

Detekcia hypermetylácie DNA ako potenciálny biomarker pre karcinóm prostaty

Detection of DNA Hypermethylation as a Potential Biomarker for Prostate Cancer

Tilandyová P.¹, Kajo K.¹, Kliment J.², Plank L.¹, Lasabová Z.³

¹Ústav patologickej anatómie JLF UK a VNM, Martin, Slovenská republika

²Urologická klinika JLF UK a VNM, Martin, Slovenská republika

³Ústav molekulovej biológie JLF UK a VNM, Martin, Slovenská republika

Súhrn

Karcinóm prostaty patrí medzi najčastejšie sa vyskytujúce nádorové ochorenia mužov vo veku nad 50 rokov. Na vzniku ochorenia sa podieľajú genetická predispozícia ako aj získané genetické a epigenetické zmeny. Najviac študovanou epigenetickou zmenou pri karcinóme prostaty je metylácia cytozínu v CpG ostrovcích promótorových oblastí rôznych génov pomocou metylačne špecifickej PCR. Kvôli hypermetylácii DNA dochádza pomerne často a relatívne špecificky v tkanivách karcinómu prostaty k vypnutiu génov ako *GSTP1*, *APC* alebo *RAS1*. Detekciu metylácie DNA je však možné prevádzať nielen na vzorkách tkanív, ale aj v moči, ejakuláte alebo sére. Translačný výskum preto ďalej hľadá nové biomarkery pre včasnú detekciu a prognózu karcinómu prostaty, vzhľadom na pomerne veľké rozdiely v použitých metódach ako aj v patientskych súboroch však boli získané tak slubné, tak aj kontroverzné výsledky. Preto sú na zistenie skutočného významu detekcie hypermetylácie DNA pre diagnostiku a prognózu karcinómu prostaty potrebné ďalšie randomizované prospektívne klinické štúdie a štandardizácia použitých metód.

Kľúčové slová

karcinóm prostaty – biomarker – DNA metylácia – CpG ostrovcy – PCR metóda

Summary

Prostate cancer is one of the most common malignant diseases in men above the age of 50. A genetic predisposition and/or acquired genetic and epigenetic changes together with lifestyle contribute to the development of the disease. The most studied epigenetic modification in prostate cancer is the methylation of the cytosine located within the dinucleotide CpG of promoter regions of different genes by methylation specific PCR. The evidence of gene silencing by DNA methylation in genes like *GSTP1*, *APC* or *RAS1* is a common and relatively specific event in prostate cancer. DNA methylation testing can be performed on tissue samples or urine, ejaculate or serum. Translational research is searching for new biomarkers for early detection and prognosis of prostate cancer, but because of large methodological differences in applied techniques and patient cohorts, the investigations have yielded promising, but also some controversial results. More prospective randomized trials and standardized methods are needed to assess the true value of methylation for the diagnosis and prognosis of prostate cancer.

Key words

prostate cancer – biomarkers – DNA methylation – CpG islands – PCR

Práca bola podporená grantom UK/54/2009 a projektom „Centrum excelentnosti pre perinatologický výskum“, ktorý je spolufinancovaný zo zdrojov ES (ITMS code 26220120016).

This work was supported in part by the grant No. UK/54/2009 and by the project „Centrum excelentnosti pre perinatologický výskum“ which is supported by ES (ITMS code 26220120016) financial resources.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



RNDr. Zora Lasabová, PhD.
Ústav molekulovej biológie
JLF UK a VNM v Martine
Záborského 2
03601 Martin
Slovenská republika
e-mail: lasabova@jfmmed.uniba.sk

Obdrženo/Submitted: 3. 9. 2009
Přijato/Accepted: 15. 7. 2010

Úvod

Karcinóm prostaty (KP) patrí medzi najčastejšie sa vyskytujúce onkologické ochorenia mužov s narastajúcim trendom výskytu. Slovensko sa hodnotami incidencie karcinómu prostaty zaraďuje medzi štáty so stredne vysokým výskytom tohto ochorenia v Európe. V roku 2003 bolo v Slovenskej republike diagnostikovaných 1 033 mužov s karcinómom prostaty, ktorý je s incidenciou 31/100 000 mužov štvrtým najčastejším zhubným nádorom mužov na Slovensku [1]. Diagnóza včasného štádia karcinómu prostaty je nevyhnutná pre úspešnú liečbu a detekcia prostatického špecifického antigénu (PSA) v sérach pacientov s karcinómom prostaty umožnila zlepšenie diagnostiky a vyšší záchyt včasných štádií tohto ochorenia. Napriek svojim určitým limitom sú preoperatívna hodnota PSA a zdvojnásobenie hodnoty PSA považované za prognostický marker [2,3]. Ďalšími základnými metódami na diagnostiku karcinómu prostaty sú digitálne rektálne vyšetrenia a bioptická diagnostika [4,5], pričom staging a Gleason scoring [GS] sú najspoľahlivejšími prognostickými markermi [2–6]. Predpokladá sa, že približne u 30 % mužov s diagnózou klinicky lokalizovaného ochorenia dôjde ku biochemickej (zvýšenie hodnoty PSA) a/alebo klinickej rekurencii a progresii k metastatickému androgén-nezávislému nádoru prostaty [7]. Vyhľadávanie efektívnych biomarkerov pre nádory všeobecne a nádory prostaty konkrétne patrí medzi oblasti intenzívneho výskumu.

Molekulová biológia karcinómu prostaty je veľmi komplexná a do patogenezy tohto ochorenia je zapojených mnoho génov [8,9], pričom vplyv na vznik genetických zmien majú aj faktory, ako sú životný štýl a zápal. Z hľadiska etiológie je možné rozdeliť karcinómy prostaty na hereditárne a sporadické, ale zatiaľ ich takto nie je možné rozlišovať aj na molekulovej úrovni, pretože na rozdiel od iných nádorov (ako sú napr. nádory hrubého čreva alebo mliečnej žľazy) nepoznáme vysokopenetranté gény zodpovedné za dedičnú formu karcinómu. Predpokladá sa, že hereditárne faktory sa zúčastňujú na vzniku a vývoji približne 5–10 % KP a v súčasnosti je známych viac ako 10 génov,

ktorých alterácie sú spojené so vznikom a progresiou familiárneho KP, pričom najčastejšie sú mutované gény *HKP2/ELAC2*, *RNASEL* a *MSR1* [9]. Nedávno bola identifikovaná asociácia vnímavosti pre adenokarcinóm prostaty na chromozómovom lókuse 5q13q12 s dokázateľne zvýšeným rizikom vzniku hereditárneho a sporadického karcinómu prostaty [10]. Bolo identifikovaných niekoľko polymorfizmov génov, ktoré sú asociované so zvýšeným rizikom vzniku karcinómu a zvýšeným rizikom progresie [8,11]. Tkanivá karcinómu prostaty sa vyznačujú mnohými genetickými zmenami v protonkógénach, tumorsupresorových génoch, génoch zodpovedných za reguláciu bunkového cyklu – apoptózu, bunkovú senescenciu, v génoch zodpovedných za odpoveď na bunkový stres a za detoxikáciu [8,9]. V súčasnosti už vieme, že okrem genetických mechanizmov zohrávajú pri vzniku nádorov dôležitú úlohu aj epigenetické mechanizmy, medzi ktoré patria metylácia DNA a modifikácia histónov [12–15].

