

# Glycin-*N*-metyltransferáza a nádorová onemocnění prostaty

## Glycine-*N*-methyltransferase and Malignant Diseases of the Prostate

Heger Z.<sup>1,2</sup>, Eckschlager T.<sup>3</sup>, Stiborová M.<sup>4</sup>, Adam V.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta Mendelovy univerzity v Brně

<sup>2</sup> CEITEC – Středoevropský technologický institut, VUT v Brně

<sup>3</sup> Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN v Motole, Praha

<sup>4</sup> Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UK v Praze

### Souhrn

**Východiska:** Nádory prostaty (prostate cancer – PC) tvoří heterogenní skupinu onemocnění s vysokou mírou prevalence, jež v populaci západních zemí neustále stoupá. Od roku 1980 je pro sledování stavu nádorového onemocnění prostaty používáno stanovení prostatického specifického antigenu (PSA) v krevním séru následované dalšími diagnostickými postupy. Avšak relativní spolehlivost těchto vyšetření je vykoupena nepříjemným, invazivním poškozením tkáně. Proto se neustále hledají molekuly, které by mohly tyto stresové situace eliminovat a zvýšit tak záchyt PC nebo dokonce poskytnout informace o vývoji a průběhu onemocnění. V nynější době ukazují metabolomické a genomické studie, že některé biomolekuly mohou být využity pro zlepšení diagnosticko-prognostických možností a/nebo mohou být dokonce vhodným cílem pro vývoj nových terapeutických modalit. Jednou z těchto biomolekul je enzym glycin-*N*-metyltransferáza (GNMT), jenž hraje důležitou roli v biochemické konverzi glycinu na sarkosin. Souvislost této molekuly, ale také stejnojmenného genu, který ji kóduje (*GNMT*), s PC byla prokázána na několika úrovních a lze ji tak považovat za jeden ze slibných cílů pro návrh nových diagnosticko-prognostických přístupů. **Cíl:** Cílem práce je popsat fyziologickou roli a dále sumarizovat propojení mezi GNMT a PC, a to jak na úrovni genové struktury, genové exprese tohoto enzymu, tak na úrovni metabolismu, který GNMT katalyzuje, čímž řídí nejen metylační status buňky, ale také metabolismus kyseliny listové či methioninu. V neposlední řadě je též diskutována důležitost metylačních procesů v buňkách a souvislost mezi jejich aberacemi a rozvojem PC.

### Klíčová slova

glycin – kyselina listová – metabolismus – metylace – sarkosin

### Summary

**Background:** Prostate cancer (PC) constitutes a heterogeneous group of diseases with high prevalence rates that are still increasing, particularly in western countries. Since 1980, prostate specific antigen (PSA) and other diagnostic approaches have been used for PC screening; however, some of these approaches are often deemed painful and cause invasive damage of tissue. Therefore, molecular approaches to PC diagnosis are attracting increasing attention, potentially providing patients with less stressful situations and providing better diagnoses and even prognostic information. Recent metabolomic and genomic studies have suggested that biomolecules can be used as diagnostic or prognostic markers or as targets for the development of novel therapeutic modalities. One of these molecules is glycine-*N*-methyltransferase (GNMT), an enzyme that plays a pivotal role in the biochemical conversion of glycine to sarcosine. The link between this molecule (encoded by homonymous gene – *GNMT*) and PC has been confirmed at several levels, and thus GNMT can be considered a promising target for the development of advanced diagnostic and/or prognostic approaches. **Aim:** The aim of this study was to analyse the physiological role of GNMT and to examine in greater detail its connection with PC at different levels, including gene structure, gene expression, and metabolism, in which GNMT plays an important role, not only in controlling the methylation status of cells, but also the metabolism of folic acid and methionine. Last but not least, we discuss the importance of cellular methylation processes and the link between their aberrations and PC development.

### Key words

glycine – folic acid – metabolism – methylation – sarcosine

Tato práce byla podpořena GA ČR 16-18917S, Ligou proti rakovině Praha (projekt 2022015) a MZ ČR – RVO, FN v Motole 00064203.

This work was supported by GA CR 16-18917S, League against Cancer Prague (project 2022015) and Czech Ministry of Health – RVO, UH Motol 00064203.

