Metylacja DNA w procesie nowotworzenia i metody jej detekcji

EWELINA SEMIK-GURGUL, TOMASZ ZĄBEK

Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt, Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy,
ul. Krakowska 1, 32-083 Balice

Otrzymano 20.02.2018

Zaakceptowano 26.03.2018

Semik-Gurgul E., Ząbek T.

DNA methylation in the cancerogenesis process and methods of its detection

Summary

Epigenetic modifications, apart from affecting gene expression, play an important role in the chromatin structure stabilization, embryonic development and the genomic imprinting. Recent studies have shown that they also play a vital role in other biological processes, including silencing of the expression and mobility of transposable elements and resistance to viral infections by blocking the expression of viral genes. The stability of the genome and the expression of genes in normal cells are strongly dependent on the DNA methylation pattern, which is visibly disturbed in tumor cells. These alterations may be a consequence of the attachment of methyl groups to cytosines in unmethylated DNA sequences, resulting in an increase in the degree of methylation or can be a result of demethylation, i.e. a reduction in the level of DNA methylation. Currently, many techniques are available to determine the level of methylcytosine in DNA, both at the level of single genes and the whole genome. However, each method has its advantages and disadvantages, not being universal in relation to the type of research material and the purpose of planned analyses.

Keywords: cytosine methylation, hypomethylation, hypermethylation, neoplastic transformation

Postęp w sekwencjonowaniu DNA umożliwił poznanie sekwencji genomów wielu gatunków ssaków oraz ich opis pod względem obecności genów, markerów genetycznych, sekwencji powtarzalnych, polimorfizmów DNA oraz wielu innych cech sekwencji nukleotydowej, które podlegają dziedziczeniu. Znajomość sekwencji genomów ssaków dała równocześnie podstawę dla badań z zakresu zarówno genomiki funkcjonalnej, jak i epigenetyki.

Epigenetycznym mechanizmem regulowania ekspresji genomów ssaków są modyfikacje chemiczne białek histonowych, które wpływają na zmiany w strukturze chromatyny (dostępność genomu dla maszynery transkrypcyjnej) i są ściśle powiązane z modyfikacją kwasów nukleinowych, polegającą na metylacji DNA. Od niedawna do czynników regulacji epigenetycznej zalicza się także białka prionowe i interferujące RNA (19, 42).

Metylacja DNA jest jedną z najlepiej poznanych modyfikacji epigenetycznych, polegającą na przyłączeniu grupy metylowej (CH_3) do węgla w piątej pozycji pierścienia cytozyny. W prawidłowym DNA około 70-80% dinukleotydów CpG charakteryzuje się obecnością metylowanej cytozyny (8). Lokalizacja sekwencji CpG w genomowym DNA nie jest przypadkowa – ok. 30% z nich zorganizowanych jest w tak

zwane wyspy CpG, czyli powtarzalne regiony o wielkości 500-5000 pz, umiejscowione w rejonach promotorów genów lub w ich sąsiedztwie (3, 37). Wiadomo obecnie, iż znaczna część metylowanych wysp CpG zlokalizowana jest w obrębie sekwencji niekodujących, w sekwencjach powtórzonych, centromerach i sekwencjach satelitarnych, natomiast niemetylowane wyspy CpG zlokalizowane są przede wszystkim w regionach genomu kodujących geny aktywne transkrypcyjnie (2). Metylacja DNA następuje po procesie replikacji, w obecności enzymu metylotransferazy DNA (DNMT) i S-adenozylometioniny (SAM), jako donora grupy metylowej (23, 41). Grupa poznanych do tej pory metylotransferaz obejmuje kilka białek enzymatycznych, w tym: DNMT1, DNMT1b, DNMT1o, DNMT1p, DNMT2, DNMT3a oraz DNMT3b z jego izoformą i DNMT3L (34). Aktywność każdej z metylotransferaz kontrolowana jest przez odmienne mechanizmy regulacyjne, a same enzymy zaangażowane są w odmienne procesy biologiczne. Wyróżnia się dwie główne podgrupy tych enzymów. Pierwsza obejmuje *de novo* metylotransferazy (przykładowo DNMT3a) zaangażowane w tworzenie specyficznego wzorca metylacji podczas gametogenezy i we wczesnym etapie rozwoju zarodka. Druga składa się z DNMT-az odpowiedzialnych za

utrzymanie wzoru metylacji w czasie podziału komórki, poprzez specyficzną metylację hemimetylowanego DNA (przykładowo DNMT1) (17).

