

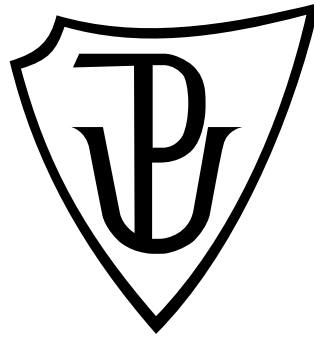
Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2018

Bc. Gabriela Fryčová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Profilování methylace DNA nádorů pro identifikaci
prediktivních biomarkerů odpovědi na bevacizumab**

Diplomová práce

Bc. Gabriela Fryčová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

Vedoucí práce: Ing. Rastislav Slavkovský, Ph.D.

Čestně prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Ing. Rastislava Slavkovského, PhD. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne:

Souhrn

Tato diplomová práce se zabývá identifikací potencionálních methylačních biomarkerů odpovědi na léčbu bevacizumabem (anti-VEGFA inhibitor angiogeneze) u pacientů s rakovinou kolorekta se zaměřením na geny související s angiogenezí.

V teoretické části této diplomové práce je popsána stručná charakteristika methylace DNA a účinky této modifikace na expresi genů. V dalších kapitolách jsou charakterizovány epigenetické změny, ke kterým dochází v rakovinných buňkách kolorekta a methylační biologické markery pro diagnostiku, určení prognózy pacientů s karcinomem kolorekta a predikci odpovědi na léčbu chemoterapeutickým léčivem. Vzhledem k nutnosti nalezení nových biomarkerů jsou v dalších kapitolách popsány metody detekce methylace DNA a princip metody sekvenování nové generace na platformě Illumina. Dále jsou v práci charakterizovány možnosti zvýšení efektivnosti sekvenování na této platformě za cílem detekce celogenomového methylačního profilu a nejčastěji využívané platformy firmy Illumina. Taktéž je zde popsán stručný princip analýzy sekvenačních dat a použité programy.

Experimentální část této práce je zaměřena na detekci celogenomových methylačních profilů DNA pomocí metody Methyl Capture sekvenování, přičemž hlavním cílem je detekovat diferenciólně methylované oblasti ve vzorcích pacientů s kolorektálním karcinomem, kteří jsou léčeni bevacizumabem, a identifikovat potencionální methylační biomarkery odpovědi na léčbu touto látkou. Bylo identifikováno 20 genů hypermethylovaných ve skupině respondentů a 1 gen hypomethylovaný ve skupině non-respondentů, jejichž umlčení v důsledku methylace, může mít roli v rozdílné odpovědi pacientů vůči této léčbě. Hypermethylované oblasti genů *EN1* a *SFRP2* ve skupině respondentů, byly validovány pomocí bisulfitového sekvenování. Nejvyšší korelaci mezi výsledky z Methyl Capture sekvenování a bisulfitového sekvenování vykazovaly oblasti genu *EN1* EN1_A a EN1_C_2.

Summary

This master's thesis is focused on identification of potential methylation biomarkers, that might predict response to the treatment of bevacizumab (anti-VEGFA inhibitor of angiogenesis) in patients with colorectal carcinoma with focus on genes associated with angiogenesis.

In the theoretical part of this master's thesis there are described basic characteristics of DNA methylation and its impact on gene expression. In the next chapters are mentioned and described epigenetic changes, which occur in the colorectal cancer cells and methylation biological markers used for diagnosis, determination of prognosis for patients with colorectal carcinoma and prediction of therapeutic response to the chemotherapeutic agents. Due to the requirement of new biomarkers, there are also described methods used for detection of DNA methylation and the principle of next generation sequencing on the Illumina sequencing platform. Further, there are also described options for raising effectiveness of sequencing on the Illumina sequencers and basic principle of data analysis and programs, which were used for that.

The practical part of this thesis is focused on the whole genome detection of DNA methylation profiles by Methyl Capture sequencing. The main goal of this work was to detect differently methylated regions in the DNA samples of patients with colorectal carcinoma, which are treated by bevacizumab, and to identify potential methylation biomarkers of response to this treatment. There have been identified 20 genes hypermethylated in the group of patients responding to the bevacizumab treatment (responders) and 1 gene hypomethylated in the non-responsive group of patients (non-responders). Hypermethylated regions in non-responders located next to *EN1* and *SFRP2* genes have been validated by bisulfite sequencing. Methylated regions of *EN1* gene, EN1_A and EN1_C_2, showed highest correlation between data from Methyl Capture sequencing and bisulfite sequencing.

Poděkování

Děkuji svému školiteli Ing. Rastislavu Slavkovskému, Ph.D. za odborné vedení, věcné připomínky, cenné rady a čas, které mi v průběhu zpracování diplomové práce věnoval. Dále také děkuji Ing. Lucii Kotkové a kolektivu Ústavu molekulární a translační medicíny za ochotu vždy mi pomoci a Mgr. Janě Vrbkové, Ph.D. za pomoc při statistickém zpracování dat. V neposlední řadě patří velké poděkování mojí rodině za umožnění studia a podporu během něj.

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíl práce	2
3	Methylace DNA	3
3.1	Lokalizace 5-methylcytosinu v genomu	3
3.1.1	CpG ostrovy.....	3
3.1.2	Intergenové oblasti	4
3.1.3	Tělo genu	5
3.2	Methylace non-CpG míst	5
3.3	Enzymy methylující DNA	6
3.3.1	<i>De novo</i> methylace DNA.....	7
3.4	Demethylace DNA.....	7
3.5	Methyl-vazebné proteiny (MBP)	8
3.6	Interakce mezi methylací DNA and dalšími epigenetickými mechanismy.....	9
3.7	Mechanismus vzniku aberantní methylace DNA.....	10
4	Epigenetické změny v rakovinných buňkách kolorekta (CRC).....	11
4.1	Role methylace DNA v karcinogenezi CRC.....	12
4.2	Role modifikací histonů v karcinogenezi CRC.....	13
4.3	Role miRNA v karcinogenezi CRC	13
5	Biomarkery v CRC	15
5.1	Diagnostické markery	15
5.1.1	Detekce methylované DNA z plasmy.....	16
5.1.2	Detekce methylované DNA ze stolice.....	16
5.2	Prognostické markery	17
5.3	Markery související s odpovědí na léčivo	17
6	Metody studia methylace DNA	19
6.1	Metody založené na štěpení restričními enzymy	19
6.1.1	MSRE sekvenování (MSRE-Seq).....	19
6.2	Metody založené na afinitním obohacení methylované DNA	20
6.2.1	MeDIP sekvenování (MeDIP-Seq).....	20
6.2.2	Sekvenování MIRA (MIRA-Seq).....	20
6.2.3	Methyl Capture sekvenování (MethylCap-Seq)	21
6.3	Metody založené na bisulfitové konverzi.....	22
6.3.1	Celogenomové bisulfitové sekvenování (WGBS)	22
6.3.2	PBAT.....	23
6.3.3	Bisulfitové sekvenování se sníženým zastoupením (RRBS)	23
6.3.4	Celogenomové bisulfitové sekvenování založené na tagmentaci (T-WGBS).....	24
6.3.5	Bisulfitové sekvenování se zámkovými sondami (BSPP)	24
6.3.6	Bisulfitové sekvenování amplikonů (BSAS)	25
6.4	Nanoporové sekvenování	25
7	Sekvenační technologie Illumina.....	27
7.1	Postup sekvenování na platformě Illumina	27

7.1.1	Paired-end sekvenování	29
7.1.2	„Patterned“ průtoková reakční komůrka.....	30
7.1.3	Technologie 10x GemCode	30
7.2	Analýza a zpracování dat	31
7.2.1	Primární analýza dat	31
7.2.2	Sekundární analýza.....	31
7.2.3	Terciární analýza dat	32
7.3	MiSeq.....	33
7.4	HiSeq 2500	33
7.5	NovaSeq 6000.....	34
8	Materiál a metody.....	35
8.1	Biologický materiál.....	35
8.2	Kity	35
8.3	Chemikálie a použité roztoky	36
8.4	Laboratorní přístroje	36
9	Metodika.....	37
8.5	Příprava DNA	37
8.6	Fragmentace DNA	37
8.7	Vychytávání fragmentů methylované DNA pomocí kitu MethylMiner Methylated DNA Enrichment Kit	38
8.7.1	Příprava magnetických kuliček.....	38
8.7.2	Příprava proteinu MBD-biotin.....	38
8.7.3	Navázání proteinového komplexu MBD-biotin na magnetické kuličky.....	38
8.7.4	Inkubace konjugátu MBD-biotin a magnetických kuliček s fragmentovanou DNA	39
8.7.5	Eluce nemethylované DNA	39
8.7.6	Eluce methylované DNA.....	40
8.7.7	Precipitace ethanolem.....	40
8.8	Kontrola kvality methylované DNA pomocí qPCR.....	41
8.8.1	Příprava vzorků pro qPCR.....	41
8.8.2	Příprava kalibrační řady pro qPCR.....	41
8.8.3	qPCR	42
8.9	Příprava knihovny pomocí QIAseq Ultralow Input Library Kitu	42
8.9.1	Syntéza tupých konců a ligace adaptorů.....	42
8.9.2	Amplifikace DNA knihovny.....	44
8.9.3	Kvantifikace knihovny	45
8.10	Příprava vzorků na sekvenování	45
8.11	Zpracování sekvenačních dat z Methyl Capture sekvenování	46
8.12	Analytická validace výsledků	48
8.12.1	Navržení primerů	48
8.12.2	Bisulfitová konverze pomocí kitu EZ DNA Methylation-Gold Kit	48
8.12.3	PCR amplifikace bisulfitované DNA	50
8.13	Přečištění amplikonů pomocí kitu QIAquick PCR Purification Kit	51
8.14	Tagmentace s použitím kitu Nextera XT Sample Prep Kit	52

8.15	Příprava vzorků na sekvenování	52
8.16	Zpracování sekvenačních dat z bisulfitového sekvenování	53
10	Výsledky	55
10.1	Methyl Capture sekvenování	55
10.2	Analýza a anotace dat z Methyl Capture sekvenování.....	58
10.2.1	Hypermethylace ve skupině non-respondenti (N).....	62
10.2.2	Hypermethylace ve skupině respondenti (R)	62
10.3	Analytická validace methylačního profilu oblastí genů <i>SFRP2</i> a <i>EN1</i> pomocí bisulfitového sekvenování	67
11	Diskuse	73
12	Závěr	85
13	Zdroje	86

Seznam zkratek

5caC	5-karboxylcytosin
5fC	5-formylcytosin
5-FU	5-fluorouracil
5hmC	5-hydroxymethylcytosin
5mc	5-methylcytosin
ACF	Aberantní kryptový focus (Aberrant Crypt Foci)
ADCYAP1	Adenylate Cyclase Activating Polypeptide 1
AID/APOBEC	Activation Induced Deaminase/Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme Complex
ALDH1A2	Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A2
ALDHbr	Lidské kmenové buňky exprimující vysoké hladiny aldehyd dehydrogenázy (Aldehyde Dehydrogenase-Bright Cells)
ALX4	ALX Homeobox 4
ANGPT2	Angiopoietin 2
APC	WNT Signaling Pathway Regulator
ASCL1	Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 1
AT2R	Angiotensin Type 2 Receptor
ATP12A	ATPase H+/K+ Transporting Non-Gastric Alpha2 Subunit
ATXN1L	Ataxin 1 Like
BER	Excizní oprava bází (Base Excision Repair)
BMP2/BMP3/BMP4	Bone Morphogenetic Protein 2/3/4
BMPR2	Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2
BP	Biologická funkce
BRAF	B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase
BSAS	Bisulfitové sekvenování ampliconů (Bisulfite Amplicon Sequencing)
BSPP	Bisulfitové sekvenování se zámkovými sondami (Bisulfite Sequencing With Padlock Probes)
BWA	Burrows-Wheeler Aligner
CACNA1G	Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 G
CAV2	Caveolin 2
CBF1	Recombination Signal Binding Protein For Immunoglobulin Kappa J Region
CCND1	Cyclin D1
CD109	CD109 Molecule
CD31	Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
CDH5	Cadherin 5
CDK2A	Cyclin Dependent Kinase 2
CGI	CpG ostrov (CpG Island)
CIMP	Methylátorový fenotyp (CpG Island Methylator Phenotype)
CIMP-	Nádory s CIMP fenotypem, vykazují hypermethylaci
CIMP+	Nádory bez CIMP fenotypu, nevykazují aberantní hypermethylaci
CIN	Chromozomální nestabilita (Chromosomal Instability)
COL5A1	Collagen Type V Alpha 1 Chain
CORO6	Coronin 6
CpG	Cytosin-fosfát-Guanin
CRC	Rakovina kolorekta (Colorectal Carcinoma)
CTBP2	C-Terminal Binding Protein 2
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
CXCL11/CXCL12/CXCL6/CXCL4	C-X-C Motif Chemokine Ligand 11/12/6/4
CXCR4	Chemokine C-X-C Motif Receptor 4
CYP4X1	Cytochrome P450 Family 4 Subfamily X Member 1
DDIT4	DNA Damage Inducible Transcript 4
DLL1/DLL4	Delta-like 1/4
DNMT	DNA methyltransferáza
DNMT1	DNA methyltransferáza 1 (DNA (Cytosine-5)-Methyltransferase 1)
DNMT3A/DNMT3B	DNA methyltransferáza 3A (DNA (Cytosine-5)-Methyltransferase 3A/3B)
DNMT3L	DNA methyltransferáza 3L (DNA (Cytosine-5)-Methyltransferase 3 Like)
dNTP	Deoxynukleosid trifosfát

dsDNA	Dvouřetězcová DNA (double stranded DNA)
DUSP21	Dual Specificity Phosphatase 21
EN1	Homeobox Protein Engrailed 1
EVL	Enah/Vasp-Like
F	Průměrná velikost molekuly DNA všech vzorků po indexaci (bp)
FC	Podíl mediánů skupiny cut-off high ku cut-off low
FDA	Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
FGF2/FGF5	Fibroblast Growth Factor 2/5
FGS	Sekvenování první generace (First Generation Sequencing)
FLI1	Friend Leukemia Integration 1 Transcription Factor
FLNC	Filamin C
FN1	Fibronectin 1
FOXF2	Forkhead Box Protein F2
FOXM1	Forkhead Box M1
FSHR	Follicle Stimulating Hormone Receptor
gDNA	Genomická DNA
GNAS	G Protein Subunit Alpha S
MBD2B	Methyl-CpG Binding Domain Protein 2
HBEGF	Heparin Binding EGF Like Growth Factor
HES5	Hes Family BHLH Transcription Factor 5
HPP1	Hyperplastic Polyposis 1
MBD3L1	Methyl-CpG Binding Domain Protein 3 Like 1
HK2	Hexokinase 2
HLTF	Helicase Like Transcription Factor
hMeDIP-Seq	Hydroxymethylated DNA Immunoprecipitation Sequencing
hMLH1	Human MutL Homolog 1
HOXB9	Homeobox 9
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICS	Instrument Control Software
ID1/ID4	Inhibitor Of DNA Binding 1/4
IGF2	Insulin Like Growth Factor 2
IGV	Integrative Genomics Viewer
IL1/IL6/IL8	Interleukin 1/6/8
IL1B	Interleukin 1 Beta
IL23A	Interleukin 23 Subunit Alpha
ISM2	Isthmin 2
ITGA4	Integrin Subunit Alpha 4
iTOKS	Imunochemické testy okultního krvácení do stolice (Fecal Immunochemical Test)
ITPKA	Inositol-Trisphosphate 3-Kinase A
JAG1	Jagged 1
JBP1-Seq	J-Binding Protein Sequencing
K	1 000
KIF16B	Kinesin Family Member 16B
KRAS	KRAS Proto-Oncogene, GTPase
KSR2	Kinase Suppressor of Ras 2
LAMB3	Laminin Subunit Beta 3
LAMP1	Lysosomal-Associated Membrane Protein 1
LEP	Leptin
LHX1	LIM Homeobox 1
LIN28	Lin-28 Homolog A
LINE1	Dlouhý rozptýlený jaderný element (Long Interspersed Nuclear Element 1)
M	Methylovaná spike-in DNA kontrola
MACS2	Model-based Analysis of ChIP-Seq
MAFB	MAF BZIP Transcription Factor B
MBD	Methyl-vazebná doména (Methyl-CpG-Binding Domain)
MBD1-4	Methyl-CpG Binding Domain Protein 1-4
MBP	Methyl-vazebné proteiny (Methyl-CpG-Binding Protein)
MeCP2	Methyl-CpG-Binding Protein 2

MeDIP-Seq	MeDIP sekvenování (Methylated DNA Immunoprecipitation Sequencing)
MethylCap-Seq	Methyl Capture sekvenování (Methyl Capture Sequencing)
MeV	Multiexperiment Viewer
MF	Molekulární funkce
MGMT	O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase
MINT1	Methylated In Tumor 1
MIRA-Seq	Sekvenování MIRA (Methylated CpG Island Recovery Assay)
miRNA	Malé nekódující RNA (microRNA)
MLH1	MutL Homolog 1
MMP2/MMP7/MMP9	Matrix Metaloproteinase 2/7/9
MPS	Masivní paralelní sekvenování (Massive Parallel Sequencing)
MRPL38	Mitochondrial Ribosomal Protein L38
MSH2/MSH6	MutS Homolog 2/6
MSI	Mikrosatelitová nestabilita (Microsatellite Instability)
MSRE	Methylačně senzitivní restriční enzymy (Methylation Sensitive Restriction Enzyme)
MSRE-Seq	MSRE sekvenování (Methylation Sensitive Restriction Enzyme Sequencing)
MTRNR2L8	MT-RNR2-Like 8
N	Skupina non-respondenti
NA	Not available (data nejsou dostupná)
ncRNA	Nekodující RNA (non-coding RNA)
NDRG4	NDRG Family Member 4
NEUROG1	Neurogenin 1
NGFR	Nerve Growth Factor Receptor
NGFRAP1	Nerve Growth Factor Receptor-Associated Protein 1
NGS	Metody sekvenování nové generace (New Generation Sequencing)
NICD	NOTCH intracelulární domén
NLGN1	Neuroigin 1
NM	Nemetylovaná spike-in DNA kontrola
NOMO1	NODAL Modulator 1
NOX4	NADPH Oxidase 4
NPY5R	Neuropeptide Y Receptor Y5
NRP1	Neuropilin 1
OLB	OFF-Line Base Caller
OS	Celkové přežití (Overall Survival)
p53	Tumor Protein p53
PBAT	Post Bisulfite Adapter Tagging
PE	Paired-end
PF	Interní filtr kvality (Passing Filter)
PFS	Přežití bez progresu (Progression Free Survival)
PKNOX2	PBX/Knotted 1 Homeobox 2
PLA2G10	Phospholipase A2 Group X
PLXNB1/PLXNB2	Plexin B1/2
PMS2	PMS1 Homolog 2
POLK	DNA Polymerase Kappa
POU3F2	POU Class 3 Homeobox 2
PRDM14	PR/SET Domain 14
R	Skupina respondenti
RA	Kyselina retinová (Retinoic Acid)
RBPJ	Recombination Signal Binding Protein For Immunoglobulin Kappa J Region
RISC	RNA Induced Silencing Complex
RNF126	Ring Finger Protein 126
RRBS	Bisulfitové sekvenování se sníženým zastoupením (Reduced Representation Bisulfite Sequencing)
RT	Reverzibilní terminátor
RTA	Real Time Analysis
RUNX1T1	RUNX1 Translocation Partner 1
RUNX3	Runt Related Transcription Factor 3
S1RP1	Sphingosine-1-Phosphate-1 Receptor

SAM	S-adenosylmethionin
SBS	Sekvenování syntézou (Sequencing By Synthesis)
SDF1	Stromal Cell-Derived Alpha Chemokine
SEMA4D	Semaphorin 4D
SEPT9	Septin 9
SFRP2	Secreted Frizzled Related Protein 2
SINE	Krátké rozptýlené nukleotidové elementy (Short Interspersed Nuclear Element)
SLC5A8	Solute Carrier Family 5 Member 8
SMIM9	Small Integral Membrane Protein 9
SMTN	Smoothelin
SNP	Jednonukleotidové polymorfismy (Single Nucleotide Polymorphism)
SNRPN	Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N
SOCS1	Suppressor Of Cytokine Signaling
SOX17/SOX7	SRY-Box 17/7
SPARC	Secreted Protein Acidic And Rich In Cysteine
SQ	Množství DNA vstupující do PCR reakce (Starting Quantity)
SUV39H1	Suppressor Of Variegation 3-9 Homolog 1
TBX18	T-Box 18
TEL	Translocation ETS Leukaemia
TET	Ten Eleven Translocation
TET1	Ten Eleven Translocation 1
TF	Transkripční faktor
TGFB2	Transforming Growth Factor Beta 2
TGS	Technologie sekvenování třetí generace (Third Generation Sequencing)
TIE1	Tyrosine Kinase With Immunoglobulin Like And EGF Like Domains 1
TIE2	TEK Receptor Tyrosine Kinase
TIMM50	Translocase of Inner Mitochondrial Membrane 50
TIMP1/TIMP2/TIMP3	TIMP Metalopeptidase Inhibitor 1-3
TMBIM6	Transmembrane BAX Inhibitor Motif Containing 6
TOKS	Okultního krvácení do stolice (Fecal Occult Blood Test)
TP53	Tumor Protein p53
T-WGBS	Tagmentation Based Whole Genome Bisulfite Sequencing
TYMS	Thymidylát syntáza
UGT1A1	UDP Glucuronosyltransferase Family 1 Member A Complex Locus
UHFR	Ubiquitin-Like, Containing PHD and RING Finger Domain
UHFR1/UHFR2	Ubiquitin-Like, Containing PHD and RING Finger Domain 1/2
ÚMTM	Ústav molekulární a translační medicíny
UNC119	Unc-119 Lipid Binding Chaperone
UTS2	Urotensin 2
UTS2R	Urotensin 2 Receptor
VE-cadherin	Vascular Endothelial Cadherin
VEGFA/VEGFC	Vaskulární endoteliální růstový faktor A/C (Vascular Endothelial Growth Factor A/C)
VEGFR2/VEGFR3	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2/3
VIM	Vimentin
WGBS	Celogenomové bisulfitové sekvenování (Whole Genome Bisulfite Sequencing)
WIF1	Wnt Inhibitory Factor 1
WNT2B	Wnt Family Member 2B
Z	Průměrná velikost fragmentu DNA po indexaci ve vzorku (bp)
ZBTB38/ZBTB4	Zinc Finger And BTB Domain Containing 38/4
ZDHHC9	Zinc Finger DHHC-Type Containing 9
ZFP	Zinc Finger Protein
ZNF483/ZNF98	Zinc Finger Protein 483/98

1 Úvod

Methylace DNA je epigenetická modifikace, ke které nejčastěji dochází na pátém uhlíku v cyklické struktuře cytosinové báze. Tyto kovalentní změny mají vliv na expresi genů a jsou zapojeny do mnoha biologických procesů, jako jsou inaktivace chromozomu X a genomický imprinting. Methylace DNA stejně jako další epigenetické modifikace, RNA interference a modifikace histonů, mají důležitou roli v procesu karcinogeneze rakoviny kolorekta.

Změny v hladině methylace určitých oblastí v genomu nádorových buněk mohou sloužit jako nástroj pro diagnostiku, stanovení prognózy u pacientů s tímto onemocněním a predikci odpovědi na léčbu terapeutickými látkami. Pro identifikaci methylačních biologických biomarkerů je používáno velké množství různých metod detekce methylovaných cytosinových bází, přičemž jejich hlavním společným rysem je sekvenování nové generace. V nynější době je sekvenování syntézou na platformách firmy Illumina nejčastěji používanou technologií pro celogenomovou detekci methylačních profilů.

Rakovina kolorekta je druhou nejčastější příčinou úmrtí v západním světě, přičemž bevacizumab (Avastin) je léčivo používané pro léčbu pacientů s tímto onemocněním. Doposud nebyl identifikován biomarker odpovědi organismu na tuto léčbu, a proto je tento problém cílem studia mnoha vědeckých pracovišť po celém světě. V praktické části byla pro detekci změn v methylaci DNA použita metoda Methyl Capture sekvenování a cílem práce bylo identifikovat potencionální methylační biomarker, který by umožnil rozlišit pacienty, u kterých dochází k rozvoji rezistence vůči léčbě bevacizumabem, od pacientů, kteří na léčbu odpovídají pozitivně. Methylační profil genů *ENI* a *SFRP2* byl validován pomocí metody bisulfitového sekvenování.

2 Cíl práce

Teoretická část

- Prohloubit znalosti v oblasti methylace DNA, zejména v souvislosti s CRC.
- Prohloubit znalosti o epigenetických změnách ve vybraných typech nádorů (CRC).
- Seznámit se s problematikou prediktivních biomarkerů v souvislosti s nádorovým bujením.
- Prohloubit znalosti problematiky sekvenování na platformě Illumina MiSeq/HiSeq a možnostech zpracování dat s vysokým sekvenačním pokrytím.
- Seznámit se s nejnovějšími možnostmi detekce methylačního profilu pomocí sekvenování nové generace (NGS) příp. nanopórové sekvenační technologie.

Praktická část

- Zvládnutí izolace DNA z FFPE nádorů, fragmentace a kvantifikace.
- Zvládnutí přípravy obohacené methylované DNA pomocí principu "MethylMiner" resp. "methyl capture".
- Zvládnutí přípravy sekvenační knihovny pomocí kitu Illumina Nextera XT.
- Sekvenování vzorků obohacené methylované DNA.
- Zpracování sekvenačních dat z methylomových analýz.
- Biologická interpretace dat z methylomových analýz.
- Analytická validace výsledků.

3 Methylace DNA

Genetika je věda zabývající se studiem dědičným změn ve funkci nebo aktivitě genů v důsledku změn v sekvenci DNA (bodová mutace, delece, inserce, translokace). Naopak epigenetika studuje změny ve funkci nebo aktivitě genů, které nejsou asociovány se změnami samotné sekvence DNA. Mezi hlavní epigenetické modifikace se řadí methylace DNA, RNA interference a modifikace histonů (Vyskot, 2010).

Jako první objevil modifikovaný cytosin v roce 1948 Rollin Hotchkiss (Hotchkiss, 1948). Nicméně samotný vliv methylace DNA na regulaci exprese genů a diferenciaci buněk byl prokázán až ve studiích z 80. let 20. století (Holliday *et Pugh*, 1975; Compere *et Palmiter*, 1981).

K methylaci DNA, tedy přenosu methylové skupiny na pátý uhlík v cyklické struktuře cytosinu za vzniku 5-methylcytosinu (5mC), dochází v buňkách bakterií, rostlin, hub a živočichů, přičemž má důležitou roli v mnoha buněčných procesech. Příkladem je embryogeneze, transkripce, přestavby struktury chromatinu, inaktivace chromozomu X, genomický imprinting a stabilita chromozomů (Bestor *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2007; Li *et al.*, 1992; Lippman *et al.*, 2004; Lister *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2007). V mnohobuněčných organismech jsou epigenetické změny příčinou existence různých profilů genové exprese v různých typech buněk a tkání.

3.1 Lokalizace 5-methylcytosinu v genomu

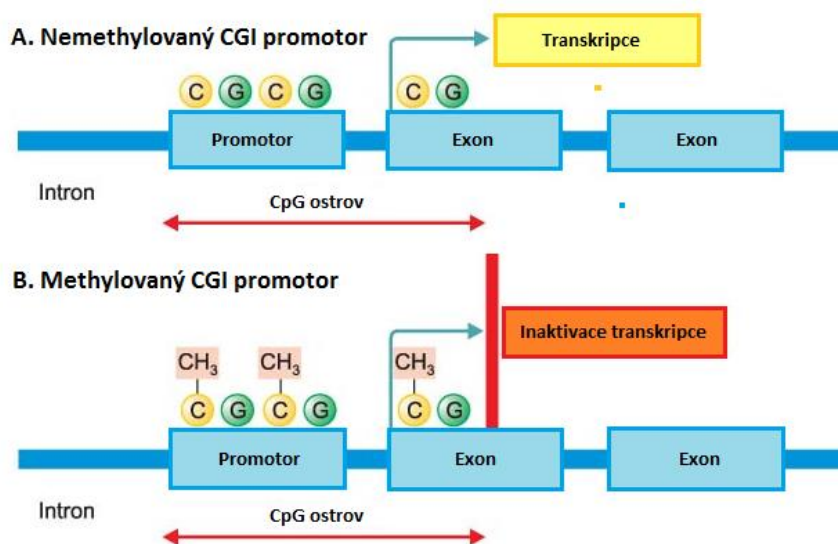
Celkové množství 5mC tvoří v lidském genomu přibližně 1 % nukleových kyselin (Ehrlich *et al.*, 1982). K většině methylace DNA dochází na cytosinových bázích, které jsou v sekvenci DNA následovány guaninovou bází. Tato místa jsou označována jako CpG (Cytosin-fosfát-Guanin) dinukleotidy nebo také CpG místa. Tyto CpG dinukleotidy jsou rozprostřeny po celém lidském genu, přičemž počet CpG míst je v průběhu života snižován v důsledku spontánní deaminace 5mC na thymin a chyb při opravě DNA, což je jeden z hlavních zdrojů mutací (Coulondre *et al.*, 1978; Bird, 1980; Shen *et al.*, 1994).

3.1.1 CpG ostrovy

Jako CpG ostrovy (CGI; CpG Island) jsou označovány oblasti DNA o velikosti 300 až 3 000 bp, které jsou charakterizovány vyšší hustotou CpG dinukleotidů, než je tomu u zbytku genomu. Tyto CpG ostrovy jsou přítomny u více než 70 % promotorových oblastí genů, zejména housekeeping genů (Saxonov *et al.*, 2006; Gardiner-Garden *et Frommer*, 1987), přičemž CpG ostrovy asociované s promotory jsou v lidském genomu vysoce konzervované (Illingworth *et al.*, 2010).

Methylace CpG ostrovů asociovaných s promotorovými oblastmi (CGI promotor) má za následek stabilní umlčení genové exprese (viz **Obrázek 1**) (Mohn *et al.*, 2008). Tato schopnost regulovat expresi genů prostřednictvím methylace CpG ostrovů má obzvláště důležitou roli při nastolování imprintingu (Wutz *et al.*, 1997; Caspary *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2005). Methylace CpG ostrovů dále reguluje expresi genů během vývoje a diferenciaci (Shen *et al.*, 2007b; Weber *et al.*, 2007; Fouse *et al.*, 2008; Meissner

et al., 2008). Nicméně přestože je methylace DNA zapojena do procesů specializace buněk, CpG ostrovy asociované s transkripčními počátky jen velmi zřídka vykazují tkáňově specifický methylační profil. Naopak oblasti v genomu označované jako břehy CpG ostrovů, které jsou od CpG ostrovů vzdáleny až 2 kb (viz **Obrázek 2**), jsou asociované s vysoce konzervovanými vzory methylace DNA. Dále bylo zjištěno, že stejně jako u CpG ostrovů methylace těchto břehů koreluje se sníženou genovou expresí (Rakyan *et al.*, 2004; Eckhardt *et al.*, 2006; Meissner *et al.*, 2008; Irizarry *et al.*, 2009; Illingworth *et al.*, 2010; Maunakea *et al.*, 2010).



Obrázek 1: Methylace CpG ostrovu v promotorové oblasti. A) Nepřítomnost methylace DNA vede k aktivaci transkripce příslušného genu. B) Přítomnost methylace v promotorové oblasti vede k umlčení transkripce souvisejícího genu (upraveno podle Tae *et al.*, 2014).



Obrázek 2 : CpG ostrov (CGI) s přilehlými CGI břehy (upraveno podle Van Dongen *et al.*, 2014)

3.1.2 Intergenové oblasti

Přibližně 45 % savčího genomu je tvořeno transponovatelnými a virálními elementy, přičemž většina těchto elementů je inaktivována methylací DNA nebo mutacemi, které vznikají jako důsledek deaminace 5mC na thymin (Walsh *et al.*, 1998). Exprese těchto elementů může představovat riziko pro stabilitu genomu. To je způsobeno tím, že replikace těchto elementů a jejich následná inserce může vést k narušení sekvence genu a vzniku mutace. Methylace DNA má tedy v tomto případě funkci represe genové exprese (Michaud *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1997; Kuster *et al.*, 1997; Gwynn *et al.*, 1998; Ukai *et al.*, 2003).

3.1.3 Tělo genu

V kontextu methylace DNA termín tělo genu označuje oblast genu od prvního exonu k dolnímu konci genu (downstream). První exon je studován separátně, jelikož jak methylace promotoru, tak i methylace první exonové sekvence vede k umlčení genové exprese (Brenet *et al.*, 2011). Naopak methylace těla genů je asociována s vyšší hladinou genové exprese v dělicích se buňkách (Hellman *et al.*, 2007; Ball *et al.*, 2009; Aran *et al.*, 2011). Nicméně zvýšená exprese genů nebyla detekována u pomalu se dělicích a nedělicích se buněk, jako je tomu například v případě nervových buněk (Aran *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2011a; b).

Role methylace těla genů není zcela jasná, nicméně ve studii pana Yanga a jeho kolegů z roku 2014 bylo ukázáno, že aplikace demethylační látky, decitabinu, na buňky HCT116 vedla nejen k reaktivaci genové exprese, ale taktéž ke snížení exprese aberantně exprimovaných genů. Zeslabení exprese byla způsobena demethylací DNA těl genů, přičemž k zpětnému zesílení transkripce byla vyžadována enzymatická aktivita DNA methyltransferázy 3 B (Yang *et al.*, 2014).

Studie pana Wang a jeho kolegů z roku 2016 ukázala, že methylace těla genu *ITPKA* (Inositol-Trisphosphate 3-Kinase A) vede k aberantnímu posílení jeho exprese, což má roli v procesu karcinogeneze. Tento jev byl zaznamenán v rakovinných buňkách prsou i plic, přičemž methylace těla genu *ITPKA* je potencionálním biomarkerem pro ranou detekci (Wang *et al.*, 2016).

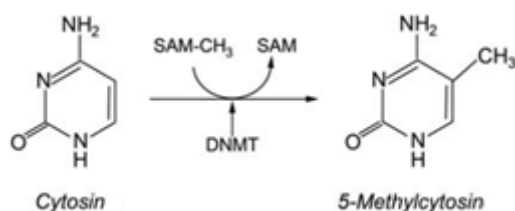
3.2 Methylace non-CpG míst

V lidských kmenových buňkách dochází k methylaci cytosinové báze taktéž mimo CpG sekvence (CpA, CpT, CpC). Bylo zjištěno, že k methylaci cytosinu v non-CpG místech dochází častěji v oblasti těla genu než v promotorové oblasti, kde methylace DNA má často funkci umlčovací (Laurent *et al.*, 2010; Lister *et al.*, 2009). Naopak methylace v non-CpG místech v oblasti těla genu pozitivně koreluje s genovou expresí. Methylace non-CpG míst je více zastoupena u genů kódujících proteiny, které jsou zapojeny do procesů metabolismu RNA. Další charakteristickou vlastností methylace non-CpG míst je to, že non-CpG místa nejsou methylována v kmenových buňkách, ale spíše k ní dochází u diferenciovaných buněk (Lister *et al.*, 2009).

Methylace cytosinů v non-CpG ostrovech promotorových oblastí může stejně jako methylace CpG ostrovů vést k umlčení genové exprese a může tak napomáhat při zakládání tkáňově specifických methylačních vzorů. Například methylace non-CpG promotorů genů *LAMB3* (Laminin Subunit Beta 3) a *RUNX3* (Runt Related Transcription Factor 3), vykazuje tkáňovou specifitu a vede k umlčení jejich exprese (non-CpG promotory podle kritérií ze studie Takai *et al.*, 2002). Navíc promotor genu *LAMB3* je aberantně methylován v rakovinných buňkách močového měchýře. Tento jev naznačuje, že aberantní methylace těchto promotorů má taktéž roli v procesu karcinogeneze (Han *et al.*, 2011).

3.3 Enzymy methylující DNA

Methylace DNA je katalyzována rodinou enzymů označované jako DNA methyltransferázy (DNMT), které zprostředkovávají přenos methylové skupiny z molekuly S-adenosylmethioninu (SAM) na pátý uhlík v cyklické struktuře cytosinu za vzniku 5mC (viz **Obrázek 3**). Přestože tyto proteiny mají velmi podobnou strukturu s velkou regulační doménou na N- konci a katalytickou doménou na C- konci, jednotlivé enzymy se liší svojí funkcí a vzorem exprese (Yen *et al.*, 1992; Xie *et al.*, 1999).



Obrázek 3: Konverze cytosinu na 5-methylcytosin pomocí aktivity enzymu DNA methyltransferázy (upraveno podle Gibney *et Nolan*, 2010)

DNMT1 (DNA (Cytosine-5)-Methyltransferase 1), je označována jako udržovací DNA methyltransferáza, která preferenčně katalyzuje metylaci hemimethylovaného vlákna DNA vznikajícího při replikaci (Pradhan *et al.*, 1999; Ramsahoye *et al.*, 2000). DNMT1 se váže na nově syntetizované vlákno a zprostředkovává přenos methylových skupin tak, aby vzniklý methylační vzor na novém vlákne odpovídal metylaci na vlákne rodičovském (Hermann *et al.*, 2004). DNMT1 je navíc schopna opravovat chyby v metylaci DNA (Mortusewicz *et al.*, 2005). DNMT1 je vysoce exprimována v savčích tkáních včetně mozku (Goto *et al.*, 1994).

DNMT3A (DNA (Cytosine-5)-Methyltransferase 3 A) a **DNMT3B** (DNA (Cytosine-5)-Methyltransferase B) jsou enzymy, které mají velmi podobnou strukturu a funkci, ale liší se od sebe různou genovou expresí. DNMT3A je exprimována relativně ubikvitně, naopak DNMT3B je slabě exprimována ve většině diferenciovaných tkání s výjimkou buněk štítné žlázy, varlat a kostní dřeně (Xie *et al.*, 1999). Jelikož mohou tyto enzymy metylovat i nemetylovaná vlákna DNA, jsou DNMT3A a DNMT3B označovány jako *de novo* DNA methyltransferázy (Okano *et al.*, 1999).

Posledním člen rodiny DNA methyltransferáz je enzym **DNMT3L** (DNA (Cytosine-5)-Methyltransferase 3 Like). Tento protein ve své struktuře postrádá katalytickou doménu (Aapola *et al.*, 2001; Hata *et al.*, 2002), nicméně DNMT3L se váže na DNMT3A a DNMT3B a stimuluje tak jejich methyltransferázovou aktivitu (Hata *et al.*, 2002; Suetake *et al.*, 2004; Jia *et al.*, 2007).

3.3.1 *De novo* methylace DNA

Enzymy DNMT3A a DNMT3B se na DNA vážou pomocí PWWP domény a katalyzují *de novo* methylaci (Ge *et al.*, 2004). Bylo zjištěno, že možnou roli v regulaci *de novo* methylace mají transkripční faktory (TF). Vazba těchto TF může sekvence DNA před methylačními procesy chránit (Straussman *et al.*, 2009; Gebhard *et al.*, 2010; Lienert *et al.*, 2011), nebo naopak podněcovat vazbu enzymů DNMT a tím methylaci DNA zprostředkovávat (Brenner *et al.*, 2005). CpG ostrovy jsou vazbou TF primárně před methylací DNA chráněny (Brandeis *et al.*, 1994; Macleod *et al.*, 1994; Straussman *et al.*, 2009; Gebhard *et al.*, 2010). V případě, že jsou vazebná místa pro TF mutována, nejsou CpG ostrovy schopny udržet svůj nemethylovaný stav (Brandeis *et al.*, 1994; Macleod *et al.*, 1994).

3.4 Demethylace DNA

Demethylace DNA může probíhat jak aktivně, tak i pasivně. K pasivní demethylaci DNA dochází v dělicích se buňkách, kdy k rodičovskému vláknu je syntetizováno vlákno nové. Methylační vzor je během replikace DNA udržován pomocí proteinu DNMT1, přičemž inhibice tohoto enzymu nebo jeho dysfunkce vede k tomu, že nově inkorporované cytosinové báze zůstávají nemethylované. Aktivní demethylace je proces několika chemických reakcí, deaminací/oxidací, které modifikují 5mC za vzniku produktu, který je následně odstraněn v procesu excizní opravy bází (BER; Base Excision Repair) a nahrazen novým cytosinem. Probíhá v dělicích se i nedělicích se buňkách a je katalyzován enzymy (Mayer *et al.*, 2000; Oswald *et al.*, 2000; Paroush *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 2007).

K modifikaci 5mC může docházet na dvou místech v jeho struktuře, na aminové skupině nebo skupině methylové. V prvním případě dochází k deaminaci aminu za vzniku karbonylové skupiny prostřednictvím komplexu AID/APOBEC (Activation Induced Deaminase/Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme Complex), což vede ke konverzi 5mC na thymin. Toto chybné párování bází indukuje aktivitu mechanismu BER (Bhutani *et al.*, 2010; Muramatsu *et al.*, 2000; Popp *et al.*, 2010).

Další mechanismus aktivní demethylace DNA je zprostředkován Ten Eleven Translocation (TET) enzymy. Tyto proteiny katalyzují přenos hydroxylové skupiny na methylovou skupinu 5mC za vzniku 5-hydroxymethylcytosinu (5hmC) (Tahiliani *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2010), který je stejně jako 5mC zapojen do procesů vývoje, diferenciaci či karcinogeneze (Pfeifer *et al.*, 2013). Takto vzniklý 5hmC může být zpět konvertován na cytosin prostřednictvím dvou různých mechanismů.

V prvním z nich dochází k opakované oxidaci 5hmC TET enzymy za vzniku 5-formylcytosinu (5fC) a poté 5-karboxylcytosinu (5caC) (Ito *et al.*, 2011). V druhém mechanismu je 5hmC deaminován pomocí komplexu AID/APOBEC na 5-hydroxymethyluracil (Guo *et al.*, 2011a). Ve všech případech aktivní demethylace DNA jsou vzniklá modifikovaná residua (thymin, 5hmC, 5fC, 5caC) odštěpena a nahrazena novou cytosinovou bází prostřednictvím reparačního systému BER (Cortellino *et al.*, 2011; He *et al.*, 2011).

3.5 Methyl-vazebné proteiny (MBP)

Jak již bylo zmíněno, methylace DNA samotná může způsobovat potlačení genové exprese, a to v důsledku narušení vazby TF na DNA. Nicméně jistá skupina proteinů s vysokou afinitou pro 5mC taktéž inhibuje vazbu těchto faktorů. Methylové skupiny na cytosinových bázích jsou rozeznávány třemi odlišnými methyl-vazebnými rodinami proteinů (MBP; Methyl-CpG-Binding Protein): **MBD proteiny** (Methyl-CpG-Binding Domain), **UHRF proteiny** (Ubiquitin-Like, Containing PHD and RING Finger Domain) a **ZFP proteiny** (Zinc Finger Protein).

MBD proteiny, **MBD1-4** (Methyl-CpG-Binding Domain Protein 1-4) a **MeCP2** (Methyl-CpG-Binding Protein 2), ve své struktuře obsahují methyl-CpG-vazebnou doménu, která jim umožňuje vázat se na CpG místa v DNA (Nan *et al.*, 1993; Meehan *et al.*, 1989; Lewis *et al.*, 1992; Hendrich *et al.*, 1998).

Protein MBD3 má ve své MBD doméně mutaci, která mu neumožňuje vytvořit vazbu na DNA (Hendrich *et al.*, 1998). Protein MBD4 se na DNA váže normálně, ale preferenčně rozeznává místa v genomu, kde je guaninová báze zaměněna za thymin, uracil nebo 5fC a asociuje s proteiny, které jsou zapojeny do mechanismů oprav chybného párování bází (Bellacosa *et al.*, 1999; Hendrich *et al.*, 1999; Petronzelli *et al.*, 2000; Millar *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2002). Ostatní členové MBD rodiny mají schopnost vázat se přímo na methylovanou DNA a obsahují ve své struktuře transkripční represorovou doménu, která umožňuje MBD proteinům asociovat s různými represorovými komplexy (Nan *et al.*, 1998; Ng *et al.*, 1999; Sarraf *et al.*, 2004).

UHRF proteiny **UHRF1** a **UHRF2** (Ubiquitin-Like, Containing PHD and RING Finger Domain 1 a 2) jsou multidoménné proteiny, které se na methylované báze cytosinu vážou pomocí SET a RING domény (Hashimoto *et al.*, 2008; Hashimoto *et al.*, 2009). Oproti ostatním proteinům vázajících se na methylované skupiny není primární funkce UHRF proteinů vázat se na DNA a potlačovat transkripci příslušných genů. Proteiny rodiny UHRF se během replikace DNA nejprve vážou na enzym DNMT1, čímž jej vedou k hemimethylované DNA za cílem udržet methylační vzor genomu (Sharif *et al.*, 2007; Bostick *et al.*, 2007; Achour *et al.*, 2008).

Poslední skupinu methyl-vazebných proteinů tvoří rodina ZFP proteinů, které se na methylovanou DNA vážou pomocí zinc finger domény a tím způsobují potlačení genové exprese (Prokhortchouk *et al.*, 2001; Yoon *et al.*, 2003; Filion *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 2008). Do této proteinové rodiny patří proteiny **Kaiso**, **ZBTB4** a **ZBTB38** (Zinc Finger And BTB Domain Containing 4 a 38) (Prokhortchouk *et al.*, 2001; Filion *et al.*, 2006). Protein Kaiso se váže na sekvence, obsahující vedle sebe ležící dvě methylovaná CpG místa (Daniel *et al.*, 2002). V případě proteinů ZBTB4 a ZBTB38 dochází k rozeznání jednoho methylovaného CpG dinukleotidu, přesto se oba proteiny preferenčně vážou na sekvence s motivem, ve kterém chybí 5mC (Daniel *et al.*, 2002; Sasai *et al.*, 2010).

3.6 Interakce mezi methylací DNA and dalšími epigenetickými mechanismy

DNA v eukaryotických buňkách je udržována ve stavu, který označujeme jako chromatin, což je komplex DNA, RNA a proteinů. Primární funkcí chromatinu je regulovat kompaktnost DNA, chránit DNA před poškozením a kontrolovat expresi genů a replikaci DNA. Základními komponentami tvořící chromatin jsou histonové proteiny. Histony tvoří proteinové oktamery, které se skládají vždy ze dvou kopií čtyř základních proteinů – histony H2A, H2B, H3 a H4. Každý oktamer obsahuje sekvenci DNA o velikosti 147 bp, přičemž dohromady tento komplex tvoří nukleozom (Vyskot, 2010).

K modifikacím histonů dochází na jejich N- konci a ovlivňují tak stav DNA. Mezi tyto modifikace patří acetylace, methylace, fosforylace, ubikvitinylace, sumoylace, deaminace a izomerace prolinu. Postranslační modifikace histonových proteinů pozměňují strukturu nukleozomu a ovlivňují tak transkripci asociovaných genů, kdy za inaktivní je považován chromatin v kompaktním stavu (heterochromatin) a naopak aktivní chromatin má strukturu rozvolněnou (euchromatin) (Vyskot, 2010).

DNMT se mohou vázat na enzymy, které jsou zodpovědné za modifikace histonových proteinů za cílem navození represivního stavu genů v dané oblasti DNA. Příkladem je vazba DNMT1 a DNMT3B na histonovou methyltransferázu SUV39H1 (Suppressor Of Variegation 3-9 Homolog 1), která způsobuje methylaci lysinu 9 na histonu H3 (H3K9me) a následné potlačení genové exprese (Fuks, 2003). Dále se mohou tyto proteiny vázat na histonové deacetylázy, které katalyzují odstranění acetylových skupin z histonů, což vede k těsnějšímu sbalení DNA a potlačení transkripce (Fuks *et al.*, 2000; Geiman *et al.*, 2004).

Modifikace histonů ale taktéž mohou ovlivnit methylační vzor DNA. Enzym DNMT3B se váže na histon H3 a podněcuje tak DNMT3A a DNMT3B k methylaci DNA dané oblasti (Ooi *et al.*, 2007). Nicméně přítomnost trimethylace lysinu 4 na histonu H3 (H3K4me³) zabraňuje vazbě DNMT3A, DNMT3B a DNMT3L na histon H3, a tak zamezuje methylaci (Ooi *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010), přičemž bylo zjištěno, že oblast DNA s CpG ostrovy obsahuje vysokou hladinu H3K4me³ (Mikkelsen *et al.*, 2007). Naopak zvýšená hladina acetylace histonů může způsobit demethylaci DNA (Cervoni *et Szyf*, 2001; D'Alessio *et al.*, 2007).

