

원발성 폐암 환자의 혈청에서 DAP kinase 유전자의 Methylation 양상

부산대학교 의과대학 내과학교실, 의학연구소¹

이준희¹, 이정욱, 정경식, 김기욱, 이태근, 이경우
나민아, 전두수, 최영민¹, 김윤성, 이민기, 박순규

=Abstract=

Aberrant Promoter Methylation of Death-Associated Protein Kinase in Serum DNA from Lung Cancer Patients

Jun Hee Lee, M.D., Jung Wook Lee, M.D., Kyung Sik Jung, M.D.,
Ki Uk Kim, M.D., Tae Kun Lee, M.D., Kyung Woo Lee, M.D.,
Min-Ah Na, M.D., Doo Soo Jeon, M.D., Young Min Choi¹,
Yun Seong Kim, M.D., Min Ki Lee, M.D., Soon Kew Park, M.D.

*Department of Internal Medicine, Pusan National University College of medicine,
Medical Research Institute of Pusan National University Hospital¹, Busan, Korea*

Background : Promoter methylation of tumor suppressor genes is one of the key epigenetic changes in many human cancers. The aim of this study was to evaluate the promoter methylation status of the Death-associated protein(DAP) kinase gene, which played an important role in lung cancer, in the serum DNA of primary lung cancer patients.

Methods : This study investigated the aberrant methylation of DAP kinase in the serum of 65 primary lung cancer patients by methylation-specific PCR (MSP).

Results : Methylation in the serum was detected in 29 of 65(44.6%) for DAP kinase. There was no statistical association between methylation of DAP kinase and age, smoking history, histologic type, or stage. Methylation of DAP kinase was found more frequently in men ($p=0.044$).

Conclusions : This study suggests that the aberrant methylation of the DAP kinase promoter is readily detectable in the serum DNA of lung cancer patients using MSP analysis. (*Tuberculosis and Respiratory Diseases* 2003, 55:378-387)

Key words : Lung cancer, DAP kinase, Methylation, Serum DNA, MSP.

Address for correspondence :

Min Ki Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, Pusan National University College of Medicine

1-10, Ami-Dong, Suh-Gu, Busan 602-739, Korea

Phone : 051-240-7216 Fax : 051-254-3127 E-mail : leemk@pusan.ac.kr

서 론

폐암의 발생 기전에서 유전자 이상이 중요한 것으로 알려져 있고, 그 중에서도 종양 억제 유전자의 불활성화는 기관지 상피 세포의 변형과 암세포의 비정상적인 증식, 침습 및 전이에 영향을 미친다고 한다¹. 종양 억제 유전자가 불활성화 되는 기전으로 유전자의 돌연변이, 이형접합체 소실(loss of heterozygosity, LOH) 등이 원인으로 알려져 있다. 또한 최근 promoter의 비정상적인 메틸화에 의한 전사 억제가 유전자 발현을 억제하는 중요한 기전으로 보고되고 있고^{2,3}, 여러 연구에서 폐암 조직에서 메틸화 양상이 보고되었다⁴⁻⁶.

DNA 메틸화는 진핵 세포에서 DNA methyltransferase에 의해 cytosine (C) 고리의 5번째 탄소에 methyl기가 추가되어 5-methylcytosine (mC)이 되는 것을 말한다^{3,7}. DNA 메틸화는 dinucleotide인 CpG에서 발견되며 유전자 활성도를 억제하는 강력한 기전으로 사람의 여러 종양에서 메틸화 양상의 변화가 유전자 발현, 염색체 구조와 염색질 형성의 이상에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다^{8,9}.

Death associated protein (DAP)중 DAP-2는 DAP kinase로 불리며, serine/threonine kinase로 interferon γ 에 의한 세포자멸사에 관여하고 전이를 억제한다고 한다¹⁰. 동물 모델에서 암의 전이와 DAP kinase 발현이 관련이 있다는 보고가 있고¹¹, 여러 악성 종양에서 이 유전자의 promoter CpG 메틸화가 유전자 발현을 억제하여 종양 형성과 전이에 관여한다고 알려져 있다¹⁰. 폐암에서도 생물학적 침습성을 결정하는 중요한 인자로 관여할 것으로 생각되어진다¹².

이런 메틸화의 확인은 조직뿐만 아니라 객담¹³, 기관지 폐포세척액¹⁴, 혈액¹⁵을 이용한 비침습적인 검사방법이 시도되고 있다.

