

Análisis de la metilación de CFTR, HTR1B, GSTM2 y PENK en líneas celulares tumorales

Xandra Pereiro Díez* y Santiago Roperó

Departamento de Bioquímica y Biología molecular, Facultad de medicina, Universidad de Alcalá, 28871, Madrid.

Resumen

Las modificaciones epigenéticas regulan la expresión génica pero no producen cambios en la secuencia nucleotídica. La metilación del DNA es la modificación epigenética mejor estudiada en cáncer, y en concreto el silenciamiento de genes por hipermetilación de su promotor, que es un cambio importante que puede ser de utilidad para el diagnóstico precoz de la enfermedad. En este trabajo nos hemos centrado en el análisis de la metilación y expresión de CFTR, HTR1B, GSTM2 y PENK, en líneas celulares de cáncer de próstata, mama, neuroblastoma, piel, colon, pulmón, cervix y tiroides. Los resultados obtenidos nos indican que la metilación de estos genes no es un hecho específico de un solo tipo tumoral ya que se encuentran metilados en al menos una línea celular de todos los tipos de tumores analizados. En la mayor parte de los casos la metilación del promotor provoca una disminución en los niveles de mRNA y proteína. Además, la pérdida de metilación inducida por el tratamiento con agentes desmetilantes provoca la reexpresión de los genes metilados, lo que confirma la relación entre metilación y pérdida de expresión.

Palabras clave: epigenética, metilación del DNA, cáncer, CFTR, HTR1B, GSTM2, PENK.

Cita: Pereiro X, Roperó S (2013) Análisis de la metilación de CFTR, HTR1B, GSTM2 y PENK en líneas celulares tumorales. *Dianas* 2(1): e20130305. ISSN 1886-8746 [dianas.20130305 URI](http://dianas.20130305.URI)

Editores: María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Recibido: 6 de julio, 2012

Copyright: © 2013 Pereiro y Roperó. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.es_ES

*E-mail: xandra.pereiro@gmail.com



Introducción

La patogenia del cáncer incluye mecanismos genéticos y epigenéticos además de múltiples factores ambientales. Se entiende por "epigenética" cualquier alteración de la expresión génica, potencialmente hereditaria, que no se acompaña de ninguna modificación en la secuencia del ADN. Está bien establecido que las alteraciones epigenéticas aparecen en estadios precoces del cáncer sin necesidad de mutaciones previas a su desarrollo. Las alteraciones epigenéticas provocan cambios en la expresión génica y alteraciones en la estructura de la cromatina que juegan un papel muy importante en la cascada de iniciación y progresión del cáncer [1] [2].

Las modificaciones epigenéticas mejor estudiadas son la metilación del DNA, las modificaciones postraduccionales de las histonas y los pequeños RNAs no codificantes (miRNAs). De estas, la metilación del DNA, es la alteración epigenética mejor estudiada en cáncer. La metilación del DNA consiste en la adición de un grupo metilo en la posición 5' de la citosina que precede a una guanina (dinucleótido CpG). Esta reacción es llevada a cabo por unas enzimas denominadas DNA metiltransferasas (DNMTs) que utilizan S-adenosilmetionina (SAM) como donante de grupos metilo. La metilación del DNA tiene como función el silenciamiento génico jugando, por tanto, un papel muy importante en la regulación de la expresión génica y en la organización de la cromatina. [3] [4]

La distribución de las CpGs no es uniforme a lo largo de todo el genoma. La mayoría de las CpGs, que supone el 70% del total, están localizadas en el cuerpo de los genes y secuencias repetitivas del ADN, que incluyen regiones centroméricas, secuencias satélite, y se encuentran metiladas [5]. El 30% restante se encuentra en las islas CpG, secuencias de aproximadamente 1 Kb que fundamentalmente se encuentran en la región promotora de más del 60% de los genes humanos. Con algunas excepciones, como es el caso de uno de los cromosomas X en mujeres, los genes específicos de tejidos y los genes imprintados, en células normales las islas CpGs no están metiladas y permiten, si los factores de transcripción están presentes, la expresión del gen [6].

