

بررسی وضعیت بیان و متیلاسیون پروموتور ژن ELF5 در بیماران مبتلا به سرطان پستان

آذر حیدری زادی^{۱،۲}، مهدیه سلیمی^{۳*}، حسین مزدارانی^۴

(۱) گروه ژنتیک، واحد علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد (سلامی، مرودشت، ایران)

(۲) گروه ژنتیک، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد (سلامی، مرودشت، ایران)

(۳) گروه ژنتیک پزشکی، پژوهشکده زیست فناوری پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

(۴) گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱/۲۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۶

چکیده

مقدمه: سرطان پستان شایع ترین نوع سرطان در زنان ایرانی است. ژن ELF5 به عنوان یک فاکتور رونویسی از خانواده ETS می تواند نقش کلیدی در بدخیمی سرطان پستان خصوصاً در زیر گروه basal-like و فرم های مقاوم آندوکرینی ایفا نماید. تغییرات متیلاسیون پروموتور ژن، هدف مناسبی جهت استراتژی های درمانی محسوب می شود. در مطالعه حاضر فراوانی این پدیده اپیژنتیک و بیان ژن ELF5 و نیز ارتباط آن ها با ویژگی های پاتولوژیکی و بالینی بیماران ایرانی مبتلا به سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: در مطالعه حاضر به منظور بررسی متیلاسیون پروموتور ژن ELF5، ۱۳۴ نمونه بافتی با استفاده از روش Methylation Specific PCR و جهت بررسی بیان ژن، ۱۶۴ نمونه بافتی توموری و ۱۰ نمونه بافت نرمال پستانی مستخرج از جراحی زیبایی کاهش حجم پستان با استفاده از روش Real-Time RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته های پژوهش: داده های حاصل از این پژوهش مبین این امر است که حدود ۷۰ درصد از نمونه های بافت بیماران مبتلا به سرطان پستان در ناحیه پروموتور ژن ELF5 واجد متیلاسیون می باشند. هم چنین کاهش بیان ژن ELF5 با افزایش استیج یا مرحله بیماری، سه گانه منفی بودن و تهاجم ارتباط معناداری را نشان می دهد.

بحث و نتیجه گیری: نتایج حاضر مبین این است که افزایش فراوانی متیلاسیون پروموتور این ژن در بیماران نسبت به بافت های کنترل و ارتباط آن با عوامل موید پروگنوز ضعیف بیماری می تواند به عنوان یک کاندید احتمالی جهت مطالعات بیشتر در جهت تایید نقش زیست نشانگر پیش آگهی ضعیف در سرطان پستان معرفی گردد.

واژه های کلیدی: ELF5، متیلاسیون، سرطان پستان، بیان ژن، اپی ژنتیک

* نویسنده مسئول: گروه ژنتیک پزشکی، پژوهشکده زیست فناوری پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
Email: salimi@nigeb.ac.ir

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

سرطان پستان یکی از اساسی ترین مشکلات حوزه سلامت زنان در جهان محسوب می شود. سرطان پستان شایع ترین سرطان در زنان ایرانی بوده و در کشور ما سالانه بیشتر از ۵۰۲۰۰ زن به علت ابتلا به سرطان پستان فوت می کنند. گزارشات ارائه شده مبین این امر است که سن ابتلا در زنان ایرانی به سرطان پستان یک دهه زودتر از همتایان اروپایی و با میانگین ۴۷/۱ الی ۴۸/۸ سال گزارش شده است (۱).

اخیراً تغییرات اپی ژنتیک به عنوان عوامل اطلاع دهنده مهم و با ارزش زیست نشانگری در انواعی از بیماری ها از جمله سرطان مورد بررسی قرار گرفته اند. رویدادهای اپی ژنتیکی منجر به تغییرات قابل توارث در بیان ژن و ساختار کروماتین، بدون تغییر در توالی DNA می شوند. متیلاسیون DNA تنها تغییر اپی ژنتیکی است که مستقیماً DNA را تحت تاثیر قرار می دهد. این امر عمدتاً در نواحی CpG به وقوع می پیوندد. متیلاسیون با اثر بر پروموتور ژن باعث تنظیم بیان ژن می شود. تغییرات در الگوی متیلاسیون ممکن است به تومورزایی و ایجاد تومور بیانجامد (۲).

در حدود ۲۰ درصد CpG ها در ژنوم انسان در جزایر CpG واقع شده اند. این جزایر دارای طول ۲۰۰ جفت باز و حداقل محتوای ۵۰ درصدی CpG می باشند. در حدود ۶۰ درصد ژن های انسان در ناحیه پروموتور خود واجد جزایر CpG بوده و در اکثر بافت ها این نواحی به صورت غیر متیله هستند (۳،۴). متیلاسیون پروموتور ژنی تحت تاثیر فاکتورهای بیرونی می تواند بر بیان ژن ها و عملکرد ژنوم موثر واقع شود. سیتوزین های متیله شده الگوهای اختصاصی را برای انواع بافت و حالات مختلف بیماری به وجود می آورد و موقعیت های متغییر متیلاسیون که به اختصار MPVs اطلاق می گردد به عنوان نشانگرهای اپی ژنتیکی محسوب می شوند. تغییرات متیلاسیون به صورت اختصاصی ممکن است بر روند پاسخ به درمان های مختلف در سرطان موثر باشند و کاربرد زیست نشانگر پیش بینی پاسخ به درمان برای آن ها متصور است (۵).

فاکتورهای رونویسی ETS در کنترل رشد سلولی و تومور زایی نقش دارند (۶-۸). یکی از اعضای این خانواده

ژنی، E74like factor (ELF5) است که به دلیل شباهت در دمین ETS در این خانواده قرار می گیرد. مکان کروموزومی ELF5 در انسان، 11p13-15 می باشد که در سرطان ها حذف این ناحیه تحت فرآیند «از دست رفتن هتروزیگوتی (LOH)» به کرات گزارش شده است. از طرفی گزارش ها مبین این امر است که پروتئین های رمزگذاری شده این ناحیه دارای نقش سرکوبگر تومور هستند (۹،۱۰). از جمله سرطان هایی که عدم هتروزیگوسیتی یا LOH در ناحیه کروموزومی ELF5 در آن ها گزارش شده، می توان به سرطان های پستان، کلیه، پروستات، تخمدان (۸-۶)، کارسینومای سلول های رنال (۱۱)، سرطان یوروتلیال (۹) و ریه (۱۲) اشاره نمود.

