



بررسی تغییرات بیان miR-101 و ارتباط آن با میزان بیان ژن‌های سرکوب‌کننده تومور PTEN و MAGI2 در سه رده سلولی سرطان پروستات

شیرین شهبازی^{۱*}، ندا فتاحی^۲، لیلا کوکبی^۳

چکیده

مقدمه: PTEN از ژن‌های مهم در روند سرطان پروستات است که نقایص آن به عنوان آغازگر روند بدخیمی شناخته می‌شود. پروتئین MAGI2 به عنوان یک چهارچوب به پایداری PTEN کمک کرده و باعث افزایش عملکرد آن می‌شود. از آنجا که miR-101 باعث کاهش بیان ژن MAGI2 شده به طور غیرمستقیم می‌تواند باعث کاهش عملکرد PTEN نیز باشد. روش بررسی: سه رده سلولی LnCap، PC3 و DU-145 سرطان پروستات جهت بررسی بیان ژن‌های PTEN، MAGI2 و miR-101 مورد مطالعه قرار گرفتند. برای ارزیابی بیان ژن‌های مورد نظر از تکنیک Real-time PCR با استفاده از TaqMan probe استفاده شد. با مقایسه سیکل‌های آستانه، نسبت بیان mRNA ژن مورد نظر بر اساس روش $\Delta\Delta CT$ محاسبه شد. نتایج: نتایج نشان داد بیان miR-101 و MAGI2 در هر سه رده سلولی نسبت به بافت سرطان پروستات کاهش داشته است. با وجود بالا بودن میزان بیان miR-101 در بافت سرطان پروستات، میزان بیان MAGI2 در این نمونه کاهش معنی‌داری نشان نداد. بیان ژن PTEN در دو رده سلولی LnCap و PC3 بسیار پایین تر از سلول‌های DU-145 بود که نشان دهنده از دست رفتن کامل ژن در سطح DNA می‌باشد. نتیجه‌گیری: این یافته تأیید کننده احتمال از دست رفتن بیان هر دو ژن PTEN و MAGI2 در رده‌های سلولی LnCap و PC3 می‌باشد. این امر می‌تواند ناشی از بازآرایی ژنتیکی در ژن MAGI2 باشد.

واژه‌های کلیدی: سرطان پروستات، بیان miR-101، ژن PTEN، ژن MAGI2

۱- استادیار گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک- بخش پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۳- دانشجوی دکترای بیوتکنولوژی - بخش پزشکی مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۴۵۵۶، پست الکترونیکی: sh.shahbazi@modares.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۷/۵

مقدمه

سرطان پروستات دومین بدخیمی بعد از سرطان ریه در آقایان بوده و میزان مرگ و میر بالایی را به خود اختصاص داده است (۱). این سرطان به عنوان یک بیماری ناهمگن شناخته می‌شود و طیفی از تظاهرات بالینی از تومورهای با رشد کند تا انواع پیشرونده را شامل می‌شود. در ۳۰٪ از موارد علیرغم درمان، عود مجدد بیماری با اثرات تهدیدکننده حیات دیده می‌شود (۲).

شواهدی از ارثی بودن سرطان پروستات از سال ۱۹۵۶ میلادی گزارش شده است اگرچه تا سال ۱۹۹۲ میلادی که اولین آنالیز Segregation انجام گرفت، دلایل علمی مستندی برای آن ارائه نشده بود (۳،۴). مطالعات ژنتیکی بعدی نقش توارث را در ابتلا به این سرطان مشخص تر کرد، به صورتی که نشان داده شد، بستگان درجه یک فرد مبتلا به سرطان پروستات دو تا سه برابر افراد عادی احتمال ابتلا به این بدخیمی را دارند (۵). همچنین گزارش شد که ابتلای ۲ یا ۳ نفر از بستگان درجه اول در سنین زیر ۶۰ سال، خطر ابتلا را پنج تا یازده برابر افزایش می‌دهد (۶،۷). تاکنون تعدادی از ژن‌های دخیل در نوع ارثی سرطان پروستات تعیین شده است که از آن میان می‌توان به HPC1، HPC2 و BRCA1، SMAD2، 14 و 34 و CYP17 اشاره کرد (۸،۹). البته باید در نظر داشت که موتاسیون‌های نقطه‌ای سوماتیک در سرطان پروستات خیلی رایج نمی‌باشند. بررسی‌های مولکولی نشان داده که موارد پیشرفته و متاستاتیک سرطان پروستات مونوکلونال بوده و از یک کلونی واحد در نتیجه تکثیر و پیشرفت تومور ناشی می‌شود (۱۰). همچنین مشخص شده، تغییرات تعداد کپی و بازآرایی‌های کروموزومی مختلف مرتبط با بدخیمی هستند (۱۱). با کمک تکنیک هیبریداسیون ژنومی مقایسه‌ای (CGH) اضافه یا حذف مناطق کروموزومی مانند 8p، 3p، 10q، 13q، 17p نشان داده شده است (۷،۹،۱۲). تغییرات تعداد کپی ژن‌های متعددی مانند MYC، PTEN، NKX3.1 در سرطان پروستات نیز به اثبات رسیده است (۱۳-۹،۱۱).