En cáncer se producen alteraciones en los patrones de metilación que consisten por un lado una hipometilación global de las citosinas que afecta fundamentalmente a las secuencias repetitivas satélite y

regiones pericentroméricas y que provoca un riesgo de rotura al cromosoma, conduciendo directamente a una inestabilidad génómica [7] [8]. Además, la hipometilación puede afectar a los promotores provocando el aumento de expresión de genes silenciados. Por otro lado, y de modo paralelo, se produce una hipermetilación de las regiones promotoras de un gran número de genes supresores de tumores impidiendo su expresión. Además, esta alteración epigenética es altamente específica del tipo tumoral, sin que se conozca todavía a que es debido. Esto quiere decir que hay genes o grupos de genes que están metilados en cada tipo tumoral. Por tanto, el perfil de metilación ayuda a distinguir los tipos y subtipos de tumores, así como a conocer el pronóstico y predecir la respuesta a los agentes quimioterápicos. Los cambios en la metilación son un hecho temprano en el desarrollo del cáncer y por lo tanto puede ser de utilidad en el diagnóstico precoz de esta enfermedad[9] [10].

En un estudio realizado recientemente en nuestro laboratorio en el que se ha definido el perfil de metilación del cáncer de próstata se han identificado nuevos genes hipermetilados en este tipo de tumor y con importantes funciones en el mantenimiento de la homeostasis celular. Entre ellos se encuentran GSTM2, HTR1B, PENK y CFTR, de los que hemos demostrado que se metilan en un elevado porcentaje de tumores y que podrían ser de utilidad en el diagnóstico y pronóstico de esta enfermedad. GSTM2 es una enzima que participa en los procesos de desintoxicación de fase 2, por lo que su inactivación por hipermetilación del promotor podría sensibilizar a las células al daño causado por carcinógenos dietéticos y oxidantes inflamatorios. HTR1B, codifica para el receptor de serotonina, que además de regular importantes funciones en el sistema nervioso tiene un papel determinante en pulmón y sistema vascular. CFTR pertenece a una superfamilia de proteínas que transportan diversas moléculas a través de membranas celulares, y están implicados en resistencia a múltiples fármacos. PENK, codifica para la proencefalina implicada en la inducción de apoptosis mediada por p53, por lo que su pérdida de expresión por metilación podría tener relevancia en cáncer ya que la pérdida de control sobre los procesos de apoptosis es una de las alteraciones relacionadas con el desarrollo de esta patología [11].

Dada la importancia de la función de estos genes y los resultados obtenidos en tumores de próstata, en el presente trabajo se analizó el estado de metilación y expresión de los cuatro genes mencionados en diferentes líneas celulares de diferentes tipos tumorales para conocer si su pérdida de expresión por metilación tiene alguna relevancia en otros tipos de cancer.

Material y Métodos

Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares de cáncer de próstata: PC3, LNCAP, próstata normal: RWPE, de cáncer de piel: A431, de mama normal: NBL100, de cáncer de mama: MCF7, BT474, T47D, MDA-MB-231, de neuroblastoma: IMR5 y Lan1, de cáncer de tiroides: WRO, de cáncer de colon: RKO, CO115, SW480, SW48 y HCT15, de cáncer pulmón: A549 y H522, de cáncer de hígado: HEPG2 y de cáncer de cérvix: HELA y SIHA, fueron cultivadas y mantenidas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) o RPMI (Roswell Park Memorial Institute médium) suplementado con 10% suero fetal bovino, 50 U/ml Penicilina/Streptomina según la línea celular y en el caso de las RWPE, Keratinocyte Serum Free Medium (K-SFM), en condiciones de esterilidad en un incubador a 37° C y un 5% de CO₂. Las líneas celulares LNCap, MCF7, MDA-MB-231, se trataron con 2 y 5 µM del agente desmetilante 5'-aza-2'-deoxicitidina durante 72 horas.