ELF5 با مهار ژن های SNAIL2, TWIST1, TWIST2, ZEB1, ZEB2 در تکوین غدد پستانی نقش دارد. در طی فرآیند سرطانی شدن پستان این عملکرد دچار اختلال می شود. مطالعات پیشین گزارش نموده است که کاهش بیان ELF5 در طی سرطان پستان و در بافت توموری تبدیل سلول های اپی تلیال به مزانشیمی را القا نموده و به سلول ویژگی های تهاجم و عود مجدد را می بخشد یا به عبارت دیگر کاهش بیان ELF5 در سرطان پستان با بالا رفتن EMT (Epithelial Mesenchymal transition) همراه است (۱۳،۱۴).

بیان ELF5 در نمونه های بافت پستانی نرمال و زیر گونه های شبه نرمال و بازال در بالاترین سطح گزارش شده است. این در حالی که در مابقی زیر گونه ها بیان این ژن پایین است. هم چنین گزارش شده است که تغییر بیان این ژن قادر است زیر گونه هایی را تغییر دهد مثلاً تبدیل سلول های بازال و HER2+ به لومینال و یا تبدیل سلول های شبه نرمال و Claudin-low به بازال را القا نماید. این امر مبین نقش مهم ELF5 به عنوان یک تنظیم کننده مهم زیر گونه می باشد (۱۵،۶).

ژن ELF5 در مسیر علامت دهی پرولاکتین و در پایین دست مسیر، ایفای نقش می کند. از سوی دیگر به عنوان تنظیم کننده STAT5 عمل کرده به این نحو که افزایش سطح STAT5 همراه با افزایش سطح بیان ELF5 بوده و هر دو فاکتور اثر متقابل دوطرفه مستقیم

روی یکدیگر دارند. در سلول های سرطانی پستان، فعالیت JAK1 در PRLR/JAK2 موجب افزایش اثر متقابل پیام رسانی STAT5 می شود (۱۶، ۱۷). محققان نشان دادند که پیش ساز لومینال CD61+ توسط STAT5A القا و توسط ELF5 به سلول های آلوئولار کاملاً تمایز یافته تبدیل می شود، بیان اجباری ELF5 با کاهش تدریجی جمعیت سلول پیش ساز CD61+ همراه بوده و به عنوان کلید تنظیم کننده سرنوشت این سلول محسوب می شود. سلول پیش ساز CD61+ آغاز و مبدا سلول های پستانی سرطان بازال می باشد (۱۸). این سلول ها از مسیر علامت دهی RANK-Ligand سبب بیان ELF5 و متعاقب آن تمایز بافت اپی تلیال می شود. این پروسه توسط میانجیگری ELF5 تقویت شده و سبب افزایش بیان RANK و تقویت سیگنالینگ NOTCH می شود (۳). گزارش ها حاکی از افزایش فعال سازی این مسیر در سرطان پستان می باشد. ELF5 به عنوان تنظیم کننده اصلی ریخت زایی در پستان بوده و این کار را از طریق مهار JAK2 به انجام می رساند (۱۷).

از طرفی بیان بالای ELF5 با بیشتر سرطان های بازال تهاجمی و مقاومت به آنتی استروژن ها مرتبط گزارش شده و هدف احتمالی جهت درمان سرطان های بازال محسوب می شود (۱۹، ۶).

درک بیشتر مکانیسم های درگیر در تومورزایی سرطان پستان می تواند موجب ارتقا و پیشرفت انتخاب های درمانی در گروه های با پروگنوز یا پیش آگهی ضعیف سرطان پستان و نیز انواع تهاجمی آن شود. در این مطالعه بیان ژن ELF5 و درجه شیوع خاموشی اپی ژنتیکی این ژن با متیلاسیون پروموتور در بیماران ایرانی مبتلا به سرطان پستان در قیاس با گروه کنترل در بافت پستان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

نمونه گیری: در این مطالعه نمونه گیری از بافت تومور و بافت نرمال مجاور تومور در بیماران مبتلا به سرطان پستان و نمونه بافت پستانی سالم از افرادی که فاقد هر گونه سرطان و بیماری های پستان در خود و فامیل درجه یک خود بوده و به دلایل زیبایی تحت عمل جراحی قرار گرفتند، انجام گرفت. همه افراد مبتلا به سرطان پستان از نوع داکتال کارسینوما بودند و پس از

تایید پاتولوژی در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند. بیماران از بیمارستان امام خمینی تهران طی سال های ۱۳۹۵-۱۳۹۷ جمع آوری شدند. اطلاعات پاراکلینیکی مورد نیاز از قبیل سن، اندازه تومور، وضعیت گیرنده های هورمونی (ER, PR, HER2) وضعیت درجه تومور و مرحله بیماری کسب گردید که در آنالیزهای جانبی مورد استفاده قرار گرفت. مراحل بیماری در چهار مرحله ۱، ۲، ۳ و ۴ تقسیم بندی شد. در این مطالعه، تعداد ۱۴۴ نمونه، مشتمل بر ۶۷ نمونه بافت تومور، ۶۷ نمونه بافت طبیعی مجاور تومور و ۱۰ بافت پستان طبیعی مستخرج از زنانی که بنا به مقاصد زیبایی تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند مورد بررسی قرار گرفتند. خصوصیات دموگرافیک بیماران و گروه کنترل نرمال در جدول شماره ۱ خلاصه شده است.

اطلاعات بیماران از لحاظ مرحله بیماری، درگیری غدد لنفاوی، وضعیت متاستاز و وضعیت گیرنده های هورمونی جمع آوری شد. از نظر اخلاقی کلیه مراحل نمونه گیری مطابق با قوانین کمیته اخلاق پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و منطبق با قوانین هلسینکی انجام گردید (کد اخلاق 6.10.2016، 52d/4922). از کلیه بیماران و افراد گروه کنترل رضایت نامه جهت استفاده از نمونه زیستی آنان در پروژه تحقیقاتی بدون ذکر نام اخذ و هیچ هزینه ای بر بیماران جهت انجام آزمایشات تحمیل نشد.

استخراج RNA و سنتز *cdDNA* RNA با استفاده از محلول (Sinaclon, Iran) RNX-PLUS از بافت طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. مقدار غلظت و کیفیت RNA به ترتیب با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر Nanodrop ND-1000 (Thermo-Scientific, USA) و با سنجش نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ و با استفاده از الکتروفورز محصول RNA بر ژل ۰/۸ درصد آگارز و سنجش باندهای s18 و s28 ریبوزومی انجام گرفت. سنتز *cdDNA* مطابق دستورالعمل بهینه شده با استفاده از کیت High Capacity *cdDNA* Reverse Transcription Kit (the Yektatajhez reverse transcription *cdDNA* synthesis kit, Iran) انجام گرفت.

