

Mikołaj Poznański, Marzena Anna Lewandowska

Katedra i Klinika Chirurgii Klatki Piersiowej i Nowotworów *Collegium Medicum* im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, Centrum Onkologii im. Prof. Franciszka Łukaszczyka w Bydgoszczy

Zastosowanie wysokowydajnych technologii w diagnostyce molekularnej chorób nowotworowych

Application of high-throughput technologies in cancer molecular diagnostics

Adres do korespondencji:

Dr n. med. Marzena Anna Lewandowska
Katedra i Klinika Chirurgii
Klatki Piersiowej i Nowotworów
Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu, Centrum Onkologii
im. Prof. Franciszka Łukaszczyka
ul. Romanowskiej 2, 85-796 Bydgoszcz
Tel.: +48 (52) 374 33 38
Faks: +48 (52) 374 33 01
e-mail: lewandowskam@co.bydgoszcz.pl

STRESZCZENIE

Istnienie mutacji punktowych i aberracji chromosomowych o znaczeniu prognostycznym i predykcyjnym sprawiło, że analiza genetyczna stała się niezbędnym narzędziem w dziedzinie diagnostyki chorób nowotworowych. Niestety, stosowane obecnie na szeroką skalę klasyczne techniki analityczne wykazują wiele ograniczeń i niedoskonałości — są stosunkowo czasochłonne i mało wydajne, a przy tym nie pozwalają na uzyskanie pełnej informacji o danym przypadku choroby. Postępujący rozwój technologii przyczynił się do opracowania wielu nowych, wysoce zaawansowanych rozwiązań, takich jak techniki oparte na zastosowaniu mikromacierzy, ilościowa analiza ekspresji genów przy wykorzystaniu spektrometrii mas czy też nowoczesne mechanizmy sekwencjonowania DNA i RNA. Rozwiązania te umożliwiają dokładniejszą i bardziej wydajną analizę materiału genetycznego. Ich zastosowanie pozwala nie tylko na stwierdzenie występowania niemożliwych wcześniej do wykrycia zmian genetycznych, ale również na prowadzenie badań w nowych obszarach onkogenetyki, takich jak wahania ekspresji genów lub oddziaływania czynników epigenetycznych na aktywność poszczególnych regionów genomu. Ponadto możliwe stało się prowadzenie wydajnych badań asocjacyjnych, ujawniających korelacje między wystąpieniem konkretnych mutacji lub polimorfizmów a pojawieniem się określonej formy nowotworu. Przewiduje się, że w niedalekiej przyszłości dalszy postęp technologiczny doprowadzi do stworzenia kolejnej generacji metod analitycznych, charakteryzujących się jeszcze wyższym stopniem dokładności i wydajności lub też umożliwiających badanie niedostępnych dotąd aspektów genetyki nowotworów.

Słowa kluczowe: personalizowana medycyna, mikromacierze, sekwencjonowanie nowej generacji, Amplichip CYP450, MammaPrint, Oncocarta

ABSTRACT

The existence of prognostic and predictive point mutations and chromosomal aberrations caused that genetic analysis has become an essential tool in the field of cancer diagnostics. Unfortunately, classical analytical techniques currently used on a large scale have several limitations and imperfections — are relatively time-consuming and inefficient, and at the same time do not provide full information about the disease. The development of technology has contributed to the creation of a number of new, highly advanced solutions, such as techniques based on the use of microarrays, quantitative gene expression analysis using mass spectrometry or modern mechanisms of DNA and RNA sequencing. These solutions allow more accurate and highly efficient analysis of genetic material. Their use allows us not only to reveal the existence of genetic changes which were previously impossible to detect, but also to conduct research in new areas of cancer genetics, such as changes in expression of certain genes or influence of epigenetic factors on the activity of specific regions of genome. In addition, it has become possible to conduct effective association studies, revealing the correlation between the occurrence of specific mutations or polymorphisms, and the emergence of certain forms of cancer. It is expected that in the near future technological development will lead to the creation of next generation of analytical methods which will

be characterized by a higher degree of accuracy and performance, or will allow previously inaccessible aspects of cancer genetics to be widely studied.

Key words: personalized medicine, microarrays, new generation sequencing, Amplichip CYP450, MammaPrint, Oncocarta

Onkol. Prak. Klin. 2013; 9, 2: 70–77

Wstęp

Ze względu na wysoki stopień zróżnicowania genetycznego komórek nowotworowych oraz wynikające z niego różnice w stopniu złośliwości, objawach klinicznych, a także wrażliwości na działanie poszczególnych chemioterapeutyków, analiza molekularna zyskuje w ostatnich latach na znaczeniu jako narzędzie diagnostyczne. Szczególnie ważna dla prowadzenia skutecznej terapii jest możliwość przewidzenia podatności komórek nowotworu na zniszczenie poprzez stosowanie konkretnej grupy leków. Biorąc pod uwagę ten parametr, komórki nowotworowe można przyporządkować do jednego z trzech typów: bardzo wrażliwych, średnio wrażliwych lub też niewrażliwych na działanie danego leku.

Niestety, szeroko stosowane obecnie techniki analityczne, mimo swej niewątpliwiej przydatności, są stosunkowo czasochłonne, a przy tym cechują się istotnymi

ograniczeniami, uniemożliwiającymi uzyskanie pełnej informacji o chorobie [1].

Postęp w dziedzinie onkologii, jaki dokonał się na przestrzeni ostatniej dekady (tab. 1), zwrócił uwagę na wiele nowych aspektów genetyki nowotworów i data miningu, których kompleksowa analiza jest niezbędna dla prowadzenia skutecznej walki z chorobami nowotworowymi [2]. Należy wśród nich wymienić między innymi występowanie wrodzonych lub nabytych zmian genetycznych mających związek z patogenezą nowotworu, różnice w natężeniu ekspresji konkretnych genów, a także wpływ czynników epigenetycznych na aktywność określonych regionów genomu. Upowszechnienie nowoczesnych, wysokowydajnych technologii, takich jak mikromacierze, sekwencjonowanie nowej generacji czy spektrometria mas, może pozwolić nie tylko na stawianie dokładniejszej diagnozy, ale również na dalsze poszerzenie stanu wiedzy o procesie karcynogenezy.