miRNAs مولکول‌های کوچک غیرکدشونده هستند که بیان ژن‌ها را تنظیم می‌کنند. شواهد زیادی از نقش مؤثر miRNAs در سرطان‌های مختلف در دست است. نشان داده شده است که ژن‌های این مولکول‌های تنظیمی اکثراً در مناطقی از کروموزوم‌ها واقع شده‌اند که در روند نئوپلازی حذف یا تکثیر می‌شوند (۱۴). یکی از miRNAs که در همین خصوص مورد مطالعه قرار گرفته، miR-101 می‌باشد که نقش آن در سرطان‌هایی مثل کبد، پروستات و پستان روشن شده است. مطالعات نشان دادند که این مولکول در مواردی می‌تواند با القای آپوپتوز نقش سرکوبگر توموری داشته باشد (۱۵) و گاهی با تحریک سیستم‌های سیگنالینگ اثر پروتوانکوژنی از خود نشان دهد (۱۶).

ژن PTEN بر روی کروموزوم 10q23 قرار گرفته و کدکننده پپتیدی با ۴۰۳ اسید آمینه می‌باشد. پروتئین PTEN در بافت‌های پستان، روده بزرگ، معده، مغز و سلول‌های اپتیلیال پروستات یافت شده است و در بسیاری از مسیرهای سیگنالینگ مهم از جمله چرخه سلولی، مهاجرت سلولی، آپوپتوز و رگزایی نقش مؤثری ایفا می‌کند (۱۷). اهمیت PTEN در بدخیمی‌های پروستات به صورتی است که دومین سرکوبگر تومور بعد از P53 در نظر گرفته می‌شود و در بیشتر از ۷۰٪ این بدخیمی‌ها فقدان هتروزیگوسیتی آن دیده می‌شود (۱۸). همچنین در بسیاری از سرطان‌های رایج انسانی دیگر همچون سرطان ریه، اندومتر، پستان و گلیوبلاستوما به عنوان دومین ژن مهم جهش یافته (بعد از P53) معرفی شده و جهش‌های آن در ۵۰٪ رده‌های سلولی‌های سرطان پروستات و ۳۰٪ رده‌های سلولی‌های گلیوبلاستوما گزارش شده است (۱۸،۱۹). مطالعات اخیر جهت رفع ابهام اینکه آیا هر دو الل PTEN در سرطان پروستات حذف می‌شود، تلاش کرده‌اند و به بررسی تعداد کپی و بیان آن در مراحل اولیه و پیشرفته تومور و تومورهای مقاوم به آندروژن پرداخته شده است. در همین راستا مکانیسم‌های مختلفی همچون متیلاسیون پروموتور، تداخل microRNAها، ژن‌های کاذب،

انجام شد. پس از رسیدن تراکم سلول‌ها به ۹۰٪، سلول‌ها برداشت شده و در محیط مخصوص انجماد حاوی ۱۰٪ DMSO در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا انجام مراحل بعدی مطالعه نگهداری شدند.

با همکاری بیمارستان امام خمینی و انستیتو پاستور ایران و پس از اخذ رضایت نامه کتبی از بیمارانی که قبلاً تحت درمان‌های جانبی (شیمی درمانی، رادیوتراپی یا هورمون تراپی) قرار نگرفته بودند، نمونه‌های بافتی سرطان پروستات و هیپرپلازی خوش خیم پروستات (BPH: Benign Prostatic Hyperplasia) تهیه شد.

بافت‌ها توسط پاتولوژیست به صورت فروزن برش داده شده و سپس از هر برش دو مقطع مشابه و یکسان تهیه گردید که یکی برای انجام تست‌های مولکولی در محلول نگهدارنده RNA (RNAlater, Qiagen-Germany) و دیگری در فرمالین ۱۰٪ برای تهیه لام و رنگ آمیزی H&E (به عنوان تست استاندارد) و تشخیص پاتولوژی سرطان پروستات و یا BPH قرار داده شد. برش‌های نگهداری شده در RNAlater به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و سپس به دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

طراحی پرایمرها و پروب‌های اختصاصی برای بررسی بیان ژن‌های miR-101، PTEN و MAGI-2 و ژن مرجع B-actin با تکنیک Real-time RT-PCR با استفاده نرم‌افزار Primer Express انجام گردید. جدول ۱ توالی پرایمرها و سائز قطعه تکثیر شده را نشان می‌دهد.

استخراج RNA با استفاده از کیت RNeasy mini kit (Qiagen-Germany) از سه رده سلولی سرطان پروستات انجام شده و RNA تخلیص شده تا انجام مراحل بعدی در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. غلظت و خلوص RNA با دستگاه نانو دراپ سنجیده شد و جهت تأیید نمونه‌ها با الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفتند. ساخت cDNA با استفاده از الگوی RNA و با کیت Quantitect reverse transcription (Qiagen-Germany) طبق پروتکل پیشنهادی صورت پذیرفت.

