

DISCUSSION

## EPIGENÈTICA EN EL CONTEXT CEL·LULAR

---

### Múltiples funcions de la cromatina.

Molts dels processos cel·lulars on intervé l'ADN poden ser regulats per la modificació de l'empaquetament i l'accessibilitat d'aquesta molècula. La transcripció necessita que l'ADN sigui accessible a diferents factors de transcripció i a les diferents polimerases d'ARN. Tanmateix, és imprescindible que les dues cadenes d'ADN es vagin separant al llarg de la doble hèlix a mesura que es va sintetitzant el transcrit. Com la transcripció, moltes altres funcions bàsiques de la cèl·lula es poden veure afectades per l'estructura cromatínica: replicació, reparació, recombinació, funció centromèrica i organització nuclear. En definitiva, l'estructura cromatínica juga un paper essencial en tots els aspectes de la biologia de l'ADN en eucariotes.

### Múltiples estats cromatínics.

Quin és el concepte d'heterocromatina? Aquesta pregunta *a priori* semblava fàcil de contestar, però a mesura que ha passat el temps la seva resposta es va desdibuixant. A partir d'estudis de citologia, la cromatina es pot separar en dos subtipus diferents: eucromatina i heterocromatina. Així, l'heterocromatina originalment va ser definida com la part del genoma que es manté en un estat condensat durant la interfase (Heitz, 1928).

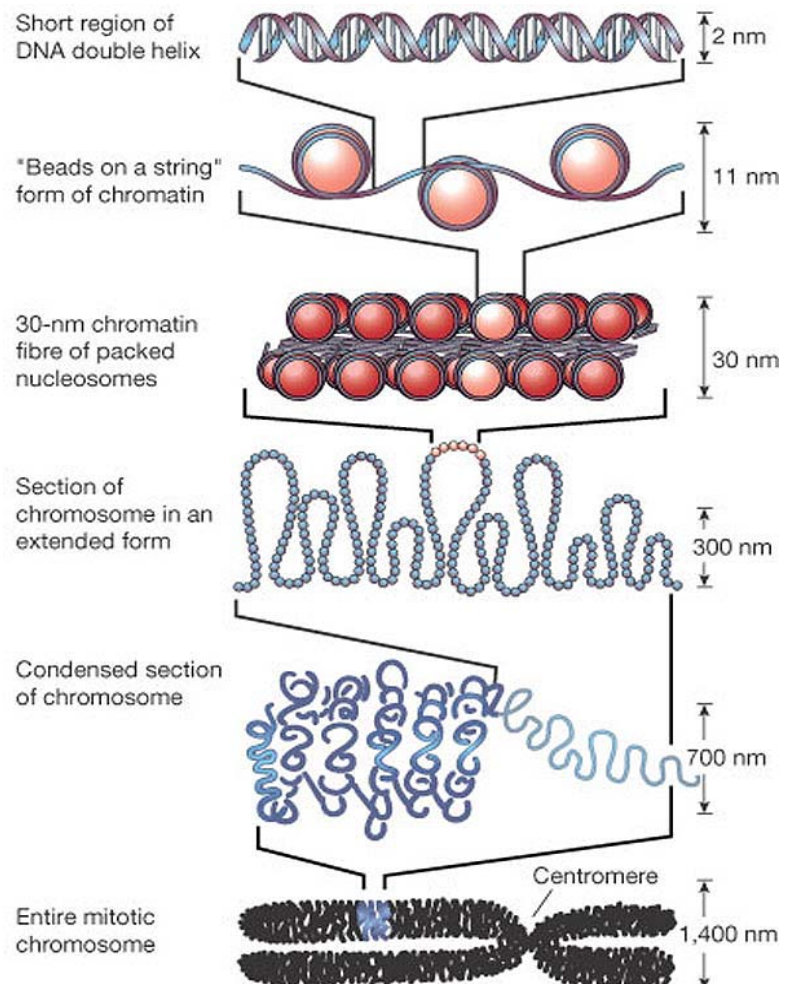
La regulació en la condensació cromatínica actua principalment a nivell de nucleosoma, unitat fonamental del plegament dels cromosomes eucariòtics (vegeu la figura 11). Al llarg dels darrers anys, els descobriments en les modificacions de les histones i de múltiples proteïnes heterocromàtiques han posat de relleu que la visió de dos estats cromatínics és excessivament reduccionista. Hennig, el 1999, va proposar l'ús del terme 'heterocromatina' com un estat de la cromatina reprimat transcripcionalment, caracteritzat per l'associació de complexos multiproteics necessaris per a la repressió transcripcional.

Actualment, es coneixen diferents proteïnes amb funcions estructurals en la formació de l'heterocromatina, la finalització telomèrica i la condensació centromèrica. Aquestes també són capaces de controlar l'expressió gènica. Aleshores, depenent de quina sigui la regió cromosòmica a la qual s'uneixin o del tipus de proteïnes presents en un mateix complex proteic, poden tenir efectes activadors o inhibidors. En un context cel·lular existeixen diferents estats de condensació de la cromatina. És aquest conjunt d'estats

el que s'ha anat especialitzant en propietats estructurals i funcions biològiques en la cèl·lula. Per tant, el concepte d'heterocromatina no és res més que un estat funcional específic d'una regió cromosòmica o d'un cromosoma sencer.

**Figura 11.**

Organització de l'ADN dins de l'estructura cromatínica. El nivell més baix d'organització és el nucleosoma. Aquests estan connectats entre ells a través de fragments d'ADN. En el següent nivell d'organització, la cadena de nucleosomes es plega en forma de fibra d'uns 30 nm de diàmetre. A través d'aquestes fibres, les estructures es disposen en nivells d'organització superior, assolint el màxim grau de compactació amb l'estructura típica que adopten els cromosomes en la metafase. Extret de Felsenfeld i Groudine, 2003.



### Principals protagonistes dels canvis cromatínics.

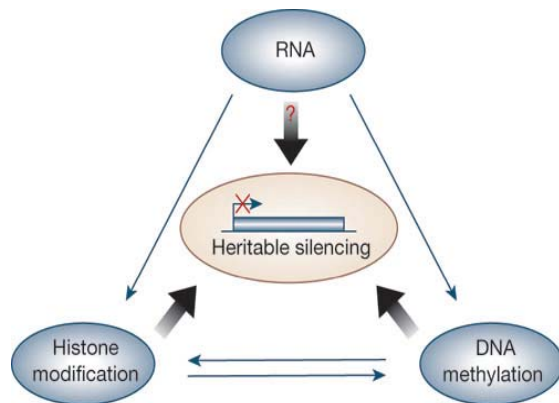
Un dels primers protagonistes descrits en els canvis associats a la cromatina és la metilació genòmica, de la qual ja n'hem parlat extensament en la introducció (vegeu la figura 12).

Un segon protagonista, amb un paper principal, el constitueix l'element bàsic en l'estructura de la cromatina, el nucleosoma. Almenys hi ha tres camins diferents per contribuir a la dinàmica d'aquesta estructura: (a) a través de complexos remodeladors dependents d'ATP, (b) a partir de variants especialitzades d'histones, i (c) mitjançant una àmplia varietat de modificacions covalents de les histones. És important destacar que aquest ventall de modificacions ofereix una gran diversitat d'estructures

cromatíniques. Aquesta varietat no tan sols és aprofitada per finalitats estructurals i/o reguladores de l'expressió gènica, sinó que també participa en altres funcions bàsiques de la cèl·lula com reparació i replicació, entre d'altres (revisat a Lisuka i Smith, 2003; Gregory i Shiekhattar, 2004). Donat que d'aquest grup de modificacions ja n'hem parlat a l'apartat 7 d'aquesta introducció, en aquesta discussió no ens estendrem amb més explicacions.

Un darrer protagonista en el conjunt de canvis cromatínics és l'ARN d'interferència (ARNi). Aquest sistema té un paper central en el silenciament gènic de l'heterocromatina, en contra de l'opinió clàssica, que considerava que en l'heterocromatina silenciada no hi havia transcripció (revisat a Lippman i Martienssen, 2004). Juntament amb aquesta funció, s'han descrit tres mecanismes més on els ARN de doble cadena (ARNds) actuen a nivell nuclear (revisat a Matzke i Birchler, 2005; Schramke i Allshire, 2004): (a) metilació de l'ADN dirigida per ARN (RdDM), ja que l'ARNi dirigeix la metilació genòmica, tal com el seu nom indica; (b) escissió programada de l'excés d'ADN en protozous ciliats; i (c) silenciament de l'ADN no aparellat durant la meiosi, que es dona en alguns organismes.

En tots els casos, els ARNds actuen dirigint modificacions en la cromatina i/o ADN. Aquestes molècules ofereixen especificitat de seqüència a partir de la seva homologia amb seqüències genòmiques.



**Figura 12.** Interacció entre ARN, modificació d'histones i metilació de l'ADN en el silenciament heretable. La desacetilació de les histones i, principalment, la metilació de H3-K9 impliquen una condensació cromatínica i un bloqueig en l'inici de la transcripció. La modificació d'histones també pot reclutar DNMT per començar la metilació genòmica, que pot reforçar les modificacions de les histones implicades en el silenciament. Experiments en plantes i llevats han demostrat clarament la implicació de l'ARNi en l'establiment dels estats heterocromàtics i en el silenciament. Per tant, l'ARNi podria estar implicat en organismes superiors. Extret d'Egger *et al*, 2004.

### Com actuen aquests protagonistes?

Una de les principals característiques en la manera d'actuar dels tres sistemes descrits en l'apartat anterior és l'elevat grau d'interrelació, fet que s'ha evidenciat tant a nivell intra- com intersistema.

Dins d'un mateix sistema, per exemple, tenim la interrelació entre les modificacions covalents de les histones i els remodeladors de la cromatina. Així, l'expressió d'alguns gens pot requerir la presència de remodeladors abans dels enzims encarregats de modificar les histones (Cosma *et al*, 1999); en canvi, en altres gens, l'ordre d'intervenció és justament l'invers (Agalioti *et al*, 2000).

Entre els diferents sistemes, els exemples d'interrelació són nombrosos. Entre la metilació genòmica i la modificació de les histones se n'han descrit pràcticament a tots els nivells:

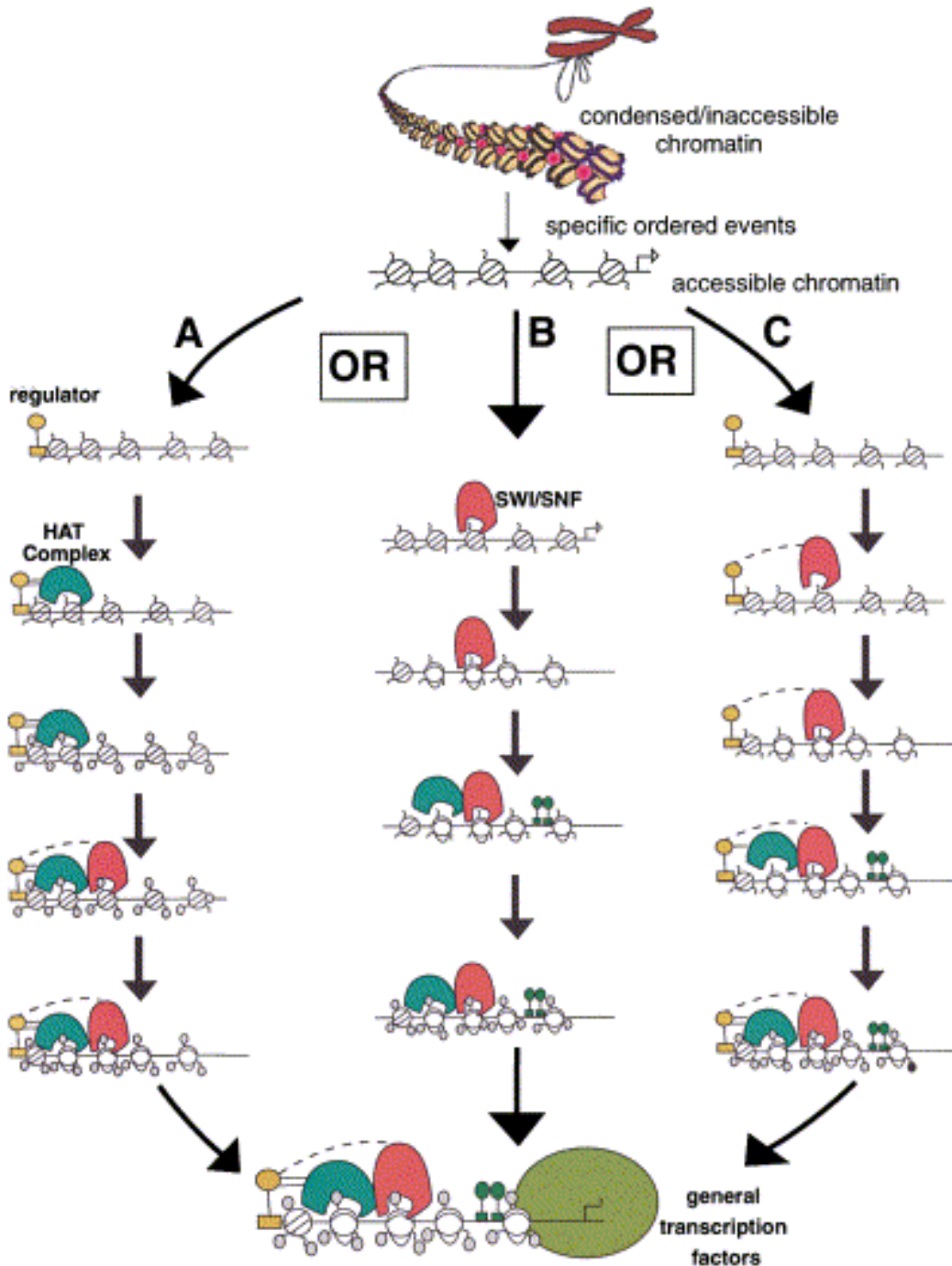
(a) Metilació de les histones. Possiblement l'evidència més directa la trobem en *Neurospora crassa*, on la metilació de l'ADN és absolutament dependent de la metilació de H3-K9 (Tamaru i Selker, 2001). En plantes, s'ha descrit que la metilació en la seqüència CpNpG també depèn de l'activitat histona H3 metiltransferasa (Jackson *et al*, 2002). Aquesta dependència en plantes està reforçada per la descripció d'una DNMT que presenta un cromodomini en la seva seqüència (Henikoff i Comai, 1998).

(b) Acetilació de les histones. Tant les MBDs com les DNMTs poden formar complexos amb les HDACs (revisat a Dobosy i Selket, 2001; Burgers *et al*, 2002, respectivament).

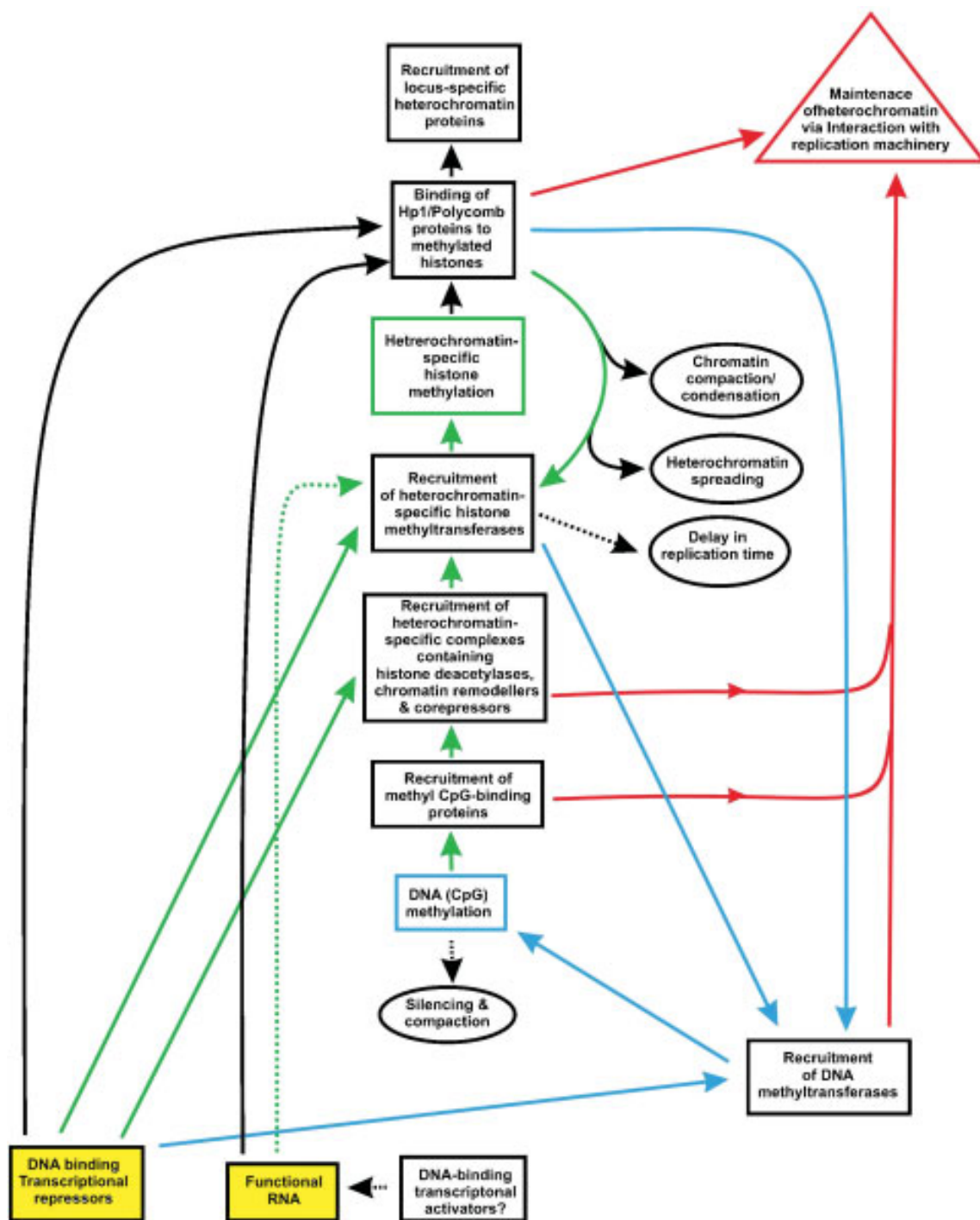
(c) Complexos remodeladors dependents d'ATP. En *Arabidopsis thaliana*, s'ha demostrat que la proteïna DDM1, de la família SWI2/SNF2, és absolutament necessària en el manteniment dels patrons de metilació genòmica (Jeddeloh *et al*, 1999). En animals, la inactivació d'altres membres de la família SNF2 també presenta alteracions significatives en els patrons de metilació globals. Aquest és el cas del gen ATRX en humans (Gibbons *et al*, 2000) i del gen Lsh2 en ratolins (Dennis *et al*, 2001).

