnej od szarej, tym większa korelacja między metylacją, a zmniejszeniem ekspresji.

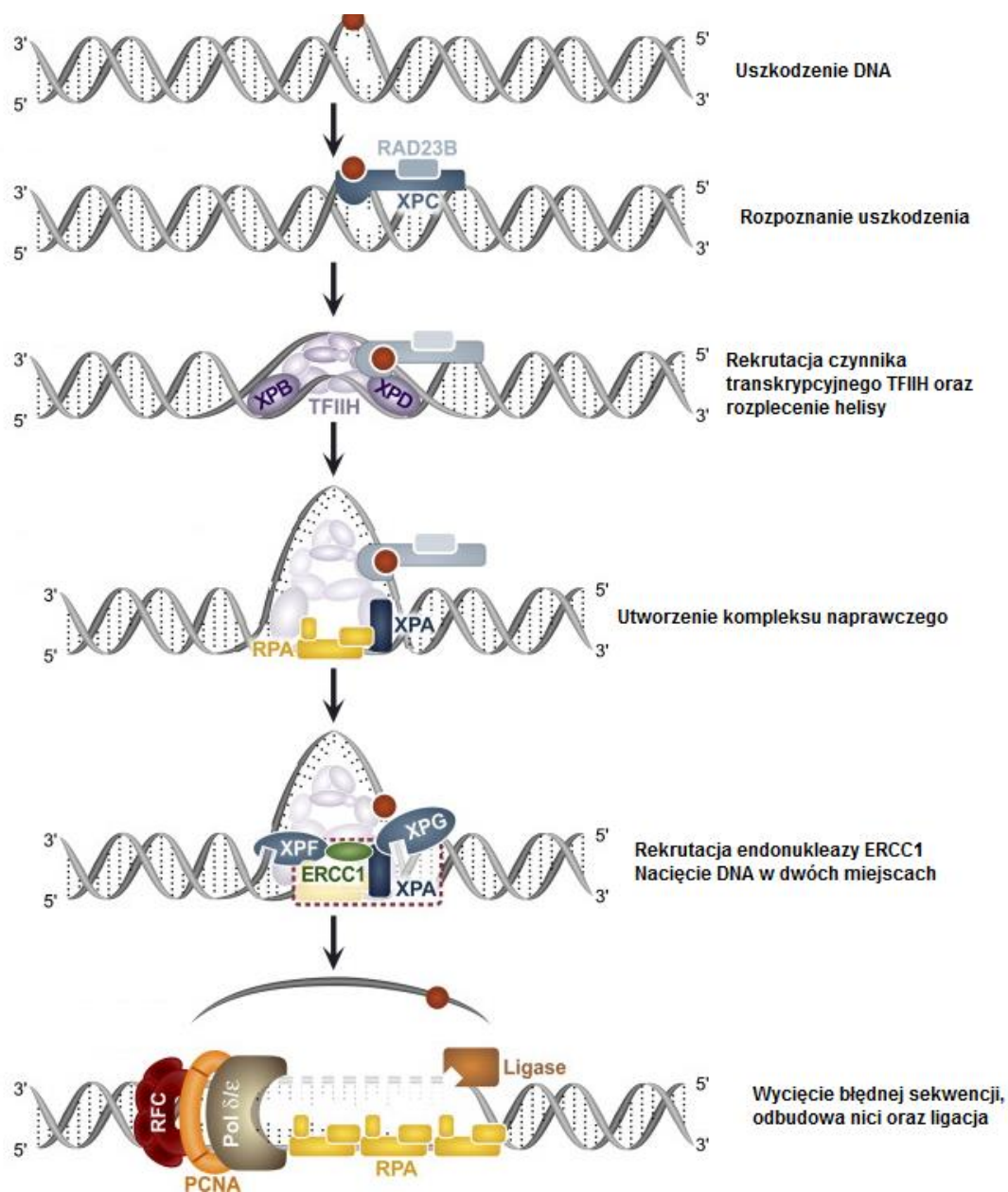
*MGMT* jest naprawczym białkiem jądrowym ulegającym ekspresji we wszystkich tkankach, w odpowiedzi na uszkodzające działanie czynników alkilujących, zawartych w kancerogenach środowiskowych, dymie tytoniowym, czy wykorzystywanych jako leki przeciwnowotworowe. Efektem działania tych czynników jest powstanie  $O^6$ -alkiloguaniny - adduktu DNA prowadzącego do powstawania podwójnych pęknięć nici DNA oraz błędnego parowania guaniny z tyminą podczas replikacji [Thon et al., 2013]. *MGMT* usuwa addukty alkilowe w jednoetapowej reakcji przeniesienia grupy alkilowej z  $O^6$ -guaniny na cysteinę stanowiącą część centrum aktywnego enzymu. Reakcja ta jednocześnie inaktywuje enzym, który po ubikwitynacji, degradowany jest w proteasomie. Jedno białko *MGMT* może zatem naprawić tylko jeden addukt alkilowy, dlatego też wydajność naprawy  $O^6$ -alkiloguaniny zależy od aktualnej ilości i wydajności produkcji czynnego enzymu *MGMT*.  $O^6$ -alkiloguanina jest zmianą potencjalnie mutageną, prowadzącą do powstania mutacji punktowych, jak również dużych ubytków chromosomalnych, może w związku z tym przyczyniać się do inicjacji zmian nowotworowych. *MGMT* chroni zatem przed kancerogenezą indukowaną przez czynniki alkilujące.

Doświadczenia na gryzoniach wskazują, że  $O^6$ -meG i  $O^6$ -etyloG ma szczególnie znaczenie jako neurokancerogen, a powiązanie między ekspozycją na czynniki wywołujące ich tworzenie, a pierwotnymi guzami mózgu u ludzi, w tym glejakami jest opisane w literaturze [Silber et al., 2012]. MGMT działa zatem jako supresor nowotworowy w OUN. Drugim istotnym aspektem wynikającym z funkcji MGMT jest jego rola w odpowiedzi pacjentów na leczenie lekami alkilującymi takimi jak temozolomid (TMZ), prokarbazyna (PCB), karmustyna (BCNU), czy lomustyna (CCNU). Metylacja MGMT jest uznawana za zmianę molekularną o największym znaczeniu klinicznym w kontekście guzów glejowych.



Ryc. 8 Reakcja przeniesienia grupy metylowej z pozycji  $O^6$  guaniny do aktywnej cysteiny białka MGMT [Hegi et al., 2008].

Gen **ERCC1** (ang. *excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence)*) zlokalizowany jest na chromosomie 19q13.32. Białko ERCC1 jest elementem naprawy DNA na drodze wycięcia nukleotydu (NER, ang., *nucleotide excision repair*), uruchamianym w odpowiedzi na uszkodzenia DNA powstałe pod wpływem czynników chemicznych, w tym leków np. cisplatyny, oraz fizycznych, w tym promieniowania UV oraz jonizującego. System NER jest ATP-zależnym kilkietapowym procesem naprawy DNA, w którym współdziała 11 czynników tworzonych przez 30 białek [Croteau et al., 2008]. Dwie ścieżki NER, a mianowicie TCR (ang. *transcription-coupled repair*) oraz GGR (ang. *global genome repair*) zapewniają ochronę sekwencji kodujących jak i pozostałych fragmentów genomu. Białko ERCC1 tworząc heterodimer z endonukleazą XPF (znaną również ERCC4) katalizuje nacięcie nici DNA celem usunięcia błędnej sekwencji. Ta heterodimeryczna endonukleaza bierze również udział w naprawie rekombinacyjnej DNA oraz w naprawie połączeń między nićmi DNA (ang. *interstrand crosslink*, ICL) jak również ich pęknięć (ang. *double strand breaks*, DSB) [McNeil & Melton, 2012]. Mutacje w tym genie prowadzą do zespołu COFS (zespół mózgowo-oczno-twarzowo-szkieletowy). Wyciszenie ERCC1 uwrażliwia komórki nowotworowe na radioterapię oraz leczenie cisplatyną [Chen et al., 2010, Liu ZG et al., 2009].

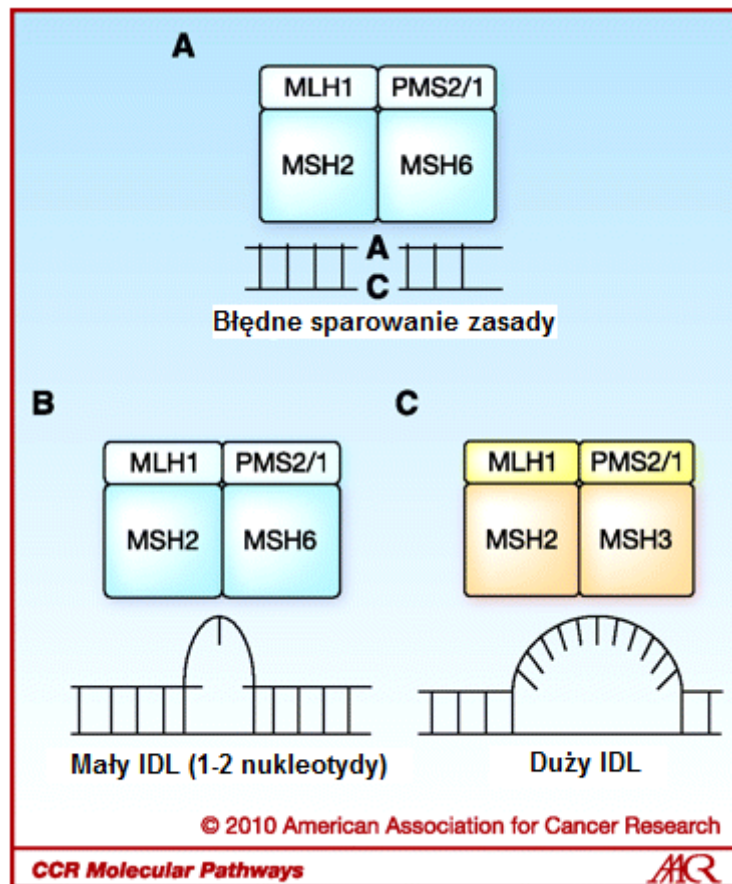


**Ryc. 9 Mechanizm naprawy przez wycięcie nukleotydu (NER).** Croteau et al. 2008, zmodyfikowany. Za rozpoznanie uszkodzonego miejsca odpowiedzialny jest kompleks XPC-HR23B-centrin, oraz w niektórych przypadkach również XPE. TFIIH rozwija helisę i umożliwia rozpoznanie uszkodzonego miejsca. Dwa komponenty TFIIH, a mianowicie XPB oraz XPD odgrywają zasadniczą rolę w udostępnieniu uszkodzonego miejsca dla kompleksu naprawczego. XPA i RPA są następnie rekrutowane do tego miejsca, a nukleaza XPG, odpowiedzialna za nacięcie 4-8 nukleotydów w kierunku 3' pojawia się w wyniku interakcji TFIIH i XPA. Jako ostatni pojawia się heterodimer nukleaz ERCC1–XPF, który wiąże się do powstałego kompleksu w wyniku interakcji z XPA, RPA i XPB. Wycinając ok. 20 nt fragment daje możliwość syntezy brakującej sekwencji przez pol  $\delta/\epsilon$ , pol  $\kappa$ , RFC, PCNA, RPA, oraz jego ligacji z DNA przy udziale ligazy DNA I i II.

***hMLH1*** jest ludzkim homologiem genu MutL u *E.coli*, zlokalizowanym na chromosomie 3p21.3, zaangażowanym w naprawę błędnie sparowanych zasad (MMR, ang. *mismatch repair*). Ten rodzaj naprawy odgrywa największą rolę w usuwaniu błędów powstałych w trakcie replikacji. Oprócz tego MMR odgrywa rolę w odpowiedzi na modyfikacje DNA powstałe pod wpływem substancji takich jak czynniki alkilujące, utleniające, cis i karboplatynę, oraz 5-fluorouracyl [Martin et al., 2010].



Mutacje w tym genie prowadzą do dziedzicznego, niezwiązanego z polipowatością raka jelita grubego. Predysponują również do innych nowotworów. Mutacje lub wyciszenie hMLH1 skutkują często niestabilnością mikrosatelitarną z uwagi na częste błędy pojawiające się w trakcie replikacji sekwencji mikrosatelitarnych.



Ryc. 10 Rodzaje uszkodzeń rozpoznawanych przez system MMR, w tym białko hMLH1 [Martin et al., 2010, zmodyfikowane]. A i B Heterodimer MSH2/MSH6 rozpoznaje parę błędnie sparowanych zasad oraz małą – jednodwunukleotydową pętlę IDL (ang. *insertion/deletion loop*). C Heterodimer MSH2/MSH3 rozpoznaje zarówno małą, jak i dużą (ok. dziesięcionukleotydową) pętlę IDL. MLH1 bierze udział we wszystkich trzech rodzajach naprawy, tworząc heterodimer z białkiem PMS.

Gen *ATM* zlokalizowany jest na chromosomie 11q22-q23. Na gen ten składa się 66 egzonów zlokalizowanych w obszarze ok. 150 kpz [Platzer et al., 1997]. Analiza sekwencji promotorowej jak również mapowanie cDNA do locus *ATM* ujawniło istnienie drugiego genu, a mianowicie *E14/NPAT* (ang. *nuclear protein mapped to the AT-locus*), 0,5 kpz powyżej *ATM* [Platzer et al., 1997]. Transkrypcja genu *E14/NPAT* zachodzi w przeciwnym kierunku aniżeli *ATM*, prowadząc ostatecznie do powstania białka złożonego z 1421 aminokwasach [Platzer et al., 1997]. Ekspresja zarówno *ATM* jak i *E14/NPAT* regulowana jest przy udziale wspólnego promotora, mającego długość 520 pz, i mogącego ulegać odczytowi w dwóch przeciwnych kierunkach (ang. *bi-directional promoter*) [Platzer et al., 1997, Kim et al., 2002]. Potencjalnie jeden dodatkowy promotor zlokalizowany jest w obrębie

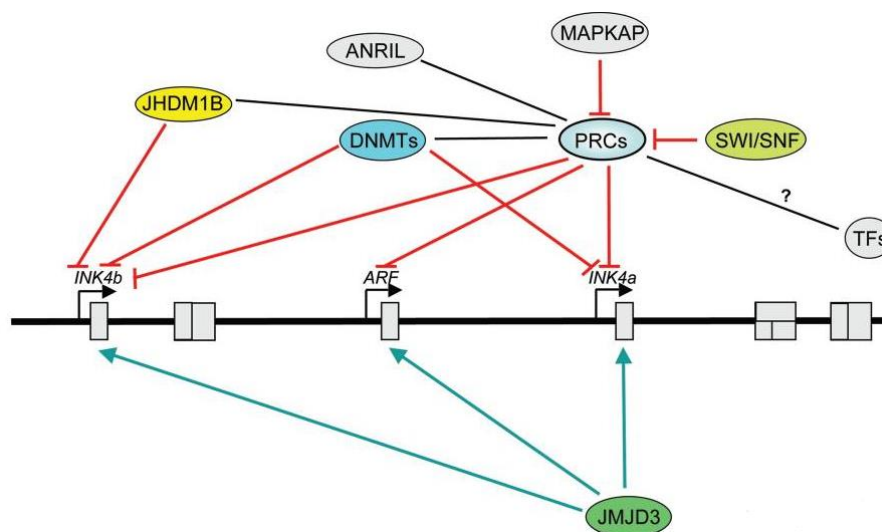
intronu 3 genu *ATM*, tuż przed pierwszym egzonem kodującym. Razem z miejscami niepodlegającymi translacji (5' i 3' UTR) elementy struktury genu wskazują na skomplikowane mechanizmy regulacji ekspresji *ATM*.

*ATM*, to kluczowe dla naprawy DNA białko o funkcji kinazy serynowo-treoninowej. Poprzez fosforylację odpowiednich białek docelowych bierze udział w naprawie podwójnych pęknięć DNA (ang. DSB - *double strand breaks*). Oprócz tego wykazuje działanie proapoptotyczne oraz bierze udział w ścieżkach sygnałowych warunkujących homeostazę komórkową. U ludzi mutacje w genie *ATM* skutkują zespołem ataksja-teleangiektazja (zespół AT), będącym chorobą genetyczną charakteryzującą się m.in. ataksją mózdkową, niedoborem immunologicznym oraz teleangiektazjami w obrębie skóry i gałki ocznej [Kim et al., 2002]. Charakterystyczne jest również znaczne zwiększenie ryzyka zachorowania na nowotwory, tj. 70. krotnie większe ryzyko białaczki oraz 250. krotnie większe ryzyko zachorowania na chłoniaka, w porównaniu do osób zdrowych, wykazujących funkcjonalne *ATM* [Kim et al., 2002]. W zespole AT ataksji mózdkowej towarzyszy neurodegeneracja pozostałych obszarów mózgu, co sugeruje neuroprotekcijną rolę prawidłowo funkcjonującego *ATM*. W odpowiedzi na uszkodzenie DNA, *ATM* jest rekrutowane do miejsca pęknięcia, gdzie formowany jest kompleks MRE11–RAD50–NBS1 inicjujący naprawę, a samo *ATM* ulega acetylacji przy udziale acetylotransferazy Tip60 [Xu et al., 2012, van Gent, 2001]. Epigenetyczna regulacja struktury chromatyny w miejscu pęknięcia DNA ma znaczenie dla funkcjonowania *ATM*, z uwagi na to, że acetylotransferaza Tip60 aktywowana jest poprzez interakcję z lizyną 9 histonu H3, w wariancie z potrójną metylacją (H3K9me3) [Xu et al., 2012]. Owa acetylacja domeny regulacyjnej jest kluczowa dla funkcji *ATM*, a mianowicie fosforylacji docelowych białek, w tym m.in. białek supresorowych p53, BRCA1, kinazy CHK2, regulatorów cyklu komórkowego RAD17, RAD9, czy białka naprawczego NBS1 [Kastan & Lim, 2000, Marinoglou, 2012, Xu et al., 2012, www2]. *ATM* odgrywa również rolę w homeostazie OUN poprzez regulację struktury chromatyny [Kim et al., 1999, Marinoglou, 2012], oraz recykling pęcherzyków synaptycznych [Li et al., 2009, Marinoglou, 2012, Herrup, 2013]. Neurony *Atm*<sup>-/-</sup> wykazują znacznie mniejszy spontaniczny wyrzut pęcherzyków synaptycznych, co może być uzasadnione koniecznością uformowania kompleksu synapsyny I z ATR (kinaza „siostrzana” *ATM*), oraz synaptobrewiną (VAMP2), po fosforylacji tej pierwszej przez *ATM* [Li et al., 2009, Herrup, 2013]. Dodatkowo również *ATM* zaangażowane jest w podtrzymanie kodu histonowego w genomach neuronów, zapobiegając globalnej deacetylacji histonów poprzez wpływ na cytoplazmatyczną lokalizację HDAC4, co zapewnia neuronom przeżycie i prawidłowe funkcjonowanie [Herrup, 2013].



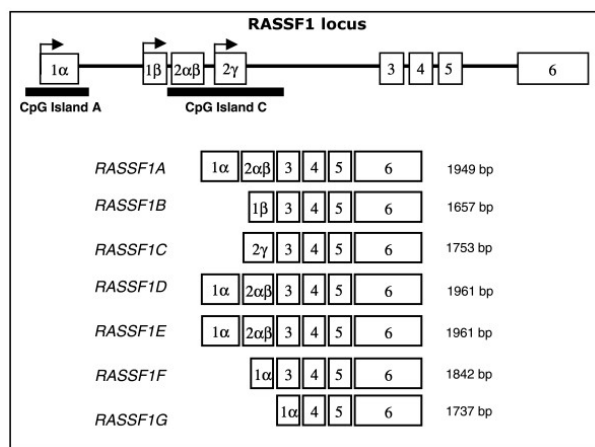
ARF-INK4A na chromosomie 9p21 należą do najczęstszych zmian obserwowanych w nowotworach, włączając w to glejaki [Jen et al., 1994, Schmidt et al., 1994, Simon et al., 1999, Rasheed et al., 2002]. Locus INK4A koduje produkty dwóch genów zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego poprzez inhibicję zależnej od CDK4 fosforylacji białka pRB (p16INK4A) i wiązanie MDM2 do p53 prowadzące do jego destabilizacji (p14ARF). Produkty genów supresorowych *p16INK4A* i *p15INK4B* są zdolne do wiązania się do kinaz białkowych CDK4 i CDK6, co uniemożliwia wiązanie się tych kinaz do cyklin typu D, które to kompleksy są odpowiedzialne za fosforylowanie białka pRB umożliwiające przejście z fazy G1 cyklu komórkowego do fazy S. Fosforylacja pRB jest uważana za krytyczny etap w przejściu punktu kontrolnego G1/S. Związanie się inhibitorów INK4 do CDK4/6 hamuje aktywność tych kinaz i tym samym zatrzymuje cykl komórkowy w fazie G1 [Gil & Peters, 2006].

Zahamowanie ekspresji locus INK4B-ARF-INK4A odbywa się przy udziale kompleksów Polycomb (ang. PRCs - *Polycomb repressive complexes*), co zniesione może być poprzez udział białkowych kompleksów aktywatorowych z rodziny Trithorax, np. kompleks remodelujący chromatynę SWI/SNF. Innymi epigenetycznymi czynnikami modyfikującymi to locus są demetylaza histonów JMJD3 i JHDM1B, oraz metylotransferazy DNA. Niekodujące RNA o nazwie ANRIL (również znane jako *CDKN2B antisense* lub *CDKN2BAS*) najprawdopodobniej odgrywa również funkcję regulacyjną [Popov & Gil, 2010]. Szczegóły tych zależności przedstawia poniższa rycina.



**Ryc.13 Regulacja epigenetyczna locus INK4B-ARF-INK4A.** W zdrowych komórkach zachodzi przy udziale kompleksów remodelujących chromatynę z rodziny Polycomb (PRCs), o działaniu wyciszającym, oraz białek Trithorax, w tym SWI/SNF5, które przeciwdziałają represji. W komórce nowotworowej dochodzi do częstej metylacji promotorów INK4A i INK4B. Demetylaza histonów Jhdm1b reguluje ekspresją p15INK4B, natomiast JMJD3 znosi wyciszający efekt trimetylacji lizyny 27 histonu H3 (H3K27me3) oraz kompleksów Polycomb. Fosforylacja Bmi1 z udziałem kinazy MAPKAP skutkuje oddzieleniem kompleksu Polycomb PRC1 z rejonu chromatyny. Najprawdopodobniej również niekodujące RNA, takie jak ANRIL regulują epigenetycznie to locus. Linie czarne pokazują zależność, czerwone – inhibicję, zielone – aktywację [Popov & Gil, 2010].

Gen **RASSF1**, zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 3 (3p.21.3) składa się z ośmiu egzonów (1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 2 $\alpha\beta$ , 2 $\gamma$ , 3, 4, 5 i 6) [Richter et al., 2009]. Wyróżnia się siedem różnych izoform RASSF1 (RASSF1A do RASSF1G), których powstanie warunkowane jest użyciem jednego z dwóch promotorów, leżących w odległości 3,5 kpz, oraz alternatywnego splicingu [Richter et al., 2009]. Największe biologiczne znaczenie przypisuje się dwóm izoformom, mianowicie RASSF1A oraz RASSF1C [Richter et al., 2009]. Izoforma A transkrybowana jest przy użyciu górnego promotora (A), podczas gdy izoforma C dolnego promotora (C) [Richter et al., 2009]. Oba promotory leżą w obrębie wysp CpG, z czego tylko ta leżąca w rejonie górnego promotora jest często zmetylowana w raku [Dammann et al., 2000, Dammann et al., 2005]. Obie izoformy RASSF1A i RASSF1C ulegają ekspresji w zdrowych tkankach, natomiast w tkankach nowotworowych i liniach komórek nowotworowych ekspresja jest często ograniczona na skutek metylacji promotora [Agathangelou et al., 2005, Dammann et al., 2005]. Poszukiwanie mutacji w egzonach RASSF1A w różnych typach nowotworów wykazało istnienie tylko nielicznych zmian, z czego większość stanowiły polimorfizmy [Dammann et al., 2003].



**Ryc.14** Struktura locus RASSF1 na chromosomie 3p21.3. Białe prostokąty symbolizują egzony, natomiast czarna linia introny. Warianty RASSF1A, RASSF1B i RASSF1C powstają przy użyciu dwóch różnych promotorów (wskazane strzałkami). Warianty RASSF1D, E, F, G są produktami alternatywnego splicingu RASSF1A. Dwie wyspy CpG związane z promotorem RASSF1: wyspa A (737 pz, 85 CpG) obejmuje rejon promotorowy RASSF1A, D, E, F i G, natomiast wyspa C (1365 pz, 139 CpG) obejmuje region regulatorowy RASSF1B oraz RASSF1C [Malpeli et al., 2011].

Udział RASSF1A w regulacji cyklu komórkowego polega na hamowaniu akumulacji cykliny D1 [Shivakumar et al., 2002] co prowadzi do zahamowania cyklu w fazie G1. Najnowsze badania wskazują, że SKP2, kluczowy regulator wejścia w fazę S, będący onkogenną podjednostką kompleksu ligazy ubikwityny, powoduje degradację RASSF1A w punkcie restrykcyjnym G1/S cyklu komórkowego [Song et al., 2008]. RASSF1A wykazuje też interakcję z CDC20 podczas wczesnej prometazy, co działa hamująco na tworzenie kompleksu ligazy ubikwityny APC/C-CDC20 ( ang. *anaphase-promoting complex/cyclosom-cell division cycle 20 homolog*) [Song et al., 2004a, Song et al., 2004b]. Zahamowanie tworzenia tego kompleksu uniemożliwia degradację cyklin A i B, oraz degradację inhibitora separazy, co pozwala na rozdzielenie chromatyd siostrzanych w trakcie anafazy. Zaobserwowano również interakcję pomiędzy RASSF1A, a siecią mikrotubul wrzeczona kariokinetycznego [Liu et al., 2003, Song et al., 2004b]. RASSF1A działa stabilizująco na mikrotubule

regulując w ten sposób progresję mitozy [Rong et al., 2004, Liu et al., 2003, Vos et al., 2004, Dallol et al., 2004]. Nadekspresja RASSF1A prowadzi do zahamowania cyklu komórkowego na etapie metafazy [Liu et al., 2003], fazy G1 [Agathangelou et al., 2003], G1 i G2/M [Rong et al., 2004] i prometafazy [Song et al., 2004b]. *RASSF1A* oddziałuje także z MAP1B (ang. *microtubule-associated protein 1B*), białkiem cytoszkieletu związanym ze wzrostem neuronów i komórek glejowych [Riederer et al., 2007].

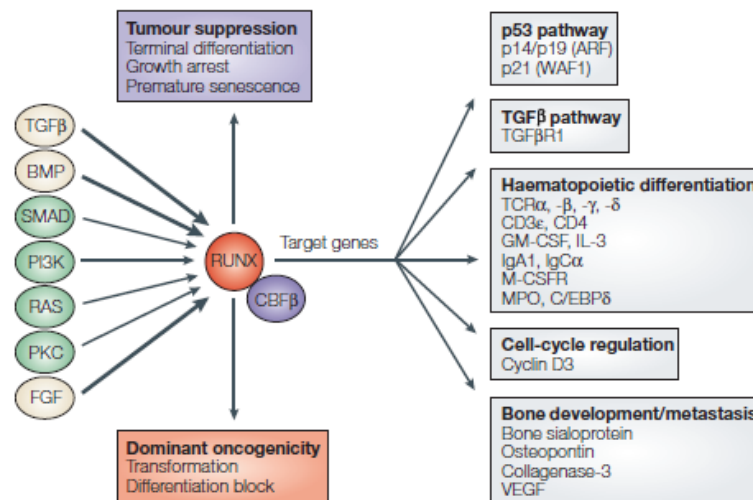
*RASSF1A* posiada domenę wiążącą Ras, co potencjalnie wskazuje na możliwość interakcji z tą onkoproteina. Wykazano jednak, że o ile *RASSF1A* jest zdolny do tworzenia z *RASSF5* heterodimerów wiążących się do GTPaz typu Ras (ang. *Ras-like GTPases*), to samodzielnie wiązanie *RASSF1A* do RAS jest słabe [Ortiz-Vega et al., 2002]. Potwierdzają to badania wskazujące, że *RASSF1* wykazuje niskie powinowactwo do GTPaz typu Ras, co nie wyklucza możliwości interakcji niebezpośrednich [Avruch et al., 2006]. Przykładowo kompleks *RASSF1A*-MST wiąże się do białka cytoszkieletu CNK1, dzięki czemu kompleks ten uczestniczy w kaskadzie proapoptotycznej inicjowanej przez aktywne RAS. [Rabizadeh et al., 2004]. Udział w regulowaniu apoptozy przez *RASSF1A* jest również szeroko opisywany w literaturze. Sugeruje się, że *RASSF1A* przyczynia się do zmian konformacyjnych proapoptotycznego białka BAX indukującego szlak wewnątrzpochodny apoptozy [Baksh et al., 2005]. *RASSF1A* bierze również udział w apoptozie inicjowanej pobudzeniem receptorów śmierci [Foley et al., 2008]. Po stymulacji TNF $\alpha$  i związaniu MOAP-1 do receptora TNF-R, *RASSF1A* przyłącza się do kompleksu tego receptora z czynnikami [Foley et al., 2008]. Wykazano, że komórki raka piersi niewykazujące endogennego *RASSF1A*, którym przywrócono ekspresję tego supresora, ulegały apoptozie indukowanej pobudzeniem receptorów śmierci [Baksh et al., 2005].

### 5.2.3 Czynniki transkrypcyjne: *RUNX3*, *GATA6*

Gen *RUNX3* (ang. *runt-related transcription factor 3*) po raz pierwszy zidentyfikowany został w roku 1994 przez zespół Levanon i wsp. [Levanon et al., 1994]. Gen ten zlokalizowany jest na chromosomie 1p36. Liczy ok. 67 kb i zawiera dwa promotory: P1 oraz P2, jak również 6 egzonów [Yu et al., 2012].

Rodzinę białek RUNX tworzą *RUNX1*, *RUNX2*, oraz *RUNX3* [Lee, 2011]. Białka te spełniają rolę czynników transkrypcyjnych uczestnicząc w takich procesach jak hematopoeza, neurogeneza oraz osteogeneza [Lee, 2011]. W ośrodkowym układzie nerwowym *RUNX3* funkcjonuje jako czynnik transkrypcyjny biorący udział w neurogenecie; istotna jest również jego rola w funkcjonowaniu układu odpornościowego, a w szczególności w tymopoezie oraz dojrzewaniu komórek dendrytycznych [Lee, 2011]. Zdolności katalityczne wszystkich trzech izoform ujawniają się poprzez heterodimeryzację z (CBF)- $\beta$  (ang. *core-binding factor  $\beta$* ) [Ito, 2004]. Heterodimer *RUNX3* wiąże się do motywu 5'-PYGPYGGT-3' obecnego w wielu sekwencjach promotorowych i wzmacniających, co może wzmacniać, lub hamować transkrypcję [www3].

Istnieją doniesienia, że RUNX3 może spełniać rolę supresora nowotworowego w nowotworze żołądka, trzustki, przewodów żółciowych, pęcherza moczowego, okrężnicy, płuc, wątroby, piersi, prostaty oraz w raku kolczystokomórkowym skóry [Lee, 2011, Chuang & Ito, 2010], w szczególności poprzez swoją rolę w szlaku sygnałowym TGFβ (transformujący czynnik wzrostu β). Z drugiej jednak strony RUNX3 może spełniać funkcję onkogenu, jeśli ulega nadekspresji. W nowotworach głowy i szyi nadekspresja *RUNX3* prowadzi do zahamowania apoptozy [Kudo et al., 2011]. Sugeruje się, że w przypadku raka żołądka hipermetylacja *RUNX3* może być efektem stresu oksydacyjnego towarzyszącego infekcji *Helicobacter pylori* [Katayama et al., 2009].



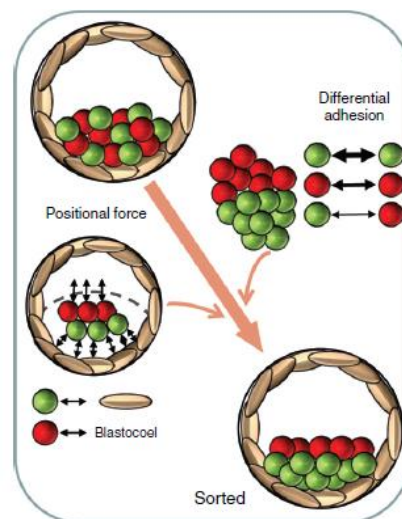
**Ryc. 15** Schemat ilustrujący powiązanie kompleksów RUNX-CBF z mechanizmami mogącymi mieć wpływ na indukcję kancerogenezy [Blyth et al., 2005]. Bloki szare – znane podzbiory genów docelowych dla RUNX, wybrane pod względem ich powiązania z kancerogenezą; blok czerwony – aktywność RUNX promująca proliferację komórek; blok fioletowy – aktywność RUNX hamująca proliferację; BMP – ang. *bone morphogenic protein*; C/EBPδ – ang. *CCAAT/enhancer binding protein-δ*; FGF – ang. *fibroblast growth factor*; GM-CSF – ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*; IgA1 – ang. *immunoglobulin A1*; IL-3 – interleukina 3; M-CSFR – ang. *macrophage colony-stimulating factor*; MPO – mieloperoksydaza; PI3K – kinaza 3-fosfatydyloinozytolowa; PKC - białkowa kinaza C; TCRα – ang. *T-cell receptor-α*; TGFβR1 – typ I receptora TGFβ.

Gen **GATA6** o lokalizacji 18q11.1-q11.2, należy do rodziny genów *GATA* kodujących sześć czynników transkrypcyjnych, a jego produkt cechuje wielkość 45 kDa [Morrissey et al., 1997]. Wszystkie te czynniki zawierają wysoce konserwatywną domenę składającą się z motywów dwóch palców cynkowych i wiążącą zgodną z nią sekwencję DNA (A/T)GATA(A/G). Dzięki obecności tej domeny, oraz możliwości interakcji z innymi regulatorami transkrypcji zawiaduje on ekspresją genów w trakcie różnicowania komórek i organogenezy kręgowców. Ulega ekspresji podczas wczesnej embriogenezy odgrywając rolę w rozwoju narządów powstałych z endo- i mezodermy takich jak jelita, płuca, czy serce. W embriogenezie razem z białkiem Nanog odpowiada za formowanie w jamie blastocysty komórek epiblastu i endodermy oraz warunkuje ich właściwe – warstwowe – ułożenie [Oron & Ivanova, 2012]. Mutacje w tym genie związane są z licznymi wadami wrodzonymi, a knock-out *GATA6* u myszy na etapie zarodkowym jest letalny [Maeda et al., 2005]. U myszy w 11. i 15. dniu wzrostu embrionu obserwuje się wpływ *GATA6* na rozwój mózgu, a u dojrzałych osobników ekspresję w

komórkach nabłonka splotu naczyniówkowego i śródbłonka, neuronach oraz astrocytach [Kamnasaran & Guha, 2005]. Transkrypcja *GATA6* u ludzi zachodzi w komórkach serca, przewodu pokarmowego oraz płuc u zarodka, jak również w sercu, płucach, wątrobie, nerkach, trzustce, jajnikach oraz jelicie cienkim u osób dorosłych [Suzuki et al., 1996, Maeda et al., 2005]. *GATA6* zostało również wykryte w ośrodkowym układzie nerwowym u ludzi [Kamnasaran & Guha, 2005, Maeda et al., 2005].



**Ryc. 16 Domeny strukturalne *GATA6*.** Zn – palec cynkowy; nls – ang. *C-terminal nuclear localization sequence*, sekwencja która razem z motywami palców cynkowych warunkuje wiązanie DNA i interakcję białko-białko [Molkentin, 2000].



**Ryc. 17. „Segregacja” komórek epiblastu i endodermy w jamie blastocysty w czasie embriogenezy [Oron & Ivanova, 2012].** Kolorem czerwonym zaznaczono komórki wykazujące ekspresję białka *GATA-6*, formujące endoderme; zielonym - komórki wykazujące ekspresję białka *Nanog*, formujące epiblast; Każda z grup komórek dzięki produkcji odpowiednich białek posiada odmienne właściwości adhezyjne, które warunkują łączenie się jednego typu w większe skupiska. Wypadkową tych zależności jest prawidłowa „segregacja” komórek.

#### 5.2.4 Geny *NDRG2*, *PTEN*, *RARβ*

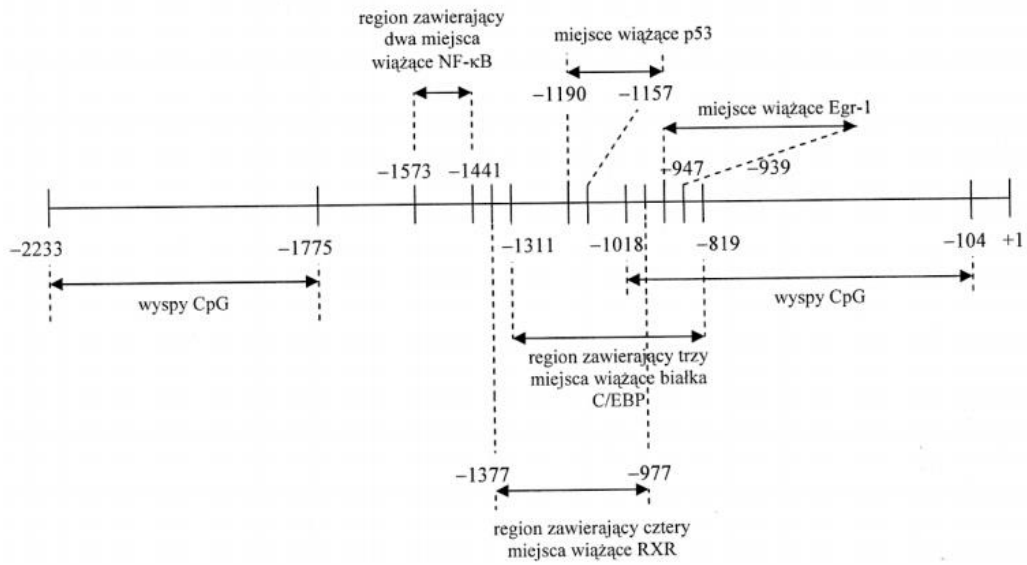
##### ***NDRG2***

Do rodziny ***NDRG*** należą cztery białka, a mianowicie *NDRG1*, *NDRG2*, *NDRG3* oraz *NDRG4*. Badania filogenetyczne klasyfikują *NDRG1* i *NDRG3* do jednej podgrupy, natomiast *NDRG2* i *NDRG4* do drugiej. Gen *NDRG2*, o lokalizacji 14q11.2 koduje białko cytoplazmatyczne, należące do superrodziny hydrolaz  $\alpha/\beta$ . U ludzi mRNA kodujące *NDRG2* wykryto w komórkach mięśniowych, w sercu, mózgu, wątrobie, i w mniejszym stopniu również w nerce, natomiast niewykrywalnym



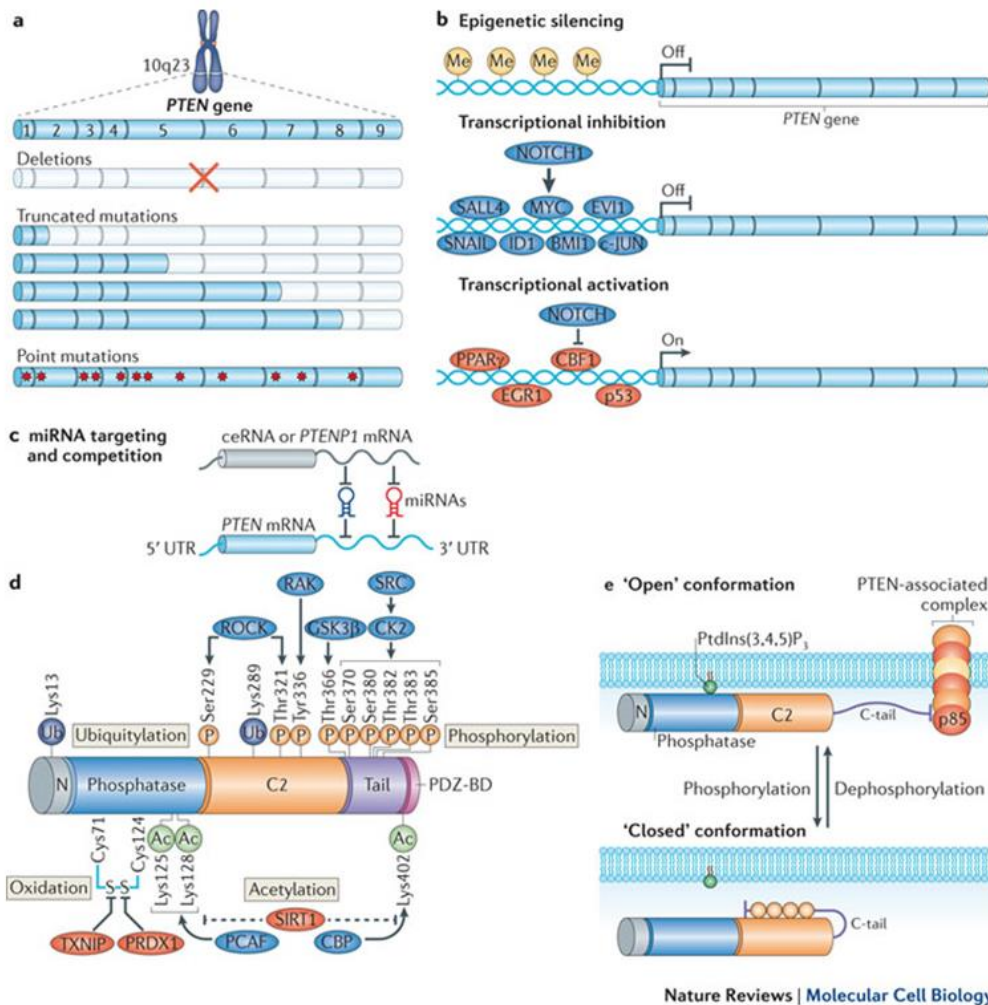
poziomem charakteryzowały się grasicca, szpik kostny, jądra oraz leukocyty. Profil ekspresji sugeruje zatem odwrotną korelację ze stopniem proliferacji komórek [Yao et al., 2008]. Rozmieszczenie NDRG2 w mózgu jest zróżnicowane. Szczególnie wysokie poziomy obserwowano w śródmózgowiu, mózdzku, rdzeniu kręgowym oraz we wzgórzu [Shen et al., 2008]. NDRG2 został zlokalizowany w astrocytach mózgowia, oraz w gleju Bergmanna w mózdzku [Okuda et al., 2008, Shen et al., 2008, Yao et al., 2008]. Istnieją doniesienia o wzroście ekspresji NDRG2 w trakcie odróżnicowywania astrocytów z ich glejowych prekursorów [Yao et al., 2008], oraz o roli białka NDRG2 we wzroście i formowaniu neurytów. Wiadomo, że transkrypcja *NDRG2* może być zahamowana pod wpływem Myc, natomiast podwyższona ekspresja towarzyszy hipoksji [Liu N et al., 2008]. Endogenne ligandy takie jak białko WT1 oraz glukokortykosteroidy prowadzą do zwiększenia ekspresji tego genu [Yao et al., 2008]. Dokładna funkcja NDRG2 nie jest znana, niemniej jednak obecność domeny wiążącej p53 w sekwencji pierwszego intronu NDRG2 sugeruje udział tego białka w zależnym od p53 szlaku apoptozy [Liu N et al., 2008]. Tezę tę potwierdza ograniczenie apoptozy towarzyszące wyciszeniu NDRG2 jak również zahamowanie wzrostu komórek nowotworowych towarzyszące nadekspresji tego genu [Liu N et al., 2008]. Z uwagi na liczne doniesienia o niskiej ekspresji NDRG2 w tkankach nowotworowych, m.in. mózgu, piersi, wątroby, żołądka, czy skóry sugeruje się, że gen ten może pełnić funkcję supresorową [Yao et al., 2008]. Największy udział w wyciszeniu ekspresji NDRG2 przypisuje się hipermetylacji jego promotora [Liu et al., 2007]. Postulowana jest szczególnie rola wyciszenia NDRG2 w kancerogenezie GBM. Najnowsze dane wskazują, że potencjalnym mechanizmem regulacji wzrostu glejaka przez NDRG2 może być wpływ na poziom acetylacji histonów [Li L et al., 2012].

Gen ***PTEN*** zlokalizowany jest na chromosomie 10q23 i zawiera 9 egzonów [Li et al., 1997, Krawczyk et al., 2006, Song et al., 2012]. Budowę promotora genu *PTEN* przedstawia poniższa rycina (Ryc. 18). W regionie promotorowym genu, pomiędzy -2233 a +1 pz znajdują się liczne sekwencje CpG, miejsca wiążące czynniki transkrypcyjne: Egr-1, NF-κB, p53, RXR i CREB, oraz potencjalne miejsca wiążące czynniki transkrypcyjne AP-2, AP-4, E2F i Sp1. Regiony od -2233 do -1775 pz i od -1018 do -104 pz są wyjątkowo bogate w dinukleotydy CpG. Stwierdzono również istnienie w sekwencji promotorowej *PTEN* miejsca wiązania dla p53, sugerując możliwość oddziaływania tego supresora na ekspresję *PTEN* [Krawczyk et al., 2006, Stambolic et al., 2001]. Istotnym faktem jest również to, iż gen *PTEN* posiada swój pseudogen (*PTENP1*, psi*PTEN*). Sekwencja *PTEN* jest w 98% identyczna z sekwencją pseudogenu; homologia tych dwóch sekwencji dotyczy 841 par zasad i obejmuje region promotorowy. Istnieją doniesienia o transkrypcji, ale nie translacji pseudogenu psi*PTEN* w szeregu tkanek i linii komórkowych [Yokoyama et al., 2000, Zhang et al., 2000, García et al., 2004]. Przeciwnie stanowisko, świadczące o braku ekspresji pseudogenu pojawiało się również w literaturze [Hamilton et al., 2000]. Dane dostarczone przez Zysman'a i wsp. świadczą o tym, że to pseudogen psi*PTEN* ulega metylacji, podczas gdy sam *PTEN* jest niezmetylowany w liniach komórkowych raka endometrium, piersi oraz okrężnicy, jak i w tkance raka endometrium [Zysman et al., 2002].



Ryc. 18 Budowa promotora *PTEN* [Krawczyk et al., 2006].

Mechanizmy regulujące ekspresję genu i aktywność białka PTEN warunkują zmiany genetyczne w sekwencji genu, mechanizmy epigenetyczne, modyfikacje potranslacyjne białka oraz zmiany jego konformacji. Szczegóły przedstawiono na Ryc. 19.



**Ryc.19 Molekularne mechanizmy regulujące ekspresję *PTEN*** [Song et al., 2012]. (a) Modyfikacje genetyczne *PTEN*. Locus 10q23, będące miejscem lokalizacji *PTEN*, jest wyjątkowo podatne na mutacje genetyczne, w tym mutacje punktowe, wypadnięcia części genu lub delecje całego fragmentu kodującego *PTEN*. (b) Regulacja ekspresji *PTEN* na poziomie transkrypcyjnym polega na wyciszeniu epigenetycznym sekwencji promotorowej, lub oddziaływaniu białek hamujących transkrypcję, takich jak: SALL4 (ang. *sal-like protein 4*), SNAIL, ID1 (ang. *inhibitor of DNA binding 1*), BMI1, c-JUN, EVI1 (ang. *ecotropic virus integration site 1 protein*) oraz MYC. Białka aktywujące transkrypcję *PTEN* to PPAR $\gamma$  (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$* ), EGR1 (ang. *early growth-response protein 1*), p53 czy CBF1 (ang. *C-repeat binding factor*). NOTCH1 hamuje transkrypcję *PTEN* poprzez MYC lub CBF1. (c) Potranskrypcyjna regulacja aktywności *PTEN* wskutek działania miRNA. Pseudogen *PTENP1* na skutek homologii sekwencji z genem *PTEN* działa jak „pułapka” dla miRNA. Transkrypt pseudogenu stanowi przykład ceRNA (ang. *competitive endogenous RNA*), który poddawany jest degradacji przez miRNA przeznaczone dla mRNA pochodzącego od *PTEN*. (d) Modyfikacje potranslacyjne białka *PTEN*. Fosforylacja Ser229, Thr321, Tyr336, Thr366, Ser370, Ser380, Thr382, Thr383 oraz Ser385 warunkuje funkcje supresorowe, możliwość wiązania do błony komórkowej oraz stabilność *PTEN*. PCAF (ang. *p300/CREB-binding protein (CBP)-associated factor*) promuje acetylację Lys125 i Lys128, podczas gdy CBP acetyluje Lys402. Sirtuina SIRT1 deacetyluje w/w miejsca. Z kolei białko TXNIP (ang. *Thioredoxin-interacting protein*) i PRDX1 (ang. *peroxiredoxin 1*) chronią przed zależną od acetylacji inaktywacją *PTEN*. Utworzenie wiązania bisulfidowego pomiędzy Cys124 and Cys71 również redukuje aktywność katalityczną *PTEN*. Ubikwitynacja *PTEN* na Lys13 i Lys289 reguluje funkcje supresorowe oraz stabilność *PTEN*. (e) Regulacja konformacyjna *PTEN*. Fosforylacja C-końca *PTEN* powoduje interakcję elektrostatyczną znoszącą aktywność katalityczną.

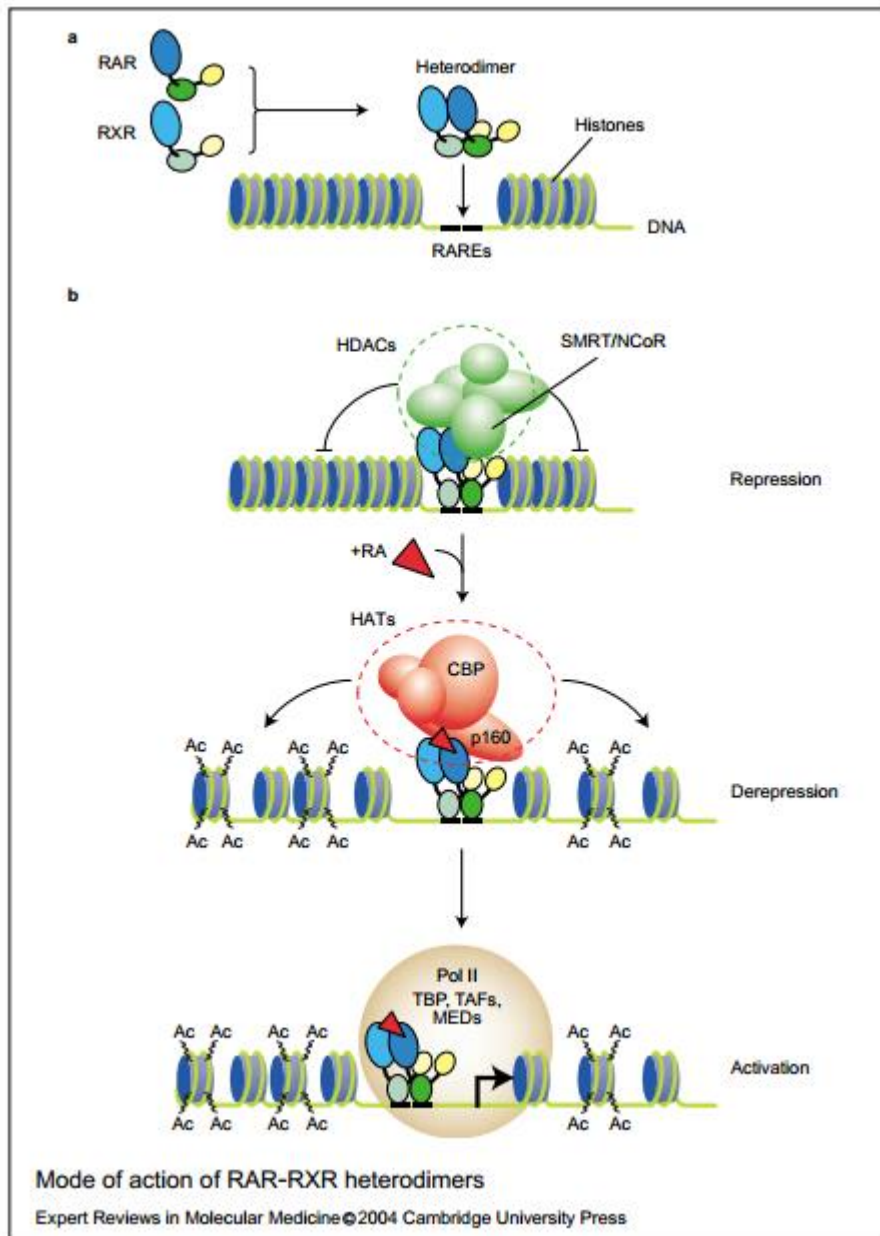
PTEN działa jako fosfataza o podwójnej specyficzności, zarówno w stosunku do substratów lipidowych, jak i białkowych [Krawczyk et al., 2006]. Jako fosfataza lipidowa, defosforyluje fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforan (PIP-3), co prowadzi do zaburzenia ścieżki sygnałowej: czynniki wzrostu/PI3K/AKT/mTOR [Krawczyk et al., 2006]. Jako fosfataza białek PTEN defosforyluje kinazę białkową FAK (ang. *Focal adhesion kinase*) i białko Shc, co zaburza szlak sygnałowy Shc/Ras/Raf/MAPK. Oba szlaki odgrywają rolę w takich procesach jak wzrost, apoptoza, przeżywalność komórek, adhezja, migracja oraz metabolizm komórkowy.

