

Vliv metylace DNA na vznik nádorových onemocnění

Effect of DNA Methylation on the Development of Cancer

Holčáková J.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: Výzkum posledního desetiletí potvrdil význam epigenetických procesů při vzniku, vývoji a léčbě nádorových onemocnění. Především sekvenování nové generace umožnilo zmapovat lidský epigenom a sledovat jeho změny během kancerogeneze. Tento přístup odhalil přímá napojení epigenetických abnormalit na mutace genů, které kontrolují metylaci DNA, sbalování a funkci DNA v chromatinu, nebo na metabolismus buněk. Epigenetické změny DNA se vyskytují už v časných fázích vývoje nádorových onemocnění, a jsou tedy slibnými kandidáty na diagnostické a prognostické markery a současně epigenetické procesy představují vhodné cíle pro vývoj nových terapeutických látek. Získané poznatky o aberantní metylaci DNA umožňují dva různé pohledy na to, jak daná modifikace přispívá k vývoji nádorového onemocnění. První pohled předpokládá, že normální buňky podléhají transformaci vlivem řídicích mutací, kdy následně metylace *de novo* a demethylace DNA přispívají k řadě programových změn genové exprese. Alternativní přístup pohlíží na změny v metylaci DNA jako na důsledek např. stárnutí buněk. A právě tyto získané změny zvyšují citlivost DNA ke vzniku mutací a k následné onkogenní transformaci. **Cíle:** Cílem přehledového článku je shrnout dosud známé úlohy abnormální metylace DNA při vývoji nádorového onemocnění a představit již publikovanou alternativní teorii, která k dané problematice přistupuje méně obvyklým způsobem.

Klíčová slova

metylace DNA – polycomb proteinový komplex – CpG ostrůvky

Summary

Background: Research in the last decade has confirmed the importance of epigenetic processes for the onset, development, and treatment of cancer. Next generation sequencing has allowed the inspection and mapping of the human epigenome and its monitoring for changes during carcinogenesis, which has revealed direct links between epigenetic abnormalities and mutations in genes that control DNA methylation and packing and those that function in chromatin dynamics and metabolism. Epigenetic changes that occur in the early stages of tumor progression thus represent promising candidates for diagnostic and prognostic markers, and epigenetic processes are suitable targets for the development of new therapeutic strategies. There are two contrasting views on how aberrant DNA methylation contributes to the development of cancer. The first view assumes that normal cells undergo transformation due to driver mutations and subsequent *de novo* methylation and DNA demethylation, resulting in global changes in gene expression. The second view considers changes in DNA methylation to be a consequence of cell aging, for example, and that the acquired changes increase the sensitivity of DNA to mutations and oncogenic transformation. **Aims:** The aim of the review article is to briefly summarize the role of abnormal DNA methylation in the development of cancer, and to present an alternative theory that considers the role of aberrant DNA methylation patterns in cancer from a new and unconventional perspective.

Key words

DNA methylation – polycomb-group proteins – CpG islands

Práce byla podpořena projektem MŠMT – NPU I – LO1413.

The work was supported by the project MEYS – NPS I – LO1413.

Autorka deklaruje, že v souvislosti s předmětem studie nemá žádné komerční zájmy.

The author declares she has no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Mgr. Jitka Holčáková, Ph.D.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
holcakova@mou.cz

Přijato/Accepted: 27. 8. 2018

doi: 10.14735/amko20182541

Úvod

Již během 80. let 20. století byly zaznamenány změny v metylaci DNA nádorových buněk [1] a pozdější intenzivní výzkum přinesl další znalosti o struktuře a modifikacích chromatinu a jejich vlivu na genovou expresi. Ukázalo se, že vznik a progresse nádorového onemocnění jsou podmíněny nejen genetickými, ale i epigenetickými změnami a do odborného jazyka tak vstupuje pojem „nádorový epigenom“. Sekvenování nové generace využívané pro zmapování chromozomů a metylaci DNA u normálních, nádorových nebo pluripotentních kmenových buněk přineslo nové poznatky o struktuře chromatinu a postavení nukleotidů a o tom, jak tyto změny přispívají ke vzniku a rozvoji různých onemocnění. Zároveň se tím otevřely možnosti pro nalezení nových nádorových markerů a terapeutických cílů.

