

PREVALENȚELE UNOR PROFILURI METILICE ALE PROMOTORULUI GENEI *p15* LA PERSOANE SĂNĂTOASE ȘI PRINTRE PACIENȚII CU LEUCEMII ACUTE

Victor Popescu¹, Ion Corcimar², Cristina Butovscaia¹, Anastasia Zuieva¹,
Sanda Buruiană², Eugen Simionică³

Laboratorul de Genetică al USMF „Nicolae Testemițanu”¹

Catedra Hematologie și Oncologie a USMF „Nicolae Testemițanu”²

Catedra Biochimie și Biochimie Clinică a USMF „Nicolae Testemițanu”³

Summary

Prevalences of some methylic profiles of p15 gene promoter in healthy persons and patients with acute leukemias

In this study we have obtained some methylic profiles in DNA extracted from venous blood of healthy persons and patients with acute leukemias. Some methylic profiles could act as molecular markers in the acute leukemias monitoring (prognosis, differential-epigenetic diagnosis and personalized treatment). We have also obtained preliminary results on some methylic profiles prevalences in DNA of healthy persons and patients with acute leukemias. The conclusion consists of MM methylic profile of *p15* gene promoter which can be used as candidate molecular marker with low-risk for the examined person who can be affected with acute leukemia immediately after the blood sample collection.

Rezumat

În cadrul studiului dat au fost obținute unele profiluri metilice la nivelul ADN-ului extras din sânge venos la persoane sănătoase și la pacienți cu leucemii acute. Unele profiluri metilice ar putea servi în calitate de markeri moleculari pentru monitorizarea leucemiilor acute (prognosticul, diagnosticul diferențiat-epigenetic și tratamentul individual). S-au înregistrat, inclusiv, rezultatele preliminare privind prevalențele diferitor profiluri metilice la nivelul ADN-ului persoanelor sănătoase și printre persoanele afectate de leucemii acute. S-a conchis că, aparent, profilul metilic MM al promotorului genei *p15* ne poate servi ca marker molecular candidat al riscului minim către leucemii acute a persoanei investigate, în perioada imediată a prelevării probei de sânge.

Introducere

În anumite celule ale persoanelor ce suferă de diverse forme de cancer au fost înregistrate alterări ale profilurilor epigenetice și genetice [Wong I., 2001]. Acestea includ hipometilarea la nivelul întregului genom, hipermetilarea locală a genelor supresoare de tumori sau a genelor responsabile de reparația ADN, precum și a genelor inhibitoare ale metastazării, mutații punctiforme (substituția 5-metilcitozinei cu timina) din cadrul insulițelor CpG ale genei *p53*.

În cele mai multe cazuri de cancer la om este stabilită producerea unor dereglări în cadrul cascadei ciclina D / retinoblastom (Rb), implicate în reglarea ciclului celular [Ewen M., 1993]. Cu toate acestea, însă, în neoplaziile hematologice, inactivarea genei *Rb* este rar întâlnită [Hangaishi A., 1996]. Genele *p16* și *p15* sunt gene supresoare în multe tumori solide sau neoplazii hematologice [Wong I., 1998]. Aceste gene codifică proteine-inhibitoare ale kinazelor ciclin-dependente care, la rândul lor, servesc drept reglatori ai fosforilării proteinei *pRb*.

În diverse tumori umane a fost detectată metilarea aberantă a genei *p16* [Wong I., 2000]. Gena *p15*, adiacentă genei *p16* pe cromozomul 9p21, la fel se caracterizează, adeseori printr-un grad avansat al metilării în neoplazmele hematopoetice umane [Wong I., 1998, Gronbaek K., 1998].