Przyłączenie ligandu (np. insuliny, czynników wzrostu) do receptora pełniącego jednocześnie funkcję kinazy tyrozynowej prowadzi do rekrutacji białek adaptorowych (w tym białka G-ras) co w efekcie prowadzi do aktywacji kinazy Pi3K (3-kinaza fosfatydyloinozytoli). Kinaza ta fosforyluje PIP2 (fosfatydyloinozytolo-4,5-bifosforanu) do PIP3 (fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforan), ten zaś niezbędny jest do aktywacji białka Akt. PTEN defosforylując PIP-3 uniemożliwia działanie Akt. Konsekwencją zablokowania aktywacji Akt jest zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 (czemu towarzyszy wzrost stężenia białka p27), aktywacja genów kodujących białka proapoptotyczne takie jak: FasL, IGBP-1 i Bim, oraz zahamowanie fosforylacji i aktywacji białka CBP (ang. *Cyclic AMP-response element Binding Protein*), które zwiększa transkrypcję genów antyapoptotycznych, takich jak Bcl-2, Mcl-1, jak i samego Akt. Wiadomo również, że PTEN kontroluje cykl komórkowy w punkcie przejścia G1/S, m.in. poprzez oddziaływanie na p27 (Kip1), będący inhibitorem kinaz cyklinozależnych CDK. PTEN może także regulować adhezję i migrację komórek poprzez bezpośrednią defosforylację  $\beta$ -kateniny [Krawczyk et al., 2006].

Istnieją dwie subfrakcje PTEN, tj. cytoplazmatyczna i jądrowa. Translokacja PTEN z cytoplazmy do jądra odgrywa ważną rolę w regulacji cyklu komórkowego, w punkcie kontrolnym G1/S [Lian & Di Cristofano, 2005, Krawczyk et al., 2006]. O ile rola cytoplazmatyczna PTEN to w dużej mierze funkcja fosfatazy lipidowej i kontrola ścieżki PI3K/AKT/mTor, o tyle jego funkcja w jądrze komórkowym polega na niezależnej od AKT supresji wzrostu komórki, a dokładne mechanizmy tego oddziaływania nie są poznane. Wiadomo natomiast, że PTEN pojawia się w jądrze komórkowym zarówno komórek prawidłowych jak i nowotworowych i być może właśnie z tą lokalizacją wiąże się jego funkcja jako supresora nowotworowego [Koul, 2008]. Istnieją dane mówiące o defosforylacji PIP3 również w jądrze komórkowym [Délérís et al., 2006], ale także o niezależnej od funkcji fosfatazy zdolności do oddziaływania typu białko-białko z p53 [Lian & Di Cristofano, 2005, Li et al., 2006]. Oddziaływania te mają modulować aktywność oraz stabilizować p53. Supresja nowotworowa której udziałem jest PTEN może również polegać na niwelowaniu sygnałów generowanych przez PI3K w lokalizacji jądrowej [Ahn et al., 2004].

Utrata aktywności PTEN jest często obserwowana w glejaku i przypisuje jej się udział w uzyskaniu takich cech komórki nowotworowej jak niekontrolowany wzrost, angiogeneza, unikanie apoptozy, oraz wysoka inwazyjność [Knobbe et al., 2002].

Gen **RARB** zlokalizowany jest na chromosomie 3p24.2, i koduje receptor dla kwasu retinowego (ang. *retinoic acid receptor  $\beta$* ). Jądrowy receptor RAR wiąże kwas retinowy, aktywną pochodną witaminy A, biorącą udział w procesie embriogenezy, oraz odróżnicowania tkankowego. Oprócz działania poprzez wiązanie do heterodimerycznych receptorów jądrowych RAR i RXR (ang. *retinoid x receptor*), kwas retinowy wiąże się również do białek wiążących retinoidy RBP (ang. *retinol-binding proteins*), białka CRBP (ang. *cellular retinol binding protein*), oraz CRABP (ang. *cellular retinoic acid-binding protein*) [Bushue & Wan, 2010]. Receptory RAR mogą być aktywowane zarówno przez kwas *trans* retinowy, jak i przez kwas 9-*cis* retinowy, podczas gdy receptory RXR są wyłącznie aktywowane przez kwas 9-*cis* retinowy [Bushue & Wan, 2010, Baer-Dubowska, 2003]. Receptory dla kwasu retinowego zaliczane są do superrodziny receptorów jądrowych, działających jako zależne od ligandu czynniki transkrypcyjne, wiążące się do elementów regulatorowych oddziałujących z sekwencjami promotorowymi DNA [Laudet & Gronemeyer, 2002, Alvarez et al., 2007]. Dokładny mechanizm tej interakcji przedstawiono na Ryc. 20.



**Ryc. 20 Schemat działania heterodimerów RAR-RXR [Clarke et al., 2004].** (a) Receptory RAR tworzą z białkami RXR heterodimery, wiążące się do sekwencji regulatorowych genów targetowych poprzez sekwencje odpowiedzi na kwas retinowy (RARE, ang: *retinoic acid response elements*). (b) W sytuacji braku liganda, np. kwasu retinowego heterodimery RAR-RXR (apo-heterodimery) wiążą się do sekwencji RARE genów targetowych razem z korepresorami transkrypcji N-CoR (ang. *nuclear receptor corepressor*) lub SMRT (ang. *silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor*), które z kolei rekrutują deacetylazy histonów HDAC. Uważa się, że mechanizm ten odpowiada za kondensację chromatyny i wyciszenie ekspresji towarzyszącą formowaniu apo-heterodimerów. Związanie liganda powoduje uwolnienie kompleksów HDAC i rekrutację koaktywatorów acetylotransferaz histonów (HAT), takich jak CBP (ang. *CREB-binding protein*) i p160. Następująca po tym relaksacja chromatyny spowodowana acetylacją histonów uważana jest za etap niezbędny, aczkolwiek niewystarczający do aktywacji ekspresji genu. Ostatnim etapem, warunkującym inicjację transkrypcji jest rekrutacja holoenzymu polimerazy RNA II, wraz z białkiem TBP (ang. *TATA-binding protein*) i czynnikami TAF (ang. *TBP-associated factors*), oraz kompleksami MED (ang. *mediator complexes*).

Trzy podtypy RAR, a mianowicie RAR $\alpha$  (NR1B1), RAR $\beta$  (NR1B2), and RAR $\gamma$  (NR1B3) kodowane są przez trzy różne geny. Domena wiążąca się do DNA zawiera dwa motywy palca cynkowego, natomiast domena wiążąca ligand jest wysoce konserwatywna w obrębie wszystkich trzech podtypów [Alvarez et al., 2007]. Zidentyfikowano wiele izoform zarówno RAR jak i RXR. Izoformy RAR powstają albo z użyciem dwóch różnych promotorów, albo na drodze alternatywnego splicingu [Bushue & Wan, 2010]. Opisano dwie główne izoformy RAR $\alpha$  ( $\alpha$ 1 i  $\alpha$ 2), oraz RAR $\gamma$  ( $\gamma$ 1 i  $\gamma$ 2), jak również 5 izoform RAR $\beta$  ( $\beta$ 1- $\beta$ , oraz  $\beta$ 1') [Bushue & Wan, 2010]. Izoformy RAR można podzielić na te, powstające z udziałem promotora P1 (klasa I: RAR $\alpha$ 1,  $\beta$ 1, i  $\beta$ 3,  $\gamma$ 1) lub promotora P2 (klasa II: RAR $\alpha$ 2,  $\beta$ 2 i  $\beta$ 4,  $\gamma$ 2). Promotory klasy II mają domenę odpowiedzi na kwas retinowy i są aktywowane przez kwas retinowy. Ekspresja RAR oraz RXR jest tkankowo specyficzna, co pozwala na wywieranie efektów plejotropowych na różnych stadiach rozwoju organizmu. Heterodimery RXR $\alpha$ /RAR $\alpha$ , RXR $\alpha$ /RAR $\beta$  oraz RXR $\alpha$ /RAR $\gamma$  wiążąc kwas retinowy zawiadują transkrypcją znacznej ilości genów nieodzownych podczas embriogenezy [Mark et al., 2009]. Doświadczenia na myszach wykazały, że mutanty pozbawione izoform *Rara*, *Rarb*, czy *Rarg* są co prawda żywe, ale wykazują szereg wrodzonych wad i nieprawidłowości rozwojowych zarówno na etapie rozwoju embrionalnego jak i w późniejszych etapach życia [Mark et al., 2009]. Poprzez wpływ na ekspresję genów homeotycznych, kwas retinowy zawiaduje prawidłowym kształtowaniem organów powstających z poszczególnych listków zarodkowych. Receptory RAR są m.in. zaangażowane w rozwój oka, w tym histogenezę siatkówki, oraz kontrolę fizjologicznej apoptozy komórek siatkówki [Mark et al., 2009]. Na etapie tworzenia przewodów moczowo-płciowych, receptory RAR zawiadują interakcją epithelialno-mezenchymalną, poprzez kontrolę ekspresji receptora kinazy tyrozynowej Ret [Mark et al., 2009]. Warunkują również odróżnicowanie kardiomiocytów.

## II. Założenia i cel pracy

Nowotwory ośrodkowego układu nerwowego, choć należą do stosunkowo rzadko występujących, w większości przypadków wiążą się z bardzo złym rokowaniem. Okresy przeżycia chorych z nowotworami mózgu, pomimo wdrożenia intensywnego leczenia, często nie przekraczają 1 roku. Jedną z przyczyn są istniejące lub rozwijające się w trakcie terapii mechanizmy oporności na leczenie farmakologiczne lub radiologiczne. Z tego powodu wczesna i trafna diagnoza nowotworów mózgu jest szczególnie ważna, aby leczenie było bardziej skuteczne. Dotychczas stosowane markery genetyczne nie są dostatecznie specyficzne, aby mogłyby być stosowane w klinice przy wyborze zindywidualizowanej formy leczenia, szczególnie w przypadku najbardziej złośliwych nowotworów mózgu, których patogeneza na ogół nie jest znana. W ostatniej dekadzie zintensyfikowano badania mające na celu poszukiwanie i optymalizację epigenetycznych markerów nowotworowych. Do celów diagnostycznych szczególnie przydatna może być analiza profilu metylacji DNA.

Celem badań podjętych w niniejszej pracy doktorskiej była zatem:

- Analiza metylacji genów *MGMT*, *ERCC1*, *hMLH1*, *ATM*, *CDKN2B (p15INK4B)*, *p14ARF*, *CDKN2A (p16INK4A)*, *RASSF1A*, *RUNX3*, *GATA6*, *NDRG2*, *PTEN*, oraz *RARβ* w materiale klinicznym pobranym w trakcie zabiegów operacyjnych guzów OUN.
- Określenie korelacji między wynikami analizy metylacji badanych genów i rozpoznaniem histopatologicznym wg klasyfikacji WHO, a także takimi parametrami jak wiek, płeć, czas wolny od wznowy i okres przeżycia pacjentów, a na ich podstawie próba wyłonienia markerów diagnostycznych, prognostycznych, bądź wskazujących na agresywność guza.
- W odniesieniu do wyselekcjonowanych genów porównanie wyników uzyskanych techniką metylospecyficznego łańcuchowej reakcji polimerazy (MSP) i na drodze pirosekwencjonowania.
- Porównanie profilu metylacji wybranych genów w DNA izolowanym z guzów OUN z metylacją tych samych genów w wolnokrążącym DNA wyizolowanym z surowicy pacjentów.



### **III. Materiały i metody**

#### **1. Pacjenci**

Materiał do badań stanowiły próbki guzów mózgu pozyskane podczas operacji resekcji guza od 163 pacjentów Katedry i Kliniki Neurochirurgii i Neurotraumatologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Próbki bezpośrednio po resekcji były zamrażane w  $-20^{\circ}\text{C}$ , a następnie rozmrażane jednokrotnie bezpośrednio przed procedurą izolacji DNA. Spośród 163 próbek, 103 stanowiły guzy glejowe, 50 stanowiły oponiaki, a 10 to guzy przerzutowe do OUN. Analizowano również surowicę 33 pacjentów leczonych w tej samej Klinice, z czego 16 posiadało swoje odniesienie w postaci próbki guza pozyskanej od tego samego pacjenta (9 guzów glejowych i 7 innego typu). Spośród 33 próbek surowicy około połowę (17/33) stanowiły próbki od pacjentów ze zdiagnozowanymi guzami pochodzenia glejowego, zaś pozostałą część (16/33) stanowiły oponiaki i guzy przerzutowe.

Materiał porównawczy stanowiła próbka tkanki pochodząca ze zdrowego mózgu (pozyskana od pacjenta z krwakiem).

Materiał kliniczny otrzymano dzięki uprzejmości prof. dr hab. med. Stanisława Nowaka oraz dr n. med. Anny-Marii Barciszewskiej. Uchwałą nr 505/12 Komisja Bioetyczna wyraziła zgodę na przeprowadzenie powyższych badań.

#### **2. Odczynniki**

- Zestaw do izolacji DNA z tkanek ludzkich i zwierzęcych, wersja zestawu 5.2 - GeneMATRIX Tissue DNA Purification Kit (EurX Ltd., Gdańsk, Polska)
- Enzyme Reaction Solution: 1.43% SDS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 7.15mM EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 14.3mM Tris (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), pH 8.0
- Proteinaza K, (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)
- Glikogen, molecular biology grade, (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)
- NaI (Chmes, Poznań, Polska)
- Alkohol izopropylowy 45% i 100% (POCH, Gliwice, Polska)
- Zestaw EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research Corp., Irvine, CA, USA), Catalog Nos. D5002
- Polimerazy DNA: FastStart Taq DNA Polymerase 5U/μl (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Niemcy); TrueStart Taq DNA Polymerase 5U/μl (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA); Perpetual Taq DNA Polymerase (1,25 U/25μl mix) (EurX Ltd., Gdańsk, Polska); My Taq HS DNA Polymerase 5U/μl (Bioline, London, UK)

- Bufory do PCR: 10 x PCR buffer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Niemcy); 10x TrueStart™ Taq Buffer 1ml (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA); 5x My Taq Reaction Buffer (Bioline, London, UK)
- Chlorek magnezu: 25mM MgCl<sub>2</sub> (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Niemcy); 25mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)
- Trifosforany deoksyrybonukleozydów (dNTP): 10 mM roztwór dNTP, (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Niemcy); 10 mM roztwór dNTP (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)
- Oligonukleotydy starterowe: Pracownia Sekwencjonowania DNA Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN (Oligo.pl, Warszawa; Polska), (Genomed Sp. z o. o. Serwis Sekwencjonowania i Syntezy Oligonukleotydów Diagnostyka Genetyczna, Warszawa, Polska)
- Całkowicie zmetylowane ludzkie DNA - CpG Methylated HeLa Genomic DNA (New England Biolabs. Ipswich. MA, USA)
- Całkowicie niezmetylowane ludzkie DNA - EpiTect Control DNA, unmethylated (Qiagen, Hilden, Niemcy)
- Agaroz: AGAROZA do biologii molekularnej (wolna od DNaz/RNaz), (Blirt, Gdańsk, Polska)
- Bufor TBE: 9 mM kwas borowy do elektroforezy (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 9 mM Trizma base (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) i 0,1 mM EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Roztwór bromku etydy: Ethidium Bromide Solution, 10 mg/ml, Molecular Biology Grade, (Q-BIO gene, MP Biomedicals, Irvine, CA, USA)
- Bufor obciążający: 6x DNA Loading Dye Buffer Double Blue, (Solis BioDyne, Tartu, Estonia)
- Wzorzec masy: 100 bp DNA Ladder (0,1 µg/µl; 100 – 3000 pz), (Solis BioDyne, Tartu, Estonia)
- Zestaw PyroMark PCR Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy): element zestawu PyroMark PCR Master Mix zawiera HotStartTaq DNA Polymerase, 1x PyroMark PCR Buffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> i dNTP
- PyroMark Q24 MGMT (Qiagen, Hilden, Niemcy): zawiera startery dla nici wiodącej i opóźnionej oraz starter sekwencyjny
- Streptawidyna: Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)
- Bufor wiążący do pirosekwencjonowania: Binding Buffer (Qiagen, Hilden, Niemcy)
- Bufor wiążący starter sekwencyjny w reakcji pirosekwencjonowania: Annealing Buffer (Qiagen, Hilden, Niemcy)
- Zestaw odczynników do sekwencjonowania w czasie rzeczywistym: PyroMark Gold Q96 Reagents (Qiagen, Hilden, Niemcy), zawierający enzymy: fragment Klenowa polimerazy DNA I, sulfurylaza ATP, lucyferazę, apirazę; oraz substraty: adenylozynyfosforian (APS), lucyferyna oraz dNTP (dATPαS, dGTP, dCTP, dTTP).

Pozostałe odczynniki o możliwie największej czystości były dostarczone przez Polskie Odczynniki Chemiczne, Gliwice, Polska.

### **3. Izolacja DNA z materiału operacyjnego**

DNA z materiału operacyjnego izolowano metodą kolumnkową. Do izolacji używano ok. 25 miligramowy wycinek tkanki, który umieszczano w probówce typu Eppendorff wraz z 350 µl buforu Lyse T, 2 µl RNazy A oraz 20 µl proteinazy K. Następnie prowadzono kilkugodzinną inkubację próbek w temp. 56°C w termomikserze z wytrząsaniem. Po całkowitej lizie tkanek przygotowywano kolumny dodając do każdej z nich 40 µl buforu aktywacyjnego Buffer T. Następnie do lizatów dodawano 350 µl Sol T, a po ogrzaniu mieszaniny przez 10 min. w temp. 70°C, dodawano 350 µl 96% etanolu. Kolejnym etapem było przeniesienie 600 µl lizatu do zaktywowanej kolumny (umieszczonej w probówce odbierającej) i odwirowanie z prędkością 10 500 rpm przez 1,5 min. Po odwirowaniu przesącz usuwano, a na kolumnie umieszczano kolejną porcję lizatu, aby zaadsorbować cały zawarty w roztworze DNA. Następnie oczyszczano zawarte na powierzchni membrany kwasy nukleinowe, dodając kolejno 500 µl buforu płuczącego Wash TX1 (wirowanie 10 500 rpm/ 1,5 min.) oraz 500 µl buforu płuczącego Wash TX2 (wirowanie 10 500 rpm/ 3 min.). Elucji DNA dokonywano przy użyciu 200 µl buforu Elution (10 mM Tris-HCl, pH 8,5), ogrzanego uprzednio do temperatury 70°C. Po 3. minutowej inkubacji w temp. pokojowej odwirowywano roztwór przy 10 500 rpm/ 2 min. do jałowej probówki typu Eppendorf. DNA było gotowe do dalszego postępowania i mogło być przechowywane w temp. -20°C. Stężenie i czystość otrzymanego preparatu DNA oceniane były przy pomocy spektrofotometru NanoDrop (Spectrophotometer ND-1000; NanoDrop Technologies, USA). Próbką DNA wykazującą stosunek absorpcji A260/A280, świadczący o stopniu zanieczyszczenia białkami, uznana była za dostatecznie czystą, gdy wartość ta przekraczała 1,7. DNA przechowywane było w temperaturze -20°C.

### **4. Izolacja DNA wolnokrążącego z surowicy**

DNA wolnokrążące izolowano z surowicy zgodnie z protokołem opisanym przez Fong'a i wsp. [Fong et al. 2009]. Surowicę uzyskiwano poprzez odwirowywanie elementów morfotycznych krwi obwodowej w cyklu dwóch wirowań – 10 min./1 600 rpm/4°C oraz 15 min./14 600 rpm/4°C. Tak otrzymywana surowica przechowywana była do czasu analizy w temp -20°C. Do 2 ml surowicy dodawano 2 ml 1x Enzyme Reaction Solution (zawierający SDS, EDTA oraz Tris), oraz 70 µl proteinazy K. Mieszaninę poddawano 2-godzinnej inkubacji w łaźni wodnej w 56°C. Następnie dodawano 6 µl glikogenu i po wymieszaniu oraz 3 minutach inkubacji w temp. pokojowej, uzupełniano 4,076 ml 9M NaI oraz 8,152 ml 100% izopropanolu. Funkcją glikogenu było wiązanie DNA, co przyczyniało się do zwiększenia wydajności izolacji kwasu nukleinowego, zaś wysokie, 9M stężenie NaI powodowało rozpuszczenie polipeptydów surowicy; izopropanol zaś powodował wytrącenie DNA. Po 15. minutach ponownej inkubacji próby odwirowywano z prędkością 9 500 x g/25 min. Osad przemywano z użyciem 12 ml 45% izopropanolu i odwirowywano (10 000 x g/20 min). Osad ponownie oczyszczano, dodając 9 ml 75% etanolu i po zworteksowaniu, odwirowywano (10 000 x g/15 min.). Po 10. minutowym suszeniu w temp. pokojowej osad DNA rozpuszczano w buforze TE (Tris/HCl-EDTA o pH=7,6), a następnie

pozostawiano w termomikserze na ok. 10h do maksymalnego rozpuszczenia. Stężenie i czystość prób sprawdzono jak w pkt. 3.

## 5. Chemiczna konwersja DNA w reakcji z wodorosiarczanem (IV) sodu

Zastosowana metoda różnicowania sekwencji zmetylowanych od niezmetrylowanych polega na konwersji niezmetrylowanej cytozyny do uracylu na drodze oksydacyjnej deaminacji, podczas gdy cytozyna zawierająca w pozycji 5' podstawnik metylowy pozostaje w tej reakcji niezmienną. Tak wprowadzona zmiana w sekwencji DNA umożliwia na dalszym etapie wykonanie analizy metylacji opartych na reakcji PCR (m. in. MSP oraz pirosekwencjonowania). W samym procesie konwersji DNA wyróżnić należy trzy etapy: denaturację, konwersję oraz desulfonację DNA.

Denaturacji ok. 300 ng DNA dokonywano poprzez zmieszanie odpowiedniej ilości DNA z 5 µl odczynnika M-Dilution Buffer oraz z wodą ultraczystą (Millipore System) do objętości 50 µl. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w termomikserze przez 15 min. w temp. 37°C. Po zakończeniu inkubacji dodawano po 100 µl odczynnika konwertującego (Conversion Reagent) zawierającego wodorosiarczan (IV) sodu - NaHSO<sub>3</sub>. Odczynnik ten przygotowano *ex tempore* poprzez rozpuszczenie w wodzie oraz M-Dilution Buffer (na każde 10 reakcji używano 750 µl wody ultraczystej i 210 µl M-Dilution Buffer). Następnie przeprowadzano 16 godzinną konwersję w temperaturze 50°C (w termomikserze), chroniąc próbki od światła. Po tym czasie próbki inkubowano w lodzie, pozostawiając je w tych warunkach przez 10 min., po czym przenoszono mieszaninę reakcyjną do zaktywowanych uprzednio kolumn umieszczonych w probówkach odbierających. Aktywacja kolumn odbywała się poprzez dodanie 400 µl buforu wiążącego M-Binding Buffer. Po naniesieniu roztworów na kolumny mieszano zawartość poprzez kilkukrotne odwracanie kolumienek do góry dnem. Następnie dokonywano odwirowania (11 000 x g/30 s), podczas którego DNA wiązane było do membrany znajdującej się w kolumnie, podczas gdy pozostałe elementy mieszaniny reakcyjnej zostawały odwirowane. Kolumnę przemywano za pomocą 100 µl buforu M-Wash Buffer i ponownie odwirowywano (jw.). Następnie dokonywano desulfonacji poprzez 15 minutową inkubację 200 µl buforu M-Desulphonation Buffer. Po odwirowaniu (jw.) dwukrotnie przemywano kolumnę 200 µl M-Wash Buffer. Ostatnim etapem było wymycie DNA z kolumny poprzez dodanie 20 µl buforu wmywającego M-Elution Buffer i odwirowanie (jw.) do jałowej probówki typu Eppendorf. Tak otrzymany roztwór DNA używano bezpośrednio do reakcji lub przechowywano w temp. -20°C.

## 6. Metylospecyficzna reakcja PCR (MSP)

Metylospecyficzna reakcja PCR (MSP) jest najczęściej stosowaną techniką wykorzystywaną do badania metylacji DNA. Różni się ona tym od standardowej reakcji PCR, że przeprowadza się równolegle dwie reakcje, tj. ze starterami specyficznymi względem sekwencji zmetylowanej oraz

specyficznymi względem sekwencji niezmetylowanej. Ponieważ jednak polimeraza DNA użyta do reakcji nie rozróżnia cytozyny zmetylowanej od niezmetylowanej, MSP jest zawsze poprzedzone reakcją z wodorosiarczanem IV sodu. W ten sposób uzyskuje się DNA zmodyfikowane w ten sposób, że możliwe staje się rozróżnienie, przy użyciu odpowiednio dobranych starterów, sekwencji zmetylowanej od niezmetylowanej. Produkty obu reakcji uwiadczenia się na żelu agarozowym wybarwiając DNA bromkiem etydyny.

Reakcję MSP przeprowadzano w termocyklerach 170-9713 MyCycler Thermal Cycler with Gradient, (Bio-Rad), bądź T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). Składy mieszanin reakcyjnych zależne od rodzaju użytej polimerazy, parametry reakcji, oraz rodzaj użytego termocyklera zamieszczono w poniższych tabelach (Tab. 4- 7). Sekwencje starterów używane do reakcji MSP przedstawiono w Tab. 8.

**Tab. 4 FastStart Taq DNA Polymerase firmy Roche**

Odczynnik	[ $\mu$ l]	Parametry reakcji	Termocykler
10 x PCR buffer	1,5	95°C 4' 95°C 30" T <sub>A</sub> 30" 72°C 45" 72°C 7' 4°C $\infty$	MyCycler BioRad lub T100 BioRad
MgCl <sub>2</sub> Solution [25 mM]	2,4		
dNTP [10 mM]	0,3		
Fast Start Taq DNA Polymerase [5 U/ $\mu$ l]	0,2		
5 x GC-RICH Solution	3,0		
H <sub>2</sub> O	7,4		
Starter MF / UF [10 $\mu$ M]	0,6		
Starter MR /UR [10 $\mu$ M]	0,6		
DNA deaminowany	2,0		
$\Sigma$	18,0		

**Tab. 5 TrueStart Hot Start Taq DNA Polymerase firmy Fermentas.\* 10x TrueStart Hot Start Taq Buffer zawiera 200mM Tris-HCl (ph 8,3 w 25°C), 200mM KCl, 50mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.**

Odczynnik	[ $\mu$ l]	Parametry reakcji	Termocykler
10x TrueStart Hot Start Taq Buffer*	3,0	95°C 2' 95°C 30" T <sub>A</sub> 30" 72°C 30" 72°C 5' 4°C $\infty$	MyCycler BioRad lub T100 BioRad
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	3,0		
dNTP [10 mM]	0,9		
TrueStart Hot Start Taq DNA Polymerase [2 U/ $\mu$ l]	0,2		
H <sub>2</sub> O	14,9		
Starter MF / UF [10 $\mu$ M]	3,0		
Starter MR /UR [10 $\mu$ M]	3,0		
DNA deaminowany	2,0		
$\Sigma$	30,0		

Tab. 6 Perpetual Taq DNA Polymerase firmy EurX. \* Perpetual Taq PCR Master Mix (2x) zawiera Perpetual Taq DNA Polymerase, 2x Pol Buffer B, 3 mM MgCl<sub>2</sub> i 0,4mM każdego z dNTP.

Odczynnik	[ $\mu$ l]	Parametry reakcji	Termocykler
2 x Perpetual Taq PCR Master Mix*	12,5	95°C 4' 95°C 30" T <sub>A</sub> 30" 72°C 45" 72°C 7' 4°C $\infty$	MyCycler BioRad lub T100 BioRad
H <sub>2</sub> O	9,5		
Starter MF / UF [10 $\mu$ M]	0,5		
Starter MR /UR [10 $\mu$ M]	0,5		
DNA deaminowany	2,0		
$\Sigma$	25,0		

Tab. 7 My Taq HS DNA Polymerase firmy Biorline. \* 5x My Taq Reaction Buffer zawiera 5mM każdego z dNTP, 15 mM MgCl<sub>2</sub> i substancje stabilizujące i wzmacniające, w optymalnych stężeniach.

Odczynnik	[ $\mu$ l]	Parametry reakcji	Termocykler
5x My Taq Reaction Buffer*	5,0	95°C 1' 95°C 15" T <sub>A</sub> 15" 72°C 10" 4°C $\infty$	MyCycler BioRad lub T100 BioRad
MyTaq HS DNA Polymerase [5 U/ $\mu$ l]	0,2		
H <sub>2</sub> O	15,8		
Starter MF / UF [10 $\mu$ M]	1,0		
Starter MR /UR [10 $\mu$ M]	1,0		
DNA deaminowany	2,0		
$\Sigma$	25,0		

**Tab. 8 Sekwencje starterów użytych do analizy MSP dla poszczególnych genów, wraz z warunkami reakcji, temperaturą hybrydyzacji starterów ( $T_A$ ), rodzajem użytej polimerazy, wielkością spodziewanego produktu (podaną jako liczba par zasad – pz) oraz źródłem literaturowym w którym również wykorzystano te sekwencje. pz – liczba par zasad w łańcuchu DNA, MF – starter przedni, specyficzny dla sekwencji zmetylowanej, MR – starter wsteczny, specyficzny dla sekwencji zmetylowanej, UF – starter przedni, specyficzny dla sekwencji niezmetrylowanej, UR – starter wsteczny, specyficzny dla sekwencji niezmetrylowanej.**

Gen	Startery	Sekwencja [5' - 3']	Produkt	TA i zastosowana polimeraza	Źródło literaturowe
<b>MGMT</b>	MF	TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCGC	81 pz	60°C Roche	Esteller et al., 1999
	MR	GCACTCTTCCGAAAACGAAACG			Malley et al., 2011
	UF	TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTGT	93 pz		Dong et al., 2005
<b>ERCC1</b>	UR	AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA			
	MF	CGCGTTATCGCGGTTAAGT	223 pz	60°C Fermentas, Roche	Liu et al., 2009
	MR	ACCTTCCCCTCCTCTCAACTT			
	UF	TGGGTTGTGTGTTATTGTGGTTA	230 pz		
<b>hMLH1</b>	UR	ACCTTCCCCTCCTCTCAACTT			
	MF	ACGTAGACGTTTTATTAGGGTCGC	124 pz	60°C Roche	Ren et al., 2012
	MR	CCTCATCGTAACTACCCGCG			
<b>ATM</b>	UF	TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTTGT	118 pz		
	UR	ACCACCTCATCATAACTACCCACA			
	MF	GGTATGTTTATGCGTATTTAGTATTACGC	121 pz	M => 60°C Fermentas	Grønbaek et al., 2002
	MR	AACGCTAAATCGCTAACCATTAATAA			
<b>RASSF1A</b>	UF	TGGTATGTTTATGTTATTTAGTATTATGT	123 pz	U => 56°C Fermentas	
	UR	AAACACTAAATCACTAACCATTAATAAA			
	MF	GTGTTAACGCGTTGCGTATC	94 pz	60°C Roche, Fermentas, EurX	Pizzi et al. 2005
	MR	AACCCCGCGAACTAAAAACGA			Malpeli et al., 2011
<b>p14ARF</b>	UF	TTTGTTGGAGTGTGTTAATGTG	108 pz		
	UR	CAAACCCACAAACTAAAAACAA			
	MF	GTGTTAAAGGGCGGCGTAGC	122 pz	M => 60°C Roche	Dong et al., 2005
	MR	AAAACCCCTCACTCGCGACGA			
<b>p15INK4B (CDKN2B)</b>	UF	TTTTTGGTGTTAAAGGGTGGTGATGT	132 pz	U => 58°C Roche	
	UR	CACAAAAACCCCTCACTACAACAA			
	MF	GCGTTCGTATTTGCGGTT	148 pz	60°C Roche	Herman et al., 1996
	MR	CGTACAATAACCGAACGACCGA			
<b>p16INK4A (CDKN2A)</b>	UF	TGTGATGTGTTTTGTATTTTGTGGTT	154 pz		
	UR	CCATACAATAACCAACAACCAA			
	MF	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	150 pz	M => 65°C Roche	Herman et al., 1996
	MR	GACCCCGAACCGGACCGTAA			
<b>NDRG2</b>	UF	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	151 pz	U => 60°C Roche	
	UR	CAACCCCAAACCAACCATAA			
	MF	AGAGGTATTAGGATTTGGGTACG	123 pz	55°C Roche, Bioline	Piepoli et al., 2009
	MR	GCTAAAAAACGAAAACTCTCGC			
<b>RUNX3</b>	UF	AGAGGTATTAGGATTTGGGTATGA	125 pz		
	UR	CCACTAAAAAACAAAAATCTCACC			
	MF	TTACGAGGGCGGTCTGACGCGGG	220 pz	M => 66°C, Roche	Song et al., 2008
	MR	AAAACGACCGACGCGAACGCCTCC			
<b>PTEN</b>	UF	TTATGAGGGTGGTTGTATGTGGG	220 pz	U => 63°C, Roche	
	UR	AAAACAACCAACACAAACACCTCC			
	MF	TTCGTTTCGTCGTCGTCGTTT	207 pz	62°C Roche, Bioline	Hino et al., 2009
	MR	GCCGCTTAACTCTAAACCGCAA			
<b>RARβ</b>	UF	GTGTTGGTGGAGGTAGTTGTTT	162 pz		
	UR	ACCACTTAACTCTAAACCAACCA			
	MF	TGTCGAGAACGCGAGCGATTTC	148 pz	60°C Fermentas	King-Batoon et al., 2008
	MR	CGACCAATCCAACCGAAACGA			
<b>GATA6</b>	UF	TTGGGATGTTGAGAATGTGAGTGATTT	154 pz		
	UR	CCTACTCAACCAATCCAACCAAAACAA			
	MF	CGGGGTAGATTTCCGATTTCG	116 pz	60°C Roche	Cecener et al., 2012
	MR	CAACCGAACCTCGAACGAACG			Guo et al., 2004
	UF	GTGTGGGGTAGATTTTGGATTTGT	122 pz		
	UR	AAACAACCAAACCTCAACAAACA			

Każdorazowo wykonując reakcje dla próbek badanych przeprowadzano również reakcje kontrolne z użyciem DNA całkowicie zmetylowanego (przy pomocy metylazy Sssl), pochodzącego z linii komórkowej HeLa [CpG Methylated HeLa Genomic DNA, New England Biolabs], DNA całkowicie niezmetylowanego [EpiTect Control DNA, unmethylated, Qiagen], oraz próby ślepej pozbawionej matrycy DNA. Każdy z badanych genów analizowany był również w odniesieniu do tkanki zdrowego mózgu; po potwierdzeniu niezmetylowanego statusu analizowanych genów w tej kontroli, przystępowano do analizy próbek guzów/surowicy.

Obecność produktu reakcji MSP sprawdzano za pomocą rozdziału elektroforetycznego z użyciem 2% żelu agarozowego z dodatkiem 0,5 µg/ml bromku etydyny. Za niezmetylowane uznawano te geny, w analizie których uzyskano prążek w reakcji z użyciem starterów wiążących się do sekwencji niezmetylowanej. W przypadku genów zmetylowanych prążek uzyskiwano zarówno w analizie z użyciem starterów specyficznych dla sekwencji zmetylowanej, jak i w analogicznej reakcji z wykorzystaniem starterów wiążących się do sekwencji niezmetylowanej. Fakt ten wynika z obecności w analizowanej próbce DNA guza również DNA pochodzącego z leukocytów, komórek nabłonka naczyń, komórek zdrowego mózgu bądź prawidłowych astrocytów i jest prawidłowością obserwowaną również przez innych badaczy.

## **7. Ocena metylacji genów techniką pirosekwencjonowania**

Pirosekwencjonowanie jest metodą sekwencjonowania w czasie rzeczywistym, pozwalającą na uzyskanie informacji o sekwencji krótkich fragmentów DNA. Podstawą rozróżnienia sekwencji zmetylowanej od niezmetylowanej w tej metodzie, podobnie jak w MSP, jest chemiczna konwersja cytozyn niezmetylowanych do uracylu, w reakcji z wodorosiarczanem IV sodu. Po konwersji DNA amplifikowane jest w reakcji PCR, z użyciem pary starterów, z których jeden wyznakowany jest biotyną. Bezpośrednio przed samym sekwencjonowaniem, DNA ulega chemicznej denaturacji, oczyszczeniu oraz związaniu ze starterem sekwencyjnym, łączącym się bezpośrednio do tego fragmentu sekwencji, który ma zostać zanalizowany. Reakcję pirosekwencjonowania katalizuje zestaw czterech enzymów: fragment Klenowa polimerazy DNA I, sulfurylaza ATP, lucyferaza oraz apiraza. Zasada metody polega na tym, że do jednoniciowego DNA dobudowywana jest zgodnie z zasadami komplementarności druga nić. Do mieszaniny reakcyjnej włączane są pojedyncze dNTP, zgodnie z zaprogramowaną kolejnością. Zaznaczyć należy, iż oprócz dGTP, dCTP oraz dTTP stosuje się również zmodyfikowany  $\alpha$ -tio trifosforan deoxyadenozyny (dATP $\alpha$ S), jako substytut dATP. Każdorazowo włączeniu komplementarnego nukleotydu towarzyszy uwolnienie pirofosforanu, który następnie z wykorzystaniem adenozyno-5'-fosfosiarczanu (APS) używany jest przez sulfurylazę do wytworzenia ATP. Następnie ATP, w obecności lucyferyny i tlenu, wykorzystany jest przez lucyferazę jako źródło energii do wytworzenia oxylucyferyny, która emituje fotony świetlne rejestrowane przez fotokamerę CCD. Niewłączone nukleotydy degradowane są przez apirazę, natomiast zastosowanie dATP $\alpha$ S zamiast dATP pozwala na włączenie tego pierwszego przez polimerazę, pozostając niewidocznym dla lucyferazy. Tak więc emisja światła świadczy o inkorporacji danego nukleotydu,



natężenie zaś światła jest wprost proporcjonalne do ilości włączonych nukleotydów. Zebrane dane następnie są podstawą do obliczeń i tworzenia tzw. pirogramu.

Za pomocą reakcji PCR amplifikowano docelowy fragment genu (szczegóły w podrozdziałach 7.1 i 7.2). Następnie, w celu uzyskania pewności, że reakcja przebiegła prawidłowo, przeprowadzano elektroforezę z użyciem 4  $\mu$ l otrzymanego produktu stosując 2% żel agarozowy z dodatkiem 0,5  $\mu$ g/ml bromku etydyny. Wizualizacji prążków dokonywano w świetle UV w aparacie G:BOX (Syngene). Następnie przygotowano mieszaninę złoża sefarozowego opłaszczzonego streptawidyną (Streptavidin Sepharose High Performance, GE Healthcare) z buforem wiążącym (Binding Buffer, Qiagen) w stosunku 3  $\mu$ l złoża i 37  $\mu$ l buforu wiążącego na jedną próbkę. Następnie do każdego produktu PCR dodawano wodę do objętości 40  $\mu$ l oraz 40  $\mu$ l uprzednio przygotowanej mieszaniny złoża sefarozowego z buforem wiążącym. Płytkę z próbkami wytrząsano przez 5 min. w temp. pokojowej. W międzyczasie przygotowano roztwory do stacji z pompą (PyroMark Q96 Vacuum Prep Workstation; Qiagen, Hilden, Germany).

Starter sekwencyjny (PyroMark Q24 MGMT, Qiagen) rozpuszczano w buforze wiążącym (Annealing Buffer, Qiagen) uzyskując stężenie 10  $\mu$ M. Rozpipetowano starter sekwencyjny do odpowiednich dołków na płytce do sekwencjonowania (PSQ 96 Plate Low). Kolejnym etapem było uzyskanie w każdej z analizowanych próbek jednoniciowego DNA. W tym celu uruchamiono pompę i płukano urządzenie zasysające wodą, w pozycji parkingu. Następnie zasysano mieszaninę DNA ze złożem sefarozowym i przechwycone na filtrze złożę ze związanym produktem PCR przepłukiwano 70% etanolem. Denaturacji DNA dokonywano poprzez zanurzenie końcówek z filtrami w buforze denaturującym zawierającym NaOH (Denaturation Solution, Qiagen). Niezwiązane z filtrem pozostałości odpłukiwano zasysając przez 5'' bufor przemywający (Washing Buffer, Qiagen), po czym suszono końcówki filtrów trzymając urządzenie przez 5'' pod kątem prostym. Wyłączano ssanie i uwalniano jednonicowy produkt DNA z końcówek z filtrem do wcześniej przygotowanej płytki z buforem do przyłączania starterów i starterem sekwencyjnym. Inkubowano płytkę z próbkami w temp. 80°C przez 2' (osłaniając przed parowaniem), po czym wychładzano płytkę do temp. pokojowej. Stację roboczą w międzyczasie przepłukiwano wodą celem oczyszczenia filtrów. Następnie przygotowano dozownik (reagent cartridge) uzupełniając poszczególne jego segmenty odczynnikami z zestawu PyroMark Gold Q96 Reagents (Qiagen), a mianowicie mieszaniną enzymów, mieszaniną substratów, oraz trifosforanami deoksyrybonukleozydów. Mieszanina enzymów (Enzyme mixture) zawierała fragment Klenowa polimerazy DNA I, sulfurylazę ATP, lucyferazę oraz apirazę. Mieszanina substratów natomiast to adenylozynylofosforan (APS) oraz lucyferyna. dNTP zaś, to dATP $\alpha$ S, dGTP, dCTP oraz dTTP. Dozownik wraz z płytką umieszczano w pirosekwencjonatorze PSQTM96 ID system (Biotage, Uppsala, Sweden) i uruchomiono wcześniej zaprogramowane sekwencjonowanie. Analizę otrzymanych wyników przeprowadzano przy użyciu oprogramowania PyroQ CpG software (Biotage, Uppsala, Sweden).

## Ustalenie linii odcięcia dla rozróżnienia próbek zmetylowanych od niezmetrylowanych

Technika pirosekwencjonowania umożliwia dokładny odczyt procentowej zawartości zmetylowanych alleli w badanej próbce, niemniej jednak istotne jest, czy to w praktyce klinicznej, czy celem porównania z MSP, zinterpretowanie danych liczbowych w systemie binarnym, tzn. jako metylację, lub brak obecności metylacji w badanej próbce. W tym celu wyznaczono wartość graniczną metylacji (tzw. linię odcięcia), poniżej której próby uznawano za niezmetrylowane, a powyżej – zmetylowane. Wartość tę obliczono na podstawie wzoru [za Håvik et al.2012] :

$$X + 2SD = Y$$

Gdzie,

X - średnia wartości % metylacji wszystkich 5 CpG kontrolnej tkanki zdrowego mózgu

SD – odchylenie standardowe z X

Y - wyznaczona procentowa wartość linii odcięcia, rozróżniająca próbki zmetylowane od niezmetrylowanych

$$\text{Dla } \mathbf{MGMT}: \quad 6,19 + 2 \cdot 2,87 = 11,93\%$$

$$\text{Dla } \mathbf{NDRG2}: \quad 9,13 + 2 \cdot 0,94 = 11,01\%$$

Po zaokrągleniu, przyjęto zatem, że wartość graniczna rozróżniająca próbki o zmetylowanym statusie *MGMT* będzie wynosić 12%, zaś dla *NDRG2* będzie to 11%.

### 7.1 Pirosekwencjonowanie *MGMT*

Konwersję przeprowadzano przy użyciu zestawu odczynników EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research), zgodnie z opisem w rozdziale 5. Do amplifikacji fragmentu promotora *MGMT* używano zestawu odczynników firmy Qiagen - PyroMark PCR Kit. W skład zestawu wchodziły: PyroMark PCR Master Mix, zawierający HotStartTaq DNA Polymerase, 1x PyroMark PCR Buffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> oraz dNTP. Użyte startery pochodziły z zestawu PyroMark Q24 *MGMT* (Qiagen). Starter wsteczny został wyznakowany biotyną. Reakcję PCR prowadzono zgodnie z następującym protokołem:

Tab.9 Protokół dla amplifikacji sekwencji promotorowej genu *MGMT*.

Odczynnik	[ $\mu$ l]	Parametry reakcji	Termocykler
PyroMark PCR Master Mix	12,5	95°C 15' 94°C 30" 53°C 30" 72°C 30" 72°C 10' 4°C $\infty$	MyCycler BioRad lub T100 BioRad
Starter F	0,5		
Starter R	0,5		
H <sub>2</sub> O	10,5		
DNA deaminowany	2		
$\Sigma$	26		

Analizowany fragment genu *MGMT* obejmował 5 dinukleotydów w egzonie 1 (Ensemble ID: OTTHUMT00000051009):

**T/CGTTTTGT/CGTTTT/CGAT/CGTTT/CGT/CAGG**

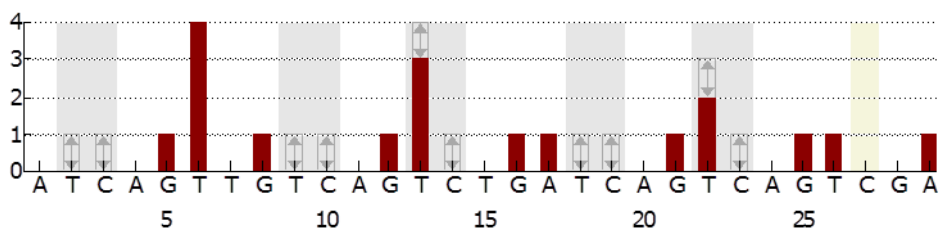
Ostatnie badane miejsce, gdzie za wariantem T/C jest adenina A to wewnętrzna kontrola konwersji.



**Ryc. 21 Fragment promotora *MGMT*, niekonwertowany.** Na żółto zaznaczono dinukleotydy CpG, egzon 1 zaznaczony jest na niebiesko, pierwsza niebieska tymina jest miejscem startu transkrypcji (TSS). Zaznaczono również regiony DMR1 i DMR2, zdefiniowane przez Malley i wsp. [Malley et al., 2011]. DMR1 – to CpG odpowiednio 25-50 w przedstawionym fragmencie; DMR2 zaś to CpG 73-90. Pięć CpG analizowanych przez pirosekwencjonowanie jest podkreślone – są to CpG 74-75-76-77-78. Dla porównania na rycinie zaznaczono również CpG analizowane techniką MSP. Są to CpG 76-77-78-79-80 i 84-85-86-87 (wytluszczone). Obie techniki zatem analizują region DMR2.

Kolejność włączanych w trakcie reakcji trifosforanów deoksyrybonukleozydów była następująca:

**ATCAGTTGTCAGTCTGATCAGTCAGTCGA**



**Ryc. 22 Histogram dla analizy metylacji genu *MGMT*.**

## 7.2 Pirosekwencjonowanie *NDRG2*

Konwersję przeprowadzano przy użyciu zestawu odczynników EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research), zgodnie z opisem w rozdziale 5. Amplifikację fragmentu promotora *NDRG2* prowadzono wykonując PCR z użyciem polimerazy FastStart Taq DNA Polymerase firmy Roche Diagnostics. Startery do reakcji PCR, jak również starter sekwencyjny zostały zaprojektowane z użyciem oprogramowania PyroMark Assay Design SW 2.0 software, a wykonane zostały przez firmę Genomed SA. Starter wsteczny przy końcu 5' wyznakowany został biotyną.

Tab. 10 Charakterystyka stosowanych starterów.

Gen	Startery	Sekwencja [5' - 3']	Wielkość produktu
<i>NDRG2</i>	F	GGGCGGTGTGATTGATTC	327 pz
	R	Biotin-CCCACAATCTTCTCCCGTTCT	
	sekwencyjny	GGGGGAAAGGGTTAGTA	

Tab. 11 Protokół dla amplifikacji sekwencji promotorowej genu *NDRG2*.

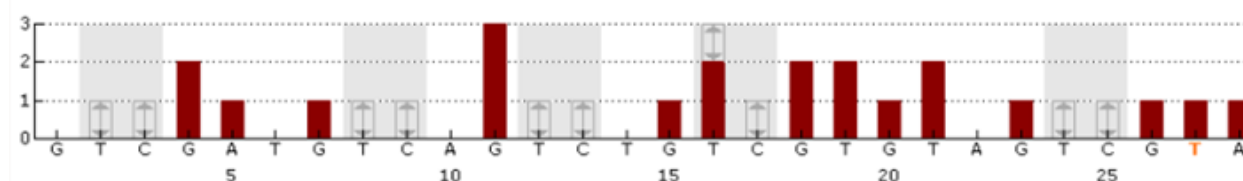
Odczynnik	[ $\mu$ l]	Parametry reakcji	Termocykler
10 x PCR buffer	2,5	95°C 4' 95°C 30" 58°C 30" 72°C 45" 72°C 7' 4°C $\infty$	MyCycler BioRad lub T100 BioRad
MgCl <sub>2</sub> Solution [25 mM]	5,0		
dNTP [10 mM]	0,5		
Fast Start Taq DNA Polymerase [5U/ $\mu$ l]	0,2		
H <sub>2</sub> O	13,3		
Starter F [10 $\mu$ M]	1,0		
Starter R biotynylowany [10 $\mu$ M]	0,5		
DNA deaminowany	2,0		
$\Sigma$	25		

Analizowany fragment genu *NDRG2* obejmował 5 dinukleotydów CpG:

**T/CGGAGT/CGGGT/CGTTT/CGGTTGTTGT/CGTATAAAGGT**

Kolejność włączanych w trakcie reakcji trifosforanów deoksyrybonukleozydów była następująca:

**GTCGATGTCAGTCTGTCGTGTAGTCGTA**



Ryc. 23 Histogram dla analizy metylacji genu *NDRG2*. Pomarańczowa litera T oznacza wewnętrzną kontrolę konwersji - pole, w którym powiniem pojawić się pik.

