

研究报告  
Research Report

## 癌症基因异常甲基化标记的鉴定

Hongbo Liu<sup>1</sup>, Zhe Li<sup>2</sup>, Jing Ding<sup>3</sup>, Jie Liu<sup>3</sup>, Yan Zhang<sup>1</sup>

1 哈尔滨医科大学生物信息科学与技术学院, 哈尔滨, 150081;

2 哈尔滨医科大学药学院, 哈尔滨, 150081;

3 哈尔滨医科大学第二附属医院, 哈尔滨, 150081,

✉ 通讯作者: yanyou1225@gmail.com; ✉ 作者

计算分子生物学, 2013 年, 第 2 卷, 第 10 篇 doi: 10.5376/cmb.cn.2013.02.00010

本文首次以英文发表在 Computational Molecular Biology 上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 用中文再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。如果读者对中文含义理解有歧义, 请以英文原文为准。

推荐引用:

Liu et al., 2013, Identification of the *Bona fide* Differentially Methylated Gene Markers among Cancers, Computational Molecular Biology, Vol.3, No.2 6-15 (doi: 10.5376/cmb.2013.03.0002)

**摘要** DNA 甲基化在肿瘤的发展中起着重要的作用。以前的研究已经确定了癌症和正常对照组之间甲基化位点(DMS)的差异, 但是, 甲基化在多发性癌症中的变异并没有被发现。在这项研究中, 我们检测了 6 例癌症(C-DMSs)和 5 例正常对照组(T-DMSs)中的 DMSs, 结果显示 C-DMSs 与 T-DMSs 高度重叠。剔除 T-DMSs 后, 挑选 4159 C-DMSs 用于研究多发性癌症中的甲基化变异。进一步的分析证实了 C-DMSs 在癌症相关基因差异表达中的调节作用, 此外, 发现这些与 C-DMSs 相关的基因在生物学过程中会富集, 如细胞膜的形成、细胞粘附、细胞迁移、免疫应答和细胞增殖以及在肿瘤和膀胱癌路径中。参与肿瘤的发生的 hsa-mir-323 针对 28 个基因, 最后, 我们通过提取蛋白质交互网络确定了潜在的癌症相关基因, 为挖掘潜在的癌症特异性甲基化标志物和癌基因提供了一个新的框架。

**关键词** DNA 甲基化, C-DMSs, 甲基化变异, 肿瘤特异性甲基化标记

## Identification of the *Bona fide* Differentially Methylated Gene Markers among Cancers

Hongbo Liu<sup>1</sup>, Zhe Li<sup>2</sup>, Jing Ding<sup>3</sup>, Jie Liu<sup>3</sup>, Yan Zhang<sup>1</sup>

1 College of Bioinformatics Science and Technology, Harbin Medical University, Harbin, 150081;

2 College of Pharmacy, Harbin Medical University, Harbin, 150081;

3 The Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin, 150081

✉ Corresponding author, yanyou1225@gmail.com; ✉ Authors

**Abstract** DNA methylation plays important roles in the development of cancers. Previous studies have identified the differentially methylated sites (DMSs) between cancer and normal control. However, the methylation variations across multiple cancers have not been revealed. In this study, we identified DMSs among six human cancers (C-DMSs) and DMSs among five normal control tissues (T-DMSs). It is revealed that C-DMSs are highly overlapped with T-DMSs. By excluding the T-DMSs from C-DMSs, 4159 bona fide C-DMSs were selected as methylation variations across multiple cancers. Further analysis confirmed the roles of bona fide C-DMSs in regulation of cancer-related gene expression difference. Moreover, the genes related with these bona fide C-DMSs showed enrichment in the biological processes such as cell membrane components, cell adhesion, cell migration, immune response and cell proliferation, and also the pathways in cancer and bladder cancer. And twenty-eight genes are targeted by

收稿日期: 2013 年 08 月 02 日

接受日期: 2013 年 08 月 19 日

发表日期: 2013 年 09 月 28 日

基金项目: 本研究由黑龙江省教育厅科学研究基金 [12521270]资助

hsa-miR-323 which participates in tumorigenesis. In the end, we identified potential cancer-related genes by extracting protein interaction sub-network. This study provides a new framework for mining the potential cancer-specific methylation markers and oncogenes.

**Keywords** DNA methylation, Bona fide C-DMRs, Methylation variation, Aancer-specific methylation markers

甲基化在癌症的发展中起着重要的作用 (Esteller, 2008)。癌症是一个起源于不同组织的复杂的疾病的集合, 大部分的癌症死亡是因为癌细胞从原来的部位转移到身体的另一个部位 (Rodenhiser, 2009; Bhatia et al., 2012), 除了遗传因素, 也可能是表观遗传学的改变导致癌细胞的转移。一些基因启动子的 DNA 甲基化参与多种重要的与转移相关分子途径 (Heng et al., 2010)。Zhang 等最近的一项研究表明乳腺癌甲基化的不同转移行为具有不同的特征 (Zhang et al., 2006), 但是, 癌细胞特异性的改变及其对肿瘤发生和转移的影响仍不清楚。