طراحی آغازگر جهت سنجش بیان ژن: توالی مطلوب آغازگر و غلظت مناسب آن دو عامل موثر در اختصاصیت

منحنی های استاندارد حاصل از سنجش بیان در غلظت های مختلف cDNA مورد بررسی قرار گرفت و پس از اطمینان از اختصاصیت آغازگرها برای تعیین میزان بیان ژن ELF5 از روش لیواک و فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و بر اساس مضربی از نرمال کنترل، نرمالایز شده با میزان بیان ژن بتا اکتین محاسبه گردید. بیان RNA با میزان دو برابر و یا بیشتر به عنوان افزایش بیان و بین ۰/۵ و ۲ برابر به عنوان میزان نرمال و ۰/۵ برابر و کمتر به عنوان کاهش بیان منظور گردید.

استخراج DNA و تیمار بی سولفیت: جهت مطالعه متیلاسیون پروموتور ژن ELF5، DNA ژنومی از بافت افراد بیمار و سالم استخراج شد. بدین منظور جهت استخراج DNA ژنومی از بافت تومور و نرمال از کیت (Cinaclon cinnaGen Bioscience Co, Iran) مطابق با دستورالعمل کیت استخراج انجام شد.

بعد از استخراج نمونه های DNA کمیت و کیفیت DNA های استخراج شده با استفاده از سنجش جذب طیف نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ مورد بررسی قرار گرفت و سپس DNA های با کیفیت مطلوب تحت تیمار بی سولفیت با استفاده از کیت EpiTect Bisulfite محصول شرکت کیژن آلمان قرار گرفتند.

تیمار DNA هدف با سدیم بی سولفیت به تبدیل سیتوزین های غیر متیله به یوراسیل می انجامد این در حالی است که سیتوزین های متیله بدون تغییر باقی می ماند. این تغییر باز حاصل شده پس از تیمار امکان بررسی الگوی متفاوت دو فرم متیله و غیر متیله را فراهم می سازد.

طراحی آغازگر مناسب جهت انجام PCR مختص مطالعه متیلاسیون: در طراحی آغازگرهای MS-PCR توالی تیمار شده DNA ژنومی با سدیم بی سولفیت، به عنوان توالی هدف، مد نظر قرار می گیرد. پس از تیمار DNA با سدیم بی سولفیت کلیه سیتوزین ها به جز سیتوزین هایی که در قالب CpG و به صورت متیله هستند به یوراسیل و در نهایت به تیمین تبدیل می شوند. بنا بر این برای طراحی آغازگر اختصاصی این نوع PCR ابتدا توالی ناحیه پروموتوری مورد نظر مشخص شده و با در نظر گرفتن نوع بازها بعد از تیمار بی سولفیت طراحی

و کارایی PCR محسوب می شوند. طراحی آغازگرهای پیش رونده F و معکوس R، در ناحیه اتصال آگزون ها انجام شد. طراحی آغازگرها از ناحیه اتصال آگزون ها شناس اتصال آغازگر به DNA ژنومی را کاهش می دهد که این امر در بررسی های بیان ژنی از اهمیت بالایی برخوردار است. توالی رونویس ژن ها از سایت NCBI به دست آمد و با استفاده از نرم افزارهای Gene Primer 3 و Runner طراحی آغازگر انجام شد.

توالی آغازگرها برای ژن ELF5،
F: 5'- TGCCCTCACGGTAATGTTGG-3'
و R: 5'- TGATGCTCAAAGGCAGGG-3'
با طول قطعه محصول ۱۲۹ جفت بازی و ژن بتا اکتین
F: 5'- GAGACCTTCAACACCCCAGC-3'
و R: 5'- AGACGCAGGATGGCATGG-3'
با طول قطعه محصول ۱۶۱ جفت بازی می باشد.

انجام Real-Time RT-PCR جهت سنجش بیان ژن: جهت انجام واکنش های Real-Time RT-PCR از مستر میکس حاوی رنگ سایبرگرین محصول شرکت یکتا تجهیز آزما و دستگاه rotor-gene 6000 ساخت شرکت Corbett استفاده شد. cDNA بافت پستان نرمال به عنوان کنترل مثبت جهت سنجش بیان ژن ELF5 مورد استفاده قرار گرفت. برنامه دمایی واکنش به صورت داناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، واسرشتی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت و با مرحله تطویل در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و به دفعات تکرار ۴۰ سیکل ادامه یافت.

در هر دور سنجش بیان ژن، از نمونه های کنترل منفی (میکروتیوب های فاقد cDNA که محتوی آب به میزان cDNA بودند) به منظور اطمینان از عدم آلودگی با DNA ژنومی استفاده شد. ژن بتا اکتین به عنوان نرمالایزر مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز منحنی ذوب برای تعیین اختصاصی بودن محصولات PCR استفاده شد. به علاوه محصولات PCR بر روی ژل ۱/۵ درصد آگارز برای اثبات اندازه مشخص محصولات و اختصاصیت بارگذاری شدند. اختصاصیت آغازگرهای ژن های ELF5 و بتا اکتین با استفاده از بررسی

شد. جهت کنترل مثبت نمونه های متیله و غیر متیله از کنترل های اختصاصی PCR Kit Methylation Specific محصول شرکت کیاژن استفاده شد. واکنش PCR در ۴۰ سیکل و با شرایط دمایی واسرشتی ۵ دقیقه ای ابتدایی در ۹۵ درجه سانتی گراد، تکرار چرخه دمایی ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه در ۵۵ درجه سانتی گراد و متعاقب آن تطویل در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و نهایتاً تطویل نهایی به مدت ۱۰ دقیقه و در ۷۲ درجه سانتی گراد. بعد از واکنش MS-PCR، الکتروفورز محصول بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام شد. در این روش برای هر جفت آغازگر متیله و غیر متیله یک PCR جداگانه صورت گرفت.

آنالیز آماری: ارزیابی و سنجش آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. ارزش P کوچک تر از ۰/۰۵ ($P < 0.05$) به عنوان سطح قابل قبول معنی داری پذیرفته شد، جهت سنجش برخورداری از توزیع نرمال یا غیر نرمال داده ها از آزمون کولموگراف اسمیرنوف استفاده شد. سپس با توجه به نرمال نبودن داده ها از آزمون های غیر پارامتری من ویتنی برای مقایسه بین دو گروه و روش کروسکال-والیس برای مقایسه معناداری میان چند گروه استفاده شد. جهت آنالیز آماری داده های مربوط به وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن ELF5 در گروه های آزمون و کنترل ژن به صورت درصد فراوانی از روش مربع کای (χ^2) استفاده شد.

