

IMPORTANȚA DIAGNOSTICĂ A GLUTATION-S-TRANSFERAZEI CLASA PI (GSTP1) ÎN CANCERUL DE PROSTATĂ

Olga Melnic , Iacob Locoman, Anatol Vișnevschi

Catedra Diagnostic de Laborator clinic ,USMF “ Nicolae Testemițanu”

Summary

The importance of the Glutathione-S-transferase Pi class (GSTP1) in prostate cancer diagnosis

Prostate cancer represents one of the most frequent localizations of the cancer in male patients over 50 years old. The most important risk factors are age, family history and race. Glutathione S-transferase (GST) enzymes may prevent carcinogenesis through inactivation of the organic compounds electrophiles by conjugation to reduced glutathione. Recently, it was reported that most prostate cancers fail to express GST-pi despite an abundant presence in benign prostate tissue, suggesting a common genetic alteration.

Rezumat

Cancerul prostatei reprezintă una dintre cele mai frecvente localizări ale cancerului la bărbații de vârstă mai mare de 50 de ani. Cei mai importanți factori de risc fiind vârsta, istoricul familial și factorul rasial. Glutathion S-transferaza (GST) poate împiedica carcinogeneza prin inactivarea compușilor organici electrofili prin conjugare cu glutathion redus. Recent, s-a raportat că cele mai multe forme de cancer de prostată nu reușesc să-și exprime GSTP1 în ciuda prezenței abundente în țesuturile benigne de prostată, sugerând o modificare genetică comună.

Actualitatea

Cancerul de prostată (CP) este în prezent una din principalele probleme de sănătate ale bărbaților. Conform datelor furnizate de Centrul de Statistică și de Cancer Registru a Institutului Oncologic din Republica Moldova (IOM) pentru anii 2000-2009 numărul de cancere de prostată, diagnosticate în Republica Moldova „de novo” atestă o continuă creștere, de la 85 cazuri în anul 2000 pînă la 249 în anul 2009. Respectiv la capitolul mortalitate se determină o creștere în rîndul populației masculine prin această boală de la 4,1‰ în 2000, pînă la 8,1‰ în anul 2009. Același tablou cu indicii ce sunt într-o continuă creștere este propriu și pentru alte țări. Cancerul de prostată constituie 11% din cancerele sexului masculin în Europa și este responsabil de 9% din decesele prin cancer ale bărbaților din Uniunea Europeană. În SUA este cel mai frecvent tip de cancer la bărbați, estimîndu-se ca mai mult de 218. 000 de bărbați diagnosticați cu cancer de prostată în 2007, și aproximativ 27. 050 de bărbați decedați din această cauză în același an. [27] Mecanismele epigenetice pot fi principala forță motrice pentru schimbările semnificative în expresia genelor care sunt responsabile de progresia cancerului de prostată. Cele trei mecanisme mai larg caracteristice pentru reglarea epigenetică a genelor sînt: schimbarea modelelor de metilare a ADN-ului; acetilarea / deacetilarea histonelor și alterări în buclele feedback-ului de reglementare pentru factorii de creștere.[43]

Glutathion S-transferazele (GST) reprezintă un grup important de enzime de detoxifiere. Toate speciile eucariote posedă multiple izoenzime GST citozolice și legate de membrană, fiecare afișează proprietăți catalitice precum și de legare necatalitice distincte: enzimele citozolice sunt codificate de cel puțin cinci familii de gene (desemnate clasa alfa, mu, pi, sigma și teta), în timp ce enzimele legate de membrană (GST microzomale și leucotrien-C4 sintetaza) sunt codificate de gene unice. Dovezile sugerează că nivelul de exprimare a GST este un factor esențial în determinarea sensibilității celulelor la un spectru larg de substanțe chimice toxice. Mulți inductori, dar nu toți, au efectul de activare a transcripției genelor GST fie prin elementul antioxidant-receptiv, elementul xenobiotic-receptiv, GST P1 amplificator (GPE), sau elementul glucocorticoid-receptiv (GRE).

În celule inducția GST de către speciile reactive de oxigen ar părea să reprezinte un răspuns adaptativ ca aceste enzime să detoxifice unele toxice carbonil-, peroxid-, și metaboliții epoxid care se conțin în celule ca produse de stres oxidativ. Majoritatea tumorilor umane și linii celulare tumorale umane exprimă cantități semnificative de GST clasa pi [18].