对 DNA 甲基化的肿瘤特异性改变的研究可以挖掘人类恶性肿瘤的标志。以前的研究已经利用生物信息学工具 MethMarker 确定了癌症和正常对照组之间甲基化位点 (DMS) 的差异 (Schuffler et al., 2009)。例如, Costello 等确定了异常甲基化 CpG 岛在肿瘤和肿瘤类型特定的甲基化模式 (Costello et al., 2000)。此外, Irizarry 等人关于结肠癌的进一步分析证明 CpG 岛的海岸存在甲基化改变, 他们还从 3 例正常组织中发现了结肠癌和正常粘膜重叠之间的癌症特异性的区域 (脑、肝、脾)。此外, Hansen 等认为结肠癌特异性差异 DNA 甲基化区域可能有助于肿瘤的异质性 (Hansen et al., 2011)。由于 DNA 甲基化的体细胞遗传性和可逆性, 更多癌症特异性的异常甲基化标记的鉴定应该有益于挖掘治疗和诊断指标。

高通量甲基化分析技术使得探索多发性癌症的甲基化变化成为可能。Illumina 人类甲基化 27 芯片允许研究人员询问超过 27000 非常翔实的 CpG 位点跨越 14475 基因包括 1126 肿瘤相关基因的甲基化状态 (He et al., 2007)。这种高密度面板可以让研究人员做到 12 个样本并行, 这使得它有足够的病例进行对照研究, 因此, 该技术已被广泛用于简介癌症和正常组织的甲基化模式 (Calin and Croce, 2006; Wang et al., 2007; Yoon and De Micheli, 2005; Weber et al., 2005), 但是, 对不同肿瘤区域的定位与功能没有一个综合的显示。因此, 在本研究中, 我们针对以下两个问题通过分析六种不同的癌症和五种相应的正常对照组中超过 27000 个 CpG 位点位于基因启动子的甲基化状态。首先, 多发性癌症的甲基化变化位点在哪里? 考虑到 DMRs 在正常组

织中的表达可能在细胞组织特异性基因功能的调节中发挥作用 (Rakyan et al., 2008), 我们分析了 C-DMRs 和 T-DMRs 之间的关系以及检测了善意 C-DMRs。其次, 这些甲基化变化在多发性癌症中的作用是什么? 为此, 我们在其调节机制、与善意 C-DMRs 相关基因的功能注释和蛋白质的相互作用方面进行了全面的研究。

## 1 结果与分析

### 1.1 DNA 甲基化在不同人体组织中的差别

为了分析人类不同类型的癌症及其相应的正常组织的甲基化模式, 我们从六种不同的癌症和五种相应的正常对照组中获得了甲基化状态的含有 27543 个 CpG 位点的 297 例样品。为了查看不同癌症和组织中的甲基化模式, 我们使用欧氏距离进行分层聚类, 所有 297 个样品的层次聚类表现出类似的甲基化模式, 代表相同的组织或癌症, 根据所有组织/癌症复制样本的平均甲基化水平得到的层次聚类也完全区分不同的组织类型, 无论是正常还是疾病状态 (图 1A)。例如, 有三个主要的甲基化集群: 第一个包含了正常的原生质、多发性骨髓瘤和浆细胞白血病, 第二个包括正常的脑和胶质母细胞瘤, 第三个包括正常前列腺和前列腺癌。特别是我们观察到的大肠癌和乳腺癌、正常直肠和正常乳腺的聚类, 这可能是因为大肠癌和乳腺癌拥有共同的易感基因 (Garcia-Patino et al., 1998) 或者常见抑癌基因的异常甲基化 (Agrawal et al., 2007)。使用皮尔森相关系数得到的层次聚类具有与上述观察完全相同的结果。结果表明, 同一组织的不同状态下的甲基化模式比在不同组织中的甲基化模式更相似。

### 1.2 癌症与相应正常对照组甲基化模式的相似性

我们探讨肿瘤和相应的正常对照之间 CpG 位点的甲基化模式在全球范围内的相似性, 有趣的是, 多发性骨髓瘤癌症和浆细胞白血病表现出明显的比其他癌症低的甲基化水平, 并且它们相应的正常组织血浆与其他正常组织相比也表现出较低的甲基化水平 (图 1B), 揭示了癌组织和相应的正常组织之间的甲基化水平的相似性分布。对存在于 CpG 岛和不存在于 CpG 岛的 CpGs 进一步分析表现出相同的结果, 存在于 CpG 岛的 CpGs 的甲基化的水平低于不存在于 CpG 岛的, 关于存在于 CpG 岛的

