

노화 관련 유전자의 후성유전학적 특성 분석

Epigenetic Characterization of Aging Related Genes

류제운*, 이상철*, 유재수**, 김학용*
충북대학교 생화학과*, 충북대학교 정보통신학과**

Jea Woon Ryu(jwryu84@cbnu.ac.kr)*, Sang Cheol Lee(zero0465@cbnu.ac.kr)*,
Jaesoo Yoo(jsyoo@cbnu.ac.kr)**, Hak Yong Kim(hykim@cbnu.ac.kr)*

요약

유전자 염기서열의 직접적인 변화 대신 염기의 수정 또는 변형을 통해 유전자 발현이 조절되는 후성유전은 크게 DNA 메틸화(methylation), 히스톤 변형(modification), ncRNA(non-coding RNA)에 의해 제어 가능하다. 본 연구에서는 후성유전을 이해하기 위해 노화 관련 유전자를 대상으로 데이터베이스를 구축하고, DNA 메틸화를 중심으로 후성 유전학적 특성을 분석하였다. 유전자의 upstream 부위와 프로모터(promoter) 부위에 있는 CpG island(CGI)에 메틸화가 될 경우 유전자 발현을 억제하기 때문에 CGI를 중심으로 전체 유전자 그룹과 노화 관련 유전자 그룹간의 분포도를 비교·분석하였다. 또한 메틸화와 관련된 CGI로부터 얻은 메틸화 관련 motif 패턴을 이용하여 노화 유전자와의 관계를 분석하였다. 노화 관련 유전자의 CGI 분포는 전사인자 결합자리의 분포와 일치하였다. 본 연구에서 제공하는 DNA 메틸화 중심의 후성유전학적 정보는 노화 관련 유전자의 조절과 노화를 이해하는데 도움이 될 것으로 사료된다.

■ 중심어 : | 노화 | 후성유전학 | DNA 메틸화 | CpG 섬 | 전사인자 결합자리 |

Abstract

Gene expression is regulated by a wide range of mechanisms at the DNA sequence level. In addition, gene expression is also regulated by epigenetic mechanisms through DNA methylation, histone modification, and ncRNA. To understand the regulation of gene expression at the epigenetic level, we constructed aging related gene database and analyzed epigenetic properties that are focused on DNA methylation. The DNA methylation of promoter or upstream region of the genes induces to repress the gene expression. We compared and analyzed distribution between whole human genes and aging related genes in the epigenetic properties such as CGI distribution, methylation motif pattern, and TFBS (transcription factor binding site) distribution. In contrast to methylation motif pattern, CGI and TFBS distributions are positively correlated with epigenetic regulation of aging related gene expression. In this study, the epigenetic data about DNA methylation of the aging genes will provide us to understand phenomena of the aging and epigenetic mechanism for regulation of aging related genes.

■ keyword : | Aging | Epigenomics | DNA mehtylation | CpG island | TFBS |

* 본 연구는 질병관리본부 학술연구용역과제(2013E6200100) 연구비를 지원받아 수행되었습니다.

* 본 논문은 한국콘텐츠학회 2013 춘계 종합학술대회 우수논문입니다.

접수일자 : 2013년 07월 09일

심사완료일 : 2013년 08월 02일

수정일자 : 2013년 07월 25일

교신저자 : 김학용, e-mail : hykim@cbnu.ac.kr

I. 서론

게놈 프로젝트가 밝혀낸 유전체 정보는 사람 간 다양성 및 생명의 비밀을 푸는 열쇠로 받아들여지고 있다 [1-3]. 이러한 선천적 유전체의 중요성에 대한 인식과 연구도 중요하지만, 후천적 요인인 환경에 대한 적응, 식습관, 운동 등도 그에 못지않게 영향을 주기 때문에 이에 대한 인식과 연구도 매우 중요하다고 할 수 있다 [4]. 유전자의 후성유전학적 변화는 신장, 체형, 질병, 노화 등 건강 전반에 걸쳐 영향을 주게 된다. 이와 같이 유전자의 염기서열에는 변화를 주지 않으면서 유전자의 발현 등에 영향을 주어 개체의 차이를 나타나게 하는 현상을 후성유전이라고 하며 이에 대한 연구 분야를 후성유전학(epigenetics)라고 한다[4][5]. 20세기 생명과학이 인간 유전체에 관한 연구라면 21세기 생명과학은 이 후성유전체에 관한 연구가 중요한 대상으로 부각되고 있다[4].