Glutation-S-transferaza clasa Pi (GSTP1), situată pe cromozomul 11q13 codifică enzime metabolice a fazei II, care detoxifică produșii intermediari sau radicalii liberi. GSTP1 joacă un rol important în protejarea celulelor de agenți citotoxici și cancerigeni și se exprimă în țesuturile normale în diferite tipuri de celule. Modificarea activității și exprimării GSTP1 au fost raportate în mai multe tumori și acest lucru se datorează în mare parte hipermetilării ADN-ului din regiunea CpG în promotor-5' a GSTP1. Cartografierea precisă a modelelor de metilare ADN-ului în insulele CpG a devenit esențială pentru înțelegerea diverselor procese biologice, cum ar fi reglarea genelor imprimate, inactivarea cromozomului X și inactivarea genelor supresoare de cancer uman. [26]

Progresele în caracterizarea epigenetică a cancerelor a permis dezvoltarea testelor de metilare a ADN care vor putea fi utilizate în curând ca teste serologice și tisulare de cancer. Inhibarea metilării promotoarelor aberante ar putea preveni teoretic carcinogeneza.

Speciile reactive de oxigen, care sunt generate în procesele fiziologice, cum ar fi respirația celulară, expunerea la agenți chimici, sau expunerea la radiații ionizante pot depăși apărarea celulară antioxidantă și provoca leziuni ale ADN-ului. [5] Astfel de afecțiuni pot duce la mutații și modificarea oncogenelor sau genelor supresoare tumorale. Izoenzima citozolică glutacion S-transferaza pi (GSTP1) este o enzimă detoxifiantă importantă din familia enzimelor glutacion S-transferaze (GST), care inactivează cancerigenele prin conjugarea cu glutationul.[29] Secvența reglatoare din apropierea genei GST este frecvent afectată de hipermetilare în etapele timpurii ale carcinogenezei.[35,6,30,21] Comparativ cu țesutul benign, în cancerul de sân, de colon, de stomac, de pancreas, pulmonar, a capului și gâtului, de ovar, și de col uterin, precum și sarcomul țesuturilor moi, carcinomul embrionar testicular, meningiom și gliom, este crescută expresia GST clasa Pi.[39,42,7,31,16,25,4,45,1]

Cu toate acestea, hipermetilarea promotorului GSTP1 a fost asociată cu inhibiția genei în cancerul de prostată și a cancerului de rinichi.[36,6,30,13]

Recent, un studiu a arătat o tendință de creștere a frecvenței de metilare a GSTP1 cu creșterea gradului de tumori mamare piloide. Autorii au raportat că hipermetilarea promotorului a fost asociată cu pierderea exprimării GSTP1. Aceste rezultate sugerează că tumorile piloide segregă în doar două grupe, pe baza profilurilor metilare: grupa benignă și grupa combinată:graniță / malign.[26] Alți cercetători au studiat rolul hipermetilării genei GSTP1 în carcinomul endometrial și s-a constatat că reducerea exprimării GSTP1 a fost asociată cu potențialul de invazie miometrială.[10]

Modificări epigenetice: markeri moleculari în curs de dezvoltare pentru detectarea cancerului. Cancerul este un proces alimentat atât de modificări genetice cât și de mecanisme epigenetice. La mecanismele epigenetice se referă schimbările în expresia genelor, care pot fi moștenite mitotic, dar nu sunt asociate cu schimbări în secvența de codificare a genelor afectate. Cu alte cuvinte, la mecanismele epigenetice se referă moștenirea de informații pe baza nivelului de expresie genică, în contrast cu genetica care se referă la transmiterea de informații pe baza secvenței genei. Metilarea ADN-ului, cel mai bun mecanism înțeles în epigenetică, este o modificare chimică enzimo-mediată care adaugă grupuri metil (-CH₃) pe locuri selecte din ADN. La om și majoritatea mamiferelor, metilarea ADN afectează numai bazele citozinice (C), atunci când acestea sînt urmate de guanozine (G). Metilarea reziduului nucleotidelor citozina situate în dinucleotida 5'-CPG-3' este cea mai frecventă modificare epigenetică la om. Aceste dinucleotide CpG nu sunt distribuite în mod aleatoriu în genom. Într-adevăr, există regiuni CpG bogate numite "insule CpG" asociate frecvent cu 5' regiuni reglatoare de gene, inclusiv

promotor. Metilarea ADN-ului în regiunile promotor este un mecanism puternic pentru suprimarea activității genei.[26]

Analiza de metilare a ADN-ului, metode disponibile în prezent.