Nesilnějším spojením mezi methylací DNA a modifikacemi histonů ale tvoří methyl-vazebné proteiny. MBD a UHRF proteiny interagují s methylovanou DNA a histony za účelem potlačení genové exprese (Nan *et al.*, 1998; Ng *et al.*, 1999; Sarraf *et Stancheva*, 2004; Citterio *et al.*, 2004; Karagianni *et al.*, 2008). Například protein MeCP2 podněcuje histonové deacetylázy k odstranění acetylových skupin a potlačení transkripce genů (Jones *et al.*, 1998; Nan *et al.*, 1998; Fuks, 2003). Navíc MeCP2 posiluje represivní stav chromatinu prostřednictvím působení na histonové methyltransferázy, které katalyzují methylaci lysinu 9 na histonu H3 (H3K9me) (Fuks, 2003).

3.7 Mechanismus vzniku aberantní methylace DNA

Společnou charakteristikou rakovinných buněk je změna v normálním methylačním vzoru, tedy vysoká hladina methylace v promotorových oblastech (hypermethylace) a globální pokles methylace DNA v celém genomu (hypomethylace) (Esteller *et al.*, 2001). Přesné vysvětlení pro aberantní změny v methylačním profilu rakovinných buněk není úplně jasné, nicméně existují aspekty, které mohou ovlivnit normální funkci regulace genové exprese prostřednictvím methylace DNA.

Mezi nejběžnější vysvětlení pro vznik aberace v regulaci methylačního profilu je zvýšená exprese DNMT, což má za následek hypermethylaci DNA. Tento jev byl pozorován v mnoha typech rakovin, jako je například leukémie (Melki *et al.*, 1998) nebo rakovina plic (Belinsky *et al.*, 1996). Dále bylo zjištěno, že ztráta exprese genu *TET1* (Ten Eleven Translocation 1) kódující enzym zodpovědný za demethylační mechanismy, by mohla mít taktéž roli při zvýšení hladiny methylace cytosinových bází v buňkách rakoviny kolorekta (CRC; colorectal carcinoma) (Kai *et al.*, 2016).

Dalším vysvětlením pro vznik aberantní methylace DNA jsou rozdíly v DNA sekvenci CpG ostrovů. Jisté sekvenční vzory mohou způsobit citlivost těchto míst k methylaci DNA nebo naopak mohou CpG ostrovy v promotorových oblastech před methylací chránit (Feltus *et al.*, 2003). Navíc bylo zjištěno, že mezi CpG ostrovy může docházet k šíření methylace DNA (Tollefsbol *et Hutchinson*, 1997).

Vliv na aberantní methylaci DNA má taktéž výživa. Bylo zjištěno, že určité složky potravy, například zvýšený příjem folátu, mohou ovlivnit množství dostupných methylových skupin, které jsou pro methylaci DNA potřebné (Wu *et Santi*, 1985). Naopak nedostatek selenu v potravě krys může způsobit hypomethylaci DNA v buňkách tlustého střeva, zatímco dlouhodobé vystavení krys kadmii iniciuje hypomethylaci DNA, která je následně doprovázená hypermethylací. Tento jev je způsoben schopností kadmia inhibovat DNMT (při krátkodobém vystavení), což vede k hypomethylaci DNA, přičemž dlouhodobá aplikace vede k posílení aktivity DNMT a zvýšení hladiny methylace DNA (Takiguchi *et al.*, 2003). V další studii pozorovali vliv alkoholismu na methylaci DNA, přičemž byla detekována zvýšená hladina methylace a snížená exprese DNMT3B (Bönsch *et al.*, 2006).

4 Epigenetické změny v rakovinných buňkách kolorekta (CRC)

Rakovina kolorekta (CRC; Colorectal Carcinoma) je druhou nejčastější příčinou úmrtí v západním světě (Ferlay *et al.*, 2013; Siegel *et al.*, 2014), která každý den postihuje více než jeden milion lidí. CRC je vysoce heterogenní onemocnění, ve kterém jsou různé podskupiny charakterizovány odlišnými genetickými, cytogenetickými a epigenetickými změnami v epiteliálních buňkách sliznice tlustého střeva (Migliore *et al.*, 2011), přičemž primárně jsou těmito změnami zasaženy onkogeny, tumor supresorové geny a geny zapojené do opravy DNA (Harrison *et Benziger*, 2011). Tyto změny jsou příčinou přechodu normálních epiteliálních buněk v buňky rakovinné (Jass *et al.*, 1989).

V případě rakoviny kolorekta je hlavním znakem tohoto onemocnění genomická nestabilita. Nicméně v rámci rozsáhlé skupiny typů onemocnění, které se hromadně označují jako CRC, rozlišujeme tři hlavní molekulární podtypy: **(1) mikrosatelitová nestabilita** (MSI; Microsatellite Instability), **(2) chromozomální nestabilita** (CIN; Chromosomal Instability) a **(3) methylátorový fenotyp** (CIMP; CpG Island Methylator Phenotype). Přítomnost těchto tří jevů v CRC se navzájem nevylučuje, přičemž rakovinné buňky mohou vykazovat znaky několika drah vedoucích ke vzniku CRC (Muleris *et al.*, 2008; Pino *et Chung*, 2010).

Z epigenetického hlediska může být CRC rozdělen na dvě skupiny: **(1)** skupina nádorů s CIMP fenotypem (CIMP+) vykazující hypermethylaci DNA a **(2)** skupina nádorů bez CIMP fenotypu (CIMP-), u kterých není detekováno zvýšené množství methylovaných CpG dinukleotidů (Toyota *et al.*, 1999). Podle tohoto přístupu lze navíc CRC rozdělit na tři podskupiny (Shen *et al.*, 2007c).

První skupinou jsou **CIMP1** nádory, které často vykazují MSI (80 %) a mutace v genu *BRAF* ((B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase) (53 %). MSI je ve většině případů výsledkem inaktivace genů pro opravu DNA, přičemž k této inaktivaci může docházet mutacemi (20 % MSI CRC) nebo hypermethylací genů *MLH1* (MutL Homolog 1), *MSH2*, *MSH6* (MutS Homolog 2 a 6), *PMS2* (PMS1 Homolog 2) (80 % MSI CRC) (Shen *et al.*, 2007c; Popat *et al.*, 2005; Ward *et al.*, 2001).

Druhou skupinou jsou nádory **CIMP2**, u kterých je detekována mutace v genu *KRAS* (KRAS Proto-Oncogene, GTPase) (92 %), ale jen ojediněle vykazují MSI a mutace v genech *BRAF* nebo *TP53* (Tumor Protein p53) (Shen *et al.*, 2007c).

Třetí skupinu tvoří nádory **CIMP-**, u kterých se s vysokou frekvencí objevují mutace genu *TP53* (71 %) (Shen *et al.*, 2007c).

4.1 Role methylace DNA v karcinogenezi CRC

V roce 1983 byla detekována přítomnost globální hypomethylace DNA a nedostatek celkového množství 5mC v tkáních CRC. Tento jev byl převážně pozorován u CpG dinukleotidů přítomných v repetitivních sekvencích, přičemž k depleci methylace dochází postupně s přibývajícím věkem a brzy v procesu karcinogeneze (Feinberg *et al.*, 1983a).

Zatímco hypermethylace DNA způsobuje potlačení exprese tumor supresorových genů, globální hypomethylace DNA ovlivňuje vznik CRC prostřednictvím indukce MSI a ztráty imprintingu (Chen *et al.*, 1998; Holm *et al.*, 2005; Graudet *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2006), což může způsobit zvýšenou expresi imprintovaných genů a tím zvýšit náchylnost jedince ke vzniku rakoviny (Sakatani *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2002).

K celogenomové hypomethylaci DNA v rakovinných buňkách obecně dochází v oblastech genomu obohacující repetitivní transponovatelné elementy, jako jsou například dlouhý rozptýlený jaderný element LINE1 (Long Interspersed Nuclear Element 1) nebo krátké rozptýlené nukleotidové elementy (SINE; Short Interspersed Nuclear Element), k tomuto jevu taktéž dochází v buňkách CRC (Lander *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2008; Pattamadilok *et al.*, 2008; Goel *et al.*, 2010; Ogino *et al.*, 2008a).

Hypomethylace LINE1 inverzně koreluje se statusem MSI a fenotypem CIMP (Ogino *et al.*, 2008a; Estécio *et al.*, 2007). Navíc je prokázáno, že zvýšená hypomethylace LINE1 koreluje s horším přežitím pacientů (Ogino *et al.*, 2008b; Antelo *et al.*, 2012; Ahn *et al.*, 2011; Rhee *et al.*, 2012). Jednou hypotézou vysvětlující vliv tohoto jevu na průběh karcinogeneze je, že hypomethylace elementů LINE či SINE indukuje neúmyslnou aktivaci potencionálních protoonkogenů (Wolff *et al.*, 2010).

Globální hypomethylace DNA bývá doprovázena hypermethylací a transkripčním umlčením několika tumor supresorových genů nebo genů zapojených do oprav DNA (Feinberg *et al.*, 1983b). Předpokládá se, že v genomu CRC jsou průměrně aberantně methylované stovky genů (Lao *et al.*, 2011). Ve studii pana Weisenbergera a jeho kolegů z roku 2006 bylo identifikováno pět genů, jejichž stav methylace umožňuje určit fenotyp CIMP v buňkách CRC. Mezi tyto geny patří **CACNA1G** (Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 G), **IGF2** (Insulin Like Growth Factor 2), **NEUROG1** (Neurogenin 1), **RUNX3** a **SOCS1** (Suppressor Of Cytokine Signaling) (Weisenberger *et al.*, 2006).

Analýzou methylace DNA byly identifikovány geny, které jsou častěji methylované ve vícekrokovém procesu karcinogeneze CRC. V průběhu přechodu normální buňky epitelu tlustého střeva v nádorový prekursor – aberantní kryptový focus (ACF; Aberrant Crypt Foci) nebo polyp jsou například přítomny hypermethylované geny **ITGA4** (Integrin Subunit Alpha 4) **SLC5A8** (Solute Carrier Family 5 Member 8), **SFRP2** (Secreted Frizzled Related Protein 2), lokus **MINT1** (Methylated In Tumor 1) a **MGMT** (O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase) (Rashid *et al.*, 2001; Chan *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003; Qi *et al.*, 2006; Ausch *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009; Esteller *et al.*, 2000).

Geny *TIMP3* (TIMP Metallopeptidase Inhibitor 3), *CXCL12* (C-X-C Motif Chemokine Ligand 12) a *ID4* (Inhibitor Of DNA Binding 4) jsou často modifikovány v pozdním stádiu CRC a je pravděpodobné, že mají důležitou roli v progresi CRC a metastázi (Kim *et al.*, 2009; Wendt *et al.*, 2006; Umetami *et al.*, 2004).

4.2 Role modifikací histonů v karcinogenezi CRC

Postranslační modifikace histonů ovlivňují strukturu chromatinu. Acetylace histonů je typicky asociována s transkripční aktivací genů. V případě methylace záleží na počtu methylových skupin, které jsou přenášeny, a na druhu aminokyseliny, kde k modifikaci dochází. Di- a trimethylace lysinu 4 na histonu H3 (H3K4me², H3K4me³) a monomethylace lysinu 9 na histonu H3 (H3K9me¹) jsou asociovány s aktivací genové exprese. Naopak di- a trimethylace lysinu 27 na histonu H3 (H3K27me², H3K27me³) a di- a trimethylace lysinu 9 na histonu H3 (H3K9me², H3K9me³) jsou spojovány s inaktivním stavem chromatinu a potlačením genové exprese (Schneider *et Grosschedl*, 2007).

Prvně byla globální změna modifikace histonů v buňkách CRC detekována v roce 2005 (Fraga *et al.*, 2005). V této studii byla detekována globální ztráta acetylace lysinu 16 na histonu H4 (H4K16ac) a trimethylace lysinu 20 na histonu H4 (H4K20me³) v rakovinných buňkách a počátečních stádiích karcinogeneze. V dalších studiích bylo zaznamenáno globální zvýšení acetylace lysinu 12 na histonu H4 (H4K12ac) a lysinu 18 na histonu H3 (H3K18ac) v buňkách adenokarcinomů v porovnání s buňkami normální tkáně či adenomu (Ashktorab *et al.*, 2009; Nakazawa *et al.*, 2012). Navíc byla zjištěna zvýšená exprese histonových deacetyláz v lidských buňkách CRC (Stypula-Cyrus *et al.*, 2013). Zvýšenou expresi v buňkách CRC naopak vykazovaly proteiny KDM4/JMJD2, které katalyzují demethylaci lysinů 9 a 36 na histonu H3 (H3K9 a H3K36) (Fu *et al.*, 2012).

4.3 Role miRNA v karcinogenezi CRC

Centrální dogma molekulární biologie, které popisuje cestu přenosu informace mezi biopolymery, tvoří základní pilíř pro moderní molekulární biologii (Crick *et al.*, 1961). Geny kódující proteiny tvoří pouze 2 % genomu a přibližně 80 % celogenomové sekvence je aktivně transkribováno do podoby nekódující RNA (ncRNA; non-coding RNA) (ENCODE Project Consortium, 2012). Malou podskupinu ncRNA tvoří malé nekódující RNA (miRNA; microRNA), které mají důležitou roli v mnoha biologických procesech, mezi které se řadí i regulace exprese onkogenů a tumor supresorových genů v rakovinných buňkách (Costa, 2005).

V průběhu posledního desetiletí byla prokázána role miRNA v procesu karcinogeneze. miRNA jsou malé endogenní jednořetězcové molekuly RNA dlouhé 18-25 nukleotidů. Tyto molekuly RNA byly prvně objeveny v roce 1993 jako negativní postranskripční regulátory v *Caenorhabditis elegans* (Lee *et al.*, 1993; Wightman *et al.*, 1993).

Během jejich biogeneze jsou pre-miRNA exportovány z jádra do cytoplasmy, kde jsou upraveny za vzniku miRNA. Umlčovací komplex RISC (RNA Induced Silencing Complex) katalyzuje vazbu miRNA na 3' nepřekládané oblasti cílové mRNA, což může vést k degradaci této mRNA nebo inhibici její translace do proteinu (He *et Hannon*, 2004; Mendell, 2005; Vasudevan *et al.*, 2007).

V rámci progresu normální buňky kolorekta v buňku rakovinnou byly identifikovány deregulované miRNA, které pravděpodobně mají roli ve vzniku CRC. Například miR-17-92a, miR-135b, miR-143 a miR-145 regulují WNT/ β -katenin signální dráhu a jejich deregulace je zapojena do iniciace CRC (Motoyama *et al.*, 2009; Nagel *et al.*, 2008; Arndt *et al.*, 2009; Oberg *et al.*, 2011).

Geny asociované se signálními dráhami RAS-MAPK a PI3K/AKT, které podporují přechod raného stádia adenomu v pozdní stádium, jsou taktéž regulovány specifickými miRNA. Geny kaskády RAS-MAPK jsou regulovány miR-143, let-7, miR-21 a miR-31, regulace genů asociovaných s kaskádou PI3K/AKT je zprostředkována prostřednictvím miR-1, miR-21 a miR-143 (Pagliuca *et al.*, 2013; Johnson *et al.*, 2005; Meng *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2014; Xiong *et al.*, 2013; Josse *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2013a).

P53 (Tumor Protein p53) je tumor supresorový protein, jehož inaktivace je velmi častá během procesu přechodu pokročilého adenomu v adenokarcinom, je regulován miR-34a/b/c, miR-133a, miR-143 a miR-145. (Pagliuca *et al.*, 2013, Vogt *et al.*, 2011; Tazawa *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2013). Naproti tomu gen *LIN28* (Lin-28 Homolog A) řídí progresi CRC prostřednictvím inhibice biogeneze let-7 miRNA (King *et al.*, 2011; Arroyo *et al.*, 2011).

5 Biomarkery v CRC

Termín „biomarker“ neboli „biologický marker“ byl definován v roce 1998 jako charakteristika, která je objektivně měřitelná a která je evaluovaná jako indikátor normálních biologických nebo patologických procesů, nebo jako indikátor farmakologické odpovědi vůči léčbě terapeutickou látkou (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). Nicméně definice biomarkerů je dynamická a je neustále upravována v závislosti na rozšiřujících vědomostích o karcinogenezi (Okugawa *et al.*, 2015).

Na základě nynějších klinických kritérií mohou být biomarkery CRC popsány jako substance, které **a)** jsou snadně a levně měřitelné za účelem identifikace rakoviny pacienta; **b)** umožňují určení prognózy pacienta nezávisle na konvenční klasifikaci (např. TNM klasifikace) za cílem zlepšení výsledku léčby; **c)** predikují odpověď pacienta na specifickou léčbu, čímž zlepšují jejich prognózu a kvalitu života (Okugawa *et al.*, 2015).

Téměř všechny formy CRC vznikají jako benigní nádor a přechází v adenokarcinom v průběhu několika postupných kroků, které jsou charakterizovány histologickými změnami, jako jsou ACF a benigní tubulární adenom. Ty se mohou rozvíjet do podoby pokročilého adenomu s vysokým rizikem maligní progresse a dále mohou přejít do podoby invazivního adenokarcinomu (Kinzler *et Vogelstein*, 1996).

I přes velké pokroky v oblasti léčby je detekce v raném stádiu a odstranění prekancerózních lézí zatím nejefektivnější strategie pro redukci úmrtnosti asociované s CRC. Nicméně nynější vyšetřovací metody jsou limitované svou invazivností, vysokými náklady a častým nesouhlasem pacientů s provedením samotného zákroku. Všechny tyto okolnosti mohou být příčinou pozdní detekce CRC, přičemž to je pak často spojeno s nepříznivou prognózou pacientů. Nejrozšířeněji používané skriningové testy, testy okultního krvácení do stolice (TOKS; Fecal Occult Blood Test) a imunochemické testy okultního krvácení do stolice (iTOKS; Fecal Immunochemical Test), má neoptimální diagnostickou přesnost. To je jedním z důvodů, proč je potřeba identifikovat nové biomarkery za cílem tvorby robustnějšího a spolehlivého neinvazivního testu pro detekci raného stádia CRC (Okugawa *et al.*, 2015).

5.1 Diagnostické markery

Rakovinu tlustého střeva je možno vyléčit relativně snadným chirurgickým zákrokem v případě, že je CRC u pacienta diagnostikována brzy, tedy dříve než dojde ke vzniku metastáze. V mnoha studiích bylo zjištěno, že během raných stádií karcinogeneze CRC epigenetické změny předčí frekvenci genetických mutací. Tento jev naznačuje, že epigenetické změny by mohly být diagnostickým biomarkerem nové generace pro detekci polypů tlustého střeva a CRC (Okugawa *et al.*, 2015).

5.1.1 Detekce methylované DNA z plasmy

V nynější době je nejvíce prokazatelný diagnostický biomarker v krvi methylovaný gen kodující **Septin 9** (SEPT9), který patří do rodiny GTP-vazebných proteinů a proteinů tvořících filamenta zapojených do tvorby cytoskeletu (Leipe *et al.*, 2002; Sheffield *et al.*, 2003).

Prvně byla popsána možnost použití genu *SEPT9* pro detekci CRC ve studii pana Grützmanna a jeho kolegů, přičemž methylovaný gen *SEPT9* v plasmě pacientů s CRC byl detekován se senzitivitou 72 % a specifitou 90 % (Grützmann *et al.*, 2008). Ve studii pana Lofton-Day a jeho kolegů byla stanovena citlivost 69 % a specifita 86 % při rozlišení mezi CRC pacienty a zdravými kontrolami (Lofton-Day *et al.*, 2008). V dnešní době je methylovaný SEPT9 součástí komerčně dostupných testů pro detekci CRC, jako jsou Epi proColon[®] 2.0 (Epigenomics AG Corporation), ColoVantage[®] (Quest Diagnostics) a RealTime mS9 (Abbot Laboratories).

Druhá generace testu Epi proColon 2.0 byla nedávno hodnocena ve studii 135 pacientů trpících CRC a 91 zdravých kontrol, přičemž byla dosažena senzitivita 66,6 % u vzorků raného stádia CRC se specifitou 87,4 % (Jin *et al.*, 2015). V roce 2016 byla Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA; Food and Drug Administration) schválen test Epi proColon pro skrining CRC. Nicméně pro zlepšení senzitivity a specifity pro detekci CRC se mnoho vědců snaží najít vhodnou kombinaci methylace genu *SEPT9* s dalšími hypermethylovanými oblastmi. Například pan Kostin a jeho kolegové představili panel genů *HLTF* (Helicase Like Transcription Factor), *ALX4* (ALX Homeobox 4) a *SEPT9*, který zvýšil senzitivu detekce CRC na 74-88% a specifitu 90-96 % (Kostin *et al.*, 2010).

5.1.2 Detekce methylované DNA ze stolice

Existují dva skriningové testy pro detekci CRC ze vzorku DNA ve stolici, které jsou nyní dostupné a byly schváleny FDA – ColoSure[™] (LabCorp) a Cologuard[™].

ColoSure[™] je test pro detekci methylovaného genu kódující protein **Vimentin** (VIM) (Ned *et al.*, 2011). CpG ostrov genu *VIM*, který je lokalizován směrem k 5' konci pozitivního řetězce (upstream) od 1. exonu a je u CRC pacientů hustě methylován, je z významné míry asociován s trendem ke vzniku metastáze jater a rozšíření karcinomu do oblasti perinea (Shirahata *et al.*, 2009). Aberantně methylovaný *VIM* lze detekovat ve fekální DNA CRC pacientů (Chen *et al.*, 2005; Wallner *et al.*, 2006), přičemž k methylaci genu *VIM* dochází specificky v tkáních CRC a je detekována se senzitivitou 46 % a specifitou 90 % (Chen *et al.*, 2005).

Cologuard[™] je taktéž diagnostický test pro detekci CRC z DNA přítomné ve stolici. Tento test zahrnuje kvantitativní methylační assay pro detekci mutaci genu **KRAS**, aberantní methylaci genů **NDRG4** (NDRG Family Member 4) a **BMP3** (Bone Morphogenetic Protein 3) a imunoassay pro **β-aktin** a **hemoglobin**. Při porovnání s metodou iTOKS, Cologuard[™] test vykazoval senzitivitu pro detekci CRC 92,3 % (iTOKS 73,8 %) a specifitu 92,3 % (iTOKS 73,8 %) (Imperiale *et al.*, 2014).

V nynější době jsou identifikovány další geny, které jsou potencionálními biomarkery pro diagnostiku CRC, mezi ně patří například *ALX4* (Ebert *et al.*, 2006), *CDK2A* (Cyclin-Dependent Kinase 2) (Petko *et al.*, 2005), *HLTF* (Leung *et al.*, 2005), *hMLH1* (Human MutL Homolog) (Leung *et al.*, 2005), *NEUROGI* (Herbst *et al.*, 2011), *NGFR* (Nerve Growth Factor Receptor), *SFRP2*, *VIM* (Li *et al.*, 2009), *APC* (WNT Signaling Pathway Regulator), *MGMT* a *WIF1* (WNT Inhibitory Factor 1) (Lee *et al.*, 2009). Nicméně je taktéž možné, že k efektivní diagnostice CRC je nutné validovat robustní panel methylovaných genů, které budou společně sloužit jako biomarker (Okugawa *et al.*, 2015).

5.2 Prognostické markery

Ze všech studovaných biomarkerů je status CIMP nejslibnějším indikátorem pro prognózu pacientů s CRC. Rijnsoever a jeho kolegové ukázali, že pacienti s CRC ve III. stádiu vykazující CIMP+ mají horší přežití (Van Rijnsoever *et al.*, 2003). Dále bylo zjištěno, že status CIMP+ koreluje s horší prognózou i u pacientů s CRC vykazující mikrosatelitovou stabilitu (Lee *et al.*, 2008).

Kamimae *et al.* (2011) ukázal, že analýza methylace DNA ze střešní tekutiny odebrané z pacientů, u kterých je prováděna kolonoskopie, by mohla být dobrým nástrojem pro predikci invazivnosti nádorů kolorekta, přičemž ukázal, že methylace miR-34b/c nejvíce korelovala s invazivností CRC.

Yi a jeho kolegové (Yi *et al.*, 2011) zjistil, že pacienti s CRC nádorem, u kterých bylo detekováno umlčení exprese genů signální dráhy pro přestavby extracelulární matrix v důsledku methylace, *EVL* (Enah/Vasp-Like), *CD109* (CD109 Molecule) a *FLNC* (Filamin C), mají horší míru přežití. Tato skutečnost naznačuje, že methylace genů zapojených do této signální dráhy by mohla sloužit jako nástroj v prognóze CRC. Navíc bylo zjištěno, že hypomethylace diferenciólně methylované oblasti genu *IGF2* v CRC nádorech, je asociována s horší prognózou (Baba *et al.*, 2010).

5.3 Markery související s odpovědí na léčivo

I přes nedávné pokroky ve vývoji protinádorových léčiv je nynější generace chemoterapeutických látek suboptimální. To je způsobeno jejich nízkou účinností a rezistencí pacientů vůči těmto látkám. V důsledku těchto omezení je vyvíjen tlak na vývoj prediktivních biomarkerů, které mohou být použity k identifikaci pacientů s vysokou či nízkou pravděpodobností odpovědi na specifickou léčbu za cílem maximálně zvýšit celkový účinek léčby s použitými látkami (Okugawa *et al.*, 2015).

Epigenetické umlčení jistých genů může vést ke vzniku chemorezistence nebo chemosenzitivity vůči určitým terapeutickým látkám. Přestože o těchto interakcích je známo velmi málo, některé studie se snaží vliv epigenetických regulačních mechanismů popsat. Příkladem je práce pana Crea a jeho kolegů, ve které byl studován vliv aberantní methylace určitých genů na vznik chemosenzitivity nebo chemorezistence vůči 5-fluorouracilu (5-FU) a irinotecanu, což jsou léky používané při léčbě CRC (Crea *et al.*, 2011).

Protinádorová aktivita 5-FU je primárně zprostředkována inhibicí thymidylát syntázy (TYMS) v *de novo* syntéze pyrimidinů. Zvýšená exprese *TYMS* je jedním z hlavních mechanismů chemorezistence vůči 5-FU, přičemž za epigenetickou regulaci exprese genu *TYMS* v CRC patrně mají odpovědnost spíše procesy deacetylace a acetylace histonů (Crea *et al.*, 2011).

Irinotecan je inhibitor topoisomerázy I. UDP-glukoronyl transferáza (UGT)-1A1 je hlavním enzymem zapojeným do detoxikace irinotecanu, přičemž farmakogenomika irinotecanu je primárně založena na genetickém profilu genu *UGT1A1* (UDP Glucuronosyltransferase Family 1 Member A Complex Locus) (Biason *et al.*, 2008), navíc k umlčení exprese tohoto genu dochází v důsledku aberantní methylace promotorové oblasti. Tento jev naznačuje, že epigenetické modifikace tohoto genu by mohly mít určitou roli ve vzniku chemosenzitivity vůči irinotecanu v CRC (Crea *et al.*, 2011).

Existují i jisté důkazy, podle kterých je snížená exprese genu *SPARC* (Secreted Protein Acidic And Rich In Cysteine) asociována se sníženou citlivostí vůči 5-FU a irinotecanu, přičemž methylovaný *SPARC* byl často detekován ve vzorcích tkáně CRC (Cheetham *et al.*, 2008). Dalším příkladem je hypermethylace promotorové oblasti genu *hMLH1* způsobující resistenci rakovinných buněk kolorekta vůči 5-FU (Arnold *et al.*, 2003).

Bevacizumab (Avastin) je první antiangiogenní terapeutická látka, která dokázala potlačit růst metastáz u pacientů s rakovinným onemocněním. Je to monoklonální protilátka vůči vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru A (VEGFA; Vascular Endothelial Growth Factor A), který je klíčovým induktorem tvorby krevních cév (angiogeneze) v nádorech (Carmeliet *et al.*, 2011). Bevacizumab je v klinické praxi používán i pro léčbu pacientů s metastatickým typem CRC. Nicméně přestože je tato látka pro léčbu CRC často používána, někteří pacienti vůči této léčbě neodpovídají nebo u nich postupně vzniká rezistence. Z tohoto důvodu se mnoho laboratoří po celém světě zabývá identifikací biomarkeru, který by umožňoval predikovat efektivnost léčby u jednotlivých pacientů.

Příkladem je recentní celogenomová studie, ve které byla identifikována methylační značka u 9 genů – *WNT2B* (Wnt Family Member 2B), *MLH1*, *POLK* (DNA Polymerase Kappa), *NOX4* (NADPH Oxidase 4), *PKNOX2* (PBX/Knotted 1 Homeobox 2), *TMBIM6* (Transmembrane BAX Inhibitor Motif Containing 6), *SNRPN* (Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N), *UNC119* (Unc-119 Lipid Binding Chaperone), *GNAS* (G Protein Subunit Alpha S), které dohromady predikují odpověď pacientů s metastatickou formou rakoviny prsu na léčbu bevacizumabem (Gampenrieder *et al.*, 2018).

V DNA laboratoři na Ústavu molekulární a translační medicíny (ÚMTM) se taky zaměřujeme na studium methylačních biomarkeru odpovědi na bevacizumab pomocí skrínigových genomických technik, což je téma této diplomové práce.

6 Metody studia methylace DNA

Methylace DNA je zapojena do vývojových procesů, inaktivace X-chromozomu, diferenciaci buněk, tkáňově specifické exprese genů, imprintingu a biologických pochodů vedoucích ke vzniku rakoviny a dalších nemocí (Vyskot, 2010).

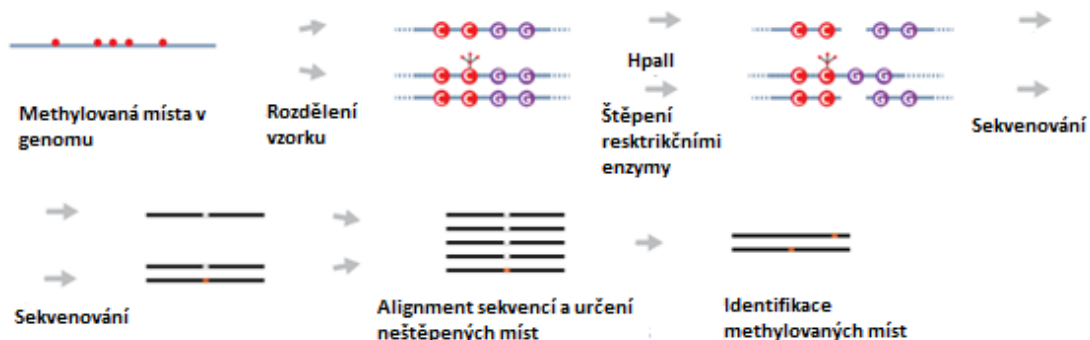
Vliv těchto modifikací na regulaci exprese genů závisí na místě v genomu, kde k nim dochází. Proto je velmi důležité správně určit jejich přesnou polohu (Illumina, 2017c). První studie methylace DNA se zaměřovaly na stanovení methylačního stavu u důležitých genů a kvantifikaci celkového množství DNA (Lisanti *et al.*, 2013). Vyvinutím technologie hybridizace DNA na čípech byla analýza methylace posunuta na úroveň celého genomu. Sekvenování nové generace nyní umožňuje konstrukci genomických map methylace DNA s rozlišením jedné báze (Laird, 2010). Metody studia methylomu jsou rozděleny do tří skupin dle přístupu analýzy: (1) enzymatické štěpení, (2) afinitní obohacení a (3) bisulfitová konverze (Yong *et al.*, 2016).

6.1 Metody založené na štěpení restriktivními enzymy

Metody založené na štěpení restriktivními enzymy vychází z různých štěpících vlastností izoschizomerů a neoschizomerů. Pár izoschizomerů rozeznává stejnou sekvenci a sdílí stejné štěpící místo, ale vykazuje různou citlivost vůči stavu methylace DNA. Methylačně senzitivní restriktivní enzymy (MSRE; Methylation Sensitive Restriction Enzyme) štěpí pouze v místech, kde DNA není methylována a ponechávají modifikovaná místa DNA neštěpena. Enzymatické štěpení DNA pomocí MSRE proteinů ve spojení se sekvenačními technologiemi je využíváno k predikci hladiny methylace DNA v celém genomu (Maunakea *et al.*, 2010; Yong *et al.*, 2016).

6.1.1 MSRE sekvenování (MSRE-Seq)

MSRE sekvenování (MSRE-Seq; Methylation Sensitive Restriction Enzyme Sequencing) je metoda pro studium methylomu, která využívá MSRE enzymy k obohacení nemethylované DNA (Maunakea *et al.*, 2010; Brunner *et al.*, 2009). Prvním krokem v protokolu metody MSRE-Seq je oddělená digesce genomické DNA (gDNA) různými enzymy MSRE štěpící nemethylovaná místa v gDNA. Fragmenty pro přípravu knihovny jsou selektovány podle velikosti a osekvenovány. V dalším kroku je pro získané sekvence proveden alignment k referenčnímu genomu a jejich porovnáním jsou identifikována místa, kde ke štěpení nedošlo (viz **Obrázek 4**). Tímto způsobem je možno mapovat polohu nemethylovaných CpG míst uvnitř rekogničních míst použitého enzymu (Li *et al.*, 2015), přičemž sekvenování s vysokým pokrytím tak umožňuje přesnou detekci methylovaných míst v celém genomu (Brunner *et al.*, 2009; Illumina, 2017c).



Obrázek 4: Schéma metody MSRE sekvenování (MSRE-Seq) (upraveno podle Illumina, 2017c)

6.2 Metody založené na afinitním obohacení methylované DNA

Metody založené na afinitním obohacení methylované DNA využívají MBD proteiny nebo specifické protilátky vůči 5mC. Jednotlivé analýzy využívající MBD proteiny mohou probíhat na DNA čipu nebo pomocí sekvenování nové generace (Brinkman *et al.*, 2010; Yong *et al.*, 2016).

6.2.1 MeDIP sekvenování (MeDIP-Seq)

Principem metody MeDIP sekvenování (MeDIP-Seq; Methylated DNA Immunoprecipitation Sequencing) pro analýzu 5mC je izolace methylované DNA z fragmentované gDNA pomocí protilátek vůči 5mC, přičemž dochází k imunoprecipitaci methylované DNA (Borgel *et al.*, 2012). Izolované fragmenty DNA jsou následně přečištěny a použity pro přípravu sekvenační knihovny (viz **Obrázek 5**) (Illumina, 2017c; Weber *et al.*, 2005).

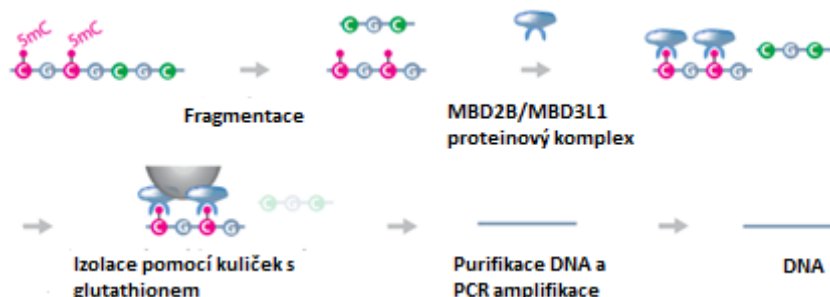


Obrázek 5: Schéma metody MeDIP sekvenování (MeDIP-Seq) (upraveno podle Illumina, 2017c)

6.2.2 Sekvenování MIRA (MIRA-Seq)

Sekvenování MIRA (MIRA-Seq; Methylated CpG Island Recovery Assay) je metoda, která využívá proteinového komplexu k obohacení oblastí DNA s methylovanými CpG dinukleotidy (Rauch *et Pfeifer*, 2010). V postupu metody MIRA-Seq je fragmentovaná gDNA inkubována s přečištěnými proteiny MBD2B (Methyl-CpG Binding Domain Protein 2) a MBD3L1 (Methyl-CpG Binding Domain Protein 3 Like 1). Vysoce afinitní proteinový komplex MBD2B/MBD3L1 se váže na templát

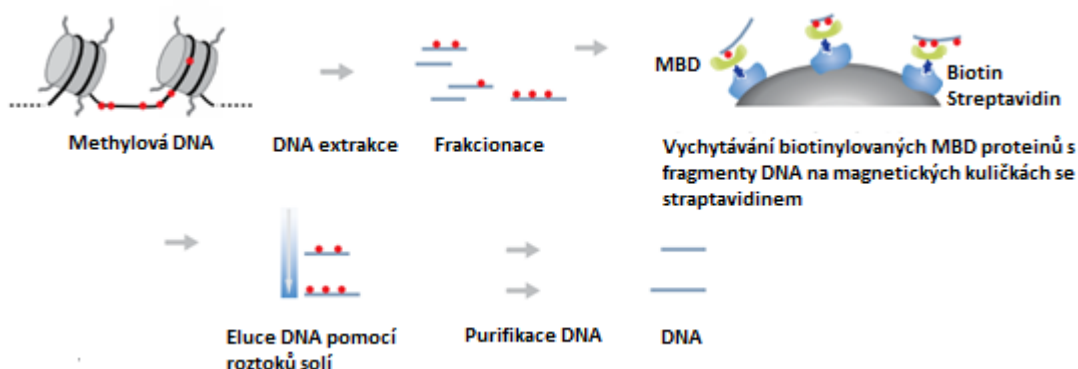
methylované gDNA. Fragmenty gDNA jsou poté vycíháný na magnetických kuličkách, na jejichž povrchu je navázán glutathion. Takto obohacená frakce methylované DNA je následně amplifikována, značena a analyzována pomocí sekvenování (viz **Obrázek 6**) (Illumina, 2017c; Benjamin *et al.*, 2016; Jung *et al.*, 2015).



Obrázek 6: Schéma metody sekvenování MIRA (MIRA-Seq) (upraveno podle Illumina, 2017c)

6.2.3 Methyl Capture sekvenování (MethylCap-Seq)

Metoda Methyl Capture sekvenování (MethylCap-Seq; Methyl Capture Sequencing) je založena na izolaci methylované DNA afinitní purifikací. Vyizolovaná gDNA je nejdříve fragmentována sonikací a inkubována se značenými MBD proteiny (např. biotin), které se mohou vázat na methylované cytosinové báze. Poté je komplex DNA-protein inkubován s magnetickými kuličkami, které mají na svém povrchu navázané protilátky specifické ke značce na proteinu (např. streptavidin). DNA je následně z těchto magnetických kuliček eluována pomocí různě koncentrovaných roztoků solí, purifikována a připravena na sekvenování (viz **Obrázek 7**). Pomocí sekvenování s vysokým rozlišením poskytuje vysoké pokrytí genomu, které reprezentuje většinu methylované DNA navázané na MBD protein (Rauch *et al.*, 2008; Rauch *et Pfeifer*, 2009; Bock *et al.*, 2010; Brinkman *et al.*, 2010; Illumina, 2017c).



Obrázek 7: Schéma metody Methyl Capture sekvenování (MethylCap-Seq) (upraveno podle Illumina, 2017c)

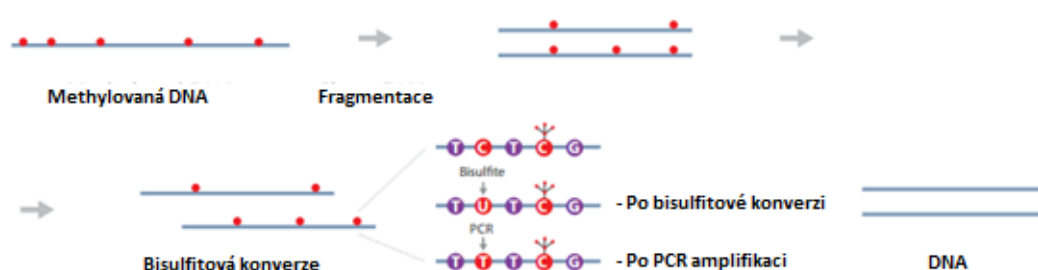
6.3 Metody založené na bisulfitové konverzi

Ošetření gDNA hydrogensířičitanem sodným vede k deaminaci nemethylované cytosinové báze na uracil, zatímco methylované cytosinové zbytky zůstávají nezměněny. Během PCR amplifikace dochází ke konverzi vzniklého uracilu na thymin (Frommer *et al.*, 1992).

Metody založené na bisulfitové konverzi spojené se Sangerovým sekvenováním poskytují vysoké rozlišení a jsou velmi často používány k analýze specifických sekvencí DNA. Nicméně přestože metody založené na bisulfitové konverzi jsou k analýze methylomu v dnešní době využívány nejčastěji, mají všechny tyto přístupy jeden společný negativní znak. Ve všech případech totiž dochází ke konverzi nemethylovaných cytosinů na thymidiny, což vede k redukci komplexity získaných sekvencí. To může způsobovat problémy při tvorbě alignmentů. Při působení hydrogensířičitanu sodného není rozlišováno mezi methylovanými bázemi cytosinu a mezi cytosiny nesoucí hydroxymethylovou skupinu. Navíc díky této konverzi není možné detekovat jednonukleotidové polymorfismy (SNP; Single Nucleotide Polymorphism) v místě konverze (Illumina, 2017c).

6.3.1 Celogenomové bisulfitové sekvenování (WGBS)

Celogenomové bisulfitové sekvenování (WGBS; Whole Genome Bisulfite Sequencing) slouží k detekci methylovaných cytosinových bází v celém genomu (Feil *et al.*, 1994). V této metodě je gDNA přečištěna a fragmentována. Poté jsou konce fragmentů DNA opraveny, ke 3' konci jsou přidány báze adeninu (A-tailing) a k nim jsou posléze naligovány methylované adaptory (Urich *et al.*, 2015). Po velikostní selekci jsou fragmenty DNA ošetřeny hydrogensířičitanem sodným a sekvenovány, přičemž je dosaženo detekce methylovaných cytosinů s rozlišením jedné báze. Použitím hydrogensířičitanu sodného jsou nemethylované cytosinové báze deaminovány na uracily, které jsou po osekvenování konvertovány na thymidiny. Methylované cytosiny této deaminaci nepodléhají a při sekvenování jsou čteny jako cytosiny (viz **Obrázek 8**). Lokalizace methylovaných cytosinových bází může být determinována porovnáním osekvenovaných sekvencí vzorku ošetřeno hydrogensířičitanem sodným se sekvencí DNA, u které bisulfitová konverze neproběhla (Illumina, 2017c).



Obrázek 8: Schéma metody Celogenomové bisulfitové sekvenování (WGBS) (upraveno podle Illumina, 2017c)

6.3.2 PBAT

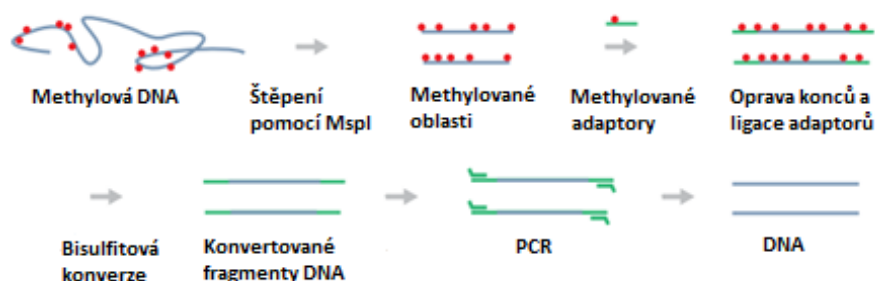
U metody PBAT (Post Bisulfite Adapter Tagging) ošetření DNA hydrogensířičitanem sodným předchází ligaci adaptorů, toto pořadí zamezuje fragmentaci již vzniklých DNA fragmentů s naligovanými adaptory, ke které dochází při ošetření DNA hydrogensířičitanem (Miura *et al.*, 2012). Ligace adaptorů je prováděna dvěma extenzemi pomocí náhodných primerů. Při první extenzi jsou použity primery obsahující adaptorovou sekvenci, která je značena biotinem. V následujícím kroku jsou fragmenty obsahující adaptor s biotinovou značkou vycytány na streptavidinových magnetických kuličkách, na kterých dochází k druhé extenzi (viz **Obrázek 9**). Tímto způsobem je lze vygenerovat značné množství čtení bez nutnosti amplifikace DNA (Illumina, 2017c; Smallwood *et al.*, 2014; Miura *et al.*, 2012).



Obrázek 9: Schéma metody PBAT (upraveno podle Illumina, 2017c)

6.3.3 Bisulfitové sekvenování se sníženým zastoupením (RRBS)

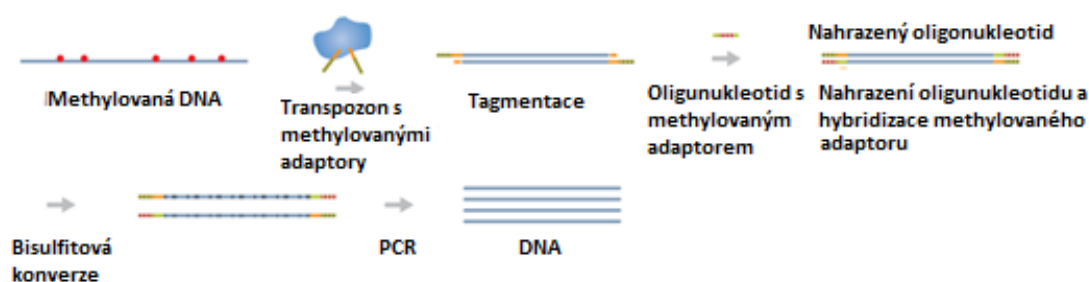
Bisulfitové sekvenování se sníženým zastoupením (RRBS; Reduced Representation Bisulfite Sequencing) využívá jeden nebo několik MSRE enzymů k sekvenčně specifické fragmentaci gDNA (Meissner *et al.*, 2005). Ke vzniklým fragmentům jsou naligovány methylované adaptory a takto připravená gDNA je následně ošetřena hydrogensířičitanem sodným a osekvenována (viz **Obrázek 10**). Tímto způsobem je možno studovat specifické oblasti DNA, přičemž je tato metoda obzvláště efektivní pro analýzu oblastí s vysokým obsahem methylovaných CpG míst, jako jsou například oblasti promotorů či repetice (Illumina, 2017c).



Obrázek 10: Schéma metody Bisulfitové sekvenování se sníženým zastoupením (RRBS) (upraveno podle Illumina, 2017c)

6.3.4 Celogenomové bisulfitové sekvenování založené na tagmentaci (T-WGBS)

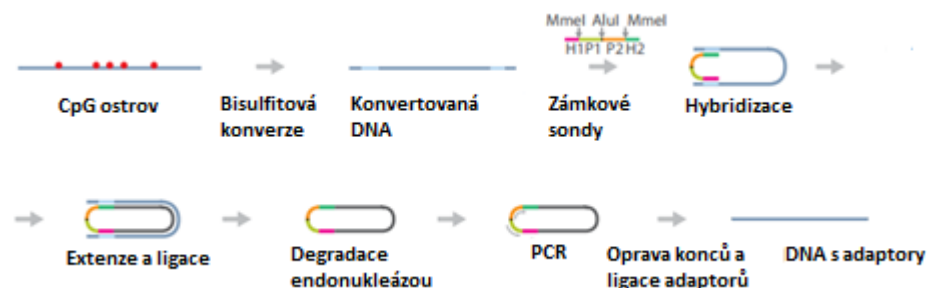
Celogenomové bisulfitové sekvenování založené na tagmentaci (T-WGBS; Tagmentation Based Whole Genome Bisulfite Sequencing) využívá aktivitu transpozonu Tn5 a bisulfitové konverzi ke studiu 5mC (Wang *et al.*, 2013). DNA je inkubována s transpozonom Tn5, který obsahuje methylované primery. Pomocí Tn5 dochází ke fragmentaci DNA a ligaci adaptorů. U fragmentů DNA s nalignovanými adaptory pak dochází k vytlačení kratšího z nalignovaných oligonukleotidů, což je následováno nahrazením tohoto oligonukleotidu delším methylovaným adaptorem a dosyntetizováním vzniklé mezery. Následně je DNA ošetřena hydrogensířičitanu sodným, fragmenty jsou amplifikovány a osekvenovány (viz **Obrázek 11**). Sekvenování s vysokým rozlišením poskytuje rozlišení 5mC až jedné báze (Illumina, 2017c; Wang *et al.*, 2013).