Extracción DNA

Para la extracción de DNA de las líneas celulares, las células se resuspendieron en tampón proteinasa K (1M de Tris pH 8,1, ClNa 2,5M, EDTA 0,5M, SDS 1%) (100µl/ml) y se incubó a 37°C toda la noche. Tras la incubación se añadió cloruro sódico 1,5 M y se centrifugó a 3000 rpm, 15 minutos. Después se añadió un volumen de isopropanol al 100% para precipitar el DNA. Por último el DNA se precipitó y se lavó tres veces con etanol al 70% mediante centrifugación a 13000 rpm 5 min, y una vez seco se resuspendió en agua miliQ esteril. y se conservó a -20°C.

Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó usando TRIZOL y siguiendo el protocolo del fabricante. Las células se homogenizaron con 1 ml de TRIZOL y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 200 µl de cloroformo por ml de TRIZOL usado, se agitaron y se incubaron 3 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se centrifugaron a 12000xg 15 minutos a 4° y se extrajo la fase acuosa donde está el RNA. Este se precipitó con 500 µl de isopropanol por ml de TRIZOL. Se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó a 12000xg 10 minutos a 4°. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol 75% (1ml etanol 75% por ml de TRIZOL). Se mezcló y se centrifugó a 7500xg 5 minutos a 4°. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet, cuando estuvo

completamente seco se añadió agua libre de RNasa (DEPC) y se incubó durante 10 minutos a 55-60°. A continuación el RNA fue almacenado a -80°.

Extracción de proteína

Para la obtención de los extractos proteicos se realizó una lisis celular con tampón RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 1% Nonidet NP40, 0,5% deoxicolato sódico, 0,1% SDS) al que se añadió inhibidores de proteasas. Una vez resuspendidas las muestras se incubaron en hielo durante 30 minutos y se centrifugaron a 13000 rpm, 20 minutos a 4° C. Se recogió el sobrenadante, que contiene el extracto proteico, y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford utilizando el Kit Bio-Rad Protein Assay. Las muestras se conservaron a -80° C hasta su utilización.

Análisis de la metilación del DNA para CFTR, HTR1B, GSTM2 y PENK

Modificación con bisulfito sódico

El tratamiento con bisulfito sódico nos permite discriminar entre secuencias metiladas y no metiladas ya que convierte las citosinas no metiladas en timidinas, mientras que las citosinas metiladas son resistentes a la reacción por lo que permanecen sin cambios.

Para la modificación con bisulfito se partió de 1 µg de DNA en 50 µl de H₂O. Seguidamente se añadió 5,7 µl de NaOH 3M y se incubó 15 minutos a 37°, para desnaturalizar el DNA y hacerlo sensible al tratamiento con bisulfito sódico. A continuación se añadieron 33 µl de hidroquinona 20 mM y 530 µl de bisulfito sódico 4,3 M pH 5. Se mezcló bien y se dejó incubar a 50° durante 16-17 horas en oscuridad. A continuación se llevó a cabo la purificación del DNA modificado. Para ello se utilizó Kit de DNA Cleanup (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante. Tras la purificación se añadieron 5,7 µl de NaOH y se incubó 20 minutos a 37°, para que se completara la conversión química de citosinas a timidinas. A continuación se precipitó el DNA modificado añadiendo 1 µl de glucógeno 10 mg/ml, 17 µl de acetato amónico 10 M, y 450 µl de etanol absoluto frío y se dejó a -80° toda la noche. Tras centrifugar a 13000 rpm a 4°, se tiró el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 ml de etanol 70%, y tras centrifugar en las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y se dejó secar al aire. Cuando el pellet estuvo seco se resuspendió en 25 µl de agua miliQ y se guardó a -20°.