فسفریلاسیون و تغییر جایگاه درون سلولی با ایجاد تومور مرتبط دانسته شده است (۲۰).

MAGI2 پروتئین مهمی در روند برقراری سیناپس سلولی است که در بافت‌های مختلف بدن بیان می‌شود. مطالعات قبلی نشان داده است که MAGI2 با جلوگیری از تخریب PTEN باعث افزایش فعالیت آن می‌شود. در ملانوما بازآرایی‌های ژن MAGI2 که بر روی جایگاه 7q21 قرار گرفته است در همراهی با حذف‌های PTEN گزارش شده است (۲۱، ۲۲).

مهار MAGI-2 توسط miR-101 سبب کاهش فعالیت PTEN از طریق فسفریلاسیون آن می‌شود. کاهش miR-101 سبب افزایش رشد مستقل از هورمون و مقاومت به درمان در سرطان سینه از طریق افزایش p-Akt بدون تأثیر بر سطح گیرنده هورمون یا فعالیت آن بوده است (۱۶). نشان داده شده است که MAGI-2 به واسطه میانکنش مستقیم دومین PDZ2 با موتیف اتصال به PDZ در PTEN سبب افزایش پتانسیل عملکرد مهاری PTEN می‌شود (۲۳). به این صورت که پروتئین MAGI-2 با اتصال به دومین PDZ انتهایی کربوکسیل PTEN سبب افزایش تنظیم و مهار آبخار سیگنالینگ PI3K/Akt می‌شود (۲۳، ۲۴). جذب PTEN به داخل اتصالات سلولی از طریق فسفریلاسیون دومین PEST در انتهای کربوکسیل PTEN، سبب تغییر ثبات و افزایش پایداری آن می‌شود که بر اهمیت نقش MAGI-2 در تنظیم رشد و تکثیر سلول تومور و مهاجرت (مرتبط با متاستاز) دلالت دارد (۲۳، ۲۵).

از آنجا که مطالعات قبلی در سرطان پستان نشان داده‌اند که miR-101 باعث کاهش بیان ژن MAGI2 شده، در این مطالعه سعی شده تا سطح بیان miR-101، MAGI2 و PTEN را در سه رده سلولی LnCap، PC3 و DU-145 سرطان پروستات بررسی شود.

روش بررسی

کشت سه رده سلولی LnCap، PC3 و DU-145 در محیط کشت RPMI جهت بررسی ژن‌های مورد مطالعه و miRNA-101

جدول ۱: توالی نشانگر و آغازگرها

PTEN	آغازگر مستقیم	CACACGACGGGAAGACAAGTTC
NM_000314.4	آغازگر معکوس	CCTCTGGTCTGGTATGAAGAATG
اندازه قطعه=۱۶۱ جفت باز	نشانگر Taqman	AGTTCCCTCAGCCGTTACCTGTGTGTGG
MAGI-2	آغازگر مستقیم	TGTGAGAAGAAAGGTGCTATGTGG
NM_012301.3	آغازگر معکوس	CGTGGTTGCTGTTGGTGTAGG
اندازه قطعه=۱۲۵ جفت باز	نشانگر Taqman	AAGTCCAGGCTCTGTATCCACCCACCAC
MiR-101	توالی Micro RNA	UACAGUACUGUGUAACUGAA
	آغازگر Stem loop RT	GTCGTATGCAGAGCAGGGTCCGAGGTATTTCGA
	توالی نشانگر Taqman	CTGCATACGACTTCAGT
	آغازگر مستقیم	CTGAAGTCGTATGCAGTGCAGAA
	آغازگر معکوس	CGACCGTACAGTACTGTGATA
		GAGCAGGGTCCGAGGT

در نمونه‌ها بدون نیاز به منحنی استاندارد و نسبت به نمونه کنترل تعیین می‌شود. در این حالت تفاوت بین CT دو واکنش تکثیر برای مقدار مشابهی از نمونه اولیه با نمونه الگو بررسی می‌شود. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها، یکی از نمونه‌ها به عنوان کنترل در هر آزمایش انتخاب می‌شود. بعد از پایان یافتن واکنش‌ها، ابتدا میانگین CT هر نمونه محاسبه و سپس تفاوت بین ژن هدف و ژن مرجع به صورت ΔCt محاسبه گردید.

نتایج

نتایج بررسی واکنش تکثیر و منحنی استاندارد بر اساس رقت‌های متوالی (۱:۱۰) ژن‌های مورد مطالعه نشان داد که رابطه خطی مستقیم بین غلظت‌های مختلف از cDNA الگو و CT حاصل از هر نمونه برقرار است. وجود این رابطه خطی امکان مقایسه بیان ژن‌های PTEN و MAGI-2 و miR-101 در نمونه‌های مختلف را با روش مقایسه‌ای $\Delta\Delta Ct$ فراهم می‌کند.