V tomto článku sa chceme zaoberať rastúcim významom detekcie hypermetylácie promótorových oblastí génov v tkanivách a telových tekutinách pacientov s karcinómom prostaty a poukázať na ich potenciálny diagnostický a prognostický potenciál.

Metódy na detekciu hypermetylácie CpG ostrovčekov

Metylácia DNA je kovalentná modifikácia DNA spôsobená väzbou metylovej skupiny na cytozín v dvojici báz CpG, pričom metylovanému cytozínu sa hovorí aj piata báza v DNA [16]. Dvojice CpG sú roztrúsené po celom genóme a určitá časť vytvára tzv. CpG ostrovčeky v tých častiach génov, ktoré kontrolujú génovú expresiu a ich súčasťou môže byť samotný promótor, 5' neprekladaná oblasť a prvý exón [16]. Promótorové CpG ostrovčeky sú väčšinou nemetylované, čo vedie ku génovej expresii, dôsledkom ich metylácie môže byť potom transkripčné vypnutie génov [17].

V princípe môžeme metódy na štúdium stupňa metylačného stavu DNA v špecifických sekvenciách rozdeliť do troch hlavných skupín: nebisulfidové a bisulfidové metódy a selektívne

zachytenie sekvencií, ktoré obsahujú metylovaný cytozín (^{5-me}C), pomocou ^{5-me}C-viažucimi proteínmi alebo anti-^{5-me}C protilátkami [18]. Ako prvé sa začali využívať metylačne senzitivné restriktčné endonukleázy kombinované so Southern blottingom alebo PCR detekciou, čo je však obmedzené len na prípady výskytu štiepných miest pre vhodné restriktčné endonukleázy. Etablovanie bisulfidovej modifikácie DNA [20], pri ktorej dochádza ku premene nemetylovaného cytozínu na uracil, zatiaľ čo metylovaný cytozín nereaguje a ostáva cytozínom, umožnilo vývoj základných metód na detekciu metylácie DNA – kombinovanej metódy bisulfidovej modifikácie a restriktčnej analýzy (COBRA) [21] a metylačne špecifickej PCR (MSP) pomocou metylačne špecifických primerov [22].

Práce základného epigenetického a epigenomického výskumu, ktoré vyhladávajú nové relevantné epigenetické zmeny a identifikujú kandidátne gény, využívajú na detekciu celkových zmien v genóme metódy, ktoré sú podrobne preberané v prehľadných článkoch, ktoré publikovali autori Shames et al (2007) a Ho and Tang (2007) [19,23]. Sú to genómové skenovanie na základe restriktčných miest (restriction landmark genomic scanning – RLGS) s nadväzujúcou analýzou pomocou microarray technológie, profilovanie génovej expresie na microarrayoch, inhibícia expresie enzýmov DNA metyltransferáz geneticky alebo RNA interferenciou (RNAi), metylačne senzitivné oligonukleotidové microrarraye, detekcia diferenciálnej metylácie pomocou hybridizácie na CpG microarrayoch, imunoprecipitácia metylovanej DNA alebo metylačne senzitivná restriktčná analýza fingerprint (methylation sensitive restriction fingerprinting – MSRF). Tieto metódy sú veľmi efektívne a umožnili detekciu mnohých nových kandidátnych génov ako možných biomarkerov ochorení. V súčasnosti sa presadzujú vysokokapacitné technológie, ktoré okrem identifikácie nových cieľových génov umožňujú aj vysokokapacitnú analýzu veľkého množstva vzoriek. Medzi tieto nové technológie patrí pyrosekvenácia [24], LUMA (luminometric methylation assay, využívajúca pyrosekvenáciu) [25] a MALDI-TOF [26].

Kedže bisulfidová modifikácia je časovo aj metodicky relatívne nenáročný postup, testovanie metylačného stavu rôznych génov sa stalo súčasťou mnohých výskumných projektov na univerzitných pracoviskách. Najčastejšia metóda, ktorá sa využíva pri týchto štúdiách, je bisulfidová modifikácia, po ktorej nasleduje metylačne špecifická PCR. Po bisulfidovej modifikácii je totiž podstatne zmenená sekvencia modifikovanej DNA a metylačne špecifické primery sú navrhované tak, aby sa viazali buď na DNA, ktorá je metylovaná (a kde cytozín po modifikácii ostal cytozínom), alebo na nemetylovanú DNA (cytozín sa po modifikácii zmenil na uracil, čo znamená tymín v PCR produkte) [22]. Jedna vzorka je potom analyzovaná pomocou oboch typov primerov v dvoch nezávislých PCR reakciách a vyhodnotená v agarózovej elektroforéze zafarbenej etídiom bromidom. Ďalšou metódou, ktorá našla uplatnenie v klinickom výskume, je COBRA [21]. Pri nej sa po bisulfidovej modifikácii DNA prevedie klasická PCR, ktorej primery sa neprekývajú s CpG ostrovcami, a následne sa prevedie restričná analýza PCR produktu, pričom k štiepeniu dôjde, len ak nebol cytozín kvôli metylácii zmenený [21]. PCR na bisulfidom modifikovanej DNA, ktorá nerozlišuje medzi metylovanými a nemetylovanými alelami, je východiskovou metódou ďalších aplikácií – bisulfidovej sekvenácie [20], nester MSP [27], metylačne špecifickej SSCP analýzy [28] a kvantitatívnej MSP (QMSP) označovanej často aj MethyLigt a jej rôznych modifikácií [29,30], ktoré sa najčastejšie využívajú na konfirmáciu výsledkov získaných v celogenómových štúdiách. Relatívna hladina metylovanej DNA v promótorovej oblasti každej vzorky sa pri QMSP stanovuje ako pomer cieľového génu ku vnútornému referenčnému génu, ktorý je amplifikovaný v modifikovanej DNA bez ohľadu na metylačný stav. Fluorescenčná detekcia značne zvyšuje senzitivitu metódy a umožňuje detekovať jednotlivé metylované alely v 105 nemetylovaných alelách. Táto metóda umožňuje porovnávanie normálnych tkanivových vzoriek s nízkym stupňom metylácie pri testovaní týchto sekvencií a tumo-

rov so značne väčším množstvom metylácie, čo umožňuje kvantitatívne stanovenie metylácie DNA v špecifických sekvenciách.