Obrázek 11: Schéma metody Celogenomové bisulfitové sekvenování založené na tagmentaci (T-WGBS) (upraveno podle Illumina, 2017c)

6.3.5 Bisulfitové sekvenování se zámkovými sondami (BSPP)

Bisulfitové sekvenování se zámkovými sondami (BSPP; Bisulfite Sequencing With Padlock Probes) je metoda pro cílenou izolaci vybraných míst DNA, které jsou následně podrobeny analýze methylace DNA (Deng *et al.*, 2009; Ball *et al.*, 2009). Zámkové sondy jsou fragmenty jednořetězcové DNA o velikosti asi 100 nukleotidů, které jsou navrženy tak, že jejich 3' a 5' konce jsou komplementární k přilehlým oblastem na cílové sekvenci DNA. Genomická DNA, na kterou tyto sondy hybridizují, je předem ošetřena hydrogensířičitanem sodným, přičemž poté co je mezera mezi nahybridizovanými úseky sondy dosyntetizována a ligována za tvorby cirkularizovaného úseku DNA, jsou zbývající fragmenty DNA odstraněny nukleázou. Tímto způsobem je vzorek obohacen o cílené sekvence, které jsou následně amplifikovány a osekvenovány (viz **Obrázek 12**) (Deng *et al.*, 2009).

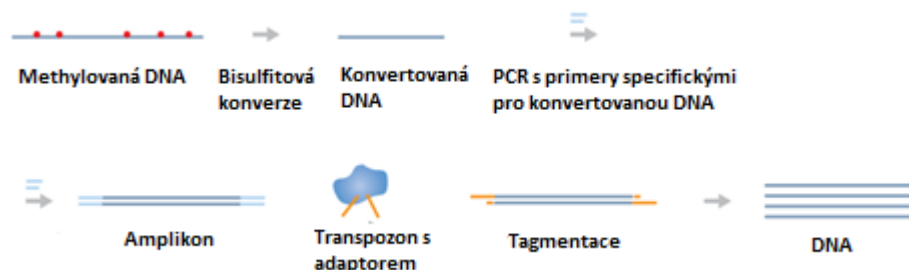


Obrázek 12: Schéma metody Bisulfitové sekvenování se zámkovými sondami (BSPP) (upraveno podle Illumina, 2017c)

6.3.6 Bisulfitové sekvenování amplikonů (BSAS)

Bisulfitové sekvenování amplikonů (BSAS; Bisulfite Amplicon Sequencing) je metoda, která k obohacení cílových oblastí v genomu využívá PCR amplifikaci a konstrukci knihovny za pomoci transpozonů (Masser *et al.*, 2013).

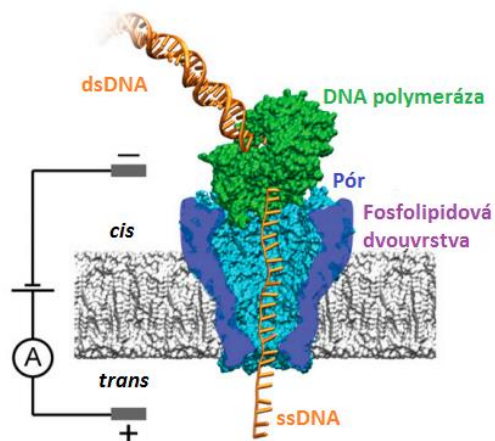
Genomická DNA je ošetřena hydrogensířičitanem sodným a poté amplifikována pomocí PCR reakce. Pro amplifikaci jsou použity primery specifické pro DNA, u které proběhla konverze bází. Z těchto amplifikovaných fragmentů DNA je vytvořena Nextera XT sekvenační knihovna, což taktéž zahrnuje transpozony indukovanou ligaci indexů (viz **Obrázek 13**). Tyto knihovny jsou následně multiplexovány a osekvenovány (Illumina, 2017c; Masser *et al.*, 2013).



Obrázek 13: Schéma metody Bisulfitové sekvenování amplikonů (BSAS) (upraveno podle Illumina, 2017c)

6.4 Nanoporové sekvenování

Technologie sekvenování třetí generace (TGS; Third Generation Sequencing) byly kromě genomických analýz adoptovány pro analýzu epigenomu (Schadt *et al.*, 2010). Mezi tyto metody patří sekvenování Nanopore, ve kterém během sekvenování tenká membrána obsahující jeden pór o velikosti 1 až 2 nanometry rozděluje roztok soli do dvou jamek, *cis* a *trans*. Napětí napříč membránou způsobuje proudění iontů skrz pór. V principu jednořetězcová DNA je prostřednicím fágové DNA polymerázy protáhnuta skrz bakteriální pór, přičemž pórem prochází jednotlivé nukleotidy v řadě a je pro ně měřen proud iontů skrz pór (viz **Obrázek 14**) (Manrao *et al.*, 2012).



Obrázek 14: Schéma sekvenování Nanopore (upraveno podle Laszlo *et al.*, 2013).

Nanopórové sekvenování je schopno rozlišit cytosinovou bázi od 5mC a 5hmC na základě rozdílu v záznamu měřených iontových proudů. Detekce 5mC a 5hmC pomocí této metody poskytuje možnost profilování methylace DNA s vysokou přesností a nedávno byla použita pro celogenomové sekvenování lidského genomu. Ve studii byla použita DNA z lidské buněčné linie GM12878, přičemž pro mapování 5mC byly použity dva programy, Nanopolish a SignalAlign. Sekvenační data byla porovnána s methylačními daty získanými pomocí bisulfitového sekvenování. Pro hodnocení byla vybrána stejná oblast DNA a v analýze byla sledována míra shody s již publikovanými daty bisulfitového sekvenování, kdy byla stanovena hodnota podobnosti (*r*-value) pro Nanopolish 0,895 a 0,779 pro SignalAlign (Miten *et al.*, 2018).

Výše popsané metody slouží ke studiu methylace DNA, přičemž tyto metody se zaměřují na detekci 5mC, nicméně v procesu demethylace DNA kromě 5hmC dochází ke vzniku 5fC a 5caC (Tahiliani *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2010; Ito *et al.*, 2011). Některé z těchto metod jsou tak často limitovány svou neschopností tyto modifikace přesně od sebe rozlišit. K analýze celkového methylomu je ale potřeba analyzovat i všechny změny na cytosinových bázích, k čemuž byly vyvinuty metody, jako jsou například JBP1-Seq (J-Binding Protein Sequencing) (Cui *et al.*, 2014) nebo hMeDIP-Seq (Hydroxymethylated DNA Immunoprecipitation Sequencing) (Xu *et al.*, 2011).

7 Sekvenační technologie Illumina

Metody sekvenování DNA vyvinuli Sanger s Coulsonem a Maxam s Gilbertem v roce 1977 (Sanger *et al.*, 1977; Maxam *et al.*, 1977). Sangerovo sekvenování se postupně vyvinulo v nynější automatizované DNA sekvenování, které je označováno jako sekvenování první generace (FGS; First Generation Sequencing), kde jsou jednotlivé terminační dideoxyribonukleosid trifosfáty značeny fluorescenční barvičkou (Ambardar *et al.*, 2016, Quail *et al.*, 2012). Metody sekvenování nové generace (NGS; New Generation Sequencing) umožňují masivní paralelní sekvenování (MPS; Massive Parallel Sequencing) velkého počtu templátů tentýž vzorku během jednoho sekvenačního běhu a produkují enormní množství dat.

7.1 Postup sekvenování na platformě Illumina

Platformy firmy Illumina využívají NGS technologii sekvenování syntézou (SBS; Sequencing By Synthesis), přičemž princip metody je podobný sekvenování dle Sangera pomocí kapilárové elektroforézy. DNA polymeráza katalyzuje inkorporaci fluorescenčně značených deoxynukleosid trifosfátů (dNTP) do řetězce templátové DNA, přičemž během každého cyklu syntézy DNA jsou nukleotidy identifikovány v místě inkorporace pomocí excitace fluoroforu. Rozdílem oproti Sangerova sekvenování je to, že v tomto případě dochází k tomuto procesu u milionu fragmentů paralelně (Illumina, 2017a; Ross *et al.*, 2013; Bentley *et al.*, 2008).

Pracovní postup sekvenování na platformě Illumina se skládá ze čtyř základních kroků: **(1) Příprava knihovny**, **(2) Tvorba klastrů**, **(3) Sekvenování** a **(4) Analýza dat** (Illumina, 2017a).

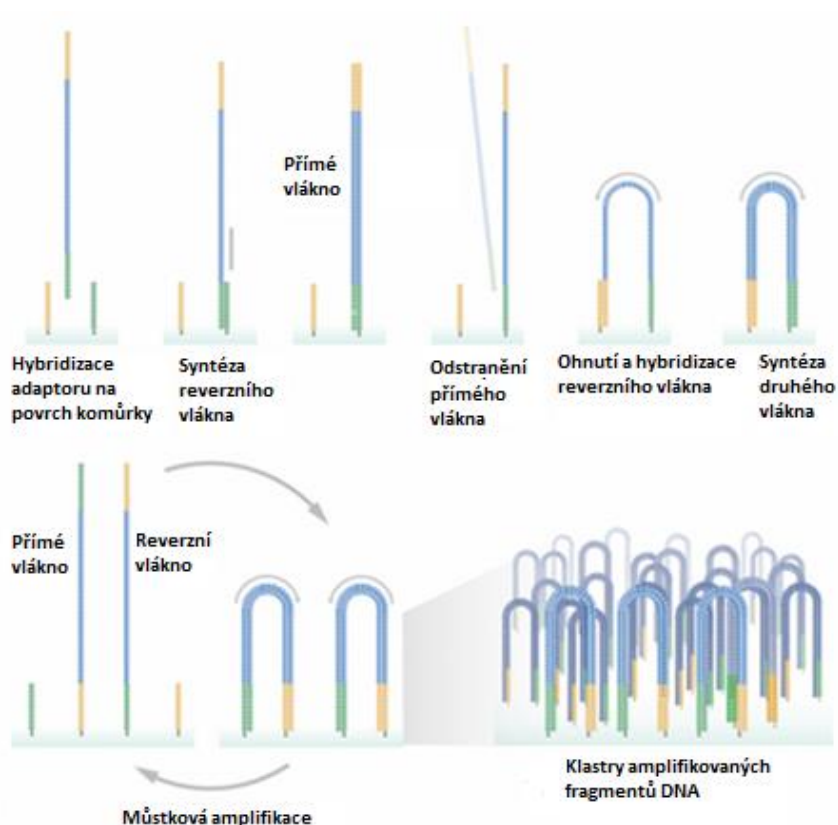
Příprava knihovny: Sekvenační knihovna je připravena fragmentací DNA či cDNA s následnou ligací adaptorů k 3' a 5' konci. Alternativním postupem je tzv. tagmentace, při které dochází pomocí transpozonů k fragmentaci DNA a ligaci adaptorů v jednom kroku (Illumina, 2014; Illumina, 2016). Fragmenty již obsahující adaptory na obou koncích jsou posléze amplifikovány pomocí PCR reakce a purifikovány (Illumina, 2017a). Při samotné amplifikaci jsou použity primery komplementární k adaptorům nalogovaným k obou koncům DNA fragmentů, přičemž součástí těchto primerů jsou také indexy, které umožňují identifikaci fragmentů a jejich přiřazení k jednotlivým vzorkům před konečnou analýzou dat. Kromě indexů primery obsahují i sekvence komplementární k oligomerům upevněným na povrchu průtokové reakční komůrky (flow cell) (Illumina, 2016, Illumina, 2017a).

Tvorba klastrů: Pro tvorbu klastrů je knihovna nanášena na průtokovou reakční komůrku, která má podobu křemenného sklíčka s jednotlivými oddělenými drahami. Na akrylamidovém povrchu drah jsou zachyceny dva typy oligomerů komplementárních k adaptorům v knihovně, což umožňuje přichycení DNA fragmentů na povrchu průtokové reakční komůrky.

Nejdříve dochází k hybridizaci přímého (forward) vlákna. Polymeráza je pak schopna syntetizovat nové komplementární reverzní vlákno, přičemž jako primer jí slouží oligomer, ke kterému je templát

nahybridizován. Po amplifikaci je dvouřetězcová molekula DNA (dsDNA; double stranded) denaturována a původní templát je odmyt. Nasyntetizované reverzní vlákno se následně ohýbá a svým druhým koncem hybridizuje s druhým typem oligomeru uchyceným na povrchu průtokové reakční komůrky. Každý fragment je tak amplifikován pomocí můstkové PCR za tvorby komplementárního dvouřetězcového můstku. Tato dsDNA je následně opět denaturována za vzniku dvou oddělených jednořetězcových kopií původního fragmentu DNA (přímé a reverzní vlákno) (Illumina, 2017a; Snipacademy, 2017; Illumina, 2016).

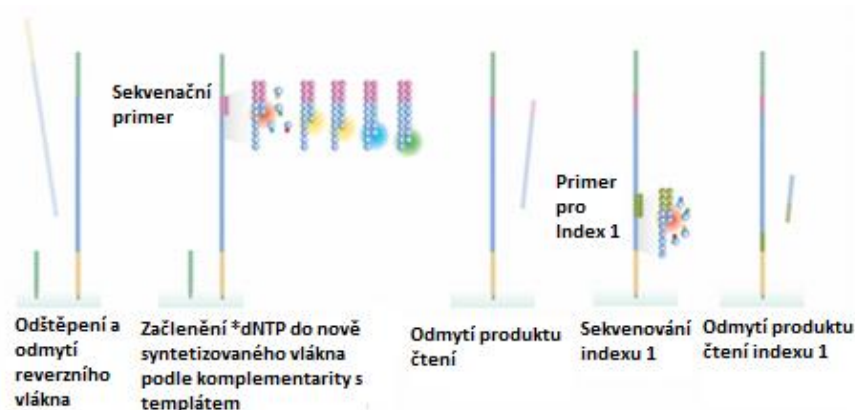
Tento proces je cyklicky opakován, dokud na průtokové reakční komůrce nevzniknou klastry obsahující všechny vložené fragmenty DNA, přičemž jednotlivé klastry obsahují vždy jeden typ původního fragmentu. Po ukončení můstkové amplifikace a konečné denuraci jsou reverzní vlákna odštěpena a odmyta pryč z komůrky a zbývající přímé řetězce, po zablokování jejich volné hydroxylové skupiny (OH-) skupiny na 3' konci, jsou připraveny k sekvenování (Illumina, 2017a; Snipacademy, 2017; Illumina, 2016). Schéma tvorby klastrů je zobrazeno na **Obrázku 15**.



Obrázek 15: Schéma tvorby klastrů (převzato a upraveno podle BIO fidal, n.d.)

Sekvenování: SBS technologie firmy Illumina využívá fluorescenčně značené dNTP s reverzibilním terminátorem (RT) k detekci jednotlivých bázi, které jsou postupně inkorporovány do templátu. Sekvenování začíná extenzí prvního sekvenačního primeru za vzniku prvního čtení. Všechny čtyři dNTP s příslušnými RT jsou přítomny během každého sekvenačního cyklu (Ross *et al.*, 2013; Bentley *et al.*, 2008; Illumina, 2017a).

Během každého sekvenačního cyklu je do oligonukleotidového řetězce zabudován jeden fluorescenčně značený dNTP, který je na svém 3' konci blokován pomocí 2-cyanoethylové skupiny (Berglund *et al.*, 2011). Tato skupina slouží jako terminátor polymerizace, po inkorporaci každého dNTP je fluorescenční značka použita k identifikaci dané báze a poté spolu s RT jsou enzymaticky odštěpeny, čímž je umožněna inkorporace dalšího nukleotidu (Illumina, 2010b). Po ukončení prvního čtení, kdy nově nasyntetizované vlákno je odmyto, na přímé vlákno hybridizuje primer komplementární k oblasti před sekvencí indexu 1 a je provedeno jeho čtení, což umožňuje přiřazení fragmentu k příslušnému vzorku (Illumina, 2016). Schéma sekvenování syntézou prvního čtení je zobrazeno na **Obrázku 16**.



Obrázek 16: Schéma sekvenování prvního čtení; *dNTP = fluorescenčně značené deoxynukleosid trifosfát (upraveno podle BIO fidal, n. d.)

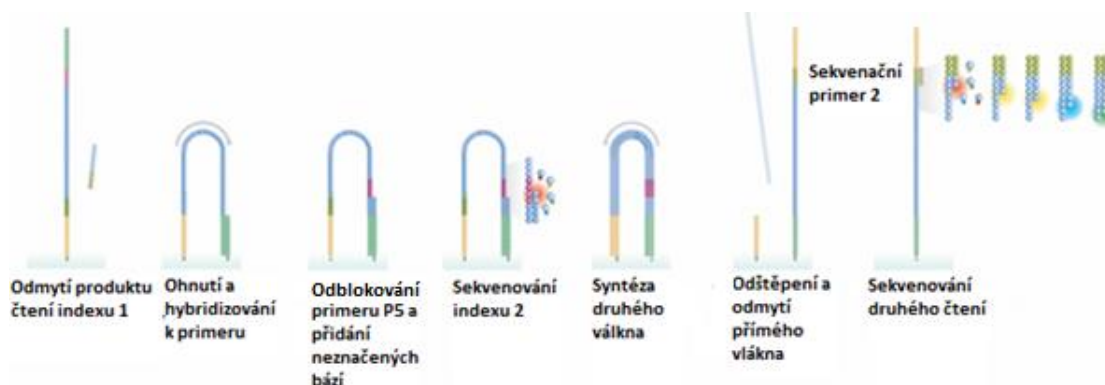
V rámci jednoho klastru jsou všechna identická vlákna čtena simultánně a stovky milionů klastrů jsou sekvenovány paralelně. Počet sekvenačních cyklů udává délku čtení, zatímco emise specifické vlnové délky a intenzita signálu charakterizují tzv. base call (Illumina, 2016). Base calling je termín, kterým je označován proces přiřazování příslušné nukleotidové báze k templátu, přičemž průběžně dochází ke stanovení pravděpodobnosti chyby tohoto přiřazení. Tento program prohlíží soubory s chromatogramy DNA sekvencí, prověřuje píky okolo každého base call a přiřazuje jim skoré kvality (Phred skóre). Hodnota Phred skóre se pohybuje od 4 do 60 (reálně do 40), přičemž vyšší hodnota značí vyšší kvalitu a menší pravděpodobnost chyby (Patel *et Jain*, 2012).

7.1.1 Paired-end sekvenování

Sekvenátory firmy Illumina umožňují svým uživatelům využívat tzv. paired-end (PE) sekvenování prostřednictvím amplifikace pomocí můstkové PCR (Kawashima *et al.*, 2005). Toto PE sekvenování generuje velké množství data o vysoké kvalitě díky, přičemž usnadňuje detekci genomických změn (např. inzerce, delece), umožňuje dokonalejší přiřazení sekvencí k oblastem DNA obsahující repetice a produkuje delší kontigy pro *de novo* sekvenování (Illumina, 2017g).

PE sekvenování následuje po ukončení prvního čtení a čtení indexů. Po odmytí nasyntetizované sekvence prvního indexu dochází k odblokování OH- skupiny na 3' konci přímého vlákna. To se může

následně ohnout a hybridizovat s druhým typem oligomeru na povrchu průtokové reakční komůrky. Index 2 je pak čten stejně jako index 1, přičemž je syntetizována celá komplementární molekula DNA za vzniku můstku dsDNA. Tato dsDNA molekula je následně denaturována, linearizována a OH-skupiny na 3' konci řetězce jsou opět zablokovány. Původní přímé vlákno je odštěpeno a odmyto z komůrky, a na povrchu tak zůstávají zachyceny pouze reverzní řetězce. Druhé čtení začíná po nahybridizování sekvenačního primeru 2 a délka tohoto čtení opět odpovídá počtu cyklů v sekvenační reakci. Po ukončení sekvenování je produkt druhého čtení odmyt (viz **Obrázek 17**) (Illumina, 2016).



Obrázek 17: Schéma paired-end sekvenování po odmytí produktu čtení indexu 1 (upraveno podle Biofidal, n.d.)

7.1.2 „Patterned“ průtoková reakční komůrka

„Patterned“ průtoková reakční komůrka je inovací firmy Illumina přítomná u systémů HiSeq X Ten, HiSeq 3000/HiSeq 4000, která zvyšuje účinnost sekvenování. Miliony uspořádaných nanojamek umožňují precizně kontrolovat velikost klastrů a mezer mezi nimi. Během tvorby klastrů je pomocí nové „exclusion“ amplifikační metody zajištěno, že do jamky se může navázat pouze jedna molekula templátové DNA. Tímto způsobem jsou ve velkém množství jamek vytvořeny monoklonální klustry a tím je dosaženo mnohonásobně vyššího zisku dat, sekvenačních čtení a vyšší rychlosti sekvenování, než je možné na platformách MiSeq a starších verzích HiSeq (Illumina, 2015b; Van Dijk *et al.*, 2014).

7.1.3 Technologie 10x GemCode

Firma Illumina ve spolupráci se společností 10x Genomics vyvinula technologii GemCode, která produkuje délku sekvenačních čtení až do 100 kb. Principem je rozdělení fragmentů vysokomolekulární gDNA pomocí mikrofluidního systému a následné uzavření jednotlivých fragmentů do emulzních kapek obsahující gelovou kuličku. Tyto gelové kuličky obsahují primery s barkódy, které jsou specifické pro každou gelovou částici, a enzymy pro isothermální inkubaci. Pomocí těchto primerů dochází v každé emulzní kapce k amplifikaci separované templátové DNA, při které vznikají krátké fragmenty nesoucí odpovídající barkód. Výsledkem sekvenování knihovny jsou krátká čtení obsahující sekvenci barkódu, pomocí které jsou poté sekvence přiřazeny k původnímu fragmentu (Eisenstein, 2015; Welgene Biotech, 2017).

System Chromium je dostupný u sekvenátorů řady HiSeq X Ten, HiSeq, MiSeq a NextSeq. Technologie GemCode je vhodná pro zvýšení efektivnosti celogenomového sekvenování, sekvenování exomu či RNA jednotlivých buněk a lze ji aplikovat na *de novo* sekvenování, určení podtypů buněk a fáze buněčného cyklu, detekci konstrukčních variant či použít pro identifikaci složených heterozygotních mutací (10x Genomics, 2017).

7.2 Analýza a zpracování dat

Analýza dat zahrnuje tři hlavní kroky, kterými jsou: **(1)** Primární analýza, **(2)** Sekundární analýza a **(3)** Terciární analýza dat. Některé kroky jsou provedeny automaticky na přístroji během sekvenování, jiné probíhají až poté, co je sekvenování ukončeno (Illumina, 2017i).

7.2.1 Primární analýza dat

Primární analýza dat probíhá na sekvenátoru a její součástí jsou dva základní kroky: **(1)** Obrazová analýza a **(2)** Base calling, hlavními komponentami primární analýzy jsou **Instrument Control Software (ICS)**, **Real Time Analysis (RTA)** a **OFF-Line Base Caller (OLB)** (Illumina, 2010a; PICB, n.d.).

- (1) Obrazová analýza:** Analýzu obrazu provádí software **ICS**, přičemž využívá nezpracované snímky ze sekvenování k lokalizaci klastrů a shromažďuje informace o intenzitě, šumu a pozici klastrů. Výstupem obrazové analýzy jsou vstupní data pro base calling (Illumina, 2010a; PICB, n.d.).
- (2) Base calling:** Využívá intenzity klastrů a šumu ke stanovení sekvence bází každého čtení z každého klastru, pravděpodobnost chybného stanovení báze (Phred skóre). Dále provádí filtrování jednotlivých čtení podle kvality. Base calling provádí software **ICS** (MiSeq) nebo **RTA** a **OLB**. RTA je součástí programu ICS, který pracuje během sekvenačního běhu, optimalizuje podmínky sekvenování a poskytuje informace o jeho kvalitě. OLB poskytuje možnost vykonat analýzu dat offline (Illumina, 2010a; PICB, n.d.).

7.2.2 Sekundární analýza

Sekundární analýza sekvenačních dat probíhá po ukončení procesu sekvenování a jsou v ní zahrnuty tři hlavní kroky: **(1)** Bcl konverze, **(2)** Sekvenční alignment a **(3)** Analýza variant a stanovení počtu čtení (PICB, n.d.).

- (1) Bcl konverze:** Konvertuje výstupní data v podobě *.bcl souborů do formátu *.fastq.gz (komprimované FASTQ soubory), přičemž tento proces může být prováděn přímo na sekvenačním přístroji (sekvenátory MiniSeq a MiSeq), online pomocí systému Illumina Basespace nebo může být ke konverzi použit samostatný program Bcl2fastq (Slavkovský, 2018). Během tohoto kroku probíhá demultiplexace vzorků (PICB, n.d.).

- (2) **Sekvenční alignment:** Přiřazuje vzorky k referenční sekvenci a k tomu využívá komprimované FASTQ soubory (PICB, n.d.). Pro alignment jsou často používány programy jako BWA (Burrows-Wheeler Aligner), Bowtie, NovoAlign, TopHat a další (Slavkovský, 2018).
- (3) **Analýza variant a stanovení počtu čtení:** Zahrnuje hledání SNP a indelů a v případě RNA sekvenování stanovení počtu čtení (PICB, n.d.).

7.2.3 Terciární analýza dat

Poté co je sekundární analýza dokončena, mohou být výsledky vizualizovány a dále analyzovány v programu GenomeStudio nebo pomocí dalších softwarů (PICB, n.d.). Součástí terciární analýzy dat je interpretace detekovaných genetických variant, což umožňuje studovat příčiny vzniku různých nemocí, stanovit možnosti jejich léčby a prevence (Illumina, 2017i) nebo také umožňuje počítat množství sekvencí v určité oblasti (např. RNA-Seq, Crispr skrining, ChIP-Seq, analýza methylomu) (Slavkovský, 2018).

Níže jsou uvedeny příklady programů, které se často používají pro analýzu sekvenačních dat.

BaseSpace: Data vygenerovaná na přístrojích Illumina jsou automaticky bezpečně přenesena a uložena na webové bioinformatické platformě BaseSpace Sequence Hub, která je plně podporována na sekvenátorech MiSeq, NextSeq a HiSeq. BaseSpace obsahuje řadu aplikací pro analýzu dat v rámci celogenomových studií, studií celého exomu, cílených genových oblastí, *de novo* sekvenování, analýzy methylomu, metagenomiky a dalších (Illumina, 2017b).

Burrows-Wheeler Aligner (BWA): Program BWA umožňuje alignment relativně krátkých sekvencí k dlouhé referenční sekvenci, jako je například lidský genom. BWA má dvě hlavní softwarové komponenty lišící se v typu algoritmu použitém pro alignment. První, Bwa-short, je určený pro krátká čtení (méně než 150 bp) a druhý, BWA-SW, byl vyvinut pro analýzu dlouhých čtení, tedy sekvencí o velikosti přibližně 100 kb. Hlavní rysem programu BWA je alignment sekvencí, ve kterém pracuje i s delecemi (gapped alignment) a provádí mapování PE sekvencí. Výstupní data z programu BWA jsou ve formátu SAM (Illumina, 2010a).

Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS2): Program MACS2 umožňuje identifikaci píků ze sekvenačních čtení z ChIP sekvenování pomocí funkce peak calling. Tato funkce je důležitá pro studium regulační proteiny genové exprese a histony. Taktéž jej lze použít pro studium methylačních profilů z dat z Methyl Capture sekvenování. V principu data z ChIP sekvenování či Methyl Capture sekvenování jsou bloky nahromaděných sekvenačních čtení, která jsou přiřazena k referenčnímu genomu, přičemž některé tyto bloky odpovídají místům, která jsou studována (vazebný motiv pro TF, vychytané methylované oblasti). Program MACS2 tyto bloky analyzuje a převádí je do podoby píku, přičemž testuje jejich statistickou hodnotu (Thomas *et al.*, 2016).

Integrative Genomics Viewer (IGV): Program IGV slouží pro vizualizaci sekvenačních dat. Tento software podporuje integraci celé řady typů genomických dat jako jsou vizualizace alignmentovaných čtení, mutací, počtu kopií, genové exprese, methylace a anotace genů. Navíc IGV umožňuje současnou vizualizaci různých typů dat u stovek vzorků (Robinson *et al.*, 2011).

7.3 MiSeq

MiSeq je stolní sekvenátor, který je primárně určen pro vědecké účely ale i pro diagnostické účely v případě použití validovaného diagnostického testu. Systémový software je plně v sekvenátoru integrovaný a umožňuje analýzu dat přímo na přístroji (Illumina, 2017h).

Délka sekvenačních běhů je pro různé aplikace variabilní a pohybuje se mezi 4 až 55 hodinami. Přístroj MiSeq umožňuje svým uživatelům zvolit pro svoji analýzu PE sekvenování, přičemž poskytuje až 15 Gb výstupních dat. Maximální délka těchto čtení je 2 x 300 bp, tedy 600 bp pro jedno čtení sekvence s maximální počtem sekvenačních čtení 25 milionů. Tyto údaje se vztahují na chemikálie sekvenačního kitu MiSeq v3 (Illumina, 2017h).

Sekvenování na platformě MiSeq je velice kompaktní proces, který zahrnuje jak tvorbu klastrů, fluidiku, PE sekvenování syntézou, tak i analýzu dat. Přístroj je vybaven dotykovou obrazovkou a reagensiemi s RFID systémem. Software sekvenátoru uživatele provází všemi kroky přípravy přístroje na sekvenační běh, kdy uživatel před zahájením sekvenování vytváří sample sheet a instaluje průtokovou reakční komůrku a reagensie. Control software během sekvenování poskytuje informace o kvalitě sekvenování, přičemž po ukončení primární analýzy software MiSeq Reporter zahajuje a automaticky analyzuje kvalitu dat a informaci o sekvenačním pokrytí každého vzorku. Výsledná data jsou nahrávána na BaseSpace Sequence Hub (Illumina, 2017f).

Kity pro přípravu sekvenačních DNA či RNA knihoven jsou optimalizované pro mnoho různých aplikací, mezi hlavní patří: **(1)** celogenomové sekvenování malých genomů (mikroby, viry), **(2)** cílené sekvenování vybraných genů (amplikony, panel genů) a **(3)** metagenomické sekvenování 16S RNA genů. MiSeq sekvenátor lze ale taktéž používat pro analýzu exprese cílových genů, analýzu miRNA a malých RNA a analýzu interakcí mezi DNA a proteiny (Illumina, 2017f).

7.4 HiSeq 2500

Sekvenační systémy řady HiSeq poskytují rozsáhlou škálu aplikací, mezi které patří: **(1)** sekvenování celých malých/velkých genomů, **(2)** sekvenování exomu, **(3)** cílené sekvenování (amplikony, panel genů), **(4)** sekvenování transkriptomu, **(5)** profilování genové exprese s mRNA-Seq, **(6)** analýza miRNA a malých RNA, **(7)** analýza interakcí mezi DNA a proteiny, **(8)** sekvenování methylomu a **(9)** shotgun metagenomické sekvenování (Illumina, 2017h).

Systém HiSeq 2500 je velmi výkonný sekvenační systém pro sekvenování s vysokým pokrytím. Díky vysoké účinnosti SBS chemie a produkci dat o vysoké kvalitě je systém HiSeq 2500 často využíván ve

velkým genomických centrech a vědeckých institucí po celém světě (Illumina, 2017d). Je to velmi flexibilní platforma, která svým uživatelům poskytuje volbu mezi dvěma sekvenačními režimy (**high output** a **rapid run**), a navíc umožňuje analyzovat vzorky na jedné průtokové reakční komůrce nebo dvou komůrkách zároveň (Illumina, 2017d).

Základní charakteristikou platformy HiSeq 2500 je HiSeq Control Software, což je rozhraní pro ovládání přístroje, které velmi intuitivně provádí uživatelé všemi kroky nastavení průběhu experimentu, přípravy reakčních průtokových komůrek a reagensí, kontroly komůrek a promývání sekvenátoru po ukončení sekvenačního běhu. Navíc je možné sledovat průběh sekvenačního běhu přímo na monitoru sekvenátoru, nebo z domova prostřednictvím BaseSpace (Illumina, 2015a).

Režim rapid run

Režim rapid run umožňuje uživatelům provádět analýzy, při kterých je kladen důraz na rychlé vygenerování výsledků. Režim rapid run zahrnuje tvorbu klastrů v přístroji, což výrazně urychluje průběh sekvenačního běhu. V případě tohoto režimu se tak délka jednoho běhu podle zvolené analýzy pohybuje mezi 7 až 60 hodinami. Taktéž je podporováno sekvenování s produkcí dlouhých PE čtení (až 600 milionů, 300 Gb dat) o maximální velikosti 2 x 250 bp, která poskytují větší pokrytí a usnadňují ta skládání sekvencí pro *de novo* aplikace a metagenomické analýzy (Illumina, 2015a).

Režim high output

Režim high output je ideální pro rozsáhlé studie, ve kterých je potřeba analyzovat stovky vzorků, nebo v případě, kdy je vyžadováno vysoké sekvenační pokrytí. V režimu high output je umožněno zpracovat až 6krát více vzorků, než je tomu v případě režimu rapid run, což velmi urychluje a zefektivňuje průběh analýzy. HiSeq SBS kity v4 navíc produkují až 4 biliony klastrů během jednoho sekvenačního běhu, přičemž je vyprodukováno až 1 Tb dat během 6 dnů. Jeden sekvenční běh trvá dle zvolené analýzy v rozpětí 29 hodin až 6 dní, přičemž je vyprodukováno 4 bilionů čtení o maximální délce 2 x 125 bp a až 1 000 Gb výstupních dat (Illumina, 2017d).

7.5 NovaSeq 6000

Sekvenační systém NovaSeq 6000 je nejvýkonnější sekvenační platforma firmy Illumina, která umožňuje produkovat čtení o délce 2 x 50 bp, 2 x 100 bp i 2 x 150 bp, přičemž délka jednoho sekvenačního běhu se podle typu zvolené délky sekvenačního cyklu a typu reakční průtokové komůrky pohybuje od 13 do 45 hodin. Při použití reakční průtokové komůrky S4 tento systém dokáže vyprodukovat až 20 miliard čtení a 6 000 Gb dat během jednoho sekvenačního běhu. Stejně jako předešlé sekvenační systémy i NovaSeq 6000 poskytuje aplikace jako je **(1)** celogenomové sekvenování, **(2)** sekvenování celého exomu nebo **(3)** sekvenování celého transkriptomu a další (Illumina, 2018).

8 Materiál a metody

8.1 Biologický materiál

- Jako biologický materiál bylo v praktické části použito 31 FFPE vzorků DNA odebraných pacientům s CRC, kteří byli léčeni chemoterapeutickou látkou bevacizumab (Avastin), přičemž patnáct vzorků (vzorky č. 1-15) bylo odebráno pacientům, u kterých nebyla detekována odpověď na léčbu, a tedy vykazovali rezistenci vůči bevacizumabu (skupina non-respondenti – N). Šestnáct zbývajících vzorků (vzorky č. 16-31) patřilo pacientům, kteří vykazovali pozitivní odpověď na léčbu (skupina respondenti – R).
- Hlavní kritérium výběru skupiny byl parameter přežití bez progresu PFS (PFS; Progression Free Survival) ostatné klinické parametry výběru (pohlaví, věk, TNM klasifikace, pravý/levý tračník, přítomnost jaterní metastázy, grade, operace primárního nádoru) se v rámci skupin statisticky nelišily. Práce probíhala v rámci projektu, který byl schválen etickou komisí a byl podporován grantem AZV VES 521101021/33 (Název projektu: Genetické a epigenetické prediktivní biomarkery úspěšnosti léčby inhibitory angiogeneze u pacientů s karcinomem kolorekta).
- Nádory byly genotypovány na *KRAS* mutaci (kodon 12, 13) s pozitivním výsledkem. Všechny vzorky DNA spadají na základě studie pan Shena a jeho kolegů z roku 2007 do skupiny nádorů CIMP2, u kterých je velmi často přítomná mutace v genu *KRAS*, a jen ojediněle vykazují MSI a mutace v genech *BRAF* nebo *TP53* (Shen *et al.*, 2007c)

8.2 Kity

- Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, kat. č. 5067-4626)
- Cobas DNA Sample Preparation Kit (Roche, kat. č. 05985536190)
- EZ DNA Methylation-Gold Kit (50 rxns.) (Zymo Research, kat. č. D5005)
- HiSeq Rapid SBS Kit (50 cycles) (Illumina, kat. č. FC-402-4022)
- HiSeq Rapid SR Cluster Kit v2 (Illumina, kat. č. FC-402-4002)
- MethylMiner Methylated DNA Enrichment Kit (Invitrogen, kat. č. ME10025)
- MiSeq Reagent Kit v2 (50 cycles) (Illumina, kat. č. MS-102-2001)
- MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina, kat. č. MS-102-3001)
- Nextera XT Index Kit (24 indexes, 96 samples) (Illumina, kat. č. FC-131-1001)
- Nextera XT Sample Prep Kit (96 samples) (Illumina, kat. č. FC-131-1096)
- QIAquick PCR Purification Kit (250) (QIAGEN, kat. č. 28106)
- QIAseq Ultralow Input Library Kit (96) (QIAGEN, kat. č. 180495)
- QIAxcel DNA Kit (1200) (QIAGEN, kat. č. 929002)
- Qubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoScientific, kat. č. Q32851)

8.3 Chemikálie a použité roztoky

- 3M acetát sodný (pH = 5,2) (ThermoScientific, kat. č. R1181)
- 5M Hydroxid sodný perly P.A. (Lach-ner, kat. č. 10006-AP2)
- Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, kat. č. 05608228001)
- Agilent High Sensitivity DNA Reagents (Agilent Technologies, kat. č. 5067-4627)
- Buffer EB (QIAGEN, kat. č. 19086)
- DEPC voda (Sigma-Aldrich, kat. č. W 4502)
- Ethanol absolutní (Penta, kat. č. 71250-11000)
 - Příprava 80 % ethanolu: k 8 ml 100% ethanolu přidat 2 ml vody.
 - Příprava 70 % ethanolu: k 7 ml 100% ethanolu přidat 3 ml vody.
- EvaGreen Dye, 20x in Water (Biotinium, kat. č. 31000)
- KAPA HiFi HotStart Uracil + ReadyMix (2x) (Kapa Biosystems, kat. č. KK2801)
- Universal Methylated DNA Standard (Zymo Research, kat. č. D5011)
- TP 2x SYBR Master Mix (Top-Bio, kat. č. T605)
- Forward a Reverse primery EN1_A-C, SFRP2_A-C (Generi Biotech)

8.4 Laboratorní přístroje

- Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)
- BioRuptor Plus (Diagenode)
- C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad)
- Centrifuge Z 383 K (Hermle)
- HiSeq 2500 (Illumina)
- Chip Priming Station (Agilent Technologies)
- Ika MS3 Vortexer (IKA)
- Minicentrifuge MiniSpin (Eppendorf)
- MJ Reseach PTC-Thermal Cycler (Marshall Scientific)
- QIAxcel Advanced System (QIAGEN)
- Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen)
- Real Time PCR Cycler CFX96 (Bio-Rad)
- Vortex Mixer PV-1 (Pro LAB, P-LAB)
- Vortex Genie 2 (Scientific Industries)

9 Metodika

8.5 Příprava DNA

1. DNA z FFPE vzorků byla izolována laborantkami ÚMTM. Izolace byla provedena prostřednictvím a podle návodu kitu Cobas DNA Sample Preparation Kit.
2. Koncentrace DNA ve vzorcích byla změřena na přístroji Qubit 2.0 Fluorometer.
 - a. Pro 1 měření bylo do mikrozkušavky připraveno 200 μl reakční směsi (199 μl Qubit dsDNA HS Buffer + 1 μl Qubit dsDNA HS Reagent, Qubit dsDNA HS Assay Kit).
 - b. K 199 μl reakční směsi byl přidán 1 μl DNA vzorku a obsah mikrozkušavky byl promíchán na vortexu. Koncentrace DNA byla změřena na přístroji Qubit 2.0 Fluorometer.
3. Byl vypočítán objem DNA a DEPC vody potřebné pro přípravu 100 ng DNA s celkovým objemem 82 μl dle následujících vzorců:

$$\text{Objem DNA } [\mu\text{l}]: V_{\text{DNA}} = \frac{100}{\text{nameřená koncentrace } [\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}]}$$

$$\text{Objem DEPC vody } [\mu\text{l}]: V_{\text{H}_2\text{O}} = 82 - V_{\text{DNA}}$$

8.6 Fragmentace DNA

1. Do mikrozkušavek pro sonikaci bylo připraveno 82 μl roztoku DNA (100 ng DNA) (pozn. v případě vzorků č. 5, 18, 20 a 24 bylo připraveno 50 ng DNA, důvodem byla nízká koncentrace DNA; pro vzorek č. 19 byl připraven duplikát označený jako vzorek č. 19b, tento duplikát byl před analýzou podroben opravě DNA pomocí kitu Nebnext DNA Repair Kit, New England BioLabs, tento krok byl proveden laborantkou ÚMTM).
2. DNA ve vzorcích byla fragmentována sonikací na přístroji Bioruptor Plus s programem LOW 30s ON, 90s OFF, 2 x 3 cykly.
3. Velikost fragmentů DNA ve vzorcích byla určena pomocí gelové elektroforézy na čipu na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer (DNA High Sensitivity Kit a test DNA High Sensitivity).
 - a. Preparační nástavec byla nastaven tak, aby stříkačka byla uzamčena v pozici, která je používaná pro vtlačování gelu pro analýzu DNA.
 - b. High Sensitivity DNA čip byl vložen na preparační nástavec.
 - c. Bylo napipetováno 9 μl gelu na dno jamky pro gel, píst byl natáhnut do pozice označené na stupnici jako 1 ml a preparační nástavec byl uzavřen.
 - d. Gel byl stlačením pístu vtlačen do všech kapilár uvnitř čipu a píst byl v této pozici uzamknut.
 - e. Píst byl po 60 sekundách uvolněn a následně byl píst pomalým pohybem opět natáhnut do pozice označené na stupnici jako 1 ml.

- f. Preparační nástavec byl otevřen a do dvou dalších jamek pro gel bylo napipetováno 9 μ l gelu. Do všech jamek pro vzorky a marker bylo napipetováno 5 μ l High Sensitivity DNA marker.
- g. Do jamky pro ladder byl napipetován 1 μ l High Sensitivity DNA ladder a do jamek pro vzorky byl napipetován 1 μ l DNA.
- h. Čip byl vložen do nástavce vortexu a obsah byl 1 minutu promícháván.
- i. Poté byl čip vložen do přístroje Agilent 2100 Bioanalyzer a byla spuštěna analýza.

8.7 Vychytávání fragmentů methylované DNA pomocí kitu MethylMiner Methylated DNA Enrichment Kit

8.7.1 Příprava magnetických kuliček

1. Byl připraven 1x Wash Buffer (360 μ l 5x Wash Buffer x N + 1,44 ml DEPC vody x N; N = počet reakcí).
2. Suspenze magnetických kuliček Dynabeads M-280 Streptavidin byla důkladně resuspendována pipetováním.
3. Do prázdné mikrozkušavky bylo napipetováno N x 10 μ l magnetických kuliček.
4. Mikrozkušavka s magnetickými kuličkami byla na 1 minutu vložena do magnetického stojanu.
5. Po shromáždění kuliček na vnitřní straně mikrozkušavky byl odstraněn čirý roztok.
6. Mikrozkušavka byla vyjmuta z magnetického stojanu a poté byly kuličky v mikrozkušavce resuspendovány pipetováním v N x 10 μ l 1x Wash Buffer.
7. Mikrozkušavka byla vložena na 1 minutu do magnetického stojanu, čirý roztok byl opatrně odstraněn z mikrozkušavky.
8. Mikrozkušavka s promytými kuličkami byla vyjmuta z magnetického stojanu a obsah magnetických kuliček byl rychle resuspendován jemným pipetováním v N x 10 μ l 1x Wash Buffer.

8.7.2 Příprava proteinu MBD-biotin

1. Do nové mikrozkušavky bylo napipetováno N x 7 μ l roztoku MBD-biotin a objem byl doplněn do 200 μ l roztokem 1x Wash Buffer.

8.7.3 Navázání proteinového komplexu MBD-biotin na magnetické kuličky

1. Ke 200 μ l roztoku MBD-biotin bylo přidáno 100 μ l magnetických kuliček.
2. Obsah mikrozkušavky byl inkubován 1 hodinu na třepačce při pokojové teplotě.
3. Mikrozkušavka byla na 1 minutu vložena do magnetického stojanu a po shromáždění kuliček na vnitřní straně mikrozkušavky byl odstraněn čirý roztok tak, aby pelet nebyl porušen.
4. Obsah mikrozkušavky byl promyt 100 μ l roztoku 1x Wash Buffer.
5. Směs v mikrozkušavce byla promíchávána na třepačce po dobu 5 minut.

6. Kroky 3 až 6 byly provedeny ještě dvakrát.
7. Mikrozkušavka byla na 1 minutu vložena do magnetického stojanu, čirý roztok byl opatrně odstraněn z mikrozkušavky.
8. Do mikrozkušavky bylo přidáno 100 μl 1x Wash Buffer a obsah byl resuspendován pipetováním, tímto způsobem byl připraven koncentrovaný roztok magnetických kuliček s navázaným proteinem MBD-biotin.

8.7.4 Inkubace konjugátu MBD-biotin a magnetických kuliček s fragmentovanou DNA

1. Pro N vzorků fragmentované DNA bylo připraveno N x 100 μl zředěného roztoku magnetických kuliček v 1x Wash Buffer (např. pro 10 vzorků bylo smícháno 100 μl magnetických kuliček s navázaným proteinem MBD-biotin a 900 μl 1x Wash Buffer).
2. Byly připraveny roztoky methylované a nemethylované DNA o koncentraci 10 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, které byly v dalším postupu použity jako *spike-in* kontroly pro ověření správnosti vychytávání fragmentů methylované DNA (1 μl příslušné methylované/nemethylované DNA o koncentraci 1 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ byl zředěn v 99 μl DEPC vody).
3. Do nové mikrozkušavky bylo k 80 μl vzorku fragmentované DNA přidáno 20 μl 5x Wash Buffer, 100 μl zředěného roztoku magnetických kuliček s navázaným komplexem MBD-biotin, 1 μl zředěné kontrolní methylované DNA (10 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) a 1 μl zředěné kontrolní nemethylované DNA (10 $\text{pg}\cdot\mu\text{l}^{-1}$).
4. Obsah mikrozkušavek se vzorky byl promícháván 1 hodinu na třepačce při pokojové teplotě.

8.7.5 Eluce nemethylované DNA

1. Mikrozkušavka s fragmentovanou DNA a magnetickými kuličkami byla vložena na 1 minutu do magnetického stojanu.
2. Čirý roztok byl odebrán a tato frakce byla uschována do nové mikrozkušavky (**frakce nemethylované DNA**).
3. Bylo přidáno 200 μl 1x Wash Buffer do mikrozkušavky s magnetickými kuličkami.
4. Obsah mikrozkušavky byl promícháván po dobu 3 minut na třepačce.
5. Mikrozkušavka byla na 1 minutu vložena do magnetického stojanu.
6. Čirý roztok byl odebrán a tato frakce byla uschována do nové mikrozkušavky (**frakce 1x Wash Buffer**).
7. Bylo přidáno 200 μl 1x Wash Buffer do mikrozkušavky s magnetickými kuličkami.
8. Obsah mikrozkušavky byl promícháván po dobu 3 minut na třepačce.
9. Mikrozkušavka byla na 1 minutu vložena do magnetického stojanu a poté byl čirý roztok odebrán a přepipetován do mikrozkušavky s **frakcí 1x Wash Buffer**.

8.7.6 Eluce methylované DNA

1. Bylo přidáno 200 μl High Salt Elution Buffer do mikrozkušavky s koncentrovanými magnetickými kuličkami.
2. Obsah mikrozkušavky byl promícháván po dobu 3 minut na třepačce.
3. Mikrozkušavka byla na 1 minutu vložena do magnetického stojanu.
4. Čirý roztok byl z mikrozkušavky odebrán. Tato frakce methylované DNA byla přepipetována do nové mikrozkušavky (**frakce methylované DNA**)
5. Bylo přidáno 200 μl High Salt Elution Buffer do mikrozkušavky s magnetickými kuličkami.
1. Obsah mikrozkušavky byl promícháván po dobu 3 minut na třepačce.
2. Mikrozkušavka byla na 1 minutu vložena do magnetického stojanu.
3. Čirý roztok byl odebrán z mikrozkušavky a přepipetován do mikrozkušavky s **frakcí methylované DNA**.