Metilarea insulei CpG prezintă interes din motive diagnostice și prognostice. Metilarea unei sau ambelor alele ale unei regiuni poate servi ca un biomarker de cancer sau de inhibiție a expresiei genelor atunci când acestea sunt într-o regiune promotor. Testele pentru metilare sunt atrăgătoare pentru cercetarea translațională, deoarece acestea pot utiliza tehnici de amplificare, cum ar fi metilare-PCR specific, și să utilizeze astfel cantități mici de probe. Datorită simplității sale relative, de siguranță și sensibilitate, metilare-PCR specific este metoda cea mai frecvent utilizată pentru analiza de metilare.[23]

Metilare-PCR specific (CMSP) -test convențional utilizează două seturi de primeri speciali concepuți pentru a amplifica secvența metilată sau nemetilată, iar produsele PCR sunt conduse într-un gel.[23] Rezultatele CMSP la o anumită regiune de ADN sunt pur și simplu raportate ca metilat sau nemetilat, nu permite cuantificarea sau identificarea metilării parțiale. Testul CMSP este folosit în principal pentru detectarea GSTP1 metilat în fluide. De exemplu:GSTP1 metilată în ser la bărbații cu cancer de prostată localizat, înainte de tratament implică un risc 4,4 ori mai mare de reapariție biochimică după o intervenție chirurgicală.[3] Utilizarea metilării-PCR specific cantitative fluorescent-bazate (QMSP) a îmbunătățit sensibilitatea detectării tumorii. Monitorizarea continuă a semnalelor fluorescente în timpul procesului PCR a permis cuantificarea alelelor metilate a unei singure regiuni, din ADN nemetilat, deoarece emisia de fluorescență reporter reprezintă numărul de fragmente ADN generate.[19]

GSTP1 hipermetilat: semnificația și incidența legată de cancerul de prostată.

Inhibarea exprimării genei GSTP1 este recunoscută ca fiind un semn distinctiv molecular a cancerului de prostată. Metilarea insulei CpG în promotorul clasei pi de glutation S-transferaza apare în neoplazia intraepitelială de prostată (PIN) și a cancerului.[15] Alte regiuni hipermetilate relevante pentru cancer de prostată includ receptorii beta-2 ai acidului retinoic.[3] Aceste constatări în cancerul de prostată sugerează că metilarea ADN-ului anticipează tumorigeneza, dar rămâne de văzut dacă metilarea ADN-ului este un eveniment necesar sau permisivă în tumorigeneză. Metilarea extinsă de nucleotide deoxicitidin distribuite în regiunea 5' a insulei CpG nu este detectată în epiteliul benign al prostatei, dar a fost detectată în neoplazie intraepitelială, adenocarcinom de prostată, în fluide (plasma, ser, ejaculat și urină) de la pacienții cu cancer de prostată cu metilare-PCR specific și poate fi util ca un biomarker molecular de cancer.[36,7,21,12,41,24,8]

Metilarea-PCR specifică cantitativă (QMSP) arată că pierderea de exprimare a genei GSTP1 este, de fapt, cea mai ordinară alterare genetică în cancerul de prostată (> 90%) și în neoplazia intraepitelială de prostată (PIN) (70 %) [36,6,7,17,21] și această inactivare somatică a GSTP1 este direct asociată cu metilarea de promotor.[7,22,21] Niveluri mai ridicate de GSTP1 cu promotor metilat este asociată cu trecerea de la neoplazie intraepitelială de prostată (PIN) la carcinom.[22]

În timpul dezvoltării cancerului, GSTP1 nu pare să funcționeze ca o oncogenă sau ca o genă supresoare tumorală, deoarece inducerea exprimării GSTP1 în linii celulare de cancer de prostată nu suprimă creșterea celulei. În schimb, GSTP1 a fost propusă pentru a acționa ca o genă "îngrijitoare". Când GSTP1 este inactivată, celule de prostată par să devină mai vulnerabile la modificările somatice la expunerea daunătoare cronică a genomului la oxidanți și electroliți, la care contribuie mediul și stilul de viață.[34,7]

Semnificația GSTP1 inactive în PIN-ul de grad înalt și carcinom este neclar. Acesta poate fi un epifenomen, reflectând simpla întrerupere a stratului celular bazal cu progresie neoplazică. Cu toate acestea, Lee și colab. consideră probabilitatea unui rol mai fundamental.[36] Două studii au descoperit că un procent mic (3,5-5%) din cazuri, rețin o modestă GSTP1 expresie în carcinom.