Metylacja DNA w komórkach nowotworowych

Komórki somatyczne organizmów eukariotycznych charakteryzują się określonym wzorem metylacji, który podczas podziałów mitotycznych przekazywany jest komórkom potomnym (50). Zmiany dziedzicznego wzorca metylacji, w złożonym procesie transformacji nowotworowej, mogą prowadzić do zaburzeń w profilu ekspresji genów i w rezultacie przyczyniać się do dalszej neoplastycznej transformacji tkanek. Metylacja DNA w procesie kancerogenezy może także skutkować powstaniem mutacji punktowych, jako wynik metylacji cytozyny, a następnie spontanicznej deaminacji 5-metylocytozyny do tyminy (35). W ludzkich komórkach nowotworowych tranzykcje C>T w obrębie dinukleotydów CpG stanowią 25% mutacji genowych (15). Podczas nowotworzenia w procesie metylacji DNA mogą wystąpić dwa główne typy zaburzeń, których efekt przejawia się w zmianie aktywności transkrypcyjnej genów. Zaburzenia te mogą być konsekwencją przyłączenia grup metylowych do cytozyn w niemetylowanych sekwencjach DNA (metylacja *de novo*), skutkując wzrostem stopnia metylacji (hipermetylacja) lub być wynikiem demetylacji, czyli obniżenia poziomu metylacji DNA (hipometylacja) (13, 35, 48).

Hipermetylacja wysp CpG w transformacji nowotworowej

Lokalna hipermetylacja wysp CpG istotna w procesie transformacji nowotworowej związana jest z rejonami promotorowymi genów supresorowych transformacji nowotworowej (Tumor Suppressor Gene, TSG). Są to przede wszystkim geny białek związanych z regulacją cyklu komórkowego, apoptozy i naprawą DNA, ale również geny, których produkty białkowe zaangażowane są w takie procesy, jak różnicowanie, angiogeneza, detoksykacja czy oporność na leki (10). Konsekwencje wyciszenia tych genów są oczywiste. Po pierwsze, komórka pozbawiona zostaje niezbędnych ograniczeń w proliferacji, co więcej – zaburzeniom podlega program apoptozy, a ograniczenie wydajności naprawy DNA może dodatkowo przyczynić się do dalszej akumulacji mutacji somatycznych.

Hipermetylacja genów supresorów nowotworowych, jest charakterystyczna dla wielu typów nowotworów występujących u ludzi, w tym m.in. guzów jelita grubego, jąder, jajnika, a także białaczki szpikowej (14, 27). Co ciekawe, zaobserwowano, iż pewne geny są powszechnie metylowane w wielu rodzajach nowotworów. Dla przykładu, gen supresorowy THBS1 jest często wyciszany na drodze metylacji promotora w raku okrężnicy (36) czy w przypadku nerwiaka (53). Inne geny są natomiast metylowane tylko w określonych typach guzów, jak na przykład gen GSTP1. Hipermetylację promotora tego genu odnotowano w ponad 90% przy-

padków raka prostaty, z drugiej strony, w dużej mierze jest on niemetylowany w ostrej białaczce szpikowej (25, 30). Istnieje szereg przykładów nowotworów charakteryzujących się większym lub mniejszym stopniem hipermetylacji jednego lub większej liczby genów. Jednym z bardziej szczegółowo opisanych jest rak płuc, w którym do 2002 r. zidentyfikowano ponad 40 genów charakteryzujących się zmianami w poziomie metylacji DNA (46).