A fost stabilită [Wong I. et al, 1998, Gonzalgo M., 1998] asocierea dintre hipermetilarea promotorului genelor *p15 / p16* cu stoparea transcripției în celulele neoplazice. Acești autori au pus în evidență metilarea aberantă a promotorului genei *p16* din carcinom hepatocelular (HCC) și anume: celule diferențiate (67%), moderat diferențiate (73%) și slab diferențiate (75%) la pacienți care prezentau tumori în stadiile T1 (40%), T2 (68%), T3 (69%) și T4 (100%) [Wong I., Johnson P. et al., 2000]. În total, 92% din pacienții cu HCC au prezentat metilarea genelor *p16* și/sau *p15* la nivelul tumorii [Wong I., Lo Y. et al, 2000]. Aceste date sugerează faptul că metilarea genelor *p16* și *p15* survine precoce în dezvoltarea carcinomului hepatocelular.

Metilarea aberantă a promotorului genei *p15* a fost stabilită cu ajutorul MSP în proporție de 58% din cazuri de leucemie mieloidă acută (AML – engl. *Acute Myeloid Leukemia*), leucemie limfoblastică acută (ALL – engl. *Acute Lymphoblastic Leukemia*) și leucemie bifenotipică acută (ABL - engl. *Acute Biphenotypic Leukemia*) [Wong I., Ng M., et al., 2000]. Acești autori au identificat unele profiluri metilice ale genei *p15* caracteristice pentru cele mai multe subtipuri morfologice care apar în diferite stadii ale diferențierii și susțin că metilarea frecventă a genei *p15* este un eveniment crucial și precoce în leucemiile acute. Cercetările acestor autori sugerează că metilarea *p15* survine în mod universal, *de novo*, în timpul transformării / progresiei leucemice a precursorilor hematopoietici din linia mieloidă / limfoidă sau în celulele stem primitive, pluripotente. Totuși, deocamdată, nu au fost găsite diferențe semnificative între profilurile metilice ale tumorilor din diferite stadii [Costello J. et al. 2000], sugerându-se că alterările epigenetice au loc în stadiile precoce ale dezvoltării cancerului sau în momentul inițierii tumorilor. Dereglarea unor căi critice precum *Rb/p16* și *p53/p14/MDM2*, sau altele, pot adeseori fi cauza creșterii neoplazice [Wong, 2001].

Perturbarea precoce a controlului ciclului celular prin metilarea *p16/p15*, alterarea factorilor de transcripție, pierderea aderenței intercelulare în urma hipermetilării genei *E-caderina*, depășirea punctelor de control al ciclului celular în urma hipermetilării genei *p53*, pot contribui la proliferarea necontrolată și imortalizarea celulară [Baylin S. et al. 2000].

Scopul studiului

Stabilirea prevalențelor profilurilor metilice ale promotorului genei *p15* la persoane sănătoase și printre pacienții cu leucemii acute în vederea stabilirii unor markeri molecular-epigenetici noi de diagnostic presimptomatic al leucemiilor acute.

Materialul biologic, metodele și echipamentele utilizate

În acest studiu au fost investigate două loturi de persoane care au fost de acord cu includerea lor în prezenta cercetare științifică, inclusiv: lotul I – 20 persoane sănătoase din populația generală au servit în calitate de lot martor și lotul II – 35 persoane afectate de leucemii acute (diverse variante) fiind, anterior, diagnosticate primar și internate la Centrul Hematologic al Institutului Oncologic din Republica Moldova.

Metoda de bază utilizată în cercetarea dată a fost studiul molecular al metilării ADN la nivelul promotorului genei *p15*, supresoare a tumorilor, prin conversia citozinei nemetilate în uracil (tratarea ADN) bisulfid de sodiu și amplificarea porțiunilor genice cu ajutorul perechilor de praimer nonmetil-specifici și metil-specifici prin tehnica MSP (methylation specific polymerase chain reaction).

Detaliat, metodele și accesoriile utilizate în proiect au fost specifice fiecărei etape de lucru, după cum urmează:

1) **Recoltarea sângelui** venos la pacienții diagnosticați în prealabil cu diverse forme de leucemii acute. Metoda: Venepuncție; Accesoriile: Seringi jetabile, Eprubete cu anticoagulant K3EDTA.