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 recommendation for biomedical papers.



prof. RNDr. Vojtěch Adam, Ph.D.  
Ústav chemie a biochemie  
Agronomická fakulta  
Mendelovy univerzity v Brně  
Zemědělská 1  
613 00 Brno  
e-mail: vojtech.adam@mendelu.cz

Obdrženo/Submitted: 9. 2. 2016

Přijato/Accepted: 20. 3. 2016

<http://dx.doi.org/10.14735/amko2016331>

## Úvod

Hypotéza, že maligní nádor může být způsoben specifickými molekulárně-biologickými alteracemi, byla poprvé experimentálně ověřena v roce 1911, kdy F. P. Rous prokázal, že sarkomy u kuřat mohou být indukovány bezbuněčnými filtráty získanými z tkáňové kultury kuřecího sarkomu [1]. O několik dekád později byla potvrzena virová etiologie těchto tumorů a bylo zjištěno, že za indukci Rousova sarkomu je zodpovědný unikátní virový onkogen *v-src* (viral-avian sarcoma oncogene) [2]. Toto zjištění vedlo k identifikaci celé řady dalších virových onkogenů, ale také jejich homologů přítomných v genomech vyšších organismů, vč. člověka [3]. V dnešní době je již zřejmé, že za rozvoj maligních nádorů jsou zodpovědné progresivní a kumulativní alterace v genetické informaci organismu.

Nádorová onemocnění prostaty (prostate cancer – PC) jsou heterogenní skupinou onemocnění řadící se v řadě zemí vč. ČR na první místo v počtu diagnostikovaných pacientů [4]. Je popsáno velké množství genů, proteinů či metabolitů, jež jsou přímo zapojeny do progresu prekursorové léze v lokalizovaném či metastatickém PC [5]. I přes značné pokroky ve znalosti genových a proteinových expresních profilů u pacientů s PC nejsou komplexní změny na úrovni metabolomu stále

zcela popsány. Důležitou součástí maligní transformace jsou také změny na úrovni bioenergetiky buněk. Pravděpodobně nejznámější metabolickou alterací maligních buněk je tzv. Warburgův efekt představující posun ke zvýšené glykolýze, produkci laktátu a zvýšení bioenergetických nároků [6]. U glykolýzy bylo zjištěno, že pomocí vhodných inhibitorů lze tento proces úspěšně blokovat, a tím specificky zamezit rozvoji nádorů [7]. K dnešnímu datu je již několik inhibitorů glykolýzy testováno v různých fázích pre-klinického či klinického testování a aplikace těchto preparátů směřuje především k terapiím hypoxických nádorů.

Specifické metabolické dráhy a molekuly, které v nich působí, tak mohou být vhodnými cíli nejen pro zefektivnění včasné nádorové diagnostiky, ale také prognostických a terapeutických možností. Jednou z takových molekul je i enzym glycin-*N*-metyltransferáza (GNMT, EC 2.1.1.20), která katalyzuje reverzibilní přeměnu glycinu na sarkosin. Tato práce si klade za cíl shrnout skutečnosti týkající se nejen tohoto enzymu a jeho role v organismu, ale také genu, který jej kóduje, a jejich propojení s PC.

## Fyziologická role GNMT

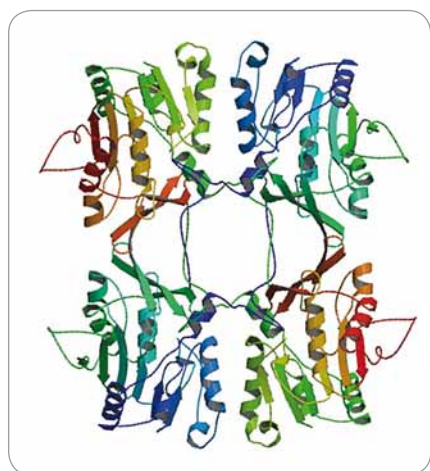
GNMT je protein vyskytující se ve velké míře především v cytoplazmě jaterních buněk (tvoří 1–3 % cytoplazmatických proteinů) [8], ale také jiných tkání, vč. prostaty či pankreatu (0,4 % cytoplazmatických proteinů) [9]. V buňce se GNMT skládá ze čtyř identických podjednotek tvořících tetramerní strukturu (obr. 1). Lidská GNMT je 32 kDa polypeptid složený z 292 aminokyselin [10]. Zajímavostí je, že ačkoliv má každá ze čtyř podjednotek své vlastní katalytické centrum, kvarterní organizace (struktura) proteinu je nezbytná pro správnou katalytickou aktivitu a dimery či monomery GNMT jsou katalyticky inaktivní [11]. V organismu GNMT katalyzuje přenos metylové skupiny z *S*-adenosyl methioninu (SAM) na amino skupinu glycinu, čímž vzniká imino kyselina sarkosin (*N*-metylglycin) a *S*-adenosyl homocystein (SAH). Sarkosin je intermediátem v metabolické degradaci cholinu a betainu a je důležitý

