

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Študijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Študijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Ivana Fabianová

Od adenómu ku kolorektálnému karcinómu: Zmena v DNA metyláciach
From adenoma to colorectal cancer: The study of DNA methylation profiles

Bakalárska práca

Školiteľ: Ing. Veronika Vymetáľková Ph.D.

Praha 2021

Čestné prehlásenia: Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne a uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca, ani jej podstatná časť, nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

V Prahe 05.01. 2021

.....
Ivana Fabianová

Podakovanie

Chcela by som sa týmto poďakovať svojej školiteľke Ing. Veronike Vymetáľkovej Ph.D. za všestrannú pomoc, rady, trpezlivosť a všetok svoj venovaný čas.

Abstrakt

Rakovina hrubého čreva (KRK) je hlavným problémom verejného zdravia na celom svete a je jedným z najčastejších typov rakoviny v rozvinutých krajinách. Najnovšie štatistiky stále naznačujú, že Česká republika má na celom svete vysoký podiel výskytu KRK, a to najmä u mužov. KRK je ochorenie, na ktorom sa okrem genetických a chromozomálnych abnormalít podieľajú aj epigenetické zmeny, z ktorých najznámejším je práve DNA metylácia. Zmeny v DNA metylácii sú najvýraznejšími mechanizmami, ktoré menia expresiu génov. Strata génovej funkcie epigenetickým umlčaním kritických génov môže hrať kľúčovú úlohu pri vývoji a progresii sporadických ľudských nádorov, vrátane KRK.

KRK sa zvyčajne vyvíja z prekancerózných lézií, známych ako adenóm. Málo je však známe o presnom načasovaní DNA metylačných zmien pri prechode zo zdravého hrubého čreva, cez adenóm až do zhubného stavu. Cieľom tejto bakalárskej práce je podrobne zhrnúť aberantné zmeny v DNA metylácii u ľudí s adenómom a u pacientov s KRK a zároveň zhrnúť aktuálne používané metódy detekcie DNA metylácie.

Kľúčové slová: rakovina hrubého čreva, DNA metylácia, adenóm, metylačný fenotyp CpG ostrovčekov, hypermetylácia, hypometylácia

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is a major public health problem worldwide and is one of the most common types of cancer in advanced countries. Recent statistics still present that the Czech Republic has a high incidence of CRC worldwide, especially in Czech men. CRC is known to be a disease that is caused not only by genetic and chromosomal abnormalities but also by epigenetic changes with the best-known DNA methylation. Changes in DNA methylation are the most prominent mechanisms that alter gene expression. Loss of gene function by epigenetic silencing of critical genes plays a key role in the development and progression of sporadic human tumors, including CRC.

CRC usually develops from a harmless protrusion, known as an adenoma. However, little is known about the exact timing of DNA methylation changes in the transition from a healthy colon, through an adenoma to a malignant state. This bachelor thesis aims to summarize in detail the aberrant changes in DNA methylation in people with adenoma and in patients with CRC and at the same time to summarize the currently used methods of DNA methylation detection.

Keywords: colorectal cancer, DNA methylation, adenoma, CpG island methylation phenotype, hypermethylation, hypomethylation

Zoznam použitých skratiek

5mC - 5 metyl-cytozín

A - adenóm

ACF - „aberrant crypt foci“

aFAP - atenuovaná familiárna adenomatózna

AQAMA- absolútna kvantitatívna analýza metylovaných alel

BSP - bisulfitové sekvenovanie

CGI - CpG ostrovčeky

CIMP- metylačný fenotyp CpG ostrovčekov

CIMP-H - CIMP „high“

CIMP-L - CIMP „low“

CIN - chromozómová nestabilita

CMS - konvenčné molekulárne podtypy

COBRA- kombinovaná bisulfitová restričná analýza

CpG - Cytosin-fosfát-Guanin

CT - počítačová tomografia

EMT - epiteliálne-mezenchymálna tranzícia

FAP - familiárna adenomatózna polypóza

FS - flexibilná sigmoidoskopia

gTOKS - test okultného krvácania do stolice

HDAC - históndeacetylázy

HNPCC - Lynchov syndróm

HP - hyperplastické polypy

iTOKS - imunochemický test okultného krvácania do stolice

JPS - juvenilný polypózny syndróm

KRK - rakovina hrubého čreva

MAP - MUTYH- asociovaná polypóza

MBD - metyl-CpG-väzbová doména

MeDIP - imunoprecipitácia metylovanej DNA

MMR - mismatch opravná dráha

MS- HRM - metylačne špecifická high resolution melting metóda

MS-MLPA - metylačne špecifická multiplexná amplifikácia prób závislá od ligácie

MSI - mikrosatelitová nestabilita

MSI-H - mikrosatelitová nestabilita „high“

MSI-L - mikrosatelitová nestabilita „low“

MSP - metylačne-špecifická PCR

MSS - mikrosatelitne stabilné

MT-sDNA - viac-cieľový DNA test stolice

PCR - polymerázová reťazová reakcia

PHTS - PTEN syndróm hamartomov a nádorov

PJS - Peutz-Jeghersov syndróm

PPAP - Polymerase proofreading-asociovaná polypóza

qMSP- kvantitatívna metylačne-špecifická PCR

RK - rakovina konečníku

SCNA - zmena počtu somatických kópií

SSA - sesislné serátne polypy

TSA- tradičné serátne polypy

Obsah

Obsah	7
1. Úvod.....	1
2. Rakovina hrubého čreva	2
2.1 Epidemiológia KRK.....	2
2.2 Rizikové faktory vzniku rakoviny hrubého čreva.....	3
2.3 Prekancerózne lézie KRK.....	4
2.4 Formy rakoviny hrubého čreva.....	5
2.5 Skríning.....	6
2.6 Liečba rakoviny hrubého čreva.....	6
3.1 Chromozómová nestabilita (CIN).....	8
3.2 Mikrosatelitová nestabilita (MSI).....	9
3.3 Metylačný fenotyp CpG ostrovčekov (CIMP).....	9
4. Molekulárne podtypy KRK.....	10
5. Metylácia DNA.....	10
5.1. Spôsobý detekcie DNA metylácie u KRK.....	12
5.1.2 MethyLight	13
5.1.3 Metylačne špecifická multiplexná amplifikácia prób závislá od ligácie (MS-MLPA)	13
5.1.4 Metylačne špecifická high resolution melting (MS-HRM)	13
5.1.5 Pyrosekvenovanie	14
5.1.6 Mikročipy.....	14
5.1.7 Imunoprecipitačné metódy.....	14
6. Hypermetylácia DNA	15
6.1 Charakteristika hypermetylácie DNA.....	15
6.2 Hypermetylácia DNA u KRK a prekancerózných štádií	15
7. Hypometylácia DNA	23
7.1 Charakteristika Hypometylácie DNA	23
7.2. Hypometylácia DNA u KRK a prekancerózných štádií	23
8. Záver	26
9. Zoznam použitej literatúry.....	27

1. Úvod

Rakovina hrubého čreva (KRK) je jedným z najčastejších nádorových ochorení vo vyspelých štátoch, vrátane Českej a Slovenskej republiky. KRK sa zvyčajne vyvíja z nezhubných zmien črevného epitelu lokalizovaných na črevnej sliznici, známych ako adenómy. Počiatočné štádia KRK sú často bezpríznakové a pacienti sú diagnostikovaní až vo vyššom štádiu, kde je šanca na ich prežitie omnoho nižšia.

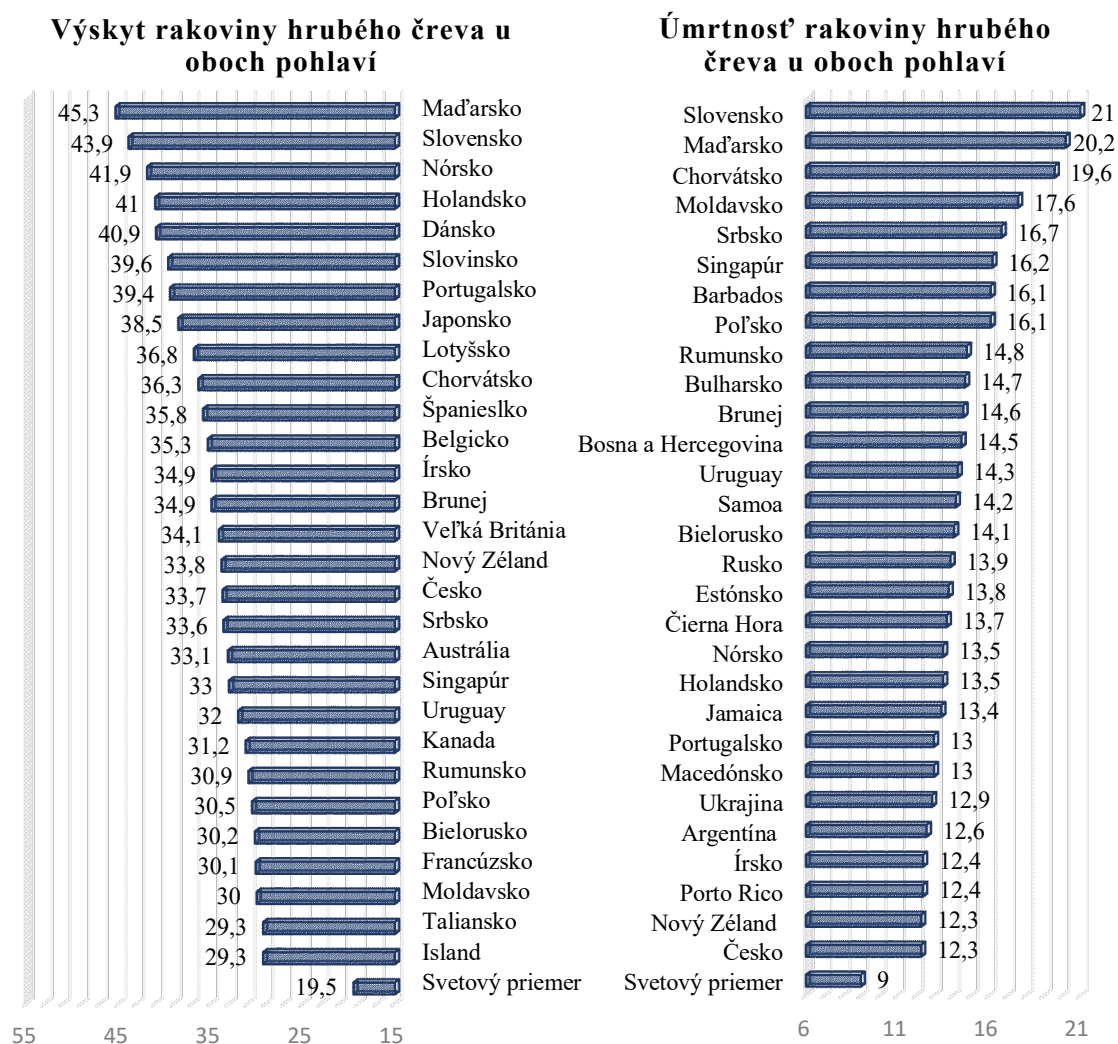
Metylácia, jedna z najštudovanejších epigenetických modifikácií, je proces, pri ktorom dochádza k prenosu $-CH_3$ skupiny z molekuly donoru, S-adenosyl-L-metionínu, na 5' C cytozínu pomocou DNA metyltransferáz. Je všeobecne známe, že výskyt aberantne metylovanej DNA prispieva k rozvoju nádorového ochorenia. Pokiaľ sú metylované promotory jednotlivých génov, dochádza k zníženiu alebo k úplnej strate expície. Genóm rakovinových buniek synchronne vykazuje globálnu hypometyláciu, ako aj promótorovú hypermetyláciu. Preto identifikácia hypo- a hyper- metylovaných génov ako u črevných adenómov tak i u KRK môže prispieť k definovaniu nových procesov, ktoré sú rozhodujúce pre vznik a progresiu KRK. Súčasťou práce je predovšetkým zhrnutie vedeckých prác venovaných sa výskytu aberantnej DNA metylácie ako u adenómov tak aj u KRK.

Táto bakalárska práca podáva ucelený pohľad na problematiku črevných adenómov a KRK s možnosťami ich detekcie a liečby. Na etiológiu KRK okrem genetických faktorov zohrávajú dôležitú úlohu aj epigenetické zmeny, predovšetkým DNA metylácie. Náplňou tejto práce je predstaviť všeobecný pohľad na úlohu DNA metylácie a jej funkcie v regulácii transkripcie u osôb s prekanceróznymi léziami - adenómami a rakovinou hrubého čreva. Nedávno bola prítomnosť DNA metylácie v nádore zahrnutá i do klasifikácie molekulárnych podtypov KRK a poukázalo sa tak na ich prognostický význam. Časť tejto práce sa preto venuje aj klasifikácii KRK podľa molekulárnych podtypov.

