

Rak jelita grubego jest nowotworem często występującym zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn. Obecne sposoby leczenia tej choroby obejmują zabieg chirurgiczny, chemioterapię i radioterapię guzów odbytnicy. Jednak nowotwory w tym samym stadium zaawansowania, leczone w identyczny sposób, w różnym stopniu poddają się terapii. Różnice te przypisuje się pewnym cechom molekularnym, za pomocą których można zróżnicować nowotwory o podobnym obrazie histologicznym. W procesie kancerogenezy w jelicie grubym, poza zmianami genetycznymi, brane są pod uwagę inne zaburzenia wpływające na ekspresję genów, określane mianem regulacji epigenetycznej. Efektem epigenetycznym nazywa się zmiany w ekspresji genu, wynikające z modyfikacji struktury chromatyny bez zmian w sekwencji DNA. Podstawowym procesem epigenetycznym u człowieka jest metylacja DNA oraz kowalencyjna modyfikacja histonów, obejmująca przede wszystkim ich acetylację i metylację. Wykazano, iż część raków jelita grubego powstaje na podłożu tego właśnie zaburzenia epigenetycznego. Hipermetylację wykryto m.in. w regionach promotorowych następujących genów – *p16*, *p14*, *APC*, *MGMT* oraz *MLH1*.

Słowa kluczowe: rak jelita grubego, metylacja DNA, zaburzenia epigenetyczne.

Epigenetyczna modyfikacja ekspresji genów w rozwoju raka jelita grubego

Epigenetic modification of gene expression in colorectal carcinogenesis

Łukasz Krakowczyk^{1,2}, Joanna Katarzyna Strzelczyk¹

¹Katedra i Zakład Ogólnej Biologii Lekarskiej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze

²Klinika Chirurgii Onkologicznej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Gliwicach

Epidemiologia raka jelita grubego

Zachorowania i zgony z powodu nowotworów złośliwych na początku XXI w., szczególnie w populacji w wieku 45–64 lat, są jednym z najpoważniejszych problemów zdrowotnych w Polsce. Rak jelita grubego jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym przewodu pokarmowego [1]. W ostatnich latach z jego powodu umiera rocznie ok. 8 tys. osób. Ogólna zachorowalność na raka jelita grubego jest zbliżona u obu płci, stanowiąc 9,5% ogółu zachorowań na nowotwory u mężczyzn i 10% u kobiet. Na raka odbytnicy częściej jednak chorują mężczyźni. Częstość zachorowań na raka jelita grubego w populacji ogólnej wzrasta co najmniej o 2,5% rocznie. Przeciętnie 5-letnie szacowane są w Polsce na 25–50% i należą do najniższych w Europie [2–4].

Jednym z najważniejszych zadań współczesnej onkologii jest rozpoznanie choroby nowotworowej w jej najwcześniejszym stadium, najczęściej bezobjawowym. Znaczący postęp w tym zakresie przynoszą metody obrazowe – endoskopia, ultrasonografia (USG), tomografia komputerowa lub magnetyczny rezonans jądrowy. Jednak w przypadku niewielkich zmian ogniskowych metody te są mało skuteczne. Wiele nadziei na poprawę współczesnej diagnostyki raka jelita grubego wiąże się z wykrywaniem zaburzeń genetycznych oraz epigenetycznych, stwierdzanych za pomocą technik biologii molekularnej [1, 5, 7, 8].

Zaburzenia epigenetyczne

Efektem epigenetycznym nazywa się zmiany w ekspresji genu, wynikające z modyfikacji struktury chromatyny bez zmian w sekwencji DNA [9, 10]. Zjawisko epigenetyczne tłumaczy dziedziczenie ilościowych zmian w ekspresji genów w przeciwieństwie do jakościowych zaburzeń genetycznych. Zjawiska epigenetyczne opierają się na 2 mechanizmach:

- odwracalnej metylacji cytozyn przy węglu 5. pierścienia pirymidynowego,
- zmianie struktury i jakości białek chromatyny [11].

