

Alteracions epigenètiques en càncer colorectal: canvis globals i identificació de noves dianes

Memòria presentada per
Jairo Rodríguez Lumbarres

per optar al grau de
Doctor en Biologia

Tesi realitzada sota la direcció del Dr. Miquel Àngel Peinado
a l'IDIBELL-Institut de Recerca Oncològica.

Tesi adscrita al Departament de Genètica de la Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona.
Programa de Genètica, bienni 2003-2005.

Director

Tutor

Miquel À. Peinado

Ricard Albalat

Jairo Rodríguez

Barcelona, Novembre de 2007

DISCUSSIÓ

L'estudi de les alteracions epigenètiques en tumors

Trobem en la literatura diferents aproximacions experimentals alhora d'analitzar les alteracions epigenètiques en càncer, cada una d'elles amb un nivell de resolució propi adequat a l'abordatge de diferents qüestions. Així doncs, existeix un gran nombre de tècniques específiques que permeten un anàlisi d'alta resolució sovint adreçat a l'anàlisi d'un o uns pocs gens específics, fet que les fa poc adients per a realitzar anàlisis globals (Veure Introducció, secció 5). Aquesta mena de metodologies va ser molt emprada en els inicis de la recerca epigenètica en càncer, dirigida principalment al descobriment de nous gens supressors tumorals silenciats amb promotors hipermetilats. En l'actualitat, la disponibilitat de tècniques d'anàlisi global ha fet invertir aquesta tendència. Les tècniques d'hibridació de mostres complexes sobre *arrays*, com la hibridació de DNA o cromatina immunoprecipitats sobre *arrays* de DNA (DIP/ChIP on chip, respectivament), ens permeten realitzar mapes de la distribució de la metilació o bé de determinades modificacions d'histones a nivell genòmic, de forma ràpida i en un sol experiment. Si bé aquesta aproximació proporciona una gran quantitat d'informació, el nivell de resolució és més baix que el de les tècniques específiques, fet que la fa inadequada per a l'estudi en profunditat de regions concretes. Queda, entre mig d'aquests dos extrems, un buit de tècniques d'anàlisi epigenètic que permetin de forma simultània tant estudis a nivell global com anàlisis específics a un nivell de resolució intermig.

Aquesta situació, conjuntament amb l'àmplia experiència del nostre laboratori en l'ús de tècniques d'anàlisi genètic basades en el *fingerprinting* de DNA i RNA va assentar les bases metodològiques per a l'estudi de la metilació en tumors amb el doble objectiu de realitzar estudis globals i específics. La nova tècnica posada a punt pel doctorand Jordi Frigola es va anomenar *Amplification of Inter Methylated Sites* o AIMS i té el seu principi en la digestió diferencial de la seqüència CCCGGG (diana SmaI) metilada per mitjà d'enzims de restricció sensibles i insensibles a la metilació (Frigola et al. 2002). Tot i que aquesta tècnica comparteix alguns passos amb mètodes preexistents, hi presenta uns clars avantatges. Principalment, l'AIMS pot ser aplicat de forma molt simple a petites quantitats de mostra, fent-la ideal per al seu ús sobre sèries llargues de mostres clíniques com els tumors primaris, dels quals disposem de quantitats molt limitades. D'altra banda, l'AIMS permet extreure dades tant a nivell global com a nivell específic. A nivell global, AIMS proporciona dos índex de metilació independents, l'índex d'hipermetilació i el d'hipometilació, obtinguts per a cada parella de teixit normal-tumor simultàniament en el mateix experiment. A nivell específic, permet el descobriment i el mapatge de regions diferencialment metilades que puguin ser rellevants per al procés tumoral (Frigola et al. 2005b).

El desenvolupament i aplicació d'AIMS, tant en línies cel·lulars com en tumors primaris colorectals, ha permès avançar de forma determinant en el coneixement dels canvis epigenètics que es donen durant el procés tumoral. A nivell global, els índex de metilació proporcionats per AIMS indiquen que la hipometilació i hipermetilació, que de forma simultània es donen en tumors, són dos fenòmens independents (Frigola et al. 2005b), fet que subratlla la necessitat de saber quins són els mecanismes que governen ambdós processos. A nivell específic, AIMS ha proporcionat una llarga llista de regions candidates a tenir gens hipermetilats i silenciats en CCR

(Frigola et al. 2002). L'estudi en profunditat d'algunes d'aquestes regions ha dut al descobriment de gens hipermetilats discrets, com és el cas del gen PTGIS, el silenciament del qual s'associa a aneuploidia (Frigola et al. 2005a). Però sense dubte, el descobriment més sorprenent i rellevant ha estat la identificació i descripció d'una regió cromosòmica en la qual la hipermetilació de promotors s'estén al llarg de vàries megabases, afectant a múltiples gens adjacents distribuïts en varis grups separats entre sí per regions no metilades (Frigola et al. 2006). Aquest descobriment representa un nou paradigma que canvia el model predominant segons el qual la hipermetilació de promotors es una alteració epigenètica específica que afecta a gens discrets.

L'aplicació d'AIMS a una sèrie de 50 tumors colorectals primaris i les seves respectives parelles de mucosa normal, de les quals disposàvem d'informació de les alteracions cromosòmiques que acumulen, representa el punt de partida d'aquesta tesi (Treball 1) i ens ha permès aprofundir en l'estudi de la relació entre les alteracions genètiques i epigenètiques.

La desmetilació del DNA correlaciona amb alteracions cromosòmiques en tumors colorectals humans

Tot i que treballs anteriors demostraven de forma clara que existeix una relació entre hipometilació del DNA i la inestabilitat genètica en diferents organismes model, aquesta qüestió no havia estat mai explorada a fons en tumors primaris humans (Veure Introducció, secció 4). Els nostres resultats indiquen per primer cop en tumors colorectals humans que existeix una correlació positiva entre el grau de hipometilació i el nombre d'alteracions cromosòmiques que acumula el tumor. L'exploració d'una primera sèrie de tumors colorectals ha posat de manifest l'existència d'una correlació positiva entre el grau de desmetilació ($r=0.25$, $P=0.022$), però no d'hipermetilació ($r=0.02$, $P=0.856$), i les alteracions genètiques mesurades per AP-PCR (pàg. 60, Figura 2A), les quals inclouen mutacions puntuals, petites insercions i delecions i alteracions cromosòmiques numèriques i estructurals (Revisat en (Risques et al. 2003)). Aquests resultats són molt similars als obtinguts per Suzuki i col·laboradors sobre una sèrie de tumors gàstrics i de còlon (Suzuki et al. 2006) tot i que en aquest cas, els autors troben una correlació positiva tant amb el grau d'hipometilació i hipermetilació del tumor i les alteracions genètiques mesurades per AP-PCR. En aquest treball, els autors estimen el grau d'hipometilació i hipermetilació del tumor per mitjà d'una tècnica d'anàlisi de metilació global similar a AIMS anomenada NotI-MseII MS-AFLP (*Methylation-sensitive amplified fragment length polymorphism*). Aquesta tècnica està basada en la digestió de llocs NotI, enzim de restricció que reconeix la seqüència GCGGCCGC (Yamamoto et al. 2001), molt més infreqüent en el genoma humà que la seqüència reconeguda per SmaI (CCCGGG). El fet que per mitjà d'aquesta metodologia trobin una correlació positiva entre hipermetilació i hipometilació en la sèrie de mostres analitzades, pot explicar la correlació positiva entre hipermetilació i alteracions genètiques que observen.

En el nostre cas, l'exploració d'una segona sèrie de tumors colorectals ens ha permès aprofundir en la naturalesa de la correlació entre desmetilació i dany genètic. Així, per aquesta segona sèrie, obtenim una correlació positiva entre hipometilació mesurada per AIMS i

alteracions cromosòmiques mesurades per CGH ($r=0.514$, $P<0.001$) significativament millor que usant la mesura de dany genètic de AP-PCR, fet que ens indica que la naturalesa del dany genètic que correlaciona amb el grau de desmetilació és bàsicament cromosòmic, d'acord amb estudis previs en diferents models tant *in vitro* (Chen et al. 1998; Lengauer et al. 1997) com *in vivo* (Eden et al. 2003; Gaudet et al. 2003).

A més a més, la utilització d'una tècnica no esbiaixada de mesura de les alteracions cromosòmiques com és la CGH posa en evidència per primera vegada en càncer que tots els cromosomes es veuen afectats per la hipometilació (pàg. 61, Figura 3). Aquest fet ens porta a suggerir que les diferències que observem en les freqüències d'alteració dels diferents cromosomes es deuen més a un efecte de selecció dins el tumor que no pas a que determinats cromosomes es vegin més afectats per la hipometilació. Així, tot i que la pèrdua dels cromosomes 17p i 18q i el guany de 20q no s'associen a nivells més alts d'hipometilació que la resta de cromosomes, són els tres cromosomes més freqüentment alterats en la sèrie de 50 tumors analitzada (pàg. 61, Figura 3), fet que pot ser associat a la presència en aquests cromosomes de gens importants per al desenvolupament del CCR, com p53 (17p) o gens SMAD (18q). A més a més, tot i que la CGH no ens permet veure alteracions balancejades ni aquelles que afecten a regions molt petites sí que ens permet saber quan una alteració cromosòmica és numèrica (quan afecta a un cromosoma sencer) o estructural (afecta a un braç cromosòmic). Els resultats indiquen que la hipometilació s'associa de forma indistinta tant amb alteracions estructurals com numèriques (pàg.66, Supplemental table 3). En resum, els nostres resultats indiquen que la hipometilació actua com un "motor cec" que s'associa a l'alteració de tots els cromosomes per igual, essent la selecció l'encarregada d'augmentar la freqüència d'aquelles alteracions necessàries per al desenvolupament del tumor.

Només un treball havia analitzat prèviament la relació entre la hipometilació i les alteracions cromosòmiques en tumors primaris. Un any abans de la publicació del nostre treball, Matsuzaki i col·laboradors (Matsuzaki et al. 2005) descrivien en una sèrie de tumors colorectals humans una correlació positiva entre la desmetilació en elements LINE, els quals s'han trobat hipometilats en varis tipus de tumors (Revisat en (Ehrlich 2002)) i una freqüència incrementada de LOH en determinats cromosomes, en un subgrup de tumors sense inestabilitat de microsatèl·lits. El fet que usin un mètode semiquantitatiu i esbiaixat per avaluar el grau de desmetilació en elements LINE, així com que només puguin avaluar LOH en determinats cromosomes limita l'impacte de les conclusions extretes pels autors.

Molt recentment, Cadieux i col·laboradors (Cadieux et al. 2006), treballant amb una sèrie molt curta de glioblastomes humans i línies cel·lulars, han obtingut correlacions similars entre desmetilació global mesurada per mitjà de l'assaig d'acceptació de grups metil i alteracions cromosòmiques en regions molt concretes com les de DNA pericentromèric. Aquesta desmetilació global afecta bàsicament al satèl·lit pericentromèric (Sat2), gens específics com els MAGEA1 i seqüències repetides disperses com els elements Alu, totes elles regions genòmiques prèviament descrites per sofrir hipometilació en càncer.

La hipometilació en tumors: causa o conseqüència de les alteracions genètiques?

No podem donar resposta des d'un punt de vista mecanístic a aquesta pregunta amb mostres clíniques, i per tant només ens podem limitar a establir associacions. Tot i això, els resultats obtinguts en diferents organismes model (Chen et al. 1998; Eden et al. 2003; Gaudet et al. 2003; Lengauer et al. 1997), així com el fet que la hipometilació és un fenomen temprà en el procés tumoral (Frigola et al. 2005b), suggereixen un paper causal de la hipometilació sobre la inestabilitat genètica. En aquest context, els estudis portats a terme per Suzuki i col·laboradors indiquen que si bé la hipometilació s'acumula progressivament en un procés lligat a l'edat, les alteracions genètiques no ho fan (Suzuki et al. 2006), fet que suggereix que la hipometilació precedeix a l'aparició d'alteracions genètiques en tumors. Així, l'acumulació progressiva d'alteracions en la metilació en les cèl·lules que donaran origen al tumor seran a la base de les alteracions genètiques que s'aniran acumulant durant la progressió tumoral.

D'altra banda, és raonable pensar que un increment en el nombre de cromosomes no fa sinó augmentar les probabilitats que noves alteracions epigenètiques puguin tenir lloc. Si bé no podem descartar aquesta hipòtesi, les nostres dades indiquen que aquest fenomen té un pes poc important en CCR. El producte del gen p53, el supressor tumoral més freqüentment mutat en càncers humans, és essencial en el manteniment de l'estabilitat del genoma a través de la regulació de processos tant importants com la reparació del DNA, la regulació del cicle cel·lular i l'apoptosi (Revisat en (Toledo and Wahl 2006)). Tant per la sèrie de mostres HSP com per la sèrie HUB la presència de mutacions en el gen p53 no altera la correlació entre desmetilació i alteracions cromosòmiques ni tampoc s'associa a nivells significativament més alts de hipometilació (pàg. 59, Taula1). El que sí que veiem és com la presència de mutacions en p53 incrementa el nombre d'alteracions cromosòmiques, fet que és consistent amb el paper permissiu, però no inductor, de p53 en l'adquisició d'alteracions genètiques (Duensing and Duensing 2005)(Figura 20).

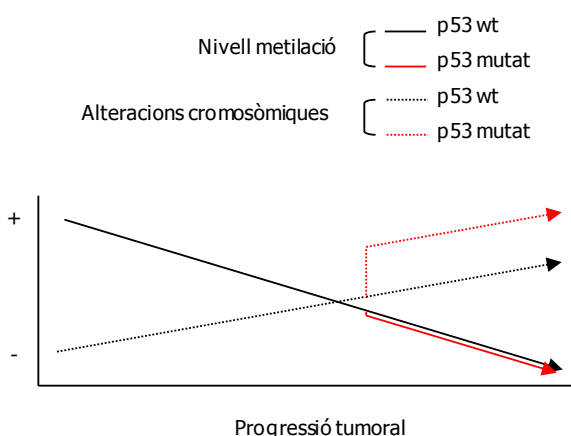


Figura 20. Hipometilació i alteracions cromosòmiques. Durant la progressió tumoral els nivells de metilació del teixit tumoral disminueixen respecte als del teixit normal adjacent. Aquesta baixada en la metilació es correspon amb un increment en el nombre d'alteracions cromosòmiques. La pèrdua de funció del gen p53 genera un ambient més permissiu que permet l'adquisició de més alteracions genètiques sense alterar la correlació amb la hipometilació, representat per una pendent igual de les dues rectes d'alteracions cromosòmiques. D'altra banda, la pèrdua de p53 no comporta una reducció dels nivells de metilació del tumor.

Ja hem vist en la introducció que les causes de la inestabilitat genètica no són clares i poden tenir múltiples orígens. Tot i això, la correlació que hem obtingut entre el grau de desmetilació i les alteracions cromosòmiques ens indica que la hipometilació pot tenir un pes important en la

generació d'alteracions genètiques en tumors. Si bé existeixen determinades mutacions en gens concrets que proporcionen un fenotip de CIN en alguns organismes model, no existeix una clara correlació genotip-fenotip a nivell de tumors primaris (com si ocorre en el cas de la inestabilitat de microsatèl·lits) i per tant hem d'assumir que la hipometilació és un dels mecanismes, però no l'únic, que opera en el tumor en la desestabilització del genoma.

Causes de la hipometilació en tumors

Les evidències de les que disposem actualment no expliquen els mecanismes a través dels quals es dona la hipometilació (Ehrlich 2002; Feinberg and Tycko 2004). Quan parlem de hipometilació estem realitzant una comparació en la que assumim que hi ha un estat inicial amb un nivell de metilació determinat i un estat final amb un nivell de metilació comparativament més baix. En aquest cas, l'estat inicial vindria representat per aquella o aquelles cèl·lules que originen el tumor i l'estat final, per les cèl·lules tumorals. Segons el model més acceptat, les cèl·lules que donen lloc al tumor són cèl·lules mare epitelials que es troben en la porció inferior de les criptes de l'epiteli digestiu, les criptes de Lieberkühn (Figura 21), on a través de divisions cel·lulars asimètriques perpetuen la població de cèl·lules mare i donen lloc a les cèl·lules que diferenciaren i migraran a través de l'epiteli digestiu (Revisat en (Sancho et al. 2003)). Donada la dificultat de purificar un nombre suficient de cèl·lules mare epitelials de les criptes intestinals, no existeix cap estudi que de forma global hagi estimat quins són els nivells de metilació d'aquest compartiment cel·lular. Aquest fet ens obliga a establir comparacions entre les cèl·lules tumorals i cèl·lules de teixit aparentment sa de l'epiteli del còlon o el recte, assumint que els nivells de metilació del teixit normal són idèntics, o molt similars, als nivells de metilació de les cèl·lules que originen el propi tumor. La recerca en el futur haurà d'abordar l'estudi global dels patrons de metilació del compartiment cel·lular que dona lloc al tumor, per tal de poder establir de forma correcta la comparació entre els nivells de metilació.

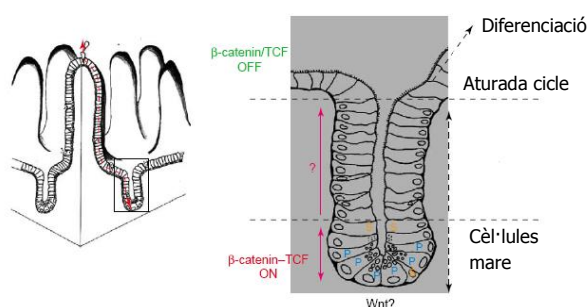


Figura 21. El compartiment de cèl·lules mare epitelials en la cripta del còlon. L'estat actiu de la via de Wnt, a través de β -catenina, en el compartiment inferior de la cripta permet perpetuar la població de cèl·lules mare del fons de la cripta, així com donar lloc al conjunt de cèl·lules diferenciades que conformaran l'epiteli, les quals desactiven la via de Wnt, fet associat a la pèrdua de la seva capacitat proliferativa. Adaptat de (Sancho et al. 2003).

Donat que la metilació del DNA es copia de forma semiconservativa durant la replicació, un dels mecanismes proposats en la desmetilació pot ser la simple acumulació d'errors epigenètics durant el procés de còpia, fet que comportaria una desmetilació passiva i progressiva. En aquest sentit estudis previs indiquen que existeix una desmetilació progressiva en teixit normal lligada a l'edat (Revisat en (Issa 1999)), fet que ha estat també demostrat per a la hipometilació que es dona en tumors gastrointestinals (Suzuki et al. 2006). De la mateixa

manera, la hipermetilació d'illes CpG en teixit normal i tumoral és també un procés lligat a l'edat (Revisat en (Issa 1999)). Aquests resultats, conjuntament amb el fet que la hipometilació té una distribució continua en càncer gàstric i de còlon (Suzuki et al. 2006) i càncer colorectal (pàg. 61, Figura 3) donen força a la hipòtesi d'una hipometilació passiva lligada a errors durant la replicació, en un procés depenent de l'edat. El fet que tant en teixit normal com en tumoral hi hagi una tendència progressiva a patir tant hipometilació global com hipermetilació regional de determinades illes CpG presenta una aparent paradoxa. Experiments duts a terme sobre fibroblasts humans en cultiu indiquen que l'activitat de la metiltransferasa de manteniment DNMT1 disminueix a mesura que avancen les divisions cel·lulars, mentre que l'activitat de la metiltransferasa *de novo* DNMT3b s'incrementa, fet que pot estar a la base de les alteracions de la metilació associades a la edat en teixit normal (Lopatina et al. 2002). D'altra banda, l'activitat tant de DNMT1 com de DNMT3b es veuen molt incrementada en els mateixos fibroblasts immortalitzats.