PCR específica de metilación (MSP)

Para estos ensayos se diseñaron dos sets de primers específicos para cada uno de los genes a estudiar, uno para la secuencia metilada y otro para el caso de no estar metilado. Estos primers deben contener 2-3 CpGs para poder discriminar entre secuencias metiladas y no metiladas. Para cada muestra se llevaron a cabo dos reacciones de PCR, la de metilación y de la no metilación. Ambas reacciones, tanto la de metilación como la de no metilación se llevaron a cabo a unas temperaturas de anillamiento de 62° para CFTR, 56° para HTR1B, 52° para GSTM2 para el no metilado y 60° para el metilado y 57° para PENK. Los productos de la PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1,5%. Como control para la reacción de no metilación se usó DNA de linfocitos normales que había sido modificados con bisulfito sódico y como control de metilación se utilizó DNA de linfocitos metilados in vitro (IVD). Como control de la MSP se utilizó agua

Secuenciación de DNA tratado con bisulfito sódico

En este caso el DNA modificado con bisulfito se amplificó mediante PCR utilizando primers que este caso no deben contener CpGs en su secuencia, para así poder amplificar tanto los alelos metilados como los no metilados. La reacción de PCR se realizó a unas temperaturas de anillamiento de: 56° para CFTR, 52° para HTR1B, 56° para GSTM2 y 58° para PENK, durante 40 ciclos en un volumen final de 25 µl. Las secuencias amplificadas se clonaron en un vector (Easy Vector de Promega) y se enviaron a secuenciar para determinar el estado de metilación de cada muestra.

Obtención de cDNA

Para producir el cDNA se retrotranscribieron 4 µg de RNA total usando el ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen).

Cuantificación de la expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa.

Esta técnica nos permite cuantificar los niveles de mRNA de una muestra. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl que contenían 1000 ng de cDNA, Sybr Green 1X (Applied biosystem), y 100 nM de los primers (Sense + antisense). Como control endógeno se utilizó β-Actina. El análisis de los datos se realizó con el programa 7000 software v2.0.1.

Western-blotting

Para estos ensayos, se prepararon 30 µg de extracto proteico con el tampón de carga (Laemmli) y se analizaron en un gel de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS (SDS-PAGE). La electroforesis se llevó a cabo a 120 V en tampón de electroforesis

Una vez separadas las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (polyvinylidene fluoride) durante 75 minutos a 100 V en tampón de transferencia. A continuación se bloqueó la membrana durante una hora a temperatura ambiente en TTBS 1x con un 5 % de leche y se incubó con el anticuerpo primario contra GSTM2 (GSTM2 monoclonal antibody M03, clone 1E10, Abnova) a una dilución 1:500 en TTBS 1x con un 2% de leche durante toda la noche a 4° C. Tras lavar la membrana con TTBS 1x se incubó con el anticuerpo secundario (anti-Mouse) conjugado con la peroxidasa a una dilución 1:10000 en TTBS 1x con un 2 % de leche durante una hora a temperatura ambiente. Para la detección de la proteína marcada se utilizaron los reactivos ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Amersham™) y se expusieron a películas fotosensibles Ortho CP-& Plus films (Agfa).

Resultados y Discusión

Análisis del estado de metilación de CFTR, HTR1B, GSTM2 y PENK

Como hemos mencionado anteriormente, el objetivo de este estudio fue analizar el estado de metilación de PENK, GSTM2, CFTR y HTR1B en un gran número de líneas celulares correspondientes con varios tipos de tumores diferentes para de este modo conocer su relevancia en el desarrollo de esta patología. Para ello, en primer lugar, se crecieron todas las líneas celulares descritas en materiales y métodos, se aisló el DNA y lo modificamos con bisulfito sódico. A continuación determinamos el estado de metilación de estos genes en líneas celulares de cáncer de próstata, mama, colón, tiroides, cervix, pulmón, neuroblastoma y piel mediante MSP, los resultados obtenidos están resumidos en la tabla 1.