정상인에서 혈액내 나노그램 양의 DNA가 순환한다는 것이 보고되었고, 암환자의 경우 정상인과

비교하여 약 4배 가량의 DNA가 암환자의 혈청에 존재한다는 보고가 있다¹⁶⁻¹⁹.

본 연구에서는 원발성 폐암 환자의 혈청에서 DNA를 추출하여 폐암 전이와 관련이 있다고 알려진 DAP kinase 유전자의 혈청에서의 메틸화 양상을 확인하고 비침습적인 검사로서 의의를 알아보았다.

대상 및 방법

1. 대 상

본 연구의 대상은 2000년 3월부터 2001년 12월까지 부산대학교 병원에서 조직학적으로 원발성 폐암으로 진단 받은 환자 중 총 65명으로부터 채취된 혈액 검체를 이용하였다.

2. 방 법

1) Genomic DNA 추출

대상 폐암 환자의 혈청 1ml에 1×SDS/PK(1% SDS, 500 μ g/ml Proteinase K, 0.5M Tris, 0.02M EDTA, 0.1M NaCl) 1ml을 첨가하여 48°C에서 16시간 이상 반응시킨 후, 이 반응액에 동량의 phenol/chloroform(PC-8){Aquaphenol 250ml(pH8.0, Q-biogene, USA), dd H₂O 40ml, 0.5M EDTA 2.5ml, Chloroform 200ml}을 첨가하여 30초간 진탕하였다. 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 새 튜브에 넣은 후 동량의 PC-8을 첨가하여 동일한 과정을 한번 더 반복 후 취해진 상층액에 100% 에탄올 800 μ l와 7.5M Ammonium acetate 100 μ l, glycogen(20mg/ml, Roche, Germany) 1 μ l를 첨가하여 -20°C에서 1시간이상 방치한 뒤 4°C에서 15,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 얻어진 DNA 압착 결정(pellet)에 70% 에탄올 1,000 μ l을 주입하고 12,000 rpm에서 5분간 원심분리한 다음, 상층을 제

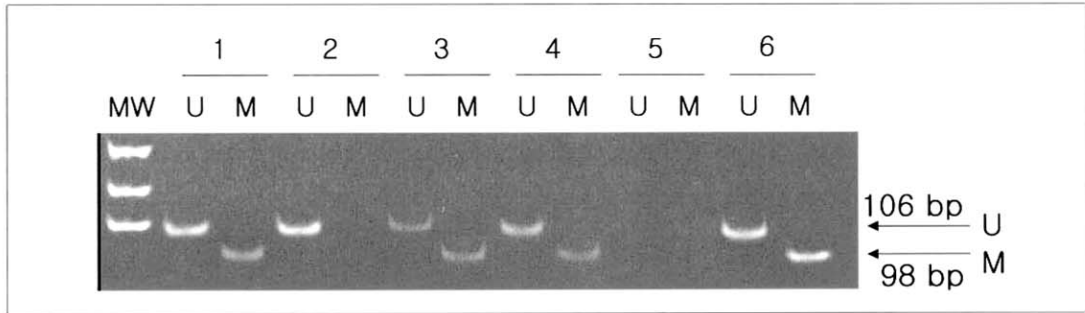


Fig 1. Methylation specific PCR of DAP kinase in the serum DNA of the primary lung carcinoma. The presence of a visible PCR product in lanes U indicates the presence of unmethylated genes. The presence of product in lanes M indicates the presence of methylated gene. Lane MW, molecular weight marker; Lanes 1-4, patient's sample; Lane 5, Peripheral blood lymphocyte as a negative control for methylation; Lane 6, in vitro methylated DNA as a positive control.

거한 후 DNA 압착결정을 건조시켜 40 μ l의 LoTE (30mM Tris, 0.3mM EDTA)에 용해하여 spectro-photometer로 DNA농도를 측정하였다.