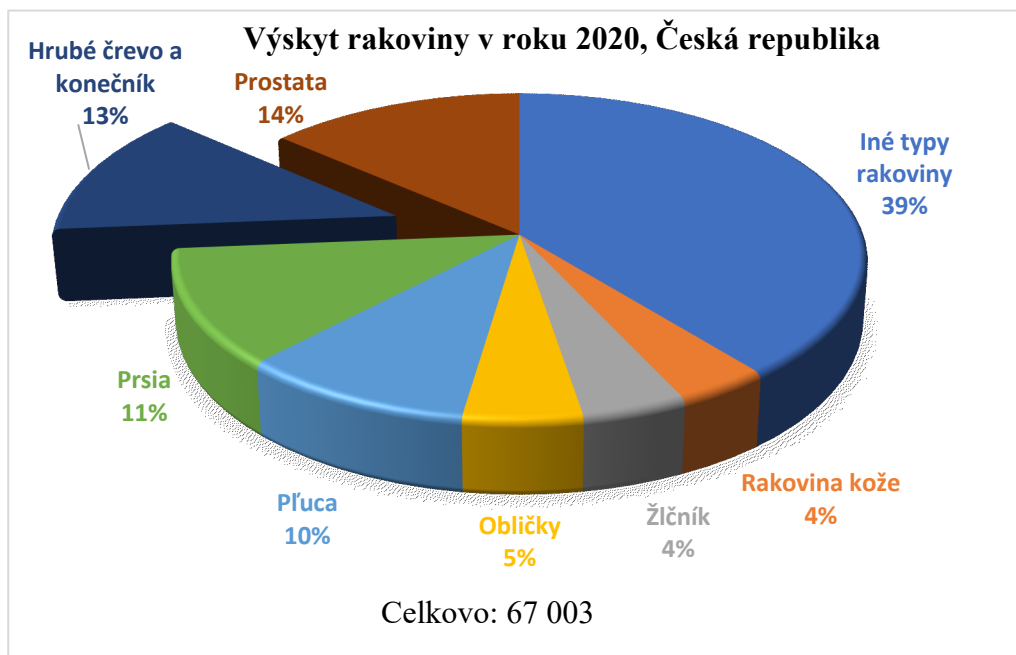
2. Rakovina hrubého čreva

2.1 Epidemiológia KRK

Rakovina hrubého čreva (KRK) patrí medzi najčastejšie diagnostikované rakoviny a miera jej výskytu v rozvinutých krajinách neustále rastie. KRK je podľa výskumu z roku 2020 tretím najčastejším typom rakoviny (10%) s druhou najvyššou úmrtnosťou (9,4%) na svete (Graf č. 1 a 2), (GLOBOCAN 2020). Vyskytuje sa častejšie u mužov (55%) než u žien (45%) a u ľudí starších ako 50 rokov (90%). V Českej republike je druhým najčastejším typom rakoviny (13%) s druhou najvyššou úmrtnosťou (12,5%). Každý rok je diagnostikovaných približne 8 000 nových pacientov a zaznamenaných takmer 4 000 úmrtí. V roku 2020 sa Česká republika umiestnila na 17. mieste v počte pacientov na svete (štandardizácia podľa veku na 100 000 ľudí) (GLOBOCAN 2020). Podľa lokalizácie môžeme KRK rozlišovať na rakovinu hrubého čreva a konečníka. Kvôli ich podobným vlastnostiam sú často študované spoločne (Phipps et al. 2013).



Graf č. 1: Incidencia a mortalita KRK vo svete, Globocan, 2020
ASR (W) = Age standardized rate – vyjadruje počet prípadov na 100 000 obyvateľov



Graf č. 2: Výskyt nádorového ochorenia v Českej Republike, Globocan, 2020

2.2 Rizikové faktory vzniku rakoviny hrubého čreva

K najväčším rizikovým faktorom KRK sa radí vek: riziko vzniku KRK sa priamo úmerne zvyšuje s narastajúcim vekom; s najčastejším výskytom po 50 roku života. Iné neovplyvniteľné faktory sú pohlavie, rasa, vrodené syndrómy a výskyt mutácií v DNA (Geneve et al. 2019, Murphy et al. 2019). V poslednej dobe sa zvýšil počet diagnostikovaných pacientov v mladšom veku (<50 let). Nádory vzniknuté v mladom veku sa odlišujú od nádorov vzniknutých v staršom veku v ich klinických i patologických vlastnostiach, molekulárnych profiloch a potenciálnej reakcii na liečbu (Venugopal et al. 2019). KRK u mladších pacientov sa častejšie vyskytuje na distálnej strane čreva a v konečníku, diagnostikovaná je v neskorších štádiách, je spojená s horším celkovým prežívaním a s horšími prognózami (Georgiou et al. 2019; Pillozzi et al. 2015).

Na vzniku KRK sa okrem dedičných faktorov podieľa aj životné prostredie a životný štýl. Ku vzniku KRK prispieva nízka fyzická aktivita, fajčenie, stres, nadváha a obezita, vysoká konzumácia alkoholu, strava bohatá na tuk, červené mäso a údeniny, sedavé zamestnanie (He et al. 2018; Simon 2016). Upravenie vyššie zmienených faktorov môže znížiť šancu na vznik KRK o približne 13% (Danaei et al. 2005). K rizikovým faktorom KRK ďalej patria aj zápalové ochorenia čriev ako sú: Crohnova choroba, ulcerózna kolitída, atď. (Amersi et al. 2005). Okrem zápalových ochorení sa sem radia aj iné ochorenia ako je diabetes mellitus druhého typu, ktorý väčšinou súvisí s obezitou a nízkou fyzickou aktivitou (Peeters et al. 2015).

2.3 Prekancerózne lézie KRK

KRK sa zvyčajne vyvíja z prekanceróznej lézie známej ako adenóm. Adenómy sú nezhubné nádory lokalizované na črevnej sliznici, ktoré vyčnievajú do črevného lúmen. Za vznik adenómov v črevnom epiteli sa považuje znížená schopnosť aktivácie apoptózy alebo zvýšená proliferácia buniek v črevnom epiteli (Fearon et al. 1990; Mäkinen 2007). Proces vývinu rakoviny z adenómu trvá zvyčajne niekoľko rokov až desaťročí. Výskyt adenómov v hrubom čreve je však relatívne bežný, a riziko rozvoja rakoviny v týchto léziách je zvyčajne nízka. Desaťročné riziko transformácie na KRK z vysoko rizikového adenómu je 2,7% (Atkin et al. 2017). Pokiaľ bol jedincovi pri kolonoskopickom vyšetrení nájdený adenóm v čreve, adenóm je následne chirurgicky odstránený a nie je nutná ďalšia liečebná stratégia. Avšak pacienti, ktorým boli odstránené adenómy zvyčajne vykazujú vyššie riziko opätovného výskytu adenómu alebo KRK, a preto im je odporúčané častejšie kolonoskopické vyšetrenie (Atkin et al. 2002). Odporúčané intervaly medzi kolonoskopickými vyšetreniami sú uvedené v tabuľke č.1.

Adenómy sa rozdeľujú podľa vzhľadu tkaniva na tubulárne, vilózne a tubulo-vilózne. Tubulárne adenómy sú väčšinou menšie ako 1cm, sú tvorené tubulmi (trubičkami), tvoria približne 75-85% všetkých adenómov so šancou na malígnu transformáciu menšou ako 5%. Vilózne adenómy zvyčajne sú väčšie ako 1cm, sú tvorené vlasovitými výrastkami, tvoria približne 5-10% všetkých adenómov a vykazujú 20-25% šancu na malígnu transformáciu. Tubulo-vilózne adenómy sú kombináciou rastúcich z oboch vzorov. Tvoria približne 10-15% všetkých adenómov s 35-40% šancou na malígnu transformáciu (Amersi et al. 2005).

Veľkosť adenómov je tiež priamo spojená s malígnym rizikom: malé (<1cm) adenómy majú šancu na malígnu transformáciu menej ako 1%, zatiaľ čo u adenómov väčších ako 2 cm je toto riziko približne 50% (Conteduca et al. 2013). Adenómy sa ďalej klasifikujú podľa Viedenskej klasifikácie kde rastúce číslo tejto klasifikácie určuje stupeň malignity. Číslo 1. predstavuje negatívny nález a 5 naopak predstavuje invazívny karcinóm (Schlemper et al. 2000).

Približne 10-15% sporadických KRK vzniká zo serátnych lézií (Conteduca et al. 2013). Serátne lézie sa z histologického hľadiska delia na hyperplastické polypy (HP), sesilné serátne adenómy (SSA) a tradičné serátne adenómy (TSA) (Crockett et al. 2019). K prekanceróznym léziám sa radia len SSA a TSA.

SSA tvoria 10-15% polypov a sú prekursorom väčšiny KRK, ktoré vznikajú serátnou dráhou. Zvyknú byť ploché s bledšou sliznicou než bežné adenómy, bývajú pokryté hlienom a častejšie sa vyskytujú v proximálnej časti čreva. Vďaka týmto znakom bývajú SSA ťažko detekovateľné a ich úplne odstránenie býva obťažnejšie (Obuch et al. 2015). TSA tvoria menej ako 1% polypov a prevažne sa vyskytujú v distálnej časti čreva. Väčšinou sú väčšie ako 5mm a majú tubulo-vilóznú architektúru (IJspeert et al. 2015).

Hyperplastické polypy tvoria 20-30% (Crockett et al. 2019). Podľa viacerých štúdií nie sú významne spojené so zvýšeným rizikom pre KRK, pri ich pozitívnom náleze sú odporúčané intervaly skriningu ako pri priemernom riziku vzniku KRK. (Tabuľka č.1) (Burt et al. 2003).

Tabuľka č.1 Odporúčané intervaly medzi jednotlivými kolonoskopickými vyšetreniami v závislosti od nálezu (Lieberman et al. 2012)

Nález	Odporúčaný interval medzi kolonoskopickými vyšetreniami (rok)
Bez polypov	10
Malé hyperplastické polypy	10
1-2 malé (<1cm) tubulárne adenómy s nízkym stupňom dysplázie	5-10
3-10 tubulárnych adenómov 1 alebo viac vilózných adenómov 1 alebo viac tubulárnych adenómov (≥10mm) adenómy s vysokým stupňom dysplázie	3
>10 adenómov	<3
Sesislné serátne adenómy (<10mm), bez dysplázie	5
Sesislné serátne adenómy (≥10mm) Sesislné serátne adenómy s dyspláziou tradičné serátne adenómy	3
Syndróm serátnej polypózy	1

2.4 Formy rakoviny hrubého čreva

Približne 75% všetkých prípadov KRK je sporadických bez rodinnej histórie a zjavného výskytu vrodených mutácií. Táto forma vzniká postupným hromadením získaných genetických a epigenetických zmien, ktoré môžu viesť k tvorbe a vzniku benígneho adenómu až k vzniku karcinómu (De Palma et al. 2019). Vznik KRK je preto možné chápať ako mnohostupňový proces. V ďalších kapitolách budú jednotlivé cesty vzniku nádoru detailnejšie popísané.

Zvyšných 25-30% tvoria familiárne KRK. Pacienti s týmto typom KRK majú rodinnú históriu spojenú s KRK čo naznačuje spoločné predispozície, spoločné rizikové faktory medzi členmi rodiny, alebo kombináciu oboch týchto faktorov. Podskupinou familiárnych KRK sú dedičné KRK, tvoriace 5%, ku ktorým dochádza v dôsledku mutácií v niektorých konkrétnych génoch, napríklad génu *MLH1* (Kanth et al. 2017). Dedičné KRK majú identifikovateľné genetické mutácie a sú tradične klasifikované ako nepolypózne a polypózne syndrómy. Medzi najbežnejšie dedičné syndrómy patria hereditárna nepolypózna KRK (HNPCC, Lynchov syndróm), familiárna adenomatózna polypóza (FAP), atenuovaná familiárna adenomatózna polypóza (aFAP), MUTYH- asociovaná polypóza (MAP), juvenilný polypózny syndróm (JPS), Peutz-Jeghersov syndróm (PJS), Polymerase proofreading- asociovaná polypóza (PPAP), PTEN syndróm hamartomov a nádorov (PHTS), Cowdenov syndróm, familiárna KRK typu X (Kastrinos et al. 2011; Rawla et al. 2019; Siskova et al. 2020).

2.5 Skrining

KRK sa dá predchádzať pravidelným preventívnym skriningom. Ten je veľmi dôležitý, pretože ak je KRK detegovaná včas, je veľmi dobre liečiteľná. Skrining dokáže detegovať prekancerózne štádiá, ktoré sú následne chirurgicky odstránené. Skoré štádiá KRK zvyčajne nevykazujú žiadne príznaky, ako sú napríklad: zápcha, kŕče, bolesti v bruchu alebo krvácanie, ktoré môže byť viditeľné v stolici. Tie sa zvyčajne objavia až v pokročilejších štádiách (Simon 2016; Maida et al. 2017).

2.5.1 Metódy skriningu

K štandardnému postupu pri skriningu patrí pravidelný test založený na prítomnosti okultnej krvi v stolici (gTOKS) po 50. roku, pokiaľ je test pozitívny je následne podstúpená kolonoskopia (Segnan et al. 2010).

Existuje niekoľko ďalších skriningových metód, ktoré sa uplatňujú menej ako sú flexibilná sigmoidoskopia (FS), počítačová tomografia (CT), imunochemický test (iTOKS) a viac-cieľový DNA test v stolici multitarget-stool DNA test (MT-sDNA) (Tabuľka č.1). Rozdeľujú sa na invazívne a neinvazívne. Invazívne zahŕňajú kolonoskopiu a FS, ktoré umožňujú priamu vizualizáciu a detekciu črevného adenómu s výhodou získania patologickej vzorky a odstránenia adenómu (Issa et al. 2017). Bolo dokázané, že použitie týchto metód znižuje ako výskyt KRK tak s ním spojenú úmrtnosť v prípade kolonoskopie výskyt o 53-72% a úmrtnosť o 31%, v prípade sigmoideoskopie výskyt a úmrtnosť o 60% v distálnej časti čreva (Simon, 2016). Neinvazívne metódy zahŕňajú testy gTOKS, iTOKS a MT-sDNA. K rádiologickým neinvazívnym metódam sa radí CT, pomocou ktorej je možná vizualizácia hrubého čreva (Issa et al. 2017).

Tabuľka č.2 Citlivosť a špecificita skriningových metód (Simon 2016; Imperiale et al. 2014; Colorectal Cancer Alliance 2019; Levin et al. 2003; National Cancer Institute 2010)

Test	Citlivosť KRK	Citlivosť adenómu pokročilý	Citlivosť adenómu skorý	Špecificita
Kolonoskopia	95%	88-98%	76-80%	86%
Sigmoidoskopia	95%*	75-95%*	75-76%	87%*
CT	84-90%	78-90%	60%	88%
gTOKS	33-75%	11-25%	2-10%	92-99%
iTOKS	60-85%	24-29%	8%	94-97%
MT-sDNA	92%	42-69%	17%	87-90%

*platí pri distálnej KRK. CT- počítačová tomografia, gTOKS- test okultného krvácania do stolice
iTOKS - imunochemický test okultného krvácania do stolice, MT-sDNA - viac-cieľový DNA test v stolici

2.6 Liečba rakoviny hrubého čreva

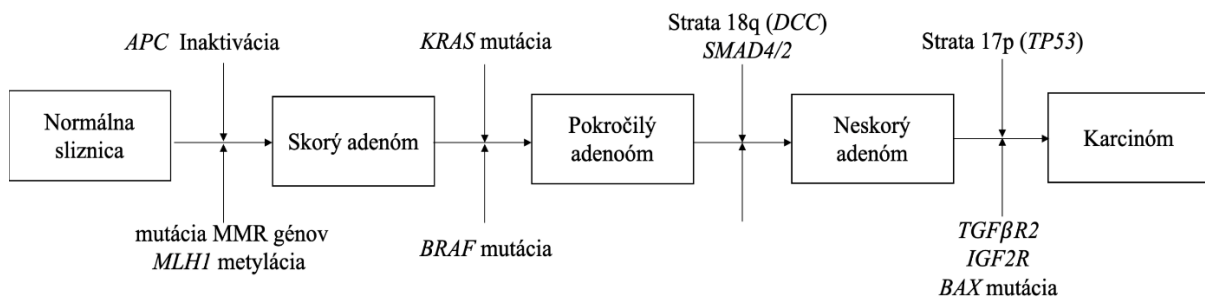
Liečba KRK je závislá na jednak na jeho štádiu a jednak na lokalizácii nádoru. Štádium KRK je rozdelené na základe troch kľúčových informácií: veľkosti tumoru (T), rozšírenia do regionálnych lymfatických uzlín (N), a rozšírenia do vzdialených metastáz (M) (Liu et al. 2018). Prežívanie aj liečba KRK sú silne ovplyvnené štádiom KRK: čím má štádium vyššie číslo, tým klesá percento prežívania. U pacientov v I štádiu je 5-ročné prežívanie viac než 90%, v II. 60-85%, v III. 38-65% a v IV. 5-10% u oboch pohlaví (Lombardi et al. 2009; CancerResearch UK 2019).

