

METHYLATION DES PROMOTEURS DE GENES ASSOCIES A LA CANCEROGENESE COLORECTALE : IMPACT CLINIQUE ET PRONOSTIC POUR DES PATIENTS TUNISIENS

R. ABDELMAKSOU-DAMMAK ¹, A. SAADALLAH-KALLEL ¹, I. MILADI-ABDENNADHER ¹, A. KHABIR ²,
T. SALLEMI-BOUDAWARA ² ET R. MOKDAD-GARGOURI ¹

*1 : Centre de Biotechnologie de Sfax, laboratoire de Biotechnologie Moléculaire des Eucaryotes, Sfax ;
université de Sfax, BP"K"3038, Sfax –Tunisie.*

2 : Service d'Anatomopathologie, CHU Habib Bourguiba, Sfax.

Résumé

Le cancer colorectal (CCR) résulte de l'accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques dans les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale. Les modifications épigénétiques, en particulier la méthylation des îlots CpG de l'ADN, sont reconnues comme des altérations moléculaires communes dans les tumeurs humaines. Des efforts considérables ont été déployés pour déterminer la cause et le rôle de la méthylation aberrante de l'ADN dans la cancérogenèse colique. Cette méthylation aberrante touche des gènes clés impliqués dans la transformation néoplasique des cellules et peut donc servir de biomarqueur pour la détection précoce de l'ADN tumoral dans les selles et le sang et comme un outil de suivi des patients atteints de CCR. Cette revue vise à résumer l'ensemble des résultats de l'étude de la méthylation d'ADN des patients du Sud Tunisien atteints de cancer colorectal sporadique, afin de mettre en évidence l'impact de cette méthylation aberrante sur la néoplasie colorectale. Nous avons trouvé des taux de méthylation variables ayant des corrélations significatives avec les paramètres clinicopathologiques et la survie des patients. En conclusion, nous avons identifié certains gènes qui pourront être utilisés comme marqueur de diagnostic et de pronostic du cancer colorectal chez les patients du sud tunisien.

Mots Clés : Cancer colorectal, Méthylation d'ADN, Paramètres cliniques, Sud Tunisien.

Summary

Colorectal cancer (CRC) results from accumulation of genetic and epigenetic alterations in the intestinal mucosa. Epigenetic changes, including DNA methylation, are recognized as common molecular modifications in human tumors. Considerable efforts have been made to determine the cause and the role of aberrant DNA methylation in colon carcinogenesis. This aberrant methylation touches key genes involved in neoplastic transformation. The DNA methylation of specific promoters can be used as a biomarker for the early detection of tumor DNA in stool and blood and as a tool for monitoring patients with CRC. This revue aimed to summarize the results of the DNA methylation study of south Tunisian patients with colorectal cancer, to put in evidence the incidence of aberrant methylation of this colorectal neoplasia. We found variable rates of methylation with significant correlations with clinicopathological features and patients survival. In conclusion, we identified some genes that can be used as marker for diagnosis and prognosis of colorectal cancer patients.

Keywords: Colorectal Cancer, DNA Methylation, Clinical Features, South Tunisia.

INTRODUCTION

La cancérogenèse est un processus complexe, caractérisé par l'accumulation progressive d'altérations génétiques et épigénétiques qui résultent de l'instabilité du génome et qui conduisent à la dérégulation de l'expression de toute une cascade de gènes et de voies de signalisation. Ces changements aboutissent à l'obtention de cellules néoplasiques ayant acquis plusieurs avantages sélectifs [1, 2]. Le cancer colorectal apparaît suite à une série de changements histologiques, chacun étant accompagné de modifications génétiques spécifiques.

Dans le monde, près d'un million de personnes développent chaque année un cancer colorectal, et le taux de mortalité de la maladie avoisine les 33% [3]. Dans le Sud de la Tunisie, les CCRs sont assez fréquents chez l'homme, représentant 7,8% de tous les cancers. Ils occupent la 2^{ème} position chez la femme et la 6^{ème} place chez l'homme [4].

Les facteurs génétiques jouent un rôle prédominant dans la carcinogenèse colorectale [5]. Selon les incidences respectives et les caractéristiques moléculaires, les cancers colorectaux peuvent être classés en deux grandes catégories, à savoir les CCRs héréditaires et les CCRs sporadiques.