Aquest elevat grau d'interrelació, respon a un ordre general d'actuació? La resposta és no. Per exemple, entre els complexos remodeladors i els modificadors covalents de les histones no hi ha un ordre obligat d'actuació funcional (revisat a Narlikar *et al*, 2002). L'únic requeriment és que s'assoleixi el resultat final, és a dir, una associació de components transcripcionals adequada en un entorn estructural òptim i en el moment oportú (vegeu la figura 13). De manera general, cada reacció facilita la reacció següent. Aquest fet facilita que una regulació transcripcional específica estigui

determinada per la solució més parsimoniosa en un moment donat. Aquesta forma d'actuar possiblement és igualment vàlida en tot el conjunt de sistemes que intervenen en la regulació de l'estructura cromatínica (vegeu la figura 14).



**Figura 13.** Diferents models en els quals poden actuar els complexos remodeladors i reguladors de cromatina. Els reguladors, els complexos HAT i els complexos remodeladors dependents d'ATP poden actuar seguint diferents ordres (vies A, B i C), arribant a un mateix resultat final: un estat compatible amb la transcripció. Extret de Narlikar *et al*, 2002.



**Figura 14.** Resum de les vies utilitzades per iniciar i mantenir l'heterocromatina en mamífers, des dels inicials repressors transcripcionals i l'ARN funcional (en groc) fins a la metilació de l'ADN (fletxes i quadrat blau), la metilació d'histones (fletxes i quadrat verd), acabant amb la unió de HP1 o homòlegs de PcG i el reclutament de proteïnes heterocromàtiques específiques de cada *locus*. També es mostren les vies que impliquen factors heterocromàtics que interaccionen amb la maquinària de replicació (fletxes i triangle vermell) i les vies de propietats físiques de l'heterocromatina (cercles). Els repressors transcripcionals poden reclutar directament factors que afectin la via de metilació de les histones. Tanmateix, l'ARN funcional pot ser induït per activadors de seqüència específica i la metilació en CpG pot conduir a un silenciament i compactació directes (fletxes discontinües). Extret de Craig, 2005.

Al llarg de tot el conjunt de canvis en l'estructura cromatínica, hi ha dos moments clau: (1) inici o establiment dels canvis cromatínics, i (2) propagació i manteniment d'aquests canvis.

1- Inici dels canvis. En aquesta etapa, el que sembla important és l'adquisició d'almenys un senyal epigenètic. Aquest senyal inicial pot tenir orígens molt diversos, d'entre els quals voldria destacar, per exemple, que en mamífers la interacció EF2-Rb-SUV39H1-HP1 implica l'inici en les seqüències homòlogues al factor de transcripció E2F (Nielsen *et al*, 2001). En altres organismes, l'origen repetitiu del *locus*, més que la seqüència primària d'ADN, pot desencadenar l'inici (Henikoff, 2000). Els senyals a partir d'ARN també poden iniciar el silenciament epigenètic, induint canvis en la cromatina (per exemple, inactivació del cromosoma X) o bé provocant canvis en la metilació de l'ADN (revisat a Matzke i Birchler, 2005).

2- Manteniment del canvi. Un cop s'ha iniciat el canvi en l'estructura cromatínica per l'adquisició d'un o més senyals epigenètics, la identitat del canvi estructural es pot estendre a través de múltiples interaccions entre els diferents sistemes. Les característiques principals d'aquestes interaccions són senyals positius entre les diferents marques epigenètiques i complexos enzimàtics que reconeixen i catalitzen la formació del mateix senyal. Una impressió general d'aquesta manera d'actuar és que aquest sistema intern de redundància sembla dissenyat per mantenir de manera contínua i estable el canvi estructural. En realitat, es tracta de diferents capes de memòria cel·lular que són afegides una sobre l'altra. Així, en organismes que no tenen 5mC, la modificació de les histones podria ser suficient per marcar i mantenir els dominis cromatínics silenciats. En aquest cas, els sistemes de reforçament de senyals entre metilació i acetilació d'histones, acoblats a mecanismes de manteniment d'aquestes modificacions, serien suficients per estabilitzar el canvi.

### **Paper de la metilació de l'ADN en el context epigenètic.**

La metilació genòmica té lloc en els gens que han estat silenciats prèviament (revisat a Bird, 2002). Nombrosos treballs indiquen que no intervé en el silenciament de promotors actius. Així, la metilació *de novo* de seqüències provirals en cèl·lules embrioniques depèn de la DNMT3A i DNMT3B (Okano *et al*, 1999). No obstant això, la inactivació inicial dels retrovirus es dona igualment quan ambdues metiltransferases són absents (Pannell *et al*, 2000). Aquest retard en la metilació de l'ADN respecte de la inactivació gènica també s'ha observat en el silenciament del cromosoma X (vegeu la figura 5). En el cas de la hipermetilació associada al procés tumoral, sembla ser que la



metilació de l'ADN podria jugar el mateix paper secundari (revisat a Clark i Melki, 2002).

Aleshores, per què s'han de metilar gens que ja estan silenciats? D'acord amb el mecanisme d'actuació dels diferents canvis epigenètics discutit anteriorment, la metilació de l'ADN actuaria com una darrera capa de memòria cel·lular amb la finalitat d'estabilitzar el silenciament. En aquest sentit, tant en la inactivació del cromosoma X com en el silenciament retroviral hi ha una pèrdua d'inactivació si les cèl·lules somàtiques són tractades amb agents desmetilants (revisat a Bird, 2002). En condicions patològiques, els individus que presenten la síndrome ICF, que tenen mutada la DNMT3B, mostren la metilació reduïda en alguns gens que es troben en el cromosoma X, juntament amb un silenciament parcial dels gens presents en aquest cromosoma (Miniou *et al*, 1994; Hansen *et al*, 2000). Treballs *in vitro* en cèl·lules embrionàries de ratolí i somàtiques en cultiu sovint evidencien una reactivació de transgens lligats al cromosoma X quan la DNMT1 està absent o inhibida (Sado *et al*, 2000). Tot plegat sembla indicar la metilació genòmica com un segell estabilitzador de tota una sèrie de canvis estructurals previs. Aquesta associació és vàlida en la majoria de contextos on trobem aquest canvi epigenètic: cromosoma X, regions heterocromàtiques, gens d'expressió teixit específica, així com les hipermetilacions associades al procés tumoral. Les regions *imprintades* en què la metilació genòmica s'associa a l'expressió gènica en són notables excepcions. Tanmateix, cal destacar que aquesta activació pot ser explicada per mecanismes en què la metilació desplaça factors que actuen en *trans* i que es troben associats a repressió (Ohlsson *et al*, 2001).

Aquesta integració de la metilació genòmica en el conjunt de canvis epigenètics que es donen a nivell cel·lular ens condueix a una revisió de les funcions de la metilació genòmica descrites en la introducció d'aquesta tesi (vegeu apartat 2.3). Aleshores, la proposta inicial en què la metilació de l'ADN podia ser un mecanisme de control de l'expressió gènica en mamífers (Riggs, 1973; Holliday i Pugh, 1973) no és encertada. Control implica reversibilitat i els canvis de metilació genòmica són canvis permanents en el silenciament gènic. En aquest sentit, aquesta permanència només pot ser revertida a través de la formació de cèl·lules germinals o durant els primers estadis del desenvolupament, ja que no hi ha exemples d'illes CpG metilades inicialment i que esdevinguin desmetilades després de la implantació (Jones, 1999). Per tant, la principal funció de la metilació genòmica seria l'estabilització de regions silenciades prèviament per altres mecanismes epigenètics, actuant tant a nivell global com local.

## EPIGENÈTICA EN EL CONTEXT TUMORAL

---

### *De la Z a 2q14.2.*

#### **Definició.**

El conjunt de resultats que presentem en els capítols 5 i 6 desvetllen un nou tipus d'alteració que no havia estat descrit en càncer. Aleshores, quina és la interpretació d'aquest conjunt de canvis? A partir de l'anàlisi de la sèrie de mecanismes epigenètics que actuen en un context cel·lular, nosaltres pensem que aquests canvis responen a un procés d'heterocromatització associat al procés tumoral. Les modificacions en l'expressió dels gens presents en la regió 2q14.2, juntament amb els estudis realitzats a nivell estructural d'aquesta regió, serien indicadors d'un silenciament gènic associat a un canvi estructural de la cromatina.

Aquesta interpretació no deixa de ser una hipòtesi, en el seu estat actual. Per tal de confirmar-la, cal realitzar un conjunt de nous experiments enfocats a resoldre dos aspectes fonamentals en el procés d'heterocromatització: (1) identificació específica de les modificacions posttranscripcionals de les histones, i (2) identificació dels complexos proteics que s'encarreguen de "llegir" aquestes modificacions posttranscripcionals.

En els treballs descrits en els capítols 5 i 6 es van utilitzar uns anticossos antimetilació H3-K9 poc específics. Treballs posteriors, principalment centrats en la inactivació del cromosoma X, han demostrat la reactivitat creuada d'aquests anticossos amb la metilació de H3-K27. En el cas de la inactivació del cromosoma X, inicialment es pensava que la modificació clau era la metilació de H3-K9 i, posteriorment, amb la utilització d'anticossos més específics, ha resultat ser clau la metilació de H3-K27 (revisat a Cao i Zhang, 2004). La importància d'aquesta especificitat es veu reforçada a partir del possible paper que hi poden jugar els diferents estats de metilació de les lisines (mono-, di- o trimetilades) en la distribució i caracterització dels diferents estats cromatínics (revisat a Grewal i Rice, 2004).

Respecte del segon aspecte clau, la identificació dels efectors *downstream* de les modificacions posttranscripcionals ens pot ser de gran ajuda a l'hora d'esbrinar el tipus d'heterocromatització associada. Així, per exemple, a la regió pericentromèrica s'ha descrit una major presència de la proteïna HP1, mentre que en el cromosoma X inactivat predominen els PcG. En definitiva, la identificació específica del canvi, així

com la identificació de les proteïnes encarregades del canvi cromatínic, ens poden ser de gran ajuda per a la confirmació, caracterització i comprensió d'aquesta possible heterocromatització associada al procés tumoral.

Els resultats d'expressió dels gens analitzats coincideixen amb el possible paper de la metilació genòmica en el segellament del silenciament transcripcional gènic. Així, la reducció en l'expressió gènica és major en aquells gens hipermetilats (EN1, SCTR i INHBB) respecte dels que no ho estan (DDX18, INSIG2, etc.). Aquesta diferència es confirma amb els experiments de reexpressió, a partir del tractament amb 5-aza-CdR i TSA, on la reexpressió és major en els gens hipermetilats. En conjunt, aquestes diferències encaixen molt bé amb el concepte de capes de silenciament, en què la metilació genòmica confereix un nivell de repressió gènica addicional.

Un aspecte important que deriva dels estudis de ChIP és la dependència de la metilació de H3-K9 respecte de la metilació genòmica. El tractament de la línia cel·lular HCT116 amb 5-Aza-CdR es tradueix en una disminució dels nivells de metilació en H3-K9. Aquests resultats suggereixen una dependència de la metilació de les histones cap a la metilació genòmica, o el que és el mateix, la metilació genòmica estaria *upstream* de les modificacions posttranscripcionals de les histones. En la bibliografia, generalment s'ha descrit un grau de dependència invers. Per tant, caldria confirmar aquesta relació.

### **Conseqüències.**

Les conseqüències d'aquesta possible heterocromatització poden ser comparables a les descrites en les LOH, tant per l'abast com per les implicacions funcionals. No obstant això, cal especificar que una LOH sempre implica la pèrdua total d'un al·lel, mentre que el canvi estructural pot anar associat a una disminució en l'expressió. En aquest sentit, la LOH és una pèrdua qualitativa, mentre que el canvi estructural pot implicar una pèrdua qualitativa i/o quantitativa.

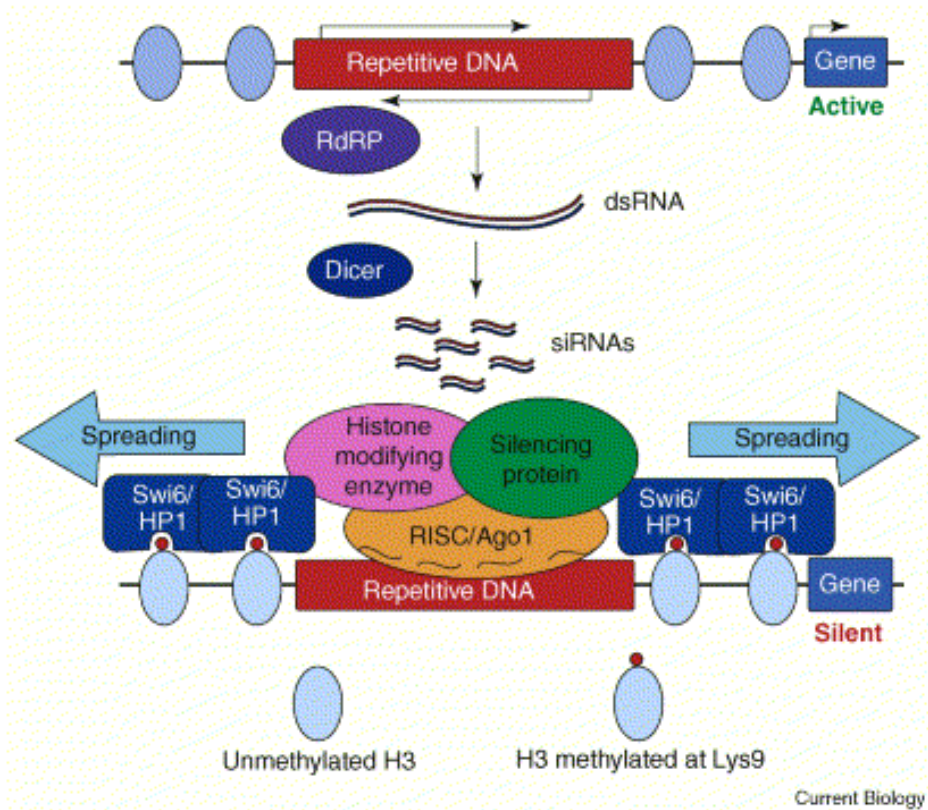
Per conèixer realment l'abast d'aquesta alteració, cal saber si aquest canvi constitueix un fet aïllat dins la cèl·lula tumoral o bé si és el reflex d'una alteració que es produeix freqüentment. Donat que aquesta regió no presenta unes característiques específiques que la facin única, interpretem que la sèrie de canvis associats al procés tumoral és el resultat d'alguna/es alteració/ns en el conjunt de sistemes epigenètics que opera/en amb normalitat dins la cèl·lula no tumoral. Per tant, pensem que aquesta

heterocromatització associada al procés tumoral no és un fet únic i que d'altres regions genòmiques poden presentar alteracions semblants.