نتایج CT‌های به دست آمده از Real-time PCR بر روی نمونه‌های بافت سرطان پروستات و BPH و رده‌های سلولی LnCap, PC3, DU-145 در جدول (۲) آمده است. در این آزمایش که به صورت تکرار سه تایی انجام شده است، میانگین CT مربوط به هر تکرار برای محاسبه بیان نسبی آن ژن در مقایسه با نمونه کنترل (BPH) مورد استفاده قرار گرفته است. این مقادیر بیان ژن در جدول (۲) به صورت میزان بیان نسبی آن ژن (Ratio) محاسبه شده است. همچنین نمودارهای ۱ تا

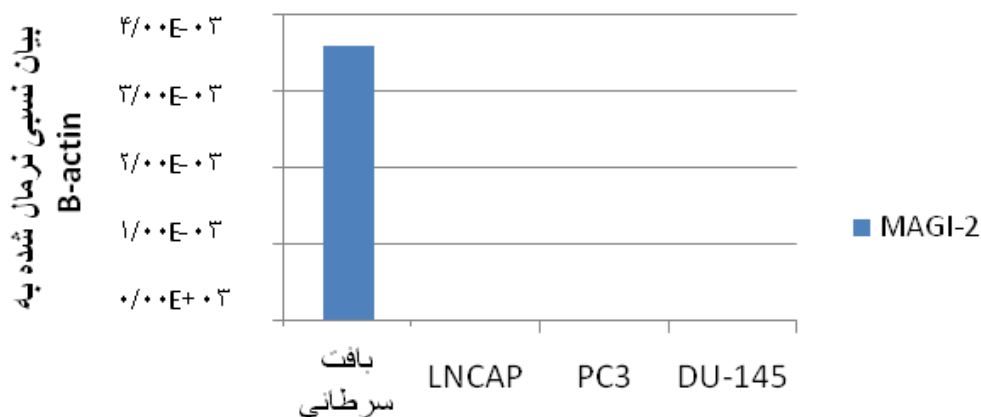
برای ارزیابی بیان ژن‌های مورد نظر از تکنیک Real-time PCR استفاده شد. این بررسی با استفاده از سیستم TaqMan probe و در دستگاه ABI 7300 انجام گرفت. واکنش‌ها در سه تکرار در پلیت ۹۶ چاهکی انجام شد و هر واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتری، شامل ۱۰ میکرولیتر، Master Mix TaqMan تهیه شده از شرکت Applied Biosystems، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای Forward و Reverse اختصاصی و پروب ژن‌های مورد نظر و ۱۰۰ نانوگرم از cDNA بود. به این مخلوط آب مقطر تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر افزوده شد. جهت انجام مرحله setup، رقت‌های متوالی از cDNA جهت ایجاد منحنی‌های استاندارد و تعیین کارآمدی PCR برای ژن‌های مورد نظر استفاده شد. واکنش مطابق با برنامه دمایی- زمانی زیر انجام شد: در ابتدا ۹۵ درجه سانتی‌گراد واسرشت سازی cDNA الگو در مدت زمان ۱۰ دقیقه در چرخه اول و سپس برنامه دمایی زیر در ۴۰ چرخه تکرار شد: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه. سپس بر اساس سیکل‌های آستانه (Cycle of threshold) در نمونه‌های مورد آزمایش و مقایسه آن با نمونه‌های کنترل، نسبت بیان mRNA ژن مورد نظر بر اساس روش $\Delta\Delta Ct$ محاسبه شد.

یکی از روش‌های ارزیابی کمی نسبی بیان ژن، روش مقایسه‌ای $\Delta\Delta Ct$ است. در این روش تغییرات سطوح بیان ژن

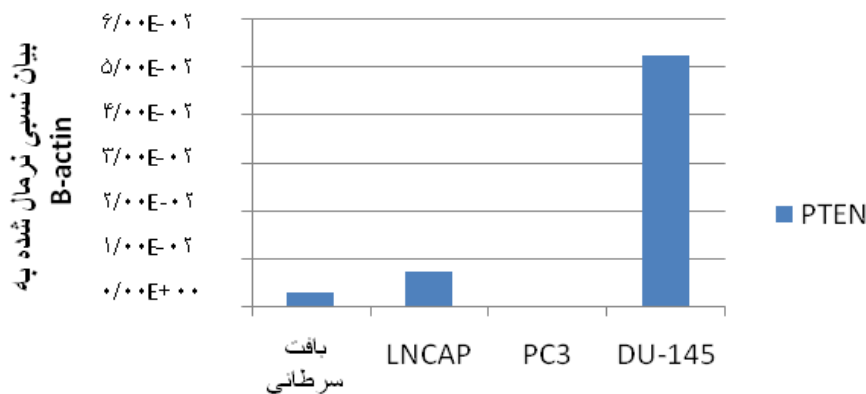
۳ نشان‌دهنده این مقادیر در نمونه‌های بافتی و رده‌های سلولی مورد مطالعه می باشد.