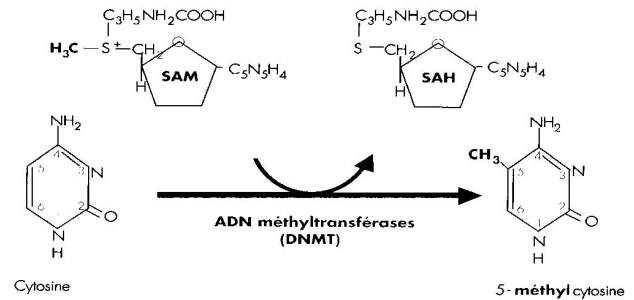
Les cancers sporadiques sont des cancers n'ayant pas de causes héréditaires mais apparaissant suite à des mutations somatiques touchant l'ADN des cellules épithéliales de la muqueuse intestinale. En effet, plusieurs gènes ont été identifiés comme impliqués dans la carcinogenèse colique. Certains sont des oncogènes (KRAS, CTNNB1), d'autres sont des gènes suppresseurs de tumeur (APC, P53) ou des gènes de réparation de l'ADN (MLH1, MYH) [6]. A ces altérations génétiques s'ajoutent les facteurs environnementaux communs à une population donnée et d'autres propres à l'individu [7].

Avec l'augmentation de l'intérêt porté à l'épigénétique, il a été démontré que des phénomènes comme l'hyperméthylation des promoteurs des GSTs, l'hypométhylation globale de l'ADN ainsi que les modifications post-traductionnelles des histones ont une part importante dans le processus de cancérogenèse colorectale [8].

La méthylation de l'ADN est une modification chimique covalente, ayant pour résultat l'addition d'un groupement méthyle (CH₃) sur un résidu cytosine. Elle se produit essentiellement sur les cytosines associées aux dinucléotides CpG, souvent localisées au niveau des promoteurs et des premiers

exons non codants d'environ 50% des gènes humains [9]. Cette réaction est assurée par les ADN méthyltransférases ou DNMT [Figure 1 ; 10].

Figure 1 : Réaction de méthylation de l'ADN



L'HYPERMETHYLATION DES PROMOTEURS DE GENES DANS LE CCR :

Il est clairement admis que l'hyperméthylation des îlots CpG est considérée comme un événement majeur impliqué dans le processus de carcinogenèse. La recherche dans cette discipline a mis l'accent sur les GSTs en tant que cibles majeures de la méthylation. Dans cette revue, nous nous sommes intéressés à la modification épigénétique de différents gènes impliqués dans la transformation cellulaire comme les suppresseurs de tumeurs (p16INK4a, APC, WIF1, UCHL1), les gènes de réparation des mésappariements de l'ADN (MLH1), de l'apoptose (DAPK, RASSF1A et RARβ2) et de l'adhésion cellulaire (CDH1) [11-13].

1. Le gène RASSF1 (Ras-Associated domain Family 1):

Le gène RASSF1 est un suppresseur de tumeur localisé au niveau du bras court du chromosome 3 (3p21.3). Le rôle de RASSF1A est de moduler le cycle cellulaire et l'apoptose induite par l'activation de diverses voies de signalisation passant par la protéine oncogénique Ras [14]. Ce gène est souvent inactivé par hyperméthylation de son promoteur dans divers types de cancers tel que le cancer du poumon à petite cellule [15], le cancer du cavum [16] et le cancer du sein [17]. Inactivation de RASSF1A, associée à la méthylation aberrante de son promoteur, a été décrite dans un grand nombre d'échantillons colorectaux cancéreux et de lésions précancéreuses

et le taux de méthylation rapporté de ce gène dans les CCR varie entre 12 et 81 % [18].

2. Le gène *DAP-Kinase* (*Death-Associated Protein Kinase*):

La DAP-Kinase est une protéine pro-apoptotique qui joue le rôle d'un médiateur positif de l'apoptose passant par les récepteurs de mort et induite par le TNF- α , l'IFN- γ et le récepteur Fas [19, 20]. Plus d'une centaine d'études ont rapporté une inactivation du gène codant la DAP-Kinase par hyperméthylation de son promoteur dans divers cancers, dont le CCR [21].

L'hyperméthylation de DAP-Kinase est détectable chez les patients atteints de CCRs sporadiques dans 53 à 81,2% des cas [22, 23].

3. Le gène *RAR β 2* (*Retinoic Acid Receptor beta 2*):

Le gène *RAR β 2* est un suppresseur de tumeur qui est sous-exprimé dans des lignées cellulaires de carcinome à cellules squameuses [24] et dans les tumeurs primaires du poumon, du sein, du nasopharynx, et du col de l'utérus [16, 25-27]. Dans le CCR, l'inactivation du promoteur *RAR β 2* par hyperméthylation a été démontrée en premier lieu dans les cellules de cancer du côlon puis dans les tumeurs primaires ; ou il a été observé que la méthylation de *RAR β 2* était plus élevée dans les tumeurs que dans les muqueuses normales associées et qu'elle est responsable de la perte de la protéine [28-30]. Le taux de méthylation rapporté dans la littérature est de l'ordre de 85% [31].