یافته های پژوهش

مقایسه میانگین بیان ژن ELF5 در بافت توموری پستان در مقایسه با بافت نرمال مجاور تومور و بافت نرمال پستانی: همان طور که در شکل شماره ۱ نشان داده شده است میانگین بیان ژن ELF5 در نمونه بافت توموری پستان در گروه بیماران مبتلا به سرطان پستان از نوع داکتال کارسینوما در مقایسه با نمونه بافت نرمال پستانی مجاور تومور و گروه کنترل نرمال که در برگزیده نمونه بافت پستان از افراد غیر مبتلا به سرطان پستان و هر گونه اختلال و بدخیمی پستان در خود و فامیل درجه یک خود هستند، اختلاف معنی داری را نشان می دهد. محدوده بیان این ژن در گروه بیمار از ۰/۱۲ تا ۲/۸ برابر

آغازگر انجام شد. توالی پروموتورها از نرم افزار تحت وب Genepromoter در سایت <http://www.genomatix.de/en/index.html> حاصل شد. بدین منظور استخراج توالی پروموتور ژن ها از حد فاصل +۲۰۰ تا -۱۵۰۰ جفت باز بالادست (upstream) ژن مورد نظر صورت گرفت. هم چنین موقعیت پروموتورها طبق دیتابیس Database of Transcriptional Start Site (DBTSS) (dbtss.hgc.jp) مورد بررسی قرار گرفت. موقعیت Transcriptional Start Site ژن ELF5 در 34511550-34512049 ناحیه ژنومی، قرار داشت.

پس از دریافت توالی مورد نظر برای ایجاد تغییرات بازی حاصل از تیمار سدیم بی سولفیت به صورت مجازی از نرم افزار Meth Primer Software جهت تعیین بهترین آغازگرها در نواحی غنی از بازهای سیتوزین و گوانین (CpG island) مربوط به پروموتورها استفاده شد. هم چنین پس از طراحی آغازگرها برای سنجش اختصاصیت آغازگرهای طراحی شده از نرم افزار Bisearch استفاده شد و با استفاده از این نرم افزار، آغازگرها به صورت مجازی BLAST شدند.

توالی آغازگرهای متیله و غیر متیله ژن ELF5 به قرار ذیل است:

MET(F): 5'-GTGCGTAAATTTGAAAAATTAAC-3'

و

MET(R): 5'-AACGCTTACGTAAAAACAACGAT-3'

با طول قطعه ۱۶۸ جفت بازی و هم چنین توالی آغازگرهای غیر متیله به صورت

UNMET(F): 5'-TGTGTAAATTTGAAAAATTAATGG-3'

و

UNMET(R): 5'-AAAAACTTACATAAAAAACAAAAT-3'

با طول قطعه ۱۶۸ جفت باز.

در *Methylation Specific PCR (MS-PCR)*

روش MS-PCR، DNA تحت تیمار بی سولفیت به عنوان الگو و دو آغازگر یا آغازگر متیله و غیر متیله اختصاصی برای ژن ELF5 مورد استفاده قرار گرفت. واکنش MSP در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر با استفاده از مستر میکس هات استارت مخصوص متیلاسیون محصول شرکت کیاژن به نام EpiTect MSP انجام

بافت نرمال کنترل و با میانگین $0/75 \pm 0/82$ محاسبه گردید.

مقایسه میانگین بیان ژن ELF5 در مراحل مختلف بیماری و خصوصیات متفاوت کلینیکوپاتولوژی بیماران: میانگین بیان ژن ELF5 با افزایش مرحله بیماری کاهش چشمگیری را نشان می دهد (شکل شماره ۲). به عبارت دیگر رابطه معکوس بین بیان ژن ELF5 و پیشرفت مرحله بیماری برقرار است.

همان طور که در شکل شماره ۳ نشان داده شده است مقایسه میانگین بیان ELF5 در گروه های مختلف بیماران از نظر وضعیت گیرنده های هورمونی در سطح تومور بیانگر تفاوت معنی دار آماری در گروه سه گانه منفی یا تریپل نگاتیو (ER-, PR-, HER2-) در مقایسه با گروه غیر سه گانه منفی می باشد. این در حالی است که تفاوت معنی داری میان گروه های واجد و فاقد گیرنده های استروژن، پروژسترون و گیرنده های فاکتور رشد اپیدرمی HER2 از نظر میزان بیان ژن ELF5 مشاهده نشد. وقتی بیماران بر اساس درگیری و یا عدم درگیری غدد لنفاوی به دو گروه (LN+) درگیری غدد لنفاوی و (LN-) عدم درگیری غدد لنفاوی تقسیم شدند، کاهش بیان معنی داری در گروه واجد درگیری غدد لنفاوی نسبت به گروهی که غدد لنفاوی در آن درگیر نیستند مشاهده شد.

نتایج متیلاسیون پرموتر ژن ELF5 در بافت تومور

پستانی در مقایسه با بافت های نرمال مجاور تومور و نرمال کنترل: همان طور که در جدول شماره ۲ خلاصه شده فراوانی متیلاسیون پرموتر ژن ELF5 در گروه های تومور، نرمال مجاور تومور و نرمال کنترل مورد مقایسه قرار گرفت. داده های به دست آمده از این پژوهش مبین این امر است که در حدود ۷۰ درصد نمونه های توموری واجد متیلاسیون در ناحیه پرموتر ژن ELF5 می باشند این در حالی است که تنها ۶ درصد از نمونه های نرمال مجاور تومور واجد متیلاسیون ناحیه پرموتر ژن ELF5 هستند و هیچ یک از نمونه های بافتی گروه نرمال کنترل، متیلاسیون پرموتر ژن را نشان ندادند. نکته جالب توجه این که در گروه نرمال مجاور تومور در حدود ۶۴ درصد از نمونه ها واجد هر دو الگوی متیله و غیر متیله در ناحیه پرموتر ژن ELF5 می باشند.

مقایسه فراوانی متیلاسیون پرموتر ژن ELF5 در گروه های مختلف بیماران مبتلا به سرطان پستان بر اساس خصوصیات پاتولوژی و بالینی بیماران: فراوانی متیلاسیون پرموتر ژن ELF5 در گروه های مختلف بیماران بر اساس خصوصیات پاتولوژی و کلینیکی بیماران در شکل شماره ۴ به تصویر کشیده شده است. نتایج حاصل بیانگر این است که ارتباط معنی داری بین درگیری غدد لنفاوی و متاستاز به نقاط دور و افزایش فراوانی متیلاسیون پرموتر ژن ELF5 وجود دارد.