Základným liečebným postupom u KRK je chirurgické odstránenie nádoru, s prípadnou následnou neo-adjuvantnou alebo adjuvantnou rádioterapiou alebo chemoterapiou (Colon Cancer Treatment 2002; Vodenkova et al. 2020). Na zmenšenie nádoru pred chirurgickým zákrokom je aplikovaná neo-adjuvantná liečba, ktorá je využívaná predovšetkým u rakoviny konečníka (neo-adjuvantná chemorádioterapia) (Grass et al. 2018). Cieľom adjuvantnej liečby je odstránenie zvyškových nádorových buniek, ktoré neboli odstránené pri chirurgickom zákroku a taktiež znížiť tak riziko návratu ochorenia (Jalaeikhoo et al. 2019). Pri pokročilých nádoroch, predovšetkým v štvrtom štádiu je uplatňovaná paliatívna liečba. Táto liečba má za cieľ predĺžiť dĺžku pacientovho života a zároveň zvýšiť jeho kvalitu (Osagiede et al. 2019).

3. Mechanizmy vzniku rakoviny hrubého čreva

Vznik KRK je charakterizovaný sledom genetických a epigenetických udalostí, počas ktorých sa normálny epitel hrubého čreva postupne vyvíja v adenóm a postupne sa transformuje do malígneho tkaniva (Testa et al. 2018). Fearon a Vogelstein v roku 1990 prvýkrát navrhli viacstupňový model prechodu „adenóm-karcinóm“ (Obrázok č.1), ktorý sa vyznačuje genomickými zmenami, ktorých akumulácia vedie k chromozómalným zmenám, chromozómalným translokáciám a aberáciám a následnej chromozómalnej instabilite, preto sa označujú ako kanonický model patogenézy KRK (Fearon et al. 1990)

CIN – Dráha chromozómalnej instability



MSI- Dráha mikrosatelitnej instability

Obrázok č.1 Sekvencia vývoju adenóm-karcinóm (Fearon et al. 1990; Gonzalez et al. 2017; De Palma et al. 2019)

Genomová nestabilita sa vzťahuje na stav so zvýšenou frekvenciou výskytu mutácií a epimutácií v rámci nádorového genómu. Tieto mutácie zahŕňajú nesynonymné zmeny v sekvenciách DNA, chromozómovú reorganizáciu alebo zmeny v počte chromozómov. Tieto mutácie vedú k následným modifikáciám genómu nádorových buniek, alebo k ďalším zmenám v molekule DNA, klonálnej evolúcií či heterogenite nádoru (Wei et al. 2016).

Genómová a epi-genomická nestabilita sú dôležitým znakom vývoja rakoviny hrubého čreva. Mechanizmy, vedúce k jej vzniku, rozdeľujeme do troch odlišných dráh: chromozómová nestabilita (CIN), mikrosatelitová nestabilita (MSI) a metylačný fenotyp CpG ostrovčekov (CIMP) (Mármol et al. 2017). Všetky tieto dráhy sa môžu navzájom prekrývať a zodpovedajú za vznik genomovej nestability v adenóme čo môže viesť k jeho malígnej transformácii (Siskova et al. 2020).

3.1 Chromozómová nestabilita (CIN)

CIN dráha chromozómovej instability je najbežnejším typom vedúcim ku genómovej instabilite, vyskytuje sa približne u 70-85% všetkým sporadickým foriám KRK (Dunican et al. 2002; Siskova et al. 2020). Chromozómová nestabilita je spôsobená hlavne poruchami v mitotickom procese alebo mitotickom aparáte, ktoré zabezpečujú presnú segregáciu chromozómov (Rao et al. 2013;).

V KRK boli najčastejšie pozorované straty chromozomálnych ramienok 1p, 4q, 5q, 8p, 17p, 18p, 18q, 20p a 22q, a chromozomálne zisky na chromozóme 7, a chromozomálnych ramienkach 1q, 8q, 12q, 13q, 19q a 20q (Alonso et al. 2017; Conconi et al. 2016; Dyrsø et al. 2011; Muzny et al. 2012; Thiagalingam et al. 2001).

3.2 Mikrosatelitová nestabilita (MSI)

Mikrosatelitová instabilita (MSI) patrí u KRK k najdlhšie a najlepšie známym aberáciám, ktorá sa uplatňuje v patogenéze KRK; definuje klinický priebeh ochorenia a jej detekcia sa už stala štandardnou súčasťou klinickej praxi.

MSI dráha sa vyskytuje u približne 15% všetkých KRK a je spôsobená hypermutabilným fenotypom kvôli strate funkčnosti DNA opravného mechanizmu, konkrétne opráv chybného párovania, tzv. mismatch reparačnej dráhy (MMR) (Dunican et al. 2002). Schopnosť opravy krátkych DNA reťazcov alebo tandemových repetícií je u nádorov s MSI znížená, preto dochádza k hromadeniu mutácií v týchto oblastiach. Inaktivácia MMR génov môže byť spôsobená spontánnymi udalosťami, najčastejšie hypermetyláciou promotora génu *MLH1* (12%), alebo zárodočnými mutáciami aké sa vyskytujú v HNPCC (3%) (Mármol et al. 2017; Boland et al. 2010)

3.3 Metylačný fenotyp CpG ostrovčekov (CIMP)

Tretia podskupina KRK, CIMP, vzniká cestou epigenetickej nestability a vyznačuje sa rozsiahlou hypermetyláciou promótorových CpG miest (CpG = Cytosin-fosfát-Guanin), čo má za následok inaktiváciu tumor supresorových génov (Toyota et al. 1999). Táto zmena sa radí k reverzibilným práve kvôli prítomnej metylácii v CpG miestach. Tieto miesta, známe ako CpG ostrovčeky (CGI), sú krátke (asi 1kb) CpG bohaté regióny, ktoré sa nachádzajú u viac ako polovice génov stavovcov (Jones, 2012). CIMP fenotyp môže byť rozdelený na CIMP „high“ (CIMP-H) a CIMP „low“ (CIMP-L) podľa úrovne metylácie. CIMP-H je spojená s hypermetyláciou promotora génu *MLH1*, *BRAF* mutáciou, vysokou frekvenciou metylácie v genóme, MSI, mucinóznym typom KRK, umiestnením na pravej strane čreva, nízkym počtom mutácií génu *TP53*, vyšším výskytom u žien a starších pacientov (Weisenberger et al. 2015; Hawkins et al. 2002; Issa 2004). CIMP-L je spojený s mutáciami v géne *KRAS*, častejším výskytom u mužov a nezávislosťou na MSI (Ogino et al. 2006). CIMP fenotyp sa určuje na základe prítomnosti metylácie v génoch, ktoré sa radia k markerom CIMP fenotypu.

Bolo navrhnutých niekoľko panelov na jeho určenie.

- Toyota(1999) navrhol nasledovné gény: *MINT2, MINT12, MINT17, MINT25, MINT27, MINT31*
- Samowitz (2005) navrhol *MINT1, p16^{INK4} MINT2, MINT31 a MLH1*
- Weisenberger (2006) identifikoval kandidátov: *CACNA1G, IGF2, NEUROG1, RUNX3, SOCS1*
- Ogino (2007) rozšíril panel: *RUNX3, CACNA1G, IGF2, MLH1, NEUROG1, CRABP1, SOCS,1 p16^{INK4}.*

Najnovšie dva panely bývajú najčastejšie používané k meraniu CIMP (Advani et al. 2019). Avšak na sledovanie zmien DNA metylácie v celom genóme sú čím ďalej viac využívané mikročipy, ktoré dokážu presnejšie identifikovať CIMP nádory (Hinoue et al. 2012).

4. Molekulárne podtypy KRK

KRK je vysoko heterogénne ochorenie. Každý pacient má jedinečné genetické a epigenetické pozadie a kvôli tejto heterogenite sa úmrtnosť a odpoveď na liečbu líšia. K dosiahnutiu lepších liečebných výsledkov bola v súčasnosti KRK klasifikovaná podľa tzv. molekulárnych podtypov. V roku 2015, skupina okolo Dr. Guinney a kolektív (Guinney et al. 2015) publikovala štúdiu s novým prístupom stanovenia molekulárnych podtypov KRK.

Tabuľka č.3 Klasifikácia podľa konvenčných molekulárnych podtypov (CMS) (Guinney et al. 2015; Hong 2018)

	CMS1 (imunitný, MSI)	CMS2 (kanonické)	CMS3 (metabolické)	CMS4 (mezenchymálne)
% všetkých KRK	14	37	13	23
Mutačný profil	<i>BRAF, TGFBR2</i>	<i>APC, TP53, CIN</i>	<i>KRAS, APC</i>	-
SCNA	Nízka	Vysoký	Stredný	Vysoký
CIMP	Vysoký/Nízky	Negatívny	Nízky	Negatívny
MSI status	MSI - H	MSS/MSI nízky	MSS/MSI - L	MSS/MSI - L
Signalizačná dráha	JAK/STAT, dráha kaspázy	WNT a MYC aktivácia; dráha bunkového cyklu	Metabolická deregulácia, Epiteliálny profil	TGF-β aktivácia, Stromálna invázia, EMT aktivácia, prestavba extracelulárneho matrix, angiogenéza
Klinická charakteristika	Starší ľudia, ženy	-	-	-
Miesto	Proximálna časť čreva	Distálna časť čreva a konečník	Proximálna, distálna časť čreva a konečník	Proximálna časť čreva a konečník
Štádium	-	-	-	Pokročilé štádium (III a IV)
Prognózy	Horšie prežívanie po recidíve	Lepšie prežívanie po recidíve	-	Horšie celkové prežívanie

SCNA - Zmena počtu somatických kópií, MSI - mikrosatelitová nestabilita, CIMP - metylačný fenotyp CpG ostrovčekov, MSS - mikrosatelitne stabilné EMT- epiteliálne-mezenchymálna tranzícia

5. Metylácia DNA

Epigenetické modifikácie predstavujú zmeny v regulácii génovej expície. Na rozdiel od genetických modifikácií u nich nedochádza k zmenám poradia nukleotidov v DNA sekvenciách (Waterland 2006). Primárne sa k epigenetickým modifikáciám radia: metylácia DNA, post-translačné modifikácie histónov a nekódujúce RNA (Jia et al. 2013). Zmeny v metylácii DNA, regulujú expresiu génov čím ovplyvňujú replikáciu, rekombináciu a opravné DNA mechanizmy alebo zostrih heterogénnej nukleárnej RNA (Holčáková 2018). Metylácia DNA je taktiež nevyhnutná na zachovanie genomovej stability, umlčanie transponovateľných a retrovirových elementov, reguláciu tkanivo špecifickej génovej expície, genomového imprintingu a deaktiváciu X chromozómu (Moore et al. 2013; Buck-Koehntop et al. 2013; Jones et al. 2001).

DNA metylácia je všeobecne definovaná ako biochemický proces, pri ktorom je $-CH_3$ skupina kovalentne spojená s bázou DNA. Zvyčajne sa tento proces odohráva na piatej pozícii cytozínu za tvorby 5-metyl-cytozínu. 5mC sa vyskytuje takmer výhradne v kontexte dinukleotidu CpG (CpG = Cytosin-fosfát-Guanin) (Robertson 2001). Približne 90% cytozínov je v ľudských somatických bunkách metylovaných práve v CpG oblastiach. Percento metylovaných cytozínov sa líši v rámci tkanív, patologickej kondície a s vekom ich počet klesá (Vymetalkova et al. 2019). V ľudských genómoch dochádza k vymiznutiu CpG miest kvôli vysokej mutabilite 5mC, ktorý je často spontánne deaminovaný na tymín (Bird 1980). A preto v metylovaných CpG miestach dochádza k výmene bázy za vznik TpG (CpA v komplementárnom reťazci). Táto výmena má za následok nízku frekvenciu výskytu CpG miest a vysokú frekvenciu TpG a CpA dinukleoidov v genóme stavovcov (Sun et al. 2020). Napriek tomu sa však v genóme nachádzajú miesta s vysokým výskytom CpG miest. Až 70% génov, ktoré kódujú proteín, obsahuje CGI v promótorovej oblasti a metylačný profil CGI promótoru všeobecne nepriamo koreluje s transkripciou génu (Saxonov et al. 2006). Pokiaľ je CGI miesto nemetylované, je chromátin dostupný transkripčným faktorom a môže byť transkribovaný. Pokiaľ je CGI miesto metylované, tak transkripcia neprebíha. Epigenetické umlčanie génu závislé na prítomnosti aberantnej metylácie promótorovej časti DNA spojené s transkripčnou represiou je dôležitým mechanizmom straty génovej funkcie pri procese karcinogenézy (Vymetalkova et al. 2019).

Metylácia DNA môže ovplyvniť transkripciu génov dvoma spôsobmi. Po prvé, metylácia samotnej DNA môže fyzicky brániť väzbe transkripčných proteínov na gén a po druhé, metylovaná DNA sa môže viazať s proteínmi známymi ako proteíny viažuce sa na doménu metyl-CpG (MBD). Všeobecne sa metylácia považuje za iniciačný krok pri inaktivácii chromátinu. Metylácia je nasledovaná hromadením MBD, na ktoré sa následne viažu históndeacetylázy, (HDAC)-represívne epigenetické modifikačné enzýmy. V dôsledku toho sa chromátin kondenzuje a dochádza k umlčaniu génovej expície (Buck-Koehntop et al. 2013; Kulis et al. 2010).