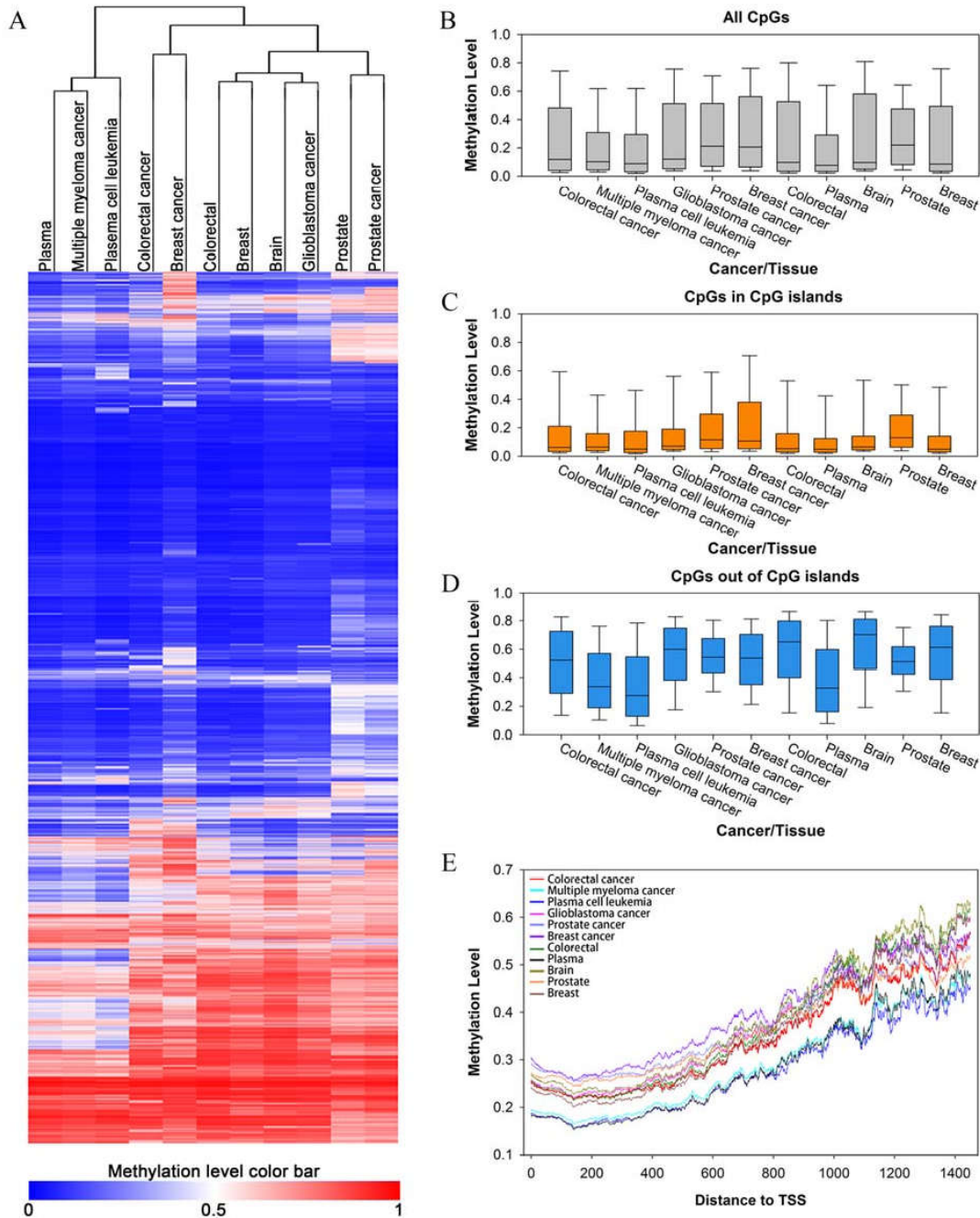


图1 27543个CpG在各种癌症和组织中的甲基化模式

注: (A): 使用27543个CpG中的甲基化水平聚集人类癌症和正常组织, 列代表个体样品(癌症或正常组织), 行代表CpG, 热图显示甲基化水平, 具有更多的甲基化和更少的蓝色; (B): 11个癌症/组织中27543个CpG的甲基化水平; (C): 位于11个癌症/组织中的CpG岛中的CpG的甲基化水平; (D): 位于11个癌症/组织中的CpG岛外的CpG的甲基化水平; (E): 具有与TSS不同距离的CpG的甲基化水平

Figure 1 Methylation pattern of 27543 CpGs in various cancers and tissues

Note: (A) Clustering of human cancers and normal tissues using methylation levels in 27543 CpGs. Columns represent individual samples (cancers or normal tissues), and rows represent CpGs. The heat map shows methylation levels, with being more methylated and blue less. (B) Methylation levels of 27543 CpGs in 11 cancers/tissues. (C) Methylation levels of CpGs located in CpG islands in 11 cancers/tissues. (D) Methylation levels of CpGs located out of CpG islands in 11 cancers/tissues. (E) Methylation levels of CpGs with different distance to TSS

CpGs, 癌症中的甲基化的水平轻微高于正常组织(图1C), 与之前启动子区CpG岛甲基化的报道一致(Koga et al., 2009)。然后, 我们绘制了转录起始位点的上游的甲基化水平(TSS), 结果表明随着所有癌症/组织上游TSS距离的增加甲基化水平逐渐升高(图1D), 所有这些结果表明, 癌症有类似于它们的相应的正常组织的甲基化水平, 因此, 在研究不同癌症之间的甲基化差异时, 有必要考虑组织的甲基化差异。