### **Possibles causes.**

Les possibles causes d'aquest canvi són moltes i diverses. L'antecedent no patològic en què es dona un canvi similar, és a dir, l'heterocromatització d'una regió eucromàtica, el constitueix la inactivació del cromosoma X. En aquest cas, l'origen dels canvis associats al procés d'heterocromatització és la presència d'un ARN no codificant (vegeu la introducció, apartat 2.4). La formació d'altres components heterocromàtics, com per exemple els centromers, al llarg dels darrers anys ha estat ben caracteritzada, especialment en *S. pombe* (Elgin i Grewal, 2003). En aquest tipus d'heterocromatina, cada vegada són més les proves que indiquen la importància de l'ARNi (originat a partir de seqüències repetides) en l'establiment dels dominis silenciats (vegeu la figura 15). Aquesta funció general de l'ARNi està àmpliament conservada al llarg de l'escala evolutiva (exceptuant *S. Cerevisiae*). En aquest sentit, estudis recents de l'epigenoma en ratolí i en *A. Thaliana* semblen indicar que qualsevol regió cromosòmica amb la presència de repeticions en tàndem podria afavorir la formació d'ARN de doble cadena i l'acumulació de trimetilació en H3-K9 i H4-K20 (Martens *et al*, 2005; Lippman *et al*, 2004). En conjunt, i a partir d'aquests antecedents bibliogràfics, la presència d'algun ARNi (originat o no a partir de seqüències repetides) podria ser la causa d'aquesta heterocromatització.

Una segona possibilitat seria la sobreexpressió d'alguna HMT. En càncer de pròstata, de mama i leucèmia s'ha descrit la sobreexpressió de EZH2 (Varambally *et al*, 2002; Bracken *et al*, 2003; Kleer *et al*, 2003; Raaphorst *et al*, 2001). EZH2 és una proteïna del PcG que presenta activitat histona metiltransferasa, principalment H3-K27 (revisat a Cao i Zhang, 2004). Treballs *in vitro* han mostrat que la sobreexpressió d'aquest gen es tradueix en el silenciament d'uns 163 gens, mentre que no s'observa activació gènica (Varambally *et al*, 2002). A causa dels problemes d'especificitat comentats abans, no és descartable que, en el nostre cas, com ha estat el del cromosoma X, la metilació important fos de H3-K27, en comptes de H3-K9. Si fos així, la hipòtesi de la sobreexpressió de EZH2 com a causa del canvi que hem observat pren un cert sentit. A favor d'aquesta hipòtesi també tenim el fet que En1 (present a la regió 2q14.2) és un gen *homeobox*, i la regulació d'aquests està determinada per PcG, entre d'altres. Aquest fet explicaria la localització EZH2 dins d'aquesta regió. Sens dubte, totes aquestes hipòtesis són nous interrogants que s'intentaran respondre en un futur proper.



**Figura 15.** Model d'inici de l'heterocromatització a través de la formació de l'ARNi. L'ARN de doble cadena (*dsRNA*) es forma a partir de les seqüències repetides, com a conseqüència de l'activitat polimerasa d'ARN dependent d'ARN (*RdRP*). També pot formar-se a través de la transcripció dels promotors externs i interns amb orientació oposada. El *dsRNA* es processa per *Dicer* i aquest origina petits ARN d'interferència (*siRNAs*). Els *siRNAs* són utilitzats per localitzar els complexos modificadors d'histones; l'empaquetament cromatínic s'expandeix a partir de l'activitat combinada de la histona metiltransferasa H3-K9 i la posterior associació de *Swi6/HP1*. Extret d'Elgin i Grewal, 2003.

## ***Revisió d'alguns canvis epigenètics associats al procés tumoral.***

### **Guanys i pèrdues globals.**

Els resultats presentats en el capítol 2 mostren els guanys i les pèrdues de metilació genòmica com dos tipus d'alteracions generalitzades en càncer de còlon. Els dos processos són el resultat de tota una sèrie d'alteracions, que es donen de manera gradual al llarg del procés tumoral, i que impliquen canvis contraposats. Aleshores, ¿aquests processos mostren una certa dependència entre ells, manifestant-se com la cara i la creu d'una mateixa moneda, o bé presenten independència?

A partir dels resultats presentats en el capítol 2 i 3, nosaltres pensem que aquests dos tipus d'alteracions mostren un cert grau d'independència, contribuint de manera diferencial al llarg de la progressió tumoral. Així, s'observen diferències a nivell de pronòstic, d'alteracions genètiques associades i d'aparició temporal. La hipometilació està associada a dany genòmic i mal pronòstic, mentre que la hipermetilació correlaciona amb bon pronòstic i silenciament gènic. Aquesta darrera correlació no deixa de ser inesperada. A partir d'estudis previs, s'esperaria una correlació entre silenciament gènic i mal pronòstic (Brock *et al*, 2003; Alaminos *et al*, 2004; Maeda *et al*, 2003 i Esteller *et al*, 2001d). Possibles explicacions a la correlació inversa observada són: (a) la hipermetilació actua de reflex dels mecanismes de senescència cel·lular, i (b) la hipermetilació s'associa a una millor resposta al tractament mèdic. Òbviament, aquestes possibilitats no deixen de ser especulacions que necessiten treballs posteriors per poder confirmar-se.

Respecte de les diferències temporals en l'aparició dels dos canvis, bàsicament ens permeten realitzar dues observacions importants: (1) la possible contribució de les alteracions epigenètiques a la inestabilitat genòmica inicial dels tumors (vegeu l'apartat sobre hipometilació en aquesta discussió); i (2) la importància del silenciament epigenètic durant la transició adenoma-carcinoma.

A partir de les característiques i conseqüències associades als dos tipus d'alteracions, no és massa difícil especular en possibles orígens diferents. Les pèrdues es donen necessàriament en regions metilades prèviament. Per tant, el seu origen el pot determinar la presència d'alteracions en el sistema de manteniment. En els darrers cinc anys, s'han descrit nombrosos treballs en què la mutació de complexos remodeladors es tradueix en una desmetilació genòmica global (Bourc'his i Bestor, 2002). Aquests resultats suggereixen una connexió molt directa entre aquests dos

sistemes epigenètics. Respecte de la hipermetilació, aquesta podria ser el resultat d'una alteració en l'establiment normal dels patrons de metilació, tant a nivell local com global.

Per tot això, pensem que la hipometilació i la hipermetilació són dos fenòmens independents; que la seva contribució, així com les característiques associades, són diferents al llarg del procés tumoral, constituint-se com la cara i la creu de monedes diverses.

### **Hipermetilació.**

En la bibliografia, quan es parla de canvis en la metilació genòmica associats al procés tumoral, es sol referir a hipometilacions generals i a hipermetilacions localitzades. Aquestes últimes afecten el silenciament d'un sol gen. En el capítol 5, presentem la hipermetilació sincrònica de quinze illes CpG. Aquestes es troben distribuïdes al llarg d'un fragment genòmic d'una megabase de longitud, on actualment hi ha descrits dos gens. Per tant, pensem que els canvis associats a la hipermetilació, igual que els de la hipometilació, poden afectar grans regions genòmiques.

En un context cel·lular normal, els patrons de metilació genòmica estan determinats en gran part pels perfils estructurals de la cromatina. En una cèl·lula no tumoral coexisteixen grans regions genòmiques silenciades (centromers i altres fragments heterocromàtics grans), amb regions silenciades locals (per exemple, gens teixit específic silenciats). Aquest fet determina que el paper regulador de la cromatina sigui vàlid tant a nivell global com local.

Quines situacions són possibles en un context tumoral? Generalment, els canvis associats al procés tumoral no representen l'aparició de "nous mecanismes", en el sentit estricte de la paraula, sinó que més aviat reflecteixen una desregulació d'aquells processos que funcionen de manera correcta en un estat no patològic. Per tant, resulta lògic pensar que errors en els mecanismes que determinen grans regions de silenciament heterocromàtic poden esdevenir heterocromatitzacions globals errònies. En aquest sentit, no hi ha res que faci pensar que en una cèl·lula tumoral només siguin possibles les alteracions cromatíniques locals. En realitat, la presència de canvis locals o globals, la determinarà la selecció natural, en funció dels avantatges que proporcionin a la cèl·lula tumoral.

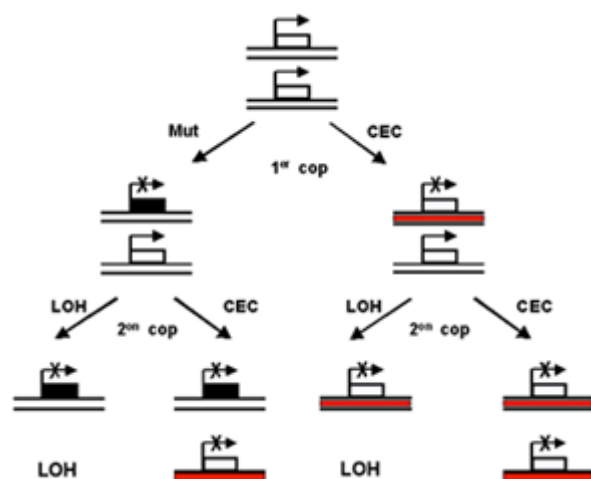
Si acceptem el paper de segellament en l'estat silenciats per part de la metilació genòmica, en certa manera, aquesta hipermetilació es pot interpretar com un senyal indicador d'un canvi estructural. En els resultats descrits en els capítols 5 i 6,

observem que el canvi estructural és més gran que les regions genòmiques hipermetilades, i que aquest canvi afecta l'expressió tant dels gens que presenten illa CpG en la seva regió promotora com dels que no la presenten. Aleshores, a partir d'aquestes dues circumstàncies: (1) canvis estructurals poden afectar l'expressió de gens amb o sense illa CpG, i (2) la hipermetilació és un bon indicador d'un canvi estructural previ, pensem que la proposició de la hipermetilació com a mecanisme alternatiu a la mutació i LOH, en la hipòtesi original de Knudson (Jones i Laird, 1999), és incorrecta, o si més no, limitada.

El mecanisme alternatiu a la hipòtesi de Knudson no seria la hipermetilació de la regió promotora d'un GST, sinó que, de manera general, podria ser un canvi estructural. Aquest podria derivar o no en la hipermetilació de la regió promotora, depenent de la presència o no d'una illa CpG en aquesta regió (vegeu la figura 16). Aquesta visió alternativa a la hipòtesi de Knudson s'exemplifica en el cas d'EN1 i MARCO. Segons la hipòtesi actual (Jones i Laird, 1999), només EN1 podria ser el possible GST, ja que MARCO no presenta illa CpG en el seu promotor. Si acceptem la hipòtesi alternativa que nosaltres proposem, els dos gens poden ser candidats a GST. En aquest cas, el raonament que fem és que la hipermetilació d'EN1 no és més que un reflex d'un canvi estructural, que també ha provocat el silenciament de MARCO, malgrat l'absència d'illa CpG i, per tant, d'hipermetilació d'aquest gen. Aquest raonament està reforçat pels resultats de reexpressió i els nivells de metilació de H3-K9 obtinguts després del tractament amb 5-aza-CdR i TSA. Després d'aquests tractaments, els dos gens presenten elevats graus de reexpressió i els estudis de CHIP revelen nivells de metilació de H3-K9 considerables per als dos.

**Figura 16.**

Hipòtesi de Knudson revisada. Els al·lells actius es mostren en blanc, els mutats, en negre i els canvis estructurals, en vermell (CEC). El primer cop, per la inactivació gènica, el produeixen una mutació a l'esquerra i un canvi estructural de silenciament a la dreta. El segon cop pot donar-se per una pèrdua d'heterozigositat (LOH) o bé per un segon canvi estructural. Modificat de Jones i Laird, 1999.



Possiblement aquests gens no són els exemples paradigmàtics d'aquesta situació, a causa de la funció biològica dels dos i el baix grau d'expressió de MARCO en teixit



normal. Tanmateix, tenint en compte els centenars de possibles gens com a candidats a hipermetilar-se al llarg del procés tumoral (vegeu la introducció, apartat 6.1), sorgeix una qüestió important: quants d'aquests gens que s'hipermetilen tenen relativament a prop altres gens amb funcions biològiques molt importants, sense illa CpG, l'expressió dels quals es pot veure alterada pel canvi estructural? A favor d'aquesta hipòtesi, s'ha descrit la possibilitat de regulació estructural en un grup de gens de metalotionenines que formen un *cluster* de 75 Kb (Gius *et al*, 2004).

En els resultats presentats en el capítol 5, la hipermetilació sincrònica al llarg de la megabase afecta tant aquelles regions que entren dins de la definició d'illa CpG de Gardiner i Frommer (1987), com les que no (vegeu la introducció, apartat 2.2). D'aquesta manera, el mateix fragment Z (bp:196, GC:47% i CpG o/e:0.7), així com el fragment que vam anomenar 20Kb (bp:182, GC:63% i CpG o/e:0.6) no entren dins d'aquesta definició d'illa CpG, malgrat que presenten el mateix comportament que la resta d'illes CpG. Aquests resultats posen de relleu que la definició d'illa CpG actual no és més que una definició empírica, que pot no ajustar-se a una realitat funcional.

En el cas del gen PTGIS (vegeu capítol 4), el fragment identificat per AIMS sí que presentava el seu origen dins d'una illa CpG (a partir de la definició clàssica d'illa CpG). Com ja s'ha comentat en la introducció (vegeu l'apartat 6.1), no tots els gens hipermetilats en càncer són susceptibles de ser GST. En aquest cas, creiem que la implicació directa d'aquest gen en la via d'apoptosi, així com l'elevada correlació significativa entre la seva hipermetilació i el grau d'aneuploidia, suggereixen aquest gen com a possible GST. Actualment, en el nostre laboratori s'estan realitzant nous experiments per tal de confirmar la importància del silenciament d'aquest gen.

### **Hipometilació.**

Les pèrdues de metilació globals que es donen al llarg del procés tumoral s'han relacionat amb inestabilitat genòmica en diversos estudis (vegeu la introducció, apartat 5.2). L'associació està determinada per la possible funció de la metilació genòmica en la integritat estructural i la defensa genòmica (vegeu la introducció, apartats 2.3 i 5.2). Aquesta funció sovint ha estat criticada per la manca de conservació de la metilació genòmica al llarg de l'evolució. Però aquestes crítiques no tenen massa sentit si entenem la metilació genòmica com un sistema epigenètic més. Així, els organismes que no tenen metilació disposen d'altres sistemes de silenciament epigenètic.

En *C. elegans* i *Drosophila*, l'alteració en l'ARNi porta a una activació dels transposons (Sijen i Plasterk, 2003; Aravin *et al*, 2001). Alguns autors han relacionat l'absència

d'ARNi en *S. cerevisiae* i la presència en *S. pombe* amb la presència molt menor de seqüències repetides en *cerevisiae*, respecte de *pombe*. Paral·lelament, els organismes que presenten metilació han estat correlacionats amb una major efectivitat en el silenciament d'elements mòbils respecte dels que no la presenten (Grewal i Rice, 2004). *Arabidopsis thaliana* és un sistema ideal per conèixer les conseqüències de la hipometilació, ja que molts mutants del sistema de metilació són viables. En aquestes plantes, s'ha determinat que tant la metilació a CpG com CpNpG contribueix al silenciament de transposons (Kato *et al*, 2003). Alguns han anat més enllà i han proposat que l'heterocromatina en *Arabidopsis* estaria determinada pels elements transposables i repeticions en tàndem (Lippman *et al*, 2004). Cal dir que en plantes i fongs filamentosos, la 5mC es troba restringida a transposons i altres seqüències repetides. En mamífers, les regions codificants també es troben metilades, fet que podria reflectir la colonització d'aquestes seqüències cap als introns (Martienssen i Colot, 2001).

Una altra possible contribució de la hipometilació a la inestabilitat genòmica es produeix a través de l'alteració en la replicació. Una de les funcions atribuïdes a les illes CpG no metilades és que actuen com orígens de replicació (revisat a Antequera i Bird, 1999). Per tant, la conseqüència immediata d'una desmetilació és l'origen de fragments rics en CpG (que poden ser illes CpG o no) desmetilats, que exerceixen de nous orígens de replicació, donant lloc a una desestabilització espacial i temporal de la replicació. En definitiva, les dades que correlacionen la hipometilació amb el dany genòmic són nombroses i els resultats que presentem en el capítol 4 no deixen de ser una confirmació més d'aquesta relació a nivell de mostres tumorals de còlon.