Genómy rakovinových buniek súčasne vykazujú globálnu hypometyláciu a promótorovú hypermetyláciu. Preto identifikácia génov, ktoré sú špecificky hypermetylované (čo vedie k umlčaniu

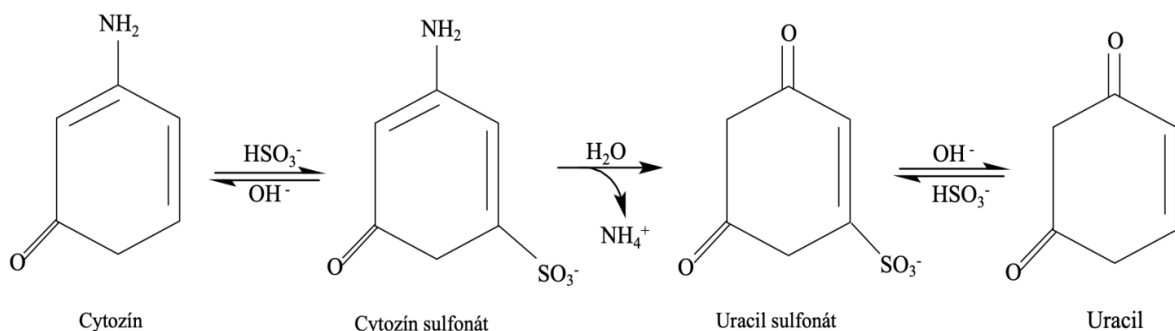
génov) alebo hypometylované, môže viesť k objaveniu nových faktorov, ktoré sú dôležité pre iniciáciu a progresiu nádoru. (Cervena et al. 2020)

V KRK aberantná metylácia CGI miest bola pozorovaná aj v takzvaných *aberrant crypt foci* (ACF) - skorých prekancerózných léziách. Aberantná metylácia bola pozorovaná aj v adenómoch aj keď menej často ako v nádoroch. Avšak množstvo metylácie v CGI miestach sa s progresiou skorého adenómu k pokročilému adenómu zvyšuje (Themes 2016). Javí sa tak, že k procesu aberantnej metylácie dochádza už na začiatku sekvencie od adenómu ku karcinómu a pravdepodobne ovplyvňuje gény, ktoré sa podieľajú na iniciácii aj progresii KRK. U týchto génov (*MGMT*, *MLH1*, *p16^{INK4A}*, *p14^{ARF}*) je frekvencia metylácie rôzna a je špecifická pre daný gén (Kim et al. 2006). Z týchto dôvodov môžeme považovať zmeny v DNA metylácii za potenciálne biomarkery rizika vzniku rakoviny alebo detekcie skorých štádií rakoviny.

5.1. Spôsob detekcie DNA metylácie u KRK

Analýza DNA metylácia môže poskytnúť cenný pohľad na reguláciu génov a identifikovať potencionálne biomarkery. Rozdielne techniky poskytujú informácie o DNA metylácii na rôznych úrovniach od celogenómvej metylácie až po metyláciu jednotlivých častí DNA v špecifických génoch. V súčasnosti je dostupných niekoľko metód detekcie zmeny v DNA metylácii na konkrétnych úsekoch DNA. K bežne používaným metódam detekcie DNA metylácie u KRK patria metódy metylačne špecifická polymerázová reťazová reakcia (MSP), MethyLight, metylačne špecifická multiplexná amplifikácia prôb závislá od ligácie (MS-MLPA), metylačne špecifická high resolution melting (MS-HRM), mikročipy, pyrosekvenovanie a imunoprecipitačné metódy.

Prvým krokom pri takmer všetkých metódach detekcie DNA metylácie, je bisulfitická konverzia. Je považovaná za „zlatý štandard“ v metylačných štúdiách. Táto metóda je založená na premene nemetylovaného cytozínu na uracil za pomoci hydrogensiričitanu sodného (Obrázok č. 2). Metylované cytozíny pritom zostávajú nekonvertované. Vďaka tomu je možné určiť DNA metyláciu na úrovni jednotlivých nukleotidov.



Obrázok č.2 Bisulfitová konverzia (Kristensen et al. 2009)

5.1.1 Metylačne špecifická PCR (MSP)

MSP je kvalitatívna vysoko citlivá a relatívne lacná metóda. Prvýkrát bola popísaná Hermanom a kol. (Herman et al. 1996). MSP deteguje metylačný profil definovaných CpG miest prostredníctvom selektívnej amplifikácie metylovaných a nemetylovaných alel. Sú využívané 2 sady rôznych primerov: jedna sada sa špecificky viaže na metylovanú sekvenciu a druhá na nemetylovanú. Za jej nevýhody sú považované nízka špecifita a možnosť falošne pozitívnych výsledkov (Deharvengt et al. 2018; Kulis et al. 2010).

5.1.2 MethyLight

Methylight je citlivá, špecifická kvantitatívna fluorescenčná metóda s PCR prebiehajúca v reálnom čase. Fluorescenčná detekcia výrazne zvyšuje citlivosť a umožňuje presné kvantitatívne hodnotenie metylácie DNA, a to aj pri veľmi nízkych frekvenciách. Spôsob kvantifikácie produktov MethyLight spočíva v zaznamenávaní počtu cyklov, keď fluorescenčný signál prekročí prahovú hodnotu (trash-hold) počas exponenciálnej fázy amplifikácie PCR (Eads et al. 2000). Vďaka vysokej citlivosti a špecifite je MethyLight mimoriadne vhodný na detekciu nízkofrekvenčných metylačných biomarkerov (Laird 2003). Táto metóda je aj mimoriadne rýchla a nepotrebuje iné metódy než PCR v reálnom čase. Nevýhodou je, že nedokáže detegovať heterogénnu DNA metyláciu vo vzorke, pretože primery a sondy bežne používané v MethyLight sú určené na meranie špecifického metylačného profilu (úplne metylovaného) (Eads et al. 2000; Hernández et al. 2013).

5.1.3 Metylačne špecifická multiplexná amplifikácia prôb závislá od ligácie (MS-MLPA)

Je semikvantitatívna metóda používaná na detekciu metylačných zmien DNA. Je variantom metódy MLPA, kombinovaná s použitím reštrikčných metylačne špecifických endonukleáz, pomocou ktorých sú rozlíšené metylované a nemetylované vlákna. DNA je na začiatku amplifikovaná a hybridizovaná s MS-MLPA prôbami. Prôba pre MS-MLPA je podobá bežnej MLPA próbe s tým rozdielom, že obsahuje rozpoznávaciu sekvenciu pre HpaII alebo HhaI. V ďalšom kroku za pomoci ligázy sú DNA a MS-MLPA próby spojené do jedného komplexu. Súčasne sú pridávané metylačne špecifické endonukleázy, ktoré štiepia nemetylovanú DNA, zatiaľ čo metylovaná DNA zostáva neštiepená. Následne sú metylované DNA fragmenty amplifikované a signál je detekovateľný (Nygren 2005).

5.1.4 Metylačne špecifická high resolution melting (MS-HRM)

MS-HRM je citlivá špecifická kvantitatívna metóda založená na PCR v reálnom čase a cenovo dostupná metóda na detekciu DNA metylácií.

PCR produkty sú priamo analyzované z disočiacej krivky a z uvoľneného interkalačného fluorescenčného farbiva počas topenia. Pôsobením hydrogensiričitanu dochádza v nemetylovanej DNA ku konverzií cytozínu na uracily, čím sa zmení aj teplota topenia molekuly DNA. V nasledujúcej PCR reakcii majú nemetylované DNA nižšiu teplotu topenie než produkty pochádzajúce z metylovanej DNA. Výhodami sú uzavretý systém detekcie so zníženou šancou kontaminácie a možnosť analýzy CpG ostrovčekov v celom amplikóne. (Wojdacz et al. 2007; Reed et al. 2007).

5.1.5 Pyrosekvenovanie

Metóda pyrosekvenovaním je založená na detekcii aktivity DNA polymerázy s iným chemoluminiscenčným enzýmom, ktorá umožňuje rýchlu a presnú kvantifikáciu zmien v DNA sekvenciách (Uhlen 1989).

Jedná sa o veľmi senzitívnu metódu, ktorá býva využitá aj k kvantifikácii sekvenčných zmien. Pyrosekvenovanie deteguje a kvantifikuje i malé zmeny v DNA metylácii. Emitované svetlo je detegované behom syntézy komplementárneho vlákna exonukleázovo-deficientnou DNA polymerázou. Metóda pyrosekvenovania je využívaná na stanovenie korelácie DNA metylácie nádorových buniek a génovej expresie, k stanoveniu bunkovej odpovede na liečbu látkami, ktoré zabraňujú vzniku DNA metylácii, k posúdeniu zmien v DNA metylácii pri vzniku nádorov a genetickom imprintingu (Dejeux et al. 2009)

5.1.6 Mikročipy

Mikročipy sú využívané na celogenómové metylačné štúdie, zmeny génovej expresie alebo genotypizáciu (Bumgarner 2013). Sú založené na paralelnej hybridizácii značených nukleotidov zo vzorky so špecifickými oligonukleotidovými próbami, ktoré sú prichytené na pevnom podklade - čipe. DNA je na začiatku rozdelená na krátke jednovláknové fragmenty a pripojená na adaptéry. DNA je následne označená fluorescenčnými látkami, denaturovaná a hybridizovaná so próbami na povrchu mikročipov. Po excitácii je možné detegovať emitované fluorescenčné žiarenie v miestach, kde došlo k hybridizácii. Získané dáta sú následne spracované pomocou bioinformatických metód (Kaliyappan 2012; *Genome.Gov* 2020). Ku komerčne používaných mikročipom patria Affymetrix, Agilent a Roche NimbleGen, a predovšetkým Illumina (Huang et al. 2010)

5.1.7 Imunoprecipitačné metódy

Sú metódy založené na extrakcii metylovanej DNA čím uľahčujú jej následnú analýzu. DNA je na rozdelená na fragmenty, denaturovaná a inkubovaná s monoklonálnou protilátkou. Následne je použitá jedna z imunoprecipitačných metód. Buď sú DNA fragmenty izolované pomocou 5mC viažucej sa pomocou špecifickej monoklonálnej protilátky alebo s využitím rekombinatného proteínu viažuceho MBD. Protilátky sú odstránené proteinkinázou K a zostáva tak neporušená iba metylovaná DNA (Thu et al. 2009). Vyčistená DNA môže byť následne detegovaná pomocou vyššie spomenutých metód.

6. Hypermetylácia DNA

6.1 Charakteristika hypermetylácie DNA

Hypermetylácia DNA sa vyskytuje predovšetkým v promótoroch bohatých na CpG miesta. Prítomnosť DNA hypermetylácie vedie k umlčaniu tumor-supresorových génov čo je spojené s rastovou výhodou buniek. U KRK môže byť až niekoľko stoviek CGI miest abnormálne hypermetylovaných. K vzniku nádorov môže primárne dochádzať pokiaľ sú umlčané gény, ktoré sú súčasťou funkčných dráh charakteristických pre vznik rakoviny (Pfeifer 2018). Nie je pochyb, že táto epigenetická modifikácia zohráva rozhodujúcu úlohu vo vzniku nádoru a je charakteristickým znakom takmer všetkých typov rakoviny u ľudí (Esteller 2008).

6.2 Hypermetylácia DNA u KRK a prekancerózných štádií

Prehľad génov hypermetylovaných v KRK je uvedený v Tabuľke č 4. Gény hypermetylované u KRK sú často súčasťou dôležitých bunkových regulačných dráh. Príkladom sú tumor-supresorové gény zapojené do bunkového cyklu (*p16^{INK4a}*, *p14^{ARF}*), gény zapojené do DNA opravných dráh (*MLH1*, *NEIL1*, *NEIL3*, *NHEJ1*), do apoptózy (*DAPK1*), do bunkovej adhézie (*CDH1*) a pri odstraňovaní mutagénnych a cytotoxických aduktov (*MGMT*) (Lee et al. 2004; Farkas et al. 2014).

Ako je vidieť v Tabuľke č.4, hypermetylácia promótoru u väčšiny génov viedla k zníženiu alebo k úplnej strate ich expresie. K najčastejšie hypermetylovaným génom v KRK sa radia gény *MLH1*, *MGMT*, *p14^{ARF}*, *APC* a *SFRP* (Lee et al. 2004; Suzuki et al. 2004). U týchto génov bola pozorovaná ich znížená génová expresia. (Sugai et al. 2017; Svrcek et al. 2010; Galamb et al. 2016). Metylácia génov *MLH1* a *p14^{ARF}* bola často spojená s výskytom *BRAF* mutácie. Metylácia génov *MGMT*, *APC* a *p14^{ARF}* bola spojená s výskytom *KRAS* mutácie (Tanaka et al. 2010). Metylácia génov *MLH1*, *p14^{ARF}*, *APC*, *MGMT* bola tiež častejšia pozorovaná u nádorov vykazujúcich MSI fenotyp (Savio et al. 2016; Kim et al. 2010; Shen et al. 2005). Výskyt metylácie génov *APC* a *p14^{ARF}* bol spojený s celkovo horším prežívaním u pacientov (Nilsson et al. 2012). Zároveň, hypermetylácia génu *MGMT* bola identifikovaná aj v nepostihnutej sliznici hrubého čreva u pacientov s KRK. Dalo by sa teda predpokladať, že metylácia

génu *MGMT* je počiatočná udalosť pri vzniku KRK. To z neho robí užitočný diagnostický biomarker pre skorú detekciu a zistenie rizika pri sporadických formách KRK (Shen et al. 2005).

Hypermetylácia génov *MLH1*, *MGMT*, *p14^{ARF}*, *APC* a *SFRP* bola tiež pozorovaná aj v črevných adenómoch a taktiež u nich bola pozorovaná znížená génová expresia (Tabuľka č.5) (Kim et al. 2006; Suzuki et al. 2004). U génov *MGMT*, *MLH1* a *p14* bolo pozorované zvyšovanie výskytu metylácie v sekvencii adenóm-KRK (Kim et al. 2006).