Określenie zmian epigenetycznych może posłużyć do opracowania paneli genów, u których metylacja promotorów może być skorelowana z wystąpieniem danego schorzenia. Dla przykładu, badania przeprowadzone przez Melnikov i wsp. (31) pozwoliły opracować zestaw biomarkerów (BRCA1, CCND2, CDKN1A, GSTP, MYF3, RPL15 i TRANCE) dla zmian metylacji, który może zostać wykorzystany w diagnostyce raka kolczystokomórkowego skóry. Ponadto, hipermetylacja niektórych genów supresji nowotworowej korelowana jest ze stadium rozwoju choroby i z gorszym rokowaniem w różnych typach nowotworów. Dla przykładu, hipermetylację regionu promotorowego genu THBS1 wykryto w przerzutach guzów litych do mózgu, takich jak czerniaka czy raka płuc (18). Z kolei hipermetylację RASSF1A wykryto w stadium IV, ale nie obserwowano w I i II etapie progresji czerniaka. Sugeruje to, że zmiany w poziomie metylacji promotora RASSF1A mogą być w przyszłości wykorzystane jako jeden z markerów progresji nowotworu (45).

Hipometylacja wysp CpG w transformacji nowotworowej

Demetylacja wysp CpG związana z procesem nowotworzenia najczęściej dotyczy sekwencji powtarzalnych, występujących w obrębie heterochromatyny, retrotranspozonów, a także endogennych elementów retrowirusowych. Konsekwencją tego procesu może być ogólna destabilizacja genomu, wynikająca z aktywacji mobilnych elementów genetycznych lub powstawanie mutacji będących następstwem nieprawidłowej rekombinacji tandemowych powtórzeń (6, 11, 27). Hipometylacja DNA przyczynia się również do nadekspresji protoonkogenów, czynników wzrostu i genów, których produkty białkowe zaangażowane są w proliferację komórek nowotworowych oraz ich inwazję i przerzuty (43). Obniżenie poziomu metylacji DNA zostało zaobserwowane między innymi w przypadku raka wątroby (26) oraz raka szyjki macicy (24). Co więcej, globalna hipometylacja DNA występująca w takich nowotworach, jak rak piersi, rak szyjki macicy i mózgu, wzrasta wraz ze stopniem złośliwości guza (12). W procesie kancerogenezy często obserwowanym zjawiskiem jest demetylacja sekwencji LINE (Long Interspersed Nuclear Elements). Dostępne wyniki badań (28) wskazują, iż hipometylacja w obrębie promotora LINE1 może prowadzić do zwiększenia jego transkrypcji *in vivo* oraz transpozycji jego elementów do nowych *loci* genomu, skutkując powstaniem nowych mutacji

somatycznych. Omawiany problem dotyczy między innymi protoonkogenu CMYC oraz genu APC inaktywowanych przez insercję *de novo* elementów LINE1, odpowiednio, w raku piersi i okrężnicy (9).

Chociaż globalna hipometylacja DNA okazała się stosunkowo częstym zjawiskiem w przypadku wielu nowotworów, to informacje dotyczące docelowych genów regulowanych przez hipometylację w tych schorzeniach są nieliczne. Badania ostatnich lat dowodzą wyraźnego udziału demetylacji DNA w aktywacji genów w komórkach nowotworowych, w tym genów, o możliwym działaniu onkogennym. Przykład stanowi gen R-RAS w raku żołądka (32) czy WNT5A, CRIP1 i S100P w raku prostaty (47).

Metody oznaczania metylacji DNA

Obecnie dostępnych jest wiele technik umożliwiających jakościowe i ilościowe oznaczenie metylocytozyny (5mC) w DNA, zarówno w obrębie pojedynczych genów, jak i całego genomu (ryc. 1). Globalna metylacja może dostarczyć wstępnych informacji na temat zmian w całkowitej liczbie metylocytozyn w wyspach CpG. Ocenia się ją w głównej mierze poprzez określenie stosunku 5mC do niemetylowanej cytozyny w badanej próbce DNA. Do tych celów wykorzystać można wysokosprawną chromatografię cieczową (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) (16) lub wysokosprawną elektroforezę kapilarną (High Performance Capillary Electrophoresis, HPCE). Wadą tych technik jest wymóg wykorzystania do analiz dużej ilości, wysokiej jakości genomowego DNA (40). Innym rozwiązaniem w globalnej analizie metylacji jest analiza wzorów metylacji powtarzalnych sekwencji DNA. Elementy takie, jak Alu i LINE1, reprezentują pulę tysięcy *loci* genomowych, dzięki czemu zawartość

metylocyzozy w ich sekwencjach wykorzystywana jest do oceny globalnego poziomu metylacji DNA (52).