Hypermetylácia promótorových oblastí DNA v tkanivách karcinómu prostaty – potenciálny biomarker ochorenia

Najlepšie charakterizovaným génom v karcinóme prostaty ohľadne metylácie je glutathion *s*-transferáza π (*GSTP1*). *GSTP1* patrí do rodiny biotransformačných enzýmov, ktoré zohrávajú významnú úlohu pri detoxifikácii bunky katalyzáciou premeny lipofilných metabolitov na lipofóbne, ktoré sú pre bunku menej toxické. Už dávnejšie bola publikovaná práca, kde bola metylácia cytidínu v *GSTP1* detekovaná pomocou metylačne senzitivných restričných endonuleáz, ktorá bola asociovaná so stratou expresie *GSTP1* v histologických preparátoch aj v bunkových kultúrach [31]. Až vyvinutie bisulfidovej modifikácie DNA a metylačne špecifickej PCR rozlišujúcej metylované a nemetylované cytozíny umožnilo ďalší rozvoj intenzívnejších štúdií hypermetylácie CpG ostrovcov aj u *GSTP1* pri karcinómoch prostaty. Pomocou metylačne špecifickej PCR, konfirmovanej sekvenáciou bisulfidom modifikovanej DNA, bola potvrdená nielen metylácia cytidínu v promótoře *GSTP1*, ale bola detekovaná hypermetylácia celého CpG ostrovčeka promótoru, pričom v normálnom prostatickom tkanive takáto hypermetylácia detekovaná nebola [32]. Promótorová hypermetylácia sprevádzaná stratou funkcie *GSTP1* je jednou z najčastejších a najbežnejších somatických epigenetických zmien pri karcinóme prostaty, ktorá sa vyskytuje už aj v prostatickej intraepitelovej neoplázii (PIN) [32,33] a v 36–94,2% karcinómoch prostaty [34–37]. V prácach boli publikované aj rôzne frekvencie hypermetylácie v závislosti od toho, či bolo vyšetrované formalínom fixované a do parafínu zaliate (FFPE) tkanivo, kde bola metylácia detekovaná v 73% [36], alebo nefixované, na -80°C zamrazené tkanivo, kde bola metylácia detekovaná v 94,2% [37], ako aj v závislosti od použitej metódy [34,36,37]. Kombináciou laserovej mikrodisekcie nádorového tkaniva

a MSP sa podarilo detekovať metyláciu *GSTP1* v 6% lézií proliferatívnej zápalovej atrofie (PIA) u pacientov s karcinómom prostaty [32]. Hoci zvýšená *GSTP1* expresia, ktorá má ochraňujúci efekt pred oxidatívnym poškodením génomu, je charakteristickým znakom PIA, tak strata aktivity *GSTP1* v časti lézií môže odštartovať transformáciu na high-grade PIN a/alebo adenokarcinóm [38]. Tieto údaje ukazujú, že hypermetylácia *GSTP1* sa vyskytuje už aj v skorej karcinogenéze prostaty. Pri porovnávaní frekvencie *GSTP1* imunoreaktívnych buniek v benígnom prostatickom epiteli, primárnom nádore a k nemu patriacim metastázam v lymfatických uzlinách bol dokázaný progresívny úbytok expresie *GSTP1* v biopsických vzorkách vyšetovaných imunohistochemicky, čo sa považuje za dôkaz medzi hypermetyláciou a vypnutím génu [38]. Ako vyplýva z hore uvedených štúdií, metylácia promótorovej oblasti *GSTP1* je charakteristickým znakom karcinómu prostaty. Vzhľadom na to, že sa nachádza v prekurzoroch PIN, uvažuje sa o hypermetylacii *GSTP1* ako včasnom biomarkeri prostatického karcinómu.

K ďalším génom, kde bola detekovaná signifikantne vyššia hypermetylácia promótorových oblastí v nádorovom tkanive prostaty ako v tkanive normálnom, patria tumor supresorový gén zodpovedný za dedičnú formu kolorektálneho nádoru a familiárnej adenomatóznej polypózy *APC* [34,39,40], gén pre P-glykoproteín zodpovedný za mnohopočetnú liekovú rezistenciu *MDR1* [40,41], receptory steroidných hormónov *ER α* , *ER β* , *RAR β 2* [42–45], gény kódujúce proteíny zúčastňujúce sa bunkovej adhézie *CD44* [46], *TIG1* [45] a E-cadherin [47], gény kódujúce proteíny podieľajúce sa na bunkovom raste a proliferácii *ZNF185* [48], *NTRK2* [49], na apoptóze ako *CRBP1* [50], na zápale ako *PTGS2/COX2* [40,47]. Podrobne sú tieto gény opísané v prehľadných článkoch Perryho et al (2006, 2008) [12,51]. Na bunkových liniách boli identifikované ďalšie hypermetylované gény v karcinómoch prostaty – *NKX2-5*, *CLSTN1*, *SPOCK2*, *SLC16A12*, *DPYS* a *NSE1*, ktoré boli potom pomocou metód COBRA a pyrosekvenácie

konfirmované aj v patientskych tkanivách [52]. Podobne ako predchádzajúce, tak aj ďalšie nové hypermetylované gény (ako napr. *IGFB3*, ktorý bol hypermetylovaný v tkanivách nádoru prostaty ako aj v high-grade PIN, ale tiež v benígnej hyperplázii, pričom v normálnom prostatickom tkanive nebol metylovaný vôbec [53] a spolu s *GSTP1* vykazoval koreláciu s GS) potrebujú rozsiahlejšiu konfirmáciu v ďalších štúdiách, aby sa o nich mohlo uvažovať ako o nových biomarkeroch KP.

Hypermetylácia génov, ktoré by mohli slúžiť ako včasný marker nádorového ochorenia, však musí spĺňať aj ďalšie podmienky, a síce, mala by byť pre daný nádor čo najšpecifickejšia. Príkladom signifikantnej hypermetylácie a nádorovej nešpecificity môže byť napríklad gén *CDKN2*, ktorý je síce hypermetylovaný už aj v HGPIN [34], ale zároveň bola detekovaná jeho hypermetylácia v celom rade ďalších nádorov [54]. Práve preto nie je ani detekcia hypermetylácie samotného génu *GSTP1* ako skorého biomarkera karcinómu prostaty dostatočná, pretože *GSTP1* môže byť, aj keď s nižšou frekvenciou, hypermetylovaný aj v iných typoch nádorov, napr. mliečnej žľazy, obličiek a pečene [54]. Z tohto dôvodu môže metylačný profil viacerých génov, ktoré majú nižšie individuálne frekvencie metylácií ako *GSTP1*, zlepšiť špecifickosť detekcie karcinómu prostaty a poskytovať lepší diagnostický alebo prognostický význam. Rôzne štúdie sledovali metyláciu promótorových oblastí týchto génov, pričom sa snažili rozlíšiť gény, ktoré sú metylované už v prekursoroch (napr. v HGPIN alebo PIA), čo sa týka hlavne génov *GSTP1*, *APC*, *RARβ2*, *CRBP1* a *COX2* [34,39,44,47,55,56], ktoré by mohli byť aj biomarkermi včasného ochorenia a prognózy. Bolo dokázané, že kombinácia hypermetylácie *GSTP1* a *APC* je vysoko špecifická pre karcinóm prostaty (v porovnaní s benígnou prostatou) a môže správne identifikovať 77–98 % tumorov [40]. Gén *MDR1* kóduje P-glykoproteín (PGP), ktorý podobne ako *GSTP1* patrí takisto k detoxikačným enzýmom a zabezpečuje vyplavovanie škodlivých metabolitov z bunky. Jeho zvýšená expresia je asociovaná s rezistenciou voči