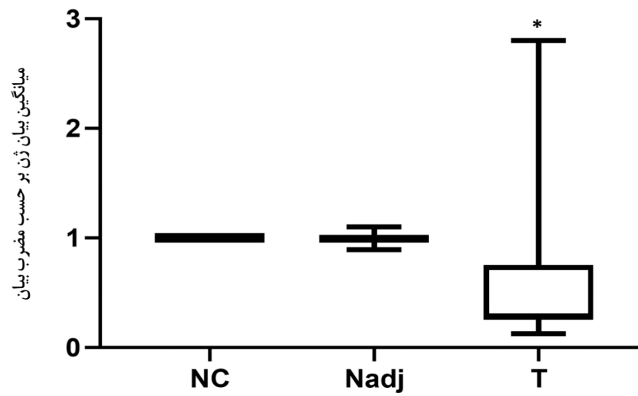
جدول شماره ۱. اطلاعات دموگرافیک بیماران و نمونه های کنترل

تعداد کنترل (درصد)	تعداد بیماران (درصد)	خصوصیات مورد بررسی	
۳۰	۶۷	تعداد	
$16/4 \pm 48/5$	$12/6 \pm 47/2$	میانگین	سن (بر حسب سال)
۸۰-۲۵	۴۸-۲۷	بازه	
	(۲۲/۴)۱۵	مرحله ۱	مرحله بیماری در زمان تشخیص
	(۳۱/۳)۲۱	مرحله ۲	
	(۳۴/۳)۲۳	مرحله ۳	
	(۱۲)۸	مرحله ۴	
	(۴۴/۸)۳۰	عدم درگیر	وضعیت درگیری غدد لنفی
	(۵۵/۲)۳۷	درگیر	
	(۱۲) ریه ۶ درگیری استخوان (۲) ۸	متاستاز	وضعیت متاستاز به نقاط دور
	۵۹(۸۸)	عدم متاستاز	
	(۸۰)۵۴	مثبت ER	وضعیت گیرنده های هورمونی (IHC)
	(۲۰)۱۲	منفی ER	
	(۷۷/۶)۵۲	مثبت PR	
	(۲۲/۴)۱۵	منفی PR	
	(۳۴/۳)۲۳	مثبت HER2	
	(۶۵/۷)۴۴	منفی HER2	
	(۱۲) ۸	سه گانه منفی (TN)	
	(۸۸) ۵۹	غیر سه گانه منفی (NTN)	

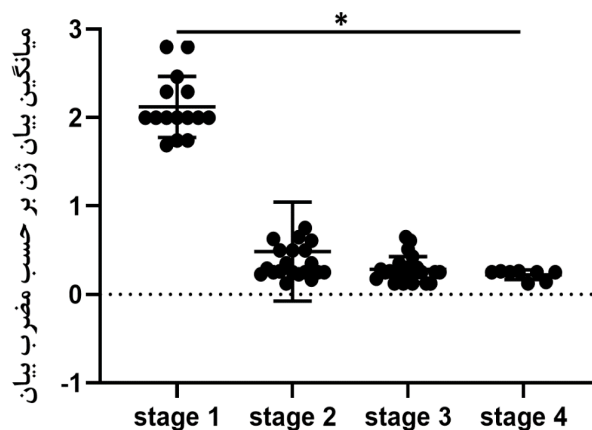
جدول شماره ۲. طبقه بندی وضعیت متیلاسیون پروموتور ژن ELF5 بر اساس انواع نمونه های توموری و نرمال پستان

P	وجود هر دو فرم متیله و غیر متیله در ناحیه پروموتور ژن ELF5 (درصد)	پروموتور غیر متیله ژن ELF5 (درصد)	پروموتور متیله ژن ELF5 (درصد)	تعداد کل	نوع نمونه
*	۳ (۴/۷۴)	۱۷ (۲۵/۳)	۴۷ (۷۰/۱)	۶۷	تومور پستان
*	۴۳ (۶۴/۱)	۲۰ (۲۹/۹)	۴ (۶)	۶۷	بافت نرمال مجاور تومور
*	۰ (۰)	۳۰ (۱۰۰)	۰ (۰)	۳۰	بافت نرمال پستانی

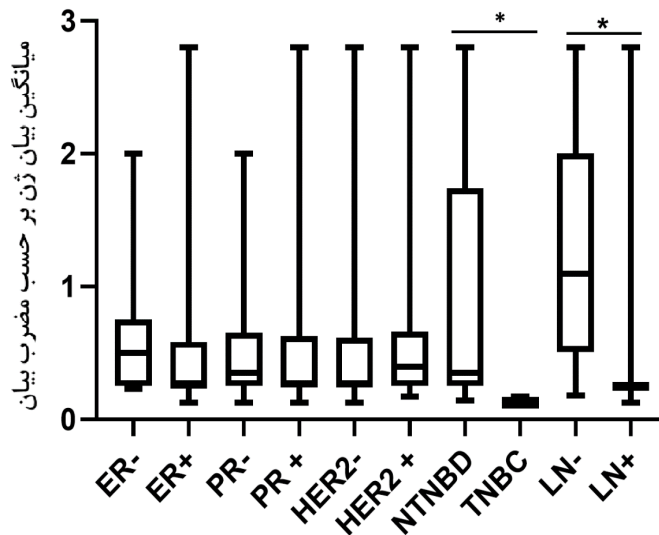
*P<0.0001



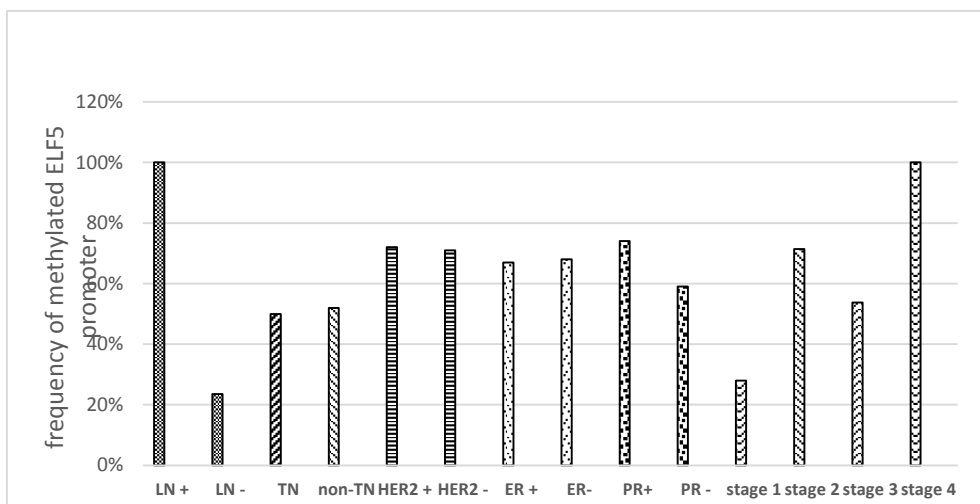
شکل شماره ۱. میانگین بیان ژن ELF5 در تومور پستانی بیماران مبتلا به سرطان پستان از نوع داکتال کارسینوما در مقایسه با بافت نرمال مجاور تومور و گروه کنترل نرمال، T: تومور، Nadj: بافت نرمال مجاور تومور، NC: بافت نرمال کنترل، *P<0.0001



شکل شماره ۲. میانگین بیان ژن ELF5 در مراحل مختلف سرطان پستان از نوع داکتال کارسینوما *P<0.0001