후성유전학적으로 유전자 발현을 조절하는 중요한 세 가지 메커니즘에는 DNA 메틸화 (DNA methylation), 히스톤 변형 (Histon modification), ncRNA (non-coding RNA)가 있다[6]. DNA 메틸화, 히스톤 변형과 ncRNA는 각각 DNA의 변화, 크로마틴 구조의 변화, 및 mRNA 제거 기작을 통해 유전자 발현의 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다[4-6].

유전 또는 환경 요인에 의해 유도되는 노화는 인체의 각 기관과 조직에 기능 저하를 포함한 다양한 변화를 일으키는데, 급속하게 진행되는 고령화가 사회적 문제로 야기됨에 따라 그에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다[7]. 최근 노화에 관련된 유전자에 대한 연구 및 유전자 정보가 급속히 축적되고 있다[8]. 특히 노화는 노화 관련 유전자 자체의 돌연변이도 중요하지만 시간의 흐름에 따른 자연스러운 변화로 후성유전학적 요인에 의해 나타나기 때문에 노화에 대한 후성유전학적 접근은 노화를 이해하는데 중요한 실마리를 제공할 가능성이 높다[8].

후성유전학적으로 가장 많은 연구가 이루어진 DNA 메틸화는 유전자 발현의 억제에 관여한다고 알려져 있는데 특히 CpG site를 중심으로 일어나게 된다[9][10].

본 연구에서는 먼저 노화 관련 유전자 데이터베이스를 구축하고 이 유전자들의 후성유전학적 특성을 분석하고자 하였다. 이를 위해 첫째, 노화관련 유전자의 DNA 메틸화가 일어나는 패턴에 따라 발현이 조절되는 CpG island(CGI)를 중심으로 분석하였다. 둘째, DNA 메틸화가 나타나는 CGI의 분포와 메틸화유무에 따라 도출해낸 모티프(motif) 염기서열을 통해 연관성을 분석하였다. 마지막으로, 노화 유전자의 프로모터 부근에 있는 전사인자 결합자리(transcription factor binding site, TFBS)와 CGI 분포를 비교 분석하여 DNA 메틸화와 유전자 발현 사이의 상관관계를 도출하고자 하였다.

II. 본론

1. 노화 관련 유전자 데이터베이스 구축

노화라는 특수한 현상과 관련하여 알려진 유전자 정보가 많지 않고 연구가 쉽지 않다. 이러한 특성 때문에 사람 대신 모델 생물을 대상으로 노화 연구가 많이 진행되고 있다[11]. 모델 생물을 통해 얻어진 유전자 정보는 노화 관련 후보유전자로써 이용이 가능하다는 장점은 있지만 사람에게 바로 적용할 수 없으며 또한 간접적인 적용을 통해서 얻어진 정보는 정확도의 한계가 있다[11]. 이러한 이유로 본 연구에서는 모델 생체에서 얻은 유전자 정보는 제외하고 사람의 노화와 관련이 있는 유전자만을 세 개의 서로 다른 web-site인, AgingDB(<http://agingdb.bio.pusan.ac.kr>, 58개 유전자), AGEID(<http://sageke.sciencemag.org/cgi/genesdb>, 20개 유전자), 및 GAD (<http://geneticassociationdb.nih.gov>, 658개 유전자)로부터 구축하였다. 서로 다른 web-site로부터 구축한 노화 관련 유전자끼리의 중복성은 매우 낮았다[그림 1]. 각 web-site별로 노화 유전자 데이터베이스를 구축하는 방법과 목적이 달랐기 때문인데, AgingDB는 산화적 스트레스 및 칼로리 제한을 주었을 때 변화하는 유전자[12]를, AGEID는 수명 또는 노화 관련 신경학적 질병을 대상으로 노화 유전자[13]로 구축하였기 때문이다. 이에 반해 노화 관련 문헌의 데이터마이닝 기법을 통해서 얻은 유전자 정보를 포함