Poniżej przedstawiono fragment promotora *NDRG2* z zaznaczoną sekwencją poddaną analizie za pomocą pirosekwencjonowania. Obejmuje ona 5 dinukleotydów CpG. Zaznaczono dla porównania również sekwencję badaną MSP (4 dinukleotydy). Warto zauważyć, że analizowane sekwencje nie pokrywają się, choć są w bliskim sąsiedztwie (643 nt).

```

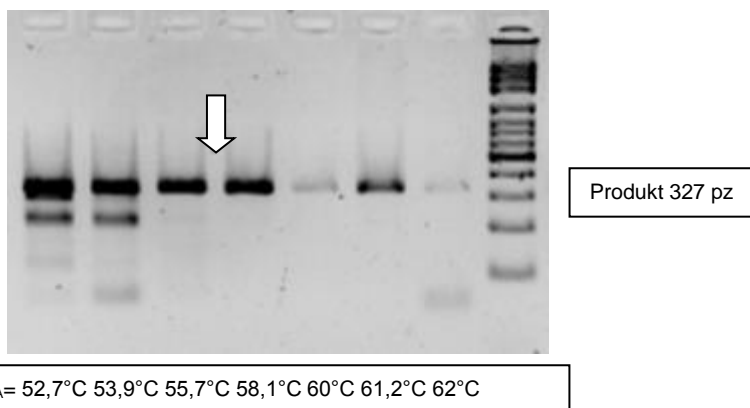
GGTTTTTTGGGTTTTAGTTTAGGATATTGCGTTTTTTTTTAAGTTTTTATTTTATTTTCGT
AGGGTTAATTTTCGTTTTTTCGTTTTGTTTTATTTAGGAGTTAGAGTTTTTGGGGTTTTTCGG
TTTTTTTTTCGCGTTTTTTGAGGTATTGATTTTAGAGTTTTTGTGGTTATTTTTTTTTTT
ATTTTTCGTTTGTTCGCGATCGTTTTTTATTTATAGCGTTTTTTCGTATTTTTCGTTTTT
ATTTTTTCGTTTTGTTGTTTAAATTTTTTTTCGGAGTAGTCGGAGAGTAGGCGTCGGGACGT
AGTAAAGAGAGGAGAGGTATTAGGATTTTGGGTACGAGGGAGTCGGAATTTTTGCGTTTT
CGACGTTTTTTCGTGTTTTTTTTTCGGCGTTAGTATATTTGTTTTTGTAGTCGGCAGAT
TTTCGTTTTTTTAGCGGCGTTTTCGTTTTATTTTTTTTTTTTTTAATTTAGTTTTTTGTGT
TCGGGCGGGGGAGTCGAATTCGTGGGTGTTAGTATTTTCGGTTCGTTTTTTTATTATT
GGTTTTTATTATTGAGTTTGGGGGCGAAGGAAGGAGTTAGAGTGAATTTAGATTTAGG
TCGTGGATGGGGCGGTGTTGAGGGTAGTCGAGGGATTTTTTTTTTAGGGTTGAGGGATTTTT
GTATTTTTTATATCGTTTTTAATGCGGGGAGGGGGTGGTGAATGTTTTGGTGAGTCGAGT
AGAGTTTGAAGCGTTTAGTCGTTTCGTTTTTCGTTTTTCGTTTTTAGTATAATTTTTTTTT
TGAGCGGTAGTTTGGGCGGGGTGAAAGGGGGGGCGTGTATTGGGGGTTTGGGGCGGGT
TTGCGGGGAGTTTAGCGTTTCGTGGGCGGGTTGGGGCGGGTCGGGGGCGGGTTTCGGGAA
GTTTCAGTCGGGGCGGGTTCAGTTAAAGGTAAGTGAAGGTGGAAGCGGTTCGCGCGGTA
GTAGGTAGGGGAGGGGTAGGCGAGGGGTCGTAGGGTTTGAAGGCGTTAGTCGGGTTCGG
CGGGCGGTGTGATTGATTCGCGTTTTTTGGAGTTGGAGTTTCGGGGAAAGGGTTAGTAC
GGAGCGGGCGTTTCGGTTGTTGCGTATAAAGGTTGAGGTTTTAAGAGTTGTAGGCGTGT
TGGGGTGC CGCGAGGTTGTGTGTAAGGTTTCGGGCGTTTGGTATCGGTTACGTAAGGGT
GTTAGTTTTTACCGGACGGGTTGCGTAGGGATTTCGTAGGGACGGGTTTCGGGTGTTGGG

```

Ryc. 24 Fragment promotora genu *NDRG2*. Sekwencja zaczerpnięta z bazy Ensembl [www4], konwertowana. Na niebiesko zaznaczono sekwencję analizowaną za pomocą pirosekwencjonowania. Dla porównania na żółto zaznaczono fragment do którego wiążą się startery użyte do MSP (wersja MF i MR). Analizowane dinukleotydy CpG zostały podkreślone.

### Optymalizacja metody

Rycina 25 przedstawia optymalizację temperatury hybrydizacji starterów  $T_A$  dla reakcji PCR poprzedzającej pirosekwencjonowanie *NDRG2*. Wykorzystanie gradientu temperatury umożliwiło wyłonienie najbardziej optymalnej  $T_A$ , a mianowicie 57°C (wskazane strzałką).



Ryc. 25 Ustalenie optymalnej temperatury hybrydizacji starterów dla reakcji PCR amplifikującej fragment genu *NDRG2*.

## 8. Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej wykorzystano program *css Statistica*, wersja 10.

- Testu Fishera użyto do oceny korelacji częstości metylacji poszczególnych genów w zależności od stopnia złośliwości wg klasyfikacji WHO (program Stat Exact).
- Za pomocą korelacji porządku rang Spearmana dokonano analizy zależności pomiędzy współczynnikiem metylacji (WM), a stopniem złośliwości wg klasyfikacji WHO, oraz wiekiem. Ten test wykorzystano również w celu sprawdzenia czy istnieje zależność pomiędzy metylacją *MGMT*, liczoną jako średnia z pięciu dinukleotydów CpG, oraz w każdym dinukleotydzie osobno, a niezależnym od leczenia operacyjnego przeżyciem chorych oraz czasem wolnym od wznowy.
- Testu t-Studenta użyto do oceny istotności współczynnika korelacji R.
- Analizy Chi-kwadrat wraz z określeniem współczynnika korelacji Pearsona użyto w celu zbadania korelacji wyników metylacji z płcią.
- Testu Kruskala-Wallisa użyto w celu zbadania zależności pomiędzy rozpoznaniem histopatologicznym a WM, oceny różnic w poziomach metylacji uzyskanych techniką pirosekwencjonowania, pomiędzy guzami różnych stopni złośliwości wg WHO, jak również w celu analizy zależności metylacji w poszczególnych dinukleotydach CpG, od wieku pacjentów.
- Test U Manna-Whitney'a zastosowano do oceny znamienności statystycznej wartości procentowej metylacji w poszczególnych dinukleotydach CpG genu *MGMT* w zależności od płci pacjentów.

## IV. Wyniki

### 1. Dane kliniczne

#### 1.1 Charakterystyka guzów glejowych

Analizie poddano 103 próbki pozyskane od pacjentów z guzami glejowymi sklasyfikowanymi wg czterostopniowej skali złośliwości WHO. Ich charakterystykę kliniczną (wiek, płeć, rozpoznanie) przedstawiono w Tab. 12 zamieszczonej w Aneksie. Ponad połowę (60/103; 58,25%) stanowiły guzy IV stopnia, zatem najbardziej złośliwe, z czego zdecydowaną większość stanowiły glejaki wielopostaciowe (GBM) oraz ich wznowy (GBM recidivans). W całej badanej populacji glejaków, te dwa typy guzów stanowiły 55,34% wszystkich nowotworów (57/103). Drugą co do częstości grupą guzów były gwiaździaki anaplastyczne oraz ich wznowy (anaplastic astrocytoma oraz anaplastic astrocytoma recidivans). Stanowiły one 18,45% całkowitej liczby badanych prób (19/103). Rozkład płci w poszczególnych grupach o różnym stopniu złośliwości był idealnie symetryczny (w grupie guzów stopnia IV), lub prawie symetryczny, co potwierdza populacyjną obserwację, że zasadniczo na guzy glejowe zapadają w równym stopniu kobiety jak i mężczyźni. Podobnie zachowana została prawidłowość dotycząca wieku zachorowań. Zgodnie z poniższą analizą struktury wieku badanej populacji [Tab. 15], największy odsetek chorych (41/103; 39,81%) stanowili pacjenci między 51-60 rokiem życia, a drugą co do częstości grupę stanowili chorzy do 50 roku życia (31/103; 30,10%). Mniejsza liczba przypadków powyżej 70. roku życia wynika z mniej licznej populacji w tym wieku (8/103; 7,77%). Średni wiek zachorowania to 54 lata. W obrębie kategorii wiekowych analizowanych w kontekście klasyfikacji wg WHO, najliczniej reprezentowana była kategoria 51-60 lat – dla grupy pacjentów z guzem IV stopnia wg WHO (45,00%; 27/60), oraz kategoria <50 lat dla pozostałych guzów o niższych stopniach złośliwości.

Tab. 13 Ogólna charakterystyka pacjentów z guzami glejowymi.

GUZY GLEJOWE		
Wiek (lata)	zakres	16-83
	średni	54
Płeć	mężczyźni	55
	kobiety	48
Klasyfikacja WHO	IV° WHO	60
	III° WHO	27
	II/III° WHO	1
	II° WHO	8
	I/II° WHO	1
	I° WHO	3
	brak danych	3

Tab. 14 Zestawienie stopnia złośliwości glejaków z płcią pacjentów.

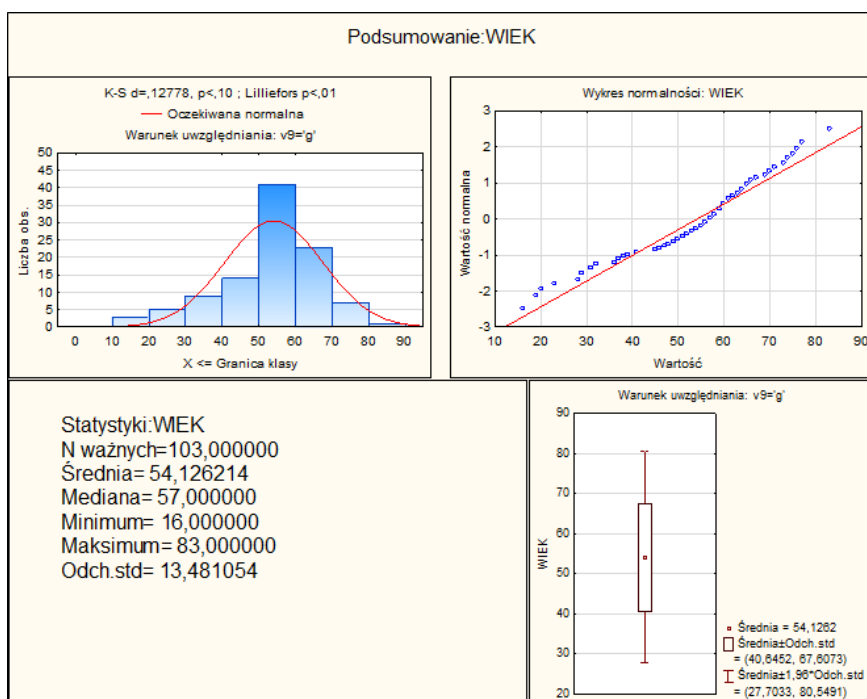
GUZY GLEJOWE		
	Kobiety	Mężczyźni
IV° WHO	30	30
III° WHO	13	14
II/III° WHO	1	0
II° WHO	2	6
I/II° WHO	1	0
I° WHO	1	2
*b.d.	0	3

\* b.d. – brak danych

Tab. 15 Zestawienie stopnia złośliwości glejaków z wiekiem pacjentów.

°WHO	WIEK				Razem
	<50	51-60	61-70	>70	
I	3	1	0	0	4
II	5	3	1	0	9
III	10	8	5	4	27
IV	13	27	16	4	60
Ogół	31	39	22	8	100*

\*Z powodu braku informacji o stopniu złośliwości próbek T55, T58 oraz T59 nie uwzględniono tych trzech pacjentów w niniejszej tabeli.



Ryc. 26 Dane statystyczne przedstawiające powiązanie wieku pacjentów z zapadalnością na guzy glejowe w badanej populacji.



Tab.16 Liczebność pacjentów w odniesieniu do grupy guzów glejowych.

ROZPOZNANIE HISTOPATOLOGICZNE (guzy glejowe)	Liczba Pacjentów	Odsetek
GBM	28	27,18%
Giant cell glioblastoma	2	1,94%
GBM recidivans	24	23,30%
Giant cell glioblastoma recidivans	1	0,97%
GBM recidivans z elementami PNET	1	0,97%
GBM recidivans, partim anaplastic astrocytoma	1	0,97%
Pierwotny glejowy nowotwór złośliwy	1	0,97%
Glioma anaplasticum NOS	1	0,97%
Glioma anaplasticum recidivans	1	0,97%
Neoplasma malignum anaplasticum	1	0,97%
Neoplasma malignum anaplasticum polymorphum	1	0,97%
Subependymal giant cell astrocytoma	1	0,97%
Astrocytoma fibrillare	2	1,94%
Astrocytoma fibrillare partim protoplasmaticum	1	0,97%
Astrocytoma fibrillare partim gemistocyticum	1	0,97%
Astrocytoma pilocyticum partim dedifferentiatum	1	0,97%
Anaplastic astrocytoma	19	18,45%
Astrocytoma pilocyticum	1	0,97%
Anaplastic astrocytoma recidivans	3	2,91%
Asytcytoma gemistocyticum	1	0,97%
Astrocytoma gemistocyticum in astrocytoma angioplasticum vertens	1	0,97%
Oligoastrocytoma anaplasticum	2	1,94%
Oligodendroglioma isomorphum	1	0,97%
Clear cell ependymoma	1	0,97%
Ganglioglioma	3	2,91%
Gliosarcoma	2	1,94%
Gliosarcoma recidivans	1	0,97%

## 1.2 Charakterystyka oponiaków

Analizie poddano 50 próbek pozyskanych od pacjentów z oponiakami sklasyfikowanymi jako I (oponiaki łagodne) lub II (oponiaki atypowe) stopień złośliwości w skali WHO. Ich dokładną charakterystykę kliniczną (wiek, płeć, rozpoznanie) przedstawiono w Tab.17 zamieszczonej w Aneksie do niniejszej pracy. Zdecydowaną większość (76%; 38/50) stanowiły guzy łagodne (I. stopnia), dwie próby oceniono na pograniczu I i II stopnia, a 10 zdiagnozowano jako guzy II. stopnia (guz atypowy). Niemal jedną czwartą próbek (24%; 12/50) stanowiły oponiaki włókniste (meningeoma fibrosum). Taki sam odsetek stanowiły oponiaki meningotelialne (meningeoma meningotheliale) i wraz z różnymi odmianami ten ostatni typ oponiaka stanowił największą analizowaną grupę. Najrzadszych, a jednocześnie najbardziej złośliwych oponiaków anaplastycznych nie analizowano w niniejszej pracy. Kobiety stanowiły 70% (35/50) badanej populacji, co odzwierciedla tendencję populacyjną. Średni wiek pacjentów wynosił 57 lat, a zakres wieku oscylował w granicach 31-87 lat. W obrębie kategorii wiekowych, najliczniej reprezentowana była kategoria 61-70 lat (32,5% 13/40 – pacjenci z I stopniem złośliwości w skali WHO) oraz kategorie do 60 lat (80%; 8/10 - pacjenci z II stopniem w skali WHO).

**Tab. 18** Ogólna charakterystyka pacjentów z oponiakami.

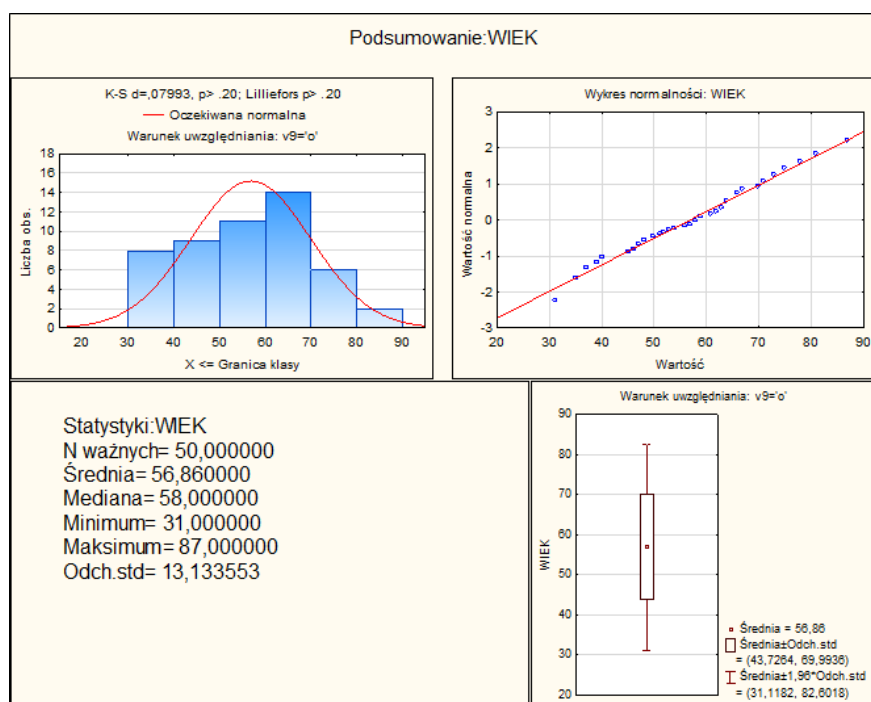
OPONIAKI		
Wiek (lata)	zakres	31-87
	średni	57
Płeć	mężczyźni	15
	kobiety	35
Klasyfikacja WHO	°IV WHO	0
	°III WHO	0
	°II/III WHO	0
	°II WHO	10
	°I/II WHO	2
	°I WHO	38
	brak danych	0

**Tab. 19** Zestawienie stopnia złośliwości oponiaków z płcią pacjentów

OPONIAKI		
	Kobiety	Mężczyźni
IV° WHO	0	0
III° WHO	0	0
II/III° WHO	0	0
II° WHO	2	8
I/II° WHO	2	0
I° WHO	31	7

**Tab. 20** Zestawienie stopnia złośliwości oponiaków z wiekiem pacjentów

°WHO	WIEK				Razem
	<50	51-60	61-70	>70	
I	13	7	13	7	40
II	4	4	1	1	10
Ogół	17	11	14	8	50



Ryc. 27 Dane statystyczne przedstawiające powiązanie wieku pacjentów z zapadalnością na oponiaki w badanej populacji.

Tab. 21 Liczebność pacjentów w odniesieniu do grupy oponiaków.

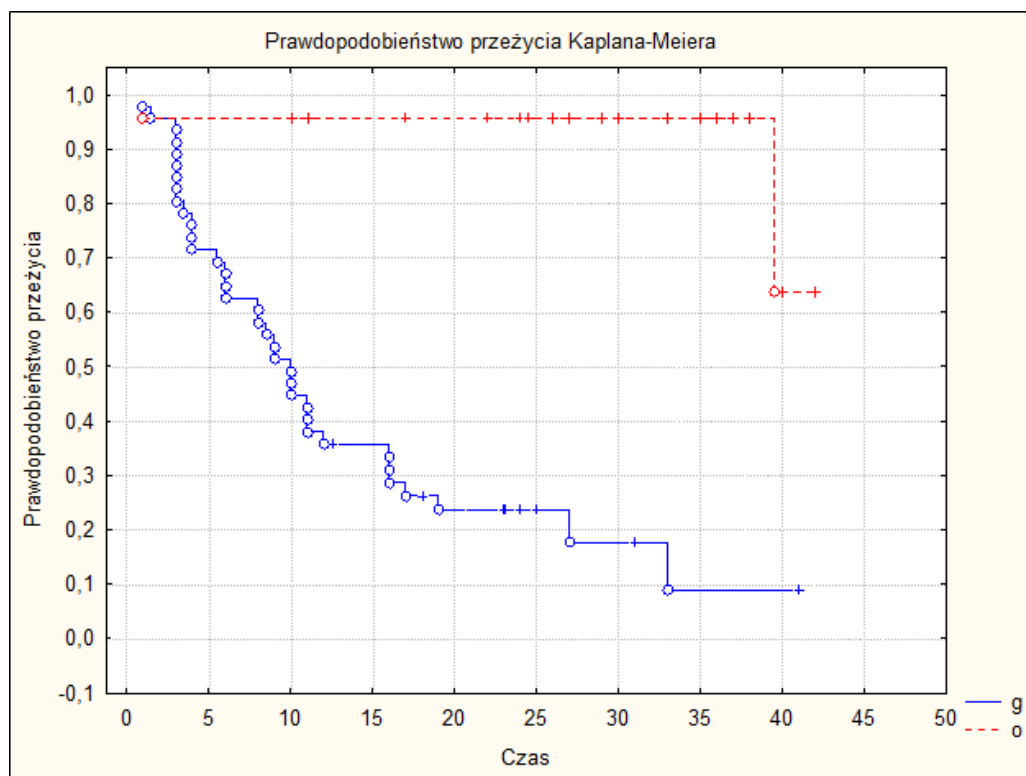
ROZPOZNANIE HISTOPATOLOGICZNE (oponiaki)	Liczba Pacjentów	Odsetek
Meningeoma fibrosum	12	24,00%
Meningeoma fibrosum psammomatousum	1	2,00%
Meningeoma transitionale	7	14,00%
Meningeoma angiomasum	2	4,00%
Meningeoma angiomasum, partim clarocellulare	1	2,00%
Meningeoma angiomasum recidivans, partim clarocellulare	1	2,00%
Meningeoma meningotheliale	12	24,00%
Meningeoma meningotheliale, partim cellulare	1	2,00%
Meningeoma meningotheliale, partim fibrosum partim cellulare	1	2,00%
Meningeoma meningotheliale, partim necroticans et psammomatousum	1	2,00%
Meningeoma meningotheliale, partim metaplasticum (xantomatosum) et psammomatousum	1	2,00%
Meningeoma meningotheliale, partim microcysticum	1	2,00%
Meningeoma meningotheliale psammomatousum	1	2,00%
Meningeoma meningotheliale psammomatousum, partim necroticans et hyalinisans	1	2,00%
Meningeoma meningotheliomasum, partim secretans et partim psammomatousum	1	2,00%
Meningeoma meningotheliomasum, partim oxyphylicum	1	2,00%
Meningeoma cellulare, partim microcysticum	1	2,00%
Meningeoma cellulare recidivans	2	4,00%
Meningeoma/Solitary fibrous tumor	1	2,00%
Meningeoma atypicum	1	2,00%

### 1.3 Dane na temat przeżycia pacjentów z glejakami i oponiakami oraz krzywe przeżycia Kaplana-Meiera

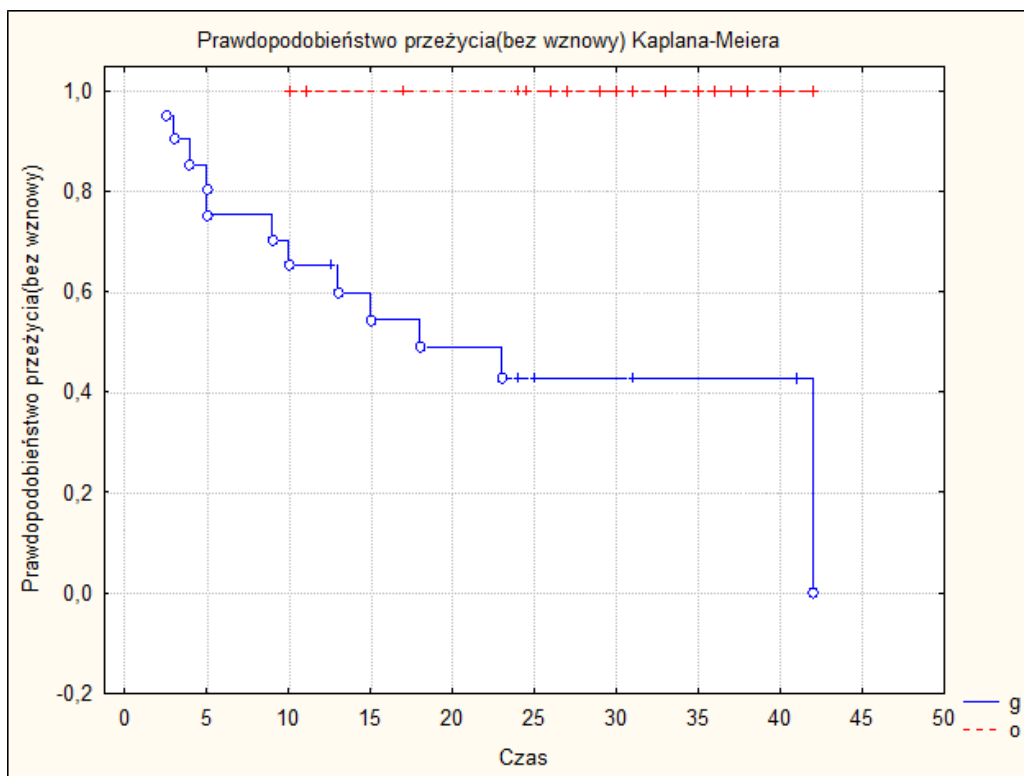
Dane na temat przeżycia pacjentów z guzami glejowymi dostępne były dla 49 osób, zaś z oponiakami dla 25 osób. Zestawiono je w Tab. 22 i 23 w Aneksie do niniejszej pracy.

Za pomocą testu Manna-Whitney'a stwierdzono istnienie statystycznie istotnej zależności pomiędzy °WHO pacjentów, a wznową ( $p=0,0008$ ) oraz °WHO pacjentów, a czasem po którym pojawia się wznowa ( $p=0,04$ ). Zatem wyższy °WHO wskazywał większe prawdopodobieństwo pojawienia się wznowy, oraz krótszy czas pomiędzy operacją, a wznową.

Sporządzono krzywe prawdopodobieństwa przeżycia Kaplana-Meiera (Ryc. 28). Uwzględniono również czas wolny od progresji, czyli okres pomiędzy pierwotną diagnozą, a pojawieniem się wznowy guza (Ryc. 29).



Ryc. 28 Prawdopodobieństwo przeżycia pacjentów z guzami glejowymi (linia niebieska) w porównaniu z oponiakami (linia czerwona). Czas podano w miesiącach.



Ryc. 29 Prawdopodobieństwo przeżycia bez wznowy pacjentów z guzami glejowymi (linia niebieska) w porównaniu z oponiakami (linia czerwona). Czas podano w miesiącach.

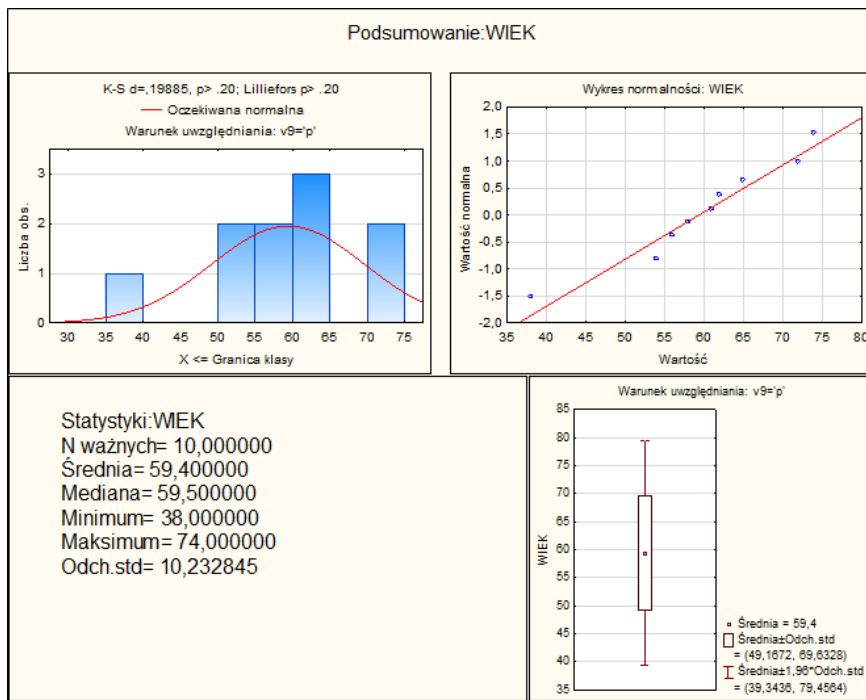
#### 1.4 Charakterystyka guzów przerzutowych

Populacja z guzami przerzutowymi obejmowała 10 pacjentów, u których guz pierwotny stanowił nowotwór płuca (u 7 pacjentów), piersi (2 pacjentki) lub czerniak (1 pacjent). Dane na temat stadium złośliwości guza przerzutowego do OUN nie były znane. Najmłodszy pacjent miał 38, a najstarszy 74 lata, natomiast średnia wieku wynosiła 59 lat. W niniejszej grupie kobiety stanowiły 30% (3/10), zaś mężczyźni 70% (7/10). Szczegółowe zestawienie analizowanych prób, wraz z charakterystyką demograficzną poszczególnych pacjentów, od których zostały pobrane zamieszczono w Aneksie do niniejszej pracy (Tab. 24)

Tab. 25 Ogólna charakterystyka pacjentów z guzami przerzutowymi.

GUZY PRZERZUTOWE		
Wiek (lata)	zakres	38-74
	średni	59
Płeć	mężczyźni	7
	kobiety	3
Klasyfikacja WHO		*b.d.

\*b.d. brak danych

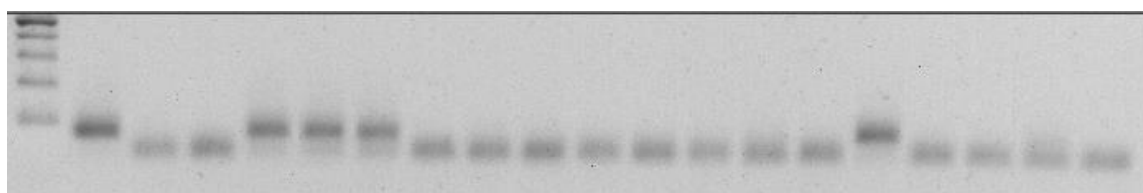


Ryc. 30 Dane statystyczne przedstawiające powiązanie wieku pacjentów, z przerzutami do OUN.

## 2. Profil zmian metylacji w nowotworach OUN uzyskany techniką MSP

Celem określenia profilu zmian metylacji w wybranym panelu genów, DNA wyizolowany z tkanek guzów pobranych od pacjentów operowanych z powodu nowotworów OUN, poddawano konwersji i reakcjom MSP z zastosowaniem starterów specyficznych dla tych genów. Szczegółowe wyniki analizy metylacji wszystkich genów wykonanej techniką MSP zamieszczone są w Aneksie do niniejszej pracy w Tab. 26 (wyniki analizy MSP dla guzów glejowych), oraz w Tab. 27 (wyniki dla oponiaków). Reakcję uznawano za przeprowadzoną prawidłowo, gdy: 1) próba kontrolna M (ang. *methylated*) dawała prążek odpowiedniej wielkości w reakcji ze starterami specyficznymi względem sekwencji zmetylowanej, a nie dawała produktu w reakcji ze starterami dla sekwencji niezmetrylowanej, 2) próba kontrolna U (ang. *unmethylated*), względnie B (ang. *brain*) dawała wynik przeciwny, tzn. prążek pojawiał się tylko w reakcji ze starterami rozpoznającymi sekwencję niezmetrylowaną, 3) próba BI (ang. *blank*) bez matrycy DNA nie dawała w obu reakcjach żadnego produktu.

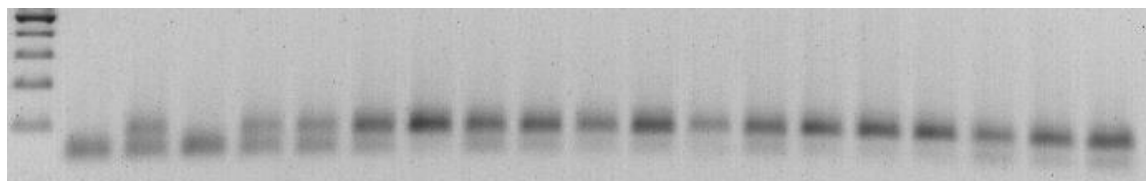
Na Ryc. 31 i 32 przedstawiono przykładowe elektroforegramy uzyskane tą techniką dla genu *MGMT*.



Wz M U BI T91 T13 T89 T55 T74 T18 T44 T7 T21 T45 T36 T39 T41 T19 T60 T59

Ryc. 31 Badanie metylacji obszaru promotorowego genu *MGMT* – Reakcja ze starterami specyficznymi względem sekwencji zmetylowanej. Objaśnienie skrótów: Wz – wzorec masy, M – DNA kontrolne, całkowicie zmetylowane, U – DNA

kontrolne całkowicie niezmetylowane, BI – próba śleba, pozbawiona matrycy DNA. Numery oznaczają kolejne próby. Prążek na wysokości odpowiadającej 81 pz wskazuje produkt amplifikacji badanej sekwencji promotorowej i świadczy o jej metylacji (numer próby pisany czcionką czerwoną). Prążki poniżej to dimery starterów.



93 pz →

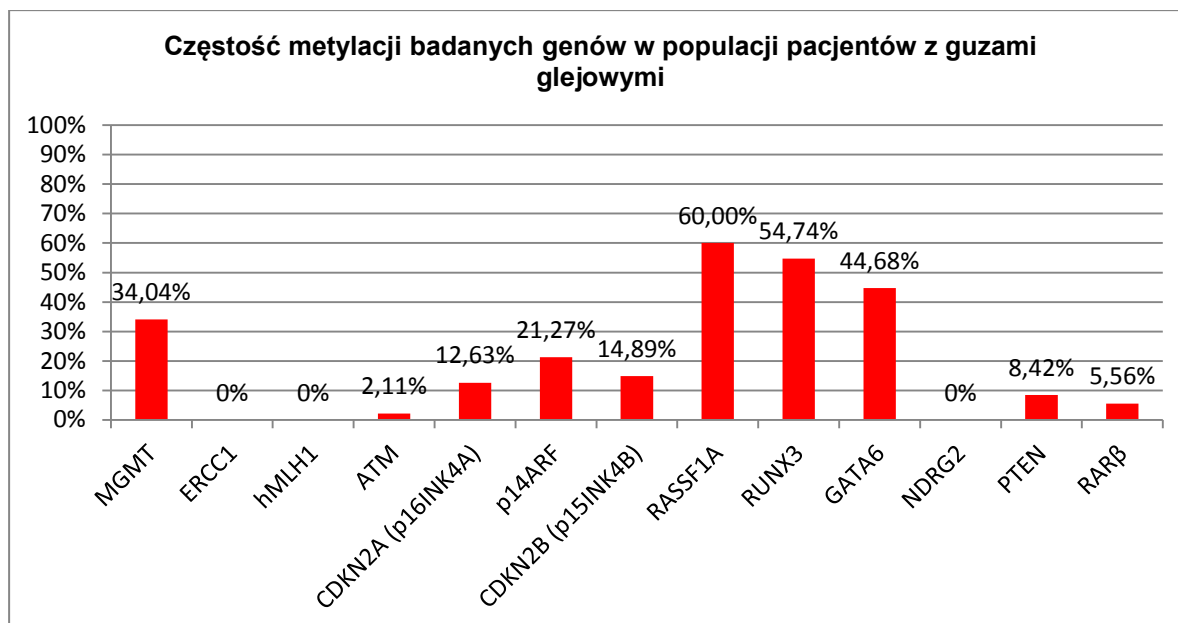
Wz M U BI T91 T13 T89 T55 T74 T18 T44 T7 T21 T45 T36 T39 T41 T19 T60 T59

**Ryc. 32 Badanie metylacji obszaru promotorowego genu *MGMT* – Reakcja ze starterami specyficznymi względem sekwencji niezmetylowanej.** Objaśnienie skrótów: Wz – wzorzec masy, M – DNA kontrolne, całkowicie zmetylowane, U – DNA kontrolne całkowicie niezmetylowane, BI – próba śleba, pozbawiona matrycy DNA. Numery oznaczają kolejne próby. Prążek na wysokości odpowiadającej 93 pz wskazuje produkt amplifikacji badanej sekwencji promotorowej i świadczy o braku metylacji (numer próby pisany czcionką niebieską). Prążki poniżej to dimery starterów.

## 2.1 Profil metylacji badanych genów w guzach glejowych

### 2.1.1 Ocena częstości metylacji genów w powiązaniu z klasyfikacją guzów wg WHO

Badaniu techniką MSP poddano 95 próbek guzów pochodzących od pacjentów z glejakami. Dziesięć spośród 13 badanych genów wykazywało metylację u co najmniej jednego pacjenta. Najczęściej zmetylowany okazał się gen *RASSF1A* - 60,00% (57/95) próbek, a kolejno *RUNX3* - 54,74% (52/95) i *GATA6* - 44,68% (42/94). Metylację genu *MGMT* stwierdzono w 34,04% prób badanych (32/94), *p14ARF* w 21,27% (20/94), *CDKN2B (p15INK4B)* w 14,89% (14/94), a *CDKN2A (p16INK4A)* w 12,63% (12/95). *ATM* zmetylowany był w zaledwie dwóch próbkach - 2,11% (2/95), natomiast brak metylacji we wszystkich próbkach badanych wykazywały geny *ERCC1* - 0% (0/95), *hMLH1* - 0% (0/95), oraz *NDRG2* - 0% (0/95). Oceny korelacji częstości metylacji poszczególnych genów w zależności od stopnia złośliwości wg klasyfikacji WHO dokonano na podstawie testu Fishera. Istotną korelację pomiędzy metylacją, a stopniem złośliwości guzów glejowych stwierdzono tylko dla *RUNX3* (Tab. 29).



Ryc. 33 Diagram ilustrujący częstość metylacji badanych genów w populacji pacjentów z guzami glejowymi.

Tab. 28 Zestawienie wyników reakcji MSP dla próbek guzów glejowych w powiązaniu z klasyfikacją WHO wraz z wynikami testu Fishera.

Gen	Procent zmetylowanych prób	Status metylacji	IV <sup>o</sup> WHO	III <sup>o</sup> WHO	II <sup>o</sup> WHO	I <sup>o</sup> WHO	Test Fishera
<b>MGMT</b>	<b>34,04% (32/94)</b>	<b>M</b>	20	8	2	0	p = 0,43
		<b>U</b>	35	15	7	4	
<b>ERCC1</b>	<b>0% (0/95)</b>	<b>M</b>	0	0	0	0	-
		<b>U</b>	56	23	9	4	
<b>hMLH1</b>	<b>0% (0/95)</b>	<b>M</b>	0	0	0	0	-
		<b>U</b>	56	23	9	4	
<b>ATM</b>	<b>2,11% (2/95)</b>	<b>M</b>	2	0	0	0	p = 0,99
		<b>U</b>	54	23	9	4	
<b>CDKN2A (p16INK4A)</b>	<b>12,63% (12/95)</b>	<b>M</b>	8	3	1	0	p = 0,9
		<b>U</b>	48	20	8	4	
<b>p14ARF</b>	<b>21,27% (20/94)</b>	<b>M</b>	12	4	3	0	p = 0,6
		<b>U</b>	43	19	6	4	
<b>CDKN2B (p15INK4B)</b>	<b>14,89% (14/94)</b>	<b>M</b>	9	1	2	1	p = 0,25
		<b>U</b>	46	22	7	3	
<b>RASSF1A</b>	<b>60,00% (57/95)</b>	<b>M</b>	33	15	6	1	p = 0,5
		<b>U</b>	23	8	3	3	
<b>RUNX3</b>	<b>54,74% (52/95)</b>	<b>M</b>	35	12	2	0	<b>p = 0,0173*</b>
		<b>U</b>	21	11	7	4	
<b>GATA 6</b>	<b>44,68% (42/94)</b>	<b>M</b>	28	8	1	2	p = 0,1
		<b>U</b>	27	15	8	2	
<b>NDRG2</b>	<b>0% (0/95)</b>	<b>M</b>	0	0	0	0	-
		<b>U</b>	56	23	9	4	
<b>PTEN</b>	<b>8,42% (8/95)</b>	<b>M</b>	5	2	1	0	p = 0,98
		<b>U</b>	51	21	8	4	
<b>RARβ</b>	<b>5,56% (5/90)</b>	<b>M</b>	3	1	1	0	p = 0,7
		<b>U</b>	48	22	8	4	



\*Kolorem czerwonym zaznaczono wartość statystycznie znamiennej.

## 2.1.2 Ocena współwystępowania metylacji badanych genów na podstawie współczynnika metylacji i jego powiązanie ze stopniem złośliwości guzów i wiekiem pacjentów

W celu oceny współwystępowania metylacji rejonów promotorowych analizowanych genów obliczono współczynnik metylacji (WM), będący ilorazem liczby zmetylowanych genów dla danej próby (x) do całkowitej liczby genów (13) poddanych analizie (x/13). Dane dla poszczególnych genów przedstawia Tab.29. Metylację obszaru promotorowego przynajmniej w jednym genie wykazywało 18,95% wszystkich prób badanych. Najwyższy zanotowany WM = 0,62 oznaczający wyciszenie 8 genów dotyczył 1,05% wszystkich prób. Wśród glejaków IV. stopnia wg WHO liczba zmetylowanych genów wahała się od 0 do 8, z czego najlichniesza grupa próbek (21,43%) wykazywała metylację 3 genów. Podobnie dla glejaków III stopnia w skali WHO, najlichnieszą (30,43%) grupę stanowiły próbki mające 3 zmetylowane geny. Glejaki niższych stopni miały znacząco niższą liczbę zmetylowanych genów, tym samym niższy współczynnik metylacji.

Tab. 29 Zestawienie liczby zmetylowanych genów u pacjentów z guzami glejowymi w powiązaniu ze stopniem złośliwości wg klasyfikacji WHO.

Liczba zmetylowanych genów	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9-13
Współczynnik metylacji [WM]	0	0,08	0,15	0,23	0,31	0,38	0,46	0,54	0,62	0,69-1
Glejaki wszystkich WHO [Σ95]	11,58%	18,95%	17,89%	23,16%*	15,79%	9,47%	2,11%	0,00%	1,05%	0,00%
Glejaki IV°WHO [Σ56]	8,93%	17,86%	17,86%	21,43%	19,64%	8,93%	3,57%	0,00%	1,79%	0,00%
Glejaki III°WHO [Σ23]	13,04%	13,04%	26,09%	30,43%	13,04%	4,35%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Glejaki II°/III°WHO [1]	100%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Glejaki II°WHO [8]	12,50%	37,50%	0,00%	25,00%	0,00%	25,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Glejaki I°/II°WHO [1]	0,00%	100%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Glejaki I°WHO [3]	33,33%	33,33%	33,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Ponieważ w żadnej z badanych prób nie stwierdzono metylacji więcej niż 8 genów (WM>0,62), wyniki dla 9-13 genów zebrano zbiorczo w jednej kolumnie. \*Kolorem czerwonym zaznaczono wartość statystycznie znamiennej.

Za pomocą korelacji porządku rang Spearmana dla każdego z pacjentów dokonano statystycznej analizy zależności pomiędzy współczynnikiem metylacji (WM), a stopniem złośliwości wg klasyfikacji WHO, jak również pomiędzy współczynnikiem metylacji (WM), a wiekiem. Stosując test t-Studenta do oceny istotności współczynnika korelacji R w obu przypadkach uzyskano znamienność statystyczną (odpowiednio p = 0,03 oraz p = 0,01; Tab. 30) Zatem wyższy współczynnik metylacji (WM), tym samym większa liczba zmetylowanych genów charakteryzował guzy bardziej złośliwe, jak również pacjentów o bardziej zaawansowanym wieku.

Tab. 30 Powiązanie współczynnika metylacji ze stopniem złośliwości guza i wiekiem pacjentów.

WSPÓŁCZYNNIK METYLACJI	Wartość p
WSPÓŁCZYNNIK METYLACJI & °WHO	0,03
WSPÓŁCZYNNIK METYLACJI & WIEK	0,01

### 2.1.3 Analiza wyników metylacji poszczególnych genów w powiązaniu z wiekiem pacjentów

Dokonano również analizy zależności pomiędzy wynikami metylacji dla poszczególnych genów, a wiekiem pacjentów w 4 kategoriach wiekowych (<50, 51-60, 61-70 oraz >70 lat). Poziomy istotności statystycznej p zestawiono w Tab. 31. Uzyskano znamienność statystyczną w przypadku genu *RUNX3*, dla którego % zmetylowanych prób relatywnie wzrastał w kolejnych grupach wiekowych, co obrazuje poniższa tabela (Tab. 32)

Tab. 31 Zależność pomiędzy wynikami metylacji poszczególnych genów, a wiekiem Pacjentów, w 4 kategoriach wiekowych, tj. <50, 51-60, 61-70 oraz >70 lat. W analizie uwzględniono tylko te geny, dla których częstość metylacji była >0%.

Metylacja vs. wiek pacjenta	
<i>MGMT</i>	p= 0,09
<i>ATM</i>	p= 0,65
<i>CDKN2A (p16INK4A)</i>	p= 0,31
<i>p14ARF</i>	p= 0,30
<i>CDKN2B (p15INK5B)</i>	p= 0,65
<i>RASSF1A</i>	p= 0,14
<i>RUNX3</i>	p= 0,03*
<i>GATA 6</i>	p= 0,50
<i>PTEN</i>	p= 0,56
<i>RARβ</i>	p= 0,42

\*Kolorem czerwonym zaznaczono wartość statystycznie znamiennej.

Tab. 32 Rozkład wyników metylacji dla genu *RUNX3* w poszczególnych grupach wiekowych

Wyniki metylacji <i>RUNX3</i> w powiązaniu z wiekiem pacjentów					
Wynik MSP	WIEK				Razem
	<50	51-60	61-70	>70	
M	12	19	15	6	52
U	17	20	5	1	43
Ogół	29	39	20	7	95

#### 2.1.4 Analiza wyników metylacji poszczególnych genów w powiązaniu z płcią pacjentów

Analiza wyników metylacji w powiązaniu z płcią (analiza Chi-kwadrat oraz określenie współczynnika korelacji Pearsona) wykazała, iż w populacji glejaków metylacja poszczególnych genów nie jest powiązana z płcią pacjentów.

Tab. 33 Zestawienie wyników metylacji z płcią pacjentów.

Metylacja vs. płeć pacjenta	
<i>MGMT</i>	p= 0,47
<i>ATM</i>	p= 0,92
<i>CDKN2A (p16INK4A)</i>	p= 0,13
<i>p14ARF</i>	p= 0,16
<i>CDKN2B (p15INK5B)</i>	p= 0,08
<i>RASSF1A</i>	p= 0,80
<i>RUNX3</i>	p= 0,11
<i>GATA 6</i>	p= 0,55
<i>PTEN</i>	p= 0,60
<i>RARβ</i>	p= 0,79

#### 2.1.5 Ocena korelacji metylacji regionów promotorowych poszczególnych genów z rozpoznaniem histopatologicznym

Analiza testem Chi-kwadrat, w obrębie 5 największych liczebnie podtypów glejaków, tj. GBM, GBM recidivans, anaplastic astrocytoma, anaplastic astrocytoma recidivans oraz astrocytoma fibrillare nie wykazała metylacji specyficznej dla żadnego z nich i tym samym możliwości ich rozróżniania. Wartość p na podstawie testu Kruskala-Wallisa dla zależności rozpoznanie vs. WM wynosiła p = 0,40. Nie stwierdzono zatem powiązania WM, a tym samym liczby zmetylowanych genów z rozpoznaniem histopatologicznym.

Tab. 34 Analiza powiązania metylacji poszczególnych genów z rozpoznaniem histopatologicznym

Rozpoznanie histopatologiczne vs. metylacja	
<i>MGMT</i>	p= 0,65
<i>ATM</i>	p= 0,47
<i>CDKN2A (p16INK4A)</i>	p= 0,80
<i>p14ARF</i>	p= 0,56
<i>CDKN2B (p15INK5B)</i>	p= 0,45
<i>RASSF1A</i>	p= 0,98
<i>RUNX3</i>	p= 0,23
<i>GATA 6</i>	p= 0,23
<i>PTEN</i>	p= 0,59
<i>RARβ</i>	p= 0,34

Dokonano również analizy porównawczej dwóch grup pacjentów z rozpoznaniem GBM i GBM recidivans (glejak wielopostaciowy względem jego wznowa) oraz anaplastic astrocytoma versus anaplastic astrocytoma recidivans (gwiazdzia anaplastyczny versus jego wznowa), pod względem metylacji poszczególnych genów. Nadmienić należy, iż próbki guza pierwotnego i wznowy pochodziły od różnych pacjentów. Celem tej analizy było sprawdzenie, czy metylacja któregoś z genów różnicuje dwie w/w grupy. Wykazano brak statystycznie istotnych zależności. Przy przyjęciu za statystycznie istotny poziomu  $p < 0,05$ , żaden z genów nie rozróżniał tych guzów. Wyniki testu Chi-Kwadrat przedstawiono w Tab. 35 i 36.