Finalment, cal destacar una característica important de la tècnica AIMS: l'origen desconegut dels fragments amplificats, és a dir, la manca d'una selecció prèvia. En aquest sentit, l'anàlisi de tot el conjunt d'illes CpG presents en la regió 2q14.2 es va realitzar perquè la banda original de l'AIMS, el fragment Z, no estava dins de la regió promotora de cap gen descrit. Aquesta característica, que va ser un important trencaclosques en el seu moment, finalment va derivar en tot el treball de caracterització posterior. Per tant, la capacitat d'aquest tipus de tècniques per generar fragments de forma estocàstica, circumstància que s'ha criticat sovint, ha estat decisiva en el nostre cas.

### ***Epigenètica, envelliment i càncer.***

Els diferents mecanismes epigenètics presenten una manera d'actuar complexa i amb un elevat grau d'interrelació. Aquestes característiques ofereixen una gran capacitat d'adaptació als canvis externs, conferint a tot el sistema la possibilitat del manteniment en l'homeòstasi cel·lular. En aquest sentit, aquesta característica recorda les propietats d'un sistema taponador, que és capaç de neutralitzar nombrosos canvis. Però arriba un punt en el qual és incapaç de mantenir l'ordre i es dispara la velocitat en l'acumulació d'alteracions.

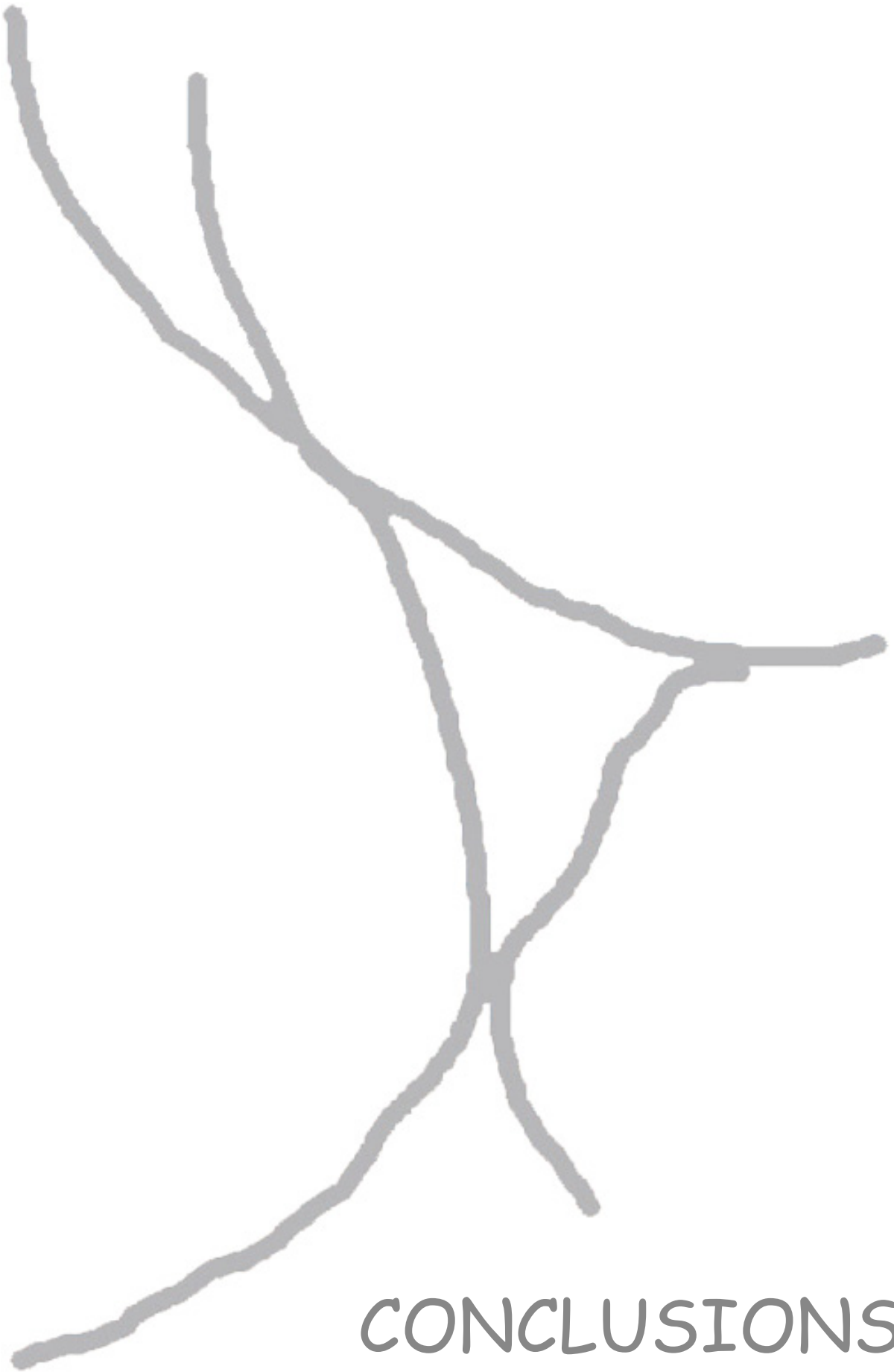
Els canvis en la metilació genòmica associats al procés tumoral són paral·lels al conjunt de canvis derivats del procés d'envelliment (Ahuja *et al*, 1998). Les pèrdues en el contingut 5mC com a conseqüència de l'envelliment s'han descrit tant en cèl·lules en cultiu com en animals (Wilson i Jones, 1983; Wilson *et al*, 1987; Barbot *et al*, 2002). S'ha demostrat que la disrupció del gen PSCG (*Proliferation associated SNF-2-like gene*), també conegut com LSH (*lymphocyte-specific helicase*), no només implica una pèrdua de metilació genòmica, sinó que també comporta un envelliment prematur associat a una pèrdua de proliferació cel·lular i a un augment de la senescència cel·lular (Sun *et al*, 2004). Aquests canvis fenotípics estan caracteritzats per un gran augment en l'expressió de diferents GST clau com: CDKN2A, CDKN2D, CDKN1A i p53. Per tant, aquests resultats suggereixen d'una manera molt plausible que la hipometilació i l'estabilitat genòmica poden representar mecanismes fonamentals per adquirir la senescència prematura. Treballs a partir de ratolins amb defectes en certs gens reparadors d'ADN suggereixen que els gens implicats en el manteniment de la integritat genòmica també poden promoure la longevitat (Hasty *et al*, 2003). Per tant, tot aquest conjunt de dades reforça la hipòtesi de la metilació genòmica i, per extensió, tot el conjunt de canvis epigenètics associats a la heterocromatina com a mecanisme de protecció i manteniment de la integritat genòmica. Igual que altres mecanismes que contribueixen a la senescència, aquests poden protegir els individus joves de morts prematures i càncer, però en edats més avançades poden accelerar l'acumulació de canvis i contribuir a la transformació maligne de cèl·lules somàtiques (Campisi, 1996, 2003). El conjunt de canvis epigenètics té el seu efecte esmorteïdor al llarg de l'edat reproductiva, per assegurar la continuïtat de l'espècie. Al llarg del temps, aquest sistema va acumulant alteracions. Aquestes alteracions, en condicions normals, són detectades per sensors biològics de dany genòmic, que desencadenen tot un seguit de canvis, entre els quals hi ha la senescència com a mecanisme protector. La possible

manca d'aquests sensors encarregats de disparar la senescència cel·lular pot provocar una inestabilitat genòmica, que afavoriria la progressió tumoral.

Nosaltres, a partir de la tècnica AIMS, vam identificar tota una sèrie de fragments subjectes a canvis de metilació genòmica associada a l'edat (vegeu la taula A1, a l'apèndix). La majoria de canvis es corresponien a pèrdues de metilació (18/19). Només un fragment va mostrar hipermetilació associada a l'edat i, paradoxalment, aquest era el fragment Z. Sens dubte, la possibilitat d'una heterocromatització genòmica associada al procés d'envelliment constitueix una hipòtesi seductora per a treballs posteriors. Mentre que la hipermetilació és progressiva amb l'edat, destaca la pèrdua accentuada de les hipometilacions (vegeu la figura A1 i la gràfica A1, a l'apèndix). Aquestes diferències, altra vegada, suggereixen mecanismes subjacents diferents entre els dos tipus de canvis. Gràcies a la possibilitat de poder caracteritzar els diferents fragments amplificats per aquesta tècnica, vam esbrinar l'origen dels fragments esmentats (vegeu la taula A1). Actualment s'estan confirmant alguns d'aquests canvis per tècniques alternatives. Paral·lelament, en els resultats presentats en el capítol 3, es pot observar que la correlació de la hipometilació amb el dany genòmic, així com el seu valor pronòstic, també es veuen condicionats per l'edat.

En definitiva, pensem que la identificació d'aquest conjunt de canvis i la posterior caracterització de la presència o no d'altres canvis epigenètics associats a l'edat ens poden ajudar a contestar algunes de les moltes preguntes que sorgeixen al voltant d'aquest triangle que formen l'epigenètica, l'envelliment i el càncer.





CONCLUSIONS



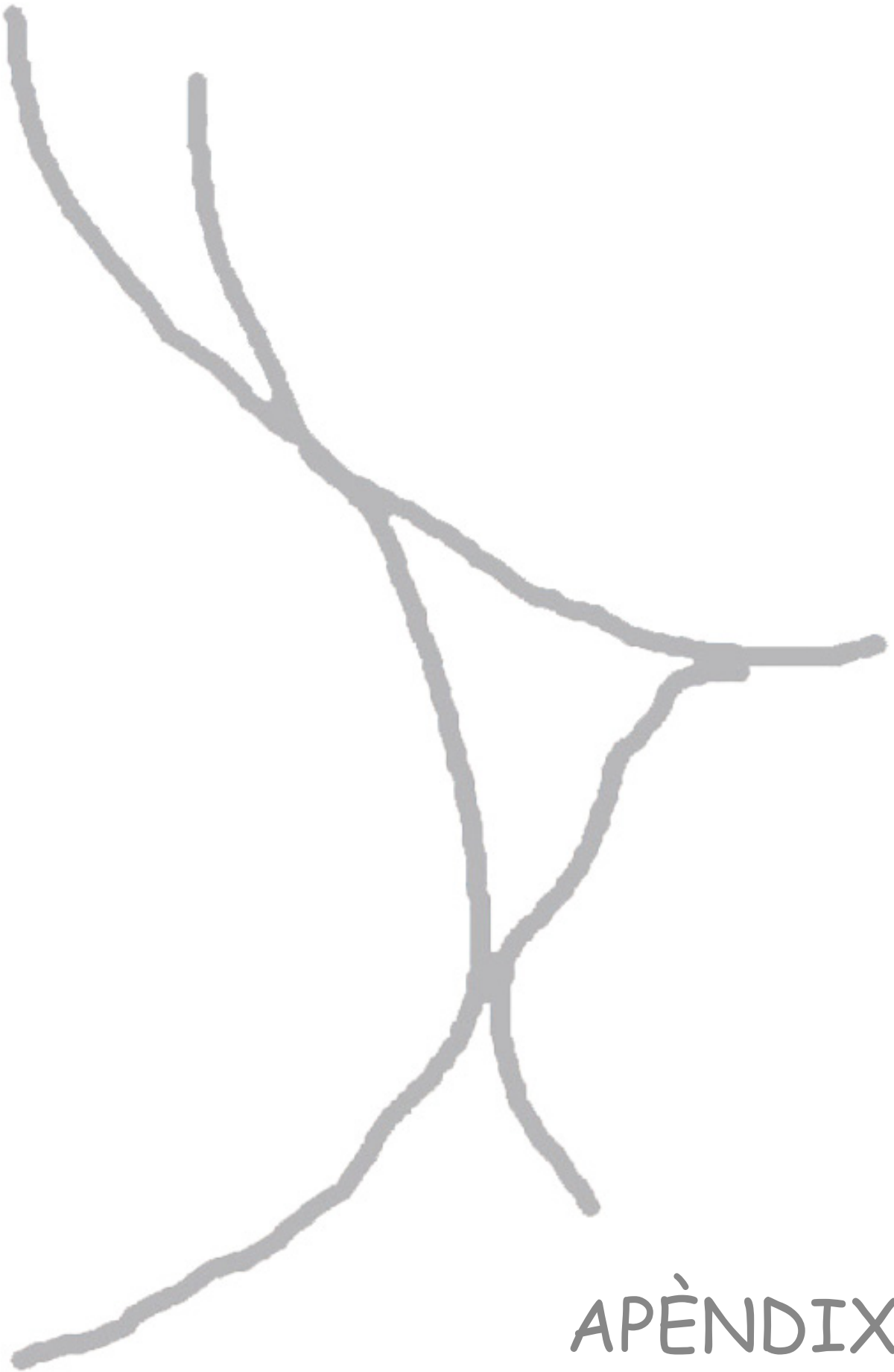
## CONCLUSIONS

---

1. La tècnica AIMS és una eina útil per realitzar estudis globals de pèrdues i guanys de metilació genòmica. Permet la identificació i posterior caracterització d'alteracions recurrents específiques.
2. La hipermetilació i la hipometilació genòmica són processos generalitzats en el càncer colorectal, però es donen de forma independent. La hipermetilació és progressiva amb l'avanç de la malaltia, mentre que la hipometilació és un canvi primerenc i s'associa a mal pronòstic.
3. La hipometilació genòmica global presenta una correlació estadísticament significativa amb el grau de dany genòmic.
4. La pèrdua d'expressió del gen PTGIS causada per una hipermetilació de la seva regió promotora és un fet comú en càncer colorectal. Aquesta inactivació presenta una associació estadísticament significativa amb el grau d'aneuploidia tumoral.
5. S'identifica, en una elevada proporció de càncers colorectals, una metilació genòmica sincrònica que afecta diverses illes CpG que s'estenen al llarg d'una megabase a la regió citogenètica 2q14.2. Aquests canvis demostren la presència d'hipermetilacions globals associades al procés tumoral.
6. El silenciament epigenètic al llarg de 2q14.2 implica una remodelació de l'estructura cromatínica associada a tota la banda citogenètica i afecta l'expressió de tots els gens presents a la regió. Aquest silenciament suposa un nou mecanisme d'inactivació gènica associat al procés tumoral.







APÉNDIX



## APÈNDIX

---

### **Taula A1**

Conjunt de fragments aïllats a partir de l'AIMS i que presenten correlacions amb l'edat. La majoria de fragments mostren una hipometilació associada a l'envelliment.

### **Figura A1**

Exemples de fragments que presenten alteracions en la metilació associades a l'edat. En aquest cas només es mostra el resultat de l'AIMS en el teixit normal. L'ordre és creixent per edats.

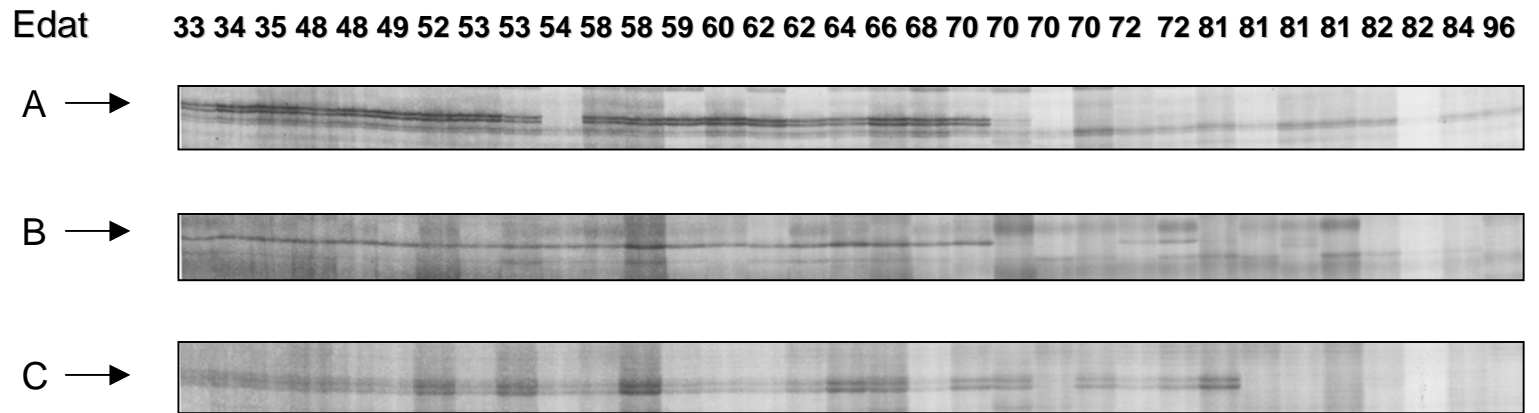
### **Gràfica A1**

A l'eix d'ordenades es mostra el percentatge de teixits normals que presenten els fragments A, B, C i D. A l'eix d'abcisses s'agrupen les diferents mostres de teixit normal per rangs d'edat.