En aquest mateix sentit, no s'ha identificat fins ara cap alteració genètica en gens de DNMT en càncer que pugui alterar o abolir la seva funció i per tant produir la desmetilació del genoma. Ben al contrari, d'acord amb els resultats obtinguts per Lopatina et al. (Lopatina et al. 2002), tant la DNMT1 com la DNMT3b s'han trobat sobreexpressades en diferents tipus de tumors (Revisat en (Esteller 2007)), fet que evidencia el profund desconeixement dels mecanismes que condueixen a la desmetilació global que pateix el genoma tumoral. Són molts els factors amb activitats modificadores de la cromatina que s'han trobat alterats en càncer (Revisat en (Esteller 2007)) i és d'esperar que el seu estudi pugui aportar en el futur noves evidències sobre les causes de la hipometilació en càncer.

Tal i com hem vist en la introducció, existeixen en càncer fenòmens d'hipometilació específics associats a pèrdues de metilació en regions promotores de gens imprintats i gens metilats específics de teixit (Revisat en (Ehrlich 2002; Feinberg 2007)). Podríem per tant hipotetitzar que en aquests casos pugui existir una hipometilació activa dirigida a regions concretes. Aquesta hipòtesi prediu l'existència d'enzims amb activitat DNA desmetilasa, fet que no ha estat completament demostrat en mamífers. Per un costat, Bhattacharya i col·laboradors varen identificar i aïllar el primer enzim amb activitat DNA desmetilasa en cèl·lules humanes, el qual es correspon amb la proteïna amb domini de unió al DNA MBD2b (Bhattacharya et al. 1999). L'existència d'aquesta desmetilasa va ser confirmada en treballs posteriors realitzats pel mateix grup (Cervoni et al. 1999; Cervoni and Szyf 2001; Ramchandani et al. 1999; Szyf and Bhattacharya 2002a; Szyf and Bhattacharya 2002b). Tot i això, la incapacitat per replicar aquests resultats per part d'altres laboratoris independents (Boeke et al. 2000; Ng et al. 1999; Wade et al. 1999) qüestiona l'existència real d'aquesta activitat.

La producció de RNA no codificant ha estat lligada tant al silenciament transcripcional com a la metilació del DNA, dos processos relacionats. El primer mecanisme, anomenat RNA interferència (RNAi), implica el silenciament post-transcripcional per mitjà de la producció de petits intermediaris de RNA de doble cadena. En plantes però, existeix un mecanisme similar depenent de la maquinària RNAi, anomenat *RNA directed DNA Methylation* (RdDM), que comporta la metilació del DNA per mitjà de metiltransferases guiades per intermediaris de RNA

(Revisat en (Goll and Bestor 2005)). Se sap que la producció de RNAi és essencial per a la formació d'heterocromatina en llevats (Revisat en (Grewal and Jia 2007)) i per al silenciament d'elements transposables com els elements LINE 1 (Yang and Kazazian 2006), el silenciament dels quals depèn també de la metilació del DNA del seu promotor (Hata and Sakaki 1997; Yu et al. 2001). De fet, s'ha descrit en càncer la desregulació de RNAs no codificants com els miRNA (Revisat en (Blenkiron and Miska 2007)). Tot i això, desconeixem si el mecanisme de RdDM, el qual ha estat també descrit en cèl·lules de mamífer (Kawasaki and Taira 2004; Morris et al. 2004), pot ser el responsable de la metilació d'aquests i altres elements repetitius. Si fos així, podem especular que alteracions en aquest sistema de metilació podrien tenir conseqüències importants en el manteniment dels patrons de metilació globals tant en cèl·lules normals com tumorals.

Finalment, la dieta sembla ser un factor important en el manteniment dels nivells de metilació a través de la ingesta de nutrients donadors de grups metil (Revisat en (Jaenisch and Bird 2003)). Tot i que les causes moleculars no estan gens clares, dietes pobres en folat estan lligades a nivells més alts de hipometilació en humans (Revisat en (Friso and Choi 2002)) i càncer de fetge en rates, associat a hipometilació global i de gens específics (Dizik et al. 1991). Per tant, els nivells globals de nutrients donadors de grups metil que ingerim és important en tant que regula la quantitat de donadors disponibles per a la cèl·lula, modulant a llarg termini el desenvolupament de malalties com el càncer.

Cap a un estudi epigenètic individualitzat dels elements repetitius: la necessitat de desenvolupar nous mètodes d'anàlisi de la metilació

L'observació que la hipometilació s'associa a alteracions cromosòmiques en tumors humans ens va fer plantejar un estudi més en profunditat de la hipometilació en càncer. Si bé es coneixia des de feia molt temps que la hipometilació era un fenomen que afecta globalment a tot el genoma i que es dona en estadis incipients del procés tumoral, poc sabíem de la mena de seqüències que es veuen afectades i sobretot, quina és la seva distribució en el genoma. Com ja hem vist en la introducció, prèviament alguns autors havien centrat la seva atenció en l'estat de metilació de les seqüències repetides com les seqüències Alu, primer per mitjà de l'anàlisi a través de *Southern Blot* (Gama-Sosa et al. 1983b; Hellmann-Blumberg et al. 1993; Kochanek et al. 1993; Schmid 1991) i més tard per mitjà de tècniques basades en l'anàlisi de seqüències de DNA tractat amb bisulfit sòdic (Weisenberger et al. 2005; Yang et al. 2004). En qualsevol cas, aquestes aproximacions havien estat dirigides a fer estimacions globals del seu estat de metilació, sense poder identificar o quantificar elements concrets. En el laboratori ja disposàvem d'una tècnica d'anàlisi de la metilació, l'AIMS, que com ja hem dit tant pot realitzar estimes globals dels nivells de metilació com servir d'eina més específica de descobriment i mapatge de noves dianes. Els primers anàlisis enfocats a conèixer de l'origen de productes d'AIMS indicaven que aquests contenien un nombre bastant elevat d'elements repetitius Alu en algun dels seus extrems (fins al 40% de productes seqüenciats)(Frigola et al. 2002). Aquest fet però no és sorprenent si tenim en compte que la major part de seqüències Alu estan fortament metilades i que una fracció considerable conté la seqüència diana de SmaI (pàg. 91, Taula 1), fet que les fa especialment propenses a ser amplificades per AIMS.

La primera aproximació experimental va consistir en l'amplificació de productes d'AIMS amb uns primers amb homologia a una seqüència consens d'Alu, especialment dissenyats per enriquir els patrons AIMS amb aquestes seqüències. Donat l'elevat nombre d'aquests elements repetitius en el genoma humà (al voltant de 1.1 milions per genoma haploid) i el seu estat fortament metilat, va resultar impossible obtenir patrons que poguessin ser interpretats a partir d'AIMS. Aquests resultats ens varen fer canviar d'estratègia, tot passant a amplificar aquelles Alu's amb la diana SmaI no metilada. Aquesta nova direcció va resultar ser encertada i varem començar a produir els primers patrons interpretables amb aquest nou plantejament. Els patrons obtinguts amb aquest nou mètode varen ser anomenats *Amplification of UnMethylated Alu* o AUMA (Trellat 2). Si bé és cert que a nivell metodològic AIMS i AUMA comparteixen molts passos, a nivell conceptual AUMA no té cap precedent en la literatura. És tracta d'obtenir patrons d'una raresa del genoma: els elements Alu desmetilats.

És important subratllar, que els elements repetits que amplifiquem per mitjà d'AUMA són sistemàticament exclosos de la major part de metodologies d'anàlisi de metilació, sobre tot aquelles que es basen en la hibridació d'àcids nucleics sobre *arrays* de DNA com el meDIP on chip (Veure Introducció, apartat 5), i que per tant els canvis de metilació que es donen en aquest compartiment del genoma són invisibles a aquestes metodologies.

Els elements repetitius desmetilats en cèl·lules normals i tumorals

L'aplicació d'AUMA a una sèrie de 50 tumors colorectals i les seves respectives parelles de teixit normal (Trellat 2) ens ha permès identificar per primera vegada tant Alu's desmetilades en teixit normal com canvis en la metilació en aquests elements repetitius associats al procés tumoral, ja siguin hipometilacions com hipermetilacions.

El fet que haguem pogut generar patrons altament reproduïbles d'Alu desmetilades (pàg. 96, Figura 2 i pàg. 111, Supplemental Figure 3) és un resultat fins a cert punt inesperat, que implica l'existència d'un nombre elevat d'elements repetitius l'estat de desmetilació dels quals està consistentment mantingut, tant en teixit normal com tumoral. La seqüenciació d'un número significatiu de productes AUMA ens indica que aquestes Alu desmetilades tendeixen a trobar-se al voltant de regions reguladores com illes CpG, promotors i al voltant de primers exons (pàg. 105, Supplemental Table 1). Si bé és cert que les seqüències Alu es distribueixen preferentment en regions riques en gens, fet que queda demostrat en la hibridació de productes AUMA sobre cromosomes metafàsics (pàg.99, Figura 5A; Revisat en (Batzer and Deininger 2002)), aquest fet no és suficient per a explicar la distribució observada per a Alu's desmetilades. D'acord amb els nostres resultats, anàlisis globals de les seqüències d'elements Alu propers a regions promotores havien hipotetitzat que aquestes tenen un estat bàsicament hipometilat, basant-se en l'evidència que tenen taxes de mutació associades al dinucleòtid CpG més baixes que la resta d'Alu's del genoma (Brohede and Rand 2006). Tenint en compte que les regions reguladores de l'activitat gènica són bàsicament les úniques regions del genoma humà que es mantenen lliures de metilació, és raonable hipotetitzar que l'estat desmetilat de les seqüències Alu adjacents depengui de l'estat de metilació d'aquestes regions reguladores i viceversa.

Pel que fa als canvis de metilació en bandes AUMA que hem detectat en els tumors, tant el gran nombre de bandes AUMA afectades com l'elevada freqüència amb la que aquests canvis es donen (pàg. 100, Figura 6) suggereixen una elevada plasticitat de l'estat epigenètic d'aquestes seqüències durant el procés tumoral. Per tant, AUMA ens permet la identificació i mapatge de dos fenòmens associats a tumors que fins ara cap altra tècnica abordava: la hipermetilació d'elements repetitius no metilats en teixit normal i la desmetilació d'elements normalment metilats. De forma notable, moltes de les seqüències que contenen elements Alu desmetilats mapen en regions del genoma prèviament caracteritzades com a punts fràgils o identificades com a llocs freqüentment alterats estructuralment en tumors, fent d'AUMA una excel·lent metodologia de descobriment de regions hipometilades que puguin jugar un paper important en la generació d'instabilitat genètica en càncer. Podem posar com a exemple les bandes Ak1 i Aq3, les quals mapen en les regions dels gens ADA (20q13.12) i MYOM2 (8p23.3) respectivament (pàg.105, Taula1), totes dues molt freqüentment alterades en diferents tipus de tumors.

L'estudi una mica més en profunditat de la banda hipometilada Aq3, la qual conté les dues dianes SmaI en un element Alu Y i MLT1A respectivament, ha evidenciat que l'estat metilat d'aquests elements en teixit normal s'associa a nivells alts de metilació en la lisina 9 de la histona H3 (pàg. 101, Figura 7D), modificació clàssicament associada a silenciament i heterocromatina (Revisat en (Kouzarides 2007)). Aquests resultats són molt similars als descrits per Kondo i col·laboradors per als elements Alu a nivells global i específic, segons els quals les seqüències Alu estan enriquides per lisina 9 metilada (Kondo and Issa 2003). El tractament amb drogues desmetilants provoca la pèrdua relativa de metilació de la lisina 9 (pàg. 101, Figura 7D), fet que implica que la supressió d'aquests elements repetitius per mitjà de la heterocromatització depèn de la metilació del DNA. En resum, podem concloure que la hipometilació que es dona en tumors dels 2 elements repetitius Alu Y i MLT1A en la regió 8p23.3 provoca canvis en la composició de la cromatina que podrien estar associats amb la instabilitat genètica que pateix la regió en múltiples tipus de càncer. Estudis futurs hauran de determinar si la hipometilació d'aquests dos elements és un esdeveniment únic en la regió o bé s'associa a la hipometilació d'una regió més extensa, i si aquesta hipometilació guarda alguna relació amb la instabilitat de la regió en càncer.

Si bé AUMA ha permès mapar elements Alu desmetilats, el desenvolupament i aplicació de QUMA ens ha permès realitzar per primer cop quantificacions relatives i absolutes del nombre d'Alu's desmetilades en teixit normal i tumoral. Fins ara, les aproximacions experimentals de les què disposàvem només permetien realitzar quantificacions relatives del grau de metilació dels dinucleòtids CpG en Alu's (Yang et al. 2004), però no del nombre absolut o relatiu d'elements Alu desmetilats. Hem pogut determinar que al voltant del 2.3% del les Alu's en una cèl·lula normal de l'epiteli del còlon, al voltant de 25000 Alu's, tenen la diana SmaI desmetilada. Segons les últimes estimacions el genoma humà conté entre 20000 i 25000 gens (IHGSC 2004), de tal manera que si els elements Alu desmetilats es distribueixen uniformement entre els gens, cada gen contindria al voltant d'un element Alu desmetilat. Aquestes estimacions són compatibles amb l'estat bàsicament desmetilat de la majoria de regions reguladores en el genoma humà (Revisat en (Yoder et al. 1997)), i com ja hem dit, argumenta a favor de la regulació de les

Alu's desmetilades per part de les seqüències reguladores adjacents. En tumors hem pogut estimar que el nombre d'Alu's desmetilades arriba al 3.8%, és a dir, al voltant de 42000 elements Alu, fet que posa de manifest el fort pes que aquestes seqüències poden jugar tant en la hipometilació global del genoma com en la generació d'instabilitat genètica.

Un anàlisi bioinformàtic detallat de la distribució de la diana SmaI, així com la diana usada per amplificar productes AUMA (l'Apèndix 1 conté el programa informàtic utilitzat), ha evidenciat que la hipometilació de seqüències Alu no afecta a les diferents famílies Alu per igual. Així doncs, la pressió per mantenir silenciats elements Alu joves, els quals contenen encara membres amb capacitat de transposició, és superior a la que sofreixen elements Alu més antics, els quals han esdevingut inactius degut a l'acumulació progressiva de mutacions en la seva seqüència (Revisat en (Batzner and Deininger 2002)). Per tant, tot i que com ja hem dit, la hipometilació pot entendre's com a un fenomen passiu que afecta globalment a tot el genoma, diferents constrenyiments selectius juguen un paper important en la modulació dels nivells de metilació de la cèl·lula tumoral.

Els elements repetitius i l'arquitectura del genoma humà

Una de les majors paradoxes de la biologia va arribar amb el coneixement que el tamany del genoma no correlaciona amb la complexitat biològica. Per què el nostre genoma és 275 vegades més gran que el del llevat però 200 vegades més petit que el de l'ameba *Amoeba proteus*? Aquesta és la paradoxa del valor C (C és el contingut en picograms de DNA d'un genoma haploide). El principi de la comprensió d'aquesta paradoxa va venir amb el coneixement que bona part del genoma humà, i el d'altres espècies, està compost per elements repetits. La seqüenciació del genoma humà ha permès xifrar en un 50% aquest contingut (Lander et al. 2001). De la resta, només un 10% té informació codificant per a proteïnes i un percentatge més elevat posseeix informació reguladora de l'activitat gènica. Per tant, els nostres genomes estan bàsicament buits d'informació codificant. Alguns autors han suggerit que la metilació del DNA pot donar resposta a aquesta paradoxa en vertebrats. Només una petita porció del genoma es manté lliure de metilació, aquella corresponent a elements reguladors com promotors i illes CpG, mentre que la resta del genoma, bàsicament seqüències repetides disperses i regions pericentromèriques es mantenen fortament metilades i en un estat heterocromàtic. Per tant, podem pensar que en realitat el tamany efectiu del genoma és el que proporcionen la col·lecció de seqüències lliures de metilació que són realment "visibles", és a dir, aquelles que són accessibles a elements reguladors de l'activitat metabòlica del DNA i RNA. La resta del genoma, en un estat inaccessible, és manté "invisible". D'aquesta manera, encara que hi hagi un contingut molt elevat de seqüències repetides aquestes no afecten el tamany efectiu del genoma, el qual sí que correlaciona amb la complexitat biològica (Rollins et al. 2006). En aquest context, la desmetilació d'Alu's i altres elements repetits que reportem en aquest treball (pàg.105, Taula1), contribueixen a l'increment del tamany efectiu del genoma en la cèl·lula tumoral, fet que incrementa el nombre de regions "visibles" propenses a patir alteracions genètiques, un dels motors de la progressió tumoral.

Noves alteracions epigenètiques en càncer: 5q35.2 com a model d'estudi

La identificació en patrons AUMA d'un petit fragment genòmic corresponent a un element repetitiu MIR desmetilat en teixit normal i freqüentment metilat en teixit tumoral marca l'inici del tercer treball presentat en aquesta memòria. El precedent de la regió genòmica 2q14.2 en CCR, en la qual mapen un gran nombre de gens amb promotors metilats tant en tumors primaris com en línies cel·lulars (Frigola et al. 2006), ens va fer plantejar l'estudi de l'estat de metilació dels gens al voltant de CPLX2, arribant a identificar 8 illes CpG metilades, prèviament no descrites, en una regió que s'estén al llarg de més de 1.2 Mb (pàg. 144, Figura 2). Aquestes dades, conjuntament amb d'altres regions cromosòmiques aïllades a partir d'AUMA en les quals hem trobat la metilació de múltiples illes CpG veïnes, ens porta a pensar que la metilació de múltiples illes CpG adjacents és un fenomen comú en el CCR i probablement en altres tipus de càncer. En aquest sentit, hem conegut molt recentment que la regió al voltant del gen hMLH1, freqüentment metilat en càncer, conté també d'altres gens veïns metilats en càncer colorectal (Hitchins et al. 2007).

És important subratllar que els mapes de metilació recentment obtinguts per a les línies de CCR SW480, DLD1 i HCT116 (Hayashi et al. 2007) i CaCo2 (Keshet et al. 2006), totes elles usades en aquest estudi, no han detectat metilació en cap dels gens de la regió genòmica 5q35.2 aquí descrits, fet que ens indica que els estudis globals, tot i que proporcionen una àmplia visió, no arriben als nivells de sensibilitat proporcionats per AUMA, basat en l'ús d'enzims de restricció i PCR. Aquesta manca de sensibilitat es deu probablement al fet que els anticossos contra 5mC usats en aquestes tècniques requereixen d'una densitat mínima de dinucleòtids CpG per tal de reconèixer i unir-se a l'epítotop (Keshet et al. 2006).