2) **Extracția ADN** genomic uman din sânge. Metoda: Protocol Qiagen Blood Mini; Accesoriile: Sânge cu K3EDTA, Set de reactivi (kit) tip Qiagen Blood Mini, Pipete, Eprubete tip Eppendorf, Centrifugă 13000 rot/min, Termostat 56°C, Congelator, Frigider.

3) **Modificarea ADN-ului** prin conversia citozinei în uracil. Metoda: Protocol “Qiagen” EpiTect Bisulfite Kit; Accesoriile: ADN genomic uman purificat cu ajutorul setului de reactivi “Qiagen” DNA Blood Mini Kit, Set de reactivi “Qiagen” EpiTect Bisulfite Kit, Etanol absolut, Pipete cu volum variabil, Eprubete din plastic tip Eppendorf, Centrifugă 13000 rot/min, Vortex, Congelator, Frigider.

4) **Amplificarea** prin tehnica MSP a ADN-ului conținând uracil. Metoda: Protocol PCR - “Fermentas”, Accesoriile: ADN purificat după conversia lui cu bisulfid de sodiu, PCR Master Mix „Fermentas”, Primeri- Ws, Was, Us, Uas, Ms, Mas, Pipete cu volum variabil, Eprubete din plastic “Eppendorf”, Centrifugă la 13.000 rot/min, Baie cu gheață, Aparat automat pentru amplificarea ADN (Termocyclor)-, „Crocodile III Appligene”, Congelator, Frigider.

Mersul lucrărilor

Pentru a putea analiza profilul metilic la nivelul ADN, care este principalul obiectiv al prezentului studiu, am planificat următoarele etape de lucru:

1. Recoltarea materialului biologic;
2. Extracția ADN-ului genomic uman din sânge venos;
3. Modificarea ADN-ului prin conversia citozinei în uracil;
4. Amplificarea prin MSP a ADN-ului modificat, conținând uracil;
5. Analiza produșilor de amplificare;
6. Prelucrarea matematică a datelor și formularea concluziilor.

Amplificarea ADN-ului modificat (aparținând aceluiași grup de 20 persoane sănătoase și 35 pacienți diagnosticați cu leucemii acute), conținând uracil, a fost realizată cu ajutorul protocolului ce urmează.

a) Pregătirea amestecului pentru reacția de amplificare în lanț (PCR)

Într-o eprubetă Eppendorf de 200 μl cu pereți subțiri (se menține pe gheață) se adaugă componentele necesare în ordinea dată pentru a petrece reacția controlului-pozitiv de amplificare a ADN:

- Apă deionizată sterilă - volum variabil;
- tampon PCR 1× (Echivalent *Fermentas*) – 5 μl soluție 10× ;
- dNTPs câte 0.2 mM/L din fiecare tip – 5 μl soluție 2mM;
- ^{N1} praimer p15W(s)- 300 ng, volum variabil; 5'- CGCACCTGCGGCCAGA -3 '
- ^{N1} praimer p15W(as)- 300 ng, volum variabil; 5'- AGTGGCCGAGCGGCCGG -3 '
- Taq ADN-polimeraza – 1,25 U/50 μl, volum variabil
- MgCl₂ - 3 mM/L – 6 μl soluție 25 mM;
- Volumul amestecului de mai sus: 40 μl*
- ^{N4} ADN modificat prin conversie ≈50 ng, 10 μl ADN soluție 5 ng/μl
- Volumul total al amestecului: 50 μl*

^{N1} **Notă:** În eprubete separate (variantele “^{N2}” sau “^{N3}”) se introduc aceleași componente ale reacției de amplificare, cu excepția praimerilor. Aceștia se introduc în corespundere cu varianta reacției adică, perechea “^{N2}” pentru reacția nonmetil-specifică sau “^{N3}” în reacția metil-specifică [Herman J., 1996]:

- ^{N2} praimer p15U(s)- 300 ng, volum variabil; 5'- TGTGATGTGTTTGTATTTTGTGGTT- 3'
- ^{N2} praimer p15U(as)- 300 ng, volum variabil; 5'- CCATACAATAACCAAACAACCAA- 3'
- ^{N3} praimer p15M(s)- 300 ng, volum variabil; 5'- GCGTTCGTATTTTGTGGTT -3'
- ^{N3} praimer p15M(as)- 300 ng, volum variabil; 5'- CGTACAATAACCGAACGACCGA -3'

^{N4} **Notă:** În reacția pentru controlul pozitiv al amplificării se introduce ADN neconvertit (≈50 ng). În prealabil, într-un tub separat au fost introduși 11 μl ADN matriță (5 ng/μl). Tubul a fost introdus în termociclor unde a fost denaturat 6 min la 95 °C. Apoi, din matrița denaturată, s-au luat 10 μl și s-au adăugat în amestecul de reacție. Tubul a fost apoi vortexat și centrifugat 30

sec. În final, tubul a fost introdus în termociclor pentru a se asigura regimul de temperatură și timpi după cum urmează.

Dacă aparatul termociclor nu este prevăzut cu capac termoactiv, se cere acoperirea amestecului de reacție cu ulei mineral.

b) Tratarea termică pentru realizarea PCR

Reacția PCR începe cu tratarea termică programată a amestecului de reacție 3 min, 95 °C, după care demarează programul de 35 cicluri în regimul următor: 30 s denaturare la 95 °C; 30 s alinierea praimerilor la 60 °C și 30 s elongare (se asigură cu 1 s mai mult pentru fiecare ciclu subsecvent) la 72 °C; după decurgerea celor 35 cicluri, se asigură etapa finală de elongare - 4 min la 72 °C.

c) Analiza produșilor de amplificare

Pentru separarea electroforetică a ampliconilor generați cu ajutorul metodei MSP noi am găsit posibilitatea utilizării gelurilor prefabricate de tip EL-600 („Elchrom Scientific”) destinate separării fragmentelor de ADN cu dimensiunile cuprinse între 40-600 perechi de nucleotide. Aceste geluri sunt relativ rezistente la acțiuni mecanice, inerte din punct de vedere chimic, rezistente la temperaturi de până la 95 °C au capacitatea de rezoluție a fragmentelor de ADN ce diferă prin ±1 pb (pereche de nucleotide), sunt înalt transparente și non-toxice. Ele au costuri mai joase în comparație cu gelurile din agaroză de înaltă rezoluție (*high resolution*), cu capacități de rezoluție echivalente.

Luând în considerare dimensiunile ampliconilor obținuți cu ajutorul praimerilor redați de Herman J. și colaboratorii săi (1996), care constituie 160 și 147 pb, noi am utilizat un marker-standard al greutății moleculare al ADN (*Ladder*) care determină aceste două valori – markerul tip M3 („Elchrom Scientific”) care reprezintă 50 de fragmente de ADN cu lungimi cuprinse între 75-622 pb și, totodată, este compatibil cu gelul EL-600.

Pentru a determina mobilitatea ampliconilor în gelul EL-600 care nu a fost până în prezent utilizat în analiza profilului metilic al promotorului genei *p15*, am realizat electroforeza cu introducerea în gel, în godeuri separate, a ampliconilor generați cu ajutorul praimerilor non-metil-specifici „U” (reacția PCR a avut loc în eprubete separate) și, respectiv, și a ampliconilor generați cu ajutorul praimerilor metil-specifici „M”. În rezultatul electroforezei cu utilizarea gelului EL-600, care a decurs 110 min. (25 °C), ampliconii s-au repartizat diferit față de modul expus în articolul publicat de Herman J. și colaboratorii săi (1996). În electroforegrama obținută în laboratorul nostru, se evidențiază dimensiunea mai mare a benzii metil-specifice (M) fiind situată mai proximal (98 pb) față de godeurile gelului. În articolul redat mai sus, autorii prezintă banda non-metil-specifică (U) ca fiind cea majoră după dimensiuni. S-a confirmat, totuși, în laboratorul nostru diferența de 3 pb între benzile „M” și „U” înregistrată de acești autori. Odată ce aceste benzi de 98 pb și 95 pb au apărut distincte în repetate rânduri, noi am decis utilizarea unei și aceleiași linii de migrare (*track*) pentru identificarea concomitentă a celor doi ampliconi după amplificarea separată cu primeri M-specifici și U-specifici și amestecarea lor (ADN-ul aceleiași persoane) în timpul preparării mixturii pentru încărcarea ei în gel.