Tabela 1. Przykłady nowoczesnych wysokowydajnych technologii stosowanych w diagnostyce molekularnej chorób nowotworowych

	Analiza mutacji i polimorfizmów	Analiza ekspresji genów	Analiza metylacji
Mikromacierze	<i>Amplichip CYP450</i> (Roche Diagnostics) Genome-Wide Human SNP Array (Affymetrix) CytoSure ISCA + SNP; CytoSure ISCA UPD (Oxford Gene Technology)	<i>MammaPrint Symphony</i> (Agendia) GeneChip PrimeView (Affymetrix) Expression Array System (Applied Biosystems)	<i>Goldengate Methylation Cancer Panel</i> HumanMethylation 450 BeadChip (Illumina) MeDIP-chip (NimbleGen)
Spektrometria mas	Analiza iPLEX (Sequenom)	QGE Analyzer (Sequenom)	EpiTyper (Sequenom)
MALDI-TOF	— <i>OncoCarta</i> — <i>MelaCarta</i> — <i>LungCarta</i>		
Sekwencjonowanie nowej generacji	DNA-Seq, RNA-Seq; Pirosekwencjonowanie 454 (Roche Diagnostics) Sekwencjonowanie z odwracalnymi terminatorami lub z amplifikacją mostkową (Illumina/Solexa): — <i>Truseq Amplicon Cancer Panel</i> Sekwencjonowanie SOLiD (z ligacją) (Applied Biosystems) Sekwencjonowanie Ion Torrent (z analizą zmian pH) (Life Technologies) PacBio RS — sekwencjonowanie pojedynczych cząsteczek DNA w czasie rzeczywistym (Pacific Biosciences)		MeDIP-seq (Illumina, Roche) Sure Select Methyl-Seq (Agilent Technologies) MethylCap-seq (Illumina) [40] Bisulphite-seq (Illumina) Bisulfite- μ TGCE [41]

Analiza mutacji i polimorfizmów

Potwierdzono, że część mutacji lub aberracji chromosomowych ma charakter powtarzalny dla danego typu nowotworu, a ich obecność związana jest z wystąpieniem konkretnych objawów choroby nowotworowej [3]. W związku z tym stanowią one ważny czynnik decydujący o postawieniu rokowania i doborze odpowiedniej terapii [4, 5]. Szczególnie ważne jest stosowanie odpowiednich narzędzi, zdolnych do wydajnego i niezawodnego wykrywania tego rodzaju nieprawidłowości. Ponadto, ważnym problemem współczesnej molekularnej diagnostyki onkologicznej jest fakt istnienia zmian genetycznych niemożliwych do wykrycia przy pomocy standardowego kariotypowania lub fluorescencyjnej hybrydizacji *in situ* (FISH, *fluorescence in situ hybridization*). Do grupy tej należą niewielkie mutacje na poziomie submikroskopowym (mikrodelecje i duplikacje), a także utrata heterozygotyczności niektórych regionów genomu w związku ze zjawiskiem nabytej disomii jednorodzielskiej (aUPD, *acquired uniparental disomy*) [1].

Nowoczesne metody oparte na zastosowaniu mikromacierzy w porównawczej hybrydizacji genomowej (Array-CGH, *Array-comparative genomic hybridization*) oraz do analizy jednonukleotydowych polimorfizmów (SNP Array, *Single Nucleotide Polymorphism Array*) mogą stanowić bardzo skuteczną alternatywę dla tradycyjnych technik analitycznych, takich jak kariotypowanie czy technika FISH [6]. Ich podstawowy element — mikromacierz DNA — to wykonana ze szkła lub tworzywa sztucznego płytka pokryta odpowiednio dobranymi oligonukleotydami (sondami), reprezentującymi określone fragmenty genomu. Sondy zdolne są do wiązania odpowiadających im fragmentów DNA na zasadzie komplementarności [7].

W metodzie Array-CGH badana próbka DNA jest znakowana barwnikiem fluorescencyjnym, a następnie mieszana w stosunku 1:1 z DNA referencyjnym (wolnym od mutacji), znakowanym barwnikiem o innej fluorescencji. Po hybrydizacji mikromacierz podlega analizie przy pomocy specjalistycznego systemu komputerowego, obliczającego wzajemny stosunek natężenia fluorescencji obu barwników dla każdej sondy. Podwyższona fluorescencja barwnika związanego z DNA badanym świadczy o zajęciu w nim duplikacji danego regionu, natomiast zwiększona fluorescencja barwnika DNA referencyjnego — o obecności delekcji w tym obszarze DNA badanego [7].

Przy wykorzystaniu opisywanej techniki przeprowadzono analizę materiału genetycznego komórek niezłośliwego gruczolaka odbytnicy oraz raka odbytnicy (po 8 przypadków) [6]. Analiza mutacji wykazała odpowiednio obecność 10 duplikacji i 22 delekcji w komórkach gruczolaka oraz 25 duplikacji i 14 delekcji w komórkach rakowych. Część zmian genetycznych występowała w obu typach patomorfologicznych nowotworów, jednak odno-

towano również obecność mutacji specyficznych wyłącznie dla raka. Uzyskane wyniki mogą przyczynić się do wyjaśnienia mechanizmu obserwowanej progresji gruczolaka (nowotwór łagodny) do raka (nowotworu złośliwego) [6].

W analogicznych badaniach [8], dotyczących 59 przypadków nowotworów nabłonkowych grasicy, ujawniono obecność 4300 przypadków zmian liczby kopii (CNV, *copy number variations*), obejmujących fragmenty od kilku tysięcy par zasad do nawet całych ramion chromosomów. Przy pomocy narzędzi bioinformatycznych (algorytm GISTIC, *Genomic Identification of Significant Targets in Cancer*) wykazano krytyczne znaczenie 126 CNV, w obrębie których zlokalizowanych było między innymi 13 znanych genów związanych z patogenezą nowotworów [8].

Analiza jednonukleotydowych polimorfizmów (SNP) ma duże znaczenie w kontekście indywidualnych predyspozycji chorych do zapadalności na określone rodzaje nowotworów, ale również do reakcji organizmu na podanie konkretnych leków. Technika SNP Array wykorzystuje specjalistyczne sondy zaprojektowane do badania tego typu zmienności. Dla danego polimorfizmu na macierzy umieszczony jest zestaw nawet kilkudziesięciu sond, odpowiadających obu jego wariantom, a także różniących się dokładnym położeniem analizowanego *loci*. Badane DNA hybryduje ze wszystkimi sondami, jednak uzyskany sygnał jest wyraźniejszy dla sekwencji o całkowitej zgodności z allelem obecnym w próbce [9].