Analiza stopnia metylacji poszczególnych genów wymaga amplifikacji sekwencji docelowej. W związku z tym, że polimerazy DNA stosowane w reakcji PCR (Polymerase Chain Reaction) nie odróżniają cytozyny od metylocytozyny, konieczne jest zastosowanie specyficznych względem zmetylowanych cytozyn enzymów restrykcyjnych (Methylation Sensitive Restriction Enzymes, MSRE) lub związków chemicznych przekształcających niemetylowane cytozyny w pochodne (przykładowo wodorosiarczany sodu) umożliwiające ich rozróżnienie. Metodę MSRE można stosować, gdy zakłada się znaczny udział 5mC w badanych fragmentach DNA, natomiast nie jest to technika rekomendowana do analizy hipometylacji promotorów genów (28). Powszechnie stosowanym rozwiązaniem w analizie metylacji DNA na poziomie sekwencji jest amplifikacja i sekwencjonowanie DNA traktowanego bisulfitem (Bisulfite Sequencing Polymerase Chain Reaction, BS-PCR). W technice tej amplifikację matrycy DNA poprzedza konwersja niemetylowanych cytozyn do uracylu, w reakcji jednoniciowego DNA z wodorosiarczaniem sodu. Podczas reakcji PCR powstały wcześniej uracyl zastępowany jest tyminą, natomiast 5mC nie podlegająca konwersji amplifikowana jest jako cytozyna. Uzyskane produkty amplifikacji mogą być bezpośrednio sekwencjonowane rutynowo stosowaną metodą Sangera, umożliwiając ocenę jakościową metylacji DNA. Produkty reakcji BS-PCR mogą też zostać sklonowane w komórkach bakteryjnych, a następnie zsekwencjonowane, dostarczając informacji niezbędnych do określenia wzoru metylacji z dokładnością do jednego nukleotydu oraz ilościowego udziału metylowanych cytozyn. Dodatkowo analiza

Ryc. 1. Schemat przedstawiający klasyfikację metod analizy metylacji DNA (40)

sekwencji produktów BS-PCR pozwala ocenić stopień konwersji bisulfitowej w badanej próbce i równocześnie umożliwia wykrycie polimorfizmów w sekwencji DNA. Mankamentem metody oceny metylacji DNA bazującej na traktowaniu DNA wodorosiarczynem sodowym jest występowanie w sekwencjach po konwersji stosunkowo długich (> 9 zasad) ciągów poli-T, co prowadzić może do niespecyficznego przyłączania starterów w reakcji PCR lub błędów polimerazy w inkorporacji nukleotydów w trakcie elongacji łańcucha DNA. Efektem tego jest mniej wydajny proces amplifikacji i trudności w reakcji sekwencjonowania metodą Sangera. Do analizy sekwencji produktów BS-PCR wykorzystuje się także pirosekwencjonowanie. Sekwencjonowanie w czasie rzeczywistym pozwala na uzyskanie wyników nie tylko jakościowych, ale także przeprowadzenie ilościowej analizy metylacji dla maksymalnie 10 miejsc CpG w badanym fragmencie DNA. Do technik wykorzystujących wodorosiarcznan sodu oraz amplifikację PCR do oceny metylacji DNA zaliczyć można również metylo-specyficzny PCR-MSP (z zastosowaniem dwóch typów starterów specyficznych do zmetylowanych oraz niezmetylowanych miejsc CpG) (22) oraz metodę bisulfitową połączoną z analizą restrykcyjną – COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis) (51). Kolejną grupę metod stanowią techniki oparte na reakcji amplifikacji w czasie rzeczywistym, w tym metoda analizy krzywej topnienia fragmentów DNA trawionych restryktazami wrażliwymi na metylację – MS-HRM (Methylation Sensitive High Resolution Melting) (49) oraz metoda Methy Light PCR, wykorzystująca wiązanie sond typu TaqMan do badania poziomu metylacji w obrębie danego *locus* (33).