pro správnou funkci regulace osmózy a stabilizaci proteinů [12]. Může být také efektivně konvertován zpět na glycin aktivitou folát-dependentního enzymu sarkosindehydrogenázy (SARDH, EC 1.5.99.1) [13]. Tyto metabolické procesy jsou důležité především pro transport metylových skupin do metabolismu kyseliny listové. Dále pak také pro zpětný přenos těchto skupin do aktivního metylového cyklu, kde jsou využívány pro SAM přes biosyntézu methioninu a také pro metylaci DNA a histonů katalyzovanou DNA-metyltransferázami (DNMT) (schéma 1). Z výše zmíněného lze usoudit, že funkcí GNMT je především regulace poměru SAM/SAH a také celkového metylačního potenciálu buňky.

Ačkoliv je GNMT převážně cytoplazmatický protein, může působit i jako vazebný receptor polycyklických aromatických uhlovodíků 4S a také transkripční aktivátor cytochromu P450 1A1, a to v odezvě na intoxikaci benzo(*a*)pyrenem (B[*a*]P) [14]. GNMT tak brání vzniku nežádoucích aduktů aktivovaného B[*a*]P s DNA sekvestrací tohoto karcinogenu a snižováním jeho koncentrace. Tento jev byl pozorován *in vitro* i *in vivo* také při intoxikacích aflatoxinem B<sub>1</sub>, kdy GNMT redukuje množství aduktů DNA s aflatoxinem B<sub>1</sub> a karcinogenu aflatoxinu [15]. Pochody, které vedou ke změně funkcí z metabolického enzymu přes vazebný protein xenobiotik až k transkripčnímu faktoru, souvisí pouze s fosforylačním stavem GNMT [16]. Výše zmíněné zdůrazňuje význam tohoto proteinu v řadě fyziologických procesů probíhajících v organismu, a není tedy překvapivé jeho spojení s nádorovými onemocněními prostaty.

## GNMT a karcinogeneze prostatické tkáně

Ačkoliv v jaterní tkáni byla GNMT identifikována jako efektivní tumorový supresor a v řadě experimentů *in vivo* bylo prokázáno, že u myši s deletovanou GNMT (GNMT<sup>-/-</sup> myši) dochází k rychlému rozvoji hepatocelulárních karcinomů [17,18], funkční role GNMT v prostatické tkáni je stále diskutabilní. Průlomová studie byla publikována v roce 2007, kdy byly porovnány vzorky DNA izolované z periferní

