



## بررسی بیان ژن KLF4 به عنوان یک مارکر مولکولی جدید در تومورهای سرطانی پستان

محمدعلی حسینپورفیضی<sup>۱\*</sup>، ثریا شیرینی ترکمانی<sup>۲</sup>، اسماعیل بابائی<sup>۳</sup>، مرضیه قنبریان<sup>۴</sup>، وحید منتظری<sup>۵</sup>، منیره حلیمی<sup>۶</sup>

- ۱- استاد گروه رادیوبیولوژی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
- ۲-۴- کارشناس ارشد گروه ژنتیک، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
- ۳- دکتری گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
- ۵- استاد گروه جراحی توراکیس، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز، تبریز، ایران
- ۶- استادیار گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۷/۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۳

### چکیده

مقدمه: KLF4 یک فاکتور رونویسی می باشد که در بسیاری از سرطانها از جمله سرطان پستان دخیل می باشد. سرطان پستان، شایع ترین سرطان عضوی در زنان می باشد و به دلیل شیوع روزافزون آن، تلاش های گسترده ای در راستای شناسایی مارکرهای مولکولی اختصاصی که بتواند غده های سرطانی را از انواع غیرسرطانی متمایز سازد، آغاز شده است. بنابراین در این تحقیق صلاحیت بیان ژن KLF4 به عنوان مارکر مولکولی در تشخیص و درمان سرطان پستان مورد ارزیابی قرار گرفته است. روش بررسی: در حدود ۳۱ نمونه سرطانی و ۲۱ نمونه غیرسرطانی (حاشیه تومور سرطانی) جمع آوری شده و بیان ژن های β2m به عنوان کنترل داخلی و KLF4 مورد بررسی قرار گرفت. داده های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۵ و آزمون آماری One-Way ANOVA و T-Test مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. نتایج: نتایج به دست آمده نشان دادند که: ۱- بیان KLF4 در تومورهای سرطانی پستان بیشتر از گروه های حاشیه تومور سرطانی می باشد. ۲- با احتمال زیاد KLF4 در تومورهای سرطانی پستان (حداقل در نوع کارسینومای مجرای) یک آنکوژن محسوب می شود ۳- سطح بیان KLF4 به طور معنی داری در ارتباط با ماهیت بدخیمی تومورهای سرطانی پستان می باشد. نتیجه گیری: استفاده از KLF4 به عنوان مارکر تشخیصی در تفکیک و شناسایی بافت های سرطانی از غیرسرطانی پستان مؤثر نیست، ولی از این مارکر می توان برای شناسایی حداقل ۵۰ درصد موارد کارسینومای مهاجم مجرای پستان و همچنین به عنوان فاکتور بالقوه پیش آگهی دهنده برای تعیین شدت های مختلف تومور سرطانی پستان استفاده کرد.

واژه های کلیدی: سرطان پستان، KLF4، آنکوژن، سرکوبگر تومور، RT-PCR نیمه کمی

## مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی در میان زنان و دومین عامل عمده مرگ‌های ناشی از سرطان می‌باشد (۱). تلاش برای رده‌بندی مولکولی سرطان پستان منجر به نتایج مختلفی شده است که هیچ یک دربرگیرنده تمامی انواع تومورهای سرطانی این بافت نمی‌باشد (۲). بنابراین تحقیقات وسیعی به منظور شناسایی مارکر مولکولی که مختص انواع تومورهای سرطانی پستان باشد و از سوی دیگر بتوان تیمارهای مناسبی بر پایه آن اتخاذ کرد، در حال انجام است. تومور مارکرها فاکتورهایی را شامل می‌شوند که در خون، ادرار یا بافت‌های بدن به وجود آمده و با تست‌های آزمایشگاهی قابل تشخیص می‌باشند. این فاکتورها توسط سلول‌های سرطانی یا پاسخ بدن به سرطان یا اختلالات غیرسرطانی خاصی تولید می‌شوند و مسئول فرایندهای اصلی سلول هستند که حضور، افزایش یا کاهش آنها می‌تواند برای اهداف مختلفی در زمینه‌های غربالگری، تشخیص، پیش‌آگهی یا درمان بیماری به کار رود. نکته مهم این است که سرطان پستان یک بیماری هتروژن می‌باشد و طبقه‌بندی‌های موجود، تمام انواع این بیماری را پوشش نمی‌دهند. از این رو نیاز به یک تومور مارکر عمومی‌تر (مختص اکثر انواع بیماری) و سریع و حساس با ویژگی بالا برای نواحی توموری ضروری می‌نماید (۳). برای دستیابی به این امر به بررسی KLF4: (Krappel-Like Factor 4) که در بسیاری از سرطان‌ها دخیل است، اقدام گردید. KLF4 یک مارکر مولکولی جدید می‌باشد که اخیراً مورد توجه محققان قرار گرفته است.