شکل شماره ۳. مقایسه میانگین بیان ژن ELF5 در گروه های مختلف بیماران بر اساس خصوصیات کلینیکوپاتولوژی بیماران
 ER: گیرنده استروژن، PR: گیرنده پروژسترون، HER2: گیرنده فاکتور رشد انسانی،
 TNBC: سرطان پستان سه گانه منفی، LN: درگیری غدد لنفاوی *P<0.0001



شکل شماره ۴. مقایسه فراوانی متیلاسیون پروموتور ژن ELF5 در گروه های مختلف بیماران مبتلا به سرطان پستان طبقه بندی شده بر اساس خصوصیات بالینی و هیستوپاتولوژی، ER: گیرنده استروژن، PR: گیرنده پروژسترون، HER2: گیرنده فاکتور رشد انسانی، TNBC: سرطان پستان سه گانه منفی، LN: درگیری غدد لنفاوی

بحث و نتیجه گیری

سرطان های مختلف از جمله سرطان ریه و پستان، در تحقیق حاضر بیان این ژن در گروه های مختلف هیستوپاتولوژی بیماران مبتلا به سرطان پستان تک گیرداکتال کارسینوما که شایع ترین نوع سرطان پستان مهاجمی در زنان ایرانی می باشد مورد بررسی قرار گرفت. هم چنین متیلاسیون ناحیه پروموتوری این ژن به عنوان یک عامل اپی ژنتیکی موثر در تغییر بیان ژن، بررسی شد.

بررسی بیان ژن های مختلف و یافتن ارتباط بیان آن ها با خصوصیات مختلف هیستوپاتولوژیکی نظیر نوع گیرنده های هورمونی و شرایط بالینی بیمار از اهمیت چشمگیری برخوردار است چرا که می تواند به کاندید کردن زیست نشانگرهایی با ارزش های مختلف تشخیصی، پیش بینی و پیش آگهی بیماری بیانجامد. به همین منظور و به دلیل اهمیت ژن ELF5 در

مطالعات مروری مبین این امر است که اختلال بیان در ژن ELF5 در بسیاری از انواع سرطان ها از جمله سرطان پستان، کلیه، پروستات، تخمدان (۸-۶)، کارسینومای سلول های رنال (۱۱)، سرطان یوروتلیال (۹) و ریه (۱۲) گزارش شده است. در تحقیق حاضر، نتایج نشان داد که میانگین بیان ژن ELF5 در بافت توموری در مقایسه با بافت نرمال مجاور تومور و بافت نرمال کنترل کاهش بیان چشمگیری را نشان می دهد هر چند که بازه بیانی این ژن گسترده بود. این اختلاف میزان بیان بر اساس وضعیت کلی نوپاتولوژی بیماران تفسیر می شود به این نحو که بیشترین میزان بیان این ژن در مرحله یک بیماری مشاهده می شود و با پیشرفت مراحل بیماری بیان ژن کاهش یافته و در مراحل ۳ و ۴ بیماری به حداقل می رسد. یک تفسیر محتمل بر این موضوع، این است که ژن ELF5 به عنوان یک ژن سرکوبگر تومور ایفای نقش می کند و اگر بیان آن به یک حد آستانه برسد موجب تغییر ساختار ژن ER α و در نتیجه مهار گیرنده استروژن و پیشرفت بیماری از لومینال به سمت بازال می شود (۱۵). مطالعات مروری نشان داد که در اکثر سرطان ها ژن ELF5 با کاهش بیان روبرو است. کاهش کلی بیان ELF5 و هم چنین نقش آن در مهار پروسه EMT بیانگر فعالیت سرکوبگری تومور این فاکتور رونویسی است (۱۳، ۶). نتایج ما مبین کاهش چشمگیر بیان ژن ELF5 در گروه TNBC یا سه گانه منفی (فاقد هر سه گروه گیرنده های استروژن، پروژسترون و HER2) در مقایسه با گروه بیماران واجد یک یا چند گیرنده از گیرنده های مذکور می باشد. این گروه از بیماران که در اصطلاح سه گانه منفی نامیده می شوند از نظر وضعیت پیش آگهی بیماری دارای پیش آگهی ضعیف هستند. پس می توان این گونه استنباط کرد که کاهش بیان ژن ELF5 به عنوان یک ژن سرکوبگر تومور ممکن است به عنوان یک مارکر زیستی احتمالی با ارزش پیش آگهی منفی برای این گروه از بیماران کاندید گردد. این احتمال با مقایسه میزان میانگین بیان این ژن در دو گروه بیماران واجد متاستاز و فاقد متاستاز به غدد لنفاوی و نیز مقایسه میزان بیان این ژن در گروه های بیماران در مراحل ۲ و ۳ و ۴ بیماری قدرت گرفت، زیرا نتایج این تحقیق نشان داد، میانگین بیان ژن

ELF5 در بیماران واجد متاستاز به نقاط دور و متاستاز به غدد لنفاوی نسبت به گروه فاقد متاستاز به این نقاط و نیز در مرحله پیشرفته تر بیماری یعنی استیج های ۲، ۳ و ۴ نسبت به استیج ۱ به طور معنی داری کمتر است. ELF5 یک کلید رونویسی تعیین کننده سابتایپ یا زیرگونه مولکولی سرطان پستان از طریق سرکوب حساسیت به استروژن در سلول های لومینال و پیشرفت خصوصیات بازال در سلول های سرطان پستان محسوب می شود (۱۵).

مسیر JAK/STAT در مسیر سیگنالینگ یا به عبارتی علامت دهی پرولاکتین نقش دارند (۱۷، ۱۶) پرولاکتین یک هورمون موثر بر فعالیت ELF5 است. به بیان دیگر، ژن ELF5 تحت کنترل پرولاکتین عمل می کند. مطالعات نشان داده است که در حالت null رسپتور پرولاکتین، بیان ژن کاهش می یابد اما در ناک اوت ELF5 بیان رسپتور پرولاکتین تغییر نمی کند. این موضوع نشانگر آن است که ELF5 عملکرد پایین دستی برای رسپتور پرولاکتین دارد (۲۰). در سلول های لومینال نرمال، ELF5 ترشح Rank را به عنوان واسطه پاراکرین تمایزی تحریک می کند و متعاقباً سیگنال NOTCH را متاثر می سازد. دو مسیر سیگنالینگ یا علامت دهی که ELF5 در آن ایفای نقش می کند در سرطان TNBC نقش دارند. اوماتا و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان دادند که فاکتورهای تمایزی ELF5 در سرطان های سه گانه منفی بیان شده و یک فاکتور مهم در آنالیز تک متغیره مقاومت محسوب می شوند. به علاوه در سرطان های پیش تهاجمی نیز نقش داشته و پیوستگی بالقوه با گیرنده های استروئیدی دارد (۱۰).