d) Protocolul pentru electroforeză

1. În tuburi Eppendorf de 0,2 ml am preparat amestecul pentru încărcare în gel, în modul următor: 2 μl soluție 5× *Loading dye* (albastru de bromfenol, zaharoză, xilencianol), 4 μl soluție conținând ampliconi generați cu primeri M-specifici, 4 μl soluție conținând ampliconi generați cu primeri U-specifici. Această proporție a fost constituită și pentru controlul pozitiv cu excepția soluției conținând ampliconi generați cu primeri W-specifici (8 μl). În paralel, am preparat și ADN-ul – marker de greutate moleculară: 2 μl soluție 5× *Loading dye*, 8 μl apă ultrapură. Pentru obținerea controlului negativ, ciclurilor de temperaturi a fost supus amestecul Master mix, fără ADN genomic. Acest amestec în proporție de 8 μl și *Loading dye* - 2 μl au fost adăugați într-un tub de 0,2 ml pentru a constitui controlul negativ.

2. Am preparat 350 ml soluție TAE (0,5×) din soluție TAE (50×) prin diluarea cu apă bidistilată.

3. Am introdus gelul *Spreadex* în cuva aparatului de electroforeză și am turnat în această cuvă soluție TAE (0,5×) până când nivelul acestei soluții deasupra gelului a constituit 3-4 mm.
4. Am încărcat godeurile gelului cu amestecurile (10 μl) preparate după cum am descris mai sus.
5. Am fixat capacul cuvei și am conectat aparatul de electroforeză la 350 V, durata – 110 min.

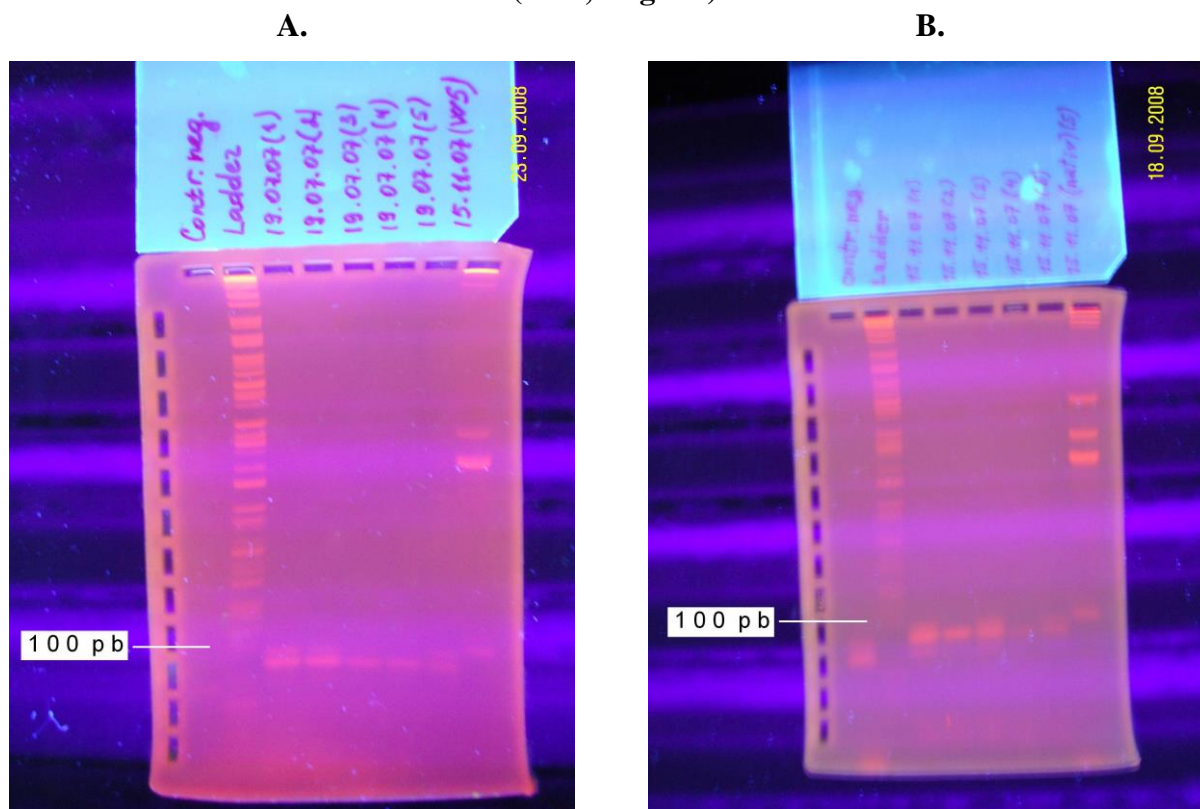
După expirarea timpului electroforezei am îndeplinit colorarea gelului în soluție bromură de etidiu (0,5 μg/ml), 45 min, asigurând agitarea periodică a cuvei pentru colorare.