KLFs یک خانواده از عوامل رونویسی هستند که نقش بسیار مهم و حیاتی در بسیاری از فرایندهای مهم سلول از جمله نمو، تکثیر، تمایز، آپوپتوز، مهاجرت و تشکیل تومور ایفا می‌کنند (۴،۵). ژن KLF4 اغلب در سلول‌های تمایز یافته به عنوان یک ضدتکثیر و ضدآپوپتوز بیان می‌شود. به نظر می‌رسد که محصول این ژن به عنوان یک سرکوبگر تومور عمل می‌کند. با این حال مطالعات اخیر ژن KLF4 را به عنوان یک آنکوژن نیز معرفی می‌کنند (۶-۹). از آنجا که KLF4 در بسیاری از فرایندهای مهم سلولی درگیر است و ارتباط این ژن با بسیاری

از سرطان‌ها از جمله معده، روده، پستان، خون، مثانه، کلیه، مری، ریه نیز تعدادی از انواع رده‌های سلولی سرطانی معلوم شده است و مهمتر از همه دارای عملکرد دو جانبه است (۱۰). در این تحقیق، این ژن برای سرطان پستان به منظور استفاده‌های تشخیصی، پیش‌آگهی و درمان برای سرطان پستان به ویژه در مبتلایان ناحیه شمال غرب ایران مورد ارزیابی واقع شده است. تا بتوان با انجام تحقیق و بررسی بیشتر در مورد مکانیسم و نحوه اثر این ژن، از آن به عنوان یک هدف پتانسیلی مناسب برای درمان سرطان استفاده کرد.

## روش بررسی

در این مطالعه تجربی، ۳۱ نمونه تومور سرطانی و ۲۱ نمونه غیرسرطانی به صورت یک مطالعه مورد شاهدی با استفاده از تکنیک Reverse Transcriptase PCR به صورت نیمه کمی مورد بررسی قرار گرفت.

نمونه‌های انسانی از بیمارستان نور نجات و امام رضا (ع) تبریز و با تکمیل فرم رضایت نامه جمع‌آوری شدند. نمونه‌های بافتی از بیماران ذریبط به صورت تازه و تحت نظارت جراح متخصص به دست آمده و در تیوب‌های استریل عاری از RNase/DNase قرار داده شدند. نمونه‌ها بلافاصله به نیتروژن مایع منتقل شده و تا مرحله استخراج RNA در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

RNA کل (Total RNA) با استفاده از محلول RNX<sup>TM</sup> plus و طبق دستورالعمل کشور سازنده (سیناژن/ ایران) استخراج شده و به دلیل حساسیت کار با RNA، کلیه لوازم مورد استفاده در راستای غیرفعال سازی آنزیم RNase با محلول DEPC (Biochimaca) ۰/۱ درصد تیمار گشتند. به منظور اطمینان از عدم تجزیه RNAهای استخراج شده، کیفیت و کمیت آنها به ترتیب توسط الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتری UV مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی ژل، دو باند ۱۸S و ۲۸S RNA ریپوزومی به دلیل غلظت بالایشان در سلول به وضوح قابل مشاهده هستند و بیانگر سالم بودن RNA و یا عدم تجزیه آن می‌باشند. در بررسی با

Human Beta- 2-microglobulin gene (NM-00114048)

Forward primer

5'-GGCTCTGTACAACCATATCCAG-3'

Reverse primer

5'-CGCCACATACATCATCACTG-3'

Human Krüppel-like Factor-4( KLF4) (NM\_004235)

Forward primer

- GGA TGG AAA TTC GCC CGC TCA G -35

Reverse primer

5- TTG GCT TCC TTG TTT GGT ACC -3

پرایمرها توسط شرکت، Tesaco آمریکا با درجه خلوص High Lyophilized) HPSF: Purified Salt Free به صورت لیوفیلیزه سنتز شدند. واکنش PCR برای هر دو ژن در دو تیوب جداگانه و در شرایط کاملاً یکسان صورت گرفت (جدول ۱). جهت اطمینان از عدم آلودگی، یک تیوب نیز به عنوان کنترل منفی به کار رفت که در آن به جای cDNA از آب دو بار تقطیر استفاده شد.

اسپکتروفتومتری نیز نسبت برای هر نمونه نسبت بین ۱/۸ و ۲ به دست آمد که نشان دهنده درجه بالای خلوص RNA و نیز آغستگی کم آن با پروتئین و DNA ژنومی می‌باشد. به طور کلی این نتایج حاکی از آن است که RNA استخراجی می‌تواند با اطمینان بالا در مراحل بعدی تحقیق مورد استفاده قرار گیرد. تیمار با DNaseI و واکنش رونویسی معکوس ( Reverse Transcription: RT) به منظور اجتناب از آلودگی RNA با DNA، ابتدا مقادیر یکسانی از RNA اولیه (۳ug) از هر نمونه با آنزیم DNaseI تیمار شد. سپس با بکارگیری پرایمر Oligo dT [Fermentas] و راهاندازی واکنش رونویسی معکوس با استفاده از آنزیم RevertAidTM M-MuLV (شرکت فرمنتاز) مولکول‌های RNA تخلیص شده به cDNA تبدیل شدند. در این تحقیق، ژن  $\beta$ -۲ میکروگلوبولین ( $\beta$ 2m) به طول ۱۹۱ جفت باز به عنوان کنترل داخلی انتخاب و جهت تکثیر ژن KLF4 به طول ۶۷۰ جفت باز از پرایمرهایی که با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner طراحی شده بودند، استفاده گردید. توالی و مشخصات این پرایمرها به صورت زیر می‌باشند:

جدول ۱: شرایط PCR هر دو ژن مورد مطالعه

KLF4		$\beta$ 2m		
۱ دقیقه	۹۵ درجه سانتیگراد	۳۰ ثانیه	۹۴ درجه سانتیگراد	Denaturation
۴۵ ثانیه	۵۶ درجه سانتیگراد	۳۰ ثانیه	۵۷ درجه سانتیگراد	Annealing
۱ دقیقه	۷۲ درجه سانتیگراد	۶۰ ثانیه	۷۲ درجه سانتیگراد	Extention
۱۰ دقیقه	۷۲ درجه سانتیگراد	۵ دقیقه	۷۲ درجه سانتیگراد	Final Extention

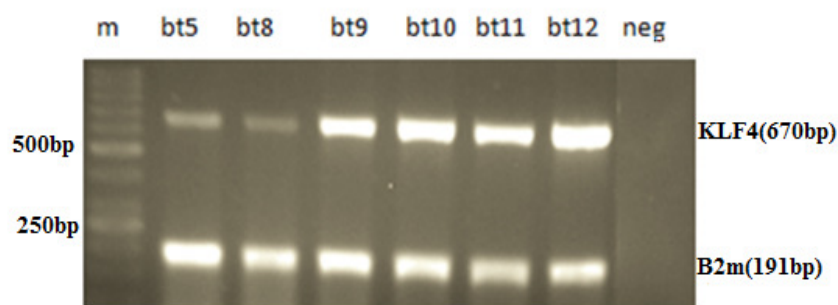
نوکلئوتیدی پس از استخراج از ژل (سیناژن/ایران) توسط شرکت فضا بیوتک تعیین توالی و با توالی موجود در بانک ژنی مقایسه گردید.

برای کمی سازی بیان ژن، تصاویر مربوط به الکتروفورز ژل آگارز توسط نرم افزار UVidoc مورد بررسی قرار گرفت و پس از تعیین حجم باندها، شاخص بیان ژن در هر نمونه (نسبت حجم باند مذکور به حجم باند  $\beta$ 2m) محاسبه گشت. جهت برای بررسی ارتباط بیان ژن KLF4 و ماهیت تومورهای

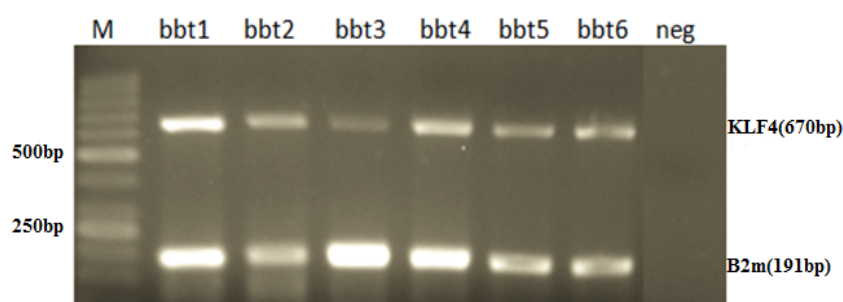
بعد از انجام واکنش PCR، برای اطمینان از تکثیر بهینه قطعه مورد نظر و تعیین کمیت محصول، ۸ میکرولیتر از محصول PCR، توسط الکتروفورز ژل آگارز (MERCK) ۲ درصد بررسی گردید و بقیه محصول PCR در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. در پایان ۸ میکرولیتر از محصول PCR هر دو ژن جهت بررسی با نرم‌افزار Uvitech به صورت مشترک در یک چاهک ژل آگارز لود شد (اشکال ۱، ۲، ۳). به منظور تأیید هویت قطعه حاصل از PCR، باند ۶۷۰

نسخه ۱۵ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

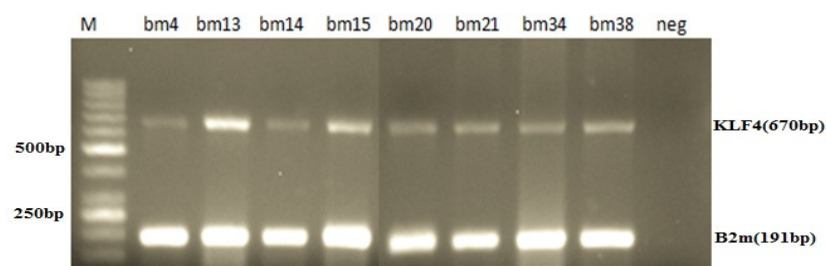
سرطانی، داده‌های جمع‌آوری شده توسط آزمون آماری T-Test و One Way ANOVA و با استفاده از نرم‌افزار SPSS