	CFTR	HTR1B	GSTM2	PENK
Próstata				
PC3	Red	Red	Green	Red
RWPE	Green	Green	White	Green
LNCAP	Red	Green	Red	Green
Mama				
MCF7	Red	Red	Red	Red
MDA-MB-231	Green	Red	Red	Red
T47D	Green	Red	Green	Green
NBL100	Red	Red	Red	Green
Colon				
RKO	Red	Green	Red	Red
CO115	Red	Red	Red	Red
SW48	Red	Green	Red	Red
SW480	Red	Green	Red	Red
HCT15	Green	Red	Red	Red
Piel				
A431	Red	Red	Red	Red
Neuroblastoma				
LAN1	Green	Red	Red	Red
IMR5	Green	Red	Green	Green
Tiroides				
WRO	Red	Red	Green	Red
Cérvix				
HELA	Red	Red	Red	Red
SIHA	Red	Green	Red	Red
Pulmón				
A549	Red	Red	Green	Red

Tabla 1: Estado de metilación de CFTR, HTR1B, GSTM2 y PENK en las diferentes líneas celulares tumorales, el color verde representa No metilado y el color rojo Metilado. En los casos en blanco no ha sido posible obtener el resultado.

A la vista de los resultados obtenidos podemos concluir que la metilación de estos 4 genes no es un hecho específico en cáncer de próstata. Por ejemplo GSTM2 y PENK se metilan con mayor frecuencia en cáncer de colon y en menor medida en neuroblastoma, mama y próstata. En el caso de CFTR y HTR1B se aprecia que la metilación conjunta se da en las líneas tumorales de tiroides, piel y pulmón y en dos de mama (MCF7 Y NBL100) y en menor medida en colon. En general casi todos los genes se metilan en al

menos una línea celular de cada tipo tumoral, lo que sugiere que el silenciamiento de estos genes por metilación podría ser un hecho generalizable a todos los tipos de tumores, sin embargo para poder realizar esta afirmación es necesario primero determinar la metilación de estos genes en tumores primarios, que es el siguiente paso que tenemos pensado realizar.

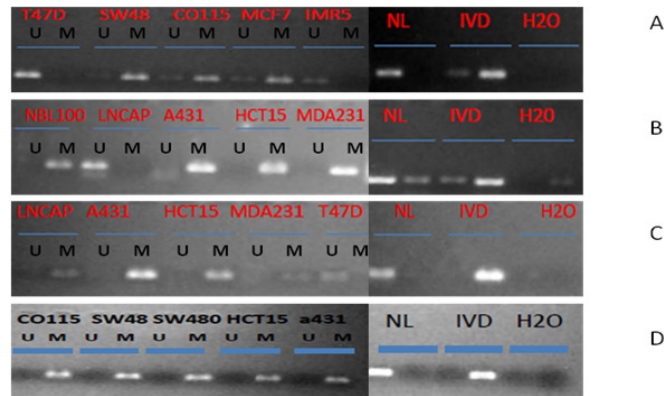


Figura 1: A) Muestra representativa de la PCR específica de metilación (MSP) para el gen CFTR. B) Muestra representativa de la PCR específica de metilación (MSP) para el gen HTR1B. C) Muestra representativa de la PCR específica de metilación (MSP) para el gen GSTM2 D) Muestra representativa de la PCR específica de metilación (MSP) para el gen PENK. Como control de la reacción de metilación se usó IVD y como control de la reacción de no metilación se usó DNA de linfocitos normales (NL).

Algunos de los resultados obtenidos mediante MSP se han confirmado mediante secuenciación de bisulfito. En la figura 1 se puede observar una muestra representativa de los resultados de la MSP para cada gen.