한 web-site인 GAD[14]는 유전자의 수가 매우 많은 편이다[그림 1].

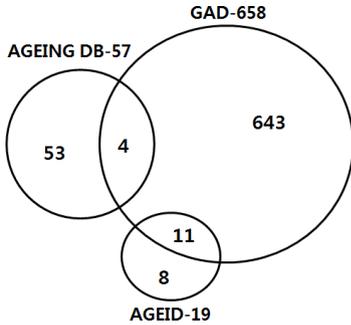


그림 1. 노화 데이터베이스의 유전자 벤다이어그램

2. 노화 유전자의 CpG island(CGI)분석

4개의 염기로 구성되어 있는 DNA 염기 서열 중에서 dinucleotide인 CpG가 나올 확률은 6.25%이다. 그러나 대부분의 인간게놈(98%)에서 CpG가 1~2%로 매우 적게 나타나는데 이를 CpG 억압(CpG suppression)이라고 한다[15]. 인간 유전체의 나머지(2%) 부위에서는 특이적으로 CG의 양이 64%로 매우 높은 특이적인 부위가 있는데 이를 CGI라고 한다[16].

인간 유전체 전체는 CpG가 매우 낮는데 반해 단지 2 퍼센트에 지나지 않는 CGI 부위에 CG가 매우 높게 분포되어 있다는 사실은 이 CGI가 생명체 조절에 관한 특별한 목적이 숨겨져 있다는 것을 충분히 예측할 수 있다. 그 숨겨진 목적은 CGI에 있는 시토신(C)의 5번째 탄소에 메틸화가 일어난다는 것이며 만약 이 부위에 메틸화가 일어나면 유전자의 발현이 억제된다는 사실이다[17]. 예를 들어, 암의 성장을 억제하는 유전자를 TSG(tumor suppressor gene)라고 하는데, 암 세포에서 TSG 유전자의 프로모터 부위에 있는 CGI의 메틸화가 일어난다는 사실이 확인되었다[18]. 암세포의 경우, 암을 억제하는 유전자의 CGI를 메틸화시킴으로써 암 억제 유전자의 발현을 억제함으로써 암 세포가 자유롭게 성장할 수 있는 발판을 만들고 있음을 반영하는 것이다 [19].

UCSC(University of California Santa Cruz)

genome browser site 기반으로 추출한 유전자의 -5000 ~1000bp 염기서열을 CpGCluster 방법을 이용해 노화 관련 유전자 중에서 어느 염기 서열 위치에 CGI가 분포되어 있는지를 분석하였다[20]. CGI를 가지고 있는 유전자는 실험 중심 데이터인 경우 78개 중 60개(77%)였으며 GAD는 659개 중 448개(68%)로 상대적으로 나온 편이다.

CGI 개수, CGI 길이, 및 CGI 분포는 DNA 메틸화를 통한 유전자 발현의 조절에 매우 중요한 인자가 된다. 따라서 사람 전체 유전자의 CGI의 개수와 길이, 분포를 특정 유전자의 그것의 분포를 비교하며 후성유전학적 조절에 대한 상호 차별성에 관한 정보를 얻을 수 있을 것이다. 이를 위해 전체 유전체 및 노화관련 유전자의 CGI 개수, 길이, 및 분포를 비교 분석하였다[그림 2].