Band ID	AIMS	Band size(bp)	Chromosome map	%GC	CpG/GpC	Gene	Alu	Age association
	primers				ratio		repeat	
H3	CTA-TGG	461	1p36	61	0.69	SLC35E2	No	Hypomethylation
LL3	CTA-TGG	270	9q34.3	62	0.27	SNAPC4	No	Hypomethylation
LL4A	CTA-TGG	272	19p13.2	63	0,59	NFIX	No	Hypomethylation
LL4B	CTA-TGG	275	19p13.3	60	0,5	FLJ20241	Yes	Hypomethylation
C5A	CTA-TGG	217	20q11.22	53	0,38	CEP2	Yes	Hypomethylation
C5B	CTA-TGG	227	3p13	52	0,44	FOXP1	No	Hypomethylation
C5C	CTA-TGG	233	9q34.3	65	0,28	None	No	Hypomethylation
C5D	CTA-TGG	306	10p13	49	0,43	RSU1	Yes	Hypomethylation
C5E	CTA-TGG	353	9q33.1	54	0,76	None	Yes	Hypomethylation
C5F	CTA-TGG	406	7p11.2	55	0,64	FKBP9	No	Hypomethylation
C5G	CTA-TGG	410	10q24.31	50	0,62	None	Yes	Hypomethylation
I5	CTG-TGG	600	10q26.3	65	0,35	INPP5A	No	Hypomethylation
M5A	CTG-TGG	401	2q37.3	52	0,53	HDAC4	No	Hypomethylation
M5B	CTG-TGG	456	10q26.2	56	0,22	None	No	Hypomethylation
M4	CTG-TGG	449	1p36.32	66	0,49	None	No	Hypomethylation
R2	CTG-TGG	343	6q25.3	65	0,65	FNDC1	No	Hypomethylation
S3	CTG-TGG	198	16p11.2	58	0,58	ATP2A1	No	Hypomethylation
X5	CTG-TGG	209	19p13.2	53	0,26	None	Yes	Hypomethylation
Z	CTG-TGG	196	2q14.2	47	0,7	None	No	Hypermethylation

Taula A1

### Hipometilació amb l'edat



### Hipermetilació amb l'edat

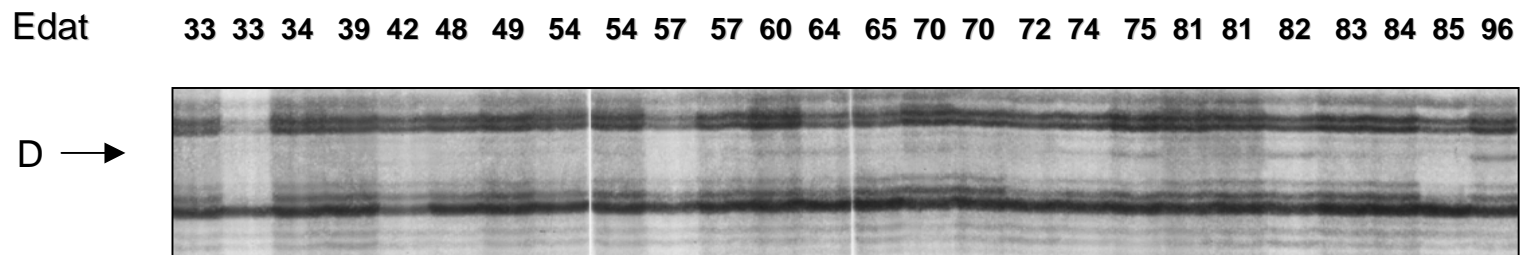
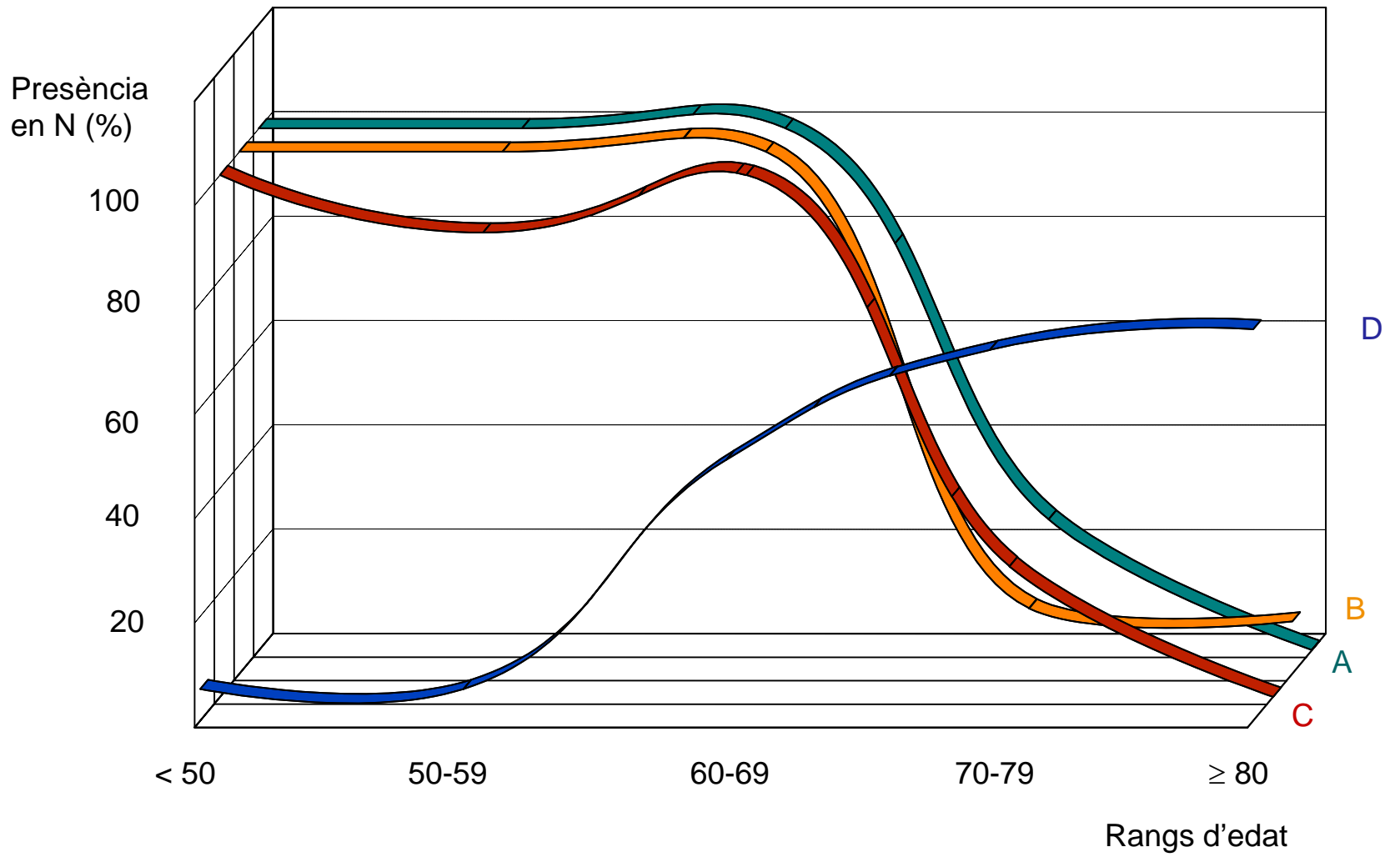
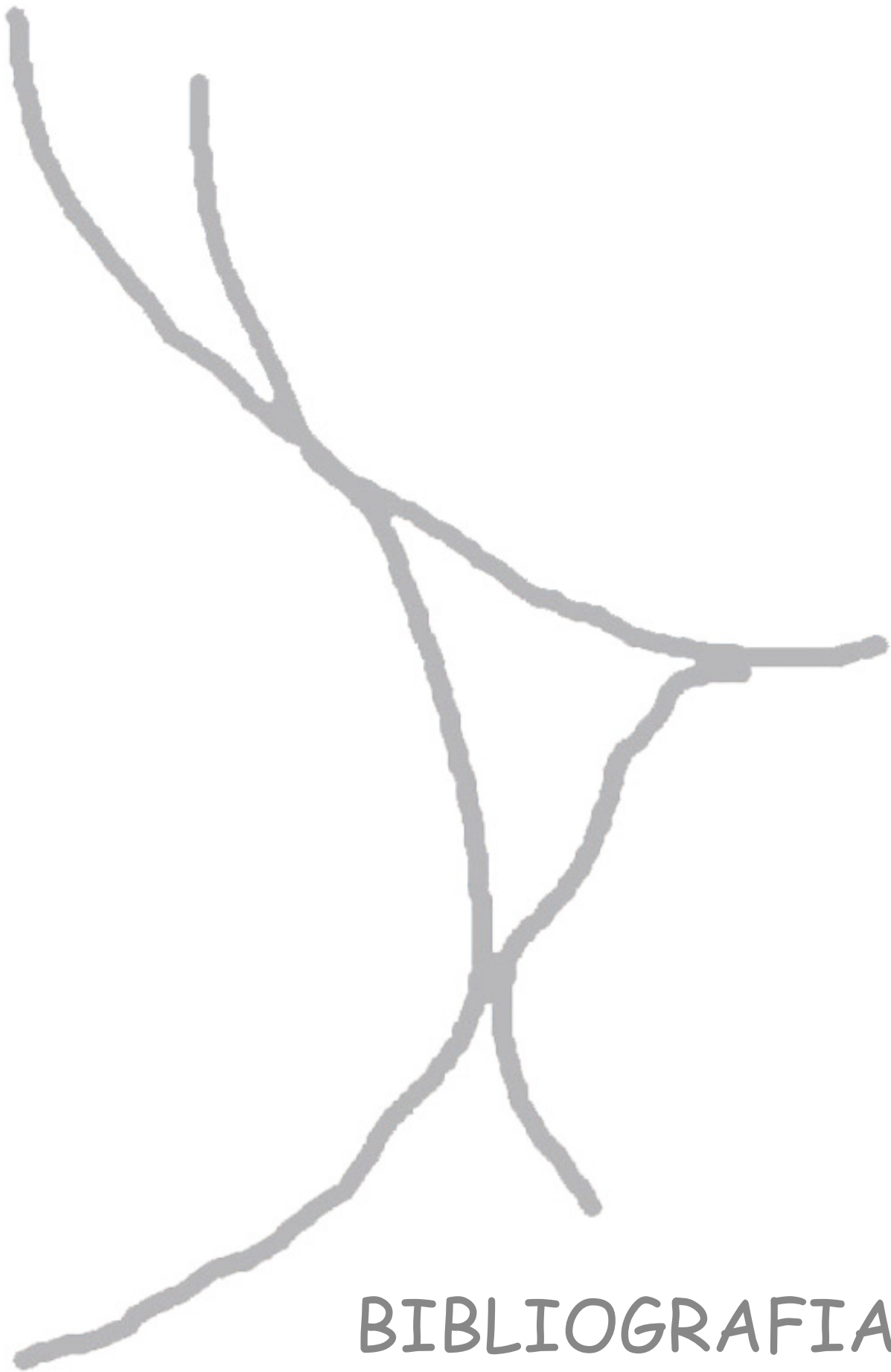


Figura A1



Gràfica A1



BIBLIOGRAFIA





- Abate-Shen, C. (2002). Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nat Rev Cancer* 2, 777-785.
- Agalioti, T., Lomvardas, S., Parekh, B., Yie, J., Maniatis, T., and Thanos, D. (2000). Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell* 103, 667-678.
- Ahmad, K., and Henikoff, S. (2002). Epigenetic consequences of nucleosome dynamics. *Cell* 111, 281-284.
- Ahuja, N., Li, Q., Mohan, A. L., Baylin, S. B., and Issa, J. P. (1998). Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res* 58, 5489-5494.
- Akiyama, Y., Maesawa, C., Ogasawara, S., Terashima, M., and Masuda, T. (2003). Cell-type-specific repression of the maspin gene is disrupted frequently by demethylation at the promoter region in gastric intestinal metaplasia and cancer cells. *Am J Pathol* 163, 1911-1919.
- Alaminos, M., Davalos, V., Cheung, N. K., Gerald, W. L., and Esteller, M. (2004). Clustering of gene hypermethylation associated with clinical risk groups in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst* 96, 1208-1219.
- Anderson, G. R., Stoler, D. L., and Brenner, B. M. (2001). Cancer: the evolved consequence of a destabilized genome. *Bioessays* 23, 1037-1046.
- Antequera, F., and Bird, A. (1999). CpG islands as genomic footprints of promoters that are associated with replication origins. *Curr Biol* 9, R661-667.
- Aravin, A. A., Naumova, N. M., Tulin, A. V., Vagin, V. V., Rozovsky, Y. M., and Gvozdev, V. A. (2001). Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Curr Biol* 11, 1017-1027.
- Avner, P., and Heard, E. (2001). X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet* 2, 59-67.
- Bachman, K. E., Park, B. H., Rhee, I., Rajagopalan, H., Herman, J. G., Baylin, S. B., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (2003). Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. *Cancer Cell* 3, 89-95.
- Bannert, N., and Kurth, R. (2004). Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2, 14572-14579. Epub 12004 Aug 14513.
- Barbot, W., Dupressoir, A., Lazar, V., and Heidmann, T. (2002). Epigenetic regulation of an IAP retrotransposon in the aging mouse: progressive demethylation and de-silencing of the element by its repetitive induction. *Nucleic Acids Res* 30, 2365-2373.
- Bariol, C., Suter, C., Cheong, K., Ku, S. L., Meagher, A., Hawkins, N., and Ward, R. (2003). The relationship between hypomethylation and CpG island methylation in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 162, 1361-1371.
- Baylin, S. B., and Herman, J. G. (2000). DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 16, 168-174.
- Baylin, S. B., and Herman, J. G. (2001). Promoter hypermethylation--can this change alone ever designate true tumor suppressor gene function? *J Natl Cancer Inst* 93, 664-665.
- Bell, A. C., and Felsenfeld, G. (2000). Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. *Nature* 405, 482-485.

- Bernardino, J., Roux, C., Almeida, A., Vogt, N., Gibaud, A., Gerbault-Seureau, M., Magdelenat, H., Bourgeois, C. A., Malfoy, B., and Dutrillaux, B. (1997). DNA hypomethylation in breast cancer: an independent parameter of tumor progression? *Cancer Genet Cytogenet* 97, 83-89.
- Bestor, T. H. (2003). Unanswered questions about the role of promoter methylation in carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 983, 22-27.
- Bestor, T. H., Hellewell, S. B., and Ingram, V. M. (1984). Differentiation of two mouse cell lines is associated with hypomethylation of their genomes. *Mol Cell Biol* 4, 1800-1806.
- Bird, A. (1997). Does DNA methylation control transposition of selfish elements in the germline? *Trends Genet* 13, 469-472.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16, 6-21.
- Bird, A. P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321, 209-213.
- Bird, A. P. (1995). Gene number, noise reduction and biological complexity. *Trends Genet* 11, 94-100.
- Bird, A. P., and Taggart, M. H. (1980). Variable patterns of total DNA and rDNA methylation in animals. *Nucleic Acids Res* 8, 1485-1497.
- Boeger, H., Griesenbeck, J., Strattan, J. S., and Kornberg, R. D. (2003). Nucleosomes unfold completely at a transcriptionally active promoter. *Mol Cell* 11, 1587-1598.
- Bourc'his, D., and Bestor, T. H. (2002). Helicase homologues maintain cytosine methylation in plants and mammals. *Bioessays* 24, 297-299.
- Bracken, A. P., Pasini, D., Capra, M., Prosperini, E., Colli, E., and Helin, K. (2003). EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *Embo J* 22, 5323-5335.
- Bradbury, J. (2003). Human epigenome project--up and running. *PLoS Biol* 1, E82.
- Brehm, A., Tufteland, K. R., Aasland, R., and Becker, P. B. (2004). The many colours of chromodomains. *Bioessays* 26, 133-140.
- Brenner, C., Deplus, R., Didelot, C., Lorient, A., Vire, E., De Smet, C., Gutierrez, A., Danovi, D., Bernard, D., Boon, T., *et al.* (2005). Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *Embo J* 24, 336-346. Epub 2004 Dec 2016.
- Brock, H. W., and van Lohuizen, M. (2001). The Polycomb group--no longer an exclusive club? *Curr Opin Genet Dev* 11, 175-181.
- Brock, M. V., Gou, M., Akiyama, Y., Muller, A., Wu, T. T., Montgomery, E., Deasel, M., Germonpre, P., Rubinson, L., Heitmiller, R. F., *et al.* (2003). Prognostic importance of promoter hypermethylation of multiple genes in esophageal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 9, 2912-2919.
- Brothman, A. R., Swanson, G., Maxwell, T. M., Cui, J., Murphy, K. J., Herrick, J., Speights, V. O., Isaac, J., and Rohr, L. R. (2005). Global hypomethylation is common in prostate cancer cells: a quantitative predictor for clinical outcome? *Cancer Genet Cytogenet* 156, 31-36.
- Burgers, W. A., Fuks, F., and Kouzarides, T. (2002). DNA methyltransferases get connected to chromatin. *Trends Genet* 18, 275-277.