[11,38] Cookson și colaboratorii au obținut pozitivitate, de asemenea, în 1 din 17 cazuri de PIN-ul de grad înalt.[10] Spre deosebire de modificările genetice permanente și definitive a modificării secvenței ADN-ului, a metilării promotorului este o modificare potențial reversibilă. Prin urmare, metilarea promotorului poate fi supusă la intervenția terapeutică care vizează reactivarea genei de cancer inhibate. Acest lucru are implicații importante pentru chemoprevenție, deoarece, după cum s-a menționat mai sus, până la 70% din PIN cu grad înalt, arată metilarea promotorului GSTP1.[6,7,30]

Recent, unii cercetători au investigat efectele polifenolilor din ceaiul verde (GTPs) pe re-expresia GSTP1. Ei au demonstrat că demetilarea promotorului de către polifenolii din ceaiul verde duce la re-expresia GSTP1 din celulele cancerului de prostată, prin urmare, polifenolii din ceaiul verde se fac candidați excelenți pentru chemoprevenția de cancer de prostată.[40]

Unii savanți au evaluat impactul terapiei de privare de androgeni pentru detectarea GSTP1 hipermetilat în cancerul de prostată.[35] La 87% (13/15) din pacienți, nu a existat nici o modificare în detectarea GSTP1 hipermetilate [35] și autorii au sugerat că schimbarea de la GSTP1 hipermetilat pozitiv la negativ, la doi pacienți pot indica dependență parțială de androgeni. [35] În plus față de presupusa interacțiune hormonală, ar putea specula alte explicații posibile pentru a explica de ce cancerul de prostată pierde GSTP1 hipermetilat după o prelungită terapie hormonală neoadjuvantă. În primul rând, lipsa de GSTP1 hipermetilat poate fi atribuit unor probleme tehnice -rezultate fals negative. În plus, ar putea fi crescută posibilitatea că în ambele tumori primordiale a lipsit GSTP1 hipermetilat. Cu toate acestea, sunt necesare studii suplimentare pentru a evalua frecvența și gradul de interacțiune hormonală cu GSTP1 hipermetilat.

Efecte anti-cancer de GSTP1 și perspectivele de viitor.

Nivelurile crescute de GSTP1 pot proteja celulele canceroase umane împotriva preparatelor citotoxice, medicamente antineoplazice, agenții alchilanți electroliții deosebit de reactivi, formele conjugate cu glutation spontan și în reacțiile catalizate.[2] Expresia anumitor subclase de GST protejează celulele de citotoxicitatea acestor medicamente cancerigene și excesul GST a fost implicate în rezistența la medicamentele antineoplazice.[37] Inducția enzimatică este ca un răspuns adaptativ la stres și poate fi declanșată de agenții chimici exogeni și de asemenea, de metaboliții reactivi de oxigen.[18] Enzimele GST au o specificitate de substrat largă, care includ substanțe cu proprietăți mutagene cunoscute. Creșterea în ser a GSTP1 a fost exploatată ca un marker tumoral în ser pentru cancerul gastrointestinal [39] și limfom non-Hodgkin [32] ca o metodă de a prezice sensibilitatea la chimioterapie.

Inactivarea GSTP1 în cancerul de prostată apare timpuriu în carcinogeneză, lasând celulele prostatice cu apărare inadecvată împotriva oxidanților și electrofililor cancerigeni.