노화 유전자들([그림 2] 검정색)의 CGI 개수, CGI 길이, CGI 분포는 인간 전체 유전자들([그림 2], 회색)의 그것과 비교했을 때 큰 차이가 없었다. 암이나 특정 부위의 손상으로 나타나는 질병과는 달리 인간 노화는 특정한 부위나 특정 기작에 의해서 생기는 질병이라기보다는 인간 전체 부위와 전체 기작의 시간의 흐름에 따른 기능저하의 결과다[21]. 따라서 전체 유전자의 후성유전학적 특징과 유사할 것이며 이는 노화 관련 유전자는 특정 기능이나 게놈에 밀집돼 있는 것이 아니라 전체 유전자 전반에 펼쳐져 있다는 것을 반영한 결과이기도 하다[그림 2].

3. 모티프(motif) 패턴 분석

DNA 메틸화는 CGI에서 일어나기 때문에 메틸화 유무는 CGI의 패턴과 밀접한 관계가 있다[22]. 메틸화가 잘 일어나는 CGI 부위의 염기서열과 메틸화가 잘 일어나지 않는 CGI 부위의 염기서열을 MEME (Multiple EM for Motif Elicitation) 도구를 이용하여 각각 나타나는 특이 염기서열 분석하였다. 이 특이 서열을 모티프라고 하는데, 메틸화가 잘 일어나는 모티프를 MP(methylation prone)라고 하며 메틸화가 잘 일어나지 않는 모티프를 MR(methylation resistance)이라고 한다[표 1][21].