### 1.3 多发性肿瘤间差异甲基化位点的鉴定

为了挖掘癌症特异性甲基化标志物, 我们使用QDMR确定在多发性癌症和正常组织中的DMSs。QDMR给每个CpG位点分配两熵, 6个癌症甲基化差异的熵范围在0.187~19.057, 5个正常组织甲基化差异的熵范围在0.194~17.673(图2 A; B), 熵越低, 癌症的甲基化差异就越大。基于定量甲基化差异, 当QDMR阈值为6个样品时, 所有CpGs被列为9645 C-DMSs和17898 Cs-UMSs(图2A), 当阈值为5个正常组织时, 所有CpGs被列为8480 T-DMSs和19063 T-UMSs(图2B)。C-DMSs的数量多于T-DMSs, 这表明在多发性癌症中有更多的CpGs有甲基化差异。多发性骨髓瘤和浆细胞白血病中大多数C-DMSs显示比其他类型癌症低甲基化水平(图2C)。巧合的是, 血浆中大多数T-DMSs显示比其他正常组织中低的甲基化水平(Figure 2D)。这表明C-DMSs和T-DMSs在不同的肿瘤/组织间具有相似的甲基化模式, 此外, Cs-UMSs和T-UMSs在所有肿瘤/组织间都表现出了甲基化(图2E; F)。

### 1.4 善意C-DMSs的选择

进一步分析发现57% (5486/9645)的C-DMSs也确定为T-DMSs, 预期只有31% (8480/27543) ( $P < 0.0001$ , 图3A), 因此, 当我们检测善意C-DMSs时也需要考虑T-DMSs。在这里, 善意C-DMSs被定义为在癌症中鉴定为C-DMSs但是在正常组织中鉴定为T-UMSs的CpG位点。基于这些标准, 我们从6例癌症中选取了4159个善意C-DMSs, 这些CpG相比于其他组织在肿瘤中有不同的甲基化, 可能是肿瘤特异性的甲基化标记。这些与善意C-DMSs相关基因的功能可能有助于了解肿瘤中DNA甲基化的作用。

### 1.5 基因甲基化位点功能的差异

为了探讨具有差异甲基化位点的基因的功能, 我们使用DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)对6

例癌症中与4159善意C-DMSs相关的基因进行了功能富集分析, 表明与善意差异甲基化位点相关的基因在与癌症相关的功能中具有富集作用, 如细胞膜组件、细胞粘附、细胞迁移、增殖和细胞免疫反应(表1), 并且在癌症的几个重要信号通路中也有富集。参与肿瘤的发生的hsa-mir-323针对28个基因(Plaisier et al., 2012)。研究表明, miRNA可能是一个潜在的DNA动态甲基化调节器也可能是多种癌症的表观遗传标志。这些结果揭示了DNA甲基化通过调节癌症基因在癌症中的潜在作用。

### 1.6 通过蛋白质相互作用网络识别潜在的癌症基因

我们通过选择含有善意C-DMSs的基因编码的蛋白以及其近邻的蛋白从蛋白质相互作用网络中得到了一个子网络(图4A)。结果表明, 含有善意C-DMSs的基因编码的蛋白容易与其他蛋白相互作用, 在这个网络中, ACSM3与大多数蛋白的相互作用, 据报道, 该基因与肝脏、结肠癌和乳腺癌有关(Chen et al., 2002)。此外, 在这个网络中蛋白功能富集分析揭示了这些蛋白是潜在的癌症相关基因(表2)。

## 2 讨论

在这项研究中, 我们主要关注癌症中差异甲基化的CpG位点, 通过一系列的生物信息学分析, 包括聚类分析、差分位点识别、网络构建与功能富集分析, 我们探讨了差异甲基化CpG位点的特点, 认为6例癌症中的善意差异甲基化位点可能是与DNA甲基化在癌症中真正的功能元素。我们的研究提出了一种新的策略确定癌症特异性的甲基化标志物, 这可能对癌症特异性诊断, 治疗和预后有帮助。

## 3 材料与方法

### 3.1 DNA甲基化数据

DNA甲基化数据以登录号“GSE17648”, “GSE21304”, “GSE22867”, “GSE26319”和“GSE26990”从基因表达数据库(GEO)下载获得(Barrett et al., 2009), 所有这些数据通过Illumina HumanMethylation27 BeadChip (人甲基化27\_270596\_v.1.2)进行分析, 其允许研究人员查询位于NCBI数据库中14,475共有编码测序的转录起始位点的近端启动子区域内的27,578个高信息CpG位点, 在这项研究中, 我们使用27543个甲基化水平已经在来源于6例癌症(大肠癌, 多发性骨髓瘤, 浆细胞白血病, 多形性胶质母细胞瘤, 前列腺癌, 乳