شکل ۱: طرح الکتروفورز محصولات PCR ژن KLF4 در گروه بدخیم تومور سرطانی



شکل ۲: طرح الکتروفورز محصولات PCR ژن KLF4 در گروه خوش خیم تومور سرطانی

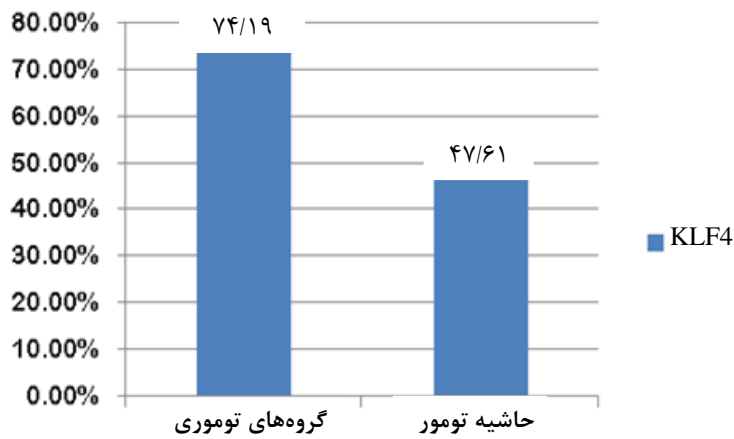


شکل ۳: طرح الکتروفورز محصولات PCR ژن KLF4 در گروه حاشیه تومور سرطانی

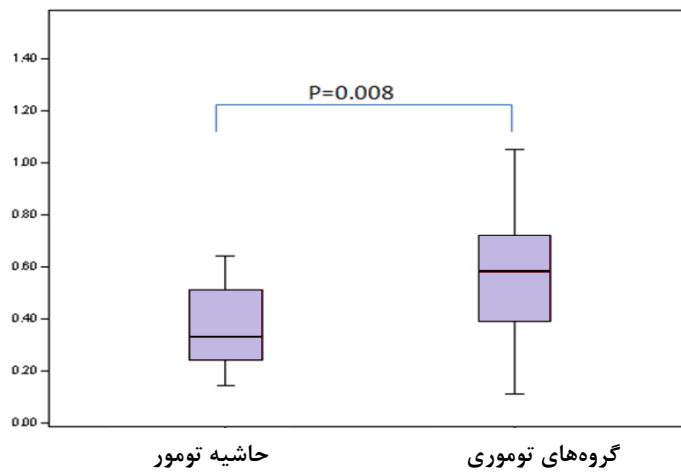
## نتایج

بافت سالم و غیرسرطانی کاهش می‌یابد. در تومورهای سرطانی بدخیم میانگین بیان KLF4 در گروه تومور سرطانی بدخیم پیشرفته، بالاتر از میانگین بیان آن در مراحل پایین‌تر بود ( $p > 0.05$ ). این اختلاف بین گروه تومور سرطانی و حاشیه تومور، همچنین بین تومورهای بدخیم و حاشیه تومور، معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ), اما بین تومورهای خوش‌خیم و بدخیم و گروه‌های توموری بدخیم پیشرفته و اولیه معنی‌دار نمی‌باشد (در هر دو مورد  $p > 0.05$ ). بین تومورهای بدخیم مرحله اولیه و پیشرفته با حاشیه تومور نیز تفاوت معنی‌داری وجود داشت ( $p < 0.05$ ).