먼저, 인간 전체 유전자([그림 3], 실선)와 노화관련

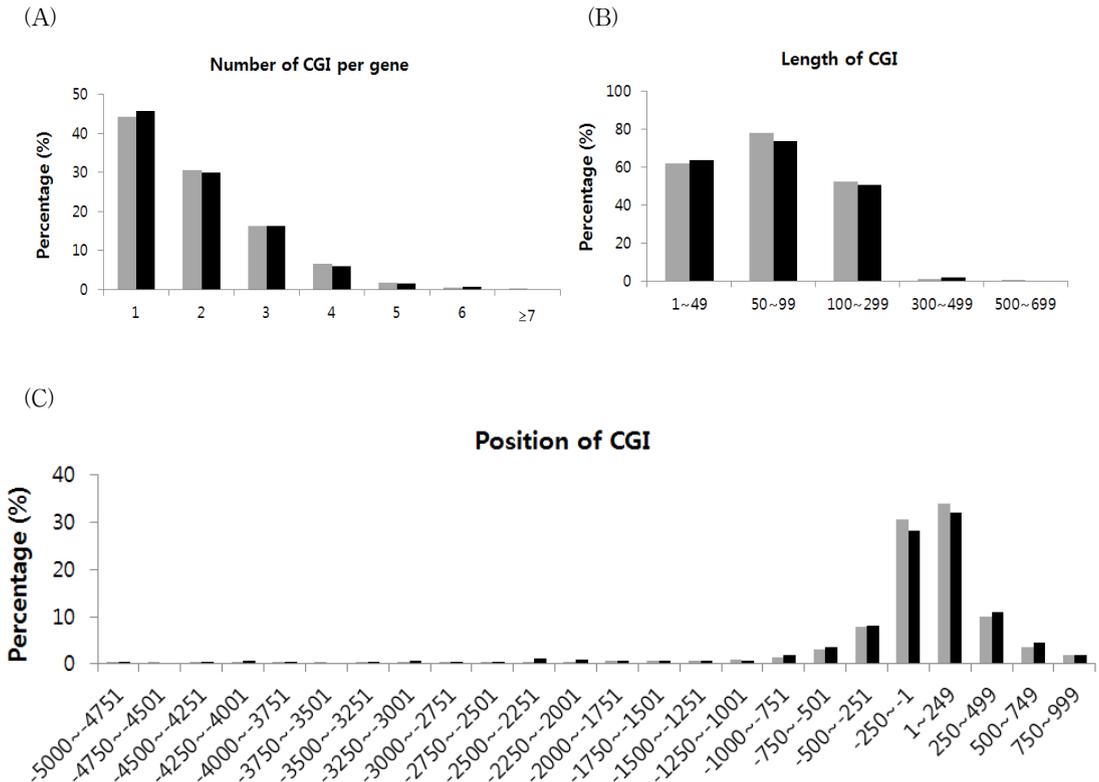


그림 2. 인간 전체 유전자 및 노화 관련 유전자의 CGI 개수(A), CGI 길이(B), 및 CGI 분포(C) 비교 (검정: 노화유전자, 회색: 사람 전체유전자)

유전자(그림 3, 점선)의 메틸화 모티프 분포를 비교 분석하였다. BLAST를 사용하여 MP 모티프, MR 모티프의 유무 및 분포도를 분석하였는데, 모티프 길이가 짧은 것을 감안하여 e-value 10^{-4} 이하, identity 90% 이상으로 제한하여 진행하였다. 그 결과, 노화 유전자와 인간 전체 유전자간에 나타나는 모티프 분포는 차이점을 보이지 않았다(그림 3). 이 결과 역시 노화 관련 유전자들은 인간 유전자 전체에 고르게 분포되었음을 다시 반영한 결과이다.

유전자로부터 upstream 영역인 -5000부터 프로모터(promoter) 직전(-501 bp)까지는 비교적 비슷한 퍼센트로 분포되어 있다가 프로모터 부분부터 분포도가 감소하기 시작하여 TSS(Transcription start site) 부근부터는 메틸화 모티프의 분포도가 급격히 감소하였다(그림 3).

표 1. Motif 염기서열

Motif	Length (bp)	Consensus sequence
MP1	20	GGTGGCTGCGGGGCGAGCAGCTG
MP2	21	AAGAAGGGAGAGAAGGAGGAA
MP3	29	TCCTCTCCCTGTGCTTCTCCTCCTCCTC
MP4	21	GGGGTGGGGGAGGGGGAGGAG
MP5	11	CTCTCCCAAGC
MR1	29	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACAGAGTCT
MR2	15	GTCAGGAGTTTGAGA
MR3	21	GCCCAGGCTGGAGTGCAGTGG
MR4	37	GCCTGTAATCCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGCAGGA
MR5	28	AAAGTGCTGGGATTACAGCGTGAGCCA
MR6	29	CTCACTGCAACCTCCGCTCCCGGGTTCA
MR7	21	TGATCCGCCCGCTCGGCCTC
MR8	21	CCAGCCTGGCCAACATGGTGA

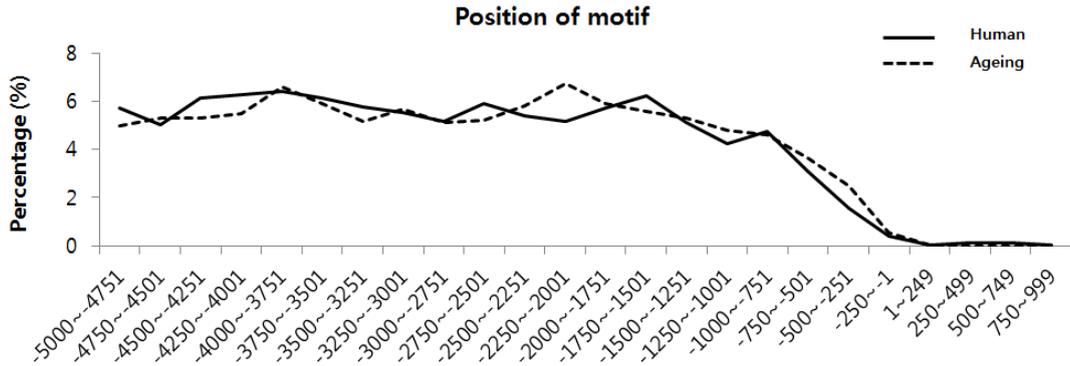


그림 3. 모티프 분포 (MR 모티프 + MP 모티프)