- Cameron, E. E., Bachman, K. E., Myohanen, S., Herman, J. G., and Baylin, S. B. (1999). Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 21, 103-107.
- Campisi, J. (1996). Replicative senescence: an old lives' tale? *Cell* 84, 497-500.
- Campisi, J. (2003). Cancer and ageing: rival demons? *Nat Rev Cancer* 3, 339-349.
- Cao, R., and Zhang, Y. (2004). The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr Opin Genet Dev* 14, 155-164.
- Cargill, M., Altshuler, D., Ireland, J., Sklar, P., Ardlie, K., Patil, N., Shaw, N., Lane, C. R., Lim, E. P., Kalyanaraman, N., *et al.* (1999). Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 22, 231-238.
- Chan, M. F., van Amerongen, R., Nijjar, T., Cuppen, E., Jones, P. A., and Laird, P. W. (2001). Reduced rates of gene loss, gene silencing, and gene mutation in Dnmt1-deficient embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 21, 7587-7600.
- Chen, R. Z., Pettersson, U., Beard, C., Jackson-Grusby, L., and Jaenisch, R. (1998). DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 395, 89-93.
- Cillo, C., Cantile, M., Faiella, A., and Boncinelli, E. (2001). Homeobox genes in normal and malignant cells. *J Cell Physiol* 188, 161-169.
- Clark, S. J., Harrison, J., Paul, C. L., and Frommer, M. (1994). High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 22, 2990-2997.
- Clark, S. J., and Melki, J. (2002). DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene* 21, 5380-5387.
- Claus, R., and Lubbert, M. (2003). Epigenetic targets in hematopoietic malignancies. *Oncogene* 22, 6489-6496.
- Clerc, P., and Avner, P. (2003). Multiple elements within the Xic regulate random X inactivation in mice. *Semin Cell Dev Biol* 14, 85-92.
- Cosma, M. P., Tanaka, T., and Nasmyth, K. (1999). Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell* 97, 299-311.
- Costello, J. F., Fruhwald, M. C., Smiraglia, D. J., Rush, L. J., Robertson, G. P., Gao, X., Wright, F. A., Feramisco, J. D., Peltomaki, P., Lang, J. C., *et al.* (2000). Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 24, 132-138.
- Costello, J. F., and Plass, C. (2001). Methylation matters. *J Med Genet* 38, 285-303.
- Costello, J. F., and Vertino, P. M. (2002). Methylation matters: a new spin on maspin. *Nat Genet* 31, 123-124.
- Cottrell, S. E. (2004). Molecular diagnostic applications of DNA methylation technology. *Clin Biochem* 37, 595-604.
- Coulondre, C., Miller, J. H., Farabaugh, P. J., and Gilbert, W. (1978). Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature* 274, 775-780.
- Craig, J. M. (2005). Heterochromatin--many flavours, common themes. *Bioessays* 27, 17-28.
- Csankovszki, G., Nagy, A., and Jaenisch, R. (2001). Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. *J Cell Biol* 153, 773-784.

- Csink, A. K., and Henikoff, S. (1998). Something from nothing: the evolution and utility of satellite repeats. *Trends Genet* 14, 200-204.
- De Backer, O., Arden, K. C., Boretti, M., Vantomme, V., De Smet, C., Czekay, S., Viars, C. S., De Plaen, E., Brasseur, F., Chomez, P., *et al.* (1999). Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis. *Cancer Res* 59, 3157-3165.
- de Boer, J., and Hoeijmakers, J. H. (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 21, 453-460.
- de la Cruz, X., Lois, S., Sanchez-Molina, S., and Martinez-Balbas, M. A. (2005). Do protein motifs read the histone code? *Bioessays* 27, 164-175.
- De Smet, C., De Backer, O., Faraoni, I., Lurquin, C., Brasseur, F., and Boon, T. (1996). The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7149-7153.
- Del Senno, L., Maestri, I., Piva, R., Hanau, S., Reggiani, A., Romano, A., and Russo, G. (1989). Differential hypomethylation of the c-myc protooncogene in bladder cancers at different stages and grades. *J Urol* 142, 146-149.
- Dennis, K., Fan, T., Geiman, T., Yan, Q., and Muegge, K. (2001). Lsh, a member of the SNF2 family, is required for genome-wide methylation. *Genes Dev* 15, 2940-2944.
- Di Croce, L., Raker, V. A., Corsaro, M., Fazi, F., Fanelli, M., Faretta, M., Fuks, F., Lo Coco, F., Kouzarides, T., Nervi, C., *et al.* (2002). Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science* 295, 1079-1082.
- Dillon, N., and Festenstein, R. (2002). Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility. *Trends Genet* 18, 252-258.
- Dobosy, J. R., and Selker, E. U. (2001). Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation. *Cell Mol Life Sci* 58, 721-727.
- Duret, L., and Galtier, N. (2000). The covariation between TpA deficiency, CpG deficiency, and G+C content of human isochores is due to a mathematical artifact. *Mol Biol Evol* 17, 1620-1625.
- Eden, A., Gaudet, F., Waghmare, A., and Jaenisch, R. (2003). Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 300, 455.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., and Jones, P. A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429, 457-463.
- Ehrlich, M., Jiang, G., Fiala, E., Dome, J. S., Yu, M. C., Long, T. I., Youn, B., Sohn, O. S., Widschwendter, M., Tomlinson, G. E., *et al.* (2002). Hypomethylation and hypermethylation of DNA in Wilms tumors. *Oncogene* 21, 6694-6702.
- Elgin, S. C., and Grewal, S. I. (2003). Heterochromatin: silence is golden. *Curr Biol* 13, R895-898.
- El-Osta, A., Kantharidis, P., Zalcborg, J. R., and Wolffe, A. P. (2002). Precipitous release of methyl-CpG binding protein 2 and histone deacetylase 1 from the methylated human multidrug resistance gene (MDR1) on activation. *Mol Cell Biol* 22, 1844-1857.
- Esteller, M. (2005). Dormant hypermethylated tumour suppressor genes: questions and answers. *J Pathol* 205, 172-180.
- Esteller, M., Corn, P. G., Baylin, S. B., and Herman, J. G. (2001b). A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 61, 3225-3229.

- Esteller, M., Fraga, M. F., Guo, M., Garcia-Foncillas, J., Hedenfalk, I., Godwin, A. K., Trojan, J., Vaurs-Barriere, C., Bignon, Y. J., Ramus, S., *et al.* (2001a). DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet* 10, 3001-3007.
- Esteller, M., Gonzalez, S., Risques, R. A., Marcuello, E., Mangués, R., Germa, J. R., Herman, J. G., Capella, G., and Peinado, M. A. (2001d). K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol* 19, 299-304.
- Esteller, M., Hamilton, S. R., Burger, P. C., Baylin, S. B., and Herman, J. G. (1999). Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 59, 793-797.
- Esteller, M., Risques, R. A., Toyota, M., Capella, G., Moreno, V., Peinado, M. A., Baylin, S. B., and Herman, J. G. (2001c). 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* 61, 4689-4692.
- Esteller, M., Toyota, M., Sanchez-Cespedes, M., Capella, G., Peinado, M. A., Watkins, D. N., Issa, J. P., Sidransky, D., Baylin, S. B., and Herman, J. G. (2000). Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 60, 2368-2371.
- Fahrner, J. A., Eguchi, S., Herman, J. G., and Baylin, S. B. (2002). Dependence of histone modifications and gene expression on DNA hypermethylation in cancer. *Cancer Res* 62, 7213-7218.
- Fazzari, M. J., and Grealley, J. M. (2004). Epigenomics: beyond CpG islands. *Nat Rev Genet* 5, 446-455.
- Feinberg, A. P., Gehrke, C. W., Kuo, K. C., and Ehrlich, M. (1988). Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. *Cancer Res* 48, 1159-1161.
- Feinberg, A. P., and Tycko, B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 4, 143-153.
- Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301, 89-92.
- Felsenfeld, G., and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* 421, 448-453.
- Feng, Q., and Zhang, Y. (2001). The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes Dev* 15, 827-832.
- Ferguson, A. T., Vertino, P. M., Spitzner, J. R., Baylin, S. B., Muller, M. T., and Davidson, N. E. (1997). Role of estrogen receptor gene demethylation and DNA methyltransferase-DNA adduct formation in 5-aza-2'deoxyctidine-induced cytotoxicity in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 272, 32260-32266.
- Ferguson-Smith, A. C., and Surani, M. A. (2001). Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. *Science* 293, 1086-1089.
- Finnegan, E. J., Peacock, W. J., and Dennis, E. S. (2000). DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Curr Opin Genet Dev* 10, 217-223.
- Fischle, W., Wang, Y., and Allis, C. D. (2003). Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature* 425, 475-479.

- Flaus, A., and Owen-Hughes, T. (2003). Mechanisms for nucleosome mobilization. *Biopolymers* 68, 563-578.
- Fleissner, E., and Borek, E. (1963). Studies on the Enzymatic Methylation of Soluble Rna. I. Methylation of the S-Rna Polymer. *Biochemistry* 338, 1093-1100.
- Flori, A. R., Steinhoff, C., Muller, M., Seifert, H. H., Hader, C., Engers, R., Ackermann, R., and Schulz, W. A. (2004). Coordinate hypermethylation at specific genes in prostate carcinoma precedes LINE-1 hypomethylation. *Br J Cancer* 91, 985-994.
- Francis, N. J., and Kingston, R. E. (2001). Mechanisms of transcriptional memory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 409-421.
- Frank, D., Keshet, I., Shani, M., Levine, A., Razin, A., and Cedar, H. (1991). Demethylation of CpG islands in embryonic cells. *Nature* 351, 239-241.
- Frigola, J., Paz, M. F., Esteller, M., and Peinado, M. A. (2005a). DNA methylation: approaches, methods and applications. In *Methylation-Arbitrarily-primed PCR and related methodologies*, M. Esteller, ed. (Londres, CRC press), pp. 85-93.
- Frigola, J., Sole, X., Paz, M. F., Moreno, V., Esteller, M., Capella, G., and Peinado, M. A. (2005b). Differential DNA hypermethylation and hypomethylation signatures in colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 14, 319-326. Epub 2004 Dec 2001.
- Futscher, B. W., Oshiro, M. M., Wozniak, R. J., Holtan, N., Hanigan, C. L., Duan, H., and Domann, F. E. (2002). Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. *Nat Genet* 31, 175-179.
- Gama-Sosa, M. A., Slagel, V. A., Trewyn, R. W., Oxenhandler, R., Kuo, K. C., Gehrke, C. W., and Ehrlich, M. (1983). The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res* 11, 6883-6894.
- Garcia-Cao, M., O'Sullivan, R., Peters, A. H., Jenuwein, T., and Blasco, M. A. (2004). Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nat Genet* 36, 94-99.
- Gardiner-Garden, M., and Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196, 261-282.
- Gaudet, F., Hodgson, J. G., Eden, A., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Gray, J. W., Leonhardt, H., and Jaenisch, R. (2003). Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 300, 489-492.
- Gibbons, R. J., McDowell, T. L., Raman, S., O'Rourke, D. M., Garrick, D., Ayyub, H., and Higgs, D. R. (2000). Mutations in ATRX, encoding a SWI/SNF-like protein, cause diverse changes in the pattern of DNA methylation. *Nat Genet* 24, 368-371.
- Gilbert, D. M. (2002). Replication timing and transcriptional control: beyond cause and effect. *Curr Opin Cell Biol* 14, 377-383.
- Gius, D., Cui, H., Bradbury, C. M., Cook, J., Smart, D. K., Zhao, S., Young, L., Brandenburg, S. A., Hu, Y., Bisht, K. S., *et al.* (2004). Distinct effects on gene expression of chemical and genetic manipulation of the cancer epigenome revealed by a multimodality approach. *Cancer Cell* 6, 361-371.
- Goelz, S. E., Vogelstein, B., Hamilton, S. R., and Feinberg, A. P. (1985). Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science* 228, 187-190.
- Gonzalez-Zulueta, M., Bender, C. M., Yang, A. S., Nguyen, T., Beart, R. W., Van Tornout, J. M., and Jones, P. A. (1995). Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res* 55, 4531-4535.

- Gonzalzo, M. L., Liang, G., Spruck, C. H., 3rd, Zingg, J. M., Rideout, W. M., 3rd, and Jones, P. A. (1997). Identification and characterization of differentially methylated regions of genomic DNA by methylation-sensitive arbitrarily primed PCR. *Cancer Res* 57, 594-599.
- Gowher, H., Leismann, O., and Jeltsch, A. (2000). DNA of *Drosophila melanogaster* contains 5-methylcytosine. *Embo J* 19, 6918-6923.
- Gray, Y. H. (2000). It takes two transposons to tango: transposable-element-mediated chromosomal rearrangements. *Trends Genet* 16, 461-468.
- Greger, V., Passarge, E., Hopping, W., Messmer, E., and Horsthemke, B. (1989). Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet* 83, 155-158.
- Gregory, R. I., and Shiekhattar, R. (2004). Chromatin modifiers and carcinogenesis. *Trends Cell Biol* 14, 695-702.
- Grewal, S. I., and Moazed, D. (2003). Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science* 301, 798-802.
- Grewal, S. I., and Rice, J. C. (2004). Regulation of heterochromatin by histone methylation and small RNAs. *Curr Opin Cell Biol* 16, 230-238.
- Grippo, P., Iaccarino, M., Parisi, E., and Scarano, E. (1968). Methylation of DNA in developing sea urchin embryos. *J Mol Biol* 36, 195-208.
- Grunau, C., Hindermann, W., and Rosenthal, A. (2000). Large-scale methylation analysis of human genomic DNA reveals tissue-specific differences between the methylation profiles of genes and pseudogenes. *Hum Mol Genet* 9, 2651-2663.
- Hajra, K. M., Ji, X., and Fearon, E. R. (1999). Extinction of E-cadherin expression in breast cancer via a dominant repression pathway acting on proximal promoter elements. *Oncogene* 18, 7274-7279.
- Hake, S. B., Xiao, A., and Allis, C. D. (2004). Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer. *Br J Cancer* 90, 761-769.
- Halushka, M. K., Fan, J. B., Bentley, K., Hsie, L., Shen, N., Weder, A., Cooper, R., Lipshutz, R., and Chakravarti, A. (1999). Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nat Genet* 22, 239-247.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hansen, R. S., Stoger, R., Wijmenga, C., Stanek, A. M., Canfield, T. K., Luo, P., Matarazzo, M. R., D'Esposito, M., Feil, R., Gimelli, G., *et al.* (2000). Escape from gene silencing in ICF syndrome: evidence for advanced replication time as a major determinant. *Hum Mol Genet* 9, 2575-2587.
- Hansen, R. S., Wijmenga, C., Luo, P., Stanek, A. M., Canfield, T. K., Weemaes, C. M., and Gartler, S. M. (1999). The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14412-14417.
- Harikrishnan, K. N., Chow, M. Z., Baker, E. K., Pal, S., Bassal, S., Brasacchio, D., Wang, L., Craig, J. M., Jones, P. L., Sif, S., and El-Osta, A. (2005). Brahma links the SWI/SNF chromatin-remodeling complex with MeCP2-dependent transcriptional silencing. *Nat Genet* 37, 254-264. Epub 2005 Feb 2006.
- Hark, A. T., Schoenherr, C. J., Katz, D. J., Ingram, R. S., Levorse, J. M., and Tilghman, S. M. (2000). CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* 405, 486-489.