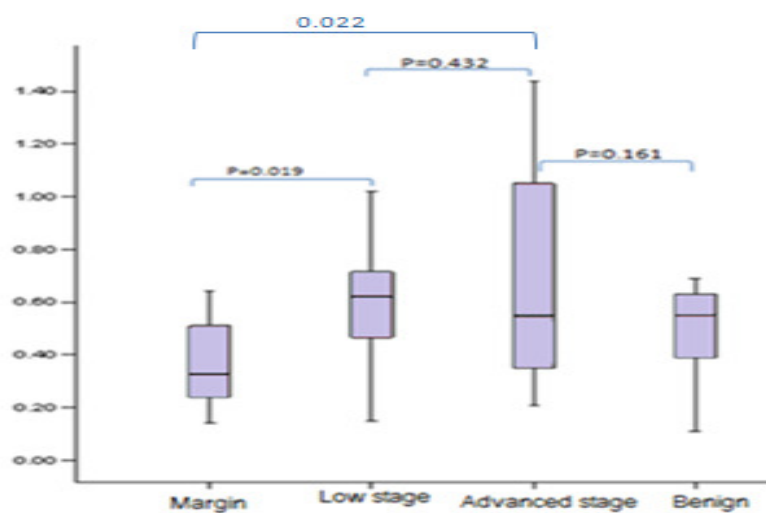
در این تحقیق ۵۲ نمونه مورد بررسی قرار گرفت که شامل ۳۱ نمونه سرطانی و ۲۱ نمونه غیرسرطانی بود. از ۳۱ نمونه سرطانی، ۲۵ نمونه در گروه بدخیم و ۶ نمونه در گروه خوش‌خیم دسته‌بندی شد. از ۲۵ نمونه‌ی بدخیم نیز، ۱۱ نمونه در مرحله اولیه و ۱۴ نمونه در مرحله پیشرفته توموری قرار داشت. به منظور بررسی شدت بیان KLF4 در گروه‌های سرطانی و غیرسرطانی و ارتباط میزان بیان آن با درجه تومورها، بیان KLF4 در گروه‌های مختلف تعیین و با استفاده از آزمون آماری One-Way ANOVA مقایسه شد. شدت بیان KLF4 به ترتیب از گروه تومور سرطانی تا حاشیه تومور یعنی



نمودار ۱: درصد نمونه‌هایی با بیان مثبت KLF4 در گروه‌های توموری و حاشیه توموری



نمودار ۲: شدت بیان KLF4 در دو گروه توموری و حاشیه تومور



نمودار ۳: بیان KLF4 در گروه‌های حاشیه تومور، تومورهای مرحله اولیه، تومورهای مرحله پیشرفته، توموری خوش‌خیم در هر نمودار محدوده‌ی بیان KLF4 در هر گروه نشان داده شده است.

## بحث

در سرطان‌های کولورکتال، معده و مری فرکانس بالای کروموزومی KLF4 است به وفور دیده شده است که دلیلی برای کاهش KLF4 در این سرطان‌ها می‌باشد. به علاوه چندین جهش نقطه‌ای در داخل (ORF: Open Reading Frame) ژن KLF4 دیده شده است. این جهش‌ها منجر به کاهش این پروتئین و کاهش توانایی آن در فعال کردن پروموتور ژن P21cip1 می‌شود. همچنین شواهد نشان می‌دهد که الگوی نابجای متیلاسیون DNA در جزایر GC اطراف پروموتور باعث غیرفعال شدن تومور ساپرسورها می‌شود. هایپرمتیلاسیون در ۵۰ بخش غیرترجمه شونده ژن KLF4 شناسایی شده است. از سوی دیگر بلوکه کردن هایپرمتیلاسیون در این ژن باعث فعال شدن دوباره و بیان KLF4 در سلول‌های سرطانی معده شده است. بنابراین هم تغییرات ژنتیکی و هم اپی‌ژنتیکی بر کاهش یا از دست رفتن بیان KLF4 تأثیر می‌گذارند. در مقابل بیان KLF4 در بسیاری از سرطان‌ها مثل سرطان سلول سنگفرشی سر و گردن افزایش می‌یابد. با این حال مکانیسم مولکولی افزایش بیان KLF4 ناشناخته است (۷،۱۱).

در مورد عملکرد KLF4 در سلول‌های سرطانی پستان شواهد متناقضی وجود دارد (۱۲،۱۳). در یک مطالعه مشاهده شد، بیان KLF4 در سلول‌های سرطانی کاهش یافته و کمتر از سلول‌های اپی‌تلیال نرمال است که این به طور قابل توجهی با کاهش بیان Laminin B5 که جزء اساسی از پروتئین‌های ECM: Extracellular Matrix Protein می‌باشد، در ارتباط است. Laminin B5 از ۳ زنجیره Alpha3a، Beta3، و Gamma2 ساخته شده است که هر کدام توسط ژن جداگانه‌ای کد می‌شود. ۲ مکان اتصال KLF4: KLF4-Binding Sites در پروموتور ژن Alpha3a شناسایی شده است که برای فعالیت این ژن ضروری می‌باشند. آزمایشات عدم اتصال KLF4 به این ۲ مکان را در ۵ پائل از رده سلولی سرطانی پستان شامل T47D، MCF7 و MDA-MB436، ZR75-1، MDA-MB231 را آشکار

کرده است. از بین رفتن Laminin باعث ایجاد متاستاز و مهاجم می‌شود (۱۶-۱۳).