Przykładem praktycznego zastosowania mikromacierzy SNP jest Amplichip CYP450 (Roche Diagnostics). Test ten pozwala na potwierdzenie występowania w organizmie konkretnych form dwóch enzymów z grupy oksydaz cytochromu P450 — CYP2D6 (33 warianty) i CYP2C19 (3 warianty). W zależności od obecności w genomie chorego poszczególnych alleli odpowiadających im genów, enzymy te charakteryzują się różną zdolnością do metabolizowania substratów. Jednocześnie szacuje się, że szlaki metaboliczne związane z ich aktywnością mogą mieć udział w przetwarzaniu nawet 25% leków [10], w tym substancji o takim znaczeniu dla onkologii jak tamoksyfen, stosowany w leczeniu hormonozależnych raków piersi [11]. Zaburzenia działania enzymów mogą przyczynić się nie tylko do obniżenia efektywności danego leku, ale również do kumulacji w organizmie nieprzetworzonych substratów mogących wywołać efekty uboczne o różnym stopniu szkodliwości (łącznie z ciężkimi zatruciami ze skutkiem śmiertelnym) [12]. W związku z tym ustalenie zdolności enzymów do metabolizowania ma duże znaczenie przy określaniu odpowiedniej dawki leku. Dodatkowe utrudnienie stanowi fakt, że efekt fenotypowy kombinacji określonych dwóch alleli CYP2D6 jest stosunkowo trudny do przewidzenia, zwłaszcza biorąc pod uwagę obecność wielu grup potencjalnych substratów dla enzymu [12].

Genotypowanie CYP2D6 u 165 chorych, przeprowadzone równoległe za pomocą testu Amplichip

CYP450 oraz częściej stosowanych metod PCR w czasie rzeczywistym (RT-PCR), wykazało całkowitą zgodność wyników uzyskanych przy wykorzystaniu tych dwóch odmiennych technologii. Oprócz szybkiej identyfikacji konkretnych alleli, dodatkową zaletą stosowania mikromacierzy była możliwość wykrywania przypadków duplikacji badanego genu, która również wykazuje zauważalny wpływ na ogólną aktywność enzymu [12].

Metoda SNP Array może także zostać z powodzeniem wykorzystana do wykrywania przypadków utraty heterozygotyczności niektórych regionów genomu. Mikromacierz Affymetrix 10K 2.0 Gene-chip zastosowano w analizie materiału genetycznego komórek chłoniaka grudkowego pobranych od 182 chorych [13]. Celem badania było ustalenie częstotliwości występowania i ewentualnego znaczenia rokowniczego przypadków aUPD. Zmiany genetyczne zaobserwowano u 118 (65%) chorych. Powtarzalne przypadki aUPD odnotowano w regionach: 6p (25 przypadków), 16p (22 przypadki), 12q (17 przypadków), 1p36 (14 przypadków), 10q i 6q (po 8 przypadków). Analiza statystyczna wykazała, że obecność aUPD w 1p36 jest związana z krótszym średnim czasem przeżycia (*overall survival*), natomiast aUPD 16p — ze skróceniem czasu wolnego od progresji (*progression-free survival*) [13].

Mimo niewątpliwych zalet cechujących techniki analityczne oparte na zastosowaniu mikromacierzy, należy zwrócić uwagę na istnienie pewnych niedogodności związanych z ich użytkowaniem. Podstawowy problem stanowi paradoksalnie ogromna liczba uzyskiwanych danych, sprawiająca trudności w zarządzaniu nimi, a także nakładająca wymóg stosowania zaawansowanych narzędzi bioinformatycznych i statystycznych w celu ich przetwarzania. Może to skutkować popełnianiem błędów i przeoczeń przez osoby prowadzące badanie, a w niektórych przypadkach przyczynić się do wyciągnięcia niewłaściwych wniosków — np. stwierdzenia wyraźnej korelacji gen–fenotyp w odniesieniu do zbieżności o całkowicie przypadkowym charakterze.

Jednocześnie, ze względu na wysoki stopień modyfikowalności, a także obecność na rynku co najmniej kilku wzajemnie konkurencyjnych technologii, za wadę mikromacierzy uznaje się niewielki stopień powtarzalności eksperymentów. Taki stan rzeczy znacząco utrudnia potwierdzanie wyników uzyskanych w danym ośrodku przez inne, niezależne zespoły badawcze. Wpływ na ten aspekt ma również stosowanie w poszczególnych laboratoriach odmiennych protokołów izolacji, oczyszczania oraz hybrydyzacji materiału genetycznego [14].

Ponadto, należy zauważyć, że błędy popełnione na etapie przygotowania próbek mogą skutkować zaburzeniami fluorescencji i uzyskaniem nieprawidłowych danych. W związku z tym badany materiał wymaga traktowania ze szczególną starannością i zastosowania specjalistycznych odczynników. W połączeniu z wysokim

kosztem pozyskania samej mikromacierzy, powoduje to znaczące obniżenie opłacalności przedsięwzięcia [15]. Problem wysokich nakładów finansowych niezbędnych do prowadzenia badań z wykorzystaniem mikromacierzy może w niedalekiej przyszłości stracić na znaczeniu. Wpływ na to będzie miał prawdopodobnie postęp technologiczny powodujący obniżenie kosztów produkcji mikromacierzy.

W ostatnich latach duże nadzieje wiąże się z badaniem zjawiska wrodzonej podatności na nowotwory, wynikającej z mutacji lub polimorfizmów. Badania asocjacyjne całego genomu (*Genome-Wide Association Studies*) prowadzone są w dwóch grupach (kontrolnej i badanej), w których porównuje się częstotliwość występowania wariantów konkretnych sekwencji genetycznych oraz jej ewentualne korelacje z pojawieniem się określonych cech fenotypowych — takich jak predyspozycja do zachorowań na nowotwory. Większa liczba przeanalizowanych genomów wpływa w takim przypadku pozytywnie na wiarygodność wyniku. W związku z tym prowadzenie tego typu badań wymaga zastosowania wydajnych technologii umożliwiających analizę materiału pobranego od wielu pacjentów w stosunkowo krótkim czasie, przy jednoczesnym ograniczeniu kosztów.

