

PROCEDEE DE MONITORIZARE *IN SITU* A METILĂRII GENELOR ÎN PREDICȚIA CANCERULUI (REVISTA LITERATURII)

<https://doi.org/10.52673/18570461.21.2-61.07>

CZU:575.1.085:616-006.6

Doctor în științe biologice **Victor POPESCU**

E-mail: victor.popescu@usmf.md

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9881-4245>

Doctorand **Mariana JIAN**

E-mail: mariana.jian@usmf.md

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9352-5866>

Doctorand **Tatiana MALCOVA**

E-mail: tatiana.malcova@usmf.md

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2470-5211>

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

PROCEDURES FOR *IN SITU* MONITORING OF GENE METHYLATION IN CANCER PREDICTION (Literature Review)

Summary. The purpose of this article is to synthesize data from the specialty literature on the best performing procedures for the *in situ* detection and monitoring of the phenomenon of gene methylation, to analyze the protocol for the realization of the *whole mount MeFISH* technology and to review the human genes that are characterized by methylation in cancer.

Keywords: *whole mount MeFISH*, DNA methylation *in vivo*, DNA methylation *in vitro*, prediction in cancer prognosis.

Rezumat. Scopul acestui articol constă în sinteza datelor din literatura de specialitate privind cele mai performante procedee de detecție și monitorizare *in situ* a fenomenului metilării genelor, analiza protocolului de realizare a tehnologiei *whole mount MeFISH* și trecerea în revistă a genelor umane care se caracterizează prin metilare în cancer.

Cuvinte-cheie: *whole mount MeFISH*, metilarea ADN *in vivo*, metilarea ADN *in vitro*, predicția în prognosticul cancerului.

INTRODUCERE

Pentru prognozarea riscului de dezvoltare a bolilor cronice, în general, și a cancerului, în special, este nevoie de a lua în considerare toți factorii care cauzează patologia respectivă, precum și de a identifica momentul în care aceștia încep să acționeze nefavorabil.

Se cunoaște că atât în cazul cancerului, cât și al majorității altor boli cronice, la baza declanșării maladiilor stau în primul rând factorii genetici și cei de mediu. Factorii de mediu și influența acestora asupra proceselor metabolice sunt studiați de către specialiști din diverse domenii, mai puțin de către geneticieni. În ultimii zece ani, în medicină devine tot mai evident că rolul factorilor de mediu în menținerea sănătății umane urmează să fie analizat în concordanță atât cu parametrii proceselor metabolice pe care le declanșează sau le influențează, cât și cu factorii genetici care dirijează informațional decurgerea acestora [1; 2; 3; 4; 5].

În ceea ce privește factorii genetici, aceștia au un șir de particularități: 1) sunt prezenți în celule din pri-

ma zi de existență a embrionului; 2) sunt, de regulă, nemodificabili pe parcursul vieții; 3) sunt interdependenți, funcționând ca genom integru. Deși, după cum am menționat, factorii genetici sunt nemodificabili pe parcursul vieții organismului, aceasta se referă doar la structura genelor și a ADN-ului (acid dezoxiribonucleic) neinformațional. Totodată, este important de luat în calcul și interacțiunea ADN-ului cu toate moleculele reglatoare ale funcțiilor genelor [1; 5; 6].

Dintre toate fenomenele epigenetice, cel mai bine studiat este fenomenul metilării ADN. În urma metilării, inclusiv sub acțiunea unor factori fizici sau chimici asupra organismului uman, la moleculele de ADN din anumite celule se leagă grupări chimice metil (în special, la nivelul citozinei din cadrul secvențelor CpG) care le modifică nu doar chimic, ci și funcțional-genetic, iar, odată cu aceasta, schimbă funcționalitatea unei sau mai multor celule sau, chiar, a organelor [2; 3; 4; 5]. Există date care atestă activarea și inactivarea anumitor gene, în cazul metilării sau demetilării secvențelor ADN, la nivelul promotorilor

genici [5; 6]. Acest lucru este primordial atunci când ne propunem să prognozăm dezvoltarea unei boli care are substrat genetic, de exemplu cancerul.