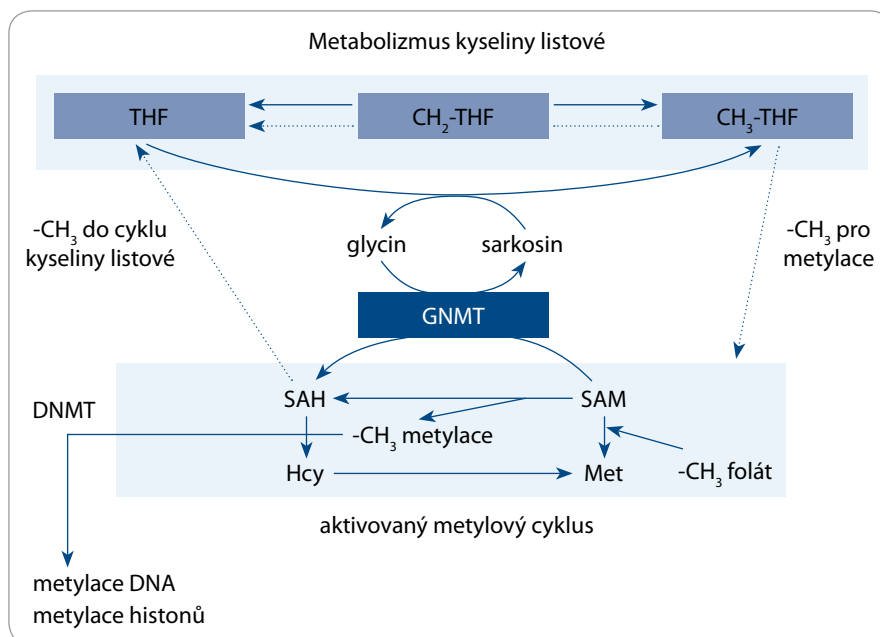


Obr. 1. Struktura tetrameru glycin-*N*-metyltransferázy (GNMT), získaná z krystalografických studií při rozlišení 2.5 Å. Převzato jako záznam 1BJJ z RCSB Protein Data Bank ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)).

krve pacientů s PC s DNA zdravých mužů bez onkologické historie srovnatelné věkové a etnické kategorie [19]. V této studii bylo zjištěno, že jedinci s haplotytem 10GAs/Ins/T, který má za následek zvýšenou úroveň promotorové aktivity *GNMT*, vykazovali výrazně nižší riziko vzniku PC ve srovnání s jedinci s haplotytem 16As/Del/C nesoucím nejnižší promotorovu aktivitu. Důležitou roli *GNMT* v rozvoji PC dokazuje i skutečnost, že jednonukleotidové polymorfizmy v promotorové oblasti genu *GNMT* jsou asociovány se zvýšeným rizikem vzniku PC [20].

Je pozoruhodné, že prevalence PC výrazně souvisí s etnicitou, přičemž nejvyšší je u Afroameričanů, následovaných Američany evropského původu a Evropany. Nejnižší prevalence PC je pozorována v asijské populaci [21]. Je tedy pravděpodobné, že existují genetické varianty indikující predispozici ke vzniku PC. Podrobná genetická analýza tak může být v klinické praxi přínosná, zejména pro vyhledání osob se zvýšeným rizikem, a tedy vhodných pro častější a detailnější screening.

Na proteinové úrovni je ale situace poněkud složitější. Jelikož je dle některých studií exprese *GNMT* v nádorové tkáni prostaty značně snížena [19] a stejný jev je pozorovatelný i ve většině PC tkáňových kultur, lze předpokládat, že koncentrace metabolitu, sarkosinu, by měla v těchto případech být relativně nízká. Některé studie ale demonstrují výrazně zvýšené hladiny sarkosinu ve vzorcích moči pacientů s PC. To indikuje vyšší enzymovou aktivitu *GNMT* v porovnání se zdravými jedinci [22]. Jiné práce dokonce tuto zvýšenou aktivitu ve tkáni PC potvrzují, přičemž byla současně detekována také snížená aktivita *SARDH*, což je naprosto v souladu se zvýšenou hladinou sarkosinu [23]. Dalším zajímavým zjištěním bylo, že vyřazením exprese *GNMT* dochází ke snížení invazivity nádorových buněk a k redukci jejich onkogenního potenciálu indukci zástavy buněčného cyklu ve fázi G<sub>1</sub> a dále apoptózy. Souvislost *GNMT* a PC byla potvrzena i v další práci, kde byla studována její exprese ve 148 vzorcích biopsií pacientů s diagnostikovaným PC [24]. Prokázána byla vysoce významná korelace zvýšené



**Schéma 1. Glycin-N-metyltransferáza (GNMT) katalyzuje přeměnu S-adenosyl methioninu (SAM) na S-adenosyl homocystein (SAH) a metyluje glycin na sarkosin.**

Tato reakce slouží k regulaci poměru SAM/SAH a také k transportu a utilizaci metylových skupin mezi aktivovaným metylovým cyklem a metabolizmem kyseliny listové.

Hcy – homocystein, THF – tetrahydrofolát, DNMT – DNA metyltransferáza

exprese *GNMT* s vyšším Gleasonovým skóre, a s vyšším pT a s kratším bezpříznakovým přežitím. Tato data potvrzují multifaktoriální a složitou povahu PC, i když je jasné, že *GNMT* hraje důležitou roli při jeho rozvoji. K jejímu využití v diagnostice a prognostice je však nezbytné posuzovat případy individuálně a na základě korelací s hladinou důležitých metabolitů, jako je sarkosin.