Metylace DNA

Za základní epigenetický mechanismus je považována metylace DNA, tedy kovalentní připojení metylové skupiny k adeninu nebo cytosinu (u adeninu na 6. uhlík, u cytosinu na 4. nebo 5. uhlík) [2]. V savčím genomu se vyskytuje pouze 5-metylcytosin (5mC) v rámci CpG (cytosine-phosphatidyl-guanin) dinukleotidů [3]. Metylace DNA regulují expresi genů bez změny genetické informace a ovlivňují replikaci, rekombinaci a opravy DNA nebo sestřih heterogenní nukleární RNA. Působí tak na vývoj kmenových buněk, diferenciaci a udržování buněk a tkání. Dále se podílejí na zachování genomové stability, potlačují transkripci repetitivních sekvencí a retrovirové DNA, zabraňují translokaci transponovatelných elementů a během zárodečného vývoje kontrolují expresi imprintovaných genů. Změny v epigenetických regulačních mechanismech probíhají během procesu stárnutí a za patologických podmínek přispívají ke vzniku rakoviny nebo autoimunitních a degenerativních onemocnění [4].

Metylace DNA je zprostředkována DNA metyltransferázami (DNMTs), které využívají jako zdroj metylové skupiny S-adenosylmethionin. DNMT1 je zodpovědná za udržovací metylace, kdy katalyzuje připojení metylové skupiny

k dinukleotidu CpG na hemimetylovaných vláknech DNA během replikace. DNMT3A a DNMT3B zajišťují metylaci *de novo* [5]. Ztráta metyltransferázy DNMT1, která zajišťuje dědičné metylační vzory DNA, je letální. [6].

Demetylace DNA řídí translokační proteiny TET (tet methylcytosine dioxygenase), které katalyzují konverzi 5-metylcytosinu na 5-hydroxymetylcytosin a následně na cytosin. Množství hydroxylovaných cytosinů v promotorech genů koreluje s jejich expresní aktivitou, přičemž přítomnost metylcytosinu vede k represi transkripcce. Modifikace DNA metylací přímo fyzicky brání transkripčním faktorům nasednout na jejich vazebné místo nebo se díky ní na DNA navážou tzv. proteiny vázající metylované CpG (methyl-CpG binding proteins – MBP), které mění chromatinovou strukturu a regulují tak vazbu dalších faktorů [7].

Metylace DNA u nádorů

U nádorových buněk se často vyskytuje komplexní ztráta metylace soustředěná do hypometylovaných bloků nebo naopak hypermetylace určitých oblastí [8]. Celogenomové sekvenování vzorků normální a nádorové tkáně tlustého střeva prokázalo, že ztráta metylace DNA není náhodná, ale většinou postihuje rozsáhlé oblasti (v řádu megabází) u mnoha chromozomů [9]. Jedná se především o jaderné oblasti spojené s laminem, kde probíhá pozdní replikace. Domény spojené s laminem tvoří asi 40 % genomu a obsahují repetitivní sekvence chudé na geny [10,11]. Předpokládá se, že hypometylace nepromotorových sekvencí DNA a strukturních částí, jako je centromera, zvyšují genomovou nestabilitu [12] a mutace genů pro metyltransferázy, které vedou ke ztrátě metylace DNA, jsou spojovány se strukturními změnami chromozomů [13]. Hypometylace promotorových sekvencí je zodpovědná za nadměrnou expresi protoonkogenů, růstových faktorů a genů zapojených do regulace proliferace, invazivity a metastazování nádorových buněk [14], hypometylace retrotransponů pak podporuje kancerogenezi destabilizací genomu prostřednictvím inzerčních mutací a rekombinací mezi nealelickými repeticemi [15].