Przykładem wysokowydajnej technologii, która znalazła zastosowanie w tej dziedzinie, jest spektrometria mas dedykowana kwasom nukleinowym. Na jej wykorzystaniu opiera się działanie systemu MassARRAY® (Sequenom). Wstępnym etapem procesu jest w tym przypadku amplifikacja badanego materiału za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*). Następnie przy wykorzystaniu fosfatazy alkalicznej usuwany jest nadmiar deoksynukleotydów. Główny etap stanowi tak zwana reakcja iPLEX® — primery przygotowane dla badanej próbki podlegają wydłużaniu z wykorzystaniem dideoksynukleotydów terminalnych odpowiednio zmodyfikowanych pod względem masy cząsteczkowej. Po zakończeniu multipleksowych reakcji (w jednym dołku może dochodzić do amplifikacji nawet 40 różnych produktów) uzyskany materiał jest analizowany w spektrometrze mas Maldi-Tof (Sequenom). Wykryte różnice w uzyskanych widmach masowych pozwalają na ujawnienie istniejących polimorfizmów. Wszystkie etapy procesu wykonywane są automatycznie w zaprojektowanym do tego urządzeniu [16].

System ten został wykorzystany między innymi w badaniu nad ryzykiem zachorowania na chłoniaki niezłośliwe [17]. Próbki materiału genetycznego pobrane od 73 chorych porównano z grupą kontrolną (500 zdrowych osób) pod kątem występowania polimorfizmów 5 genów związanych z naprawą DNA (*MGMT* L84F, *MGMT* K178R, *XPA* TSS+62, *XPD* K751Q oraz *XPG* TSS+372). Statystyczną korelację z pojawieniem się chłoniaków wykazał polimorfizm *MGMT* L84F — zastąpienie cząsteczki leucyny przez fenyloalaninę w pozycji

84. omawianego białka wiązało się z ponad 2-krotnie większym ($2,085 \times$) ryzykiem rozwoju nowotworu [17].

Do poszukiwania nowych rozwiązań w zakresie sekwencjonowania materiału genetycznego zachęca również niewystarczający poziom detekcji mutacji somatycznych w tradycyjnym sekwencjonowaniu metodą Sangera. Przy wykorzystaniu spektrometrii mas przeprowadzono analizę 1000 próbek tkanek pobranych od chorych z 17 różnymi typami nowotworów złośliwych [3]. Celem badania było ustalenie częstotliwości występowania 238 znanych mutacji niesynonimicznych mających związek z patogenezą chorób nowotworowych. W przypadku genu *EGFR* analiza widm masowych ujawniła występowanie 12 mutacji, podczas gdy sekwencjonowanie tych samych próbek metodą Sanger'a pozwoliło na wykrycie jedynie 9 z nich. Pozostałe 3 mutacje (25%) nie zostały wykryte ze względu na niski udział ilościowy zmutowanej sekwencji.

Wyniki tego badania zostały wykorzystane do stworzenia wyspecjalizowanych aplikacji diagnostycznych: OncoCarta, MelaCarta i LungCarta, umożliwiających analizę nowotworowego DNA pod kątem występowania najczęstszych mutacji. W przypadku dwóch ostatnich paneli analiza zawężona jest do konkretnego typu nowotworu — czerniaka złośliwego lub raka płuca [18].

Według specyfikacji producenta, panel OncoCarta 1.0 zdolny jest do identyfikacji 238 mutacji w obrębie 19 genów związanych z nowotworami. Porównania jego skuteczności z tradycyjnymi metodami dokonano poprzez analizę 96 próbek tkanki nowotworowej zatopionych w parafinie. Za pomocą konwencjonalnego sekwencjonowania z użyciem dideoksynukleotydów stwierdzono obecność 74 mutacji. Panel OncoCarta 1.0 pozwolił na wykrycie 70 z nich, a ponadto ujawnił obecność 31 kolejnych, niewykrytych wcześniej [18].

System MassARRAY nie tylko pozwala na genotypowanie z użyciem do ośmiu paneli dziennie w wersjach zawierających 96 lub 384 dołki, ale również umożliwia znaczne obniżenie kosztu badania. Wyniki analizy 45 mutacji w genach: *APC*, *MLH1*, *MSH2* i *MSH6* przeprowadzonej z wykorzystaniem reakcji iPLEX oraz techniki PCR w czasie rzeczywistym (*real-time* PCR) wykazały zdecydowanie wyższą opłacalność wysoko-wydajnych technologii w porównaniu z tradycyjnym sekwencjonowaniem. Multipleksowa analiza iPLEX pozwala na ocenę 36 mutacji w cenie 3 euro za próbkę, ocena 9 mutacji metodą *real-time* PCR z sondami TaqMan została wyceniona na 2,5 euro, natomiast sekwencjonowanie pojedynczej nici metodą Sanger'a wymaga nakładów 7 euro za odczynniki i materiały eksploatacyjne, nie wliczając kosztów amortyzacji, czasu pracy i kosztów pośrednich [19].

Innym przykładem kompleksowego narzędzia związanego z diagnostyką nowotworów jest TruSeq[®] Amplicon — Cancer Panel (Illumina), wykorzystujący technikę *sequencing by synthesis* (SBS). Pierw-

szym etapem metody jest przygotowanie tak zwanej biblioteki genomowej — genomowe DNA podlega fragmentacji, a następnie hybrydyzacji z sondami specjalnie przygotowanymi pod kątem badanych genów. Sondy te zawierają zarówno sekwencje oskrzydlające określony region genomu, jak i tak zwane sekwencje adaptorowe. Na płycie zlokalizowane są oligonukleotydy komplementarne do adaptorów, co po dodaniu próbki skutkuje hybrydyzacją, wydłużaniem cząsteczek oraz następowaniem kolejnych cykli amplifikacji. Wysokie zagęszczenie oligonukleotydów odpowiadających konkretnemu fragmentowi genomu skutkuje powstaniem w wyniku amplifikacji mostkowej tak zwanych klastrów DNA, pozwalających na uzyskanie silniejszego końcowego sygnału. Po amplifikacji nici opóźnione są usuwane z roztworu, a zakończenia pozostałych cząsteczek zostają zablokowane. Kolejny krok stanowi sekwencjonowanie próbki poprzez przyłączenie komplementarnych nukleotydów połączonych ze znakowanymi odwracalnymi terminatorami (*reversible terminators*). Przyłączenie danego nukleotydu do nici powoduje zablokowanie dalszego wydłużania i jednocześnie wzbudzenie odpowiadającego mu barwnika, co wychwytuje odpowiedni detektor. Następnie terminator wraz z barwnikiem jest usuwany, aby umożliwić przyłączenie kolejnych nukleotydów [20].