4. Le gène *CDH1* (*E-cadherin*):

La glycoprotéine transmembranaire E-cadherine, responsable de l'adhésion intercellulaire dépendante du calcium dans le tissu épithélial, joue un rôle important dans l'embryogenèse, la polarisation, la différenciation et la migration cellulaire [32]. Une dérégulation de l'expression du gène *CDH1* est souvent observée dans les tumeurs métastasées. Dans le CCR, le gène *CDH1* est méthylé dans 40 à 56% des cas [33,34].

5. Le gène *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*):

Le gène *APC* est un suppresseur de tumeur qui intervient entre autre dans la régulation du taux cytosolique de la β -caténine [35]. L'inactivation du

gène *APC* par mutation est l'aberration la plus communément observée dans les tumeurs colorectales. Plusieurs études ont montré que l'hyperméthylation du promoteur de ce gène peut entraîner sa perte d'expression dans les tumeurs qui ne présentent pas de LOH au niveau de ce locus, avec une fréquence qui varie entre 10 et 50% [36-39].

6. Le gène *MLH1* (*human MutL Homolog 1*):

Le gène *MLH1* code pour un membre du complexe de réparation des mésappariements au cours de la réplication de l'ADN [40]. Des mutations constitutionnelles de ce gène sont responsables du syndrome HNPCC [41]. Dans les cas de CCR sporadique, ce gène est inactivé par hyperméthylation de son promoteur dans 10 à 50% des cas [42-44]. Cet événement semble se mettre en place de façon précoce au cours de la carcinogenèse colorectale [45]. L'hyperméthylation du promoteur de *MLH1* est associée au phénotype MSI-H et à la mutation V600E de l'oncoprotéine *BRAF* [46].

7. Le gène *p16INK4a*:

p16INK4a est un inhibiteur *CDK4* (kinase dépendante de la cycline 4) qui agit spécifiquement sur la phase G1/S du cycle cellulaire par un contrôle négatif de l'état de phosphorylation de rétinoblastome [47]. La méthylation de *p16INK4a* a été rapportée à une fréquence de 7-53% dans des tumeurs malignes colorectales et dans 0-25% au niveau de la muqueuse colique normale [48-50]. Certaines études montrent que la méthylation de *p16INK4a* est un événement précoce lors de la carcinogenèse colorectale, tandis que d'autres suggèrent qu'il s'agit d'un événement tardif [51,52].

8. Le gène *WIF1* (*Wnt Inhibitory Factor 1*):

Le gène *WIF-1* est un suppresseur de tumeurs qui fonctionne en tant qu'inhibiteur sécrété de la voie Wnt/ β -caténine. Il a été démontré que l'expression du gène *WIF-1* est réprimée par méthylation de son promoteur dans différents cancers, notamment celui des poumons, de la prostate, de la vessie et du nasopharynx [53-55]. Le promoteur du gène *WIF1* est fréquemment méthylé dans les CCRs. Des études antérieures ont montré un taux de méthylation très élevé de ce gène, corrélé avec une perte de l'expression [56]. En effet, Lee et al. ont montré que parmi 7 promoteurs étudiés, la

méthylation de WIF-1 était la plus élevée (74%) dans une grande série de patients atteints de cancers colorectaux [57].

9. *Le gène UCHL1 (ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1):*

UCHL1 (ou PARK5/PGP9.5) est un membre de la classe UCH des enzymes de déubiquitination (DUBs), exprimé spécifiquement dans les neurones et représente 1 à 5% de toutes les protéines solubles du cerveau [58]. Le rôle exact de la protéine UCHL1 dans la cancérogenèse est complexe car elle fonctionnerait comme un oncogène ou un GST selon le type de cancer. L'expression du gène UCHL1 est réprimée par méthylation de son promoteur dans différents types de cancers comme celui du côlon [59]. En effet, des études antérieures ont montré une méthylation aberrante du promoteur UCHL1 dans les tumeurs colorectales primaires, ainsi que dans les lignées cellulaires de cancer du côlon, avec des taux avoisinant les 73% [59, 60]. Cependant, une autre étude a montré que le promoteur d'UCHL1 est hypométhylé dans les cancers colorectaux métastatiques. Ceci suggère que l'hypométhylation de ce promoteur serait le mécanisme responsable de la réexpression de ce gène à des stades avancés du CCR, faisant de lui un marqueur potentiel pour les CCRs métastatiques [61].

RESULTATS DE L'ETUDE EPIGENETIQUE CHEZ LES PATIENTS DU SUD TUNISIEN ATTEINTS DE CANCER COLORECTAL :

Notre travail a porté sur une panoplie de gènes impliqués dans la carcinogenèse colorectale, à savoir : les suppresseurs de tumeurs (p16INK4a, APC, WIF1, UCHL1), les gènes de réparation des mésappariements de l'ADN (MLH1), de l'apoptose (DAPK, RASSF1A et RARβ2) et de l'adhésion cellulaire (CDH1) ; et nous avons comme objectif la détermination du statut de méthylation des régions promotrices de ces gènes. L'étude a été réalisée sur une série de 83 adénocarcinomes lieberkuhniens prélevés chez des patients du sud tunisien atteints d'un CCR sporadique. Les fréquences de méthylation ont été comparées avec les données de la littérature et corrélées avec les paramètres clinicopathologiques.