U eukariontów cytozyny znajdujące się w chromosomowym DNA są czasami przekształcane w 5-metylocytozynę przez przyłączenie grupy metylowej. Reakcja przeprowadzana jest przez enzym metylotransferazę DNA. Miejsca metylacji nie są przypadkowe – metylowane są tylko cytozyny wchodzące w skład niektórych sekwencji 5'-CG-3' [12, 13], a reakcja następuje natychmiast po replikacji w miejscach komplementarnych do zmetylowanych cytozyn na nici DNA służącej za matrycę [9, 14, 15]. Enzymy metylujące można podzielić na 2 grupy. Pierwsza z nich to enzymy przeprowadzające metylację zachowawczą, odpowiedzialne za przyłączenie grup metylowych

Colorectal carcinoma is a common malignancy in both males and females. Current treatment modalities include surgery, chemotherapy and irradiation of rectal lesions. Despite these interventions, however, there is considerable variance in treatment success. This has been observed in same-stage tumours treated with standardized surgical and chemotherapeutic schedules. It has been postulated that these variations arise due to inherent differences in the tumour characteristics, in particular their molecular profiles. In colorectal carcinogenesis disturbances different from genetic changes, called epigenetic regulations, are also taken into consideration. Epigenetics is defined as modifications of the genome, heritable during cell division, that do not involve a change in the DNA sequence. In humans, the fundamental epigenetic process is DNA methylation and histone modifications. It was demonstrated that certain colorectal cancers originate on the basis of this epigenetic disorder. Hypermethylation was discovered among others in promoters of the following genes – *p16*, *p14*, *APC*, *MGMT* and *MLH1*.

Key words: colorectal cancer, DNA methylation, epigenetic change.

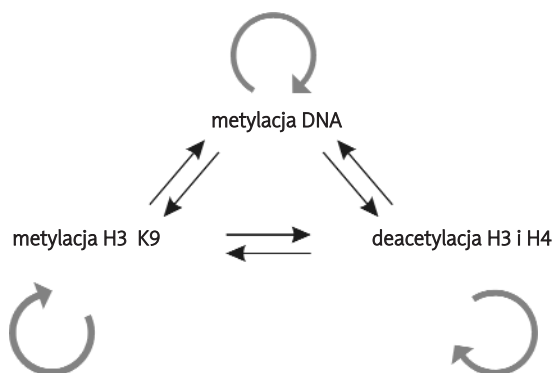
do nowo zsyntetyzowanej nici DNA w miejscach komplementarnych do miejsc metylowanych w nici rodzicielskiej. Dzięki aktywności tych enzymów 2 potomne cząsteczki DNA są metylowane w taki sam sposób, jak cząsteczka rodzicielska. Druga grupa enzymów to enzymy powodujące metylację *de novo*. Przyłączają one grupy metylowe w zupełnie nowych miejscach, a więc zmieniają wzór metylacji konkretnych fragmentów genomu [15].

Liczne dane wskazują, że różnorodne mechanizmy biochemiczne odpowiedzialne za pamięć epigenetyczną są ze sobą ściśle połączone i na danym fragmencie chromosomu działają w układzie sprzężeń zwrotnych dodatnich (ryc. 1) [12]. Metylacja lizyny 9. histonu H3 powoduje deacetylację histonów i metylację DNA, deacetylacja histonów wywołuje metylację DNA i metylację lizyny 9. histonu H3, a metylacja DNA pociąga za sobą deacetylację histonów i metylację lizyny 9. histonu H3 [13].

Przykładem zmian epigenetycznych odgrywających istotną rolę w rozwoju zmian nowotworowych jest hipermetylacja sekwencji CpG, występujących obficie w regionach promotorowych genów [16]. Powstaje w ten sposób fenotyp metylatora wysp CpG (ang. *CpG island methylator phenotype* – CIMP), w którym hipermetylacja powoduje utratę funkcji genów w związku z zaburzeniem transkrypcji [3, 25]. Co najmniej 4 grupy faktów przemawiają za ważną rolę zmian typowo epigenetycznych w rozwoju nowotworów:

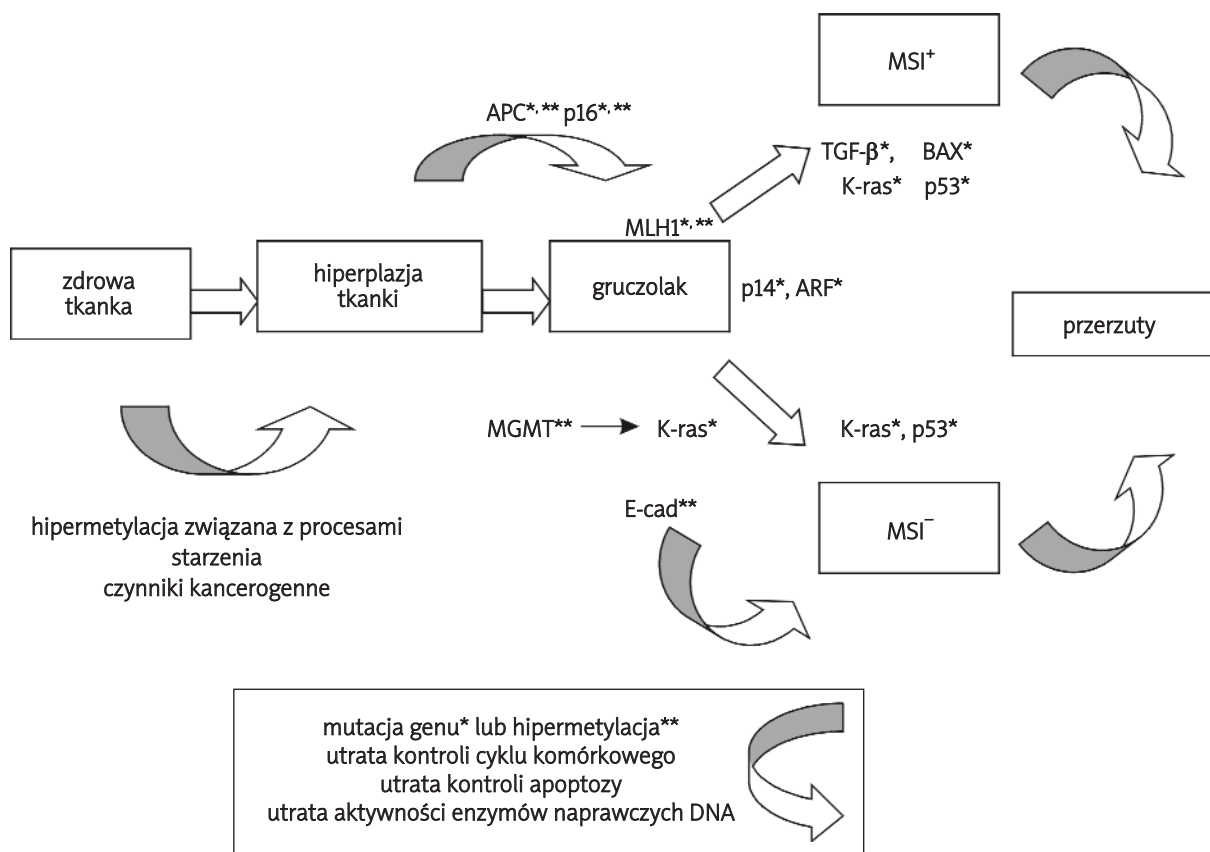
- zmniejszenie metylacji zmniejsza intensywność tworzenia polipów w jelicie grubym, a są one zmianami przedrakowymi;
- nieprawidłowa bialleliczna metylacja promotora genu *H19* występuje w komórkach nerkowych pacjentów z guzem Wilmsa;
- metylację promotora genu *VHL* obserwuje się w przypadkach rodzinnego zespołu von Hippela-Lindaua i genu *RBI* w jednostronnej retinoblastomie;
- hipermetylacja promotorowych binukleotydów CpG w genie naprawy DNA – *MLH1*, co w konsekwencji wyraźnie zwiększa częstość mutacji kancerogennych [11].