Epigenetica (în particular, fenomenul metilării ADN) explică inactivarea, într-un moment anumit, a unei gene, care este necesară pentru decurgerea normală a unei funcții celulare sau a unui organ uman. În acest caz, chiar dacă gena are secvența intactă, odată ce ea se inactivează organismul pierde o funcție. Așa se explică faptul că structura genelor și starea lor funcțională sunt două părți indispensabile ale unei și aceleiași analize a geneticianului care se ocupă de prognozarea riscului de dezvoltare a bolilor condiționate genetic. Totodată, statusul metilării ADN este unul dintre markerii care fac parte, de regulă, din categoria factorilor modificabili (în mod reversibil) pe parcursul vieții, dar acești markeri se moștenesc împreună cu ADN-ul de-a lungul generațiilor. Prin urmare, trebuie să avem în vedere faptul că, datorită metilării reversibile a ADN-ului, unele gene pot fi considerate în categoria factorilor modificabili pe parcursul vieții, expresia fiecăreia dintre aceste gene fiind dependentă de anumiți factori de mediu [1; 5; 6].

Descifrarea posibilităților de modulare, inclusiv dezvoltarea procedeele de detecție și monitorizare a metilării ADN la nivel de o celulă ar aduce soluții intervenționale terapeutice la o etapă timpurie în patogeniza bolii și ar permite prevenirea multor afecțiuni sau complicațiilor acestora, pe baza statusului epigenetic al celulelor subiecților investigați.

SCURT ISTORIC

În anul 2007, grupul de cercetători condus de K. Tanaka [7] a elaborat o metodă de laborator capabilă să deceleze secvențele specifice de ADN care conțin citozină metilată. Această metodă constă în formarea complexelor între sonda moleculară și catena ADN-ului studiat, prin intermediul atomilor de osmiu. Sondele date au primit denumirea de ICON (*interstrand complexes formed by osmium and nucleic acids*). Tot în baza utilizării sondelor moleculare ICON, în anul 2007 grupul de cercetători condus de Y. Li a publicat [8] o metodă, numită MeFISH (*methylation-specific fluorescence in situ hybridization*), pentru detecția metilării secvențelor specifice de ADN în celule individuale. Cu ajutorul acestei metode, cercetătorii au reușit să vizualizeze profilul metilării ADN în preparate histologice, la nivelul cromozomilor și al secvențelor de ADN satelit.

Din cauza că soluțiile hipotonice și fixarea în metanol/acid acetic provoacă degradarea structurilor nucleare ale celulelor de investigat, în anul 2014 H. Shiura și coautorii [9] au modificat protocolul MeFISH și au elaborat procedeul *whole mount MeFISH* care oferă

posibilitatea de a monitoriza prezența grupărilor chimice metil la nivelul ADN-ului celulelor individuale integre. Dat fiind faptul că sondele ICON se leagă specific de secvențele ADN, care conțin 5 mC sau 5 hmC, ele pot fi utilizate și în reacțiile de amplificare PCR (*polymerase chain reaction*) cantitative, pentru studierea insulițelor dinucleotidice CpG (citozină – rest acid ortofosforic – guanină) în cadrul unei și aceleiași catene a moleculei de ADN.

EXEMPLU AL UNUI PROTOCOL DE OPERARE MeFISH (CU SUGESTII INTERVENȚIONALE INEDITE)

În calitate de exemplu al unui protocol de operare MeFISH putem face referire la cel realizat de către grupul de cercetători condus de H. Shiura [9]. Totuși, în opinia noastră, la unele etape (*notificate*) de procesare fizico-chimică a biomoleculelor sau țesuturilor biologice ar fi binevenită aplicarea unor proceduri de control al calității, post-tratare, care ne-ar asigura de stabilitatea complexelor moleculare rezultate și specificitatea maximum posibilă a hibridizărilor moleculare, de care depinde, direct, tabloul vizualizat/înregistrat la microscop și, în final, valabilitatea rezultatelor investigației.

Conform autorilor [9], pentru a realiza tehnica *whole mount MeFISH* este necesară, mai întâi, alegerea sondelor moleculare de hibridizare cu secvența corespunzătoare *situs*-ului de investigat în speciemenle ADN-ului, dar care conțin câte un derivat bipiridinic al adeninei, încorporat. Sonda moleculară ICON conține un derivat al adeninei de care este legat un complex bipiridinic, sonda având afinitate mult mai înaltă cu 5-metilcitozina (5 mC) și 5-hidroximetilcitozina (5 hmC) în comparație cu citozina nemetilată/nehidroxilată. Sondele sunt marcate cu biotină (moleculă care are afinitate cu avidina sau streptavidina, formând complexe moleculare foarte stabile), utilizându-se reagentul biotinamidohexanoil-6-acid aminohexanoic N-hidroxisuccinimidă. Înainte de a fi supuse reacției de hibridizare, moleculele ADN de investigat sunt tratate cu osmiu [7; 9; 10]¹.