Nous avons trouvé des taux de méthylation variables chez nos patients (Figure 2 ; tableau 1). Les différents pourcentages de méthylation que

nous avons trouvé se rapprochent de ce qui a été décrit dans la littérature (tableau 1). L'importance de l'étude du statut de méthylation de tous ces gènes réside dans les corrélations avec les divers paramètres clinicopathologiques qui peuvent en sortir ainsi que dans les différences de survie globale chez les patients. L'association avec ces paramètres pourrait nous renseigner sur les marqueurs de suivi et de pronostic.

Tableau 1 : Résultats de l'étude du statut de méthylation des différents gènes et comparaisons par rapport à la littérature.

Gène	Fréquence	Fréquence Théorique (référence)
RARβ2	80,8%	~85% [31]
DAPK	47,2%	53-81,2% [22,23]
RASSF1A	35,6%	12-81% [18]
CDH1	46,6%	40-56% [33,34]
P16	47,2%	7-53% [48-50]
MLH1	53,4%	10-50% [42-44]
APC	58,9%	10-50% [39]
WIF1	87,95%	74% [57]
UCHL1	68,57%	73% [59,60]

1. *Associations avec les paramètres cliniques des patients :*

Pour la plupart des gènes étudiés, nous avons trouvé des corrélations significatives avec les facteurs cliniques liés à une plus grande agressivité de la maladie.

En effet, la perte d'expression du gène RARβ2 suite à la méthylation de son promoteur corrèle avec la surexpression de COX-2 (p=0.014) [11], cette dernière est impliquée dans le processus inflammatoire et la progression tumorale. En effet, RARβ2 peut réguler la transcription de COX-2 directement en se fixant sur le promoteur ou indirectement en inhibant le facteur transcriptionnel AP1 qui régule à son tour positivement l'expression de COX-2 [62-64].

Concernant l'E-cadhérine, nous avons trouvé une association significative entre les résultats de méthylation et d'immunohistochimie (p=0,005). En effet, son expression a été observée dans 83.3% des cas (50/60). Parmi les 50 cas positifs, 32 (64%) ont montré l'absence totale de méthylation du gène CDH1 tandis que seuls 2 cas avaient un statut méthylé, ce qui suggère l'importance de cette altération épigénétique dans la perte d'expression de la protéine d'adhésion dans les CCRs [11].

Ce résultat est en accord avec le travail de Garinis et al. qui ont rapporté une association significative entre la diminution de l'expression de l'E-cadhérine et l'hyperméthylation de son promoteur, dans environ 80% des carcinomes [33].

L'analyse de la méthylation concomitante des deux gènes p16INK4a et MLH1 a montré qu'elle est fortement associée avec le stade de la maladie ($p=0,024$) et la taille tumorale ($p=0,021$) [12]. La méthylation de p16INK4a est plus fréquente chez les patients dont la tumeur est de taille élevée ($p=0,035$) [12]. Selon d'autres travaux, le profil de méthylation de p16INK4a est associé avec le type mucineux, le stade tumoral avancé, l'atteinte ganglionnaire et un mauvais pronostic [52, 65]. En ce qui concerne le statut de méthylation du promoteur MLH1, l'hyperméthylation de ce gène tend à être corrélée avec la localisation proximale de la tumeur ($p=0,063$) comme il a été déjà décrit dans la littérature [66].

L'analyse univariée a montré que la méthylation du promoteur WIF-1 est significativement corrélée avec l'agressivité de la maladie comme la présence de métastases ($p=0,039$) et l'invasion vasculaire ($p=0,029$). L'analyse de l'expression de WIF-1 a donné lieu à une corrélation significative entre la MSP et la RT-PCR ($P = 0,001$). En effet, alors que l'ARNm de WIF-1 a été observé seulement dans 9,5% des échantillons avec un profil héli-méthylé, il a été détecté dans 100% des échantillons non méthylés. Ceci suggère que cette méthylation du promoteur de WIF1 est responsable de sa perte d'expression dans les tissus tumoraux [13]. Nos résultats sont en accord avec Taniguchi et al. qui ont montré un taux de méthylation très élevé de ce gène, corrélé avec une perte de l'expression [56].

Pour le gène APC, l'analyse statistique a révélé une association significative entre l'hyperméthylation du gène APC et le statut MSI-H ($p=0,002$) et avec la forme sauvage du gène BRAF. Ce résultat concorde avec celui d'Iacopetta et al. [44].