8.7.7 Precipitace ethanolem

1. Ke každé frakci v mikrozkušavkách byl přidán 1 μl glykogenu ($20 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$).
2. Bylo přidáno 1/10 objemu acetátu sodného o koncentraci $3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (pH = 5,2), 20 nebo 40 μl , a 2x objem 100% ethanolu, 400 nebo 800 μl .
3. Obsah zkumavek byl důkladně promíchán vortexováním a inkubován 2 hodiny při $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.
4. Byla provedena centrifugace (12 000 g/15 min/4 $^\circ\text{C}$).
5. Supernatant byl odstraněn tak, aby nedošlo k porušení peletu na dně mikrozkušavky.
6. Bylo přidáno 500 μl chlazeného 70% ethanolu.
7. Byla provedena centrifugace (12 000 g/5 min/4 $^\circ\text{C}$).
8. Supernatant byl odstraněn tak, aby nedošlo k porušení peletu na dně mikrozkušavky.
9. Byla provedena centrifugace (12 000 g/15 min/4 $^\circ\text{C}$).
10. Veškerý supernatant byl opatrně odstraněn z mikrozkušavky.
11. Supernatant na dně mikrozkušavky byl vysušen na vzduchu (5 minut nebo do úplného vysušení ethanolu).
12. Obsah mikrozkušavky byl resuspendován v 30 μl DEPC vody.
13. Koncentrace DNA ve vzorcích byla změřena na přístroji Qubit 2.0 Fluorometer High Sensitivity (postup viz **Příprava DNA**, krok č. 2) (pozn. vzorek č. 25 byl z důvodu nedetekovatelného množství DNA vyřazen z analýzy).
14. Vzorky byly uschovány v mrazáku při $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

8.8 Kontrola kvality metylované DNA pomocí qPCR

8.8.1 Příprava vzorků pro qPCR

1. Byla připravena reakční směs pro metylovanou a nemetylovanou DNA (viz **Tabulka 1 a 2**).
2. Do mikrozkušavky pro PCR bylo napipetováno 18 μl reakční směsi pro metylovanou DNA a byl přidán 1 μl vzorku DNA z frakce metylované DNA/nemetylované DNA/1x Wash Buffer.
3. Do nové PCR mikrozkušavky bylo napipetováno 18 μl reakční směsi pro nemetylovanou DNA a byl přidán 1 μl vzorku DNA z frakce metylované DNA/nemetylované DNA/1x Wash Buffer.

8.8.2 Příprava kalibrační řady pro qPCR

1. Byly připraveny zředěné roztoky metylované a nemetylované kontrolní DNA o koncentracích 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 a 1 (počet kopií DNA v 1 μl roztoku DNA).
2. Do mikrozkušavky pro PCR bylo napipetováno 18 μl reakční směsi pro metylovanou DNA a byl přidán 1 μl roztoku kalibrační řady metylované DNA nebo 1 μl DEPC vody (negativní kontrola) (viz **Tabulka 1**).
3. Do nové mikrozkušavky pro PCR bylo napipetováno 18 μl reakční směsi pro nemetylovanou DNA a byl přidán 1 μl roztoku kalibrační řady nemetylované DNA nebo 1 μl DEPC vody (negativní kontrola) (viz **Tabulka 2**).

Tabulka 1: Složení reakční směsi pro qPCR (metylovaná DNA)

Reagencie	Objem pro 1 reakci [μl]
TP SYBR Master Mix (2x)	10
Primery pro metylovanou DNA ($10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	0,5
DEPC voda	7,5
Celkový objem [μl]	18

Tabulka 2: Složení reakční směsi pro qPCR (nemetylovaná DNA)

Reagencie	Objem pro 1 reakci [μl]
TP SYBR Master Mix (2x)	10
Primery pro nemetylovanou DNA ($10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$)	0,5
DEPC voda	7,5
Celkový objem [μl]	18

8.8.3 qPCR

1. Mikrozkumavky byly vloženy do termocykléru CFX96 a byl spuštěn program pro qPCR (viz **Tabulka 3**).
2. Z naměřených SQ hodnot (množství DNA vstupující do PCR reakce; starting quantity) jednotlivých vzorků a kalibrační řady byl vypočítán počet kopií *spike-in* DNA a procentuální zastoupení methylované a nemethylované *spike-in* kontroly v jednotlivých frakcích každého analyzovaného vzorku dle následujících vzorců:

Procentuální zastoupení nemethylované (NM) DNA:

$$\% \text{ NM DNA} = \frac{\text{SQ nemethylované spike in kontroly}}{(\text{SQ nemethylované spike in kontroly} + \text{SQ methylované spike in kontroly})}$$

Procentuální zastoupení methylované (M) DNA:

$$\% \text{ M DNA} = \frac{\text{SQ methylované spike in kontroly}}{(\text{SQ nemethylované spike in kontroly} + \text{SQ methylované spike in kontroly})}$$

Tabulka 3: Podmínky qPCR pro kontrolu kvality methylované DNA

Cyklus	Teplota	Čas	Opakování
Počáteční denaturace	95 °C	15 min	1x
Denaturace	94 °C	15 s	40x
Hybridizace	55 °C	15 s	
Elongace	68 °C	30 s	
Konečná elongace	72 °C	5 min	1x

8.9 Příprava knihovny pomocí QIAseq Ultralow Input Library Kitu

8.9.1 Syntéza tupých konců a ligace adaptorů

1. Reakční směs pro syntézu tupých konců byla připravena na ledu (viz **Tabulka 4**).

Tabulka 4: Složení reakční směsi pro syntézu tupých konců

Reagencie	Objem pro 1 reakci [μl]
1,1 ng DNA	Různé
End-Polishing Buffer (10x)	5
End-Polishing Enzyme Mix	2
DEPC voda	Různé
Celkový objem [μl]	50

2. Obsah mikrozkumavky byl promíchán pipetováním a mikrozkumavka byla vložena do termocykléru C1000 Thermal Cycler s programem pro syntézu tupých konců (viz **Tabulka 5**).
3. Po proběhnutí programu pro syntézu tupých konců byly mikrozkumavky vyjmuty z termocykléru a umístěny na led. Okamžitě byla provedena ligace adaptorů podle postupu (viz níže).

Tabulka 5: Podmínky programu pro syntézu tupých konců

Cyklus	Teplota	Čas
Syntéza tupých konců	25 °C	30 min
	65 °C	15 min
	4 °C	∞

4. Adaptory byla připraveny zředěním v poměru 1 : 10 přidáním 90 µl DEPC vody k 10 µl adaptoru. Obsah byl promíchán pipetováním a poté přenesen do nové mikrozkušavky.
5. Ke vzorkům DNA byly přidány reagenty pro ligaci adaptorů podle **Tabulky 6**.

Tabulka 6: Složení ligační směsi

Reagencie	Objem pro 1 reakci [µl]
DNA po syntéze tupých konců	50
Ultralow Input Buffer (4x)	25
Ultralow Input Ligase	5
QIAseq adaptor	2
DEPC voda	18
Celkový objem [µl]	50

6. Mikrozkušavky byly vloženy do termocykléru C1000 Thermal Cycler s programem pro ligaci adaptorů bez použití vyhřívaného víka (viz **Tabulka 7**).

Tabulka 7: Podmínky programu pro ligaci adaptorů

Cyklus	Teplota	Čas
Ligace adaptorů	25 °C	10 min
	4 °C	∞

7. Po proběhnutí ligace adaptorů byly mikrozkušavky umístěny na led a byla provedena purifikace použitím magnetických kuliček Agencourt AMPure XP.
 - a. Vzorky byly přepipetovány do jamek přečišťovací destičky.
 - b. Ke každému vzorku bylo přidáno 80 µl resuspendovaných magnetických kuliček Agencourt AMPure XP a obsah byl promíchán pipetováním.
 - c. Směs byla inkubována 5 minut při pokojové teplotě.
 - d. Destička byla vložena na magnetický stojánek na 2 minuty a poté byl opatrně odstraněn supernatant.
 - e. Magnetické kuličky byly promyty přidáním 200 µl čerstvého 80% ethanolu do každé jamky.
 - f. Destička byla vložena na magnetický stojánek na 2 minuty a poté byl opatrně odstraněn supernatant.
 - g. Magnetické kuličky byly opět promyty přidáním 200 µl čerstvého 80% ethanolu do každé jamky.

- h. Destička byla vložena na magnetický stojánek na 2 minuty a poté byl opatrně odstraněn supernatant.
 - i. Směs byla inkubována na magnetickém stojanu 5 až 10 minut nebo dokud nebyly magnetické kuličky suché.
 - j. Destička se vzorky byly sundána z magnetického stojanu a magnetické kuličky byly resuspendovány v 52,5 μl Buffer EB.
 - k. Destička byla vložena na magnetický stojánek na 2 minuty a 50 μl supernatantu byl opatrně přenesen do nové jamky na destičce.
8. Byla provedena druhá purifikace použitím magnetických kuliček Agencourt AMPure XP.
- l. Bylo přidáno 50 μl resuspendovaného roztoku magnetických kuliček Agencourt AMPure XP ke každému vzorku a obsah byl důkladně promíchán pipetováním.
 - m. Kroky *h* až *m* byly ještě jednou opakovány, přičemž kuličky byly resuspendovány v 26 μl Buffer EB.
 - n. Destička byla vložena na magnetický stojánek na 2 minuty a 23,5 μl supernatantu bylo opatrně přeneseno do nové PCR mikrozkušavky.
9. Vzorky byly uschovány v mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

8.9.2 Amplifikace DNA knihovny

- 1. Byla připravena reakční směs pro amplifikaci knihovny podle **Tabulky 8**.
- 2. PCR destička byla přenesena do termocykléru CFX96 s programem pro amplifikaci DNA (viz **Tabulka 9**).

Tabulka 8: Reakční směs pro amplifikaci knihovny

Reagencie	Objem pro 1 reakci [μl]
HiFi PCR Master Mix (2x)	25
Primer Mix, (10 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	1,5
Knihovna DNA	23
EvaGreen (20x in water)	0,5
Celkový objem [μl]	50

Tabulka 9: Podmínky amplifikace DNA

Cyklus	Teplota	Čas	Opakování
Počáteční denaturace	98 $^{\circ}\text{C}$	2 min	1x
Denaturace	98 $^{\circ}\text{C}$	20 s	12x
Hybridizace	60 $^{\circ}\text{C}$	30 s	
Elongace	72 $^{\circ}\text{C}$	30 s	
Konečná elongace	72 $^{\circ}\text{C}$	5 min	1x
Chlazení	4 $^{\circ}\text{C}$	∞	1x

- 3. Po proběhnutí amplifikace byly mikrozkušavky umístěny na led a byla provedena purifikace pomocí magnetických kuliček Agencourt AMPure XP.

- a. Vzorky byly přepipetovány na přečišťovací destičku.
 - b. Ke každému vzorku (50 μl) bylo přidáno 50 μl resuspendovaných magnetických kuliček Agencourt AMPure XP a směs byla promíchána pipetováním.
 - c. Směs byla inkubována 5 minut při pokojové teplotě.
 - d. Destička byla na 2 minuty vložena na magnetický stojánek a poté byl odstraněn supernatant.
 - e. Magnetické kuličky se vzorky byly promyty přidáním 200 μl čerstvě připraveného 80% ethanolu.
 - f. Destička byla na 2 minuty vložena na magnetický stojánek a poté byl odstraněn supernatant.
 - g. Magnetické kuličky se vzorky byly promyty přidáním 200 μl 80% ethanolu.
 - h. Destička byla na 2 minuty vložena na magnetický stojánek a poté byl odstraněn supernatant. Směs byla inkubována 5 minut, nebo dokud nebyly kuličky vysušené.
 - i. Destička byla sundána z magnetického stojanu a kuličky byly resuspendovány v 25 μl Buffer EB.
 - j. Destička byla vložena na magnetický stojánek na 2 minuty a poté bylo přeneseno 23 μl supernatantu do nové mikrozkušavky.
4. Vzorky byly uschovány v mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

8.9.3 Kvantifikace knihovny

1. Koncentrace DNA ve vzorcích byla změřena na přístroji Qubit 2.0 Fluorometer (postup viz Příprava DNA, krok č. 2).
2. Kvalita knihovny byla zkontrolována použitím kapilární elektroforézy na přístroji QIAxcel Advanced Systém a reagensí kytu QIAxcel DNA High Resolution Kit, program OL800, injection time 40 s, 2 μl DNA + 8 μl Dilution Buffer.
3. Z elektroforetogramu byla určena průměrná velikost fragmentů po indexaci v jednotlivých vzorcích (Z), z těchto hodnot byla vypočítána průměrná velikost molekuly DNA všech vzorků (F).

8.10 Příprava vzorků na sekvenování

1. Jednotlivé pooly byly připraveny vždy po 10 vzorcích.
2. Z naměřených koncentrací DNA (viz **Kvantifikace knihovny**, krok č. 1) a průměrných velikostí fragmentů byla vypočítána molární koncentrace jednotlivých vzorků dle vzorce:

$$c [\text{nmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}] = \frac{\rho_i [\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}] \cdot 10^6}{660 [\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}] \cdot Z}$$

Legenda: ρ_i = koncentrace DNA vzorku ($\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$); $660 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ je průměrná molární hmotnost jedné báze (1 bp); Z = průměrná velikost fragmentu DNA po indexaci ve vzorku (bp)

3. Pool vzorků byl připraven tak, aby byl každý vzorek zastoupen ve stejném množství (9 nmol/vzorek).
4. Koncentrace poolu byla třikrát zkontrolována na přístroji Qubit 2.0 Fluorometer High Sensitivity (postup viz **Příprava DNA**, krok č. 2) a byla vypočítána jejich průměrná hodnota.
5. Ze zjištěné koncentrace poolu byla podle vzorce vypočítána molarita DNA v poolu.

$$c [\text{nmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}] = \frac{\rho_i [\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}] \cdot 10^6}{660 [\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}] \cdot F}$$

Legenda: ρ_i = koncentrace DNA poolu ($\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$); $660 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ je průměrná molární hmotnost jedné báze (1 bp); F = průměrná velikost molekuly DNA všech vzorků po indexaci (bp)

6. Pool vzorků byl naředěn vodou na koncentraci $2,8 \text{ nmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.
7. Byl připraven roztok NaOH o koncentraci $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ smícháním $10 \mu\text{l}$ NaOH o koncentraci $5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $240 \mu\text{l}$ DEPC vody.
8. K $10 \mu\text{l}$ poolu o koncentraci $2,8 \text{ nmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ bylo přidáno $10 \mu\text{l}$ NaOH o koncentraci $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a směs byla inkubována 5 minut při pokojové teplotě.
9. K $10 \mu\text{l}$ poolu bylo přidáno $990 \mu\text{l}$ HT1.
10. Malé množství poolu bylo osekvenováno na sekvenátoru MiSeq a podle počtu PF čtení bylo množství DNA jednotlivých vzorků adjustováno v poolu knihovny (Illumina MiSeq Reagent Kit v2, 50 cyklů)
11. Adjustovaná knihovna DNA byla osekvenována na přístroji HiSeq 2500 (Illumina HiSeq SBS Rapid Kit, 50 cyklů).

8.11 Zpracování sekvenačních dat z Methyl Capture sekvenování

1. Data získaná po sekvenování byla následně upravena a zpracována Ing. Rastislavem Slavkovským, PhD. Statistická analýza byla provedena Mgr. Janou Vrbkovou, Ph.D. Poté byla provedena analýza filtrovaných methylovaných oblastí.
2. Pro data ve formátu FASTQ byl proveden alignment k referenčnímu lidskému genomu (GRCh37/hg19) pomocí programu BWA do formátu SAM.
3. SAM soubory byly převedeny do formátu BAM v programu SAMtools za použití příkazů: view, sort a index.
 - a. `samtools view -b -s $fp.sam>$fp.bam`
 - b. `samtools sort $fp.bam $(fp)_sort`
 - c. `samtools index $(fp)_sort.bam`
4. Data jednotlivých vzorků byla sloučena v experimentálních skupinách (skupina non-respondenti = N a skupina respondenti = R).
5. Data byla analyzována v programu MACS2 pomocí funkce peak calling, přičemž bylo provedeno porovnání methylačních profilů mezi skupinami, a tak byla zjištěna informace

o poloze píku odpovídající metylované oblasti v rámci experimentální skupiny (poloha píku, vzdálenost od transkripčního počátku, hodnoty p-value a q-value, nejvyšší bod píku).

6. Metylované oblasti byly anotovány pomocí programu vytvořeném ve skriptovacím jazyce Python, který byl vytvořen Ing. Rastislavem Slavkovským, PhD (přiřazení ke genu a lokalizace píku v rámci genu).
7. Pro další analýzu byly vybrány oblasti okolo nejvyššího bodu píku (peak summit, místo s nejvyšším počtem přiřazených čtení), 250 bp v obou směrech od tohoto píku, celková velikost 500 bp. V programu Bedtools byly pro tyto oblasti vygenerovány počty jednotlivých čtení v jednotlivých vzorcích, které byly přiřazeny k této oblasti. Počty čtení byly normalizovány s ohledem na velikost jednotlivých BAM souborů dle následujícího vzorce (kompenzace vlivu různého prosekvenování vzorků).

$$\text{vzorec: } \frac{\text{počet čtení v jednotlivých vzorcích, které byly přiřazeny k dané oblasti}}{\text{velikost FASTQ souboru [kB]}} \cdot 1\,000\,000 \text{ [kB]}$$

8. Byl stanoven počet CpG míst ve vybraných oblastech okolo nejvyššího bodu píku o velikosti 500 bp (Bioinformatics, 2015). Jako vstupná data byly použity sekvence FASTA příslušných oblastí, které byly získány pomocí skriptu `get_sekvences.sh`. Ten byl připraven na základě modifikovaného skriptu, který je dostupný na internetové stránce: <https://bioinformatics.stackexchange.com/questions/2543/way-to-get-genomic-sequences-at-given-coordinates-without-downloading-fasta-file>.
9. Data byla dále statisticky zpracována (stanovení cutpointu, počtu čtení, odlišující pacienty v dané oblasti metylované či nemetylované; stanovení počtu pacientů s hypermethylací/hypomethylací v této oblasti: cut-off high = počet pozorování vyšších než cutpoint; a cut-off low = počet pozorování nižších nebo rovných cutpointu; hodnoty logrank statistiky, p-value a FC (podíl mediánů skupiny cut-off high ku cut-off low)).
10. Data byla filtrována a výstupný soubor genů, v jejichž blízkosti byla detekována hypermethylace, byl následně podroben literární rešerši z dostupných literárních zdrojů. Cílem bylo najít spojitost mezi funkcí těchto genů a procesem angiogeneze.
11. Pro výsledný soubor genů bylo taktéž provedeno hierarchické klastrování v programu MeV (MultiExperiment Viewer), kdy jako hodnoty exprese v rámci jednotlivých vzorků byly zvoleny počty čtení přiřazených do analyzované oblasti daného genu. Byla použita klastrovací metoda nejvzdálenějšího souseda (Complete Linkage) a bloková vzdálenost (Manhattan).

8.12 Analytická validace výsledků

1. Byla provedena analytická validace vybraných methylovaných oblastí. Pro tuto validaci byly vybrány methylované oblasti ležící v blízkosti genů *EN1* a *SFRP2*, jejichž hypermethylace byla detekována ve skupině R.
2. Koordináty určující počátek a konec analyzovaných sekvencí o velikost 500 bp byly použity pro vizualizaci této sekvence v programu IGV (GRCh37/hg19), kde byly porovnány methylační profily všech analyzovaných vzorků a byla sledována poloha tohoto regionu v rámci známých CpG ostrovů a promotorové oblasti příslušícího genu.

8.12.1 Navržení primerů

1. Koordináty určující polohu analyzovaných 500bp úseků DNA byly následně použity pro vizualizaci této oblasti v databázi UCSC Genome Browser (GRCh37/hg19). Pro navržení primerů zde byly získány nové koordináty pro sekvenci DNA o velikosti 1 500 až 2 000 bp.
2. Z databáze UCSC Genome Browser (GRCh37/hg19) byly pomocí těchto koordinát získány sekvence DNA, které byly následně použity v programu MethPrimer 2.0 pro navržení primerů pro bisulfitové sekvenování.
3. Pro každý gen byly navrženy 3 páry primerů pokrývající analyzovaný 500 bp úsek DNA (*EN1_A*, *EN1_B*, *EN1_C*, *SFRP2_A*, *SFRP2_B*, *SFRP2_C*) (viz **Tabulka 10**).

Tabulka 10: Primery pro bisulfitové sekvenování methylovaných oblastí genů *EN1* a *SFRP2*

Primery	Sekvence (5'-3')	Koordináty	Velikost produktu [bp]
EN1_A_F	AGTTGGATTAGGYGGTATTT	chr2:119,607,817-119,607,984	168
EN1_A_R	CACAAAATTCCCAATAACATATTCA		
EN1_B_F	GTGAATAAAATTTGGTTAAAAG	chr2:119,607,540-119,607,768	229
EN1_B_R	TCRGAACCTCCACTACATAAAAA		
EN1_F_C	ATTTAGTTGYGTAGTTTTTGTG	chr2:119,607,371-119,607,506	135
EN1_R_C	ATAAAAAATAATTTAAAACCTATAAATTATC		
SFRP2_A_F	TTTAGTAGGGAGTGGGGAAGTAAG	chr4:154,709,450-154,709,746	297
SFRP2_A_R	GCTAATCATAAAACAATACCACC		
SFRP2_B_F	ATTYGAGGAGGGTTGGTTAT	chr4:154,710,313-154,710,642	330
SFRP2_B_R	CTAACAACCCAACAAAACTT		
SFRP2_C_F	GTTGGGTTGTTAGGTATGAG	chr4:154,710,630-154,710,835	206
SFRP2_C_R	AACACACRGACAACTACTAAA		

8.12.2 Bisulfitová konverze pomocí kitu EZ DNA Methylation-Gold Kit

1. Pro analytickou validaci genů *EN1* a *SFRP2* byly vybrány vzorky s dostatečně vysokou koncentrací DNA (vzorky č. 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 21, 22, 28 a 30).
2. Do PCR mikrozkušavek bylo připraveno 20 μ l DNA jednotlivých vzorků o koncentraci 5 ng· μ l⁻¹ (celkem 100 ng DNA), 20 μ l pozitivní kontroly pro bisulfitovou konverzi

- o koncentraci $25 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ (celkem 500 ng, Universal Methylated DNA Standard) a $16 \mu\text{l}$ negativní kontroly (DEPC voda).
3. Před použitím bylo do zkumavky s CT-Conversion Reagent přidáno $900 \mu\text{l}$ DEPC vody, $300 \mu\text{l}$ M-Dilution Buffer a $50 \mu\text{l}$ M-Dissolving Buffer. Obsah mikrozkušavky byl míchán s častým vortexováním po dobu 10 minut.
 4. Byl připraven roztok M-Wash přidáním 8 ml 100% ethanolu do 2 ml M-Wash Buffer a obsah zkumavky byl promíchán vortexováním.
 5. K $20 \mu\text{l}$ každého vzorku, negativní kontrole a pozitivní kontrole bylo přidáno $130 \mu\text{l}$ CT-Conversion Reagent. Obsah mikrozkušavky byl promíchán pipetováním.
 6. Mikrozkušavky byly vloženy do termocykléru MJ Research PTC-200 s programem pro bisulfitovou konverzi (viz **Tabulka 11**).
 7. Po proběhnutí bisulfitové konverze byly vzorky vyjmuty z termocykléru a umístěny na led.

Tabulka 11: Program pro bisulfitovou konverzi

Krok	Teplota	Čas
1	98 °C	10 min
2	64 °C	150 min
3	4 °C	∞

8. Kolonky Zymo-Spin IC byly umístěny do sběrné zkumavky, do kolonek bylo přidáno $600 \mu\text{l}$ M-Binding Buffer.
9. Bisulfitované vzorky, pozitivní kontrola a negativní kontrola ($150 \mu\text{l}$) byly napipetovány na Zymo-Spin IC kolonku. Vršek kolonky byl uzavřen a obsah byl smíchán otáčením mikrozkušavky.
10. Byla provedena centrifugace ($> 10\,000 \text{ g}/30 \text{ s}$) a poté byla kolonka přemístěna do nové sběrné zkumavky.
11. Do kolonky bylo přidáno $100 \mu\text{l}$ M-Wash Buffer a opět byla provedena centrifugace ($>10\,000 \text{ g}/30 \text{ s}$). Kolonka byla přemístěna do nové sběrné zkumavky.
12. Do kolonky bylo přidáno $200 \mu\text{l}$ M-Desulfonation Buffer a obsah kolonky byl inkubován při pokojové teplotě 20 minut.
13. Byla provedena centrifugace ($> 10\,000 \text{ g}/30 \text{ s}$). Kolonka byla přemístěna do nové sběrné zkumavky.
14. Do kolonky bylo přidáno $200 \mu\text{l}$ M-Wash Buffer a poté byla opět provedena centrifugace ($>10\,000 \text{ g}/30 \text{ s}$).
15. Opět bylo přidáno $200 \mu\text{l}$ M-Wash Buffer a byla provedena centrifugace ($>10\,000 \text{ g}/30 \text{ s}$).
16. Kolonka byla přenesena do nové označené $1,5 \text{ ml}$ zkumavky. Na filtr kolonky bylo napipetováno $10 \mu\text{l}$ M-Elution Buffer a byla provedena eluce centrifugací ($>10\,000 \text{ g}/30 \text{ s}$).
17. Vzorky byly uschovány v mrazáku při -80 °C .

8.12.3 PCR amplifikace bisulfitované DNA

1. Byla provedena gradientová qPCR pro určení optimální teploty nasedání primerů (62 °C, 60 °C, 57 °C, 52,3 °C). Pro optimalizaci byly použity patientské vzorky DNA a DNA buněčné linie K-562 po bisulfitové konverzi, které byly připraveny Veronikou Holinkovou, DiS., z DNA laboratoře ÚMTM (pozn. optimální teplota reverse a forward primerů EN1_A, EN1_C, SFRP2_A a SFRP2_C byla 60 °C, optimální teplota pro nasedání reverse a forward primerů EN1_B byla 57 °C, primery SFRP2_B reverse a forward nevytvořily žádný produkt, proto byly vyřazeny z analýzy).
2. Dále byla provedena optimalizace podmínek qPCR, kdy byl snížen objem reakce z 20 μl na 15 μl a byla zvýšena výsledná koncentrace primerů v reakční směsi z 0,3 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ na 0,4 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.
3. Poté byla provedena PCR amplifikace bisulfitované DNA jednotlivých metylovaných vzorků.
 - a. Byly připraveny reakční směsi (viz **Tabulka 12**) pro jednotlivé primery pro amplifikaci 17 vzorků (14 vzorků pro validaci, negativní kontrola a pozitivní kontrola po bisulfitové konverzi, komerční bisulfitovaná pozitivní kontrola Bisulfite-Converted Universal Methylated Human DNA Standard).
 - b. Do PCR mikrozkušavek bylo k 14,5 μl reakční směsi přidáno 0,5 μl DNA vzorku či kontroly. Mikrozkušavky byly krátce vortexovány a stočeny na minicentrifuze, poté byly vloženy do termocykléru CFX96 a byl spuštěn program pro amplifikaci bisulfitované DNA (viz **Tabulka 13**).

Tabulka 12: Reakční směs pro amplifikaci bisulfitové DNA

Reagencie	Objem pro 1 reakci [μl]
KAPA HiFi HS Uracil + RM (2x)	7,5
EvaGreen Dye (20x in water)	0,5
DEPC voda	5,3
Primer R (10 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	0,6
Primer F (10 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	0,6
Celkový objem	14,5

Tabulka 13: Podmínky qPCR pro amplifikaci bisulfitované DNA

Cyklus	Teplota	Čas	Opakování
Počáteční denaturace	95 °C	3 min	1x
Denaturace	98 °C	20 s	40x
Hybridizace	57 °C/60 °C	30 s	
Elongace	60 °C	45 s	
Konečná elongace	72 °C	1 min	1x
Teplota tání PCR produktů	60 °C - 95 °C	5 s	1x
Chlazení	10 °C	10 min	1x

4. Po skončení PCR amplifikace byla velikost produktů zkontrolována pomocí kapilárové elektroforézy na přístroji QIAxcel Advanced Systém a reagensí kitu QIAxcel DNA High Resolution Kit, program OL500, injection time 20 s, 2 μ l DNA + 8 μ l Dilution Buffer.
5. Z důvodu nepřítomnosti PCR produktu byla u některých vzorků PCR amplifikace opakována.
 - a. V případě primerů pro EN1_B byla PCR amplifikace opakována u vzorků 6, 7, 9, 12, 14, přičemž podmínky reakce nebyly změněny.
 - b. V případě primerů pro SFRP2A byla PCR amplifikace opakována u vzorků 7, 9, 11, 12, 13, 17, 19, 21, 22 a 28, přičemž byl zvýšen objem vložené DNA vzorku na 1,5 μ l.
 - c. V případě primerů pro SFRP2C byla PCR amplifikace opakována u vzorků 7, 9, 11, 12, 14, 30, přičemž byl zvýšen objem vložené DNA vzorku na 1 μ l.
6. Velikost PCR produktu byla opět zkontrolována pomocí kapilárové elektroforézy na přístroji QIAxcel Advanced Systém a reagensí kitu QIAxcel DNA High Resolution Kit, program OL500, injection time 20 s, 2 μ l DNA + 8 μ l Dilution Buffer.

8.13 Přečištění ampliconů pomocí kitu QIAquick PCR Purification Kit

1. Produkty amplifikace pomocí primerů EN1_A, EN1_B, EN1_C, SFRP2_A a SFRP2_C byly v rámci jednotlivých vzorků sjednoceny.
2. Ke vzorku byl přidán 10x objem roztoku Buffer PB a obsah mikrozkušavky byl promíchán vortexováním a poté stočen v minicentrifuze.
3. Vzorek byl přenesen na QUAquick kolonku umístěnou ve sběrné 2 ml mikrozkušavce.
4. Byla provedena centrifugace (12 100 g/ 60 s).
5. Supernatant byl ze sběrné mikrozkušavky odstraněn a kolonka byla umístěna zpět do sběrné mikrozkušavky.
6. Na kolonku bylo přidáno 750 μ l Buffer PE a poté byla provedena centrifugace (12 100 g/60 s).
7. Supernatant byl opět ze sběrné mikrozkušavky odstraněn a kolonka byla umístěna zpět do sběrné mikrozkušavky.
8. Pro odstranění veškeré tekutiny byla provedena další centrifugace (12 100 g/60 s).
9. Supernatant byl ze sběrné mikrozkušavky odstraněn a kolonka byla umístěna do nové 1,5 ml mikrozkušavky.
10. Na střed kolonky bylo přidáno 30 μ l Buffer EB a obsah mikrozkušavky byl inkubován 1 minutu při pokojové teplotě.
11. Byla provedena eluce DNA centrifugací (12 100 g/60 s).
12. Koncentrace DNA byla změřena na přístroji Qubit 2.0 Fluorometer (postup viz **Příprava DNA**, krok č. 2).

8.14 Tagmentace s použitím kitu Nextera XT Sample Prep Kit

1. Do PCR mikrozkušavky bylo připraveno 2,5 μl DNA o koncentraci 0,2 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ (0,5 ng DNA). Bylo přidáno 5 μl TD a 5 μl ATM.
2. Mikrozkušavky byly vloženy do termocykléru C1000 Thermal Cycler a byl spuštěn program tagmentace Nextera XT (viz **Tabulka 14**).
3. Ke každému vzorku bylo přidáno 2,5 μl NT, 7,5 μl NPM a 2,5 μl indexů.
4. Mikrozkušavky byly umístěny do termocykléru C1000 Thermal Cycler a byl spuštěn program PCR amplifikace tagmentované DNA (viz **Tabulka 15**).
5. Koncentrace DNA ve vzorcích byla změřena na přístroji Qubit 2.0 Fluorometer High Sensitivity (postup viz **Příprava DNA**, krok č. 2).

Tabulka 14: Podmínky tagmentace Nextera XT

Cyklus	Teplota	Čas	Opakování
1	55 °C	5 min	1x
2	10 °C	60 min	1x

Tabulka 15: Podmínky PCR amplifikace tagmentované DNA

Cyklus	Teplota	Čas	Opakování
1	72 °C	3 min	1x
2	95 °C	30 s	16x
3	95 °C	10 s	
4	55 °C	30 s	
5	72 °C	30 s	
6	72 °C	5 min	1x
7	72 °C	∞	1x

6. Produkty amplifikace DNA byly přečištěny pomocí kitu QIAquick PCR Purification (postup viz **Přečištění ampliconů pomocí kitu QIAquick PCR Purification Kit**).
7. Koncentrace DNA ve vzorcích byla změřena na přístroji Qubit 2.0 Fluorometer High Sensitivity (postup viz **Příprava DNA**, krok č. 2).

8.15 Příprava vzorků na sekvenování

1. Z naměřených koncentrací DNA byly vypočítána molarita DNA v jednotlivých vzorcích dle následujícího vzorce.

$$c [\text{nmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}] = \frac{\rho_i [\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}] \cdot 10^6}{660 [\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}] \cdot 250}$$

Legenda: ρ_i = koncentrace DNA vzorku po tagmentaci a přečištění ($\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$); 660 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ = průměrná molární hmotnost jedné báze (1 bp); 250 = průměrná velikost molekuly DNA po tagmentaci (bp)

2. Pool vzorků byl připraven tak, aby byl každý vzorek zastoupen ve stejném množství (20 nmol/vzorek).

- Koncentrace poolu byla třikrát zkontrolována na přístroji Qubit 2.0 Fluorometer High Sensitivity (postup viz **Příprava DNA**, krok č. 2) a byla vypočítána jejich průměrná hodnota.
- Ze zjištěné koncentrace poolu byla podle vzorce vypočítána molarita DNA v poolu.

$$c [\text{nmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}] = \frac{\rho_i [\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}] \cdot 10^6}{660 [\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}] \cdot 250}$$

Legenda: ρ_i = koncentrace DNA vzorku po tagmentaci a přečištění ($\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$); $660 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ = průměrná molární hmotnost jedné báze (1 bp); 250 = průměrná velikost molekuly DNA po tagmentaci (bp)

- Pool vzorků byla naředěn DEPC vodou na koncentraci $2 \text{ nmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.
- Byl připraven roztok NaOH o koncentraci $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ smícháním $10 \mu\text{l}$ NaOH o koncentraci $5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $240 \mu\text{l}$ DEPC vody.
- K $10 \mu\text{l}$ poolu o koncentraci $2 \text{ nmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ bylo přidáno $10 \mu\text{l}$ NaOH o koncentraci $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a směs byla inkubována 5 minut při pokojové teplotě.
- K $10 \mu\text{l}$ poolu bylo přidáno $990 \mu\text{l}$ HT1.
- Knihovna DNA byla osekvenována na přístroji MiSeq (MiSeq Reagent Kit v3, 150 cyklů).

8.16 Zpracování sekvenačních dat z bisulfitového sekvenování

- Pro vygenerovaná data ve formátu FASTQ byl proveden alignment k referenčnímu genomu v programu Bismark, byl použit níže uvedený příkaz. Tento krok byl proveden Ing. Rastislavem Slavkovským, PhD.

```
FILES=/*1_001.fastq.gz
for f in $FILES
do
f2=${f%.*}
fp=${f2%.*}
filename=${fp::-5}
echo "Processing $f file to $f.bam"→
././bismark --bowtie2 --multicore 2 --non-directional -p 4 --path_to_bowtie /home/rasta/Desktop/bowtie2-2.2.8 -n 1 -l 28 /home/rasta/Desktop/bwa/bwa-0.7.12/hg19 -1 ${filename}1_001.fastq.gz -2
${filename}2_001.fastq.gz
done
```

- Data ve formátu *.txt vygenerovaná z programu Bismark Methylation Extractor pomocí níže uvedeného příkazu byla vizualizována v programu SeqMonk.

```
FILES=/*001.fastq.gz_bismark_bt2_pe.bam
for f in $FILES
do
echo "Processing $f file to $f.txt"
bismark_methylation_extractor -p --multicore 10 --merge_non_CpG $f
done
```

- Byla provedena kvantifikace methylace CpG míst v osekvenovaných oblastí genů *EN1* a *SFRP2*.
 - Nejdříve byla provedena kvantifikace celých oblastí jednotlivých ampliconů (*EN1_A*, *EN1_B*, *EN1_C*, *SFRP2_A* a *SFRP2_B*).

- b. Poté byly sekvence některých amplikonů rozděleny na dvě části a byla provedena kvantifikace methylace CpG míst, tento krok byl proveden z důvodu přítomnosti diference v methylaci dané oblasti v rámci jednoho vzorku (viz **Tabulka 16**).

Tabulka 16: Koordináty úseků methylovaných oblastí genů *EN1* a *SFRP2* v programu SeqMonk

Oblast	Koordináty
EN1_A	chr2:119,607,817-119,607,984
EN1_B	chr2:119,607,540-119,607,768
EN1_B_1	chr2:119,607,540-119,607,595
EN1_B_2	chr2:119,607,596-119,607,768
EN1_C	chr2:119,607,371-119,607,506
EN1_C_1	chr2:119,607,371-119,607,435
EN1_C_2	chr2:119,607,436-119,607,506
SFRP2_A	chr4:154,709,450-154,709,746
SFRP2_A_1	chr4:154,709,450-154,709,530
SFRP2_A_2	chr4:154,709,531-154,709,746
SFRP2_C	chr4:154,710,630-154,710,835
SFRP2_C_1	chr4:154,710,630-154,710,774
SFRP2_C_2	chr4:154,710,775-154,710,835

4. Pro korelační analýzu výsledků z Methyl Capture sekvenování a bisulfitového sekvenování byly v programu Bedtools pro výše definované oblasti vygenerovány počty jednotlivých čtení v jednotlivých vzorcích, které byly přiřazeny k této sekvenci. Počty čtení byly normalizovány s ohledem na velikost jednotlivých BAM souborů z Methyl Capture sekvenování dle následujícího vzorce (kompenzace vlivu různého prosekvenování vzorků).

$$\text{vzorec: } \frac{\text{počet čtení v jednotlivých vzorcích, které byly přiřazeny k dané oblasti}}{\text{velikost FASTQ souboru [kB]}} \cdot 1\,000\,000 \text{ [kB]}$$

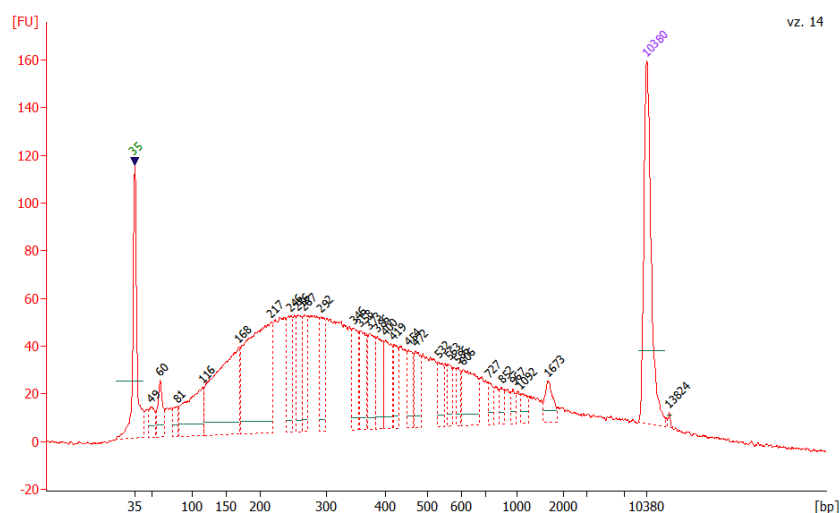
5. Byla provedena korelační analýza, kdy byly do grafu naneseny hodnoty počtu čtení mapované do analyzované oblasti (Methyl Capture sekvenování) a hodnoty methylace CpG míst získané z programu SeqMonk (bisulfitové sekvenování).

10 Výsledky

Pro studii byl vybrán soubor 31 pacientů s kolorektálním karcinomem, kteří byli léčeni chemoterapeutickou látkou bevacizumab (Avastin). Patnáct FFPE vzorků DNA (vzorky č. 1-15) bylo odebráno pacientům, u kterých nebyla detekována odpověď na léčbu, a tedy vykazovali rezistenci vůči bevacizumabu (skupina non-respondenti – N), zbývajících šestnáct vzorků (vzorky č. 16-31) patřilo pacientům, kteří vykazovali pozitivní odpověď na léčbu (skupina respondenti – R). Ve vzorcích DNA byl studován methylační profil genomu. Pomocí metody Methyl Capture byly ve vzorcích obohaceny methylované oblasti DNA a patientská DNA byla následně připravena pro sekvenování na platformě Illumina HiSeq 2500. Výsledky methylační analýzy Methyl Capture sekvenování byly následně validovány pomocí bisulfitového sekvenování na přístroji MiSeq.

10.1 Methyl Capture sekvenování

Vyizolovaná patientská DNA byla fragmentována sonikací tak, aby vznikly fragmenty o velikosti přibližně 300 až 500 bp (viz **Obrázek 18**). Vzorek č. 25 byl z další analýzy vyřazen z důvodu nízké koncentrace DNA po fragmentaci a nepřítomnosti DNA na elektroforetogramu.



Obrázek 18: Separované fragmenty DNA vzorku č. 14 pomocí kapilárové elektroforézy na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer

Methylované fragmenty DNA byly vychtány na magnetických kuličkách pomocí principu Methyl Capture a kitu MethylMiner Methylated DNA Enrichment Kit (Invitrogen). Kvalita obohacené methylované DNA byla stanovena pomocí metody qPCR se specifickými primery pro methylovanou a nemethylovanou kontrolní DNA (*spike-in* kontrola). Přítomnost methylované a nemethylované DNA byla kontrolována ve všech eluovaných frakcích jednotlivých vzorků, přičemž methylovaná DNA byla nejvíce obsažena ve frakci označené jako frakce methylované DNA. Naopak ve frakci nemethylované DNA byla v nejvyšší míře přítomna nemethylovaná DNA a ve frakci 1x Wash Buffer se v různých podílech vyskytovala methylovaná i nemethylovaná DNA (viz **Tabulka 17**). Vzorek č. 10 byl z další

analýzy vyřazen z důvodu nedostatečného obohacení kontrolní metylované DNA ve frakci metylované DNA.

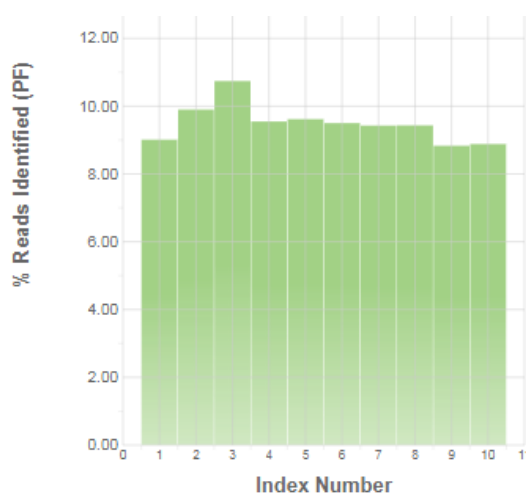
Tabulka 17: Zastoupení metylované a nemetylované kontrolní DNA ve frakci nemetylované DNA, 1x Wash a metylované DNA v jednotlivých vzorcích

Vzorek	Frakce nemetylované DNA		Frakce 1x Wash Buffer		Frakce metylované DNA	
	Podíl z celkového počtu detekovaných kopií <i>spike-in</i> DNA kontroly		Podíl z celkového počtu detekovaných kopií <i>spike-in</i> DNA kontroly		Podíl z celkového počtu detekovaných kopií <i>spike-in</i> DNA kontroly	
	NM	M	NM	M	NM	M
1	98,1%	1,9%	43,7%	56,3%	0,3%	99,7%
2	93,3%	6,7%	30,1%	69,9%	0,1%	99,9%
3	88,8%	11,2%	20,6%	79,4%	0,1%	99,9%
4	94,4%	5,6%	50,0%	50,0%	0,1%	99,9%
5	96,5%	3,5%	29,1%	70,9%	0,1%	99,9%
6	93,9%	6,1%	26,9%	73,1%	0,2%	99,8%
7	93,8%	6,2%	18,1%	81,9%	0,1%	99,9%
8	95,2%	4,8%	25,0%	75,0%	0,0%	100,0%
9	94,4%	5,6%	40,9%	59,1%	0,2%	99,8%
10	96,0%	4,0%	90,4%	9,6%	75,8%	24,2%
11	80,2%	19,8%	2,5%	97,5%	0,0%	100,0%
12	79,9%	20,1%	3,6%	96,4%	0,0%	100,0%
13	92,2%	7,8%	5,9%	94,1%	0,1%	99,9%
14	83,1%	16,9%	4,0%	96,0%	0,0%	100,0%
15	87,0%	13,0%	2,1%	97,9%	0,0%	100,0%
16	95,3%	4,7%	8,8%	91,2%	0,0%	100,0%
17	89,7%	10,3%	5,0%	95,0%	0,0%	100,0%
18	96,9%	3,1%	47,5%	52,5%	0,1%	99,9%
19	93,6%	6,4%	7,5%	92,5%	0,1%	99,9%
19b	87,2%	12,8%	11,7%	88,3%	0,1%	99,9%
20	98,6%	1,4%	56,9%	43,1%	0,2%	99,8%
21	84,6%	15,4%	1,7%	98,3%	0,1%	99,9%
22	91,7%	8,3%	7,4%	92,6%	0,0%	100,0%
23	95,8%	4,2%	47,5%	52,5%	0,1%	99,9%
24	92,6%	7,4%	19,5%	80,5%	0,1%	99,9%
26	95,1%	4,9%	34,5%	65,5%	0,1%	99,9%
27	94,7%	5,3%	29,6%	70,4%	0,1%	99,9%
28	99,2%	0,8%	69,6%	30,4%	0,4%	99,6%
29	95,9%	4,1%	29,5%	70,5%	0,2%	99,8%
30	97,0%	3,0%	48,1%	51,9%	0,1%	99,9%
31	96,8%	3,2%	31,9%	68,1%	0,1%	99,9%

Legenda: vzorky č. 1-15 = skupina pacientů non-respondenti; vzorky č. 16-31 = skupina pacientů respondenti; NM = nemetylovaná *spike-in* DNA kontrola; M = metylovaná *spike-in* DNA kontrola

Ze vzorků s obohacenými methylovanými fragmenty DNA byly následně připraveny knihovny pomocí postupu a reagentů kitu QIAseq™ Ultralow Input Library Kit (QIAGEN). Pro další analýzu byly vzorky rozděleny do třech skupin vždy po deseti vzorcích a připravené knihovny byly osekvenovány na přístroji HiSeq 2500 pomocí kitů HiSeq Rapid SBS Kit (Illumina) a HiSeq Rapid SR Cluster Kit v2 (Illumina), 1 x 50 bp. Pro zobrazení průběhu a kvality sekvenování jsou dále uvedeny informace o sekvenačním běhu knihovny 3 (vzorky č. 6, 7, 8, 9, 26, 27, 28, 29, 30, 31).

Statistické přiřazení identifikovaných čtení k jednotlivým vzorkům, která prošla interním filtrem kvality (PF; Passing Filter), je zobrazeno na **Obrázku 19**. Z údajů uvedených na obrázku lze vidět, že vzorky dosahují přibližně stejné hodnoty PF. Z toho vyplývá, že průběh sekvenování byl u všech vzorků obdobný, přičemž můžeme předpokládat, že během něj nedocházelo ke vzniku artefaktů.



Obrázek 19: Identifikovaná čtení u jednotlivých vzorků knihovny 3 na dráze č. 1 reakční průtokové komůrky.

Legenda: Index number = číslo indexu přiřazeného ke každému vzorku (Index 1 = vzorek č. 6, Index 2 = vzorek č. 7, Index 3 = vzorek č. 8, Index 4 = vzorek č. 9, Index 5 = vzorek č. 26, Index 6 = vzorek č. 27, Index 7 = vzorek č. 28, Index 8 = vzorek č. 29, Index 9 = vzorek č. 30, Index 10 = vzorek č. 31); % Reads Identified (PF) = procento čtení mapovaných k jednotlivým vzorkům, která prošla vnitřním filtrem kvality (PF) (dráha č. 1 na reakční průtokové komůrce)

Informace o hodnotách parametrů sekvenování knihovny 3 vypovídající o jeho kvalitě a výkonnosti jsou uvedeny v **Tabulce 18**. Během sekvenačního běhu bylo osekvenováno 67 bází (započítány sekvence indexů 2 x 8 bází). Na každé dráze bylo na ploše o velikosti 1 mm² vytvořeno přibližně **100 000 klastrů**, přičemž v obou případech asi 93 % klastrů prošlo vnitřním filtrem kvality. Na dráze č. 1 bylo vygenerováno 186 491 600 čtení, přičemž 173 076 176 čtení prošlo vnitřním filtrem kvality. Na dráze č. 2 bylo celkem vyprodukováno 189 863 808 čtení a filtrem kvality prošlo 173 773 072 čtení. Z těchto čtení přibližně 96,2 % mělo hodnotu kvality vyšší než 30. Celkový výtěžek sekvenování po započítání sekvencí obou indexů byl **22,33 Gb**. V případě, že během sekvenování dalších knihoven nebylo dosaženo hustoty klastrů **minimálně 100 000/1 mm²**, byly vzorky dosekvenovány v dalším sekvenačním běhu. Poté byla data z těchto sekvenování v rámci vzorku sloučena.