جدول ۲: نتایج CT های به دست آمده از Real-time PCR بر روی نمونه‌های بافت سرطان پروستات و رده‌های سلولی LnCap, PC3, DU-145

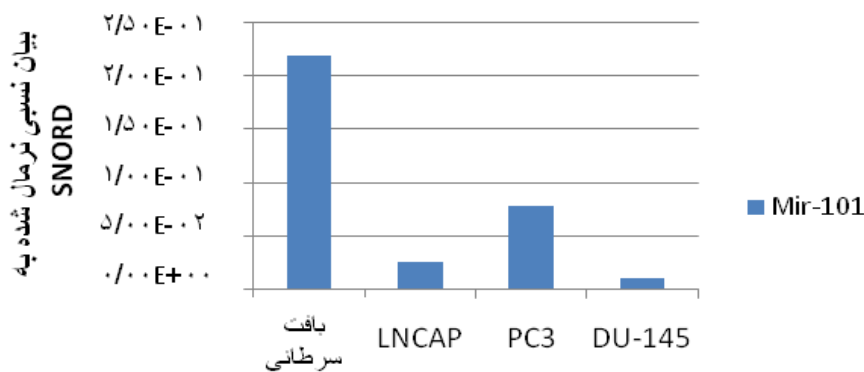
Ratio	$\Delta\Delta CT$	B-actin	PTEN	
$2/69E-03$	-۸/۵۴	۱۷/۷۱	۲۶/۲۵	بافت سرطان پروستات
$7/19E-03$	-۷/۱۲	۱۷/۳۸	۲۴/۵	رده سلولی LNCAP
$8/84E-07$	-۲۰/۱۱	۱۶/۷۸	۳۶/۸۹	رده سلولی PC3
$5/22E-02$	-۴/۲۶	۱۸/۳۷	۲۲/۶۳	رده سلولی DU-145
Ratio	$\Delta\Delta CT$	B-actin	MAGI-2	
$3/59E-03$	-۸/۱۲	۱۷/۷۱	۲۵/۸۳	بافت سرطان پروستات
$2/61E-06$	-۱۸/۵۴	۱۷/۳۸	۳۵/۹۳	رده سلولی LNCAP
$1/33E-06$	-۱۹/۵۲	۱۶/۷۸	۳۶/۳۰	رده سلولی PC3
$1/18E-05$	-۱۶/۳۶	۱۸/۳۷	۳۴/۷۴	رده سلولی DU-145
Ratio	$\Delta\Delta CT$	SNORD	MiR-101	
$2/18E-01$	-۲/۲	۲۵/۹	۲۸/۱	بافت سرطان پروستات
$2/54E-02$	-۵/۳	۲۱/۱	۲۶/۴	رده سلولی LNCAP
$7/69E-02$	-۳/۷	۲۴/۹	۲۸/۶	رده سلولی PC3
$1/03E-02$	-۶/۶	۲۲	۲۸/۶	رده سلولی DU-145



نمودار ۱: مقایسه بیان ژن MAGI-2 در بافت سرطان پروستات و رده های سلولی LnCap, PC3, DU-145



نمودار ۲: مقایسه بیان ژن PTEN در بافت سرطان پروستات و رده های سلولی Lncap, PC3, DU-145



نمودار ۳: مقایسه بیان ژن miR-101 در بافت سرطان پروستات و رده های سلولی Lncap, PC3, DU-145

بحث و نتیجه گیری

را در برگرفته است و نقش عوامل دیگر مانند miRNAs را نیز روشن ساخته است (۲۸). جهش های ژن PTEN از رایج ترین تغییرات ژنتیکی در سرطان پروستات بوده که در ۳۰٪ بدخیمی های پروستات اولیه و ۶۳٪ موارد پیشرفته و متاستاتیک گزارش شده است (۲۹).

قابل ذکر است که انکولوژی مولکولی برای تشخیص زودهنگام و بهبود پیش آگهی سرطان پروستات نقش مهم و اساسی بازی می کند. اگر چه روش های سرولوژی مانند تعیین سطح سرمی آنتی ژن اختصاصی پروستات در تشخیص

در شروع و پیشرفت سرطان پروستات نقش ژن های سرکوبگر تومور به خوبی شناخته شده است. کاهش یا فقدان بیان این ژن ها زمینه ساز تغییرات بدخیم بعدی و گسترش تومور از طریق متاستاز به بافت های دیگر می باشد (۲۶). این تغییرات عموماً ناشی از موتاسیون یا بازآرایی ژنتیکی در محل ژن های سرکوبگر تومور نظیر PTEN روی می دهد (۲۷). با گذشت بیش از ۱۵ سال از آشکار شدن نقش مهم PTEN در سرطان پروستات، زوایای مختلفی از عملکرد آن مورد بررسی قرار گرفته است این تغییرات سطوح مختلف بیان ژن و پروتئین

گرفت. نتایج نشان داد بیان MAGI-2 در هر سه رده سلولی کاهش شدید و معنی‌داری دارد. این امر می‌تواند ناشی از بازآرایی ژنتیکی در ژن MAGI-2 باشد. بیان ژن PTEN در دو رده سلولی LnCap و PC3 بسیار پایین‌تر از سلول‌های DU-145 بود که نشان‌دهنده از دست رفتن کامل ژن در سطح DNA می‌باشد. به علاوه این یافته تأییدکننده احتمال از دست رفتن بیان هر دو ژن در رده‌های سلولی LnCap و PC3 می‌باشد. این یافته، هماهنگ با اطلاعات قبلی در رابطه با احتمال تغییرات ژنتیکی همزمان در این دو ژن می‌باشد (۳۴).