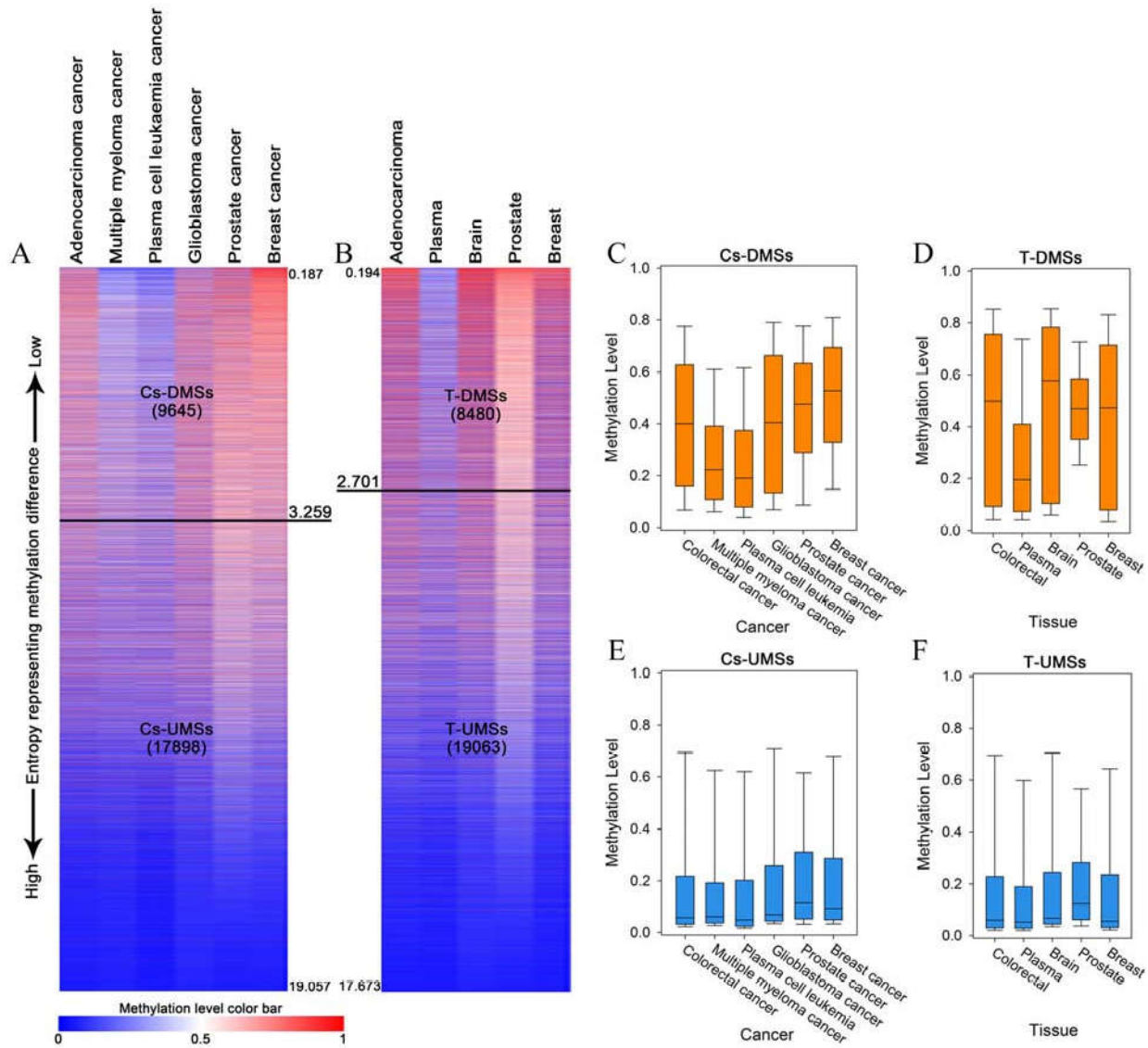


图2 C-DMS, T-DMS, Cs-UMS和T-UMS的甲基化模式

注: (A): CpGs熵通过QDMR排序得到的6例癌症的甲基化热图; (B): CpGs熵通过QDMR排序得到的5例正常组织的甲基化热图; (C-F): C-DMS, T-DMS, Cs-UMS和T-UMS的甲基化水平

Figure 2 Methylation patterns of C-DMSs, T-DMSs, Cs-UMSs and T-UMSs

Note: (A): Methylation heat map across six cancers of CpGs ranked by entropy derived from QDMR; (B) Methylation heat map across five tissues of CpGs ranked by entropy derived from QDMR. (C-F) Methylation levels of C-DMSs, T-DMSs, Cs-UMSs and T-UMSs, respectively

腺癌)以及5例匹配正常对照组织(结直肠, 血浆, 脑, 前列腺和乳腺)的297个样品中检测的CpG。对于每个CpG位点, 癌症/组织中的甲基化水平是每个癌症/组织的所有重复样品中的甲基化水平的平均值。