Dat fiind faptul că profilurile metilării moleculelor de ADN sunt specifice pentru diferite țesuturi ale organismului, dar și-s variabile în timp, pentru studiere se aleg țesuturile biologice care corespund acestor două criterii.

¹ Sugerăm necesitatea verificării încorporării suficiente a atomilor de osmiu (control pozitiv-cantitativ) în moleculele ADN de investigat, deoarece de acest parametru depinde, direct, stabilitatea ulterioară a complexelor moleculare rezultate.

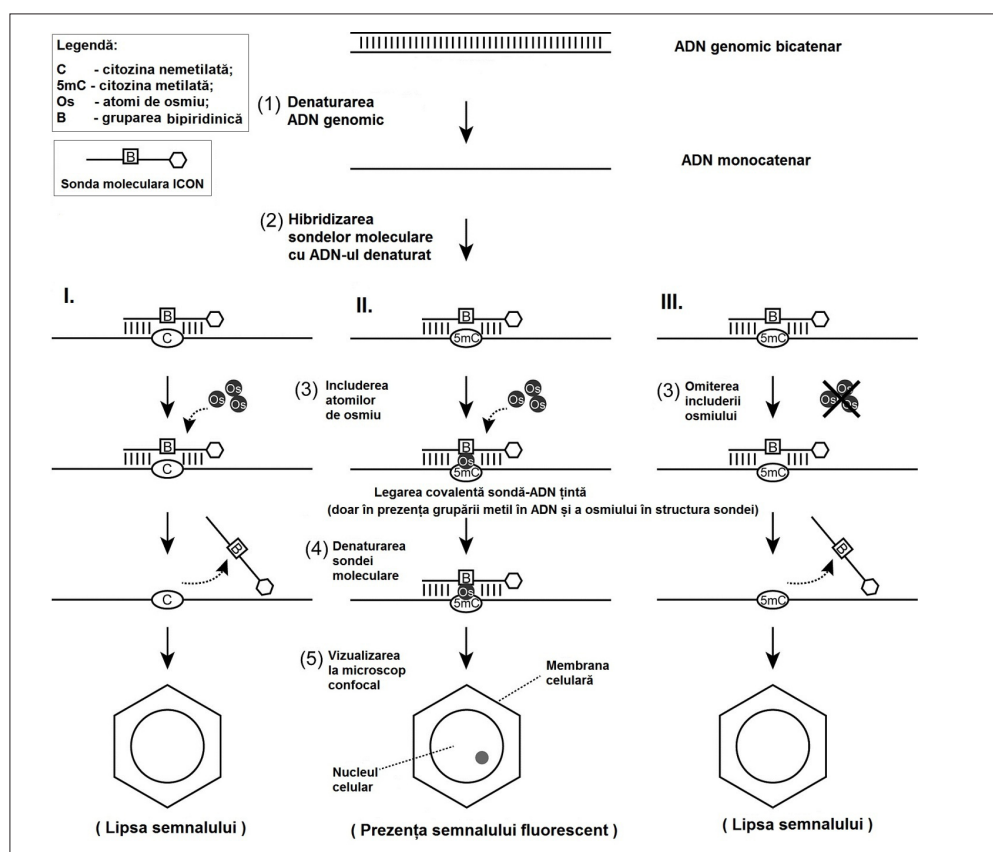


Figura 1. Etapele de procesare a celulelor somatice umane pentru vizualizarea *in situ* (coloana II) a metilării specifice a genelor, cu ajutorul microscopului (adaptată după Shiura H. et al., 2014 [9]).

Conform metodei elaborate de H. Shiura și coautori [9], la început se realizează permeabilizarea celulelor de investigat, pentru a asigura accesul sondelor moleculare ICON către nucleele acestor celule. Condițiile pentru permeabilizare se stabilesc empiric. Drept exemplu de agent pentru permeabilizare poate servi soluția de 0,5 % Triton X-100 în PBS (*phosphate buffered saline*), în care celulele se incubază timp de 2-15 min pe gheață. După permeabilizare celulele sunt supuse fixării în soluție de 4 % paraformaldehidă în PBS, ce conține 0,1 % Triton X-100 (PBST), timp de 10 min, la temperatura de 25 °C. Ulterior, celulele se spală de trei ori în PBST, 5 min, la temperatura camerei. Pentru anumite țesuturi, se cere o permeabilizare suplimentară, cu soluție de 10 mg/ml Proteinază K în PBST, 5 min, la 37 °C, după care celulele sunt supuse fixării suplimentare cu soluție de 4 % paraformaldehidă în PBST, 15 min.