Na omawianym panelu zlokalizowanych jest 212 ampliconów związanych z 48 genami, które szczególnie często ulegają uszkodzeniu podczas transformacji i progresji różnych typów nowotworów — między innymi czerniaka, raka płuca, jajników i jelita grubego. Ponadto, na każdym panelu możliwa jest jednoczesna analiza nawet 96 próbek. Zastosowanie tego rodzaju testów może pozwolić na stosunkowo szybkie uzyskiwanie informacji dotyczących profilu genetycznego danego przypadku nowotworu [20].

Analiza metylacji

Oprócz opisanych przypadków zmian genetycznych wyraźny związek z patogenezą nowotworów wykazują również czynniki epigenetyczne, z których najczęściej występującymi są metylacje zasad azotowych wchodzących w skład DNA [21]. Zwiększone predyspozycje do metylacji wykazują tak zwane miejsca CpG (*Cytosine-phosphate-Guanine*), czyli miejsca na nici DNA, w których sąsiadują ze sobą cząsteczki cytozyny i guaniny połączone wiązaniem fosfodiesterowym. W miejscach tych ze szczególnie wysoką częstotliwością następuje metylacja cytozyny do 5-metylocytozyny. Należy zauważyć, że miejsca CpG (skupione w większych jednostkach — tzw. wyspach CpG) bardzo licznie występują w obrębie sekwencji promotorowych, w związku z czym ich metylacje mogą skutkować zmianami w ekspresji określonych genów [22].

Badania asocjacyjne epigenomu (EWAS, *Epigenome-Wide Association Studies*) wykorzystywały w ostatnich latach mikromacierze Infinium HumanMethylation27 BeadChip (Illumina) do jednoczesnej analizy około 27,5 tys. *loci* CpG w obrębie ponad 14 tys. genów [23], natomiast najnowsze mikromacierze Infinium HumanMethylation450 BeadChip umożliwiają ocenę ponad 485 tys. miejsc metylacji na próbkę przy rozdzielczości na poziomie pojedynczych nukleotydów (tab. 1).

Badana próbka DNA traktowana jest bisulfitem, który powoduje konwersję niezmetylowanych cząsteczek cytozyny do uracylu. Następnie DNA podlega standardowej amplifikacji, w wyniku której w miejscach niezmetylowanych uracyl zostaje zamieniony na tyminę. Kolejnym krokiem jest trawienie próbki za pomocą enzymów restrykcyjnych oraz denaturacja w celu uzyskania pojedynczych nici. Na stosowanej mikromacieczy są zlokalizowane sondy, w których sekwencje komplementarne do analizowanych *loci* (zmetylowanych lub nie) umieszczone są na końcu cząsteczki. Jeśli badane DNA ulegnie pełnej hybrydyzacji z sondą, nastąpi jej wydłużanie (*annealing*), natomiast jeśli hybrydyzacja nie będzie kompletna przez niezgodność ostatnich nukleotydów — wydłużanie się nie rozpocznie. W skład roztworu reakcyjnego wchodzi znakowane dideoksynuklotydy, które po przyłączeniu blokują dalsze wydłużanie. Analiza wzajemnego stosunku ich fluorescencji pozwala określić, czy w danym *loci* nastąpiła metylacja, a także czy dotyczy ona jednego, czy też obu alleli [23].

W badaniach porównawczych gruczolakoraka przełyku oraz tak zwanego przełyku Barretta, prowadzonych z wykorzystaniem wolnego DNA wyizolowanego z płynu międzykomórkowego wykazano, że na podstawie wzorów metylacji możliwe jest odróżnienie tych schorzeń zarówno od siebie, jak i od zdrowej tkanki [24]. W DNA raka przełyku odnotowano 911 *loci* z różnicami w metylacji w stosunku do zdrowej tkanki, w DNA komórek przełyku Barretta — 46 *loci*, natomiast różnice pomiędzy gruczolakorakiem i przełykiem Barretta wykazano w obrębie 554 *loci* [24].

W analizie materiału genetycznego nowotworów jelita grubego: raka ($n = 124$) i gruczolaka ($n = 39$) ujawniono, że już na wczesnym etapie schorzenia, w ponad 80% przypadków pojawiają się metylacje w obrębie sekwencji promotorowych genów *FBN2* i *TCERGIL* powodujące ich wyciszenie. Zjawiska tego nie zaobserwowano w zdrowych komórkach jelita. W związku z tym wymienione przypadki metylacji mogą z powodzeniem służyć jako biomarkery [25].

Analiza ekspresji genów

Ważnym aspektem badań w dziedzinie onkologii jest analiza poziomu ekspresji konkretnych genów oraz ewentualnych zmian jej natężenia w związku z transfor-

macją i progresją nowotworu. Rozwój zaawansowanych technik analitycznych może pozwolić na wyodrębnienie genów markerowych, których ekspresja ulega widocznym zmianom w toku rozwoju konkretnej odmiany nowotworu. W takim przypadku analizie Array-CGH mogą zostać poddane próbki cDNA lub cRNA wywodzące się z komórek badanych i kontrolnych.

Jako pierwotna matryca do stworzenia tego rodzaju cząsteczek może posłużyć wyizolowany z komórki całkowity RNA lub też oczyszczony mRNA. W obu przypadkach na uzyskanej syntetycznej cząsteczce reprezentowane są jedynie geny ulegające transkrypcji w danej komórce. Porównanie hybrydyzacji badanych próbek z przygotowanymi sondami pozwala na zobrazowanie różnic w ekspresji konkretnych genów [26, 27], a co za tym idzie, stworzenie sygnatur prognostycznych i ich zastosowania do onkologicznej diagnostyki molekularnej.