En el present treball hem volgut anar un pas més enllà dels estudis duts a terme en la regió 2q14.2, els quals aprofundeixen molt en aspectes de la metilació del DNA, més que no pas en la caracterització de les modificacions d'histones en la regió. Globalment, creiem que la regió 5q35.2 és un excel·lent model d'estudi de les alteracions epigenètiques en càncer. En primer lloc, existeixen entre els gens hipermetilats i silenciats gens lliures de metilació amb nivells alts d'expressió. Aquest fet ens proporciona controls positius i negatius dins de la mateixa regió d'estudi i facilita les comparacions entre els estats transcripcionals actius i silenciats. En segon lloc, disposem d'una línia de CCR genòmicament estable amb perfils de metilació molt similars als que trobem en tumors primaris, fet que ens proporciona un bon model d'estudi sobre el qual realitzar els experiments que no podem dur a terme en tumors.

Mecanismes de supressió gènica en 5q35.2: els dos hits de Knudson

La prèvia caracterització de les alteracions genètiques de tipus cromosòmic en un subgrup de 50 parelles normal-tumor de CCR indica que un 10% dels tumors en aquesta sèrie presenten pèrdua del braç 5q (Vendrell et al. 2007). En aquest braç cromosòmic hi ha un dels gens supressors tumorals més rellevants tant per a l'inici com per a la progressió del CCR, el gen APC en 5q21, freqüentment inactivat o perdut tant en síndromes familiars com en tumors esporàdics de CCR (Revisat en (Fodde et al. 2001)), fet que comporta que les alteracions genètiques

d'aquest cromosoma siguin freqüents en aquest tipus de càncer. Els anàlisis de metilació duts a terme sobre les mateixes mostres han determinat que tots els tumors amb pèrdues de 5q presenten també hipermetilació de promotors de gens en 5q35.2 (dades no mostrades). En la resta de tumors, els quals retenen els dos braços 5q (90%), la freqüència de metilació és també molt elevada, amb el 100% dels casos amb almenys 1 gen metilat (6.6% de casos amb 1 gen metilat; 35.5% amb 2 gens metilats; 31.1% amb 3 gens metilats i 20% amb 4 gens metilats).

Les dades de metilació obtingudes per seqüenciació directa ens indiquen que la metilació de les illes CpG de gens en 5q35.2 és probablement bialèlica, donat que la metilació és present a la major part de casos a uns nivells per sobre del 75% (pàg. 143, Figura 1 i Apèndix 2). S'ha descrit anteriorment que gens amb promotors hipermetilats no són dianes de mutació (Revisat en (Jones and Baylin 2002)), i de fet l'anàlisi mutacional dut a terme a gran escala sobre més de 11.000 gens en càncer colorectal i de mama no ha identificat cap mutació en els gens en 5q35.2 aquí descrits (Sjoblom et al. 2006). Tot plegat ens condueix a pensar que la metilació bialèlica és el mecanisme de supressió més freqüent en els gens de 5q35.2. En la resta de casos, la metilació d'un dels al·lels aniria acompanyada de pèrdues d'un dels braços 5q, mentre que la mutació es presenta a hores d'ara com a un esdeveniment improbable, tot i que no el podem descartar.

El descobriment d'un nou conjunt de gens silenciats amb promotors metilats en la regió 5q35.2 no només ens han proporcionat un bon model sobre el qual poder analitzar els mecanismes que mantenen aquests gens silenciats, sinó que també ens proporciona nous gens candidats a jugar un paper en el procés tumoral.

Rellevància del silenciament de gens en 5q35.2 en CCR

Els gens que trobem silenciats en la regió analitzada es poden agrupar en unes poques categories funcionals: receptors d'hormones, com el receptor 1 de la dopamina (DRD1) i el receptor H2 de la histamina (HRH2); proteïnes relacionades amb el tràfic vesicular, com la complexina2 (CPLX2) i la clatrina B (CLTB); proteïnes d'unió cel·lular, com la protocadherina de pulmó, fetge i còlon (PCLKC); proteïnes reguladores com la G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1 (GPRIN1) i proteïnes de funció desconeguda com la β sinucleïna (SNCB).

La dopamina ha estat caracteritzada per tenir efectes anti-proliferatius en l'epiteli del pilor en Gerbs (*Meriones unguiculatus*) (Wegner et al. 1997) i ja s'havia descrit nivells més baixos de receptor de la dopamina en càncer de còlon (Basu and Dasgupta 1999). Aquests resultats suggereixen un paper antitumoral de la dopamina, situació a la qual la cèl·lula tumoral respon disminuint els nivells del receptor cel·lular. Els nostres resultats mostren la infraexpressió del receptor DRD1 tant en tumors primaris com en línies cel·lulars (pàg. 146, Figura 4A-D), tot i que la metilació de la regió promotora és infreqüent en tumors però no en línies (pàg. 144 Figura 2B i pàg. 146, Figura 4A/C). Aquesta major tendència a metilar de les línies cel·lulars ja havia estat descrita prèviament (Smiraglia et al. 2001).

En el cas del gen de la Sideroflexina 1 (SFXN1), tot i que el seu promotor està lliure de metilació en tots els teixits i línies cel·lulars analitzades (pàg. 144, Figura 2B i pàg. 146, Figura 4A) l'hem trobat parcialment infraexpressada en tumors primaris (pàg. 146, Figura 4A/B). Desconeixem les implicacions que la reducció de l'expressió del gen que codifica per aquesta proteïna de membrana mitocondrial pugui tenir en càncer. D'altra banda se sap que mutacions en SFXN1 provoquen anèmia siderocítica en ratolins (Roy and Andrews 2001).

Resultats oposats han estat obtinguts en el cas de la histamina. Si bé la histamina té reconeguts efectes estimuladors de la proliferació cel·lular, diferents treballs li atribueixen un paper antitumoral (Brunstein et al. 2004; Burtin et al. 1982; Suonio et al. 1994), mentre que d'altres li atribueixen un paper estimulador del creixement tumoral (Adams et al. 1994; Tutton and Barkla 1978). En la pràctica mèdica, inhibidors del receptor HRH2 com el Cimetidine han estat usats amb èxit en la teràpia contra el CCR durant molts anys, pels reconeguts efectes de reducció del creixement cel·lular que té aquesta droga (Adams et al. 1994; Armitage and Sidner 1979; Gifford et al. 1981), fet que incrementa la confusió al voltant del paper de la histamina en càncer. Les evidències de les que es disposa actualment indiquen que la inhibició del receptor HRH2 en càncer té efectes antitumorals a través de dos mecanismes: la supressió directa dels efectes estimuladors de la proliferació de la histamina en aquells tumors que expressen HRH2, i l'increment de la resposta immune, a través de la inhibició de la funció supressora de les cèl·lules T sobre els limfòcits (Revisat en (Siegers et al. 1999)). Els nostres resultats indiquen que la segona via immunològica podria ser prevalent en CCR, donat que el receptor HRH2 es troba silenciats en totes les línies de CCR analitzades en un elevat nombre de tumors primaris, freqüentment associat a la metilació de la seva regió promotora (pàg. 146, Figura 4).

El silenciament transcripcional dels gens CPLX2 i CLTB pot tenir efectes sobre dues funcions cel·lulars bàsiques relacionades, importants per al funcionament de les cèl·lules de l'epiteli colorectal: l'exocitosi i l'endocitosi. La complexina 2 és una proteïna adaptadora que juga un paper en la regulació de l'exocitosi mediada per Ca^{++} , actuant principalment en les sinapsis de les terminacions axòniques neuronals (Revisat en (Li and Chin 2003)). La complexina 2 s'expressa a nivells baixos en el còlon normal (pàg. 146, Figura 4D) i tot i que se'n desconeix la funció en aquest teixit, la podríem relacionar amb la important activitat secretora que presenten determinades cèl·lules de la mucosa colònica. Això ens porta a hipotetitzar que el silenciament de CPLX2 podria estar relacionat amb una disminució de la capacitat secretora de les cèl·lules tumorals, amb uns efectes que desconeixem per a la biologia del tumor. D'altra banda, la clatrina és un polipèptid, del qual la cadena lleugera de la clatrina codificada pel gen CLTB en forma part, que recobreix un tipus determinat de vesícules d'endocitosi (Revisat en (McNiven and Thompson 2006)). Es desconeix el paper que el silenciament que aquí reportem pugui tenir per al CCR, tot i que segurament estarà relacionat amb la capacitat de les cèl·lules tumorals de formar vesícules recobertes de clatrina, importants per al tràfic vesicular. De fet, diverses molècules relacionades amb l'endocitosi entre les quals no es troba la clatrina B, s'han trobat alterades genèticament en diversos tipus de leucèmia (Revisat en (Floyd and De Camilli 1998)), fet que suggereix que el silenciament del producte del gen CLTB pugui jugar algun paper en tumors colorectals.

L'any 2002 va ser identificat un nou membre de la família de les protocadherines, dins de la superfamília de les cadherines, anomenat protocadherin lung, kidney and colon (PcLKC) (Okazaki et al. 2002). Com el seu nom indica, s'expressa bàsicament en pulmó, ronyó i còlon. És en el còlon on s'ha vist que la PcLKC juga un paper supressor tumoral, ja que la reexpressió de PcLKC en la línia de CCR HCT116 inhibeix la capacitat d'aquesta de créixer en múltiples capes, a més a més d'inhibir el creixement tumoral en ratolins nuus (Okazaki et al. 2002). D'acord amb aquests resultats, hem trobat la PcLKC fortament reprimida en tots els tumors i línies cel·lulars analitzades (pàg. 146, Figura 4), fet que suggereix que el silenciament d'aquest gen podria ser essencial per al desenvolupament del CCR.

Pel que fa a GPRIN1, lleument silenciada tant en tumors com en la línia cel·lular HCT116 (pàg. 146, Figures 4A-D), es desconeix la seva funció en el còlon normal, on s'expressa a uns nivells mitjos (pàg. 146, Figura 4D) i el paper que pugui jugar el seu silenciament en càncer. És en cervell, on GPRIN s'expressa abundantment, que regula el creixement i la morfologia neuronal (Chen et al. 1999; Nakata and Kozasa 2005).

La β -sinucleïna (SNCB) és una proteïna de funció desconeguda en teixit normal que s'expressa principalment en cervell, on es localitza en les terminals pre-sinàptiques. Altres membres de la família són la α -sinucleïna, involucrada en malalties neurodegeneratives com el Parkinson i l'Alzheimer, l'activitat neurotòxica de la qual és inhibida per la β -sinucleïna en aquests contextos patològics (Hashimoto et al. 2001). Finalment, la γ -sinucleïna va ser identificada com a marcador de progressió en càncer de mama (Revisat en (George 2002)). La β -sinucleïna s'ha trobat expressada en medulloblastomes (Fung et al. 2003) i càncer de mama i ovari (Bruening et al. 2000), però se'n desconeixia la seva expressió en altres teixits. Els nostres resultats mostren per primer cop que la β -sinucleïna s'expressa a nivells baixos en teixit de còlon normal. Tant en tumors primaris com en línies de CCR hi ha una marcada tendència al silenciament d'aquest gen (pàg. 146, Figura 4A-D) associada a la metilació aberrant del seu promotor (pàg. 146, Figura 4A/C). Desconeixem el paper que el silenciament de la β -sinucleïna pugui jugar en càncer colorectal, el qual haurà de ser abordat en futurs experiments.

Finalment és important subratllar que en la regió 5q35.2 no només hem descrit gens silenciats, sinó també gens sobreexpressats en tumors. És el cas dels gens THOC3 i RNF44 (pàg. 146, Figura 4A-D). El producte del gen Tho Complex 3 (THOC3) participa en l'estabilitat del DNA durant la transcripció i s'ha vist que alteracions en el complex THO/TREX en llevats provoquen inestabilitat genètica associada a hiper-recombinació (Huertas and Aguilera 2003). Per tant, la sobreexpressió de THOC3 té sentit en un context en el qual hi ha un increment de l'activitat transcripcional, com és el cas dels gens de rRNA (Koyuncuoglu et al. 1998; Williamson et al. 2006) i l'activació de la transcripció no codificant en les cèl·lules tumorals (Revisat en (Szymanski et al. 2005)), fet que pot ser interpretat com un mecanisme dirigit a minimitzar la inestabilitat genètica associada a la transcripció, que s'ha de sumar a la inestabilitat genètica inherent que mostren molts tipus de tumors. Els nostres resultats són els primers que indiquen que THOC3 es troba sobreexpressat en càncer, tant en tumors primaris com en línies cel·lulars de CCR. D'altra banda, el gen Ring Finger 44 (RNF44) pertany a la família de proteïnes amb dominis de dits de zinc, els quals els permeten tant interaccions proteïna-DNA com proteïna-

proteïna (Freemont et al. 1991). Aquest gen s'expressa a alts nivells en teixit normal de còlon (pàg. 146, Figura 4D) on es desconeix la seva funció, així com els efectes que la seva sobreexpressió en tumors pugui tenir.

Valor diagnòstic i prognòstic dels marcadors de metilació identificats en 5q35.2

L'elevada freqüència amb la que hem trobat metilats alguns gens en 5q35.2 (pàg. 145, Figura 3C), i encara més, l'elevada freqüència amb la que els trobem infraexpressats (pàg. 146, Figura 4A) és indicativa que aquests gens poden jugar un paper important en el procés tumoral, d'acord amb les funcions conegudes d'alguns d'aquests gens que acabem de veure. Tot i això, estudis estadístics d'associació amb diferents característiques clíniques i patològiques dels tumors han estat negatius, fet que pot ser atribuït en part a l'elevada freqüència de metilació d'aquests gens. Per tant, si bé aquests gens no ens proporcionen informació amb valor prognòstic, sí que tenen un elevat valor diagnòstic. Una de les fites de la recerca en càncer és la identificació de marcadors moleculars amb una forta associació a tumors que puguin ser emprats en el diagnòstic del càncer. La metilació del DNA és un molt bon marcador, ja que podem detectar la presència de patrons de metilació aberrants en diferents tipus de mostres com la sang o la femta, per mitjà de tècniques molt sensibles basades en la PCR com el MSP (Veure Introducció, secció 5). Estudis futurs hauran de determinar la utilitat dels marcadors de metilació aquí descrits en el diagnòstic precoç del CCR i d'altres tipus de càncer.

L'origen *stem* del càncer i els dominis bivalents

La hipòtesi que en l'origen dels tumors trobem cèl·lules amb característiques de cèl·lules mare, les anomenades cèl·lules mare del càncer o *Cancer Stem Cells* (CSCs) està prenent en els darrers anys un major protagonisme. Aquesta hipòtesi ofereix respostes a moltes de les preguntes plantejades fins ara, com el potencial replicatiu il·limitat de les cèl·lules tumorals, la qual s'assembla a la capacitat d'autoperpetuació de les cèl·lules mare. A més a més explicaria fins a cert punt l'heterogeneïtat cel·lular que s'observa en molts tumors, en els quals una petita proporció de CSCs proliferatives està envoltada d'una gran majoria de cèl·lules filles diferenciades. El fet que les cèl·lules mare es divideixen al llarg de moltes generacions permetria també que aquestes poguessin acumular al llarg de la seva vida moltes alteracions genètiques i epigenètiques, començant així el seu camí cap a la malignitat (Revisat en (Valk-Lingbeek et al. 2004)). En el cas del CCR, ja hem vist que la hipòtesi més acceptada és que el seu origen es troba en el compartiment inferior de les criptes de Lieberkühn en l'epiteli del còlon i el recte (Revisat en (Sancho et al. 2003)). Fins ara però, les evidències moleculars que donaven suport a aquesta hipòtesi eren més aviat escasses.

La ciència al voltant de l'estudi epigenètic del càncer és mou ràpid. De fet, es mou tan ràpid que en el moment de llegir aquesta tesi, ja estarà desfasada. En els darrers dos anys, el gran desenvolupament de les tècniques d'anàlisi massiu aplicades a l'estudi de la cromatina, ha permès aprofundir en el coneixement de la regulació epigenètica de les cèl·lules mare, tot obtenint mapes globals de distribució de diferents modificacions d'histones. La comparació d'aquests patrons epigenètics amb els patrons de cromatina observats en càncer han evidenciat

per primera vegada que un gran nombre de gens epigenèticament alterats en càncer posseeixen patrons de cromatina similars als de les cèl·lules mare embrionàries, en suport d'un origen *stem* del càncer. Contràriament al que passa en ESCs, en les quals els patrons d'expressió són reversibles, la hipermetilació de promotors en cèl·lules tumorals elimina la reversibilitat, tot bloquejant un determinat patró d'expressió que permet mantenir un estat de divisió permanent (Widschwendter et al. 2007).

El treball que ha donat origen a aquesta línia de recerca epigenètica és el mapatge genòmic en ESCs murines de la histona H3 trimetilada en les posicions 4 i 27 (Bernstein et al. 2006), marques catalitzades pels sistemes de memòria tritòrax i polycomb, respectivament (Veure Introducció, secció 3). En aquest treball, els autors descriuen per primer cop que gens clau per al desenvolupament es troben sota el control del que ells denominen els promotors bivalents en ESCs, en els quals colocalitzen tant la trimetilació de la lisina 4 com de la 27. Aquest descobriment ha fet canviar la concepció que fins ara teníem de la regulació epigenètica, segons la qual un estat transcripcional actiu s'associava a marques de cromatina actives, mentre que un estat inactiu s'associava a marques de cromatina inactives. La realitat ha demostrat no ser tant simple com això, i aquest treball demostra que determinats gens amb nivells de transcripció baixos contenen marques tant d'activació (H3K4me3) com d'inactivació (H3K27me3) sobre els seus promotors. La presència de promotors bivalents sobre aquests gens s'interpreta com a la capacitat que tenen les cèl·lules mare embrionàries de donar lloc a qualsevol patró transcripcional de cèl·lula adulta diferenciada: si bé els gens amb promotors bivalents s'expressen poc o gens en ESCs, l'enriquiment durant la diferenciació d'una de les dues modificacions d'histones comportarà l'activació transcripcional del gen (enriquiment per H3K4me3 i pèrdua de H3K27me3) o bé el seu silenciament definitiu (enriquiment per H3K27me3 i pèrdua de H3K4me3). Posteriorment, altres estudis han permès obtenir mapes genòmics de distribució de diverses modificacions d'histones en ESCs i altres tipus cel·lulars en diferents estadis de diferenciació en ratolins (Mikkelsen et al. 2007), en ESCs humanes (Pan et al. 2007; Zhao et al. 2007) i en cèl·lules diferenciades humanes (Barski et al. 2007), tots ells reportant la presència de dominis bivalents en un gran nombre de gens.