Nejčastěji sledovanou epigenetickou změnou u nádorů je však nyní abnormální metylace DNA *de novo* u standardně nemetylovaných promotorů a s tím související potlačení transkripcce a ztráta genové exprese [16,17].

Hypermetylace CpG ostrůvků

CpG dinukleotidy nejsou v genomu zastoupeny často a většinou se soustřeďují do krátkých oblastí (0,5–4 kb) známých jako CpG ostrůvky. CpG ostrůvky byly během evoluce umístěny a zachovány v oblastech DNA, které mají funkční význam. Regulují chromatinovou strukturu, čímž ovlivňují vazbu transkripčních faktorů a výsledně i genovou expresi. U většiny genů savčího genomu se CpG ostrůvky nacházejí v počátečních oblastech promotorů a prvního exonu a v normálních buňkách obvykle nejsou metylovány. Metylace CpG ostrůvků vede ke stabilnímu snížení exprese těchto genů.

Mapování metylací DNA u nádorových buněk potvrdilo, že téměř všechny typy nádorů obsahují stovky genů s abnormální metylací, přičemž v normálních buňkách není 5–10 % CpG ostrůvků těchto promotorů od embryonálního vývoje nikdy metylováno [3]. Překvapivě jsou hypermetylace promotorů u nádorových buněk minimálně stejně tak časté jako výskyt mutací nádorových supresorů. Aberantní metylace promotoru spojené s jeho umlčením představují selektivní výhodu pro neoplastické buňky podobně jako mutace. Téměř 50 % genů, jejichž zárodečné mutace vedou k dědičným formám rakoviny, podléhá i hypermetylacii a následnému potlačení jejich exprese. Příkladem je gen *BRCA1* kódující nádorový supresor, jehož zárodečné mutace jsou spojeny se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu (breast cancer – BC). U 10–15 % žen s BC, které nenesly mutaci *BRCA1*, byla nalezena hypermetylace tohoto genu. Profily genové exprese BC s hypermetylovaným i mutovaným *BRCA1* jsou totožné, a je tedy zřejmé, že i důsledky obou typů aberací *BRCA1*, tj. mutace i hypermetylace, jsou stejné [18,19].

Předpokládá se, že ztráta exprese nádorových supresorů se fenotypově projeví jen v případě, že jsou inaktivovány obě alely genu. Některé studie však uká-

zaly, že jedna z alel genu může stabilně nést zárodečnou mutaci a druhá je inaktivována právě metylací [20]. Nicméně se zdá, že metylována je vždy jen wild type alela a nikdy ne alela mutovaná [21].

Podobně jako se mutace DNA často objevují u specifických genů (*TP53*, *KRAS* apod.), které působí jako spouštěče nádorového bujení, jsou známy i epigenetické změny, které se u nádorů vyskytují poměrně často. Příkladem jsou hypermetylace nádorového supresoru *VHL* u karcinomu ledvin nebo *CDKN2A* (kódující nádorové supresory *INK4A* a *ARF*) u karcinomu plic [22], jícnu [23], Burkittova lymfomu [24] nebo melanomu [25].

Seznam identifikovaných genů, u kterých dochází u různých typů nádorů ke snížení exprese v důsledku hypermetylace, se neustále rozšiřuje. Tyto geny jsou pravděpodobně důležité pro vývoj daného nádoru z podstaty jejich funkce, ale nepodléhají často mutacím. Příkladem je gen *MGMT* nezbytný pro genomovou stabilitu, růstový regulátor *CDKN2B* nebo supresor proliferace *RASSF1A* [26,27]. Předpokládá se, že hlavním působením metylací je jejich nahromadění do jednotlivých signálních drah, které napomáhají vzniku a vývoji rakoviny [28]. Příkladem jsou geny pro transkripční faktory *GATA4* a *GATA5*, které řídí epiteliální diferenciaci u karcinomu tlustého střeva a které bývají souběžně hypermetylovány spolu se svými cílovými geny [29]. Souběžně hypermetylací podléhají i geny negativně regulující signální dráhu WNT a doplňují tak vliv řídicích mutací *APC* a *CTNNB1*, které WNT dráhu naopak aktivují [30]. Součinnost různých hypermetylovaných genů navíc přispívá i k narušení signální dráhy p53.