nádorovej terapii substrátmi PGP. Rozsiahla štúdia, ktorá kvantifikovala metyláciu šestnástich rozdielnych génov, opísala panel štyroch génov (*GSTP1*, *APC*, *PTGS2* a *MDR1*), ktoré vedú rozlíšiť primárny karcinóm prostaty od benígneho tkaniva prostaty s 92% presnosťou a citlivosťou blížiacu sa 100 % [57]. Bolo dokázané, že kombinácia hypermetylácie *NSE1* a *SPOCK2*, ktorá je špecifická v 95 % pre bunkové línie karcinómu prostaty, môže správne identifikovať 80 % tumorov [52]. Gén pre FYN tyrozínovú kinázu je tiež hypermetylovaný v primárnom karcinóme, pričom v nenádorových tkanivách prostaty a benígnej hyperplázii (BHP) hypermetylácia nebola detekovaná [59].

Ako sme už uviedli vyššie, tak niektoré práce zaznamenali veľké rozdiely v detekcii hypermetylácie, ktoré môžu byť výsledkom biologických rozdielov v študovaných populáciách a študovaných patientskych súboroch, ako aj rozdielov v preparácii klinických vzoriek a v použití rozdielnych metodických prístupov. Sú to najmä metódy ako QMSP alebo konvenčná MSP a nested MSP, ktoré sa v klinických štúdiách využívajú najčastejšie. Pri QMSP (ktorá sa zdá byť najvyužívanejšou metódou na testovanie klinických vzoriek pri relatívnej kvantifikácii hypermetylácie) je dôležitou časťou interpretácie výsledku stanovenie prahovej hodnoty a porovnanie s benígnymi tkanivami [36,37,39]. QMSP je najčastejšie dizajnovaná tak, že detekuje relatívne množstvo metylovanej DNA v porovnaní s metyláciou *MYOD1* génu, ktorý slúži ako referenčný gén a kde nebola preukázaná stúpajúca metylácia s vekom [29,39]. Pri detekcii metylácie *GSTP1* a porovnaní tkanív s BPH, PIN a KP bolo množstvo detekovanej metylácie medzi týmito jednotlivými štádiami signifikantne odlišné. Stredné hodnoty logaritmu pomeru *GSTP1/MYOD1* boli pre BPH 0 (interval 0–0,1), pre PIN 1,4 (interval 0–45,9), pre karcinóm prostaty 250,8 (rozsah 53,5–697,5), hraničná hodnota pre negatívu cut-off bola určená 10 [31]. Z uvedeného je zrejme, že aj keď bola dokázaná minimálna metylácia aj v BPH alebo PIN, tak v nádorovom tkanive je úroveň metylácie výrazne vyššia [36,37,39].

Význam detekcie hypermetylácie DNA v nádorovom tkanive – diagnostický a prognostický potenciál

Jedným z faktorov, ktoré môžu ovplyvniť bioptickú diagnostiku karcinómu prostaty, je falošne negatívny výsledok ihlovej biopsie, ktorá minie samotný nádor. QMSP analýza *GSTP1* spoločne s bioptickou diagnostikou vzoriek ihlovej biopsie ukázala zlepšenie citlivosti detekcie tumoru vo vyhodnocovanom nádore prostaty o 11 %, a to bez negatívneho vplyvu na špecifickosť [37]. Pri tejto štúdii boli využité tkanivá pacientov po prostatektómii s určenou diagnózou karcinómu prostaty a tkanivá pacientov po cystoprostatektómii kvôli nádoru močového mechúra. Z týchto tkanív boli urobené sextantové biopsie, ktoré však boli zmrazené na –80 °C a neskôr v slepej analýze vyhodnocované skúseným uropatológom. Predtým však už bol známy staging a grading týchto nádorov. V takto postavenom experimente QMSP *GSTP1* detekovala 9 prípadov karcinómu prostaty, ktoré boli histologicky nespoznané, a histológia naopak identifikovala 2 prípady, ktoré boli prehliadané QMSP *GSTP1*. Autori práce tieto výsledky interpretujú ako dôkaz potreby skombinovať obe metódy pri detekcii karcinómu prostaty [37].

Zisťovanie efektívnosti multigénového metylačného panelu pre zlepšenie citlivosti histopatologickej detekcie karcinómu pri ihlových biopsiách na paneli štyroch lokusov (*GSTP1*, *APC*, *TIG1*, *RARB2*) zlepšilo citlivosť diagnostiky karcinómu prostaty o 33 % v porovnaní s histológiou samotnou [56]. Avšak autori tiež potvrdzujú, že použitie mrazených bioptických rezov je oveľa obtiažnejšie pre histologické zhodnotenie, než je hodnotenie štandardných parafínových rezov. Niektoré štúdie sa zaoberajú analýzou metylácie panelov viacerých génov, pričom v niektorých štúdiách sa porovnáva ich metylácia a vypočítavajú sa rôzne skórovacie systémy na zlepšenie špecificity a senzitivity daných testov [34,47,56]. Jedným z nich je metylačný index (MI) definovaný ako pomer metylovaných génov a celkového počtu analyzovaných génov. Pri porovnávaní metylácie panelu až 10 génov a Gleaso-