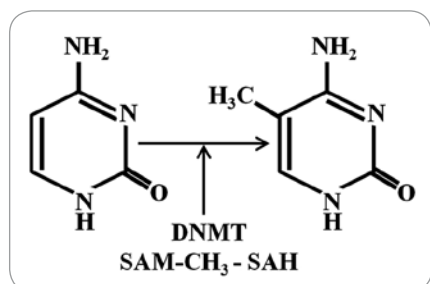
### Sarkosin – možný nástroj pro diagnostiku PC

Sarkosin je znám již od roku 1847, kdy jej poprvé izoloval a pojmenoval německý chemik Justus von Liebig. Dlouho byl považován za pouhý intermediát metabolismu glycinu katalyzovaného *GNMT*, a to až do roku 2009, kdy Sreekumar et al provedli rozsáhlou metabolickou studii s cílem identifikovat potenciální biomarkery PC ve vzorcích moči [22]. Koncentrace sarkosinu byly u pacientů s PC signifikantně zvýšeny a autoři uvedené studie prokázali, že stanovení jeho koncentrace umožňuje rozlišit subjekty s benigní hyperplazií, lokalizovaným a metastatickým stadiem PC. Toto zjištění následně potvrdily i některé další

práce [25–28], nicméně některé další studie tyto nálezy nepotvrdily [29]. Rozdíly mezi studii jsou pravděpodobně způsobeny faktory, které mohou získaná data ovlivňovat, a to výběrem pacientů, odběrem, skladováním či přípravou klinických vzorků a také volbou analytické techniky používané pro stanovení sarkosinu.

### GNMT a epigenetické faktory

Epigenetika se zabývá dědičnými změnami ve fenotypu, které primárně nejsou důsledkem změn v sekvenci nukleových kyselin [30]. Mezi epigenetické regulační mechanismy se řadí posttranslační modifikace histonů, remodelace chromatinu, aktivace mikroRNA a také metylace DNA [31]. Jak již bylo zmíněno výše, je to právě *GNMT*, jež reguluje metylační stav buněk. Je to již více než 30 let, kdy bylo poprvé zjištěno, že metylační status benigních a maligních buněk je odlišný [32]. Důležitou metylací je např. kovalentní adice metylové skupiny na uhlík 5 cytosinu za vzniku 5-metylcytosinu (obr. 2). Tyto metylové skupiny se soustředí do velkého žlábků DNA a mohou efektivně inhibovat tran-



Obr. 2. Schematické znázornění metylace cytosinu na uhlíku 5 katalyzované DNA-methyltransferázami (DNMT).

skripci [33]. Metylace DNA tak pomáhá inhibovat transkripci v nekódujících oblastech genomu, jako je např. pericentromerický heterochromatin, který je tak díky velké míře metylace transkripčně inaktivní [34]. Hypermetylace může ale také indukovat neodvratné změny v genové expresi. Například metylace reparačních genů *MLH1* či *MGMT* je může inaktivovat, což má za následek zvýšenou destabilizaci mikrosatelitů a vyšší četnost mutací [35]. Metylace může rovněž aktivovat spontánní deaminaci bází DNA, což umožňuje vyšší schopnost interakcí s karcinogeny. Je také zvýšena tvorba pyrimidinových dimerů vyvolaných UV zářením, což vede k vyšší kumulaci počtu mutací. Správná regulace metylačních procesů tak může značně ovlivňovat zdraví organismu.

U PC je hypermetylace považována za nejlépe charakterizovanou epigenetickou abnormalitu a aberantní metylaci genů spojených s PC se již zabývala řada autorů [36–38]. Důležité je i říci, že mnoho hypermetylovaných genů kóduje proteiny zapojené do důležitých buněčných procesů a také těch s tumor-supresorovou aktivitou (*GST1*, *GSTM1*, *RAR β*, *RASSF1A*, *CDH1*, *CDKN2A/p16*, *TIMP-2* a další) [36]. Na druhou stranu jsou ale dobře popsány také geny, které jsou naopak hypometylované (*uPA*, *PLAU*, *HPSE*, *CAGE*, *CYP1B1*) [39]. Z výše zmíněného je zřejmé, že metylační status některých genů může být důležitý pro vznik a rozvoj PC, a jeho poznání tak může značně zlepšit diagnostické, prognostické či terapeutické možnosti v klinické praxi.