**Tab. 35 Analiza powiązania metylacji poszczególnych genów w dwóch typach GBM.**

<b>GBM vs. GBM recidivans</b>	
<i>MGMT</i>	$p = 0,75$
<i>ATM</i>	$p = 0,16$
<i>CDKN2A (p16INK4A)</i>	$p = 0,51$
<i>p14ARF</i>	$p = 0,38$
<i>CDKN2B (p15INK5B)</i>	$p = 0,17$
<i>RASSF1A</i>	$p = 0,82$
<i>RUNX3</i>	$p = 0,14$
<i>GATA 6</i>	$p = 0,69$
<i>PTEN</i>	$p = 0,19$
<i>RARβ</i>	$p = 0,11$

**Tab. 36 Analiza powiązania metylacji poszczególnych genów w dwóch typach gwiazdziaaków.**

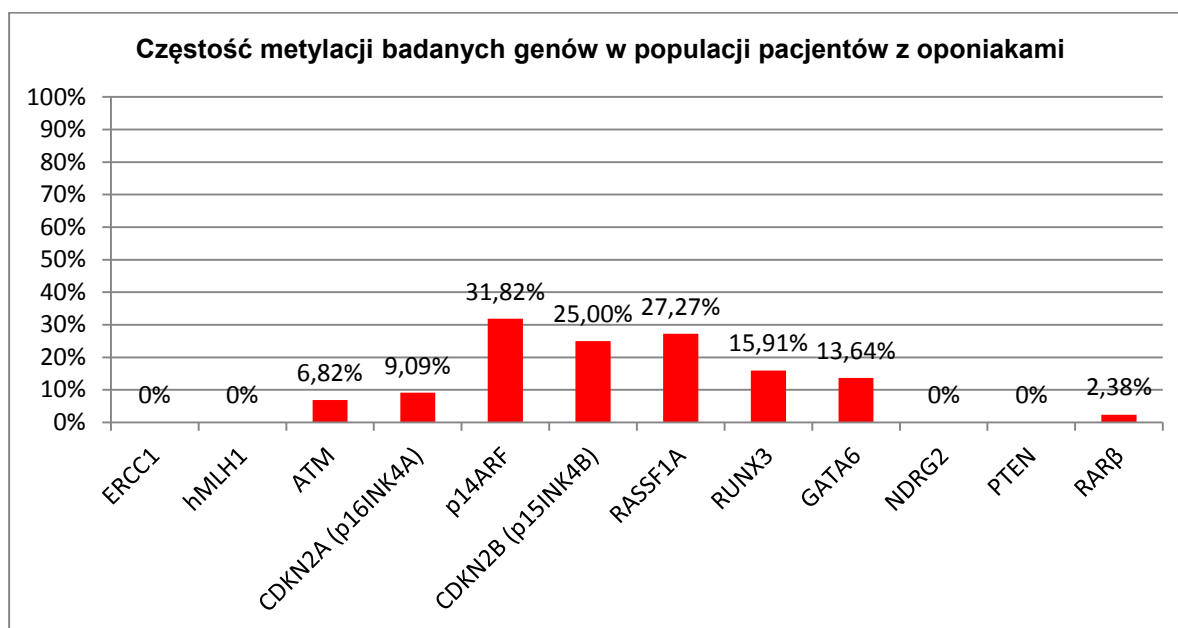
<b>Anaplastic astrocytoma vs. anaplastic astrocytoma recidivans</b>	
<i>MGMT</i>	$p = 0,99$
<i>CDKN2A (p16INK4A)</i>	$p = 0,50$
<i>p14ARF</i>	$p = 0,31$
<i>CDKN2B (p15INK5B)</i>	$p = 0,65$
<i>RASSF1A</i>	$p = 0,67$
<i>RUNX3</i>	$p = 0,28$
<i>GATA 6</i>	$p = 0,28$
<i>PTEN</i>	$p = 0,65$
<i>RARβ</i>	$p = 0,65$

## 2.2 Profil metylacji badanych genów w oponiakach

### 2.2.1 Ocena częstości metylacji genów w powiązaniu z klasyfikacją guzów wg WHO

Analizie MSP poddano 44 oponiaki. Osiem spośród 12 badanych genów wykazywało metylację u co najmniej jednego pacjenta (Ryc.34). Najczęściej zmetylowany okazał się supresor *p14ARF* - zmetylowany w 31,82% (14/44) próbek, a kolejno *RASSF1A* w 27,27% (12/44) i *CDKN2B (p15INK4B)*

w 25,00% (11/44). Kolejne najczęściej zmetylowane geny to czynniki transkrypcyjne *RUNX3* i *GATA6*, zmetylowane odpowiednio u 15,91% (7/44) oraz 13,64% (6/44) pacjentów. Metylację genu *CDKN2A* (*p16INK4A*) stwierdzono w 9,09% prób badanych (4/44), *ATM* w 6,82% (3/44), natomiast *RARβ* w 2,38% (1/42). Brak metylacji we wszystkich próbkach badanych wykazywały geny *ERCC1* - 0% (0/44), *hMLH1* - 0% (0/44), oraz *NDRG2* - 0% (0/44) i *PTEN* – 0% (0/44). Oceny korelacji częstości metylacji poszczególnych genów w zależności od stopnia złośliwości wg skali WHO dokonano na podstawie testu Fishera (Tab. 37). Istotna statystycznie okazała się korelacja pomiędzy metylacją *RUNX3*, a stopniem złośliwości oponiaków (stopień II względem stopnia I i I/II w skali WHO), wskazując, że guzy bardziej złośliwe charakteryzuje częstsza metylacja tego genu.



Ryc. 34 Diagram ilustrujący częstość metylacji badanych genów w populacji pacjentów z oponiakami.

Tab. 37 Zestawienie wyników reakcji MSP dla próbek oponiaków w powiązaniu z klasyfikacją WHO wraz z wynikami testu Fishera.

Gen	Procent zmetylowanych prób	Status metylacji	II <sub>0</sub> WHO	I <sub>0</sub> /II <sub>0</sub> WHO	I <sub>0</sub> WHO	Test Fishera
<i>ERCC1</i>	0% (0/44)	M	0	0	0	-
		U	9	2	33	
<i>hMLH1</i>	0% (0/44)	M	0	0	0	-
		U	9	2	33	
<i>ATM</i>	6,82% (3/44)	M	0	0	3	p = 0,99
		U	9	2	30	
<i>CDKN2A (p16INK4A)</i>	9,09% (4/44)	M	1	0	3	p = 0,74
		U	8	2	30	
<i>p14ARF</i>	31,82% (14/44)	M	4	1	9	p = 0,38
		U	5	1	24	
<i>CDKN2B (p15INK4B)</i>	25,00% (11/44)	M	3	0	8	p = 0,82
		U	6	2	25	
<i>RASSF1A</i>	27,27% (12/44)	M	5	0	7	p = 0,15
		U	4	2	26	
<i>RUNX3</i>	15,91% (7/44)	M	5	0	5	p = 0,03*
		U	4	2	28	
<i>GATA 6</i>	13,64% (6/44)	M	0	0	6	p = 0,49
		U	9	2	27	
<i>NDRG2</i>	0% (0/44)	M	0	0	0	-
		U	9	2	33	
<i>PTEN</i>	0% (0/44)	M	0	0	0	-
		U	9	2	33	
<i>RARβ</i>	2,38% (1/42)	M	1	0	0	p = 0,2
		U	6	2	33	

\*Kolorem czerwonym zaznaczono wartość statystycznie znamiennej.

### 2.2.2 Ocena współwystępowania metylacji badanych genów na podstawie współczynnika metylacji (WM) i jego powiązanie ze stopniem złośliwości guzów i wiekiem pacjentów

Analiza metylacji wykazała w 34,09% wszystkich prób badanych metylację obszaru promotowego przynajmniej w jednym genie. Najliczniejszy wariant współwystępowania statusu metylacji WM = 0,33 oznaczający wyciszenie 4 genów dotyczył 2,27% wszystkich prób. Wśród oponiaków I stopnia złośliwości w skali WHO liczba zmetylowanych genów wahała się od 0 do 3. Ponad połowa oponiaków II stopnia w skali WHO miała zmetylowany 1 gen.

Tab. 38 Zestawienie liczby zmetylowanych genów u pacjentów z guzami glejowymi w powiązaniu ze stopniem złośliwości wg klasyfikacji WHO.

Liczba zmetylowanych genów	0	1	2	3	4	5-12
Współczynnik metylacji [WM]	0	0,08	0,17	0,25	0,33	0,42-1
Oponiaki wszystkich °WHO [Σ44]	25,00%	34,09%*	27,27%	11,36%	2,27%	0,00%
Oponiaki w II°WHO [9]	0,00%	55,56%	22,22%	11,11%	11,11%	0,00%
Oponiaki w I°/II° WHO [2]	50,00%	50,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Oponiaki w I°WHO [33]	30,30%	27,27%	30,30%	12,12%	0,00%	0,00%

Ponieważ w żadnej z badanych prób nie stwierdzono metylacji więcej niż 4 genów (WM>0,33), wyniki dla 5-12 genów zebrano zbiorczo w jednej kolumnie. \*Kolorem czerwonym zaznaczono wartość statystycznie znamiennej.

Za pomocą korelacji porządku rang Spearmana dla każdego z pacjentów dokonano statystycznej analizy zależności pomiędzy współczynnikiem metylacji (WM), a stopniem złośliwości wg klasyfikacji WHO, jak również pomiędzy współczynnikiem metylacji (WM), a wiekiem. Istotność współczynnika korelacji R badano testem t Studenta. W obu przypadkach nie uzyskano znamienności statystycznej (odpowiednio p = 0,28 oraz p = 0,40). Szczegółowe wyniki tej analizy przedstawiono w Tab. 39.

Tab. 39 Powiązanie WM ze stopniem złośliwości guza i wiekiem pacjentów.

WSPÓŁCZYNNIK METYLACJI	Wartość p
WSPÓŁCZYNNIK METYLACJI & °WHO	0,28
WSPÓŁCZYNNIK METYLACJI & WIEK	0,40

### 2.2.3 Analiza wyników metylacji poszczególnych genów w powiązaniu z wiekiem pacjentów

Dokonano analizy zależności pomiędzy wynikami metylacji dla poszczególnych genów, a wiekiem pacjentów w 4 kategoriach wiekowych (<50, 51-60, 61-70 oraz >70 lat). Poziomy istotności statystycznej p zestawiono w Tab 41. Nie uzyskano znamienności statystycznej dla żadnego z analizowanych genów.

Tab. 40 Zależność pomiędzy metylacją poszczególnych genów, a wiekiem pacjentów. W analizie uwzględniono tylko te geny, dla których częstość metylacji była >0%.

Metylacja vs. wiek Pacjenta	
ATM	p= 0,14
CDKN2A (p16INK4A)	p= 0,47
p14ARF	p= 0,58
CDKN2B (p15INK5B)	p= 0,46
RASSF1A	p= 0,36
RUNX3	p= 0,66
GATA 6	p= 0,57
RARB	p= 0,19

## 2.2.4 Analiza wyników metylacji poszczególnych genów w powiązaniu z płcią pacjentów

Analiza wyników metylacji w powiązaniu z płcią (analiza Chi-kwadrat oraz określenie współczynnika korelacji Pearsona – Tab.41) wykazała, iż w populacji oponiaków gen *RASSF1A* jest relatywnie częściej zmetylowany u mężczyzn aniżeli u kobiet ( $p = 0,04$ ). Metylacja pozostałych genów nie jest powiązana z płcią pacjentów. W Tab. 42 przedstawiono szczegółowe dane liczbowe na temat tego genu.

Tab. 41 Zestawienie wyników metylacji z płcią pacjentów.

Metylacja vs. płeć pacjenta	
<i>ATM</i>	$p = 0,26$
<i>CDKN2A (p16INK4A)</i>	$p = 0,89$
<i>p14ARF</i>	$p = 0,95$
<i>CDKN2B (p15INK5B)</i>	$p = 0,96$
<i>RASSF1A</i>	$p = 0,04^*$
<i>RUNX3</i>	$p = 0,51$
<i>GATA 6</i>	$p = 0,51$
<i>RARβ</i>	$p = 0,20$

\*Kolorem czerwonym zaznaczono wartość statystycznie znamiennej.

Tab. 42 Zależność metylacji *RASSF1A* od płci pacjenta.

Wyniki metylacji <i>RASSF1A</i> w powiązaniu z płcią pacjentów			
Wynik MSP	PŁEĆ		
	Kobieta	Mężczyzna	Razem
M	6	6	12
U	25	6	31
Ogół	31	12	43

## 2.3 Porównanie wyników analizy metylacji metodą MSP w populacjach glejaków i oponiaków

Stwierdzono znamiennej statystycznie różnicę pomiędzy wartością średniego współczynnika metylacji (WM) dla guzów glejowych i oponiaków ( $p = 0,004$ ). Guzy glejowe wykazywały wyższy WM aniżeli oponiaki. Metylacja genów *RASSF1A*, *RUNX3*, *GATA6* oraz *PTEN* w sposób istotny statystycznie różnicowała guzy glejowe od oponiaków. Glejaki wykazywały istotnie częstsza metylację tych genów.



Tab. 43 Porównanie metylacji wybranych genów w glejakiach i oponiakach. Kolorem czerwonym zaznaczono różnice statystycznie znamienne.

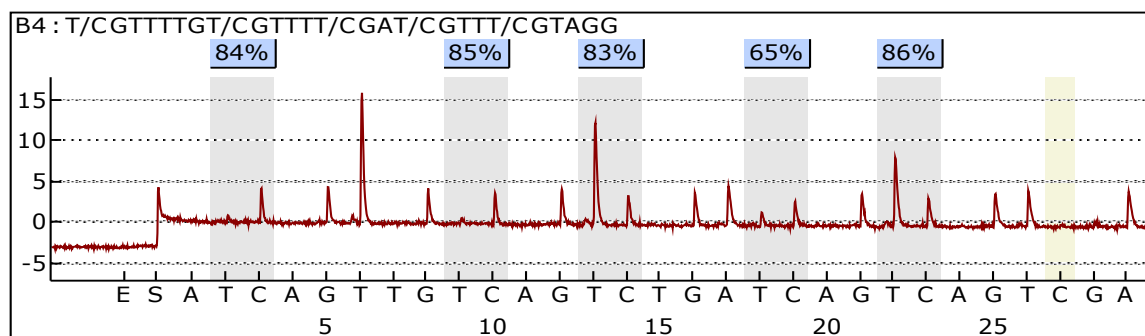
Wyniki MSP glejaki vs. oponiaki	
Gen	Wartość p
<i>ATM</i>	p= 0,16
<i>CDKN2A (p16INK4A)</i>	p= 0,57
<i>p14ARF</i>	p= 0,29
<i>CDKN2B (p15INK5B)</i>	p= 0,26
<i>RASSF1A</i>	p= 0,0005*
<i>RUNX3</i>	p= 0,000007
<i>GATA 6</i>	p= 0,002
<i>PTEN</i>	p= 0,05
<i>RARβ</i>	p= 0,72

\*Kolorem czerwonym zaznaczono wartość statystycznie zmienną.

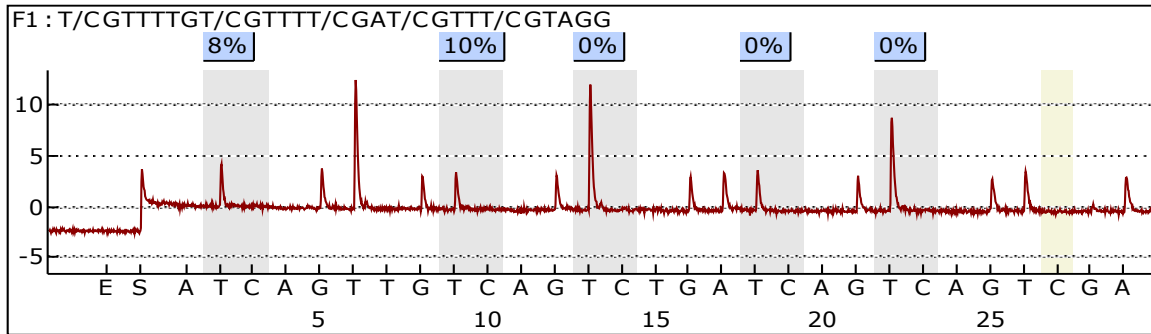
### 3. Ocena metylacji genów *MGMT* i *NDRG2* w nowotworach OUN uzyskanej techniką pirosekwencjonowania

W celu zweryfikowania wyników uzyskanych techniką MSP w odniesieniu do *MGMT* oraz *NDRG2* przeprowadzono szczegółową analizę metylacji 5 dinukleotydów CpG w promotorach tych genów na drodze pirosekwencjonowania.

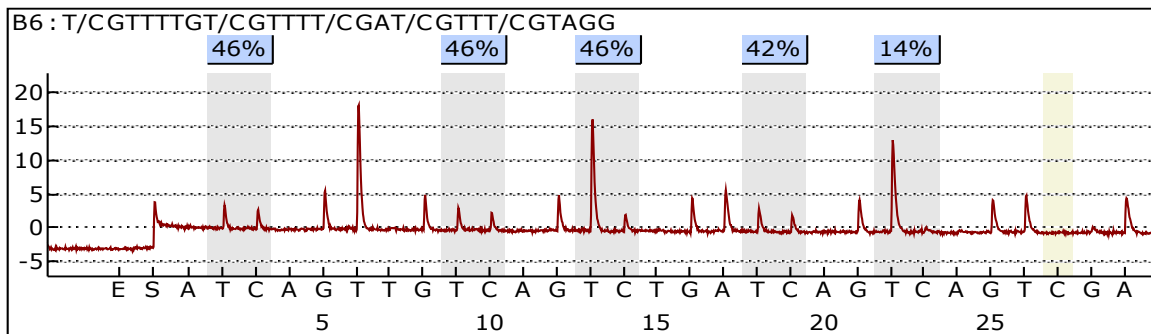
Ryc. 35 – 40 przedstawiają przykładowe pirogramy uzyskane w wyniku analizy DNA tkanki nowotworowej.



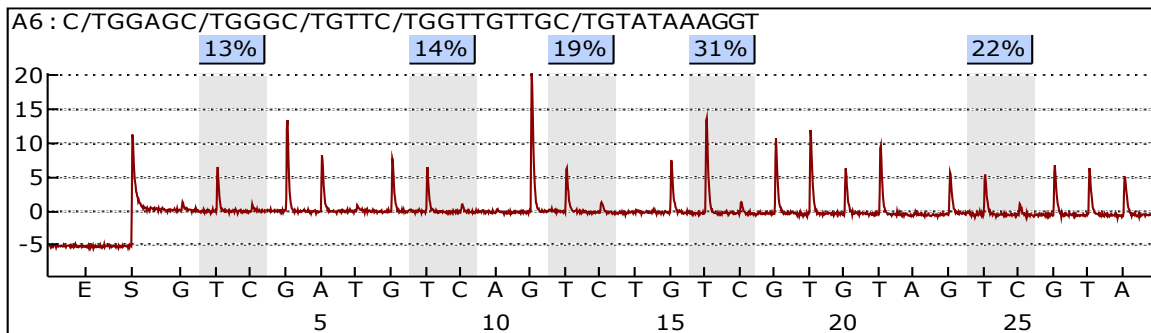
Ryc. 35 Pirogram dla obszaru promotorowego genu *MGMT* próby T72 – anaplastic astrocytoma.



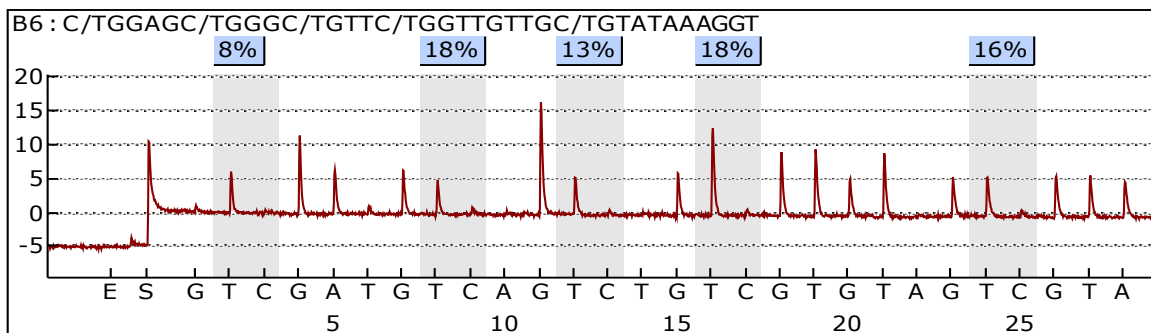
Ryc. 36 Pirogram dla obszaru promotorowego genu *MGMT* próby T67 - anaplastic astrocytoma.



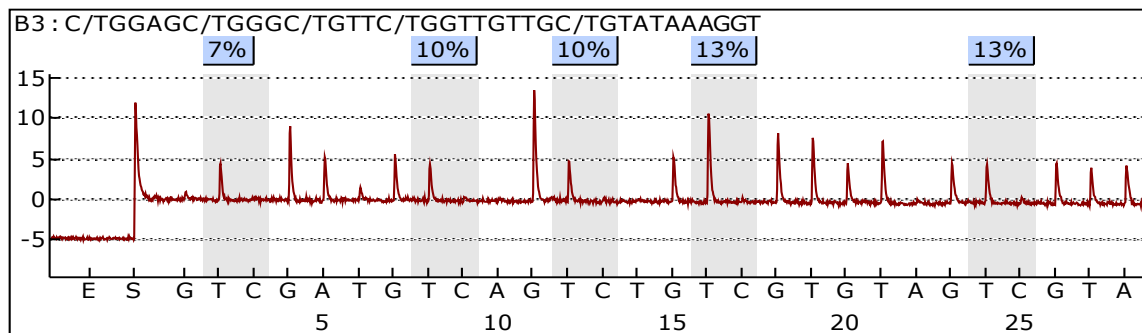
Ryc. 37 Pirogram dla obszaru promotorowego genu *MGMT* próby T10 – GBM.



Ryc. 38 Pirogram dla obszaru promotorowego genu *NDRG2* próby T66 – Astrocytoma pilocyticum partim dedifferentiatum.



Ryc. 39 Pirogram dla obszaru promotorowego genu *NDRG2* próby T3 – GBM.



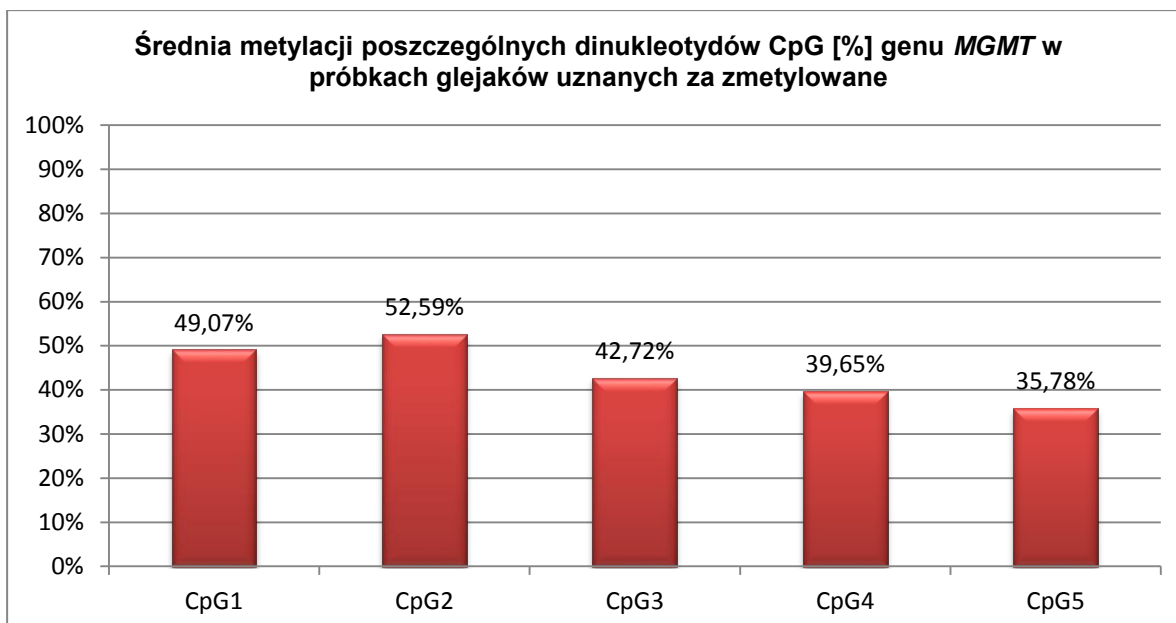
Ryc. 40 Pirogram dla obszaru promotorowego genu *NDRG2* próby T53 – Giant cel glioblastoma recidivans.

### 3.1 Analiza wyników metylacji *MGMT* na podstawie reakcji pirosekwencjonowania – guzy glejowe

Szczegółowe wyniki analizy metylacji *MGMT* wykonanej techniką pirosekwencjonowania dla glejaków przedstawione są w Tab. 44 zamieszczonej w Aneksie do niniejszej pracy.

#### 3.1.1 Ocena częstości metylacji *MGMT*

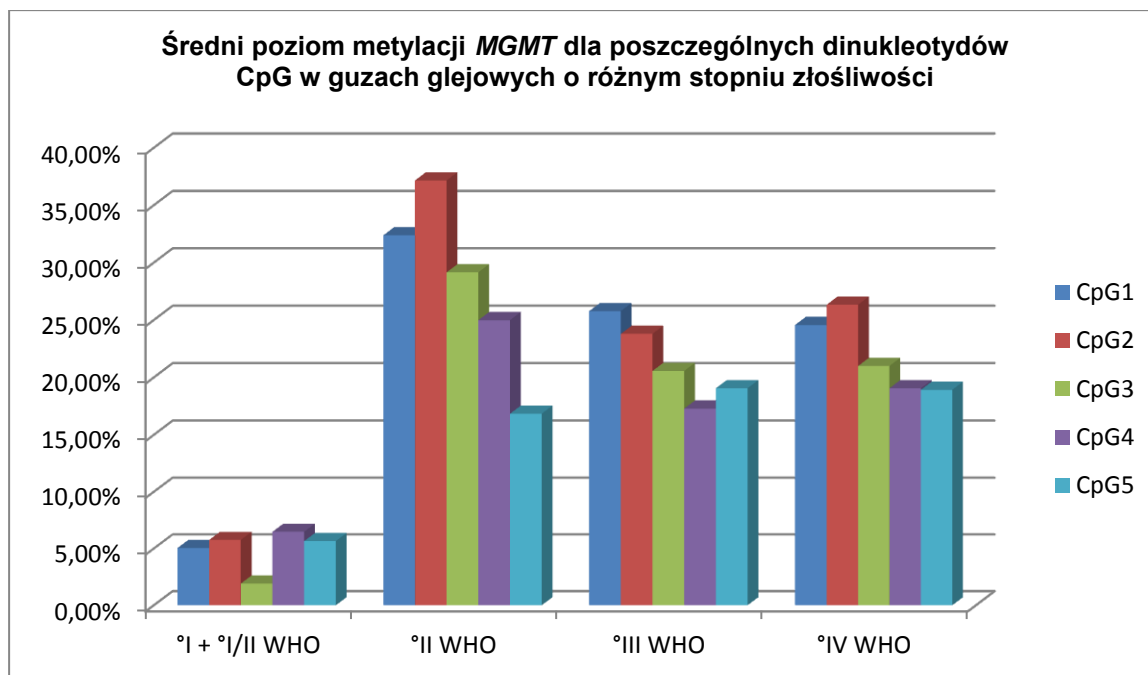
Badaniu poddano próbki guzów od 91 pacjentów z glejakami, z czego 55 stanowiły guzy IV° WHO, 22 II° WHO, 7 III° WHO, 1 I/II° WHO, 3 I° WHO oraz 3 nie były przyporządkowane do żadnego ze stopni złośliwości wg klasyfikacji WHO. Przyjmując jako wartość graniczną średniej metylacji pięciu CpG wynik 12%, stwierdzono, że 39 pacjentów miało zmetylowany gen *MGMT*, natomiast 52 wykazywało brak metylacji tego genu. Zatem odsetek pacjentów wykazujących metylację wynosił 42,86% (39/91). Najniższy średni poziom metylacji pięciu CpG reprezentowała próbka T17, od pacjenta z GBM - 12,11%, natomiast najwyższy próbka T58 – Neoplasma malignum anaplasticum (prawdopodobnie złośliwy glejak), wykazująca metylację na poziomie 86,27%. Uśrednione wartości metylacji w grupie pacjentów u których stwierdzono metylację tego genu wynosiły dla kolejnych dinukleotydów CpG1-CpG5 odpowiednio 49,07%, 52,59%, 42,72%, 39,65% oraz 35,78%. Zatem najwyższy poziom metylacji charakteryzował dinukleotyd CpG2, natomiast najniższy dinukleotyd CpG5. Zależność ta przedstawiona jest na Ryc. 41.



**Ryc. 41** Uśredniona wartość procentowa metylacji pięciu kolejnych dinukleotydów CpG genu *MGMT* obliczona dla próbek uznanych za zmetylowane.

### 3.1.2 Ocena korelacji metylacji *MGMT* ze stopniem złośliwości, wiekiem oraz płcią pacjentów

Dla guzów glejowych I stopnia w skali WHO średni poziom metylacji wszystkich badanych CpG wynosił 4,97%, co zgodnie z klasyfikacją binarną uznać by trzeba za próbki o niezmetrylowanym statusie *MGMT*, podczas gdy dla guzów bardziej złośliwych wartości te były bardzo zbliżone i wynosiły odpowiednio 28,11%, 21,31% oraz 22,07% dla II, III oraz IV stopnia wg klasyfikacji WHO. Analiza statystyczna uwzględniająca wartości metylacji w kolejnych dinukleotydach CpG nie wykazała jednak istnienia statystycznie istotnych różnic w poziomach metylacji dla poszczególnych dinukleotydów CpG w odniesieniu do guzów różnych stopni złośliwości, co najprawdopodobniej wynikało z małej liczby prób w poszczególnych grupach (Ryc. 42, Tab. 45).



Ryc. 42 Porównanie średnich wartości procentowych metylacji pięciu kolejnych dinukleotydów CpG genu *MGMT* pacjentów z guzami glejowymi o różnym stopniu złośliwości wg klasyfikacji WHO.

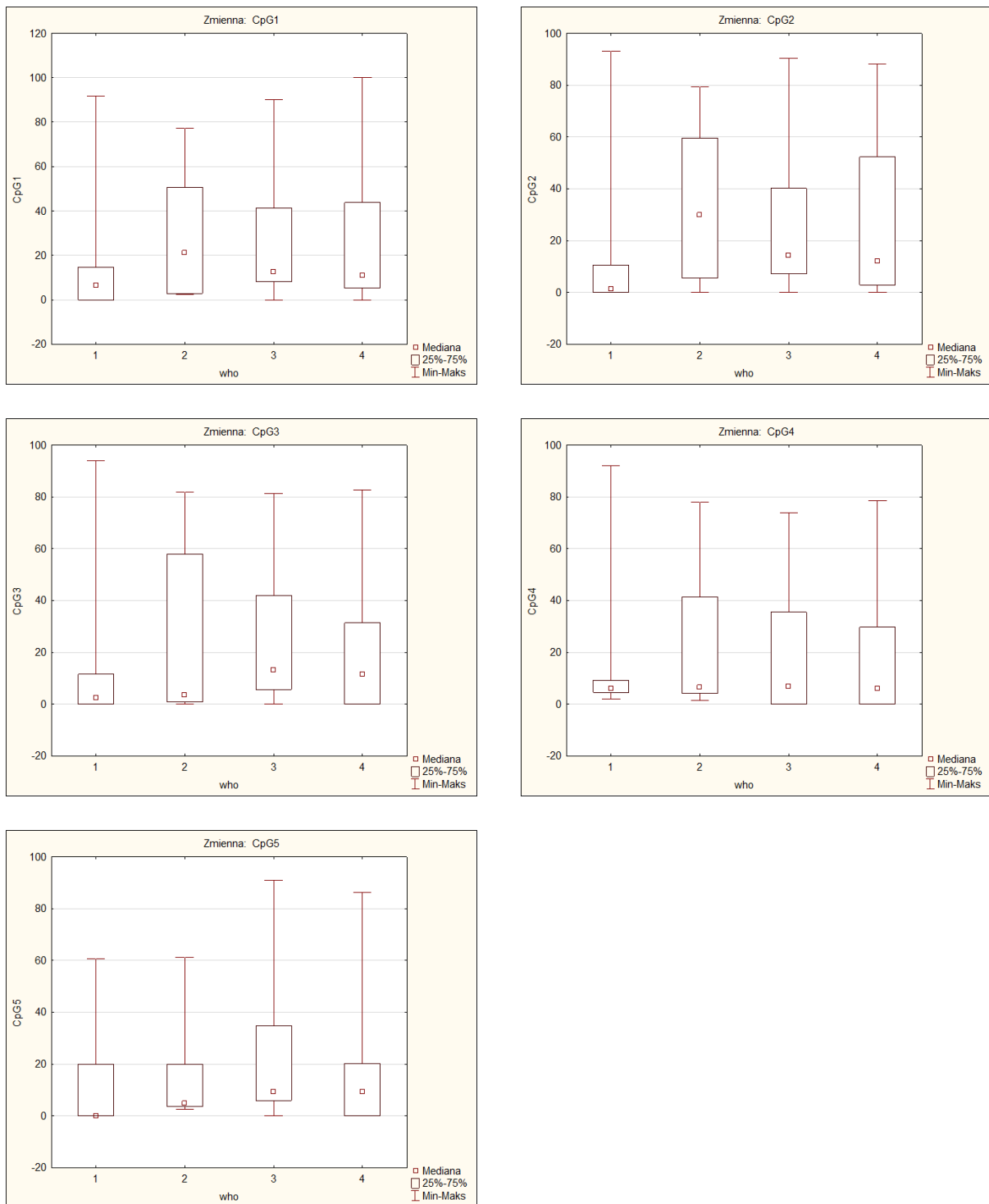
Tab. 45 Średnie poziomy metylacji pięciu dinukleotydów CpG w glejakiach o różnym stopniu złośliwości.

°WHO	Liczba prób	Średni poziom metylacji we wszystkich badanych CpG
I° i I°/II° WHO	4	4,97% ± 1,78
II° WHO	7	28,11% ± 7,71
III° WHO	22	21,31% ± 3,46
IV° WHO	55	22,07% ± 3,31

Wartości p obliczone na podstawie testu Kruskala-Wallisa przedstawiające zależność pomiędzy metylacją w poszczególnych dinukleotydach CpG, a klasyfikacją WHO przedstawia Tab. 46 oraz Ryc. 43.

Tab. 46 Porównanie wyników metylacji w poszczególnych dinukleotydach CpG genu *MGMT*, ze stopniem złośliwości w skali WHO pacjentów z glejakiemi.

CpG	Wartość p
CpG1	p = 0,54
CpG2	p = 0,39
CpG3	p = 0,55
CpG4	p = 0,78
CpG5	p = 0,53
Średnia ze wszystkich CpG	p = 0,55



**Ryc. 43** Zależności między metylacją *MGMT* w poszczególnych dinukleotydach CpG, a stopniem złośliwości glejaków. Każda kolejna rycina przedstawia jeden dinukleotyd. Środkowy kwadracik wskazuje medianę, duży kwadrat określa 25-75 centyl, a „wąsy” wskazują wartość najwyższego i najniższego wyniku. Cyfry arabskie na osi odciętych: 1, 2, 3, oraz 4 oznaczają odpowiednio I, II, III, oraz IV stopień złośliwości wg WHO.

Korzystając z testu Kruskala-Wallisa dokonano również analizy zależności metylacji w poszczególnych dinukleotydach CpG od wieku pacjentów i ustalono, że poziom metylacji *MGMT* w

dinukleotydy CpG3 oraz CpG4 był skorelowany z wiekiem pacjentów z guzami glejowymi i. wzrastał wraz z wiekiem pacjentów. Szczegółowe zestawienie danych z obliczeń statystycznych przedstawia Tab. 47)

**Tab. 47 Porównanie metylacji w poszczególnych dinukleotydach CpG z wiekiem pacjentów.**

CpG	Wartość p
CpG1	p = 0,10
CpG2	p = 0,15
CpG3	p = 0,01*
CpG4	p = 0,05
CpG5	p = 0,12
Średnia ze wszystkich CpG	p = 0,24

\*Kolorem czerwonym zaznaczono wartość statystycznie znamioną.

Analiza statystyczna wyników na podstawie testu U Manna-Whitney'a (Tab. 48) wykazała natomiast, że wartość procentowa metylacji w poszczególnych dinukleotydach CpG genu *MGMT* była niezależna od płci pacjentów.

**Tab. 48 Porównanie metylacji w poszczególnych dinukleotydach CpG z płcią pacjentów.**

CpG	Wartość p
CpG1	p = 0,91
CpG2	p = 0,32
CpG3	p = 0,96
CpG4	p = 0,97
CpG5	p = 0,31
Średnia ze wszystkich CpG	p = 0,72

### 3.1.3 Ocena korelacji metylacji *MGMT* z przeżyciem pacjentów i czasem wolnym od wznowy

Na podstawie analizy korelacji porządku rang Spearmana wykazano brak statystycznie istotnej zależności pomiędzy metylacją *MGMT*, liczoną jako średnia z pięciu dinukleotydów CpG, oraz w każdym dinukleotydzie osobno, a niezależnym od leczenia operacyjnego przeżyciem chorych, jak również czasem wolnym od wznowy (Tab. 49 i 50).

**Tab. 49 Powiązanie metylacji *MGMT* w poszczególnych dinukleotydach CpG, z długością życia chorych na glejaki.**

CpG	Wartość p
CpG1	p = 0,85
CpG2	p = 0,92
CpG3	p = 1
CpG4	p = 0,21
CpG5	p = 0,79
Średnia ze wszystkich CpG	p = 1

Tab. 50 Powiązanie metylacji *MGMT* w poszczególnych dinukleotydach CpG, z czasem wolnym od wznowy chorych na glejaki.

CpG	Wartość p
CpG1	p = 0,93
CpG2	p = 0,75
CpG3	p = 0,81
CpG4	p = 0,34
CpG5	p = 0,57
Średnia ze wszystkich CpG	p = 0,72

### 3.1.4. Porównanie wyników uzyskanych metodą MSP i pirosekwencjonowania

Porównanie wyników uzyskanych metodą MSP i pirosekwencjonowania wykazało zgodny status metylacji *MGMT* w 83 próbach badanych, różniąc się zaś w 8 przypadkach. Zatem w 91,21% obie metody dały identyczny wynik jakościowy. Sześć z ośmiu niezgodnych wyników stanowiły przypadki, gdy pirosekwencjonowanie wykazywało metylację, podczas gdy MSP wskazywało na brak metylacji genu. W przypadku jednej próbki (T51) sytuacja była odwrotna, natomiast jedna próbka (T38) z racji braku jednoznacznego wyniku MSP również zaklasyfikowana była jako niezgodna. Szczegółowe zestawienie tych danych przedstawia Tab. 44 zawarta w Aneksie do niniejszej pracy. Komentując te dane należy stwierdzić, że sekwencje badane obydwoma metodami są tylko w części zbieżne, tzn. z pięciu analizowanych metodą pirosekwencjonowania dinukleotydów CpG trzy stanowią miejsce wiązania dla starterów użytych do MSP. Jednocześnie MSP analizuje kolejne 6 CpG (w sumie 9 CpG).

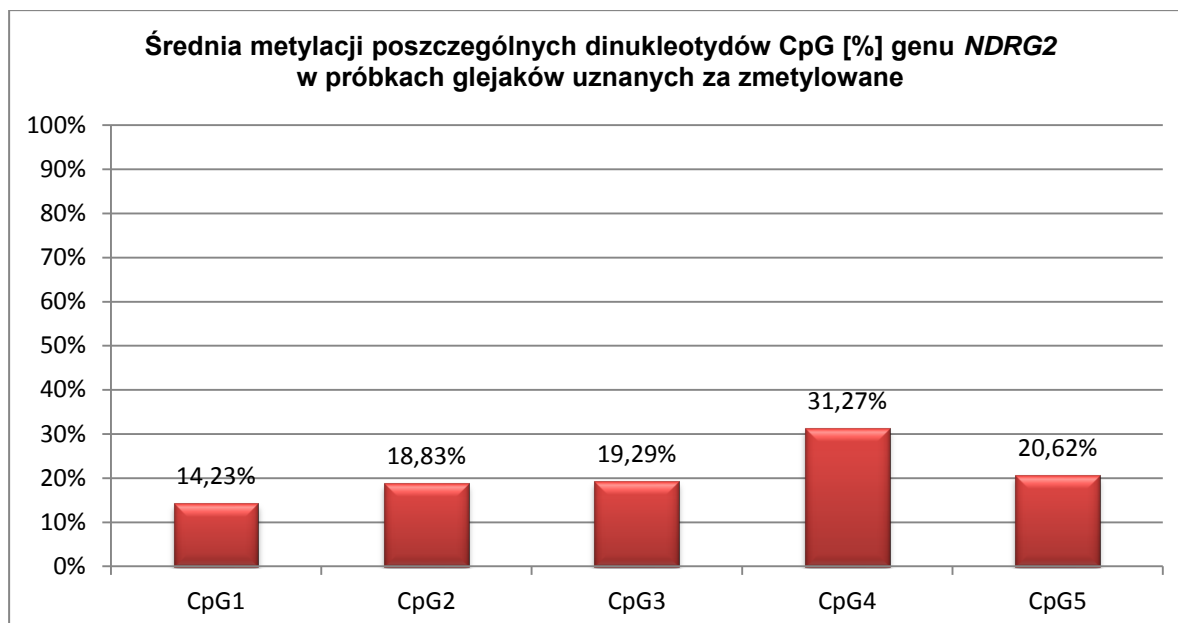
## 3.2 Analiza wyników metylacji *NDRG2* na podstawie reakcji pirosekwencjonowania – guzy glejowe

Szczegółowe wyniki analizy metylacji *NDRG2* wykonanej techniką pirosekwencjonowania dla glejaków zawarte są w Tab. 51 zamieszczonej w Aneksie do niniejszej pracy.

### 3.2.1 Ocena częstości metylacji *NDRG2*

Analiza metylacji genu *NDRG2* została przeprowadzona na 82 próbkach pochodzących od pacjentów z guzami glejowymi. Ponad połowa (48/82) stanowiła guzy IV °WHO, 21 próbek stanowiły guzy III °WHO, zaś guzy stopnia II, I/II oraz I reprezentowane były przez odpowiednio 6, 1 oraz 3 próbki. Dodatkowo trzy próbki nie miały przyporządkowanego stopnia złośliwości wg klasyfikacji WHO. Przyjmując za linię odcięcia wartość 11% wykazano, że 70,73% (58/82) próbek charakteryzowało się metylacją powyżej poziomu reprezentowanego przez kontrolną zdrową tkankę mózgu (Ryc. 44). Najwyższą metylacją charakteryzował się dinukleotyd CpG4, którego średni poziom metylacji wszystkich próbek wynosił 31,27%, natomiast najniższą wartość zanotowano dla CpG1 = 14,23.

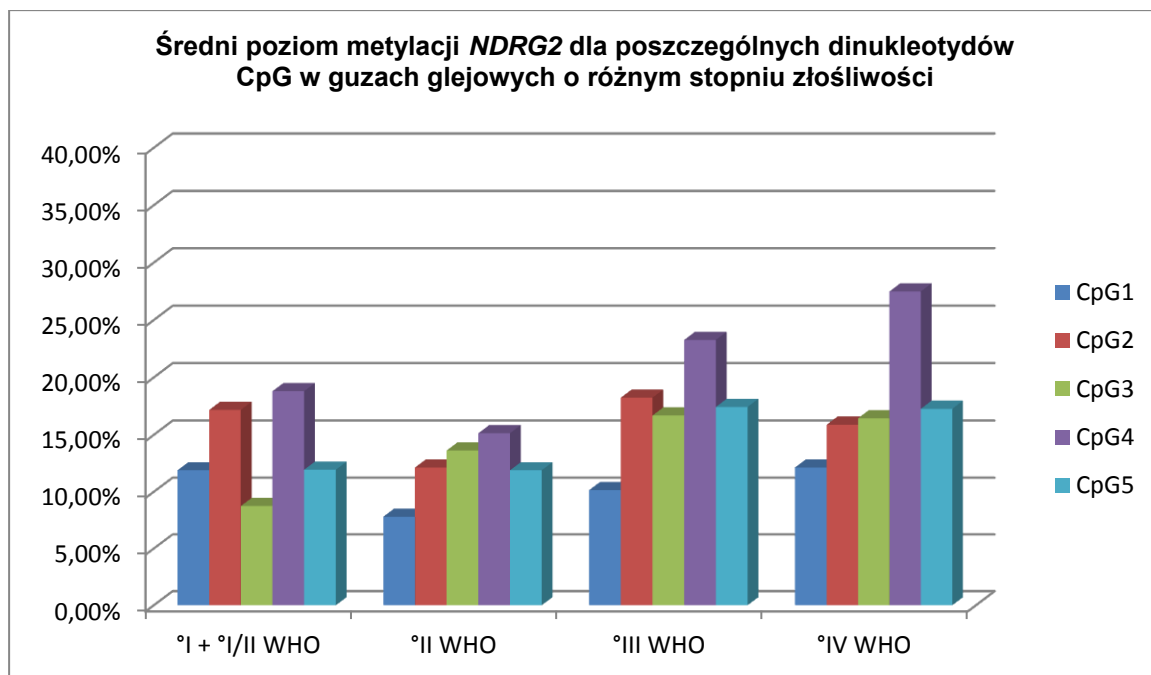




Ryc. 44 Uśredniona wartość procentowa metylacji pięciu kolejnych dinukleotydów CpG genu *NDRG2* obliczona dla próbek glejaków uznanych za zmetylowane.

### 3.2.2 Ocena korelacji metylacji *NDRG2* ze stopniem złośliwości, wiekiem, oraz płcią pacjentów

Średnie wartości metylacji wszystkich dinukleotydów CpG genu *NDRG2* nie przekraczały 20% we wszystkich czterech kategoriach złośliwości glejaków. Analiza statystyczna uwzględniająca poszczególne dinukleotydy nie wykazała istotnych statystycznie różnic w poziomach metylacji pomiędzy guzami I, II, III, oraz IV stopnia złośliwości wg WHO (test Kruskala-Wallis) (Ryc. 45, 46, Tab. 51).



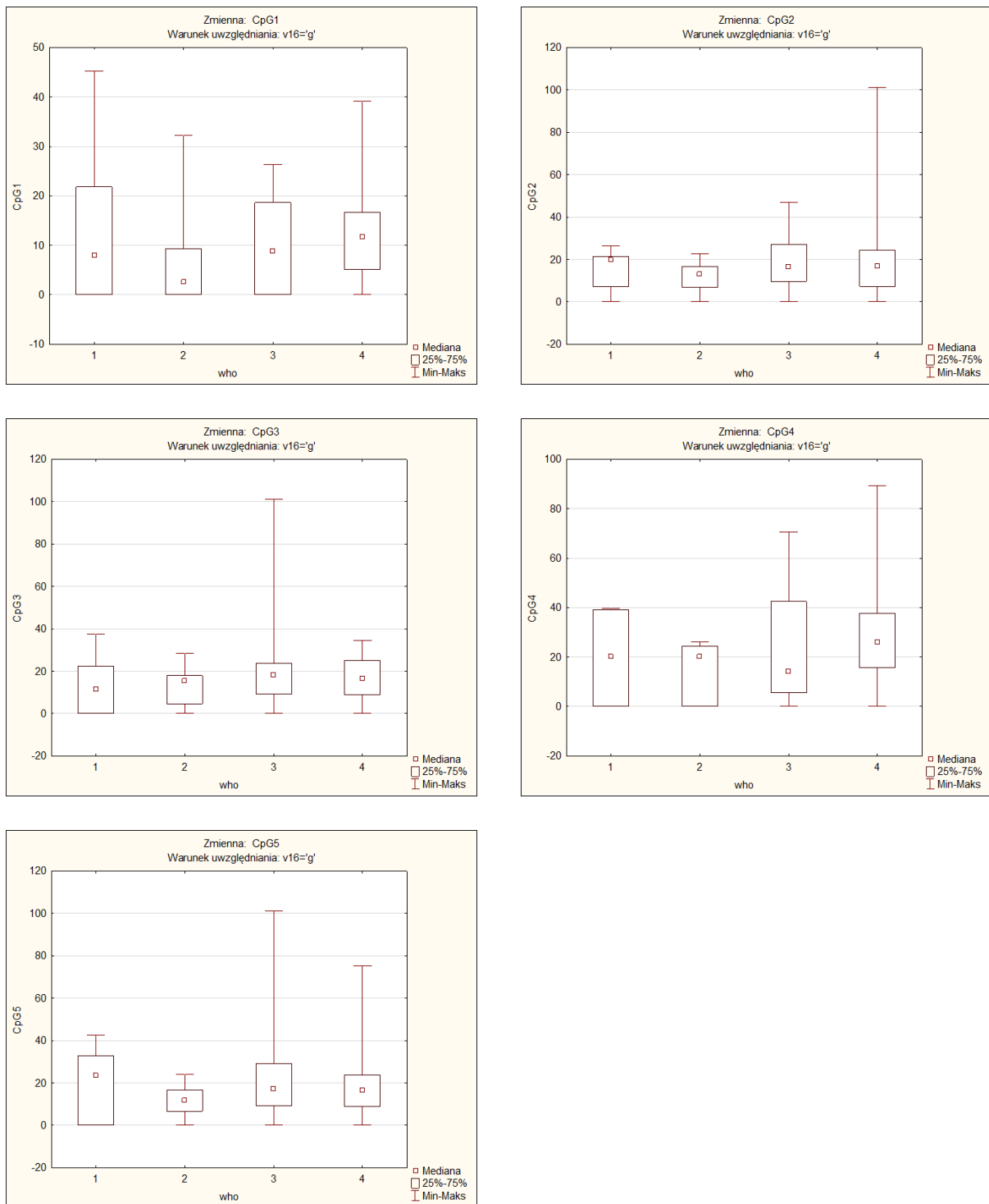
Ryc. 45 Porównanie średnich wartości procentowych metylacji pięciu kolejnych dinukleotydów CpG genu *NDRG2* pacjentów z guzami glejowymi o różnym stopniu złośliwości wg klasyfikacji WHO.

Tab. 52 Średnie poziomy metylacji pięciu dinukleotydów CpG genu *NDRG2* w glejakach o różnym stopniu złośliwości.

°WHO	Liczba prób	Średni poziom metylacji we wszystkich badanych CpG
I° + I°/II° WHO	4	13,71% ± 4,15
II° WHO	6	12,13% ± 2,74
III° WHO	21	17,16% ± 4,68
IV° WHO	48	17,85% ± 5,74

Tab. 53 Porównanie wyników metylacji w poszczególnych dinukleotydach CpG genu *NDRG2*, ze stopniem złośliwości w skali WHO pacjentów z glejakami.

CpG	Wartość p
CpG1	p = 0,54
CpG2	p = 0,72
CpG3	p = 0,63
CpG4	p = 0,42
CpG5	p = 0,69
Średnia ze wszystkich CpG	p = 0,53



**Ryc.46** Zależności między metylacją *NDRG2* w poszczególnych dinukleotydach CpG, a stopniem złośliwości glejaków. Każda kolejna rycina przedstawia jeden dinukleotyd. Środkowy kwadracik wskazuje medianę, duży kwadrat określa 25-75 centyl, a „wąsy” wskazują wartość najwyższego i najniższego wyniku. Cyfry arabskie na osi odciętych: 1, 2, 3, oraz 4 oznaczają odpowiednio I, II, III, oraz IV stopień złośliwości wg WHO.

Test Kruskala-Wallis zastosowany do badania zależności między wynikami metylacji w poszczególnych dinukleotydach CpG genu *NDRG2*, a wiekiem pacjentów z guzami glejowymi nie wykazał istotnych statystycznie zależności. Szczegółowe wartości poziomów istotności p zestawiono w poniższej tabeli (Tab. 54).

**Tab. 54** Porównanie metylacji w poszczególnych dinukleotydach CpG genu *NDRG2* z wiekiem pacjentów z guzami glejowymi.

CpG	Wartość p
CpG1	p = 0,82
CpG2	p = 0,66
CpG3	p = 0,89
CpG4	p = 0,49
CpG5	p = 0,78
Średnia ze wszystkich CpG	p = 0,74

Wykorzystując test U Manna-Whitney'a określono również wartości p dla relacji wynik metylacji w poszczególnych CpG, a płeć pacjentów z guzami. Nie wykazano istnienia relacji znamiennej statystycznie.

**Tab. 55** Porównanie metylacji w poszczególnych dinukleotydach CpG genu *NDRG2* z płcią pacjentów z guzami glejowymi.

CpG	Wartość p
CpG1	p = 0,38
CpG2	p = 0,21
CpG3	p = 0,94
CpG4	p = 0,81
CpG5	p = 0,34
Średnia ze wszystkich CpG	p = 0,42

### 3.2.3 Ocena korelacji metylacji *NDRG2* z przeżyciem i czasem wolnym od wznowy

Na podstawie analizy korelacji porządku rang Spearmana wykazano brak statystycznie istotnej zależności pomiędzy metylacją *NDRG2*, liczoną jako średnia z pięciu dinukleotydów CpG, oraz w każdym dinukleotydzie osobno, a przeżyciem chorych, jak również czasem wolnym od wznowy.

**Tab. 56** Powiązanie metylacji *NDRG2* w poszczególnych dinukleotydach CpG, z długością życia chorych na guzaki.

CpG	Wartość p
CpG1	p = 0,08
CpG2	p = 0,96
CpG3	p = 0,21
CpG4	p = 0,25
CpG5	p = 0,86
Średnia ze wszystkich CpG	p = 0,56

Tab. 57 Powiązanie metylacji *NDRG2* w poszczególnych dinukleotydach CpG, z czasem wolnym od wznowy (tzn. okresem od operacji do momentu pojawienia się wznowy) chorych na glejaki.