novho skóre (GS) bola dokázaná korelácia medzi výškou MI a Gleasonovým skóre väčším ako 7 [34]. Analýza prognostického významu metylácie promotora malého panelu génov (*APC*, *CCND2*, *GSTP1*, *RARB2* a *RASSF1*) pomocou QMSP z tkanív pacientov s histologicky potvrdeným karcinómom prostaty ukázala, že vysoký stupeň metylácie promotora *APC* je nezávislým prediktorom nepriaznivej prognózy v biotických vzorkách prostaty a mohol by poskytovať dôležitú informáciu o prognóze pre zlepšenie manažmentu pacientov [58]. Vysoké frekvencie metylácie génov *APC*, *GSTP1*, *MGMT* a *RASSF1A* (56,8%, 86,5%, 75,7% a 83,8%) boli detekované v nádoroch prostaty a korelované s hladinami PSA a GS, pričom bola dokázaná zvýšená metylácia génov *APC*, *RASSF1A* a *RUNX3* v nádoroch pri vyššom GS a vyššími hodnotami PSA [47]. Pri porovnávaní prognostickej hodnoty hypermetylácie promotórov u génov *PTGS2*, *RAR-beta* a *EDNRB* sa ukázalo, že kombinácia viacerých génov zvyšuje diagnostickú efektivitu, pričom hypermetylácia *PTGS2* korelovala s infiltráciou seminálnych vačkov, infiltráciou púzdra a pT štádiom TNM klasifikácie a *RAR* metylácia bola spojená s vyšším GS [60]. Analýza hypermetylácií *CD44* a *PTGS2* zase poukázala na ich spojitosť s biochemickou rekurenciou po prostatektómii [61]. QMSP bola použitá k analýze metylačného panelu 9 génov (*Annexin2*, *APC*, *EDNRB*, *GSTP1*, *PTGS2*, *MDR1*, *RARB*, *Reprimo* a *TIG1*), kde frekvencia metylácie v KP bola značne vyššia ako v BHP, pričom kombinácia hypermetylácie *TIG1* a *GSTP1* odlišovala KP od BHP so špecifitou väčšou ako 85% a senzitivitou väčšou ako 93% [62]. Hypermetylácia dvoch génov (napr. *APC* a *TIG1*, *APC* a *GSTP1*, *APC* a *PTGS2*, *APC* alebo *MDR1*, *GSTP1* alebo *PTGS2*) signifikantne korelovala s pT štádiom a/alebo GS. K vzostupu hypermetylácie panelu týchto génov dochádzalo počas progresie karcinómu prostaty a vzostup indikoval skorú biochemickú rekurenciu po radikálnej prostatektómii [62]. V ďalšej štúdii bola pomocou QMSP kvantifikovaná metylácia 12 génov (*MDR1*, *APC*, *BCL2*, *GSTP1*, *PTGS2*, *ASC*, *RARB*, *RARRES1*, *RASSF1*, *RBP1*, *TNFRSF10C* a *THBS1*) v normálnom tkanive prostaty, PIN a KP. Tri

skupiny génov boli rozpoznateľné podľa ich „metylačného správania“ počas mnohokrokovej karcinogenézy. Prvou skupinou boli gény metylované v tkanive prostaty bez neoplastických zmien (*MDR1*, *RARRES1* a *RASSF1*; frekvencia metylácie v normálnom tkanive prostaty > 60%). Druhou skupinu tvorili gény metylované v skorom štádiu neoplázie (*APC*, *GSTP1*, *PTGS2* a *RARB* – neprítomnosť metylácie v normálnom tkanive prostaty, ale prítomnosť metylácie v PIN a KP) a tretiu gény metylované v pokročilom štádiu neoplázie (*ASC*, *BCL2*, *RBP1* a *THBS1* – výskyt metylácie iba v KP). Počet metylovaných génov u jedného pacienta koreloval s výškou hladiny PSA, GS a TNM štádiom [63]. Prevedením celogenómovej analýzy bolo vybratých 62 kandidátnych génov, ktoré boli analyzované v zamrazených tkanivách nádoru prostaty pomocou microarrayas. Metylačná úroveň troch markerových kandidátov *GPR7*, *ABHD9* a exprimovanej sekvencie tag na chromozóme č. 3 (*CHR3-EST*) bola signifikantne zvýšená u pacientov s PSA pozitívnou rekurenciou, pričom najlepšie predpovedali rekurentnosť pri GS 6 alebo 7 [64].

QMSP analýzou bola porovnaná frekvencia metylácie *MCAM* génu v primárnom karcinóme, BHP a v PIN (80%; 12,5% a 23%), pričom bola dokázaná korelácia primárneho karcinómu s GS a pT štádiom (pT3 + pT4). Vysoký stupeň promotórovej metylácie *MCAM* v pokročilom karcinóme prostaty zdôrazňuje jeho využitie ako markera závažnosti nepriaznivej prognózy [65]. Analýza promotórovej metylácie proapoptického génu *HRK* poukázala na jej spojitosť so stratou expresie *HRK* dokázanej pomocou imunohistochemie, ktorá bola zase asociovaná so zníženou apoptózou v tumoroch s GS 5–GS 7 [66]. Pomocou MSP bola detekovaná metylácia CpG ostrovčekov promotórových oblastí *TGFBI* v 82% tkanív s karcinómom prostaty, ktorá korelovala s redukovanou expresiou tohto génu v bunkových líniiach tumoru prostaty. Autori tejto štúdie tvrdia, že detekcia metylácie promotora génu *TGFBI* u pacientov s karcinómom prostaty môže byť použitá ako potenciálny prognostický marker pre invazivitu a budúci vývoj metastáz [67].

Najnovšia štúdia odhalila hypermetyláciu promotórovej oblasti ďalšieho génu *EphA7*, kde bola porovnaná jeho frekvencia metylácie v CaP, BHP a normálnom tkanive prostaty (41,7%; 19,3% a 0%), ktorá korelovala s vyšším GS (GS 7–GS 10) [68]. Pomocou QMSP bola detekovaná hypermetylácia ssDNA-väzbového proteínu 2 (*SSBP2*) v 61,4% primárneho karcinómu prostaty, ktorá bola asociovaná s vyšším štádiom, pričom v BHP táto metylácia detekovaná nebola [69]. Zároveň bolo preukázané, že demetylačný liek 5-aza-2'-deoxycytidín reaktivuje expresiu *SSBP2* v bunkových kultúrach a táto obnovená expresia viedla ku inhibícii tvorby bunkových kolónií v teste na tvorbu kolónií (colony formation assay – CFA) [69]. Ďalšia rozsiahla štúdia na 605 pacientoch s karcinómom prostaty sa zaoberala koreláciou biochemickej rekurencie a hypermetylácie génov *ABDH9*, *Chr3-EST*, *GPR7*, *HIST2H2BF* a *PITX2* pomocou QPCR, ktoré sú signifikantne asociované s biochemickou rekurenciou, pričom najvýznamnejšiu koreláciu v QPCR vykázal gén *PITX2* [70].

Význam detekcie hypermetylácie DNA v telových tekutinách – skríningový potenciál

Ako sme už uviedli, štúdium hypermetylácie v tkanivách nádorov prostaty je súčasťou intenzívneho translačného výskumu a uvažuje sa o nich ako o sľubných biomarkeroch ochorenia a prognostických faktoroch. Aj keď význam mnohých nových poznatkov musí byť potvrdený v ďalších štúdiách a významná je tu aj úloha štandardizácie metód, tak zaujímavou sa v tejto súvislosti javí aj zodpovedanie otázok, či by detekcia hypermetylácie určitých génov v telesných tekutinách, ako napr. sedimentoch moču a extracelulárnej DNA prítomnej v periférnej krvnej plazme a sére, mohla poslúžiť ako nový biomarker karcinómu prostaty vhodný aj pre skríningové vyšetrenia.