- Hashimshony, T., Zhang, J., Keshet, I., Bustin, M., and Cedar, H. (2003). The role of DNA methylation in setting up chromatin structure during development. *Nat Genet* 34, 187-192.
- Hasty, P., Campisi, J., Hoeijmakers, J., van Steeg, H., and Vijg, J. (2003). Aging and genome maintenance: lessons from the mouse? *Science* 299, 1355-1359.
- Hayashizaki, Y., Hirotsune, S., Okazaki, Y., Hatada, I., Shibata, H., Kawai, J., Hirose, K., Watanabe, S., Fushiki, S., Wada, S., and et al. (1993). Restriction landmark genomic scanning method and its various applications. *Electrophoresis* 14, 251-258.
- Heard, E. (2004). Recent advances in X-chromosome inactivation. *Curr Opin Cell Biol* 16, 247-255.
- Heitz, E. (1928). Das heterochromatin der moose. *Jahrb Wiss Botanik* 69, 762-818.
- Hendrich, B., and Bird, A. (1998). Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 18, 6538-6547.
- Hendrich, B., and Tweedie, S. (2003). The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals. *Trends Genet* 19, 269-277.
- Henikoff, S. (2000). Heterochromatin function in complex genomes. *Biochim Biophys Acta* 1470, O1-8.
- Henikoff, S., and Comai, L. (1998). A DNA methyltransferase homolog with a chromodomain exists in multiple polymorphic forms in *Arabidopsis*. *Genetics* 149, 307-318.
- Hennig, W. (1999). Heterochromatin. *Chromosoma* 108, 1-9.
- Herman, J. G., and Baylin, S. B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349, 2042-2054.
- Herman, J. G., Civin, C. I., Issa, J. P., Collector, M. I., Sharkis, S. J., and Baylin, S. B. (1997). Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res* 57, 837-841.
- Herman, J. G., Graff, J. R., Myohanen, S., Nelkin, B. D., and Baylin, S. B. (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9821-9826.
- Herman, J. G., Latif, F., Weng, Y., Lerman, M. I., Zbar, B., Liu, S., Samid, D., Duan, D. S., Gnarr, J. R., Linehan, W. M., and et al. (1994). Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9700-9704.
- Hernandez, R., Frady, A., Zhang, X. Y., Varela, M., and Ehrlich, M. (1997). Preferential induction of chromosome 1 multibranching figures and whole-arm deletions in a human pro-B cell line treated with 5-azacytidine or 5-azadeoxycytidine. *Cytogenet Cell Genet* 76, 196-201.
- Holliday, R. (1987). The inheritance of epigenetic defects. *Science* 238, 163-170.
- Holliday, R., and Pugh, J. E. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 187, 226-232.
- Holmgren, C., Kanduri, C., Dell, G., Ward, A., Mukhopadhyay, R., Kanduri, M., Lobanenko, V., and Ohlsson, R. (2001). CpG methylation regulates the Igf2/H19 insulator. *Curr Biol* 11, 1128-1130.
- Huang, C., Sloan, E. A., and Boerkoel, C. F. (2003). Chromatin remodeling and human disease. *Curr Opin Genet Dev* 13, 246-252.

- Huang, T. H., Laux, D. E., Hamlin, B. C., Tran, P., Tran, H., and Lubahn, D. B. (1997). Identification of DNA methylation markers for human breast carcinomas using the methylation-sensitive restriction fingerprinting technique. *Cancer Res* 57, 1030-1034.
- Huang, T. H., Perry, M. R., and Laux, D. E. (1999). Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells. *Hum Mol Genet* 8, 459-470.
- Hung, M. S., Karthikeyan, N., Huang, B., Koo, H. C., Kiger, J., and Shen, C. J. (1999). Drosophila proteins related to vertebrate DNA (5-cytosine) methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11940-11945.
- Iizuka, M., and Smith, M. M. (2003). Functional consequences of histone modifications. *Curr Opin Genet Dev* 13, 154-160.
- Ioshikhes, I. P., and Zhang, M. Q. (2000). Large-scale human promoter mapping using CpG islands. *Nat Genet* 26, 61-63.
- Issa, J. P., Ottaviano, Y. L., Celano, P., Hamilton, S. R., Davidson, N. E., and Baylin, S. B. (1994). Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet* 7, 536-540.
- Jackson, J. P., Lindroth, A. M., Cao, X., and Jacobsen, S. E. (2002). Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* 416, 556-560. Epub 2002 Mar 2017.
- Jackson-Grusby, L., Beard, C., Possemato, R., Tudor, M., Fambrough, D., Csankovszki, G., Dausman, J., Lee, P., Wilson, C., Lander, E., and Jaenisch, R. (2001). Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat Genet* 27, 31-39.
- Jackson-Grusby, L., Laird, P. W., Magge, S. N., Moeller, B. J., and Jaenisch, R. (1997). Mutagenicity of 5-aza-2'-deoxycytidine is mediated by the mammalian DNA methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4681-4685.
- Jeanpierre, M. (1994). Human satellites 2 and 3. *Ann Genet* 37, 163-171.
- Jeanpierre, M., Turleau, C., Aurias, A., Prieur, M., Ledest, F., Fischer, A., and Viegas-Pequignot, E. (1993). An embryonic-like methylation pattern of classical satellite DNA is observed in ICF syndrome. *Hum Mol Genet* 2, 731-735.
- Jeddeloh, J. A., Stokes, T. L., and Richards, E. J. (1999). Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nat Genet* 22, 94-97.
- Johnston, C. M., Newall, A. E., Brockdorff, N., and Nesterova, T. B. (2002). Enox, a novel gene that maps 10 kb upstream of Xist and partially escapes X inactivation. *Genomics* 80, 236-244.
- Jones, P. A. (1999). The DNA methylation paradox. *Trends Genet* 15, 34-37.
- Jones, P. A., and Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3, 415-428.
- Jones, P. A., and Laird, P. W. (1999). Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 21, 163-167.
- Jones, P. L., Veenstra, G. J., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., Strouboulis, J., and Wolffe, A. P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19, 187-191.
- Jurgens, B., Schmitz-Drager, B. J., and Schulz, W. A. (1996). Hypomethylation of L1 LINE sequences prevailing in human urothelial carcinoma. *Cancer Res* 56, 5698-5703.

- Kafri, T., Ariel, M., Brandeis, M., Shemer, R., Urven, L., McCarrey, J., Cedar, H., and Razin, A. (1992). Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev* 6, 705-714.
- Kamakaka, R. T., and Biggins, S. (2005). Histone variants: deviants? *Genes Dev* 19, 295-310.
- Kane, M. F., Loda, M., Gaida, G. M., Lipman, J., Mishra, R., Goldman, H., Jessup, J. M., and Kolodner, R. (1997). Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 57, 808-811.
- Kato, M., Miura, A., Bender, J., Jacobsen, S. E., and Kakutani, T. (2003). Role of CG and non-CG methylation in immobilization of transposons in Arabidopsis. *Curr Biol* 13, 421-426.
- Kazazian, H. H., Jr. (2004). Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303, 1626-1632.
- Khorasanizadeh, S. (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* 116, 259-272.
- Kim, Y. I., Giuliano, A., Hatch, K. D., Schneider, A., Nour, M. A., Dallal, G. E., Selhub, J., and Mason, J. B. (1994). Global DNA hypomethylation increases progressively in cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer* 74, 893-899.
- Kleer, C. G., Cao, Q., Varambally, S., Shen, R., Ota, I., Tomlins, S. A., Ghosh, D., Sewalt, R. G., Otte, A. P., Hayes, D. F., *et al.* (2003). EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11606-11611. Epub 12003 Sep 11619.
- Kohno, T., Kawanishi, M., Inazawa, J., and Yokota, J. (1998). Identification of CpG islands hypermethylated in human lung cancer by the arbitrarily primed-PCR method. *Hum Genet* 102, 258-264.
- Kokalj-Vokac, N., Almeida, A., Viegas-Pequignot, E., Jeanpierre, M., Malfoy, B., and Dutrillaux, B. (1993). Specific induction of uncoiling and recombination by azacytidine in classical satellite-containing constitutive heterochromatin. *Cytogenet Cell Genet* 63, 11-15.
- Kouzarides, T. (2002). Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev* 12, 198-209.
- Kremenskoy, M., Kremenska, Y., Ohgane, J., Hattori, N., Tanaka, S., Hashizume, K., and Shiota, K. (2003). Genome-wide analysis of DNA methylation status of CpG islands in embryoid bodies, teratomas, and fetuses. *Biochem Biophys Res Commun* 311, 884-890.
- Kubicek, S., and Jenuwein, T. (2004). A crack in histone lysine methylation. *Cell* 119, 903-906.
- Lachner, M., and Jenuwein, T. (2002). The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol* 14, 286-298.
- Lachner, M., O'Sullivan, R. J., and Jenuwein, T. (2003). An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci* 116, 2117-2124.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- Lee, J. T. (2003). Molecular links between X-inactivation and autosomal imprinting: X-inactivation as a driving force for the evolution of imprinting? *Curr Biol* 13, R242-254.

- Lethe, B., Lucas, S., Michaux, L., De Smet, C., Godelaine, D., Serrano, A., De Plaen, E., and Boon, T. (1998). LAGE-1, a new gene with tumor specificity. *Int J Cancer* 76, 903-908.
- Lewis, J. D., Meehan, R. R., Henzel, W. J., Maurer-Fogy, I., Jeppesen, P., Klein, F., and Bird, A. (1992). Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* 69, 905-914.
- Li, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 3, 662-673.
- Li, E., Beard, C., and Jaenisch, R. (1993). Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366, 362-365.
- Li, E., Bestor, T. H., and Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69, 915-926.
- Li, L. C., Carroll, P. R., and Dahiya, R. (2005). Epigenetic changes in prostate cancer: implication for diagnosis and treatment. *J Natl Cancer Inst* 97, 103-115.
- Li, Q., Ahuja, N., Burger, P. C., and Issa, J. P. (1999). Methylation and silencing of the Thrombospondin-1 promoter in human cancer. *Oncogene* 18, 3284-3289.
- Lin, I. G., Tomzynski, T. J., Ou, Q., and Hsieh, C. L. (2000). Modulation of DNA binding protein affinity directly affects target site demethylation. *Mol Cell Biol* 20, 2343-2349.
- Lippman, Z., Gendrel, A. V., Black, M., Vaughn, M. W., Dedhia, N., McCombie, W. R., Lavine, K., Mittal, V., May, B., Kasschau, K. D., *et al.* (2004). Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature* 430, 471-476.
- Lippman, Z., and Martienssen, R. (2004). The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* 431, 364-370.
- Liu, W. M., Maraia, R. J., Rubin, C. M., and Schmid, C. W. (1994). Alu transcripts: cytoplasmic localisation and regulation by DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 22, 1087-1095.
- Loeb, L. A. (2001). A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 61, 3230-3239.
- Loeb, L. A., Springgate, C. F., and Battula, N. (1974). Errors in DNA replication as a basis of malignant changes. *Cancer Res* 34, 2311-2321.
- Lohe, A. R., Hilliker, A. J., and Roberts, P. A. (1993). Mapping simple repeated DNA sequences in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 134, 1149-1174.
- Lund, A. H., and van Lohuizen, M. (2004a). Polycomb complexes and silencing mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 16, 239-246.
- Lund, A. H., and van Lohuizen, M. (2004b). Epigenetics and cancer. *Genes Dev* 18, 2315-2335.
- Lyko, F. (2001). DNA methylation learns to fly. *Trends Genet* 17, 169-172.
- Lyko, F., Ramsahoye, B. H., and Jaenisch, R. (2000). DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 408, 538-540.
- Macleod, D., Charlton, J., Mullins, J., and Bird, A. P. (1994). Sp1 sites in the mouse *aprt* gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes Dev* 8, 2282-2292.
- Maeda, K., Kawakami, K., Ishida, Y., Ishiguro, K., Omura, K., and Watanabe, G. (2003). Hypermethylation of the CDKN2A gene in colorectal cancer is associated with shorter survival. *Oncol Rep* 10, 935-938.

- Magdinier, F., and Wolffe, A. P. (2001). Selective association of the methyl-CpG binding protein MBD2 with the silent p14/p16 locus in human neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4990-4995.
- Maison, C., and Almouzni, G. (2004). HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 296-304.
- Marmorstein, R. (2001). Structure of histone deacetylases: insights into substrate recognition and catalysis. *Structure (Camb)* 9, 1127-1133.
- Martens, J. H., O'Sullivan R, J., Braunschweig, U., Opravil, S., Radolf, M., Steinlein, P., and Jenuwein, T. (2005). The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *Embo J* 24, 800-812. Epub 2005 Jan 2027.
- Martienssen, R. (1998). Transposons, DNA methylation and gene control. *Trends Genet* 14, 263-264.
- Martienssen, R. A., and Colot, V. (2001). DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science* 293, 1070-1074.
- Marx, J. (2002). Debate surges over the origins of genomic defects in cancer. *Science* 297, 544-546.
- Matzke, M. A., and Birchler, J. A. (2005). RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat Rev Genet* 6, 24-35.
- McNairn, A. J., and Gilbert, D. M. (2003). Epigenomic replication: linking epigenetics to DNA replication. *Bioessays* 25, 647-656.
- Melki, J. R., Vincent, P. C., and Clark, S. J. (1999). Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 59, 3730-3740.
- Merlo, A., Herman, J. G., Mao, L., Lee, D. J., Gabrielson, E., Burger, P. C., Baylin, S. B., and Sidransky, D. (1995). 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1, 686-692.
- Miki, Y., Katagiri, T., Kasumi, F., Yoshimoto, T., and Nakamura, Y. (1996). Mutation analysis in the BRCA2 gene in primary breast cancers. *Nat Genet* 13, 245-247.
- Miki, Y., Nishisho, I., Horii, A., Miyoshi, Y., Utsunomiya, J., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Nakamura, Y. (1992). Disruption of the APC gene by a retrotransposal insertion of L1 sequence in a colon cancer. *Cancer Res* 52, 643-645.
- Miniou, P., Jeanpierre, M., Blanquet, V., Sibella, V., Bonneau, D., Herbelin, C., Fischer, A., Niveleau, A., and Viegas-Pequignot, E. (1994). Abnormal methylation pattern in constitutive and facultative (X inactive chromosome) heterochromatin of ICF patients. *Hum Mol Genet* 3, 2093-2102.
- Misteli, T. (2004). Spatial positioning; a new dimension in genome function. *Cell* 119, 153-156.
- Monk, M., Boubelik, M., and Lehnert, S. (1987). Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development* 99, 371-382.
- Montagna, M., Santacatterina, M., Torri, A., Menin, C., Zullato, D., Chieco-Bianchi, L., and D'Andrea, E. (1999). Identification of a 3 kb Alu-mediated BRCA1 gene rearrangement in two breast/ovarian cancer families. *Oncogene* 18, 4160-4165.
- Moore, J. K., and Haber, J. E. (1996). Capture of retrotransposon DNA at the sites of chromosomal double-strand breaks. *Nature* 383, 644-646.

- Morse, B., Rotherg, P. G., South, V. J., Spandorfer, J. M., and Astrin, S. M. (1988). Insertional mutagenesis of the *myc* locus by a LINE-1 sequence in a human breast carcinoma. *Nature* 333, 87-90.
- Murphy, S. K., and Jirtle, R. L. (2003). Imprinting evolution and the price of silence. *Bioessays* 25, 577-588.
- Myohanen, S. K., Baylin, S. B., and Herman, J. G. (1998). Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia. *Cancer Res* 58, 591-593.
- Nakamura, N., and Takenaga, K. (1998). Hypomethylation of the metastasis-associated S100A4 gene correlates with gene activation in human colon adenocarcinoma cell lines. *Clin Exp Metastasis* 16, 471-479.
- Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N., and Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393, 386-389.
- Narayan, A., Ji, W., Zhang, X. Y., Marrogi, A., Graff, J. R., Baylin, S. B., and Ehrlich, M. (1998). Hypomethylation of pericentromeric DNA in breast adenocarcinomas. *Int J Cancer* 77, 833-838.
- Narlikar, G. J., Fan, H. Y., and Kingston, R. E. (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108, 475-487.
- Ng, H. H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C. A., Turner, B. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D., and Bird, A. (1999). MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet* 23, 58-61.
- Nielsen, S. J., Schneider, R., Bauer, U. M., Bannister, A. J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R. E., and Kouzarides, T. (2001). Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* 412, 561-565.
- Nystrom-Lahti, M., Kristo, P., Nicolaides, N. C., Chang, S. Y., Aaltonen, L. A., Moisio, A. L., Jarvinen, H. J., Mecklin, J. P., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and et al. (1995). Founding mutations and Alu-mediated recombination in hereditary colon cancer. *Nat Med* 1, 1203-1206.
- O'Brien, T. P., Bult, C. J., Cremer, C., Grunze, M., Knowles, B. B., Langowski, J., McNally, J., Pederson, T., Politz, J. C., Pombo, A., et al. (2003). Genome function and nuclear architecture: from gene expression to nanoscience. *Genome Res* 13, 1029-1041.
- Ogawa, Y., and Lee, J. T. (2003). Xite, X-inactivation intergenic transcription elements that regulate the probability of choice. *Mol Cell* 11, 731-743.
- Ohlsson, R., Renkawitz, R., and Lobanenkova, V. (2001). CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends Genet* 17, 520-527.
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247-257.
- O'Neill, R. J., O'Neill, M. J., and Graves, J. A. (1998). Undermethylation associated with retroelement activation and chromosome remodelling in an interspecific mammalian hybrid. *Nature* 393, 68-72.
- Orlando, V. (2003). Polycomb, epigenomes, and control of cell identity. *Cell* 112, 599-606.
- Oshimo, Y., Nakayama, H., Ito, R., Kitadai, Y., Yoshida, K., Chayama, K., and Yasui, W. (2003). Promoter methylation of cyclin D2 gene in gastric carcinoma. *Int J Oncol* 23, 1663-1670.