Techniki badań metylacji DNA wykorzystujące wysokoprzepustową analizę genomu

Rozwój technologii sekwencjonowania nowej generacji (Next Generation Sequencing, NGS) dał sposobność analizy metylacji sekwencji nukleotydowej w skali całego genomu (analizy metylomu). Obecnie dostępnych jest kilka podejść metodycznych pozwalających na analizę metylomu, które w głównej mierze oparte są o NGS bądź technologię badań na mikromacierzach DNA (38). W zakresie technik analiz metylomu wykorzystujących NGS wyróżnia się metody oparte na „wzbogacaniu” analizowanej frakcji regionów DNA w sekwencje o podwyższonej zawartości dinukleotydów CpG, poprzez użycie przeciwciał przeciwko 5-metylocytozynie (5mC) (technika MeDIP-seq, Methylated DNA Immuno-Precipitation Sequencing) (44) lub zastosowanie domen wiążących metylowane sekwencje CpG (technika MBD-seq (Methylated DNA Binding Domain Sequencing) oraz metoda MethylCap-seq (Methyl Capture Sequencing) (5, 39). Inną z metod jest technika MRE-seq (Methylation-sensitive Restriction Enzyme Sequencing), która do selekcji regionów bogatych w miejsca CpG wykorzystuje enzymy restrykcyjne wrażliwe na metylację (1). Kolejną grupę

stanowią metody NGS oparte na sekwencjonowaniu DNA po konwersji bisulfitowej, w której wyróżnia się metodę WGBS (Whole Genome Bisulfite Sequencing) pozwalającą na ocenę metylacji pełnej sekwencji całego genomu oraz technikę RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing) nakierowaną na analizę metylacji frakcji genomu bogatej w dinukleotydy CpG (29). Dostępne techniki oparte na NGS zapewniają dokładny pomiar poziomu metylacji DNA i mogą być stosowane do wykrywania regionów o różnicowej metylacji w badaniach klinicznych (4). Wymienione metody pozwalają w dużej mierze na uzyskanie porównywalnych wyników w zakresie poziomu metylacji. Metody te charakteryzują się jednak różnicami pod względem uzyskiwanej informacji o stopniu pokrycia CpG w analizowanych regionach genomu oraz zdolności do wykrywania metylo-cytozyny w miejscach innych niż dinukleotydy CpG (21). Pod względem dokładności metody oparte na konwersji wodorosiarczaniem (RRBS, mikromacierze metylacyjne typu Infinium) są nieco lepsze niż metody wykorzystujące wzbogacanie sekwencjonowanych regionów DNA i nie wymagają dodatkowej korekty odnośnie do zawartości par CG. Co więcej, analiza porównawcza wykazała, iż zastosowanie metody MethylCap pozwala na wykrycie mniej więcej dwukrotnie większej liczby regionów o różnicowej metylacji aniżeli użycie metody MeDIP. RRBS, pod względem wydajności wykrywania regionów o różnicowej metylacji (Differentially Methylated Region, DMR) jest metodą plasującą się pomiędzy technikami MethylCap i MeDIP, natomiast zastosowanie technologii mikromacierzy metylacyjnych typu Infinium umożliwia wykrycie zaledwie 20% DMR zidentyfikowanych z użyciem metod opartych na sekwencjonowaniu NGS (4). Zastosowanie mikromacierzy do analizy poziomu metylacji uzasadnione jest zatem w przypadku dużej liczby prób oraz w odniesieniu do badań zmian poziomu metylacji w pełni scharakteryzowanych genów (7).