KLF4 برای حفظ مورفولوژی سلول‌های اپی‌تلیال پستانی ضروری است. همچنین نقش بسیار مهمی در جلوگیری از فرایند (EMT: Epithelial to Mesenchymal Transition) در سلول‌های اپی‌تلیال از طریق حفظ E-cadherin و کمپلکس اتصالات سلولی دارد. EMT فرایندی است که اپی‌تلیال ویژگی‌های خاص خود را از دست داده و فنوتیپ مزانشیمال را کسب می‌کند. از دست رفتن زود هنگام E-cadherin در طول پیشرفت تومور در سرطان لوبولار مشاهده شده است. در حالی که در کارسینوم مجرای پستان بیان متغیری دارد. KLF4 مستقیماً به منطقه غنی از GC در پروموتور E-cadherin متصل شده و باعث بیان آن می‌شود. بیان القاء شده و اجباری KLF4 در سلول‌های سرطانی پستان باعث بیان E-cadherin در رده سلولی MDA-MB-231 شده و از گسترش تومور و پیشرفت بیماری جلوگیری به عمل آمده است (۱۵،۱۶).

مطالعات دیگری نشان داده است که KLF4 رشد سلول‌های سرطانی پستان وابسته به گیرنده استروژن را مهار می‌کند. KLF4 به منطقه متصل شونده به DNA در گیرنده استروژن (ER) می‌چسبد و باعث کاهش بیان ژن‌های وابسته به ER می‌شود (۱۱،۱۷). همگی این آزمایشات دال بر نقش مهارکنندگی توموری برای KLF4 دارد. ولی شواهد و نتایج متناقضی هم وجود دارد.

Ashka و همکاران بیان KLF4 را توسط روش Immunostaining و mRNA in Situ Hybridization در ۱۴۶ بیمار سرطانی پستان مطالعه و تجزیه و تحلیل کردند (۹). نتایج آنها حاکی از این بود که جایگیری KLF4 در هسته سلول‌های سرطانی یک فاکتور تشخیصی و یک عامل پیش‌آگهی است و از KLF4 می‌توان به عنوان یک مارکر شناسایی و تشخیص فنوتیپ مهاجمی در سرطان داکتال در مراحل اولیه استفاده کرد. آنها مشاهده کردند که در مقایسه با بافت سالم و اپی‌تلیوم درگیر نشده در اکثر تومورهای پستان بیان KLF4 افزایش

بیان تومور مارکر Clusterin می‌شود که هر دوی این تغییرات باعث پیشرفت تومور و متاستاز می‌شود (۱۴).

KLF4 باعث افزایش رونویسی و بیان از Notch1 در سلول‌های اپی‌تلیال پستانی می‌شود. شواهد حاکی از این هست که Notch1 به عنوان یک آنکوژن در بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان پستان دخیل است (۱۶).

این شواهد نیز آشکارا بیان می‌کند که KLF4 در سرطان پستان به عنوان یک آنکوژن عمل می‌کند و باعث پیشبرد بیماری می‌شود که نتایج آزمایشات پژوهش حاضر هم در راستای این شواهد است. اما اینکه KLF4 به عنوان یک سرکوبگر تومور عمل کند یا یک آنکوژن، به نوع بافت و محتوای سلول وابسته است (۷، ۱۳، ۱۶).

### نتیجه‌گیری

مطالعاتی که در مورد عملکرد KLF4 در سلول‌های سرطانی پستان صورت گرفته شواهد متناقضی به دست آورده است. KLF4 هم به عنوان یک سرکوبگر سرطان عمل می‌کند هم به عنوان یک آنکوژن، نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که بیان KLF4 در گروه تومور سرطانی نسبت به گروه غیرسرطانی و سالم افزایش یافته است ( $p < 0.05$ ) ولی در تفکیک گروه سرطانی به بدخیم و خوش‌خیم، مشاهده می‌شود که این افزایش فقط در گروه بدخیم معنی‌داری می‌باشد ( $p < 0.05$ ). جالب توجه است که در گروه سرطانی نیز نمونه‌های بود که بیان بسیار کمتری نسبت به گروه غیرسرطانی داشتند که احتمال می‌رود شاید در این نمونه‌ها KLF4 نقش تومور ساپرسوری داشته باشد. نتیجه‌ای که منطقی‌تر به نظر می‌رسد این است که KLF4 بیشتر در جهت پیشرفت و بدخیمی عمل می‌کند. اکثر نمونه‌های تومور سرطانی بدخیم کار شده در تحقیق حاضر از نوع کارسینومای مجرای مهاجم بودند و این جزء شایع‌ترین نوع سرطان پستان می‌باشد. شاید بتوانیم که با استفاده از آنتی‌بادی KLF4 بیمارانی که در معرض خطر عود مجدد قرار دارند را شناسایی کنیم. این بیماران احتمالاً به مهارکننده‌های مسیر KLF4 پاسخ می‌دهند.

یافته است (۹). همچنین Foster و همکاران اعلام کردند که mRNA و پروتئین KLF4 در سرطان پستان افزایش می‌یابد (۱۰). آنها با استفاده از روش‌های In Situ Northern Blot Analysis, Hybridization و Immunohistochemistry افزایش بیان KLF4 را در نمونه‌های سرطانی پستان و بیان کم و پایین آن در اپی‌تلیوم مجاور سلول‌های توموری پستان که از لحاظ مورفولوژی نرمال بودند، آشکار کردند (۱۳).