Dans notre série d'étude, la méthylation du gène UCHL-1 corrèle significativement avec l'invasion des ganglions lymphatiques ($p = 0,029$). L'analyse de l'expression de son ARNm a révélé une corrélation significative entre les résultats de la MSP et ceux de la RT-PCR ($p=0,016$), suggérant que cette méthylation entraîne la perte d'expression de UCHL-1 dans les tissus tumoraux. Ces résultats sont en accord avec une étude récente montrant que l'expression accrue d'UCHL1 était significativement associée à l'invasion des ganglions lymphatiques [67].

2. Associations avec la survie des patients :

En utilisant la méthode de Kaplan-Meier, nous avons trouvé que l'hyperméthylation des gènes RAR α 2 et MLH1 est associée avec une durée réduite de la survie des patients (Figure 3: A,B ; respectivement $p \log \text{rank} = 0,026$; $p \log \text{rank} = 0,007$).

Concernant le gène de réparation d'ADN MLH1, nous avons trouvé, en utilisant l'analyse multivariée, qu'en plus de la taille tumorale, l'hyperméthylation de ce gène constitue un facteur indépendant de pronostic dans les CCRs.

Les courbes de survie ont montré que la durée de la survie globale est significativement réduite pour des patients ayant un promoteur WIF-1 méthylé ((Figure 3C ; $p \log \text{rank} = 0,024$). De plus, en considérant le groupe de patients ayant un profil de méthylation positif, nous avons constaté que la durée de survie globale est significativement prolongée pour ceux ayant une taille tumorale réduite ($p=0,007$) et une absence de métastase ($p=0,036$) (Figure 3D, 3E).

Figure 2 : Histogramme illustrant les différences de méthylation entre les différents gènes étudiés.

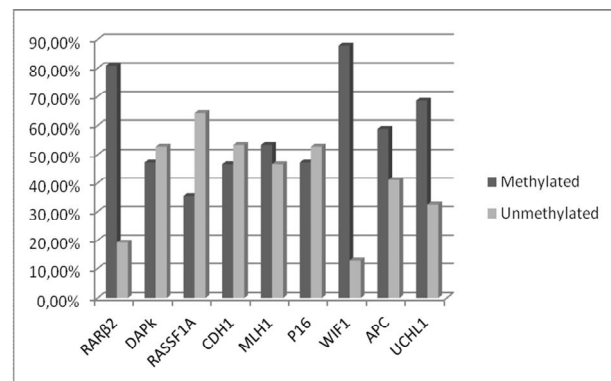
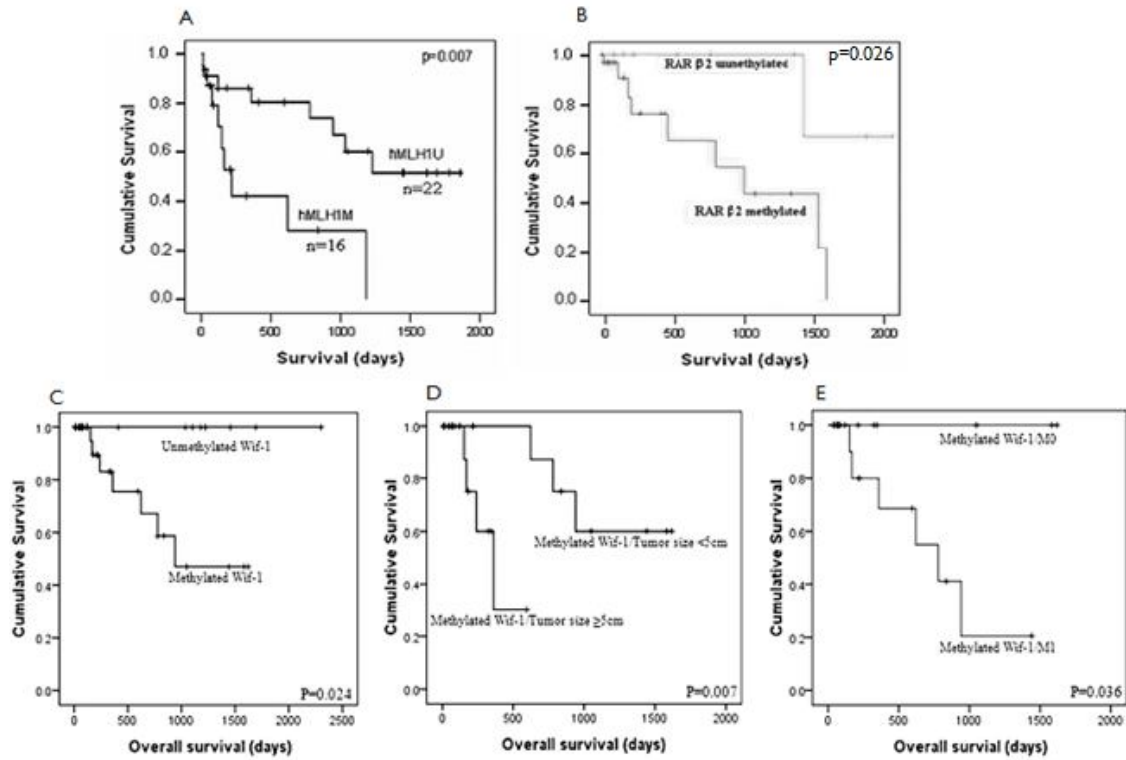


