

بررسی بیان ژن‌های Snail در سرطان پروستات

مجتبی عمادی بایگی^۱، زهراسهیلا سهیلی^{۲*}، شهرام سمعی^۳

خلاصه

سابقه و هدف: سرطان پروستات (PCa) دومین بدخیمی مرسوم در مردان در سراسر جهان است. Snail و Slug، تنظیم‌کنندگان اصلی فرآیند تغییر اپیتلیال - مزانشیما (EMT)، ژن‌هایی هستند که عملکرد آنها به طور اساسی تنظیم حرکت سلولی و فراهم نمودن ویژگی‌های بقا برای سلول‌ها است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه‌ی مورد - شاهد حاضر، محتوای mRNA کل از بافت‌های طبیعی و سرطانی پروستات استخراج گردید و جهت تولید cDNA مورد استفاده قرار گرفت. cDNA تولید شده جهت کمی نمودن بیان ژن‌های Snail با استفاده از روش Real-Time PCR مورد استفاده قرار گرفت؛ بدین صورت که با استفاده از رقت‌های پی در پی cDNA تولید شده، منحنی استاندارد رسم گردید و سپس بر اساس اطلاعات به دست آمده، میزان بیان ژن‌ها و بازدهی واکنش Real-Time PCR تعیین گردید. نتایج حاصل با استفاده از Student t-test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج: در این مطالعه، بیان ژن‌های Snail با بازدهی ۱/۸۲ در نمونه‌های بافتی پروستات تعیین گردید. یافته‌های این مطالعه نشانگر آن است که هر دو ژن در بافت‌های طبیعی و سرطانی بیان می‌شوند و تفاوت معنی‌داری از حیث بیان این ژن‌ها در میان نمونه‌های سرطانی و طبیعی دیده نمی‌شود (p=0.35 برای ژن Snail و p=0.06 برای ژن Slug).

نتیجه‌گیری: بیان غیرمتمايز ژن‌های Snail در بافت پروستات ممکن است بیانگر هتروژنی در بیان این ژن‌ها باشد. این هتروژنی در بیان ژن‌ها می‌تواند بیانگر پویایی و عدم پایایی تغییر اپیتلیال به مزانشیما در طی پیشرفت و متاستاز تومور باشد. به علاوه، احتمال دارد خاستگاه بیان ژن‌های Snail در نمونه‌های مورد مطالعه، سلول‌هایی به جز سلول‌های توموری باشند. بنابراین، جهت بررسی دقیق میزان بیان این ژن‌ها در سرطان پروستات استفاده از سلول‌های توموری جدا شده با استفاده از Laser microdissection بسیار مفید و سودمند به نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: سرطان پروستات، تغییر اپیتلیال به مزانشیما، ژن‌های Snail، Real-time RT-PCR

۱- دانشجوی دکتری تخصصی گروه ژنتیک دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس

۲- استادیار گروه بیوشیمی پژوهشکده علوم پایه پژوهشگاه ملی مهندس ژنتیک و زیست فناوری

۳- مسوول بخش کیت‌سازی مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

* نویسنده مسوول: زهراسهیلا سهیلی

آدرس: تهران، کیلومتر ۱۷ اتوبان تهران - کرج، بلوار پژوهش، پژوهشگاه ملی مهندس ژنتیک و زیست فناوری، گروه بیوشیمی

پست الکترونیک: soheili@nigeb.ac.ir

تلفن: ۰۲۱ ۴۴۵۸۰۳۷۹

دورنویس: ۰/۴۴۵۸۰۳۹۹

تاریخ دریافت: ۸۷/۳/۲

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۷/۸/۲۱

مقدمه

۹۰ درصد آسیب‌های استخوان فنتوتیبی استئوپلاستیک دارند [۴، ۵]. علایم کلینیکی بیماری با متاستاز به استخوان عبارتند از: درد شدید، شکستگی‌های پاتولوژیک، و فشرده شدن نخاع [۶]. به طور معمول میانگین بقای چنین بیمارانی از ۹ تا ۱۲ ماه می‌باشد [۷]؛ بنابراین، هرگاه PCa به استخوان متاستاز دهد؛ درمان و حذف آن مشکل می‌شود. قبل از آنکه سلول‌های PCa به جریان خون وارد شوند، باید متحرک شوند و از تومور اولیه جدا شوند (anoikis)

سرطان پروستات (PCa) دومین بدخیمی مرسوم مردان در سراسر جهان است [۱]. مشخص شده است که حدود ۹۰ درصد بیماران مبتلا به PCa پیشرفته، متاستاز به استخوان را خواهند داشت [۲]. [۳]. مطالعاتی که بر روی نمونه‌های اتوپسی بیماران مبتلا به PCa انجام گرفته، نشان داده است که در تقریباً بیش از ۸۰ درصد بیماران، ماکرومتاستازهای شامل استخوان ایجاد می‌شود و بیش از