Mecanismele epigenetice sunt puternic implicate în progresia cancerului.[43] Spre deosebire de modificările genetice, modificările metilării ADN-ului sunt potențial reversibile. Astfel, intervențiile terapeutice care implică inversarea procesului de metilare a mai multor gene-cheie în carcinogeneza de prostată ar putea îmbunătăți opțiunile terapeutice actuale, sporind astfel efectul anti-cancer a genelor GSTP1 la pacienții cu risc sporit, cu PIN-ul de grad înalt sau la bărbații cu cancer de prostată stabilit. Inhibitorii nucleozidelor analogice ale metiltransferazelor ADN, cum ar fi 5-aza-2'-deoxicitidin, sunt capabili să demetileze ADN-ul și restabili expresia genelor inhibate. Din păcate, utilitatea clinică a acestor compuși nu a fost încă pe deplin realizată, în principal din cauza efectelor secundare ale acestora. Procainamida, un medicament anti-aritmic, un inhibitor non-nucleosidic al ADN metil-transferazelor (categorie de enzime care catalizează metilare ADN-ului în timpul replicării celulelor), inversează ADN-ul GSTP1 hipermetilate și restabilește exprimarea GSTP1 în LNCaP celulelor cancerului de prostată propagat in vitro sau in vivo ca tumori xenograft în șoareci atimici.[7] Utilizarea MCF-7, linie de celule din cancerul mamar, au constatat că procaina a produs o reducere cu 40% a conținutului de 5-metilcitozinei din ADN determinat prin electroforeză capilară de înaltă performanță și

digestia enzimatică totală a ADN. Procaina poate demetilă, de asemenea, insulele CpG dens hipermetilate, cum ar fi cele situate în regiunea promotor al beta-2 gena RAR, restabilind expresia genelor inhibitate. Această proprietate poate fi explicată prin legarea procainei la CpG ADN-ului îmbogățit. În cele din urmă, procaina are, de asemenea, efecte de inhibare a creșterii, în aceste celule canceroase provocând inhibiția mitotică.[26] Astfel, procaina și procainamida sunt agenți promițători pentru terapia viitoare a cancerului, bazat pe epigenetică. Lee și colaboratorii au raportat că GSTP1 a fost stimulată în compartimentul stromal de cancer de prostată hormono-independent, care pot contribui la chemorezistența de cancer avansat de prostată.[37]

Dovezile epidemiologice au arătat un risc redus de cancer de prostată la bărbații seleniu consumatori, ceea ce sugerează că are un rol de antioxidant în protecția împotriva cancerului de prostată. O analiză sistematică și meta-analiza literaturii de specialitate confirmă faptul că aportul de seleniu poate reduce riscul de cancer de prostată.[14] De asemenea, vitamina E poate reduce deteriorarea ADN-ului și inhibă transformarea prin intermediul funcției sale antioxidante. Suplimentarea pe termen lung cu alfa-tocoferol a redus substanțial incidența cancerului de prostată și a mortalității în cazul fumătorilor de sex masculin.[26]

Concluzii

Progresele realizate în cunoașterea mecanismelor implicate în progresia cancerului prostatic au identificat multiple ținte potențiale pentru terapia moleculară. Aceasta ar putea îmbunătăți atât supraviețuirea cât și calitatea vieții pacienților diagnosticați cu această afecțiune.

GSTP1 are un rol protector ca un agent antioxidant în transformarea și progresia cancerului de prostată. Interacțiunea dintre modificarea expresiei sau afectarea de GST pare să joace un rol important în carcinogeneza în prostată. Inhibarea metilării promotorului aberant ar putea fi o metodă eficientă de chemoprevenție.

Bibliografie

1. Arai T, Miyoshi Y, Kim SJ, :Association of GSTP1 CpG islands hypermethylation with poor prognosis in human breast cancers, *Breast Cancer Res Treat.* 2006 nov;100(2):169-76. Epub 2006 Jun 22.
2. Awasthi S, Bajpai KK, Piper JT.: Interactions of melphalan with glutathione and the role of glutathione S-transferase, *Drug Metab Dispos.* 1996 Mar;24(3):371-4.
3. Bastian PJ, Ellinger J, Heukamp LC.: Prognostic value of CpG island hypermethylation at PTGS2, RAR-beta, EDNRB, and other gene loci in patients undergoing radical prostatectomy, *Eur Urol.* 2007 Mar;51(3):665-74; discussion 674. Epub 2006 Aug 23.
4. Bentz BG, Haines GK 3rd, Radosevich JA.: Glutathione S-transferase pi in squamous cell carcinoma of the head and neck, *Laryngoscope.* 2000 Oct;110(10 Pt 1):1642-7.
5. Bostwick DG, Alexander EE, Singh R.: Antioxidant enzyme expression and reactive oxygen species damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer, *Cancer.* 2000 Jul 1;89(1):123-34.
6. Brooks JD, Weinstein M, Lin X.: CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic intraepithelial neoplasia, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998 Jun;7(6):5316
7. Cairns P, Esteller M, Herman JG, Schoenberg M, Jeronimo C.: Molecular detection of prostate cancer in urine by GSTP1 hypermethylation.; *Clin Cancer Res.* 2001 Sep;7(9):2727-30.
8. Cao DL, Yao XD.: Advances in biomarkers for the early diagnosis of prostate cancer, *Chin J Cancer.* 2010 Feb;29(2):229-33.
9. Carmen Jerónimo, Henning Usadel, Rui Henrique: Quantitation of GSTP1 Methylation in Non-neoplastic Prostatic Tissue and Organ-Confined Prostate Adenocarcinoma