Dominis bivalents en 5q35.2: un model lligat a *stem cells* i càncer

Els nostres resultats indiquen que, d'acord amb treballs publicats anteriorment, gens amb promotors metilats en càncer són gens que s'expressen poc o gens en teixit normal (Revisat en (Bird 2002)) i que aquests gens estan sota el control de promotors bivalents en càncers colorectals adults, a més a més de presentar altres característiques de cromatina inactiva com la hipocetilació de determinats residus en les histones H3 i H4 (pàg. 147, Figura 5). Només en carcinomes embrionaris, tumors provinents de cèl·lules mare, s'havia descrit la presència de promotors bivalents sobre gens silenciats amb promotors no metilats, tot i que els autors suggerien que els mateixos gens amb promotors bivalents en carcinomes embrionaris tendien a estar hipermetilats en diferents càncers adults (Ohm et al. 2007). Els mateixos gens que descrivim en la regió 5q35.2 estan també regulats per dominis bivalents en ESCs tant humanes com murines, però no en cèl·lules humanes diferenciades (pàg. 155, Supplementary table 5), fet que suggereix un origen del CCR en cèl·lules amb característiques de cèl·lules mare.

A més a més, aportem evidències de la presència sobre els gens silenciats amb dominis bivalents de components de complexes repressors polycomb. Existeixen múltiples treballs que demostren la implicació de EZH2, dins el context del PRC2, en el silenciament transcripcional de múltiples gens en càncer de pròstata i mama (Bracken et al. 2003; Kleer et al. 2003; Rhodes et al. 2003; Sellers and Loda 2002; Varambally et al. 2002) i leucèmia promielocítica (Villa et al. 2007). Els nostres resultats indiquen que a més a més de la HKMT EZH2, trobem sobre els promotors bivalents la HDAC SirT1 (pàg. 150, Figura 8), la qual havia estat implicada prèviament en el silenciament de gens hipermetilats en línies de CCR (Pruitt et al. 2006). Per tant demostrem per primera vegada la implicació de EZH2 i SirT1 sobre gens silenciats amb promotors hipermetilats sota el control de dominis bivalents en càncer. Aquestes dues proteïnes han estat identificades per formar part, conjuntament amb la isoforma Eed2, del PRC4, específic de cèl·lules indiferenciades i tumorals (Kuzmichev et al. 2005). Tot i que la caracterització bioquímica de complexes repressors PRC demostra que la presència de SirT1 és específica del PRC4, experiments duts a terme pel mateix laboratori indiquen que SirT1 pot localitzar-se sobre promotors regulats pels PRC2/3 quan se sobreexpressa SirT1 (Kuzmichev et al. 2005). Per tant no podem concloure que la presència de EZH2 i SirT1 sobre els promotors silenciats en 5q35.2 sigui en el context del PRC4, tot i que dues evidències experimentals ens portin a suggerir aquesta possibilitat: (1) EZH2 s'ha trobat sobreexpressat tant en tumors de pròstata (Varambally et al. 2002) com de còlon i mama (Kuzmichev et al. 2005), fet que s'associa a la formació del PRC4 en cèl·lules en cultiu (Kuzmichev et al. 2005) i (2) la isoforma de Eed específica del PRC4, Eed2, s'expressa en tumors de còlon, però no en teixit normal de còlon (Kuzmichev et al. 2005).

La caracterització bioquímica del PRC4 demostra la preferència de EZH2 en aquest complex repressor per metilar la lisina 26 en la histona H1, tot i que en absència de H1 també pot metilar la histona H3 (Kuzmichev et al. 2005). Per tant, tot i que no hem determinat la presència d'histona H1, la qual s'associa a la compactació de la fibra de cromatina en una estructura transcripcionalment inactiva (Revisat en (Felsenfeld and Groudine 2003)), els resultats obtinguts ens porten a suggerir que el silenciament dels gens en 5q35.2 es pot donar en absència de histona H1, context en el què el complex PRC4 podria metilar la histona H3 en la lisina 27, tal i com ha estat suggerit prèviament (Revisat en (Vaquero et al. 2007)).

També hem pogut detectar la presència del component del PRC1 BmiI sobre els promotors silenciats (pàg. 150, Figura 8), la qual s'ha trobat sobreexpressada en diferents tumors humans (Revisat en (Valk-Lingbeek et al. 2004)). El descobriment que la proteïna del PRC1 PC conté un cromodomini que s'uneix específicament a lisina 27 metilada (Cao et al. 2002), va demostrar que el silenciament transcripcional associat a la metilació de la lisina 27 ve mediat pel PRC1, el qual bloqueja l'entrada de complexes remodeladors de cromatina (Revisat en (Cao and Zhang 2004)). Per tant, la detecció del component del PRC1 BmiI sobre els promotors silenciats suggereix que el silenciament d'aquests gens ve mediat per un bloqueig dels nucleosomes en una conformació de cromatina refractòria a l'activitat transcripcional. Aquest paper de PRC1 en el silenciament transcripcional està d'acord amb els nostres resultats, els quals demostren per primera vegada que la desrepressió de gens hipermetilats amb promotors bivalents va acompanyada de la pèrdua de BmiI.

Finalment, no hem determinat si els dominis bivalents que hem descrit es troben ja sobre aquests mateixos gens en teixit de còlon normal, o bé es formen de manera aberrant durant el procés tumoral. Aquest punt haurà de ser adreçat en el futur per mitjà de ChIP sobre teixit, tècnica de més fàcil aplicació sobre cèl·lules en cultiu. Tot i això, el fet que els gens amb promotors metilats en càncer s'expressin poc en teixit normal (pàg. 146, Figura 4D) ens porta a suggerir que aquests ja podrien estar marcats amb dominis bivalents, d'acord amb els baixos nivells d'expressió que mostren gens amb promotors bivalents en ESCs (Bernstein et al. 2006).

El codi d'histones i la dominància de la memòria cel·lular

En les aproximacions d'estudi gen a gen, la capacitat de les drogues desmetilants com la 5-aza-2'-deoxycitidina i els inhibidors de HDAC com el TSA de reexpressar gens amb promotors hipermetilats ha estat clàssicament relacionada amb la pèrdua de modificacions d'histones associades a silenciament, com la metilació de la histona H3 en la lisina 9, i el guany de modificacions associades a activació, com l'acetilació i la metilació de la lisina 4, entre d'altres (Revisat en (Jones and Baylin 2007)). Aquest fet respon a la idea que els gens actius estan sota el control d'un codi de marques d'activació i els gens silenciats sota el control d'un codi de marques d'inactivació. Ja hem vist però, que el descobriment dels dominis bivalents representa un nou paradigma en la regulació epigenètica una mica menys simplista.

Els nostres resultats mostren una característica fins ara no descrita dels dominis bivalents, la seva dominància sobre altres modificacions d'histones. D'aquesta manera, la presència de dominis bivalents en els gens silenciats en limita la seva reexpressió, mentre que la creació *de novo* de dominis bivalents sobre els gens actius en provoca la infraexpressió, tot i que el conjunt dels gens presenten guanys a nivell d'acetilació, sobretot de la histona H3.

Els nostres resultats però, no expliquen aquest fenomen de dominància. Podem hipotetitzar però, que es deu a que les dues marques de metilació (H3K4me3/H3K27me3) poden ser reconegudes per factors amb capacitat d'alterar l'estructura de la cromatina de forma específica, en contra de l'acetilació de residus com la lisina 9 de la histona H3, associada bàsicament a una estructura més oberta de la cromatina a través de l'apantallament de càrregues positives de lisina (Veure Introducció, secció 3). Per tant, és plausible hipotetitzar que la presència de complexos modificadors de cromatina tinguin un efecte dominant sobre els efectes més generals d'activació de la transcripció de l'acetilació de lisines.

Finalment, el fet que els gens actius en 5q35.2 prèviament no marcats amb H3K27me3 mostrin enriquiment d'aquesta marca en els seus promotors després dels tractaments amb drogues, indica que cap gen en 5q35.2 és intrínsecament no metilable per part de EZH2. Aquests resultats estan d'acord amb el fet que en mamífers no s'ha descrit fins a la data l'existència de *Polycomb response elements* o PREs, elements de seqüència de regulació en *cis* que guien la maquinària polycomb cap als seus gens diana en *Drosophila* (Revisat en (Ringrose and Paro 2004)). Aquest fet suggereix que els components polycomb poden ser reclutats, de forma directa o indirecta, sobre els seus promotors diana a través de factors de transcripció, com ha estat demostrat en el cas de la leucèmia promielocítica, on la proteïna de fusió PML-RAR α

recluta el PRC2 sobre seus gens diana (Villa et al. 2007). Aquests resultats ens condueixen una altra vegada a hipotetitzar la presència de barreres físiques que mantinguin aïllades regions de cromatina amb estats transcripcionals oposats. Ja hem vist que un bon candidat a realitzar aquesta funció és el factor CTCF, el qual s'uneix en múltiples llocs en 5q35.2 (Barski et al. 2007). Queda per demostrar si el fet d'esborrar les marques de metilació en la cèl·lula tumoral afecta al reconeixement de factors com CTCF de les seves dianes, i si aquest fet té un paper causal en l'aparent trencament dels dominis d'expressió que veiem en 5q35.2.

En resum, els resultats obtinguts ens han permès elaborar un model del conjunt de regulació epigenètica dels gens silenciats en la regió 5q35.2 (Figura 22).

SirT1 i supervivència: la connexió amb el metabolisme cel·lular

Les nostres dades indiquen que el silenciament aberrant dels gens amb promotors hipermetilats va associat a la hipoacetilació de la lisina 16 en la histona H4 (H4K16), fet que va acompanyat de la presència de SirT1 sobre els promotors silenciats, molt probablement en el context del PRC4. La implicació de SirT1 en el silenciament de gens amb promotors hipermetilats ja havia estat mostrada prèviament en un model de CCR (Pruitt et al. 2006). SirT1 és un membre de la família de les Sirtuïnes, proteïnes identificades per la seva homologia amb la proteïna de llevat *silent information regulator 2* (Sir2), les quals pertanyen a la classe III de HDAC, dependents de NAD⁺ per la seva activitat (Revisat en (Vaquero et al. 2007)).

La implicació de SirT1 en la formació d'heterocromatina a través de la desacetilació de la H4K16 està ben documentada, així com la seva capacitat de promoure el silenciament transcripcional (Revisat en (Vaquero et al. 2007)), activitats amb conseqüències a nivell de replicació, reparació i recombinació (Revisat en (Blander and Guarente 2004)). Sorprenentment, estudis en llevat demostren que la sobreexpressió de SirT1 va associada a un increment del *lifespan* (període de vida) a través d'un increment del nombre de cicles de replicació del DNA que una cèl·lula pot afrontar abans d'entrar en senescència. Aquest efecte s'associa al requeriment de NAD⁺ per part de SirT1, fet que lliga l'activitat desacetilasa d'aquest enzim als nivells globals de NAD⁺ i per tant, a l'activitat metabòlica. Aquest efecte de SirT1 sobre la vida replicativa pot ser explicada a través de la restricció calòrica o CR (de l'anglès *caloric restriction*) la qual se sap que augmenta el *lifespan* des de llevats fins a mamífers a través de diferents mecanismes fisiològics i moleculars (Revisat en (Cohen et al. 2004; Guarente 2005)). Entre d'altres, la CR provoca un increment dels nivells de NAD⁺, els quals al seu torn incrementen l'activitat de SirT1, fet que s'associa a l'activació de mecanismes de supervivència com la inhibició de la senescència i apoptosi i l'activació de vies de senyalització en resposta a l'estrès (Revisat en (Vaquero et al. 2007)). A més a més, SirT1 inhibeix la diferenciació tant d'adipòcits com de cèl·lules musculars esquelètiques, les quals depenen en gran mesura del balanç de NAD⁺/NADH (Fulco et al. 2003; Picard et al. 2004). Aquests resultats mostren un clar paper de SirT1 en la regulació del *lifespan* replicatiu i la inhibició de la diferenciació, ambdós fenòmens lligats a l'envelliment i el càncer.

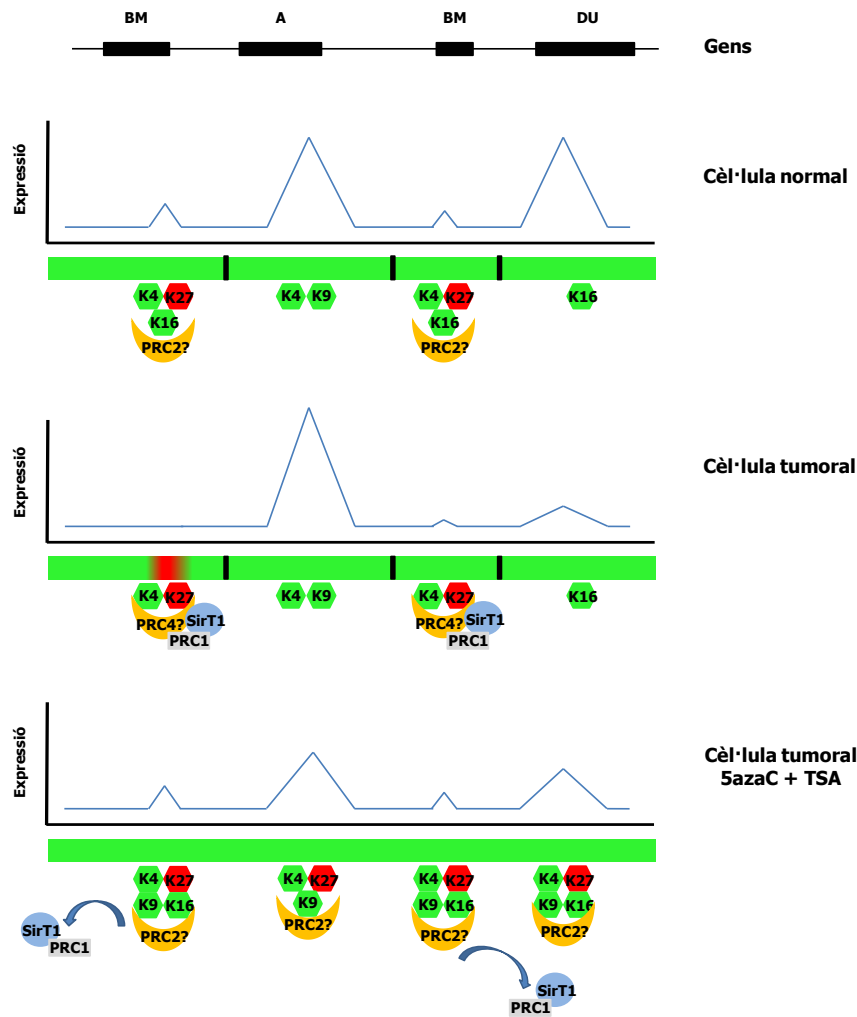


Figura 22. Model simplificat de silenciament en 5q35.2. El model presenta el comportament dels 3 tipus de gens descrits en la línia cel·lular HCT116: (BM, Bivalent methylated or methylable) gens amb promotors bivalents hipermetilats o hipermetilables en tumors i línies (DRD1, HRH2, CPLX2, AK124.837 i SNCB), (A, Active) gens actius (SFXN1, THOC3, RNF44 i TSPAN), i (DU, downregulated unmethylated) gens infraexpressats no metilats o sense illa CpG (CLTB i PCLKC). La barra horitzontal determina l'estat no metilatat (verd) o metilatat (vermell) de les illes CpG. La cèl·lula normal presenta gens actius (A i probablement DU) amb promotors enriquits per marques d'activació (K4me/Ac K9/Ac K16), els quals es troben dispersos entre gens inactius amb promotors bivalents (gens BM), probablement sota el control del PRC2. Elements aïllants (caixes negres verticals) mantindrien els diferents dominis separats. En la cèl·lula tumoral, la presència de metilació sobre la major part dels promotors bivalents provoca el silenciament del gen (BM) acompanyat del component del PRC1 BmiI i de la HDAC SirT1, la qual provoca la desaparició de Ac K16, possiblement en el context del PRC4. La infraexpressió també afecta gens DU, els quals no presenten marques de cromatina inactiva sobre el promotor. D'altra banda, els gens A mantenen les seves marques de cromatina i la seva activitat transcripcional es veu incrementada. L'ús de drogues desmetilants (5azaC) i inhibidors de HDAC (TSA) provoca la desaparició de la metilació del DNA i un increment global de l'acetilació Ac K9 en la regió. Tots els gens infraexpressats o silenciats en a cèl·lula tumoral (BM i DU) incrementen la seva expressió i guanyen Ac K16 de forma específica, tot i que els gens que tenien promotors bivalents no els perden. Aquesta reexpressió va acompanyada de la pèrdua de SirT1 i BmiI. En aquest punt, la possible pèrdua de les barreres que mantenen separats els diferents dominis provoca que marques d'inactivació de cromatina inactiva (K27me) s'estenguin als dominis actius adjacents (A) i sobre altres gens que no presentaven aquestes marques prèviament (DU). Així, la formació de dominis bivalents sobre els promotors de gens A en provoca la seva infraexpressió.

En aquest context, SirT1 és l'única sirtuïna que ha estat directament implicada en càncer, la qual juga un paper important a varis nivells. Aquesta HDAC s'ha trobat sobreexpressada en càncer, entre ells el CCR, fet que s'associa al silenciament transcripcional de gens supressors tumorals amb promotors hipermetilats, els quals es poden reexpressar per mitjà d'inhibidors específics de SirT1 com la esplitomicina (Pruitt et al. 2006). Podem especular que la restricció calòrica a la qual estan sotmesos els tumors abans de ser capaços de mantenir angiogènesi (Revisat en (Hanahan and Weinberg 2000)) podria jugar un paper causal en l'augment de l'activitat de SirT1 a través de la modulació del balanç entre NAD⁺/NADH. Tot i això, es coneix que el silenciament de HIC1, regulador negatiu de SirT1, a través de la hipermetilació del seu promotor provoca la sobreexpressió de SirT1 en tumors (Chen et al. 2005). De fet, la inactivació epigenètica d'un al·lel de HIC1 en la línia germinal de ratolí predisposa a un gran ventall de tumors malignes, en un procés depenent de l'edat (Chen et al. 2003).

Alguns dels gens silenciats per SirT1 estan directament implicats en un increment de les senyals de supervivència. És el cas dels gens SFRP, reprimits per SirT1 en CCR, fet que provoca un increment de l'activitat de la via de Wnt (Revisat en (Jones and Baylin 2007)). Tant p53 com NF-κB són desacetilats per SirT1, inhibint en el tumor l'entrada en senescència i l'apoptosi (Revisat en (Vaquero et al. 2007)). Estudis genòmics han permès identificar pèrdues globals d'acetilació de H4K16 en cèl·lules tumorals (Fraga et al. 2005), tot indicant que l'acció de SirT1 no queda reduïda a gens específics, sinó que també pot tenir efectes en l'arquitectura del genoma modulant els nivells globals d'acetilació de H4K16.

Nous coneixements, noves preguntes

Fa anys que coneixem que el càncer és manifesta com un problema de l'expressió gènica, creant patrons d'expressió aberrants que configuren fenotips capaços d'alterar l'homeostasi cel·lular. La recerca en plena era epigenètica ha proporcionat algunes respostes a les preguntes plantejades, però queda encara molt camí per fer.