Tabulka 18: Výstupní hodnoty ze sekvenování knihovny 3

Dráha	Počet cyklů (s indexy)	Hustota klastrů (K/mm ²)	Klastr PF (%)	Celkový počet čtení	Počet čtení PF	% ≥ Q30	Celkový výtěžek [Gb]
1	67	1 007 ± 99	92,97 ± 1,85	186 491 600	173 076 176	96,29	22,33
2	67	1 025 ± 97	92,74 ± 1,81	189 863 808	175 773 072	96,22	

Legenda: Počet cyklů = počet osekvenovaných bází (i s indexy 2 x 8 bází); Hustota klastrů = počet klastrů na ploše 1 mm²; K = 1 000; Klastr PF = počet klastrů, které prošly vnitřním filtrem kvality (PF) (uvedeno v procentech); Celkový počet čtení = počet čtení vygenerovaných na jedné dráze reakční průtokové komůrky; Počet čtení PF = čtení, která prošla vnitřním filtrem kvality (PF); % ≥ Q30 = čtení, které mají hodnotu kvality vyšší než 30 (nezahrnuté hodnoty kvality čtení sekvencí indexů); Celkový výtěžek = počet osekvenovaných bází (zahrnuté i sekvence indexů)

10.2 Analýza a anotace dat z Methyl Capture sekvenování

Pro data vyprodukovaná sekvenováním ve formátu FASTQ byl v programu BWA proveden alignment k referenčnímu genomu (GRCh37/hg19) a vzniklé SAM soubory byly převedeny do formátu BAM (program SAMtools). Získaná data byla v rámci skupiny spojena do jednoho souboru (N/R) a pro vzniklé dvě skupiny byl proveden v programu MACS2 peak calling, kde byly analyzované skupiny a jejich methylační profily porovnány mezi sebou (skupina respondenti vs skupina non-respondenti a naopak). Rozdíly v methylaci byly analyzovány na základě odlišností v počtu čtení přiřazených k daným oblastem. Tímto způsobem byly diferencielně methylované regiony identifikovány jako píky zobrazující čtení přiřazená k dané oblasti v genomu, ve zkoumané skupině oproti skupině druhé, a získány informace o jejich přesné poloze v genomu.

V analýze skupiny N vůči skupině R bylo vygenerováno 63 427 hypermethylovaných oblastí (hypermethylace ve skupině N), v analýze skupiny R vs skupině N bylo identifikováno 43 437 hypermethylovaných oblastí ve skupině R (viz **Tabulka 19**).

Tabulka 19: Počet píků vygenerovaných v programu MACS2 pomocí funkce peak calling při porovnání methylačních profilů mezi skupinami s parametrem q-value cutoff 0,001

Analýza peak calling	Počet píků ve vzorku
Skupina N vs skupina R (non-respondenti vs respondenti)	63 427
Skupina R vs skupina N (respondenti vs non-respondenti)	43 437

Informace o identifikaci vzorků a klíčových parametrech provedené analýzy uvedené v hlavičkové části výstupního souboru z programu MACS2 jsou zobrazeny v **Tabulce 20**.

Tabulka 20: Hlavička výstupního souboru z programu MACS2 – analýza skupiny non-respondenti (N) vůči skupině respondenti (R)

```
# This file is generated by MACS version 2.0.9 20111102 (tag:alpha)
# ARGUMENTS LIST:
# name = sk1_vs_sk2odp_q0001
# format = BAM
# ChIP-seq file = sk1_sort.bam
# control file = sk2-odp_sort.bam
# effective genome size = 2.70e+09
# band width = 300
# model fold = 10,30
# qvalue cutoff = 1.00e-03
# Larger dataset will be scaled towards smaller dataset.
# Range for calculating regional lambda is: 1000 bps and 10000 bps
# Broad region calling is off
# tag size is determined as 53 bps
# total tags in treatment: 349283547
# tags after filtering in treatment: 251664672
# maximum duplicate tags at the same position in treatment = 4
# Redundant rate in treatment: 0.28
# total tags in control: 492176306
# tags after filtering in control: 370768515
# maximum duplicate tags at the same position in control = 4
# Redundant rate in control: 0.25
# d = 63
```

Legenda: name = název; formát = formát, ve kterém je soubor vkládán; ChIP-seq file = analyzovaný soubor; control file = kontrolní soubor, se kterým je vkládáný soubor porovnáván; effective genome size = velikost genomu po odstranění repetitivních elementů; bandwidth = velikost fragmentů DNA po sonikaci; model fold = parametr definující charakteristiku píku; total tags = počet čtení; tag size = velikost čtení; q-value cutoff = hodnoty q-value (-log10), které jsou z analýzy vyřazeny; redundant rate = část čtení, která jsou nadbytečná a proto vyřazena z analýzy

V **Tabulce 21** jsou uvedena částečná data získaná prostřednictvím funkce peak calling v programu MACS2. Byla vybrána data prvních pěti záznamů z výstupního souboru analýzy porovnání methylačních profilů skupiny N vůči skupině R, kde R sloužila jako kontrola, vůči které byly detekovány rozdíly v methylaci. V tabulce jsou uvedeny informace o poloze píku na chromozomu (chromosome, start, end), délce píku (length) a místě, kde se nachází nejvyšší bod píku (abs summit, bod s nevyšším počtem přiřazených čtení v rámci píku). Dále je uvedena hodnota pileup, která udává počet čtení přiřazených k identifikované methylované oblasti, a fold enrichment, která charakterizuje obohacení methylace v analyzované skupině oproti skupině kontrolní. Se zvyšující se hodnotou pileup roste i významnost píku. P-value a q-value jsou statistické hodnoty, které udávají míru věrohodnosti detekovaných piků, přičemž hodnota q roste se zvyšující se hodnotou p .

Tabulka 21: Částečný výstup porovnání methylačních profilů skupiny non-respondenti (N) vůči skupině respondenti (R) z programu MACS2

Chromosome	Start	End	Length	Abs summit	Pileup	p-value	Fold enrichment	q-value
chr1	129622	129684	63	129656	38	6,8	2,54	4,37
chr1	170959	171027	69	171015	69	8,41	2,16	5,74
chr1	249509	249573	65	249530	91	8,74	1,97	6,02
chr1	415156	415237	82	415179	30	10,98	4,42	7,97
chr1	564694	564803	110	564731	399	16,62	1,57	12,96

Legenda: Chromosome = chromozom; Start = místo počátku píku; End = místo konce píku; Length = délka píku; Abs summit = místo, ve kterém se nachází nejvyšší bod píku; Pileup = počet detekovaných čtení přiřazených k jedné oblasti DNA; p-value = míra statistické věrohodnosti detekovaných píků; Fold enrichment = bohatství methylace dané oblasti DNA oproti DNA v kontrolní experimentální skupině; q-value = míra statistické věrohodnosti detekovaných píků

Hypermetylované oblasti byly následně anotovány, přičemž dané oblasti byly přiřazeny k nejbližší umístěným genům a byl doplněn název a zkratka genu. Dále byla stanovena přesná poloha píku v rámci sktruktury genu (před genem, uvnitř genu). Anotace dále obsahuje informace o poloze transkripčního počátku, transkripčního konce a start kodonu příslušného genu, absolutní vzdálenost okraje píku od první báze v sekvenci transkripčního počátku nebo transkripčního konce v závislosti na orientaci vlákna DNA. Gen ležící na vlákně s orientací „+“ má místo začátku transkripce v místě označeném jako Tx start. Naopak gen, který leží na opačně orientovaném vlákně („-“), má reálně počátek transkripce v místě označeném jako Tx end.

Pro další anotaci detekovaných píků byly získány koordináty vyznačující cílovou sekvenci o velikosti 500 bp se středem v peak summit, bodě s nejvyšším počtem přiřazených čtení v rámci píku (250 bp upstream a 250 bp downstream). Celková vzdálenost 500 bp byla vybrána na základě údajů o délce CpG ostrovů (Takai *et* Jones; 2002; Han *et* Zhao; 2009). Pomocí programu Bedtools byly vygenerovány počty methylovaných čtení v jednotlivých vzorcích pro výše identifikované oblasti. Tyto počty čtení byly normalizovány s ohledem na velikost jednotlivých BAM souborů, aby se vykompenzoval vliv nižšího prosekvenování některých vzorků.

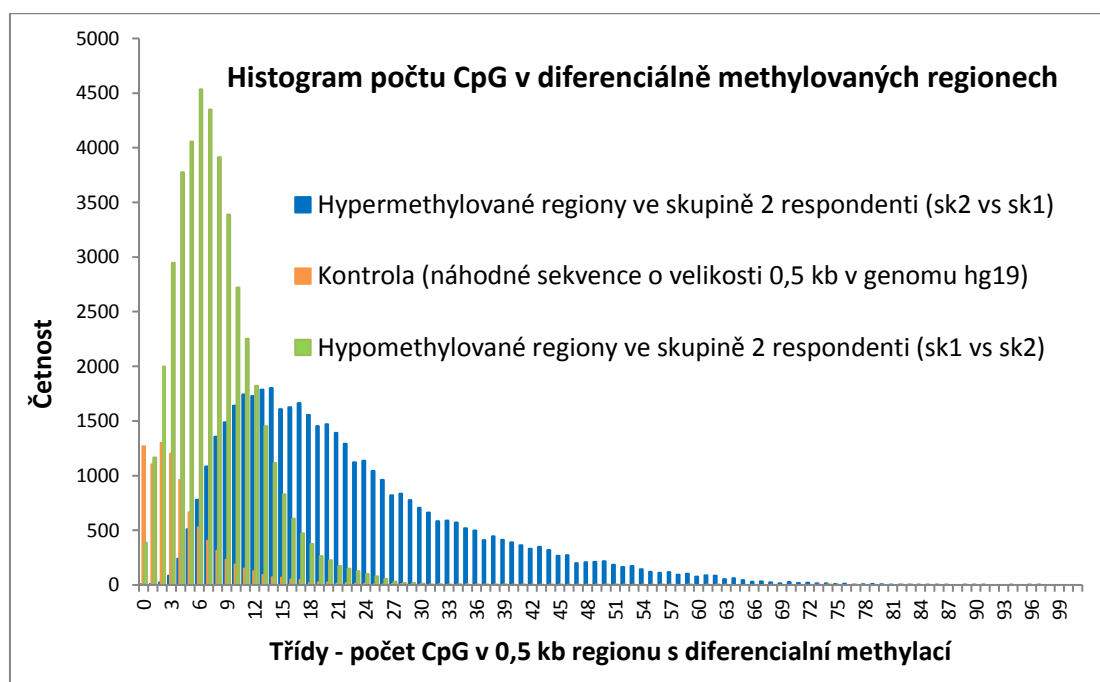
Tyto koordináty byly taktéž použity pro stanovení počtu CpG dinukleotidů ve vyznačených sekvencích DNA.

V dalším kroku byla tato anotovaná a normalizovaná data statisticky zpracována Mgr. Janou Vrbkovou, Ph.D. Pro každou oblast byla z počtu čtení v dané oblasti stanovena hodnota cutpointu (počet čtení), odlišující pacienty dále označované jako v dané oblasti methylované od nemethylovaných a jejich počty (cut-off high = počet pozorování vyšších než cutpoint a cut-off low = počet pozorování nižší nebo roven cutpointu). Dále byly stanoveny hodnoty logrank statistiky, p-value a FC (podíl mediánů skupiny cut-off high ku cut-off low).

Pro analýzu methylomu studovaných skupin pacientů byla zvolena následující kritéria pro filtraci získaných výsledků.

- Absolutní vzdálenost okraje methylované oblasti od první báze transkripčního počátku je menší nebo rovna 2 500 bp (Ma *et* Dinesh-Kumar, 2017).
- Oblasti náležící ke strukturním genům, označovaným podle RefSeq kategorií jako NM.
- Byly vybrány oblasti lokalizované před genem, protože to jsou oblasti, kde se může methylace projevit na promotoru.
- P-value je menší nebo rovna 0,05, což poskytuje výsledky s 95% jistotou správnosti.
- Hodnota FC je větší nebo rovna 5, což představuje pětinasobné zvýšení methylace ve zkoumané skupině oproti skupině druhé.
- Počet CpG míst je větší nebo roven 25 u analýzy hypermethylace respondentů (peak calling skupiny R vs skupiny N) a větší nebo roven 9 u analýzy hypomethylace respondentů (peak calling skupiny N vs skupiny R). Tyto hodnoty byly stanoveny na základě rozložení počtu CpG míst v diferencially methylovaných regionech (viz **Graf 1**). U hypermethylovaných i hypomethylovaných oblastí byla hodnota filtru nastavena tak, aby zůstala alespoň 1/3 regionů (36,8% a 37,6 %) s nejvyšším počtem CpG.

Graf 1: Rozložení počtu CpG míst v diferencially methylovaných regionech



10.2.1 Hypermethylace ve skupině non-respondenti (N)

S využitím výše uvedených filtračních kritérií bylo získáno 24 genů hypermetylovaných ve skupině N (hypometylovaných ve skupině R) (viz **Tabulka 22**). Vzhledem k nízkému počtu genů nebylo možné provést analýzu genové ontologie v programu DAVID, a proto byly všechny podrobeny literární rešerši.

Tabulka 22: Geny hypermetylované ve skupině non-respondenti (N) vybrané pro literární rešerši

Geny hypermetylované ve skupině non-respondenti (N)				
<i>ATP12A</i>	<i>DUSP21</i>	<i>LAMP1</i>	<i>NPY5R</i>	<i>TIMM50</i>
<i>ATXNIL</i>	<i>HK2</i>	<i>MRPL38</i>	<i>PLA2G10</i>	<i>ZDHHC9</i>
<i>CAV2</i>	<i>ISM2</i>	<i>MTRNR2L8</i>	<i>RNF126</i>	<i>ZNF483</i>
<i>CYP4X1</i>	<i>KIF16B</i>	<i>NGFRAP1</i>	<i>SMIM9</i>	<i>ZNF98</i>
<i>DDIT4</i>	<i>KSR2</i>	<i>NOMO1</i>	<i>SMTN</i>	

Legenda: *ATP12A* = ATPase H+/K+ Transporting Non-Gastric Alpha2 Subunit; *ATXNIL* = Ataxin 1 Like; *CAV2* = Caveolin 2; *CYP4X1* = Cytochrome P450 Family 4 Subfamily X Member 1; *DDIT4* = DNA Damage Inducible Transcript 4; *DUSP21* = Dual Specificity Phosphatase 21; *HK2* = Hexokinase 2; *ISM2* = Isthmin 2; *KIF16B* = Kinesin Family Member 16B; *KSR2* = Kinase Suppressor of Ras 2; *LAMP1* = Lysosomal-Associated Membrane Protein 1; *MRPL38* = Mitochondrial Ribosomal Protein L38; *MTRNR2L8* = MT-RNR2-Like 8; *NGFRAP1* = Nerve Growth Factor Receptor-Associated Protein 1; *NOMO1* = NODAL Modulator 1; *NPY5R* = Neuropeptide Y Receptor Y5; *PLA2G10* = Phospholipase A2 Group X; *RNF126* = Ring Finger Protein 126; *SMIM9* = Small Integral Membrane Protein 9; *SMTN* = Smoothelin; *TIMM50* = Translocase of Inner Mitochondrial Membrane 50; *ZDHHC9* = Zinc Finger DHHC-Type Containing 9; *ZNF483/98* = Zinc Finger Protein 483/98

U těchto genů bylo posuzováno, zdali jejich mechanismus účinku umožňuje zasahovat do procesu angiogeneze a mechanismu účinku bevacizumabu. Byly použity dostupné literární zdroje (například Morrow *et al.*, 2007; Tong *et al.*, 2011). Na základě získaných informací byl vytipován 1 gen (*ATXNIL*; Ataxin 1 Like), hypermetylovaný ve skupině N, který by mohl mít roli ve vzniku rezistence pacientů s CRC vůči léčbě bevacizumabem. U genu *ATXNIL* byla zjištěna aktivita související s antiangiogenní dráhou, proto je předpokládáno, že při jeho vypnutí v důsledku hypermethylace promotorové oblasti je tato antiangiogenní aktivita potlačena a i přes podání bevacizumabu tvorba nových kapilár probíhá.

10.2.2 Hypermethylace ve skupině respondenti (R)

S využitím výše uvedených filtračních kritérií bylo získáno 299 oblastí hypermetylovaných ve skupině R respondenti (hypometylovaných ve skupině N), které byly anotovány k příslušným genům. K některým genům bylo v některých případech přiřazeno několik oblastí. Pro dané geny byly analyzovány jejich molekulární (MF) a biologické funkce (BP) pomocí programu na stanovení genových ontologií DAVID.

Analýzou bylo vygenerováno 62 statisticky významně obohacených skupin biologických funkcí a 16 skupin molekulárních funkcí. Celkem 100 genů nebylo na základě své funkce zařazeno ani do jedné skupiny. Pro literární rešerši byly vybrány geny spadající do alespoň jedné z následujících skupin:

BP: Dráha neuropeptidové signalizace (BP1); Regulace transkripce (BP2); Transkripce (BP3); Negativní regulace transkripce z promotoru RNA polymerázy II (BP4); Regulace dělení kmenových buněk (BP5); Pozitivní regulace transkripce z promotoru RNA polymerázy II (BP6); Regulace proliferace endoteliálních buněk (BP7); Vývoj embrya (BP8), Signalizace zprostředkovaná cAMP (BP9); Vývoj krevních cév (BP10); Organizace kolagenových vláken (BP11); Glycinerární přenos synaptického signálu (BP12); Transport neurotransmiterů (BP13)

MF: Aktivita transkripčních faktorů (MF1); Aktivita růstových faktorů (MF2); Neurotransmitery: Aktivita sodíkového symportu (MF3)

Byly vybírány výše uvedené skupiny, které mohou funkčně zasahovat do vývoje cév a s tím spojené rezistence nádorových buněk vůči antiangiogenní léčbě, skupiny funkčně související s procesem angiogeneze a stavby krevních cév. Vývoj cév může být ovlivňován také neuropeptidy a neurální signalizací, proto byly vybrány i tyto související skupiny. Různé transkripční a růstové faktory jsou známými činiteli signálních drah podílejících se na různých funkcích vývoje a přežití nádoru a tedy ovlivňujících prognózu. Skupiny funkčně související s vývojem plodu byly vybrány kvůli známému zapojení mnoha embryonálních genů do postnatálního vývoje rakovinných buněk.

Na základě výběru těchto funkčních skupin bylo pro literární řešerši vybráno 81 genů, které byly součástí těchto skupin (viz **Tabulka 23**).

Tabulka 23: Geny hypermetylované ve skupině respondenti (R) vybrané pro literární řešerši

Geny hypermetylované ve skupině respondenti (R)				
<i>ADCY8</i> BP9	<i>DRGX</i> BP2, BP3	<i>IRX6</i> BP2	<i>POU3F2</i> BP6, MF1	<i>SOHLH1</i> BP6
<i>ADCYAP1</i> BP1, BP6, BP9	<i>EBF3</i> BP2, BP3, BP6	<i>LEP</i> BP4, BP7, MF2	<i>POU4F3</i> BP6, MF1	<i>SOX11</i> BP4, BP6, MF1
<i>ALDH1A2</i> BP7, BP10	<i>ECEL1</i> BP1	<i>LHX1</i> BP2, MF1	<i>PRDM12</i> BP2, BP3	<i>SOX17</i> BP2, BP4, BP5, BF6
<i>ANKRD30A</i> BP2, MF1	<i>EN1</i> BP4, BP6	<i>LMX1B</i> BP2, BP3, BP6, MF1	<i>PRDM14</i> BP3, BP4	<i>SOX7</i> BP3, MF1
<i>ASCL1</i> BP3, BP4, BP6, MF1	<i>FEZF2</i> BP4, BP6	<i>LRRFIP1</i> BP2, BP3	<i>PRDM6</i> BP3	<i>SP9</i> BP2, BP3
<i>ASCL5</i> BP3, MF1	<i>FGF3</i> MF2	<i>MAFB</i> BP6	<i>PTF1A</i> BP2, BP6, BP8	<i>TBX18</i> BP2, BP4, BP5
<i>BDNF</i> MF2	<i>FGF5</i> MF2	<i>MDF1</i> BP4, BP8	<i>RIMS2</i> BP9	<i>TCF24</i> BP2, BP3
<i>BHLHE23</i> BP2, BP3, BP6	<i>FOXI2</i> BP3	<i>MEDI2L</i> BP3, BP6	<i>RIPPLY2</i> BP4	<i>UTS2R</i> BP1
<i>BHMG1</i> BP2, BP3	<i>GBX2</i> BP2, BP6, MF1	<i>NCOA5</i> BP2, BP3	<i>RUNX1T1</i> BP3, MF1	<i>VAX1</i> BP3, BP4
<i>CDX2</i> BP2, BP4, BP10, MF1	<i>GDF6</i> MF2	<i>NKX6-2</i> BP2, BP4, MF1	<i>SEMA4D</i> BP4	<i>VSX1</i> BP2, BP3, MF1
<i>CELF4</i> BP8	<i>GLRA1</i> BP1, BP12	<i>NPFPR1</i> BP1	<i>SFRP2</i> BP5, BP6, BP11	<i>ZIK1</i> BP2, BP3, MF1
<i>COL14A1</i> BP11	<i>HELT</i> BP2, BP3, BP4, BP6	<i>NPY4R</i> BP1	<i>SIM1</i> BP3, MF1	<i>ZNF256</i> BP3, MF1
<i>COL5A1</i> BP10, BP11	<i>HMX2</i> BP2, BP3	<i>NXPH2</i> BP1	<i>SIM2</i> BP2, BP3, BP4, MF1	<i>ZNF354C</i> BP2, BP3, MF1
<i>CTBP2</i> BP3, BP4, BP6	<i>HMX3</i> BP2, BP3	<i>OLIG1</i> BP2, BP3	<i>SLC6A11</i> BP13, MF3	<i>ZNF471</i> BP2, BP3, MF1
<i>CXCL12</i> MF2	<i>HOXD10</i> BP3, BP6, MF1	<i>OTP</i> BP2, BP3	<i>SLC6A15</i> BP13, MF3	<i>ZNF595</i> BP2, BP3, MF1
<i>DMRTA2</i> BP2, MF1	<i>IRX1</i> BP2, MF	<i>PCGF3</i> BP2, BP3	<i>SLC6A5</i> BP12, BP13, MF3	<i>ZNF74</i> BP2, BP3, MF1
				<i>ZNF80</i> BP2

Legenda: Dráha neuropeptidové signalizace (BP1); Regulace transkripce (BP2); Transkripce (BP3); Negativní regulace transkripce z promotoru RNA polymerázy II (BP4); Regulace dělení kmenových buněk (BP5); Pozitivní regulace transkripce z promotoru RNA polymerázy II (BP6); Regulace proliferace endoteliálních buněk (BP7); Vývoj embrya (BP8), Signalizace zprostředkovaná cAMP (BP9); Vývoj krevních cév (BP10); Organizace kolagenových vláken (BP11); Glycinerární přenos

synaptického signálu (BP12); Transport neurotransmiterů (BP13); Aktivita transkripčních faktorů (MF1); Aktivita růstových faktorů (MF2); Neurotransmitery: Aktivita sodíkového symportu (MF3)

U těchto genů bylo posuzováno, zda jejich mechanismus účinku umožňuje zasahovat do procesu angiogeneze a mechanismu účinku bevacizumabu. Byly použity dostupné literární zdroje (např. Bachar-Dahan *et al.*, 2006; Banki *et al.*, 2015; Barret *et al.*, 2012; Basile *et al.*, 2004; Basile *et al.*, 2006; Bergers *et al.*, 2010; Bhati *et al.*, 2008; Carino *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2006; Collado *et al.*, 2004; Conrotto *et al.*, 2005; Corada *et al.*, 2013; Courtwright *et al.*, 2009; Diebold *et al.*, 2012; Dieterich *et al.*, 2015; Dormoy *et al.*, 2009; Dormoy *et al.*, 2010; Federico *et al.*, 2014; Gaetano *et al.*, 2001; Giordano *et al.*, 1996; Gonzalez *et al.*, 2006; Gonzalez et Leavis, 2001; Hoffmann *et al.*, 2007; Horvath *et al.*, 2014; Ito *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2017; Koblizek *et al.*, 1998; Koltowska *et al.*, 2015; Liao *et al.*, 2017; Lilly *et al.*, 2017; Lux *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2012; Moody *et al.*, 2002; Napp *et al.*, 2012; NCBI, 1998; Oon *et al.*, 2017; Paauwe *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2001; Roukens, 2010; Saito *et al.*, 2007; Salvucci *et al.*, 2002; Saxena *et al.*, 2007; Seo *et al.*, 2016; Schüller *et al.*, 2007; Sorensen *et al.*, 2009; Spinazzi *et al.*, 2006; Subedee, 2015; Tachibana *et al.*, 1998; Taniguchi *et al.*, 2017; Toyama *et al.*, 2017; Wenstrup *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2017; Wong *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2013; Zaichuk *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2013 a další).

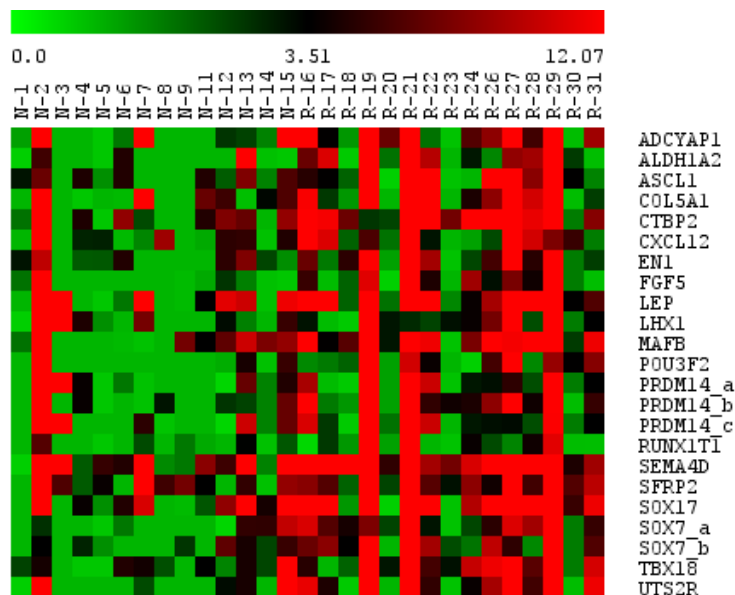
Na základě získaných informací bylo vytipováno 20 genů, jejichž aktivita by mohla mít roli při navozování rezistence vůči bevacizumabu u pacientů s CRC (viz **Tabulka 24**). U těchto genů byla zjištěna aktivita související s proangiogenní dráhou nebo byla vypořádována přímá souvislost s procesem tvorby kapilár, nicméně ještě nebyl popsán mechanismus jejich účinku. Z tohoto důvodu je předpokládáno, že při jejich umlčení těchto genů v důsledku hypermethylace promotorové oblasti je tato proangiogenní aktivita vypnuta a účinek bevacizumabu může být uplatněn.

Tabulka 24: Seznam vytipovaných genů hypermethylovaných ve skupině respondentů (R) s pravděpodobnou funkcí v navozování funkcí vůči bevacizumabu u pacientů s CRC

Geny			
<i>ADCYAP1</i>	<i>CXCL12</i>	<i>MAFB</i>	<i>SFRP2</i>
<i>ALDH1A2</i>	<i>EN1</i>	<i>POU3F2</i>	<i>SOX17</i>
<i>ASCL1</i>	<i>FGF5</i>	<i>PRDM14</i>	<i>SOX7</i>
<i>COL5A1</i>	<i>LEP</i>	<i>RUNX1T1</i>	<i>TBX18</i>
<i>CTBP2</i>	<i>LHX1</i>	<i>SEMA4D</i>	<i>UTS2R</i>

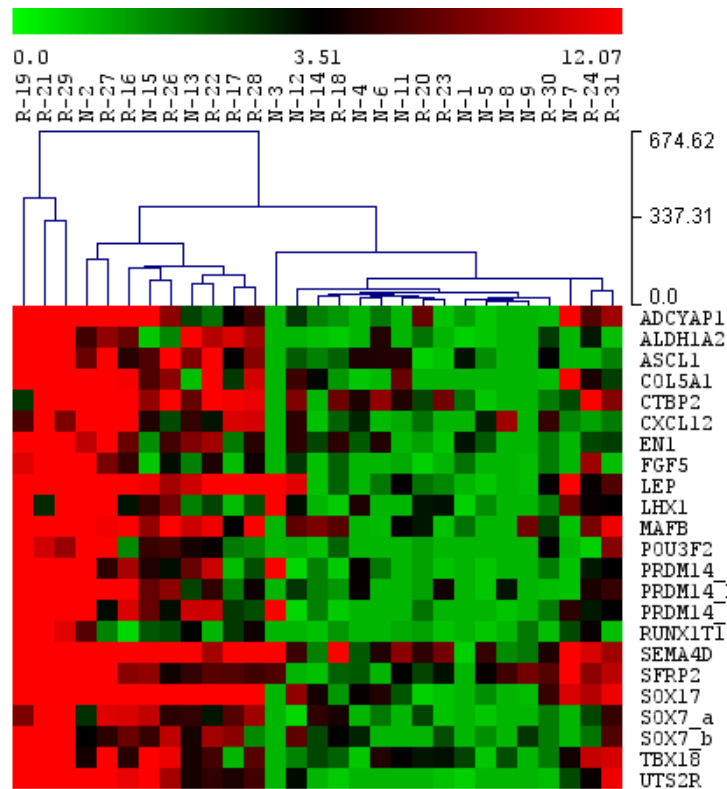
Legenda: *ADCYAP1* = Adenylate Cyclase Activating Polypeptide 1; *ALDH1A2* = Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A2; *ASCL1* = Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 1; *COL5A1* = Collagen Type V Alpha 1 Chain; *CTBP2* = C-Terminal Binding Protein 2; *CXCL12* = C-X-C Motif Chemokine Ligand 12; *EN1* = Homeobox Protein Engrailed 1; *FGF5* = Fibroblast Growth Factor 5; *LEP* = Leptin; *LHX1* = LIM Homeobox 1; *MAFB* = MAF BZIP Transcription Factor B; *POU3F2* = POU Class 3 Homeobox 2; *PRDM14* = PR/SET Domain 14; *RUNX1T1* = RUNX1 Translocation Partner 1; *SEMA4D* = Semaphorin 4D; *SFRP2* = Secreted Frizzled Related Protein 2; *SOX17* = SRY-Box 17; *SOX7* = SRY-Box 7; *TBX18* = T-Box 18; *UTS2R* = Urotensin 2 Receptor

Pro analyzované vzorky bylo v rámci 20 genů ze skupiny R provedeno hierarchické klastrování v programu MeV, přičemž některé geny jsou v analýze zastoupeny až třikrát. To je způsobeno tím, že v jejich blízkosti bylo detekováno více methylovaných oblastí (píků). Na **Obrázku 20** je vizualizována exprese daných genů v jednotlivých vzorcích, která byla odvozena z dat z Methyl Capture sekvenování (počet čtení mapovaných do dané oblasti). Červená barva zobrazuje vyšší hladinu methylace, naopak zelená barva zobrazuje spíše demethylovaný stav.



Obrázek 20: Hladina methylace (počet čtení z Methyl Capture sekvenování) v oblastech analyzovaných genů hypermethylovaných ve skupině R (zelená = nízká hladina methylace, červená = vysoká hladina methylace)

Na **Obrázku 21** je zobrazeno hierarchické klastrování vzorků skupiny N a R dle methylačního profilu 20 analyzovaných genů hypermethylovaných ve skupině R. Byla použita klastrovací metoda nejvzdálenějšího souseda (Complete Linkage) a bloková vzdálenost (Manhattan). V levé části jsou seřazeny vzorky, které vykazují podobný methylovaný profil, naopak do pravé části klastrovaly vzorky, které spíše sdílejí demethylovaný stav. Nicméně taktéž došlo k oddělení vzorků č. 7, 24 a 31, které jsou zařazeny vpravo. Tyto vzorky, přestože jejich profil je v určitých genech výrazně methylovaný, tak klastrují ke vzorkům demethylovaným. Při porovnání se vzorky č. 13, 22, 17, které taktéž vykazují diferenciální methylaci v rámci analyzovaných genů, lze pozorovat inverzi v tomto methylačním stavu.



Obrázek 21: Hierarchické klastrování vzorků skupiny N a R dle methylačního profilu 20 analyzovaných genů hypermetylovaných ve skupině R (zelená = nízká hladina methylace, červená = vysoká hladina methylace)

Bylo zjištěno, že v rámci těchto 20 genů došlo k obohacení 4 funkčních skupin, které se liší mechanismem proangiogenní dráhy, do které jsou zapojeny: (1) skupina induktorů angiogeneze, jejichž aktivita ovlivňuje funkci VEGFA; (2) induktory angiogeneze, jejichž aktivita je spojena s NOTCH dráhou; (3) induktory interleukinů; (4) induktory metaloproteináz (viz **Tabulka 25**).

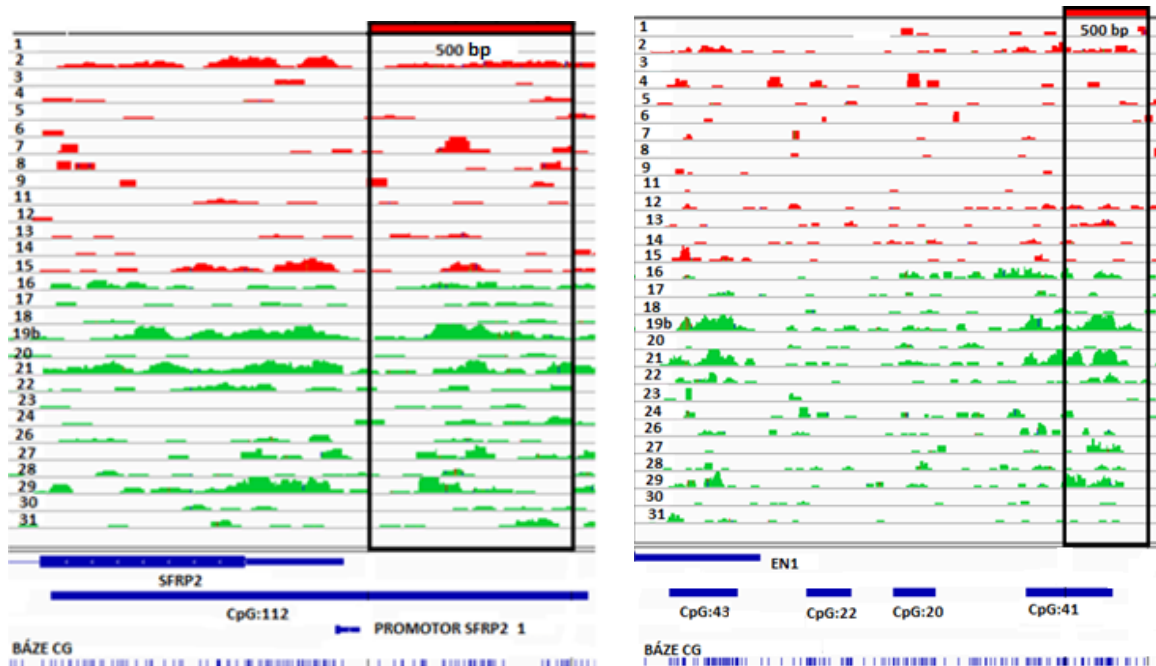
Tabulka 25: Obohacené skupiny angiogenních drah

Induktory VEGFA	Induktory NOTCH dráhy	Induktory interleukinů (IL)	Induktory metaloproteináz (MMP)
<i>EN1</i>	<i>ASCL1</i>	<i>EN1</i>	<i>CTBP2</i>
<i>ADCYAP1</i>	<i>CTBP2</i>	<i>CTBP2</i>	<i>CXCL12</i>
<i>ASCL1</i>	<i>POU3F2</i>	<i>LEP</i>	<i>LEP</i>
<i>CTBP2</i>	<i>PRDM14</i>	<i>PRDM14</i>	<i>LHX1</i>
<i>CXCL12</i>	<i>SOX17</i>		<i>PRDM14</i>
<i>LEP</i>			<i>SEMA4D</i>
<i>RUNX1T1</i>			
<i>TBX18</i>			

10.3 Analytická validace methylačního profilu oblastí genů *SFRP2* a *EN1* pomocí bisulfitového sekvenování

Geny *SFRP2* a *EN1* byly vybrány pro předběžnou analytickou validaci s cílem detekovat metylaci v analyzovaných oblastech pomocí bisulfitového sekvenování a porovnat to se získanými daty z Methyl Capture sekvenování. V obou případech se jednalo o geny hypermetylované ve skupině R, respondenti. Pro analyzované 500 bp úseky DNA, ve kterých byla detekována methylace, byly v programu MethPrimer 2.0 navrženy vždy 3 páry primerů (forward a reverse) pro bisulfitové sekvenování: EN1_A, EN1_B, EN1_C, SFRP2_A, SFRP2_B, SFRP2_C, tak aby byla tato oblast pokryta celá.

Na **Obrázku 22** jsou zobrazeny oblasti genů *SFRP2* a *EN1*, ve kterých byly navrženy primery. V dolní části obrázku jsou zobrazena jednotlivá CpG místa v dané oblasti, promotor, část genu a známé CpG ostrovy. Jednotlivá čtení mapovaná do těchto oblastí v některých případech tvoří píky velké až několik stovek párů bází. Metoda Methyl Capture sekvenování je celogenomová metoda, nicméně vykazuje omezené rozlišení (100-200 bp).



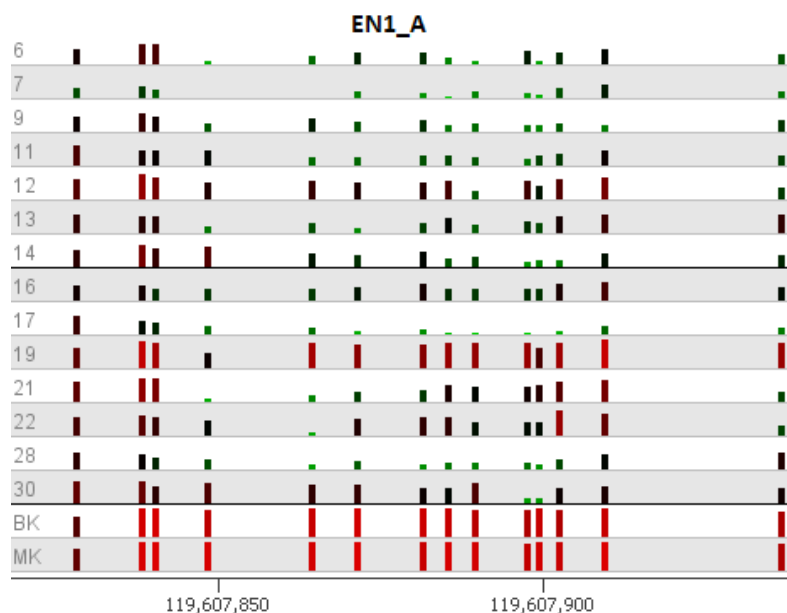
Obrázek 22: Detekovaný methylovaný region v oblasti genu *SFRP2* (vlevo) a genu *EN1* (vpravo) (vizualizováno v programu IGV). Červeně jsou zobrazena sekvenační čtení vzorků č. 1-15 skupiny N (non-respondenti). Zeleně jsou zobrazena čtená sekvenační čtení vzorků č. 16-31 skupiny R (respondenti). V dolní části jsou zobrazeny promotorové oblasti, CpG dinukleotidy a známé CpG ostrovy (CpG:112, CpG:43, CpG:22, CpG:20, CpG:41).

Pro všechny páry primerů byla provedena gradientová PCR pro určení optimální teploty nasedání primerů (62 °C, 60 °C, 57 °C, 52,3 °C). V případě primerů EN1_A, EN1_C, SFRP2_A, SFRP2_B, SFRP2_C byla optimální teplota 60 °C. V případě primerů EN1_B byla pro amplifikaci optimální

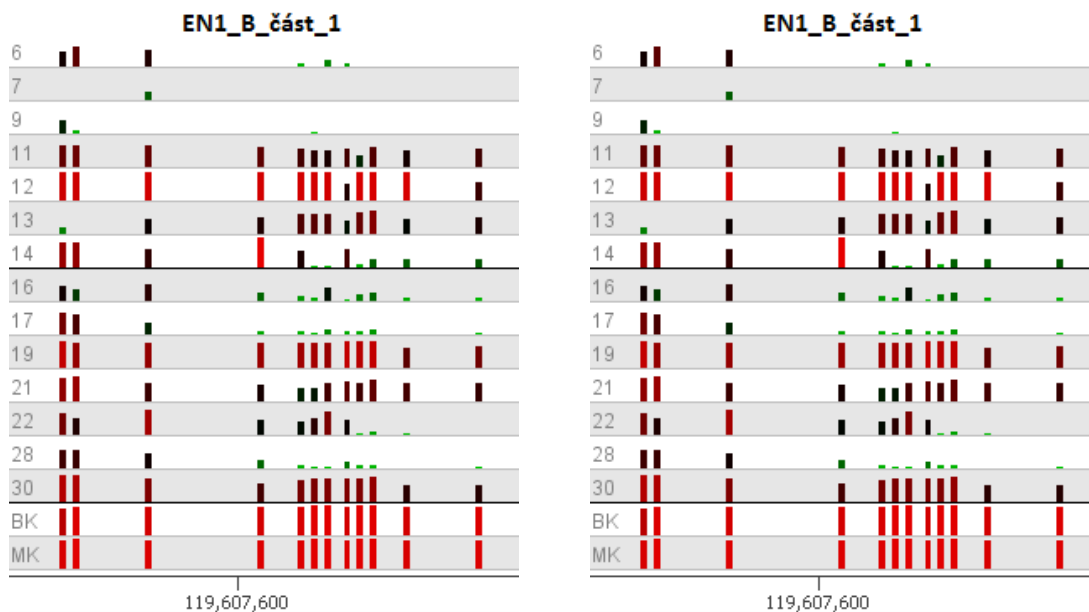
teplota nasedání primerů 57 °C. V dalším kroku byla pomocí těchto primerů provedena amplifikace vzorků č. 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 21, 22, 28 a 30 po bisulfitové konverzi. V případě primerů SFRP2_B nedošlo k amplifikaci produktu. Produkty amplifikace byly osekvenovány na přístroji MiSeq (MiSeq Reagent Kit v3, 150 cyklů).

Sekvenační data byla následně Ing. Rastislavem Slavkovským, Ph.D. zpracována pomocí programu Bismark, ve kterém byla sekvenační čtení přiřazena k referenčnímu genomu (GRCh37/hg19). Takto upravená data byla následně vizualizována v programu SeqMonk, kde silně methylovaná místa (CpG místa s rozlišením jedné báze) jsou zobrazena červeně, naopak nízká hladina methylace je vizualizována zeleně (viz **Obrázek 23** až **28**). Výška píků značí hloubku osekvenování dané báze.

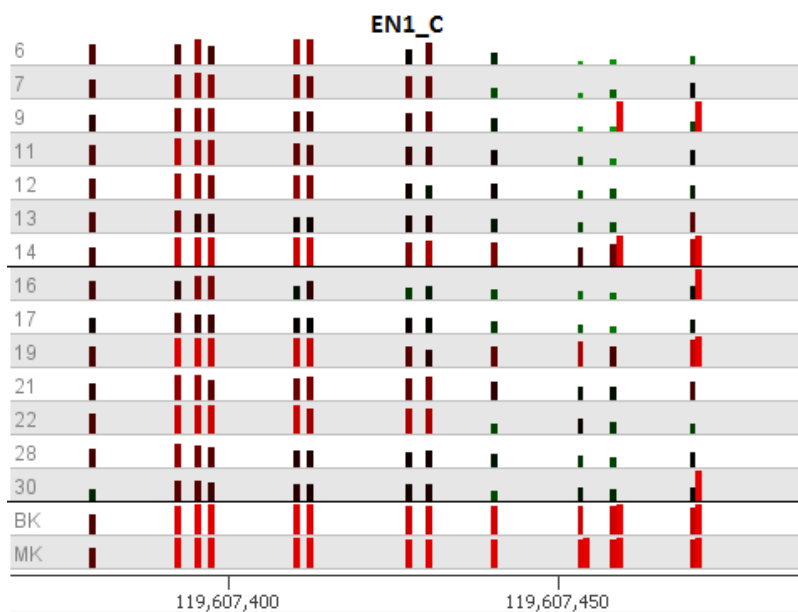
BK (bisulfitovaná kontrola) a MK (methylovaná kontrola) značí pozitivní kontroly použité pro hodnocení průběhu bisulfitového sekvenování. V těchto případech lze u všech amplikonů pozorovat téměř vysokou hladinu methylace (červená barva, silně methylované), což značí správný průběh amplifikace. Naopak v oblasti genu *SFRP2* amplifikované pomocí primerů SFRP2_A se nenachází žádný signál u vzorků č. 7, 9 a 12 (viz **Obrázek 26** a **27**), to je způsobeno nedostatečnou amplifikací této oblasti. Nicméně na žádném obrázku kromě **Obrázku 23** není vizualizován velký rozdíl v methylačním profilu mezi skupinami (intenzitě píků znázorňující methylaci dané oblasti). Proto byla v dalším kroku provedena detailnější analýza, kde byla tato data převedena na signál kvantifikující hladinu methylace jednotlivých oblastí (viz níže).