Badanie z wykorzystaniem mikromacieczy przeprowadzone na 98 przypadkach raka piersi (dziedzicznych i sporadycznych) pozwoliło na wyodrębnienie około 5000 genów, których ekspresja ulega wyraźnym wahaniom [28]. Do analiz wykorzystano próbki cRNA, natomiast materiał referencyjny uzyskano poprzez wymieszanie w równych proporcjach cRNA wszystkich przypadków sporadycznych. Automatyczne uszeregowanie analizowanych nowotworów pod względem genetycznego podobieństwa (dendrogram) uwidocznilo istnienie dwóch głównych grup o potencjalnym znaczeniu prognostycznym. W grupie I ($n = 62$) spośród wszystkich przypadków nowotworów sporadycznych przerzuty w ciągu 5 lat od postawienia diagnozy rozwinęły się u 34% chorych, podczas gdy w grupie II ($n = 36$) współczynnik ten wyniósł aż 70% chorych. Badanie immunohistochemiczne receptora dla estrogenów ($ER\alpha$) wykazało jego nieobecność w 39 przypadkach, z czego 34 umieszczone zostały wcześniej w grupie II. Dokładniejsza analiza danych uzyskanych z mikromacieczy wykazała, że w grupie II deregulacji ulegają dwa główne zespoły genów — pierwszy, o znacząco obniżonej ekspresji, obejmujący gen receptora ER (*ESR1*) i geny ulegające wspólnej z nim regulacji, oraz drugi, wykazujący nadekspresję i obejmujący głównie geny ulegające ekspresji w limfocytach T i B. Należy również zauważyć, że w grupie II znalazło się 16 z 18 przypadków nowotworów dziedzicznych związanych z wrodzoną mutacją genu *BRCA1* [28].

Dla raka piersi opracowano sygnaturę prognostyczną pozwalającą określić ewentualną zdolność nowotworu do tworzenia przerzutów odległych [28] oraz sygnaturę predykcyjną pozwalającą na indywidualizację terapii (MammaPrint Symphony, Agendia) (tab. 1). Wynik analizy ekspresji genów wykonanej testem diagnostycznym bazującym na technologii mikromaciezowej pozwala na przyporządkowanie chorego do jednej z grup rokowniczych (MammaPrint) oraz na podjęcie decyzji dotyczącej wdrożenia radykalnej terapii adjuwantowej

[29] (MammaPrint, TargetPrint, BluePrint) i personalizację leczenia (TheraPrint).

W innym eksperymencie, przy wykorzystaniu mikromacierzy do analiz ekspresji genów (Applied Biosystems Gene Expression Array System) przebadano 23 przypadki kostniakomięsaka [30]. Dwanaście próbek pobrano z guzów pierwotnych, natomiast kolejnych 11 — z ognisk przerzutowych. Wyniki badania wykazały, że w komórkach przerzutów wyraźnie podwyższona jest ekspresja genów cytokin i chemokin. Ponadto zauważono, że w komórkach guzów pierwotnych, które wytworzyły lub też miały w przyszłości wytworzyć przerzuty, istnieje podwyższona ekspresja genu receptora chemokiny 4 (*CXCR4*), nieobsługiwana w guzach bez przerzutów [30].

W celu badania ekspresji genów możliwe jest również wykorzystanie sekwencjonowania nowej generacji (RNA-seq) opartego na opisywanej wcześniej technice SBS (Illumina). Badania porównawcze komórek macierzystych raka wątrobowokomórkowego ze standardowymi, nienowotworowymi komórkami macierzystymi wykazały podwyższoną ekspresję 119 oraz obniżenie ekspresji 381 genów [31]. Pierwotny eksperyment przeprowadzony został na próbkach pobranych od trzech chorych. Wyniki potwierdzono przy wykorzystaniu techniki qRT-PCR, a także poprzez analogiczne badanie kolejnej grupy chorych (12 osób). Geny wykazujące zmiany ekspresji w nowotworowych komórkach macierzystych związane były między innymi ze stanem zapalnym, lekoopornością oraz metabolizmem lipidów. Jako potencjalny marker obecności komórek macierzystych raka (a także obiekt terapii celowanej) może posłużyć gen *GPC3*, który według uzyskanych wyników ulega w nich bardzo wyraźnej ekspresji, pozostaje natomiast nieaktywny w prawidłowych komórkach wątroby [31].

Innym przykładem jest badanie porównawcze cDNA z komórek nabłonka oskrzeli, przeprowadzone w celu zbadania wpływu dymu tytoniowego na ekspresję genów [32]. Porównywane grupy stanowiły osoby niepalące i palący ochotnicy oraz palacze zdrowi i cierpiący na raka płuca, poddani chirurgicznemu usunięciu guzka płuca. Analizy RNA-Seq z wykorzystaniem bibliotek genomowych przygotowanych według dwóch różnych protokołów wykazały między innymi, że w komórkach nabłonka oskrzela u palaczy zmianom ulegała ekspresja genów związanych z przemianami ksenobiotyków (przy udziale cytochromu P450), metabolizmem retinolu oraz aktywnością enzymów z grupy oksydoreduktaz. Ponadto w komórkach chorych z rakiem płuca w porównaniu z pozostałymi grupami deregulacji ulegały geny związane ze szlakami sygnałowymi cytokin i chemokin oraz z białkami adhezyjnymi błon komórkowych. Uzyskane wyniki potwierdzono za pomocą mikromacierzy oraz techniki qRT-PCR [32].

Jako przykład nowego podejścia w dziedzinie genetyki nowotworów może posłużyć analiza aktywności cząsteczek miRNA, które w świetle ostatnich badań

stanowią szczególnie istotny element sieci wewnątrzkomórkowych oddziaływań. Szacuje się, że poprzez mechanizm interferencji RNA modulowana być może aktywność nawet 60% genów w ludzkim organizmie [33].