CpG	Wartość p
CpG1	p = 0,15
CpG2	p = 0,81
CpG3	p = 0,38
CpG4	p = 0,45
CpG5	p = 0,51
Średnia ze wszystkich CpG	p = 0,33

### 3.2.4 Porównanie wyników uzyskanych metodą MSP i pirosekwencjonowania

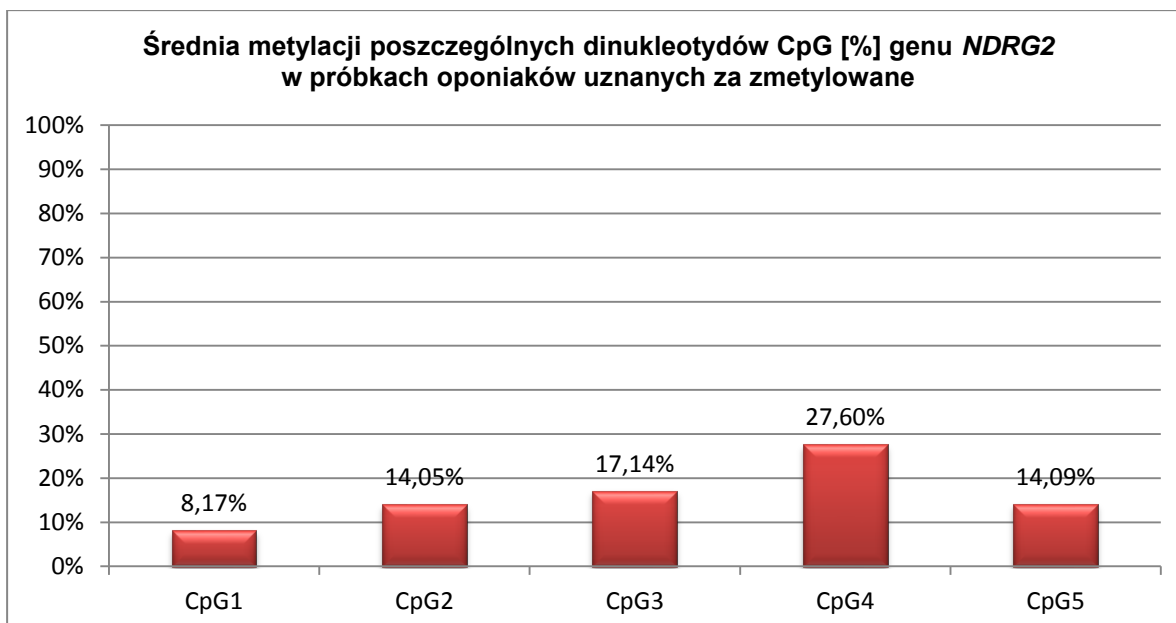
Porównanie wyników uzyskanych metodą MSP i pirosekwencjonowania wykazało zgodny status metylacji *NDRG2* w 25 próbach badanych, różniąc się zaś w 57 przypadkach. Szczegółowe zestawienie tych danych przedstawia Tab. 51 zawarta w Aneksie do niniejszej pracy. Zaznaczyć przy tym należy, iż sekwencje badane obydwoma metodami nie pokrywały się, tzn. 5 analizowanych metodą pirosekwencjonowania dinukleotydów CpG leży w odległości 643 nt w kierunku 3' względem ostatniego z 4 dinukleotydów badanych przez MSP.

### 3.3 Analiza wyników metylacji *NDRG2* na podstawie reakcji pirosekwencjonowania – oponiaki

Szczegółowe wyniki analizy metylacji *NDRG2* wykonanej techniką pirosekwencjonowania dla oponiaków zawarte są w Tab. 58 zamieszczonej w Aneksie do niniejszej pracy.

#### 3.3.1 Ocena częstości metylacji genu *NDRG2*

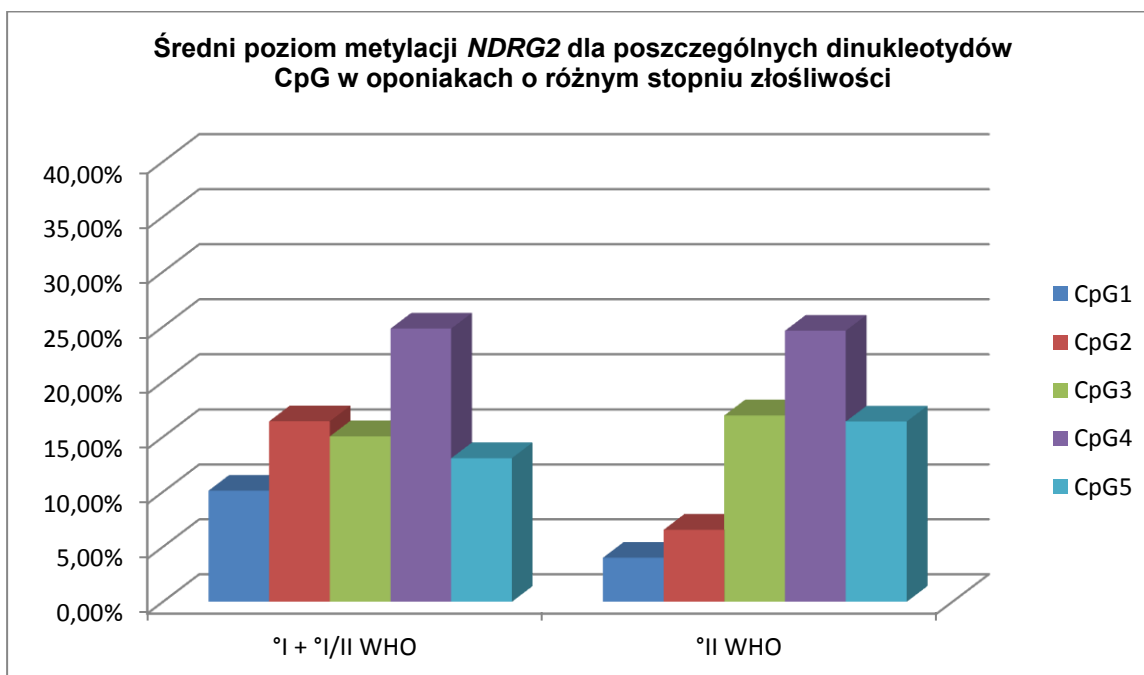
Analiza metylacji genu *NDRG2* została przeprowadzona na 25 próbkach pochodzących od pacjentów z oponiakami. Większość stanowiły guzy łagodne w I oraz I/II stopniu złośliwości wg klasyfikacji WHO (72,00%; 18/25). Pozostałe 7 guzów sklasyfikowano jako stopień II. Przyjmując za linię odcięcia wartość 11% wykazano, iż 84,00% próbek (21/25) wykazywało metylację powyżej poziomu stwierdzonego w DNA zdrowej tkanki mózgu. Najwyższą metylacją charakteryzował się dinukleotyd CpG4, którego średni poziom metylacji wszystkich próbek wynosił 27,60%, natomiast najniższą wartość zanotowano dla CpG1 = 8,17% (Ryc. 47).



Ryc. 47 Uśredniona wartość procentowa metylacji pięciu kolejnych dinukleotydów CpG genu *NDRG2* obliczona dla próbek oponiaków uznanych za zmetylowane.

### 3.3.2 Ocena korelacji metylacji *NDRG2*, ze stopniem złośliwości, wiekiem, oraz płcią pacjentów

Jak przedstawia Ryc. 48 średnie wartości metylacji wszystkich dinukleotydów CpG genu *NDRG2* nie przekraczały 20% w obu kategoriach złośliwości oponiaków.



Ryc. 48 Porównanie średnich wartości procentowa metylacji pięciu kolejnych dinukleotydów CpG genu *NDRG2* pacjentów z oponiakami o różnym stopniu złośliwości wg klasyfikacji WHO.

**Tab. 59** Poziomy metylacji pięciu dinukleotydów CpG genu *NDRG2* w oponiakach o różnym stopniu złośliwości.

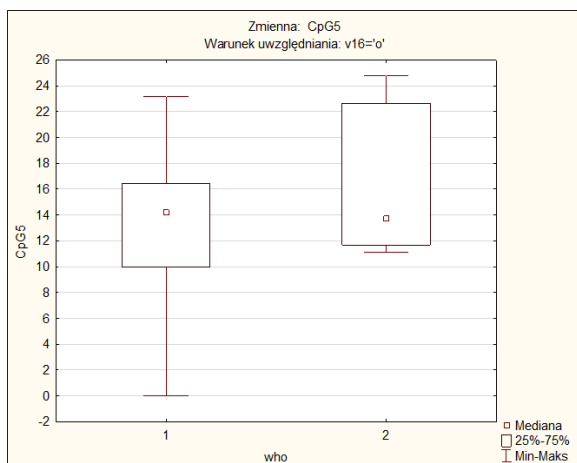
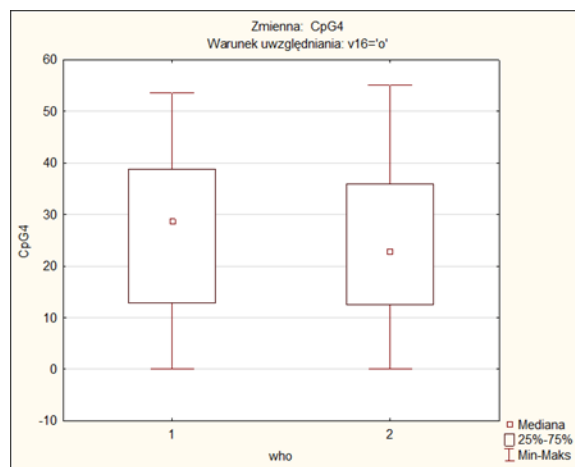
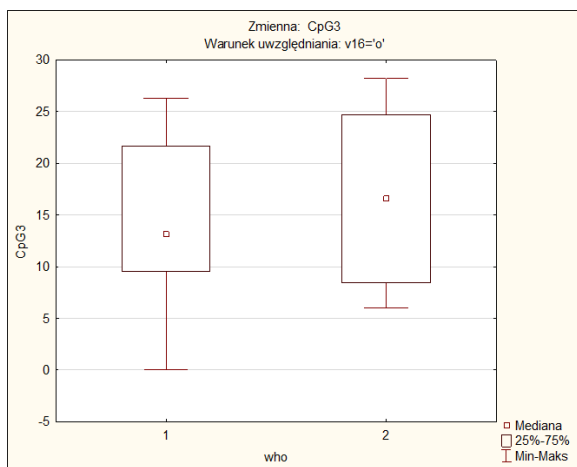
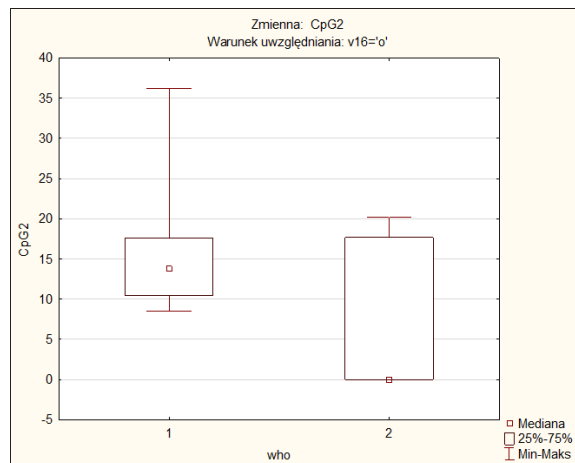
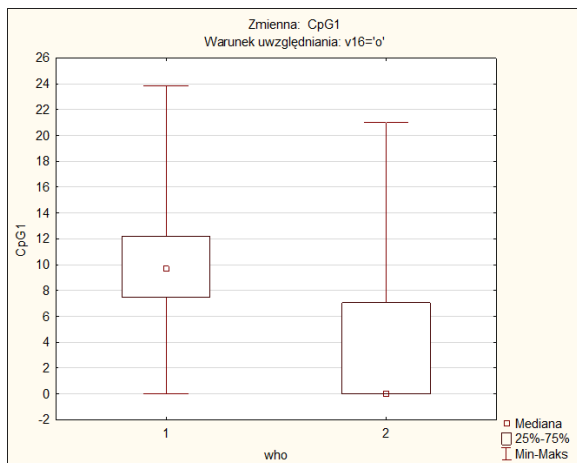
°WHO	Liczba prób	Średni poziom metylacji we wszystkich badanych CpG
I° + I/II° WHO	18	15,90% ± 5,53
II° WHO	7	13,71% ± 8,41

Wykazano statystycznie istotną korelację (test Kruskala-Wallisa) pomiędzy metylacją w dwóch pierwszych badanych dinukleotydach, czyli CpG1 oraz CpG2, a stopniem złośliwości wg klasyfikacji WHO. Wyższe wartości metylacji w tym dinukleotydzie wykazywali pacjenci z oponiakami łagodnymi (Tab. 60, Ryc. 49).

**Tab. 60** Porównanie wyników metylacji w poszczególnych dinukleotydach CpG genu *NDRG2*, ze stopniem złośliwości w klasyfikacji WHO pacjentów z oponiakami.

CpG	Wartość p
CpG1	p = 0,04*
CpG2	p = 0,04
CpG3	p = 0,69
CpG4	p = 0,98
CpG5	p = 0,38
Średnia ze wszystkich CpG	p = 0,26

\*Kolorem czerwonym zaznaczono wartość statystycznie znamiennej.



**Ryc. 49** Zależności między metylacją *NDRG2* w poszczególnych dinukleotydach CpG, a stopniem złośliwości oponiaków. Każda kolejna rycina przedstawia jeden dinukleotyd. Środkowy kwadracik wskazuje medianę, duży kwadrat określa 25-75 centyl, a „wąsy” wskazują wartość najwyższego i najniższego wyniku. Cyfry arabskie na osi odciętych: 1 i 2 oznaczają odpowiednio I WHO i II stopień złośliwości wg klasyfikacji WHO.

Na podstawie testu Kruskala-Wallisa wykazano również, iż średnia metylacja wszystkich pięciu CpG *NDRG2* w populacji oponiaków koreluje z wiekiem. Wyższe poziomy metylacji stwierdzono u pacjentów starszych ( $p=0,03$ ). Na granicy znamienności statystycznej było również powiązanie



między metylacją *NDRG2* w dinukleotydzie CpG2, a wiekiem pacjentów, tj. im bardziej zaawansowany wiek, tym wyższa metylacja w CpG2 ( $p=0,06$ ).

**Tab. 61 Porównanie metylacji w poszczególnych dinukleotydach CpG genu *NDRG2* z wiekiem pacjentów z oponiakami.**

CpG	Wartość p
CpG1	$p = 0,22$
CpG2	$p = 0,06$
CpG3	$p = 0,65$
CpG4	$p = 0,13$
CpG5	$p = 0,96$
Średnia ze wszystkich CpG	$p = 0,03^*$

\*Kolorem czerwonym zaznaczono wartość statystycznie znamiennej.

Wykorzystując test U Manna-Whitney'a określono również wartość poziomu istotności  $p$  dla relacji wynik metylacji w poszczególnych CpG, a płeć pacjentów z oponiakami. Uzyskano znamiennej statystycznie wynik dla CpG2 oznaczający, że statystycznie wyższe poziomy metylacji miały kobiety, aniżeli mężczyźni.

**Tab. 62 Porównanie metylacji w poszczególnych dinukleotydach CpG genu *NDRG2* z płcią pacjentów z oponiakami.**

CpG	Wartość p
CpG1	$p = 0,98$
CpG2	$p = 0,01^*$
CpG3	$p = 0,70$
CpG4	$p = 0,84$
CpG5	$p = 0,46$
Średnia ze wszystkich CpG	$p = 0,66$

\*Kolorem czerwonym zaznaczono wartość statystycznie znamiennej.

### 3.3.3 Ocena korelacji metylacji *NDRG2* z przeżyciem i czasem wolnym od wznowy

Na podstawie analizy korelacji porządku rang Spearmana wykazano, iż poziom metylacji w dinukleotydzie CpG5 korelował istotnie z czasem wolnym od wznowy ( $p=0,04$ ) oraz długością przeżycia chorych na oponiaki. Wyższe poziomy metylacji w tym dinukleotydzie wskazywały na późniejsze pojawienie się wznowy oraz dłuższe przeżycie w odniesieniu do pacjentów o niższych wartościach metylacji w tym dinukleotydzie (Tab. 63 i 64).

**Tab. 63 Powiązanie metylacji *NDRG2* w poszczególnych dinukleotydach CpG, z długością życia chorych na oponiaki.**

CpG	Wartość p
CpG1	$p = 0,68$
CpG2	$p = 0,74$
CpG3	$p = 0,90$
CpG4	$p = 0,92$
CpG5	$p = 0,04^*$
Średnia ze wszystkich CpG	$p = 0,33$

\*Kolorem czerwonym zaznaczono wartość statystycznie znamiennej.

**Tab. 64 Powiązanie metylacji *NDRG2* w poszczególnych dinukleotydach CpG, z czasem wolnym od wznowy chorych na oponiaki.**

CpG	Wartość p
CpG1	p = 0,66
CpG2	p = 0,71
CpG3	p = 0,91
CpG4	p = 0,96
CpG5	p = 0,04*
Średnia ze wszystkich CpG	p = 0,32

\*Kolorem czerwonym zaznaczono wartość statystycznie znamiennej.

### 3.3.4 Porównanie wyników uzyskanych metodą MSP i pirosekwencjonowania

Porównanie wyników uzyskanych metodą MSP i pirosekwencjonowania wykazało zgodny status metylacji *NDRG2* w 4 próbach badanych, różniąc się zaś w 21 przypadkach. Szczegółowe zestawienie tych danych przedstawia Tab. 58 zawarta w Aneksie do niniejszej pracy. Zaznaczyć przy tym należy, iż sekwencje badane obydwoma metodami nie pokrywały się, tzn. 5 analizowanych metodą pirosekwencjonowania dinukleotydów CpG leży w odległości 643 nt w kierunku 3' względem ostatniego z 4 dinukleotydów badanych przez MSP.

### 3.4 Porównanie wyników pirosekwencjonowania *NDRG2* w populacjach glejaków i oponiaków

Stwierdzono brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy średnią metylacją *NDRG2* w populacjach glejaków i oponiaków. Uśredniony wynik dla wszystkich dinukleotydów CpG, jak również dla poszczególnych CpG nie różnił się w sposób statystycznie znamiennej w tych nowotworach. Zestawienie wyników analizy statystycznej (test Manna-Whitney'a) przedstawia Tab. 65.

**Tab. 65 Analiza statystyczna zależności metylacji *NDRG2* w dwóch populacjach badanych, tj. glejakach i oponiakach.**

<b>Metylacja <i>NDRG2</i> glejaki vs. oponiaki</b>	
CpG	Wartość p
CpG1 [%]	0,27
CpG2 [%]	0,22
CpG3 [%]	0,82
CpG4 [%]	0,84
CpG5 [%]	0,29
Średnia z 5 CpG	0,41

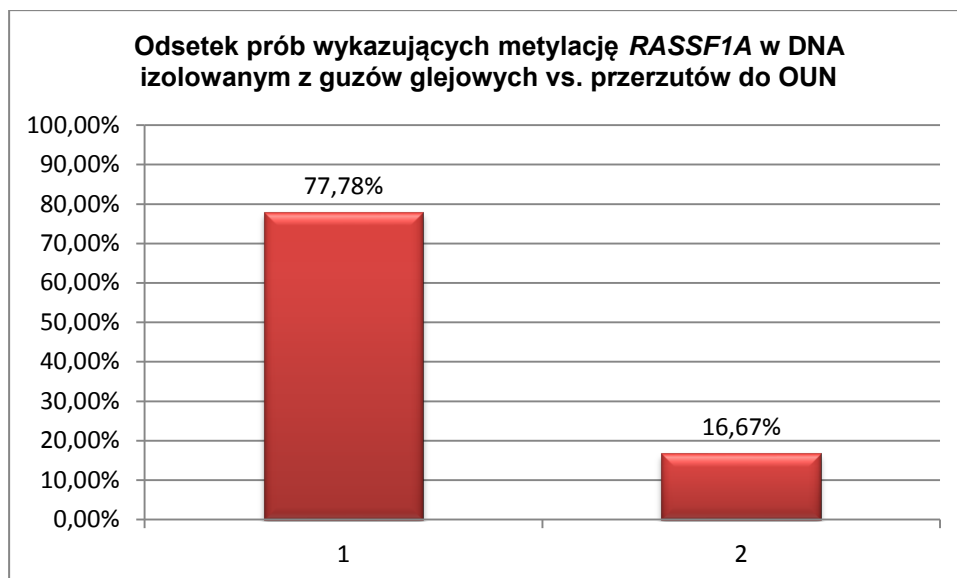
#### **4. Profil zmian metylacji wybranych genów w wolnokrążącym DNA wyizolowanym z surowicy**

Szczegółowe zestawienie wyników analizy metylacji genów w wolnokrążącym DNA z surowicy pacjentów z guzami glejowymi oraz innymi guzami OUN zamieszczono w Aneksie do niniejszej pracy (Tab. 66 i 67).

##### **4.1 Ocena częstości metylacji genów analizowanych w wolnokrążącym DNA izolowanym z surowicy – grupa glejaków oraz grupa innych nowotworów OUN**

Cztery geny: *MGMT*, *RASSF1A*, *p15INK4B* oraz *p14ARF* zostały wyłonione celem sprawdzenia, czy DNA wolnokrążące pozyskane z surowicy może stanowić dobrą alternatywę, jako źródło informacji o statusie metylacji genów, dla próbek pozyskanych bezpośrednio z tkanki guza. Zostały one wyselekcjonowane w oparciu o wcześniejsze wyniki badań w tkance guza, wykazujące, że są one częstym celem metylacji. DNA wolnokrążące izolowano metodą opisaną w Rozdz. 4 sekcji Materiały i Metody, zaś analiza metylacji przebiegała analogicznie do prób będących fragmentami guza. Analizie poddano próbki uzyskane od pacjentów chorych na glejaki (17 próbek) oraz chorych na inne nowotwory OUN, w tym oponiaki (6) i guzy przerzutowe do OUN (10, w tym 7 będące przerzutem z płuc, 2 z piersi i 1 będący przerzutem czerniaka). W przypadku wszystkich badanych w surowicy genów wykryto przynajmniej jeden przypadek metylacji. Metylacja w najmniejszym stopniu dotyczyła promotora *MGMT*, zarówno w przypadku guzów glejowych (17,65%; 3/17), jak i innych nowotworów OUN (6,25%; 1/16). Większą częstotliwość metylacji wykazały geny *p15INK4B* (11,76%; 2/17 vs. 25,00%; 4/16) oraz *p14ARF* (41,18%; 7/17 vs. 25,00%; 4/16), zaś największy odsetek zmetylowanych próbek oznaczono dla genu *RASSF1A* (47,06%; 8/17 vs. 31,25%; 5/16). Ze względu na zdecydowanie mniejszą liczebność grup badanych wartości procentowe uzyskane w wolnokrążącym DNA powinny być traktowane jako nieco mniej wymierne w porównaniu z wynikami otrzymanymi dla próbek pozyskanych z tkanki guza.

Porównując dane z analizy tkanki guza dla *RASSF1A* wykazano, że metylacja tego genu w sposób statystycznie istotny różnicuje guzy glejowe od guzów przerzutowych do OUN (Ryc. 50).



Ryc. 50 Wykres obrazujący istotną statystycznie różnicę w odsetku prób wykazujących metylację *RASSF1A* w grupie glejaków (na wykresie oznaczona nr 1) oraz guzów przerzutowych do OUN (na wykresie nr 2).

#### 4.2 Ocena współwystępowania metylacji badanych genów na podstawie współczynnika metylacji

Podobnie jak dla prób pozyskanych z tkanki guza, również dla DNA wolnokrążącego izolowanego z surowicy dokonano analizy współwystępowania metylacji badanych genów. Wśród guzów glejowych 29,41% wszystkich prób badanych wykazywało metylację obszaru promotorowego przynajmniej w jednym genie. W tej grupie badanej najliczniejszy wariant współwystępowania statusu metylacji to WM = 0,50, reprezentujący 35,29% próbek. Dla grupy innych guzów OUN, WM = 0,25 oznaczający wyciszenie 1 genu był najczęstszym współczynnikiem i dotyczył on połowy wszystkich prób badanych. Żaden z pacjentów w obu grupach badanych nie wykazywał jednoczesnej metylacji wszystkich czterech genów.

Tab. 68 Zestawienie liczby zmetylowanych genów wraz ze współczynnikiem metylacji u pacjentów z guzami glejowymi oraz innymi nowotworami OUN – dane z analizy wolnokrążącego DNA.

Liczba zmetylowanych genów	0	1	2	3	4
Współczynnik metylacji [WM]	0	0,25	0,50	0,75	1,00
Glejaki wszystkich °WHO [Σ17]	29,41%	29,41%	35,29%*	5,88%	0,00%
Inne nowotwory OUN [16]	37,50%	50,00%	0,00%	12,50%	0,00%

\*Kolorem czerwonym zaznaczono wartość statystycznie znamioną.

#### 4.3 Porównanie wyników metylacji w DNA wolnokrążącym oraz DNA guza

Dla 16 prób surowicy dostępna była również tkanka guza od tego samego pacjenta, co umożliwiło analizę porównawczą wyników w tych dwóch grupach odniesienia (Tab. 66, 67). Dla genów *MGMT*, *RASSF1A*, *p15INK4B* oraz *p14ARF* dla guzów glejowych stwierdzono zgodność na odpowiednio poziomie 88,89% (8/9), 66,67% (6/9), 88,89% (8/9) i 77,78% (7/9). Dla innych nowotworów OUN wartości te wynosiły kolejno 100% (7/7) oraz trzykrotnie 71,43% (5/7). Wyniki zsumowane dla obu grup badanych dały zgodność kolejno w 93,75% (15/16), w 68,75% (11/16), w 81,25% (13/16) oraz w 75,00% (12/16), a dla całej przeprowadzonej analizy wartość ta wyniosła 79,69% (51/64).

Tabele porównujące wyniki analizy metylacji DNA wolnokrążącego oraz DNA guza umieszczona jest w Aneksie (Tab.69).

## V. Dyskusja

Badania ostatnich lat wyraźnie wskazują na powiązanie zmian w epigenomie z patogenezą pierwotnych nowotworów mózgu [Lavon et al., 2010, Nagarajan & Costello, 2009 (a i b), Carén et al., 2013]. Dane dotyczące profilu zmian epigenetycznych charakterystycznych dla tych nowotworów są jednak wciąż nieliczne i dotyczą przede wszystkim guzów glejowych. Badania epigenetyczne glejaków wielopostaciowych (GBM) koncentrują się głównie na analizie hipermetylacji promotora genu *MGMT*, która może mieć istotne znaczenie w odpowiedzi pacjentów na leczenie cytostatykami alkilującymi. Poszukiwanie markerów epigenetycznych umożliwiających wczesną diagnozę i przewidywanie skuteczności terapii w nowotworach OUN jest więc ciągle aktualne. Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej, których celem była ocena profilu metylacji genów o potencjalnym znaczeniu diagnostycznym i/lub prognostycznym w nowotworach mózgu o zróżnicowanej złośliwości, dobrze wpisują się więc w ten nurt.

W niniejszej pracy analizie metylacji poddano panel 13 genów: *MGMT*, *ERCC1*, *hMLH1*, *ATM*, *CDKN2B (p15INK4B)*, *p14ARF*, *CDKN2A (p16INK4A)*, *RASSF1A*, *RUNX3*, *GATA6*, *NDRG2*, *PTEN*, oraz *RARβ*. Za kryterium doboru genów przyjęto udokumentowany udział produktów tych genów w procesach takich jak naprawa DNA, regulacja cyklu komórkowego i proliferacji oraz wcześniejsze dane wskazujące na powiązanie ich modyfikacji z okresem przeżycia, bądź okresem wolnym od wznowy i/lub odpowiedzi na leczenie.

Jednym z elementów oceny było określenie średniej częstości metylacji analizowanych genów. Współczynnik metylacji (WM) zgodnie z danymi literaturowymi [Chen et al., 2011], określony został jako stosunek liczby zmetylowanych genów do całkowitej liczby genów badanych w każdej próbie.

Wyższy współczynnik metylacji, a tym samym większą liczbę zmetylowanych genów zaobserwowano w guzach glejowych, w porównaniu z oponiakami. W odniesieniu do tych ostatnich z panelu badanych genów wyłączono gen *MGMT* ponieważ w tym typie guzów nie obserwuje się jego metylacji [de Robles et al., 2008], co potwierdziły badania wykonane w ramach niniejszej pracy (dane niezamieszczone).

Ponadto w odniesieniu do glejaków wartość współczynnika metylacji była powiązana ze stopniem złośliwości wg. klasyfikacji WHO, a także z wiekiem pacjentów. Takiej zależności nie stwierdzono natomiast w oponiakach. Dane te sugerują, że WM badanych genów mógłby być przydatny w diagnostyce guzów, których ocena histologiczna nie jest jednoznaczna. I tak np. próbka T55 określona została jako pierwotny glejowy guz mózgu, T58 – neoplasma malignum anaplasticum (najprawdopodobniej złośliwy glejak), a T59 - neoplasma malignum anaplasticum polymorphum (najprawdopodobniej również złośliwy glejak). Analiza metylacji wykazała, że WM dla T55 był wyższy (0,38; 5 zmetylowanych genów), niż dla T58 (0,31; 4 zmetylowane geny), a ten z kolei był wyższy niż w próbce T59 (0,23; 3 zmetylowane geny). Można więc przypuszczać, że guzy te różniły się stopniem złośliwości, a współczynnik metylacji pozwoliłby powiązać ich charakterystykę z klasyfikacją WHO.

Ocena WM może więc mieć znaczenie prognostyczne, bądź wpływać na decyzje odnośnie sposobu leczenia. Zdecydowanie wyższy WM w guzach glejowych niż w oponiakach dodatkowo potwierdza, że zwiększona metylacja jest powiązana ze złośliwością guzów OUN.

Zależność WM od wieku pacjentów potwierdza natomiast tezę, że wraz z wiekiem ilość nieprawidłowości w epigenomie narasta, co jest wynikiem zmian w aktywności enzymów zaangażowanych w rearanżacje epigenetyczne chromatyny, modyfikacje histonów oraz metylację DNA typowych dla procesu starzenia [Cencioni et al., 2013].

Dodatkowym elementem różnicującym glejaki i oponiaki okazała się metylacja specyficznych genów.

Analiza techniką MSP wykazała, że w guzach glejowych najczęściej zmetylowane były geny *RASSF1A*, *RUNX3*, *GATA6* i *MGMT*, w mniejszym stopniu natomiast geny w obrębie locus *INK4B-ARF-INK4A*, oraz *PTEN*, *RARβ* i *ATM*. Geny *ERCC1*, *hMLH1* oraz *NDRG2* były niezmetylowane. Natomiast w oponiakach najczęściej zmetylowanym genem był *p14ARF*, a także *RASSF1A* i *p15INK4B*, mniejszy odsetek prób wykazywał metylację *RUNX3* i *GATA6*, zaś najrzadziej zmetylowane były *p16INK4A*, *ATM* oraz *RARβ*. Niezmetylowane były geny *hMLH1*, *ERCC1*, *NDRG2* i *PTEN*. Geny *RASSF1A*, *RUNX3*, *GATA6* oraz *PTEN* były jednocześnie zdecydowanie częściej zmetylowane w guzach glejowych niż oponiakach.

Nieprawidłowa metylacja promotora *RASSF1A* prowadząca do wyciszenia transkrypcji jest jedną z najczęstszych zmian epigenetycznych obserwowanych w nowotworach u ludzi. Hipermetylację tego genu, zlokalizowanego na chromosomie 3p21.3, stwierdzano m.in. w rakach przełyku [Mao et al., 2011], trzustki [Dammann et al., 2005], niedrobnokomórkowym raku płuc [Maruyama et al., 2004], raku piersi [Mehrotra et al., 2004], nerki [Dulaimi et al., 2004], prostaty [Woodson et al., 2004], tarczycy [Xing et al., 2004], a także w guzach glejowych mózgu [Hesson et al., 2004, Horiguchi et al., 2003, Lorente et al., 2009, Piperi et al., 2010]. Często hipermetylacja tego genu korelowała ze stopniem zaawansowania /progresją nowotworu. Takie powiązanie obserwowano również w przypadku guzów glejowych mózgu [Hesson et al., 2004]. Podsumowując więc badania własne i innych można stwierdzić, że metylacja genu *RASSF1A* jest bardzo częstą zmianą epigenetyczną w guzach glejowych i w związku z tym może być uznana za potencjalny marker diagnostyczny w tej grupie nowotworów OUN. Z drugiej strony metylację tego genu stwierdzono także w oponiakach, choć ze znacznie mniejszą częstotliwością (27,27%) – gen ten był relatywnie częściej zmetylowany u mężczyzn aniżeli u kobiet. Tym samym potwierdzono wcześniejszą obserwację dotyczącą małej grupy pacjentów (12) wykazującą metylację tego genu (16,7%) w guzach oponowych [Horiguchi et al., 2003]. Ponadto metylacja *RASSF1A* wydaje się być także elementem różnicującym guzy glejowe i przerzutowe do OUN.

Kolejną obserwacją, dotyczącą tym razem genu *RUNX3* był fakt, iż w obu typach guzów metylacja w sposób istotny korelowała ze stopniem złośliwości, a także wiekiem pacjentów (w grupie guzów

glejowych), jednak częstotliwość metylacji tego genu tak jak *GATA6* oraz *PTEN* była zdecydowanie większa w guzach glejowych.

Białka rodziny RUNX, w tym RUNX3 są tkankowo-specyficznymi czynnikami transkrypcyjnymi, które odgrywają istotną rolę w neurogenезie. Hipermetylacja promotora tego genu w obrębie wysp CpG została wcześniej opisana w glejakach. Mueller i wsp. [Mueller et al., 2007], stosując specyficzne podejście doświadczalne polegające na powiązaniu analizy techniką mikromacierzy i farmakologicznej reaktywacji genu za pomocą 5-aza-dC, zidentyfikowali dwa geny, które mogą być wyciszone w wyniku hipermetylacji. Jednym z nich był *RUNX3*. Ostatnie badania Avci i wsp. [Avci et al., 2013] wykonanie na niewielkiej grupie pacjentów (10 kobiet, 11 mężczyzn) zdiagnozowanych z różnymi postaciami guzów mózgu wykazały hipermetylację *RUNX3* we wszystkich typach guzów w tym oponiakach III stopnia wg klasyfikacji WHO. Różnice w poziomie metylacji były stosunkowo niewielkie, ale najwyższy stosunek genu zmetylowanego do niezmetrylowanego stwierdzono w GBM. Co więcej badania te wykazały, że w każdym z tych typów nowotworów co najmniej jeden allel jest zmetylowany. Dane przedstawione w niniejszej pracy, będące wynikiem badań na znacznie liczniejszej grupie pacjentów nie tylko potwierdzają metylację *RUNX3* w obydwu typach guzów, ale wskazują na jej powiązanie ze stopniem złośliwości (zarówno w glejakach, jak i w oponiakach) oraz z wiekiem pacjentów (w grupie glejaków). Sugerują tym samym, że *RUNX3* może być nowym markerem agresywności zarówno guzów glejowych, jak i oponiaków.

Locus *INK4B-ARF-INK4A* koduje dwa białkowe inhibitory kinaz zależnych od cyklin, *p15INK4B* i *p16INK4A*, a także regulator ścieżki sygnałowej *p53*, *p14ARF*. Są one dobrze zdefiniowanymi genami supresorowymi, których ekspresja jest często nieprawidłowa w nowotworach [Popov & Gil, 2010]. Poza homozygotyczną delecją i inaktywacją w wyniku mutacji, często geny te są wyciszone w wyniku hipermetylacji promotora. Dotyczy to także guzów glejowych. Glejaki z wyższym stopniem złośliwości często charakteryzują także mutacje w innych genach zaangażowanych w ścieżki *pRB* i *p53*, co wyłącza prawidłowe funkcjonowanie tych krytycznych dla kontroli cyklu komórkowego elementów [He et al., 1995, Ichimura et al., 1996, Ichimura et al., 2000, Fulci et al., 2000]. Wyniki badań przedstawionych w niniejszej pracy wskazują, że epigenetyczne modyfikacje tych genów są charakterystyczne również dla oponiaków. Co więcej gen *p14ARF*, alternatywny produkt locus *INK4A/ARF* był najczęściej zmetylowanym genem spośród wszystkich 12 genów badanych – 31,82% prób wykazywała obecność prążka w reakcji ze starterami dla sekwencji zmetylowanej (14/44). Można zatem wnioskować, że metylacja tego genu odgrywa istotną rolę w tym typie guzów OUN. Ponieważ *p14ARF* stabilizuje *p53*, sugeruje się, że jego inaktywacja jest równoważna mutacji *p53* [Nicholson et al., 2001]. W opublikowanym niedawno artykule przeglądowym [He et al., 2013] metylacja *p14ARF*, obok metylacji *TIMP3*, jest wymieniana jako jedna z bardziej istotnych zmian epigenetycznych charakteryzujących ten typ nowotworu.

Ponadto wyniki niniejszej pracy sugerują, podobnie jak wcześniejsze badania Amatya i wsp. [Amatya et al., 2004], że metylacja tego genu może być powiązana ze stopniem złośliwości. Guzy atypowe (II stopień wg klasyfikacji WHO) wykazywały częstszą metylację *p14ARF*, aniżeli guzy łagodne (I stopień



WHO) (44,44%; 4/9 versus 27,27% (9/33). Wnioskować można zatem, że metylacja *p14ARF* charakteryzuje guzy opon mózgowych, a w szczególności te bardziej złośliwe, choć wymaga to potwierdzenia na większej grupie pacjentów.

Biorąc pod uwagę fakt, że *p15INK4B (CDKN2B)* był trzecim najczęściej zmetylowanym genem w grupie oponiaków (25,00%; 11/44), zaś *p16INKA (CDKN2A)* był zmetylowany u 9,09% chorych (4/44) można stwierdzić, że metylacja locus INK4B-ARF-INK4A, a w szczególności genu *p14ARF* jest charakterystyczna dla guzów opon mózgowych niezależnie od wieku i płci i może mieć potencjalne znaczenie diagnostyczne w tej grupie guzów OUN.

W guzach glejowych odsetek pacjentów wykazujących metylację genów *p16INK4A*, *p14ARF* oraz *p15INK4* był zasadniczo zbliżony do danych literaturowych, choć interpretacja tych danych jest zróżnicowana. I tak badania He i wsp. sugerowały, że metylacja *p14ARF* skutkuje wyciszeniem epigenetycznym i może stanowić marker diagnostyczny guzów glejowych [He et al., 2011], a także, że metylacja tego genu jest jednym z najwcześniejszych zdarzeń w kancerogenezie glejaka, a dodatkowa inaktywacja innych genów supresorowych i/lub aktywacja onkogenów może być konieczna do progresji nowotworu. Z kolei Kuo i wsp. na podstawie badań przeprowadzonych na 49 skąpodrzewiakach stwierdzili, że 24,5% spośród osób badanych wykazywało metylację *p14ARF*, co korelowało z krótszym okresem wolnym od progresji (ang. *shorter progression free survival*) [Kuo et al., 2009].

*PTEN* i *RAR $\beta$*  należą do genów, których metylacja w odniesieniu do nowotworów mózgu była przedmiotem nielicznych badań. *PTEN* jest genem supresorowym, którego produkt jest negatywnym regulatorem ścieżki sygnałowej PI3K/Akt i w związku z tym odgrywa ważną rolę w regulacji proliferacji komórkowej, apoptozy i inwazyjności nowotworów [McNamara et al., 2013]. Sugeruje się, że jego obniżona ekspresja, może być związana z hipermetylacją jego promotora, jednak częściej wiąże się to z jego mutacją lub utratą na skutek delecji wywołanej utratą heterozygotyczności (LOH).

Nieznaczna metylacja tego genu (8,42%; 8/95) w guzach glejowych, a także jej całkowity brak w oponiakach zaobserwowana w niniejszej pracy, wskazuje, że nie jest to główny mechanizm wyciszenia tego genu w nowotworach mózgu. W odniesieniu do glejaków potwierdza to pośrednio obserwacje innych autorów, że *PTEN* ulega delecji na skutek LOH w chromosomie 10q zarówno w guzach pierwotnych jak i przerzutowych [Simpson & Parsons, 2001].

W odniesieniu do genu *RAR $\beta$*  wcześniejsze badania wskazywały, że ocena jego metylacji może być przydatna w diagnostyce przerzutów raka piersi do mózgu [Mehrotra et al., 2004], w przeciwieństwie do guzów pierwotnych, w których nie wykazano metylacji tego genu [Weaver et al., 2006]. Dane uzyskane w niniejszej pracy, w odniesieniu do guzów pierwotnych, zdają się to potwierdzać. Z drugiej strony Piperi i wsp. [Piperi et al., 2010] wykazali niedawno metylację *RAR $\beta$*  u 70,58% (12/17) pacjentów z GBM. W badaniach tych gwiazdziaki II stopnia wg klasyfikacji WHO były niezmetylowane (0/6), co wskazywało na korelację metylacji *RAR $\beta$*  z fenotypem bardziej agresywnym. Rozbieżności te wymagają jeszcze wyjaśnienia, choć jedną z ich przyczyn może być stosunkowo mała grupa pacjentów (23) analizowana w tych ostatnich badaniach.

Spośród genów, których produkty biorą udział w naprawie DNA oceniano metylację *hMLH1*, *ATM*, *ERCC1* i *MGMT*. Analiza 95 badanych próbek glejaków nie wykazała metylacji *hMLH1* w żadnej z nich. Dane literaturowe odnośnie metylacji tego genu, oraz jego znaczenia w odpowiedzi na leczenie są nieliczne i sprzeczne. Najnowsze badania grupy German Glioma Network potwierdzają dane uzyskane w niniejszej pracy i wskazują, że metylacja genów zaangażowanych w naprawę błędnie sparowanych zasad (geny ścieżki MMR) nie bierze udziału w rozwoju i progresji GBM. Pomimo, iż badania immunohistochemiczne ujawniły niższe poziomy białek MSH2, MSH6 i PMS2 we wznowie GBM, to jednak żaden z w/w genów, jak również gen *hMLH1* nie wykazywały metylacji w grupie badanej składającej się z 43 pacjentów z glejakiem w postaci pierwotnej, a następnie ze wznową [Felsberg et al., 2011]. Wcześniejsze badania niektórych zespołów sugerowały udział metylacji tego genu w progresji glejaków i odpowiedzi na terapię. Z reguły były to jednak badania przeprowadzone na niewielkiej grupie pacjentów [Kanamori et al., 2000, Fukushima et al., 2005, Gömöri et al., 2007]. W badaniach przeprowadzonych w niniejszej pracy nie stwierdzono metylacji *hMLH1* również w oponiakach. Analiza metylacji tego genu w tym typie nowotworów była jak dotąd przedmiotem badań tylko jednej grupy [Chen et al., 2012]. Ich wyniki sugerowały powiązanie metylacji tego genu ze stopniem złośliwości tych guzów. Te rozbieżności wymagają wyjaśnienia w dalszych badaniach. Jednym z elementów, które ewentualnie powinno się wziąć pod uwagę jest przynależność etniczna pacjentów zważywszy na fakt, że powyższe wyniki uzyskano w populacji azjatyckiej.

W niniejszej pracy nie stwierdzono również metylacji genu *ATM* w żadnym z badanych typów guzów (glejaki – 2,11%, oponiaki – 0%). Badania linii komórkowych wyprowadzonych z glejaków wskazywały wprawdzie, że metylacja tego genu może mieć znaczenie w podatności na radioterapię [Roy et al., 2006], jednak brak metylacji w próbkach klinicznych wyklucza możliwość wykorzystania tego genu jako markera radiowrażliwości. Podobnie wyniki niniejszej pracy nie potwierdziły udziału metylacji genu *ERCC1* w patogenezie glejaków, co sugerowały podobnie jak w przypadku genu *ATM* badania z wykorzystaniem linii komórkowych [Chen et al., 2010]. Dowodzi to jednocześnie, że informacje uzyskane z hodowli komórkowych *in vitro* nie zawsze znajdują odzwierciedlenie w materiale klinicznym.

Zgodnie z oczekiwaniami w guzach glejowych stwierdzono natomiast wysoki odsetek zmetylowanego wariantu genu *MGMT*. Tym samym wykazano, że spośród genów kodujących białka zaangażowane w naprawę DNA, tylko *MGMT* posiada realny potencjał jako marker epigenetyczny. Metylotransferaza O<sup>6</sup>-metyloguaniny kodowana przez ten gen usuwa addukty DNA powstałe w wyniku działania leków alkilujących. Obniżona ekspresja *MGMT* będąca skutkiem metylacji wysp CpG jego promotora jest cechą wielu nowotworów, w tym również glejaków [Everhard et al., 2009]. Wykorzystanie danych o metylacji *MGMT* może być przydane przy wyborze schematu leczenia i dlatego jest obecnie przedmiotem wielu badań [Hegi et al., 2008, Weller et al., 2009, Wick et al., 2012]. Zapoczątkowała je obserwacja Hegi i wsp. opisująca korzystny wpływ metylacji *MGMT* na leczenie pacjentów z GBM [Hegi et al., 2005]. Epigenetyczne wyciszenie *MGMT* wiąże się przede wszystkim z lepszą prognozą dla chorych na GBM leczonych lekami alkilującymi, takimi jak temozolomid [Paz et al., 2004, Stupp et

al., 2005, Hegi et al., 2005, Watanabe et al., 2005]. Obecnie testuje się również inne schematy terapeutyczne, np. z wykorzystaniem leków antyangiogennych, dla których skuteczności istotne może być wyciszenie genu *MGMT*. Wyniki badań klinicznych fazy I/IIA dla cilengitidu (inhibitor integryny wykazujący działanie antyangiogenne) wskazują również, że rezultaty leczenia są lepsze u pacjentów ze zmetylowanym promotorem *MGMT*. Trwa również III faza badań klinicznych o nazwie CENTRIC (*Cilengitide, Temozolomide, and Radiation Therapy in Treating Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma and Methylated Gene Promoter Status*), których celem jest ocena skuteczności i bezpieczeństwa cilengitidu, w kombinacji ze standardowym leczeniem, obejmująca tylko pacjentów z GBM wykazujących metylację *MGMT* [www5]. Z kolei w badaniach RTOG 0825 (*The Radiation Therapy Oncology Group*) biorą udział pacjenci z GBM i zmetylowanym promotorem *MGMT*, leczeni bevacizumabem i radioterapią [Thon et al., 2013].

Wyniki badań klinicznych w większości potwierdzają korzystny wpływ metylacji *MGMT* na skuteczność leczenia i długość przeżycia pacjentów z GBM, dowodząc wartości oceny metylacji tego genu jako markera predykcyjnego, a niekiedy również prognostycznego [Hegi et al., 2005; Hegi et al., 2008, Weller et al., 2009, Wick et al., 2012]. Marker ten nie jest jednak jeszcze wykorzystywany w praktyce klinicznej.

Do tej pory w większości badań wykorzystywano technikę MSP, po raz pierwszy opisaną przez zespół Hermana w 1996 roku [Herman et al., 1996 a]. Technika ta jest wygodna z racji swojej prostoty, stosunkowo niewielkich kosztów, oraz binarnego wyniku (gen zmetylowany lub niezmetylewany), co w praktyce klinicznej jest bardzo pożądane. Ma jednak również ograniczenia. Jednym z nich jest możliwość oceny tylko w wymiarze jakościowym, a także brak możliwości analizy stopnia metylacji poszczególnych dinukleotydów CpG, co może prowadzić do uzyskania nieprawidłowych wyników w przypadku prób, w których poziom metylacji nie jest homogeny.

W niniejszej pracy porównano wyniki metylacji genu *MGMT* uzyskane techniką MSP oraz pirosekwencjonowania. Sekwencja badana przy udziale tej ostatniej metody obejmowała trzy dinukleotydy CpG spośród dziewięciu badanych techniką MSP, oraz dwa dodatkowe (łącznie 5 dinukleotydów CpG). W ponad 90% badanych prób [91,21% 83/91] wyniki były zgodne z tymi jakie uzyskano metodą MSP.

Spośród 8 próbek w których uzyskano rozbieżny wynik 6 stanowiły przypadki, w których pirosekwencjonowanie wykazywało metylację, natomiast MSP wskazywało na brak metylacji genu. Dokładniejsza analiza tych niezgodnych wyników dostarczyła argumentów wskazujących, że weryfikacja szczególnie wyników MSP świadczących o braku metylacji, jest bardzo pożądana. Przykładowo analiza metodą MSP próbki T64 (*Astrocytoma fibrillare partim protoplasmaticum*, II stopień złośliwości w skali WHO) wykazała brak metylacji, podczas gdy pirosekwencjonowanie wskazywało na 18,70% udział zmetylowanych alleli w badanej próbce. Szczegółowe wartości procentowe dla kolejnych dinukleotydów CpG wynosiły odpowiednio dla CpG1 37,37%, CpG2 41,20%, CpG3 4,82%, CpG4 4,88% oraz dla CpG5 5,24%. Tym samym oznacza to, że trzy ostatnie dinukleotydy, badane techniką MSP, miały status niezmetylewany. Ten przykład ilustruje jak istotnym

jest dobór właściwych dinukleotydów CpG do analizy i tym samym do interpretacji klinicznej. Gdyby od wyniku analizy techniką MSP uzależnić leczenie, przykładowo pacjent T64 nie byłby zakwalifikowany do badań CENTRIC.

Rozbieżność w wynikach uzyskanych tymi dwoma technikami wynika przede wszystkim z faktu, że w metodzie MSP dla reakcji ze starterami dla sekwencji zmetylowanej produkt pojawia się zasadniczo wtedy, gdy wszystkie z badanych CpG będą zmetylowane. W przypadku częściowej metylacji, wydajność MSP jest trudna do oszacowania i trzeba założyć, że metylacja części takich heterogennych prób nie będzie wykryta. Tego typu problemy pozwala pokonać pirosekwencjonowanie.

W kontekście doniesień literaturowych warto zaznaczyć, że o ile znaczenie metylacji *MGMT* jako czynnika predykcyjnego, jest już dość dobrze udokumentowane [Weller et al., 2012], o tyle znaczenie tej zmiany jako czynnika prognostycznego, jest niejasne i niekiedy sprzeczne. Badania Crinière i wsp. wykazują, że u pacjentów nieleczonych metylacja *MGMT* nie ma wpływu, bądź jest złym czynnikiem rokowniczym (*negative impact on survival*) [Crinière et al., 2007]. Pojawiają się jednak doniesienia, że w populacji guzów glejowych III stopnia w skali WHO (anaplastyczne skąpodrzewiaki), pacjenci ze zmetylowanym *MGMT* mają dobre rokowania niezależnie od sposobu postępowania terapeutycznego [van den Bent et al., 2009, Thon et al., 2013]. Tym samym obserwacja poczyniona w niniejszej pracy dostarcza argumentu na korzyść tezy o braku znaczenia prognostycznego metylacji *MGMT* w kontekście przeżycia niezależnego od leczenia cytostatycznego.