Celulele se incubază în soluție 2×SSC (*saline-sodium citrate*) cu adaos de 0,1 % Triton X-100, 10 min, 2×SSC și soluție 25 % formamidă cu adaos de 0,1 % Triton X-100, 10 min, 2×SSC și soluție 50 % formamidă, cu adaos de 0,1 % Triton X-100, 10 min, în două reprize.

La etapa următoare, celulele sunt supuse prehibridizării în soluție pentru hibridizare (2×SSC, 2 mg/ml BSA (*bovine serum albumine*), 0,1 % Triton X-100,

50 % formamidă), 20 min, apoi celulele sunt plasate într-o eprubetă din plastic, de 1,5 ml, care conține 30 μl soluție tampon pentru hibridizare și molecule ale sondei moleculare de hibridizare ICON (0,1 ng/μl). După denaturarea ADN-ului genomic la 98 °C, timp de 5 min, se efectuează hibridizarea moleculară, peste noapte, la temperatura camerei, la temperatura de 25 °C, după care celulele se spală de trei ori în soluție 2×SSC cu adaos de 0,1 % Triton X-100, la temperatura de 25 °C, 5 min, pentru a îndepărta sondele moleculare nehibridizate². Pentru a asigura legături chimice covalente între moleculele sondelor moleculare și *situs*-urile ADN-ului metilate, celulele se incubază în 100 μl soluție pentru legarea covalentă (eng. *cross-linking*), care conține 25 mM K₂OsO₄×2H₂O și soluție Tris-HCl (100 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA, 2 M NaCl, 0,1 % Triton X-100). Sondele moleculare care nu au participat în legarea covalentă se îndepărtează, prin denaturare, la 80 °C, 15 min, în soluție ce conține 90 % formamidă, 2×SSC, 0,1 % Triton X-100, urmată de spălare în PBST. Sondele moleculare, în

² Sugerăm verificarea hibridizării fidele (control pozitiv-cativ) a sondelor marcate cu moleculele ADN de investigat, de care depinde, direct, stabilitatea complexelor moleculare rezultate și valabilitatea rezultatelor investigației.

complex cu biotina, sunt detectate cu ajutorul setului de reagenți TSA (*Tyramide Signal Amplification*).

După incubarea celulelor în soluție de 3 % BSA în PBST, activitatea peroxidazei endogene se atenuază prin procesare cu soluție 0,6% peroxid de hidrogen, 10 min. După câteva spălări în PBST, celulele se procesează cu complexe streptavidină-HRP (*horse-redish peroxidase*) în soluție de 3 % BSA în PBST, 30 min. Apoi, celulele se spală de trei ori în PBST, timp de 5 min la 37 °C, urmând incubarea în soluție de 0,0015 % peroxid de hidrogen, în soluție de tiramidă, marcată cu fluorocromi (Alexa Fluor 488 sau Alexa Fluor 546).

Soluția de tiramidă, în această aplicație, reflectă lumina cu lungime de undă diferită în comparație cu cea utilizată în imunofluorescență sau ARN-FISH. În această aplicație, celulele se spală de câteva ori în PBST, iar ADN-ul nuclear se colorează cu agentul TO-PRO-3. Rezultatele se vizualizează cu ajutorul unui microscop confocal, cu fluorescență (figura 1).

CARTAREA MOLECULARĂ PENTRU CARACTERIZAREA PROFILURILOR METILĂRII ADN

Pentru a elucida gradul de diferențiere a celulelor în culturi *in vitro*, dar și pentru a preciza dacă o populație de celule, prelevate din organism sau men-

ținute în cultură *in vitro* sunt omogene din punct de vedere al diferențierii, a fost propusă și dezvoltată o metodologie bazată pe cartarea moleculară a ADN-ului extras și purificat din celulele selectate pentru a fi studiate. Pentru a realiza cartarea ADN metilat, după etapa de tratare a acidului dezoxiribonucleic cu bisulfit de sodiu, se aplică algoritmul „Bismark” (figura 2a) [11]. Etapele de lucru, pentru acest deziderat, sunt următoarele:

1. Cartarea pe baza repozitoriului „Bismark” și atribuirea datelor de referință perechilor nucleotidice distale din secvențele de ADN metilat;
2. Extragerea profilurilor specificate ale ADN metilat;
3. Delimitarea porțiunilor de ADN a câte patru secvențe dinucleotidice CpG;
4. Estimarea entropiei variațiilor profilurilor de ADN metilat, pentru fiecare porțiune selectată.