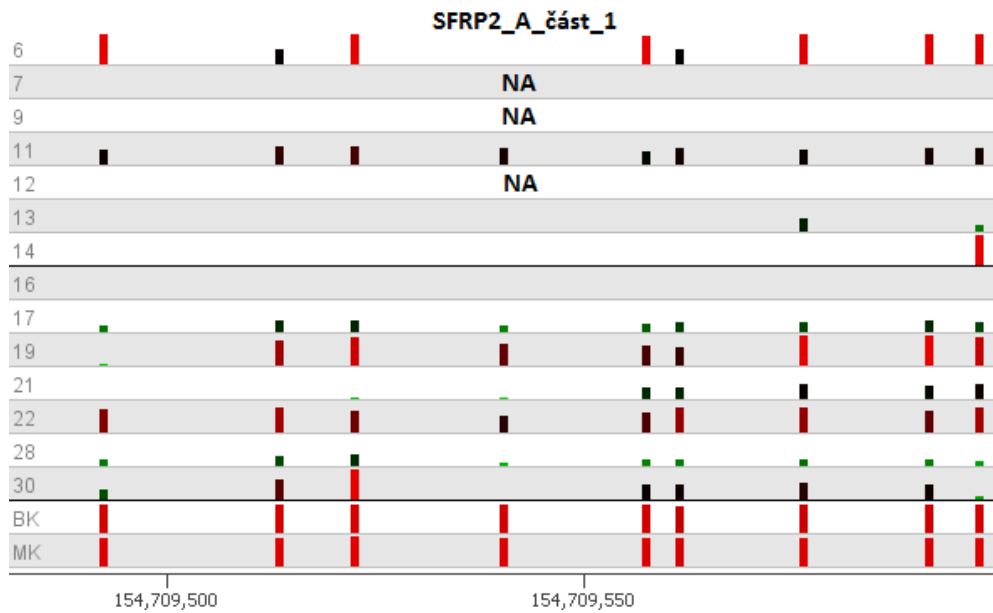
Obrázek 23: Hladina methylace v oblasti genu *EN1* amplifikované pomocí primerů EN1_A (zelená = nízká hladina methylace, červená = vysoká hladina methylace, BK a MK = pozitivní kontroly, osa *x* = chromozomální koordináty)



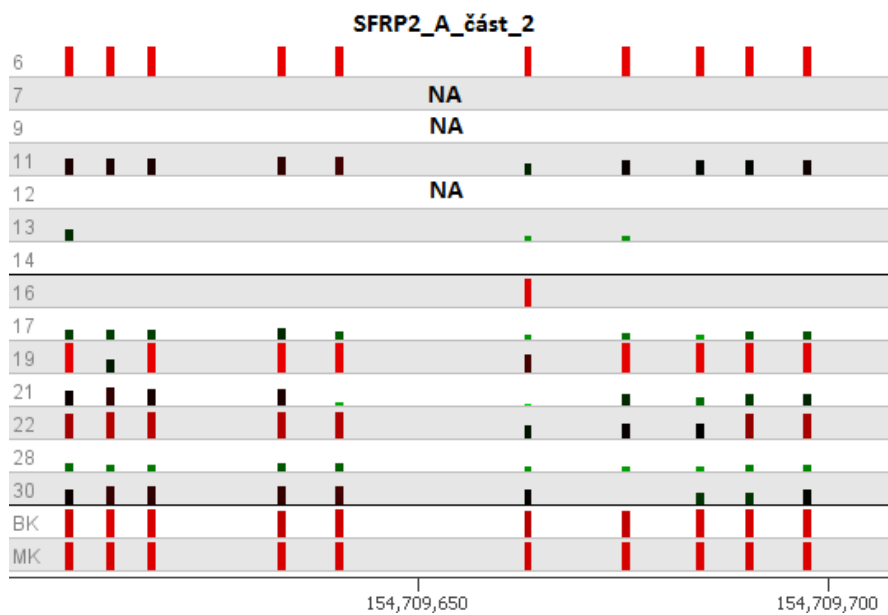
Obrázek 24: Hladina methylace v oblasti genu *EN1* amplifikované pomocí primerů EN1_B (zelená = nízká hladina methylace, červená = vysoká hladina methylace, BK a MK = pozitivní kontroly, osa x = chromozomální koordináty)



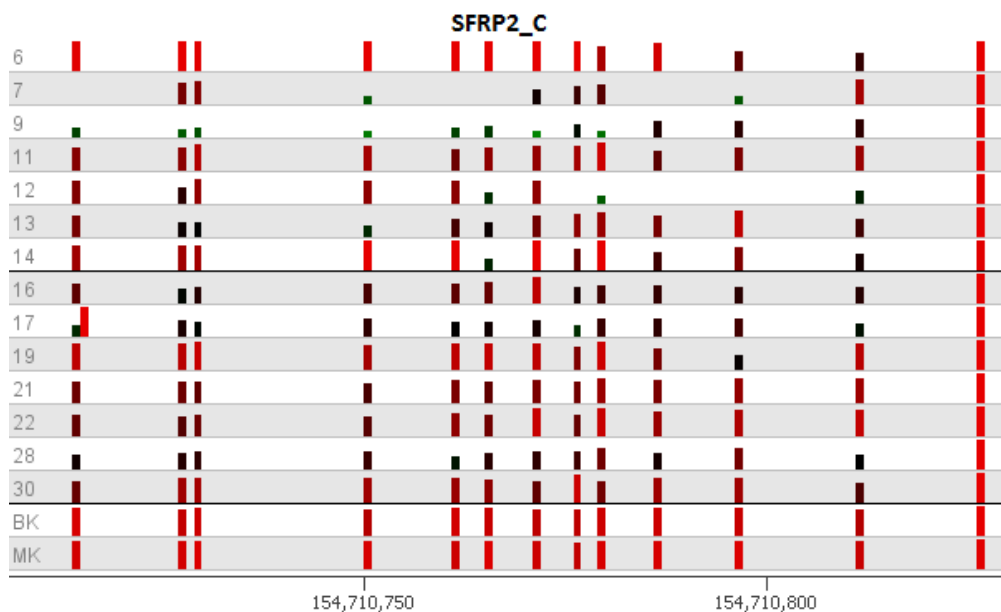
Obrázek 25: Hladina methylace v oblasti genu *EN1* amplifikované pomocí primerů EN1_C (zelená = nízká hladina methylace, červená = vysoká hladina methylace, BK a MK = pozitivní kontroly, osa x = chromozomální koordináty)



Obrázek 26: Hladina methylace v oblasti genu *SFRP2* amplifikované pomocí primerů SFRP2_A (část 1) (zelená = nízká hladina methylace, červená = vysoká hladina methylace, BK a MK = pozitivní kontroly, osa x = chromozomální koordináty, NA = *not available*)



Obrázek 27: Hladina methylace v oblasti genu *SFRP2* amplifikované pomocí primerů SFRP2_A (část 2) (zelená = nízká hladina methylace, červená = vysoká hladina methylace, BK a MK = pozitivní kontroly, osa x = chromozomální koordináty, NA = *not available*)



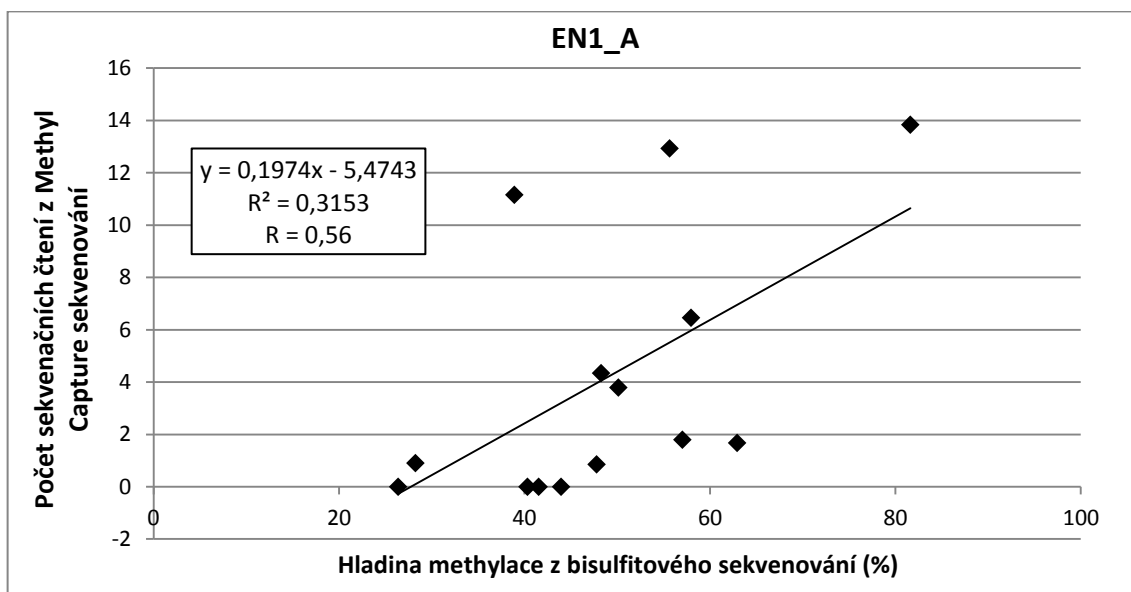
Obrázek 28: Hladina methylace v oblasti genu *SFRP2* amplifikované pomocí primerů SFRP2_C (zelená = nízká hladina methylace, červená = vysoká hladina methylace, BK a MK = pozitivní kontroly, osa x = chromozomální koordináty)

U všech vzorků byla provedena kvantifikace hladiny methylace v jednotlivých úsecích amplikonů EN1_A, EN1_B, EN1_B_1, EN1_B_2, EN1_C, EN1_C_1, EN1_C_2, SFRP2_A, SFRP2_A_1, SFRP2_A_2, SFRP2_C, SFRP2_C_1 a SFRP2_C_2. Hodnoty hladiny methylace v procentech v jednotlivých vzorcích byly následně korelovány s počtem sekvenačních čtení z Methyl Capture sekvenování mapovaných do těchto oblastí, přičemž byly vytvořeny bodové grafy, do kterých byla vložena lineární spojnice trendu, a byla vypočítána hodnota korelačního koeficientu R (hodnota spolehlivosti) (viz **Tabulka 26**). Jako nejvíce spolehlivé se jeví výsledky methylační analýzy oblasti EN1_A a EN1_C_2 (R je 0,56 a 0,61), přičemž korelace mezi výsledky Methyl Capture sekvenování (počet mapovaných čtení) a bisulfítového sekvenování (stupeň methylace v procentech) těchto oblastí jsou zobrazeny v **Grafech 2 a 3**.

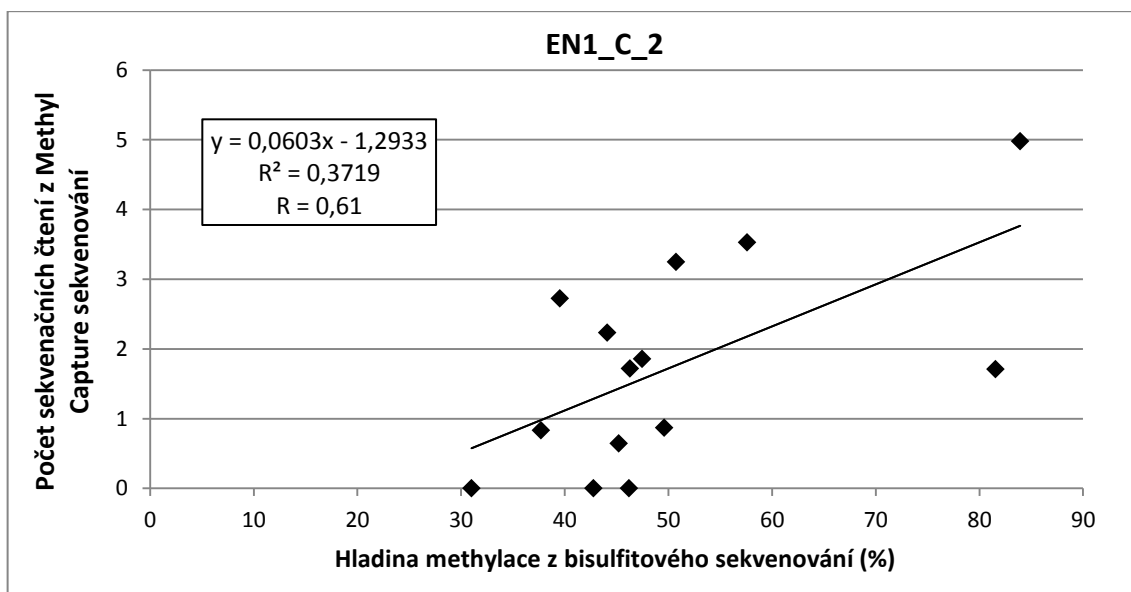
Tabulka 26: Hodnoty korelačního koeficientu R

Analyzovaná oblast genu <i>EN1</i>	Hodnota R	Analyzovaná oblast genu <i>SFRP2</i>	Hodnota R
EN1_A	0,56	SFRP2_A	0,11
EN1_B	0,19	SFRP2_A_1	0,14
EN1_B_1	0,32	SFRP2_A_2	0,08
EN1_B_2	0,14	SFRP2_C	0,07
EN1_C	0,32	SFRP2_C_1	0,11
EN1_C_1	0,12	SFRP2_C_2	0,26
EN1_C_2	0,61		

Graf 2: Závislost počtu sekvenačních čtení z Methyl Capture sekvenování na hodnotě hladiny methylace z bisulfitového sekvenování v oblasti genu *EN1* amplifikované pomocí primerů EN1_A



Graf 3: Závislost počtu sekvenačních čtení z Methyl Capture sekvenování na hodnotě hladiny methylace z bisulfitového sekvenování v oblasti genu *EN1* amplifikované pomocí primerů EN1_C_2



11 Diskuse

Bevacizumab je rekombinantní monoklonální protilátka, která se váže na molekulu VEGFA, a tak zamezuje jeho vazbě na příslušný receptor. Zamezení indukce VEGFA signalizace tak způsobuje redukci tvorby kapilár. Bevacizumab v kombinaci s chemoterapií nebo jinou cílenou terapeutickou látkou je velmi často používán v klinické praxi u pacientů s pokročilým stádiem CRC (Shord *et al.*, 2009).

Bevacizumab je první látka, která ovlivňuje přežití u pacientů s metastatickou formou CRC, přičemž dochází ke zvýšení přežití o 30 % (Hurwitz *et al.*, 2004). Bevacizumab inhibuje progresi nádoru vazbou na VEGFA a blokáci jeho biologické aktivity, což vede k potlačení angiogeneze a nedostatečnému vyživování nádoru. Nicméně u některých pacientů se vyvinula rezistence vůči účinku bevacizumabu a není u nich pozorováno zlepšení a jejich tělo je tak zbytečně zatěžováno (Fischer *et al.*, 2007).

Předpokládá se, že po nasazení léčby bevacizumabem dochází ke zvýšení exprese ostatních proangiogenních faktorů, což nakonec vede k selhání anti-VEGF terapie (Fischer *et al.*, 2007). Z tohoto důvodu je cílem mnoha pracovišť po celém světě identifikovat biomarker, který by dokázal predikovat odpověď na léčbu pomocí bevacizumabu a rozlišit tak pacienty, kteří by z této léčby benefitovali od těch, u kterých nemá žádný pozitivní efekt. Přestože již byly identifikovány potencionální biomarkery jako je hladina VEGFA či jeho receptoru (VEGFR) v plasmě (Cameron *et al.*, 2013; Miles *et al.*, 2017), hladina exprese tkáňového proteinu NRP1 (Neuropilin 1, koreceptor VEGFR), DLL4 (Delta-like 4), transkripčního faktoru HOXB9 (Homeobox 9) (Jubb *et al.*, 2011; Van Cutsem *et al.*, 2012; Oon *et al.*, 2017; Carbone *et al.*, 2017) nebo přítomnost SNP v *VEGFA* (Schneider *et al.*, 2009), efektivnost žádného z nich nebyla zatím v klinické praxi prokázána.

Hypermethylace promotoru specifických genů je známým mechanismem epigenetického umlčení genové exprese a byl již několikrát identifikován jako příčina vzniku rezistence nádorových buněk vůči účinku terapeutické látky. Příkladem je hypermethylace promotorové oblasti genu *hMLH1* způsobující resistenci rakovinných buněk kolorekta vůči 5-FU (Arnold *et al.*, 2003). Z tohoto důvodu je velmi pravděpodobné, že specifický methylační profil rakovinných buněk a s tím spojené umlčení určitých genů má vliv na efektivnost bevacizumabu u pacientů s CRC.

V této studii jsme se zaměřili na studium methylačního profilu rakovinných buněk kolorekta v souvislosti s identifikací biomarkerů odpovědi na léčbu bevacizumabem. Pro celogenomovou analýzu byla použita metoda Methyl Capture sekvenování, přičemž bylo analyzováno 31 vzorků (15 non-respondenti N, 16 respondenti R). Analýzou sekvenačních dat a jejich dalším zpracováním (statistika, filtrování, genová ontologie) bylo identifikováno 81 hypermetylovaných oblastí ve skupině R a 24 ve skupině N. Jelikož byla studie zaměřena na skupinu genů funkčně souvisejících s procesem

angiogeneze, byly tyto geny následně anotovány z hlediska jejich zapojení do tohoto procesu, přičemž bylo vytipováno 20 genů hypermethylovaných ve skupině R a 1 gen hypermethylovaný ve skupině N.

Ve skupině N byla detekována hypermethylace oblasti genu *ATXN1L* (Ataxin 1 Like). *ATXN1L* je transkripční faktor, který se stejně jako jeho paralog *ATXN1* v nepřítomnosti NOTCH intracelulární domény (NICD) váže na protein CBF1 (Recombination Signal Binding Protein For Immunoglobulin Kappa J Region; RBPJ) a potlačují jeho aktivitu, která byla asociována s NOTCH signální dráhou (Tong *et al.*, 2011). Při potlačení CBF1 zprostředkované regulace exprese v lidských endoteliálních buňkách HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) pomocí proteinu RPMS1, bylo detekováno snížení angiogeneze, která je vyvolána cyklickým zatěžováním (cyclic strain), a inhibice exprese genů *TIE1* (Tyrosine Kinase With Immunoglobulin Like And EGF Like Domains 1) a *TIE2* (TEK Receptor Tyrosine Kinase) (Morrow *et al.*, 2007). V nedávné studii byl studován vliv roli genu *TIE1* v angiogenezi a tumorogenezi. Bylo zjištěno, že delece *TIE1* v endoteliálních buňkách vedla k inhibici angiogeneze a potlačení růstu nádoru. (Porta *et al.*, 2018). Snížením exprese *ATXN1L* tak možná nedochází k inhibici angiogenního proteinu CBF1, což má za následek tvorbu nových kapilár i přes působení antiangiogenní anti-VEGFA léčby.

Bylo zjištěno, že v rámci 20 genů hypermethylovaných ve skupině R došlo k obohacení čtyř funkčních skupin, které se liší mechanismem proangiogenní dráhy, do které jsou zapojeny: **(1)** skupina induktorů angiogeneze, jejichž aktivita ovlivňuje expresi *VEGFA* (*EN1*, *ADCYAP1*, *ASCL1*, *CTBP2*, *CXCL12*, *LEP*, *RUNX1T1*, *TBX18*); **(2)** induktory angiogeneze, jejichž aktivita je spojena s NOTCH dráhou (*ASCL1*, *CTBP2*, *POU3F2*, *PRDM14*, *SOX17*); **(3)** induktory interleukinů (*EN1*, *CTBP2*, *LEP*, *PRDM14*); **(4)** induktory metaloproteináz (*CTBP2*, *CXCL12*, *LEP*, *LHX1*, *PRDM14*, *SEMA4D*).

Dále je popsán vztah detekovaných genů s procesem angiogeneze a molekulární interakce s angiogenními faktory.

Gen *EN1* (Homeobox Protein Engrailed 1) kóduje protein obsahující homeodoménu, kterým je obecně prisuzována role v kontrole vývoje organismu (NCBI, 1998). Analýzou genové exprese buněčných linií Triple negativního nádoru prsu s potlačenou expresí *EN1* bylo prokázáno, že *EN1* reguluje geny zapojené do angiogeneze, neurogeneze, interakcí buněčné matrix a další cílové části Wnt signální dráhy (Subedee, 2015). β -katenin je jedním z hlavních proteinů zapojených do Wnt signální dráhy, přičemž signalizace Wnt/ β -katenin indukuje proliferaci, přežití a expresi proangiogenního proteinu IL8 (Interleukin 8) v lidských endoteliálních buňkách (Masckauchán *et al.*, 2005; Bancroft *et al.*, 2001). Podle studie z roku 2006 na buněčných liniích gen *EN1* funguje jako nezávislý negativní regulátor transkripční aktivity β -kateninu (jeho umlčení pomocí siRNA stimuluje transkripční aktivitu β -kateninu) (Bachar-Dahan *et al.*, 2006). Na základě těchto výsledků by se dalo předpokládat, že gen *EN1* působí spíše antiangiogenním způsobem, nicméně při analýze genové exprese v buňkách basal-like karcinomu prsu se zvýšenou expresí genu *EN1* byly aktivovány dráhy související s rezistencí vůči chemoterapii

a zvýšená transkripce zánětlivých faktorů, zejména chemokinů a jejich receptorů, které mají potenciál podporovat angiogenezi. Mezi geny s proangiogenní funkcí se zvýšenou hladinou exprese patří například *CXCL11* a *CXCL6* (C-X-C Motif Ligand 11/6), *IL23A* (Interleukin 23 Subunit Alpha), *IL8* a *VEGFA* (Beltran, 2014; Koo *et al.*, 2017; Langowski *et al.*, 2006; Torán *et al.*, 2017; Bancroft *et al.*, 2001). Dále bylo zjištěno, že po umlčení exprese genu *EN1* dochází k značnému potlačení transkripce genu *NLGN1* (Neurologin 1), přičemž *NLGN1* je považován za klíčový regulátor v zahájení angiogenního procesu (Subedee, 2015; Bottos *et al.*, 2009; Samarelli *et al.*, 2014).

ADCYAP1 (Adenylate Cyclase Activating Polypeptide 1) je gen kódující peptidy, které stimulují adenylát cyklázu a zvyšují hladinu cyklického adenosin fosfátu, což má za následek aktivaci transkripce cílových genů. Alternativní sestřih *ADCYAP1* vede ke vzniku transkripčních variant *PACAP1-27* a *PACAP1-38* (NCBI, 1998). Studie *PACAP1-38* v souvislosti s angiogenezí v lidských buňkách trofoblastu ukázala, že potom co byly tyto buňky po dobu 24 hodin ošetřovány *PACAP1-38*, došlo v případě buněk HTR-8/SVneo ke snížení sekrece angiogenních molekul jako jsou aktivin, angiogenin, angiopoietin 1, EG-VEGF a endoglin. Tato data naznačují, že *PACAP1-38* by mohl mít antiangiogenní roli prostřednictvím modulace produkce různých angiogenních faktorů (Horvath *et al.*, 2014). Naopak v případě varianty *PACAP1-27* byla zjištěna proangiogenní funkce, kdy aplikace *PACAP1-27* vedla ke zvýšení exprese *VEGF* v buňkách rakoviny plic (Moody *et al.*, 2002). Podobně *PACAP1-27* vykazoval schopnost zvyšovat expresi *VEGF* v buněčné linii LNCaP odvozené od rakoviny prostaty (Collado *et al.*, 2004). Navíc bylo zjištěno, že zvýšená exprese *ADCYAP1* vede k indukci exprese genu *VEGFR2* (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) ve starých cerebromikrovaskulárních endoteliálních buňkách a potlačení apoptózy. Z těchto poznatků vyplývá, že interakce mezi autokrinním *PACAP-27* a *VEGF* signalizací může pravděpodobně přispívat k proangiogennímu a anti-apoptotickému efektu *ADCYAP1* (Banki *et al.*, 2015).

Gen **ASCL1** (Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 1) kóduje transkripční faktor, který je po dimerizaci s jinými proteiny aktivovat transkripci cílových genů (NCBI, 1998). Mezi cílové geny *ASCL1* patří gen *FOXM1* (Forkhead Box M1), který řídí přechod G2 fáze do M fáze v rámci buněčného cyklu (Schüller *et al.*, 2007) Vliv na gen *FOXM1* vysvětluje proliferační efekt genu *ASCL1*. *FOXM1* je ale také schopen aktivovat expresi *VEGF* a tím podporovat angiogenezi (Zhang *et al.*, 2008). Dále *ASCL1* aktivuje transkripci NOTCH ligandu *DLL1* (Delta-like 1), který je zapojen do procesu angiogeneze, přičemž při potlačení exprese *DLL1* byla také inhibována aktivace NOTCH dráhy interakce, což vedlo ke snížení exprese receptoru *VEGFR2* a jeho koreceptoru *NRP1* (Castro *et al.*, 2006; Sorensen *et al.*, 2009).

Gen **CTBP2** (C-terminal Binding Protein 2) produkuje pomocí alternativní transkripce dva různé proteiny. Jeden z nich je hlavní komponentou specializovaného druhu synapse (ribbon synapse), druhý vystupuje jako transkripční represor (NCBI, 1998). Protein *CTBP2* je zodpovědný za udržení stabilní struktury transkripčního represoru TEL (Translocation ETS Leukaemia). Bylo zjištěno, že u myši

deficientních na produkty genu *TEL* nebo *CTBP2* se vyskytovaly defekty angiogeneze ve žloutkovém vaku, přičemž u *in vitro* modelů na *TEL* deficientních buněčných liniích HUVEC nedocházelo k vytvoření nových cév. *TEL* zprostředkovává větvení endotelií vazbou na *CTBP2* za vzniku komplexu, který dočasně oslabuje VEGF zprostředkovanou expresi *DLL4*, čímž spojuje VEGF a NOTCH signalizaci. Naopak ztráta *TEL* nebo *CTBP2* vedla ke zvýšení exprese *DLL4*, což vede k inhibici větvení kapilár (Roukens, 2010).

Přestože aktivita *DLL4* je spojena s potlačením větvení kapilár, kde hraje roli antagonisty NOTCH ligandu *JAG1* (Jagged 1), ve studii z roku 2017 ukázali, že nádorové buňky exprimující *DLL4* tvořily sice menší počet kapilár, ale tyto cévy byly větší. Taktéž poukázali na to, že *DLL4* a *JAG1* podněcují angiogenezi prostřednictvím odlišného mechanismu a spíše na tvorbě kapilár spolupracují. Kromě funkce *DLL4* na angiogenezi byla popsána role *DLL4* a *JAG1* na vznik rezistence nádorových buněk vůči bevacizumabu, kdy buňky exprimující vyšší hladiny endogenního ligandu byly imunní vůči anti-VEGFA léčbě (Oon *et al.*, 2017).

Ve studii z roku 2017 byl sledován vliv umlčení a posílení exprese *CTBP2* na expresi genů v buňkách v buňkách rakoviny prostaty. Snížení exprese *CTBP2* vedlo ke snížení exprese zejména genů s angiogenní funkcí *FSHR* (Follicle Stimulating Hormone Receptor), *VEGFA*, *IL8*, *AT2R* (Angiotensin Type 2 Receptor), *CCND1* (Cyclin D1) a *MMP9* (Matrix Metalloproteinase 9) (Xuan *et al.*, 2017; Stillely *et al.*, 2014; Xua *et al.*, 2017; Clere *et al.*, 2010; Bancroft *et al.*, 2001; Yasui *et al.*, 2006; Christofferson *et al.*, 2012). Nicméně *CTBP* taktéž vystupuje jako antagonist β -katenin/TCF aktivace (Kim *et al.*, 2017), přičemž tvorba komplexu β -katenin/TCF pozitivně reguluje transkripci proangiogenních genů (*IL8*, *VEGFA*) (Lévy *et al.*, 2002; Skurk *et al.*, 2005).

Gen *CXCL12* (C-X-C Motif Chemokine 12) kóduje protein SDF1 (Stromal Cell-Derived Alpha Chemokine), který funguje jako ligand pro receptor *CXCR4* (Chemokine C-X-C Motif Receptor 4) a má důležitou roli v různých buněčných procesech, jako jsou embryogeneze, reakce na zánět, tkáňová homeostáze, růst nádoru a vznik metastáz. Je to jediný chemokin, který je nutný k přežití, a bylo prokázáno, že myši deficitní na *CXCR4* nebo *CXCL12* umírají perinatálně s defekty ve vývoji vaskulární soustavy (obzvláště v gastrointestinálním traktu) (NCBI, 1998; Tachibana *et al.*, 1998). Signální dráha *CXCL12/CXCR4* je důležitým mediátorem VEGF indukované angiogeneze, přičemž blokace *CXCL12* nebo *CXCR4* vede k inhibici VEGF a FGF indukované morfogeneze endoteliálních buněk (Salvucci *et al.*, 2002; Salcedo *et al.*, 2003). Ve studii na buněčné linii CRC bylo zjištěno, že v buňkách CRC dochází k inverzní expresi *CXCL12* a *CXCR4*, kdy exprese genu pro *CXCR4* je zvýšená a naopak *CXCL12* je velmi nízká nebo nedekovatelná. *CXCL12* aktivuje *MMP9*, jejichž proangiogenní funkce byla sledována na modelu pankreatických ostrůvků, kde *MMP9* indukovala uvolnění VEGF faktorů z těchto ostrůvků (Brand *et al.*, 2005; Bergers *et al.*, 2010). Tyto signály indukované pomocí *CXCL12* zprostředkovávají okamžitou reorganizaci aktinového cytoskeletu, což vede ke zvýšení

migrace rakovinných buněk. Navíc bylo zjištěno, že CXCL12 zvyšuje expresi *VEGF* faktoru a proliferaci buněk CRC (Brand *et al.*, 2005).

Gen ***RUNX1T1*** (RUNX1 Translocation Partner 1; MTG8) kóduje myeloidní translokační protein, který interaguje s DNA-vazebnými transkripčními faktory a ve spolupráci s různými korepresory zajišťuje represi transkripce (NCBI, 1998). Bylo potvrzeno, že snížení exprese genu *RUNX1T1* v endoteliálních buňkách snižuje viabilitu, mobilitu i kapacitu buněk vytvářet trubcovité struktury. U heterozygotních myši se sníženou expresí *RUNX1T1* byla pozorována zvýšená permeabilita cév, přítomnost menšího množství angiogenních progenitorů odvozených z kostní dřeně a u více než 60 % poškození cévních struktur. Na základě těchto modelů bylo určeno, že *RUNX1T1* hraje roli nejen ve vývoji, ale i v udržení endoteliálních funkcí. Při zvýšené expresi *RUNX1T1* se zvýšila exprese zejména genů *VEGFA*, *TGFB2* (Transforming Growth Factor Beta 2), *BMP2* a *BMP4* (Bone Morphogenetic Protein 2 a 4), taktéž *ANGPT2* (Angiopoietin 2), *HBEGF* (Heparin Binding EGF Like Growth Factor), *FNI* (Fibronectin 1), *CXCR4* a *BMP2R* (Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2), což jsou známé angiogenní faktory (Liao *et al.*, 2017; Mehta *et al.*, 2007; Langenfeld *et al.*, 2004; Rothhammer *et al.*, 2007; Felcht *et al.*, 2012, 2001; Salvucci *et al.*, 2002; Nicosia *et al.*, 1993; Vinicio *et al.*, 2009). Analogicky byl pozorován pokles exprese u heterozygotů se sníženou expresí *RUNX1T1* (Liao *et al.*, 2017). Kromě výše uvedené asociace s angiogenní dráhou, může *RUNX1T1* (MTG8) potlačovat expresi genu *MMP7* (Matrix Metalloproteinase 7), která mimo jiné řídí zahájení patologické angiogeneze (angiogenní switch) (Barret *et al.*, 2012), přičemž *MMP7* umožňuje uvolnit VEGF z komplexu s jeho inhibitory, tím zvyšuje jeho biologickou dostupnost a umožňuje mu zahajovat angiogenezi (Ito *et al.*, 2009). Navíc bylo pozorováno, že u pacientů s CRC s vysokými hladinami VEGF, ale nízkými hladinami *MMP7* je angiogeneze poměrně slabá, podobně jako u pacientů s nízkou expresí *VEGF*. Naproti tomu u pacientů s vysokou expresí *VEGF* a *MMP7* je angiogeneze silná (Ito *et al.*, 2007).

Gen ***TBX18*** (T-Box 18) kóduje vysoce konzervovaný transkripční faktor, který hraje klíčovou roli v embryonálním vývoji (NCBI, 1998). *TBX18* je nutný k vývoji mimo jiné vaskulárních hladkých svalů v ledvině, přičemž ledviny s vyřazenou expresí genu *TBX18* vykazovaly výrazně sníženou hustotu cév a rozvolněné glomerulární kapilární kličky (Xu *et al.*, 2015). *TBX18* je vysoce exprimován v proepikardiu a kontroluje rané kroky srdečního vývoje (Wu *et al.*, 2014). Ztráta funkce *TBX18* způsobuje perinatální letalitu s defekty v kosterním, urogenitálním a perikardiálním systému, společně s poškozením signalizace NOTCH, Wnt a Hedgehog, což jsou dráhy zapojené do procesu angiogeneze. Sonic Hedgehog dráha je dokonce považována za klíčový endodermální faktor zahajující formaci tubulárních cévních struktur. Proepikardiální buňky s nedostatečnou expresí *TBX18* produkují epikard a koronární cévy se strukturními a funkčními defekty, přičemž snížená exprese *TBX18* souvisí se sníženou hladinou genů kódující proteiny související s tvorbou vaskulárního systému, jako jsou *VEGFA*, endoglin a angiopoietin 1 (Wu *et al.*, 2014; Paauwe *et al.*, 2015; Koblizek *et al.*, 1998) a geny zapojené

do Wnt signalizace a markery Hedgehog signalizace (Patched 1, Smoothed, GLI Family Zinc Finger 2) (Wu *et al.*, 2014).

Gen **LEP** (Leptin) kóduje protein sekretovaný bílými adipocyty, který reguluje energetickou homeostázu. Je zapojený do procesu regulace imunitní a zánětlivé odpovědi, spouští sekreci hypothalamo-pituitárních hormonů (NCBI, 1998). Je to růstový faktor v určitých typech tkání, prostřednictvím aktivace různých signálních drah dochází ke zvýšení exprese genů zapojených do regulace buněčného cyklu. Příkladem je gen **CCND1**, u kterého taktéž byla pozorována role v angiogenezi (Saxena *et al.*, 2007; Yasui *et al.*, 2006). V různých studiích bylo zjištěno, že LEP zvyšuje expresi **VEGF** v různých typech nádorů (Gonzalez *et al.*, 2006; Carino *et al.*, 2008). Leptin taktéž indukuje expresi **IL1** (Interleukin 1) a receptů a ligandů signální dráhy NOTCH v karcinomu prsu, přičemž obě dráhy mohou zvýšit expresi **VEGF** (Gonzalez *et Leavis*, 2001; Zhou *et al.*, 2011; Guo *et Gonzalez-Perez*, 2011). Bylo prokázáno, že LEP má mitogenní aktivitu v buňkách HUVEC a má roli v přestavbách matrix a to v důsledku regulace exprese matrix metaloproteináz a tkáňových inhibitorů metaloproteináz, přičemž byla detekována zvýšená exprese **MMP2** (Matrix Metaloproteinase 2), **MMP9** a jejich inhibitorů **TIMP1** a **TIMP2** (TIMP Metalopeptidase Inhibitor 1 a 2) (Park *et al.*, 2001).

Gen **LHX1** (LIM Homeobox 1) kóduje transkripční faktor významný pro vývoj renálního a urogenitálního systému (NCBI, 1998). Exprese genu **LHX1** je částečně řízena Sonic Hedgehog signální (Dormoy *et al.*, 2009). Po umlčení **LHX1** v buňkách renálního karcinomu se o cca 60 % snížila proliferace a o 10 % zvýšila apoptóza. Po snížení exprese **LHX1** se snížila i exprese genů pro MMP9, tenascin C, fibronectin, paxilin, aktin a tubulin, které jsou markery buněčné adheze a pohybu (Dormoy *et al.*, 2010). Tyto proteiny jsou taktéž zapojeny do procesu angiogeneze (Christoffersson *et al.*, 2012; Rupp *et al.*, 2016; Bergers *et al.*, 2000; Nicosia *et al.*, 1993; German *et al.*, 2014). Mezi signální dráhy a molekulární faktory (zapojené do procesů angiogeneze, pohybu buněk, proliferace a apoptózy) regulované na úrovni aktivace nebo exprese genem **LHX1** patří Akt, Stats, cytochrom c, Fas, Bad, ROR, Erk1/2, p27, p38, p53, FGFR, PDGFR, EGFR, MMP8, MMP9 (Dormoy *et al.*, 2010).

Gen **SEMA4D** (Semaphorin 4D) kóduje protein vylučovaný oligodendrocyty a zajišťuje správné směřování axonů při vývoji CNS, zahajuje reorganizaci aktinového cytoskeletu nebo migraci granulocytů a endotelií. Protein SEMA4D aktivuje GTPázy vazbou na povrchové receptory PLXNB1 a PLXNB2 (Plexin B1 a B2, na povrchu endotelií), které hrají významnou roli v mezibuněčné signalizaci. SEMA4D zprostředkovává endoteliální chemotaxi a podporuje proces vzniku mikrovaskulárních cév, přičemž vazbou na plexin B1 dochází k rozvoji nádorové angiogeneze (Basile *et al.*, 2006; Basile *et al.*, 2004; Conrotto *et al.*, 2005). Zároveň angiogenní funkce SEMA4D není pod kontrolou žádného z jiných běžných angiogenních faktorů (Conrotto *et al.*, 2005). Mezi VEGF a SEMA4D se u klinických vzorků epiteliálního nádoru vaječníku vyskytuje pozitivní korelace a mají synergický efekt na podporu angiogeneze. U buněčných linií s potlačenou expresí **VEGF**, **SEMA4D** a **PLXNB1** byla výrazně snížena exprese genů pro CD31 (Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule

1), MMP2 a VE-cadherin (Vascular Endothelial Cadherin), což jsou angiogenní markery (Chen *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2013). U squamózních nádorů hlavy a krku bylo prokázáno, že exprese *SEMA4D* se zvyšuje při inhibici VEGF. Přestože za normálních podmínek VEGF a *SEMA4D* procesu angiogeneze spolupracují, *SEMA4D* má dostatečný efekt i samostatně, což umožňuje nádorům obejít účinek anti-VEGF léčby (Zhou *et al.*, 2013). Interference exprese *SEMA4D* vedla ke snížení proliferace a migrační schopnosti u nádorových linií odvozených od nádoru prsu. Bylo pozorováno také navýšení apoptózy a potlačení vývoje cév spojené s potlačením exprese *SEMA4D* (Jiang *et al.*, 2016).

Gen *SOX17* (Transcription Factor SOX-17) kóduje člen rodiny transkripčních faktorů, které jsou zapojeny do regulace vývoje embryogeneze a determinace osudu buňky (NCBI, 1998). V myším modelu nádorových endoteliálních buněk vedla zvýšená exprese *SOX17* k indukci nádorové angiogeneze a vzniku vaskulárních abnormalit. Delece *SOX17* vedla v EC buňkách k redukcí angiogeneze a způsobila inhibici růstu nádoru a normalizaci nádorových cév, přičemž bylo zjištěno, že *SOX17* posiluje expresi *VEGFR2* (Yang *et al.*, 2013). Naopak v další studii nebyl pozorován žádný vliv *SOX17* na expresi *VEGFR2* v myším modelu. Bylo zjištěno, že *SOX17* působí upstream v NOTCH signální dráze a downstream v kanonické Wnt signální dráze. Navíc byla pozorována zvýšená exprese *SOX17* prostřednictvím β -kateninu, přičemž zvýšení exprese *SOX17* indukovalo expresi signálních molekul zapojených do NOTCH dráhy (*DDL1*, *DLL4*) (Corada *et al.*, 2013).

Gen *POU3F2* (POU Class 3 Homeobox 2) kóduje neurální transkripční faktor rodiny POU-II zapojený do neuronální diferenciace. Společně s *ASCL1* mohou přeprogramovat somatické buňky na buňky neuronální *in vitro* (NCBI, 1998). *POU3F2* aktivuje angiogenní NOTCH ligand *DLL1* (Castro *et al.*, 2006; Napp *et al.*, 2012) a naopak potlačuje efektor *HES5* (Hes Family BHLH Transcription Factor 5) (Dominquez *et al.*, 2013). Na embryonálním modelu *Danio rerio* bylo zjištěno, že *POU3F2* je exprimován ve většině struktur, nejsilněji v mozku. Při zablokování exprese embrya umírala během embryonálního vývoje v důsledku nedostatečně vyvinutého cévního systému (Wong *et al.*, 2017). Taktéž byla pozorována snížená exprese genů *FLII* (Friend Leukemia Integration 1 Transcription Factor) a *VEGFR2*, přičemž tyto geny mají proangiogenní roli (Toyama *et al.*, 2017; Takahashi *et al.*, 2001). Zároveň bylo dokázáno, že *POU3F2* je nezbytný pro raný vývoj endoteliálních buněk, ale ne pro udržení tohoto fenotypu. Dále bylo zjištěno, že exprese *POU3F2* pravděpodobně řídí signální dráhy MAPK a Wnt, přičemž *POU3F2* samotný působí upstream v signální dráze NOTCH (Wong *et al.*, 2017).

Gen *PRDM14* (PR/SET Domain 14) kóduje transkripční faktor, který má histonovou methyltransferázovou aktivitu a hraje zásadní roli v buněčné pluripotenci potlačováním exprese diferenciačních genů (NCBI, 1998). Ve studii z roku 2017 (Taniguchi *et al.*, 2017) se snažili objasnit roli *PRDM14* ve vzniku nádorových kmenových buněk a zdali ovlivňuje epigenetický stav rakovinných buněk. Bylo zjištěno, že zvýšená exprese *PRDM14* v buněčných liniích odvozených od nádoru prsu nezvýšila proliferaci *in vitro*. V případě myších modelů byla pozorována korelace mezi hladinou

PRDM14 a velikostí nádorů, přičemž nádory se zvýšenou hladinou PRDM14 byly v porovnání s kontrolami větší, výrazněji metastazovaly do lymfatických uzlin a do plic, méně se u nich projevovала apoptóza a vykazovaly vyšší hustotu cév. Změna exprese *PRDM14* ovlivnila transkripci mnoha genů spojených s metastazováním, kmenovými buňkami, apoptózou, epiteliálně mesenchymální přechod, rezistencí vůči terapii aj. Mezi geny se zvýšenou expresí patřily také geny kódující metaloproteinázy a angiogenní geny *CDH5* (Cadherin 5), *CTGF* (Connective Tissue Growth Factor), *CXCL9* (Chemokine C-X-C motif Ligand 9), *SIRP1* (Sphingosine-1-Phosphate-1 Receptor), *FNI*, *IDI* (Inhibitor Of DNA Binding 1), *IL1B* (Interleukin 1 Beta), *IL8*, *IL6* (Interleukin 6) a *NOTCH1* (Taniguchi *et al.*, 2017).

Mezi další geny, v jejichž blízkosti byla detekována hypermethylace ve skupině R, patří *COL5A1*, *FGF5*, *MAFB*, *SFRP2*, *SOX7*, *ALDH1A2*, *UTSR2*.

V případě genu *COL5A1* (Collagen Type V Alpha 1) nebyl popsán mechanismus, pomocí kterého je jeho aktivita spojena s tvorbou kapilár, nicméně delece *COL5A1* je u myši letální v rané fázi embryonálního vývoje. Smrt byla způsobena hromaděním krve ve žlutkovém vaku z důvodu nedostatečné integrity cévní stěny (Wenstrup *et al.*, 2000). Bylo zjištěno, že v buňkách HMEC1 nízká i vysoká koncentrace TGF- β 1 (důležitý angiogenní faktor) vedly ke zvýšení exprese genu *COL5A1*, naopak v buňkách HUVEC při nízkých koncentracích TGF- β 1 došlo ke zvýšení exprese a naopak při vysokých koncentracích došlo k potlačení exprese (Lux *et al.*, 2006). V další práci z roku 2012, ve které studovali vliv léčiva irbesartanu na angiogenezi v EC buňkách, bylo identifikováno 7 genů zapojených do angiogeneze, mezi nim byl i gen *COL5A1* (Ma *et al.*, 2012).

Zvýšená exprese genu *FGF5* (Fibroblast Growth Factor 5) způsobuje angiogenezi v lidských aortálních endoteliálních buňkách, přičemž umlčení exprese *FGF5* pomocí siRNA vedlo k potlačení tvorbu kapilár (Seo *et al.*, 2016). Bylo taktéž zjištěno, že intrakoronární transfer genu *FGF5* vedl ke zvýšení průtoku krve a posílení tvorby cév (Giordano *et al.*, 1996). Přesný mechanismus účinku *FGF5* na tvorbu cév nebyl popsán, nicméně FGF5 pravděpodobně působí stejným způsobem jako jiný proangiogenní faktor FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2), který je do angiogeneze zapojen skrz VEGF signalizaci (Seo *et al.*, 2016).

Gen *MAFB* (Transcription Factor MafB) podněcuje větvení kapilár v embryonálních krevních cév a u buněčných linií odvozených od endoteliálních buněk, přičemž *MAFB* vykazuje zvýšenou expresi po stimulaci VEGFA, ale ne po stimulaci jinými růstovými faktory. Stabilně snížená exprese *MAFB* významně snížila větvení endotelií ve 3D fibrinových gelech, zvýšená exprese oproti tomu tvorbu nových cév výrazně zvýšila (Jeong *et al.*, 2017). Při odpovědi na VEGFC/VEGFR3 (Vascular Endothelial Growth Factor C/Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3) signalizaci hraje významnou roli ve zprostředkování lymfoangiogeneze (Dieterich *et al.*, 2015; Koltowska *et al.*, 2015).

Gen **SFRP2** (Secreted Frizzled Related Protein 2) je považován za angiogenní faktor, který je exprimován ve vaskulatuře mnoha nádorů – například nádor prsu. SFRP2 indukoval angiogenezi v myším modelu testů Matrigel plug a CAM, přičemž bylo zjištěno, že tvorbu kapilár stimuluje prostřednictvím Wnt nekanonické calcineurin-dependentní NFAT dráhy, která je součástí VEGF indukované angiogeneze (Bhati *et al.*, 2008; Courtwright *et al.*, 2009; Zaichuk *et al.*, 2004).

V případě genu **SOX7** (SRY-Box 7) není znám přesný mechanismus, jakým je zapojen do procesu angiogeneze. Nicméně ve studii, ve které studovali roli SOX7 v procesu diferenciaci prekurzorů endotelu, zjistili, že jeho exprese je velmi důležitá pro vaskulogenezi a angiogenezi endoteliálních buněk exprimujících **VEGFR2** během embryogeneze. Kompletní potlačení exprese genu **SOX7** vedlo ke vzniku rozsáhlých vaskulárních defektů (Lilly *et al.*, 2017). Navíc nedávno bylo prokázáno, že delece **SOX7** v endoteliálních buňkách exprimujících **TIE2** vedla k defektům v procesu větvení kapilár a aberacím v angiogenezi. VEGF signalizace vedla ke zvýšení exprese **SOX7** i **SOX17** v angiogenních endoteliálních buňkách prostřednictvím mTOR dráhy, přičemž naopak geny **SOX7** a **SOX17** indukovaly expresi genu **VEGFR2**. Tento jen naznačuje, že existuje pozitivní zpětná smyčka mezi VEGF signalizací a SOX proteiny (Kim *et al.*, 2016).

ALDH1A2 (Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A2) kóduje enzym aldehyd dehydrogenázu, která katalyzuje syntézu kyseliny retinové (RA; Retinoic Acid). Lidské kmenové buňky, které exprimují vysoké hladiny aldehyd dehydrogenázy (ALDHbr; Aldehyde Dehydrogenase bright cells) vykazují angiogenní aktivitu v preklinických modelech, přičemž byly použity pro léčbu pacientů s ischemickou kardiovaskulární poruchou. Přestože mechanismus, jakým tyto buňky na angiogenezi působí, není znám, je možné, že tento efekt zprostředkovávají sekrecí dalších angiogenních faktorů a interakcemi s endoteliálními buňkami (White *et al.*, 2011). Ve studii z roku 2007 ukázali, že *all-trans*-RA indukuje angiogenezi prostřednictvím stimulace proliferace buněk HUVEC a posílení endogenní VEGF signalizace. Taktéž může z části hrát roli indukce jaterního růstového faktoru a produkce angiopoietinu 2 (Saito *et al.*, 2007). Nicméně v další studii bylo ukázáno, že angiogeneze a růst thyroidních nádorových buněk je inhibován pomocí RA. Taktéž bylo pozorováno snížení exprese VEGF v buněčných liniích odvozených od nádoru štítné žlázy, které byly ošetřovány *13-cis* RA (Hoffmann *et al.*, 2007). Nicméně taktéž bylo zjištěno, že RA stimuluje proliferaci a diferenciaci endoteliálních buněk *in vitro* prostřednictvím posílení produkce FGF2 (Gaetano *et al.*, 2001).

Chemotaxe je základní rys buněk a její regulace má obzvláště důležitou roli v procesech jako jsou organogeneze, angiogeneze a metastáze. Většina chemotaktických stimulů aktivuje receptory na buněčné membráně, které patří do rodiny receptorů spřažených s proteiny. Urotensin 2 (UTS2) je jedním z nejsilnějších vasoaktivních peptidů, přičemž vazba UTS2 na **UTS2R** (Urotensin 2 Receptor; GPR14) stimuluje migraci buněk CRC nebo progenitorových endoteliálních buněk (Federico *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2009). V jiné studii zjistili, že UTS2 skrz aktivaci UTS2R značně stimuloval tvorbu kapilár v endoteliálních buňkách potkana, navíc obrazová analýza ukázala, že tato stimulace měla stejný

efekt na tvorbu kapilár jako FGF2 *in vivo* a *in vitro* (Spinazzi *et al.*, 2006). Taktéž v případě lidských endoteliálních buněk kultivovaných pomocí Matrigel testu došlo po vystavení buněk UTS2 k tvorbě struktur podobným kapilárám. Naopak deplece UTSR2 pomocí siRNA nebo v důsledku působení antagonisty UTS2R vedla ke snížení tvorby těchto kapilár (Diebold *et al.*, 2012).

Přestože identifikace biomarkerů odpovědi vůči bevacizumabu je cílem mnoha pracovišť, jen některé provádí celogenomovou methylační analýzu za účelem profilování methylomu v rakovinných buňkách rezistentních a citlivých vůči jeho účinku. Při identifikaci prediktivního biomarkerů se mnoho z nich spíše zaměřuje na stanovení prediktivní síly vybraných cílů.

Příkladem je studie z roku 2016, kde sledovali roli diferenciatně methylovaného genu **MGMT** v účinku léčby bevacizumabem v kombinaci s temozolomidem a radioterapií u pacientů s glioblastomem. Zjistili, že pacienti s diferenciatně methylovaným **MGMT** vykazují lepší PFS, nicméně nebylo pozorováno zlepšení celkového přežití (OS; Overall Survival) u pacientů s methylovaným nebo hypomethylovaným **MGMT** (Du *et al.*, 2016).