نتایج آزمایشات McConnell و همکاران نیز در سال ۲۰۰۷ میلادی نشان داد که در رده سلولی سرطان پستانی MDA-MB-134 بیان KLF4 دچار افزایش شده و با مهار P53 از آپوپتوز جلوگیری می‌کند. با مهار KLF4 توسط siRNA، سطوح P53 افزایش یافته و سلول‌های سرطانی دچار آپوپتوز می‌شوند (۶).

در سال ۱۹۹۹ میلادی در مؤسسه UAB Breast Cancer SPORE، محققان KLF4 را به عنوان یک آنکوژن جدید در سرطان پستان معرفی کردند (۱۸). بعدها ثابت شد که mRNA و پروتئین اینتگرین در اپی‌تلیوم دیس‌پلاستیک و در تومورهای پستان کاهش می‌یابد. بیان کاهش یافته اینتگرین در تومورهای پستان یک فاکتور پیش‌آگهی برای متاستاز به غدد لنفاوی زیر بغل است. مشاهده شده است که بیان القاء شده اینتگرین در سلول‌های سرطانی پستان باعث بازیابی ویژگی‌های متعدد اپی‌تلیال نرمال می‌شود. KLF4 بیان اینتگرین  $\beta-1$  و  $\alpha 3$  را مهار می‌کند و باعث متاستاز و بدخیمی می‌شود. محققان این مؤسسه KLF4 را به عنوان یک مارکر برای تشخیص IDC معرفی کردند (۱۸).

چندین مکانیسم برای توضیح عملکرد آنکوژنی KLF4 در سرطان پستان توضیح داده شده است. اولین و شاید مهمترین مکانیسم جلوگیری از آپوپتوز می‌باشد. KLF4 باعث مهار P53 و سرکوب رونویسی از آن می‌شود. همچنین از رونویسی فاکتور پروآپوپتوتیک BAX ممانعت می‌کند (۱۶، ۱۷، ۱۹).

افزایش بیان KLF4 در سرطان پستان و سرطان سلول سنگفرشی سر و گردن موجب سرکوب بیان Integrin و القاء

## سیاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه تبریز و همچنین از

کارکنان اتاق عمل و بخش پاتولوژی بیمارستان امام رضا و نورنجات تبریز ابراز می‌دارند.

## References:

- 1- American Cancer Society. *Breast cancer facts & figures 2011-2012*. Atlanta: American Cancer Society; 2011.
- 2- Jones RL, Constantinidou A, Reis-Filho JS. *Molecular classification of breast cancer*. Surgical Pathology Clinics 2012; 5(3): 701-17.
- 3- Dunn BK, Wagner PD, Anderson D, Greenwald P. *Molecular markers for early detection*. Semin Oncol 2010; 37(3): 224-42.
- 4- Yori JL, Seachrist DD, Johnson E, Lozada KL, Abdu Karim FW, Chodosh LA, et al. *Krüppel-like factor 4 inhibits tumorigenic progression and metastasis in a mouse model of breast cancer*. Neoplasia 2011; 13(4): 601-10
- 5- Reiss A, Rosenberg UB, Kienlin A, Seifert E, Jackle H. *Molecular genetics of Krüppel, a gene required for segmentation of the Drosophila embryo*. Nature 1985; 313: 27-32.
- 6- McConnell BB, Ghaleb AM, Nandan MO, Yang VW. *The diverse functions of Krüppel-like factors 4 and 5 in epithelial biology and pathobiology*. Bioessays 2007; 29(6): 549-57.
- 7- Wei D, Kanai M, Huang S, Xie K. *Emerging role of KLF4 in human gastrointestinal cancer*. Carcinogenesis 2006; 27(1): 23-31.
- 8- Rowland BD, Peeper DS. *KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer*. Nat Rev Cancer 2006; 6(1): 11-23
- 9- Pandya AY, Talley LI, Frost AR, Fitzgerald TJ, Trivedi V, Chakravarthy M, et al. *Nuclear Localization of KLF4 Is associated with an aggressive phenotype in early-stage breast cancer*. Clin Cancer Res 2004; 10, 2709-19
- 10- Foster KW, Frost AR, McKie-Bell P, Lin CY, Engler JA, Grizzle WE, et al. *Increase of GSK3β messenger RNA and protein expression during progression of breast cancer*. Cancer Res 2000; 60(22): 6488-95.
- 11- Hu D, Zhou Z, Davidson NE, Huang Y, Wan Y. *Novel insight into KLF4 proteolytic regulation in estrogen receptor signaling and breast carcinogenesis*. J Biol Chem 2012; 287(17): 13584-97.
- 12- Yu F, Li J, Chen H, Fu J, Ray S, Huang S, Zheng H, Ai W. *Krüppel-like factor 4 (KLF4) is required for maintenance of breast cancer stem cells and for cell migration and invasion*. Oncogene 2011; 30(18): 2161-72.
- 13- Miller KA, Eklund EA, Peddinghaus ML, Cao Z, Fernandes N, Turk PW, et al. *Krüppel-like factor 4 regulates laminin α3A expression in mammary epithelial cells*. J Biol Chem 2001; 276: 42865-68.
- 14- Higaki Y, Schullery D, Kawata Y, Shnyreva M, Abrass C, Bomsztyk K. *Synergistic activation of the rat*