A doua parte a algoritmului reprezentat mai sus constă în delimitarea porțiunilor de ADN, a câte patru secvențe dinucleotidice CpG. Pe baza acestora se calculează entropia variațiilor profilurilor metilării ADN (figura 2b) [6].

X. Shao și coautorii [6] au reușit să aplice criteriul entropiei pentru a estima cantitativ, cu specificitate înaltă, pentru fiecare subset celular, heterogenitatea profilurilor metilării ADN (metilomuri) în populații

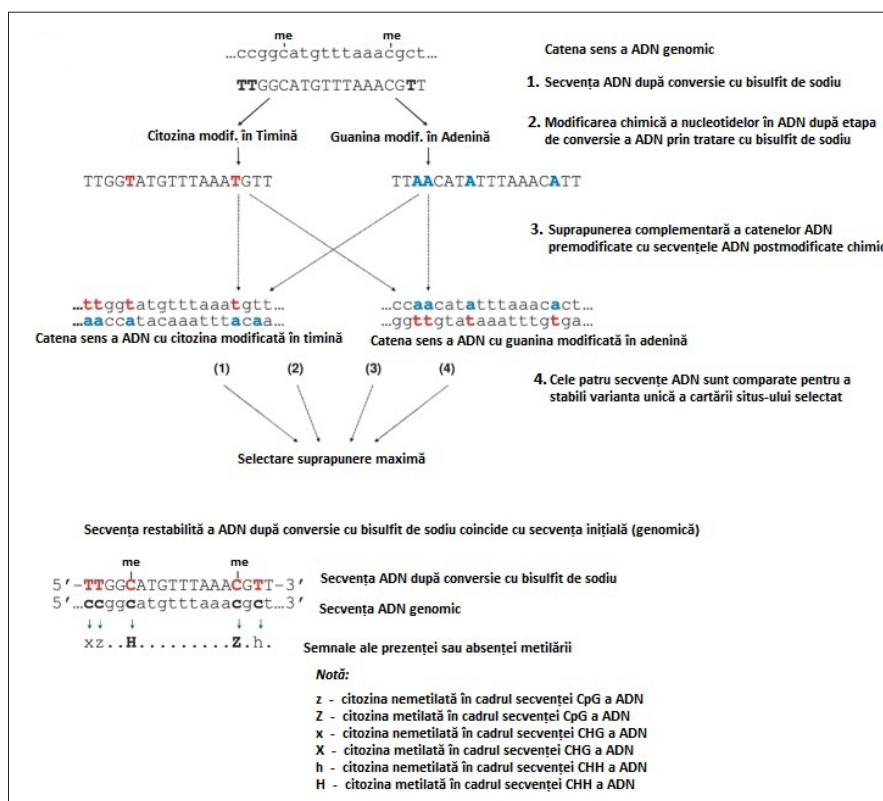


Figura 2a. Algoritmul „Bismark” pentru cartarea ADN metilat, la etapa de posttratare cu bisulfit de sodiu (adaptată după Krueger F. et al., 2011 [11]).

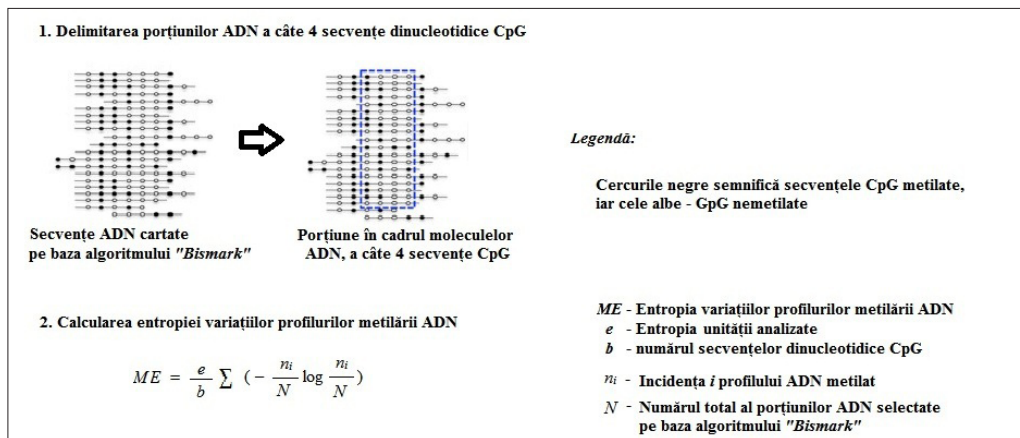


Figura 2b. Estimarea entropiei variațiilor profilurilor de ADN metilat (adaptată după Shao X. et al., 2014 [6]).

heterogene de celule (amestec), în diferite etape de cultivare *in vitro* a acestora, cum sunt: adipocitele diferențiate, celulele stem adult-derivate din adipocite (ADS – *adipose derived stem cells*), celulele stem induse-pluripotente umane derivate din ADS (iPSC – *human induced pluripotent stem cells*).