Figure 3 : Courbes de Kaplan Meier montrant l'effet de la méthylation aberrantes des promoteurs de certains gènes sur la survies patients tunisiens atteints de cancer colorectal sporadique.



CONCLUSION

L'étude des modifications épigénétiques qui modulent la transformation cellulaire néoplasique a suscité un intérêt grandissant au cours de ces dernières années et les efforts se sont consentis pour en sortir une liste de gènes qui pourront être utilisés comme marqueur de diagnostic et de pronostic de la maladie. Dans ce présent travail, nous avons étudié le statut de méthylation de 9 gènes qui jouent des rôles importants dans différents processus cellulaires. Nous avons mis en évidence que l'hyperméthylation de RAR β , MLH1 et WIF1 est un événement fréquent dans les carcinomes recto-coliques corrélé à un mauvais pronostic. Nous avons aussi montré que l'hyperméthylation de CDH1 et WIF1 est le mécanisme majeur de la perte d'expression des protéines correspondantes dans les CCRs. Ces gènes constituent donc des marqueurs de mauvais pronostic pour les patients originaires du Sud tunisien atteints de cancer colorectal.

REFERENCES

- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646-74
- Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ. Colorectal cancer. *The Lancet* 2010; 375(9719): 1030-1047.
- Sellami A, Sellami-Boudawara T, Hsairi M, Jliidi R, Achour N, Zitoun I et al. Incidence des cancers dans le gouvernorat de Sfax Année 2000-2002. *Registre du cancer du sud tunisien* 2007; 2: 18-20.
- Heavey PM, McKenna D, Rowland IR. Colorectal cancer and the relationship between genes and the environment. *Nutri Cancer* 2004; 48: 124-141.
- Bodmer WF. Cancer genetics: colorectal cancer as a model. *J Hum Genet* 2006; 51(5): 391-396.
- Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer --analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *New England Journal of Medicine* 2000; 343: 78-85.
- Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. *Science* 1999; 286(5439): 481-6.
- Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2004; 4: 988-993.
- Szyf M. Targeting DNA méthylation in cancer. *Bull Cancer* 2006; 93: 961-972.
- Miladi-Abdennadher I, Abdelmaksoud-Dammak R, Ayadi L, Khabir A, Frikha F, Kallel L et al. Hyperméthylation of RAR β correlates with high COX-2 expression and poor prognosis in patients with colorectal carcinoma. *Tumor Biology* 2010; 31(5):503-11.
- Miladi-Abdennadher I, Abdelmaksoud-Dammak R, Ayadi L, Khabir A, Frikha F, Kallel L et al. Aberrant Methylation of hMLH1 and p16INK4a in Tunisian patients with sporadic colorectal adenocarcinoma. *Bioscience Report*, 2011; 31(4):257-64.
- Abdelmaksoud-Dammak R, Miladi-Abdennadher I, Saadallah-Kallel A, Khabir A, Sellami-Boudawara T, Frikha M et al. Downregulation of WIF-1 and Wnt5a in patients with colorectal carcinoma: clinical significance. *Tumor Biology* 2014; 35(8):7975-82.
- Agathangelou A, Cooper W N, Latif F. Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Res* 2005; 65, 3497-3508
- Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat. Genet.* 2000; 25:315-319.
- Fendri A, Masmoudi A, Khabir A, Sellami-Boudawara T, Daoud J, Frikha M et al. Inactivation of RASSF1A, RAR β and DAP-kinase by promoter methylation correlates with lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Biol Therapy* 2009; 8:(5)1-8
- Karray-Chouayekh S, Trifa F, Khabir A, Boujelbane N, Sellami-Boudawara T, Daoud J et al. Aberrant methylation of RASSF1A is associated with poor survival in Tunisian breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136(2):203-10
- Fernandes MS, Carneiro F, Oliveira C, Seruca R. Colorectal cancer and RASSF family--a special emphasis on RASSF1A. *Int J Cancer* 2013; 132(2):251-8.
- Cohen O, Feinstein E, Kimchi A. DAP-kinase is a Ca²⁺/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. *EMBO J* 1997; 16: 998-1008.
- Cohen O, Inbal B, Kissil JL, Raveh T, Berissi H, Spivak-Kroizaman T et al. DAP-kinase participates in TNF- α and Fas-induced apoptosis and its function requires the death domain. *J Cell Biol* 1999; 146:141-148.
- Gozuacik D, Kimchi A. DAPK protein family and cancer. *Autophagy* 2006; 2(2):74-9.
- Mittag F, Kuester D, Vieth M, Peters B, Stolte B, Roessner A et al. DAPK promoter methylation is an early event in colorectal carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2006; 240(1):69-75.
- Pehlivan S, Artac M, Sever T, Bozcuk H, Kilincarslan C, Pehlivan M. Gene methylation of SFRP2, P16, DAPK1, HIC1, and MGMT and KRAS mutations in sporadic colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; 201(2):128-32.
- Liu ZM, Ding F, Guo MZ, Zhang LY, Wu M, Liu ZH. Downregulation of retinoic acid receptor- β 2 expression is linked to aberrant methylation in esophageal squamous cell carcinoma cell lines. *World J Gastroenterol* 2004; 110: 771-5.
- Yang Q, Mori I, Shan L, Nakamura M, Nakamura Y, Utsunomiya H et al. Biallelic inactivation of retinoic acid receptor β 2 gene by epigenetic change in breast cancer. *Am J Pathol* 2001; 158: 299-303.
- Virmani AK, Rathi A, Zochbauer-Muller S, Sacchi N, Fukuyama Y, Bryant D et al. Promoter methylation and silencing of the retinoid acid receptor- β gene in lung carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:1303-7.
- Ivanova T, Petrenko A, Gritsko T, Vinokourova S, Eshilev E, Kobzeva V et al. Methylation and silencing of the retinoic acid receptor- β 2 gene in cervical cancer. *BMC Cancer* 2002; 2:1-7.
- Côté S, Sinnott D, Momparler RL. Demethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine of specific 5-methylcytosine sites in the promoterregion of the retinoic acid receptor beta gene in human colon carcinoma cells. *Anticancer Drugs* 1998; 9:743-50.