### Závěr a výhledy do budoucnosti

Prevalence PC se v západní společnosti stále zvyšuje. Ačkoliv jsou diagnostické

i terapeutické možnosti poměrně pokročilé, je PC stále příčinou úmrtí velkého množství mužů. Genomické i metabolické studie ukazují, že některé molekuly, a mezi nimi právě GNMT, mohou hrát roli při vzniku a rozvoji PC. Multifaktoriální efekt GNMT lze pozorovat již na genové úrovni, kde byly identifikovány haplotypy se zvýšeným rizikem vzniku PC. Stejně tak byl význam tohoto proteinu demonstrován v několika studiích. S ohledem na metabolismus katalyzovaný GNMT je nezbytné zmínit i významný intermediát tvořený tímto enzymem, sarkosin. Ten je stále předmětem diskuzí o možnostech jeho využití pro včasnou diagnostiku PC. Kromě toho GNMT významným způsobem ovlivňuje metylační status buněk. Komplexní genetická a metabolická vyšetření zahrnující také studium metylací specifických genů tak mohou být přínosem pro klinickou praxi. Epigenetika odkrývá celou řadu slibných diagnosticko-prognostických a terapeutických cílů. Není proto překvapivé, že se výzkum na poli PC zaměřil na identifikaci epigenetických „otisků“, které mohou být využity pro rozlišení ohraňovaných, indolentních nádorů od agresivních forem onemocnění. Určitým nedostatkem je stále nedostupnost sledování metylačních procesů. Nicméně vývoj vysoce kvalitních a přesných sekvenčních metod nové generace může tento fakt změnit a učinit tyto analýzy dostupnějšími.

### Literatura

- Rous P. Transmission of a malignant new growth by means of a cell-free filtrate. *JAMA* 1911; 56(198): 1445–1446.
- Baltimore D. RNA dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature* 1970; 226(5252): 1209–1211.
- Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* 2008; 358(5): 502–511. doi: 10.1056/NEJMra072367.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016; 66(1): 7–30. doi: 10.3322/caac.21332.
- Abate-Shen C, Shen MM. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev* 2000; 14(19): 2410–2434.
- Warburg O. Origin of cancer cells. *Science* 1956; 123(3191): 309–314.
- Chen Z, Lu WQ, Garcia-Prieto C et al. The Warburg effect and its cancer therapeutic implications. *J Bioenerg Biomembr* 2007; 39(3): 267–274.
- Yeo EJ, Wagner C. Tissue distribution of glycine-N-methyltransferase, a major folate-binding protein of liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(1): 210–214.
- Chen YM, Chen LY, Wong FH et al. Genomic structure, expression, and chromosomal localization of the human glycine N-methyltransferase gene. *Genomics* 2000; 66(1): 43–47.