Wykazano, iż część raków jelita grubego powstaje na podłożu tego właśnie zaburzenia epigenetycznego, przy czym unieczynniane są geny związane zarówno z torem mutacyjnym gruczolak-rak Fearona i Vogelsteina, jak i geny związane z niestabilnością mikrosatelitarną [3, 17]. Zależności pomiędzy zaburzeniami genetycznymi a epigenetycznymi w rozwoju zmian nowotworowych przedstawiono na ryc. 2. [18]. Hipermetylację wykryto m.in. w regionach promotorowych genów *APC*, *p16*, *p14*, *p15*, *MDR1*, *MINT1*, *MINT2*, *MINT12*, *MINT31*, *THBS1*, *TIMP3*, *hMLH1*, *MGMT*, *GSTP1*, *RASSF1A* [6, 19–21]. W raku jelita grubego światowe piśmiennictwo najczęściej opisuje zaburzenia epigenetyczne genów *p16*, *APC* oraz *MGMT*. Wyniki badań autorów poszczególnych prac przedstawiono w tab. 1.



Ryc. 1. Układ sprzężeń zwrotnych dodatnich łączących główne mechanizmy wyciszania epigenetycznego

Fig. 1. System of positive feedbacks of main mechanisms of epigenetics silencing



Ryc. 2. Zależności pomiędzy zaburzeniami genetycznymi a epigenetycznymi w ewolucji raka jelita grubego
Fig. 2. Dependence between genetic and epigenetic disturbances in colorectal carcinogenesis

Tabela 1. Wyniki badań autorów poszczególnych prac
Table 1. The results of individual author's study

| Autorzy | Tytuł pracy | Stopień metylacji wysp CpG genów | | |
|------------------------------|--|----------------------------------|-----|-------|
| | | p16 | APC | MGMT |
| Lind i wsp., 2004 [22] | A CpG island hypermethylation profile | 32% | 32% | 40% |
| Esteller i wsp., 2001 [19] | A gene hypermethylation profile of human cancers | 37% | 18% | 39% |
| Xiao-Li Xu i wsp., 2004 [20] | Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis | 10% | 8% | 20% |
| Jing Yi i wsp., 2001 [28] | p16 gene methylation in colorectal cancers associated with Duke's staging | 42% | – | – |
| Rijnsoever i wsp., 2002 [25] | Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands | 36% | – | – |
| Esteller i wsp., 2000 [29] | Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation | – | 18% | – |
| Esteller i wsp., 2001 [33] | Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase | – | – | 40% |
| Qi i wsp., 2005 [32] | Hypermethylation of CpG island in O6-methylguanine-DNA methyltransferase | – | – | 43,5% |
| Kawakami i wsp., 2006 [41] | DNA hypermethylation in the normal colonic mucosa of patients with colorectal cancer | 24% | 18% | – |

Geny *p16*, *APC* oraz *MGMT* w rozwoju raka jelita grubego

Gen *p16* (*CDKN2A*) został zlokalizowany na chromosomie 9p21. Gen ten koduje 2 białka – P16 i P14. Białko P14 powstaje na drodze alternatywnego składowania zidentyfikowanego eksonu 1B. Białka te są inhibitorami kinaz zależnych od cyklin, w szczególności CDK4 i CDK6, biorąc udział w fosforylacji Rb. Z tej przyczyny gen *p16* został zaliczony do grupy genów supresorowych. Gen *p16* może kontrolować cykl komórkowy także poprzez bezpośrednią regulację transkrypcji. W tym przypadku *CDKN2A*, wiążąc się z C-kończącą domeną polimerazy RNA II, uniemożliwia fosforylację tego fragmentu przez czynnik transkrypcyjny TFIIH. Dzięki unikalnej organizacji eksonu 1 genu *p16* kodowane jest także białko P14ARF. Poprzez wiązanie się z MDM2 zapobiega degradacji białka P53, wpływając w ten sposób na jego stabilizację. Tym samym *p16* stanowi istotne ogniwo łączące 2 najważniejsze szlaki regulacji cyklu komórkowego. Mutacje w obrębie części kodującej, jak i wyciszenie ekspresji *p16* na skutek metylacji wysp CpG w obrębie odcinka promotorowego tego genu, są często znajdowane w nowotworach jelita grubego [26–28].