Ako už bolo spomenuté vyššie, najčastejším študovaným hypermetylovaným génom u KRK je gén *MLH1*. Metylácia génu *MLH1* je zároveň úzko spätá s výskytom mutácie v géne *BRAF*. Je pozoruhodné, že MSI nádory vykazujú oveľa vyššiu frekvenciu V600E mutácie v géne *BRAF*. V skutočnosti mutácia génu *BRAF* všeobecne predchádza hypermetyláciou génu *MLH1*, ako dokazuje pozorovanie, že táto mutácia *BRAF* (V600E) sa často vyskytuje u SSA, ktoré sú považované za prekursor MSI karcinómov, kde sa hypermetylácia génu *MLH1* vyskytuje zriedka (Muto et al. 2014). Nedávno sa ukázalo, že mutácia *BRAF* V600F zvyšuje mieru aberantnej metylácie CGI v myších modeloch (Bond et al. 2018).

Tabuľka č.4 Zoznam identifikovaných hypermetylovaných génov u KRK

Autor	Pacienti s KRK	Kontrolná skupina	Použitá metóda	Gény	Poznámka
(Esteller et al. 2000)	110	-	MSP	<i>p14^{ARF}</i>	↓ génová expresia
(Esteller et al. 2000)	235	-	MSP	<i>MGMT</i>	Metylácia spojená s <i>TP53</i> mutáciou Hypermetylácia <i>MGMT</i> spojená s G:C->A:T tranzíciou v géne <i>TP53</i>
(Moinova et al. 2002)	61	78	MSP	<i>HLTF</i>	Častejšia lokalizácia v proximálnej časti Spojené s CIMP-H ↓ génová expresia
(Lee et al. 2004)	149	24	MSP	<i>APC, COX-2, DAPK, GSTP1, MLH1, p16^{INKA}, RASSF1A, THBS1, TIMP3, p14^{ARF}, *MGMT, *CDH1</i>	<i>APC</i> metylácia pozorovaná aj v okolnej črevnej mukóze <i>COX-2, DAPK, CDH1, hMLH1</i> a <i>p14</i> boli častejšie metylované v pravej časti KRK. *↓ génová expresia
(Goel et al. 2004)	273	-	MSP	<i>PTEN</i>	Hypermetylácia promótoru spojená s MSI-H statusom. ↓ génová expresia
(Suzuki et al. 2004)	164	-	MSP	<i>SFRP1, SFRP2, SFRP4, SFRP5</i>	Spojené s <i>APC</i> mutáciou ↓ génová expresia
(Ebert et al. 2005)	47	21	Methylight	<i>TPEF/HPP1</i>	Častejšie metylované v proximálnej časti KRK
(Chen et al. 2005)	126	46	MSP	<i>VIM</i>	Hypermetylovaný exon-1
(Murai et al. 2005)	111		COBRA	<i>BNIP3</i>	↓ génová expresia
(Shen et al. 2005)	95	95	COBRA/MSP	<i>MGMT</i>	Hypermetylovaný aj v okolnej črevnej mukóze Častejšie metylovaný u ženského pohlavia Spojený s <i>KRAS</i> mutáciou ↓ génová expresia
(Aguilera et al. 2006)	54	-	BSP	<i>DKK1</i>	Hypermetylovaný prevažne v neskorších KRK štádiách

(Lind et al. 2006)	53	22	MSP	<i>ADAMTS1, CRABP1, NR3C1</i>	Častejšia lokalizácia v pravej časti KRK Častejšie metylované u žien <i>NR3C1a CRABP1</i> častejšie hypermetylované v MSI nádoroch ↓ génová expresia
(Jacinto et al. 2007)	52	10	MSP	<i>RASGRF2, HOXD1, PLK2, SCNN1B</i>	↓ génová expresia
(Park et al. 2007)	432	-	MSP	<i>RASSF2A</i>	Prítomnosť metylácie spojená s <i>KRAS/BRAF</i> mutáciou Častejšie metylovaný v MSS a v distálnej časti ↓ génová expresia
(Melotte et al. 2009)	75	75	qMSP	<i>NDRG4</i>	↓ génová expresia
(Hellebrekers et al. 2009)	153	230	MSP	<i>GATA4, GATA5</i>	↓ génová expresia
(Liu et al. 2010)	63	40	MSP	<i>NGX6</i>	↓ génová expresia
(Svrcek et al. 2010)	81	-	MSP	<i>MGMT</i>	Strata expresie častejšie v MSI než v MSS
(Tanaka et al. 2010)	861	-	MethyLight	<i>CACNA1G, p16^{INKA}, CHFR, CRABP1, HIC, IGFBP3, MGMT, MINT-1, MINT-31, MLH1, NEUROG1, p14^{ARF} RUNX3, SOCS1, WRN</i>	Prítomnosť metylácie spojená s <i>BRAF</i> mutáciou (okrem <i>MGMT</i> génu) <i>WRN, IGFBP3, MINT-1</i> a <i>p14^{ARF}</i> spojené s <i>KRAS</i> mutáciou Prítomnosť metylácie génu <i>MLH1</i> spojená s nemutovaným <i>KRAS</i> genotypom <i>CACNA1G, MGMT, MINT-1</i> v prítomnosti <i>BRAF</i> mutácie spojené s CIMP fenotypom <i>CACNA1G, p14^{ARF}, p16^{INKA}, CHFR, CRABP1, HIC1, MINT-1, MINT-31, NEUROG1, RUNX3, SOCS1, WRN</i> v prítomnosti <i>KRAS</i> mutácie spojené s CIMP
(Kim et al. 2010)	285	-	Pyrosekvenovanie	<i>MLH1, MINT1, MINT2, MINT31, p14^{ARF}, CACNA1G, COX2, DAPK, MGMT, APC, p16^{INK4a}</i>	<i>COX2</i> a <i>DAPK</i> asociované s CIMP-H a MSI <i>APC</i> a <i>p16^{INK4a}</i> spojené s <i>KRAS</i> mutáciou <i>p16^{INK4a}</i> spojená s celkovo horším prežívaním <i>MLH1, MINT1, MINT2, MINT31, p16^{INK4a}, p14^{ARF}</i> častejšie metylované v MSI nádoroch
(Nilsson et al. 2012)	146	46	Pyrosekvenovanie	<i>MGMT, p16^{INK4a}, RASSF1A, APC, p14^{ARF}</i>	Prítomnosť metylácie génu <i>APC</i> a <i>p14^{ARF}</i> bola spojená s horším prežívaním

(Draht et al. 2014)	624		MSP Pyrosekvenovanie	<i>RET</i>	Horšie celkové prežítvanie Častejšie metylovaný v proximálnej časti KRK Horšie prognózy v II KRK štádiu
(Farkas et al. 2014)	12	12	IlluminaBeadChip 450K	<i>NEIL1, NEIL3, NHEJ1, GTF2H5, DKK2, DKK3, FZD5, LRP5, TLE3, WNT2, WNT3A, WNT6, KIAA1804, MYO1B, *EDNRB1, *GPC6, *SMAD2</i>	*↓ génová expresia
(Chen et al. 2014)	72	142	MSP	<i>KISS1</i>	Metylácia spojená s nádorovou diferenciáciou, prítomnosťou metastáz v lymfatických uzlinách a vzdialených metastáz
(Silva et al. 2014)	91	6	Pyrosekvenovanie	<i>SFRP1, SFRP2, SFRP5, DKK2, WIF1</i>	Strata génovej expresie (okrem <i>DKK2</i>) Nárast výskytu metylácie s neoplastickou progresiou – od normálneho epitelu cez adenóm až po KRK
(Tsai et al. 2015)	127	-	Pyrosekvenovanie	<i>SHISA3</i>	Horšie celkové prežítvanie ↓ génová expresia
(Galamb et al. 2016)	9	-	IlluminaBeadChip 450K	<i>AXIN2, CHP1, SFRP2, DKK1, VANGL1, WNT5A, *PRICKLE1, *SFRP1, *PSEN1</i>	*↓ génová expresia
(Savio et al. 2016)	48	47	Methylight	<i>ITF2, MLH1, APC</i>	Častejšie metylované v MSI-H KRK, spojené s metyláciou <i>MLH1</i> v MSI-H KRK
(Vymetalkova et al. 2016)	32 RK	32	IlluminaBeadChip 450K	<i>ADHFE1, FLII, GPR85, ITGA4, ITGBL1, NPY, MYBPC3, TLI</i>	
(McInnes et al. 2017)	94	94	Illumina Infinium HumanMethylation 450 K	<i>EYA4, TFPI2, TLX1</i>	Hypermetylované v CIMP-H
(Sugai et al. 2017)	100	-	Pyrosekvenovanie	<i>SFRP1, SFRP2, SFRP5, DKK2, DKK3, RASSF1A, IGFBP7, *p14^{ARF}, *MLH1</i>	<i>SFRP1, SFRP2, DKK2</i> častejšie v MSS <i>MLH1, IGFBP7</i> častejšie v MSI *↓ génová expresia

(Freitas et al. 2018)	214	50	qMSP	<i>APC, MGMT, SEPT9, RASSF1A</i>	<i>MGMT</i> častejšie metylované u žien <i>APC, MGMT, SEPT9</i> metylované častejšie v RK <i>SEPT9</i> najviac metylované v IV KRK štádiu <i>SEPT9, MGMT</i> zníženie metylácie po adjuvantnej liečbe <i>APC</i> častejšie u MSI-H nádorov
(Barault et al. 2018)	182	-	Infinium Human Methylation 450 BeadChip	<i>EYA4, GRIA4, ITGA4, MAP3K14-AS1, MSC</i>	Hypermetylované u pacientov s metastázami
(Li et al. 2019)	15	-	BSP	<i>HOXA5, HOXA2, HOXA6</i>	<i>HOXA5, HOXA6</i> častejšie metylované u ľudí <60 rokov, u MSS/MSS-L, CIMP-L/0 ↓ génová expresia
(Chung et al. 2019)	369	46	Infinium Human Methylation 450K BeadChips	<i>LMX1A, SOX1, ZNF177</i>	<i>LMX1A</i> spojené s horším celkovým preživaním, a preživaním bez ochorenia v I a II štádiu
(Sun et al. 2020)	122	-	MeDIP Illumina MiSeq platforma	<i>C14orf159, CADM3, CNRIP1, GRIA4, GSTM2, NRXN1, PRKG, RSPO2</i>	<i>CADM3, CNRIP1, GRIA4, GSTM2, NRXN1</i> vplyv na celkové preživaním u KRK pacientov ↓ génová expresia

PCR- polymerázová reťazová reakcia, MSP- Metylačne-špecifická PCR, BSP- bisulfitové sekvenovanie, qMSP - Kvantitatívna metylačne-špecifická PCR, COBRA- kombinovaná bisulfitová restrikčná analýza, KRK-kolorektálny karcinom, RK- rektálny karcinom, MeDIP -imunoprecipitácia metylovanej DNA

Tabuľka č. 5 Zoznam hypermetylovaných génov v prekancerózných štádiách

Autor	Pacienti s A	Kontrolná skupina	Použitá metóda	Gény	Poznámka
(Toyooka et al. 2002)	19	-	MSP	<i>CDH13</i>	Strata génovej expresie
(Li et al. 2003)	29		MSP	<i>SLC5A8</i>	Hypermetylované v ACF
(Lee et al. 2004)	92	24	MSP	<i>APC, DAPK, CDH1, MGMT, p14^{ARF}</i>	Spojené so vznikom nádoru nie však s progresiou (okrem génu <i>APC</i>)
(Suzuki et al. 2004)	30	-	MSP	<i>SFRP1, SFRP2, SFRP5</i>	↓ génová expresia
(Taniguchi et al. 2005)	44	-	MSP	<i>WIF1</i>	↓ génová expresia
(Hesson et al. 2005)	8	-	MSP	<i>RASSF2A</i>	Spojené s nemutovaným <i>KRAS</i> genotypom ↓ génová expresia
(Kim et al. 2006)	42	-	MSP	<i>MGMT, p16^{INK4A}, MLH1, TIMP3, CDH1, p14^{ARF}, THBS1, HMTF</i>	Zvyšovanie výskytu metylácie v sekvencii normálny črevný epitel-adenóm- KKK
(Sato et al. 2007)	29	34	MSP	<i>DKK2, DKK3</i>	↓ génová expresia
(Rojas et al. 2008)	42	15	MSP	<i>TSP1</i>	Strata génovej expresie
(Psofaki et al. 2010)	39	20	MSP	<i>MLH1, p16^{INK4A}, MGMT</i>	Zvyšovanie výskytu metylácie v sekvencii

					normálny črevný epitel-adenóm- KKK
(Sloane et al. 2014)	89	51	COBRA	<i>USP44</i>	↓ génová expresia
(Galamb et al. 2016)	15	-	IlluminaBeadChip 450K	<i>AXIN2, DAAM2, DKK4, SOX17, *SFRP1, *SFRP2, *SFRP4, *APC, *PRICKLE1,</i>	* ↓ génová expresia
(Ma et al. 2016)	88	47	COBRA	<i>ROR2</i>	Strata génovej expresie
(Barták et al. 2017)	15	15	Methylight	<i>SFRP1, SFRP2, SDC2, PRIMA1</i>	↓ génová expresia
(Park et al. 2018)	190	-	qMSP Pyrosekvenovanie	<i>SDC2</i>	
(Andrew et al. 2017)	34	15	IlluminaInfiniumHumanMethylation 450 BeadChip	<i>RET, GSG1L, MIR4493, NTNG1, MCIDAS, ZNF568, RERG</i>	Spojené s <i>BRAF</i> mutáciou
(Liu et al. 2019)	40	-	Illumina HumanMethylation450 platform	<i>SV2B, MLH1, EPM2AIP1, C16orf62, RCOR3, BAIAP3, OGDHL, HDHD3, ATP1B2</i>	<i>MLH1</i> spojené s <i>BRAF</i> mutáciou a CIMP-H ↓ génová expresia

PCR- polymerázová reťazová reakcia, MSP- Metylačne-špecifická PCR, COBRA- kombinovaná bisulfitová restričná analýza, A - Adenóm, ACF - aberant crypt foci, qMSP - Kvantitatívna metylačne-špecifická PCR

7. Hypometylácia DNA

7.1 Charakteristika Hypometylácie DNA

Hypometylácia DNA predstavuje stratu metylovej skupiny na 5-mC nukleotide. Vyskytuje sa v celom genóme, zvyčajne sa však vyskytuje v repetitívnych oblastiach, ktoré tvoria približne 50% ľudského genómu a vedie k nadmernej expresii protoonkogénov, aktivácií génov v zárodočnej línii, alternatívnych promótorov, transponovateľných elementov, a ku genómovej nestabilite (Mukamel et al. 2013; Pfeifer 2018). Jednou z prvých pozorovaných asociácií DNA hypometylácie s rakovinovým ochorením bola spojená s prítomnosťou aberantnej regulácie *RAS* onkogénu u KRK už v roku 1983 (Feinberg et al. 1983). Zvyčajne sa DNA hypometylácia vyskytuje v pokročilejších štádiách vývoja nádoru a ovplyvňuje genóm vo väčšej miere ako hypermetylácia (Chen et al. 2017).