W grupie metod wykorzystujących sekwencjonowanie DNA po konwersji bisulfitowej technika WGBS pozwala na dokładną analizę poziomów metylacji dla każdej cytozyny w genomie i generuje kompletne mapy metylomu, jednak ze względu na wymaganą dokładność sekwencjonowania (głębokość pokrycia oznaczaną liczbą dopasowanych odczytów sekwencyjnych) jest stosunkowo kosztowna. Częściej stosowanym rozwiązaniem jest analiza metylacji z użyciem techniki RRBS, która obniża koszty sekwencjonowania poprzez analizę reprezentatywnej części genomu w odniesieniu do regionów bogatych w sekwencje CpG. Prezentowane podejście umożliwia analizę około 85% wszystkich wysp CpG i promotorów w przybliżeniu 60% genów, co więcej, wymaga niewielkiej ilości wyjściowego DNA (20). Oczywistą wadą techniki RRBS jest fakt, iż nie uwzględnia ona wszystkich miejsc genomu bogatych w sekwencje CpG oraz wymusza konieczność analizy uzyskanych danych z wykorzystaniem specjalnych programów bioinformatycznych.

Każda z przedstawionych technik ma swoje wady i zalety, nie będąc uniwersalną w odniesieniu do typu materiału badawczego i celu planowanych analiz (ryc. 1). Wybierając odpowiednią metodę analizy należy uwzględnić ilość dostępnego DNA, rodzaj i jakość analizowanych prób, jak również czułość oraz specyficzność stosowanej metody.