Com ja hem dit anteriorment, l'era de l'anàlisi genètic ens ha proporcionat mapes precisos de la seqüència del DNA. D'altra banda, ens hem adonat que aquesta informació no és suficient per entendre com la cèl·lula restringeix l'accés a la informació per tal de produir els diferents patrons d'expressió que confereixen la identitat a cada tipus cel·lular. Així doncs, varem entrar en l'era de l'anàlisi epigenètic, en la qual encara ens trobem. En aquest sentit, la posada en marxa del projecte epigenoma humà (*Human Epigenome Project*, www.epigenome.org) (Bradbury 2003) representa una fita important per tal d'arribar en el futur al ple coneixement dels patrons de metilació normals i sobretot, com la seva desregulació contribueix a fenòmens com el càncer. Així, només per mitjà de la integració de la informació genètica i epigenètica, arribarem a entendre com el genoma es regulat i interpretat globalment. Fins ara però, la major part dels nostres esforços en el camp de l'epigenètica han anat enfocats a l'estudi de l'estat de metilació d'illes CpG i regions reguladores individuals, les quals conformen una fracció minoritària del genoma. Queda per explorar el compartiment genòmic més gran i desconegut a nivell epigenètic: el de les seqüències repetides disperses i les seqüències úniques fora de les regions reguladores. Ja hem vist al llarg d'aquesta tesi que la influència que aquest

compartiment pot tenir sobre la regulació gènica, l'arquitectura del genoma i la inducció de diverses malalties és important, i per tant s'hauran d'aplicar més esforços al seu estudi.

En aquest context, la disponibilitat de tècniques d'anàlisi de la metilació que siguin capaces de "veure-hi" més enllà de les regions reguladores normalment desmetilades és essencial en la caracterització dels patrons de metilació normals fora d'aquestes regions. Creiem que el desenvolupament i aplicació de tècniques senzilles com l'AUMA obren camí en el difícil estudi dels patrons de metilació en elements repetitius, camí que ens ha de conduir a la comprensió del complex joc que existeix entre aquests elements i la resta del genoma.

Els esforços realitzats fins ara ens han permès començar a veure l'abast de la metilació aberrant en tumors, però queda sense resposta el per què determinats gens es metilen el càncer i d'altres no, tot i que sabem de fa temps que gens de metiltransferases com la DNMT1 i DNMT3b es troben sobreexpressats en diferents tumors com el CCR (Revisat en (Esteller 2007; Issa 1999)). En aquest context, anàlisis genòmics a nivell global han permès identificar motius de DNA en illes CpG que o bé les protegeixen o bé en promouen la metilació (Feltus et al. 2006), fet que suggereix que l'estructura del DNA, a través de la seqüència primària, pot jugar un paper important en la generació de patrons de metilació. Un altre focus d'atenció en aquest camp és la possible relació entre la metilació aberrant d'illes CpG i la metilació de la lisina 27. En aquest context experiments recents indiquen que la metilació d'illes CpG amb nivells de metilació baixos o moderats depèn de la presència dels components del PRC2 EZH2 (McGarvey et al. 2007) i SUZ12 (Villa et al. 2007) en diferents models de càncer, tot i que la metilació d'illes fortament metilades no es veu afectada per la supressió de EZH2 (McGarvey et al. 2007). Així, experiments futurs hauran d'anar enfocats a aclarir la relació que existeix entre la maquinària de metilació del DNA i la maquinària de silenciament polycomb en la producció de patrons de metilació aberrants en càncer. Tot i això, s'han pogut caracteritzar a nivell molecular els perfils de cromatina que defineixen el silenciament transcripcional associat a la hipermetilació de promotors, arribant a la conclusió que aquests són molt semblants als de les cèl·lules mare. Potser, com s'ha suggerit, la metilació del DNA no té efectes reguladors de l'activitat transcripcional, sinó que només bloqueja un determinat estat epigenètic necessari per a l'expansió del tumor (Widschwendter et al. 2007).

L'aparició dels organismes pluricel·lulars planteja dos problemes bàsics relacionats: el control de la divisió cel·lular i la diferenciació. En aquests organismes, a partir d'una única cèl·lula totipotent es deriven, a través de la divisió i la diferenciació, els diferents llinatges cel·lulars que donaran lloc a l'individu adult. Comencem a entendre com aquests mecanismes regulen processos normals de diferenciació i desenvolupament, i ens comencem a adonar que el càncer, una malaltia lligada a l'edat i l'envelliment, potser no és més que un reflex de l'acumulació progressiva d'errors en els sistemes cel·lulars que han de vetllar pel manteniment de la identitat cel·lular.

CONCLUSIONS

Conclusions

1. Existeix una correlació estadísticament significativa entre el grau d'hipometilació, però no d'hipermetilació, i el nombre d'alteracions cromosòmiques numèriques i estructurals en càncer colorectal.
2. La hipometilació afecta l'estabilitat de tots els cromosomes, essent la selecció dins el tumor l'encarregada d'augmentar la freqüència de determinades alteracions.
3. La presència de mutacions en el gen p53 juga un paper permissiu en l'adquisició d'alteracions cromosòmiques, sense alterar-ne el grau de correlació amb la hipometilació.
4. El mètode AUMA és útil en la detecció d'elements Alu desmetilats en teixit normal i permet la identificació tant d'hipometilacions com hipermetilacions associades a aquests elements en cèl·lules tumorals. La banda hipometilada en tumors Aq3, la qual mapa en un intró del gen MYOM2, n'és un exemple. En aquesta regió, la hipometilació d'un element repetitiu Alu Y va acompanyada de pèrdues en els nivells de metilació de la lisina 9 en la histona H3.
5. El mètode QUMA permet la quantificació d'elements Alu desmetilats a nivell genòmic en cèl·lules normals i tumorals. Així hem determinat que una cèl·lula normal de l'epiteli colorectal conté al voltant de 25000 elements Alu desmetilats per genoma haploïd, els quals es distribueixen sobre tot al voltant de regions reguladores. D'altra banda, els elements Alu es desmetilen en cèl·lules de càncer colorectal, les quals acumulen al voltant de 42000 Alu's desmetilades.
6. La pressió per metilar elements Alu joves, entre els quals encara hi ha membres amb capacitat de transposició, és major que la pressió per metilar elements Alu més antics, entre els quals no hi ha membres actius en el genoma humà.
7. Hem identificat 8 noves illes CpG metilades en càncer colorectal, en una regió que s'estén al llarg de més de 1.2 Mb en la regió cromosòmica 5q35.2. La metilació d'aquestes illes s'associa al silenciament transcripcional dels gens associats.
8. Els gens amb promotors hipermetilats en 5q35.2 estan sota el control de dominis bivalents en cèl·lules tumorals. Trobem sobre els promotors dels gens silenciats la presència de EZH2, SirT1 i BmiI.
9. La reexpressió dels gens silenciats per mitjà de drogues desmetilants i inhibidors de HDAC no resol els dominis bivalents cap a dominis només enriquits per marques de cromatina activa.
10. L'ús de drogues desmetilants i inhibidors de HDAC té un efecte inhibidor de la transcripció sobre els gens actius en la regió 5q35.2, fet que va associat a la formació *de novo* de dominis bivalents.

Conclusions

1. There is a statistically significant correlation between the degree of hypomethylation, but not hypermethylation, and the number of numeric and structural chromosomal alterations in colorectal cancer.
2. Hypomethylation compromises the stability of all chromosomes, whose alteration frequency in the tumor depends on selection.
3. Mutations in the p53 gene do not affect the correlation between hypomethylation and chromosomal alterations, but rather play a permissive role in the acquisition of these alterations.
4. The AUMA method is useful in the detection of unmethylated Alu repeats in normal cells and allows the identification of Alu-associated hypomethylation and hypermethylation events in tumor cells. As an example, we have identified the hypomethylated sequence Aq3, mapping to an intron of the MYOM2 gene. In this region, the hypomethylation of an Alu Y element is associated to a depletion of the methylated lysine 9 in histone H3.
5. The QUMA method allows the quantification of unmethylated Alu elements in normal and tumor cells on the genomic scale. We have determined that a normal cell of the colorectal epithelium contains 25000 Alu's per haploid genome, mainly distributed around regulatory regions. On the other hand, Alu elements become demethylated in tumor cells, which accumulate around 42000 unmethylated Alu elements.
6. Pressure to keep young Alu elements methylated, which still contain members capable of retrotransposition, is higher than pressure to methylate older Alu elements, which do not contain any active member in the human genome.
7. We have identified 8 methylated CpG islands in colorectal cancer, in a region spanning over 1.2 Mb in genomic region 5q35.2. The methylated status of these islands correlates with transcriptional downregulation of the associated genes.
8. Genes across 5q35.2 with promoter DNA methylation are under the control of bivalent domains in tumor cells. We have detected the presence of EZH2, SirT1 and BmiI over the silenced promoters.
9. Bivalent domains do not resolve into an active chromatin conformation with active chromatin modifications upon gene reexpression with demethylating agents and HDAC inhibitors.
10. The use of demethylating agents and HDAC inhibitors has an inhibitory effect on the transcriptional activity of highly expressed genes across 5q35.2, which is associated to the *de novo* formation of bivalent domains.

BIBLIOGRAFIA

- Aaltonen, L.A., P. Peltomaki, F.S. Leach, P. Sistonen, L. Pylkkanen, J.P. Mecklin, H. Jarvinen, S.M. Powell, J. Jen, S.R. Hamilton et al. 1993. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260: 812-816.
- Adams, W.J., J.A. Lawson, and D.L. Morris. 1994. Cimetidine inhibits in vivo growth of human colon cancer and reverses histamine stimulated in vitro and in vivo growth. *Gut* 35: 1632-1636.
- Agalioti, T., G. Chen, and D. Thanos. 2002. Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell* 111: 381-392.
- Agalioti, T., S. Lomvardas, B. Parekh, J. Yie, T. Maniatis, and D. Thanos. 2000. Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell* 103: 667-678.
- Allfrey, V.G., R. Faulkner, and A.E. Mirsky. 1964. Acetylation And Methylation Of Histones And Their Possible Role In The Regulation Of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51: 786-794.
- Armitage, J.O. and R.D. Sidner. 1979. Antitumour effect of cimetidine. *Lancet* 1: 882-883.
- Bannister, A.J., P. Zegerman, J.F. Partridge, E.A. Miska, J.O. Thomas, R.C. Allshire, and T. Kouzarides. 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410: 120-124.
- Barski, A., S. Cuddapah, K. Cui, T.Y. Roh, D.E. Schones, Z. Wang, G. Wei, I. Chepelev, and K. Zhao. 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129: 823-837.
- Basu, S. and P.S. Dasgupta. 1999. Decreased dopamine receptor expression and its second-messenger cAMP in malignant human colon tissue. *Dig Dis Sci* 44: 916-921.
- Batzer, M.A. and P.L. Deininger. 2002. Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet* 3: 370-379.
- Baylin, S.B. 2005. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2 Suppl 1: S4-11.
- Baylin, S.B., E.R. Fearon, B. Vogelstein, A. de Bustros, S.J. Sharkis, P.J. Burke, S.P. Staal, and B.D. Nelkin. 1987. Hypermethylation of the 5' region of the calcitonin gene is a property of human lymphoid and acute myeloid malignancies. *Blood* 70: 412-417.
- Bell, A.C. and G. Felsenfeld. 2000. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* 405: 482-485.
- Bernstein, B.E., E.L. Humphrey, R.L. Erlich, R. Schneider, P. Bouman, J.S. Liu, T. Kouzarides, and S.L. Schreiber. 2002. Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 8695-8700.

- Bernstein, B.E., M. Kamal, K. Lindblad-Toh, S. Bekiranov, D.K. Bailey, D.J. Huebert, S. McMahon, E.K. Karlsson, E.J. Kulbokas, 3rd, T.R. Gingeras et al. 2005. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* 120: 169-181.
- Bernstein, B.E., T.S. Mikkelsen, X. Xie, M. Kamal, D.J. Huebert, J. Cuff, B. Fry, A. Meissner, M. Wernig, K. Plath et al. 2006. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125: 315-326.
- Bestor, T.H. and V.M. Ingram. 1983. Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 5559-5563.
- Bhattacharya, S.K., S. Ramchandani, N. Cervoni, and M. Szyf. 1999. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 397: 579-583.
- Bienvu, T. and J. Chelly. 2006. Molecular genetics of Rett syndrome: when DNA methylation goes unrecognized. *Nat Rev Genet* 7: 415-426.
- Bird, A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16: 6-21.
- Bird, A.P. 1978. Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: II. The symmetry of methylated sites supports semi-conservative copying of the methylation pattern. *J Mol Biol* 118: 49-60.
- Bird, A.P. 1980. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res* 8: 1499-1504.
- Blander, G. and L. Guarente. 2004. The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem* 73: 417-435.
- Blenkiron, C. and E.A. Miska. 2007. miRNAs in cancer: approaches, aetiology, diagnostics and therapy. *Hum Mol Genet* 16 Spec No 1: R106-113.
- Boeke, J., O. Ammerpohl, S. Kegel, U. Moehren, and R. Renkawitz. 2000. The minimal repression domain of MBD2b overlaps with the methyl-CpG-binding domain and binds directly to Sin3A. *J Biol Chem* 275: 34963-34967.
- Boveri, T. 1929. The origin of malignant tumors. *Williams and Wilkins*.
- Bracken, A.P., D. Pasini, M. Capra, E. Prosperini, E. Colli, and K. Helin. 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.
- Brohede, J. and K.N. Rand. 2006. Evolutionary evidence suggests that CpG island-associated Alus are frequently unmethylated in human germline. *Hum Genet* 119: 457-458.

- Brownell, J.E., J. Zhou, T. Ranalli, R. Kobayashi, D.G. Edmondson, S.Y. Roth, and C.D. Allis. 1996. Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84: 843-851.
- Bruening, W., B.I. Giasson, A.J. Klein-Szanto, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski, and A.K. Godwin. 2000. Synucleins are expressed in the majority of breast and ovarian carcinomas and in preneoplastic lesions of the ovary. *Cancer* 88: 2154-2163.
- Brunstein, F., S. Hoving, A.L. Seynhaeve, S.T. van Tiel, G. Guetens, E.A. de Bruijn, A.M. Eggermont, and T.L. ten Hagen. 2004. Synergistic antitumor activity of histamine plus melphalan in isolated limb perfusion: preclinical studies. *J Natl Cancer Inst* 96: 1603-1610.
- Burtin, C., P. Scheinmann, J.C. Salomon, G. Lespinats, and P. Canu. 1982. Decrease in tumour growth by injections of histamine or serotonin in fibrosarcoma-bearing mice: influence of H1 and H2 histamine receptors. *Br J Cancer* 45: 54-60.
- Cadioux, B., T.T. Ching, S.R. Vandenberg, and J.F. Costello. 2006. Genome-wide Hypomethylation in Human Glioblastomas Associated with Specific Copy Number Alteration, Methylenetetrahydrofolate Reductase Allele Status, and Increased Proliferation. *Cancer Res* 66: 8469-8476.
- Cahill, D.P., K.W. Kinzler, B. Vogelstein, and C. Lengauer. 1999. Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol* 9: M57-60.
- Cao, R., L. Wang, H. Wang, L. Xia, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, R.S. Jones, and Y. Zhang. 2002. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 298: 1039-1043.
- Cao, R. and Y. Zhang. 2004. The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr Opin Genet Dev* 14: 155-164.
- Cervoni, N., S. Bhattacharya, and M. Szyf. 1999. DNA demethylase is a processive enzyme. *J Biol Chem* 274: 8363-8366.
- Cervoni, N. and M. Szyf. 2001. Demethylase activity is directed by histone acetylation. *J Biol Chem* 276: 40778-40787.
- Chalitchagorn, K., S. Shuangshoti, N. Hourpai, N. Kongruttanachok, P. Tangkijvanich, D. Thongngam, N. Voravud, V. Sriuranpong, and A. Mutirangura. 2004. Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. *Oncogene* 23: 8841-8846.
- Chen, L.T., A.G. Gilman, and T. Kozasa. 1999. A candidate target for G protein action in brain. *J Biol Chem* 274: 26931-26938.
- Chen, R.Z., U. Pettersson, C. Beard, L. Jackson-Grusby, and R. Jaenisch. 1998. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 395: 89-93.

- Chen, W.Y., D.H. Wang, R.C. Yen, J. Luo, W. Gu, and S.B. Baylin. 2005. Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* 123: 437-448.
- Chen, W.Y., X. Zeng, M.G. Carter, C.N. Morrell, R.W. Chiu Yen, M. Esteller, D.N. Watkins, J.G. Herman, J.L. Mankowski, and S.B. Baylin. 2003. Heterozygous disruption of Hic1 predisposes mice to a gender-dependent spectrum of malignant tumors. *Nat Genet* 33: 197-202.
- Choi, I.S., M.R. Estecio, Y. Nagano, H. Kim do, J.A. White, J.C. Yao, J.P. Issa, and A. Rashid. 2007. Hypomethylation of LINE-1 and Alu in well-differentiated neuroendocrine tumors (pancreatic endocrine tumors and carcinoid tumors). *Mod Pathol* 20: 802-810.
- Clark, S.J., J. Harrison, C.L. Paul, and M. Frommer. 1994. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 22: 2990-2997.
- Cohen, H.Y., C. Miller, K.J. Bitterman, N.R. Wall, B. Hekking, B. Kessler, K.T. Howitz, M. Gorospe, R. de Cabo, and D.A. Sinclair. 2004. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 305: 390-392.
- International Human Genome Sequence Consortium. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431: 931-945.
- Cottrell, S.E. 2004. Molecular diagnostic applications of DNA methylation technology. *Clin Biochem* 37: 595-604.
- Cross, S.H. and A.P. Bird. 1995. CpG islands and genes. *Curr Opin Genet Dev* 5: 309-314.
- Czermin, B., R. Melfi, D. McCabe, V. Seitz, A. Imhof, and V. Pirrotta. 2002. Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* 111: 185-196.
- De Santa, F., M.G. Totaro, E. Prosperini, S. Notarbartolo, G. Testa, and G. Natoli. 2007. The Histone H3 Lysine-27 Demethylase Jmjd3 Links Inflammation to Inhibition of Polycomb-Mediated Gene Silencing. *Cell* 130: 1083-1094.
- De Smet, C., O. De Backer, I. Faraoni, C. Lurquin, F. Brasseur, and T. Boon. 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.
- Deininger, P.L. and M.A. Batzer. 1999. Alu repeats and human disease. *Mol Genet Metab* 67: 183-193.
- Delaval, K. and R. Feil. 2004. Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Curr Opin Genet Dev* 14: 188-195.
- Dhalluin, C., J.E. Carlson, L. Zeng, C. He, A.K. Aggarwal, and M.M. Zhou. 1999. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399: 491-496.