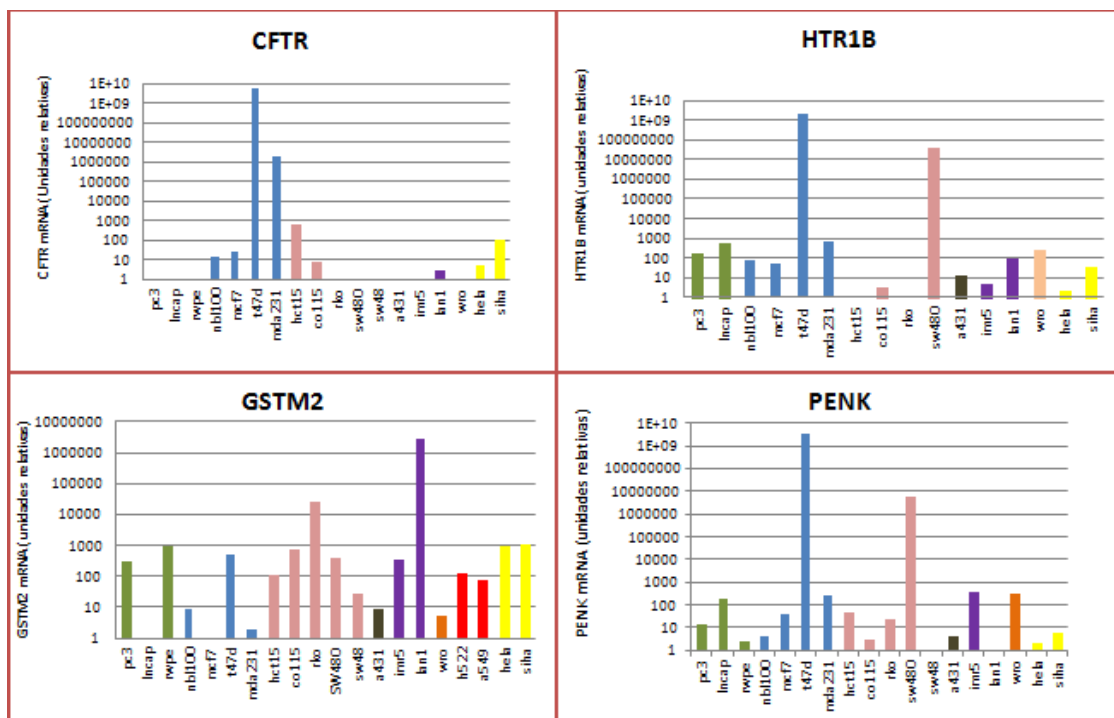


Figura 2: Q-PCR para los genes CFTR, HTR1B, GSTM2 y PENK se muestran los niveles obtenidos de mRNA en cada línea celular. Cada tipo de tumor se distingue por colores: próstata-verde, mama-azul, colon-rosa, piel-marrón, neuroblastoma-morado, tiroides-naranja, pulmón-rojo, cérvix-amarillo.

Análisis de la expresión por QRT-PCR y Western blot de GSTM2

Para conocer la repercusión que tiene la metilación de estos genes sobre su expresión, se determinaron los niveles de mRNA mediante QRT-PCR. En la figura 2 se pueden ver los niveles de mRNA de los genes analizados en cada una de las líneas celulares. En la mayoría de los casos los niveles se corresponden con lo que cabría esperar según el estado de metilación descrito anteriormente (tabla 1), es decir, en las líneas en las que están metilados no hay expresión o los niveles son bajos, mientras que en las líneas en las que no están metilados los niveles de mRNA son más altos. Pero hay casos en los que la metilación no se correlaciona con la pérdida de expresión, por ejemplo el gen CFTR, no se expresa en RWPE y sin

embargo no está metilado por lo que se podría pensar que está actuando otro tipo de regulación génica que impida la expresión del gen, esto también sucede en las líneas IMR5 y LAN1. Para el gen HTR1B sucede esto en las RKO y SIHA que aunque hay expresión son niveles muy bajos. Otro ejemplo es la expresión de GSTM2 en la línea WRO y de PENK en las RWPE y NBL100. Por el contrario también se da el caso contrario en el que aunque las secuencias promotoras del gen están metiladas hay expresión. Esto sucede por ejemplo, para el gen HTR1B en la línea T47D, para GSTM2 en la línea LAN1, y por último para el gen PENK en la línea SW480. Esto podría ser debido a que estén actuando otras secuencias reguladoras diferentes a las que hemos analizado o que hayamos tenido algún falso positivo en la determinación de la metilación.