Metylace DNA přispívá ke vzniku mutací DNA

Epigenetické změny často zvyšují riziko vzniku mutací v průběhu vývoje nádoru. Poprvé byl tento jev popsán u genu *MLH1*, který je často hypermetylován u nádorů s vysokou hladinou nestability mikrosatelitů, jako jsou nádory tlustého střeva a konečníku [31]. Dalším genem, který je nezbytný pro opravy DNA a podléhá hypermetylací, je *MGMT*. *MGMT* kóduje protein O^6 -alkylguanin DNA

alkyltransferázu, který opravuje O^6 -metylguanin vznikající při působení karcinogenů zpět na guanin a zabraňuje tak vzniku mutací (tranzicí) $G \rightarrow A$. Nádory s umlčenými alelami genu *MGMT* jsou pak náchylné k mutacím v klíčových genech, jako je *TP53* nebo *KRAS* [32].

Metylace cytosinu může ovlivnit vznik a vývoj nádoru i jinými mechanismy, než je umlčení genové exprese. Samotná 5-metylace cytosinu je v podstatě mutagenní, protože může vést ke spontánní deaminaci a následné tranzici $C \rightarrow T$ [33]. Uvádí se, že až 50 % inaktivujících bodových mutací nádorového supresoru *TP53* u somatických buněk vychází z metylovaného cytosinu [34]. Přítomnost metylové skupiny u CpG v kódující oblasti *TP53* zvyšuje výskyt mutací vyvolaných UV zářením u nádorů kůže, protože zvyšuje citlivost cytosinu k oblasti spektra převládajícího u slunečního záření [35]. Metylované CpG jsou i cílem tranzičních mutací $C \rightarrow T$ vyvolaných karcinogenem benzo(a)pyren diol epoxid, který je přítomen v tabáku [36]. Skutečnost, že kódující sekvence *TP53* obsahuje velké množství metylovaných CpG, tedy může zvyšovat pravděpodobnost vzniku mutací tohoto genu.

Metylace DNA a polycomb proteiny

Metylace DNA je spojována především s potlačením genové exprese a předpokládá se, že její hlavní úlohou při tumorigenezi je inaktivace nádorových supresorů. Ačkoliv byl tento typ inhibice pozorován u nádorových buněčných linií [37], je tento pohled poněkud zjednodušený. Metylace CpG *de novo* se nevyskytuje pouze u nádorových buněk, ale v nízké hladině byly pozorovány i u normálních tkání a jejich množství se postupně navyšuje s věkem [3,38]. Podobně i demetylace typické pro nádorové buňky se objevují u normálních stárnoucích hematopoetických a epidermálních kmenových buněk *in vivo* [39].

Několik studií prokázalo, že většina genů metylovaných u nádorů *de novo* je transkripčně neaktivní i u normálních buněk, což je v souladu s tvrzením, že většina cílových genů pro metylaci je označena tzv. polycomb komplexem