Weryfikacja danych uzyskanych techniką MSP na drodze pirosekwencjonowania okazała się też bardzo przydatna w odniesieniu do analizy genu supresorowego *NDRG2*. Choć ekspresja tego zlokalizowanego na chromosomie 14q11.2 genu, nie była tak intensywnie badana jak *MGMT*, doniesienia kilku zespołów wskazywały, że produkt tego genu może hamować rozwój glejaków, a jego obniżona ekspresja w tych typach nowotworów jest wynikiem hipermetylacji promotora szczególnie w pierwotnych guzach glejowych, jak również w oponiakach [Lusis et al., 2005, Tepel et al., 2008, Li et al., 2011 a i b, Skiriutė et al., 2013]. Sugerowano więc, że metylacja *NDRG2* może stanowić nowy marker agresywności zarówno w odniesieniu do obu typów guzów OUN. Analiza metylacji fragmentu genu *NDRG2* obejmującego cztery dinukleotydy CpG techniką MSP wykonana w ramach niniejszej pracy nie wykazała metylacji w żadnym z badanych guzów OUN. Natomiast analiza techniką pirosekwencjonowania fragmentu genu zlokalizowanego w odległości 643 nt od tego analizowanego techniką MSP i obejmującego pięć kolejnych dinukleotydów wykazała metylację powyżej poziomu, stwierdzanego w tym samym fragmencie DNA zdrowej tkanki mózgu, w 70,73% (58/82) próbek glejaków. Najwyższą metylacją charakteryzował się dinukleotyd CpG4, w przypadku którego średni poziom metylacji wszystkich próbek wynosił 31,27%, natomiast najniższą wartość odnotowano dla CpG1 (14,23%). Średnie wartości metylacji wszystkich dinukleotydów CpG genu *NDRG2* nie przekraczały jednak 20% we wszystkich czterech stopniach złośliwości glejaków. W przypadku oponiaków odsetek zmetylowanych próbek był jeszcze wyższy niż w przypadku glejaków (84,00%; 21/25) i podobnie jak w przypadku tych ostatnich najwyższą metylację stwierdzono dla dinukleotydu

CpG4. Natomiast poziom metylacji dinukleotydu CpG5 korelował z czasem wolnym od wznowy oraz długością przeżycia chorych wskazując, że może on być markerem prognostycznym w tym typie nowotworów. Przetawione dane dowodzą więc zarówno konieczności weryfikacji stosowanych do analizy metylacji technik, jak i właściwego doboru próby kontrolnej do analizy techniką pirosekwencjonowania. Jej pozyskanie jest zawsze poważnym problemem, a szczególnie trudnym w odniesieniu do takiej tkanki jak mózg. Jest to jeden z powodów dla których poszukuje się alternatywnego w stosunku do wycinka guza pobranego w trakcie operacji lub pochodzącego z biopsji materiału do analizy metylacji DNA.

W niniejszej pracy podjęto próbę wykorzystania w tym celu wolnokrążącego DNA izolowanego z surowicy pacjentów, od których równolegle uzyskano także próbki materiału operacyjnego. W surowicy osób zdrowych stężenie wolnokrążącego DNA jest bardzo niskie (1ng/ml). U pacjentów onkologicznych wzrasta ok. 4 krotnie [Hodgson et al., 2010]. Trudność w izolacji sprawia jednak nie tylko małe stężenie, ale również silna fragmentacja pozyskanego DNA będąca wynikiem apoptozy lub nekrozy. W odniesieniu do guzów mózgu podnosi się również kwestię bariery krew-mózg jako czynnika ograniczającego ilość DNA wolnokrążącego we krwi obwodowej, co jednak nie uniemożliwia pozyskania wystarczającej jego ilości do analiz molekularnych [Weaver et al., 2006].

Dzięki optymalizacji metody izolacji udało się uzyskać dostateczną ilość wolnokrążącego DNA do dalszej analiz genów, dla których stwierdzono najwyższy poziom metylacji w próbkach guzów OUN. Status metylacji większości analizowanych genów w wolnokrążącym DNA w dużej mierze odpowiadał temu jaki stwierdzano w DNA pochodzącym z tkanki guza. Najwyższy poziom metylacji stwierdzono dla genu *RASSF1A*. Co więcej metylacja tego genu umożliwiała różnicowanie pierwotnych guzów glejowych od guzów przerzutowych. Dane te potwierdzają obserwacje innych autorów, że bariera krew-mózg umożliwia przenikanie nowotworowego DNA do układu krążenia [Lavon et al., 2010, Weaver et al., 2006]. Jednocześnie wskazują, że wolnokrążący DNA może być przydatny do oceny epigenetycznych markerów guzów mózgu dla celów klinicznych.

Podsumowując należy stwierdzić, że przeprowadzone badania dostarczyły dowodów na możliwość różnicowania/diagnozowania nowotworów mózgu o różnym stopniu złośliwości w oparciu o profil metylacji wybranego do badań panelu genów. Niektóre z tych markerów mogą być przydatne w kwalifikacji do określonego schematu leczenia i/lub monitorowania terapii. Stosunkowo duża zgodność profilu metylacji w DNA wolnokrążącym i pochodzącym z tkanki guza wskazuje też na możliwość jego wykorzystania do celów diagnostycznych. Wykorzystanie tych danych w praktyce klinicznej wymaga jednak dalszej walidacji i potwierdzenia w odniesieniu do większej grupy pacjentów z nowotworami OUN.

## VI. Podsumowanie i wnioski

1. Przeprowadzone badania wykazały, że guzy glejowe charakteryzuje wyższy współczynnik metylacji (WM) analizowanych genów w porównaniu z oponiakami. Ponadto w odniesieniu do glejaków wartość tego współczynnika jest powiązana ze stopniem złośliwości wg klasyfikacji WHO, a także wiekiem pacjentów. Takiej zależności nie stwierdzono w oponiakach.
2. Analiza techniką MSP wykazała, że w guzach glejowych najczęściej zmetylowane są geny *RASSF1A*, *RUNX3*, *GATA6* oraz *MGMT*, w mniejszym zaś stopniu geny w obrębie locus *INK4B-ARF-INK4A* oraz *ATM*. Geny *ERCC1*, *hMLH1* oraz *NDRG2* były niezmetrylowane. Natomiast w oponiakach najczęściej zmetylowanym genem był *p14ARF*, a także *RASSF1A* i *p15INK4B*, rzadziej zaś *RUNX3* i *GATA6*. Geny *p16INK4A*, *ATM* oraz *RARβ* były zmetylowane w marginalnej liczbie próbek, zaś niezmetrylowane były *hMLH1*, *NDRG2* oraz *PTEN*.
3. W obydwu typach guzów metylacja *RUNX3* w sposób istotny korelowała ze stopniem złośliwości, a także, w grupie glejaków, z wiekiem pacjentów. Ponadto w oponiakach gen *RASSF1A* był relatywnie częściej zmetylowany u mężczyzn aniżeli u kobiet. Metylacja tego genu wydaje się być także elementem różnicującym guzy glejowe i przerzutowe do OUN.
4. Dalsza analiza genu *MGMT* techniką pirosekwencjonowania potwierdziła znaczący odsetek zmetylowanego wariantu tego genu u pacjentów z glejakiem. Wykazała jednocześnie, że najwyższy poziom metylacji charakteryzuje dinukleotyd CpG2, natomiast najniższy CpG5. Natomiast poziom metylacji dinukleotydów CpG3 i CpG4 wzrastał wraz z wiekiem pacjentów. Te obserwacje potwierdzają jednocześnie przydatność oceny metylacji *MGMT* do przewidywania skuteczności terapii związkami alkilującymi.
5. Porównanie poziomu metylacji genu *NDRG2* ocenianej techniką pirosekwencjonowania zarówno w glejakach jak i oponiakach, z metylacją tego genu w zdrowej tkance mózgu wykazało znacząco wyższy odsetek metylacji w tkance nowotworowej. Najwyższą wartość procentową metylacji odnotowano dla dinukleotydu CpG4, natomiast najniższą dla CpG1.
6. Analiza profilu metylacji badanych genów w wolnokrążącym DNA surowicy wykazała w dużej mierze zgodność z profilem metylacji stwierdzanym w DNA guzów pochodzących od tych samych pacjentów wskazując, że wolnokrążący DNA może być dobrą alternatywą dla materiału operacyjnego, bądź biopsyjnego do celów diagnostycznych.
7. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują, że analiza profilu metylacji całego panelu badanych genów jak i indywidualnych genów, wyselekcjonowanych w toku analizy może być przydatna w diagnostyce nowotworów ONU, szczególnie w odniesieniu do guzów, których diagnoza histopatologiczna jest niejednoznaczna.

## VII. Piśmiennictwo

Agathangelou A, Bièche I, Ahmed-Choudhury J, Nicke B, Dammann R, Baksh S, Gao B, Minna JD, Downward J, Maher ER, Latif F (2003) Identification of novel gene expression targets for the Ras association domain family 1 (RASSF1A) tumor suppressor gene in non-small cell lung cancer and neuroblastoma. *Cancer Res.* 63: 5344-51.

Agathangelou A, Cooper WN, Latif F (2005) Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Res.* 65: 3497-508.

Ahn JY, Rong R, Liu X, Ye K (2004) PIKE/nuclear PI 3-kinase signaling mediates the antiapoptotic actions of NGF in the nucleus. *EMBO J.* 23: 3995-4006.

Alvarez S, Germain P, Alvarez R, Rodríguez-Barrios F, Gronemeyer H, de Lera AR (2007) Structure, function and modulation of retinoic acid receptor beta, a tumor suppressor. *Int J Biochem Cell Biol.* 39: 1406-15.

Amatya VJ, Takeshima Y, Inai K (2004) Methylation of p14(ARF) gene in meningiomas and its correlation to the p53 expression and mutation. *Mod Pathol.* 17: 705-10.

Avci CB, Dodurga Y, Susluer SY, Sigva ZO, Yucebas M, Caglar HO, Akalin T, Dalbasti T, Oktar N, Gunduz C (2013) Promoter hypermethylation-mediated down-regulation of RUNX3 gene in human brain tumors. *Ir J Med Sci.* PMID: 23934435.

Avruch J, Praskova M, Ortiz-Vega S, Liu M, Zhang XF (2006) Nore1 and RASSF1 regulation of cell proliferation and of the MST1/2 kinases. *Methods Enzymol.* 407: 290-310.

Baer-Dubowska W (2003) Chemoprewencja – profilaktyka i terapia wspomaganą raków głowy i szyi. *post Chir Głowy i Szyi* 2: 3-14.

Baksh S, Tommasi S, Fenton S, Yu VC, Martins LM, Pfeifer GP, Latif F, Downward J, Neel BG (2005) The tumor suppressor RASSF1A and MAP-1 link death receptor signaling to Bax conformational change and cell death *Mol Cell.* 18: 637-50.

Barciszewska AM (2010) Analiza składników DNA guzów nowotworowych mózgu u człowieka. Praca Doktorska Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Baylin SB (2005) DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2: 4-11.

Baylin SB, Jones PA (2011) A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer.* 11: 726-34.

Bazan V, Bruno L, Augello C, Agnese V, Calo V, Corsale S, Gargano G, Terrasi M, Schiro V, Di Fede G, Adamo V, Intrivici C, Crosta A, Rinaldi G, Latteri F, Dardanoni G, Grassi N, Valerio MR, Colucci G, Macaluso M, Russo A (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.

Bian EB, Zong G, Xie YS, Meng XM, Huang C, Li J, Zhao B (2014) TET family proteins: new players in gliomas. *J Neurooncol*. PMID: 24395347.

Blumenthal DT, Cannon-Albright LA (2008) Familiality in brain tumors. *Neurology*. 71: 1015-20.

Blyth K, Cameron ER, Neil JC (2005) The RUNX genes: gain or loss of function in cancer, *Nat Rev Cancer*. 5: 376-87.

Bogdanovic O, Veenstra GJ (2009) DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma*. 118: 549–65.

Brait M & Sidransky D (2011) Cancer epigenetics: above and beyond. *Toxicol Mech Methods*. 21: 275-88.

Brock MV, Hooker CM, Ota-Machida E, Han Y, Guo M, Ames S, Glöckner S, Piantadosi S, Gabrielson E, Pridham G, Pelosky K, Belinsky SA, Yang SC, Baylin SB, Herman JG (2008) DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer. *N Engl J Med*. 358: 1118-28.

Buffart TE, Overmeer RM, Steenbergen RD, Tijssen M, van Grieken NC, Snijders PJ, Grabsch HI, van de Velde CJ, Carvalho B, Meijer GA (2008) MAL promoter hypermethylation as a novel prognostic marker in gastric cancer. *Br J Cancer*. 99: 1802–7.

Bushue N & Wan YJ (2010) Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*. 62: 1285-98.

Cairns P, Esteller M, Herman JG, Schoenberg M, Jeronimo C, Sanchez-Cespedes M, Chow NH, Grasso M, Wu L, Westra WB, Sidransky D (2001) Molecular detection of prostate cancer in urine by GSTP1 hypermethylation. *Clin Cancer Res*. 7: 2727-30.

Cairns P (2007) Gene methylation and early detection of genitourinary cancer: the road ahead. *Nat Rev Cancer*. 7: 531-43.

Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, Shimizu M, Cimmino A, Zupo S, Dono M, Dell'Aquila ML, Alder H, Rassenti L, Kipps TJ, Bullrich F, Negrini M, Croce CM (2004) MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101: 11755-60.

Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, Farina M, Lee JS, Conner EA, Schroeder I, Factor VM, Thorgeirsson SS (2007) Mechanistic and prognostic significance of aberrant methylation in the molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest*. 117: 2713-22.

Carén H, Pollard SM, Beck S (2013) The good, the bad and the ugly: epigenetic mechanisms in glioblastoma. *Mol Aspects Med*. 34: 849-62.

Cawley S, Bekiranov S, Ng HH, Kapranov P, Sekinger EA, Kampa D, Piccolboni A, Sementchenko V, Cheng J, Williams AJ, Wheeler R, Wong B, Drenkow J, Yamanaka M, Patel S, Brubaker S, Tammana H, Helt G, Struhl K, Gingeras TR (2004) Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell*. 116: 499-509.



Cecener G, Tunca B, Egeli U, Bekar A, Tezcan G, Erturk E, Bayram N, Tolunay S (2012) The promoter hypermethylation status of GATA6, MGMT, and FHIT in glioblastoma. *Cell Mol Neurobiol.* 32: 237-44.

Cencioni C, Spallotta F, Martelli F, Valente S, Mai A, Zeiher AM, Gaetano C (2013) Oxidative stress and epigenetic regulation in ageing and age-related diseases. *Int J Mol Sci.* 14: 17643-63.

Chan KC & Lo YM (2007) Circulating tumour-derived nucleic acids in cancer patients: potential applications as tumour markers. *Br J Cancer.* 96: 681–5.

Chen HY, Shao CJ, Chen FR, Kwan AL, Chen ZP (2010) Role of ERCC1 promoter hypermethylation in drug resistance to cisplatin in human gliomas. *Int J Cancer.* 126: 1944-54.

Chen PC, Tsai MH, Yip SK, Jou YC, Ng CF, Chen Y, Wang X, Huang W, Tung CL, Chen GC, Huang MM, Tong JH, Song EJ, Chang DC, Hsu CD, To KF, Shen CH, Chan MW (2011) Distinct DNA methylation epigenotypes in bladder cancer from different Chinese sub-populations and its implication in cancer detection using voided urine. *BMC Med Genomics.* 20: 4-45.

Chen MN, Wang P, Zhang J, Zhou BY, Mao Q, Liu YH (2012) Analysis of the role of hMLH1 hypermethylation and microsatellite instability in meningioma progression. *Genet Mol Res.* 11: 3933-41.

Chen QW, Zhu XY, Li YY, Meng ZQ (2014) Epigenetic regulation and cancer. *Oncol Rep.* 31: 523-32.

Chodavarapu RK, Feng S, Bernatavichute YV, Chen PY, Stroud H, Yu Y, Hetzel JA, Kuo F, Kim J, Cokus SJ, Casero D, Bernal M, Huijser P, Clark AT, Krämer U, Merchant SS, Zhang X, Jacobsen SE, Pellegrini M (2010) Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation. *Nature.* 466: 388–92.

Choudhuri S (2009) Lesser known relatives of miRNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 388: 177-80.

Choudhuri S, Cui Y, Klaassen CD (2010) Molecular targets of epigenetic regulation and effectors of environmental influences. *Toxicol Appl Pharmacol.* 245: 378-93.

Choudhuri S (2011) From Waddington's epigenetic landscape to small noncoding RNA: some important milestones in the history of epigenetics research. *Toxicol Mech Methods.* 21: 252-74.

Chuang LS, Ito Y (2010) RUNX3 is multifunctional in carcinogenesis of multiple solid tumors. *Oncogene* 29: 2605–15.

Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM (2005) miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 13944-9.

Clarke N, Germain P, Altucci L, Gronemeyer H (2004) Retinoids: potential in cancer prevention and therapy. *Expert Rev Mol Med.* 6: 1-23.

Cortellino S, Xu J, Sannai M, Moore R, Caretti E, Cigliano A, Le Coz M, Devarajan K, Wessels A, Soprano D, Abramowitz LK, Bartolomei MS, Rambow F, Bassi MR, Bruno T, Fanciulli M, Renner C, Klein-Szanto AJ, Matsumoto Y, Kobi D, Davidson I, Alberti C, Larue L, Bellacosa A (2011) Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell.* 146: 67-79.

Crinière E, Kaloshi G, Laigle-Donadey F, Lejeune J, Auger N, Benouaich-Amiel A, Everhard S, Mokhtari K, Polivka M, Delattre JY, Hoang-Xuan K, Thillet J, Sanson M (2007) MGMT prognostic impact on glioblastoma is dependent on therapeutic modalities. *J Neurooncol.* 83: 173-9.

Croteau DL, Peng Y, Van Houten B (2008) DNA repair gets physical: mapping an XPA-binding site on ERCC1. *DNA Repair (Amst).* 7: 819-26.

Dallol A, Agathangelou A, Fenton SL, Ahmed-Choudhury J, Hesson L, Vos MD, Clark GJ, Downward J, Maher ER, Latif F (2004) RASSF1A interacts with microtubule-associated proteins and modulates microtubule dynamics. *Cancer Res.* 64: 4112-6.

Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP (2000) Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet.* 25: 315-9.

Dammann R, Schagdarsurengin U, Strunnikova M, Rastetter M, Seidel C, Liu L, Tommasi S, Pfeifer GP (2003) Epigenetic inactivation of the Ras-association domain family 1 (RASSF1A) gene and its function in human carcinogenesis. *Histol Histopathol.* 18: 665-77.

Dammann R, Schagdarsurengin U, Seidel C, Strunnikova M, Rastetter M, Baier K, Pfeifer GP (2005) The tumor suppressor RASSF1A in human carcinogenesis: an update. *Histol Histopathol.* 20: 645-63.

Déléris P, Gayral S, Breton-Douillon M (2006) Nuclear PtdIns(3,4,5)P3 signaling: an ongoing story. *J Cell Biochem.* 98: 469-85.

Deng S, Calin GA, Croce CM, Coukos G, Zhang L (2008) Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer. *Cell Cycle.* 7: 2643-6.

Deplus R, Brenner C, Burgers WA, Putmans P, Kouzarides T, de Launoit Y, Fuks F (2002) Dnmt3L is a transcriptional repressor that recruits histone deacetylase. *Nucleic Acids Res.* 30: 3831-8.

de Robles P, McIntyre J, Kalra S, Roldán G, Cairncross G, Forsyth P, Magliocco T, Hamilton M, Easaw J (2008) Methylation status of MGMT gene promoter in meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet.* 187: 25-7.

Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, Diaz LA Jr, Goodman SN, David KA, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B (2005) Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 16368-73.

Dong SM, Lee EJ, Jeon ES, Park CK, Kim KM (2005) Progressive methylation during the serrated neoplasia pathway of the colorectum. *Mod Pathol.* 18: 170-8.

Dulaimi E, Ibanez de Caceres I, Uzzo RG, Al-Saleem T, Greenberg RE, Polascik TJ, Babb JS, Grizzle WE, Cairns P (2004) Promoter hypermethylation profile of kidney cancer. *Clin Cancer Res.* 10: 3972-9.

Dumitrescu RG (2012) Epigenetic markers of early tumor development. *Methods Mol Biol.* 863: 3-14.

Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R (2003) Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science.* 300: 455.

Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG (1999) Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res.* 59: 793-7.

Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG (2001). A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 61: 3225-9.

Esteller M (2002) CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene.* 21: 5427-40.

Estève PO, Chin HG, Benner J, Feehery GR, Samaranayake M, Horwitz GA, Jacobsen SE, Pradhan S (2009) Regulation of DNMT1 stability through SET7-mediated lysine methylation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106: 5076-81.

Everhard S, Tost J, El Abdalaoui H, Crinière E, Busato F, Marie Y, Gut IG, Sanson M, Mokhtari K, Laigle-Donadey F, Hoang-Xuan K, Delattre JY, Thillet J (2009) Identification of regions correlating MGMT promoter methylation and gene expression in glioblastomas. *Neuro Oncol.* 11: 348-56.

Feinberg AP, Vogelstein B (1983) Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts *Nature.* 301: 89-92.

Felsberg J, Thon N, Eigenbrod S, Hentschel B, Sabel MC, Westphal M, Schackert G, Kreth FW, Pietsch T, Löffler M, Weller M, Reifenberger G, Tonn JC; German Glioma Network (2011) Promoter methylation and expression of MGMT and the DNA mismatch repair genes MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 in paired primary and recurrent glioblastomas. *Int J Cancer.* 129: 659-70.

Ferrara N, Keyt B (1997) Vascular endothelial growth factor: basic biology and clinical implications. *EXS.* 79: 209-32.

Fiegl H, Millinger S, Mueller-Holzner E, Marth C, Ensinger C, Berger A, Klocker H, Goebel G, Widschwendter M (2005) Circulating tumor-specific DNA: a marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients *Cancer Res.* 65: 1141-5.

Fijuth J & Dziaduszek R (Red) Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych: Nowotwory ośrodkowego układu nerwowego. PTOK 2013. <http://www.onkologia.zalecenia.med.pl>

Foley CJ, Freedman H, Choo SL, Onyskiw C, Fu NY, Yu VC, Tuszynski J, Pratt JC, Baksh S (2008) Dynamics of RASSF1A/MOAP-1 association with death receptors. *Mol Cell Biol.* 28: 4520-35.

- Fong SL, Zhang JT, Lim CK, Eu KW, Liu Y (2009) Comparison of 7 methods for extracting cell-free DNA from serum samples of colorectal cancer patients. *Clin Chem.* 55: 587-9.
- Fraga MF, Herranz M, Espada J, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Erkek E, Bozdogan O, Peinado H, Niveleau A, Mao JH, Balmain A, Cano A, Esteller M (2004) A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors. *Cancer Res.* 64: 5527-34.
- Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Pérez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M (2005) Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet.* 37: 391-400.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19: 92–105.
- Fukushima T, Katayama Y, Watanabe T, Yoshino A, Ogino A, Ohta T, Komine C (2005) Promoter hypermethylation of mismatch repair gene hMLH1 predicts the clinical response of malignant astrocytomas to nitrosourea. *Clin Cancer Res.* 11: 1539–44.
- Fulci G, Labuhn M, Maier D, Lachat Y, Hausmann O, Hegi ME, Janzer RC, Merlo A, Van Meir EG (2000) p53 gene mutation and ink4a-arf deletion appear to be two mutually exclusive events in human glioblastoma. *Oncogene.* 19: 3816-22.
- García JM, Silva J, Peña C, Garcia V, Rodríguez R, Cruz MA, Cantos B, Provencio M, España P, Bonilla F (2004) Promoter methylation of the PTEN gene is a common molecular change in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 41: 117-24.
- Gautschi O, Bigosch C, Huegli B, Jermann M, Marx A, Chasse E, Ratschiller D, Weder W, Joerger M, Betticher DC, Stahel RA, Ziegler A (2004) Circulating deoxyribonucleic acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *J Clin Oncol.* 22: 4157–64.
- Gibney ER, Nolan CM (2010) Epigenetics and gene expression. *Heredity (Edinb).* 105: 4-13.
- Gil J & Peters G (2006) Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7: 667-77.
- Glöckner SC, Dhir M, Yi JM, McGarvey KE, Van Neste L, Louwagie J, Chan TA, Kleeberger W, de Bruïne AP, Smits KM, Khalid-de Bakker CA, Jonkers DM, Stockbrügger RW, Meijer GA, Oort FA, Iacobuzio-Donahue C, Bierau K, Herman JG, Baylin SB, Van Engeland M, Schuebel KE, Ahuja N (2009) Methylation of TFPI2 in stool DNA: a potential novel marker for the detection of colorectal cancer. *Cancer Res.* 69: 4691-9.

Gömöri E, Pál J, Mészáros I, Dóczi T, Matolcsy A (2007) Epigenetic inactivation of the hMLH1 gene in progression of gliomas. *Diagn Mol Pathol.* 16: 104-7.

Grønbaek K, Worm J, Ralfkiaer E, Ahrenkiel V, Hokland P, Guldborg P (2002) ATM mutations are associated with inactivation of the ARF-TP53 tumor suppressor pathway in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 100: 1430-7.

Guo M, Akiyama Y, House MG, Hooker CM, Heath E, Gabrielson E, Yang SC, Han Y, Baylin SB, Herman JG, Brock MV (2004) Hypermethylation of the GATA genes in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 10: 7917-24.

Gupta K & Salunke P (2012) Molecular markers of glioma: an update on recent progress and perspectives. *J Cancer Res Clin Oncol.* 138: 1971-81.

Hamilton JA, Stewart LM, Ajayi L, Gray IC, Gray NE, Roberts KG, Watson GJ, Kaisary AV, Snary D (2000) The expression profile for the tumour suppressor gene PTEN and associated polymorphic markers. *Br J Cancer.* 82: 1671–6.

Hamilton JP (2011) Epigenetics: principles and practice. *Dig Dis.* 29: 130-5.

Hanahan D & Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144: 646-74.

Håvik AB, Brandal P, Honne H, Dahlback HS, Scheie D, Hektoen M, Meling TR, Helseth E, Heim S, Lothe RA, Lind GE (2012) MGMT promoter methylation in gliomas-assessment by pyrosequencing and quantitative methylation-specific PCR. *J Transl Med.* 10: 36.

He J, Olson JJ and James CD (1995) Lack of p16INK4 or retinoblastoma protein (pRb), or amplification-associated overexpression of cdk4 is observed in distinct subsets of malignant glial tumors and cell lines. *Cancer Res.* 55: 4833-36.

He J, Qiao JB, Zhu H (2011) p14ARF promoter region methylation as a marker for gliomas diagnosis. *Med Oncol.* 28: 1218-24.

He S, Pham MH, Pease M, Zada G, Giannotta SL, Wang K, Mack WJ (2013) A review of epigenetic and gene expression alterations associated with intracranial meningiomas. *Neurosurg Focus.* 35: E5.

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 352: 997-1003.

Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, Mehta MP, Gilbert MR (2008) Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol.* 26: 4189–99.

Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD and Baylin SB (1996 a) Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9821-6.

Herman JG, Jen J, Merlo A and Baylin SB (1996 b) Hypermethylation associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B1. *Cancer Res.* 56: 722-7.

Herrup K (2013) ATM and the epigenetics of the neuronal genome. *Mech Ageing Dev.* 134: 434-9.

Hesson L, Bieche I, Krex D, Criniere E, Hoang-Xuan K, Maher ER and Latif F (2004) Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A and BLU genes located within the critical 3p21.3 region in gliomas. *Oncogene.* 23: 2408-19.

Hino R, Uozaki H, Murakami N, Ushiku T, Shinozaki A, Ishikawa S, Morikawa T, Nakaya T, Sakatani T, Takada K, Fukayama M (2009) Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV latent membrane protein 2A leads to promoter hypermethylation of PTEN gene in gastric carcinoma. *Cancer Res.* 69: 2766-74.

Hodgson DR, Wellings R, Orr MC, McCormack R, Malone M, Board RE, Cantarini MV (2010) Circulating tumour-derived predictive markers in oncology. *Drug Discov Today.* 15: 98-101.

Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD (1999) New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene.* 18: 5356-62.

Hoque MO, Feng Q, Toure P, Dem A, Critchlow CW, Hawes SE, Wood T, Jeronimo C, Rosenbaum E, Stern J, Yu M, Trink B, Kiviat NB, Sidransky D (2006) Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer. *J Clin Oncol.* 24: 4262-9.

Horiguchi K, Tomizawa Y, Tosaka M, Ishiuchi S, Kurihara H, Mori M, Saito N (2003) Epigenetic inactivation of RASSF1A candidate tumor suppressor gene at 3p21.3 in brain tumors. *Oncogene.* 22: 7862-5.

Ichimura K, Schmidt EE, Goike HM and Collins VP (1996) Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16INK4A, MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene. *Oncogene.* 13: 1065-72.

Ichimura K, Bolin MB, Goike HM, Schmidt EE, Moshref A and Collins VP (2000) Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities. *Cancer Res.* 60: 417-24.

Ito Y (2004) Oncogenic potential of the RUNX gene family: 'overview'. *Oncogene.* 23: 4198-208.

Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, Cui H, Gabo K, Rongione M, Webster M, Ji H, Potash JB, Sabunciyan S, Feinberg AP (2009) The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet.* 41: 178-86.

Isharwal S, Miller MC, Marlow C, Makarov DV, Partin AW, Veltri RW (2008) p300 (histone acetyltransferase) marker predicts prostate cancer biochemical recurrence and correlates with changes in epithelia nuclear size and shape. *Prostate.* 68: 1097-104.

Jen J, Harper JW, Bigner SH, Bigner DD, Papadopoulos N, Markowitz S, Willson JK, Kinzler KW, Vogelstein B (1994) Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. *Cancer Res.* 54: 6353-8.

Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet.* 19: 187-91.

Jones PA & Laird PW (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet.* 21: 163-7.

Katayama Y, Takahashi M, Kuwayama H (2009) *Helicobacter pylori* causes runx3 gene methylation and its loss of expression in gastric epithelial cells, which is mediated by nitric oxide produced by macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 388: 496–500.

Kamnasaran D & Guha A (2005) Expression of GATA6 in the human and mouse central nervous system. *Dev. Brain Res.* 160: 90-5.

Kanamori M, Kon H, Nobukuni T, Nomura S, Sugano K, Mashiyama S, Kumabe T, Yoshimoto T, Meuth M, Sekiya T, Murakami Y (2000) Microsatellite instability and the PTEN1 gene mutation in a subset of early onset gliomas carrying germline mutation or promoter methylation of the hMLH1 gene. *Oncogene.* 19: 1564–71.

Kaplan N, Moore IK, Fondufe-Mittendorf Y, Gossett AJ, Tillo D, Field Y, LeProust EM, Hughes TR, Lieb JD, Widom J, Segal E (2009) The DNA-encoded nucleosome organization of a eukaryotic genome. *Nature* 458: 362–6.

Kastan MB & Lim DS (2000) The many substrates and functions of ATM. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1:179-86.

Kim GD, Choi YH, Dimtchev A, Jeong SJ, Dritschilo A, Jung M (1999) Sensing of ionizing radiation-induced DNA damage by ATM through interaction with histone deacetylase. *J Biol Chem.* 274: 31127-30.

Kim WJ, Vo QN, Shrivastav M, Lataxes TA, Brown KD (2002) Aberrant methylation of the ATM promoter correlates with increased radiosensitivity in a human colorectal tumor cell line. *Oncogene.* 21: 3864-71.

Kim WJ, Kim EJ, Jeong P, Quan C, Kim J, Li QL, Yang JO, Ito Y, Bae SC (2005) RUNX3 inactivation by point mutations and aberrant DNA methylation in bladder tumors. *Cancer Res.* 65: 9347–54.

King-Batoon A, Leszczynska JM, Klein CB (2008) Modulation of gene methylation by genistein or lycopene in breast cancer cells. *Environ Mol Mutagen.* 49: 36-45.

Knobbe CB, Merlo A, Reifenberger G (2002) Pten signaling in gliomas. *Neuro Oncol.* 4: 196-211.

Knudson AG Jr (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 68: 820-3.

Kondo Y, Shen L, Ahmed S, Boumber Y, Sekido Y, Haddad BR, Issa JP (2008) Downregulation of histone H3 lysine 9 methyltransferase G9a induces centrosome disruption and chromosome instability in cancer cells. *PLoS One*. 3: e2037.

Koul D (2008) PTEN signaling pathways in glioblastoma. *Cancer Biol Ther*. 7: 1321-5.

Krawczyk B, Rychlewski P, Fabianowska-Majewska K (2006) PTEN - białko supresorowe: regulacja aktywności białka i ekspresji genu. *Post. Biol. Kom.* 33: 365-80.

Krivtsov AV, Armstrong SA (2007) MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer*. 7: 823-33.

Kudo Y, Tsunematsu T, Takata T (2011) Oncogenic role of RUNX3 in head and neck cancer. *J Cell Biochem*. 112: 387-93.

Kuo LT, Kuo KT, Lee MJ, Wei CC, Scaravilli F, Tsai JC, Tseng HM, Kuo MF, Tu YK (2009) Correlation among pathology, genetic and epigenetic profiles, and clinical outcome in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer*. 124: 2872-9.

Laird PW (2003) The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer*. 3: 253-66.

Laudet V & Gronemeyer H (2002) *The nuclear receptor facts book*. Academic Press, San Diego.

Lavon I, Refael M, Zelikovitch B, Shalom E, Siegal T (2010) Serum DNA can define tumor-specific genetic and epigenetic markers in gliomas of various grades. *Neuro Oncol*. 12: 173-80.

Lee HS, Kim BH, Cho NY, Yoo EJ, Choi M, Shin SH, Jang JJ, Suh KS, Kim YS, Kang GH (2009) Prognostic implications of and relationship between CpG island hypermethylation and repetitive DNA hypomethylation in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 15: 812-20.

Lee YM (2011) Control of RUNX3 by histone methyltransferases. *J Cell Biochem*. 112: 394-400.

Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AA, Braunschweig U, Perez-Burgos L, Kubicek S, Chen T, Li E, Jenuwein T, Peters AH (2003) Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol*. 13: 1192-200.

Leon SA, Ehrlich GE, Shapiro B, Labbate VA (1977) Free DNA in the serum of rheumatoid arthritis patients. *J Rheumatol*. 4: 139-43.

Levanon D, Negreanu V, Bernstein Y, Bar-Am I, Avivi L, Groner Y (1994) AML1, AML2, and AML3, the human members of the runt domain gene-family: cDNA structure, expression, and chromosomal localization. *Genomics*. 23: 425-32.

Levenson VV (2010) DNA methylation as a universal marker. *Expert Rev Mol Diagn*. 10: 481-8.



Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R (1997) PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*. 275: 1943-7.

Li AG, Piluso LG, Cai X, Wei G, Sellers WR, Liu X (2006) Mechanistic insights into maintenance of high p53 acetylation by PTEN. *Mol Cell*. 23: 575-87.

Li J, Han YR, Plummer MR, Herrup K (2009) Cytoplasmic ATM in neurons modulates synaptic function. *Curr Biol*. 19: 2091-6.

Li L, Wang J, Shen X, Wang L, Li X, Liu Y, Shi M, Zhao G, Deng Y (2011 - a) Expression and prognostic value of NDRG2 in human astrocytomas. *J Neurol Sci*. 308: 77–82.

Li W, Chu D, Chu X, Meng F, Wei D, Li H, Sun B (2011 - b) Decreased expression of NDRG2 is related to poor overall survival in patients with glioma. *J Clin Neurosci*. 18: 1534–37.

Li L, Qin X, Shi M, Miao R, Wang L, Liu X, Yao L, Deng Y (2012) Regulation of histone acetylation by NDRG2 in glioma cells. *J Neurooncol*. 106: 485-92.

Lian Z & Di Cristofano A (2005) Class reunion: PTEN joins the nuclear crew. *Oncogene*. 24: 7394-400.

Lim DH & Maher ER (2010) Genomic imprinting syndromes and cancer. *Adv Genet*. 70: 145-75.

Lim U & Song MA (2012) Dietary and lifestyle factors of DNA methylation. *Methods Mol Biol*. 863: 359-76.

Liu L, Tommasi S, Lee DH, Dammann R, Pfeifer GP (2003) Control of microtubule stability by the RASSF1A tumor suppressor. *Oncogene*. 22: 8125-36.

Liu N, Wang L, Liu X, Yang Q, Zhang J, Zhang W, Wu Y, Shen L, Zhang Y, Yang A, Han H, Zhang J, Yao L (2007) Promoter methylation, mutation, and genomic deletion are involved in the decreased NDRG2 expression levels in several cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 358: 164–9.

Liu N, Wang L, Li X, Yang Q, Liu X, Zhang J, Zhang J, Wu Y, Ji S, Zhang Y, Yang A, Han H, Yao L (2008) N-Myc downstream-regulated gene 2 is involved in p53-mediated apoptosis. *Nucleic Acids Res*. 36: 5335-49.

Liu ZG, Chen HY, Cheng JJ, Chen ZP, Li XN, Xia YF (2009) Relationship between methylation status of ERCC1 promoter and radiosensitivity in glioma cell lines. *Cell Biol Int.* 33: 1111-7.

Lofton-Day C, Model F, Devos T, Tetzner R, Distler J, Schuster M, Song X, Lesche R, Liebenberg V, Ebert M, Molnar B, Grützmann R, Pilarsky C, Sledziewski A (2008) DNA methylation markers for blood-based colorectal cancer screening. *Clin Chem.* 54: 414-23.

Lorente A, Mueller W, Urdangarín E, Lázcoz P, Lass U, von Deimling A, Castresana JS (2009) RASSF1A, BLU, NORE1A, PTEN and MGMT expression and promoter methylation in gliomas and glioma cell lines and evidence of deregulated expression of de novo DNMTs. *Brain Pathol.* 19: 279-92.

Lorincz AT (2011) The Promise and the Problems of Epigenetics Markers in Cancer. *Expert Opin Med Diagn.* 5: 375-9.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK (eds) (2007 a) WHO Classification of tumours of the central nervous system. IARC, Lyon.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007 b) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 114: 97-109.

Lucio-Eterovic AK, Cortez MA, Valera ET, Motta FJ, Queiroz RG, Machado HR, Carlotti CG Jr, Neder L, Scrideli CA, Tone LG (2008) Differential expression of 12 histone deacetylase (HDAC) genes in astrocytomas and normal brain tissue: class II and IV are hypoexpressed in glioblastomas. *BMC Cancer.* 8: 243.

Lusis EA, Watson MA, Chicoine MR, Lyman M, Roerig P, Reifenberger G, Gutmann DH, Perry A (2005) Integrative genomic analysis identifies NDRG2 as a candidate tumor suppressor gene frequently inactivated in clinically aggressive meningioma. *Cancer Res.* 65: 7121-6.

Maeda M, Ohashi K, Ohashi-Kobayashi A (2005) Further extension of mammalian GATA-6. *Dev Growth Differ.* 47: 591-600.

Maldonado L & Hoque MO (2010) Epigenomics and ovarian carcinoma. *Biomark Med.* 4: 543-70.

Malley DS, Hamoudi RA, Kocalkowski S, Pearson DM, Collins VP, Ichimura K (2011) A distinct region of the MGMT CpG island critical for transcriptional regulation is preferentially methylated in glioblastoma cells and xenografts. *Acta Neuropathol.* 121: 651-61.

Malpeli G, Amato E, Dandrea M, Fumagalli C, Debattisti V, Boninsegna L, Pelosi G, Falconi M, Scarpa A (2011) Methylation-associated down-regulation of RASSF1A and up-regulation of RASSF1C in pancreatic endocrine tumors. *BMC Cancer.* 11: 351.

Mandel P & Métais P (1947) Les acides nucléiques du plasma sanguine chez l'homme. CR Acad Sci Paris. 142: 241–3.

Mao WM, Li P, Zheng QQ, Wang CC, Ge MH, Hu FJ, Fang XH, Dong ZM, Ling ZQ (2011) Hypermethylation-modulated downregulation of RASSF1A expression is associated with the progression of esophageal cancer. Arch Med Res. 42: 182-8.

Marinoglou K (2012) The role of the DNA damage response kinase ataxia telangiectasia mutated in neuroprotection. Yale J Biol Med. 85: 469-80.

Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P (2009) Function of retinoic acid receptors during embryonic development. Nucl Recept Signal. 7: e002.

Martin SA, Lord CJ, Ashworth A (2010) Therapeutic targeting of the DNA mismatch repair pathway. Clin Cancer Res. 16: 5107-13.

Maruyama R, Sugio K, Yoshino I, Maehara Y, Gazdar A (2004) Hypermethylation of FHIT as a prognostic marker in nonsmall cell lung carcinoma. Cancer. 10: 1472-7.

McNamara MG, Sahebjam S, Mason WP (2013) Emerging biomarkers in glioblastoma. Cancers (Basel). 5: 1103-19.

McNeil EM, Melton DW (2012) DNA repair endonuclease ERCC1-XPF as a novel therapeutic target to overcome chemoresistance in cancer therapy. Nucleic Acids Res. 40: 9990-10004.

Mehrotra J, Vali M, McVeigh M, Kominsky SL, Fackler MJ, Lahti-Domenici J, Polyak K, Sacchi N, Garrett-Mayer E, Argani P, Sukumar S (2004) Very high frequency of hypermethylated genes in breast cancer metastasis to the bone, brain, and lung. Clin Cancer Res. 10: 3104-9.

Mitra SA, Mitra AP, Triche TJ (2012) A central role for long non-coding RNA in cancer. Front Genet. 3: 17.

Mehrotra J, Vali M, McVeigh M, Kominsky SL, Fackler MJ, Lahti-Domenici J, Polyak K, Sacchi N, Garrett-Mayer E, Argani P, Sukumar S (2004) Very high frequency of hypermethylated genes in breast cancer metastasis to the bone, brain, and lung. Clin Cancer Res. 10: 3104-9.

Mohammad HP, Cai Y, McGarvey KM, Easwaran H, Van Neste L, Ohm JE, O'Hagan HM, Baylin SB (2009) Polycomb CBX7 promotes initiation of heritable repression of genes frequently silenced with cancer-specific DNA hypermethylation. Cancer Res. 69: 6322-30.

Molkentin JD (2000) The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5 and -6, J Biol Chem. 275: 38949-52.

Morrissey EE, Ip HS, Tang Z, Lu MM, Parmacek MS (1997) GATA-5: a transcriptional activator expressed in a novel temporally and spatially-restricted pattern during embryonic development, *Dev Biol.* 183: 21-36.

Mueller W, Nutt CL, Ehrich M, Riemenschneider MJ, von Deimling A, van den Boom D, Louis DN (2007) Downregulation of RUNX3 and TES by hypermethylation in glioblastoma. *Oncogene* 26: 583-93.

Mulero-Navarro S & Esteller M (2008) Epigenetic markers for human cancer: the time is now. *Crit Rev Oncol Hematol.* 68: 1-11.

Nguyen CT, Weisenberger DJ, Velicescu M, Gonzales FA, Lin JC, Liang G, Jones PA (2002) Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* 62: 6456-61.

Nicholson SA, Okby NT, Khan MA, Welsh JA, McMenamin MG, Travis WD, Jett JR, Tazelaar HD, Trastek V, Pairolero PC, Corn PG, Herman JG, Liotta LA, Caporaso NE, Harris CC (2001) Alterations of p14ARF, p53, and p73 genes involved in the E2F-1-mediated apoptotic pathways in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res.* 61: 5636-43.

Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 99: 247-57.

Okuda T, Kokame K, Miyata T (2008) Differential expression patterns of NDRG family proteins in the central nervous system. *J Histochem Cytochem.* 56 : 175-82.

Oron E & Ivanova N (2012) Cell fate regulation in early mammalian development, *Physical Biology.* 9: 1-17.

Ortiz-Vega S, Khokhlatchev A, Nedwidek M, Zhang XF, Dammann R, Pfeifer GP, Avruch J (2002) The putative tumor suppressor RASSF1A homodimerizes and heterodimerizes with the Ras-GTP binding protein Nore1. *Oncogene.* 21: 1381-90.

Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, Stroup NE, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS (2013) CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol.* 15: 1-56.

Paluszczak J & Baer-Dubowska W (2014) DNA methylation as a target of cancer chemoprevention by dietary polyphenols. W *Polyphenols in Human Health and Disease.* (Ed. RR Watson, VR Preedy, S Zibadi). Elsevier Academic Press, San Diego, Vol. 2 str 1385-92.

Paz MF, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I, Reynes G, Pollan M, Aguirre-Cruz L, García-Lopez JL, Piquer J, Safont MJ, Balaña C, Sanchez-Céspedes M, García-Villanueva M, Arribas L, Esteller M (2004) CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas. *Clin Cancer Res.* 10: 4933-8.

Philipp AB, Stieber P, Nagel D, Neumann J, Spelsberg F, Jung A, Lamerz R, Herbst A, Kolligs FT (2012) Prognostic role of methylated free circulating DNA in colorectal cancer. *Int J Cancer.* 131: 2308-19.

Piepoli A, Cotugno R, Merla G, Gentile A, Augello B, Quitadamo M, Merla A, Panza A, Carella M, Maglietta R, D'Addabbo A, Ancona N, Fusilli S, Perri F, Andriulli A (2009) Promoter methylation correlates with reduced NDRG2 expression in advanced colon tumour. *BMC Med Genomics*. 2: 11.

Piperi C, Themistocleous MS, Papavassiliou GA, Farmaki E, Levidou G, Korkolopoulou P, Adamopoulos C, Papavassiliou AG (2010) High incidence of MGMT and RARbeta promoter methylation in primary glioblastomas: association with histopathological characteristics, inflammatory mediators and clinical outcome. *Mol Med*. 16: 1-9.

Pizzi S, Azzoni C, Bottarelli L, Campanini N, D'Adda T, Pasquali C, Rossi G, Rindi G, Bordi C (2005) RASSF1A promoter methylation and 3p21.3 loss of heterozygosity are features of foregut, but not midgut and hindgut, malignant endocrine tumours. *J Pathol*. 206: 409-16.

Platzer M, Rotman G, Bauer D, Uziel T, Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Shiloh Y, Rosenthal A (1997) Ataxia-telangiectasia locus: sequence analysis of 184 kb of human genomic DNA containing the entire ATM gene. *Genome Res*. 7: 592-605.

Popov N & Gil J (2010) Epigenetic regulation of the INK4b-ARF-INK4a locus: in sickness and in health. *Epigenetics*. 5: 685-90.

Rabizadeh S, Xavier RJ, Ishiguro K, Bernabeortiz J, Lopez-Illasaca M, Khokhlatchev A, Mollahan P, Pfeifer GP, Avruch J, Seed B (2004) The scaffold protein CNK1 interacts with the tumor suppressor RASSF1A and augments RASSF1A-induced cell death. *J Biol Chem*. 279: 29247-54.

Rasheed A, Herndon JE, Stenzel TT, Raetz JG, Kendelhardt J, Friedman HS, Friedman AH, Bigner DD, Bigner SH, McLendon RE (2002) Molecular markers of prognosis in astrocytic tumors. *Cancer*. 94: 2688-97.

Ren F, Wang D, Jiang Y, Ren F (2012) Epigenetic inactivation of hMLH1 in the malignant transformation of ovarian endometriosis. *Arch Gynecol Obstet*. 285: 215-21.

Richter AM, Pfeifer GP, Dammann RH (2009) The RASSF proteins in cancer; from epigenetic silencing to functional characterization. *Biochim Biophys Acta*. 1796: 114-28.

Riederer BM (2007) Microtubule-associated protein 1B, a growth-associated and phosphorylated scaffold protein. *Brain Res Bull*. 71: 541-58.

Rong R, Jin W, Zhang J, Sheikh MS, Huang Y (2004) Tumor suppressor RASSF1A is a microtubule-binding protein that stabilizes microtubules and induces G2/M arrest. *Oncogene*. 23: 8216-30.

Rosenbaum E, Hoque MO, Cohen Y, Zahurak M, Eisenberger MA, Epstein JI, Partin AW, Sidransky D (2005) Promoter hypermethylation as an independent prognostic factor for relapse in patients with prostate cancer following radical prostatectomy. *Clin Cancer Res*. 11: 8321-5.

- Roy K, Wang L, Makrigiorgos GM, Price BD (2006) Methylation of the ATM promoter in glioma cells alters ionizing radiation sensitivity. *Biochem Biophys Res Commun.* 344: 821-6.
- Sandoval J & Esteller M (2012) Cancer epigenomics: beyond genomics. *Curr Opin Genet Dev.* 22: 50-5.
- Sawan C, Vaissière T, Murr R, Herceg Z (2008) Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutat Res.* 642: 1-13.
- Schmidt EE, Ichimura K, Reifenberger G and Collins VP (1994) CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res* 54: 6321-4.
- Segal E & Widom J (2009) What controls nucleosome positions? *Trends Genet.* 25: 335–43.
- Sharma S, Kelly TK, Jones PA (2010) Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis.* 31: 27-36.
- Shen L, Zhao ZY, Wang YZ, Ji SP, Liu XP, Liu XW, Che HL, Lin W, Li X, Zhang J, Yao LB (2008) Immunohistochemical detection of NdrG2 in the mouse nervous system. *Neuroreport.* 19: 927–31.
- Shivakumar L, Minna J, Sakamaki T, Pestell R, White MA (2002) The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. *Mol Cell Biol.* 22: 4309-18.
- Silber JR, Bobola MS, Blank A, Chamberlain MC (2012) O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in glioma therapy: promise and problems. *Biochim Biophys Acta.* 1826: 71-82.
- Simon M, Koster G, Menon AG and Schramm J (1999) Functional evidence for a role of combined CDKN2A[p16/p14(arf)]/ CDKN2B (p15) gene inactivation in malignant gliomas. *Acta Neuropathol* 98: 444-52.
- Simpson L & Parsons R (2001) PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res.* 264: 29-41.
- Skiriutė D, Vaitkienė P, Ašmonienė V, Steponaitis G, Deltuva VP, Tamašauskas A (2013) Promoter methylation of AREG, HOXA11, hMLH1, NDRG2, NPTX2 and Tes genes in glioblastoma. *J Neurooncol.* 113: 441-9.
- Skvortsova TE, Rykova EY, Tamkovich SN, Bryzgunova OE, Starikov AV, Kuznetsova NP, Vlassov VV, Laktionov PP (2006) Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumours: DNA quantification and analysis of tumour-related gene methylation. *Br J Cancer.* 94: 1492-5.
- Sohn BH, Park IY, Lee JJ, Yang SJ, Jang YJ, Park KC, Kim DJ, Lee DC, Sohn HA, Kim TW, Yoo HS, Choi JY, Bae YS, Yeom YI (2010) Functional switching of transforming growth factor-beta1 signaling in liver cancer via epigenetic modulation of a single CpG site in tristetraproline promoter. *Gastroenterology.* 138: 1898–908.
- Song MS, Lim DS (2004 a) Control of APC-Cdc20 by the tumor suppressor RASSF1A. *Cell Cycle.* 3: 574-6.

Song MS, Song SJ, Ayad NG, Chang JS, Lee JH, Hong HK, Lee H, Choi N, Kim J, Kim H, Kim JW, Choi EJ, Kirschner MW, Lim DS (2004 b) The tumour suppressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC-Cdc20 complex. *Nat Cell Biol.* 6: 129-37.

Song MS, Song SJ, Kim SJ, Nakayama K, Nakayama KI, Lim DS. (2008) Skp2 regulates the antiproliferative function of the tumor suppressor RASSF1A via ubiquitin-mediated degradation at the G1-S transition. *Oncogene.* 27: 3176-85.

Song MS, Salmena L, Pandolfi PP (2012) The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13: 283-96.

Stambolic V, MacPherson D, Sas D, Lin Y, Snow B, Jang Y, Benchimol S, Mak TW (2001) Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell.* 8: 317-25.

Struhl K (1998) Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev.* 12: 599-606.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352: 987-96.