În urma acestor cercetări, autorii menționați au ajuns la concluzia că în regiunea promotorului genic nivelul variațiilor metilării este corelat negativ cu nivelul expresiei genice sau că variația nivelului metilării ADN descrește odată cu progresarea diferențierii celulare, dar crește în momentul reprogramării genomului celular. Totodată, la nivel genomic, heterogenitatea profilurilor metilării ADN descrește în momentul reprogramării celulare ADS → iPSC. Genele care se caracterizează doar prin două stări distincte ale metilării, cea de metilare profundă sau metilare absentă, sunt responsabile, de regulă, de metabolismul hidraților de carbon sau de creșterea celulară [6].

PROFILURILE METILĂRII ADN – BIOMARKERI AI STĂRILOR PRECANCEROASE

Tot mai mulți autori [2; 3; 4; 5] atribuie metilarea ADN la *biomarkerii* implementați, în special în domeniul oncologiei sau în dereglările metabolice, dat fiind faptul că profilul metilării ADN posedă capacități înalte atât la capitolul stabilirii diagnosticului (în depistarea precoce), cât și la cel al prognosticului sau riscului recurenței unor procese maligne, precum și al predicției sau stabilirii potențialului organismului pacientului de a răspunde la un tratament cu anumite preparate chimio-terapeutice prescrise individual, în doze precizate și adaptate la starea organismului pacientului (tabel).

Actualmente, sunt cunoscute gene care, pe baza fenomenului metilării acestora și valorii lor pentru diagnostic, au fost introduse în diverse protocoale clini-

Tabel

Exemple ale genelor umane care se caracterizează prin metilare în cancer

Aplicație	Maladia	Gena	Funcția genei la nivel celular
Diagnostic	Cancerul colono-rectal	VIM	Codifică Vimentina, proteina cu rol de suport al poziționării organelor celulare
		wSEPT9	Codifică Septina-9, proteina cu rol în formarea pseudopodelor celulare
	Cancerul la plămâni	SHOX2	Codifică Homeoboxa Og12X, proteina cu rol în reglarea transcripției genice
	Cancerul la prostată	GSTP1	Codifică Glutation S-transferaza-P, enzima cu rol în detoxifierea celulară
		APC	Codifică Adenomatous polyposis coli, proteina cu rol în adeziunea intercelulară
		RASSF1	Codifică Ras association domain-containing protein-1, proteina cu rol în reglarea ciclului celular și repararea ADN
		PTGS2	Codifică Prostaglandin-endoperoxid sintaza-2, enzima cu rol proinflamator
		MDR1	Codifică Multidrug resistance protein-1, proteina cu rol în transportul celular transmembranar al diverselor molecule

Prognostic	Cancerul la plămâni cu celule non-small	CDKN2A	Codifică Cyclin-dependent kinase inhibitor-2A, proteina cu rol în reglarea ciclului celular
		CDH13	Codifică Caderina-13, proteina cu rol în recepția și transmiterea din exteriorul celulei spre interior a semnalelor moleculare
		RASSF1	Codifică Ras association domain-containing protein-1, proteina cu rol în reglarea ciclului celular și repararea ADN
		APC	Codifică Adenomatous polyposis coli, proteina cu rol în adeziunea intercelulară
	Cancerul la glanda mamară	RASSF1	Codifică Ras association domain-containing protein-1, proteina cu rol în reglarea ciclului celular și repararea ADN
		APC	Codifică Adenomatous polyposis coli, proteina cu rol în adeziunea intercelulară
	Cancerul la vezica urinară	DAPK1	Codifică Death-associated protein kinase-1, enzima cu rol în medierea apoptozei
Predicție (monitorizare în dinamică)	Glioblastom	MGMT	Codifică O ⁶ -metilguanin-ADN-metiltransferaza, enzima cu rol antimutagen
	Limfom B cu celule mari, difuze	MGMT	Codifică O ⁶ -metilguanin-ADN-metiltransferaza, enzima cu rol antimutagen
	Sindrom mielodisplazic	ERα	Codifică Estrogen receptor alpha, proteina cu rol în reglarea transcripției genice
		CDH1	Codifică Caderina-1, proteina cu rol în recepția și transmiterea din exteriorul celulei spre interior a semnalelor moleculare
		NOR1	Codifică Neuron-derived orphan receptor-1, proteina cu rol în reglarea proliferării, diferențierii celulare și apoptozei
		NPM2	Codifică Nucleoplasmina-2, proteina-chaperone cu rol în reprogramarea celulară
		CDH13	Codifică Caderina-13, proteina cu rol în recepția și transmiterea din exteriorul celulei spre interior a semnalelor moleculare
		CDKN2A	Codifică Cyclin-dependent kinase inhibitor-2A, proteina cu rol în reglarea ciclului celular
		OLIG2	Codifică Oligodendrocyte transcription factor, proteina cu rol în reglarea transcripției genice
		PGRB	Codifică Progesterone nuclear receptor, izoforma B, proteina cu rol în inițierea transcripției genice
		PGRA	Codifică Progesterone nuclear receptor, izoforma A, responsabilă de neinițierea (prevenirea) transcripției genice
		RIL	Codifică Reversion-induced LIM protein, proteina cu rol în reglarea ciclului celular