Piśmiennictwo

- Ball M. P., Li J. B., Gao Y., Lee J. H., LeProust E. M., Park I. H., Xie B., Daley G. Q., Church G. M.: Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. *Nat. Biotechnol.* 2009, 27, 361-368.
- Baylin S. B., Herman J. G.: DNA hipermetylation in tumorigenesis: Epigenetics joins genetics. *Trends Genet.* 2000, 16, 168-174.
- Bird A. P.: CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus. *Trends Genet.* 1987, 3, 342-347.
- Bock C., Tomazou E. M., Brinkman A., Müller F., Simmer F., Gu H., Jäger N., Gnirke A., Stunnenberg H. G., Meissner A.: Genome-wide mapping of DNA methylation: a quantitative technology comparison. *Nat. Biotechnol.* 2010, 28, 1106-1114.
- Brinkman A. B., Simmer F., Ma K., Kaan A., Zhu J., Stunnenberg H. G.: Whole-genome DNA methylation profiling using MethylCap-seq. *Methods* 2010, 52, 232-236.
- Choi S. H., Worswick S., Byun H. M., Shear T., Soussa J. C., Wolff E. M., Douer D., Garcia-Manero G., Liang G., Yang A. S.: Changes in DNA methylation of tandem DNA repeats are different from interspersed repeats in cancer. *Int. J. Cancer* 2009, 125, 723-729.
- Clark C., Palta P., Joyce C. J., Scott C., Grundberg E., Deloukas P., Palotie A., Coffey A. J.: A comparison of the whole genome approach of MeDIP-seq to the targeted approach of the Infinium HumanMethylation450 BeadChip for methylome profiling. *PLoS One* 2012, 7:e50233.
- Cooper D. N., Krawczak M.: Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomes. *Hum. Genet.* 1989, 83, 181-188.
- Costello J. F., Plass C.: Methylation matters. *J. Med. Genet.* 2001, 38, 285-303.
- Das P. M., Singal R.: DNA Methylation and Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2004, 22, 4632-4642.
- Ehrlich M.: DNA hipomethylation, cancer, the immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies syndrome and chromosomal rearrangements. *J. Nutr.* 2002, 132, 2424-2429.
- Ehrlich M.: DNA methylation in cancer: Too much, but also too little. *Oncogene* 2002, 21, 5400-5413.
- Esteller M.: Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat. Rev. Genet.* 2007, 8, 286-298.
- Esteller M., Corn P. G., Baylin S. B., Herman J. G.: A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 2001, 61, 3225-3229.
- Fabianowska-Majewska K.: Rola metylacji DNA w procesie karcinogenezy. *Acta Haematol. Pol.* 2000, 31, 399-406.
- Feinberg A. P., Vogelstein B.: Hipomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983, 301, 89-92.
- Goll M. G., Bestor T. H.: Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* 2005, 74, 481-514.
- Gonzalez-Gomez P., Bello M. J., Alonso M. E., Amiñoso C., Lopez-Marin I., De Campos J. M., Isla A., Gutierrez M., Rey J. A.: Promoter methylation status of multiple genes in brain metastases of solid tumors. *Int. J. Mol. Med.* 2004, 13, 93-98.
- Gräff J., Mansuy I. M.: Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behav. Brain Res.* 2008, 192, 70-87.
- Gu H., Smith Z. D., Bock C., Boyle P., Gnirke A., Meissner A.: Preparation of reduced representation bisulfite sequencing libraries for genome-scale DNA methylation profiling. *Nat. Protoc.* 2011, 6, 468-481.
- Harris R. A., Wang T., Coarfa C., Nagarajan R. P., Hong C., Downey S. L., Johnson B. E., Fouse S. D., Delaney A., Zhao Y., Olshen A., Ballinger T., Zhou X., Forsberg K. J., Gu J., Echipare L., O'Geen H., Lister R., Pelizzola M., Xi Y., Epstein C. B., Bernstein B. E., Hawkins R. D., Ren B., Chung W. Y., Gu H., Bock C., Gnirke A., Zhang M. Q., Haussler D., Ecker J. R., Li W., Farnham P. J., Waterland R. A., Meissner A., Marra M. A., Hirst M., Milosavljevic A., Costello J. F.: Comparison of sequencing-based methods to profile DNA methylation and identification of monoallelic epigenetic modifications. *Nat. Biotechnol.* 2010, 28, 1097-1105.
- Herman J. G., Graff J. R., Myöhänen S., Nelkin B. D., Baylin S. B.: Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93, 9821-9826.
- Jones P. A.: DNA methylation errors and cancer. *Cancer Res.* 1996, 56, 2463-2467.
- Kim Y. I., Giuliano A., Hatch K. D., Schneider A., Nour M. A., Dallal G. E., Selhub J., Mason J. B.: Global DNA hipomethylation increases progressively in cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer* 1994, 74, 893-899.
- Lee W. H., Morton R. A., Epstein J. I., Brooks J. D., Campbell P. A., Bova G. S., Hsieh W. S., Isaacs W. B., Nelson W. G.: Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, 11733-11737.
- Lin C. H., Hsieh S. Y., Sheen I. S., Lee W. C., Chen T. C., Shyu W. C., Liaw Y. F.: Genome-wide hipomethylation in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res.* 2001, 61, 4238-4243.
- Luczak M. W., Jagodzinski P. P.: The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2006, 44, 143-154.