7.2. Hypometylácia DNA u KRK a prekancerózných štádií

Prehľad génov hypometylovaných v KRK je uvedený v Tabuľke č.6. Gény hypometylované u KRK sú zvyčajne zapojené do bunkových regulačných dráh, ako sú gény bunkového cyklu (*DCLRE1C*), gény ovplyvňujúce apoptózu (*CASP8*), regulátory transkripcie (*IGF2*, *TCF7L1*, *HES1*) a gény DNA opravných systémov (*CCNH*, *DCLRE1C*) (Farkas et al. 2014; Baba et al. 2010; Wu et al. 2017)

Ako vidieť v Tabuľke č.6., hypometylácia DNA u väčšiny génov viedla k zvýšeniu ich expresie. K najčastejšie hypometylovaným génom v KRK patrili *HES1*, *MYC*, *IGF2* a *LINE-1* element a ich hypometylácia bola spojená s horšími prognózami u pacientov. Hypometylácia génu *HES1* bola spojená s horšou histologickou klasifikáciou, prítomnosťou metastáz v lymfatických uzlinách (Wu et al. 2017). V géne *MYC* a *LINE-1* sa množstvo metylácie s neoplastickou progresiou - od epitelového tkaniva cez adenóm až po KRK znižovalo (Sharrard et al. 1992; Shademan et al. 2020).

Najčastejšie študovaným hypometylovaným génom v KRK bol *IGF2*. Jeho hypometylácia viedla k strate génového imprintingu a k zvýšeniu jeho expresie čím sa zvýšila bunková proliferácia (Kasprzak et al. 2019) Hypometylácia génu *IGF2* prevládala u mužského pohlavia, bola ďalej spojená s nižším štádiom KRK, MSI-L/MSS statusom, CIMP-L, *KRAS* mutáciou, horším prežívaním a vyššou mortalitou u pacientov. Hypometylácia génu *IGF2* bola ďalej nezávisle asociovaná s prítomnosťou *LINE-1* metylácie (Baba et al. 2010). Gény *MYC* a *LINE-1* boli metylované aj v adenómoch a množstvo DNA metylácie sa znižovalo s neoplastickou progresiou (Tabuľka č.7) (Sharrard et al. 1992; Shademan et al. 2020).

Tabuľka č.6 Zoznam identifikovaných hypometylovaných génov v KRK

Autor	Pacienti s KRK	Kontrolná skupina	Použitá metóda	Gény	Poznámka
(Sharrard et al. 1992)	9	10	Southernblots	<i>MYC</i>	Znižovanie množstva metylácia s neoplastickou progresiou - od normálneho epitelu cez adenóm až po KRK ↑génová expresia
(Grunau et al. 2008)	40	-	COBRA	<i>BAGE</i>	Častejšie na pravej strane
(Ogino et al. 2008)	634	-	Pyrosekvenovanie	<i>LINE1</i>	Spojená s celkovo horším prežívaním a vyššou mortalitou
(Baba et al. 2010)	1178	51	Pyrosekvenovanie	<i>IGF2</i>	Spojený s celkovou vyššou úmrtnosťou , Hypometylácia spojená s mužským pohlavím, s nemutovaným <i>BRAF</i> a <i>KRAS</i> genotypom, MSI-L/MSS statusom a <i>LINE</i> metyláciou, CIMP-L/0
(Farkas et al. 2014)	12	12	IlluminaBeadChip 450K	<i>TTN, SMAD2, CCNH, TCF7L1, CTNNB1, *CASP8, *DCLRE1C</i>	*↑génová expresia
(Galamb et al. 2016)	9		IlluminaBeadChip 450K	<i>CACYBP, CTNNB1, MYC</i>	↑génová expresia
(Vymetalkova et al. 2016)	32RK	32	IlluminaBeadChip 450K	<i>ADHFE1, BPIL3, CYP27, A1, GPR85, HBBP1</i>	
(Wu et al. 2017)	65	50	MSP	<i>HES1</i>	Spojená s horšou histologickou klasifikáciou s prítomnosťou metastáz v lymfatických uzlinách a s horšou prognózou u pacientov ↑génová expresia
(Ansar et al. 2020)	548	548	Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip	<i>SMAD3</i>	

(Hahn-Strömberg et al. 2017)	31	-	Pyrosekvenovanie	<i>CLDN1, CLDN7, CLDN4</i>	
(Sun et al. 2020)	122	-	Infinium HumanMethylation450	<i>CEACAM6, GRHL2, SRPRB</i>	GRHL2 spojený s horším celkovým prežívaním u pacientov ↑ génová expresia

PCR- polymerázová reťazová reakcia, MSP- Metylačne-špecifická PCR, COBRA- kombinovaná bisulfitová restričná analýza, KKK-kolorektálny karcinom, RK- rektálny karcinom

Tabuľka č.7 Zoznam identifikovaných hypometylovaných génov v prekancerózných štádiách

Autor	Pacienti s A	Kontrolná skupina	Použitá metóda	Gény	Poznámka
(Sharrard et al. 1992)	8	10	Southern blots	<i>MYC</i>	↑ génová expresia
(Galamb et al. 2016)	15	-	Illumina BeadChip 450K	<i>FZD3, *CACYPB</i>	* ↑ génová expresia
(Shademan et al. 2020)	11	-	AQAMA	<i>LINE-1</i>	Znižovanie výskytu metylácie s vývojom adenómu ↑ génová expresia

A - Adenóm, AQAMA- absolútna kvantitatívna analýza metylovaných alel

8. Záver

KRK patrí k najčastejšie sa vyskytujúcim rakovinám na svete. Jej vznik je výsledkom hromadenia mutácií a epimutácií v črevných bunkách, čo vedie k abnormálnej bunkovej proliferácii a tvorbe metastáz. Cieľom tejto práce bolo charakterizovať úlohu DNA metylácie ako regulátora transkripcie v rámci vývoja KRK a u adenómov nachádzajúcich sa v hrubom čreve. Zvýšený výskyt DNA metylácie v rakovinových bunkách je často pozorovaný v miestach génového promótoru a vedie k umlčaniu transkripcie a následnému zníženiu expresie týchto génov.

V súčasnosti je využívaných niekoľko metód, ktorými je možné detegovať zmeny v DNA metylácií. Na základe použitej metódy je DNA metyláciu možné detegovať buď na úrovni celého genómu alebo iba v jednotlivých častiach génov.

Hypermetylácia DNA promótoru je zvyčajne spojená so znížením expresie, výskytom *BRAF* alebo *KRAS* mutácie, MSI statusom a častejšou lokalizáciou na pravej strane čreva. Hypometylácia je často spojená so zvýšením expresie.

K najčastejšie hypermetylovaným génom v KRK patria *MLH1*, *MGMT*, *p14^{ARF}*, *APC* a *SFRP*. Obdobne, u adenómov bola tiež zaznamenaná DNA metylácia v týchto génoch. Gén *MGMT* bol hypermetylovaný aj v normálnej črevnej mukóze, čím je poukázané na jeho možné využitie ako potencionálneho prognostického a diagnostického biomarkeru.

Medzi najčastejšie hypometylované gény patria *IGF2*, *MYC*, *HES1* a *LINE-1*. Gény *MYC* a *LINE-1* boli metylované aj v adenómoch a množstvo DNA metylácie sa znižovalo s neoplastickou progresiou. Prítomnosť metylácie v génoch *IGF2*, *HES1* a *LINE-1* bola spojená s celkovo horšími prognózami u pacientov s KRK. To poukazuje na možnosť využitia týchto génov ako možných potencionálnych biomarkerov.

U adenómov bola aberantná metylácia pozorovaná menej často ako v nádoroch. Výskyt metylácie sa s progresiou adenómu ku karcinómu zvyšoval. To naznačuje, že k aberatnej metylácií dochádza už na začiatku sekvencie adenóm-karcinóm. Metylácia teda ovplyvňuje aj gény, ktoré sa podieľajú na iniciácií a progresii KRK. Štúdium DNA metylačných zmien predstavuje súčasné téma a stanovenie metylačných zmien v kaskáde adenóm-KRK by mohlo byť užitočným, a to nielen pre prognostiku, diagnostiku a predikciu odpovede na liečbu.

9. Zoznam použitej literatúry

(* = sekundárny zdroj)

- ADVANI SM, ADVANI PS, BROWN DW, et al. Global differences in the prevalence of the CpG island methylator phenotype of colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2019, **19**(1). ISSN 1471-2407
- AGUILERA O, FRAGA MF, BALLESTAR E, et al. Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene*. 2006, **25**(29), 4116-4121. ISSN 0950-9232
- ALONSO MH, AUSSÓ S, LOPEZ-DORIGA, et al. Comprehensive analysis of copy number aberrations in microsatellite stable colon cancer in view of stromal component. *British Journal of Cancer*. 2017, **117**(3), 421-431. ISSN 0007-0920
- AMERSI F, AGUSTIN M, CLIFFORD Y. Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Health Services. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*. 2005, **18**(03), 133-140. ISSN 1531-0043
- ANDREW A, BARON J, BUTTERLY L, et al. Hyper-Methylated Loci Persisting from Sessile Serrated Polyps to Serrated Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, **18**(3) . ISSN 1422-0067
- ANSAR M, WANG CH, WANG Y, et al. Hypomethylation as a Biomarker for Early Prediction of Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, **21**(19). ISSN 1422-0067
- ATKIN WS, SAUNDERS BP. Surveillance guidelines after removal of colorectal adenomatous polyps. *Gut*. 2002, **51**(Supplement 5), v6-v9. ISSN 0017-5749
- ATKIN W, WOOLDRAGE K, BRENNER A, et al. Adenoma surveillance and colorectal cancer incidence: a retrospective, multicentre, cohort study. *The Lancet Oncology*. 2017, **18**(6), 823-834. ISSN 14702045
- AUSUBEL FM, BRENT R, KINGSTON RE, et al. *Current Protocols in Molecular Biology* . Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2001. ISBN 0471142727
- BABA Y, NOSHO K, SHIMA K, et al. Hypomethylation of the IGF2 DMR in Colorectal Tumors, Detected by Bisulfite Pyrosequencing, Is Associated With Poor Prognosis. *Gastroenterology*. 2010, **139**(6), 1855-1864. ISSN 00165085
- BARAULT L, AMATU A, SIRAVEGNA G, et al. Discovery of methylated circulating DNA biomarkers for comprehensive non-invasive monitoring of treatment response in metastatic colorectal cancer. *Gut*. 2018, **67**(11), 1995-2005. ISSN 0017-5749
- BARTÁK BK, KALMÁR A, PÉTERFIA B, et al. Colorectal adenoma and cancer detection based on altered methylation pattern of SFRP1, SFRP2, SDC2 , and PRIMA1 in plasma samples. *Epigenetics*. 2017, **12**(9), 751-763. ISSN 1559-2294
- BIRD AP. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Research* . 1980, **8**(7), 1499–1504. ISSN 0305-1048
- BOLAND CR, GOEL A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2010, **138**(6), 2073-2087.e3 . ISSN 00165085

- BOND CE, LIU CH, KAWAMATA F, et al. Oncogenic BRAF mutation induces DNA methylation changes in a murine model for human serrated colorectal neoplasia. *Epigenetics*. 2018, **13**(1), 40-48 . ISSN 1559-2294
- BUCK-KOEHN TOP BA, DEFOSSEZ PA. On how mammalian transcription factors recognize methylated DNA. *Epigenetics*. 2014, **8**(2), 131-137. ISSN 1559-2294
- Burt RW, Cannon JA, David DS, et al. Colorectal Cancer Screening Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2003, **1**(1). ISSN 1540-1405
- CAMPOS FG. Colorectal cancer in young adults: A difficult challenge. *World Journal of Gastroenterology*. 2017, **23**(28) . ISSN 1007-9327
- *CERVENA K, SISKOVA A, BUCHLER T, VODICKA P, et al. Methylation-Based Therapies for Colorectal Cancer. *Cells*. 2020, **9**(6). ISSN 2073-4409
- CONCONI D, REDAELLI S, BOVO G, et al. Unexpected frequency of genomic alterations in histologically normal colonic tissue from colon cancer patients. *Tumor Biology*. 2016, **37**(10), 13831-13842. ISSN 1010-4283
- CONTEDEUCA V, SANSONNO D, RUSSI S, et al. Precancerous colorectal lesions. *International Journal of Oncology*. 2013, **43**(4), 973-984. ISSN 1019-6439
- CROCKETT SD, NAGTEGAAL ID. Terminology, Molecular Features, Epidemiology, and Management of Serrated Colorectal Neoplasia. *Gastroenterology*. 2019, **157**(4), 949-966.e4. ISSN 00165085
- DANAEI G, VANDER HOORN S, LOPEZ AD, et al. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *The Lancet*. 2005, **366**(9499), 1784-1793. ISSN 01406736
- DE PALMA F, D'ARGENIO V, POL J, et al. The Molecular Hallmarks of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer. *Cancers*. 2019, **11**(7). ISSN 2072-6694
- DEHARVENGT SJ, TSONGALIS GJ. Molecular Assessment of Human Diseases in the Clinical Laboratory. *Elsevier*, 2018, 2018, s. 709-730. Molecular Pathology. ISBN 9780128027615.
- DEJEUX E, EL ABDALAOUI H, GUT IG, et al. Identification and Quantification of Differentially Methylated Loci by the Pyrosequencing™ Technology. TOST, Jörg, ed. *DNA Methylation* . Totowa, NJ: Humana Press, 2009, 2009, s. 189-205. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-934115-61-9
- DRAHT MXG, SMITS KM, TOURNIER B, et al. Promoter CpG island methylation of RET predicts poor prognosis in stage II colorectal cancer patients. *Molecular Oncology*. 2014, **8**(3), 679-688. ISSN 15747891
- DYRSØ T, LIJ, WANG K, et al. Identification of chromosome aberrations in sporadic microsatellite stable and unstable colorectal cancers using array comparative genomic hybridization. *Cancer Genetics*. 2011, **204**(2), 84-95. ISSN 22107762
- EADS CA. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Research*. **28**(8), 32e-0. ISSN 13624962.
- EBERT MPA, MOONEY SH, TONNES-PRIDDY L, et al. Hypermethylation of the TPEF/HPP1 Gene in Primary, Metastatic Colorectal Cancers. *Neoplasia*. 2005, **7**(8), 771-778. ISSN 14765586