ce, de exemplu, genele VIM și SEPT9 se investighează în situațiile de suspexie în cancerul colono-rectal, SHOX2 – în cancerul la plămâni, GSTP1 – în cancerul la prostată [12; 13; 14; 15; 16]. Pragul de hipermetilare a promotorului genei se consideră atins atunci când mai mult de 15 % de nucleotide din secvența poli-nucleotidică a acelui sector genic conține nucleotide metilate [6]. Dacă se ia în investigație doar metilarea promotorului genei GSTP1, diagnosticul cancerului la prostată se stabilește cu o probabilitate de peste 82 % și o specificitate de 95 %, care e determinată și de reușita alegerii secvenței sondei de hibridizare [17]. Pentru a obține acuratețea și specificitatea de 100 % în diagnosticul cancerului la prostată, se cere investigația metilării, în complex, a unui set din cinci gene,

care sunt adnotate: GSTP1, APC, RASSF1, PTGS2, MDR1 [17].

O altă utilitate a investigației metilării ADN este cea de stratificare a pacienților, conform potențialului tumorilor acestora de a răspunde la anumite preparate sau doze, în cadrul tratamentelor chimio-terapeutice. Astfel, rezultate bune ale predicției remisiei creșterii neoplazice au fost înregistrate la pacienții cu limfom B cu celule mari, difuze, pe baza profilurilor metilării promotorului genei MGMT [18], în cancerul colono-rectal – profilul genei RASGRF1 [19], în cancerul la glanda mamară – profiluri ale genelor BRCA1, DAPK1, RASSF1A [20], în cancerul la cervix – profiluri ale genelor RAD51L3, XRCC2 [21], în cancerul gastric – profilul genei EIF4E [22], în cancerul

la ficat – profilul genei NKAPL [23], în cancerul la plămâni – profiluri ale genelor RASSF1A, p16INK4a [24], în cancerul la ovar – profilul genei RASSF1A [25], în cancerul de pancreas – profilul genei TERT [26], în cancerul la prostată – profiluri ale genelor ST6GALNAC3, ZNF660 [27].

CONCLUZIE

Analiza și sinteza datelor din literatura de specialitate privind procedeele de monitorizare *in situ* a metilării genelor în predicția cancerului conduce la concluzia că metodele de referință pot fi perfecționate. Noi am adus câteva completări metodologice care, după părerea noastră, ar contribui la perfecționarea tehnologiei date și ar asigura o calitate mai bună a rezultatelor obținute.