Ulterior, am introdus gelul în apă bidistilată pentru spălare, 10 min, asigurând agitarea periodică a cuvei pentru spălare.

După spălare, gelul a fost amplasat pe suprafața transiluminatorului cu ajutorul căruia am iradiat gelul cu lumină UV, lungimea de undă 254 nm. În lumină UV moleculele de ADN colorate cu bromură de etidiu emit fluorescență și au fost înregistrate prin fotografiere cu ajutorul unui aparat foto digital (Exemple, Fig. 1A, 1B).

Fotografiile-electroforegrame astfel obținute au fost stocate în calculator și au servit pentru interpretarea rezultatelor amplificării.

Figura 1. Unele profiluri metilice la nivelul ADN-ului persoanelor sănătoase (A) și la pacienții cu leucemii acute (B) (Foto, original)



În baza datelor din electroforegramele obținute (exemple, Fig. 1A, 1B), au fost obținute rezultatele preliminare privind prevalențele diferitor profiluri metilice la nivelul ADN-ului persoanelor sănătoase (Fig. 2) și persoanelor afectate de leucemii acute (Fig. 3).

Rezultate și discuții

În vederea formulării răspunsului la ipoteza fixată în scopul proiectului, adică, stabilirea prevalențelor profilurilor metilice ale promotorului genei p15 la persoane sănătoase și printre

pacienții cu leucemii acute, am aplicat datele din electroforegramele obținute pentru a construi histogramele ce indică proporțiile procentuale (prevalențele) profilurilor UU, UM, MM atât la persoane sănătoase (Fig. 2) cât și la persoanele afectate de leucemii acute (Fig. 3).

Figura 2. Prevalențele profilurilor metilice epigenetice UU, UM, MM la persoanele sănătoase