- Pattanayek R, Newcomer ME, Wagner C. Crystal structure of apo-glycine N-methyltransferase (GNMT). *Protein Sci* 1998; 7(6): 1326–1331.
- Krupenko NI, Wagner C. Transport of rat liver glycine N-methyltransferase into rat liver nuclei. *J Biol Chem* 1997; 272(43): 27140–27146.
- Kumar N, Kishore N. Structure and effect of sarcosine on water and urea by using molecular dynamics simulations: implications in protein stabilization. *Biophys Chem* 2013; 171(1): 9–15. doi: 10.1016/j.bpc.2012.11.004.
- Cernei N, Heger Z, Gumulec J et al. Sarcosine as a potential prostate cancer biomarker – a review. *Int J Mol Sci* 2013; 14(7): 13893–13908. doi: 10.3390/ijms140713893.
- Yen CH, Lin YT, Chen HL et al. The multi-functional roles of GNMT in toxicology and cancer. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 266(1): 67–75. doi: 10.1016/j.taap.2012.11.003.
- Liu SP, Li YS, Lee CM et al. Higher susceptibility to aflatoxin B-1-related hepatocellular carcinoma in glycine N-methyltransferase knockout mice. *Int J Cancer* 2011; 128(3): 511–523. doi: 10.1002/ijc.25386.
- Bhat R, Weaver JA, Wagner C et al. ATP depletion affects the phosphorylation state, ligand binding, and nuclear transport of the 4 S polycyclic aromatic hydrocarbon-binding protein in rat hepatoma cells. *J Biol Chem* 1996; 271(51): 32551–32556.
- Martinez-Chantar ML, Vazquez-Chantada M, Ariz U et al. Loss of the glycine N-methyltransferase gene leads to steatosis and hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology* 2008; 47(4): 1191–1199. doi: 10.1002/hep.22159.
- Liao YJ, Liu SP, Lee CM et al. Characterization of a glycine N-methyltransferase gene knockout mouse model for hepatocellular carcinoma: Implications of the gender disparity in liver cancer susceptibility. *Int J Cancer* 2009; 124(4): 816–826. doi: 10.1002/ijc.23979.
- Huang YC, Lee CM, Chen M et al. Haplotypes, loss of heterozygosity, and expression levels of glycine N-methyltransferase in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13(5): 1412–1420.
- Ianni M, Porcellini E, Carbone I et al. Genetic factors regulating inflammation and DNA methylation associated with prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2013; 16(1): 56–60. doi: 10.1038/pcan.2012.30.
- Gronberg H. Prostate cancer epidemiology. *Lancet* 2003; 361(9360): 859–864.
- Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM et al. Metabolic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature* 2009; 457(7231): 910–914. doi: 10.1038/nature07762.
- Khan AP, Rajendiran TM, Ateeq B et al. The role of sarcosine metabolism in prostate cancer progression. *Neoplasia* 2013; 15(5): 491–501.
- Song YH, Shiota M, Kuroiwa K et al. The important role of glycine N-methyltransferase in the carcinogenesis and progression of prostate cancer. *Mod Pathol* 2011; 24(9): 1272–1280. doi: 10.1038/modpathol.2011.76.
- Heger Z, Cernei N, Gumulec J et al. Determination of common urine substances as an assay for improving prostate carcinoma diagnostics. *Oncol Rep* 2014; 31(4): 1846–1854. doi: 10.3892/or.2014.3054.
- Burton C, Gamagedara S, Ma YF. A novel enzymatic technique for determination of sarcosine in urine samples. *Anal Methods* 2012; 4(1): 141–146.
- Wu H, Liu TT, Ma C et al. GC/MS-based metabolomic approach to validate the role of urinary sarcosine and target biomarkers for human prostate cancer by microwave-assisted derivatization. *Anal Bioanal Chem* 2011; 401(2): 635–646. doi: 10.1007/s00216-011-5098-9.

28. Cao DL, Ye DW, Zhang HL et al. A multiplex model of combining gene-based, protein-based, and metabolite-based with positive and negative markers in urine for the early diagnosis of prostate cancer. *Prostate* 2011; 71(7): 700–710. doi: 10.1002/pros.21286.
29. Jentzmik F, Stephan C, Miller K et al. Sarcosine in urine after digital rectal examination fails as a marker in prostate cancer detection and identification of aggressive tumours. *Eur Urol* 2010; 58(1): 12–18. doi: 10.1016/j.eururo.2010.01.035.
30. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* 2008; 9(6): 465–476. doi: 10.1038/nrg2341.
31. Kim JK, Samaranyake M, Pradhan S. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66(4): 596–612. doi: 10.1007/s00018-008-8432-4.
32. Goelz SE, Vogelstein B, Hamilton SR et al. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human-colon neoplasms. *Science* 1985; 228(4696): 187–190.
33. Clark SJ, Melki J. DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene* 2002; 21(35): 5380–5387.
34. Saksouk N, Simboeck E, Dejardin J. Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics Chromatin* 2015; 8(1): 3. doi: 10.1186/1756-8935-8-3.
35. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000; 343(19): 1350–1354.
36. Majumdar S, Buckles E, Estrada J et al. Aberrant DNA methylation and prostate cancer. *Curr Genomics* 2011; 12(7): 486–505. doi: 10.2174/138920211797904061.
37. Hoque MO. DNA methylation changes in prostate cancer: current developments and future clinical implementation. *Expert Rev Mol Diagn* 2009; 9(3): 243–257. doi: 10.1586/erm.09.10.
38. Delgado-Cruzata L, Hruby GW, Gonzalez K et al. DNA methylation changes correlate with gleason score and tumor stage in prostate cancer. *DNA Cell Biol* 2012; 31(2): 187–192. doi: 10.1089/dna.2011.1311.
39. Dunn BK. Hypomethylation: one side of a larger picture. In: Verma M, Dunn BK, Umar A (eds). *Epigenetics in cancer prevention: early detection and risk assessment*. New York: New York Acad Sciences 2003: 28–42.