Gen *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*) również należy do grupy genów supresorowych. Jest zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 5. Koduje białko zbudowane z 2843 aminokwasów o masie 312 kDa. Białko to pełni wiele funkcji w komórce, współdziałając z β -kateniną, kinazą syntazy glikogenu 3β (*GSK- β*), końcowym białkiem wiążącym 1 (*EB1*) i kinazami Bub. Na podstawie badań nad zespołami dziedzicznymi, jak również sporadycznymi przypadkami raka jelita grubego uznano, że podstawowym elementem w sekwencji zdarzeń gruczolak-rak są zaburzenia regulacji kompleksu *APC* i β -katenina. W normalnej komórce β -katenina tworzy niestabilny kompleks z *GSK- β* i *APC*, co wpływa na prawidłową degradację tego białka, natomiast w przypadku mutacji *APC* dochodzi do kumulacji β -kateniny w komórce. Podstawową funkcją β -kateniny jest tworzenie kompleksu z α -kateniną i E-kadheryną, natomiast pozakomórkowa domena E-kadheryny jest odpowiedzialna za adhezję międzykomórkową. Zaburzenia funkcji katenin i kadheryn, poza zmniejszeniem zdolności wzajemnego przylegania komórek, wpływają również na zaburzenie ich różnicowania i uzyskania zdolności do inwazji [3, 29–31].

Gen *MGMT* jest odpowiedzialny za procesy naprawcze uszkodzonego DNA. Dzięki procesom reperacyjnym może zostać przywrócony pierwotny stan materiału genetycznego. W każdej komórce po zadziałaniu czynnika genotoksycznego następuje uruchomienie mechanizmów naprawczych. Do jednych z najważniejszych enzymów biorących udział w naprawie uszkodzeń DNA należy metylotransferaza O⁶-metyloguanina-DNA (*MGMT*). Katalizuje ona przeniesienie grupy alkilowej z atomu O⁶-guaniny DNA na cysteinę, w wyniku czego enzym ten ulega nieodwracalnej dezaktywacji. Ekspresję genu *MGMT* w różnych tkankach prawidłowych i nowotworowych cechuje zróżnicowany poziom. U ludzi najwyższy poziom aktywności tego enzymu obserwu-

je się w wątrobie, zaś najniższy w komórkach prekursorowych szpiku kostnego. Ekspresja genu *MGMT* w komórkach nowotworowych raka jelita grubego ulega zmniejszeniu o 30–40% [19–21, 32–34].

Dyskusja

W ostatnich latach choroba nowotworowa jest traktowana nie tylko jako zaburzenie genetyczne, ale zwraca się również uwagę na współistnienie zaburzeń epigenetycznych. Oba procesy są ze sobą powiązane, stanowiąc kompleks, który w efekcie prowadzi do kancerogenezy. Metylacja wiąże się z represją aktywności genów. Wynika to z eksperymentów, w których do komórek wprowadzono klonowane geny, metylowane lub niemetylowane, a następnie mierzono poziom ich ekspresji. Ekspresja nie zachodziła, jeśli wprowadzony DNA był metylowany. Powiązanie metylacji z ekspresją genów wynika również z obserwacji wzorów metylacji chromosomowego DNA pokazujących, iż geny nieaktywne są położone w rejonach metylowanych. Około 56% ludzkich genów występuje blisko wysp CpG. W genach warunkujących podstawowe funkcje komórki, ulegających ekspresji we wszystkich komórkach, wyspy CpG nie są metylowane. Natomiast w przypadku genów, których ekspresja jest tkankowo specyficzna, wyspy CpG nie są metylowane tylko w tych tkankach, w których ekspresji ulega sąsiadujący z nimi gen [15]. Stopień metylacji wybranych genów został oceniony przez Shannona i wsp. u 58 chorych na raka jelita grubego [35, 36]. Hipermetylację genów *hMLH1*, *p16* oraz *MDR1* obserwowano odpowiednio u 23, 29 i 28% chorych. Hipermetylację tych genów częściej znajdowano w nowotworach z niestabilnością sekwencji mikrosatelitarnych (ang. *microsatellite instability* – MSI) ($p < 0,001$). Ponadto korelowała ona z niskim zróżnicowaniem histologicznym ($p < 0,001$). Ciao-Li Xu i wsp. ocenili profil metylacji wysp CpG rejonu promotora 31 genów w nowotworach jelita grubego. Materiał stanowiły próbki tkanek guza pobrane od 65 chorych z rozpoznaniem rakiem jelita grubego. Spośród 31 badanych genów wybrano 17 charakterystycznych dla raka jelita grubego. Stopień metylacji wysp CpG przedstawiał się następująco: *MGMT* – 20%, *hMLH1* – 18%, *p16* – 10%, *MINT1* – 15,4%, *MINT31* – 11%, *COX2* – 72%, *cyclina A1* – 100%, *CDX1* – 100%, *RAR* – 85%, *MYOD1* – 69%, *p15* – 68%, *CDH13* – 66%, *CXX1* – 58%, *p73* – 63%, *WT1* – 58% [20].