نتایج مطالعات گذشته نشان می‌دهد که PTEN دستخوش فقدان تعداد کمی در اولین مراحل ایجاد تومور پروستات می‌شود. حذف یا جهش PTEN در ابتدایی‌ترین مراحل کارسینوم پروستات صورت می‌گیرد و کاهش بیان و فعالیت آن با پیشرفت و تهاجم تومور مرتبط می‌باشد. همچنین مطالعات نشان می‌دهد که سطح پایین بیان PTEN در موارد پیشرفته سرطان پروستات باقی می‌ماند که این مشاهدات موافق با پدیده Haploinsufficiency در مورد ژن NKX3.1 است و بیانگر خاموشی نسبی ژن‌های مهارکننده تومور در سرطان پروستات می‌باشد (۳۵). بر اساس یک مطالعه انجام شده، غیرفعال شدن و کاهش بیان PTEN با استعداد ابتلا به سرطان پروستات مقاوم به هورمون مرتبط می‌باشد. در مدل موشی و رده‌های سلولی سرطان پروستات، حذف هدفمند و یا کاهش بیان PTEN، برای ایجاد نوع مقاومت به هورمون کافی است که این احتمالاً بیانگر پتانسیل بالای PTEN در میانکشی مستقیم با AR می‌باشد (۳۶). طبق گزارشات موجود، در اغلب موارد غیرفعال شدن PTEN در تومورهای پروستات با فقدان عملکرد ژن هومئوباکس NKX3.1، افزایش بیان پروتئوکوزن MYC و ترکیب ژنی TMRSS2-ERG همراه می‌باشد (۳۷).

در مطالعه حاضر بیان miR-101 در هر سه رده سلولی

نسبت به بافت سرطان پروستات کمتر بود. این میزان بیان نمی‌تواند توجیه‌کننده کاهش شدید در میزان mRNA ژن

زودهنگام سرطان پروستات بسیار پرکاربرد هستند اما پایین بودن سطح اختصاصیت و ارزش پیش‌آگهی آن گاهاً منجر به نتایج بی‌بسی منفی می‌شود (۳۰). امروزه مارکرهای مولکولی با اختصاصیت و حساسیت بالاتر در روند تشخیص و درمان سرطان پروستات سهم زیادی از مطالعات را به خود اختصاص داده‌اند.

اخیراً مطالعه‌ای جامع بر روی تغییرات ژنومیک در سرطان پروستات نشان داده است که ژن MAGI-2 به عنوان تولیدکننده پروتئین scaffold کمک‌کننده به پایداری PTEN عمل کرده و باعث افزایش پایداری و عملکرد آن می‌شود (۲۱). از سوی دیگر miR-101 باعث کاهش بیان ژن MAGI-2 شده و با مهار بیان این ژن سطح پروتئین آن را پایین می‌آورد. این تغییر باعث کاهش عملکرد PTEN شده و می‌تواند آغازگر روند بدخیمی پروستات باشد (۱۶). مطالعه پروفایل کل ژنوم (در مجموع ۲۶۰ miRNA) قبلاً نشان داده بود که بیان ۱۶ miRNA در بافت تومور پروستات ۱/۵ برابر افزایش و بیان ۱۷ miRNA در بافت تومور نسبت به BPH حداقل ۲ برابر کاهش می‌یابد (۳۱). تا کنون بیشتر miRNAهای مرتبط با سرطان پروستات شناخته شده، نقش مهارکنندگی تومور دارند و در نتیجه ایجاد تومور بیان آنها در نمونه‌های تومور کاهش می‌یابد. نقش مهارکنندگی تومور با توانایی مداخله آنها در تنظیم مهاجرت و تهاجم و آپوپتوزیس سلولی با یک فعالیت پروآپوپتوتیک قابل توجیه است (۳۲). بر اساس مطالعات، بیان miR-101 سبب مهار MAGI-2، گیرنده آندروژن، کاهش سطح PTEN و افزایش Akt می‌شود که مبین یک نقش مستقل و جدید برای miR-101 در فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ مستقل از هورمون است (۱۶،۳۳). همچنین مشخص شده که مسیر سیگنالینگ PTEN/PI3K/Akt برای بقای سلول‌های شبه بنیادی سرطان پروستات بسیار مهم بوده که می‌تواند هدف خوبی برای درمان‌های جدید این سرطان باشد (۳۳).