V další studii z roku 2017 se snažili studovat roli detekce methylovaného genu **HPPI** (Hyperplastic Polyposis 1) v predikci odpovědi vůči léčbě kombinací terapeutických látek s bevacizumabem u pacientů s metastatickým typem CRC. S využitím bisulfitového sekvenování zjistili, že methylace genu **HPPI** ve volně cirkulující DNA se jeví jako prognostický marker a raný biomarker odpovědi na kombinaci terapie pomocí bevacizumabu, fluoropyrimidinu a oxaliplatinu (Herbst *et al.*, 2017).

Ve studii pana Gampenriedera a jeho kolegů z roku 2018 se snažili identifikovat methylační profil nádorových buněk prsu spojený s rezistencí těchto buněk vůči účinku bevacizumabu. Celogenomová methylační analýza byla provedena pomocí Infinium HumanMethylation450K BeadChip u 36 vzorků pacientů s HER2-negativním metastatickým typech rakoviny prsu (18 R, 18 N), kteří dostávali bevacizumab, přičemž identifikovaná signifikantně diferenciatně methylovaná CpG místa byla následně evaluována pomocí bisulfitového sekvenování na další kohortě 80 patientských vzorků a 15 vzorků bez této léčby (negativní kontrola). V dalším kroku bylo identifikováno 9 CpG míst (9 genů) podle síly asociace těchto methylovaných CpG míst s PFS nebo celkovém přežitím jednotlivých pacientů, výsledků z ROC analýzy, a jejich vzdálenosti od nejbližších genů, které umožňovaly rozdělit pacienty ze skupiny R od pacientů ze skupiny N: **WNT2B**, **MLH1**, **POLK**, **NOX4**, **PKNOX2**, **TMBIM6**, **SNRPN**, **UNC119** a **GNAS**. Tento seznam byl dále zúžen na 3 CpG místa (3 geny), která vykazovala asociaci s predikovanými respondenty s delším PFS a dobrou schopnost rozlišit skupinu pacientů N od pacientů skupiny R (**MHL1**, **POLK**, **TMBIM6**) (Gampenrieder *et al.*, 2018).

Od roku 2012 do roku 2016 probíhal mezinárodní projekt pod vedením sdružení Angiopredict, ve kterém se snažili identifikovat novu generaci metod pro stratifikaci pacientů s metastatickým typem CRC, kteří jsou léčeni bevacizumabem. Jedním z cílů bylo identifikovat methylační status, který by mohl sloužit jako prediktivní marker odpovědi vůči bevacizumabu. Pro tuto analýzu použili technologii

Differential Methylation Hybridization arraye a bisulfitové sekvenování, přičemž identifikovali 197 kandidátních biomarkerů. Tyto geny poté filtrovali dle biologických a technických parametrů, přičemž výsledné geny byly následně hodnoceny z hlediska jejich potencionálu jako prediktivní biomarkery. Žádný z nich bohužel nevykazoval dostatečnou prediktivní sílu, nicméně dva z nich, **CORO6** (Coronin 6) a **FOXF2** (Forkhead Box Protein F2), se jevily jako dobré diagnostické markery (Angiopredict, 2016). Nicméně je možné, že pro určení odpovědi vůči bevacizumabu je opravdu nutné identifikovat několik genů, které by tvořily určitou prediktivní matici, která by dohromady sloužila jako biomarker.

Výše uvedené studie využily pro skrining methylačních profilů čipové technologie či bisulfitové sekvenování, což jsou metody s vysokým rozlišením a které jsou pro celogenomové analýzy nejčastějším nástrojem. Metoda Methyl Capture sekvenování je založena na principu afinity methylvazebných proteinů k methylovaným CpG místům, přičemž tyto oblasti jsou vychytávány na magnetických kuličkách a poté osekvenovány. I přes nižší rozlišení byla tato metoda taktéž použita pro profilování methylace DNA v neuroblastomových buňkách, kde potvrdili methylační status určitých genů, často methylovaných v těchto buňkách. V této studii použili 102 vzorků čerstvě zmražené DNA a provedly na nich methylační analýzu pomocí kitu a návodu Methyl Cap Kit (Diagenode). Sekvenační knihovna byl připravena pomocí reagensií a instrukcí kitů Nebnext DNA Library Prep Master Mix Set (New England Biolabs) Multiplexing Sample Preparation Oligonucleotide Kit (Illumina) (Decock *et al.*, 2016).

V naší studii jsme analyzovaly 31 patientských vzorků, což je obdobný počet, jaký použili pan Gampenrieder a jeho kolegové pro identifikaci potencionálních biomarkerů (Gampenrieder *et al.*, 2018). Nicméně celogenomové studie jsou velmi náročné, proto i pro naši studii by bylo dobrým kompromisem výsledky z analýz dále validovat na rozšířené skupině pacientů, jako bylo v jejich případě.

V naší studii jsme se zaměřovali pouze na oblasti promotorů a geny přímo funkčně související s procesem angiogeneze. Nicméně vliv epigenetických mechanismů na regulaci genové exprese je komplexní a zdaleka ne celý probádán, přičemž se tento efekt může lišit podle typu nádoru nebo místem v genomu, kde k epigenetické změně dochází. Zaměření na analýzu pouze promotorových oblastí tak velmi zužuje schopnost identifikovat silný prediktivní biomarker. Z tohoto důvodu nedošlo v naší práci a studii pana Gampenriedera a jeho kolegů k překryvu mezi výsledky. V budoucnosti by kromě genů funkčně přímo zapojených do procesu angiogeneze mohly být validovány i další hypermethylované oblasti, které vykazovaly velkou statistickou relevantnost.

Výsledky z validace methylovaných oblastí v blízkosti genů *EN1* a *SFRP2* ukázaly, že nejvyšší korelaci mezi výsledky z Methyl Capture sekvenování a přesnějšího bisulfitového sekvenování vykazují oblasti genu *EN1*: **EN1_A** a **EN1_C_2**, kde korelační koeficient R dosáhl hodnot 0,56 a 0,61. V další části

práce bude nutné validovat i ostatní identifikované regiony diferenciallyně methylované mezi skupinami N a R a zejména rozšířit validační skupinu, jak bylo zmíněno výše.

V případě výsledků z hierarchického klastrování 20 genů hypermethylovaných ve skupině R došlo k rozdělení patientských vzorků mezi skupinami N a R do třech klastrů. Některé vzorky vykazují homogenní methylační profil napříč všemi analyzovanými geny (například vzorek č. 19 a 29), proto by bylo vhodné u těchto vzorků ověřit kvalitu průběhu methylační analýzy a posoudit hodnoty parametrů, podle kterých byly zařazeny do skupiny N.

12 Závěr

V teoretické části byla na základě dostupných literárních a internetových zdrojů popsána stručná charakteristika methylace DNA, enzymy, které zodpovídají za její vznik, mechanismus odstranění methylových skupin z cytosinových bází a v neposlední řadě možné příčiny vzniku aberantní methylace v genomu. Taktéž zde byly popsány obecné epigenetické mechanismy, které přispívají ke vzniku rakoviny kolorekta a methylační biomarkery, které slouží pro diagnostiku, stanovení prognózy a určení odpovědi pacienta vůči specifické léčbě. V dalších kapitolách byly popsány metody, které se používají pro detekci methylace DNA a princip sekvenování na platformách firmy Illumina, přičemž poslední kapitoly byly věnovány principu analýzy genomických dat a stručné charakterizaci vybraných typů sekvenačních systémů firmy Illumina.

V experimentální části byla provedena identifikace potencionálních methylačních biomarkerů odpovědi na léčbu bevacizumabem u pacientů s rakovinou kolorekta. Pro detekci methylovaných oblastí v genomu byla použita metoda Methyl Capture sekvenování, přičemž ve skupině non-respondentů (N) byla vytipována 1 hypermethylovaná oblast genu *ATXNIL*, jehož aktivita funkčně souvisí s procesem angiogeneze. V případě genu *ATXNIL* je předpokládáno, že v případě hypermethylace jeho promotorové oblasti dojde k inhibici jeho transkripce a tvorba kapilár může probíhat. Ve skupině respondentů (R) bylo identifikováno 20 hypermethylovaných genů (*ADCYAP1*, *ALDH1A2*, *ASCL1*, *COL5A1*, *CTBP2*, *CXCL12*, *EN1*, *FGF5*, *LEP*, *LHX1*, *MAFB*, *POU3F2*, *PRDM14*, *RUNX1T1*, *SEMA4D*, *SFRP2*, *SOX17*, *SOX7*, *TBX18*, *UTS2R*), jejichž aktivita má proangiogenní funkci a při jejich umlčení hypermethylocí dochází k inhibici angiogeneze v důsledku účinku bevacizumabu.

Hypermethylované oblasti genů *SFRP2* a *EN1* byly validovány pomocí bisulfitového sekvenování, přičemž do regionů byly vždy navrženy 3 páry primerů, které tuto oblast pokryly. Nejvyšší korelaci mezi výsledky z Methyl Capture sekvenování a bisulfitového sekvenování vykazovaly oblasti genu *EN1* **EN1_A** a **EN1_C_2** (hodnota korelačního koeficientu R 0,56 a 0,61).

Hierarchické klastrování 20 genů hypermethylovaných ve skupině R rozdělilo pacienty skupin N a R do 3 klastrů. Pro zlepšení této analýzy by proto bylo vhodné rozšířit validační skupinu pacientů.

V této práci jsme jako první provedli celogenomovou methylační analýzu za cílem identifikovat potencionální biomarkery vůči bevacizumabu pomocí metody Methyl Capture sekvenování u pacientů s CRC. Podařilo se nám identifikovat potencionální methylační biomarkery odpovědi vůči bevacizumabu, které mají popsanou souvislost s procesem angiogeneze.

13 Zdroje

- 10x Genomics. (2017). Applications - 10x Genomics. [online] [navštíveno 28. 8. 2017] Dostupné z <https://www.10xgenomics.com/applications/>
- Aapola, U., Lyle, R., Krohn, K., Antonarakis, S., & Peterson, P. (2001). Isolation and initial characterization of the mouse Dnmt3l gene. *Cytogenetic and Genome Research*, 92(1-2), 122-126.
- Achour, M., Jacq, X., Rondé, P., Alhosin, M., Charlot, C., Chataigneau, T., ... Bronner, C. (2008). The interaction of the SRA domain of ICBP90 with a novel domain of DNMT1 is involved in the regulation of VEGF gene expression. *Oncogene*, 27(15), 2187-2197.
- Ahn, J. B., Chung, W. B., Maeda, O., Shin, S. J., Kim, H. S., Chung, H. C., ... Issa, J. P. (2011). DNA methylation predicts recurrence from resected stage III proximal colon cancer. *Cancer*, 117(9), 1847-1854.
- Ambardar, S., Gupta, R., Trakroo, D., Lal, R., & Vakhlu, J. (2016). High throughput sequencing: An overview of sequencing chemistry. *Association of Microbiologists of India*, 56(4), 394-404.
- Angiopredict. (2016). European Commission: CORDIS: Projects and Results: Predictive Genomic Biomarkers Methods for Combination Bevacizumab (Avastin) Therapy in Metastatic Colorectal Cancer. [online] [navštíveno 10. 2. 2018] https://cordis.europa.eu/project/rcn/102319_en.html
- Antelo, M., Balaguer, F., Shia, J., Shen, Y., Hur, K., Moreira, L., ... Goel, A. (2012). A high degree of LINE-1 hypomethylation is a unique feature of early-onset colorectal cancer. *PLoS ONE*, 7(9), e45357.
- Aran, D., Toperoff, G., Rosenberg, M., & Hellman, A. (2011). Replication timing-related and gene body-specific methylation of active human genes. *Human Molecular Genetics*, 20(4), 670-680.
- Arndt, G. M., Dossey, L., Cullen, L. M., Lai, A., Druker, R., Eisbacher, M., ... Raponi, M. (2009). Characterization of global microRNA expression reveals oncogenic potential of miR-145 in metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer*, 9(1), 374.
- Arnold, C. N., Goel, A., & Boland, C. R. (2003). Role of hMLH1 promoter hypermethylation in drug resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines. *International Journal of Cancer*, 106(1), 66-73.
- Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F., ... Tewari, M. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(12), 5003-5008.
- Ashktorab, H., Belgrave, K., Hosseinkhah, F., Brim, H., Nouraie, M., Takkikto, M., ... Smoot, D. (2009). Global histone H4 acetylation and HDAC2 expression in colon adenoma and carcinoma. *Digestive Diseases and Sciences*, 54(10), 2109-2117.
- Ausch, C., Kim, Y., Tsuchiya, K. D., Dzieciatkowski, S., Washington, M. K., Paraskeva, C., ... Grady, W. M. (2009). Comparative analysis of PCR-based biomarker assay methods for colorectal polyp detection from fecal DNA. *Clinical Chemistry*, 55(8), 1559-1563.
- Baba, Y., Noshio, K., Shima, K., Huttenhower, C., Tanaka, N., Hazra, A., ... Ogino, S. (2010). Hypomethylation of the IGF2 DMR in colorectal tumors, detected by bisulfite pyrosequencing, is associated with poor prognosis. *Gastroenterology*, 139(6), 1855-1864.
- Bachar-Dahan, L., Goltzmann, J., Yaniv, A., & Gazit, A. (2006). Engrailed-1 negatively regulates beta-catenin transcriptional activity by destabilizing beta-catenin via a glycogen synthase kinase-3beta-independent pathway. *Molecular Biology of the Cell*, 17(6), 2572-2580.
- Ball, M. P., Li, J. B., Gao, Y., Lee, J., LeProust, E. M., Park, I., ... Church, G. M. (2009). Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. *Nature Biotechnology*, 27(4), 361-368.
- Bancroft, C. C., Chen, Z., Dong, G., Sunwoo, J. B., Yen, N., Park, C., & Van Waes, C. (2001). Coexpression of proangiogenic factors IL-8 and VEGF by human head and neck squamous cell carcinoma involves coactivation by MEK-MAPK and IKK-NF-kappaB signal pathways. *Clinical Cancer Research*, 7(2), 435-42.
- Banki, E., Sosnowska, D., Tucsek, Z., Gautam, T., Toth, P., Tarantini, S., ... Ungvari, Z. (2015). Age-related decline of autocrine pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide impairs angiogenic capacity of rat cerebrovascular endothelial cells. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 70(6), 665-674.
- Barrett, C. W., Smith, J. J., Lu, L. C., Markham, N., Stengel, K. R., Short, S. P., ... Williams, C. S. (2012). Kaiso directs the transcriptional corepressor MTG16 to the Kaiso binding site in target promoters. *PLoS ONE*, 7(12), e51205.
- Basile, J. R., Barac, A., Zhu, T., Guan, K. L., & Gutkind, J. S. (2004). Class IV semaphorins promote angiogenesis by stimulating Rho-initiated pathways through plexin-B. *Cancer Research*, 64(15), 5212-5224.
- Basile, J. R., Castilho, R. M., Williams, V. P., & Gutkind, J. S. (2006). Semaphorin 4D provides a link between axon guidance processes and tumor-induced angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24), 9017-9022.
- Belinsky, S. A., Nikula, K. J., Baylin, S. B., & Issa, J. P. (1996). Increased cytosine DNA-methyltransferase activity is target-cell-specific and an early event in lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(9), 4045-4050.

- Bellacosa, A., Cicchillitti, L., Schepis, F., Riccio, A., Yeung, A. T., Matsumoto, Y., ... Neri, G. (1999). MED1, a novel human methyl-CpG-binding endonuclease, interacts with DNA mismatch repair protein MLH1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7), 3969-3974.
- Beltran, A. S., Graves, L. M., & Blancafort, P. (2014). Novel role of Engrailed 1 as a prosurvival transcription factor in basal-like breast cancer and engineering of interference peptides block its oncogenic function. *Oncogene*, 33(39), 4767-4777.
- Benjamin, A. L., Green, B. B., Crooker, B. A., McKay, S. D., & Kerr, D. E. (2016). Differential responsiveness of Holstein and Angus dermal fibroblasts to LPS challenge occurs without major differences in the methylome. *BMC Genomics*, 17(1), 258.
- Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., Smith, G. P., Milton, J., Brown, C. G., ... Hall, K. P. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 456(7218), 53-59.
- Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T. H., Itoh, T., Tamaki, K., ... Hanahan*, D. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature Cell Biology*, 2(10), 737-744.
- Berglund, E. C., Kiialainen, A., & Syvänen, A. (2011). Next-generation sequencing technologies and applications for human genetic history and forensics. *Investigative Genetics*, 2(1), 23.
- Bestor, T. H. (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Human Molecular Genetics*, 9(16), 2395-2402.
- Bhati, R., Patterson, C., Livasy, C. A., Fan, C., Ketelsen, D., Hu, Z., ... Klauber-DeMore, N. (2008). Molecular characterization of human breast tumor vascular cells. *The American Journal of Pathology*, 172(5), 1381-1390.
- Bhutani, N., Brady, J. J., Damian, M., Sacco, A., Corbel, S. Y., & Blau, H. M. (2010). Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature*, 463(7284), 1042-1047.
- Biason, P., Masier, S., & Toffoli, G. (2008). UGT1A128 and other UGT1A polymorphisms as determinants of irinotecan toxicity. *Journal of Chemotherapy*, 20(2), 158-165.
- BIO fidal. (n.d.). MiSeq Illumina sequencing system at Lyon. [online] [navštívěno 26. 1. 2018] Dostupné z <http://www.biofidal-lab.com/details-miseq+illumina+sequencing+system+at+lyon-50.html>
- Biomarkers Definitions Working Group. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 69(3), 89-95.
- Bioinformatics. (2015). OK OK, stop badgering! I'll try Python.... [online] Dostupné z <https://sidderb.wordpress.com/2015/07/27/ok-ok-stop-badgering-ill-try-python/>
- Bird, A. P. (1980). DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(7), 1499-1504.
- Bock, C., Tomazou, E. M., Brinkman, A. B., Müller, F., Simmer, F., Gu, H., ... Meissner, A. (2010). Quantitative comparison of genome-wide DNA methylation mapping technologies. *Nature Biotechnology*, 28(10), 1106-1114.
- Borgel, J., Guibert, S., & Weber, M. (2012). Methylated DNA Immunoprecipitation (MeDIP) from low amounts of cells. *Methods in Molecular Biology*, 149-158.
- Bostick, M., Kim, J. K., Esteve, P., Clark, A., Pradhan, S., & Jacobsen, S. E. (2007). UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science*, 317(5845), 1760-1764.
- Bottos, A., Destro, E., Rissone, A., Graziano, S., Cordara, G., Assenzio, B., ... Arese, M. (2009). The synaptic proteins neurexins and neuroligins are widely expressed in the vascular system and contribute to its functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(49), 20782-20787.
- Brand, S., Dambacher, J., Beigel, F., Olszak, T., Diebold, J., Otte, J., ... Eichhorst, S. T. (2005). CXCR4 and CXCL12 are inversely expressed in colorectal cancer cells and modulate cancer cell migration, invasion and MMP-9 activation. *Experimental Cell Research*, 310(1), 117-130.
- Brandeis, M., Frank, D., Keshet, I., Siegfried, Z., Mendelsohn, M., Names, A., ... Cedar, H. (1994). Spl elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature*, 371(6496), 435-438.
- Brenet, F., Moh, M., Funk, P., Feierstein, E., Viale, A. J., Socci, N. D., & Scandura, J. M. (2011). DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. *PLoS ONE*, 6(1), e14524.
- Brenner, C., Deplus, R., Didelot, C., Lorient, A., Vire, E., De Smet, C., ... Fuks, F. (2005). Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *The EMBO Journal*, 24(2), 336-346.
- Brinkman, A. B., Simmer, F., Ma, K., Kaan, A., Zhu, J., & Stunnenberg, H. G. (2010). Whole-genome DNA methylation profiling using MethylCap-seq. *Methods*, 52(3), 232-236.
- Brown, S. E., Fraga, M. F., Weaver, I. C., Berdasco, M., & Szyf, M. (2007). Variations in DNA methylation patterns during the cell cycle of HeLa cells. *Epigenetics*, 2(1), 54-65.
- Brunner, A. L., Johnson, D. S., Kim, S. W., Valouev, A., Reddy, T. E., Neff, N. F., ... Myers, R. M. (2009). Distinct DNA methylation patterns characterize differentiated human embryonic stem cells and developing human fetal liver. *Genome Research*, 19(6), 1044-1056.
- Bönsch, D., Lenz, B., Fiszer, R., Frieling, H., Kornhuber, J., & Bleich, S. (2006). Lowered DNA methyltransferase (DNMT-3b) mRNA expression is associated with genomic DNA hypermethylation in patients with chronic alcoholism. *Journal of Neural Transmission*, 113(9), 1299-1304.

- Cameron, D., Brown, J., Dent, R., Jackisch, C., Mackey, J., Pivot, X., ... Bell, R. (2013). Adjuvant bevacizumab-containing therapy in triple-negative breast cancer (BEATRICE): primary results of a randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 14(10), 933-942.
- Carbone, C., Piro, G., Simionato, F., Ligorio, F., Cremolini, C., Loupakis, F., ... Melisi, D. (2017). Homeobox B9 mediates resistance to Anti-VEGF therapy in colorectal cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 23(15), 4312-4322.
- Carino, C., Olawaiye, A. B., Cherfils, S., Serikawa, T., Lynch, M. P., Rueda, B. R., & Gonzalez, R. R. (2008). Leptin regulation of proangiogenic molecules in benign and cancerous endometrial cells. *International Journal of Cancer*, 123(12), 2782-2790.
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473(7347), 298-307.
- Casparly, T., Cleary, M. A., Baker, C. C., Guan, X., & Tilghman, S. M. (1998). Multiple mechanisms regulate imprinting of the mouse distal chromosome 7 gene cluster. *Molecular and Cellular Biology*, 18(6), 3466-3474.
- Castro, D. S., Skowronska-Krawczyk, D., Armant, O., Donaldson, I. J., Parras, C., Hunt, C., ... Guillemot, F. (2006). Proneural bHLH and Brn Proteins Coregulate a Neurogenic Program through Cooperative Binding to a Conserved DNA Motif. *Developmental Cell*, 11(6), 831-844.
- Castro, D. S., Skowronska-Krawczyk, D., Armant, O., Donaldson, I. J., Parras, C., Hunt, C., ... Guillemot, F. (2006). Proneural bHLH and Brn proteins coregulate a neurogenic program through cooperative binding to a conserved DNA motif. *Developmental Cell*, 11(6), 831-844.
- Cervoni, N., & Szyf, M. (2001). Demethylase activity is directed by histone acetylation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(44), 40778-40787.
- Cheetham, S., Tang, M. J., Mesak, F., Kennecke, H., Owen, D., & Tai, I. T. (2008). SPARC promoter hypermethylation in colorectal cancers can be reversed by 5-Aza-2'-deoxycytidine to increase SPARC expression and improve therapy response. *British Journal of Cancer*, 98(11), 1810-1819.
- Chan, A. O., Broaddus, R. R., Houlihan, P. S., Issa, J. J., Hamilton, S. R., & Rashid, A. (2002). CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. *The American Journal of Pathology*, 160(5), 1823-1830.
- Chen, R. Z., Pettersson, U., Beard, C., Jackson-Grusby, L., & Jaenisch, R. (1998). DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature*, 395(6697), 89-93.
- Chen, Y., Zhang, L., Liu, W., & Wang, K. (2018). VEGF and SEMA4D have synergistic effects on the promotion of angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 23(1), 2.
- Chen, W., Han, Z. J., Skoletsky, J., Olson, J., Sah, J., Myeroff, L., ... Markowitz, S. D. (2005). Detection in fecal DNA of colon cancer-specific methylation of the nonexpressed vimentin gene. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 97(15), 1124-1132.
- Choi, J. D., Underkoffler, L. A., Wood, A. J., Collins, J. N., Williams, P. T., Golden, J. A., ... Oakey, R. J. (2005). A novel variant of Inpp5f is imprinted in brain, and its expression is correlated with differential methylation of an internal CpG island. *Molecular and Cellular Biology*, 25(13), 5514-5522.
- Christoffersson, G., Vagesjo, E., Vandooren, J., Liden, M., Massena, S., Reinert, R. B., ... Phillipson, M. (2012). VEGF-A recruits a proangiogenic MMP-9-delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue. *Blood*, 120(23), 4653-4662.
- Citterio, E., Papait, R., Nicassio, F., Vecchi, M., Gomiero, P., Mantovani, R., ... Bonapace, I. M. (2004). Np95 is a histone-binding protein endowed with ubiquitin ligase activity. *Molecular and Cellular Biology*, 24(6), 2526-2535.
- Clere, N., Corre, I., Faure, S., Guihot, A., Vessières, E., Chalopin, M., ... Henrion, D. (2010). Deficiency or blockade of angiotensin II type 2 receptor delays tumorigenesis by inhibiting malignant cell proliferation and angiogenesis. *International Journal of Cancer*, 127(10), 2279-2291.
- Collado, B., Gutiérrez-Cañás, I., Rodríguez-Henche, N., Prieto, J. C., & Carmena, M. J. (2004). Vasoactive intestinal peptide increases vascular endothelial growth factor expression and neuroendocrine differentiation in human prostate cancer LNCaP cells. *Regulatory Peptides*, 119(1-2), 69-75.
- Compere, S. J., & Palmiter, R. D. (1981). DNA methylation controls the inducibility of the mouse metallothionein-I gene in lymphoid cells. *Cell*, 25(1), 233-240.
- Conrotto, P., Valdembrì, D., Corso, S., Serini, G., Tamagnone, L., Comoglio, P. M., ... Giordano, S. (2005). Sema4D induces angiogenesis through Met recruitment by Plexin B1. *Blood*, 105(11), 4321-4329.
- Corada, M., Orsenigo, F., Morini, M. F., Pitulescu, M. E., Bhat, G., Nyqvist, D., ... Dejana, E. (2013). Sox17 is indispensable for acquisition and maintenance of arterial identity. *Nature Communications*, 4.
- Cortellino, S., Xu, J., Sannai, M., Moore, R., Caretti, E., Cigliano, A., ... Bellacosa, A. (2011). Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell*, 146(1), 67-79.
- Costa, F. F. (2005). Non-coding RNAs: New players in eukaryotic biology. *Gene*, 357(2), 83-94.
- Coulondre, C., Miller, J. H., Farabaugh, P. J., & Gilbert, W. (1978). Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature*, 274(5673), 775-780.

- Courtwright, A., Siamakpour-Reihani, S., Arbiser, J. L., Banet, N., Hilliard, E., Fried, L., ... Klauber-DeMore, N. (2009). SFRP2 stimulates angiogenesis via a calcineurin/NFAT signaling pathway. *Cancer Research*, 69(11), 4621-4628.
- Crea, F., Nobili, S., Paolicchi, E., Perrone, G., Napoli, C., Landini, I., ... Mini, E. (2011). Epigenetics and chemoresistance in colorectal cancer: An opportunity for treatment tailoring and novel therapeutic strategies. *Drug Resistance Updates*, 14(6), 280-296.
- Crick, F. H., Barnett, L., Brenner, S., & Watts-Tobin, R. J. (1961). General nature of the genetic code for proteins. *Nature*, 192(4809), 1227-1232.
- Cui, K., Onyango, P., Brandenburg, A., Wu, Y., Hsieh, C. L., & Feinberg, A. P. (2002). Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2. *Cancer Research*, 62(22), 6442-6446.
- Cui, L., Chung, T. H., Tan, D., Sun, X., & Jia, X. (2014). JBP1-seq: A fast and efficient method for genome-wide profiling of 5hmC. *Genomics*, 104(5), 368-375.
- D'Alessio, A. C., Weaver, I. C., & Szyf, M. (2007). Acetylation-induced transcription is required for active DNA demethylation in methylation-silenced genes. *Molecular and Cellular Biology*, 27(21), 7462-7474.
- Daniel, J. M., Spring, C. M., Crawford, H. C., Reynolds, A. B., & Baig, A. (2002). The p120ctn-binding partner Kaiso is a bimodal DNA-binding protein that recognizes both a sequence-specific consensus and methylated CpG dinucleotides. *Nucleic Acids Research*, 30(13), 2911-2919.
- Decock, A., Ongenaert, M., Van Criekinge, W., Speleman, F., & Vandesompele, J. (2016). DNA methylation profiling of primary neuroblastoma tumors using methyl-CpG-binding domain sequencing. *Scientific Data*, 3, 160004.
- De Jesus Perez, V. A., Alastalo, T., Wu, J. C., Axelrod, J. D., Cooke, J. P., Amieva, M., & Rabinovitch, M. (2009). Bone morphogenetic protein 2 induces pulmonary angiogenesis via Wnt- β -catenin and Wnt-RhoA-Rac1 pathways. *The Journal of Cell Biology*, 184(1), 83-99.
- Deng, J., Shoemaker, R., Xie, B., Gore, A., LeProust, E. M., Antosiewicz-Bourget, J., ... Zhang, K. (2009). Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. *Nature Biotechnology*, 27(4), 353-360.
- Diebold, I., Petry, A., Sabrane, K., Djordjevic, T., Hess, J., & Görlach, A. (2012). The HIF1 target gene NOX2 promotes angiogenesis through urotensin-II. *Journal of Cell Science*, 125(4), 956-964.
- Dieterich, L. C., Klein, S., Mathelier, A., Sliwa-Primorac, A., Ma, Q., Hong, Y., ... Detmar, M. (2015). DeepCAGE transcriptomics reveal an important role of the transcription factor MAFB in the lymphatic endothelium. *Cell Reports*, 13(7), 1493-1504.
- Dominguez, M. H., Ayoub, A. E., & Rakic, P. (2013). POU-III transcription factors (Brn1, Brn2, and Oct6) influence neurogenesis, molecular identity, and migratory destination of upper-layer cells of the cerebral cortex. *Cerebral Cortex*, 23(11), 2632-2643.
- Dong, Y., Zhao, J., Wu, C., Zhang, L., Liu, X., Kang, W., ... Yu, J. (2013). Tumor suppressor functions of miR-133a in colorectal cancer. *Molecular Cancer Research*, 11(9), 1051-1060.
- Dormoy, V., Béraud, C., Lindner, V., Thomas, L., Coquard, C., Barthelmebs, M., ... Massfelder, T. (2010). LIM-class homeobox gene *Lim1*, a novel oncogene in human renal cell carcinoma. *Oncogene*, 30(15), 1753-1763.
- Dormoy, V., Danilin, S., Lindner, V., Thomas, L., Rothhut, S., Coquard, C., ... Massfelder, T. (2009). The sonic hedgehog signaling pathway is reactivated in human renal cell carcinoma and plays orchestral role in tumor growth. *Molecular Cancer*, 8(1), 123.
- Du, C., Ren, J., Zhang, R., Xin, T., Li, Z., Zhang, Z., ... Pang, Q. (2016). Effect of Bevacizumab Plus Temozolomide-Radiotherapy for Newly Diagnosed Glioblastoma with Different MGMT Methylation Status: A Meta-Analysis of Clinical Trials. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 22, 3486-3492.
- Ebert, M. P., Model, F., Mooney, S., Hale, K., Lograsso, J., Tonnes-Priddy, L., ... Lofton-Day, C. (2006). *Aristaless-like homeobox-4* gene methylation is a potential marker for colorectal adenocarcinomas. *Gastroenterology*, 131(5), 1418-1430.
- Eckhardt, F., Lewin, J., Cortese, R., Rakyan, V. K., Attwood, J., Burger, M., ... Beck, S. (2006). DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nature Genetics*, 38(12), 1378-1385.
- Ehrlich, M., Gama-Sosa, M. A., Huang, L., Midgett, R. M., Kuo, K. C., McCune, R. A., & Gehrke, C. (1982). Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic Acids Research*, 10(8), 2709-2721.
- Eisenstein, M. (2015). Startups use short-read data to expand long-read sequencing market. *Nature Biotechnology*, 33(5), 433-435.
- ENCODE Project Consortium. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 489(7414), 57-74.
- Esteller, M., Corn, P. G., Baylin, S. B., & Herman, J. G. (2001). A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Research*, 61(8), 3225-3229.

- Estéicio, M. R., Gharibyan, V., Shen, L., Ibrahim, A. E., Doshi, K., He, R., ... Issa, J. J. (2007). LINE-1 Hypomethylation in Cancer Is Highly Variable and Inversely Correlated with Microsatellite Instability. *PLoS ONE*, 2(5), e399.
- Federico, A., Zappavigna, S., Romano, M., Grieco, P., Luce, A., Marra, M., ... Caraglia, M. (2014). Urotensin-II receptor is over-expressed in colon cancer cell lines and in colon carcinoma in humans. *European Journal of Clinical Investigation*, 44(3), 285-294.
- Feil, R., Charlton, J., Bird, A. P., Walter, J., & Reik, W. (1994). Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for bisulphite genomic sequencing. *Nucleic Acids Research*, 22(4), 695-696.
- Feinberg, A. P., & Vogelstein, B. (1983a). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, 301(5895), 89-92.
- Feinberg, A. P., & Vogelstein, B. (1983b). Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 111(1), 47-54.
- Felcht, M., Luck, R., Schering, A., Seidel, P., Srivastava, K., Hu, J., ... Augustin, H. G. (2012). Angiotensin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling. *Journal of Clinical Investigation*, 122(6), 1991-2005.
- Feltus, F. A., Lee, E. K., Costello, J. F., Plass, C., & Vertino, P. M. (2003). Predicting aberrant CpG island methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(21), 12253-12258.
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J., Comber, H., ... Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer*, 49(6), 1374-1403.
- Filion, G. J., Zhenilo, S., Salozhin, S., Yamada, D., Prokhortchouk, E., & Defossez, P. (2006). A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 26(1), 169-181.
- Fischer, C., Jonckx, B., Mazzone, M., Zacchigna, S., Loges, S., Pattarini, L., ... Carmeliet, P. (2007). Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell*, 131(3), 463-475.
- Fouse, S. D., Shen, Y., Pellegrini, M., Cole, S., Meissner, A., Van Neste, L., ... Fan, G. (2008). Promoter CpG methylation contributes to ES cell gene regulation in parallel with Oct4/Nanog, PcG complex, and histone H3 K4/K27 trimethylation. *Cell Stem Cell*, 2(2), 160-169.
- Fraga, M. F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., ... Esteller, M. (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature Genetics*, 37(4), 391-400.
- Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., ... Paul, C. L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(5), 1827-1831.
- Fuks, F. (2003). The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Research*, 31(9), 2305-2312.
- Fuks, F., Burgers, W. A., Brehm, A., Hughes-Davies, L., & Kouzarides, T. (2000). DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nature Genetics*, 24(1), 88-91.
- Fu, L., Chen, L., Yang, J., Ye, T., Chen, Y., & Fang, J. (2012). HIF-1 α -induced histone demethylase JMJD2B contributes to the malignant phenotype of colorectal cancer cells via an epigenetic mechanism. *Carcinogenesis*, 33(9), 1664-1673.
- Gaetano, C., Catalano, A., Illi, B., Felici, A., Minucci, S., Palumbo, R., ... Capogrossi, M. C. (2001). Retinoids induce Fibroblast Growth Factor-2 production in endothelial cells via Retinoic Acid Receptor activation and stimulate angiogenesis in vitro and in vivo. *Circulation Research*, 88(4), e38-e47.
- Gampenrieder, S. P., Rinnerthaler, G., Hackl, H., Pulverer, W., Weinhaeusel, A., Ilic, S., ... Hufnagl, R. (2018). DNA methylation signatures predicting bevacizumab efficacy in metastatic breast cancer. *Theranostics*, 8(8), 2278-2288.
- Gardiner-Garden, M., & Frommer, M. (1987). CpG Islands in vertebrate genomes. *Journal of Molecular Biology*, 196(2), 261-282.
- Ge, Y., Pu, M., Gowher, H., Wu, H., Ding, J., Jeltsch, A., & Xu, G. (2004). Chromatin targeting of de novo DNA methyltransferases by the PWWP domain. *Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25447-25454.
- Gebhard, C., Benner, C., Ehrlich, M., Schwarzfischer, L., Schilling, E., Klug, M., ... Rehli, M. (2010). General transcription factor binding at CpG islands in normal cells correlates with resistance to de novo DNA methylation in cancer cells. *Cancer Research*, 70(4), 1398-1407.
- Geiman, T. M., Sankpal, U. T., Robertson, A. K., Zhao, Y., Zhao, Y., & Robertson, K. D. (2004). DNMT3B interacts with hSNF2H chromatin remodeling enzyme, HDACs 1 and 2, and components of the histone methylation system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 318(2), 544-555.
- German, A. E., Mammoto, T., Jiang, E., Ingber, D. E., & Mammoto, A. (2014). Paxillin controls endothelial cell migration and tumor angiogenesis by altering neuropilin 2 expression. *Journal of Cell Science*, 127(8), 1672-1683.
- Gibney, E. R., & Nolan, C. M. (2010). Epigenetics and gene expression. *Heredity*, 105(1), 4-13.
- Giordano, F. J., Ping, P., McKirnan, M. D., Nozaki, S., Demaria, A. N., Dillmann, W. H., ... Hammond, H. K. (1996). Intracoronary gene transfer of fibroblast growth factor-5 increases blood flow and contractile function in an ischemic region of the heart. *Nature Medicine*, 2(5), 534-539.

- Goel, A., Xicola, R. M., Nguyen, T., Doyle, B. J., Sohn, V. R., Bandipalliam, P., ... Llor, X. (2010). Aberrant DNA methylation in hereditary nonpolyposis colorectal cancer without mismatch repair deficiency. *Gastroenterology*, 138(5), 1854-1862.
- Gonzalez, R. R., Cherfils, S., Escobar, M., Yoo, J. H., Carino, C., Styer, A. K., ... Rueda, B. R. (2006). Leptin signaling promotes the growth of mammary tumors and increases the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor type two (VEGF-R₂). *Journal of Biological Chemistry*, 281(36), 26320-26328.
- Gonzalez, R. R., & Leavis, P. (2001). Leptin upregulates beta3-integrin expression and interleukin-1beta, upregulates leptin and leptin receptor expression in human endometrial epithelial cell cultures. *Endocrine*, 16(1), 21-28.
- Goto, K., Numata, M., Komura, J., Ono, T., Bestor, T., & Kondo, H. (1994). Expression of DNA methyltransferase gene in mature and immature neurons as well as proliferating cells in mice. *Differentiation*, 56(1), 39-44.
- Grützmann, R., Molnar, B., Pilarsky, C., Habermann, J. K., Schlag, P. M., Saeger, H. D., ... Lofton-Day, C. (2008). Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay. *PLoS ONE*, 3(11), e3759.
- Guo, J., Su, Y., Zhong, C., Ming, G., & Song, H. (2011a). Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*, 145(3), 423-434.
- Guo, J. U., Ma, D. K., Mo, H., Ball, M. P., Jang, M., Bonaguidi, M. A., ... Song, H. (2011b). Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. *Nature Neuroscience*, 14(10), 1345-1351.
- Gwynn, B., Lueders, K., Sands, M. S., & Birkenmeier, E. H. (1998). Intracisternal A-particle element transposition into the murine beta-glucuronidase gene correlates with loss of enzyme activity: a new model for beta-glucuronidase deficiency in the C3H mouse. *Molecular and Cellular Biology*, 18(11), 6474-6481.
- Han, H., Cortez, C. C., Yang, X., Nichols, P. W., Jones, P. A., & Liang, G. (2011). DNA methylation directly silences genes with non-CpG island promoters and establishes a nucleosome occupied promoter. *Human Molecular Genetics*, 20(22), 4299-4310.
- Han, L., & Zhao, Z. (2009). CpG islands or CpG clusters: how to identify functional GC-rich regions in a genome? *BMC Bioinformatics*, 10(1), 65.
- Harrison, S., & Benziger, H. (2011). The molecular biology of colorectal carcinoma and its implications: A review. *The Surgeon*, 9(4), 200-210.
- Hashimoto, H., Horton, J. R., Zhang, X., Bostick, M., Jacobsen, S. E., & Cheng, X. (2008). The SRA domain of UHRF1 flips 5-methylcytosine out of the DNA helix. *Nature*, 455(7214), 826-829.
- Hashimoto, H., Horton, J. R., Zhang, X., & Cheng, X. (2009). UHRF1, a modular multi-domain protein, regulates replication-coupled crosstalk between DNA methylation and histone modifications. *Epigenetics*, 4(1), 8-14.
- Hata, K., Okano, M., Lei, H., & Li, E. (2002). Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development*, 129(8), 1983-1993.
- He, L., & Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, 5(7), 522-531.
- He, Y., Li, B., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., ... Xu, G. (2011). Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*, 333(6047), 1303-1307.
- Hellman, A., & Chess, A. (2007). Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science*, 315(5815), 1141-1143.
- Hendrich, B., & Bird, A. (1998). Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 18(11), 6538-6547.
- Hendrich, B., Hardeland, U., Ng, H., Jiricny, J., & Bird, A. (1999). The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature*, 401(6750), 304-304.
- Herbst, A., Rahmig, K., Stieber, P., Philipp, A., Jung, A., Ofner, A., ... Kolligs, F. T. (2011). Methylation of NEUROG1 in serum is a sensitive marker for the detection of early colorectal cancer. *The American Journal of Gastroenterology*, 106(6), 1110-1118.
- Herbst, A., Vdovin, N., Gacesa, S., Philipp, A., Nagel, D., Holdt, L. M., ... Kolligs, F. T. (2017). Methylated free-circulatingHPP1DNA is an early response marker in patients with metastatic colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, 140(9), 2134-2144.
- Hermann, A., Goyal, R., & Jeltsch, A. (2004). The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *Journal of Biological Chemistry*, 279(46), 48350-48359.
- Hoffmann, S., Rockenstein, A., Ramaswamy, A., Celik, I., Wunderlich, A., Lingelbach, S., ... Zielke, A. (2007). Retinoic acid inhibits angiogenesis and tumor growth of thyroid cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 264(1-2), 74-81.
- Holliday, R., & Pugh, J. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*, 187(4173), 226-232.
- Holm, T. M., Jackson-Grusby, L., Brambrink, T., Yamada, Y., Rideout, W. M., & Jaenisch, R. (2005). Global loss of imprinting leads to widespread tumorigenesis in adult mice. *Cancer Cell*, 8(4), 275-285.

- Horvath, G., Reglodi, D., Brubel, R., Halasz, M., Barakonyi, A., Tamas, A., ... Szereday, L. (2014). Investigation of the possible functions of PACAP in human trophoblast cells. *Journal of Molecular Neuroscience*, 54(3), 320-330.
- Hotchkiss, W. T. (1948). The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *The Journal of Biological Chemistry*, 168, 315-332.
- Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., ... Kabbinavar, F. (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 350(23), 235-42.
- Illingworth, R. S., Gruenewald-Schneider, U., Webb, S., Kerr, A. R., James, K. D., Turner, D. J., ... Bird, A. P. (2010). Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genetics*, 6(9), e1001134.
- Illumina. (2010a). Illumina next generation sequencing data analysis. [online] [navštíveno 18. 8. 2017] Dostupné z https://www.epigen.it/system/files/06_A_Dal%20Fiume.pdf
- Illumina. (2010b). Illumina sequencing technology. [online] [navštíveno 18. 8. 2017] Dostupné z https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf
- Illumina. (2014). Nextera DNA library preparation kits data sheet. [online] [navštíveno 18. 8. 2017] Dostupné z www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_nextera_dna_sample_prep.pdf
- Illumina. (2015a). HiSeq 2500 Sequencing System. [online] [navštíveno 24. 10. 2017] Dostupné z <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet-hiseq-2500.pdf>
- Illumina. (2015b). Patterned flow cell technology: Subtitled | Illumina video. In: Youtube [online] [navštíveno 18. 8. 2017] Dostupné z <https://www.youtube.com/watch?v=DJQn-qA6fTw>
- Illumina. (2016). Illumina sequencing by synthesis. In: Youtube [online] [navštíveno 18. 8. 2017] Dostupné z <https://www.youtube.com/watch?v=fCd6B5HRaZ8&feature=youtu.be>
- Illumina. (2017a). An introduction to next-generation sequencing technology. [online] [navštíveno 18. 8. 2017] Dostupné z https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf
- Illumina. (2017b). DNA sequencing data analysis | Simple software tools. [online] [navštíveno 17. 9. 2017] Dostupné z <https://www.illumina.com/informatics/sequencing-data-analysis/dna.html>
- Illumina. (2017c). DNA sequencing methods collection. [online] [navštíveno 12. 9. 2017] Dostupné z https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/research_reviews/dna-sequencing-methods-review-web.pdf
- Illumina. (2017d). HiSeq 2500 System. [online] [navštíveno 24. 10. 2017] Dostupné z <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/hiseq-2500.html>
- Illumina. (2017f). MiSeq System | Focused power for targeted gene and small genome sequencing. [online] [navštíveno 24. 9. 2017] Dostupné z <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/miseq.html>
- Illumina. (2017g). Paired-end vs. single-read sequencing technology. [online] [navštíveno 11. 8. 2017] Dostupné z <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/paired-end-vs-single-read-sequencing.html>
- Illumina. (2017h). Sequencing Platforms | Compare NGS platforms (benchtop, production-scale). [online] [navštíveno 24. 10. 2017] Dostupné z <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html>
- Illumina. (2018). Sequencing Platforms | Compare NGS platforms (benchtop, production-scale). [online] [navštíveno 28. 2. 2018] Dostupné z <https://emea.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html>
- Imperiale, T. F., Ransohoff, D. F., Itzkowitz, S. H., Levin, T. R., Lavin, P., Lidgard, G. P., ... Berger, B. M. (2014). Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *New England Journal of Medicine*, 370(14), 1287-1297.
- Irizarry, R. A., Ladd-Acosta, C., Wen, B., Wu, Z., Montano, C., Onyango, P., ... Feinberg, A. P. (2009). The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nature Genetics*, 41(2), 178-186.
- Ito, S., D'Alessio, A. C., Taranova, O. V., Hong, K., Sowers, L. C., & Zhang, Y. (2010). Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*, 466(7310), 1129-1133.
- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S. C., Collins, L. B., Swenberg, J. A., ... Zhang, Y. (2011). Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*, 333(6047), 1300-1303.
- Ito, T. K., Ishii, G., Chiba, H., & Ochiai, A. (2007). The VEGF angiogenic switch of fibroblasts is regulated by MMP-7 from cancer cells. *Oncogene*, 26(51), 7194-7203.
- Ito, T. K., Ishii, G., Saito, S., Yano, K., Hoshino, A., Suzuki, T., & Ochiai, A. (2008). Degradation of soluble VEGF receptor-1 by MMP-7 allows VEGF access to endothelial cells. *Blood*, 113, 2363-2369.
- Jass, J. R. (1989). Do all colorectal carcinomas arise in preexisting adenomas? *World Journal of Surgery*, 13(1), 45-51.