### 3.2 层次聚类

所有297个样本的CpGs聚类分析和6例癌症和5例正常组织的层次聚类分析都利用GenePattern

(<http://genepattern.broadinstitute.org>) (Reich et al., 2006)。欧氏距离作为列和行距离聚类的距离度量。为了避免在距离测量中出现偏差, 我们还使用皮尔森相关系数对6例癌症和5例正常组织层次聚类进行了重复, 其他参数用作GenePattern中给出的默认值。

### 3.3 C-DMSs和T-DMSs的鉴定

本文中使用的C-DMS和T-DMS通过我们在先前研究中开发的QDMR来鉴定(Zhang et al., 2011)。对于每个CpG位点,通过QDMR定量6种癌症之间的甲基化差异。对于由Q DMR给出的6个样品,熵小于DMR阈值(3.259)的CpG位点被鉴定为C-DMS。我们以同样的方式获得了5个正常对照组织中每个CpG位点的定量甲基化差异和5个样品熵低于阈值(2.701)的T-DMS。

### 致谢

感谢黑龙江省教育厅科学研究基金[12521270]对本研究资助。

	T-DMR	T-UMR
Cs-DMR	5486	4159
Cs-UMR	2994	14904

图3 T-DMR和Cs-DMR的重叠

Figure 3 Overlap of T-DMRs and Cs-DMR

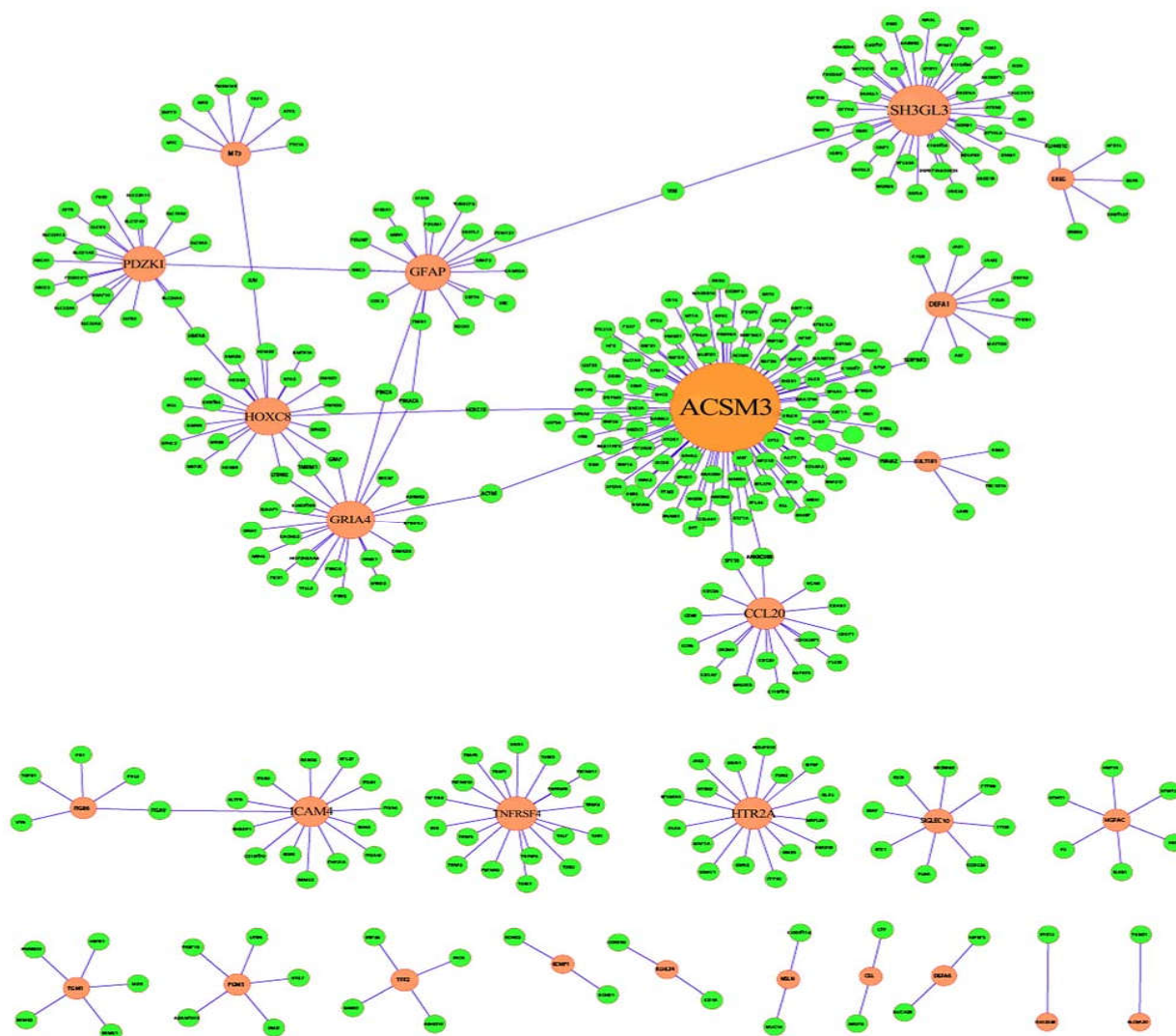


图4基于人类蛋白质相互作用网络的蛋白质相互作用子网络  
注: 橙色代表善意C-DMS的基因编码的蛋白质, 绿色代表它们最邻近的蛋白质

Figure 4 Protein interaction sub-network based on human protein interaction network