(polycomb-group proteins – PcGs) [40]. PcGs představují rodinu proteinů, které využívají epigenetické mechanismy k udržení nebo potlačení exprese cílových genů. Původně byly objeveny u *Drosophila melanogaster*, ale jejich úloha v regulaci vývojových genů byla prokázána u mnoha živočišných druhů. PcGs potlačují transkripční genů nezbytných pro tvorbu vývojových linií z embryonálních nebo dospělých kmenových buněk [41,42]. Exprese těchto genů je během raného embryonálního vývoje potlačena vazbou PcGs, které zprostředkovávají metylaci histonu H3 pomocí histon metyl transferázy (EZH2), a dochází k lokální tvorbě fakultativního heterochromatinu. To je relativně plastická struktura, která může být jednoduše zrušena uvolněním PcGs a dochází k obnově transkripce [43]. Tato regulace bez přítomnosti abnormální metylace DNA promotorů byla pozorována u mnoha typů nádorů. Předpokládá se, že molekulární vývoj během tumorigeneze začíná abnormální expanzí dospělých kmenových buněk a progenitorů, kde u CpG ostrůvků v rámci promotorů dochází k nahrazování flexibilního umlčení genů pomocí PcGs mnohem stabilnější regulací spojenou s metylací DNA, která je zprostředkována *de novo* metylázami DNMT3A a 3B [44,45]. Je zřejmé, že spíše než potlačení aktivních genů postihuje metylace již umlčené geny a hlavní úlohou je zabránění jejich reaktivace [46].

Protože většina CpG, které podléhají změnám *de novo*, je standardně označena PcGs, jsou výsledné metylační vzory u všech tkání podobné, ačkoliv se intenzita metylací liší mezi jednotlivými nádory, např. je vysoká u nádorů střev nebo naopak nízká u nádorů mozku [47]. V principu zde tedy musí existovat další kontrolní mechanismy, které řídí metylace *de novo* a pravděpodobně vycházejí z vývojové historie jednotlivých buněčných typů. Například lokální záněty zvyšují pravděpodobnost nádorové transformace a metylace DNA je do těchto procesů také zapojena [48,49]. Podobně působí i oxidační stres, který přímo ovlivňuje vazbu DNA metyltransferáz na cílové geny označené PcGs [50].

Co bylo dříve, mutace, nebo metylace?

Podle Klutsteina et al lze na současné znalosti o metylacích DNA u nádorů nahlížet ze dvou stran [51]. Buď mohou 1. normální buňky podlehnout nádorové transformaci v důsledku genetické mutace a následná metylace a demethylace DNA vede k celkové programové změně genové exprese, nebo se 2. subpopulace buněk, u kterých došlo ke změnám v metylaci DNA, např. v důsledku stárnutí, stává náchylnější k onkogenní transformaci [49]. Podle druhého modelu je přítomnost abnormální metylace u nádoru důsledkem výběru primární buňky s charakteristickým metylačním fenotypem, ze které nádor vznikl. Pokud je tento fenotyp jednou ustanoven, přenáší se na dceřiné buňky podobně jako mutace. Velké množství důkazů napovídá, že metylace DNA související s nádory nebo stárnutím pochází z malé populace buněk. Jako příklad uvádí Klutstein et al vývoj nádorů tlustého střeva [51]. Střevní epitel se neustále obnovuje díky kmenovým buňkám umístěným ve střevních kryptách. Kmenové buňky produkují proliferyjící buňky, které v určitém bodě podléhají diferenciaci a vytvářejí nový střevní epitel. Většina genů podílejících se na tomto kroku je řízena vazbou PcGs. Během vývoje jsou tyto geny vazbou PcGs umlčeny a k jejich reaktivaci dochází až po jejich uvolnění. Následně se začínají produkovat transkripční faktory, které vedou k diferenciaci buněk. Během stárnutí podléhá subpopulace kmenových buněk metylacím *de novo* na cílových CpG ostrůvcích a vznikají malé oblasti tkáně s aberantním metylačním profilem. Tato modifikace vede k tvorbě konstitutivního heterochromatinu, který nelze jednoduše změnit. Takové kmenové buňky mohou sice odstranit z cílových diferenciacních genů PcGs, ale k reaktivaci jejich transkripce nedochází. Buňky se nepřeměňují na epitelální a zůstávají v proliferativním stavu. Tím vznikají příznivé podmínky pro maligní transformaci, ať už v důsledku genetické predispozice, nebo spontánní mutace. Tuto teorii podporují zjištění, že cílová místa jsou již částečně metylována u normálních buněk a silně modifi-