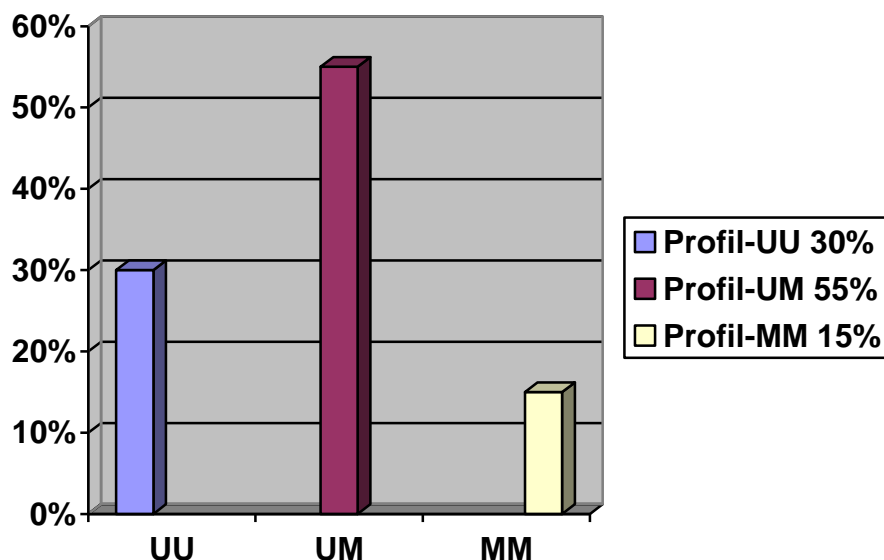
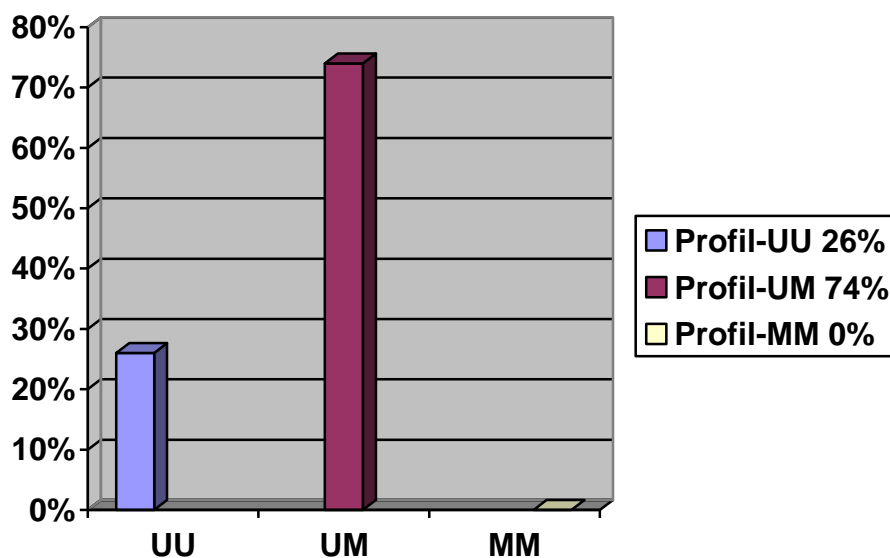


Figura 3. Prevalențele profilurilor metilice epigenetice UU, UM, MM la persoanele afectate de leucemii acute



Din histogramele obținute, rezultă că cele două loturi diferă (rezultatele se referă la un număr restrâns de subiecți analizați), în primul rând, prin incidența profilului MM (ADN este metilat la nivelul ambelor alele ale genei p15) și anume, în lotul persoanelor sănătoase aceasta constituie 15% (3/20), pe când în lotul pacienților afectați de leucemii acute (35 subiecți) prevalența profilului MM este 0 (zero) sau în acest lot constatăm lipsa subiecților care ar prezenta metilarea concomitentă a ADN în ambele alele la nivelul genei p15, adică, persoanele afectate de leucemii acute se caracterizează fie prin profilul UU sau UM.

Profilul UU se găsește atât printre persoanele afectate de leucemii acute – 26% (9/35), cât și la persoanele sănătoase – 30% (6/20), semnificând starea nemetilată a ambelor alele în toate

celulele probei biologice analizate, atât la persoane afectate de leucemii acute, cât și la persoane sănătoase. Această constatare conduce către două ipoteze: 1) în stare nemetilată la nivelul promotorului său gena p15 este inactivă; 2) gena p15 nu are un aport direct la supresia transformării maligne în cazul leucemiilor acute.

Profilul UM, deocamdată, nu ne permite să stabilim, dacă în proba dată de sânge au fost prezente celule cu profiluri UU și MM în amestec sau constituțiile U și M aparțin concomitent aceluiași celule și acestea posedă câte o alelă metilată și o altă alelă nemetilată.