Viaceré štúdie publikovali detekciu hypermetylácie DNA v moči. Metylácia *GSPT1* v sére aj moči vykazuje veľké rozdiely v senzitivite, a síce medzi 32 a 72% v plazme [71–74]. V moči sú rozdiely podobné a hypermetylácia bola dokázaná v rozsahu 19 až 54% [71,75]. Tieto diskre-

pancie sú výsledkom využívania rozličných metód, ale aj dôsledkom spôsobu tvorby patientskych súborov. Ak boli pacienti rozdelení do skupiny s progresiou ochorenia a bez nej, tak pacienti bez progresie mali nižší výskyt metylovaných *GSTP*, *RAS1 alpha*, *APC* a *RAR beta* [76]. V pokročilej chorobe sa detekčná schopnosť metylovaného *GSTP1* pohybovala medzi 32 % (73) až 70 % (77). Autori, ktorí tu sledovali aj iné hypermetylované gény, dospeli k záveru, že je potrebné optimalizovať určitý panel génov vhodný pre detekciu nádoru prostaty a sledovanie priebehu ochorenia v sérach. Najčastejšie sú testované okrem *GSTP1* gény *APC*, *RAR beta*, *MDR1*, *PTSG2*, *ARF*, *p16*, *MGMT* a *RASFF1* [73,74,76,78–81]. Štúdia zaoberajúca sa možnosťou využitia neinvazívneho skríningu KP pomocou QMSP vo vzorkách moču zistila, že detekcia hypermetylácie minimálne jedného zo štyroch génov (*GSTP1*, *ARF*, *P16*, *MGMT*) by teoreticky mohla byť schopná identifikovať 87 % pacientov s karcinómom prostaty so 100% špecifickosťou [81]. Autori sú presvedčení, že vzorky moču môžu byť doplnkom k skríningu PSA. Analýza metylačného panelu ôsmich génov (*MDR1*, *EDNRB*, *CD44*, *NEP*, *PTGS2*, *RASSF1A*, *RARβ* a *ESR1*) detekovala v sére pacientov s hormonálne nezávislým metastatickým karcinómom prostaty hypermetyláciu génov *MDR1* (83,3 %), *EDNRB* (50 %), *RARβ* (38,9 %), *GSTP1* (27,8 %) a *NEP* alebo *RASSF1A* (16,7 %). Hypermetylácia CpG ostrovčekov v génoch *CD44*, *PTGS2* a *ESR* nebola prítomná vôbec. Podľa názoru týchto autorov môže byť detekcia hypermetylácie CpG ostrovčekov definovaného panelu génov užitočným biomarkerom pre mužov s hormonálne nezávislým KP [78]. Minuloročná štúdia zaoberajúca sa metylačnou analýzou viacerých génov (*GSTP1*, *PTGS2*, *Reprimo* a *TIG1*) v bezbunkovom sére pacientov s KP, BPH a zdravých jedincov, odhalila pomocou QMSP signifikantne vyššiu hypermetyláciu promótorových oblastí génov *GSTP1* a *TIG1* u pacientov s KP, pričom hypermetylácia *GSTP1* detekovaná v sére pacientov s KP bola signifikantne vyššia ako u pacientov s BPH a špecifita testu medzi týmito dvoma skupinami bola 92 %, ale jej senzitivita iba 42–47 % [74]. Nedávno zverej-

nená multicentrická štúdia využila multiplexnú QMSP na princípe sond škorpión na detekciu 3 epigenetických markerov – *GSTP1*, *RARB* a *APC* – z moča pacientov s KP [80]. Kombinácia týchto troch markerov, ktorá vykazovala 55% citlivosť a 80% špecifitu a bola realizovaná v 9 centrách, predstavuje prototyp klinického testu ako pomôcku pre urológov.

Využitie detekcie hypermetylácie v klinickej praxi

Vzhľadom na dostupnosť rôznych metód na detekciu hypermetylácie promótorov génov došlo v poslednom období k významnému nárastu vedeckých publikácií v tejto oblasti. Výsledkom týchto analýz je narastajúce množstvo poznatkov o epigenetických zmenách v nádoroch prostaty, ale aj úvahy o klinickom využití týchto poznatkov. Pri karcinóme prostaty bolo detekovaných niekoľko sľubných biomarkerov, ako *GSTP1* alebo kombinácia *GSTP1* s *APC* a *RARB*. Než však dôjde k rutinnej aplikácii uvedených markerov do klinickej praxe, sú potrebné ďalšie validačné prospektívne štúdie. Mnohé ďalšie gény, ako *PITX2*, *MCAM*, *TGFBI*, vykazujú asociáciu s prognostickými faktormi pri KP. Ako sme ukázali aj v našej práci, jedným z hlavných problémov je potreba štandardizácie a zjednodušenia metód a hodnotenie výsledkov v externých kontrolách kvality. Podľa nedávnej publikácie pracovnej skupiny Pathobiology pri EORTC je bisulfidová sekvenácia považovaná za optimálnu metódu na detekciu CpG metylácie v nových génoch a pyrosekvenácia je považovaná za metódu voľby pri kvantifikácii rozsahu metylácie jednotlivých CpG dunukleotidov, QMSP je zase považovaná za najsenzitívnejšiu metódu na detekciu metylovaných alel pri štandardizovaných postupoch [82]. Títo autori však zároveň tvrdia, že zatiaľ nie je možné jednoznačne povedať, ktorá z týchto metód a či vôbec bude využívaná na rutinnú klinickú aplikáciu [82]. Detekcia metylácie ako potenciálneho biomarkera by mala byť testovaná aj na základe odporúčania Early Detection Research Network (EDRN) [83].

Stále viacej vedcov a lekárov si uvedomuje, že metylácia DNA môže byť sľubným biomarkerom včasného záchytu

nádorového ochorenia ako aj prognostickým a prediktívnym parametrom a potenciálnym terapeutickým cieľom. Z tohto pohľadu sú potrebné nielen retrospektívne analýzy, ale aj prospektívne klinické štúdie, ktoré sa budú sústreďovať na detekciu a validáciu nových biomarkerov nádorových ochorení, vrátane prostatických nádorov.