이는 TSS에서 급격히 증가하는 CGI 분포([그림 2]C)와는 상반되는 결과를 보이고 있다. 이와 같은 결과는 본 연구에서 도출한 메틸화 모티프들이 MP 모티프가 아닌 MR 모티프로만 구성되어 있기 때문이다. 다시 말해, MR 모티프는 메틸화가 잘 일어나지 않는 CGI로부터 얻은 모티프이므로, 비교적 메틸화가 잘 일어나는 TSS 부근에 분포하기 보다는 메틸화가 잘 일어나지 않는 프로모터보다 upstream(-5000 ~ -501 bp)에 비교적 더 많이 분포되어 있는 결과로 해석할 수 있다.

4. 전사인자 결합 자리 분석

전사인자(Transcription factor)는 DNA 서열에 특이적으로 붙는 단백질로 DNA에서 RNA로의 전사과정에서 유전자의 발현을 활성화시키거나 RNA polymerase의 작용을 방해하여 발현을 억제하는 역할을 한다 [23][24]. 유전자발현 조절에 중요한 역할을 하는 전사인자 결합 자리에 메틸화가 일어나면 전사인자가 전사인자 결합자리(transcription factor binding site, TFBS)에 결합할 수 없기 때문에 전사가 억제된다. 이는 유전자 염기서열에 따른 CGI 분포와 전사인자 결합 자리 분포는 서로 상관관계가 있을 것으로 판단된다. 따라서 노화 관련 유전자의 염기서열에 따른 전사인자 결합자리 분포를 분석하고 CGI 분포와 비교하였다[그림 4]. 염기서열에 따른 전사인자 결합자리 분포는 유전자의 프로모터 부근에 상대적으로 많이 분포되어 있었으며 이 결과는 CGI 분포([그림 2]C)와 유사한 패턴을

보여준다. 이 결과는 노화 유전자의 프로모터 부근에 존재하는 전사인자 결합자리와 일치하는 CGI에 메틸화가 일어나면 전사인자가 결합할 수 없기 때문에 유전자 발현이 억제되는 생리학적 현상을 그대로 반영하는 것으로 풀이된다.

III. 결론

본 연구에서는 노화 관련 유전자의 CGI 분포, 메틸화 모티프 패턴 및 전사인자 결합 자리 분포간의 상호관계를 분석하였다. 노화는 다른 질병과 달리 어떤 특정 기능을 수행하는 유전자에 의해 이루어지기보다는 인간을 구성하고 있는 모든 생체 기능을 조절하는 유전자에 의해서 나타난다. 따라서 노화 관련 유전자나 인간 전체 유전자의 후성학적 분석 결과는 서로 유사할 것으로 예측하여 수행하였다. 예측한 바와 같이 노화 관련 유전 및 인간 전체 유전자의 CGI 분포, 메틸화 모티프 패턴, 전사인자 결합자리 분포에서 뚜렷한 차이를 보이지 않았다.

노화 관련 유전자의 CGI가 유전자의 발현이 조절되는데 필요한 전사인자 결합자리와 유사한 분포[그림 2][그림 4]를 보이고 MR 모티프와는 상보적인 분포[그림 3]를 보임으로써, DNA 메틸화와 같은 후성유전학적 조절이 노화 관련 유전자의 후성유전학적 특성을 분석하는데 기초 자료로 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