29. Sun SY. Retinoic acid receptor β and colon cancer. *Canc Biol Ther* 2004; 3:87-8.
30. Youssef EM, Estecio MRH, Issa JP. Methylation and regulation of expression of different retinoic acid receptor- β isoforms in human colon cancer. *Canc Biol Ther* 2004; 3: 82-6.
31. Xu XL1, Yu J, Zhang HY, Sun MH, Sun MH, Gu J, Du X et al. Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2004; 10(23):3441-54.
32. Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 619-627.
33. Garinis GA, Menounos PG, Spanakis NE, Papadopoulos K, Karavitis G, Parassi I et al. Hypermethylation-associated transcriptional silencing of E-cadherin in primary sporadic colorectal carcinomas. *J Pathol* 2002; 198: 442-449.
34. Lee S, Hwang KS, Lee HJ, Kim JS, Kang GH. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in colorectal neoplasia. *Lab Invest* 2004; 84: 884-893
35. Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW et al. Constitutive transcriptional activation by β -catenin – Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* 1997; 275:1784-7.
36. Hiltunen MO, Alhonen L, Koistinaho J, Myöhänen S, Pääkkönen M, Marin S et al. Hypermethylation of the APC adenomatous polyposis coli) gene promoter region in human colorectal carcinoma. *Int J. Cancer* 1997; 70:644-648.
37. Esteller M, Sparks A, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA et al. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res* 2000; 60:4366-4371.
38. Chen J, Röcken C, Lofton-Day C, Schulz HU, Müller O, Kutzner N et al. Molecular analysis of APC promoter methylation and protein expression in colorectal cancer metastasis. *Carcinogenesis* 2005; 26(1):37-43.
39. Lin SY, Yeh KT, Chen WT, Chen HC, Chen ST, Chiou HY et al. Promoter CpG methylation of tumor suppressor genes in colorectal cancer and its relationship to clinical features. *Oncol Rep* 2004; 11:341-348.
40. Jascur T, Boland C.R. Structure and function of the components of the human DNA mismatch repair system. *Int J Cancer* 2006; 119:2030-2035.
41. Dunlop MG, Farrington SM, Carothers AD, Wyllie AH, Sharp L, Burn J et al. Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. *Hum Mol Genet* 1997; 6:105-110.
42. Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 2002; 196:1-7.
43. Yang H, Hoshino K, Sanchez-Gonzalez B, Kantarjian H, Garcia-Manero G. Antileukemia activity of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid. *Leuk Res* 2005; 29: 739-748.
44. Iacopetta B, Grieu F, Li W, Ruskiewicz A, Caruso M, Moore J et al. Gene methylation is inversely correlated with features of the CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2006; 119(10): 2272-2278.
45. Kawakami K, Ruskiewicz A, Bennett G, Moore J, Grieu F, Watanabe G et al. DNA hypermethylation in the normal colonic mucosa of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 2006; 94(4):593-598.
46. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006; 38: 787-93.
47. Liggett W H, Sidransky J D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16:1197-1206.
48. Liang JT, Chang KJ, Chen JC, Lee CC, Cheng YM, Hsu HC et al. Hypermethylation of the p16 gene in sporadic T3N0M0 stage colorectal cancers: Association with DNA replication error and shorter survival. *Oncology* 1999; 57:149-156.
49. Wiencke JK, Zheng S, Lafuente A, Lafuente MJ, Grudzen C, Wrensch MR et al. Aberrant methylation of p16INK4a in anatomic and gender-specific subtypes of sporadic colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1999; 8:501-506.