بررسی های انجام شده موید این امر است که عوامل زیاد و متنوعی در بروز سرطان پستان دخیل هستند که از آن میان می توان به سابقه خانوادگی، تغذیه، سن و تغییرات اپی ژنتیک هم چون متیلاسیون DNA اشاره نمود. مطالعه الگوی متیلاسیون پروموتور ژن ELF5 در تحقیق حاضر فراوانی الگوی متیله در نمونه بافت بیماران مبتلا به سرطان پستان را بیش از ۷۰ درصد گزارش نمود که این امر مبین غالب بودن الگوی متیله در پروموتور این ژن در طی سرطان پستان می باشد که می

توان به نقش اپی ژنتیک در مهار این ژن در سرطان پستان اشاره نمود.

بررسی الگوی متیلاسیون این ژن در بافت نرمال مجاور تومور در مقایسه با بافت پستانی مستخرج از زنان غیر بیمار که به دلایل زیبایی عمدتاً کاهش حجم پستان تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند، نشان داد که بافت نرمال مجاور تومور در بیش از ۶۴ درصد نمونه‌ها الگوی دوگانه متیله و غیرمتیله را نشان می‌دهد، این در حالی است که بافت نرمال پستانی از الگوی غالب غیرمتیله برخوردار است. این نتیجه مبین این امر است که سلول‌های پستانی نرمال مجاور ناحیه توموری به نوعی تحت تاثیر سیگنال‌های دریافتی از سلول‌های توموری قرار می‌گیرند و تغییرات اپی ژنتیکی در آنان ایجاد می‌شود هر چند که ممکن است در سطح پاتولوژی و بافت‌شناسی تغییرات حاصله قابل رویت نباشد.

مقایسه الگوی بیان و متیلاسیون پروموتور ژن ELF5 در مطالعه حاضر نشان داد که در نمونه‌های بیماران مبتلا به سرطان پستان که واجد درگیری غدد لنفاوی بودند یا LN+ ها و هم چنین آن دسته از بیمارانی که متاستاز به نقاط دور در آنان گزارش شده بود (استیج یا مرحله ۴ بیماری) پروموتور ژن ELF5 از الگوی متیلاسیون با فراوانی ۱۰۰ درصد برخوردار بود. هم چنین میانگین بیان این ژن نیز کاهش چشمگیری را نشان می‌داد. این نتایج موید نقش مهم ژن ELF5 در پروسه و فرآیند EMT، که سلول‌ها را به سمت تهاجم و مقاومت پیش می‌برد، می‌باشد (۱۰).

فیتزگراو و همکاران در سال ۲۰۱۶ گزارش کردند که تومورهای اولیه PR+ واجد درصد بالایی از متیلاسیون پروموتور ژن ELF5 می‌باشند که در تومورهای ثانویه بعد از درمان با آنتی استروژن فراوانی متیلاسیون به طور چشمگیری کاهش می‌یابد (۲۱). هم چنین بیان بالای این ژن با مقاومت به آنتی استروژن مرتبط گزارش شد. از سوی دیگر در رده‌های سلولی مقاوم به تاموکسیفن، کاهش در سطوح پروتئین PR به همراه افزایش بیان ELF5 و DOK7 گزارش گردید (۲۱).

مطالعات مبین نقش مهارت ژن ELF5 بر

SNAIL2 به عنوان یکی از واسطه‌های موثر در انتقال اپی تلیال به مزانشیمال یا فرآیند EMT می‌باشد. مهار این ژن توسط ELF5 به کاهش وقوع متاستاز در سلول‌های سرطانی می‌انجامد. از سوی دیگر ELF5 می‌تواند فرآیند عکس EMT یا به عبارتی MET یعنی تبدیل بافت مزانشیمال به اپی تلیال را القا نماید. این نقش از ELF5 کمتر مورد بررسی قرار گرفته است (۲۲). عملکرد مذکور ژن ELF5 مبین و موید نقش مهارت آن در فرآیند متاستاز می‌باشد. نتایج ما نیز نشان داد که متیلاسیون پروموتور این ژن در بیماران واجد متاستاز به غدد لنفاوی و نیز متاستاز به نقاط دور از فراوانی بالایی برخوردار است. این گونه می‌توان استنتاج نمود که متیلاسیون ناحیه پروموتوری ژن ELF5 با خصوصیت تهاجم و بدخیمی در سرطان پستان مرتبط است.

نتایج نشان داد که متیلاسیون ژن ELF5 به عنوان یک پدیده اپی ژنتیکی موثر در بیماران سرطان پستان ایرانی می‌باشد که قابلیت بررسی بیشتر را دارد. نقش متیلاسیون ژن ELF5 در سبب شناسی بیماران با فنوتایپ TNBC، متاستاز دور و LN+ ممکن است به عنوان یک عامل پیش‌آگهی احتمالی در نظر گرفته شود که شناسایی آن در تشخیص و مانیتورینگ درمان سرطان پستان در دوره پیش‌تهاجمی به متاستاز مثر ثمر خواهد بود. لذا مطالعات آتی در نمونه‌های بیشتر و پیگیری وضعیت بیماران برای ارزیابی سودمندی این کاندید زیست‌نشانگر پیش‌آگهی دهنده لازم به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

از کلیه بیمارانی که از نمونه‌های بافتی آنان در این پژوهش استفاده شد و جناب آقای دکتر کاویانی که در تهیه نمونه بیماران همکاری قابل تقدیری داشتند و هم چنین پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک که در تهیه مواد امکانات و تجهیزات نقش موثری داشت، سپاسگزاری به عمل می‌آید.

از نظر اخلاقی کلیه مراحل نمونه‌گیری مطابق با قوانین کمیته اخلاق پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و منطبق با قوانین هلسینکی انجام گردید.