Gen *myf-3* odgrywa ważną rolę w różnicowaniu komórek mięśniowych. W badaniu Shannona i wsp. hipermetylację tego genu stwierdzono w 88% raków jelita grubego. Stopień metylacji korelował z wiekiem, lokalizacją nowotworu (proksymalny vs dystalny), inwazyjnością oraz stopniem zaawansowania histopatologicznego nowotworu, jak również z MSI [36, 37]. Esteller i wsp. w swojej pracy oceniali zaburzenia epigenetyczne 12 genów w raku piersi, nerki, płuca, jelita grubego oraz w białaczkach. Za najbardziej specyficzne geny, ulegające zamianie ekspresji w raku jelita grubego, uznano *p16*, *p14*, *MGMT*, *APC* oraz *hMLH1*. Ich stopień metylacji przedstawiał się następująco – 37, 20, 39, 18 oraz 44% [19]. Rijnsoever i wsp. analizowali stopień metylacji 3 genów (*p16*, *MDR1* i *MINT2*) w 275 przypadkach raka jelita grubego w stopniu zaawansowa-

nia II i III (wg skali Dukesa). Materiał stanowiły próbki zatopione w parafinie (n=142) oraz pochodzące z materiału pooperacyjnego pobranego zaraz po resekcji guza (n=133). Podgrupa przypadków, w których występowała równoczesna metylacja 2 lub 3 genów, została określona jako CIMP – fenotyp metylatora wysp CpG. Była ona reprezentowana przez 32% badanych i określono ją jako CIMP⁺. Nowotwory typu CIMP⁺ wykazywały mniejsze zróżnicowanie histopatologiczne, mutacja genu *p53* występowała rzadziej, częściej lokalizowały się w odcinku proksymalnym jelita grubego w porównaniu do nowotworów CIMP⁻. Stwierdzono, iż CIMP⁺ nie ma znaczenia prognostycznego w chirurgicznym leczeniu raka jelita grubego w stopniu II i III. Autorzy badali również zależność pomiędzy przypadkami raków z obecnością metylowanych genów (CIMP⁺) a niestabilnością mikrosatelitarną (MSI⁺). Wykazali, iż ww. cechy, charakterystyczne dla CIMP⁺, występują niezależnie od MSI⁺. Większość przypadków guzów z niestabilnością mikrosatelitarną wykazuje metylację genu *hMLH1* i dotyczy częściej starszych kobiet (średnia wieku 70 lat). Przypadki te charakteryzowały się mniejszą częstością występowania mutacji genu *K-ras*, ale nie *p53* [25]. Toyota i wsp. oznaczali w swojej pracy mutacje genów *K-ras*, *p53*, *DPC* i *TGFβ RII* oraz stopień ich metylacji w 41 przypadkach raka jelita grubego oraz 64 przypadkach polipów jelita grubego u chorych bez wywiadu rodzinnego. Wykazano, iż mutacja genu *K-ras* występuje częściej w przypadkach raków określanych jako CIMP⁺ (68%) w porównaniu z przypadkami CIMP⁻, które stanowiły 30%. Z drugiej strony, mutacja genu *p53* występowała w 24% przypadków raków CIMP⁺ w porównaniu do przypadków CIMP⁻ (60%). Mutacja genu *TGFβ RII*, która pojawia się w rakach z niestabilnością mikrosatelitarną, była obecna w 88% w rakach MSI⁺. Znalaziono jedną mutację genu *DPC4* w guzie CIMP⁻, MSI⁻. Zauważono również, że zarówno metylacja wysp CpG genów występujących w raku jelita grubego, jak i mutacja genu *p53* pojawiają się znacznie wcześniej, przed rozwojem zmiany nowotworowej, ponieważ można je wykryć w polipach jelita grubego [6].