- Oudet, P., Gross-Bellard, M., and Chambon, P. (1975). Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* **4**, 281-300.
- Pannell, D., Osborne, C. S., Yao, S., Sukonnik, T., Pasceri, P., Karaiskakis, A., Okano, M., Li, E., Lipshitz, H. D., and Ellis, J. (2000). Retrovirus vector silencing is de novo methylase independent and marked by a repressive histone code. *Embo J* **19**, 5884-5894.
- Paro, R. (1990). Imprinting a determined state into the chromatin of *Drosophila*. *Trends Genet* **6**, 416-421.
- Perucho, M. (1996). Cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Biol Chem* **377**, 675-684.
- Peterson, C. L., and Laniel, M. A. (2004). Histones and histone modifications. *Curr Biol* **14**, R546-551.
- Pfeifer, G. P., Steigerwald, S. D., Hansen, R. S., Gartler, S. M., and Riggs, A. D. (1990b). Polymerase chain reaction-aided genomic sequencing of an X chromosome-linked CpG island: methylation patterns suggest clonal inheritance, CpG site autonomy, and an explanation of activity state stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 8252-8256.
- Pfeifer, G. P., Tanguay, R. L., Steigerwald, S. D., and Riggs, A. D. (1990a). In vivo footprint and methylation analysis by PCR-aided genomic sequencing: comparison of active and inactive X chromosomal DNA at the CpG island and promoter of human PGK-1. *Genes Dev* **4**, 1277-1287.
- Plath, K., Mlynarczyk-Evans, S., Nusinow, D. A., and Panning, B. (2002). Xist RNA and the mechanism of X chromosome inactivation. *Annu Rev Genet* **36**, 233-278.
- Ponger, L., Duret, L., and Mouchiroud, D. (2001). Determinants of CpG islands: expression in early embryo and isochore structure. *Genome Res* **11**, 1854-1860.
- Prak, E. T., and Kazazian, H. H., Jr. (2000). Mobile elements and the human genome. *Nat Rev Genet* **1**, 134-144.
- Prokhortchouk, A., Hendrich, B., Jorgensen, H., Ruzov, A., Wilm, M., Georgiev, G., Bird, A., and Prokhortchouk, E. (2001). The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev* **15**, 1613-1618.
- Qu, G., Dubeau, L., Narayan, A., Yu, M. C., and Ehrlich, M. (1999a). Satellite DNA hypomethylation vs. overall genomic hypomethylation in ovarian epithelial tumors of different malignant potential. *Mutat Res* **423**, 91-101.
- Qu, G. Z., Grundy, P. E., Narayan, A., and Ehrlich, M. (1999b). Frequent hypomethylation in Wilms tumors of pericentromeric DNA in chromosomes 1 and 16. *Cancer Genet Cytogenet* **109**, 34-39.
- Raaphorst, F. M., Otte, A. P., and Meijer, C. J. (2001). Polycomb-group genes as regulators of mammalian lymphopoiesis. *Trends Immunol* **22**, 682-690.
- Rand, E., and Cedar, H. (2003). Regulation of imprinting: A multi-tiered process. *J Cell Biochem* **88**, 400-407.
- Rashid, A., and Issa, J. P. (2004). CpG island methylation in gastroenterologic neoplasia: a maturing field. *Gastroenterology* **127**, 1578-1588.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C. P., Allis, C. D., and Jenuwein, T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**, 593-599.
- Regev, A., Lamb, M. J., and Jablonka, E. (1998). The role of DNA methylation in invertebrates: developmental regulation or genome defense? *MolBiolEvol* **15**, 880-891.

- Reik, W., and Walter, J. (2001). Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2, 21-32.
- Rein, T., DePamphilis, M. L., and Zorbach, H. (1998). Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes. *Nucleic Acids Res* 26, 2255-2264.
- Rhee, I., Bachman, K. E., Park, B. H., Jair, K. W., Yen, R. W., Schuebel, K. E., Cui, H., Feinberg, A. P., Lengauer, C., Kinzler, K. W., *et al.* (2002). DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 416, 552-556.
- Rhee, I., Jair, K. W., Yen, R. W., Lengauer, C., Herman, J. G., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Baylin, S. B., and Schuebel, K. E. (2000). CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature* 404, 1003-1007.
- Ribieras, S., Song-Wang, X. G., Martin, V., Lointier, P., Frappart, L., and Dante, R. (1994). Human breast and colon cancers exhibit alterations of DNA methylation patterns at several DNA segments on chromosomes 11p and 17p. *J Cell Biochem* 56, 86-96.
- Richardson, B. (2003). Impact of aging on DNA methylation. *Ageing Res Rev* 2, 245-261.
- Riggs, A. D. (1975). X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* 14, 9-25.
- Robert, M. F., Morin, S., Beaulieu, N., Gauthier, F., Chute, I. C., Barsalou, A., and MacLeod, A. R. (2003). DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat Genet* 33, 61-65.
- Roberts, C. W., and Orkin, S. H. (2004). The SWI/SNF complex--chromatin and cancer. *Nat Rev Cancer* 4, 133-142.
- Robertson, K. D. (2002). DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web. *Oncogene* 21, 5361-5379.
- Roth, S. Y., Denu, J. M., and Allis, C. D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 70, 81-120.
- Sado, T., Fenner, M. H., Tan, S. S., Tam, P., Shioda, T., and Li, E. (2000). X inactivation in the mouse embryo deficient for Dnmt1: distinct effect of hypomethylation on imprinted and random X inactivation. *Dev Biol* 225, 294-303.
- Sanders, S. L., Portoso, M., Mata, J., Bahler, J., Allshire, R. C., and Kouzarides, T. (2004). Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell* 119, 603-614.
- Santarosa, M., and Ashworth, A. (2004). Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochim Biophys Acta* 1654, 105-122.
- Sarma, K., and Reinberg, D. (2005). Histone variants meet their match. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 139-149.
- Sassaman, D. M., Dombroski, B. A., Moran, J. V., Kimberland, M. L., Naas, T. P., DeBerardinis, R. J., Gabriel, A., Swergold, G. D., and Kazazian, H. H., Jr. (1997). Many human L1 elements are capable of retrotransposition. *Nat Genet* 16, 37-43.
- Scarano, M. I., Strazzullo, M., Matarazzo, M. R., and D'Esposito, M. (2004). DNA methylation 40 years later: its role in human health and disease. *Journal of Cellular Physiology*.
- Schar, P. (2001). Spontaneous DNA damage, genome instability, and cancer--when DNA replication escapes control. *Cell* 104, 329-332.



- Schmid, C. W. (1998). Does SINE evolution preclude Alu function? *Nucleic Acids Res* 26, 4541-4550.
- Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D., and Jenuwein, T. (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* 18, 1251-1262.
- Schramke, V., and Allshire, R. (2004). Those interfering little RNAs! Silencing and eliminating chromatin. *Curr Opin Genet Dev* 14, 174-180.
- Schreiber, S. L., and Bernstein, B. E. (2002). Signaling network model of chromatin. *Cell* 111, 771-778.
- Shaker, S., Bernstein, M., Momparler, L. F., and Momparler, R. L. (2003). Preclinical evaluation of antineoplastic activity of inhibitors of DNA methylation (5-aza-2'-deoxycytidine) and histone deacetylation (trichostatin A, depsipeptide) in combination against myeloid leukemic cells. *Leuk Res* 27, 437-444.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J. R., Cole, P. A., and Casero, R. A. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119, 941-953.
- Shiota, K., Kogo, Y., Ohgane, J., Imamura, T., Urano, A., Nishino, K., Tanaka, S., and Hattori, N. (2002). Epigenetic marks by DNA methylation specific to stem, germ and somatic cells in mice. *Genes Cells* 7, 961-969.
- Sidransky, D. (2002). Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 210-219.
- Sijen, T., and Plasterk, R. H. (2003). Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germ line by natural RNAi. *Nature* 426, 310-314.
- Silva, J., Mak, W., Zvetkova, I., Appanah, R., Nesterova, T. B., Webster, Z., Peters, A. H., Jenuwein, T., Otte, A. P., and Brockdorff, N. (2003). Establishment of histone h3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes. *Dev Cell* 4, 481-495.
- Simmen, M. W., Leitgeb, S., Charlton, J., Jones, S. J., Harris, B. R., Clark, V. H., and Bird, A. (1999). Nonmethylated transposable elements and methylated genes in a chordate genome. *Science* 283, 1164-1167.
- Sims, R. J., 3rd, Nishioka, K., and Reinberg, D. (2003). Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet* 19, 629-639.
- Smit, A. F. (1999). Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. *Curr Opin Genet Dev* 9, 657-663.
- Soares, J., Pinto, A. E., Cunha, C. V., Andre, S., Barao, I., Sousa, J. M., and Cravo, M. (1999). Global DNA hypomethylation in breast carcinoma: correlation with prognostic factors and tumor progression. *Cancer* 85, 112-118.
- Song, F., Smith, J. F., Kimura, M. T., Morrow, A. D., Matsuyama, T., Nagase, H., and Held, W. A. (2005). Association of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) with differential gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3336-3341. Epub 2005 Feb 3322.
- Spatz, A., Borg, C., and Feunteun, J. (2004). X-chromosome genetics and human cancer. *Nat Rev Cancer* 4, 617-629.
- Stancheva, I., El-Maarri, O., Walter, J., Niveleau, A., and Meehan, R. R. (2002). DNA methylation at promoter regions regulates the timing of gene activation in *Xenopus laevis* embryos. *Dev Biol* 243, 155-165.

- Stancheva, I., and Meehan, R. R. (2000). Transient depletion of xDnmt1 leads to premature gene activation in *Xenopus* embryos. *Genes Dev* 14, 313-327.
- Stirzaker, C., Song, J. Z., Davidson, B., and Clark, S. J. (2004). Transcriptional gene silencing promotes DNA hypermethylation through a sequential change in chromatin modifications in cancer cells. *Cancer Res* 64, 3871-3877.
- Sun, L. Q., Lee, D. W., Zhang, Q., Xiao, W., Raabe, E. H., Meeker, A., Miao, D., Huso, D. L., and Arceci, R. J. (2004). Growth retardation and premature aging phenotypes in mice with disruption of the SNF2-like gene, PASG. *Genes Dev* 18, 1035-1046.
- Suzuki, H., Gabrielson, E., Chen, W., Anbazhagan, R., van Engeland, M., Weijnen, M. P., Herman, J. G., and Baylin, S. B. (2002). A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genet* 31, 141-149.
- Symer, D. E., Connelly, C., Szak, S. T., Caputo, E. M., Cost, G. J., Parmigiani, G., and Boeke, J. D. (2002). Human I1 retrotransposition is associated with genetic instability in vivo. *Cell* 110, 327-338.
- Szabo, P., Tang, S. H., Rentsendorj, A., Pfeifer, G. P., and Mann, J. R. (2000). Maternal-specific footprints at putative CTCF sites in the H19 imprinting control region give evidence for insulator function. *Curr Biol* 10, 607-610.
- Takai, D., and Jones, P. A. (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3740-3745.
- Tamaru, H., and Selker, E. U. (2001). A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 414, 277-283.
- Tate, P. H., and Bird, A. P. (1993). Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 3, 226-231.
- Tautz, D., and Schlotterer (1994). Simple sequences. *Curr Opin Genet Dev* 4, 832-837.
- Teng, S. C., Kim, B., and Gabriel, A. (1996). Retrotransposon reverse-transcriptase-mediated repair of chromosomal breaks. *Nature* 383, 641-644.
- Toyota, M., Ho, C., Ahuja, N., Jair, K. W., Li, Q., Ohe-Toyota, M., Baylin, S. B., and Issa, J. P. (1999). Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Res* 59, 2307-2312.
- Tupler, R., Perini, G., and Green, M. R. (2001). Expressing the human genome. *Nature* 409, 832-833.
- Tweedie, S., Charlton, J., Clark, V., and Bird, A. (1997). Methylation of genomes and genes at the invertebrate-vertebrate boundary. *Mol Cell Biol* 17, 1469-1475.
- Tweedie, S., Ng, H. H., Barlow, A. L., Turner, B. M., Hendrich, B., and Bird, A. (1999). Vestiges of a DNA methylation system in *Drosophila melanogaster*? *Nat Genet* 23, 389-390.
- Ushijima, T. (2005). Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. *Nat Rev Cancer* 5, 223-231.
- Ushijima, T., Morimura, K., Hosoya, Y., Okonogi, H., Tatematsu, M., Sugimura, T., and Nagao, M. (1997). Establishment of methylation-sensitive-representational difference analysis and isolation of hypo- and hypermethylated genomic fragments in mouse liver tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2284-2289.
- Vachtenheim, J., Horakova, I., and Novotna, H. (1994). Hypomethylation of CCGG sites in the 3' region of H-ras protooncogene is frequent and is associated with H-ras allele loss in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 54, 1145-1148.

- Valk-Lingbeek, M. E., Bruggeman, S. W., and van Lohuizen, M. (2004). Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell* 118, 409-418.
- van Driel, R., Fransz, P. F., and Verschure, P. J. (2003). The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels. *J Cell Sci* 116, 4067-4075.
- van Leeuwen, F., Gafken, P. R., and Gottschling, D. E. (2002). Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell* 109, 745-756.
- van Leeuwen, F., and Gottschling, D. E. (2002). Genome-wide histone modifications: gaining specificity by preventing promiscuity. *Curr Opin Cell Biol* 14, 756-762.
- Varambally, S., Dhanasekaran, S. M., Zhou, M., Barrette, T. R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M. G., Ghosh, D., Pienta, K. J., Sewalt, R. G., Otte, A. P., *et al.* (2002). The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419, 624-629.
- Vogelauer, M., Wu, J., Suka, N., and Grunstein, M. (2000). Global histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature* 408, 495-498.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10, 789-799.
- Waddington, C. H. (1942). *Endeavour* 1, 18.
- Wade, P. A. (2001). Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *Bioessays* 23, 1131-1137.
- Wade, P. A. (2005). SWItching off methylated DNA. *Nat Genet* 37, 212-213.
- Walsh, C. P., and Bestor, T. H. (1999). Cytosine methylation and mammalian development. *Genes Dev* 13, 26-34.
- Walsh, C. P., Chaillet, J. R., and Bestor, T. H. (1998). Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet* 20, 116-117.
- Warnecke, P. M., and Clark, S. J. (1999). DNA methylation profile of the mouse skeletal alpha-actin promoter during development and differentiation. *Mol Cell Biol* 19, 164-172.
- Welsh, J., and McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18, 7213-7218.
- Whitelaw, E., and Martin, D. I. (2001). Retrotransposons as epigenetic mediators of phenotypic variation in mammals. *Nat Genet* 27, 361-365.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18, 6531-6535.
- Wilson, V. L., and Jones, P. A. (1983). DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells. *Science* 220, 1055-1057.
- Wilson, V. L., Smith, R. A., Ma, S., and Cutler, R. G. (1987). Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age. *J Biol Chem* 262, 9948-9951.
- Wolf, P., Hu, Y. C., Doffek, K., Sidransky, D., and Ahrendt, S. A. (2001). O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase promoter hypermethylation shifts the p53 mutational spectrum in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 61, 8113-8117.
- Wong, N., Lam, W. C., Lai, P. B., Pang, E., Lau, W. Y., and Johnson, P. J. (2001). Hypomethylation of chromosome 1 heterochromatin DNA correlates with q-arm copy gain in human hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 159, 465-471.

- Woodcock, D. M., Lawler, C. B., Linsenmeyer, M. E., Doherty, J. P., and Warren, W. D. (1997). Asymmetric methylation in the hypermethylated CpG promoter region of the human L1 retrotransposon. *J Biol Chem* 272, 7810-7816.
- Xu, G. L., Bestor, T. H., Bourc'his, D., Hsieh, C. L., Tommerup, N., Bugge, M., Hulten, M., Qu, X., Russo, J. J., and Viegas-Pequignot, E. (1999). Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 402, 187-191.
- Yamashita, K., Upadhyay, S., Osada, M., Hoque, M. O., Xiao, Y., Mori, M., Sato, F., Meltzer, S. J., and Sidransky, D. (2002). Pharmacologic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Cell* 2, 485-495.
- Yeager, T. R., DeVries, S., Jarrard, D. F., Kao, C., Nakada, S. Y., Moon, T. D., Bruskewitz, R., Stadler, W. M., Meisner, L. F., Gilchrist, K. W., *et al.* (1998). Overcoming cellular senescence in human cancer pathogenesis. *Genes Dev* 12, 163-174.
- Yoder, J. A., Walsh, C. P., and Bestor, T. H. (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 13, 335-340.
- Zhang, K., Tang, H., Huang, L., Blankenship, J. W., Jones, P. R., Xiang, F., Yau, P. M., and Burlingame, A. L. (2002). Identification of acetylation and methylation sites of histone H3 from chicken erythrocytes by high-accuracy matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight, matrix-assisted laser desorption ionization-postsource decay, and nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 306, 259-269.