کد اخلاق: 52d/4922, 6.10.2016

References

1. Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, Ebrahimi M. Breast cancer in Iran an epidemiological review. *Breast J* 2007; 13:383-91. doi.10.1111/j.1524-474
2. Dumitrescu RG. Early epigenetic markers for precision medicine. *Meth Mol Biol* 2018; 1856:3-17. doi.10.1007/978-1-4939-8751-1-1.
3. Ramalho J, Henrique R, Jeronimo C. Methylation specific PCR in Tost J DNA methylation protocols. *Meth Mole Biol* 2018; 1708:123-9. doi.10.1007/978-1-4939-7481-8-23
4. Abbasi B, Ansarinejad N, Fardad F, Nasiripour S, Ramim T. [Breast cancer epigenetics]. *Tehran Uni Med J* 2016; 74:535-44. (Persian)
5. Brancaccio M, Natale F, Falco G, Angrisano T. Cell free DNA methylation the new frontiers of pancreatic cancer biomarkers discovery. *Genes* 2020; 11:14. doi.10.3390/genes11010014
6. Lee HJ, Hinshelwood RA, Bouras T, Gallego D, Valdes F, Blazek K, et al. Lineage specific methylation of the Elf5 promoter in mammary epithelial cells. *Stemcells* 2011; 29:1611-9. doi.10.1002/stem.706
7. Zhang X, Lin J, Ma Y, Zhao J. Overexpression of E74-like factor 5 inhibits migration and invasion of ovarian cancer cells. *Int J Exp Clin Res* 2019; 25:856. doi.10.12659/MSM.913058
8. Luk IY, Reehorst CM, Mariadason JM. ELF3 and ELF5 and EHF and SPDEF transcription factors in tissue homeostasis and cancer. *Molecules* 2018; 23:2191. doi.10.3390/molecules23092191
9. Zhou J, Ng AY, Tymms MJ, Jermiin LS, Seth AK, Thomas RS, et al. A novel transcription factor ELF5 belongs to the ELF subfamily of ETS genes and maps to human chromosome 11p13-15 a region subject to LOH and rearrangement in human carcinoma cell lines. *Oncogene* 1998; 17:2719-32. doi.10.1038/sj.onc.1202198
10. Omata F, Mcnamara KM, Suzuki K, Abe E, Hirakawa H, Ishida T, et al. Effect of the normal mammary differentiation regulator ELF5 upon clinical outcomes of triple negative breast cancers patients. *Breast Cancer* 2018 1; 25:489-96. doi.10.1007/s12282-018-0842-z.
11. Lapinskas EJ, Svobodova S, Davis ID, Cebon J, Hertzog PJ, Pritchard MA. The ets transcription factor elf5 functions as a tumor suppressor in the kidney. *Twin Res Hum Gene* 2011; 14:316-22. doi.10.1375/twin.14.4.316.
12. Metzger DE, Xu Y, Shannon JM. Elf5 is an epithelium specific fibroblast growth factor sensitive transcription factor in the embryonic lung. *Dev Dynam Off Publ Am Associ Anatom* 2007; 236:1175-92. doi.10.1002/dvdy.21133.
13. Chakrabarti R, Hwang J, Blanco MA, Wei Y, Lukacisin M, Romano RA, et al. Elf5 inhibits the epithelial mesenchymal transition in mammary gland development and breast cancer metastasis by transcriptionally repressing Snail2. *Nature Cell Biol* 2012; 14:1212-22. doi.10.1038/ncb2607.
14. Wu B, Cao X, Liang X, Zhang X, Zhang W, Sun G, et al. Epigenetic regulation of Elf5 is associated with epithelial-mesenchymal transition in urothelial cancer. *Plos One* 2015 28;10: 117510. doi.10.1371/journal.pone.0117510.
15. Rogers RL, Seuningen I, Gould J, Hertzog PJ, Naylor MJ, Pritchard MA. Transcript profiling of Elf5+/- mammary glands during pregnancy identifies novel targets of Elf5. *Plos One* 2010 7; 5: 13150. doi.10.1371/journal.pone.0013150.
16. Furth PA, Nakles RE, Millman S, Diaz ES, Cabrera MC. Signal transducer and activator of transcription 5 as a key signaling pathway in normal mammary gland developmental biology and breast cancer. *Breast Cancer Res Ac* 2011; 13:220. doi.10.1186/bcr2921.
17. Chean J, Chen CJ, Shively JE. ETS transcription factor ELF5 induces lumen formation in a 3D model of mammary morphogenesis and its expression is inhibited by Jak2 inhibitor TG101348. *ExpCell Res* 2017; 359:62-75. doi.10.1016/j.yexcr.2017.08.008.
18. Siegel PM, Muller WJ. Transcription factor regulatory networks in mammary epithelial development and tumorigenesis. *Oncogene* 2010; 29:2753-9. doi.10.1038/onc.2010.43.
19. Piggan CL, Roden DL, Gallego D, Lee HJ, Oakes SR, Ormandy CJ. ELF5 isoform expression is tissue specific and significantly

altered in cancer. *Breast Cancer Res*2016; 18:4. doi.10.1186/s13058-015-0666-0.

20. Okamura Y, Aoki Y, Obayashi T, Tadaka S, Ito S, Narise T, et al. Coexpression database for animal species by DNA-microarray and RNAseq based expression data with multiple quality assessment systems. *Nucle Acids Res*2015; 43: 82-6. doi.10.1093/nar/gku1163.

21. Fitzgerald LM, Browne EP, Christie KD, Punska EC, Simmons LO, Williams KE, et al. *ELF5* and *dok7* regulation in anti-estrogen treated cells and tumors. *Cancer Cell Int*2016; 16:8. doi.10.1186/s12935-016-0282-9.

22. Mathsyaraja H, Ostrowski MC. Setting *Snail2s* pace during EMT. *Nature Cell Biolo* 2012; 14:123-7. doi.10.1038/ncb2616

Investigation of Expression and Methylation Status of ELF5 Gene Promoter in Patients with Breast Cancer

Heidarizadi A^{1,2}, Salimi M^{3*}, Mozdarani H⁴

(Received: 28 September 2019

Accepted: April 14, 2020)

Abstract

Introduction: Breast cancer is the most prevalent cancer among Iranian women. ELF5 gene as a transcription factor member of the ETS family could play a key role in breast cancer neoplasms, especially basal-like and endocrine-resistant subtypes. The changes in the gene promoter methylation pattern are considered proper targets in the therapeutic strategies. This study aimed to investigate the frequency of this epigenetic phenomenon and ELF5 gene expression as well as their association with pathologic and clinical characteristics of Iranian patients suffering from this cancer.

Materials & Methods: In order to investigate the ELF5 promoter methylation, 134 breast tissues were analyzed using methylation-specific PCR method. Moreover, 164 tumoral and 10 normal breast tissues retrieved from breast reduction surgery were assessed using Real-Time RT-PCR to analyze the gene expression.

Ethics code: 52d/4922, 6.10.2016

Findings: The data revealed that about 70% of the breast cancer tumoral specimens showed ELF5 promoter methylated pattern. Furthermore, the down-regulation of ELF5 gene expression was significantly associated with higher cancer stages, being triple-negative, and invasion.

Discussions & Conclusions: The results revealed that an increase in the ELF5 promoter methylation frequency in patients, compared to the control tissues, and its association with poor prognosis indicators may propose the ELF5 promoter methylation as a possible candidate in further studies to confirm the poor prognostic role of this biomarker in breast cancer.

Keywords: Breast neoplasms, ELF5, Epigenetics, Gene expression, Methylation

1. Dept of Genetics, Fars Science and Research Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran

2. Dept of Genetics, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran

3. Dept of Medical Genetics, Institute of Medical Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

4. Dept of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

* Corresponding author Email: salimi@nigeb.ac.ir