2) Modification 반응

Modification 반응은 CpGenome™ DNA Modification Kit (Intergen, UK)를 이용하였다. 분리한 DNA 1 μ g을 DNA Modification Reagent IV 2 μ l와 멸균 증류수에 혼합하여 부피 100 μ l로 만든 다음 3 M NaOH 7 μ l를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 후 Kit의 방법에 따라 조제한 DNA Modification Reagent I (DNA Modification Reagent I 227 mg, dd H₂O 571 μ l, 3M NaOH 20 μ l) 550 μ l를 첨가하여 진탕 후 50 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 반응시켰다. 반응물에 DNA Modification Reagent III 5 μ l를 첨가한 후 조제한 DNA Modification Reagent II (dd H₂O 750 μ l, β -mercapto-ethanol 0.0375 μ l, DNA Modification Reagent II 1.35 g) 750 μ l를 혼합하여 상온에서 10분간 반응시켰다. 12,000 rpm으로 10초간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 70% 에탄올 1,000 μ l를 주입하여 3번 세척한 다음 15,000 rpm으로 3분간 원심 분리

하여 얻어진 pellet에 20 mM NaOH 90% EtOH (100% EtOH 900 μ l, dd H₂O 93.4 μ l, 3 M NaOH 6.6 μ l) 50 μ l를 첨가하여 진탕 후 상온에 5분간 반응시켜 12,000 rpm으로 1분간 원심한 후 상층액을 제거하고 90% 에탄올로 2번 세정한 다음 15,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 얻어진 pellet에 TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.5) 20 μ l를 첨가하여 50 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시킨 후 15,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 얻어진 상층액을 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였으며, 나머지는 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

3) Methylation specific PCR (MSP)

DAP kinase의 메틸화 양상은 MSP 방법을 이용하였다¹⁹. Primer는 보고된 염기 서열¹²을 참고하여 결정된 oligonucleotide를 사용하였다(Table 1). PCR 반응에 사용된 용액의 조성은 총 25 μ l의 용액 내에 10 \times PCR Gold buffer 2.5 μ l, 2.5 mM dNTP 1.25 μ l, 25 mM MgCl₂ 6.7 μ l, 10 μ M sense primer 1 μ l, 10 μ M antisense primer 1 μ l, modified DNA 2 μ l, AmpliTaq Gold polymerase (Perkin Elmer, USA) 1 unit를 사용하였다. PCR은

Table 1. Primers used in DAP kinase MSP

Primer	Direction	Product size	Sequence
Unmethylated	sense	106bp	5'-GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT-3'
	antisense		5'-CAAATCCCCTCCCAAACACCAA-3'
Methylated	sense	98bp	5'-GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC-3'
	antisense		5'-CCCTCCCAAACGCCGA-3'

GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, USA)을 사용하여, 95℃에서 5분간 반응시킨 후 변성 반응은 95℃에서 45초, 결합 반응은 56℃에서 45초, 연장 반응은 72℃에서 1분씩 반복적으로 35 회전을 시행한 후 72℃에서 7분간 더 반응시켰다. 건강 성인의 말초 혈액 림프구에서 추출된 DNA를 modification한 것을 양성 대조로 하였다. PCR 과정이 끝난 후 얻어진 MSP 반응물 10 μ l를 10% native acrylamide gel에 100 volt에서 1시간 30분 동안 전기영동을 실시하여 ethidium bromide로 염색 후 106 bp의 unmethylation된 DNA 분절과 98bp의 methylation된 DNA 분절을 자외선 조사기 상에서 확인하였다.

3. 통계학적 처리

통계 처리는 SPSS version 10.0프로그램을 사용하여 단변수 분석에는 chi-square test를, 다변수 분석에는 logistic regression analysis를 시행하였다. p 값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의한 것으로 정의하였다.

결 과

1. 대상 환자들의 임상적, 병리학적 특징

대상 환자는 총 65명 중 남자 43명, 여자 22명이었고, 평균 연령은 61세이었으며 흡연자가 37명, 비흡연자가 28명이었고, 흡연자의 평균 흡연력은

Table 2. Clinical characteristics of primary lung cancer patients

No. of cases	65
Age (mean)	61 years
Sex	
male	43(66%)
female	22(34%)
Smoking	
smoker*	37(57%)
nonsmoker	28(43%)

*22.1 pack/year in mean smoking history

22.1갑/년이었다. 원발성 폐암의 조직형은 선암 32명, 편평 세포암 24명, 선편평 세포암 1명, 소세포암 8명이었고, 비소세포암의 병기는 1기 6명 (IA:3명, IB:3명), 2기 6명 (IIA: 1명, IIB: 5명), 3기 11명 (IIIA: 3명, IIIB: 8명), 4기 34명이었으며 소세포암은 제한적 병기 3명, 광범위 병기 5명이었다 (Tables 2, 3).