Obniżenie ekspresji cząsteczki miR-342 wykazuje udowodnioną korelację z opornością odmian ER+ raka piersi na tamoksyfen [34]. Badania porównawcze ekspresji wykazały deregulację aktywności aż 160 genów w odpowiedzi na zmiany stężenia tej cząsteczki. Analiza uzyskanych danych przy wykorzystaniu narzędzi bioinformatycznych potwierdziła zaburzenie przebiegu co najmniej kilku szlaków metabolicznych związanych między innymi z kontrolą cyklu komórkowego i naprawą DNA [34].

Jako marker prognostyczny raka prostaty może natomiast posłużyć cząsteczka miR-30d. Według danych uzyskanych przy pomocy mikromacierzy i techniki qPCR, jej ekspresja w komórkach trzech linii raka prostaty była znacznie wyższa niż w próbce kontrolnej (2 linie prawidłowych komórek prostaty). Wynik ten potwierdzono poprzez analizę próbek tkanek nowotworowych. W badaniach *in vitro* wykazano ponadto, że komórki raka prostaty o wysokiej ekspresji miR-30d charakteryzują się przyspieszoną proliferacją i zwiększonym potencjałem inwazyjnym [35].

Zmiany w ekspresji miRNA potwierdzono także w wielu innych badaniach dotyczących różnych klas nowotworów [36–38]. W związku z tak szerokim spektrum oddziaływań tej klasy cząsteczek, poszerzanie stanu wiedzy na ich temat wydaje się być jednym z nadrzędnych celów współczesnej onkogenetyki.

Podsumowanie

Wysokowydajne techniki analityczne oparte na wykorzystaniu mikromacierzy, spektrometrii mas i sekwencjonowania nowej generacji mogą stanowić skuteczną alternatywę dla tradycyjnych, szerzej rozpowszechnionych metod, takich jak standardowe kariotypowanie, technika FISH, *real-time* PCR czy sekwencjonowanie metodą Sangera. Do najważniejszych korzyści płynących z ich zastosowania należy zaliczyć: możliwość wykrywania nowych typów zmian genetycznych i czynników epigenetycznych wpływających na ekspresję genów, dużą dokładność, spadek kosztów wraz ze wzrostem liczebności grupy badanej oraz oszczędność czasu i niewielkie prawdopodobieństwo popełnienia błędu przez człowieka w związku z częstą automatyzacją poszczególnych procesów. Ponadto dodatkową zaletą jest możliwość dostosowania użytkowanej techniki do wymagań osoby prowadzącej badanie — zawężenie testu do danej klasy nowotworów lub personalizacja względem konkretnego chorego.

Na przestrzeni ostatnich lat obserwuje się niezwykle szybki rozwój technologii związanych z analizą materiału genetycznego, a także wyraźną tendencją do spadku cen

i stopniowego upowszechniania zaawansowanych rozwiązań w ośrodkach diagnostycznych oraz badawczych. Techniki do niedawna dostępne jedynie w wiodących światowych laboratoriach obecnie pojawiają się w zasięgu mniejszych placówek lub zakładów szpitalnych. Jako przykład mogą posłużyć sekwenatory 454 GS Junior (Roche) oraz MiSeq (Illumina), będące w istocie zminiaturyzowanymi wersjami systemów o większej przepustowości (odpowiednio: 454 GS FLX i systemy z grupy HiSeq), zaprojektowanymi z myślą o ograniczeniu kosztów [39].

Należy przewidywać, że nieustanny postęp technologiczny doprowadzi w niedalekiej przyszłości do stworzenia kolejnej generacji metod analizy molekularnej, charakteryzujących się jeszcze wyższym stopniem wydajności i dokładności lub też skupiających się na zupełnie nowych, niedostępnych dotąd aspektach genetyki nowotworów.

Podziękowania

Praca powstała przy realizacji grantu Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, Homing Plus 2010-2/7 realizowanego w Centrum Onkologii im. Prof. F. Łukaszczyka w Bydgoszczy, współfinansowanego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (POIG) 2007–2013.