Concluzii

1. În cadrul studiului au fost obținute unele profiluri metilice preliminare la nivelul ADN-ului persoanelor sănătoase și la cele afectate de leucemii acute care pot servi în calitate de candidați ai markerilor moleculari pentru monitorizarea leucemiilor acute (prognosticul, diagnosticul diferențiat-epigenetic și tratamentul individual).
2. Au fost obținute rezultatele preliminare privind prevalențele unor profiluri metilice la nivelul ADN-ului persoanelor sănătoase și persoanelor afectate de leucemii acute.
3. Rezultatele obținute sunt preliminare și necesită completarea cu subiecți investigați pentru a realiza interpretarea statistică desfășurată a semnificației diferențelor între prevalențele diferitor profiluri metilice ale ADN.
4. Profilurile UM și UU nu s-au evidențiat clar ca markeri moleculari pentru un risc major către leucemiile acute.
5. Spre deosebire de persoanele sănătoase, în lotul pacienților diagnosticați primar cu leucemii acute nici unul dintre subiecți nu prezintă metilarea tuturor moleculelor de ADN din proba analizată la nivelul promotorului genei p15.
6. Profilul metilic MM poate servi ca marker molecular al riscului minim către leucemii acute, din ziua prelevării probei de sânge.

Această lucrare a fost realizată în baza finanțării din partea Consiliului Suprem pentru Știință și Dezvoltare Tehnologică al Academiei de Științe a Moldovei, Contractele de finanțare nr. 12/ind din 02.01.2007, nr. 13/ind din 31.01.2008, nr.27/ind din 26.01.09.

Bibliografie

1. **Bielas J., Loeb L.** *Mutator phenotype in cancer: Timing and perspectives.* Environmental and Molecular Mutagenesis 45: 206-213, 2005.
2. **Esteller M., Herman J.** *Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer.* Oncogene, 23: 1-8; 2004.
3. **Hangaishi A.** *Inactivation of multiple tumor-suppressor genes involved in negative regulation of the cell cycle, MTS1/p16INK4A/CDKN2, MTS2/p15INK4B, p53, and Rb genes in primary lymphoid malignancies.* Blood 87: 4949-4958, 1996.
4. **Herman J.** *Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 93, pp. 9821-9826, 1996.
5. **Hoon D.** *Profiling epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in tumors and plasma from cutaneous melanoma patients.* Oncogene, 23: 4014-22, 2004.
6. **Issa J.** *Phase I study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies.* Blood, 103: 1635-40, 2004.
7. **Jahr S.** *DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin apoptotic and necrotic cells.* Cancer Res., 1:1659-65, 2001.
8. **Kantarjian H.** *Results of decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) therapy in 130 patients with chronic myelogenous leukemia.* Cancer, 98: 522-8, 2003.
9. **Miyamoto K., Ushijima T.** *Diagnostic and Therapeutic Applications of Epigenetics.* Jpn. J.Clin. Oncol., 35 (6), 293-301, 2005.

10. **Van Steensel B., Henikoff S.** *Epigenomic profiling using microarrays.* BioTechniques 35: 346-357, 2003.
11. **Wong I.** *Aberrant p15 promoter methylation in adult and childhood acute leukemias of nearly all the morphologic subtypes: potential prognostic implications.* Blood, 95: 1942-1949, 2000.
12. **Wong I.** *Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients.* Cancer Res., 59: 71-3, 1999.
13. **Wong I.** *Frequent p15 promoter methylation in tumor and peripheral blood from hepatocellular carcinoma patients.* Clin. Cancer. Res., 6: 3516-21, 2000.
14. **Wong I.** *Methylation profiling of human cancers in blood: molecular monitoring and prognostication (Review).* International Journal of Oncology 19: 1319-1324, 2001.
15. **Wong I.** *Quantitative analysis of tumor-derived methylated p16INK4a sequences in plasma, serum, and blood cells of hepatocellular carcinoma patients.* Clin. Cancer. Res., 9: 1047-52, 2003.