2. DAP kinase 유전자의 메틸화 빈도

전체 대상 환자 65명 중 29명(44.6%)에서 DAP kinase 유전자의 메틸화를 확인할 수 있었고, 남자가 23명(53.5%), 여자가 6명(27.3%)으로 남자 군에서 의미 있게 메틸화 빈도가 높게 나타났다($p=0.044$). 흡연에따른 메틸화 빈도는 흡연자 군 37명 중 19명(51.4%)으로 비흡연자 군 28명 중 10명(35.7%)보다 높게 나타났으나, 통계학적 유의성은 없었다($p=0.209$). 환자의 연령에 따른 차이도

Table 3. Distribution of clinical stages according to histologic types of primary lung cancers

	IA	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV	Limited	Extensive	Total
ADC	2	1	1	2	2	3	21			32(49%)
SCC	1	2	0	3	1	5	12			24(37%)
ADSC							1			1(2%)
SCLC								3	5	8(12%)

ADC : Adenocarcinoma, SCC : Squamous cell carcinoma,

ADSC : Adenosquamous cell carcinoma, SCLC : Small cell lung carcinoma

Table 4. Clinical characteristics associated with DAP kinase methylation in primary lung cancer patients

Characteristics	Total no.	Serum positive no.(%)
No. of cases	65	29(44.6)
Sex Male	43	23(53.5)*
Female	22	6(27.2)
Age <60	28	16(57.1)
≥60	37	13(35.1)
Smoker	37	19(51.4)
Nonsmoker	28	10(35.7)

* $p<0.05$ **Table 5.** Clinicopathologic characteristics associated with DAP kinase methylation in primary lung cancer patients

Characteristics	Total no.	Serum positive no.(%)
Tumor T1	5	2(40.0)
T2	12	4(33.3)
T3	18	7(38.9)
T4	22	11(50.0)
Node N0	9	4(44.4)
N1	9	4(44.4)
N2	15	7(46.7)
N3	24	10(41.7)
Metastasis M0	23	12(52.2)
M1	34	13(38.2)
Limited	3	1(33.3)
Extensive	5	3(60.0)

없었다(Table 4)($p=0.206$). 종양의 조직형이나
($p=0.311$), 임상적 병기에 따른 메틸화 빈도의 차
이도 없었다(Table 5, 6)($p=0.328$).

고 찰

폐암의 발생은 유전적 변화가 축적되는 다단계 과

Table 6. Distribution of DAP kinase methylation according to clinical stages and histologic types of primary lung cancers

	IA	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV	Limited	Extensive
	positive no. / total no. (%)								
ADC	1/2(50)	0/1(0)	0/1(0)	0/2(0)	1/2(50)	2/3(66.7)	7/21(33.3)		
SCC	0/1(0)	1/2(50)	0/0(0)	1/3(33.3)	1/1(100)	4/5(80)	5/12(41.7)		
ADSC							1/1(100)		
SCLC								1/3(33.3)	3/5(60)

ADC : Adenocarcinoma, SCC : Squamous cell carcinoma,

ADSC : Adenosquamous cell carcinoma, SCLC : Small cell lung carcinoma

정을 거치며²⁰, 종양 억제 유전자의 불활성화는 폐암의 발생에 중요하다고 알려져 있다.⁷ 종양 억제 유전자가 불활성화 되는 기전 중 최근 promoter의 비정상적인 메틸화에 의한 전사 억제가 유전자의 발현을 억제하는 중요한 기전으로 보고되고 있다²³.

척추동물에서 생물학적으로 의미 있는 메틸화는 CpG dinucleotide 쌍의 cytosine 염기에서만 일어나는 것으로 알려져 있다³⁷. CpG의 빈도가 예측된 수치보다 더 높게 나타나는 것을 CpG islands라고 하며 보통 유전자의 5' 부위에서 발견되며 promoter 부위에 포함되어 있고, 크기는 대략 1 kb 정도이고, 전체 유전자의 1%정도를 차지한다⁸.