- laminin gamma1 chain promoter by the gut-enriched Krüppel-like factor (GKLF/KLF4) and Sp1.* Nucleic Acids Res 2002; 30(11): 2270-9.
- 15- Yori JL, Johnson E, Zhou G, Jain MK, Keri RA. *Krüppel-like factor 4 (KLF4) inhibits epithelial-to-mesenchymal transition through regulation of E-cadherin gene expression.* J Biol Chem 2010; 285(22): 16854-63.
- 16- Liu Z, Teng L, Bailey SK, Frost AR, Bland KI, LoBuglio AF, et al, *Epithelial transformation by KLF4 requires Notch1 but not canonical Notch1 signaling, NIH Public Access, Cancer Biol Ther* 2009;8(19): 1840-51.
- 17- Akaogi K, Nakajima Y, Ito I, Kawasaki S, Oie SH, Murayama A, et al, *KLF4 suppresses estrogen-dependent breast cancer growth by inhibiting the transcriptional activity of ERalpha.* Oncogene 2009; 28(32): 2894-902.
- 18- DeBellis AB. *Breast cancer SPORE funds research of leading-edge Treatments.* Birmingham Medical News; 2009. [Cited 2013 Feb]. Available from: [http://birmanghammedicalnews.com/news.php?view\\_story=1329](http://birmanghammedicalnews.com/news.php?view_story=1329).
- 19- *Krüppel like transcription factor (KLF4) protein as a biomarker.* In: National Cancer Institute Breast Cancer Progress Report. US: Department of Health and Human Services; 2004. [Cited 2013 Feb]. Available from: [http://planning.cancer.org/library/2004\\_breast\\_prog\\_Rat.pdf](http://planning.cancer.org/library/2004_breast_prog_Rat.pdf)

## ***Investigating the KLF4 Gene Expression as a New Molecular Marker in Breast Tumors***

**Hosseinpour Feizi M(PhD)<sup>\*1</sup>, Shiri Torkamani S(MSc)<sup>2</sup>, Babaei E(PhD)<sup>3</sup>, Ghanbarian M(MSc)<sup>4</sup>, Montazeri V(MD)<sup>5</sup>, Halimi M(MD)<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biology, Tabriz University, Tabriz, Iran

<sup>2,4</sup>Department of Genetic, Tabriz University, Tabriz, Iran

<sup>3</sup>Department of Molecular Genetics, University of Tabriz, Iran

<sup>5</sup>Department of Torax Surgery, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

<sup>6</sup>Department of Pathology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

**Received:** 22 Jan 2013

**Accepted:** 26 Sep 2013

### ***Abstract***

**Introduction:** Kruppel-like factor4 is a transcription factor which is involved in many cancers including Breast cancer. Breast cancer is the most common malignancy among women. Due to the high prevalence of these tumors, there are ongoing efforts to find molecular markers which can recognize nontumoral from tumoral tissues. Therefore, the aim of this study was to evaluate the potential usefulness of KLF4 as a potential diagnostic and therapeutic molecular marker in breast cancer.

**Methods:** In the current study, 31 tumoral and 21 non tumoral adjacent tissues were evaluated. Transcription levels were measured by Semiquantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction and were normalized by the  $\beta 2m$  as an endogenous PCR control. Data was analyzed by spss software, one-way ANOVA and T-test.

**Results:** The results showed that: 1) KLF4 is over expressed in Breast tumors rather than adjacent normal tissues. 2) KLF4 is an oncogene in breast tumors (at least in IDC type). 3) The KLF4 expression levels are related significantly with nature of malignant breast tumors.

**Conclusion:** Findings do not confirm KLF4 as a diagnostic marker in classification and identification of tumoral tissues from non-tumoral ones in breast, but we can use this marker to identify at least 50% of invasive Ductal Carcinoma in breast and utilize it as a potential predictive factor to demonstrate severity degree in various tumors.

**Keywords:** Breast Cancer; KLF4; Oncogene; Semiquantitative RT-PCR; Tumor Suppressor

**This paper should be cited as:**

Hosseinpour Feizi M, Shiri Torkamani S, Babaei E, Ghanbarian M, Montazeri V, Halimi M. *Investigating the KLF4 gene expression as a new molecular marker in breast tumors*. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2013; 21(5): 599-608.

**\*Corresponding author: Tel: +98 411 3362280, Email: pourfeizi@eastp.ir**