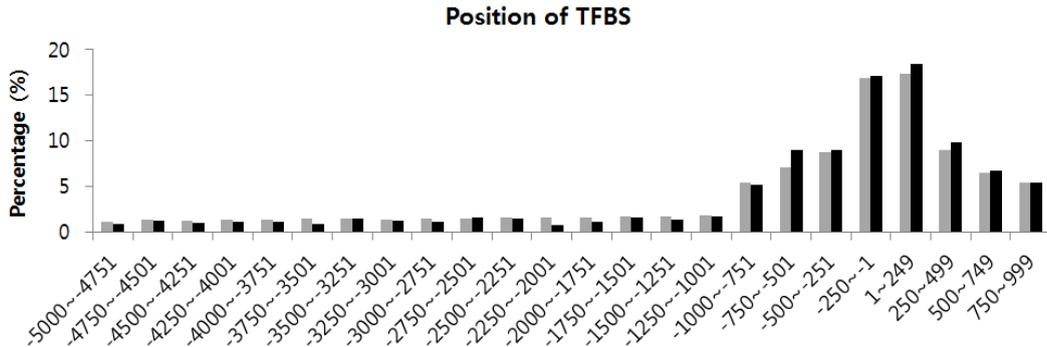


그림 4. 전사인자 결합자리 분포 (검정: 노화유전자, 회색: 사람 전체유전자)

특히, 본 연구에서 제시한 CGI 분포와 전사인자 결합자리 분포가 일치하는 결과는 후성유전학적 연관성을 강력하게 뒷받침하고 있다.

메틸화 MR 모티프는 CGI 분포나 전사인자 결합자리 분포와 달리 오히려 노화 유전자의 프로모터 부근으로부터 멀리 떨어져 있는 부위에서 많이 나타났다. 그러나 MR 모티프가 메틸화가 잘 일어나지 않는 부위라는 특성을 감안하면 당연한 결과이다.

메틸화 MP 모티프는 CGI 분포나 전사인자 결합자리 분포와 일치하게 나타나야 할 것이다. 왜냐하면, 메틸화가 잘 일어나는 염기서열인 MP 모티프는 주로 CGI에 분포되어 있을 것이고, 이는 곧 전사인자 결합자리 분포와 일치하여 DNA 메틸화가 일어나면서 전사인자의 결합을 방해하여 유전자 발현을 억제하기 때문이다. 불행하게도 본 연구에서는 Fetus 등[21]이 제시한 MP 모티프는 노화 관련 유전자에서는 찾을 수가 없었다. 이는 이 MP 모티프가 노화 관련 유전자와는 무관하며, 노화 관련 특이 MP 모티프가 따로 존재하고 있을 가능성을 시사해 준다. 지속되는 연구에서 노화 특이 MP 모티프를 찾아서 CGI 분포나 전사인자 결합자리 분포와 비교한다면 아마도 이들 분포와 일치할 것으로 예상된다. 그러나 현 시점에서 노화 관련 특이 MP 모티프가 존재하는지는 명확하지 않다. 설령 존재하더라도 노화 관련 특이 모티프의 존재를 확인하기란 쉬운 일이 아니다. 왜냐하면 노화 관련 유전자의 수가 절대적으로 적기 때문에 염기서열을 비교 분석하여 모티프를 도출

하는 방법으로는 한계가 있기 때문이다. 그럼에도 불구하고 만약 CGI 분포가 전사인자 결합자리 분포와 일치할 것이라는 가정 하에 출발한다면, 비록 유전자 수는 적지만 프로모터 부위에 있는 노화 관련 염기 서열에 한정시키기 때문에 MP 모티프를 도출할 수 있는 가능성은 충분히 열려 있다고 판단한다. 향후 이에 대한 연구가 필요한 대목이다.

참고 문헌

- [1] J. C. Venter, M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, and R. A. Holt, "The sequence of the human genome," *Science*, Vol.291, No.5507, pp.1304-1361, 2001.
- [2] E. S. Lander, L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, and W. FitzHugh, "Initial sequencing and analysis of the human genome," *Nature*, Vol.409, No.6822, pp.860-921, 2001.
- [3] 강태호, 류제운, 유재수, 김학용, "단백질 허브 네트워크에서 도메인분석을 통한 단백질 기능발견 시스템", *한국콘텐츠학회논문지*, 제8권, 제1호, pp.259-271, 2008.
- [4] R. Jaenisch and A. Bird, "Epigenetic regulation