Jak wynika z analizy wyników przytoczonych prac, metylacja wysp CpG jest częstsza w guzach mało zróżnicowanych i w wyższym stopniu zaawansowania klinicznego (wg klasyfikacji Dukesa), a podgrupa raków jelita grubego, określana jako fenotyp metylatora wysp CpG (CIMP), występuje częściej w proksymalnym odcinku jelita grubego w porównaniu do odcinka dystalnego (granicę anatomiczną wyznacza zagięcie śledzionowe). Wykazano również, iż tkanka guza nowotworowego wykazuje wyższy stopień metylacji w porównaniu ze zdrową tkanką jelita grubego. Natomiast podgrupa raków określona jako CIMP⁺ nie ma znaczenia prognostycznego w chirurgicznym leczeniu raka jelita grubego w stopniu II i III (wg klasyfikacji Dukesa) [25]. Precyzyjne określenie zmian genetycznych (mutacji) i epigenetycznych (metylacji wysp CpG) każdej zmiany nowotworowej może być istotne zarówno dla planowania leczenia, jak i prognozowania przeżycia, a podgrupa guzów, która wykazuje wysoki poziom metylacji, może zostać zakwalifikowana do leczenia inhibitorami metylacji [38–40]. Stopień metylacji DNA w guzach jelita grubego może okazać się w przyszłości użytecznym markerem

aktywności genomu, a ocena zaburzeń epigenetycznych w marginesie tkanki zdrowej może stać się cenną wskazówką do oceny prawidłowości resekcji zmiany nowotworowej. Należy jednak podkreślić, iż znaczne różnice pomiędzy poszczególnymi nowotworami, dotyczące wieku zachorowania, lokalizacji, budowy histopatologicznej, rokowania oraz zmian molekularnych sugerują, że wiele procesów onkogenezy nadal pozostaje jeszcze niepoznanych [3].

Piśmiennictwo

1. Ławicki S, Mroczo B. Markery nowotworowe przydatne w diagnostyce i monitorowaniu raka jelita grubego. *Postępy Hig Med Dośw* 2002; 56: 617-34.
2. Nowacki M. Nowotwory jelita grubego. Wydawnictwo Wiedza i Życie, Warszawa 1996; 51-66.
3. Pasz-Walczak G, Jesionek-Kupnicka D. Podstawowe mechanizmy kancerogenezy w jelicie grubym. *Współcz Onkol* 2004; 8: 303-7.
4. Paduch R, Niedziela P. Markery molekularne w nowotworach układu pokarmowego. *Onkol Pol* 2004; 7: 19-23.
5. Grzebieńiak Z, Szynglarewicz B. Czynniki prognostyczne w raku okrężnicy i odbytnicy. *Przew Lek* 2004; 61: 43-53.
6. Toyota M, Ohe-Toyota M, Ahuja N, Issa JP. Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 710-5.
7. Vogelstein B, Kinzel K. The genetic basis of human cancer. *Trends Genet* 1993; 9: 138-41.
8. Jorde L, Carey J. Genetyka nowotworów. W: Genetyka medyczna. Wojciorowski J (red.). Wydawnictwo CZELEJ, Warszawa 2000; 260-83.
9. Feinberg A. Cancer epigenetics takes center stage. *PNAS* 2001; 98: 392-4.
10. Winter PC, Hickey G, Fletcher H. Epigenetyka i modyfikacje chromatyny. W: Krótkie wykłady. Genetyka. Winter PC, Hickey G, Fletcher H. (red.). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003; 374-81.
11. Srebro Z, Lach H. Genetyczne, epigenetyczne i bioenergetyczne mechanizmy starzenia się i nowotworów. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2000.
12. Wierzbicki A. Dziedziczenie epigenetyczne. *Kosmos* 2004; 53: 271-80.
13. Richards E, Elgin S. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing, rounding up the usual suspect. *Cell* 2002; 108: 489-500.
14. Costello J, Plass C. Methylation matters. *J Med Genet* 2001; 38: 285-303.
15. Brown TA. Genomy. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2001; 172-193.
16. Robertson K, Jones P. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis* 2000; 21: 461-7.
17. Neiberghs H, Hein D, Spratt J. Genetic profiling of colon cancer. *J Surg Oncol* 2002; 80: 204-13.
18. Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 687-92.
19. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 3225-9.
20. Xu X, Yu J, Zhang H, Sun M, et al. Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3441-54.
21. Bhakat K, Mitra S. CpG methylation-dependent repression of the human 06-methylguanine-DNA methyltransferase gene linked to chromatin structure alteration. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1337-45.
22. Lind GE, Thorstensen L, Lovig T, Meling GI, Hamelin R, Rognum TO, Esteller M, Lothe RA. A CpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell lines. *Mol Cancer* 2004; 3: 1186-97.