در این مطالعه میزان بیان MAGI-2 در سه رده سلولی LnCap، PC3 و DU-145 سرطان پروستات انجام

در این رابطه نیاز به بررسی‌های بیشتر بر روی نمونه‌های دیگر از سرطان پروستات و همچنین تعیین بیان ژن MAGI-2 در سطح پروتئین در مطالعات بعدی می‌باشد. در این سلول‌ها باشد. علاوه بر این، با وجود بالا بودن میزان بیان miR-101 در بافت سرطان پروستات، میزان بیان MAGI-2 در این نمونه کاهش معنی‌داری نشان نمی‌دهد. لذا

References:

- 1- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. *Cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin 2012; 62(1): 10-29.
- 2- Boorjian SA, Eastham JA, Graefen M, Guillonneau B, Karnes RJ, Moul JW, et al. *A critical analysis of the long-term impact of radical prostatectomy on cancer control and function outcomes*. Eur Urol 2012; 61(4): 664-75.
- 3- Morganti G, Gianferrari L, Cresseri A, Arrigoni G, Lovati G. *Clinico-statistical and genetic research on neoplasms of the prostate*. Acta Genet Stat Med 1956-1957; 6(2): 304-5.
- 4- Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. *Mendelian inheritance of familial prostate cancer*. Proc Nati Acad Sci USA 1992; 89(8): 3367-71.
- 5- Qaseem A, Barry MJ, Denberg TD, Owens DK, Shekelle P. *Screening for prostate cancer: a guidance statement from the clinical guidelines committee of the American college of physicians*. Ann Intern Med 2013; 158(10): 761-69.
- 6- Suzuki M, Muto S, Hara K, Ozeki T, Yamada Y, Kadowaki T, et al. *Single-nucleotide polymorphisms in the 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase genes might predict the risk of side-effects of estramustine phosphate sodium in prostate cancer patients*. Int J Urol 2005; 12(2): 166-72.
- 7- Thomas G, Jacobs KB, Yeager M, Kraft P, Wacholder S, Orr N, et al. *Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer*. Nature Genetics 2008; 40: 310-15.
- 8- Zheng SL, Sun J, Wiklund F, Smith S, Stattin P, Li G, et al. *Cumulative association of five genetic variants with prostate cancer*. N Engl J Med 2008; 358: 910-19.
- 9- Ishkanian AS, Malloff CA, Ho J, Meng A, Albert M, Syed A, et al. *High-resolution array CGH identifies novel regions of genomic alteration in intermediate-risk prostate cancer*. Prostate 2009; 69(10): 1091-100.
- 10- Bonkhoff H, Wernert N, Dhom G, Remberger K. *Distribution of basement membranes in primary and metastatic carcinomas of the prostate*. Human Pathol 1992; 23(8): 934-39.
- 11- Yu J, Mani RS, Cao Q, Brenner CJ, Cao X, Wang X, et al. *An integrated network of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression*. Cancer cell 2010; 17(5): 443-54.
- 12- Bhatia-Gaur R, Donjacour AA, Sciavolino PJ, Kim M, Desai N, Young P, et al. *Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer*. Genes Dev 1999; 13(8): 966-77.

- 13- He WW, Sciavolino PJ, Wing J, Augustus M, Hudson P, Meissner PS, et al. *A novel human prostate-specific, androgen-regulated homeobox gene (NKX3.1) that maps to 8p21, a region frequently deleted in prostate cancer*. Genomics 1997; 43(1): 69-77.
- 14- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. *Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers*. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101(9): 2999-3004.
- 15- Su H, Yang JR, Xu T, Huang J, Xu L, Yuan Y, et al. *MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity*. Cancer Res 2009; 69(3): 1135-42.
- 16- Sachdeva M, Wu H, Ru P, Hwang L, Trieu V, Mo YY. *MicroRNA-101-mediated Akt activation and estrogen-independent growth*. Oncogene 2011; 30(7): 822-31.
- 17- Mulholland DJ, Tran LM, Li Y, Cai H, Morim A, Wang S, et al. *Cell autonomous role of PTEN in regulating castration-resistant prostate cancer growth*. Cancer cell 2011; 19(6): 792-804.
- 18- Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, et al. *Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis*. Nature 2005; 436(7051): 725-30.
- 19- Carver BS, Tran J, Gopalan A, Chen Z, Shaikh S, Carracedo A, et al. *Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in the prostate*. Nature Genet 2009; 41(5): 619-24.
- 20- Shen MM, Abate-Shen C. *Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges*. Genes Dev 2010; 24(18): 1967-2000.
- 21- Berger MF, Lawrence MS, Demichelis F, Drier Y, Cibulskis K, Sivachenko AY, et al. *The genomic complexity of primary human prostate cancer*. Nature 2011; 470(7333): 214-20.
- 22- Tolkacheva T, Boddapati M, Sanfiz A, Tsuchida K, Kimmelman AC, Chan AM. *Regulation of PTEN binding to MAGI-2 by two putative phosphorylation sites at threonine 382 and 383*. Cancer Res 2001; 61(13): 4985-89.
- 23- Wu X, Hepner K, Castelino-Prabhu S, Do D, Kaye MB, Yuan XJ, et al. *Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2*. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97(8): 4233-38.
- 24- Songyang Z, Fanning AS, Fu C, Xu J, Marfatia SM, Chishti AH, et al. *Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains*. Science 1997; 275(5296): 73-77.
- 25- Neudauer CL, Joberty G, Macara IG. *PIST: a novel PDZ/coiled-coil domain binding partner for the rho-family GTPase TC10*. Biochem Biophys Res Commun 2001; 280(2): 541-47.
- 26- Eeles RA, Kote-Jarai Z, Giles GG, Olama AA, Guy M, Jugurnauth SK, et al. *Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility*. Nature Genetics 2008; 40(3): 316-21.