kována u raných prekancerózních stadií, tzv. polypů [47]. Během obnovy střevního epitelu z kmenových buněk umístěných v kryptách dochází k rychlým a častým přeměnám. Proto je metylační vzorec u normálních střevních buněk stejný jako u příslušných kmenových buněk. Methylace DNA u buněk jedné střevní krypty se zdají být uniformní, mezi jednotlivými kryptami se však liší. Předpokládá se, že jednotlivé CpG ostrůvky podléhají abnormální metylaci *de novo* zcela individuálně, některé jsou silně modifikovány, jiné zcela nemetylovány, ale u jiných tkání tomu může být naopak. To naznačuje, že v každé tkáni jsou přítomny buňky s nízkou hladinou metylace *de novo* a jiné buňky mají metylaci CpG ostrůvků vysokou. A pravděpodobně jsou to právě tyto buňky, které následně podléhají transformaci a získávají selekční výhodu. Podle této teorie metylace *de novo* existují již v subpopulaci normálních buněk ještě před jejich transformací podmíněnou genetickou mutací [51].

Malignity krvetvorby jsou dalším příkladem, jak změny v metylaci DNA přispívají k vývoji nádorů. Myelodysplastický syndrom nebo akutní myeloidní leukemie jsou onemocnění vyznačující se poruchou diferenciaci krevních buněk, jejichž riziko stoupá s věkem pacientů. Několik studií popisuje, že během stárnutí jak u myši, tak i u člověka se zvyšuje počet hematopoetických kmenových buněk, jejichž schopnost diferenciaci do lymfocytů je snížena a převládá myeloidní fenotyp. Bisulfitové studie celého genomu prokázaly, že tento proces je spojen se specifickými metylacemi *de novo* a demethylacemi standardně přítomnými u nádorů a je pravděpodobné, že tyto změny přispívající k obnově kmenových buněk a ztrátě diferenciaci jsou výsledkem přirozeného stárnutí bez přítomnosti genové mutace.

Závěr

V uplynulých letech došlo ke značnému pokroku v problematice nádorové epigenetiky. Velká část výzkumu byla věnována charakteristice epigenomu normálních a nádorových buněk s cílem definovat přesný buněčný původ nádoru a využití epigenetiky ke zlepšení

klasifikace jednotlivých podskupin nádorů. Nyní se pozornost obrací k objasnění funkcí jednotlivých epigenetických modifikací. V poslední době se pojmy genetika a epigenetika k sobě přibližují a ustupuje boj o to, která ze změn DNA je pro iniciaci a progresi nádorů důležitější. Naopak je zřejmé, že mutace a epigenetické změny DNA vzájemně „spolupracují“ na vzniku a vývoji tohoto onemocnění. Otevírají se další možnosti pro hledání biomarkerů a nových preventivních a terapeutických strategií. Cílem příštích let tedy bude zavedení DNA metylačních markerů do klinické diagnostiky a využití identifikovaných epigenetických terapeutických cílů pro léčbu nejen nádorových onemocnění.