Note: The proteins coded by the genes with *bona fide* C-DMSs are in orange, and their nearest neighbor proteins in green

表1与善意c-DMS相关基因的功能富集分析

Table 1 Functional enrichment analysis for genes related with bona fide c-DMSs

Term	Genes
Cell-cell signaling	<i>EREG, HTR2A, GRIA4, CCL20, KCNIP1</i>
Defense response	<i>DEFA1, DEFA6, ITGB6, CCL20, TNFRSF4</i>
Cell adhesion	<i>PGM5, DEFA6, ICAM4, MSLN, SIGLEC10</i>
Biological adhesion	<i>PGM5, ITGB6, ICAM4, MSLN, SIGLEC10</i>
Cell proliferation	<i>PDZK1, MT3, EREG, TNFRSF4, CCL20</i>
Response to wounding	<i>EREG, ITGB6, CCL20, TNFRSF4</i>
Digestion	<i>CAPN9, CAPN9, TFF2</i>
Defense response to bacterium	<i>DEFA1, DEFA6, CCL20</i>
Response to bacterium	<i>DEFA1, DEFA6, CCL20</i>
Negative regulation of cell differentiation	<i>MT3, EREG, DLL3</i>
Positive regulation of multicellular organismal process	<i>EREG, HTR2A, GRIA4</i>
Defense response to fungus	<i>DEFA1, DEFA6</i>
Killing of cells of another organism	<i>DEFA1, DEFA6</i>
Regulation of synaptic transmission, glutamatergic	<i>HTR2A, GRIA4</i>
Cell killing	<i>DEFA1, DEFA6</i>
Response to fungus	<i>DEFA1, DEFA6</i>
Negative regulation of neurogenesis	<i>MT3, DLL3</i>
Negative regulation of cell development	<i>MT3, DLL3</i>

注：这里仅列出了所有GO水平的p值<0.05的注释

Note: Only annotations with p value < 0.05 for GO in all levels are listed here

表2蛋白质相互作用子网中蛋白质/基因的功能富集分析

Table 2 Functional enrichment analysis for Proteins/genes in protein interaction sub-network

Term	Gene Num.	p value
Multicellular organismal process	152	5.01E-12
Homeostatic process	46	1.01E-09
Cell-cell signaling	44	1.14E-09
Response to chemical stimulus	81	1.36E-09
Regulation of multicellular organismal process	54	4.66E-09
Chemical homeostasis	34	1.64E-08
Response to stress	84	2.98E-08
Wound healing	31	6.02E-08
Response to wounding	42	1.49E-07
Ion homeostasis	27	2.40E-07
Developmental process	107	2.74E-07
Cell proliferation	48	4.31E-07
Cell differentiation	70	6.76E-07
Cell morphogenesis	32	1.36E-06
Localization of cell	29	2.08E-06
Cation homeostasis	20	4.47E-06
Regulation of sequence-specific DNA binding transcription factor activity	16	4.77E-06
Regulation of transcription regulator activity	16	5.84E-06
Response to stimulus	157	6.30E-06
Regulation of cell communication	39	6.88E-06
Protein modification process	65	8.71E-06
MAPKKK cascade	20	8.71E-06
Regulation of signaling	51	1.04E-05
Central nervous system development	26	1.48E-05
Immune system process	51	1.76E-05
Response to drug	18	1.78E-05
Small cell lung cancer	10	5.68E-05

---

MI:hsa-miR-323-5p	28	1.03E-04
Regulation of actin cytoskeleton	15	1.75E-04
Pathways in cancer	19	3.58E-04