Suzuki E, Evans T, Lowry J, Truong L, Bell DW, Testa JR, Walsh K (1996) The human GATA 6 gene: structure, chromosomal location, and regulation of expression by tissue-specific and mitogen-responsive signals. *Genomics.* 38: 283–290.

Tachibana M, Matsumura Y, Fukuda M, Kimura H, Shinkai Y (2008) G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. *EMBO J.* 27: 2681-90.

Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, Dinger M, Mattick JS (2010) Non-coding RNAs: regulators of disease. *J Pathol.* 220: 126-39.

Tepel M, Roerig P, Wolter M, Gutmann DH, Perry A, Reifenberger G, Riemenschneider MJ (2008) Frequent promoter hypermethylation and transcriptional downregulation of the NDRG2 gene at 14q11.2 in primary glioblastoma. *Int. J. Cancer.* 123: 2080–6.

Thon N, Kreth S, Kreth FW (2013) Personalized treatment strategies in glioblastoma: MGMT promoter methylation status. *Onco Targets Ther.* 6: 1363-72.

Trosko JE, Chang CC, Upham BL, Tai MH (2004) Ignored hallmarks of carcinogenesis: stem cells and cell-cell communication. *Ann N Y Acad Sci.* 1028: 192-201.

Ushijima T & Okochi-Takada E (2005) Aberrant methylations in cancer cells: where do they come from? *Cancer Sci.* 96: 206-11.

van den Bent MJ, Dubbink HJ, Sanson M, van der Lee-Haarloo CR, Hegi M, Jeuken JW, Ibdaih A, Brandes AA, Taphoorn MJ, Frenay M, Lacombe D, Gorlia T, Dinjens WN, Kros JM (2009) MGMT promoter methylation is prognostic but not predictive for outcome to adjuvant PCV chemotherapy in anaplastic oligodendroglial tumors: a report from EORTC Brain Tumor Group Study 26951. *J Clin Oncol.* 27: 5881-6.

van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet.* 2: 196-206.

van Vlodrop IJ, Baldewijns MM, Smits KM, Schouten LJ, van Neste L, van Criekinge W, van Poppel H, Lerut E, Schuebel KE, Ahuja N, Herman JG, de Bruïne AP, van Engeland M (2010) Prognostic significance of Gremlin1 (GREM1) promoter CpG island hypermethylation in clear cell renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 176: 575–84.

van Vlodrop IJ, Niessen HE, Derks S, Baldewijns MM, van Criekinge W, Herman JG, van Engeland M (2011) Analysis of promoter CpG island hypermethylation in cancer: location, location, location! *Clin Cancer Res.* 17: 4225-31.

Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinden JM, Bollen M, Esteller M, Di Croce L, de Launoit Y, Fuks F (2006) The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature.* 439: 871-4.

Vos MD, Martinez A, Elam C, Dalloil A, Taylor BJ, Latif F, Clark GJ (2004) A role for the RASSF1A tumor suppressor in the regulation of tubulin polymerization and genomic stability. *Cancer Res.* 64: 4244-50.

Walecki J & Chojnacka E (2007) Diagnostyka obrazowa guzów wewnątrzczaszkowych. Część I – guzy neuroepitelialne. *Onkologia w praktyce klinicznej.* 3: 177-197.

Watanabe T, Katayama Y, Komine C, Yoshino A, Ogino A, Ohta T and Fukushima T (2005) O6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation and TP53 mutation in malignant astrocytomas and their relationships with clinical course. *Int J Cancer.* 113: 581-7.

Watts GS, Pieper RO, Costello JF, Peng YM, Dalton WS, Futscher BW (1997) Methylation of discrete regions of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) CpG island is associated with heterochromatinization of the MGMT transcription start site and silencing of the gene. *Mol Cell Biol.* 17: 5612–5619.

Wang Y & Leung FC (2004) An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers. *Bioinformatics.* 20: 1170–7.

Weaver KD, Grossman SA, Herman JG (2006) Methylated tumor-specific DNA as a plasma marker in patients with glioma. *Cancer Invest.* 24: 35-40.

Weller M, Felsberg J, Hartmann C, Berger H, Steinbach JP, Schramm J, Westphal M, Schackert G, Simon M, Tonn JC, Heese O, Krex D, Nikkhah G, Pietsch T, Wiestler O, Reifenberger G, von Deimling A, Loeffler M (2009) Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J Clin Oncol.* 27: 5743–50.



Wick W, Platten M, Meisner C, Felsberg J, Tabatabai G, Simon M, Nikkhah G, Papsdorf K, Steinbach JP, Sabel M, Combs SE, Vesper J, Braun C, Meixensberger J, Ketter R, Mayer-Steinacker R, Reifenberger G, Weller M; NOA-08 Study Group of Neuro-oncology Working Group (NOA) of German Cancer Society (2012) Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 13: 707-15.

Widschwendter M, Fiegl H, Egle D, Mueller-Holzner E, Spizzo G, Marth C, Weisenberger DJ, Campan M, Young J, Jacobs I, Laird PW (2007) Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat. Genet.* 39, 157–8.

Williams K, Christensen J, Helin K (2011) DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *EMBO Rep.* 13: 28-35.

Woodson K, Gillespie J, Hanson J, Emmert-Buck M, Phillips JM, Linehan WM, Tangrea JA (2004) Heterogeneous gene methylation patterns among pre-invasive and cancerous lesions of the prostate: a histopathologic study of whole mount prostate specimens. *Prostate.* 60: 25-31.

Wu H & Zhang Y (2011) Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Genes Dev.* 25: 2436-52.

Xing M, Cohen Y, Mambo E, Tallini G, Udelsman R, Ladenson PW, Sidransky D (2004) Early occurrence of RASSF1A hypermethylation and its mutual exclusion with BRAF mutation in thyroid tumorigenesis. *Cancer Res.* 64: 1664-8.

Xu Y, Xu C, Price BD (2012) Mechanistic links between ATM and histone methylation codes during DNA repair. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 110: 263-88.

Yan PS, Shi H, Rahmatpanah F, Hsiau TH, Hsiau AH, Leu YW, Liu JC, Huang TH (2003) Differential distribution of DNA methylation within the RASSF1A CpG island in breast cancer. *Cancer Res.* 63: 6178–86.

Yao L, Zhang J, Liu X (2008) NDRG2: a Myc-repressed gene involved in cancer and cell stress. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 40: 625-35.

Yokoyama Y, Wan X, Shinohara A, Takahashi S, Takahashi Y, Niwa K, Tamaya T (2000) Expression of PTEN and PTEN pseudogene in endometrial carcinoma. *Int J Mol Med* 6: 47–50.

Yu GP, Ji Y, Chen GQ, Huang B, Shen K, Wu S, Shen ZY (2012) Application of RUNX3 gene promoter methylation in the diagnosis of non-small cell lung cancer. *Oncol Lett.* 3: 159-62.

Zhang CL, Tada M, Kobayashi H, Nozaki M, Moriuchi T, Abe H (2000) Detection of PTEN nonsense mutation and psiPTEN expression in central nervous system high-grade astrocytic tumors by a yeast-based stop codon assay. *Oncogene.* 19: 4346–53.

Zhao Q, Rank G, Tan YT, Li H, Moritz RL, Simpson RJ, Cerruti L, Curtis DJ, Patel DJ, Allis CD, Cunningham JM, Jane SM (2009) PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing. *Nat Struct Mol Biol.* 16: 304-11.

Zysman MA, Chapman WB, Bapat B (2002) Considerations when analyzing the methylation status of PTEN tumor suppressor gene. *Am J Pathol.* 160: 795-800.

Żyromska & Makarewicz (2004) Przerzuty do mózgu. *Polska Medycyna Paliatywna* 2004, 3: 27–31.

**Źródła internetowe:**

www1: <http://onkologia.org.pl/mozg-c71/>

www2: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/472>

www3: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/864>

www4: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Sequence?g=ENSG00000165795;r=14:2148492-21539031](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?g=ENSG00000165795;r=14:2148492-21539031)

www5: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00689221>

## VIII. Wykaz publikacji i komunikatów zjazdowych

### Artykuły:

1. Majchrzak-Celińska A, Paluszczak J, Kleszcz R, Magiera M, Barciszewska AM, Nowak S, Baer-Dubowska W (2013) Detection of MGMT, RASSF1A, p15INK4B, and p14ARF promoter methylation in circulating tumor-derived DNA of central nervous system cancer patients. *J Appl Genet.* 54: 335-44.
2. Szaefer H, Cichocki M, Majchrzak-Celińska A (2013): New cytochrome P450 isoforms as cancer markers and targets for chemopreventive and chemotherapeutic agents, *Postepy Hig Med Dosw.* 67: 709-18.
3. Kosicka K, Cymerys M, Majchrzak-Celińska A, Chuchracki M, Głowska FK (2013) 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in hypertension: comparison of phenotype and genotype analysis. *J Hum Hypertens.* 27: 510-15.
4. Kosicka K, Cymerys M, Majchrzak-Celińska A, Głowska FK (2012) Pacjent z podejrzeniem zespołu pozornego nadmiaru mineralokortykosteroidów - trudności diagnostyczne. *Nadciś. Tętn.* 16: 101-104.
5. Baer-Dubowska W, Majchrzak-Celińska A, Cichocki M (2011) Pharmacoeugenetics: a new approach to predicting individual drug responses and targeting new drugs. *Pharmacol. Rep.* 63: 293-304.
6. Majchrzak A, Baer-Dubowska W (2009) Markery epigenetyczne w diagnostyce: Metody oceny metylacji DNA. *Diag. Lab.* 45: 167-73.

### Fragmety większych całości:

1. Rozdział: Pirosekwencjonowanie – sekwencjonowanie w czasie rzeczywistym, w *Biologia molekularna dla farmaceutów* (Red. B. Licznarska, E. Ignatowicz i Baer-Dubowska). Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, Poznań, 2012.

### Streszczenia zjazdowe:

1. Majchrzak-Celińska A, Paluszczak J, Barciszewska A-M, Nowak S, Baer-Dubowska W (2013) *RUNX3, GATA6, RASSF1A* and *MGMT* are Frequently Methylated in Glioma Patients and *RUNX3* Promoter Methylation Correlates with Tumor Grade (2013) - Abstracts of the SELECTBIO Conference „ Epigenetics, microRNAs and non Coding RNAs in Disease” – Barcelona, 16-17.10.2013
2. Paluszczak J, Majchrzak-Celińska A, Hemmerling D, Mielcarek-Kuchta D, Barciszewska A-M, Wierzbicka M, Nowak S, Baer-Dubowska W (2013) The diagnostic significance of the hypermethylation of WNT pathway genes in head and neck and brain cancer patients (2013) Abstracts of the Cell Symposia Conference „Cancer Epigenomics” - Sitges, 6-8.10.2013
3. Baer-Dubowska W, Majchrzak-Celińska A, Paluszczak J (2013) Farmakoepigenetyka – element indywidualnej odpowiedzi na leki. XXII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego "Farmacja - Nauka - Społeczeństwo". Białystok, 18-21.09.2013 r.
4. Baer-Dubowska W, Paluszczak J, Majchrzak-Celińska A (2013) Application of epigenetic markers in cancer diagnosis, prophylaxis and therapy. *Acta Bioch. Pol.* 60: 4 Abstract of the 48th Congress of the Polish Biochemical Society. Toruń, 2-5.09.2013.

5. Majchrzak-Celińska A, Kleszcz R, Magiera M, Paluszczak J, Barciszewska A-M, Nowak S, Baer-Dubowska W (2012) Methylated circulating tumour-derived DNA as a serum marker of brain cancer patients. Acta Bioch. Pol. 59: 98. Abstracts of the 47th Congress of the Polish Biochemical Society and Polish-German Biochemical Societies Joint Meeting. Poznań, 11-14.09.2012
6. Paluszczak J, Majchrzak-Celińska A, Baer-Dubowska W (2012) DNA methylation markers in cancer diagnostics. Acta Bioch. Pol. 59: 82. Abstracts of the 47th Congress of the Polish Biochemical Society and Polish-German Biochemical Societies Joint Meeting. Poznań, 11-14.09.2012
7. Kosicka K, Główka FK, Cymerys M, Majchrzak-Celińska A (2012) Polimorfizm genetyczny dehydrogenazy 11 -hydroksysteroidowej 2 a pierwotne nadciśnienie tętnicze. Geny i leki. I Polski Kongres Farmakogenetyki. VI Kongres PTFKIT. Poznań, 27-28.11.2012 r.
8. Ocena wartości prognostycznej potencjalnych markerów epigenetycznych w optymalizacji terapii guzów mózgu - Wielkopolskie Dni Neurochirurgii – 20.04.2012 Poznań (wystąpienie ustne)
9. Majchrzak-Celińska A, Szalata M, Barciszewska A-M, Nowak S, Baer-Dubowska W (2011) The analysis of *MGMT* promoter methylation in human glioma tissue and peripheral blood. Abstract of the BACR Conference "Cancer Epigenetics". Londyn, 19.05.2011.
10. Majchrzak-Celińska A, Baer-Dubowska W (2011) Epigenetyka, czyli jak pokierować swoimi genami. Dni DNA w Poznaniu. Poznań 28.04.2011 (wystąpienie ustne)
11. Paluszczak P, Wierzbicka M, Woźniak A, Majchrzak A, Baer-Dubowska W (2010) Methylation of *MGMT* and *RARB* correlates with lymph node metastasis in laryngeal cancer patients. Abstracts of Francois Fuks' Conference "Epigenetic mechanisms in health and disease". Bruksela 18.06.2010 s.48.
12. Majchrzak A, Baer-Dubowska W (2009) Analyzing brain tumors for O<sup>6</sup> - methylguanine- DNA methyltransferase hypermethylation in the routine clinical setting. Acta Bioch. Pol., 2009, 56 S
13. Majchrzak A, Matuszak I, Misiak P, Gallas A (2007) siRNA jak lek. Materiały Konferencji „Osiągnięcia w chemii leków” Poznań 6-7.09.2007, 93, (P-65).

## IX. Streszczenie

Nowotwory ośrodkowego układu nerwowego, choć należą do stosunkowo rzadko występujących, w większości przypadków wiążą się z bardzo złym rokowaniem. Okresy przeżycia chorych z nowotworami mózgu, pomimo wdrożenia intensywnego leczenia, często nie przekraczają 1 roku. Jedną z przyczyn są istniejące lub rozwijające się w trakcie terapii mechanizmy oporności na leczenie farmakologiczne lub radiologiczne. Z tego powodu wczesna i trafna diagnoza nowotworów mózgu jest szczególnie ważna, aby leczenie było bardziej skuteczne. Dotychczas stosowane markery genetyczne nie są dostatecznie specyficzne, aby mogły być stosowane w klinice przy wyborze zindywidualizowanej formy leczenia szczególnie, że w przypadku najbardziej złośliwych nowotworów mózgu ich patogenezę nie jest znana. W ostatniej dekadzie zintensyfikowano badania mające na celu poszukiwanie i optymalizację epigenetycznych markerów nowotworowych. Termin epigenetyka odnosi się do zmian fenotypowych, które nie są wynikiem zmiany w sekwencji DNA. Zmiany te związane są przede wszystkim z metylacją DNA, kowalencyjnymi modyfikacjami białek histonowych oraz regulacją ekspresji genów za pośrednictwem niekodujących RNA. Do celów diagnostycznych szczególnie przydatna, ze względu na stabilność tej modyfikacji, jak i stosunkowo łatwe pozyskanie materiału do badań, może być analiza profilu metylacji DNA.

Celem niniejszej pracy doktorskiej była ocena profilu metylacji genów o potencjalnym znaczeniu diagnostycznym i/lub prognostycznym w nowotworach OUN o zróżnicowanej złośliwości. Analizie poddano geny *MGMT*, *ERCC1*, *hMLH1*, *ATM*, *CDKN2B (p15INK4B)*, *p14ARF*, *CDKN2A (p16INK4A)*, *RASSF1A*, *RUNX3*, *GATA6*, *NDRG2*, *PTEN*, oraz *RARβ* w dwóch typach guzów, glejakach i oponiakach, wykorzystując technikę metylospecyficjnej polimerazowej reakcji łańcuchowej (MSP) oraz pirosekwencjonowania. Poza tkanką guza w wybranej grupie pacjentów analizowano także metylację badanych genów w wolnokrążącym DNA surowicy krwi. W celu wyłonienia potencjalnych markerów epigenetycznych oceniano korelację uzyskanych wyników z rozpoznaniem histopatologicznym wg klasyfikacji WHO, a także takimi parametrami jak wiek, płeć, czas wolny od wznowy i okres przeżycia pacjentów. Przeprowadzone badania wykazały, że guzy glejowe charakteryzuje wyższy współczynnik metylacji (WM) badanych genów w porównaniu z oponiakami. Ponadto w odniesieniu do glejaków wartość tego współczynnika jest powiązana ze stopniem złośliwości wg klasyfikacji WHO, a także wiekiem pacjentów. Takiej zależności nie stwierdzono w oponiakach. W guzach glejowych najczęściej zmetylowane były geny *RASSF1A*, *RUNX3*, *GATA6* oraz *MGMT*, w mniejszym zaś stopniu geny w obrębie locus *INK4B-ARF-INK4A* oraz *ATM*. Geny *ERCC1*, *hMLH1* oraz *NDRG2* były niezmetylowane. Natomiast w oponiakach najczęściej zmetylowanym genem był *p14ARF*, a także *RASSF1A* i *p15INK4B*, rzadziej zaś *RUNX3* i *GATA6*. Geny *p16INK4A*, *ATM* oraz *RARβ* były zmetylowane w marginalnej liczbie próbek, zaś niezmetylowane były *hMLH1*, *NDRG2* oraz *PTEN*.

Zarówno w guzach glejowych jak i oponiakach metylacja *RUNX3* w sposób istotny korelowała ze stopniem złośliwości, a w grupie glejaków, także z wiekiem pacjentów. Gen ten zatem może być uważany jako potencjalny marker agresywności w obu wymienionych typach guzów OUN. Ponadto w

oponiakach gen *RASSF1A* był relatywnie częściej zmetylowany u mężczyzn aniżeli u kobiet. Metylacja tego genu wydaje się być także elementem różnicującym guzy glejowe i przerzutowe do OUN.

W odniesieniu do genów *MGMT* oraz *NDRG2* porównano wyniki uzyskane techniką MSP i na drodze pirosekwencjonowania. Analiza genu *MGMT* techniką pirosekwencjonowania potwierdziła znaczący odsetek zmetylowanego wariantu tego genu u pacjentów z glejakiem. Wykazała jednocześnie, że najwyższy poziom metylacji charakteryzuje dinukleotyd CpG2, natomiast najniższy CpG5. Natomiast poziom metylacji dinukleotydów CpG3 i CpG4 wzrastał wraz z wiekiem pacjentów. Te obserwacje potwierdzają jednocześnie przydatność oceny metylacji *MGMT* do przewidywania skuteczności terapii związkami alkilującymi. Porównanie poziomu metylacji genu *NDRG2* ocenianej techniką pirosekwencjonowania zarówno w glejakach jak i oponiakach, z metylacją tego genu w zdrowej tkance mózgu wykazało znacząco wyższy odsetek metylacji w tkance nowotworowej. Najwyższą wartość procentową metylacji odnotowano dla dinukleotydu CpG4, natomiast najniższą dla CpG1.

Analiza profilu metylacji badanych genów w wolnokrążącym DNA surowicy wykazała w dużej mierze zgodność z profilem metylacji stwierdzanym w DNA guzów pochodzących od tych samych pacjentów wskazując, że wolnokrążący DNA może być dobrą alternatywą dla materiału operacyjnego, bądź biopsyjnego do celów diagnostycznych.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują, że analiza profilu metylacji całego panelu badanych genów jak i indywidualnych genów, wyselekcjonowanych w toku analizy może być przydatna w diagnostyce nowotworów ONU, szczególnie w odniesieniu do guzów, których diagnoza histopatologiczna jest niejednoznaczna.

## X. Abstract

Despite the growing understanding of the mechanisms of carcinogenesis, cancers of the central nervous system are usually associated with unfavorable prognosis. The use of an appropriate molecular marker may improve the treatment outcome by allowing early diagnosis and treatment susceptibility monitoring. It is now widely accepted that the deregulation of cellular homeostasis observed in cancer cells may be a consequence of the aberrations in the epigenetic information besides genetic mutations. Epigenetic mechanisms are responsible for the regulation of gene expression and their frequent changes in carcinogenesis are especially attractive for investigation because of their potential applicability in both tumor diagnostics and therapy. The hypermethylation of CpG islands in the promoter regions of tumor suppressor genes, which leads to their silencing, can be found at all stages of carcinogenesis. The profile of DNA methylation changes is claimed to be relatively specific for tumor (sub)type, which makes it a promising marker for disease detection and stratification. Evidence shows that it may also be used for both prognostic and predictive purposes.

The aim of this study was the evaluation of DNA methylation profile of genes selected on the basis of their diagnostic and/or prognostic potential in central nervous system (CNS) tumors. The methylation status of *MGMT*, *ERCC1*, *hMLH1*, *ATM*, *CDKN2B (p15INK4B)*, *p14ARF*, *CDKN2A (p16INK4A)*, *RASSF1A*, *RUNX3*, *GATA6*, *NDRG2*, *PTEN*, and *RAR $\beta$*  was determined in the subset of CNS tumors of different grades, mainly gliomas and meningiomas, using methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) and pyrosequencing. Beside tumor DNA in selected group of patients methylation profile was assessed also in circulating tumor-derived DNA isolated from serum. The results revealed that gliomas are characterized by higher methylation index (MI) as compared to meningiomas. Moreover MI of individual glioma patient correlated with tumor grade (according to WHO grading system) and age. In glioma patients' group, *RASSF1A*, *RUNX3*, *GATA6* and *MGMT* were most frequently methylated, whereas locus INK4B-ARF-INK4A and *ATM* gene were methylated to less extent. *ERCC1*, *hMLH1* and *NDRG2* were unmethylated in all cases. On the other hand in meningioma patients, *p14ARF* as well as *RASSF1A* and *p15INK4B* were the most frequently methylated. In this group *RUNX3* and *GATA6* were methylated to a lesser extent, whereas *p16INK4A*, *ATM* and *RAR $\beta$*  were found to be methylated in a marginal number of patients. The *hMLH1*, *NDRG2* and *PTEN* genes were unmethylated.

Methylation analysis results were correlated with patients' WHO classification of tumors, age, sex, progression free and overall survival time. Both in the glioma and meningioma group *RUNX3* methylation was found to correlate with the WHO grade, and in glioma group also with patients' age. Therefore *RUNX3* methylation can be considered as a promising novel marker –indicator of the aggressiveness of both gliomas and meningiomas. *RASSF1A* gene was found to be more frequently methylated in men than in women. Methylation of this gene seems also to differentiate gliomas from brain metastasis from different organs.

In case of *MGMT* and *NDRG2*, the MSP results were validated using pyrosequencing technique. The pyrosequencing of *MGMT* confirmed significant number of methylated variants in glioma group of patients. It also revealed the highest methylation level in CpG2, and the lowest in CpG5. The methylation level of CpG3 and CpG4 correlated with patient's age. These observations also confirm the utility of *MGMT* as a marker predicting patient's response to alkylating agents. On the other hand the comparison of *NDRG2* methylation between normal and cancerous tissue revealed significantly higher methylation level in the latter. The highest methylation level was found in CpG4, whereas the lowest in CpG1.

The analysis of DNA methylation in circulating tumor-derived DNA revealed that the methylation status is very similar to that found in tumor tissue DNA. This indicates that circulating tumor-derived DNA is a good alternative to biopsy or surgical specimens and can be used in the diagnostic purposes.

Overall the results of this study indicate, that the status of methylation of individual genes selected in this study, as well as the whole panel, can be useful in the diagnostics of CNS tumors, especially in those tumors, for which the histopathological examination is unequivocal.



## XI. Aneks

Tab. 2 Klasyfikacja histologiczna nowotworów OUN wg WHO [Louis et al. 2007 a i b]

### TUMOURS OF NEUROEPITHELIAL TISSUE

#### Astrocytic tumours

Pilocytic astrocytoma	9421/1 <sup>1</sup>
Pilomyxoid astrocytoma	9425/3*
Subependymal giant cell astrocytoma	9384/1
Pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3
Diffuse astrocytoma	9400/3
Fibrillary astrocytoma	9420/3
Gemistocytic astrocytoma	9411/3
Protoplasmic astrocytoma	9410/3
Anaplastic astrocytoma	9401/3
Glioblastoma	9440/3
Giant cell glioblastoma	9441/3
Gliosarcoma	9442/3
Gliomatosis cerebri	9381/3

#### Oligodendroglial tumours

Oligodendroglioma	9450/3
Anaplastic oligodendroglioma	9451/3

#### Oligoastrocytic tumours

Oligoastrocytoma	9382/3
Anaplastic oligoastrocytoma	9382/3

#### Ependymal tumours

Subependymoma	9383/1
Myxopapillary ependymoma	9394/1
Ependymoma	9391/3
Cellular	9391/3
Papillary	9393/3
Clear cell	9391/3
Tanycytic	9391/3
Anaplastic ependymoma	9392/3

#### Choroid plexus tumours

Choroid plexus papilloma	9390/0
Atypical choroid plexus papilloma	9390/1*
Choroid plexus carcinoma	9390/3

#### Other neuroepithelial tumours

Astroblastoma	9430/3
Chordoid glioma of the third ventricle	9444/1
Angiocentric glioma	9431/1*

### Neuronal and mixed neuronal-glia tumours

Dysplastic gangliocytoma of cerebellum (Lhermitte-Duclos)	9493/0
Desmoplastic infantile astrocytoma/ganglioglioma	9412/1
Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	9413/0
Gangliocytoma	9492/0
Ganglioglioma	9505/1
Anaplastic ganglioglioma	9505/3
Central neurocytoma	9506/1
Extraventricular neurocytoma	9506/1*
Cerebellar liponeurocytoma	9506/1*
Papillary glioneuronal tumour	9509/1*
Rosette-forming glioneuronal tumour of the fourth ventricle	9509/1*
Paraganglioma	8680/1

### Tumours of the pineal region

Pineocytoma	9361/1
Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation	9362/3
Pineoblastoma	9362/3
Papillary tumour of the pineal region	9395/3*

### Embryonal tumours

Medulloblastoma	9470/3
Desmoplastic/nodular medulloblastoma	9471/3
Medulloblastoma with extensive nodularity	9471/3*
Anaplastic medulloblastoma	9474/3*
Large cell medulloblastoma	9474/3
CNS primitive neuroectodermal tumour	9473/3
CNS Neuroblastoma	9500/3
CNS Ganglioneuroblastoma	9490/3
Medulloepithelioma	9501/3
Ependymoblastoma	9392/3
Atypical teratoid / rhabdoid tumour	9508/3

### TUMOURS OF CRANIAL AND PARASPINAL NERVES

Schwannoma (neurilemoma, neurinoma)	9560/0
Cellular	9560/0
Plexiform	9560/0
Melanotic	9560/0
Neurofibroma	9540/0
Plexiform	9550/0

<sup>1</sup> Morphology code of the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) (614A) and the Systematized Nomenclature of Medicine (<http://snomed.org>). Behaviour is coded /0 for benign tumours, /3 for malignant tumours and /1 for borderline or uncertain behaviour.

\* The italicised numbers are provisional codes proposed for the 4th edition of ICD-O. While they are expected to be incorporated into the next ICD-O edition, they currently remain subject to change.

Tab. 3 Klasyfikacja nowotworów OUN zgodnie z przyporządkowanymi stopniami złośliwości wg WHO [Louis et al. 2007 a i b]

	I	II	III	IV
<b>Astrocytic tumours</b>				
Subependymal giant cell astrocytoma	•			
Pilocytic astrocytoma	•			
Pilomyxoid astrocytoma		•		
Diffuse astrocytoma		•		
Pleomorphic xanthoastrocytoma		•		
Anaplastic astrocytoma			•	
Glioblastoma				•
Giant cell glioblastoma				•
Gliosarcoma				•
<b>Oligodendroglial tumours</b>				
Oligodendroglioma		•		
Anaplastic oligodendroglioma			•	
<b>Oligoastrocytic tumours</b>				
Oligoastrocytoma		•		
Anaplastic oligoastrocytoma			•	
<b>Ependymal tumours</b>				
Subependymoma	•			
Myxopapillary ependymoma	•			
Ependymoma		•		
Anaplastic ependymoma			•	
<b>Choroid plexus tumours</b>				
Choroid plexus papilloma	•			
Atypical choroid plexus papilloma		•		
Choroid plexus carcinoma			•	
<b>Other neuroepithelial tumours</b>				
Angiocentric glioma	•			
Chordoid glioma of the third ventricle		•		
<b>Neuronal and mixed neuronal-gliial tumours</b>				
Gangliocytoma	•			
Ganglioglioma	•			
Anaplastic ganglioglioma			•	
Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	•			
Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	•			
<b>Central neurocytoma</b>				
Central neurocytoma		•		
<b>Extraventricular neurocytoma</b>				
Extraventricular neurocytoma		•		
<b>Cerebellar liponeurocytoma</b>				
Cerebellar liponeurocytoma		•		
<b>Paraganglioma of the spinal cord</b>				
Paraganglioma of the spinal cord	•			
<b>Papillary glioneuronal tumour</b>				
Papillary glioneuronal tumour	•			
<b>Rosette-forming glioneuronal tumour of the fourth ventricle</b>				
Rosette-forming glioneuronal tumour of the fourth ventricle	•			
<b>Pineal tumours</b>				
Pineocytoma	•			
Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation		•	•	
Pineoblastoma				•
Papillary tumour of the pineal region		•	•	
<b>Embryonal tumours</b>				
Medulloblastoma				•
CNS primitive neuroectodermal tumour (PNET)				•
Atypical teratoid / rhabdoid tumour				•
<b>Tumours of the cranial and paraspinal nerves</b>				
Schwannoma	•			
Neurofibroma	•			
Perineurioma	•	•	•	
Malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST)		•	•	•
<b>Meningeal tumours</b>				
Meningioma	•			
Atypical meningioma		•		
Anaplastic / malignant meningioma			•	
Haemangiopericytoma		•		
Anaplastic haemangiopericytoma			•	
Haemangioblastoma	•			
<b>Tumours of the sellar region</b>				
Craniopharyngioma	•			
Granular cell tumour of the neurohypophysis	•			
Pituicytoma	•			
Spindle cell oncocytoma of the adenohypophysis	•			

**Tab. 12 Charakterystyka pacjentów z guzami glejowymi.** T - guz, S - surowica, k - kobieta, m - mężczyzna, n.b. - nie badano, b.d. - brak danych. (i) – informacja dodatkowa: najprawdopodobniej złośliwy glejak.

lp.	nr PRÓBY	ROZPOZNANIE HISTOPATOLOGICZNE	oWHO	PŁEĆ	WIEK
<b>Guzy glejowe</b>					
1	T1	GBM	IV	k	73
2	T2	GBM	IV	m	54
3	T3	GBM	IV	k	64
4	T4	GBM	IV	m	62
5	T5	GBM	IV	m	41
6	T6	GBM	IV	m	64
7	T7	GBM	IV	m	58
8	T8	GBM	IV	k	70
9	T9	GBM	IV	m	56
10	T10	GBM	IV	m	52
11	T11	GBM	IV	m	53
12	T12	GBM	IV	k	55
13	T13	GBM	IV	k	70
14	T14	GBM	IV	k	60
15	T15	GBM	IV	m	58
16	T16	GBM	IV	m	60
17	T17	GBM	IV	k	52
18	T18	GBM	IV	k	65
19	T19	GBM	IV	k	65
20	T20	GBM	IV	m	58
21	T21	GBM	IV	m	47
22	T22, S10	GBM	IV	m	50
23	T23	GBM	IV	k	60
24	T24	GBM	IV	m	64
25	T25	GBM	IV	k	74
26	T26	GBM	IV	m	76
27	n.b., S2	GBM	IV	k	60
28	n.b., S7	GBM	IV	m	49
29	T27	Giant cell glioblastoma	IV	k	53
30	T28	Giant cell glioblastoma	IV	m	55
31	T29	GBM recidivans	IV	m	48
32	T30	GBM recidivans	IV	m	60
33	T31	GBM recidivans	IV	k	59
34	T32	GBM recidivans	IV	k	58
35	T33	GBM recidivans	IV	k	52
36	T34	GBM recidivans	IV	m	55
37	T35	GBM recidivans	IV	k	46
38	T36	GBM recidivans	IV	k	56
39	T37	GBM recidivans	IV	m	59
40	T38	GBM recidivans	IV	k	70
41	T39	GBM recidivans	IV	k	54
42	T40	GBM recidivans	IV	m	50
43	T41	GBM recidivans	IV	m	57
44	T42	GBM recidivans	IV	m	62
45	T43	GBM recidivans	IV	k	60
46	T44	GBM recidivans	IV	m	31

47	T45	GBM recidivans	IV	m	45
48	T46, S11	GBM recidivans	IV	m	64
49	T47, S15	GBM recidivans	IV	k	51
50	T48, S17	GBM recidivans	IV	k	61
51	T49	GBM recidivans	IV	k	65
52	T50	GBM recidivans (radionecrosis)	IV	k	37
53	T51	GBM recidivans	IV	k	50
54	T52	GBM recidivans IV (radionecrosis)	IV	k	64
55	T53	Giant cell glioblastoma recidivans	IV	k	63
56	T54	GBM recidivans z elementami PNET	IV	k	32
57	n.b., S6	GBM recidivans, partim anaplastic astrocytoma	IV	m	56
58	T55	Pierwotny glejowy nowotwór złośliwy	b.d.	m	56
59	T56	Glioma anaplasticum NOS	III	m	58
60	T57	Glioma anaplasticum recidivans	III	m	59
61	T58	Neoplasma malignum anaplasticum (i)	b.d.	m	56
62	T59	Neoplasma malignum anaplasticum polymorphum (i)	b.d.	m	66
63	T60	Subependymal giant cell astrocytoma [Tuberous sclerosis]	I	m	23
64	T61	Anaplastic astrocytoma	III	m	29
65	T62	Astrocytoma fibrillare	II	k	57
66	T63, S14	Astrocytoma fibrillare	II	k	38
67	T64, S16	Astrocytoma fibrillare partim protoplasmaticum	II	m	51
68	T65	Astrocytoma fibrillare partim gemistocyticum	II	m	37
69	T66	Astrocytoma pilocyticum partim dedifferentiatum	I/II	k	20
70	T67	Anaplastic astrocytoma	III	k	39
71	T68	Anaplastic astrocytoma	III	k	41
72	T69	Anaplastic astrocytoma	III	m	60
73	T70	Anaplastic astrocytoma	III	m	29
74	T71	Anaplastic astrocytoma	III	m	57
75	T72	Anaplastic astrocytoma	III	k	73
76	T73	Anaplastic astrocytoma	III	k	48
77	T74	Anaplastic astrocytoma	III	m	83
78	T75	Anaplastic astrocytoma	III	k	61
79	T76	Anaplastic astrocytoma	III	m	62
80	T77, S9	Anaplastic astrocytoma	III	m	45
81	T78, S12	Anaplastic astrocytoma	III	m	58
82	T79	Anaplastic astrocytoma	III	k	66
83	T80	Anaplastic astrocytoma	III	m	59
84	n.b., S3	Anaplastic astrocytoma	III	k	71
85	n.b., S4	Anaplastic astrocytoma	III	m	62
86	n.b., S5	Anaplastic astrocytoma	III	k	49
87	n.b., S8	Anaplastic astrocytoma	III	k	67
88	T81	Astrocytoma pilocyticum	I	k	55
89	T82	Anaplastic astrocytoma recidivans	III	k	55
90	T83	Anaplastic astrocytoma recidivans	III	m	53
91	T84	Anaplastic astrocytoma recidivans	III	k	47
92	T85	Asyctocytoma gemistocyticum	II	m	31
93	T86	Astrocytoma gemistocyticum in astrocytoma angioplasticum vertens	II/III	k	28
94	T87	Oligoastrocytoma anaplasticum	III	k	77
95	T88	Oligoastrocytoma anaplasticum	III	m	29
96	T89	Oligodendroglioma isomorphum	II	m	59
97	T90	Clear cell ependymoma	III	k	19
98	T91	Ganglioglioma	II	m	69

99	T92	Ganglioglioma	II	m	37
100	T93	Ganglioglioma	I	m	16
101	T94	Gliosarcoma	IV	m	36
102	T95, S13	Gliosarcoma	IV	k	75
103	n.b., S1	Gliosarcoma recidivans	IV	m	66

Tab. 17 Charakterystyka pacjentów z oponiakami. T - guz, S - surowica, k - kobieta, m - mężczyzna, n.b. - nie badano.

lp.	nr PRÓBY	ROZPOZNANIE HISTOPATOLOGICZNE	WHO	PŁEĆ	WIEK
<b>Oponiaki</b>					
1	T96	Meningeoma fibrosum	I	k	59
2	T97	Meningeoma fibrosum	II	m	87
3	T98	Meningeoma fibrosum	I	k	31
4	T99	Meningeoma fibrosum	I	k	78
5	T100	Meningeoma fibrosum	I	k	58
6	T101	Meningeoma fibrosum	I	k	64
7	T102	Meningeoma fibrosum	I	k	47
8	T103	Meningeoma fibrosum	I	k	35
9	T104	Meningeoma fibrosum	I	k	73
10	T105	Meningeoma fibrosum	I	k	45
11	n.b., S22	Meningeoma fibrosum	I	k	71
12	T106, S33	Meningeoma fibrosum	I	k	35
13	T107	Meningeoma fibrosum psammomatosum	I	k	63
15	T108	Meningeoma transitionale	I	k	51
16	T109	Meningeoma transitionale	I	k	48
17	T110	Meningeoma transitionale	I	k	50
18	T111	Meningeoma transitionale	I	m	64
19	T112	Meningeoma transitionale	I	m	67
20	T113	Meningeoma transitionale	I	k	66
21	T114	Meningeoma transitionale	I	k	54
23	T115	Meningeoma angiomasum	I	k	81
24	T116	Meningeoma angiomasum	I	m	35
25	T117	Meningeoma angiomasum, partim clarocellulare	I/II	k	66
26	n.b., S21	Meningeoma angiomasum recidivans, partim clarocellulare	II	k	53
22	T118	Meningeoma meningothele	I	k	70
27	T119	Meningeoma meningothele	I	k	73
28	T120	Meningeoma meningothele	I	k	57
29	T121	Meningeoma meningothele	I	m	63
30	T122	Meningeoma meningothele	I	k	64
31	T123	Meningeoma meningothele	I	k	39
33	T124	Meningeoma meningothele	I	k	71
34	T125	Meningeoma meningothele	II	m	37
35	T126	Meningeoma meningothele	I	k	58
36	T127	Meningeoma meningothele	II	m	63
37	T128	Meningeoma meningothele	I	k	45
38	n.b., S25	Meningeoma meningothele	I	k	64
39	T129	Meningeoma meningothele, partim fibrosum partim cellulare	I/II	k	50
40	T130	Meningeoma meningothele, partim necroticans et psammomatosum	II	m	59

41	T131	Meningeoma meningotheliale, partim metaplasticum (xantomatosum) et psammomatosum	I	k	52
42	n.b., S24	Meningeoma meningotheliale, partim microcysticum	I	m	62
32	T132	Meningeoma meningotheliale, partim cellulare	I	k	40
14	T133	Meningeoma meningotheliale psammomatosum	I	k	75
43	T134	Meningeoma meningotheliale psammomatosum, partim necroticans et hyalinisans	I	m	66
44	T135	Meningeoma meningotheliomatosum, partim secretans et partim psammomatosum	I	m	39
45	T136	Meningeoma meningotheliomatosum, partim oxyphylicum	I	k	61
46	T137	Meningeoma cellulare, partim microcysticum	II	k	46
47	T138	Meningeoma cellulare recidivans	II	m	47
48	T139	Meningeoma cellulare recidivans	II	m	48
49	T140	Meningeoma/Solitary fibrous tumor	II	m	56
50	n.b., S19	Meningeoma atypicum	II	m	58

**Tab. 22 Przeżycie pacjentów z guzami glejowymi podane w miesiącach.** \* orientacyjna liczba miesięcy; (i) – zgon z przyczyn nienowotworowych (zator); (ii) - pacjent chory na stwardnienie guzowate (tuberous sclerosis).

Lp.	#	ROZPOZNANIE HISTOPATOLOGICZNE	WHO	PŁEĆ	WIEK	PRZEŻYCIE (miesiące od momentu operacji)
1	T2	GBM	IV	m	54	16
2	T6	GBM	IV	m	64	1,5
3	T7	GBM	IV	m	58	10
4	T8	GBM	IV	k	70	3
5	T10	GBM	IV	m	52	*nie > niż 27
6	T11	GBM	IV	m	53	33
7	T16	GBM	IV	m	60	*nie > niż 9
8	T20	GBM	IV	m	58	17
9	T22	GBM	IV	m	50	8
10	T23	GBM	IV	k	60	*nie > niż 12
11	T27	Giant cell glioblastoma	IV	k	53	19
12	T30	GBM recidivans	IV	m	60	1
13	T31	GBM recidivans	IV	k	59	4 (i)
14	T32	GBM recidivans	IV	k	58	8
15	T33	GBM recidivans	IV	k	52	3
16	T34	GBM recidivans	IV	m	55	16
17	T35	GBM recidivans	IV	k	46	11
18	T36	GBM recidivans	IV	k	56	5,5
19	T37	GBM recidivans	IV	m	59	3
20	T39	GBM recidivans	IV	k	54	3
21	T40	GBM recidivans	IV	m	50	3
22	T42	GBM recidivans	IV	m	62	4
23	T45	GBM recidivans	IV	m	45	po 21 m-cach nadal żyje
24	T46	GBM recidivans	IV	m	64	8
25	T48	GBM recidivans	IV	k	61	6
26	T53	Giant cell glioblastoma recidivans	IV	k	63	6
27	T56	Glioma anaplasticum NOS	III	m	58	po 23 m-cach nadal żyje
28	T57	Glioma anaplasticum recidivans	III	m	59	3
29	T60	Subependymal giant cell astrocytoma (ii)	I	m	23	*po ok. 24 m-cach nadal żyje

30	T61	Anaplastic astrocytoma	III	m	29	11
31	T63	Astrocytoma fibrillare	II	k	38	po 18 m-cach nadal żyje
32	T64	Astrocytoma fibrillare partim protoplasmaticum	II	m	51	po 12,5 m-cach nadal żyje
33	T66	Astrocytoma pilocyticum partim dedifferentiatum	I/II	k	20	po 25 m-cach nadal żyje
34	T67	Anaplastic astrocytoma	III	k	39	16
35	T69	Anaplastic astrocytoma	III	m	60	10
36	T71	Anaplastic astrocytoma	III	m	57	6
37	T75	Anaplastic astrocytoma	III	k	61	9
38	T78	Anaplastic astrocytoma	III	m	58	11
39	T81	Astrocytoma pilocyticum	I	k	55	po 3 m-cach nadal żyje
40	T82	Anaplastic astrocytoma recidivans	III	k	55	4
41	T84	Anaplastic astrocytoma recidivans	III	k	47	8,5
42	T85	Asyctocytoma gemistocyticum	II	m	31	po 39 m-cach nadal żyje
43	T87	Oligoastrocytoma anaplasticum	III	k	77	3,5
44	T88	Oligoastrocytoma anaplasticum	III	m	29	po 23 m-cach nadal żyje
45	T89	Oligodendroglioma isomorphum	II	m	59	6 m-cy
46	T90	Clear cell ependymoma	III	k	19	3
47	T91	Ganglioglioma	II	m	69	po 31 m-cach nadal żyje
48	T94	Gliosarcoma	IV	m	36	30
49	T95	Gliosarcoma	IV	k	75	10

Tab. 23 Przeżycie pacjentów z guzami glejowymi podane w miesiącach. \* orientacyjna liczba miesięcy.

Lp.	#	ROZPOZNANIE HISTOPATOLOGICZNE	oWHO	PŁEĆ	WIEK	PRZEŻYCIE (miesiące od momentu operacji)
1	T96	Meningeoma fibrosum	I	k	59	po ok. 36 m-cach nadal żyje
2	T98	Meningeoma fibrosum	I	k	31	po 29 m-cach nadal żyje
3	T100	Meningeoma fibrosum	I	k	58	po 24 m-cach nadal żyje
4	T101	Meningeoma fibrosum	I	k	64	po 24,5 m-cach nadal żyje
5	T102	Meningeoma fibrosum	I	k	47	po 29 m-cach nadal żyje
6	T107	Meningeoma fibrosum psammomatousum	I	k	63	po 26 m-cach nadal żyje
7	T108	Meningeoma transitionale	I	k	51	po 42 m-cach nadal żyje
8	T110	Meningeoma transitionale	I	k	50	po 37 m-cach nadal żyje
9	T111	Meningeoma transitionale	I	m	64	po 35 m-cach nadal żyje
10	T112	Meningeoma transitionale	I	m	67	po 22 m-cach nadal żyje
11	T115	Meningeoma angiomasum	I	k	81	39,5
12	T119	Meningeoma meningotheliale	I	k	73	po 31 m-cach bez wznowy
13	T121	Meningeoma meningotheliale	I	m	63	po 41 m-cach nadal żyje
14	T122	Meningeoma meningotheliale	I	k	64	po 30 m-cach nadal żyje
15	T123	Meningeoma meningotheliale	I	k	39	po 17 m-cach nadal żyje
16	T124	Meningeoma meningotheliale	I	k	71	po 34 m-cach nadal żyje
17	T125	Meningeoma meningotheliale	II	m	37	*po ok. 40 m-cach nadal żyje
18	T126	Meningeoma meningotheliale	I	k	58	po 38 m-cach nadal żyje
19	T127	Meningeoma meningotheliale	II	m	63	*po ok. 35 m-cach nadal żyje
20	T129	Meningeoma meningotheliale, fibrosum partim cellulare	I/II	k	50	po 35 m-cach nadal żyje
21	T130	Meningeoma meningotheliale, necroticans et psammomatousum	II	m	59	po 24 m-cach nadal żyje

22	T131	Meningeoma meningothele, partim metaplasticum (xantomatosum) et psammomatosum	I	k	52	*po ok. 33 m-cach nadal żyje
23	T132	Meningeoma meningothele, partim cellulare	I	k	40	po 11 m-cach nadal żyje
24	T133	Meningeoma meningothele psammomatosum	I	k	75	1
25	T137	Meningeoma cellulare partim microcysticum	II	k	46	po 40 m-cach nadal żyje

**Tab. 24** Charakterystyka pacjentów z guzami przerzutowymi do OUN. W nawiasach podano lokalizację guza pierwotnego. T - guz, S - surowica, k - kobieta, m - mężczyzna, n.b. - nie badano, b.d. – brak danych.

lp.	nr PRÓBY	ROZPOZNANIE HISTOPATOLOGICZNE	WHO	PŁEĆ	WIEK
<b>Guzy przerzutowe do OUN</b>					
1	n.b., S18	Metastasis carcinomatosa (płuco)	b.d.	k	56
2	n.b., S20	Metastasis carcinomatosa (płuco)	b.d.	m	74
3	n.b., S23	Metastasis carcinomatosa (piers)	b.d.	k	58
4	n.b., S26	Metastasis carcinomatosa (czerniak)	b.d.	m	62
5	T141, S27	Metastasis carcinomatosa (piers)	b.d.	k	38
6	T142, S28	Metastasis carcinomatosa (płuco)	b.d.	m	54
7	T143, S29	Metastasis carcinomatosa (płuco)	b.d.	m	65
8	T144, S30	Metastasis carcinomatosa (płuco)	b.d.	m	61
9	T145, S31	Metastasis carcinomatosa (płuco)	b.d.	m	54
10	T146, S32	Metastasis carcinomatosa (płuco)	b.d.	m	72



**Tab. 26 Zestawienie zbiorcze wyników reakcji MSP wszystkich analizowanych genów w populacji guzów glejowych.**  
Kolor czerwony wskazuje metylację (M), kolor niebieski natomiast braku metylacji (U). Pola białe, wraz z literą L wskazują wynik niepewny/brak wyniku. Podano liczbę zmetylowanych genów oraz współczynnik metylacji (WM) dla każdego z pacjentów.