DNA 메틸화의 종양 발생 기전 가설로는 메틸화 감소로 억제되어 있던 종양 형성 유전자(proto-oncogenes)가 발현된다는 설과 증가된 메틸화로 종양 억제 유전자의 전사가 억제되어 세포 증식을 억제할 수 없게 된다는 설이 있으며, 이러한 비정상적인 메틸화가 돌연 변이의 가능성을 증가시키고, 염색체의 안정성을 감소시켜 비정상적인 단백질을 형성함으로써 간접적으로 유전자 활성화도에 영향을 줄 수 있다고 보고되고 있다³. 또한, 메틸화된 cytosine은 저절로 탈 아미노화되어 thymine으로 바뀌는 경향이 있어 이로 인해 점 돌연변이(point mutation)를 야기할 수 있으며 이 과정이 종양 억제 유전자에서 일어난다면 세포 증식을 조

절하는 능력을 상실하게 된다⁷.

DAP kinase 유전자는 염색체 9q34.1 부위에 위치하며²¹, 160 kDa의 Ca^{2+} /Calmodulin 의존성의 serine/threonine kinase로 kinase domain, ankyrin repeats, death domain등으로 구성되고²², 세포 골격계에 위치하며 apoptosis에 관여하고¹⁰, DAP kinase 발현 억제가 HeLa 세포의 interferon γ 에 의한 세포 자연사에 대한 감수성을 감소시키는 것으로 알려졌다²³.

DAP kinase 유전자는 여러 악성 종양에서 종양 억제 유전자로서의 역할이 제시되었고²⁴⁻²⁸, Inbal 등¹¹은 동물 실험 모델에서 DAP kinase 회복후 Lewis 암종의 폐전이 억제되며, DAP kinase 발현 감소가 폐암의 전이와 관련이 있음을 확인하였다. 따라서 DAP kinase 유전자가 전이를 억제하는 종양 억제 유전자의 역할을 하며 또한 폐암의 전이과정에서 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 한편, 방광암과 B 세포 림프종 환자에서 DNA 메틸화를 억제하는 5-aza-2'-deoxycytidine이 DAP kinase 발현을 유의하게 회복시킨 경우가 보고 되어 메틸화 억제가 DAP kinase의 종양 억제 기능 회복에 관여할 가능성을 뒷받침하고 있다^{10,24}.

폐암 조직에서 DAP kinase 유전자의 메틸화의 빈도를 보면, Tang 등¹²은 135명중 59명(44%), Zöchbauer-Müller 등⁶은 107명 중 20명(19%)으로

보고하고 있다. 또한, Esteller 등¹⁵은 폐암 환자들을 대상으로 한 연구에서 MSP 방법을 사용하여 22명 중 조직에서 메틸화가 확인된 5명(23%) 중 4명(80%)의 혈청에서 DAP kinase 유전자의 메틸화를 관찰하여 총 22명 중 4명(18%)의 혈청에서 메틸화를 확인하여 혈액을 이용한 종양 유전자 메틸화 검사의 가능성을 최초로 제시하였다. 이후 혈액 검체를 이용한 메틸화 확인에 대한 연구가 진행중으로 Wong 등²⁸은 비인두 암종 환자에서 MSP 방법을 사용하여 32명의 조직에서 24명(75%)의 DAP kinase 유전자의 메틸화를 확인하였으며, 12명 중 8명(67%)의 혈액 검체에서 DAP kinase 유전자의 메틸화를 확인하였다. 또한 Yamaguchi 등³⁰은 대장암 환자에서 MSP 방법을 사용하여 122명의 조직에서 67명(55%)의 DAP kinase 유전자의 메틸화를 확인한 후 이 중 14명의 혈청을 검사하여 3명(21%)에서 메틸화를 확인하였고, 성별, 암의 위치, 분화도, 병기와 메틸화의 관련성은 없다고 보고하였다.

본 연구에서는 혈청 내 DAP kinase 유전자의 메틸화가 비교적 높게 관찰되었으며 남자에서 의미 있게 높은 빈도의 DAP kinase 유전자의 메틸화가 발견되었으나 연령에 따른 차이는 보이지 않았다. 그밖에 조직형이나 병기에 따른 빈도의 차이도 없었지만, Kim 등³¹의 연구에서는 폐암의 병기, 종양의 크기, 림프절 침범과 연관이 있다고 보고하였다. 또한, Tang 등¹²의 연구에 의하면 DAP kinase 유전자의 메틸화가 비소세포 폐암의 초기에 생물학적 침습성 결정에 중요한 역할을 한다고 하여 향후 더 많은 예를 대상으로 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에 사용된 MSP 방법은 Herman 등¹⁹이 처음 보고한 이후로, 십만 개 중 한 개의 메틸화 세포도 확인할 수 있을 정도로 민감한 검사법으로 알려지고 있으며³², 정성적이며 신속하여 환자의 혈청에서 쉽게 다양한 유전자의 promoter 메틸화

를 발견할 수 있어 폐암의 조기 발견이나 치료 등에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 불충분한 bisulfite 처리시 위양성이 생길 수 있는 점을 주의를 요한다¹⁹.