- Dion, M.F., S.J. Altschuler, L.F. Wu, and O.J. Rando. 2005. Genomic characterization reveals a simple histone H4 acetylation code. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 5501-5506.
- Dizik, M., J.K. Christman, and E. Wainfan. 1991. Alterations in expression and methylation of specific genes in livers of rats fed a cancer promoting methyl-deficient diet. *Carcinogenesis* 12: 1307-1312.
- Duensing, A. and S. Duensing. 2005. Guilt by association? p53 and the development of aneuploidy in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 331: 694-700.
- Durrin, L.K., R.K. Mann, P.S. Kayne, and M. Grunstein. 1991. Yeast histone H4 N-terminal sequence is required for promoter activation in vivo. *Cell* 65: 1023-1031.
- Eads, C.A., K.D. Danenberg, K. Kawakami, L.B. Saltz, C. Blake, D. Shibata, P.V. Danenberg, and P.W. Laird. 2000. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 28: E32.
- Easwaran, H.P., L. Schermelleh, H. Leonhardt, and M.C. Cardoso. 2004. Replication-independent chromatin loading of Dnmt1 during G2 and M phases. *EMBO Rep* 5: 1181-1186.
- Eden, A., F. Gaudet, A. Waghmare, and R. Jaenisch. 2003. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 300: 455.
- Eden, S., T. Hashimshony, I. Keshet, H. Cedar, and A.W. Thorne. 1998. DNA methylation models histone acetylation. *Nature* 394: 842.
- Ehrlich, M. 2002. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 21: 5400-5413.
- Ehrlich, M., M.A. Gama-Sosa, L.H. Huang, R.M. Midgett, K.C. Kuo, R.A. McCune, and C. Gehrke. 1982. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res* 10: 2709-2721.
- Espada, J., E. Ballestar, M.F. Fraga, A. Villar-Garea, A. Juarranz, J.C. Stockert, K.D. Robertson, F. Fuks, and M. Esteller. 2004. Human DNA methyltransferase 1 is required for maintenance of the histone H3 modification pattern. *J Biol Chem* 279: 37175-37184.
- Estecio, M.R., V. Gharibyan, L. Shen, A.E. Ibrahim, K. Doshi, R. He, J. Jelinek, A.S. Yang, P.S. Yan, T.H. Huang et al. 2007. LINE-1 Hypomethylation in Cancer Is Highly Variable and Inversely Correlated with Microsatellite Instability. *PLoS ONE* 2: e399.
- Esteller, M. 2007. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 8: 286-298.
- Fearon, E.R. and P.A. Jones. 1992. Progressing toward a molecular description of colorectal cancer development. *Faseb J* 6: 2783-2790.
- Fearon, E.R. and B. Vogelstein. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767.

- Feinberg, A.P. 2007. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* 447: 433-440.
- Feinberg, A.P., C.W. Gehrke, K.C. Kuo, and M. Ehrlich. 1988. Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. *Cancer Res* 48: 1159-1161.
- Feinberg, A.P. and B. Tycko. 2004. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 4: 143-153.
- Feinberg, A.P. and B. Vogelstein. 1983a. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301: 89-92.
- Feinberg, A.P. and B. Vogelstein. 1983b. Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 111: 47-54.
- Felsenfeld, G. and M. Groudine. 2003. Controlling the double helix. *Nature* 421: 448-453.
- Feltus, F.A., E.K. Lee, J.F. Costello, C. Plass, and P.M. Vertino. 2006. DNA motifs associated with aberrant CpG island methylation. *Genomics* 87: 572-579.
- Floyd, S. and P. De Camilli. 1998. Endocytosis proteins and cancer: a potential link? *Trends Cell Biol* 8: 299-301.
- Fodde, R., R. Smits, and H. Clevers. 2001. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 1: 55-67.
- Fraga, M.F., E. Ballestar, A. Villar-Garea, M. Boix-Chornet, J. Espada, G. Schotta, T. Bonaldi, C. Haydon, S. Ropero, K. Petrie et al. 2005. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* 37: 391-400.
- Freemont, P.S., I.M. Hanson, and J. Trowsdale. 1991. A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell* 64: 483-484.
- Frigola, J., M. Munoz, S.J. Clark, V. Moreno, G. Capella, and M.A. Peinado. 2005a. Hypermethylation of the prostacyclin synthase (PTGIS) promoter is a frequent event in colorectal cancer and associated with aneuploidy. *Oncogene* 24: 7320-7326.
- Frigola, J., M. Ribas, R.A. Risques, and M.A. Peinado. 2002. Methylome profiling of cancer cells by amplification of inter-methylated sites (AIMS). *Nucleic Acids Res* 30: e28.
- Frigola, J., X. Sole, M.F. Paz, V. Moreno, M. Esteller, G. Capella, and M.A. Peinado. 2005b. Differential DNA hypermethylation and hypomethylation signatures in colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 14: 319-326.
- Frigola, J., J. Song, C. Stirzaker, R.A. Hinshelwood, M.A. Peinado, and S.J. Clark. 2006. Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nat Genet* 38: 540-549.
- Friso, S. and S.W. Choi. 2002. Gene-nutrient interactions and DNA methylation. *J Nutr* 132: 2382S-2387S.

- Fulco, M., R.L. Schiltz, S. Iezzi, M.T. King, P. Zhao, Y. Kashiwaya, E. Hoffman, R.L. Veech, and V. Sartorelli. 2003. Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Mol Cell* 12: 51-62.
- Fung, K.M., L.B. Rorke, B. Giasson, V.M. Lee, and J.Q. Trojanowski. 2003. Expression of alpha-, beta-, and gamma-synuclein in glial tumors and medulloblastomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 106: 167-175.
- Furano, A.V., S.M. Robb, and F.T. Robb. 1988. The structure of the regulatory region of the rat L1 (L1Rn, long interspersed repeated) DNA family of transposable elements. *Nucleic Acids Res* 16: 9215-9231.
- Gama-Sosa, M.A., V.A. Slagel, R.W. Trewyn, R. Oxenhandler, K.C. Kuo, C.W. Gehrke, and M. Ehrlich. 1983a. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res* 11: 6883-6894.
- Gama-Sosa, M.A., R.Y. Wang, K.C. Kuo, C.W. Gehrke, and M. Ehrlich. 1983b. The 5-methylcytosine content of highly repeated sequences in human DNA. *Nucleic Acids Res* 11: 3087-3095.
- Gardiner-Garden, M. and M. Frommer. 1987. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196: 261-282.
- Gaudet, F., J.G. Hodgson, A. Eden, L. Jackson-Grusby, J. Dausman, J.W. Gray, H. Leonhardt, and R. Jaenisch. 2003. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 300: 489-492.
- Geiman, T.M., L. Tessarollo, M.R. Anver, J.B. Kopp, J.M. Ward, and K. Muegge. 2001. Lsh, a SNF2 family member, is required for normal murine development. *Biochim Biophys Acta* 1526: 211-220.
- George, J.M. 2002. The synucleins. *Genome Biol* 3: REVIEWS3002.
- Gifford, R.R., R.M. Ferguson, and B.V. Voss. 1981. Cimetidine reduction of tumour formation in mice. *Lancet* 1: 638-640.
- Glozak, M.A., N. Sengupta, X. Zhang, and E. Seto. 2005. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 363: 15-23.
- Goel, A., C.N. Arnold, D. Niedzwiecki, D.K. Chang, L. Ricciardiello, J.M. Carethers, J.M. Dowell, L. Wasserman, C. Compton, R.J. Mayer et al. 2003. Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res* 63: 1608-1614.
- Goll, M.G. and T.H. Bestor. 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 74: 481-514.
- Gonzalo, S., I. Jaco, M.F. Fraga, T. Chen, E. Li, M. Esteller, and M.A. Blasco. 2006. DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 8: 416-424.

- Gowher, H., O. Leismann, and A. Jeltsch. 2000. DNA of *Drosophila melanogaster* contains 5-methylcytosine. *Embo J* 19: 6918-6923.
- Grewal, S.I. and S. Jia. 2007. Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet* 8: 35-46.
- Grossniklaus, U. and R. Paro. 2007. Transcriptinal silencing by polycomb group proteins. *Epigenetics* Cold Spring Harbor laboratory press, Cold Spring Harbor, New York
- Guarente, L. 2005. Calorie restriction and SIR2 genes--towards a mechanism. *Mech Ageing Dev* 126: 923-928.
- Hall, I.M., G.D. Shankaranarayana, K. Noma, N. Ayoub, A. Cohen, and S.I. Grewal. 2002. Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science* 297: 2232-2237.
- Hanahan, D. and R.A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Hansen, R.S., C. Wijmenga, P. Luo, A.M. Stanek, T.K. Canfield, C.M. Weemaes, and S.M. Gartler. 1999. The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14412-14417.
- Hark, A.T., C.J. Schoenherr, D.J. Katz, R.S. Ingram, J.M. Levorse, and S.M. Tilghman. 2000. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* 405: 486-489.
- Hashimoto, M., E. Rockenstein, M. Mante, M. Mallory, and E. Masliah. 2001. beta-Synuclein inhibits alpha-synuclein aggregation: a possible role as an anti-parkinsonian factor. *Neuron* 32: 213-223.
- Hata, K. and Y. Sakaki. 1997. Identification of critical CpG sites for repression of L1 transcription by DNA methylation. *Gene* 189: 227-234.
- Hayashi, H., G. Nagae, S. Tsutsumi, K. Kaneshiro, T. Kozaki, A. Kaneda, H. Sugisaki, and H. Aburatani. 2007. High-resolution mapping of DNA methylation in human genome using oligonucleotide tiling array. *Hum Genet* 120: 701-711.
- Hayashizaki, Y., S. Hirotsune, Y. Okazaki, I. Hatada, H. Shibata, J. Kawai, K. Hirose, S. Watanabe, S. Fushiki, S. Wada 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.
- Hebbes, T.R., A.W. Thorne, A.L. Clayton, and C. Crane-Robinson. 1992. Histone acetylation and globin gene switching. *Nucleic Acids Res* 20: 1017-1022.
- Hebbes, T.R., A.W. Thorne, and C. Crane-Robinson. 1988. A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *Embo J* 7: 1395-1402.
- Hellman, A. and A. Chess. 2007. Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science* 315: 1141-1143.

- Hellmann-Blumberg, U., M.F. Hintz, J.M. Gatewood, and C.W. Schmid. 1993. Developmental differences in methylation of human Alu repeats. *Mol Cell Biol* 13: 4523-4530.
- Hendrich, B. and S. Tweedie. 2003. The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals. *Trends Genet* 19: 269-277.
- Herman, J.G. and S.B. Baylin. 2003. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349: 2042-2054.
- Herman, J.G., J.R. Graff, S. Myohanen, B.D. Nelkin, and S.B. Baylin. 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., A. Umar, K. Polyak, J.R. Graff, N. Ahuja, J.P. Issa, S. Markowitz, J.K. Willson, S.R. Hamilton, K.W. Kinzler et al. 1998. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6870-6875.
- Hitchins, M.P., V.A. Lin, A. Buckle, K. Cheong, N. Halani, S. Ku, C.T. Kwok, D. Packham, C.M. Suter, A. Meagher et al. 2007. Epigenetic Inactivation of a Cluster of Genes Flanking MLH1 in Microsatellite-Unstable Colorectal Cancer. *Cancer Res* 67: 9107-9116.
- Holliday, R. and J.E. Pugh. 1975. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 187: 226-232.
- Hori, T.A. 1983. Induction of chromosome decondensation, sister-chromatid exchanges and endoreduplications by 5-azacytidine, an inhibitor of DNA methylation. *Mutat Res* 121: 47-52.
- Houck, C.M., F.P. Rinehart, and C.W. Schmid. 1979. A ubiquitous family of repeated DNA sequences in the human genome. *J Mol Biol* 132: 289-306.
- Huertas, P. and A. Aguilera. 2003. Cotranscriptionally formed DNA:RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination. *Mol Cell* 12: 711-721.
- Ionov, Y., M.A. Peinado, S. Malkhosyan, D. Shibata, and M. Perucho. 1993. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363: 558-561.
- Issa, J.P. 1999. Aging, DNA methylation and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 32: 31-43.
- Jackson, J.P., A.M. Lindroth, X. Cao, and S.E. Jacobsen. 2002. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* 416: 556-560.
- Jaenisch, R. and A. Bird. 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 Suppl: 245-254.
- Jallepalli, P.V. and C. Lengauer. 2001. Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. *Nat Rev Cancer* 1: 109-117.

- Jeanpierre, M., C. Turleau, A. Aurias, M. Prieur, F. Ledest, A. Fischer, and E. Viegas-Pequignot. 1993. An embryonic-like methylation pattern of classical satellite DNA is observed in ICF syndrome. *Hum Mol Genet* 2: 731-735.
- Jenuwein, T. and C.D. Allis. 2001. Translating the histone code. *Science* 293: 1074-1080.
- Jeppesen, P. and B.M. Turner. 1993. The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell* 74: 281-289.
- Ji, W., R. Hernandez, X.Y. Zhang, G.Z. Qu, A. Frady, M. Varela, and M. Ehrlich. 1997. DNA demethylation and pericentromeric rearrangements of chromosome 1. *Mutat Res* 379: 33-41.
- Jones, P.A. and S.B. Baylin. 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3: 415-428.
- Jones, P.A. and S.B. Baylin. 2007. The epigenomics of cancer. *Cell* 128: 683-692.
- Jones, P.A. and P.W. Laird. 1999. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 21: 163-167.
- Jones, P.L., G.J. Veenstra, P.A. Wade, D. Vermaak, S.U. Kass, N. Landsberger, J. Strouboulis, and A.P. Wolffe. 1998. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19: 187-191.
- Jorgensen, H.F. and A. Bird. 2002. MeCP2 and other methyl-CpG binding proteins. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 8: 87-93.
- Josse, J., A.D. Kaiser, and A. Kornberg. 1961. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. VIII. Frequencies of nearest neighbor base sequences in deoxyribonucleic acid. *J Biol Chem* 236: 864-875.
- Jurgens, B., B.J. Schmitz-Drager, and W.A. Schulz. 1996. Hypomethylation of L1 LINE sequences prevailing in human urothelial carcinoma. *Cancer Res* 56: 5698-5703.
- Karpf, A.R. and S. Matsui. 2005. Genetic disruption of cytosine DNA methyltransferase enzymes induces chromosomal instability in human cancer cells. *Cancer Res* 65: 8635-8639.
- Kass, S.U., N. Landsberger, and A.P. Wolffe. 1997. DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr Biol* 7: 157-165.
- Kawasaki, H. and K. Taira. 2004. Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature* 431: 211-217.
- Keshet, I., Y. Schlesinger, S. Farkash, E. Rand, M. Hecht, E. Segal, E. Pikarski, R.A. Young, A. Niveleau, H. Cedar et al. 2006. Evidence for an instructive mechanism of de novo methylation in cancer cells. *Nat Genet* 38: 149-153.
- Kinzler, K.W. and B. Vogelstein. 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87: 159-170.

- Kleer, C.G., Q. Cao, S. Varambally, R. Shen, I. Ota, S.A. Tomlins, D. Ghosh, R.G. Sewalt, A.P. Otte, D.F. Hayes 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.
- Knudson, A.G. 2001. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 1: 157-162.
- Kochanek, S., D. Renz, and W. Doerfler. 1993. DNA methylation in the Alu sequences of diploid and haploid primary human cells. *Embo J* 12: 1141-1151.
- Kondo, Y. and J.P. Issa. 2003. Enrichment for histone H3 lysine 9 methylation at Alu repeats in human cells. *J Biol Chem* 278: 27658-27662.
- Kornberg, R.D. and Y. Lorch. 1999. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98: 285-294.
- Kornberg, R.D. and J.O. Thomas. 1974. Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science* 184: 865-868.
- Kouzarides, T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* 128: 693-705.
- Kouzarides, T. and S.L. Berger. 2007. Chromatin Modifications and their mechanisms of action. *Epigenetics* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York: 191-209.
- Koyuncuoglu, M., A. Kargi, S. Cingoz, and Z. Kirkali. 1998. Investigation of p53, c-erbB-2, PCNA immunoreactivity, DNA content, AgNOR and apoptosis in bladder carcinoma as prognostic parameters. *Cancer Lett* 126: 143-148.
- Kuzmichev, A., T. Jenuwein, P. Tempst, and D. Reinberg. 2004. Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3. *Mol Cell* 14: 183-193.
- Kuzmichev, A., R. Margueron, A. Vaquero, T.S. Preissner, M. Scher, A. Kirmizis, X. Ouyang, N. Brockdorff, C. Abate-Shen, P. Farnham et al. 2005. Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 1859-1864.
- Kuzmichev, A., K. Nishioka, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and D. Reinberg. 2002. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev* 16: 2893-2905.
- Lachner, M., D. O'Carroll, S. Rea, K. Mechtler, and T. Jenuwein. 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410: 116-120.
- Laird, P.W., L. Jackson-Grusby, A. Fazeli, S.L. Dickinson, W.E. Jung, E. Li, R.A. Weinberg, and R. Jaenisch. 1995. Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell* 81: 197-205.

- Lan, F., P.E. Bayliss, J.L. Rinn, J.R. Whetstine, J.K. Wang, S. Chen, S. Iwase, R. Alpatov, I. Issaeva, E. Canaani et al. 2007. A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development. *Nature*.
- Lander, E.S. L.M. Linton B. Birren C. Nusbaum M.C. Zody J. Baldwin K. Devon K. Dewar M. Doyle W. FitzHugh et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.
- Lapeyre, J.N. and F.F. Becker. 1979. 5-Methylcytosine content of nuclear DNA during chemical hepatocarcinogenesis and in carcinomas which result. *Biochem Biophys Res Commun* 87: 698-705.
- Lee, M.G., R. Villa, P. Trojer, J. Norman, K.P. Yan, D. Reinberg, L. Di Croce, and R. Shiekhattar. 2007. Demethylation of H3K27 Regulates Polycomb Recruitment and H2A Ubiquitination. *Science*.
- Lengauer, C., K.W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1997. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 386: 623-627.
- Leonhardt, H., A.W. Page, H.U. Weier, and T.H. Bestor. 1992. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* 71: 865-873.
- Li, E., T.H. Bestor, and R. Jaenisch. 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69: 915-926.
- Li, E. and A. Bird. 2007. DNA methylation in mammals. *Epigenetics* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York: 341-356.
- Li, L. and L.S. Chin. 2003. The molecular machinery of synaptic vesicle exocytosis. *Cell Mol Life Sci* 60: 942-960.
- Lindahl, T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709-715.
- Loeb, L.A. 1991. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 51: 3075-3079.
- Lopatina, N., J.F. Haskell, L.G. Andrews, J.C. Poole, S. Saldanha, and T. Tollefsbol. 2002. Differential maintenance and de novo methylating activity by three DNA methyltransferases in aging and immortalized fibroblasts. *J Cell Biochem* 84: 324-334.
- Lyko, F., B.H. Ramsahoye, and R. Jaenisch. 2000. DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 408: 538-540.
- Markowitz, S., J. Wang, L. Myeroff, R. Parsons, L. Sun, J. Lutterbaugh, R.S. Fan, E. Zborowska, K.W. Kinzler, B. Vogelstein et al. 1995. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268: 1336-1338.
- Martin, C. and Y. Zhang. 2005. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 838-849.