Literatura

1. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3(6): 415–428. doi: 10.1038/nrg816.
2. Kim JK, Samaranyake M, Pradhan S. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66(4): 596–612. doi: 10.1007/s00018-008-8432-4.
3. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16(1): 6–21. doi: 10.1101/gad.947102.
4. Chen ZX, Riggs AD. DNA methylation and demethylation in mammals. *J Biol Chem* 2011; 286(21): 18347–18353. doi: 10.1074/jbc.R110.205286.
5. Poh WJ, Wee CP, Gao Z. DNA Methyltransferase activity assays: advances and challenges. *Theranostics* 2016; 6(3): 369–391. doi: 10.7150/thno.13438.
6. Cheng X, Blumenthal RM. Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure* 2008; 16(3): 341–350. doi: 10.1016/j.str.2008.01.004.
7. Buck-Koehntop BA, Defossez PA. On how mammalian transcription factors recognize methylated DNA. *Epigenetics* 2013; 8(2): 131–137. doi: 10.4161/epi.23632.
8. Berman BP, Weisenberger DJ, Aman JF et al. Regions of focal DNA hypermethylation and long-range hypomethylation in colorectal cancer coincide with nuclear lamina-associated domains. *Nat Genet* 2011; 44(1): 40–46. doi: 10.1038/ng.969.
9. Bjornsson HT, Fallin MD, Feinberg AP. An integrated epigenetic and genetic approach to common human disease. *Trends Genet* 2004; 20(8): 350–358. doi: 10.1016/j.tig.2004.06.009.
10. Issa JP. Epigenetic variation and cellular Darwinism. *Nat Genet* 2011; 43(8): 724–726. doi: 10.1038/ng.897.
11. Hansen KD, Timp W, Bravo HC et al. Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. *Nat Genet* 2011; 43(8): 768–775. doi: 10.1038/ng.865.
12. Feinberg AP, Gehrke CW, Kuo KC et al. Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. *Cancer Res* 1988; 48(5): 1159–1161.
13. Chan MF, van Amerongen R, Nijjar T et al. Reduced rates of gene loss, gene silencing, and gene mutation in Dnmt1-deficient embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 2001; 21(22): 7587–7600. doi: 10.1128/MCB.21.22.7587-7600.2001.
14. Szyf M, Pakneshan P, Rabbani SA. DNA methylation and breast cancer. *Biochem Pharmacol* 2004; 68(6): 1187–1197. doi: 10.1016/j.bcp.2004.04.030.

15. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 2000; 9(16): 2395–2402.
16. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000; 16(4): 168–174.
17. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999; 21(2): 163–167. doi: 10.1038/5947.
18. Esteller M, Silva JM, Dominguez G et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(7): 564–569.
19. Esteller M, Avizienyte E, Corn PG et al. Epigenetic inactivation of LKB1 in primary tumors associated with the Peutz-Jeghers syndrome. *Oncogene* 2000; 19(1): 164–168. doi: 10.1038/sj.onc.1203227.
20. Myohanen SK, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia. *Cancer Res* 1998; 58(4): 591–593.
21. Esteller M, Fraga MF, Guo M et al. DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet* 2001; 10(26): 3001–3007.
22. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; 128(4): 683–692. doi: 10.1016/j.cell.2007.01.029.
23. Zhou C, Li J, Li Q. CDKN2A methylation in esophageal cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* 2017; 8(30): 50071–50083. doi: 10.18632/oncotarget.18412.
24. Robaina MC, Faccion RS, Arruda VO et al. Quantitative analysis of CDKN2A methylation, mRNA, and p16(INK4a) protein expression in children and adolescents with Burkitt lymphoma: biological and clinical implications. *Leuk Res* 2015; 39(2): 248–256. doi: 10.1016/j.leukres.2014.11.023.
25. Jonsson A, Tuominen R, Grafstrom E et al. High frequency of p16(INK4A) promoter methylation in NRAS-mutated cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 2010; 130(12): 2809–2817. doi: 10.1038/jid.2010.216.
26. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC et al. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 1999; 59(4): 793–797.
27. Herman JG, Civin CI, Issa JP et al. Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res* 1997; 57(5): 837–841.
28. Wood LD, Parsons DW, Jones S et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 2007; 318(5853): 1108–1113. doi: 10.1126/science.1145720.
29. Akiyama Y, Watkins N, Suzuki H et al. GATA-4 and GATA-5 transcription factor genes and potential downstream antitumor target genes are epigenetically silenced in colorectal and gastric cancer. *Mol Cell Biol* 2003; 23(23): 8429–8439.
30. Suzuki H, Toyota M, Carraway H et al. Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer. *Br J Cancer* 2008; 98(6): 1147–1156. doi: 10.1038/sj.bjc.6604259.
31. Nakagawa H, Nuovo GJ, Zervos EE et al. Age-related hypermethylation of the 5' region of MLH1 in normal colonic mucosa is associated with microsatellite-unstable colorectal cancer development. *Cancer Res* 2001; 61(19): 6991–6995.
32. Esteller M, Rissques RA, Toyota M et al. Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 2001; 61(12): 4689–4692.
33. Coulondre C, Miller JH, Farabaugh PJ et al. Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature* 1978; 274(5673): 775–780.
34. Rideout WM3rd, Coetzee GA, Olumi AF et al. 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science* 1990; 249(4974): 1288–1290.
35. Pfeifer GP, Tang M, Denissenko MF. Mutation hotspots and DNA methylation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 249: 1–19.
36. Yoon JH, Smith LE, Feng Z et al. Methylated CpG dinucleotides are the preferential targets for G-to-T transversion mutations induced by benzo[a]pyrene diol epoxide in mammalian cells: similarities with the p53 mutation spectrum in smoking-associated lung cancers. *Cancer Res* 2001; 61(19): 7110–7117.
37. Fang M, Ou J, Hutchinson L et al. The BRAF oncoprotein functions through the transcriptional repressor MAFK to mediate the CpG island methylator phenotype. *Mol Cell* 2014; 55(6): 904–915. doi: 10.1016/j.molcel.2014.08.010.
38. Issa JP. Aging and epigenetic drift: a vicious cycle. *J Clin Invest* 2014; 124(1): 24–29. doi: 10.1172/JCI69735.
39. Raddatz G, Hagemann S, Aran D et al. Aging is associated with highly defined epigenetic changes in the human epidermis. *Epigenetics Chromatin* 2013; 6(1): 36. doi: 10.1186/1756-8935-6-36.
40. Keshet I, Schlesinger Y, Farkash S et al. Evidence for an instructive mechanism of de novo methylation in cancer cells. *Nat Genet* 2006; 38(2): 149–153. doi: 10.1038/ng1719.
41. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X et al. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 2006; 125(2): 315–326. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.041.
42. Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB et al. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 2007; 448(7153): 553–560. doi: 10.1038/nature06008.
43. Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J et al. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 2006; 441(7091): 349–353. doi: 10.1038/nature04733.
44. Ohm JE, Baylin SB. Stem cell chromatin patterns: an instructive mechanism for DNA hypermethylation? *Cell Cycle* 2007; 6(9): 1040–1043. doi: 10.4161/cc.6.9.4210.
45. Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* 2009; 10(5): 295–304. doi: 10.1038/nrg2540.
46. Easwaran H, Johnstone SE, Van Neste L et al. A DNA hypermethylation module for the stem/progenitor cell signature of cancer. *Genome Res* 2012; 22(5): 837–849. doi: 10.1101/gr.131169.111.
47. Nejman D, Straussman R, Steinfield I et al. Molecular rules governing de novo methylation in cancer. *Cancer Res* 2014; 74(5): 1475–1483. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3042.
48. Tomasetti C, Vogelstein B. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* 2015; 347(6217): 78–81. doi: 10.1126/science.1260825.
49. Easwaran H, Tsai HC, Baylin SB. Cancer epigenetics: tumor heterogeneity, plasticity of stem-like states, and drug resistance. *Mol Cell* 2014; 54(5): 716–727. doi: 10.1016/j.molcel.2014.05.015.
50. O'Hagan HM, Wang W, Sen S et al. Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG Islands. *Cancer Cell* 2011; 20(5): 606–619. doi: 10.1016/j.ccr.2011.09.012.
51. Klutstein M, Nejman D, Greenfield R et al. DNA Methylation in Cancer and Aging. *Cancer Res* 2016; 76(12): 3446–3450. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3278.