- ESTELLER M. Epigenetics in Cancer. *New England Journal of Medicine* . 2008, **358**(11), 1148-1159. ISSN 0028-4793
- ESTELLER M, TOYOTA M, SANCHEZ-CESPEDES M, et al. Inactivation of the DNA Repair Gene O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase by Promoter Hypermethylation Is Associated with G to A Mutations in K-ras in Colorectal Tumorigenesis. *Cancer Research*. 2000, **60**(9), 2368–2371. ISSN 0008-5472, 1538-7445
- ESTELLER M, TORTOLA S, TOYOTA M, et al. Hypermethylation-associated Inactivation of p14ARF Is Independent of p16INK4a Methylation and p53 Mutational Status. *Cancer Research*. 2000, **60**(1), 129–133. ISSN 0008-5472, 1538-7445
- FARKAS AS, VYMETALKOVA V, VODICKOVA L, et al. DNA methylation changes in genes frequently mutated in sporadic colorectal cancer and in the DNA repair and Wnt/ β -catenin signaling pathway genes. *Epigenomics*. 2014, **6**(2), 179-191. ISSN 1750-1911
- FEARON RE, VOGELSTEIN B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990, **61**(5), 759-767. ISSN 00928674
- FEINBERG PA, VOGELSTEIN B. Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1983, **111**(1), 47-54. ISSN 0006291X
- FREITAS M, FERREIRA F, CARVALHO S, et al. A novel DNA methylation panel accurately detects colorectal cancer independently of molecular pathway. *Journal of Translational Medicine*. 2018, **16**(1). ISSN 1479-5876
- GALAMB O, KALMÁR A, PÉTERFIA B, et al. Aberrant DNA methylation of WNT pathway genes in the development and progression of CIMP-negative colorectal cancer. *Epigenetics*. 2016, **11**(8), 588-602. ISSN 1559-2294
- GENEVE N, KAIRYS D, BEAN B, et al. Colorectal Cancer Screening. *Primary Care: Clinics in Office Practice*. 2019, **46**(1), 135-148. ISSN 00954543
- GEORGIU A, KHAKOO S, EDWARDS P, et al. Outcomes of Patients with Early Onset Colorectal Cancer Treated in a UK Specialist Cancer Center. *Cancers*. 2019, **11**(10). ISSN 2072-6694
- GOEL A, ARNOLD CHN, NIEDZWIECKI D, et al. Frequent Inactivation of PTEN by Promoter Hypermethylation in Microsatellite Instability-High Sporadic Colorectal Cancers. *Cancer Research*. 2004, **64**(9), 3014-3021. ISSN 0008-5472
- GONZALEZ RS, WASHINGTON K, SHI CH. Current applications of molecular pathology in colorectal carcinoma. *Applied Cancer Research*. 2017, **37**(1). ISSN 1980-5578
- GRASS F, MATHIS K. Novelties in treatment of locally advanced rectal cancer. *F1000Research*. 2018, **7** . ISSN 2046-1402
- GRUNAU C, BRUN ME, RIVALS I, et al. BAGE Hypomethylation, A New Epigenetic Biomarker for Colon Cancer Detection. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2008, **17**(6), 1374-1379. ISSN 1055-9965
- GUINNEY J, DIENSTMANN R, WANG X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine*. 2015, **21**(11), 1350-1356. ISSN 1078-8956

- HAHN-STRÖMBERG V, ASKARI S, AHMAD A, et al. Expression of claudin 1, claudin 4, and claudin 7 in colorectal cancer and its relation with CLDN DNA methylation patterns. *Tumor Biology*. 2017, **39**(4). ISSN 1010-4283
- HAWKINS N, NORRIE M, CHEONG K, et al. CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. *Gastroenterology*. 2002, **122**(5), 1376-1387. ISSN 00165085
- HE X, WU K, OGINO S, et. al. Association Between Risk Factors for Colorectal Cancer and Risk of Serrated Polyps and Conventional Adenomas. *Gastroenterology*. 2018, **155**(2), 355-373.e18. ISSN 00165085
- HELLEBREKERS MEID, LENTJES MHFM, VAN DEN BOSCH SM, et al. GATA4 and GATA5 are Potential Tumor Suppressors and Biomarkers in Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2009, **15**(12), 3990-3997. ISSN 1078-0432
- HERMAN JG, GRAFF JR, MYOHANEN S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996, **93**(18), 9821-9826. ISSN 0027-8424
- HERNÁNDEZ HG, TSE MY, PANG SC, et. al. Optimizing methodologies for PCR-based DNA methylation analysis. *BioTechniques*. 2013, **55**(4). ISSN 1940-9818
- HESSON LB, WILSON R, MORTON D, et al. CpG island promoter hypermethylation of a novel Ras-effector gene RASSF2A is an early event in colon carcinogenesis and correlates inversely with K-ras mutations. *Oncogene*. 2005, **24**(24), 3987-3994. ISSN 0950-9232
- HINOUE T, WEISENBERGER DJ, LANGE CPE, et al. Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer. *Genome Research*. 2012, **22**(2), 271-282. ISSN 1088-9051
- HOLČÁKOVÁ J. Effect of DNA Methylation on the Development of Cancer. *Klinická onkologie*. 2018, **31**(Suppl2). ISSN 0862495X
- *HONG SN. Genetic and epigenetic alterations of colorectal cancer. *Intestinal Research*. 2018, **16**(3). ISSN 1598-9100
- HUANG YW, HUANG THM, WANG LS. Profiling DNA Methylomes from Microarray to Genome-Scale Sequencing. *Technology in Cancer Research & Treatment* . 2010, **9**(2), 139-147. ISSN 1533-0346
- CHEN JJ, WANG AQ, CHEN QQ, et. al. DNA methylation assay for colorectal carcinoma. *Cancer Biology & Medicine*. 2017, **14**(1), 42-49. ISSN 2095-3941
- CHEN SQ. KISS1 methylation and expression as predictors of disease progression in colorectal cancer patients. *World Journal of Gastroenterology*. 2014, **20**(29). ISSN 1007-9327
- CHEN WD, HAN ZJ, SKOLETSKY J, et al. Detection in Fecal DNA of Colon Cancer-Specific Methylation of the Nonexpressed Vimentin Gene. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2005, **97**(15), 1124-1132. ISSN 1460-2105
- CHUNG HH, KUO CHCH, HSIAO CHW, et al. A Novel Prognostic DNA Methylation Panel for Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, **20**(19). ISSN 1422-0067

- IJSPEERT EGJ, VERMEULEN L, MEIJER GA, et al. Serrated neoplasia—role in colorectal carcinogenesis and clinical implications. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* . 2015, **12**(7), 401-409. ISSN 1759-5045
- IMPERIALE TF, RANSOHOFF DF, ITZKOWITZ SH, et al. Multitarget Stool DNA Testing for Colorectal-Cancer Screening. *New England Journal of Medicine* . 2014, **370**(14), 1287-1297. ISSN 0028-4793
- ISSA AI, NOUREDDINE M. Colorectal cancer screening: An updated review of the available options. *World Journal of Gastroenterology*. 2017, **23**(28). ISSN 1007-9327
- ISSA JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2004, **4**(12), 988-993. ISSN 1474-175X
- JACINTO FV, BALLESTAR E, ROPERO M, et al. Discovery of Epigenetically Silenced Genes by Methylated DNA Immunoprecipitation in Colon Cancer Cells. *Cancer Research*. 2007, **67**(24), 11481-11486. ISSN 0008-5472
- JALAEIKHOO H, ZOKAASADI M, KHAJEH-MEHRIZI A, et al. Effectiveness of adjuvant chemotherapy in patients with Stage II colorectal cancer: A multicenter retrospective study. *Journal of Research in Medical Sciences*. 2019, **24**(1). ISSN 1735-1995
- JIA Y, GUO M. Epigenetic changes in colorectal cancer. *Chinese Journal of Cancer*. 2013, **32**(1), 21-30. ISSN 1000467X
- JONES PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*. 2012, **13**(7), 484-492. ISSN 1471-0056
- JONES PA. The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics. *Science*. **293**(5532), 1068-1070. ISSN 00368075.
- KALIYAPPAN K, PALANISAMY M, GOVINDARAJAN R, et al. Microarray and its applications. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 2012, **4**(6). ISSN 0975-7406.
- KANTH P, GRIMMETT J, CHAMPINE M, et al. Hereditary Colorectal Polyposis and Cancer Syndromes: A Primer on Diagnosis and Management. *American Journal of Gastroenterology*. 2017, **112**(10), 1509-1525. ISSN 0002-9270
- KASPRZAK A, ADAMEK A. Insulin-Like Growth Factor 2 (IGF2) Signaling in Colorectal Cancer—from Basic Research to Potential Clinical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, **20**(19). ISSN 1422-0067
- KASTRINOS F, SYNGAL S. Inherited Colorectal Cancer Syndromes. *The Cancer Journal*. 2011, **17**(6), 405-415. ISSN 1528-9117
- KIM JC, CHOI JS, ROH SA, et al. Promoter Methylation of Specific Genes is Associated with the Phenotype and Progression of Colorectal Adenocarcinomas. *Annals of Surgical Oncology*. 2010, **17**(7), 1767-1776. ISSN 1068-9265
- KIM YH, PETKO Z, DZIECIATKOWSKI S, et al. CpG island methylation of genes accumulates during the adenoma progression step of the multistep pathogenesis of colorectal cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2006, **45**(8), 781-789. ISSN 1045-2257

- KRISTENSEN LS, HANSEN LL. PCR-Based Methods for Detecting Single-Locus DNA Methylation Biomarkers in Cancer Diagnostics, Prognostics, and Response to Treatment. *Clinical Chemistry*. 2009, **55**(8), 1471-1483. ISSN 0009-9147.
- KULIS M, ESTELLER M. DNA Methylation and Cancer. Epigenetics and Cancer, Part A. *Advances in Genetics*. Elsevier, 2010, 2010, s. 27-56. ISBN 9780123808660
- LAIRD PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature Reviews Cancer*. 2003, **3**(4), 253-266. ISSN 1474-175X
- LEE S, HWANG KS, LEE HJ, et al. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in colorectal neoplasia. *Laboratory Investigation*. 2004, **84**(7), 884-893. ISSN 0023-6837
- LEVIN B, BROOKS D, SMITH RA, et al. Emerging Technologies in Screening for Colorectal Cancer: CT Colonography, Immunochemical Fecal Occult Blood Tests, and Stool Screening Using Molecular Markers. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2003, **53**(1), 44-55. ISSN 0007-9235
- LI D, BAI Y, FENG Z, et al. Study of Promoter Methylation Patterns of HOXA2, HOXA5, and HOXA6 and Its Clinicopathological Characteristics in Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology*. 2019, **9**. ISSN 2234-943X
- LI H, MYEROFF L, SMIRAGLIA D, et al. SLC5A8 , a sodium transporter, is a tumor suppressor gene silenced by methylation in human colon aberrant crypt foci and cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003, **100**(14), 8412-8417. ISSN 0027-8424
- LIU Q, LUO D, CAI S, et al. P–TNM staging system for colon cancer: combination of P-stage and AJCC TNM staging system for improving prognostic prediction and clinical management. *Cancer Management and Research*. 2018, **10**, 2303-2314. ISSN 1179-1322.
- LIEBERMAN D, REX DK, WINAWER SJ, et al. Guidelines for Colonoscopy Surveillance After Screening and Polypectomy: A Consensus Update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2012, **143**(3), 844-857. ISSN 00165085
- LIND GE, KLEIVI K, MELING GI, et al. ADAMTS1, CRABP1, and NR3C1 Identified as Epigenetically Deregulated Genes in Colorectal Tumorigenesis. *Cellular Oncology : the Official Journal of the International Society for Cellular Oncology*. 2006, **28**(5–6), 259–272. ISSN 1570-5870
- LIU CH, FENNELL LJ, BETTINGTON ML, et al. DNA methylation changes that precede onset of dysplasia in advanced sessile serrated adenomas. *Clinical Epigenetics*. 2019, **11**(1). ISSN 1868-7075
- LIU M, PENG Y, WANG X, et al. NGX6 gene mediated by promoter methylation as a potential molecular marker in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2010, **10**(1). ISSN 1471-2407
- LOMBARDI L, GEBBIA V, SILVESTRIS N, et al. Adjuvant Therapy in Colon Cancer. *Oncology*. 2009, **77**(1), 50-56. ISSN 1423-0232
- MA SSQ, SRIVASTAVA S, LLAMOSAS E, et al. FORD. ROR2 is epigenetically inactivated in the early stages of colorectal neoplasia and is associated with proliferation and migration. *BMC Cancer*. 2016, **16**(1). ISSN 1471-2407
- MAIDA M, MACALUSO FS, IANIRO G, et al. Screening of colorectal cancer: present and future. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2017, **17**(12), 1131-1146. ISSN 1473-7140