- of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals," *Nat. Genet.*, Vol.33, pp.245-254, 2003.
- [5] A. P. Wolffe and M. A. Matzke, "Epigenetics: regulation through repression," *Science*, Vol.286, No.5439, pp.481-486, 1999.
- [6] S. Guil and M. Esteller, "DNA methylations, histone codes and miRNAs," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, Vol.41, No.1, pp.87-95, 2009.
- [7] T. B. Harris, L. J. Launer, G. Eiriksdottir, O. Kjartansson, P. V. Jonsson, G. Sigurdsson, G. Thorgeirsson, T. Aspelund, M. E. Garcia, M. P. Cotch, H. J. Hoffman, and V. Gudnason, "Age, Gene/Environment Susceptibility- Reykjavik Study: multidisciplinary applied phenomics," *Am. J. Epidemiol.*, Vol.165, No.9, pp.1076-1087, 2007.
- [8] M. Bibikova, Z. Lin, L. Zhou, E. Chudin, E. W. Garcia, B. Wu, D. Doucet, N. J. Thomas, Y. Wang, E. Vollmer, T. Goldmann, C. Seifart, W. Jiang, D. L. Barker, M. S. Chee, J. Floros, and J. B. Fan, "High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays," *Genome Res.*, Vol.16, No.3, pp.383-393, 2006.
- [9] E. Li, C. Beard and R. Jaenisch, "Role for DNA methylation in genomic imprinting," *Nature*, Vol.366, No.6453, pp.362-365, 1993.
- [10] K. D. Tremblay, J. R. Saam, R. S. Ingram, S. M. Tilghman, and M. S. Bartolomei, "A paternal-specific methylation imprint marks the alleles of the mouse H19 gene," *Nat. Genet.*, Vol.9, No.4, pp.407-413, 1995.
- [11] L. Guarente and C. Kenyon, "Genetic pathways that regulate ageing in model organisms nature," *Nature*, Vol.408, No.6809, pp.255-262, 2000.
- [12] D. U. Park, C. H. Kim, S. E. Hong, B. P. Yu, and H. Chung, "agingDB: A database for oxidative stress and calorie restriction in the study of aging," *J. Am. Aging Assoc.*, Vol.26, No.1-2, pp.11-17, 2003.
- [13] M. Kaerberlein, B. Jegalianb, and M. McVeyc, "AGEID: a database of aging genes and interventions," *Mech. Ageing Dev.*, Vol.123, No.8, pp.1115-1119, 2002.
- [14] K. G. Becker, K. C. Barnes, T. J. Bright, and S. A. Wang, "The Genetic association Database," *Nature Genetics*, Vol.36, No.5, pp.431-432, 2004.
- [15] M. Gardiner-Garden and M. Frommer, "CpG islands in vertebrate genomes," *J. Mol. Biol.*, Vol.196, No.2, pp.261-282, 1987.
- [16] D. Takai and P. A. Jones, "Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol.99, No.6, pp.3740-3745, 2002.
- [17] F. Watt and P. L. Molloy, "Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter," *Genes Dev.*, Vol.2, No.9, pp.1136-1143, 1988.
- [18] I. Keshet, Y. Schlesinger, S. Farkash, E. Rand, M. Hecht, E. Segal, E. Pikarski, R. A. Young, A. Niveleau, H. Cedar, and I. Simon, "Evidence for an instructive mechanism of de novo methylation in cancer cells," *Nat. Genet.*, Vol.38, No.2, pp.149-153, 2006.
- [19] T. H. Huang, M. R. Perry, and D. E. Laux, "Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells," *Hum. Mol. Genet.*, Vol.8, No.3, pp.459-470, 1999.
- [20] M. Hackenberg, C. Previti, P. L. Luque-Escamilla, P. Carpena, J. Martínez -Aroza, and J. L. Oliver, "CpGcluster: a distance-based algorithm for CpG-island detection," *BMC Bioinformatics*, Vol.7, p.446, 2006.