10. Chan QK, Khoo US, Chan KY, Ngan HY.: Promoter methylation and differential expression of pi-class glutathione S-transferase in endometrial carcinoma, *J Mol Diagn.* 2005 Feb;7(1):8-16.
11. Cookson MS, Reuter VE, Linkov I, Fair WR: Glutathione S-transferase PI (GST-pi) class expression by immunohistochemistry in benign and malignant prostate tissue., *J Urol.* 1997 Feb;157(2):673-6
12. Crocitto LE, Korns D, Kretzner L, Shevchuk T.: Prostate cancer molecular markers GSTP1 and hTERT in expressed prostatic secretions as predictors of biopsy results., *Urology.* 2004 Oct;64(4):821-5
13. Dulaimi E, Ibanez de Caceres I, Uzzo RG.: Promoter hypermethylation profile of kidney cancer., *Clin Cancer Res.* 2004 Jun 15;10(12 Pt 1):3972-9.
14. Etminan M, FitzGerald JM, Gleave M, Chambers K.: Intake of selenium in the prevention of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis., *Cancer Causes Control.* 2005 Nov;16(9):1125-31.
15. Gonzalgo ML, Nakayama M, Lee SM.: Detection of GSTP1 methylation in prostatic secretions using combinatorial MSP analysis., *Urology.* 2004 Feb;63(2):414-8.
16. Green JA, Robertson LJ, Clark AH.: Glutathione S-transferase expression in benign and malignant ovarian tumours., *Br J Cancer.* 1993 Aug;68(2):235-9.
17. Harden SV, Guo Z, Epstein JI, Sidransky D.: Quantitative GSTP1 methylation clearly distinguishes benign prostatic tissue and limited prostate adenocarcinoma., *J Urol.* 2003 Mar;169(3):1138-42.
18. Hayes JD, Pulford DJ.: The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance., *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1995;30(6):445-600. (REVIEW)
19. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM.: Real time quantitative PCR., *Genome Res.* 1996 Oct;6(10):986-94.
20. Heinonen OP, Albanes D, Virtamo J, Taylor PR: Prostate cancer and supplementation with alpha-tocopherol and beta-carotene: incidence and mortality in a controlled trial., *J Natl Cancer Inst.* 1998 Mar 18;90(6):440-6.
21. Henrique R, Jeronimo C.: Molecular detection of prostate cancer: a role for GSTP1 hypermethylation., *Eur Urol.* 2004 Nov;46(5):660-9; discussion 669. (REVIEW)
22. Henrique R, Jeronimo C, Teixeira MR.: Epigenetic heterogeneity of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia: clues for clonal progression in prostate carcinogenesis., *Mol Cancer Res.* 2006 Jan;4(1):1-8.
23. 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 U S A.* 1996 Sep 3;93(18):9821-6.
24. Hopkins TG, Burns PA, Routledge MN.: DNA methylation of GSTP1 as biomarker in diagnosis of prostate cancer., *Urology.* 2007 Jan;69(1):11-6. (REVIEW)
25. Inoue T, Ishida T, Sugio K, Maehara Y, Sugimachi K.: Glutathione S transferase Pi is a powerful indicator in chemotherapy of human lung squamous-cell carcinoma., *Respiration.* 1995;62(4):223-7.
26. Isabelle Meiers M.D.: Glutathione S-Transferase pi (GSTP1)
27. Iurcu Corneliu: Managementul diagnosticului precoce și optimizarea screeningului multilateral în cancerul de prostată
28. Jenny Z Song, Clare Stirzaker, Janet Harrison: Hypermethylation trigger of the glutathione-S-transferase gene (GSTP1) in prostate cancer cells
29. Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, Oliveira J, Lopes C, Nelson WG, Sidransky D.: Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma., *J Natl Cancer Inst.* 2001 Nov 21;93(22):1747-52.

30. Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, Silva C, Oliveira J, Lopes C, Sidransky D.: Quantitative GSTP1 hypermethylation in bodily fluids of patients with prostate cancer., *Urology*. 2002 Dec;60(6):1131-5.
31. Kantor RR, Giardina SL, Bartolazzi A.: Monoclonal antibodies to glutathione S-transferase pi-immunohistochemical analysis of human tissues and cancers., *Int J Cancer*. 1991 Jan 21;47(2):193-201.
32. Katahira T, Takayama T, Miyanishi K.: Plasma glutathione S-Transferase P1-1 as a prognostic factor in patients with advanced non-Hodgkin's lymphoma (stages III and IV)., *Clin Cancer Res*. 2004 Dec 1;10(23):7934-40.
33. Kim JH, Choi YD, Lee JS, Lee JH, Nam JH, Choi C, Park MH, Yoon JH.: Borderline and malignant phyllodes tumors display similar promoter methylation profiles., *Virchows Arch*. 2009 Dec;455(6):469-75. Epub 2009 Nov 19.
34. Kinzler KW, Vogelstein B.: Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers., *Nature*. 1997 Apr 24;386(6627):761, 763.
35. Kollermann J, Kempkensteffen C, Helpap B, Schrader M, Krause H, Muller M, Miller K, Schostak M.: Impact of hormonal therapy on the detection of promoter hypermethylation of the detoxifying glutathione-S-transferase P1 gene (GSTP1) in prostate cancer., *BMC Urol*. 2006 Jun 27;6:15.
36. Lee WH, Morton RA, Epstein JI, Brooks JD: Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Nov 22;91(24):11733-7.
37. Morrow CS, Smitherman PK, Diah SK, Schneider E, Townsend AJ.: Coordinated action of glutathione S-transferases (GSTs) and multidrug resistance protein 1 (MRP1) in antineoplastic drug detoxification. Mechanism of GST A1-1- and MRP1-associated resistance to chlorambucil in MCF7 breast carcinoma cells., *J Biol Chem*. 1998 Aug 7;273(32):20114-20.
38. Moskaluk CA, Duray PH, Cowan KH, Linehan M, Merino MJ.: Immunohistochemical expression of pi-class glutathione S-transferase is down-regulated in adenocarcinoma of the prostate., *Cancer*. 1997 Apr 15;79(8):1595-9.
39. Niitsu Y, Takahashi Y, Saito T, Hirata Y, Arisato N, Maruyama H, Kohgo Y, Listowsky I.: Serum glutathione-S-transferase-pi as a tumor marker for gastrointestinal malignancies., *Cancer*. 1989 Jan 15;63(2):317-23.
40. Pandey M, Shukla S, Gupta S.: Promoter demethylation and chromatin remodeling by green tea polyphenols leads to re-expression of GSTP1 in human prostate cancer cells., *Int J Cancer*. 2010 Jun 1;126(11):2520-33.
41. Perry AS, Foley R, Woodson K, Lawler M.: The emerging roles of DNA methylation in the clinical management of prostate cancer., *Endocr Relat Cancer*. 2006 Jun;13(2):357-77. (REVIEW)
42. Randall BJ, Angus B, Akiba R.: Glutathione S-transferase (placental) as a marker of transformation in the human cervix uteri: an immunohistochemical study., *Br J Cancer*. 1990 Oct;62(4):614-8.
43. Rennie PS, Nelson CC.: Epigenetic mechanisms for progression of prostate cancer., *Cancer Metastasis Rev*. 1998-1999;17(4):401-9. (REVIEW)
44. Satta T, Isobe K, Yamauchi M, Nakashima I, Takagi H.: Expression of MDR1 and glutathione S transferase-pi genes and chemosensitivities in human gastrointestinal cancer., *Cancer*. 1992 Feb 15;69(4):941-6.
45. Simic T, Mimic-Oka J, Savic-Radojevic A.: Glutathione S-transferase T1-1 activity upregulated in transitional cell carcinoma of urinary bladder., *Urology*. 2005 May;65(5):1035-40.