결론적으로 원발성 폐암 환자의 혈청에서 DAP kinase 유전자의 메틸화 양상을 조사한 결과 DAP kinase 유전자의 메틸화가 폐암 환자의 혈청 내에서 비교적 높은 빈도로 검출되었으며, 향후 다른 종양 억제 유전자들의 메틸화 양상과 병행하여 검사시 비침습적인 폐암의 표지자 검사방법으로 사용될 수 있을 것이라 생각된다.

요 약

목 적 :

폐암의 발생 기전에서 종양 억제 유전자의 메틸화가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 폐암의 전이에 관여한다고 알려진 DAP kinase 유전자의 메틸화 양상을 폐암 환자의 말초 혈액 내 종양 DNA를 이용하여 알아보고자 하였다.

방 법 :

조직학적으로 원발성 폐암으로 진단 받은 총 65명을 대상으로 말초 혈액 내에서 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 sodium bisulfite로 처리한 후 methylation specific PCR (MSP) 방법을 사용하여 DAP kinase 유전자의 비정상적인 메틸화 양상을 조사하였으며, 조직학적 양상, TNM 병기, 임상 양상에 따른 비정상적인 메틸화 빈도의 차이점을 보았다.

결 과 :

전체 대상군은 남자 43명(66.2%), 여자 22명(33.8%)이었고 평균 연령은 61.0세, 평균 흡연력은 22.1갑/년이었다. 전체 65명 중 DAP kinase 유전자의 비정상적인 메틸화는 29명(44.6%)였다. 비소세포암은 57명 중 25명(43.9%), 소세포암은 8명 중 4

명(50.0%)에서 비정상적인 메틸화가 관찰되었으며, 조직형에 따른 통계학적 차이는 없었다. 비소세포암과 소세포암 모두에서 TNM병기에 따른 비정상적인 메틸화 빈도의 차이는 없었다.

결 론 :

원발성 폐암 환자의 혈청에서 비교적 높은 빈도로 DAP kinase 유전자의 메틸화를 관찰할 수 있어 비침습적인 종양 표지자 검사로 이용될 수 있는 가능성을 보여준다.

참 고 문 헌

1. Kelley MJ, Nakagawa K, Steinberg SM, Mulshine JL, Kamb A, Johnson BE. Differential inactivation of CDKN2 and Rb protein in non-small cell and small cell lung cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:756-61
2. Fong KM, Sekido Y, Minna JD. Molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;118:1136-52
3. Wajed SA, Laird PW, DeMeester TR. DNA Methylation : An alternative pathway to cancer. *Ann Surg* 2001;234:10-20
4. Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E, Baylin SB, Herman JG. Aberrant methylation of *p16^{INK4a}* is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:11891-6
5. Virmani AK, Rath A, Zöchbauer-Müller S, Sacchi N, Fukuyama Y, Bryant D, Maitra A, Heda S, Fong KM, Thunnissen F, Minna JD, Gazdar AF. Promoter methylation and silencing of the retinoic acid receptor- β gene in lung carcinomas. *J Natl Cancer Inst* (Bethesda) 2000;92:1303-7
6. Zöchbauer-Müller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 2001;61:249-55
7. Singal R, Ginder GD. DNA methylation. *Blood* 1999;93:4059-70
8. Antequera F, Boyes J, Bird A. High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* 1990;62:503-14
9. Keshet I, Leiman-Hurwitz J, Cedar H. DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell* 1986;44:535-43
10. Kimchi A. DAP kinase and DAP-3: novel positive mediators of apoptosis. *Ann Rheum Dis* 1999;58:114-9
11. Inbal B, Cohen O, Polak-Charcon S, Kopolovic J, Vadai E, Eisenbach L, Kimchi A. DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature* 1997;390:180-4
12. Tang X, Khuri FR, Lee JJ, Kemp BL, Liu D, Hong WK, Mao L. Hypermethylation of the death-associated protein (DAP) kinase promoter and aggressiveness in stage I non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000;92: 1511-6
13. Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, Gilliland FD, Baylin SB, Herman JG, Belinsky SA. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res* 2000;60:5954-8
14. Ahrendt SA, Chow JT, Xu LH, Yang SC, Eisenberger CG, Estellar M, Herman JG, Wu L, Decker PA, Jen J, Sidransky D. Molecular

- detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91:332-9
15. Esteller M, Sanchez-Céspedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res* 1999;59:67-70
16. Hibi K, Robinson CR, Booker S, Wu L, Hamilton SR, Sidransky D, Jen J. Molecular detection of genetic alterations in the serum of colorectal cancer patients. *Cancer Res* 1998;58:1405-7
17. Lo YMD, Tein MSC, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PMK, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AMZ, Hjelm NM. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998;62:768-75
18. Wong IHN, Leung T, Ho S, Lau WY, Chan M, Johnson PJ. Semiquantification of circulating hepatocellular carcinoma cells by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 1997;76:628-33
19. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation specific PCR. A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9821-6
20. Thiberville L, Payne P, Vielkinds J, LeRiche J, Horsman D, Nouvet G, Palcic B, Lam S. Evidence of cumulative gene losses with progression of premalignant epithelial lesions to carcinoma of the bronchus. *Cancer Res* 1995;55:5133-9
21. Feinstein E, Druck T, Kastury K, Berissi H, Goodart SA, Overhauser J, Kimchi A, Huebner K. Assignment of DAP 1 and DAPK-genes that positively mediate programmed cell death triggered by IFN- γ to chromosome regions 5p12.2 and 9q34.1, respectively. *Genomics* 1995;29:305-7
22. Cohen O, Feinstein E, Kimchi A. DAP kinase is a Ca^{2+} /calmodulin-dependent cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. *EMBO J* 1997;16:998-1008
23. Deiss LP, Feinstein E, Berissi H, Cohen O, Kimchi A. Identification of a novel serine/threonine kinase and a novel 15-kD protein as potential mediators of the gamma interferon-induced cell death. *Genes Dev* 1995;9:15-30
24. Kissil JL, Feinstein E, Cohen O, Jones PA, Tsai YC, Knowles MA, Eydmann ME, Kimchi A. DAP-kinase loss of expression in various carcinoma and B-cell lymphoma cell lines: Possible implications for role as tumor suppressor gene. *Oncogene* 1997;15:403-7
25. Katzenellenbogen RA, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation of DAP kinase CpG island is a common alteration in B cell malignancies. *Blood* 1999;93:4347-53
26. Ng MH, To KW, Lo KW, Chan S, Tsang KS, Cheng SH, Ng HK. Frequent death-associated protein kinase promoter hypermethylation in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2001;7:1724-9
27. Tada Y, Wada M, Taguchi K, Mochida Y,

- Kinugawa N, Tsuneyoshi M, Naito S, Kuwano M. The association of death-associated protein kinase hypermethylation with early recurrence in superficial bladder cancers. *Cancer Res* 2002;62:4048-53
28. Rosas SL, Koch W, da Costa Carvalho MG, Wu L, Califano J, Westra W, Jen J, Sidransky D. Promoter hypermethylation patterns of *p16*, O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 2001;61:939-42
29. Wong TS, Chang HW, Tang KC, Wei WI, Kwong DL, Sham JS, Yuen AP, Kwong YL. High frequency of promoter hypermethylation of the death-associated protein-kinase gene in nasopharyngeal carcinoma and its detection in the peripheral blood of patients. *Clin Cancer Res* 2002;8:433-7
30. Yamaguchi S, Asao T, Nakamura J, Ide M, Kuwano H. High frequency of DAP-kinase gene promoter methylation in colorectal cancer specimens and its identification in serum. *Cancer Lett* 2003;194:99-105
31. Kim DH, Nelson HH, Wiencke JK, Christiani DC, Wain JC, Mark EJ, Kelsey KT. Promoter methylation of DAP-kinase : association with advanced stage in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 2001;20:1765-70
32. Belinsky SA, Foley JF, White CM, Anderson MW, Maronpot RR. Dose-response relationship between O⁶-methylguanine formation in Clara cells and induction of pulmonary neoplasia in the rat by 4-(methylnitro-sani-mo)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res* 1990;50:3772-80