50. Trzeciaka L, Henniga E, Kolodziejcki J, Nowacki M, Ostrowski J. Mutations, methylation and expression of CDKN2a/p16 gene in colorectal cancer and normal colonic mucosa. *Cancer Letters* 2001; 163:17-23.
51. Ramirez N, Bandres E, Navarro A, Pons A, Jansa S, Moreno I et al. Epigenetic events in normal colonic mucosa surrounding colorectal cancer lesions. *Eur J Cancer* 2008; 44, 2689-269.
52. Wettergren Y, Odin E, Nilsson S, G'oran C, Gustavsson B. P16INK4a gene promoter hypermethylation in mucosa as a prognostic factor for patients with colorectal cancer. *Mol. Med* 2008; 14:412-417.
53. Wissmann C, Wild PG, Kaiser S, Roepcke S, Stoehr R, Woenckhaus M et al. WIF-1, a component of the Wnt pathway, is downregulated in prostate, breast, lung, and bladder cancers. *J Pathol* 2003; 201(2):204-212.
54. Mazieres J, He B, You L, Xu Z, Lee AY, Mikami I et al. Wnt inhibitory factor-1 is silenced by promoter hypermethylation in human lung cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 4717-7420.
55. Fendri A, Khabir A, Hadri-Guiga B, Sellami-Boudawara T, Daoud J, Frikha M et al. Epigenetic alteration of the Wnt inhibitory factor-1 promoter is common and occurs in advanced stage of Tunisian nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Invest* 2010; 28:896-903.
56. Taniguchi H, Yamamoto H, Hirata T. Frequent epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 in human gastrointestinal cancers. *Oncogene* 2005; 24:7946-7952.
57. Lee BB, Lee EJ, Jung EH, Chun HK, Chang DK, Song SY et al. Aberrant Methylation of APC, MGMT, RASSF2A, and Wif-1 Genes in Plasma as a Biomarker for Early Detection of Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15:6185-6191.
58. Jackson P, Thompson RF. The demonstration of new human brain-specific proteins by high-resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *J Neurol. Sci* 1981; 49:429-438.
59. Okochi-Takada E, Nakazawa K, Wakabayashi M, Mori A, Ichimura S, Yasugi T et al. Silencing of the UCHL1 gene in human colorectal and ovarian cancers. *Int J Cancer* 2006; 119(6):1338-44.
60. Yu J, Tao Q, Cheung KF, Jin H, Poon FF, Wang X et al. Epigenetic identification of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 as a functional tumor suppressor and biomarker for hepatocellular carcinoma and other digestive tumors. *Hepatology* 2008; 48(2):508-18.
61. Mizukami H, Shirahata A, Goto T, Sakata M, Saito M, Ishibashi K et al. PGP9.5 methylation as a marker for metastatic colorectal cancer. *Anticancer Research* 2008; 28(5A):2697-2700.
62. Li M, Song S, Lippman SM, Zhang XK, Liu X, Lotan R et al. Induction of retinoic acid receptor beta

suppresses cyclooxygenase-2 expression in esophageal cancer cells. *Oncogene* 2002; 21:411-8.

63. Lin F, Xiao D, Kolluri SK, Zhang X. Unique anti-activator protein-1 activity of retinoic acid receptor beta. *Cancer Res* 2000; 60:3271-80.

64. Zha S, Yegnasubramanian V, Nelson WG, Isaacs WB, De Marzo AM. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Lett.* 2004;215:1-20

65. Guan RJ, Fu Y, Holt PR, Pardee AB. Association of K-ras mutations with p16 methylation in human colon cancer. *Gastroenterology* 1999; 116.

66. Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, Allen BA et al. BRAF Mutation Is Frequently Present in Sporadic colorectal Nonpolyposis Colorectal Cancer Cancer with Methylated hMLH1, But Not in Hereditary. *Clin Cancer Res* 2004; 10:191-195.

67. Ma Y, Zhao M, Zhong J, Shi L, Luo Q, Liu J et al. Proteomic profiling of proteins associated with lymph node metastasis in colorectal cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* 2010; 110(6): 1512-9.