---

注: 这里仅列出了所有GO水平的p值<0.05的注释

Note: Only annotations with *p* value <0.05 for GO in all levels are listed here

## 参考文献

- Agrawal A., Murphy R.F., and Agrawal D.K., 2007, DNA methylation in breast and colorectal cancers, *Mod Pathol*, 20: 711-721
- Barrett T., Troup D.B., Wilhite S.E., Ledoux P., Rudnev D., Evangelista C., Kim I.F., Soboleva A., Tomashevsky M., Marshall K.A., Phillippy K.H., Sherman P.M., Muertter R.N., and Edgar R., 2009, NCBI GEO: archive for high-throughput functional genomic data, *Nucleic Acids Res*, 37: D885-890
- Bhatia S., Frangioni J.V., Hoffman R.M., Iafrate A.J., and Polyak K., 2012, The challenges posed by cancer heterogeneity, *Nat Biotechnol*, 30: 604-610
- Calin G.A., and Croce C.M., 2006, MicroRNA signatures in human cancers, *Nat Rev Cancer*, 6: 857-866
- Chen X., Cheung S.T., So S., Fan S.T., Barry C., Higgins J., Lai K.M., Ji J., Dudoit S., Ng I.O., Van De Rijn M., Botstein D., and Brown P.O., 2002, Gene expression patterns in human liver cancers, *Mol Biol Cell*, 13: 1929-1939
- Costello J.F., Fruhwald M.C., Smiraglia D.J., Rush L.J., Robertson G.P., Gao X., Wright F.A., Feramisco J.D., Peltomaki P., Lang J.C., Schuller D.E., Yu L., Bloomfield C.D., Caligiuri M.A., Yates A., Nishikawa R., Su Huang H., Petrelli N.J., Zhang X., O'dorisio M.S., Held W.A., Cavenee W.K., and Plass C., 2000, Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns, *Nat Genet*, 24: 132-138
- Esteller M., 2008, Epigenetics in cancer, *N Engl J Med*, 358: 1148-1159
- Garcia-Patino E., Gomendio B., Leonart M., Silva J.M., Garcia J.M., Provencio M., Cubedo R., Espana P., Ramon Y Cajal S., and Bonilla F., 1998, Loss of heterozygosity in the region including the BRCA1 gene on 17q in colon cancer, *Cancer Genet Cytogenet*, 104: 119-123
- Hansen K.D., Timp W., Bravo H.C., Sabunciyan S., Langmead B., Mcdonald O.G., Wen B., Wu H., Liu Y., Diep D., Briem E., Zhang K., Irizarry R.A., and Feinberg A.P., 2011, Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types, *Nat Genet*, 43: 768-775
- He L., He X., Lim L.P., De Stanchina E., Xuan Z., Liang Y., Xue W., Zender L., Magnus J., Ridzon D., Jackson A.L., Linsley P.S., Chen C., Lowe S.W., Cleary M.A., and Hannon G.J., 2007, A microRNA component of the p53 tumour suppressor network, *Nature*, 447: 1130-1134
- Heng H.H., Liu G., Stevens J.B., Bremer S.W., Ye K.J., and Ye C.J., 2010, Genetic and epigenetic heterogeneity in cancer: the ultimate challenge for drug therapy, *Curr Drug Targets*, 11(10): 1304-1316
- Irizarry R.A., Ladd-Acosta C., Wen B., Wu Z., Montano C., Onyango P., Cui H., Gabo K., Rongione M., Webster M., Ji H., Potash J.B., Sabunciyan S., and Feinberg A.P., 2009, The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores, *Nat Genet*, 41: 178-186
- Koga Y., Pelizzola M., Cheng E., Krauthammer M., Sznol M., Ariyan S., Narayan D., Molinaro A.M., Halaban R., and Weissman S.M., 2009, Genome-wide screen of promoter methylation identifies novel markers in melanoma, *Genome Res*, 19: 1462-1470
- Plaisier C.L., Pan M., and Baliga N.S., 2012, A miRNA-regulatory network explains how dysregulated miRNAs perturb oncogenic processes across diverse cancers, *Genome Res*, 22: 2302-2314
- Rakyan V.K., Down T.A., Thorne N.P., Flicek P., Kulesha E., Graf S., Tomazou E.M., Backdahl L., Johnson N., Herberth M., Howe K.L., Jackson D.K., Miretti M.M., Fiegler H., Marioni J.C., Birney E., Hubbard T.J., Carter N.P., Tavare S., and Beck S., 2008, An integrated resource for genome-wide identification and analysis of human tissue-specific differentially methylated regions (tDMRs), *Genome Res*, 18: 1518-1529
- Reich M., Liefeld T., Gould J., Lerner J., Tamayo P., and Mesirov J.P., 2006, GenePattern 2.0, *Nat Genet*, 38: 500-501



- Rodenhiser D.I., 2009, Epigenetic contributions to cancer metastasis, *Clin Exp Metastasis*, 26: 5-18
- Schuffler P., Mikeska T., Waha A., Lengauer T., and Bock C., 2009, MethMarker: user-friendly design and optimization of gene-specific DNA methylation assays, *Genome Biol*, 10: R105
- Wang E., Lenferink A., and O'connor-Mccourt M., 2007, Cancer systems biology: exploring cancer-associated genes on cellular networks, *Cell Mol Life Sci*, 64: 1752-1762
- Weber M., Davies J.J., Wittig D., Oakeley E.J., Haase M., Lam W.L., and Schubeler D., 2005, Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells, *Nat Genet*, 37: 853-862
- Yoon S., and De Micheli G., 2005, Prediction of regulatory modules comprising microRNAs and target genes, *Bioinformatics*, 21 Suppl 2: ii93-100
- Zhang Y., Kobayashi K., Kitazawa K., Imai K., and Kobayashi M., 2006, Contribution of cooperativity and the Bohr effect to efficient oxygen transport by hemoglobins from five mammalian species, *Zoolog Sci*, 23: 49-55
- Zhang Y., Liu H., Lv J., Xiao X., Zhu J., Liu X., Su J., Li X., Wu Q., Wang F., and Cui Y., 2011, QDMR: a quantitative method for identification of differentially methylated regions by entropy, *Nucleic Acids Res*, 39(9):e58