23. Jones P, Laird P. Cancer epigenetics come of age. *Nature Genet* 1999; 21: 163-7.
24. Feinberg A, Oshimura M, Barrett J. Epigenetic mechanisms in human disease. *Cancer Res* 2002; 62: 6784-7.
25. Rijnsoever M, Grieu F, Elsaleh H, Joseph D. Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands. *Gut* 2002; 51: 797-802.
26. Mackiewicz K, Lamperska K, Kaczmarek A i wsp. Analiza ekspresji białka oraz mutacji i metylacji wysp CpG *p16* w komórkach pierwotnego, sporadycznego czerniaka oka. *Współcz Onkol* 1999; 6: 231-3.
27. Gmyrek G, Kwiatkowska E, Lamperska K, Mackiewicz A. Analiza metylacji wysp CpG w odcinkach promotorowych genów *p15* i *p16*. *Współcz Onkol* 2001; 5: 10-2.
28. Yi J, Wang ZW, Cang H, Chen YY, Zhao R, Yu BM, Tang XM. *p16* gene methylation in colorectal cancers associated with Duke's staging. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 722-5.
29. Esteller M, Sparks A, Toyota M, et al. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 4366-71.
30. Fearhead N, Britton M, Bodmer W. The ABC of *APC*. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 721-33.
31. Chen J, Röcken C, Lofton-Day C, Schulz HU, Müller O, Kutzner N, Malfertheiner P, Ebert MP. Molecular analysis of *APC* promoter methylation and protein expression in colorectal cancer metastasis. *Carcinogenesis* 2005; 26: 37-43.
32. Qi J, Zhu YQ, Huang MF, Yang D. Hypermethylation of CpG island in 0⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene was associated with *K-ras* G to A mutation in colorectal tumor. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2022-5.
33. Esteller M, Risques RA, Toyota M, Capella G, Moreno V, Peinado MA, Baylin SB, Herman JG. Promoter hypermethylation of the DNA repair gene 0⁶-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G: C to A: T transition mutations in *p53* in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 2001; 61: 4689-92.
34. Drewa G, Ferenc T. Podstawy genetyki. Elsevier Urban & Partner, Warszawa 2003; 235-46.
35. Kamiński A, Joseph D. Markery molekularne w raku jelita grubego – doświadczenia z Zachodniej Australii. *Współcz Onkol* 2003; 7: 54-60.
36. Shannon BA, Iacopetta BJ. Methylation of the *hMLH1*, *p16* and *MDR1* genes in colorectal carcinoma: associations with pathological features and with microsatellite instability. *Cancer Lett* 2001; 167: 91-7.
37. Shannon B, Kay P, House A, Iacopetta B. Hypermethylation of the *MYF-3* gene in colorectal carcinoma: associations with pathological features and with microsatellite instability. *Int J Cancer* 1999; 84: 109-13.
38. Jones P, Gonzalgo M. Altered DNA methylation and genome instability: A new pathway to cancer? *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2103-5.
39. Su-Lyn K, Meagher A. The relationship between hypomethylation and CpG island methylation in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 2003; 162: 1361-71.
40. Kopelovich L, Crowell J, Fay J. The epigenome as a target for cancer chemoprevention. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1747-57.
41. Kawakami K, Ruskiewicz A, Bennett G, Moore J, Grieu F, Watanabe G, Iacopetta B. DNA hypermethylation in the normal colonic mucosa of patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 2006; 94: 593-8.

Adres do korespondencji

lek. Łukasz Krakowczyk
Zakład Ogólnej Biologii Lekarskiej
ul. Jordana 19
41-808 Zabrze Rokitnica
e-mail: helluk@wp.pl