- Matsuzaki, K., G. Deng, H. Tanaka, S. Kakar, S. Miura, and Y.S. Kim. 2005. The relationship between global methylation level, loss of heterozygosity, and microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 11: 8564-8569.
- Mayer, W., A. Niveleau, J. Walter, R. Fundele, and T. Haaf. 2000. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 403: 501-502.
- McGarvey, K.M., E. Greene, J.A. Fahrner, T. Jenuwein, and S.B. Baylin. 2007. DNA methylation and complete transcriptional silencing of cancer genes persist after depletion of EZH2. *Cancer Res* 67: 5097-5102.
- McNiven, M.A. and H.M. Thompson. 2006. Vesicle formation at the plasma membrane and trans-Golgi network: the same but different. *Science* 313: 1591-1594.
- Meehan, R.R., J.D. Lewis, S. McKay, E.L. Kleiner, and A.P. Bird. 1989. Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell* 58: 499-507.
- Mighell, A.J., A.F. Markham, and P.A. Robinson. 1997. Alu sequences. *FEBS Lett* 417: 1-5.
- Mikkelsen, T.S., M. Ku, D.B. Jaffe, B. Issac, E. Lieberman, G. Giannoukos, P. Alvarez, W. Brockman, T.K. Kim, R.P. Koche et al. 2007. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 448: 553-560.
- Miniou, P., M. Jeanpierre, V. Blanquet, V. Sibella, D. Bonneau, C. Herbelin, A. Fischer, A. Niveleau, and E. Viegas-Pequignot. 1994. Abnormal methylation pattern in constitutive and facultative (X inactive chromosome) heterochromatin of ICF patients. *Hum Mol Genet* 3: 2093-2102.
- Morales, C., M. Ribas, G. Aiza, and M.A. Peinado. 2005. Genetic determinants of methotrexate responsiveness and resistance in colon cancer cells. *Oncogene* 24: 6842-6847.
- Morris, K.V., S.W. Chan, S.E. Jacobsen, and D.J. Looney. 2004. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science* 305: 1289-1292.
- Mukhopadhyay, R., W. Yu, J. Whitehead, J. Xu, M. Lezcano, S. Pack, C. Kanduri, M. Kanduri, V. Ginjala, A. Vostrov et al. 2004. The binding sites for the chromatin insulator protein CTCF map to DNA methylation-free domains genome-wide. *Genome Res* 14: 1594-1602.
- Muller, J., C.M. Hart, N.J. Francis, M.L. Vargas, A. Sengupta, B. Wild, E.L. Miller, M.B. O'Connor, R.E. Kingston, and J.A. Simon. 2002. Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell* 111: 197-208.
- Nakata, H. and T. Kozasa. 2005. Functional characterization of Galphao signaling through G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1. *Mol Pharmacol* 67: 695-702.
- Nan, X., H.H. Ng, C.A. Johnson, C.D. Laherty, B.M. Turner, R.N. Eisenman, and A. Bird. 1998. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393: 386-389.

- Narayan, A., W. Ji, X.Y. Zhang, A. Marrogi, J.R. Graff, S.B. Baylin, and M. Ehrlich. 1998. Hypomethylation of pericentromeric DNA in breast adenocarcinomas. *Int J Cancer* 77: 833-838.
- Ng, H.H., Y. Zhang, B. Hendrich, C.A. Johnson, B.M. Turner, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, D. Reinberg, and A. Bird. 1999. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet* 23: 58-61.
- Nielsen, S.J., R. Schneider, U.M. Bauer, A.J. Bannister, A. Morrison, D. O'Carroll, R. Firestein, M. Cleary, T. Jenuwein, R.E. Herrera et al. 2001. Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* 412: 561-565.
- Nowell, P.C. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194: 23-28.
- Nur, I., E. Pascale, and A.V. Furano. 1988. The left end of rat L1 (L1Rn, long interspersed repeated) DNA which is a CpG island can function as a promoter. *Nucleic Acids Res* 16: 9233-9251.
- Ohm, J.E., K.M. McGarvey, X. Yu, L. Cheng, K.E. Schuebel, L. Cope, H.P. Mohammad, W. Chen, V.C. Daniel, W. Yu et al. 2007. A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat Genet* 39: 237-242.
- Okano, M., D.W. Bell, D.A. Haber, and E. Li. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99: 247-257.
- Okano, M., S. Xie, and E. Li. 1998a. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 19: 219-220.
- Okano, M., S. Xie, and E. Li. 1998b. Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 26: 2536-2540.
- Okazaki, N., N. Takahashi, S. Kojima, Y. Masuho, and H. Koga. 2002. Protocadherin LKC, a new candidate for a tumor suppressor of colon and liver cancers, its association with contact inhibition of cell proliferation. *Carcinogenesis* 23: 1139-1148.
- Pan, G., S. Tian, J. Nie, C. Yang, V. Ruotti, H. Wei, G.A. Jonsdottir, R. Stewart, and J.A. Thomson. 2007. Whole-genome analysis of histone H3 lysine 4 and lysine 27 methylation in human embryonic stem cells. *Cell stem cell* 1: 299-312.
- Parsons, R., L.L. Myeroff, B. Liu, J.K. Willson, S.D. Markowitz, K.W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1995. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res* 55: 5548-5550.
- Pearson, J.C., D. Lemons, and W. McGinnis. 2005. Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nat Rev Genet* 6: 893-904.

- Peters, A.H., S. Kubicek, K. Mechtler, R.J. O'Sullivan, A.A. Derijck, L. Perez-Burgos, A. Kohlmaier, S. Opravil, M. Tachibana, Y. Shinkai et al. 2003. Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell* 12: 1577-1589.
- Picard, F., M. Kurtev, N. Chung, A. Topark-Ngarm, T. Senawong, R. Machado De Oliveira, M. Leid, M.W. McBurney, and L. Guarente. 2004. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 429: 771-776.
- Pokholok, D.K., C.T. Harbison, S. Levine, M. Cole, N.M. Hannett, T.I. Lee, G.W. Bell, K. Walker, P.A. Rolfe, E. Herbolsheimer et al. 2005. Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* 122: 517-527.
- Pruitt, K., R.L. Zinn, J.E. Ohm, K.M. McGarvey, S.H. Kang, D.N. Watkins, J.G. Herman, and S.B. Baylin. 2006. Inhibition of SIRT1 reactivates silenced cancer genes without loss of promoter DNA hypermethylation. *PLoS Genet* 2: e40.
- Qu, G.Z., P.E. Grundy, A. Narayan, and M. Ehrlich. 1999. Frequent hypomethylation in Wilms tumors of pericentromeric DNA in chromosomes 1 and 16. *Cancer Genet Cytogenet* 109: 34-39.
- Quentin, Y. 1992. Fusion of a free left Alu monomer and a free right Alu monomer at the origin of the Alu family in the primate genomes. *Nucleic Acids Res* 20: 487-493.
- Quentin, Y. 1994. A master sequence related to a free left Alu monomer (FLAM) at the origin of the B1 family in rodent genomes. *Nucleic Acids Res* 22: 2222-2227.
- Ramchandani, S., S.K. Bhattacharya, N. Cervoni, and M. Szyf. 1999. DNA methylation is a reversible biological signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6107-6112.
- Rea, S., F. Eisenhaber, D. O'Carroll, B.D. Strahl, Z.W. Sun, M. Schmid, S. Opravil, K. Mechtler, C.P. Ponting, C.D. Allis et al. 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406: 593-599.
- Rhee, I., K.E. Bachman, B.H. Park, K.W. Jair, R.W. Yen, K.E. Schuebel, H. Cui, A.P. Feinberg, C. Lengauer, K.W. Kinzler et al. 2002. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 416: 552-556.
- Rhee, I., K.W. Jair, R.W. Yen, C. Lengauer, J.G. Herman, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, S.B. Baylin, and K.E. Schuebel. 2000. CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature* 404: 1003-1007.
- Rhodes, D.R., M.G. Sanda, A.P. Otte, A.M. Chinnaiyan, and M.A. Rubin. 2003. Multiplex biomarker approach for determining risk of prostate-specific antigen-defined recurrence of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 95: 661-668.
- Rice, J.C., S.D. Briggs, B. Ueberheide, C.M. Barber, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, Y. Shinkai, and C.D. Allis. 2003. Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Mol Cell* 12: 1591-1598.

- Rideout, W.M., 3rd, G.A. Coetzee, A.F. Olumi, and P.A. Jones. 1990. 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science* 249: 1288-1290.
- Riggs, A.D. 1975. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* 14: 9-25.
- Ringrose, L. and R. Paro. 2004. Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu Rev Genet* 38: 413-443.
- Risques, R.A., M. Ribas, and M.A. Peinado. 2003. Assessment of cumulated genetic alterations in colorectal cancer. *Histol Histopathol* 18: 1289-1299.
- Rizwana, R. and P.J. Hahn. 1999. CpG methylation reduces genomic instability. *J Cell Sci* 112 (Pt 24): 4513-4519.
- Robert, M.F., S. Morin, N. Beaulieu, F. Gauthier, I.C. Chute, A. Barsalou, and A.R. MacLeod. 2003. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat Genet* 33: 61-65.
- Rollins, R.A., F. Haghighi, J.R. Edwards, R. Das, M.Q. Zhang, J. Ju, and T.H. Bestor. 2006. Large-scale structure of genomic methylation patterns. *Genome Res* 16: 157-163.
- Roman-Gomez, J., A. Jimenez-Velasco, X. Agirre, F. Cervantes, J. Sanchez, L. Garate, M. Barrios, J.A. Castillejo, G. Navarro, D. Colomer et al. 2005. Promoter hypomethylation of the LINE-1 retrotransposable elements activates sense/antisense transcription and marks the progression of chronic myeloid leukemia. *Oncogene* 24: 7213-7223.
- Roy, C.N. and N.C. Andrews. 2001. Recent advances in disorders of iron metabolism: mutations, mechanisms and modifiers. *Hum Mol Genet* 10: 2181-2186.
- Sancho, E., E. Battle, and H. Clevers. 2003. Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* 15: 763-770.
- Schilling, E. and M. Rehli. 2007. Global, comparative analysis of tissue-specific promoter CpG methylation. *Genomics*.
- Schmid, C.W. 1991. Human Alu subfamilies and their methylation revealed by blot hybridization. *Nucleic Acids Res* 19: 5613-5617.
- Schubeler, D., M.C. Lorincz, D.M. Cimborra, A. Telling, Y.Q. Feng, E.E. Bouhassira, and M. Groudine. 2000. Genomic targeting of methylated DNA: influence of methylation on transcription, replication, chromatin structure, and histone acetylation. *Mol Cell Biol* 20: 9103-9112.
- Schubeler, D., D.M. MacAlpine, D. Scalzo, C. Wirbelauer, C. Kooperberg, F. van Leeuwen, D.E. Gottschling, L.P. O'Neill, B.M. Turner, J. Delrow et al. 2004. The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev* 18: 1263-1271.

- Schwartz, Y.B. and V. Pirrotta. 2007. Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nat Rev Genet* 8: 9-22.
- Sellers, W.R. and M. Loda. 2002. The EZH2 polycomb transcriptional repressor--a marker or mover of metastatic prostate cancer? *Cancer Cell* 2: 349-350.
- Shen, J.C., W.M. Rideout, 3rd, and P.A. Jones. 1994. The rate of hydrolytic deamination of 5-methylcytosine in double-stranded DNA. *Nucleic Acids Res* 22: 972-976.
- Shi, Y., F. Lan, C. Matson, P. Mulligan, J.R. Whetstine, P.A. Cole, R.A. Casero, and Y. Shi. 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119: 941-953.
- Shibata, D., M.A. Peinado, Y. Ionov, S. Malkhosyan, and M. Perucho. 1994. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nat Genet* 6: 273-281.
- Sieber, O., K. Heinemann, and I. Tomlinson. 2005. Genomic stability and tumorigenesis. *Semin Cancer Biol* 15: 61-66.
- Sieber, O.M., K. Heinemann, and I.P. Tomlinson. 2003. Genomic instability--the engine of tumorigenesis? *Nat Rev Cancer* 3: 701-708.
- Siegers, C.P., S. Andresen, and J.P. Keogh. 1999. Does cimetidine improve prospects for cancer patients?. A reappraisal of the evidence to date. *Digestion* 60: 415-421.
- Sjoblom, T., S. Jones, L.D. Wood, D.W. Parsons, J. Lin, T.D. Barber, D. Mandelker, R.J. Leary, J. Ptak, N. Silliman et al. 2006. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314: 268-274.
- Smiraglia, D.J., L.J. Rush, M.C. Fruhwald, Z. Dai, W.A. Held, J.F. Costello, J.C. Lang, C. Eng, B. Li, F.A. Wright et al. 2001. Excessive CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies. *Hum Mol Genet* 10: 1413-1419.
- Song, F., J.F. Smith, M.T. Kimura, A.D. Morrow, T. Matsuyama, H. Nagase, and W.A. Held. 2005. Association of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) with differential gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3336-3341.
- Spencer, F., S.L. Gerring, C. Connelly, and P. Hieter. 1990. Mitotic chromosome transmission fidelity mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 124: 237-249.
- Sterner, D.E. and S.L. Berger. 2000. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 435-459.
- Stopper, H., R. Pechan, and D. Schiffmann. 1992. 5-azacytidine induces micronuclei in and morphological transformation of Syrian hamster embryo fibroblasts in the absence of unscheduled DNA synthesis. *Mutat Res* 283: 21-28.
- Strahl, B.D. and C.D. Allis. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403: 41-45.

- Strand, M., T.A. Prolla, R.M. Liskay, and T.D. Petes. 1993. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 365: 274-276.
- Strichman-Almashanu, L.Z., R.S. Lee, P.O. Onyango, E. Perlman, F. Flam, M.B. Frieman, and A.P. Feinberg. 2002. A genome-wide screen for normally methylated human CpG islands that can identify novel imprinted genes. *Genome Res* 12: 543-554.
- Suonio, E., L. Tuomisto, and E. Alhava. 1994. Effects of histamine, H1, H2 and Hic receptor antagonists and alpha-fluoromethylhistidine on the growth of human colorectal cancer in the subrenal capsule assay. *Agents Actions* 41 Spec No: C118-120.
- Suzuki, K., I. Suzuki, A. Leodolter, S. Alonso, S. Horiuchi, K. Yamashita, and M. Perucho. 2006. Global DNA demethylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes genomic damage. *Cancer Cell* 9: 199-207.
- Swartz, M.N., T.A. Trautner, and A. Kornberg. 1962. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XI. Further studies on nearest neighbor base sequences in deoxyribonucleic acids. *J Biol Chem* 237: 1961-1967.
- Szabo, P., S.H. Tang, A. Rentsendorj, G.P. Pfeifer, and J.R. Mann. 2000. Maternal-specific footprints at putative CTCF sites in the H19 imprinting control region give evidence for insulator function. *Curr Biol* 10: 607-610.
- Szyf, M. and S.K. Bhattacharya. 2002a. Extracting DNA demethylase activity from mammalian cells. *Methods Mol Biol* 200: 163-176.
- Szyf, M. and S.K. Bhattacharya. 2002b. Measuring DNA demethylase activity in vitro. *Methods Mol Biol* 200: 155-161.
- Szymanski, M., M.Z. Barciszewska, V.A. Erdmann, and J. Barciszewski. 2005. A new frontier for molecular medicine: noncoding RNAs. *Biochim Biophys Acta* 1756: 65-75.
- Tachibana, M., J. Ueda, M. Fukuda, N. Takeda, T. Ohta, H. Iwanari, T. Sakihama, T. Kodama, T. Hamakubo, and Y. Shinkai. 2005. Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9. *Genes Dev* 19: 815-826.
- Takai, D. and P.A. Jones. 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 E.U. Selker. 2001. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 414: 277-283.
- Tamaru, H., X. Zhang, D. McMillen, P.B. Singh, J. Nakayama, S.I. Grewal, C.D. Allis, X. Cheng, and E.U. Selker. 2003. Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nat Genet* 34: 75-79.

- Tamkun, J.W., R. Deuring, M.P. Scott, M. Kissinger, A.M. Pattatucci, T.C. Kaufman, and J.A. Kennison. 1992. *brahma*: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* 68: 561-572.
- Taunton, J., C.A. Hassig, and S.L. Schreiber. 1996. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* 272: 408-411.
- Thibodeau, S.N., G. Bren, and D. Schaid. 1993. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260: 816-819.
- Toledo, F. and G.M. Wahl. 2006. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* 6: 909-923.
- Toribara, N.W. and M.H. Sleisenger. 1995. Screening for colorectal cancer. *N Engl J Med* 332: 861-867.
- Toyota, M., N. Ahuja, M. Ohe-Toyota, J.G. Herman, S.B. Baylin, and J.P. Issa. 1999a. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8681-8686.
- Toyota, M., C. Ho, N. Ahuja, K.W. Jair, Q. Li, M. Ohe-Toyota, S.B. Baylin, and J.P. Issa. 1999b. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Res* 59: 2307-2312.
- Tschiersch, B., A. Hofmann, V. Krauss, R. Dorn, G. Korge, and G. Reuter. 1994. The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *Embo J* 13: 3822-3831.
- Turner, B.M. 2000. Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* 22: 836-845.
- Tutton, P.J. and D.H. Barkla. 1978. Stimulation of cell proliferation by histamine H2 receptors in dimethylhydrazine-induced adenocarcinoma. *Cell Biol Int Rep* 2: 199-202.
- Tweedie, S., J. Charlton, V. Clark, and A. Bird. 1997. Methylation of genomes and genes at the invertebrate-vertebrate boundary. *Mol Cell Biol* 17: 1469-1475.
- Valk-Lingbeek, M.E., S.W. Bruggeman, and M. van Lohuizen. 2004. Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell* 118: 409-418.
- Vaquero, A., R. Sternglanz, and D. Reinberg. 2007. NAD⁺-dependent deacetylation of H4 lysine 16 by class III HDACs. *Oncogene* 26: 5505-5520.
- Varambally, S., S.M. Dhanasekaran, M. Zhou, T.R. Barrette, C. Kumar-Sinha, M.G. Sanda, D. Ghosh, K.J. Pienta, R.G. Sewalt, A.P. Otte et al. 2002. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419: 624-629.
- Varis autors. 2002. The History of Cancer. *The American Cancer Society*.
- Varis autors. 2005. DNA methylation. Approaches, methods and applications. *Ed. Manel Esteller* CRC Press.

- Vendrell, E., M. Ribas, J. Valls, X. Sole, M. Grau, V. Moreno, G. Capella, and M.A. Peinado. 2007. Genomic and transcriptomic prognostic factors in R0 Dukes B and C colorectal cancer patients. *Int J Oncol* 30: 1099-1107.
- Venter, J.C. M.D. Adams E.W. Myers P.W. Li R.J. Mural G.G. Sutton H.O. Smith M. Yandell C.A. Evans R.A. Holt et al. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351.
- Vettese-Dadey, M., P.A. Grant, T.R. Hebbes, C. Crane- Robinson, C.D. Allis, and J.L. Workman. 1996. Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro. *Embo J* 15: 2508-2518.
- Villa, R., D. Pasini, A. Gutierrez, L. Morey, M. Occhionorelli, E. Vire, J.F. Nomdedeu, T. Jenuwein, P.G. Pelicci, S. Minucci et al. 2007. Role of the polycomb repressive complex 2 in acute promyelocytic leukemia. *Cancer Cell* 11: 513-525.
- Vogelstein, B., E.R. Fearon, S.R. Hamilton, S.E. Kern, A.C. Preisinger, M. Leppert, Y. Nakamura, R. White, A.M. Smits, and J.L. Bos. 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319: 525-532.
- Volpe, T.A., C. Kidner, I.M. Hall, G. Teng, S.I. Grewal, and R.A. Martienssen. 2002. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 297: 1833-1837.
- Vongs, A., T. Kakutani, R.A. Martienssen, and E.J. Richards. 1993. Arabidopsis thaliana DNA methylation mutants. *Science* 260: 1926-1928.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper et al. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407-4414.
- Wade, P.A., A. Geggion, P.L. Jones, E. Ballestar, F. Aubry, and A.P. Wolffe. 1999. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* 23: 62-66.
- Wakimoto, B.T. 1998. Beyond the nucleosome: epigenetic aspects of position-effect variegation in Drosophila. *Cell* 93: 321-324.
- Walsh, C.P. and T.H. Bestor. 1999. Cytosine methylation and mammalian development. *Genes Dev* 13: 26-34.
- Walter, P. and G. Blobel. 1982. Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature* 299: 691-698.
- Wang, Y., M. Jorda, P.L. Jones, R. Maleszka, X. Ling, H.M. Robertson, C.A. Mizzen, M.A. Peinado, and G.E. Robinson. 2006. Functional CpG methylation system in a social insect. *Science* 314: 645-647.