Piśmiennictwo

- Simons A., Sikkema-Raddatz B., de Leeuw N., Konrad N.C., Hastings R.J., Schoumans J. Genome-wide arrays in routine diagnostics of hematological malignancies. *Hum. Mutat.* 2012; 33: 941–948. doi:10.1002/humu.22057.
- Lewandowski R., Roszkowski K., Lewandowska M.A. Personalized medicine in oncology: vision or realistic concept? *Contemporary Oncology* 2011; 15: 1–6.
- Thomas R.K., Baker A.C., Debiasi R.M. i wsp. High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer. *Nat. Genet.* 2007; 39: 347–351. doi:10.1038/ng1975 [pii] 10.1038/ng1975.
- Solit D.B., Garraway L.A., Pratilas C.A. i wsp. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* 2006; 439: 358–362. doi:10.1038/nature04304.
- Flaherty K.T., Puzanov I., Kim K.B. i wsp. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363: 809–819. doi:10.1056/NEJMoa1002011.
- Shi Z.Z., Zhang Y.M., Shang L. i wsp. Genomic profiling of rectal adenoma and carcinoma by array-based comparative genomic hybridization. *BMC Med. Genomics* 2012; 5: 52. doi:10.1186/1755-8794-5-52.
- Bejjani B.A., Shaffer L.G. Application of array-based comparative genomic hybridization to clinical diagnostics. *JMD* 2006; 8: 528–533. doi:10.2353/jmoldx.2006.060029.
- Petrini I., Meltzer P.S., Zucali P.A. i wsp. Copy number aberrations of BCL2 and CDKN2A/B identified by array-CGH in thymic epithelial tumors. *Cell Death Dis.* 2012; 3: e351. doi:10.1038/cddis.2012.92.
- LaFramboise T. Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Research* 2009; 37: 4181–4193. doi:10.1093/nar/gkp552.
- Zhou S.F. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I. *Clin. Pharmacokinet.* 2009; 48: 689–723. doi:10.2165/11318030-000000000-00000.
- Kiyotani K., Mushiroda T., Nakamura Y., Zembutsu H. Pharmacogenomics of tamoxifen: roles of drug metabolizing enzymes and transporters. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2012; 27: 122–131.
- Rebsamen M.C., Desmeules J., Daali Y. i wsp. The AmpliChip CYP450 test: cytochrome P450 2D6 genotype assessment and phenotype prediction. *Pharmacogenomics J.* 2009; 9: 34–41. doi:10.1038/tpj.2008.7.
- O'Shea D., O'Riain C., Gupta M. i wsp. Regions of acquired uniparental disomy at diagnosis of follicular lymphoma are associated with both overall survival and risk of transformation. *Blood* 2009; 113: 2298–2301. doi:10.1182/blood-2008-08-174953.
- Larkin J.E., Frank B.C., Gavras H., Sultana R., Quackenbush J. Independence and reproducibility across microarray platforms. *Nature Methods* 2005; 2: 337–344. doi:10.1038/nmeth757.
- Russo G., Zegar C., Giordano A. Advantages and limitations of microarray technology in human cancer. *Oncogene* 2003; 22: 6497–6507. doi:10.1038/sj.onc.1206865.
- Gabriel S., Ziaugra L., Tabbaa D. SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 2009; 2: 12. doi:10.1002/0471142905.hg0212s60.
- Yang F., Shi J.Y., Xu L. i wsp. [Genetic susceptibility of single nucleotide polymorphism in MGMT to non-Hodgkin lymphoma]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2009; 30: 622–625.
- Inc S MassARRAY iPLEX Gold — SNP Genotyping; <http://www.sequenom.com/Sites/Genetic-Analysis/Applications/Somatic-Mutation-Profiles>.
- Dymerska D., Serrano-Fernandez P., Suchy J. i wsp. Combined iPLEX and TaqMan assays to screen for 45 common mutations in Lynch syndrome and FAP patients. *JMD* 2010; 12: 82–90. doi:10.2353/jmoldx.2010.090063.
- Illumina. TruSeq Amplicon — Cancer Panel, Data sheet: Sequencing, Illumina 2012.
- Castro M., Grau L., Puerta P. i wsp. Multiplexed methylation profiles of tumor suppressor genes and clinical outcome in lung cancer. *J. Transl. Med.* 2010; 8: 86. doi:10.1186/1479-5876-8-86.
- Antequera F. Structure, function and evolution of CpG island promoters. *CMLS* 2003; 60: 1647–1658. doi:10.1007/s00018-003-3088-6.
- Weisenberger D.J. VdBD, Pan F., Berman B.P., Laird P.W. *Comprehensive DNA Methylation Analysis on the Illumina Infinium Assay Platform*. Illumina Epigenetic Analysis 2008.
- Zhai R., Zhao Y., Su L., Cassidy L., Liu G., Christiani D.C. Genome-wide DNA methylation profiling of cell-free serum DNA in esophageal adenocarcinoma and Barrett esophagus. *Neoplasia* 2012; 14: 29–33.
- Yi J.M., Dhir M., Guzzetta A.A. i wsp. DNA methylation biomarker candidates for early detection of colon cancer. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2012; 33: 363–372. doi:10.1007/s13277-011-0302-2.
- Chen Q.R., Bilke S., Khan J. High-resolution cDNA microarray-based comparative genomic hybridization analysis in neuroblastoma. *Cancer Letters* 2005; 228: 71–81. doi:10.1016/j.canlet.2004.12.056.
- Biosystem A Gene expression Array System; http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_040420.pdf.
- van 't Veer L.J., Dai H., van de Vijver M.J. i wsp. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415: 530–536. doi:10.1038/415530a415530a [pii].
- Mook S., Van't Veer L.J., Rutgers E.J., Piccart-Gebhart M.J., Cardoso F. Individualization of therapy using Mammprint: from development to the MINDACT Trial. *Cancer Genomics Proteomics* 2007; 4: 147–155.
- Namlos H.M., Kresse S.H., Muller C.R. i wsp. Global gene expression profiling of human osteosarcomas reveals metastasis-associated chemokine pattern. *Sarcoma* 2012; 2012: 639038. doi:10.1155/2012/639038.
- Ho D.W., Yang Z.F., Yi K. i wsp. Gene expression profiling of liver cancer stem cells by RNA-sequencing. *PLoS One* 2012; 7: e37159. doi:10.1371/journal.pone.0037159.
- Beane J., Vick J., Schembri F. i wsp. Characterizing the impact of smoking and lung cancer on the airway transcriptome using RNA-Seq. *Cancer Prev. Res. (Phila.)* 2011; 4: 803–817. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0212.
- Friedman R.C., Farh K.K., Burge C.B., Bartel D.P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research* 2009; 19: 92–105. doi:10.1101/gr.082701.108.
- Cittelly D.M., Das P.M., Spoelstra N.S. i wsp. Downregulation of miR-342 is associated with tamoxifen resistant breast tumors. *Molecular Cancer* 2010; 9: 317. doi:10.1186/1476-4598-9-317.
- Kobayashi N., Uemura H., Nagahama K. i wsp. Identification of miR-30d as a novel prognostic maker of prostate cancer. *Oncotarget* 2012; 3: 1455–1471.
- Gee G.V., Koestler D.C., Christensen B.C. i wsp. Downregulated microRNAs in the differential diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *International journal of cancer Journal International du Cancer* 2010; 127: 2859–2869. doi:10.1002/ijc.25285.
- Novello C., Pazzaglia L., Cingolani C. i wsp. miRNA expression profile in human osteosarcoma: Role of miR-1 and miR-133b in proliferation and cell cycle control. *International Journal of Oncology* 2013; 42: 667–675. doi:10.3892/ijo.2012.1717.
- Zhuo L., Liu J., Wang B., Gao M., Huang A. Differential miRNA expression profiles in hepatocellular carcinoma cells and drug-resistant sublines. *Oncology Reports* 2013; 29: 555–562. doi:10.3892/or.2012.2155.
- Loman N.J., Misra R.V., Dallman T.J. i wsp. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat. Biotechnol.* 2012; 30: 434–439. doi:10.1038/nbt.2198.
- Brinkman A.B., Simmer F., Ma K., Kaa A., Zhu J., Stunnenberg H.G. Whole-genome DNA methylation profiling using MethylCap-seq. *Methods* 2010; 52: 232–236. doi:10.1016/j.ymeth.2010.06.012.
- Zhang H., Shan L., Wang X., Ma Q., Fang J. A novel bisulfite-microfluidic temperature gradient capillary electrophoresis platform for highly sensitive detection of gene promoter methylation. *Biosens Bioelectron* 2012; 42C: 503–511. doi:10.1016/j.bios.2012.10.013.