Literatúra

1. Incidencia zhubných nádorov v Slovenskej republike 2003. Bratislava: NCZI 2006: 31.
2. Partin AW, Kattan MW, Subong EN et al. Combination of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer. A multi-institutional update. *JAMA* 1997; 277(18): 1445–1451.
3. Ondruš D. Karcinóm prostaty – Epidemiológia, Etiológia, Diagnostika, Klinické prejavy. *Skrínung. Onkológia* 2006; 1(1): 14–18.
4. Kajo K. Biopické vyšetrenie prostaty I. Punkčná biopsia, transuretrálna resekcia a radikálna prostatektómia. *Klin Urol* 2005; 1(1): 8–11.
5. Kajo K, Machálek K. Biopické vyšetrenie prostaty II. Histomorfológické ukazovatele pri karcinóme prostaty. *Klin Urol* 2005; 1(1): 13–17.
6. Liska J, Repiska V, Galbavy S et al. Prostate tumours – histological classification and molecular aspects of prostate tumorigenesis. *Endocr Regul* 2007; 41(1): 45–57.
7. Roberts WW, Bergstralh EJ, Blute ML et al. Contemporary identification of patients at high risk of early prostate cancer recurrence after radical retropubic prostatectomy. *Urology* 2001; 57(6): 1033–1037.
8. Kajo K, Machálek K, Tilandýová P et al. Molekulová patológia karcinómu prostaty (1. časť). *Onkológia* 2009; 4(3): 178–180.
9. Hughes C, Murphy A, Martin C et al. Molecular pathology of prostate cancer. *J Clin Pathol* 2005; 58(7): 673–684.
10. FitzGerald LM, Patterson B, Thomson R et al. Identification of a prostate cancer susceptibility gene on chromosome 5p13q12 associated with risk of both familial and sporadic disease. *Eur J Hum Genet* 2009; 17(3): 368–377.
11. Sionova M, Waczulikova I, Dobrota D et al. Polymorphisms of glutathione-S-transferase M1, T1, P1 and the risk of prostate cancer: a case-control study. *J Exp Clin Res* 2009; 28: 32.
12. Perry AS, Foley R, Woodson K et al. The emerging roles of DNA methylation in the clinical management of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13(2): 357–377.
13. Seligson DB, Horvath S, Shi T et al. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature* 2005; 435(7046): 1262–1266.
14. Baylin S, Bestor TH. Altered methylation patterns in cancer cell genomes: cause or consequence? *Cancer Cell* 2002; 1(4): 299–305.
15. Kurdiani SK. Histone modification as markers of cancer prognosis: a cellular view. *Br J Cancer* 2007; 97(1): 1–5.
16. Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22(22): 4632–4642.
17. Merlo A, Herman JG, Mao L et al. 5 CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor gene p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1995; 1(7): 686–692.
18. Fraga MF, Esteller M. DNA methylation: a profile of methods and applications. *Biotechniques* 2002; 33(3): 632–649.
19. Shames DS, Minna JD, Gazdar AF. Methods for detecting DNA methylation in tumors: from bench to bedside. *Cancer Lett* 2007; 251(2): 187–198.
20. Frommer M, McDonald LE, Millar DS et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-meth-

lycytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(5): 1827–1831.

21. Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(12): 2532–2534.

22. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(18): 9821–9826.

23. Ho SM, Tang WY. Techniques used in studies of epigenome dysregulation due to aberrant DNA methylation: an emphasis on fetal-based adult diseases. *Reprod Toxicol* 2007; 23(3): 267–282.

24. Colella S, Shen L, Baggerly KA et al. Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. *Biotechniques* 2003; 35(1): 146–150.

25. Tost J, El Abdalaoui H, Gut IG. Serial pyrosequencing for quantitative DNA methylation analysis. *Biotechniques* 2006; 40(6): 721–722.

26. Ehrlich M, Nelson MR, Stanssens P et al. Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(44): 15785–15790.

27. House MG, Guo M, Efron DT et al. Tumor suppressor gene hypermethylation as a predictor of gastric stromal tumor behaviour. *J Gastrointest Surg* 2003; 7(8): 1004–1014.

28. Bian YS, Yan P, Osterheld MC et al. Promoter methylation analysis on microdissected paraffin-embedded tissues using bisulfite treatment and PCR-SSCP. *Biotechniques* 2001; 30(1): 66–72.

29. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(8): E32.

30. Swift-Scanlan T, Blackford A, Argani P et al. Two-color quantitative multiplex methylation-specific PCR. *Biotechniques* 2006; 40(2): 210–219.

31. Lee WH, Morton RA, Epstein JI et al. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(24): 11733–11737.

32. Nakayama M, Bennett CJ, Hicks JL et al. Hypermethylation of the human glutathione S-transferase-pi gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: a detailed study using laser-capture microdissection. *Am J Pathol* 2003; 163(3): 923–933.

33. Brooks JD, Weinstein M, Lin X et al. CG Island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7(6): 531–536.

34. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO et al. Aberrant promoter methylation profile of prostate cancers and its relationship to clinicopathological features. *Clin Cancer Res* 2002; 8(2): 514–519.

35. Woodson K, Gillespie J, Hanson J et al. Heterogeneous gene methylation patterns among pre-invasive and cancerous lesions of the prostate: a histopathologic study of whole mount prostate specimens. *Prostate* 2004; 60(1): 25–31.

36. Jerónimo C, Usadel H, Henrique R et al. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(22): 1747–1752.

37. Harden SV, Sanderson H, Goodman SN et al. Quantitative GSTP1 methylation and the detection of prostate adenocarcinoma in sextant biopsies. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(21): 1634–1637.

38. Meiers I, Shanks JH, Bostwick DG. Glutathione S-transferase pi (GSTP1) hypermethylation in prostate cancer: review 2007. *Pathology* 2007; 39(3): 299–304.

39. Jerónimo C, Henrique R, Hoque MO et al. A quantitative promoter methylation profile of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10(24): 8472–8478.

40. Yegnasubramanian S, Kowalski J, Gonzalgo ML et al. Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer. *Cancer Res* 2004; 64(6): 1975–1986.

41. Enokida H, Shiina H, Igawa M et al. CpG hypermethylation of MDR1 gene contributes to the pathogenesis and progression of human prostate cancer. *Cancer Res* 2004; 64(17): 5956–5962.

42. Sasaki M, Tanaka Y, Perinchery G et al. Methylation and inactivation of estrogen, progesterone, and androgen receptors in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94(5): 384–390.

43. Zhu X, Leav I, Leung YK et al. Dynamic regulation of estrogen receptor-beta expression by DNA methylation during prostate cancer development and metastasis. *Am J Pathol* 2004; 164(6): 2003–2012.

44. Jerónimo C, Henrique R, Hoque MO et al. Quantitative RARBeta2 hypermethylation: a promising prostate cancer marker. *Clin Cancer Res* 2004; 10(12 Pt 1): 4010–4014.

45. Zhang J, Liu L, Pfeifer GP. Methylation of the retinoid response gene TIG1 in prostate cancer correlates with methylation of the retinoic acid receptor beta gene. *Oncogene* 2004; 23(12): 2241–2249.

46. Kito H, Suzuki H, Ichikawa T et al. Hypermethylation of the CD44 gene is associated with progression and metastasis of human prostate cancer. *Prostate* 2001; 49(2): 110–115.

47. Kang GH, Lee S, Lee HJ et al. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *J Pathol* 2004; 202(2): 233–240.

48. Vanaja DK, Chevillie JC, Itturia SJ et al. Transcriptional silencing of zinc finger protein 185 identified by expression profiling is associated with prostate cancer progression. *Cancer Res* 2003; 63(14): 3877–3882.