- MÁRMOL I, SÁNCHEZ-DE-DIEGO C, PRADILLA DIESTE A, et. al. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, **18**(1). ISSN 1422-0067
- MÄKINEN MJ. Colorectal serrated adenocarcinoma. *Histopathology*. 2007, **50**(1), 131-150. ISSN 0309-0167
- MCINNES T, ZOU D, RAO DS, et al. Genome-wide methylation analysis identifies a core set of hypermethylated genes in CIMP-H colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2017, **17**(1). ISSN 1471-2407
- MELOTTE V, LENTJES MHFM, VAN DEN BOSCH SM, et al. N-Myc Downstream-Regulated Gene 4 (NDRG4): A Candidate Tumor Suppressor Gene and Potential Biomarker for Colorectal Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009, **101**(13), 916-927. ISSN 0027-8874
- MOINOVA HR, CHEN WD, SHEN L, et al. HMTF gene silencing in human colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002, **99**(7), 4562-4567. ISSN 0027-8424
- MOORE LD, LE T, FAN G. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*. 2013, **38**(1), 23-38. ISSN 0893-133X
- MUKAMEL Z, TANAY A. Hypomethylation marks enhancers within transposable elements. *Nature Genetics*. 2013, **45**(7), 717-718. ISSN 1061-4036
- MURAI M, TOYOTA M, SUZUKI H, et al. Aberrant Methylation and Silencing of the BNIP3 Gene in Colorectal and Gastric Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2005, **11**(3), 1021–1027. ISSN 1078-0432, 1557-3265
- MURPHY N, MORENO V, HUGHES DJ, et al. Lifestyle and dietary environmental factors in colorectal cancer susceptibility. *Molecular Aspects of Medicine*. 2019, **69**, 2-9. ISSN 00982997
- MUTO Y, MAEDA T, SUZUKI K, et al. DNA methylation alterations of AXIN2 in serrated adenomas and colon carcinomas with microsatellite instability. *BMC Cancer*. 2014, **14**(1). ISSN 1471-2407
- MUZNY D, BAINBRIDGE M, CHANG K, et al. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012, **487**(7407), 330-337. ISSN 0028-0836
- NILSSON TK, LÖF-ÖHLIN ZM, SUN XF. DNA methylation of the p14ARF, RASSF1A and APC1A genes as an independent prognostic factor in colorectal cancer patients. *International Journal of Oncology*. 2013, **42**(1), 127-133. ISSN 1019-6439
- NYGREN AOH. Methylation-Specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Research*. 2005, **33**(14), e128-e128. ISSN 0305-1048
- OBUCH JC, PIGOTT CM, AHNEN DJ. Sessile Serrated Polyps: Detection, Eradication, and Prevention of the Evil Twin. *Current Treatment Options in Gastroenterology*. 2015, **13**(1), 156-170. ISSN 1092-8472
- OGINO S, KAWASAKI T, KIRKNER GJ, et al. CpG Island Methylator Phenotype-Low (CIMP-Low) in Colorectal Cancer: Possible Associations with Male Sex and KRAS Mutations. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2006, **8**(5), 582-588. ISSN 15251578
- OGINO S, KAWASAKI T, KIRKNER GJ, et al. Evaluation of Markers for CpG Island Methylator Phenotype (CIMP) in Colorectal Cancer by a Large Population-Based Sample. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2007, **9**(3), 305-314. ISSN 15251578

- OGINO S, NOSHO K, KIRKNER GJ, et al. A Cohort Study of Tumoral LINE-1 Hypomethylation and Prognosis in Colon Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2008, **100**(23), 1734-1738. ISSN 0027-8874
- OSAGIEDE O, SPAULDING AC, FRANK RD, et al. Predictors of palliative treatment in stage IV colorectal cancer. *The American Journal of Surgery*. 2019, **218**(3), 514-520. ISSN 00029610
- PARK HW, KANG HCH, KIM IJ, et al. Correlation between hypermethylation of the RASSF2A promoter and K-ras/BRAF mutations in microsatellite-stable colorectal cancers. *International Journal of Cancer*. 2007, **120**(1), 7-12. ISSN 00207136
- PARK YS, KIM DS, CHO SW, et al. Analysis of Syndecan-2 Methylation in Bowel Lavage Fluid for the Detection of Colorectal Neoplasm. *Gut and Liver*. 2018, **12**(5), 508-515. ISSN 1976-2283
- PEETERS PJHL, BAZELIER MT, LEUFKENS HGM, et al. The Risk of Colorectal Cancer in Patients With Type 2 Diabetes: Associations With Treatment Stage and Obesity. *Diabetes Care*. 2015, **38**(3), 495-502. ISSN 0149-5992
- PFEIFER G. Defining Driver DNA Methylation Changes in Human Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, **19**(4). ISSN 1422-0067
- PHIPPS AI, LINDOR NM, JENKINS MA, et al. Colon and Rectal Cancer Survival by Tumor Location and Microsatellite Instability. *Diseases of the Colon & Rectum*. 2013, **56**(8), 937-944. ISSN 0012-3706
- PILOZZI E, MARESCA C, DURANTI E, et al. Left-Sided Early-Onset vs Late-Onset Colorectal Carcinoma. *American Journal of Clinical Pathology*. 2015, **143**(3), 374-384. ISSN 1943-7722
- PSOFAKI V. Promoter methylation status of *hMLH1*, *MGMT*, and *CDKN2A / p16* in colorectal adenomas. *World Journal of Gastroenterology*. 2010, **16**(28). ISSN 1007-9327
- RAO CV, YAMADA HY. Genomic Instability and Colon Carcinogenesis: From the Perspective of Genes. *Frontiers in Oncology*. 2013, **3**. ISSN 2234-943X
- RAWLA P, SUNKARA T, BARSOUK A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Gastroenterology Review*. 2019, **14**(2), 89-103. ISSN 1895-5770
- REED GH, O KENT J, WITTEWER CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*. 2007, **8**(6), 597-608. ISSN 1462-2416
- ROBERTSON KD. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene*. 2001, **20**(24), 3139-3155. ISSN 0950-9232
- ROJAS A, MEHEREM S, KIM YH, et al. The aberrant methylation of TSP1 suppresses TGF- β 1 activation in colorectal cancer. *International Journal of Cancer*. 2008, **123**(1), 14-21. ISSN 00207136
- SAMOWITZ WS, ALBERTSEN H, HERRICK J, et al. Evaluation of a Large, Population-Based Sample Supports a CpG Island Methylator Phenotype in Colon Cancer. *Gastroenterology*. 2005, **129**(3), 837-845. ISSN 00165085
- SATO H, SUZUKI H, TOYOTA M, et al. Frequent epigenetic inactivation of DICKKOPF family genes in human gastrointestinal tumors. *Carcinogenesis*. 2007, **28**(12), 2459-2466. ISSN 1460-2180

- SAVIO AJ, DAFTARY D, DICKS E, et al. Promoter methylation of ITF2, but not APC, is associated with microsatellite instability in two populations of colorectal cancer patients. *BMC Cancer*. 2016, **16**(1). ISSN 1471-2407
- SAXONOV S, BERG P, BRUTLAG DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006, **103**(5), 1412-1417. ISSN 0027-8424
- SEGNAN N, PATNICK J, VON KARSA L, EUROPEAN COMMISSION a INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, ed., 2010. *European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis*. 1. ed. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities. ISBN 978-92-79-16435-4.
- SHADEMAN M, ZARE K, ZAHEDI M, et al. Promoter methylation, transcription, and retrotransposition of LINE-1 in colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Cancer Cell International*. 2020, **20**(1). ISSN 1475-2867
- SHARRARD RM, ROYDS JA, ROGERS S et al. Patterns of methylation of the c-myc gene in human colorectal cancer progression. *British Journal of Cancer*. 1992, **65**(5), 667-672. ISSN 0007-0920
- SHEN L, KONDO Y, ROSNER GL, et al. MGMT Promoter Methylation and Field Defect in Sporadic Colorectal Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005, **97**(18), 1330-1338. ISSN 1460-2105
- SCHLEMPER RJ. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut*. **47**(2), 251-255. ISSN 00175749
- SILVA AL, DAWSON SN, ARENDS MJ, et al. Boosting Wnt activity during colorectal cancer progression through selective hypermethylation of Wnt signaling antagonists. *BMC Cancer*. 2014, **14**(1). ISSN 1471-2407.
- *SIMON K. Colorectal cancer development and advances in screening. *Clinical Interventions in Aging*. 2016, **11**, 967-976. ISSN 1178-1998
- *SISKOVA A, CERVENA K, KRAL J, et al. Colorectal Adenomas—Genetics and Searching for New Molecular Screening Biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, **21**(9). ISSN 1422-0067
- SLOANE MA, WONG JWH, PERERA D, et al. Epigenetic inactivation of the candidate tumor suppressor USP44 is a frequent and early event in colorectal neoplasia. *Epigenetics*. 2014, **9**(8), 1092-1100. ISSN 1559-2294
- SUGAI T, YOSHIDA M, EIZUKA M, et al. Analysis of the DNA methylation level of cancer-related genes in colorectal cancer and the surrounding normal mucosa. *Clinical Epigenetics*. 2017, **9**(1). ISSN 1868-7075
- SUN JH, AI SM, LIU SQ. Methylation-driven model for analysis of dinucleotide evolution in genomes. *Theoretical Biology and Medical Modelling*. 2020, **17**(1). ISSN 1742-4682
- SUN X, CHEN D, JIN Z, et al. Genome-wide methylation and expression profiling identify methylation-associated genes in colorectal cancer. *Epigenomics*. 2020, **12**(1), 19-36. ISSN 1750-1911

- SUZUKI H, WATKINS DN, JAIR KW, et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nature Genetics*. 2004, **36**(4), 417-422. ISSN 1061-4036
- SVRCEK M, BUHARD O, COLAS C, et al. Methylation tolerance due to an O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) field defect in the colonic mucosa: an initiating step in the development of mismatch repair-deficient colorectal cancers. *Gut*. 2010, **59**(11), 1516-1526. ISSN 0017-5749
- TANAKA N, HUTTENHOWER C, NOSHO K, et al. Novel Application of Structural Equation Modeling to Correlation Structure Analysis of CpG Island Methylation in Colorectal Cancer. *The American Journal of Pathology*. 2010, **177**(6), 2731-2740. ISSN 00029440
- TANIGUCHI H, YAMAMOTO H, HIRATA T, et al. Frequent epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 in human gastrointestinal cancers. *Oncogene*. 2005, **24**(53), 7946-7952. ISSN 0950-9232
- TESTA U, PELOSI E, CASTELLI G. Colorectal Cancer: Genetic Abnormalities, Tumor Progression, Tumor Heterogeneity, Clonal Evolution and Tumor-Initiating Cells. *Medical Sciences*. 2018, **6**(2). ISSN 2076-3271
- THIAGALINGAM S, LAKEN S, WILLSON JKV, MARKOWITZ SD, et al. Mechanisms underlying losses of heterozygosity in human colorectal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001, **98**(5), 2698-2702. ISSN 0027-8424
- THU KL, PIKOR LA, KENNETT JY, et al. Methylation analysis by DNA immunoprecipitation. *Journal of Cellular Physiology*. 2009. ISSN 00219541
- TOYOOKA S, TOYOOKA KO, HARADA K, et al. Aberrant Methylation of the CDH13 (H-cadherin) Promoter Region in Colorectal Cancers and Adenomas. *Cancer Research*. 2002, **62**(12), 3382–3386. ISSN 0008-5472, 1538-7445
- TOYOTA M, AHUJA N, OHE-TOYOTA M, et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999, **96**(15), 8681-8686. ISSN 0027-8424
- TSAI MH, CHEN WCH, YU SL, et al. DNA Hypermethylation of SHISA3 in Colorectal Cancer: An Independent Predictor of Poor Prognosis. *Annals of Surgical Oncology*. 2015, **22**(S3), 1481-1489. ISSN 1068-9265
- UHLEN M. Magnetic separation of DNA. *Nature*. 1989, **340**(6236), 733-734. ISSN 0028-0836
- VENUGOPAL A, STOFFEL EM. Colorectal Cancer in Young Adults. *Current Treatment Options in Gastroenterology*. 2019, **17**(1), 89-98. ISSN 1092-8472
- VODENKOVA S, BUCHLER T, CERVENA K, et al. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacology & Therapeutics*. 2020, **206**. ISSN 01637258
- VYMETALKOVA V, VODICKA P, PARDINI B, et al. Epigenome-wide analysis of DNA methylation reveals a rectal cancer-specific epigenomic signature. *Epigenomics*. 2016, **8**(9), 1193-1207. ISSN 1750-1911
- *VYMETALKOVA V, VODICKA P, VODENKOVA S, et al. DNA methylation and chromatin modifiers in colorectal cancer. *Molecular Aspects of Medicine*. 2019, **69**, 73-92. ISSN 00982997

WATERLAND RA. Epigenetic mechanisms and gastrointestinal development. *The Journal of Pediatrics*. 2006, **149**(5), S137-S142. ISSN 00223476

WEI.W, CHENG Y, WANG B. Cancer and Genomic Instability. *Genome Stability*. Elsevier, 2016, 2016, s. 463-486. ISBN 9780128033098

WEISENBERGER DJ, LEVINE AJ, LONG TI, et al. Association of the Colorectal CpG Island Methylator Phenotype with Molecular Features, Risk Factors, and Family History. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2015, **24**(3), 512-519. ISSN 1055-9965

WEISENBERGER DJ, SIEGMUND KD, CAMPAN M, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nature Genetics*. 2006, **38**(7), 787-793. ISSN 1061-4036

WOJDACZ TK, DOBROVIC A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Research*. 2007, **35**(6), e41-e41. ISSN 0305-1048

WU Y, GONG L, XU J, et al. The clinicopathological significance of *HES1* promoter hypomethylation in patients with colorectal cancer. *OncoTargets and Therapy*. 2017, **10**, 5827-5834. ISSN 1178-6930.

Zdroje z webových stránek:

Cancer Research UK, 2019. Bowel cancer survival statistics [online]. Dostupné na: <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/bowel-cancer/survival#heading-Three>

Colorectal Cancer Alliance, 2019. Screening Methods,. Dostupné na: <https://www.ccalliance.org/screening-prevention/screening-methods>

DNA Microarray Technology Fact Sheet, 2020. *Genome.gov*. Dostupné na: <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Microarray-Technology>

GLOBOCAN 2020, *Cancer today*. Dostupné na: <http://gco.iarc.fr>

PDQ ADULT TREATMENT EDITORIAL BOARD, 2002. Colon Cancer Treatment (PDQ®): Patient Version. V: *PDQ Cancer Information Summaries*. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US). Dostupné na: <https://www.cancer.gov/types/colorectal/patient/colon-treatment-pdq>

Precision Cancer Medicines for Colon Cancer, 2020. *news.cancerconnect.com*. Dostupné na: <https://news.cancerconnect.com/colon-cancer/precision-cancer-medicines-for-colon-cancer-k9pfxLhWk0WaJ-JtYC4QfQ>

Screening Tests Included in the Colorectal Cancer Models, 2010. Dostupné na: <https://cisnet.cancer.gov/projections/colorectal/screening.php>

THEMES, U. F. O., 2016. Methylation in Colorectal Cancer. *Oncohemakey*. Dostupné na: <https://oncohemakey.com/methylation-in-colorectal-cancer/>