- Majchrzak A., Baer-Dubowska W.: Markery epigenetyczne w diagnostyce: Metody oceny metylacji DNA. *Diagnostyka Laboratoryjna* 2009, 45, 167-173.
- Meissner A., Gnirke A., Bell G. W., Ramsahoye B., Lander E. S., Jaenisch R.: Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res.* 2005, 33, 5868-5877.
- Melki J. R., Vincent P. C., Clark S. J.: Concurrent DNA hipermetylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer Res.* 1999, 59, 3730-3740.
- Melnikov A., Shrestha S., Yi Q., Replogle C., Borgia J., Bonomi P., Liptay M., Ugolini D., Neri M., Verri C., Sozzi G., Levenson V.: Non-Small Cell Lung Cancer can be Detected and its Subtypes Differentiated by a Blood Test of Methylation in Cell-Free DNA from Plasma. *JSM Biomed.* 2004, 1, 1003.
- Nishigaki M., Aoyagi K., Danjoh I., Fukaya M., Yanagihara K., Sakamoto H., Yoshida T., Sasaki H.: Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hipomethylation in gastric cancer using microarrays. *Cancer Res.* 2005, 65, 2115-2124.
- Ogino S., Kawasaki T., Brahmandam M., Cantor M., Kirkner G. J., Spiegelman D., Makrigiorgos G. M., Weisenberger D. J., Laird P. W., Loda M., Fuchs C. S.: Precision and performance characteristics of bisulfite conversion and real-time PCR (MethylLight) for quantitative DNA methylation analysis. *J. Mol. Diagn.* 2006, 8, 209-217.
- Robertson K. D.: DNA methylation and chromatin: Unraveling the tangled web. *Oncogene* 2002, 21, 5361-5379.
- Robertson K. D., Jones P. A.: DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis* 2002, 21, 461-467.
- Rojas A., Meherem S., Kim Y. H., Washington M. K., Willis J. E., Markowitz S. D., Grady W. M.: The aberrant methylation of TSP1 suppresses TGF-beta1 activation in colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 2008, 123, 14-21.
- Saxonov S., Berg P., Brutlag D. L.: A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103, 1412-1417.
- Schumacher A., Kapranov P., Kaminsky Z., Flanagan J., Assadzadeh A., Yau P., Virtanen C., Winegarden N., Cheng J., Gingeras T., Petronis A.: Microarray-based DNA methylation profiling: technology and applications. *Nucleic Acids Res.* 2006, 34, 528-542.
- Serre D., Lee B. H., Ting A. H.: MBD-isolated Genome Sequencing provides a high-throughput and comprehensive survey of DNA methylation in the human genome. *Nucleic Acids Res.* 2010, 38, 391-399.
- Shen L., Waterland R. A.: Methods of DNA methylation analysis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2007, 10, 576-581.
- Smith S. S.: Biological implication of the mechanism of action of human DNA cytosine-5-methyltransferase. *Progress Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.* 1994, 49, 65-111.
- Solaroglu I., Zhang J. H.: The neurosurgical role of epigenome. *Surg. Neurol.* 2009, 71, 159-160.
- Szyf M., Pakneshan P., Rabbani S. A.: DNA methylation and breast cancer. *Biochem. Pharmacol.* 2004, 68, 1187-1197.
- Taiwo O., Wilson G. A., Morris T., Seisenberger S., Reik W., Pearce D., Beck S., Butcher L. M.: Methylome analysis using MeDIP-seq with low DNA concentrations. *Nat. Protoc.* 2012, 7, 617-636.
- Tanemura A., Terando A. M., Sim M. S., van Hoesel A. Q., de Maat M. F., Morton D. L., Hoon D. S.: CpG Island Methylator Phenotype Predicts Progression of Malignant Melanoma. *Clin. Cancer Res.* 2009, 15, 1801-1807.
- Tsou J. A., Hagen J. A., Carpenter C. L., Laird-Offringa I. A.: DNA methylation analysis: A powerful new tool for lung cancer diagnosis. *Oncogene* 2002, 21, 5450-5461.
- Wang Q., Williamson M., Bott S., Brookman-Amissah N., Freeman A., Naricula J., Hubank M. J., Ahmed A., Masters J. R.: Hipomethylation of WNT5A, CRIP1 and S100P in prostate cancer. *Oncogene* 2007, 26, 6560-6565.
- Watson R. E., Curtin G. M., Doolittle D. J., Goodman J. I.: Progressive alteration in global and GC-rich DNA methylation during tumorigenesis. *Toxicol. Sci.* 2003, 75, 289-299.
- Wojdacz T. K., Dobrovic A.: Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res.* 2007, 35:e41.
- Worm J., Guldberg P.: DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. *J. Oral Pathol. Med.* 2002, 32, 443-449.
- Xiong Z., Laird P. W.: COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res.* 1997, 25, 2532-2534.
- Yang A. S., Estecio M. R., Doshi K., Kondo Y., Tajara E. H., Issa J. P.: A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res.* 2004, 32:e38.
- Yang Q. W., Liu S., Tian Y., Salwen H. R., Chlenski A., Weinstein J., Cohn S. L.: Methylation associated silencing of the thrombospondin-1 gene in human neuroblastoma. *Cancer Res.* 2003, 63, 6299-6310.

Adres autora: dr inż. Ewelina Semik-Gurgul, ul. Krakowska 1, 32-083 Balice; e-mail: ewelina.semik@izoo.krakow.pl