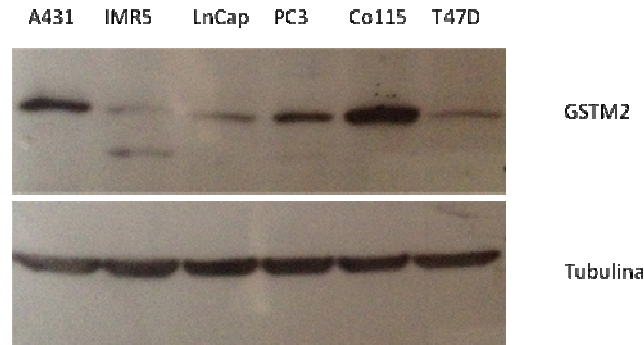


Figura 3: Análisis Western Blot de GSTM2 y como control de carga se usó la proteína Tubulina.

Además, también se analizó la expresión de GSTM2 mediante Western blot. En la figura 3 se muestran los niveles de esta proteína en las líneas A431, IMR5, LNCap, PC3, Co115 y T47D. En la figura 3 se muestran los resultados preliminares que hemos obtenido.

En los resultados obtenidos podemos apreciar evidentes diferencias de expresión proteica, algunas coinciden con los niveles de metilación y de mRNA observados, ya que en la línea celular LNCap GSTM2 se encuentra metilado y presenta bajos niveles de mRNA y proteína. Por otro lado PC3 no está metilado y encontramos mas expresión, en cambio los demás casos no concuerdan con los resultados obtenidos ya que GSTM2 no está metilado en T47D e IMR5 hay expresión a nivel de mensajero y en cambio los niveles de proteína son muy bajos. Aunque es necesario hacer nuevos ensayos, estos resultados se podrían deberse a algún tipo de regulación posttranscripcional, como por ejemplo disminución de la traducción o estabilidad de la proteína.

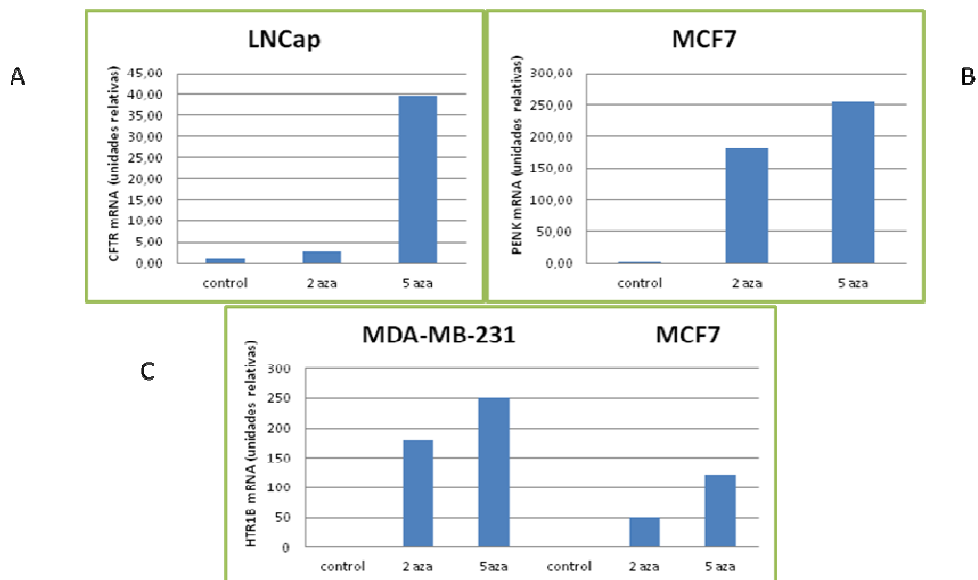


Figura 4: Análisis de expresión de CFTR (A), PENK (B) y HTR1B (C) por QRT-PCR en las líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP MCF7 y MDA231 sin tratar (control) y tratadas con el agente desmetilante 5'-aza-2'-deoxicidina a diferentes concentraciones (2 y 5 μ M).