#	DIAGNOZA HISTOPATOLOGICZNA i *WHO	MGMT	ERCC1	hMLH1	ATM	p16INK4A	p14ARF	p15INK4B	RASSF1A	RUNX3	GATA 6	NDRG2	PTEN	RARβ	Liczba zmetylowanych genów	WM
T1	GBM IV	M	U	U	U	U	U	U	M	M	U	U	U	U	3	0,23
T2	GBM IV	U	U	U	M	U	U	U	U	U	U	U	U	U	1	0,08
T3	GBM IV	M	U	U	M	U	M	M	M	M	M	U	M	U	8	0,62
T4	GBM IV	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	0	0,00
T5	GBM IV	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	M	1	0,08
T6	GBM IV	M	U	U	U	M	U	U	M	M	M	U	U	U	5	0,38
T7	GBM IV	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	0	0,00
T8	GBM IV	M	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	M	2	0,15
T9	GBM IV	U	U	U	U	U	M	U	M	M	M	U	U	U	4	0,31
T10	GBM IV	M	U	U	U	U	M	U	U	M	M	U	U	U	4	0,31
T11	GBM IV	M	U	U	U	U	U	U	U	M	M	U	U	U	3	0,23
T12	GBM IV	U	U	U	U	U	U	U	U	U	M	U	U	U	1	0,08
T13	GBM IV	M	U	U	U	U	U	U	M	U	M	U	U	U	3	0,23
T14	GBM IV	M	U	U	U	U	U	U	M	M	M	U	U	M	5	0,38
T15	GBM IV	U	U	U	U	U	M	M	M	U	U	U	U	U	3	0,23
T16	GBM IV	U	U	U	U	M	U	U	M	M	M	U	M	U	5	0,38
T17	GBM IV	U	U	U	U	M	U	U	U	M	U	U	U	U	2	0,15
T18	GBM IV	U	U	U	U	U	U	U	M	M	M	U	M	U	4	0,31
T19	GBM IV	U	U	U	U	M	U	U	M	M	M	U	U	U	4	0,31
T20	GBM IV	U	U	U	U	U	U	M	U	M	U	U	M	U	3	0,23
T21	GBM IV	U	U	U	U	U	U	M	M	U	U	U	U	U	2	0,15
T22	GBM IV	U	U	U	U	U	M	U	M	M	M	U	U	U	4	0,31
T23	GBM IV	U	U	U	U	U	U	U	M	U	M	U	U	U	2	0,15
T24	GBM IV	U	U	U	U	U	U	U	M	U	U	U	U	L	1	0,08
T25	GBM IV	M	U	U	U	U	U	U	M	M	M	U	U	U	4	0,31
T26	GBM IV	M	U	U	U	M	U	M	M	M	M	U	U	U	6	0,46
T27	Giant cell glioblastoma IV	U	U	U	U	U	U	M	M	U	U	U	U	U	2	0,15
T28	Giant cell glioblastoma IV	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	0	0,00
T29	GBM recidivans IV	U	U	U	U	U	M	M	M	M	U	U	U	U	4	0,31
T30	GBM recidivans IV	M	U	U	U	U	U	U	M	M	M	U	U	U	4	0,31
T31	GBM recidivans IV	U	U	U	U	U	U	U	U	M	U	U	U	U	1	0,08
T32	GBM recidivans IV	M	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	1	0,08
T33	GBM recidivans IV	M	U	U	U	U	U	U	U	M	M	U	U	U	3	0,23
T34	GBM recidivans IV	U	U	U	U	U	U	U	M	M	M	U	U	U	3	0,23
T35	GBM recidivans IV	U	U	U	U	U	U	U	M	U	U	U	U	L	1	0,08
T36	GBM recidivans IV	U	U	U	U	U	U	U	M	M	M	U	U	U	3	0,23
T37	GBM recidivans IV	M	U	U	U	U	M	M	U	M	M	U	U	U	5	0,38
T38	GBM recidivans IV	L	U	U	U	U	L	L	M	M	U	U	U	L	2	0,22
T39	GBM recidivans IV	M	U	U	U	U	U	U	M	U	U	U	U	U	1	0,08
T40	GBM recidivans IV	U	U	U	U	U	M	U	M	U	U	U	U	U	2	0,15
T41	GBM recidivans IV	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	L	0	0,00
T42	GBM recidivans IV	M	U	U	U	U	U	U	M	M	U	U	U	L	3	0,25
T43	GBM recidivans IV	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	0	0,00
T44	GBM recidivans IV	U	U	U	U	U	U	U	U	M	L	U	U	U	1	0,08
T45	GBM recidivans IV	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	M	U	1	0,08
T46	GBM recidivans IV	M	U	U	U	U	M	U	M	M	U	U	U	U	4	0,31
T47	GBM recidivans IV	U	U	U	U	U	U	U	M	M	M	U	U	U	3	0,23
T48	GBM recidivans IV	U	U	U	U	U	M	U	M	M	M	U	U	U	4	0,31
T49	GBM recidivans IV	M	U	U	U	M	M	U	M	M	M	U	U	U	6	0,46
T50	GBM recidivans (radionecrosis) IV	U	U	U	U	U	U	U	U	M	M	U	U	U	2	0,15
T51	GBM recidivans IV	M	U	U	U	M	U	U	M	M	M	U	U	U	5	0,38
T52	GBM recidivans IV (radionecrosis)	U	U	U	U	U	U	U	U	M	M	U	U	U	2	0,15
T53	Giant cell glioblastoma recidivans IV	U	U	U	U	U	M	U	M	M	M	U	U	U	4	0,31
T54	GBM recidivans z elementami PNET IV	M	U	U	U	M	U	U	U	M	U	U	U	U	3	0,23
T55	Pierwotny glejowy guz mózgu	U	U	U	U	U	M	M	M	M	M	U	U	U	5	0,38
T56	Glioma anaplasticum NOS III	M	U	U	U	U	U	U	M	U	U	U	U	U	2	0,15

#	DIAGNOZA HISTOPATOLOGICZNA I WHO	MGMT	ERCC1	hMLH1	ATM	p16INK4A	p14ARF	p15INK4B	RASSF1A	RUNX3	GATA 6	NDRG2	PTEN	RARβ	Liczba zmutowanych genów	WM
T57	Glioma anaplasticum recidivans III	U	U	U	U	U	U	U	U	U	M	U	U	U	1	0,08
T58	Neoplasma malignum anaplasticum	M	U	U	U	U	U	U	M	M	M	U	U	U	4	0,31
T59	Neoplasma malignum anaplasticum polymorphum	U	U	U	U	U	U	U	M	M	M	U	U	U	3	0,23
T60	Subependymal giant cell astrocytoma I [Tuberous sclerosis]	U	U	U	U	U	U	U	U	U	M	U	U	U	1	0,08
T62	Astrocytoma fibrillare II	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	M	1	0,08
T63	Astrocytoma fibrillare II	U	U	U	U	U	U	U	M	U	U	U	U	U	1	0,08
T64	Astrocytoma fibrillare partim protoplasmaticum II	U	U	U	U	U	U	M	M	M	U	U	U	U	3	0,23
T65	Astrocytoma fibrillare partim gemistocyticum II	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	0	0,00
T66	Astrocytoma pilocyticum partim dedifferentiatum I/II	U	U	U	U	U	U	U	M	U	U	U	U	U	1	0,08
T61	Anaplastic astrocytoma III	M	U	U	U	U	U	U	M	U	U	U	M	U	3	0,23
T67	Anaplastic astrocytoma III	U	U	U	U	U	M	M	M	M	U	U	U	U	4	0,31
T68	Anaplastic astrocytoma III	M	U	U	U	M	U	U	M	M	U	U	U	U	4	0,31
T69	Anaplastic astrocytoma III	M	U	U	U	U	M	U	M	M	U	U	U	M	5	0,38
T70	Anaplastic astrocytoma III	U	U	U	U	U	U	U	M	M	M	U	U	U	3	0,23
T71	Anaplastic astrocytoma III	M	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	1	0,08
T72	Anaplastic astrocytoma III	M	U	U	U	U	U	U	U	M	M	U	U	U	3	0,23
T73	Anaplastic astrocytoma III	U	U	U	U	U	M	U	U	M	M	U	U	U	3	0,23
T74	Anaplastic astrocytoma III	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	0	0,00
T75	Anaplastic astrocytoma III	U	U	U	U	U	U	U	M	M	U	U	U	U	2	0,15
T76	Anaplastic astrocytoma III	U	U	U	U	U	U	U	U	M	M	U	U	U	2	0,15
T77	Anaplastic astrocytoma III	U	U	U	U	U	M	U	U	U	U	U	U	U	1	0,08
T78	Anaplastic astrocytoma III	U	U	U	U	U	U	U	M	M	M	U	U	U	3	0,23
T79	Anaplastic astrocytoma III	U	U	U	U	M	U	U	M	M	U	U	U	U	3	0,23
T80	Anaplastic astrocytoma III	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	0	0,00
T81	Astrocytoma pilocyticum I	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	0	0,00
T82	Anaplastic astrocytoma recidivans III	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	0	0,00
T83	Anaplastic astrocytoma recidivans III	U	U	U	U	U	U	U	M	U	M	U	U	U	2	0,15
T84	Anaplastic astrocytoma recidivans III	M	U	U	U	U	U	U	M	M	M	U	U	U	4	0,31
T85	Asyctoma gemistocyticum II	U	U	U	U	U	U	U	M	U	U	U	U	U	1	0,08
T86	Astrocytoma gemistocyticum in astrocytoma angioplasticum vertens IV/III	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	0	0,00
T87	Oligoastrocytoma anaplasticum III	U	U	U	U	U	U	U	M	M	U	U	M	U	3	0,23
T88	Oligoastrocytoma anaplasticum III	M	U	U	U	U	U	U	M	U	U	U	U	U	2	0,15
T89	Oligodendroglioma isomorphum II	M	U	U	U	U	M	U	M	U	U	U	U	U	3	0,23
T90	Clear cell ependymoma III	U	U	U	U	M	U	U	M	U	U	U	U	U	2	0,15
T91	Ganglioglioma II	M	U	U	U	U	M	M	M	U	U	U	M	U	5	0,38
T92	Ganglioglioma II	U	U	U	U	M	M	U	M	M	M	U	U	U	5	0,38
T93	Ganglioglioma I	U	U	U	U	U	U	M	U	U	M	U	U	U	2	0,15
T94	Gliosarcoma IV	U	U	U	U	U	U	M	M	U	U	U	U	U	2	0,15
T95	Gliosarcoma IV	M	U	U	U	U	U	U	U	M	M	U	U	U	3	0,23

**Tab. 27 Zestawienie zbiorcze wyników reakcji MSP wszystkich analizowanych genów w populacji oponiaków. Kolor czerwony wskazuje metylację (M), kolor niebieski natomiast brak metylacji (U). Pola białe, wraz z literą L wskazują wynik niepewny/brak wyniku. Podano liczbę zmetylowanych genów oraz współczynnik metylacji (WM) dla każdego z pacjentów.**

#	DIAGNOZA HISTOPATOLOGICZNA i *WHO	ERCC1	hMLH1	ATM	p16INK4A	p14ARF	p15INK4B	RASSF1A	RUNX3	GATA 6	NDRG2	PTEN	RARβ	Liczba zmetylowanych genów	WM
T96	Meningeoma fibrosum I	U	U	U	U	U	M	U	U	U	U	U	U	1	0,08
T97	Meningeoma fibrosum II	U	U	U	U	M	M	M	U	U	U	U	M	4	0,33
T98	Meningeoma fibrosum I	U	U	M	U	U	U	M	U	U	U	U	U	2	0,17
T99	Meningeoma fibrosum I	U	U	U	U	U	U	U	M	M	U	U	U	2	0,17
T100	Meningeoma fibrosum I	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	0	0,00
T101	Meningeoma fibrosum I	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	0	0,00
T102	Meningeoma fibrosum I	U	U	U	U	U	M	U	U	U	U	U	U	1	0,08
T103	Meningeoma fibrosum I	U	U	U	U	M	U	U	U	U	U	U	U	1	0,08
T104	Meningeoma fibrosum I	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	0	0,00
T105	Meningeoma fibrosum I	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	0	0,00
T107	Meningeoma fibrosum psammomatosum I	U	U	U	U	M	M	U	U	U	U	U	U	2	0,17
T108	Meningeoma transitionale I	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	0	0,00
T109	Meningeoma transitionale I	U	U	U	M	U	U	U	U	U	U	U	U	1	0,08
T110	Meningeoma transitionale I	U	U	U	U	U	U	U	U	M	U	U	U	1	0,08
T111	Meningeoma transitionale I	U	U	U	M	U	M	M	U	U	U	U	U	3	0,25
T112	Meningeoma transitionale I	U	U	U	U	M	U	M	U	U	U	U	U	2	0,17
T113	Meningeoma transitionale I	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	0	0,00
T114	Meningeoma transitionale I	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	0	0,00
T115	Meningeoma angiomasum I	U	U	U	U	U	M	M	U	U	U	U	U	2	0,17
T116	Meningeoma angiomasum I	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	0	0,00
T117	Meningeoma angiomasum partim clarocellulare I/II	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	0	0,00
T118	Meningeoma meningotheleiale I	U	U	U	M	M	U	U	U	M	U	U	U	3	0,25
T119	Meningeoma meningotheleiale I	U	U	U	U	M	U	M	M	U	U	U	U	3	0,25
T120	Meningeoma meningotheleiale I	U	U	U	U	M	U	U	U	M	U	U	U	2	0,17
T121	Meningeoma meningotheleiale I	U	U	U	U	M	U	U	U	M	U	U	U	2	0,17
T122	Meningeoma meningotheleiale I	U	U	U	U	U	M	U	U	M	U	U	U	2	0,17
T123	Meningeoma meningotheleiale I	U	U	U	U	M	M	M	U	U	U	U	U	3	0,25
T124	Meningeoma meningotheleiale I	U	U	U	U	U	M	U	U	U	U	U	U	1	0,08
T125	Meningeoma meningotheleiale II	U	U	U	U	M	U	U	U	U	U	U	L	1	0,09
T126	Meningeoma meningotheleiale I	U	U	M	U	U	U	U	U	U	U	U	U	1	0,08
T127	Meningeoma meningotheleiale II	U	U	U	U	U	M	U	U	U	U	U	U	1	0,08
T128	Meningeoma meningotheleiale I	U	U	U	U	U	U	M	M	U	U	U	U	2	0,17
T129	Meningeoma meningotheleiale, partim fibrosum partim cellulare I/II	U	U	U	U	M	U	U	U	U	U	U	U	1	0,08
T130	Meningeoma meningotheleiale, partim necroticans et psammomatosum II	U	U	U	U	U	U	M	U	U	U	U	U	1	0,08
T131	Meningeoma meningotheleiale, partim metaplasticum (xantomasum) et psammomatosum I	U	U	M	U	U	U	U	M	U	U	U	U	2	0,17
T132	Meningeoma meningotheleiale, partim cellulare II	U	U	U	U	M	M	U	U	U	U	U	L	2	0,18
T133	Meningeoma meningotheleiale psammomatosum I	U	U	U	U	M	U	U	U	U	U	U	U	1	0,08
T134	Meningeoma meningotheleiale psammomatosum partim necroticans et hyalinisans I	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	0	0,00
T135	Meningeoma meningotheleiomatosum partim secretans et partim psammomatosum I	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	0	0,00
T136	Meningeoma meningotheleiomatosum partim oxyphilicum I	U	U	U	U	U	U	U	M	U	U	U	U	1	0,08
T137	Meningeoma cellulare partim microcysticum II	U	U	U	M	M	U	M	U	U	U	U	U	3	0,25
T138	Meningeoma cellulare recidivans II	U	U	U	U	U	U	M	U	U	U	U	U	1	0,08
T139	Meningeoma cellulare recidivans II	U	U	U	U	U	U	M	M	U	U	U	U	2	0,17
T140	Meningeoma/solitary fibrous tumor II	U	U	U	U	U	U	U	M	U	U	U	U	1	0,08

Tab. 44 Szczegółowe zestawienie wyników pirosekwencjonowania promotora genu *MGMT* – guzy glejowe. Podano wartości uśrednione dla co najmniej dwóch oznaczeń.

Lp.	#	ROZPOZNANIE HISTOPATOLOGICZNE i °WHO	PŁEĆ	WIEK	MSP	PIRO	Zgodność MSP i piro	CpG1	CpG2	CpG3	CpG4	CpG5	Średnia z 5 CpG
1	T1	GBM IV	k	73	M (3+)	piro M	Tak	17,06	14,13	16,92	11,54	18,15	15,56
2	T2	GBM IV	m	54	U	piro U	Tak	5,17	0,00	14,17	5,98	9,53	6,97
3	T3	GBM IV	k	64	M (3+)	piro M	Tak	44,01	58,22	44,29	51,36	65,38	52,65
4	T4	GBM IV	m	62	U	piro U	Tak	7,46	12,09	9,48	8,33	10,39	9,55
5	T5	GBM IV	m	41	U	piro U	Tak	10,30	12,36	0,00	0,00	0,00	4,53
6	T6	GBM IV	m	64	M (3+)	piro M	Tak	65,52	62,23	70,40	54,84	77,07	66,01
7	T7	GBM IV	m	58	U	piro U	Tak	0,00	3,94	0,00	2,27	3,56	1,95
8	T8	GBM IV	k	70	M (3+)	piro M	Tak	8,67	37,34	37,97	16,12	40,12	28,04
9	T9	GBM IV	m	56	U	piro U	Tak	4,83	7,00	0,00	2,74	7,66	4,45
10	T10	GBM IV	m	52	M (3+)	piro M	Tak	52,53	52,68	58,37	45,45	17,98	45,40
11	T11	GBM IV	m	53	M (3+)	piro M	Tak	52,83	52,34	55,72	46,79	61,83	53,90
12	T12	GBM IV	k	55	U	piro U	Tak	5,86	5,26	6,47	6,15	7,97	6,34
13	T13	GBM IV	k	70	M (3+)	piro M	Tak	60,69	60,12	21,50	20,91	16,14	35,87
14	T14	GBM IV	k	60	M (3+)	piro M	Tak	21,73	55,09	20,85	15,79	20,29	26,75
15	T15	GBM IV	m	58	U	piro M	Nie	11,04	17,22	14,45	12,15	21,99	15,37
16	T16	GBM IV	m	60	U	piro U	Tak	4,77	4,96	5,14	1,98	4,74	4,32
17	T17	GBM IV	k	52	U	piro	Nie	12,71	12,47	18,53	4,27	12,60	12,11

						M							
18	T18	GBM IV	k	65	U	piro U	Tak	1,87	2,26	1,60	1,30	2,12	1,83
19	T19	GBM IV	k	65	U	piro U	Tak	5,22	4,42	6,60	0,00	0,00	3,25
20	T20	GBM IV	m	58	U	piro U	Tak	5,17	7,07	21,78	0,00	7,80	8,36
21	T21	GBM IV	m	47	U	piro U	Tak	2,75	0,00	26,93	0,00	3,30	6,59
22	T22	GBM IV	m	50	U	piro U	Tak	11,25	11,03	0,00	0,00	0,00	4,46
23	T23	GBM IV	k	60	U	piro M	<b>Nie</b>	<b>53,73</b>	<b>64,95</b>	<b>23,60</b>	<b>56,46</b>	<b>19,38</b>	<b>43,62</b>
24	T24	GBM IV	m	64	U	piro U	Tak	11,84	0,00	0,00	0,00	10,78	4,52
25	T25	GBM IV	k	74	M (3+)	piro M	Tak	<b>61,41</b>	<b>64,45</b>	<b>63,82</b>	<b>60,38</b>	<b>70,47</b>	<b>64,11</b>
26	T26	GBM IV		76	M (3+)	piro M	Tak	<b>84,21</b>	<b>81,32</b>	<b>82,78</b>	<b>78,50</b>	<b>86,11</b>	<b>82,58</b>
27	T27	Giant cell glioblastoma IV	k	53	U	piro U	Tak	5,33	14,33	0,00	0,00	0,00	3,93
28	T28	Giant cell glioblastoma IV	m	55	U	piro M	<b>Nie</b>	<b>26,96</b>	<b>29,05</b>	<b>4,74</b>	<b>9,43</b>	<b>25,33</b>	<b>19,10</b>
29	T29	GBM recidivans IV	m	48	U	piro U	Tak	9,81	9,59	22,38	0,00	17,48	11,85
30	T30	GBM recidivans IV	m	60	M (3+)	piro M	Tak	<b>20,64</b>	<b>45,93</b>	<b>24,13</b>	<b>12,09</b>	<b>24,67</b>	<b>25,49</b>
31	T31	GBM recidivans IV	k	59	U	piro U	Tak	11,95	11,74	0,00	2,81	14,71	8,24
32	T32	GBM recidivans IV	k	58	M (3+)	piro M	Tak	<b>43,82</b>	<b>78,70</b>	<b>11,61</b>	<b>17,00</b>	<b>34,65</b>	<b>37,16</b>
33	T33	GBM recidivans IV	k	52	M (3+)	piro M	Tak	<b>54,05</b>	<b>54,30</b>	<b>59,26</b>	<b>51,09</b>	<b>65,26</b>	<b>56,79</b>
34	T34	GBM recidivans IV	m	55	U	piro U	Tak	0,00	0,00	0,00	9,35	0,00	1,87
35	T35	GBM recidivans IV	k	46	U	piro U	Tak	2,34	2,92	3,26	2,40	4,16	3,01
36	T36	GBM recidivans IV	k	56	U	piro	Tak	0,00	0,00	0,00	0,00	5,85	1,17

						U								
37	T37	GBM recidivans IV	m	59	M (3+)	piro M	Tak	54,19	54,79	50,07	45,64	18,48	44,63	
38	T38	GBM recidivans IV	k	70	L	piro M	Nie	100,00	85,49	15,93	69,74	0,00	54,23	
39	T39	GBM recidivans IV	k	54	M (3+)	piro M	Tak	18,10	31,74	31,63	31,20	35,96	29,72	
40	T40	GBM recidivans IV	m	50	U	piro U	Tak	16,68	6,87	0,00	4,37	6,02	6,79	
41	T41	GBM recidivans IV	m	57	U	piro U	Tak	3,22	0,00	4,02	2,20	0,00	1,89	
42	T42	GBM recidivans IV	m	62	M (1+)	piro M	Tak	30,43	22,89	37,54	4,74	7,86	20,69	
43	T43	GBM recidivans IV	k	60	U	piro U	Tak	19,78	0,00	14,74	8,26	0,00	8,56	
44	T44	GBM recidivans IV	m	31	U	piro U	Tak	0,00	0,00	0,00	7,46	0,00	1,49	
45	T45	GBM recidivans IV	m	45	U	piro U	Tak	8,50	0,00	0,00	0,00	0,00	1,70	
46	T46	GBM recidivans IV	m	64	M (3+)	piro M	Tak	26,42	30,44	33,97	29,79	0,00	24,12	
47	T47	GBM recidivans IV	k	51	U	piro U	Tak	6,08	8,91	10,39	0,00	0,00	5,07	
48	T48	GBM recidivans IV	k	61	U	piro U	Tak	6,50	0,00	0,00	0,00	0,00	1,30	
49	T49	GBM recidivans IV	k	65	M (3+)	piro M	Tak	80,77	77,70	75,12	75,24	77,70	77,30	
50	T50	GBM recidivans (radionecrosis) IV	k	37	U	piro U	Tak	5,85	19,35	0,00	0,00	13,89	7,82	
51	T51	GBM recidivans IV	k	50	M (3+)	piro U	Nie	17,33	9,94	0,00	0,00	20,18	9,49	
52	T52	GBM recidivans IV (radionecrosis)	k	64	U	piro U	Tak	3,62	0,00	0,00	4,09	0,00	1,54	
53	T53	Giant cell glioblastoma recidivans IV	k	63	U	piro U	Tak	0,00	3,96	5,23	3,71	0,00	2,58	
54	T54	GBM recidivans z elementami PNET IV	k	32	M (3+)	piro M	Tak	88,58	88,08	80,83	65,57	69,60	78,53	
55	T55	Pierwotny glejowy nowotwór złośliwy	m	56	U	piro	Tak	0,00	0,00	0,00	5,50	0,00	1,10	

						U							
56	T56	Glioma anaplasticum NOS III	m	58	M	piro M	Tak	41,35	40,23	42,04	35,46	43,31	40,47
57	T57	Glioma anaplasticum recidivans III	m	59	U	piro U	Tak	7,28	6,08	0,00	0,00	0,00	2,67
58	T58	Neoplasma malignum anaplasticum	m	56	M	piro M	Tak	91,60	93,13	93,86	92,12	60,67	86,27
59	T59	Neoplasma malignum anaplasticum polymorphum	m	66	U	piro U	Tak	10,23	0,00	11,49	4,59	0,00	5,26
60	T60	Subependymal giant cell astrocytoma I [Tuberous sclerosis]	m	23	U	piro U	Tak	14,73	10,62	0,00	9,14	0,00	6,90
61	T62	Astrocytoma fibrillare II	k	57	U	piro U	Tak	2,30	1,67	1,77	1,39	2,44	1,91
62	T63	Astrocytoma fibrillare II	k	38	U	piro U	Tak	5,21	18,76	0,00	4,77	6,36	7,02
63	T64	Astrocytoma fibrillare partim protoplasmaticum II	m	51	U	piro M	Nie	37,37	41,20	4,82	4,88	5,24	18,70
64	T66	Astrocytoma pilocyticum partim dedifferentiatum I/II	k	20	U	piro U	Tak	2,67	9,59	2,70	8,28	2,81	5,21
65	T61	Anaplastic astrocytoma III	m	29	M (3+)	piro M	Tak	33,96	49,83	17,75	39,07	54,91	39,10
66	T67	Anaplastic astrocytoma III	k	39	U	piro U	Tak	6,53	10,30	3,46	2,14	4,25	5,33
67	T68	Anaplastic astrocytoma III	k	41	M (3+)	piro M	Tak	65,76	55,64	59,82	31,30	34,77	49,46
68	T69	Anaplastic astrocytoma III	m	60	M (3+)	piro M	Tak	65,20	66,65	70,63	73,92	74,53	70,18
69	T70	Anaplastic astrocytoma III	m	29	U	piro U	Tak	11,20	2,82	5,86	2,75	6,93	5,91
70	T71	Anaplastic astrocytoma III	m	57	M (3+)	piro M	Tak	54,72	32,73	17,99	49,18	14,59	33,84
71	T72	Anaplastic astrocytoma III	k	73	M (3+)	piro M	Tak	89,99	90,43	81,23	64,38	90,98	83,40
72	T73	Anaplastic astrocytoma III	k	48	U	piro U	Tak	14,14	8,49	4,98	0,00	9,96	7,51
73	T74	Anaplastic astrocytoma III	m	83	U	piro U	Tak	8,06	8,02	15,78	0,00	5,89	7,55
74	T75	Anaplastic astrocytoma III	k	61	U	piro	Tak	8,06	6,28	6,26	0,00	8,54	5,83

						U							
75	T76	Anaplastic astrocytoma III	m	62	U	piro U	Tak	5,85	0,00	6,09	0,00	0,00	2,39
76	T77	Anaplastic astrocytoma III	m	45	U	piro U	Tak	6,77	18,38	5,64	0,00	0,00	6,16
77	T78	Anaplastic astrocytoma III	m	58	U	piro U	Tak	10,36	8,27	0,00	0,00	0,00	3,73
78	T79	Anaplastic astrocytoma III	k	66	U	piro U	Tak	8,33	7,20	10,92	8,98	15,96	10,28
79	T81	Astrocytoma pilocyticum I	k	55	U	piro U	Tak	2,83	2,83	4,97	2,00	19,83	6,49
80	T82	Anaplastic astrocytoma recidivans III	k	55	U	piro U	Tak	0,00	0,00	3,63	0,00	4,62	1,65
81	T83	Anaplastic astrocytoma recidivans III	m	53	U	piro U	Tak	4,98	0,00	5,54	3,15	10,84	4,90
82	T84	Anaplastic astrocytoma recidivans III	k	47	M (3+)	piro M	Tak	62,08	33,21	12,67	9,13	13,00	26,02
83	T85	Asyctocytoma gemistocyticum II	m	31	U	piro U	Tak	3,13	0,00	0,00	3,42	4,58	2,22
84	T87	Oligoastrocytoma anaplasticum III	k	77	U	piro U	Tak	0,00	6,61	0,00	5,07	9,30	4,20
85	T88	Oligoastrocytoma anaplasticum III	m	29	M	piro M	Tak	35,68	37,96	40,14	24,44	7,35	29,11
86	T89	Oligodendroglioma isomorphum II	m	59	M (3+)	piro M	Tak	77,34	74,84	67,48	69,18	33,50	64,47
87	T90	Clear cell ependymoma III	k	19	U	piro M	Nie	27,05	34,59	42,29	31,62	9,70	29,05
88	T91	Ganglioglioma II	m	69	M (3+)	piro M	Tak	61,26	79,40	81,78	77,89	61,17	72,30
89	T92	Ganglioglioma II	m	37	U	piro M	Tak	40,09	44,24	48,27	13,45	4,62	30,13
90	T93	Ganglioglioma I	m	16	U	piro U	Tak	0,00	0,00	0,00	6,50	0,00	1,30
91	T95	Gliosarcoma IV	k	75	M (3+)	piro M	Tak	40,05	45,53	31,45	44,39	0,00	32,28



Tab. 51 Szczegółowe zestawienie wyników pirosekwencjonowania promotora genu *NDRG2* – guzy glejowe. Podano wartości uśrednione dla co najmniej dwóch oznaczeń.

Lp.	#	ROZPOZNANIE HISTOPATOLOGICZNE i °WHO	PŁEĆ	WIEK	MSP	PIRO	Zgodność MSP i piro	CpG1	CpG2	CpG3	CpG4	CpG5	Średnia z 5 CpG
1	T1	GBM IV	k	73	U	piro M	Nie	8,31	7,53	15,79	26,40	16,59	14,92
2	T2	GBM IV	m	54	U	piro M	Nie	12,82	29,93	29,25	25,90	0,00	19,58
3	T3	GBM IV	k	64	U	piro M	Nie	4,22	14,45	14,86	16,48	13,37	12,68
4	T4	GBM IV	m	62	U	piro M	Nie	6,13	19,39	25,73	33,64	27,95	22,57
5	T5	GBM IV	m	41	U	piro M	Nie	7,88	10,33	20,04	36,95	18,10	18,66
6	T6	GBM IV	m	64	U	piro M	Nie	16,17	29,60	31,83	44,68	17,01	27,86
7	T7	GBM IV	m	58	U	piro M	Nie	0,00	20,88	30,89	50,00	0,00	20,35
8	T8	GBM IV	k	70	U	piro M	Nie	12,34	19,17	16,27	23,64	19,47	18,18
9	T9	GBM IV	m	56	U	piro M	Nie	8,81	8,63	20,50	24,33	18,89	16,23
10	T10	GBM IV	m	52	U	piro M	Nie	10,27	8,53	22,17	34,35	18,54	18,77
11	T11	GBM IV	m	53	U	piro M	Nie	14,88	21,37	17,88	31,57	21,86	21,51
12	T12	GBM IV	k	55	U	piro M	Nie	39,11	20,08	11,41	27,66	30,97	25,84
13	T13	GBM IV	k	70	U	piro M	Nie	17,77	17,89	22,39	16,76	13,92	17,75
14	T14	GBM IV	k	60	U	piro M	Nie	14,32	23,44	22,29	34,20	21,37	23,12
15	T15	GBM IV	m	58	U	piro M	Nie	34,05	15,24	18,25	26,59	16,75	22,18
16	T16	GBM IV	m	60	U	piro M	Nie	12,65	14,21	8,03	25,57	18,66	15,82
17	T17	GBM IV	k	52	U	piro	Nie	33,44	37,05	33,51	82,80	42,39	45,84

						M							
18	T18	GBM IV	k	65	U	piro U	<b>Tak</b>	0,00	0,00	4,50	0,00	0,00	0,90
19	T19	GBM IV	k	65	U	piro M	Nie	11,27	24,61	13,07	39,83	31,30	24,01
20	T20	GBM IV	m	58	U	piro M	Nie	24,97	30,72	0,00	29,38	13,71	19,75
21	T23	GBM IV	k	60	U	piro U	<b>Tak</b>	12,12	0,00	12,41	0,00	0,00	4,91
22	T24	GBM IV	m	64	U	piro M	Nie	0,00	33,32	33,89	46,50	24,77	27,70
23	T28	Giant cell glioblastoma IV	m	55	U	piro M	Nie	32,22	26,61	0,00	0,00	17,11	15,19
24	T29	GBM recidivans IV	m	48	U	piro M	Nie	12,98	17,76	26,27	47,20	33,17	27,47
25	T30	GBM recidivans IV	m	60	U	piro M	Nie	15,59	7,19	16,97	21,63	15,19	15,31
26	T31	GBM recidivans IV	k	59	U	piro U	<b>Tak</b>	0,00	0,00	20,00	24,21	0,00	8,84
27	T32	GBM recidivans IV	k	58	U	piro U	<b>Tak</b>	6,68	9,57	21,43	8,51	8,19	10,87
28	T33	GBM recidivans IV	k	52	U	piro M	Nie	13,43	16,47	25,33	64,95	27,73	29,58
29	T34	GBM recidivans IV	m	55	U	piro U	<b>Tak</b>	10,16	13,88	0,00	0,00	15,65	7,94
30	T35	GBM recidivans IV	k	46	U	piro M	Nie	0,00	32,65	29,41	64,79	15,76	28,52
31	T36	GBM recidivans IV	k	56	U	piro M	Nie	9,75	15,45	11,51	14,74	13,58	13,01
32	T37	GBM recidivans IV	m	59	U	piro M	Nie	7,79	5,33	15,40	19,99	12,13	12,13
33	T38	GBM recidivans IV	k	70	U	piro M	Nie	18,23	0,00	0,00	28,43	32,55	15,84
34	T39	GBM recidivans IV	k	54	U	piro M	Nie	17,11	24,41	29,02	39,09	26,52	27,23
35	T40	GBM recidivans IV	m	50	U	piro U	<b>Tak</b>	0,00	0,00	0,00	38,62	0,00	7,72
36	T41	GBM recidivans IV	m	57	U	piro	Nie	24,24	0,00	28,07	23,80	22,99	19,82

						M							
37	T42	GBM recidivans IV	m	62	U	piro M	Nie	22,78	30,02	13,95	41,28	9,89	23,58
38	T43	GBM recidivans IV	k	60	U	piro U	Tak	8,76	10,54	9,54	11,68	10,73	10,25
39	T44	GBM recidivans IV	m	31	U	piro M	Nie	24,69	41,73	34,47	89,19	75,17	53,05
40	T45	GBM recidivans IV	m	45	U	piro U	Tak	0,00	18,53	0,00	0,00	0,00	3,71
41	T46	GBM recidivans IV	m	64	U	piro U	Tak	0,00	-	0,00	0,00	0,00	0,00
42	T47	GBM recidivans IV	k	51	U	piro M	Nie	0,00	19,22	13,89	21,74	7,37	12,44
43	T48	GBM recidivans IV	k	61	U	piro U	Tak	10,87	0,00	5,86	0,00	9,47	5,24
44	T49	GBM recidivans IV	k	65	U	piro M	Nie	0,00	0,00	24,86	0,00	36,42	12,26
45	T50	GBM recidivans (radionecrosis) IV	k	37	U	piro M	Nie	16,34	27,86	7,06	31,22	26,81	21,86
46	T53	Giant cell glioblastoma recidivans IV	k	63	U	piro U	Tak	5,52	7,90	10,75	15,50	8,65	9,66
47	T54	GBM recidivans z elementami PNET IV	k	32	U	piro M	Nie	17,36	18,37	16,90	28,92	20,44	20,40
48	T55	Pierwotny glejowy nowotwór złośliwy	m	56	U	piro M	Nie	7,94	21,31	11,56	33,02	32,86	21,34
49	T56	Glioma anaplasticum NOS III	m	58	U	piro M	Nie	18,67	28,12	30,95	48,39	34,19	32,06
50	T57	Glioma anaplasticum recidivans III	m	59	U	piro M	Nie	0,00	12,88	7,74	14,07	24,72	11,88
51	T58	Neoplasma malignum anaplasticum	m	56	U	piro U	Tak	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
52	T59	Neoplasma malignum anaplasticum polymorphum	m	66	U	piro M	Nie	45,21	19,95	37,44	39,63	42,70	36,99
53	T60	Subependymal giant cell astrocytoma I [Tuberous sclerosis]	m	23	U	piro M	Nie	19,38	13,99	12,67	15,96	23,97	17,19
54	T61	Anaplastic astrocytoma III	m	29	U	piro U	Tak	7,33	13,46	12,37	7,33	7,84	9,66
55	T62	Astrocytoma fibrillare II	k	57	U	piro	Nie	9,33	13,27	17,88	24,40	9,46	14,87

						M							
56	T64	Astrocytoma fibrillare partim protoplasmaticum II	m	51	U	piro U	<b>Tak</b>	0,00	0,00	4,69	0,00	24,18	5,77
57	T66	Astrocytoma pilocyticum partim dedifferentiatum I/II	k	20	U	piro M	Nie	6,38	7,18	22,32	39,07	23,84	19,75
58	T67	Anaplastic astrocytoma III	k	39	U	piro U	<b>Tak</b>	9,50	9,39	9,18	14,42	10,95	10,69
59	T68	Anaplastic astrocytoma III	k	41	U	piro M	Nie	10,97	27,47	21,49	63,97	9,15	26,61
60	T69	Anaplastic astrocytoma III	m	60	U	piro M	Nie	7,84	25,86	20,20	47,06	12,16	22,62
61	T70	Anaplastic astrocytoma III	m	29	U	piro M	Nie	16,38	20,75	18,18	45,44	31,05	26,36
62	T71	Anaplastic astrocytoma III	m	57	U	piro M	Nie	24,49	11,22	20,69	14,41	29,17	19,99
63	T72	Anaplastic astrocytoma III	k	73	U	piro M	Nie	8,64	26,22	9,47	41,98	11,45	19,55
64	T73	Anaplastic astrocytoma III	k	48	U	piro U	<b>Tak</b>	0,00	7,78	7,77	5,50	5,50	5,31
65	T74	Anaplastic astrocytoma III	m	83	U	piro U	<b>Tak</b>	8,89	9,64	5,00	11,43	17,28	10,45
66	T75	Anaplastic astrocytoma III	k	61	U	piro U	<b>Tak</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	-	0,00
67	T76	Anaplastic astrocytoma III	m	62	U	piro M	Nie	21,14	28,28	23,80	0,00	26,51	19,95
68	T77	Anaplastic astrocytoma III	m	45	U	piro M	Nie	0,00	38,35	13,41	0,00	31,62	16,68
69	T79	Anaplastic astrocytoma III	k	66	U	piro M	Nie	19,36	47,07	41,01	33,62	0,00	28,21
70	T81	Astrocytoma pilocyticum I	k	55	U	piro U	<b>Tak</b>	0,00	20,96	0,00	20,18	0,00	8,23
71	T82	Anaplastic astrocytoma recidivans III	k	55	U	piro M	Nie	23,24	16,67	33,62	70,51	34,38	35,68
72	T83	Anaplastic astrocytoma recidivans III	m	53	U	piro M	Nie	26,32	15,98	26,51	42,51	25,63	27,39
73	T84	Anaplastic astrocytoma recidivans III	k	47	U	piro U	<b>Tak</b>	0,00	0,00	-	0,00	0,00	0,00
74	T85	Asyocytoma gemistocyticum II	m	31	U	piro	Nie	32,30	13,53	28,33	25,98	0,00	20,03

						M								
75	T87	Oligoastrocytoma anaplasticum III	k	77	U	piro M	Nie	10,66	16,64	22,67	15,72	22,52	17,64	
76	T88	Oligoastrocytoma anaplasticum III	m	29	U	piro U	Tak	0,00	0,00	9,72	12,33	14,48	7,31	
77	T89	Oligodendroglioma isomorphum II	m	59	U	piro U	Tak	0,00	16,61	16,00	0,00	16,78	9,88	
78	T90	Clear cell ependymoma III	k	19	U	piro U	Tak	0,00	27,21	0,00	0,00	0,00	5,44	
79	T91	Ganglioglioma II	m	69	U	piro M	Nie	0,00	22,54	0,00	18,90	14,29	11,15	
80	T92	Ganglioglioma II	m	37	U	piro M	Nie	5,21	6,98	14,92	21,56	6,71	11,07	
81	T93	Ganglioglioma I	m	16	U	piro U	Tak	21,83	26,54	0,00	0,00	0,00	9,67	
82	T95	Gliosarcoma IV	k	75	U	piro U	Tak	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

Tab. 58 Szczegółowe zestawienie wyników pirosekwencjonowania promotora genu *NDRG2* – oponiaki. Podano wartości uśrednione dla co najmniej dwóch oznaczeń.

Lp.	#	ROZPOZNANIE HISTOPATOLOGICZNE i °WHO	PŁEĆ	WIEK	MSP	PIRO	Zgodność MSP i piro	CpG1	CpG2	CpG3	CpG4	CpG5	Średnia z 5 CpG
1	T96	Meningeoma fibrosum I	k	59	U	piro M	Nie	11,79	17,39	14,21	0,00	14,18	11,51
2	T97	Meningeoma fibrosum II	m	87	U	piro M	Nie	0,00	17,69	16,55	25,89	12,91	14,61
3	T98	Meningeoma fibrosum I	k	31	U	piro U	Tak	11,72	9,10	6,38	0,00	14,22	8,28
5	T108	Meningeoma transitionale I	k	51	U	piro M	Nie	6,63	13,95	21,74	19,50	23,17	16,99
6	T109	Meningeoma transitionale I	k	48	U	piro M	Nie	9,00	13,72	21,59	12,84	11,09	13,65
7	T110	Meningeoma transitionale I	k	50	U	piro U	Tak	11,48	15,31	0,00	0,00	14,34	8,22

8	T111	Meningeoma transitionale I	m	64	U	piro M	Nie	15,86	9,85	13,72	22,74	19,01	16,23
10	T115	Meningeoma angiomasum I	k	81	U	piro M	Nie	10,35	20,69	12,14	35,79	0,00	15,79
9	T118	Meningeoma meningotheleiale I	k	70	U	piro M	Nie	7,49	8,54	21,64	34,34	7,60	15,92
11	T119	Meningeoma meningotheleiale I	k	73	U	piro M	Nie	8,99	34,92	25,87	53,62	16,68	28,02
12	T120	Meningeoma meningotheleiale I	k	57	U	piro M	Nie	12,22	17,35	9,10	38,89	8,44	17,20
13	T121	Meningeoma meningotheleiale I	m	63	U	piro M	Nie	17,03	10,47	21,48	18,05	11,27	15,66
14	T122	Meningeoma meningotheleiale I	k	64	U	piro M	Nie	9,10	17,56	12,49	34,60	12,97	17,34
15	T123	Meningeoma meningotheleiale I	k	39	U	piro M	Nie	0,00	10,67	26,28	13,96	7,97	11,78
17	T124	Meningeoma meningotheleiale I	k	71	U	piro M	Nie	17,41	12,74	11,80	0,00	14,50	11,29
18	T126	Meningeoma meningotheleiale I	k	58	U	piro M	Nie	23,84	12,63	9,15	38,73	15,58	19,98
19	T127	Meningeoma meningotheleiale II	m	63	U	Piro U	<b>Tak</b>	21,00	0,00	15,14	0,00	17,91	10,81
20	T129	Meningeoma meningotheleiale, partim fibrosum partim cellulare I/II	k	50	U	piro M	Nie	0,00	8,87	9,57	37,33	10,00	13,15
21	T130	Meningeoma meningotheleiale, partim necroticans et psammomasum II	m	59	U	piro M	Nie	0,00	0,00	24,69	55,11	13,75	18,71
22	T131	Meningeoma meningotheleiale, partim metaplasticum (xantomasum) et psammomasum I	k	52	U	piro M	Nie	9,04	36,23	23,08	44,31	16,44	25,82
16	T132	Meningeoma meningotheleiale, partim cellulare II	k	40	U	piro M	Nie	0,00	20,24	8,44	22,79	11,13	12,52
4	T133	Meningeoma meningotheleiale psammomasum I	k	75	U	piro M	Nie	0,00	25,63	10,62	42,46	17,93	19,33
23	T137	Meningeoma cellulare, partim microcysticum II	k	46	U	piro M	Nie	0,00	0,00	28,23	20,30	24,78	14,66

24	T138	Meningeoma cellulare recidivans II	m	47	U	piro U	Tak	7,05	7,95	6,05	12,50	11,68	9,04
25	T139	Meningeoma cellulare recidivans II	m	48	U	piro M	Nie	0,00	0,00	19,59	35,95	22,66	15,64

**Tab. 66 Zestawienie wyników reakcji MSP dla genów *MGMT*, *RASSF1A*, *CDKN2B (p15INK4B)* oraz *p14ARF* pacjentów z guzami glejowymi.** Analizie poddane było DNA wolnokrążące izolowane z surowicy (lewa część tabeli; próby S1, S2 etc.), oraz dla części pacjentów również tkanka guza mózgu (prawa część tabeli). b.d. – brak danych

L.p	#	ROZPOZNANIE HISTOPATOLOGICZNE i °WHO	WIEK	PŁEĆ	SUROWICA	SUROWICA	SUROWICA	SUROWICA	#	GUZ	GUZ	GUZ	GUZ
					<i>MGMT</i>	<i>RASSF1A</i>	<i>CDKN2B (p15INK4B)</i>	<i>p14ARF</i>		<i>MGMT</i>	<i>RASSF1A</i>	<i>CDKN2B (p15INK4B)</i>	<i>p14ARF</i>
1	S1	Gliosarcoma recidivans IV	66	m	U	U	U	U					
2	S2	GBM IV	60	k	U	U	U	M					
3	S3	Anaplastic astrocytoma III	71	k	U	M	U	U					
4	S4	Anaplastic astrocytoma III	62	m	M	M	U	U					
5	S5	Anaplastic astrocytoma III	49	k	U	M	U	U					
6	S6	GBM recidivans, partim anaplastic astrocytoma IV	56	m	M	M	U	U					
7	S7	GBM IV	49	m	U	U	M	M					
8	S8	Anaplastic astrocytoma III	67	k	U	U	M	M					
9	S9	Anaplastic astrocytoma III	45	m	U	U	U	M	T77	U	U	U	M
10	S10	GBM IV	50	m	U	M	U	M	T22	U	M	U	M
11	S11	GBM recidivans IV	64	m	M	M	U	M	T46	M	M	U	M
12	S12	Anaplastic astrocytoma III	58	m	U	U	U	U	T78	U	M	U	U
13	S13	Gliosarcoma IV	75	k	U	U	U	U	T95	M	U	U	U
14	S14	Astrocytoma fibrillare II	38	k	U	M	U	U	T63	U	M	U	U
15	S15	GBM recidivans IV	51	k	U	U	U	U	T47	U	M	U	U
16	S16	Astrocytoma fibrillare partim protoplasmaticum II	51	m	U	M	U	M	T64	U	M	M	U
17	S17	GBM recidivans IV	61	k	U	U	U	U	T48	U	M	U	M
	Σ M				3/17	8/17	2/17	7/17		2/9	7/9	1/9	4/9
	% M				17.65%	47.06%	11.76%	41.18%		22.22%	77.78%	11.11%	44.44%

**Tab. 67 Zestawienie wyników reakcji MSP dla genów *MGMT*, *RASSF1A*, *CDKN2B (p15INK4B)* oraz *p14ARF* pacjentów z guzami OUN innymi niż glejowe, tj. oponiakami oraz guzami przerzutowymi do OUN (w nawiasie podano miejsce nowotworu pierwotnego). Analizie poddane było DNA wolnokrążące izolowane z surowicy (lewa część tabeli; próby S1, S2 etc.), oraz dla części pacjentów również tkanka guza mózgu (prawa część tabeli). b.d. – brak danych**

L.p	#	ROZPOZNANIE HISTOPATOLOGICZNE	WIEK	PŁEĆ	SUROWICA	SUROWICA	SUROWICA	SUROWICA	#	GUZ	GUZ	GUZ	GUZ
					<i>MGMT</i>	<i>RASSF1A</i>	<i>CDKN2B (p15INK4B)</i>	<i>p14ARF</i>		<i>MGMT</i>	<i>RASSF1A</i>	<i>CDKN2B (p15INK4B)</i>	<i>p14ARF</i>
1	S18	Metastasis carcinomatosa (płuco)	56	k	U	U	U	U					
2	S19	Meningeoma atypicum II	58	m	U	U	U	M					
3	S20	Metastasis carcinomatosa (płuco)	74	m	U	U	U	M					
4	S21	Meningeoma angiomasum recidivans partim clarocellulare II	53	k	U	M	U	U					
5	S22	Meningeoma fibrosum I	71	k	U	U	U	U					
6	S23	Metastasis carcinomatosa (piers)	58	k	U	M	M	M					
7	S24	Meningeoma meningotheliale, partim microcysticum I	62	m	U	U	U	U					
8	S25	Meningeoma meningotheliale I	64	k	M	M	M	U					
9	S26	Metastasis carcinomatosa (czerniak)	62	m	U	M	U	U					
10	S27	Metastasis carcinomatosa (piers)	38	k	U	U	M	U	T141	U	U	U	U
11	S28	Metastasis carcinomatosa (płuco)	54	m	U	U	U	U	T142	U	U	U	M
12	S29	Metastasis carcinomatosa (płuco)	65	m	U	U	U	M	T143	U	U	U	M
13	S30	Metastasis carcinomatosa (płuco)	61	m	U	U	M	U	T144	U	U	U	U
14	S31	Metastasis carcinomatosa (płuco)	54	m	U	U	U	U	T145	U	M	U	U
15	S32	Metastasis carcinomatosa (płuco)	72	m	U	M	U	U	T146	U	U	U	U
16	S33	Meningeoma fibrosum	35	k	U	U	U	U	T106	U	U	U	M
	Σ M				1/16	5/16	4/16	4/16		0/7	1/7	0/7	3/7
	% M				6.25%	31.25%	25.00%	25.00%		0.00%	14.29%	0.00%	42.86%



**Tab. 69 Porównanie wyników dla analizy metylacji DNA wolnokrążącego oraz DNA guza.** Status metylacji oznaczono standardowo literami M i U, natomiast źródło pozyskanego materiału do analizy oznaczono odpowiednio dla DNA wolnokrążącego – Surowica, a dla DNA z guza – Guz. Dane liczbowe odnoszą się do ilości prób odpowiednio wykazujących wspólny, lub rozbieżny wynik metylacji w obu badanych materiałach.

L.p	#	MGMT			RASSF1A			p15INK4B			p14ARF		
		GUZ	SUROWICA	Zgodność wyników	GUZ	SUROWICA	Zgodność wyników	GUZ	SUROWICA	Zgodność wyników	GUZ	SUROWICA	Zgodność wyników
<b>GUZY GLEJOWE</b>													
1	S9	U	U	tak	U	U	tak	U	U	tak	M	M	tak
2	S10	U	U	tak	M	M	tak	U	U	tak	M	M	tak
3	S11	M	M	tak	M	M	tak	U	U	tak	M	M	tak
4	S12	U	U	tak	M	U	FN	U	U	tak	U	U	tak
5	S13	M	U	FN	U	U	tak	U	U	tak	U	U	tak
6	S14	U	U	tak	M	M	tak	U	U	tak	U	U	tak
7	S15	U	U	tak	M	U	FN	U	U	tak	U	U	tak
8	S16	U	U	tak	M	M	tak	M	U	FN	U	M	FP
9	S17	U	U	tak	M	U	FN	U	U	tak	M	U	FN
Σ M		2/9	1/9	8/9	7/9	4/9	6/9	1/9	0/9	8/9	4/9	4/9	7/9
% M		22.22%	11.11%	88.89%	77.78%	44.44%	66.67%	11.11%	0.00%	88.89%	44.44%	44.44%	77.78%
<b>INNE GUZY OUN</b>													
10	S27	U	U	tak	U	U	tak	U	M	FP	U	U	tak
11	S28	U	U	tak	U	U	tak	U	U	tak	M	U	FN
12	S29	U	U	tak	U	U	tak	U	U	tak	M	M	tak
13	S30	U	U	tak	U	U	tak	U	M	FP	U	U	tak
14	S31	U	U	tak	M	U	FN	U	U	tak	U	U	tak
15	S32	U	U	tak	U	M	FP	U	U	tak	U	U	tak
16	S33	U	U	tak	U	U	tak	U	U	tak	M	U	FN
Σ M		0/7	0/7	7/7	1/7	1/7	5/7	0/7	2/7	5/7	3/7	1/7	5/7
% M		0.00%	0.00%	100.00%	14.29%	14.29%	71.43%	0.00%	28.57%	71.43%	42.86%	14.29%	71.43%
<b>OBIE GRUPY BADANE</b>													
Σ M		2/16	1/16	15/16	8/16	5/16	11/16	1/16	2/16	13/16	7/16	5/16	12/16
% M		12.50%	6.25%	93.75%	50.00%	31.25%	68.75%	6.25%	12.50%	81.25%	43.75%	31,25%	75.00%
<b>ZGODNOŚĆ WYNIKÓW</b>									<b>51/64 (79.69%)</b>				

## OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorką pracy doktorskiej p.t.:

**„Analiza metylacji wybranych genów w DNA guzów ośrodkowego układu nerwowego - poszukiwanie nowych markerów epigenetycznych.”**

Praca ta została przeze mnie napisana samodzielnie (bez jakiegokolwiek udziału osób trzecich), przy wykorzystaniu wykazanej w pracy literatury przedmiotu i materiałów źródłowych, stanowi ona pracę oryginalną, nie narusza praw autorskich oraz dóbr osobistych osób trzecich i jest wolna od jakichkolwiek zapożyczeń.

Oświadczam również, że wymieniona praca nie zawiera danych i informacji, które zostały pozyskane w sposób niedozwolony prawem oraz nie była dotychczas przedmiotem żadnej urzędowej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego: doktora nauk farmaceutycznych, a złożona przeze mnie płyta CD zawiera elektroniczny zapis przedstawionej przeze mnie pracy.

Jednocześnie oświadczam, że nieodpłatnie udzielam Uniwersytetowi Medycznemu im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu licencji do korzystania z wyżej wymienionej pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych w zakresie obrotu nośnikami, na których pracę utrwalono przez: wprowadzanie do obrotu, użyczenie lub najem egzemplarzy w postaci elektronicznej, a nadto upoważniam Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu do przechowywania i archiwizowania pracy w zakresie wprowadzania jej do pamięci komputera oraz do jej zwielokrotniania i udostępniania w formie elektronicznej oraz drukowanej.

Imię i nazwisko: Aleksandra Majchrzak-Celińska

Poznań, dnia 10.01.2014

Podpis .....

**OŚWIADCZENIE**

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej rozprawy doktorskiej w Czytelni Naukowej Biblioteki Głównej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz w formie elektronicznej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej ([www.wbc.poznan.pl](http://www.wbc.poznan.pl)).

Poznań, dnia 10.01.2014

Podpis .....