- Jeong, H., Hernández-Rodríguez, B., Kim, J., Kim, K., Enriquez-Gasca, R., Yoon, J., ... Adams, R. H. (2017). Transcriptional regulation of endothelial cell behavior during sprouting angiogenesis. *Nature Communications*, 8(1).
- Jia, D., Jurkowska, R. Z., Zhang, X., Jeltsch, A., & Cheng, X. (2007). Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature*, 449(7159), 248-251.
- Jiang, H., Chen, C., Sun, Q., Wu, J., Qiu, L., Gao, C., ... Dong, J. (2016). The role of semaphorin 4D in tumor development and angiogenesis in human breast cancer. *OncoTargets and Therapy*, 9, 5737-5750.
- Jin, P., Kang, Q., Wang, X., Yang, L., Yu, Y., Li, N., ... Sheng, J. (2015). Performance of a second-generation methylated SEPT9 test in detecting colorectal neoplasm. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 30(5), 830-833.
- Johnson, S. M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., ... Slack, F. J. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 120(5), 635-647.
- Jones, P. L., Jan Veenstra, G. C., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., ... Wolffe, A. P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genetics*, 19(2), 187-191.
- Josse, C., Bouznad, N., Geurts, P., Irrthum, A., Huynh-Thu, V. A., Servais, L., ... Oury, C. (2014). Identification of a microRNA landscape targeting the PI3K/Akt signaling pathway in inflammation-induced colorectal carcinogenesis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 306(3), G229-G243.
- Jubb, A. M., Miller, K. D., Rugo, H. S., Harris, A. L., Chen, D., Reiman, J. D., ... Koeppen, H. (2011). Impact of exploratory biomarkers on the treatment effect of bevacizumab in metastatic breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 17(2), 372-381.
- Jullien, P. E., & Berger, F. (2010). DNA methylation reprogramming during plant sexual reproduction? *Trends in Genetics*, 26(9), 394-399.
- Jung, M., Kadam, S., Xiong, W., Rauch, T. A., Jin, S., & Pfeifer, G. P. (2015). MIRA-seq for DNA methylation analysis of CpG islands. *Epigenomics*, 7(5), 695-706.
- Kai, M., Niinuma, T., Kitajima, H., Yamamoto, E., Harada, T., Aoki, H., ... Suzuki, H. (2016). TET1 depletion induces aberrant CpG methylation in colorectal cancer cells. *PLOS ONE*, 11(12), e0168281.
- Kamimae, S., Yamamoto, E., Yamano, H., Nojima, M., Suzuki, H., Ashida, M., ... Toyota, M. (2011). Epigenetic alteration of DNA in mucosal wash fluid predicts invasiveness of colorectal tumors. *Cancer Prevention Research*, 4(5), 674-683.
- Karagianni, P., Amazit, L., Qin, J., & Wong, J. (2008). ICBP90, a novel methyl K9 H3 binding protein linking protein ubiquitination with heterochromatin formation. *Molecular and Cellular Biology*, 28(2), 705-717.
- Kim, K., Kim, I., Yang, J. M., Lee, E., Koh, B. I., Song, S., ... Kim, I. (2016). SoxF transcription factors are positive feedback regulators of VEGF signaling novelty and significance. *Circulation Research*, 119(7), 839-852.
- Kim, T. W., Kwak, S., Shin, J., Kang, B., Lee, S., Suh, M. Y., ... Youn, H. (2017). Ctp2-mediated β -catenin regulation is required for exit from pluripotency. *Experimental & Molecular Medicine*, 49(10), e385.
- Kim, Y., Petko, Z., Dzieciatkowski, S., Lin, L., Ghiassi, M., Stain, S., ... Grady, W. M. (2006). CpG island methylation of genes accumulates during the adenoma progression step of the multistep pathogenesis of colorectal cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 45(8), 781-789.
- King, C. E., Cuatrecasas, M., Castells, A., Sepulveda, A. R., Lee, J., & Rustgi, A. K. (2011). LIN28B promotes colon cancer progression and metastasis. *Cancer Research*, 71(12), 4260-4268.
- Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87(2), 159-170.
- Koblizek, T. I., Weiss, C., Yancopoulos, G. D., Deutsch, U., & Risau, W. (1998). Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. *Current Biology*, 8(9), 529-532.
- Koh, K. P., & Rao, A. (2013). DNA methylation and methylcytosine oxidation in cell fate decisions. *Current Opinion in Cell Biology*, 25(2), 152-161.
- Koltowska, K., Paterson, S., Bower, N. I., Baillie, G. J., Legendijk, A. K., Astin, J. W., ... Hogan, B. M. (2015). mafba is a downstream transcriptional effector of Vegfc signaling essential for embryonic lymphangiogenesis in zebrafish. *Genes & Development*, 29(15), 1618-1630.
- Koo, Y. J., Kim, T. J., So, K. A., Jung, U. S., & Hong, J. H. (2017). CXCL11 mediates TWIST1-induced angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Tumor Biology*, 39(5), 101042831770622.
- Kostin, P. A., Zakhazhevskaia, N. B., Generozov, F. V., Govorun, V. M., Chernyshov, S. V., & Shchelygin, I. A. (2010). Hypermethylation of the CDH1, SEPT9, HLTF and ALX4 genes and their diagnostic significance in colorectal cancer. *Voprosy Onkologii*, 56, 162-168.
- Kuster, J. E., Guarnieri, M. H., Ault, J. G., Flaherty, L., & Swiatek, P. J. (1997). IAP insertion in the murine LamB3 gene results in junctional epidermolysis bullosa. *Mammalian Genome*, 8(9), 673-681.
- La Porta, S., Roth, L., Singhal, M., Mogler, C., Spegg, C., Schieb, B., ... Augustin, H. G. (2018). Endothelial Tie1-mediated angiogenesis and vascular abnormalization promote tumor progression and metastasis. *Journal of Clinical Investigation*, 128(2), 834-845.
- Laird, P. W. (2010). Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. *Nature Reviews Genetics*, 11(3), 191.

- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., ... Morgan, M. J. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), 860-921.
- Langenfeld, E. M., & Langenfeld, J. (2004). Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors. *Molecular Cancer Research*, 2(3), 141-9.
- Langowski, J. L., Zhang, X., Wu, L., Mattson, J. D., Chen, T., Smith, K., ... Kastelein, R. A. (2006). IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature*, 442(7101), 461-465.
- Lao, V. V., & Grady, W. M. (2011). Epigenetics and colorectal cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 8(12), 686-700.
- Laszlo, A. H., Derrington, I. M., Brinkerhoff, H., Langford, K. W., Nova, I. C., Samson, J. M., ... Gundlach, J. H. (2013). Detection and mapping of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine with nanopore MspA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(47), 18904-18909.
- Laurent, L., Wong, E., Li, G., Huynh, T., Tsirogos, A., Ong, C. T., ... Wei, C. (2010). Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Research*, 20(3), 320-331.
- Lee, B. B., Lee, E. J., Jung, E. H., Chun, H., Chang, D. K., Song, S. Y., ... Kim, D. (2009). Aberrant methylation of APC, MGMT, RASSF2A, and Wif-1 genes in plasma as a biomarker for early detection of colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 15(19), 6185-6191.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843-854.
- Lee, S., Cho, N., Choi, M., Yoo, E. J., Kim, J., & Kang, G. H. (2008). Clinicopathological features of CpG island methylator phenotype-positive colorectal cancer and its adverse prognosis in relation to KRAS/BRAF mutation. *Pathology International*, 58(2), 104-113.
- Leipe, D. D., Wolf, Y. I., Koonin, E. V., & Aravind, L. (2002). Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *Journal of Molecular Biology*, 317(1), 41-72.
- Leung, W. K., To, K., Man, E. P., Chan, M. W., Bai, A. H., Hui, A. J., ... Sung, J. J. (2005). Quantitative detection of promoter hypermethylation in multiple genes in the serum of patients with colorectal cancer. *The American Journal of Gastroenterology*, 100(10), 2274-2279.
- Lévy, L., Neuveut, C., Renard, C., Charneau, P., Branchereau, S., Gauthier, F., ... Buendia, M. A. (2002). Transcriptional Activation of Interleukin-8 by β -Catenin-Tcf4. *Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 42386-42393.
- Lewis, J. D., Meehan, R. R., Henzel, W. J., Maurer-Fogy, I., Jeppesen, P., Klein, F., & Bird, A. (1992). Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to Methylated DNA. *Cell*, 69(6), 905-914.
- Li, D., Zhang, B., Xing, X., & Wang, T. (2015). Combining MeDIP-seq and MRE-seq to investigate genome-wide CpG methylation. *Methods*, 72, 29-40.
- Li, E., Bestor, T. H., & Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 69(6), 915-926.
- Li, H., Myeroff, L., Smiraglia, D., Romero, M. F., Pretlow, T. P., Kasturi, L., ... Markowitz, S. D. (2003). 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*, 100(14), 8412-8417.
- Li, M., Chen, W., Papadopoulos, N., Goodman, S. N., Bjerregaard, N. C., Laurberg, S., ... Vogelstein, B. (2009). Sensitive digital quantification of DNA methylation in clinical samples. *Nature Biotechnology*, 27(9), 858-863.
- Liao, K., Chang, S., Chang, H., Chien, C., Huang, T., Feng, T., ... Lee, O. K. (2017). Endothelial angiogenesis is directed by RUNX1T1-regulated VEGFA, BMP4 and TGF- β 2 expression. *PLOS ONE*, 12(6), e0179758.
- Lienert, F., Wirbelauer, C., Som, I., Dean, A., Mohn, F., & Schübeler, D. (2011). Identification of genetic elements that autonomously determine DNA methylation states. *Nature Genetics*, 43(11), 1091-1097.
- Lilly, A., Mazan, A., Scott, D. A., Lacaud, G., & Kouskoff, V. (2017). SOX7 expression is critically required in FLK1-expressing cells for vasculogenesis and angiogenesis during mouse embryonic development. *Mechanisms of Development*, 146, 31-41.
- Lippman, Z., Gendrel, A., Black, M., Vaughn, M. W., Dedhia, N., Richard McCombie, W., ... Martienssen, R. (2004). Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature*, 430(6998), 471-476.
- Lisanti, S., Omar, W. A., Tomaszewski, B., De Prins, S., Jacobs, G., Koppen, G., ... Langie, S. A. (2013). Comparison of methods for quantification of global DNA methylation in human cells and tissues. *PLoS ONE*, 8(11), e79044.
- Lister, R., O'Malley, R. C., Tonti-Filippini, J., Gregory, B. D., Berry, C. C., Millar, A. H., & Ecker, J. R. (2008). Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in Arabidopsis. *Cell*, 133(3), 523-536.
- Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., ... Ecker, J. R. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 462(7271), 315-322.
- Lofton-Day, C., Model, F., DeVos, T., Tetzner, R., Distler, J., Schuster, M., ... Sledziewski, A. (2008). DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clinical Chemistry*, 54(2), 414-423.

- Lopes, E. C., Valls, E., Figueroa, M. E., Mazur, A., Meng, F., Chiosis, G., ... Melnick, A. (2008). Kaiso contributes to DNA methylation-dependent silencing of tumor suppressor genes in colon cancer cell lines. *Cancer Research*, 68(18), 7258-7263.
- Lux, A., Salway, F., Dressman, H. K., Kröner-Lux, G., Hafner, M., Day, P. J., ... Garland, J. (2006). ALK1 signalling analysis identifies angiogenesis related genes and reveals disparity between TGF- β and constitutively active receptor induced gene expression. *BMC Cardiovascular Disorders*, 6(1), 13.
- Ma, C., Lu, X. C., Cuo, Y., Cao, J., Yang, B., Gao, Y., ... Fan, L. (2012). Angiogenesis related gene expression profiles of EA.hy926 cells induced by irbesartan: a possible novel therapeutic approach. *Chinese Medical Journal*, 125(8), 1369-75.
- Ma, S., Snyder, M., & Dinesh-Kumar, S. P. (2017). Discovery of novel human gene regulatory modules from gene co-expression and promoter motif analysis. *Scientific Reports*, 7(1).
- Macleod, D., Charlton, J., Mullins, J., & Bird, A. P. (1994). Sp1 sites in the mouse aprt gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes & Development*, 8(19), 2282-2292.
- Manrao, E. A., Derrington, I. M., Laszlo, A. H., Langford, K. W., Hopper, M. K., Gillgren, N., ... Gundlach, J. H. (2012). Reading DNA at single-nucleotide resolution with a mutant MspA nanopore and phi29 DNA polymerase. *Nature Biotechnology*, 30(4), 349-353.
- Masckauchán, T. N., Shawber, C. J., Funahashi, Y., Li, C. M., & Kitajewski, J. (2005). Wnt/ β -catenin signaling induces proliferation, survival and interleukin-8 in human endothelial cells. *Angiogenesis*, 8(1), 43-51.
- Masser, D. R., Berg, A. S., & Freeman, W. M. (2013). Focused, high accuracy 5-methylcytosine quantitation with base resolution by benchtop next-generation sequencing. *Epigenetics & Chromatin*, 6(1), 33.
- Maunakea, A. K., Nagarajan, R. P., Bilenky, M., Ballinger, T. J., D'Souza, C., Fouse, S. D., ... Costello, J. F. (2010). Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature*, 466(7303), 253-257.
- Maxam, A. M., & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(2), 560-564.
- Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R., & Haaf, T. (2000). Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*, 403(6769), 501-502.
- Meehan, R. R., Lewis, J. D., McKay, S., Kleiner, E. L., & Bird, A. (1989). Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell*, 58(3), 499-507.
- Mehta, V. B., & Besner, G. E. (2007). HB-EGF promotes angiogenesis in endothelial cells via PI3-kinase and MAPK signaling pathways. *Growth Factors*, 25(4), 253-263.
- Meissner, A., Gnirke, A., Bell, G. W., Ramsahoye, B., Lander, E. S., & Jaenisch, R. (2005). Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Research*, 33(18), 5868-5877.
- Meissner, A., Mikkelsen, T. S., Gu, H., Wernig, M., Hanna, J., Sivachenko, A., ... Lander, E. S. (2008). Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature*, 454(7205), 766-770.
- Melki, J., Warnecke, P., Vincent, P., & Clark, S. (1998). Increased DNA methyltransferase expression in leukaemia. *Leukemia*, 12(3), 311-316.
- Mendell, J. T. (2005). MicroRNAs: critical regulators of development, cellular physiology and malignancy. *Cell Cycle*, 4(9), 1179-1184.
- Meng, F., Henson, R., Wehbe-Janek, H., Ghoshal, K., Jacob, S. T., & Patel, T. (2007). MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*, 133(2), 647-658.
- Michaud, E. J., Van Vugt, M. J., Bultman, S. J., Sweet, H. O., Davissom, M. T., & Woychik, R. P. (1994). Differential expression of a new dominant agouti allele (Ai_{ap}) is correlated with methylation state and is influenced by parental lineage. *Genes & Development*, 8(12), 1463-1472.
- Migliore, L., Migheli, F., Spisni, R., & Coppedè, F. (2011). Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal Cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1-19.
- Mikkelsen, T. S., Ku, M., Jaffe, D. B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., ... Bernstein, B. E. (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*, 448(7153), 553-560.
- Millar, C. B., Guy, J., Sansom, O. J., Selfridge, J., MacDougall, E., Hendrich, B., ... Keightley, P. D. (2002). Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice. *Science*, 297(5580), 403-405.
- Miles, D., Cameron, D., Bondarenko, I., Manzyuk, L., Alcedo, J. C., Lopez, R. I., ... O'Shaughnessy, J. (2017). Bevacizumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel as first-line therapy for HER2-negative metastatic breast cancer (MERiDiAN): A double-blind placebo-controlled randomised phase III trial with prospective biomarker evaluation. *European Journal of Cancer*, 70, 146-155.
- Miten, J., Koren, S., Higa, K. H., Quick, J., Rand, A. C., Sasani, T. A., ... Loose, M. (2018). Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. *Nature Biotechnology*.
- Miura, F., Enomoto, Y., Dairiki, R., & Ito, T. (2012). Amplification-free whole-genome bisulfite sequencing by post-bisulfite adaptor tagging. *Nucleic Acids Research*, 40(17), e136-e136.

- Mohn, F., Weber, M., Rebhan, M., Roloff, T. C., Richter, J., Stadler, M. B., ... Schübeler, D. (2008). Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Molecular Cell*, 30(6), 755-766.
- Moody, T. W., Leyton, J., Casibang, M., Piseigna, J., & Jensen, R. T. (2002). PACAP-27 tyrosine phosphorylates mitogen activated protein kinase and increases VEGF mRNAs in human lung cancer cells. *Regulatory Peptides*, 109(1-3), 135-140.
- Mortusewicz, O., Schermelleh, L., Walter, J., Cardoso, M. C., & Leonhardt, H. (2005). Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(25), 8905-8909.
- Motoyama, K., Inoue, H., Takatsuno, Y., Tanaka, F., Mimori, K., Uetake, H., ... Mori, M. (2009). Over- and under-expressed microRNAs in human colorectal cancer. *International Journal of Oncology*, 34(4), 1069-1075.
- Muleris, M., Chalastanis, A., Meyer, N., Lae, M., Dutrillaux, B., Sastre-Garau, X., ... Duval, A. (2008). Chromosomal instability in near-diploid colorectal cancer: a link between numbers and structure. *PLoS ONE*, 3(2), e1632.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., & Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*, 102(5), 553-563.
- Nagel, R., Le Sage, C., Diosdado, B., Van der Waal, M., Oude Vrielink, J. A., Bolijn, A., ... Agami, R. (2008). Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer. *Cancer Research*, 68(14), 5795-5802.
- Nakazawa, T., Kondo, T., Ma, D., Niu, D., Mochizuki, K., Kawasaki, T., ... Katoh, R. (2012). Global histone modification of histone H3 in colorectal cancer and its precursor lesions. *Human Pathology*, 43(6), 834-842.
- Nan, X., Meehan, R. R., & Bird, A. (1993). Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Research*, 21(1), 4886-4892.
- Nan, X., Ng, H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N., & Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, 393(6683), 386-389.
- Napp, L. C., Augustynik, M., Paesler, F., Krishnasamy, K., Woiterski, J., Limbourg, A., ... Limbourg, F. P. (2012). Extrinsic Notch Ligand Delta-Like 1 Regulates Tip Cell Selection and Vascular Branching Morphogenesis. *Circulation Research*, 110(4), 530-535.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Internet]. (1988). Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Ned, R. M., Melillo, S., & Marrone, M. (2011). Fecal DNA testing for colorectal cancer screening: the ColoSure™ test. *PLoS Currents*, 3, RRN1220.
- Ng, H. H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C. A., Turner, B. M., Erdjument-Bromage, H., ... Tempst, P. (1999). MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nature Genetics*, 23, 58-61.
- Nicosia, R. F., Bonanno, E., & Smith, M. (1993). Fibronectin promotes the elongation of microvessels during angiogenesis in vitro. *Journal of Cellular Physiology*, 154(3), 654-661.
- Notch, IL-1 and leptin crosstalk outcome (NILCO) is critical for leptin-induced proliferation, migration and VEGF/VEGFR-2 expression in breast cancer. (2011). *PLoS ONE*, 6(6), e21467.
- Oberg, A. L., French, A. J., Sarver, A. L., Subramanian, S., Morlan, B. W., Riska, S. M., ... Thibodeau, S. N. (2011). miRNA expression in colon polyps provides evidence for a multihit model of colon cancer. *PLoS ONE*, 6(6), e20465.
- Ogino, S., Kawasaki, T., Nosho, K., Ohnishi, M., Suemoto, Y., Kirkner, G. J., & Fuchs, C. S. (2008a). LINE-1 hypomethylation is inversely associated with microsatellite instability and CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, 122(12), 2767-2773.
- Ogino, S., Nosho, K., Kirkner, G. J., Kawasaki, T., Chan, A. T., Schernhammer, E. S., ... Fuchs, C. S. (2008b). A cohort study of tumoral LINE-1 hypomethylation and prognosis in colon cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 100(23), 1734-1738.
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., & Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99(3), 247-257.
- Okugawa, Y., Grady, W. M., & Goel, A. (2015). Epigenetic alterations in colorectal cancer: Emerging biomarkers. *Gastroenterology*, 149(5), 1204-1225.e12.
- Ooi, S. K., Qiu, C., Bernstein, E., Li, K., Jia, D., Yang, Z., ... Bestor, T. H. (2007). DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature*, 448(7154), 714-717.
- Oon, C. E., Bridges, E., Sheldon, H., Sainson, R. C., Jubb, A., Turley, H., ... Li, J. (2017). Role of Delta-like 4 in Jagged1-induced tumour angiogenesis and tumour growth. *Oncotarget*, 8(25), 40115-40131.
- Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, A., Fundele, R., ... Walter, J. (2000). Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Current Biology*, 10(8), 475-478.
- Paauwe, M., Heijkants, R. C., Oudt, O. H., Pelt, G. W., Cui, C., Theuer, C. P., ... Hawinkels, L. J. (2016). Endoglin targeting inhibits tumor angiogenesis and metastatic spread in breast cancer. *Oncogene*, 35(31), 4069-4079.

- Pagliuca, A., Valvo, C., Fabrizi, E., Di Martino, S., Biffoni, M., Runci, D., ... Ricci-Vitiani, L. (2013). Analysis of the combined action of miR-143 and miR-145 on oncogenic pathways in colorectal cancer cells reveals a coordinate program of gene repression. *Oncogene*, 32(40), 4806-4813.
- Park, H. Y., Kwon, H. M., Lim, H. J., Hong, B. K., Lee, J. Y., Park, B. E., ... Kim, H. S. (2001). Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro. *Experimental & Molecular Medicine*, 33(2), 95-102.
- Paroush, Z., Keshet, I., Yisraeli, J., & Cedar, H. (1990). Dynamics of demethylation and activation of the α -actin gene in myoblasts. *Cell*, 63(6), 1229-1237.
- Partner Institute for Computational Biology (PICB). (n.d.). Illumina Sequencing and Data Analysis. [online] [navštívno 17. 9. 2017] Dostupné z <http://www.picb.ac.cn/http://www.picb.ac.cn/picb-dynamic/admin/pdf/The%20First%20Run%20of%20Sequencing.pdf>
- Patel, R. K., & Jain, M. (2012). NGS QC toolkit: A toolkit for quality control of next generation sequencing data. *PLoS ONE*, 7(2), e30619.
- Pattamadilok, J., Huapai, N., Rattananayong, P., Vasurattana, A., Triratanachat, S., Tresukosol, D., & Mutirangura, A. (2008). LINE-1 hypomethylation level as a potential prognostic factor for epithelial ovarian cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, 18(4), 711-717.
- Pauli, A., Rinn, J. L., & Schier, A. F. (2011). Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis. *Nature Reviews Genetics*, 12(2), 136-149.
- Petko, Z., Ghiassi, M., Shuber, A., Gorham, J., Smalley, W., Washington, M. K., ... Grady, W. M. (2005). Aberrantly methylated CDKN2A, MGMT, and MLH1 in colon polyps and in fecal DNA from patients with colorectal polyps. *Clinical Cancer Research*, 11(3), 1203-1209.
- Petronzelli, F., Riccio, A., Markham, G. D., Seeholzer, S. H., Stoerker, J., Genuardi, M., ... Bellacosa, A. (2000). Biphasic kinetics of the human DNA repair protein MED1 (MBD4), a mismatch-specific DNA N-glycosylase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(42), 32422-32429.
- Pfeifer, G. P., Kadam, S., & Jin, S. (2013). 5-hydroxymethylcytosine and its potential roles in development and cancer. *Epigenetics & Chromatin*, 6(1), 10.
- Pino, M. S., & Chung, D. C. (2010). The Chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2059-2072.
- Popat, S., Hubner, R., & Houlston, R. (2005). Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *Journal of Clinical Oncology*, 23(3), 609-618.
- Popp, C., Dean, W., Feng, S., Cokus, S. J., Andrews, S., Pellegrini, M., ... Reik, W. (2010). Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature*, 463(7284), 1101-1105.
- Pradhan, S., Bacolla, A., Wells, R. D., & Roberts, R. J. (1999). Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(46), 33002-33010.
- Prokhortchouk, A., Hendrich, B., Jorgensen, H., Ruzov, A., Wilm, M., Georgiev, G., ... Bird, A. (2001). The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes & Development*, 15(13), 1613-1618.
- Qi, J., Zhu, Y. Q., & Tao, W. H. (2006). Hypermethylation and expression regulation of secreted frizzled-related protein genes in colorectal tumor. *World Journal of Gastroenterology*, 12(44), 7113
- Quail, M., Smith, M. E., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R., Connor, T. R., ... Gu, Y. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*, 13(1), 341.
- Rakyan, V. K., Hildmann, T., Novik, K. L., Lewin, J., Tost, J., Cox, A. V., ... Beck, S. (2004). DNA methylation profiling of the human major histocompatibility complex: a pilot study for the human epigenome project. *PLoS Biology*, 2(12), e405.
- Ramsahoye, B. H., Biniszkiwicz, D., Lyko, F., Clark, V., Bird, A. P., & Jaenisch, R. (2000). Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(10), 5237-5242.
- Rashid, A., Shen, L., Morris, J. S., Issa, J. J., & Hamilton, S. R. (2001). CpG Island Methylation in Colorectal Adenomas. *The American Journal of Pathology*, 159(3), 1129-1135.
- Rauch, T. A., & Pfeifer, G. P. (2009). The MIRA method for DNA methylation analysis. *Methods in Molecular Biology*, 507, 65-75.
- Rauch, T. A., & Pfeifer, G. P. (2010). DNA methylation profiling using the methylated-CpG island recovery assay (MIRA). *Methods*, 52(3), 213-217.
- Rauch, T. A., Zhong, X., Wu, X., Wang, M., Kernstine, K. H., Wang, Z., ... Pfeifer, G. P. (2008). High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(1), 252-257.

- Rhee, Y., Kim, M. J., Bae, J. M., Koh, J. M., Cho, N., Juhn, Y., ... Kang, G. H. (2012). Clinical outcomes of patients with microsatellite-unstable colorectal carcinomas depend on L1 methylation level. *Annals of Surgical Oncology*, 19(11), 3441-3448.
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., & Mesirov, J. P. (2011). Integrative Genomics Viewer. *Nature Biotechnology*, 29(1), 24–26.
- Ross, M. G., Russ, C., Costello, M., Hollinger, A., Lennon, N. J., Hegarty, R., ... Jaffe, D. B. (2013). Characterizing and measuring bias in sequence data. *Genome Biology*, 14(5), R51.
- Rothhammer, T., Bataille, F., Spruss, T., Eissner, G., & Bosserhoff, A. (2007). Functional implication of BMP4 expression on angiogenesis in malignant melanoma. *Oncogene*, 26(28), 4158-70.
- Roukens, M. G., Alloul-Ramdhani, M., Baan, B., Kobayashi, K., Peterson-Maduro, J., Van Dam, H., ... Baker, D. A. (2010). Control of endothelial sprouting by a Tel–CtBP complex. *Nature Cell Biology*, 12(10), 933-942.
- Rupp, T., Langlois, B., Koczorowska, M. M., Radwanska, A., Sun, Z., Hussenet, T., ... Orend, G. (2016). Tenascin-C orchestrates glioblastoma angiogenesis by modulation of pro- and anti-angiogenic signaling. *Cell Reports*, 17(10), 2607-2619.
- Sakatani, T., Kaneda, A., Iacobuzio-Donahue, C. A., Carter, M. G., De Boom Witzel, S., Okano, H., ... Feinberg, A. P. (2005). Loss of imprinting of Igf2 alters intestinal maturation and tumorigenesis in mice. *Science*, 307(5717), 1976-1978.
- Salcedo, R., Zhang, X., Young, H. A., Michael, N., Wasserman, K., Ma, W. H., & Oppenheim, J. J. (2003). Angiogenic effects of prostaglandin E2 are mediated by up-regulation of CXCR4 on human microvascular endothelial cells. *Blood*, 102(6), 1966-1977.
- Salvucci, O., Yao, L., Villalba, S., Sajewicz, A., Pittaluga, S., & Tosato, G. (2002). Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor-1. *Blood*, 99(8), 2703-2711.
- Samarelli, A. V., Riccitelli, E., Bizzozero, L., Silveira, T. N., Seano, G., Pergolizzi, M., ... Arese, M. (2014). Neuroligin 1 induces blood vessel maturation by cooperating with the $\alpha 6$ integrin. *Journal of Biological Chemistry*, 289(37), 25475-25475.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Sarraf, S. A., & Stancheva, I. (2004). Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. *Molecular Cell*, 15(4), 595-605.
- Sasai, N., Nakao, M., & DeFossez, P. (2010). Sequence-specific recognition of methylated DNA by human zinc-finger proteins. *Nucleic Acids Research*, 38(15), 5015-5022.
- Saxena, N. K., Vertino, P. M., Anania, F. A., & Sharma, D. (2007). leptin-induced growth stimulation of breast cancer cells involves recruitment of histone acetyltransferases and mediator complex to CYCLIN D1 promoter via activation of Stat3. *Journal of Biological Chemistry*, 282(18), 13316-13325.
- Saxonov, S., Berg, P., & Brutlag, D. L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(5), 1412-1417.
- Schmitz, R. J., He, Y., Valdes-Lopez, O., Khan, S. M., Joshi, T., Urich, M. A., ... Ecker, J. R. (2013). Epigenome-wide inheritance of cytosine methylation variants in a recombinant inbred population. *Genome Research*, 23(10), 1663-1674.
- Schneider, B. P., Wang, M., Radovich, M., Sledge, G. W., Badve, S., Thor, A., ... Miller, K. D. (2008). Association of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 genetic polymorphisms with outcome in a trial of paclitaxel compared with paclitaxel plus bevacizumab in advanced breast cancer: ECOG 2100. *Journal of Clinical Oncology*, 26(28), 4672-4678.
- Schneider, R., & Grosschedl, R. (2007). Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes & Development*, 21(23), 3027-3043.
- Schadt, E. E., Turner, S., & Kasarskis, A. (2010). A window into third-generation sequencing. *Human Molecular Genetics*, 19(R2), R227-R240.
- Schuller, U., Zhao, Q., Godinho, S. A., Heine, V. M., Medema, R. H., Pellman, D., & Rowitch, D. H. (2007). Forkhead transcription factor FoxM1 regulates mitotic entry and prevents spindle defects in cerebellar granule neuron precursors. *Molecular and Cellular Biology*, 27(23), 8259-8270.
- Seo, H., Jeong, H. E., Joo, H. J., Choi, S., Park, C., Kim, J., ... Lim, D. (2016). Intrinsic FGF2 and FGF5 promotes angiogenesis of human aortic endothelial cells in 3D microfluidic angiogenesis system. *Scientific Reports*, 6(1), 28832.
- Sharif, J., Muto, M., Takebayashi, S., Suetake, I., Iwamatsu, A., Endo, T. A., ... Koseki, H. (2007). The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature*, 450(7171), 908-912.
- Sheffield, P. J., Oliver, C. J., Kremer, B. E., Sheng, S., Shao, Z., & Macara, I. G. (2003). Borg/septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments. *Journal of Biological Chemistry*, 278(5), 3483-3488.

- Shen, J. C., Rideout, 3rd, W. M., & Jones, P. A. (1994). The rate of hydrolytic deamination of 5-methylcytosine in double-stranded DNA. *Nucleic Acids Research*, 22(6), 972-976.
- Shen, L., Catalano, P. J., Benson, A. B., O'Dwyer, P., Hamilton, S. R., & Issa, J. J. (2007a). Association between DNA methylation and shortened survival in patients with advanced colorectal cancer treated with 5-fluorouracil based chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, 13(20), 6093-6098.
- Shen, L., Kondo, Y., Guo, Y., Zhang, J., Zhang, L., Ahmed, S., ... Issa, J. J. (2007b). Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *PLoS Genetics*, 3(10), 2023-2036.
- Shen, L., Toyota, M., Kondo, Y., Lin, E., Zhang, L., Guo, Y., ... ISSA, J. A. (2007c). Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(47), 18654-18659.
- Shirahata, A., Sakata, M., Sakuraba, K., Goto, T., Mizukami, H., Saito, M., ... Hibi, K. (2009). Vimentin methylation as a marker for advanced colorectal carcinoma. *Anticancer Research*, 29, 279-281.
- Shord, S. S., Bressler, L. R., Tierney, L. A., Cuellar, S., & George, A. (2009). Understanding and managing the possible adverse effects associated with bevacizumab. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 66(11), 999-1013.
- Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., & Jemal, A. (2014). Cancer statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 64(1), 9-29.
- Skurk, C., Maatz, H., Rocnik, E., Bialik, A., Force, T., & Walsh, K. (2005). Glycogen-Synthase Kinase3beta/beta-catenin axis promotes angiogenesis through activation of vascular endothelial growth factor signaling in endothelial cells. *Circulation Research*, 96(3), 308-318.
- Slavkovský, R. (2018). Ústní sdělení. [Ústav molekulární a translační medicíny, Hněvotínská 1333/5, 779 00 Olomouc, Česká republika] [cit. 28. 02. 2018]
- Smallwood, S. A., Lee, H. J., Angermueller, C., Krueger, F., Saadeh, H., Peat, J., ... Kelsey, G. (2014). Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity. *Nature Methods*, 11(8), 817-820.
- Smith, Z. D., & Meissner, A. (2013). DNA methylation: roles in mammalian development. *Nature Reviews Genetics*, 14(3), 204-220.
- Snipacademy. (2017). Illumina sequencing by synthesis. [online] [navštíveno 11. 8. 2017] Dostupné z <https://bin.snipcademy.com/lessons/ngs-techniques/illumina-solexa>
- Sörensen, I., Adams, R. H., & Gossler, A. (2009). DLL1-mediated Notch activation regulates endothelial identity in mouse fetal arteries. *Blood*, 113(22), 5680-5688.
- Spinazzi, R., Albertin, G., Nico, B., Guidolin, D., Di Liddo, R., Rossi, G., ... Nussdorfer, G. (2006). Urotensin-II and its receptor (UT-R) are expressed in rat brain endothelial cells, and urotensin-II via UT-R stimulates angiogenesis in vivo and in vitro. *International Journal of Molecular Medicine*, 18(6), 1107-12.
- Stilley, J. A., Guan, R., Duffy, D. M., & Segaloff, D. L. (2014). Signaling through FSH receptors on human umbilical vein endothelial cells promotes angiogenesis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(5), E813-E820.
- Straussman, R., Nejman, D., Roberts, D., Steinfeld, I., Blum, B., Benvenisty, N., ... Cedar, H. (2009). Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(5), 564-571.
- Stypula-Cyrus, Y., Damania, D., Kunte, D. P., Cruz, M. D., Subramanian, H., Roy, H. K., & Backman, V. (2013). HDAC up-regulation in early colon field carcinogenesis is involved in cell tumorigenicity through regulation of chromatin structure. *PLoS ONE*, 8(5), e64600.
- Subedee, Ashim. 2015. Molecular Determinants and Transcriptional Regulators in Triple Negative Breast Cancer. Doctoral dissertation, Harvard University, Graduate School of Arts & Sciences. [online] [navštíveno 12. 2. 2018] Dostupné z <https://dash.harvard.edu/bitstream/handle/1/23845415/SUBEDDEE-DISSERTATION-2015.pdf?sequence=1>
- Suetake, I., Shinozaki, F., Miyagawa, J., Takeshima, H., & Tajima, S. (2004). DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 27816-27823.
- Sun, D., Yu, F., Ma, Y., Zhao, R., Chen, X., Zhu, J., ... Zhang, J. (2013a). MicroRNA-31 activates the RAS pathway and functions as an oncogenic MicroRNA in human colorectal cancer by repressing RAS p21 GTPase activating protein 1 (RASA1). *Journal of Biological Chemistry*, 288(13), 9508-9518.
- Suzuki, K., Suzuki, I., Leodolter, A., Alonso, S., Horiuchi, S., Yamashita, K., & Perucho, M. (2006). Global DNA demethylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes genomic damage. *Cancer Cell*, 9(3), 199-207.
- Tae, S. Y., Chi, H., Kim, S., Lee, K. E., & Youn, Y. (2014). Gene methylation associated with differentiated thyroid cancer. *Journal of Korean Thyroid Association*, 7(2), 118-128.
- Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., ... Nagasawa, T. (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*, 393(6685), 591-594.
- Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., ... Rao, A. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 324(5929), 930-935.

- Takahashi, T., Yamaguchi, S., Chida, K., & Shibuya, M. (2001). A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC- γ and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *The EMBO Journal*, 20(11), 2768-2778.
- Takai, D., & Jones, P. A. (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6), 3740-3745.
- Takiguchi, M., Achanzar, W. E., Qu, W., Li, G., & Waalkes, M. P. (2003). Effects of cadmium on DNA-(cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Experimental Cell Research*, 286(2), 355-365.
- Taniguchi, H., Hoshino, D., Moriya, C., Zembutsu, H., Nishiyama, N., Yamamoto, H., ... Imai, K. (2017). Silencing PRDM14 expression by an innovative RNAi therapy inhibits stemness, tumorigenicity, and metastasis of breast cancer. *Oncotarget*, 8(29), 46856-46874.
- Tazawa, H., Tsuchiya, N., Izumiya, M., & Nakagama, H. (2007). Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(39), 15472-15477.
- Thomas, R., Thomas, S., Holloway, A. K., & Pollard, K. S. (2016). Features that define the best ChIP-seq peak calling algorithms. *Briefings in Bioinformatics*, bbw035.
- Tollefsbol, T. O., & Hutchison, C. A. (1997). Control of methylation spreading in synthetic DNA sequences by the murine DNA methyltransferase. *Journal of Molecular Biology*, 269(4), 494-504.
- Tong, X., Gui, H., Jin, F., Heck, B. W., Lin, P., Ma, J., ... Tsai, C. C. (2011). Ataxin-1 and Brother of ataxin-1 are components of the Notch signalling pathway. *EMBO reports*, 12(5), 428-435.
- Torán, J. L., Aguilar, S., López, J. A., Torroja, C., Quintana, J. A., Santiago, C., ... Bernad, A. (2017). CXCL6 is an important paracrine factor in the pro-angiogenic human cardiac progenitor-like cell secretome. *Scientific Reports*, 7(1).
- Toyama, T., Asano, Y., Miyagawa, T., Nakamura, K., Hirabayashi, M., Yamashita, T., ... Sato, S. (2017). The impact of transcription factor Fli1 deficiency on the regulation of angiogenesis. *Experimental Dermatology*, 26(10), 912-918.
- Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J. G., Baylin, S. B., & Issa, J. P. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(15), 8681-6.
- Ukai, H., Ishii-Oba, H., Ukai-Tadenuma, M., Ogiu, T., & Tsuji, H. (2003). Formation of an active form of the interleukin-2/15 receptor beta-chain by insertion of the intracisternal A particle in a radiation-induced mouse thymic lymphoma and its role in tumorigenesis. *Molecular Carcinogenesis*, 37(2), 110-119.
- Umetami, N., Takeuchi, H., Fujimoto, A., Shinozaki, M., Bilchik, A. J., & Hoon, D. S. (2004). Epigenetic inactivation of ID4 in colorectal carcinomas correlates with poor differentiation and unfavorable prognosis. *American Association for Cancer Research*, 10(22), 7475-7483.
- Urich, M. A., Nery, J. R., Lister, R., Schmitz, R. J., & Ecker, J. R. (2015). MethylC-seq library preparation for base-resolution whole-genome bisulfite sequencing. *Nature Protocols*, 10(3), 475-483.
- Van Cutsem, E., De Haas, S., Kang, Y., Ohtsu, A., Tebbutt, N. C., Ming Xu, J., ... Shah, M. A. (2012). Bevacizumab in combination with chemotherapy as first-line therapy in advanced gastric cancer: a biomarker evaluation from the AVAGAST randomized phase III trial. *Journal of Clinical Oncology*, 30(17), 2119-2127.
- Van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., & Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics*, 30(9), 418-426.
- Van Dongen, J., Ehli, E., Sliker, R., Bartels, M., Weber, Z., Davies, G., ... Boomsma, D. (2014). Epigenetic variation in monozygotic twins: A genome-wide analysis of DNA methylation in buccal cells. *Genes*, 5(2), 347-365.
- Van Rijnsoever, M., Elsaleh, H., Joseph, D., McCaul, K., & Iacopetta, B. (2003). CpG island methylator phenotype is an independent predictor of survival benefit from 5-fluorouracil in stage III colorectal cancer. *International Journal of Radiation Oncology, biology, physics*, 9(8), 2898-903.
- Vasudevan, S., Tong, Y., & Steitz, J. A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can upregulate translation. *Science*, 318(5858), 1931-1934.
- Vogt, M., Munding, J., Grüner, M., Liffers, S., Verdoodt, B., Hauk, J., ... Hermeking, H. (2011). Frequent concomitant inactivation of miR-34a and miR-34b/c by CpG methylation in colorectal, pancreatic, mammary, ovarian, urothelial, and renal cell carcinomas and soft tissue sarcomas. *Virchows Archiv*, 458(3), 313-322.
- Vyskot, Boris. *Epigenetika. Univerzita Palackého v Olomouci přírodovědecká fakulta. Olomouc, 2010. ISBN 978-80-244-2534-4.*
- Wallner, M., Herbst, A., Behrens, A., Crispin, A., Stieber, P., Goke, B., ... Kolligs, F. T. (2006). Methylation of serum DNA is an independent prognostic marker in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 12(24), 7347-7352.
- Walsh, C. P., Chaillet, J. R., & Bestor, T. H. (1998). Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nature Genetics*, 20(2), 116-117.
- Wang, Q., Gu, L., Adey, A., Radlwimmer, B., Wang, W., Hovestadt, V., ... Weichenhan, D. (2013). Tagmentation-based whole-genome bisulfite sequencing. *Nature Protocols*, 8(10), 2022-2032.

- Wang, Y., Ma, X., Zhang, Y., Wang, M., Yatabe, Y., Lam, S., ... Gazdar, A. F. (2016). ITPKA gene body methylation regulates gene expression and serves as an early diagnostic marker in lung and other cancers. *Journal of Thoracic Oncology*, 11(9), 1469-1481.
- Ward, R., Meagher, A., Tomlinson, I., O'Connor, T., Norrie, M., Wu, R., & Hawkins, N. (2001). Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut*, 48(6), 821-829.
- Weber, M., Davies, J. J., Wittig, D., Oakeley, E. J., Haase, M., Lam, W. L., & Schübeler, D. (2005). Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nature Genetics*, 37(8), 853-862.
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M. B., Ramos, L., Pääbo, S., Rebhan, M., & Schübeler, D. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature Genetics*, 39(4), 457-466.
- Weisenberger, D. J., Siegmund, K. D., Campan, M., Young, J., Long, T. I., Faasse, M. A., ... Laird, P. W. (2006). CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nature Genetics*, 38(7), 787-793.
- Welgene Biotech. (2017). 10x genomics chromium genome 系統原理 - 威健生技. In: Youtube [online] 22. 1. 2017 [navštívěno 25. 10. 2017] Dostupné z <https://www.youtube.com/watch?v=aUyFzwRFWJQ>
- Wendt, M. K., Johanesen, P. A., Kang-Decker, N., Binion, D. G., Shah, V., & Dwinell, M. B. (2006). Silencing of epithelial CXCL12 expression by DNA hypermethylation promotes colonic carcinoma metastasis. *Oncogene*, 25(36), 4986-4997.
- Wenstrup, R. J., Florer, J. B., Willing, M. C., Giunta, C., Steinmann, B., Young, F., ... Cole, W. G. (2000). COL5A1 haploinsufficiency is a common molecular mechanism underlying the classical form of EDS. *The American Journal of Human Genetics*, 66(6), 1766-1776.
- White, H. S. (2011). Mechanisms of action of human aldehyde dehydrogenase bright cells in therapy of cardiovascular diseases: Expression analysis of angiogenic factors and aldehyde dehydrogenase isozymes. *Journal of Stem Cell Research & Therapy*, 02(01).
- Wong, W. T., Matrone, G., Tian, X., Tomoiaga, S. A., Au, K. F., Meng, S., ... Cooke, J. P. (2017). Discovery of novel determinants of endothelial lineage using chimeric heterokaryons. *eLife*, 6, e23588.
- Wightman, B., Ha, I., & Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5), 855-862.
- Wolff, E. M., Byun, H., Han, H. F., Sharma, S., Nichols, P. W., Siegmund, K. D., ... Liang, G. (2010). Hypomethylation of a LINE-1 promoter activates an alternate transcript of the MET oncogene in bladders with cancer. *PLoS Genetics*, 6(4), e1000917.
- Wong, E., Yang, K., Kuraguchi, M., Werling, U., Avdievich, E., Fan, K., ... Edelmann, W. (2002). Mbd4 inactivation increases C->T transition mutations and promotes gastrointestinal tumor formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(23), 14937-14942.
- Wu, J. C., & Santi, D. V. (1985). On The mechanism and inhibition of DNA cytosine methyltransferases. *Progress in Clinical and Biological Research*, 198, 119-129.
- Wu, M., Rinchik, E. M., Wilkinson, E., & Johnson, D. K. (1997). Inherited somatic mosaicism caused by an intracisternal A particle insertion in the mouse tyrosinase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(3), 890-894.
- Wu, S., Dong, X., Regan, J. N., Su, C., & Majesky, M. W. (2013). Tbx18 regulates development of the epicardium and coronary vessels. *Developmental Biology*, 383(2), 307-320.
- Wutz, A., Smrzka, O. W., Schweifer, N., Schellander, K., Wagner, E. F., & Barlow, D. P. (1997). Imprinted expression of the *Igf2r* gene depends on an intronic CpG island. *Nature*, 389(6652), 745-749.
- Xie, S., Wang, Z., Okano, M., Nogami, M., Li, Y., He, W., ... Li, E. (1999). Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene*, 236(1), 87-95.
- Xiong, B., Cheng, Y., Ma, L., & Zhang, C. (2013). MiR-21 regulates biological behavior through the PTEN/PI-3 K/Akt signaling pathway in human colorectal cancer cells. *International Journal of Oncology*, 42(1), 219-228.
- Xu, J., Nie, X., Cai, X., Cai, C., & Xu, P. (2014). Tbx18 is essential for normal development of vasculature network and glomerular mesangium in the mammalian kidney. *Developmental Biology*, 391(1), 17-31.
- Xu, L., Zhang, Y., Wang, H., Zhang, G., Ding, Y., & Zhao, L. (2014). Tumor suppressor miR-1 restrains epithelial-mesenchymal transition and metastasis of colorectal carcinoma via the MAPK and PI3K/AKT pathway. *Journal of Translational Medicine*, 12(1), 244.
- Xu, S., Jiang, H., Wu, B., Yang, J., & Chen, S. (2009). Urotensin II induces migration of endothelial progenitor cells via activation of the RhoA/Rho kinase pathway. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 219(4), 283-288.
- Xu, Y., Wu, F., Tan, L., Kong, L., Xiong, L., Deng, J., ... Shi, Y. (2011). Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells. *Molecular Cell*, 42(4), 451-464.
- Xuan, Q., Zhong, X., Li, W., Mo, Z., Huang, Y., & Hu, Y. (2017). CtBP2 is associated with angiogenesis and regulates the apoptosis of prostate cancer cells. *Oncology Reports*, 38(2), 1259-1267.

- Yamamoto, E., Toyota, M., Suzuki, H., Kondo, Y., Sanomura, T., Murayama, Y., ... Shinomura, Y. (2008). LINE-1 hypomethylation is associated with increased CpG island methylation in *Helicobacter pylori*-related enlarged-fold gastritis. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 17(10), 2555-2564.
- Yang, H., Lee, S., Lee, S., Kim, K., Yang, Y., Kim, J. H., ... Kim, I. (2012). Sox17 promotes tumor angiogenesis and destabilizes tumor vessels in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 123(1), 418-431.
- Yang, X., Han, H., De Carvalho, D., Lay, F., Jones, P., & Liang, G. (2014). Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell*, 26(4), 577-590.
- Yasui, M., Yamamoto, H., Ngan, C. Y., Damdinsuren, B., Sugita, Y., Fukunaga, H., ... Monden, M. (2006). Antisense to Cyclin D1 inhibits vascular endothelial growth factor-stimulated growth of vascular endothelial cells: Implication of tumor vascularization. *Clinical Cancer Research*, 12(15), 4720-4729.
- Yen, R. C., Vertino, P. M., Nelkin, B. D., Yu, J. J., El-Deiry, W., Cumaraswamy, A., ... Baylin, S. B. (1992). Isolation and characterization of the cDNA encoding human DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Research*, 20(9), 2287-2291.
- Yi, J. M., Dhir, M., Van Neste, L., Downing, S. R., Jeschke, J., Glockner, S. C., ... Ahuja, N. (2011). Genomic and epigenomic integration identifies a prognostic signature in colon cancer. *Clinical Cancer Research*, 17(6), 1535-1545.
- Yong, W., Hsu, F., & Chen, P. (2016). Profiling genome-wide DNA methylation. *Epigenetics & Chromatin*, 9(1).
- Yoon, H., Chan, D. W., Reynolds, A. B., Qin, J., & Wong, J. (2003). N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso. *Molecular Cell*, 12(3), 723-734.
- Zaichuk, T. A., Shroff, E. H., Emmanuel, R., Filleur, S., Nelius, T., & Volpert, O. V. (2004). Nuclear factor of activated T cells balances angiogenesis activation and inhibition. *The Journal of Experimental Medicine*, 199(11), 1513-1522.
- Zhang, F., Pomerantz, J. H., Sen, G., Palermo, A. T., & Blau, H. M. (2007). Active tissue-specific DNA demethylation conferred by somatic cell nuclei in stable heterokaryons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(11), 4395-4400.
- Zhang, Y., Jurkowska, R., Soeroes, S., Rajavelu, A., Dhayalan, A., Bock, I., ... Jeltsch, A. (2010). Chromatin methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3a/3L is guided by interaction of the ADD domain with the histone H3 tail. *Nucleic Acids Research*, 38(13), 4246-4253.
- Zhang, Y., Zhang, N., Dai, B., Liu, M., Sawaya, R., Xie, K., & Huang, S. (2008). FoxM1B transcriptionally regulates vascular endothelial growth factor expression and promotes the angiogenesis and growth of glioma cells. *Cancer Research*, 68(21), 8733-8742.
- Zhou, H., Binmadi, N. O., Yang, Y., Proia, P., & Basile, J. R. (2013). Semaphorin 4D cooperates with VEGF to promote angiogenesis and tumor progression. *Angiogenesis*, 15(3), 391-407.
- Zhou, W., Guo, S., & Gonzalez-Perez, R. R. (2011). Leptin pro-angiogenic signature in breast cancer is linked to IL-1 signalling. *British Journal of Cancer*, 104(1), 128-137.