Efectos del tratamiento con el agente desmetilante 5'-aza-2'-deoxicidina en la expresión de CFTR, PENK y HTR1B

El compuesto 5'-aza-2'-deoxicidina, es un agente desmetilante análogo del nucleósido natural 2'-deoxicidina, que actúa incorporándose al DNA, y uniéndose covalentemente a las DNMTs, inhibiendo

su función e impidiendo que se restauren los patrones de metilación de las células. Así se consigue revertir la hipermetilación de los promotores de los genes y que estos puedan expresarse nuevamente.

Para comprobar que la disminución en la expresión se debe a la metilación de los promotores observada, a continuación se trataron las líneas celulares MDA 231, MCF7 y LNCap con el agente desmetilante 5'-aza-2'-deoxicidina en las condiciones indicadas anteriormente, y se realizó un análisis de los niveles de mRNA de CFTR, PENK y HTR1B mediante QRT-PCR. Como se puede observar en la figura 2 las tres líneas celulares presentan unos niveles de expresión muy bajos en condiciones normales, pero tras el tratamiento con el agente desmetilante 5'-aza-2'-deoxicidina se produce un aumento de la expresión de este gen (figura 4). Además, se aprecia una mayor expresión en aquellas que han sido tratadas con mayor concentración de 5'-aza-2'-deoxicidina, lo que indica una relación directa entre la dosis del agente desmetilante administrada y la expresión. Estos resultados indican que la metilación de estos genes impide su expresión en estas líneas celulares, ya que el tratamiento con 5'-aza-2'-deoxicidina revierte el silenciamiento en los genes estudiados.

Conclusiones

La metilación de CFTR, HTR1B, GSTM2 y PENK no es un hecho específico de un solo tipo de cáncer, ya que la mayoría de los genes estudiados se metilan en al menos una línea celular de cada tipo tumoral.

En la mayoría de los casos la metilación de CFTR, HTR1B, GSTM2 y PENK impide la expresión de estos genes y el tratamiento con agentes desmetilantes la recupera.

Dada la función de los genes estudiados, la metilación de estos podría jugar un papel importante en el desarrollo del cáncer.

Referencias

1. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin D. Globocan 2002: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC CancerBase N.o5. version 2.0. Lyon: IARC Press; 2004.
2. Baylin SB, Ohm JE. 2006. Epigenetic gene silencing in cancer: a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*. 6:107-16.
3. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. 2006. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet*. 7:21-33.
4. Chen T, Li E. 2006. Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals. *Curr Top Microbiol Immunol*. 301:179-201.
5. Wong JJ, Hawkins NJ, Ward RL. 2007. Colorectal cancer: a model for epigenetic tumorigenesis. *Gut*. 56:140-8.
6. Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T. 2000. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet*. 24:88-91.
7. Bachman KE, Rountree MR, Baylin SB. 2001. Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin. *J Biol Chem*. 276:32282-7.
8. Geiman TM, Sankpal UT, Robertson AK, Zhao Y, Zhao Y, Robertson KD. 2004. DNMT3B interacts with hSNF2H chromatin remodeling enzyme, HDACs 1 and 2, and components of the histone methylation system. *Biochem Biophys Res Com*. 318: 544-55.
9. Qu GZ, Grundy PE, Narayan A, Ehrlich M. 1999. Frequent hypomethylation in Wilms tumors of pericentromeric DNA in chromosomes 1 and 16. *Cancer Genet Cytogenet*. 109:34-9
10. Esteller M, Corn PG, Baylin SB and Herman JG. 2001. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 61: 3225-3229.
11. McTavish, N., Copeland, L. A., Saville, M. K., Perkins, N. D., and Spruce, B. A. 2007. Proenkephalin assists stress-activated apoptosis through transcriptional repression of NFkappaB- and p53-regulated gene targets. *Cell Death Differ*. 14:1700-1710.