49. Yamada Y, Toyota M, Hirokawa Y et al. Identification of differentially methylated CpG islands in prostate cancer. *Int J Cancer* 2004; 112(5): 840–845.

50. Jerónimo C, Henrique R, Oliveira J et al. Aberrant cellular retinol binding protein 1 (CRBP1) gene expression and promoter methylation in prostate cancer. *J Clin Pathol* 2004; 57(8): 872–876.

51. Murphy TM, Perry AS, Lawler M. The emergence of DNA methylation as a key modulator of aberrant cell death in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2008; 15(1): 11–25.

52. Chung W, Kwabi-Addo B, Ittmann M et al. Identification of novel tumor markers in prostate, colon and breast cancer by unbiased methylation profiling. *PLoS One* 2008; 3(4): e2079.

53. Perry AS, Loftus B, Moroese R et al. In silico mining identifies IGFBP3 as a novel target of methylation in prostate cancer. *Cancer* 2007; 96(10): 1587–1594.

54. Esteller M, Corn PG, Baylin SB et al. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61(8): 3225–3229.

55. Jerónimo C, Henrique R, Hoque MO et al. Quantitative RARBeta2 hypermethylation: a promising prostate cancer marker. *Clin Cancer Res* 2004; 10(12 Pt 1): 4010–4014.

56. Tokumaru Y, Harden SV, Sun DI et al. Optimal use of a panel of methylation markers with GSTP1 hypermethylation in the diagnosis of prostate adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10(16): 5518–5522.

57. Yamanaka M, Watanabe M, Yamada Y et al. Altered methylation of multiple genes in carcinogenesis of the prostate. *Int J Cancer* 2003; 106(3): 382–387.

58. Henrique R, Ribeiro FR, Fonseca D et al. High promoter methylation levels of APC predict poor prognosis in sextant biopsies from prostate cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007; 13(20): 6122–6129.

59. Sørensen KD, Borre M, Ørntoft TF et al. Chromosomal deletion, promoter hypermethylation and downregulation of FYN in prostate cancer. *Int J Cancer* 2008; 122(3): 509–519.

60. Bastian PJ, Ellinger J, Heukamp LC et al. Prognostic value of CpG island hypermethylation at PTGS2, RAR-beta, EDNRB, and other gene loci in patients undergoing radical prostatectomy. *Urology* 2007; 51(3): 665–674.

61. Woodson K, O'Reilly KJ, Ward DE et al. CD44 and PTGS2 methylation are independent prognostic markers for biochemical recurrence among prostate cancer patients with clinically localized disease. *Epigenetics* 2006; 1(4): 183–186.

62. Ellinger J, Bastian PJ, Jurgan T et al. CpG island hypermethylation at multiple gene sites in diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Urology* 2008; 71(1): 161–167.

63. Cho NY, Kim JH, Moon KC et al. Genomic hypomethylation and CpG island hypermethylation in prostatic intraepithelial neoplasm. *Virchows Arch* 2009; 454(1): 17–23.

64. Cottrell S, Jung K, Kristiansen G et al. Discovery and validation of 3 novel DNA methylation markers of prostate cancer prognosis. *Urology* 2007; 177(5): 1753–1758.

65. Liu JW, Nagpal JK, Jeronimo C et al. Hypermethylation of MCAM gene is associated with advanced tumor stage in prostate cancer. *Prostate* 2008; 68(4): 418–26.

66. Higuchi T, Nakamura M, Shimada K et al. HRK inactivation associated with promoter methylation and LOH in prostate cancer. *Prostate* 2008; 68(1): 105–113.

67. Shah JN, Shao G, Hei TK et al. Methylation screening of the TGFB1 promoter in human lung and prostate cancer by methylation-specific PCR. *BMC Cancer* 2008; 8: 284.

68. Guan M, Xu C, Zhang F et al. Aberrant methylation of EphA7 in human prostate cancer and its relation to clinicopathological features. *Int J Cancer* 2009; 124(1): 88–94.

69. Liu JW, Nagpal JK, Sun W et al. ssDNA-binding protein 2 is frequently hypermethylated and suppresses cell growth in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14(12): 3754–3760.

70. Weiss G, Cottrell S, Distler J et al. DNA methylation of the PITX2 gene promoter region is strong independent prognostic marker of biochemical recurrence in patients with prostate cancer after radical prostatectomy. *J Urol* 2009; 181(4): 1678–1685.

71. Jerónimo C, Usadel H, Henrique R et al. Quantitative GSTP1 hypermethylation in bodily fluids of patients with prostate cancer. *Urology* 2002; 60(6): 1131–1135.

72. Goessl C, Müller M, Heicappell R et al. DNA-based detection of prostate cancer in blood, urine, and ejaculates. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 945: 51–58.

73. Reibenwein J, Pils D, Horak P et al. Promoter hypermethylation of GSTP1, AR, and 14-3-3sigma in serum of prostate cancer patients and its clinical relevance. *Prostate* 2007; 67(4): 427–432.

74. Ellinger J, Haan K, Heukamp LC et al. CpG island hypermethylation in cell-free serum DNA identifies patients with localized prostate cancer. *Prostate* 2008; 68(1): 42–49.

75. Goessl C, Krause H, Müller M et al. Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids. *Cancer Res* 2000; 60(21): 5941–5945.

76. Roupert M, Hupertan V, Catto JW et al. Promoter hypermethylation in circulating blood cells identifies prostate cancer progression. *Int J Cancer* 2008; 122(4): 952–956.

77. Gonzalgo ML, Pavlovich CP, Lee SM et al. Prostate cancer detection by GSTP1 methylation analysis of postbiopsy urine specimens. *Clin Cancer Res* 2003; 9(7): 2673–2677.

78. Bastian PJ, Palapattu GS, Yegnasubramanian S et al. CpG island hypermethylation profile in the serum of men with clinically localized and hormone refractory metastatic prostate cancer. *Urology* 2008; 179(2): 529–534.

79. Woodson K, O'Reilly KJ, Hanson JC et al. The usefulness of the detection of GSTP1 methylation in urine as a biomarker in the diagnosis of prostate cancer. *Urology* 2008; 179(2): 508–511.

80. Vener T, Derecho C, Baden J et al. Development of a multiplexed urine assay for prostate cancer diagnosis. *Clin Chem* 2009; 54(5): 874–882.

81. Hoque MO, Topaloglu O, Begum S et al. Quantitative methylation-specific polymerase chain reaction gene patterns in urine sediment distinguish prostate cancer patients from control subjects. *J Clin Oncol* 2005; 23(27): 6569–6575.

82. Duffy MJ, Napieralski R, Martens JW et al. Methylated genes as new cancer biomarkers. *Eur J Cancer* 2009; 45(3): 335–346.

83. Pepe MS, Feng Z, Janes H et al. Pivotal evaluation of the accuracy of a biomarker used for classification or prediction: standards for study design. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100(20): 1432–1438.