- 27- Phin S, Moore MW, Cotter PD. *Genomic Rearrangements of PTEN in Prostate Cancer*. *Frontiers in Oncology* 2013; 3: 240.
- 28- Dhar S, Hicks C, Levenson AS. *Resveratrol and prostate cancer: promising role for micro RNAs*. *Molecular Nutr Food Res* 2011; 55(8): 1219-29.
- 29- Dong JT. *Prevalent mutations in prostate cancer*. *J Cell Biochem* 2006; 97(3): 433-47.
- 30- Grubb RL, 3rd, Kibel AS. *Prostate cancer: screening, diagnosis and management in 2007*. *M Med* 2007; 104(5):408-413.
- 31- Ambs S, Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, Howe TM, Petrocca F, et al. *Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer*. *Cancer Res* 2008; 68(15): 6162-70.
- 32- Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. *MicroRNA expression profiling in prostate cancer*. *Cancer Res* 2007; 67(13): 6130-35.
- 33- Dubrovskaya A, Kim S, Salamone RJ, Walker JR, Maira SM, Garcia-Echeverria C, et al. *The role of PTEN/Akt/PI3K signaling in the maintenance and viability of prostate cancer stem-like cell populations*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(1): 268-73.
- 34- Brenner JC, Chinnaiyan AM. *Disruptive events in the life of prostate cancer*. *Cancer cell* 2011; 19(3): 301-3.
- 35- Kim MJ, Cardiff RD, Desai N, Banach-Petrosky WA, Parsons R, Shen MM, et al. *Cooperativity of Nkx3.1 and Pten loss of function in a mouse model of prostate carcinogenesis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(5): 2884-89.
- 36- Ornstein DK, Cinquanta M, Weiler S, Duray PH, Emmert-Buck MR, Vocke CD, et al. *Expression studies and mutational analysis of the androgen regulated homeobox gene NKX3.1 in benign and malignant prostate epithelium*. *J Urol* 2001; 165(4): 1329-34.
- 37- Nam RK, Sugar L, Yang W, Srivastava S, Klotz LH, Yang LY, et al. *Expression of the TMPRSS2: ERG fusion gene predicts cancer recurrence after surgery for localised prostate cancer*. *Br J Cancer* 2007; 97(12): 1690-95.

Evaluation of Mir-101 Expression Changes and its Correlation with PTEN and MAGI2 Gene Expression in Three Prostate Cancer Cell Lines

Shahbazi Sh(MD)^{*1}, Fatahi N(MSc)², Kokabi L(PhD Student)³

¹*Department of Medical Genetics, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*

^{2,3}*Department of Molecular Medicine, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.*

Received: 27 Sep 2014

Accepted: 5 Feb 2015

Abstract

Introduction: Defects in PTEN gene play an important role in the initiation of the prostate cancer. MAGI2 is recognized as a frame which assists in stabilizing PTEN protein and enhances its tumor suppressor function. As miR-101 down-regulates MAGI2 expression, it can indirectly cause to reduce the PTEN activity.

Methods: LnCap, PC3 and DU-145 prostate cancer cell lines were studied in order to investigate expression of PTEN, MAGI2 and miR-101 using TaqMan probe Real-time PCR assay. The relative expression of each gene was determined based on their CT value and $\Delta\Delta CT$ method.

Results: The study results demonstrated that miR-101 and MAGI2 expression was down-regulated in all the three cell lines in comparison to prostate cancer tissue. However, despite the high expression of miR-101 in prostate cancer tissue, MAGI2 expression was not significantly affected in this sample. The expression of PTEN gene in LnCap and PC3 cells was significantly lower than its expression in DU-145 cells. This can be explained by the complete loss of the PTEN gene at DNA level.

Conclusion: The findings of the present study confirmed the loss of the expression of PTEN and MAGI2 genes in PC3 and LnCap cells, which may be due to MAGI2 gene rearrangements in a mutually exclusive manner.

Keywords: MAGI2 expression; MiR-101 expression; PTEN expression

This paper should be cited as:

Shahbazi Sh, Fatahi N, Kokabi L. *Evaluation of mir-101 expression changes and its correlation with pten and magi2 gene expression in three prostate cancer cell line.* J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2015; 23(3): 1979-86.

****Corresponding author: Tel: +98 21 82884556, Email: sh.shahbazi@modares.ac.ir***