- Watt, F. and P.L. Molloy. 1988. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev* 2: 1136-1143.
- Wegner, I.C., R.R. Dawirs, C. Grond, and G. Teuchert-Noodt. 1997. Dopamine and the regulation of cell proliferation in gerbil (*Meriones unguiculatus*) pyloric mucosa. *Life Sci* 60: 2005-2011.
- Weintraub, H. and M. Groudine. 1976. Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. *Science* 193: 848-856.
- Weisenberger, D.J., M. Campan, T.I. Long, M. Kim, C. Woods, E. Fiala, M. Ehrlich, and P.W. Laird. 2005. Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic Acids Res* 33: 6823-6836.
- Widschwendter, M., H. Fiegl, D. Egle, E. Mueller-Holzner, G. Spizzo, C. Marth, D.J. Weisenberger, M. Campan, J. Young, I. Jacobs et al. 2007. Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat Genet* 39: 157-158.
- Williamson, D., Y.J. Lu, C. Fang, K. Pritchard-Jones, and J. Shipley. 2006. Nascent pre-rRNA overexpression correlates with an adverse prognosis in alveolar rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 45: 839-845.
- Woerner, S.M., M. Kloor, A. Mueller, J. Rueschoff, N. Friedrichs, R. Buettner, M. Buzello, P. Kienle, H.P. Knaebel, E. Kunstmann et al. 2005. Microsatellite instability of selective target genes in HNPCC-associated colon adenomas. *Oncogene* 24: 2525-2535.
- Woodcock, D.M., P.J. Crowther, W.P. Diver, M. Graham, C. Bateman, D.J. Baker, and S.S. Smith. 1988. RglB facilitated cloning of highly methylated eukaryotic DNA: the human L1 transposon, plant DNA, and DNA methylated in vitro with human DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 16: 4465-4482.
- Worm, J., A. Aggerholm, and P. Guldborg. 2001. In-tube DNA methylation profiling by fluorescence melting curve analysis. *Clin Chem* 47: 1183-1189.
- Xiang, Y., Z. Zhu, G. Han, H. Lin, L. Xu, and C.D. Chen. 2007. JMJD3 is a histone H3K27 demethylase. *Cell Res*.
- Xiong, Z. and P.W. Laird. 1997. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* 25: 2532-2534.
- Xu, G.L., T.H. Bestor, D. Bourc'his, C.L. Hsieh, N. Tommerup, M. Bugge, M. Hulten, X. Qu, J.J. Russo, and E. Viegas-Pequignot. 1999. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 402: 187-191.
- Yamamoto, F., M. Yamamoto, J.L. Soto, E. Kojima, E.N. Wang, M. Perucho, T. Sekiya, and H. Yamanaka. 2001. NotI-MselI methylation-sensitive amplified fragment length polymorphism for DNA methylation analysis of human cancers. *Electrophoresis* 22: 1946-1956.

- Yamashita, K., T. Dai, Y. Dai, F. Yamamoto, and M. Perucho. 2003. Genetics supersedes epigenetics in colon cancer phenotype. *Cancer Cell* 4: 121-131.
- Yang, A.S., M.R. Estecio, K. Doshi, Y. Kondo, E.H. Tajara, and J.P. Issa. 2004. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res* 32: e38.
- Yang, N. and H.H. Kazazian, Jr. 2006. L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells. *Nat Struct Mol Biol* 13: 763-771.
- Yang, X.J. and E. Seto. 2003. Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 13: 143-153.
- Yoder, J.A., C.P. Walsh, and T.H. Bestor. 1997. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 13: 335-340.
- Yu, F., N. Zingler, G. Schumann, and W.H. Stratling. 2001. Methyl-CpG-binding protein 2 represses LINE-1 expression and retrotransposition but not Alu transcription. *Nucleic Acids Res* 29: 4493-4501.
- Zhao, X.D., X. Han, J.L. Chew, J. Liu, K.P. Chiu, A. Choo, Y.L. Orlov, W. Sung, A. Shahab, V.A. Kuznetsov et al. 2007. Whole-genome mapping of histone H3 lys4 and 27 trimethylations reveals distinct genomic compartments in human embryonic stem cells. *Cell stem cell* 1: 286-298.

APÈNDIX

Apèndix 1

AUMA.pl

Programa bioinformàtic en llenguatge Perl d'anàlisi de seqüències utilitzat per mapar seqüències AUMA en el genoma humà. Contingut en el fitxer AUMA.pl i executat des de DOS. Codi en lletra Courier i comentaris en lletra Tahoma.

```
#####
##
##
##   Format de sequencies V 1.0
##
##   Per Jairo Rodriguez Lumbarres IDIBELL 2006
##
##
#####

print "\n";
print "\n";
print "\n";
print "          #####\n";
print "\n";
print "          Posicio hits V 1.0\n";
print "\n";
print "          #####\n";
print "\n";
print "\n";
print "\n";
print "Ruta del fitxer a analitzar\n";

# Obertura del fitxer que conté la seqüència a analitzar

$ruta=<STDIN>;

open (FITXER,$ruta) or die "No es pot obrir el fitxer especificat";

print "El fitxer ",$ruta,"ha estat obert correctament\n";
print "\n";
print "Introdueix el primer 1:\n";

# Entrada del primer Primer

$primer=<STDIN>;
chop $primer;
$long_primer= length($primer);
print "Primer sequence 1= ", $primer, "\n";
print "\n";
print "Length primer 1= ", $long_primer, "\n";
print "\n";
```


Entrada del segon Primer

```

print "\n";
print "\n";
print "Introdueix el primer 2:\n";

$primer2=<STDIN>;
chop $primer2;
$long_primer2= length($primer2);

print "Primer sequence 2= ", $primer2, "\n";
print "\n";
print "Length primer 2= ", $long_primer2, "\n";
print "\n";
print "Formatejant la sequencia\n";
print "\n";

$linia_final="";

while (<FITXER>)
{
    if (!/\>/)
    {
        chop $_;
        $linia_final .=$_;
    }
    else
    {
        print $_, "\n";
    }
}

$long= length($linia_final);

print "\n";
print "La longitud de la seq es de ", $long, "pb\n";
print "\n";
print "\n";
print "_____ \n";
print "\n";
print "\n";
close FITXER;

```

```
#####
# Anàlisi de la seqüència formatejada
#####
```

Fem l'anàlisi de les dues seqs de forma continua

```
print "Posicionant els hits del primer ", $primer, "\n";
```

Creem el fitxer de text que contindrà els resultats del primer Primer...

```
open (RESULTS, ">c:/perl/bin/ecosistema/resultats.txt") or die "No es
pot obrir el fitxer de resultats\n";
```

```
for ($linia_final)
```

```
{
    @hits_primer= /$primer/g;
    $hits=@hits_primer;
    print "Sequence hits=", $hits, "\n";
    print "\n";
}
```

Posició del primer hit

```
$posicio_0= index($linia_final,$primer);
push(@posicions,$posicio_0);
print $posicio_0, "\n";
print RESULTS $ruta, "\n";
print RESULTS $long, "\n";
print RESULTS $hits, "\n";
```

Primer en capçalera de columna

```
print RESULTS $primer, "\n";
print RESULTS $posicio_0, "\n";
```

Posicionem la resta de hits en la resta de seqüència..

```
for ($i=1; $i<$hits; $i++)
```

```
{
    local $string=""; #definició de la subcadena.
    $nombre=$i-1;
```

#posicio d'extracció relativa.

```
$extract_pos[$i]=$posicions[$nombre]+$long_primer;
```

```

$string= substr($linia_final,$extract_pos[$i]);
$pos[$i]=index($string,$primer);
$posicio_final=$pos[$i]+$long_primer+$posicions[$nombre];
push(@posicions,$posicio_final);
print $posicio_final,"\n";
print RESULTS $posicio_final,"\n";

}

```

#posicionem el segon primer que ja hem entrat previament.

```

print "\n";
print "\n";
print "Posicionant els hits del primer ",$primer2,"\n";

```

Creem el segon fitxer temporal que contindrà la informació del segon Primer

```

open (RESULTS1,">c:/perl/bin/ecosistema/resultats1.txt") or die "No es
pot obrir el fitxer de resultats\n";

```

```

for ($linia_final)
{

@hits_primer2= /$primer2/g;
$hits2=@hits_primer2;
print "Sequence hits=", $hits2, "\n";
print "\n";

}

```

Posició del primer hit

```

$posicio= index($linia_final,$primer2);
push(@posicions2,$posicio);
print $posicio,"\n";
print RESULTS1 $ruta,"\n";
print RESULTS1 $long,"\n";
print RESULTS1 $hits2,"\n";

```

Primer en capçalera de columna

```

print RESULTS1 $primer2, "\n";
print RESULTS1 $posicio,"\n";

```

Posicionem la resta de hits en la resta de seqüència.

```

for ($a=1; $a<$hits2; $a++)
{

local $string=""; #definició de la subcadena.

```

```
$nombre2=$a-1;
```

```
#posició d'extracció relativa.
```

```
$extract_pos2[$a]=$posicions2[$nombre2]+$long_primer2;  
$string2= substr($linia_final,$extract_pos2[$a]);  
$pos2[$a]=index($string2,$primer2);
```

```
$posicio_final2=$pos2[$a]+$long_primer2+$posicions2[$nombre2];
```

```
push(@posicions2,$posicio_final2);  
print $posicio_final2,"\n";  
print RESULTS1 $posicio_final2,"\n";
```

```
}
```

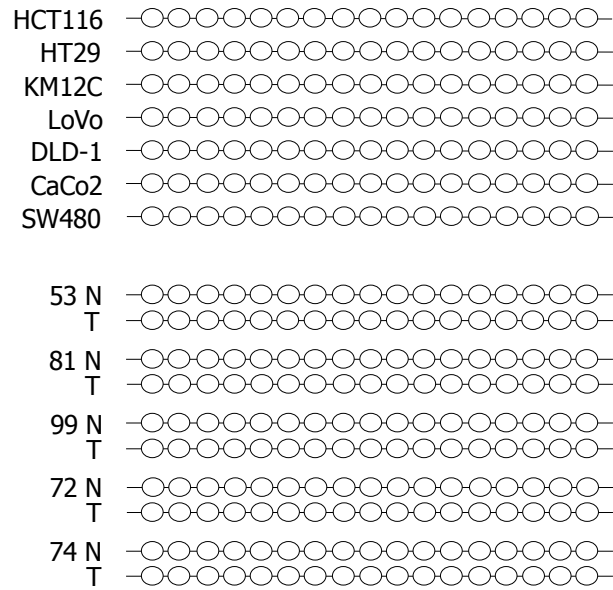
```
# Fi del programa
```

```
exit;
```

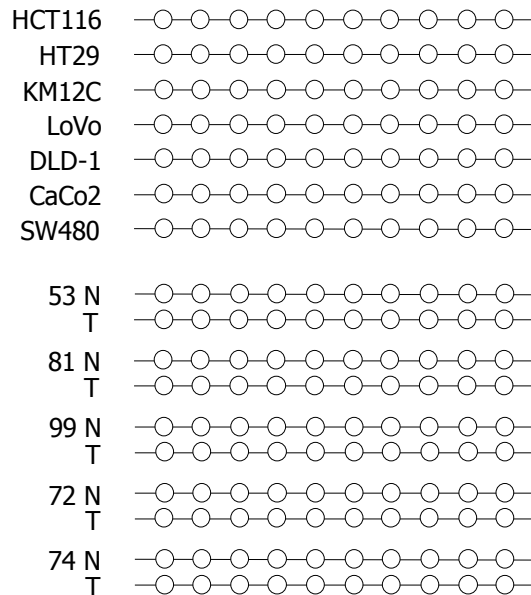
Apèndix 2

Conjunt d'illes CpG analitzades en la regió 5q35.2, a excepció de la illa CpG118 de CPLX2 i el fragment CPLX2 MIR, els quals es poden veure en la Figura 1C del segon treball (pàg. 143). Les dades mostrades provenen dels resultats obtinguts per seqüenciació directa de línies cel·lulars i parelles normal-tumor tractades amb bisulfit sòdic, el resum de les quals correspon a la Figura 2 del Treball 2 (pàg. 144). Cada cercle representa un dinucleòtid CpG en la seqüència original.

CpG126 RNF44

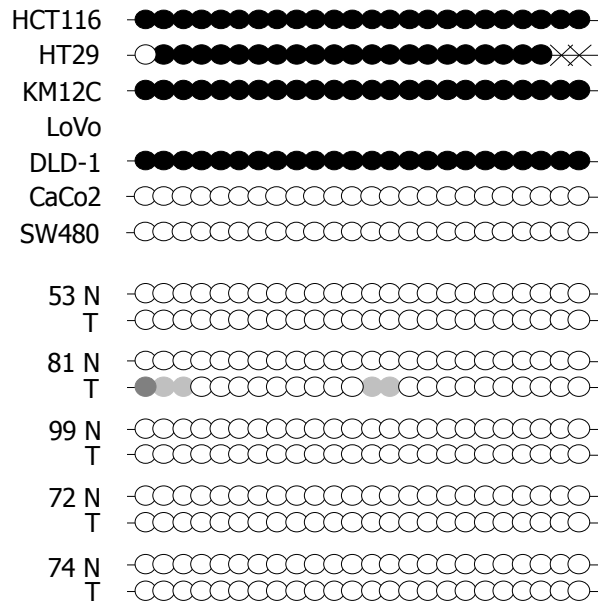


CpG110

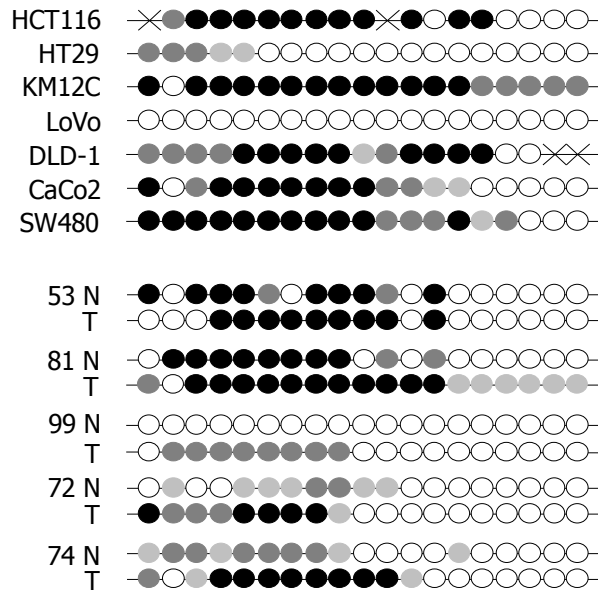


Methylation status ○ 0% ● 25% ● 50% ● 100% ✕ Not determined

CpG91

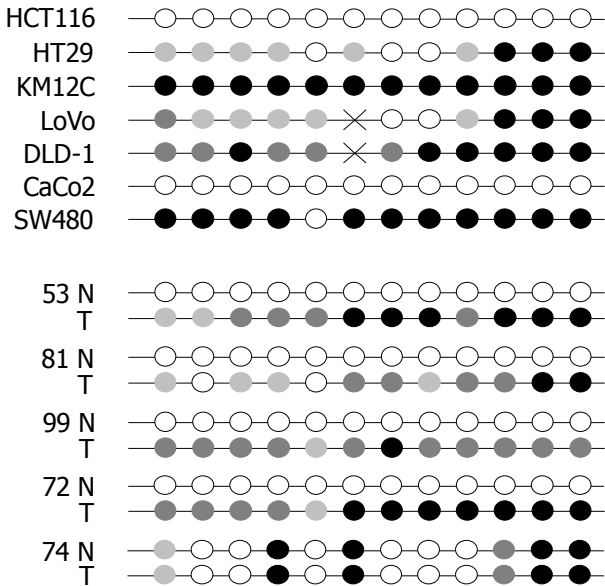


CpG114 GPRIN1

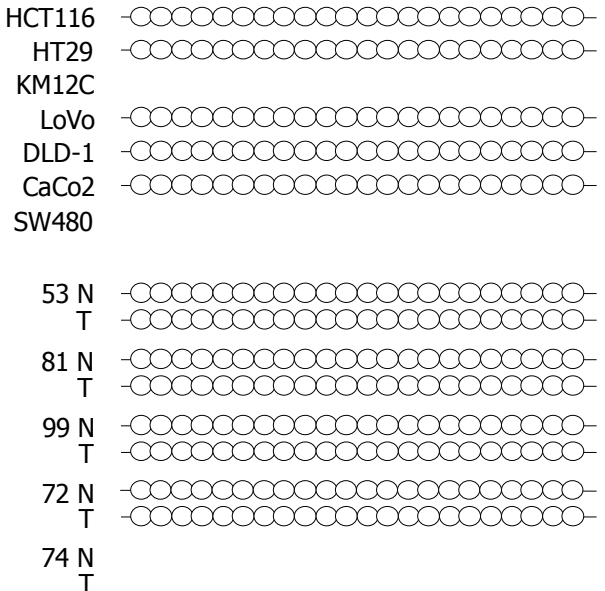


Methylation status ○ 0% ● 25% ● 50% ● 100% ✕ Not determined

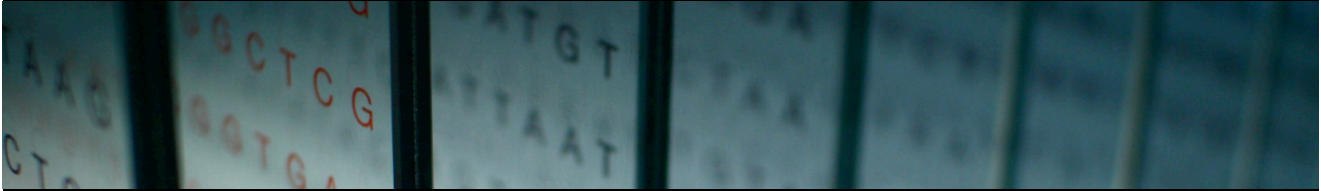
CpG79 SNCB



CpG47 TSPAN17



Methylation status ○ 0% ● 25% ● 50% ● 100% X Not determined



[Ens entestem dia a dia a desmuntar el rellotge per tal d'algun dia poder tornar enrere i ser capaços d'escriure'n el manual d'instruccions]