BIBLIOGRAFIE

1. Thomas D. Gene-environment-wide association studies: emerging approaches. In: Nature Reviews Genetics. AOP, published online 9 March 2010, [https://org/doi:10.1038/nrg2764](https://org/doi/10.1038/nrg2764)
2. Cardona A., Day F., et al. Epigenome-wide association study of incident type 2 diabetes in a British population: EPIC-Norfolk study. În: Diabetes, 2019, 68:2315-2326.
3. Tao S., Zhou T., et al. Intrauterine growth restriction alters the genome-wide DNA methylation profiles in small intestine, liver and longissimus dorsi muscle of newborn piglets. In: Curr Protein Pept Sci, 2019, 20:713-726.
4. Saussenthaler S., Ouni M. et al. Epigenetic regulation of hepatic Dpp4 expression in response to dietary protein. In: J Nutr Biochem, 2019, 63:109-116.
5. Ouni M., Saussenthaler S. et al. Epigenetic Changes in Islets of Langerhans Preceding the Onset of Diabetes. In: Diabetes, 2020, 69(11), 2503-2517.
6. Shao X., Zhang C. et al. Deciphering the heterogeneity in DNA methylation patterns during stem cell differentiation and reprogramming. In: BMC Genomics, 2014, 15:978-987.
7. Tanaka K., Tainaka K. et al. An osmium-DNA interstrand complex: application to facile DNA methylation analysis. In: J Am Chem Soc, 2007, 129: 14511-14517.
8. Li Y., Miyanari Y. et al. Sequence-specific microscopic visualization of DNA methylation status at satellite repeats in individual cell nuclei and chromosomes. In: Nucleic Acids Res, 2013, 41: e186.
9. Shiura H., Okamoto A. et al. Whole-mount MeFISH: A novel technique for simultaneous visualization of specific DNA methylation and protein/RNA expression. In: PLoS ONE. 2014, 9(4), e95750.
10. Sugizaki K., Ikeda S. et al. Facile synthesis of hydroxymethylcytosine-containing oligonucleotides and their reactivity upon osmium oxidation. In: Org Biomol Chem. 2011, 9, 4176-4181.
11. Krueger F., Andrews S. Bismark: a flexible aligner and methylation caller for bisulfite-seq applications. In: Bioinformatics, 2011, 27(11):1571-2.
12. Li Y., Kong F. et al. Aberrant promoter methylation of the vimentin gene may contribute to colorectal carcinogenesis: a meta-analysis. In: Tumor Biol, 2014, 35(7): 6783-90.
13. Sun J., Fei F. et al. The role of ^mSEPT9 in screening, diagnosis and recurrence monitoring of colorectal cancer. In: BMC Cancer, 2019, 19, 450.
14. Dietrich D., Hasinger O. et al. DNA methylation of the homeobox genes PITX2 and SHOX2 predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients. In: Diagn Mol Pathol, 2012, 21(2): 93-104.
15. Martignano F., Gurioli G. et al. GSTP1 Methylation and protein expression in prostate cancer: diagnostic implications. In: Disease Markers, 2016, article ID 4358292.
16. Mikeska T., Craig J. DNA methylation biomarkers: cancer and beyond. In: Genes, 2014, 5(3): 821-64.
17. Van Neste L., Herman J. et al. The epigenetic promise for prostate cancer diagnosis. In: Prostate, 2012, 72(11): 1248-61.
18. Clozel T., Yang S. et al. Mechanism-based epigenetic chemosensitization therapy of diffuse large B-cell lymphoma. In: Cancer Discov, 2013, 3(9):1002-19.
19. Chen H., Xu Z. et al. RASGRF1 hypermethylation, a putative biomarker of colorectal cancer. In: Ann Clin Lab Sci, 2018, 48:3-10.
20. Yadav P., Masroor M. et al. Promoter methylation of BRCA1, DAPK1 and RASSF1A is associated with increased mortality among indian women with breast cancer. In: Asian Pac J Cancer Prev, 2018, 19(2): 443-448.
21. Paulikova S., Chmelarova M. et al. Hypermethylation of RAD51L3 and XRCC2 genes to predict late toxicity in chemoradiotherapy-treated cervical cancer patients. In: Folia Biol, 2013, 59:240-5.
22. Ge Y., Wu Q. et al. Hypermethylation of EIF4E promoter is associated with early onset of gastric cancer. In: Carcinogenesis, 2018, 39:66-71.
23. Ng PKS., Lau CPY. et al. Hypermethylation of NF-kappaB-activating protein-like (NKAPL) promoter in hepatocellular carcinoma suppresses its expression and predicts a poor prognosis. In: Dig Dis Sci, 2018, 63:676-86.
24. El-Sherif WT., Sayed SK. et al. Diagnostic role of RASSF1A and p16INK4a promoter gene hypermethylation in serum DNA of lung cancer patients: clinicopathological significance. In: Egypt J Immunol, 2016, 23:1-16.
25. Rezk NA., Mohamed RH. et al. Promoter methylation of RASSF1A gene in egyptian patients with ovarian cancer. In: Appl Biochem Biotechnol, 2018, 185:153-62.
26. Faleiro I., Apolonio J. et al. The TERT hypermethylated oncologic region predicts recurrence and survival in pancreatic cancer. Future Oncol, 2017, 13:2045-51.
27. Haldrup C., Pedersen A. et al. Biomarker potential of ST6GALNAC3 and ZNF660 promoter hypermethylation in prostate cancer tissue and liquid biopsies. In: Mol Oncol, 2018, 12:545-60.