و سارکوماهای سینوویال [۳۰] تایید کرده‌اند که بیان Snail با بیان کاهش یافته E-cadherin و با از دست رفتن تمایز و تهاجم مربوط می‌شود. Snail2 (Slug) اخیراً به لیست اعضای خانواده Snail که در پیشرفت تومور موثرند، اضافه شده است [۳۱]. یافته‌ی این مطالعه حاکی از آن است که Snail2 در سرطان‌های سنگ-فرشی مری با کاهش بیان E-cadherin، فروتنظیمی مارکرهای اپیتلیال و عملکرد ضد آپوپتوزی باعث تهاجم و پیش‌آگهی ضعیف می‌شود. این یافته پیشنهاد می‌کند که Snail2، علاوه بر Snail1 می‌تواند باعث القای EMT پاتولوژیکی در انواع خاصی از سلول‌ها شود یا ممکن است با Snail1 در این فرآیند مشارکت داشته باشد. مثالی از این مشارکت احتمالاً در سلول‌های سرطانی پستان انسان رخ می‌دهد، به طوری که بیان Snail1 با ازدست رفتن تمایز و متاستاز و Snail2 با سرکوب ژن مهارکننده‌ی توموری BRCA2 همراه می‌شود [۳۲]. در این مطالعه، بیان ژن‌های Snail (Snail1 و Snail2) برای نخستین بار در تومورهای پروستات با استفاده از تکنیک Real-time RT-PCR مورد سنجش قرار گرفته است. یافته‌های این مطالعه حاکی از آن است که هر دو ژن در نمونه‌های توموری بیان می‌شوند، هر چند این الگوی بیان ویژه به نمونه‌های توموری نیست و در نمونه‌های طبیعی نیز مشاهده می‌شود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: در مطالعه‌ی مورد - شاهد حاضر، دوازده نمونه‌ی انسانی طبیعی و سرطانی مورد نیاز به طور کاملاً تصادفی از بانک بافتی موجود در بخش ارولوژی دانشگاه هایرنش هاین آلمان جمع‌آوری شدند که گروه مورد شامل نمونه‌های pTu-217، pTu-121، pTu-219، pTu-247، pTu-36، pTu-139، pTu-248، PN-216، PN-229، PN-220، PN-122 و PN-148 می‌شدند. برای جمع‌آوری نمونه‌های گروه کنترل نیز با توجه به وجود محدودیت دسترسی به بافت کاملاً طبیعی که عاری از هر گونه فعالیت هایپرپلاستیک باشد، از نمونه‌های پروستات حاصل از پروستاتکتومی باز استفاده شده است. خلاصه‌ی گزارش پاتولوژی نمونه‌های توموری در جدول شماره‌ی ۱ ذکر شده است. همان گونه که جدول شماره‌ی ۱ نشان می‌دهد نمونه‌های توموری در lgrade و Stage‌های متفاوتی می‌باشند.

و بر مانع ماتریکس خارج سلولی¹ (ECM) غلبه یابند. بنابراین نخستین مراحل متاستاز افزایش تحرک و تهاجم می‌باشد. در نتیجه، فرضیه آن است که این مراحل با تغییر اپیتلیال به مزانشیمال² (EMT) مرتبط می‌شوند [۸]. EMT فرآیندی است که از طریق آن سلول‌های اپیتلیال فنوتیپ خود را تعدیل می‌کنند و خصوصاتی شبه‌مزانشیمی را اکتساب می‌کنند که از طریق آن چسبندگی بین سلولی تخریب می‌شود و تحرک سلولی افزایش می‌یابد. این فرآیند به عنوان یک ویژگی بنیادین تکوین طبیعی شناخته می‌شود و در چندین واقعه مهم تکوینی نقش دارد [۹]. یک خصوصیت مولکولی اصلی EMT، فروتنظیمی E-cadherin است [۱۰-۱۲]. E-cadherin در واقع به صورت یک سرکوب-کننده‌ی توموری که مانع تهاجم و متاستاز می‌شود، عمل می‌کند و اغلب در طی دگرگونی سرکوب یا تخریب می‌شود [۱۳، ۱۴]. در سرطان‌های انسانی مختلف، از دست رفتن عملکردی E-cadherin ممکن است در نتیجه‌ی تولید پروتئینی ناقص، فرونشانی رونوشت‌برداری به علت هایپرمتیلاسیون پروموتور یا سرکوب رونوشت‌برداری در نتیجه‌ی فعال شدن سرکوب‌کنندگانی چون Snail، Slug، Sip1 و Ets باشد [۲۴-۱۵]. Snail و Slug که به ترتیب توسط ژن‌های Snail1 و Snail2 کد می‌شوند - پروتئین‌های انگشت روی ایی هستند که همراه با Twist در تشکیل مزودرم دخالت دارند [۲۵]. نتیجه‌ای که می‌تواند از مطالعات فراوان اخیر در مورد پروتئین‌های Snail به ذهن متبادر شود، آن است که عملکرد این پروتئین‌ها به طور اساسی تنظیم حرکت سلولی و فراهم نمودن ویژگی‌های بقا برای سلول‌ها است [۲۵]. هرچند این عملکردها برای تکوین جنینی ضروری هستند، اما در حالت‌های پاتولوژیک کشنده می‌باشند. بنابراین، فعال شدن پاتولوژیکی Snail1 منجر به اکتساب ویژگی‌های تهاجمی توسط تومورهای اپیتلیال می‌شود؛ همچنان که این موضوع پس از نخستین نشانه‌ی دخالت ژن‌های Snail در القای EMT پیشنهاد شد [۲۲]. چون که از دست رفتن E-cadherin در تومورها با پیش‌آگهی ضعیف همراه می‌شود، ژن‌های Snail به عنوان سرکوب‌کنندگان E-cadherin می‌توانند به صورت مارکرهای اولیه بدخیمی مورد توجه قرار گیرند. علاوه بر فروتنظیمی E-cadherin، سلول‌های بیان‌کننده‌ی Snail ویژگی‌های مهاجرتی و تهاجمی را از طریق تغییر در اسکلت سلولی و القای متالوپروتئینازها اکتساب می‌کنند [۲۵]. بررسی بیوپسی‌های به دست آمده از تومورهای پستان [۲۶]، معده [۲۷]، سرطان‌های هیپاتوسلولار [۲۸]، سرطان‌های کولون [۲۹]،

1- Extracellular Matrix (ECM)

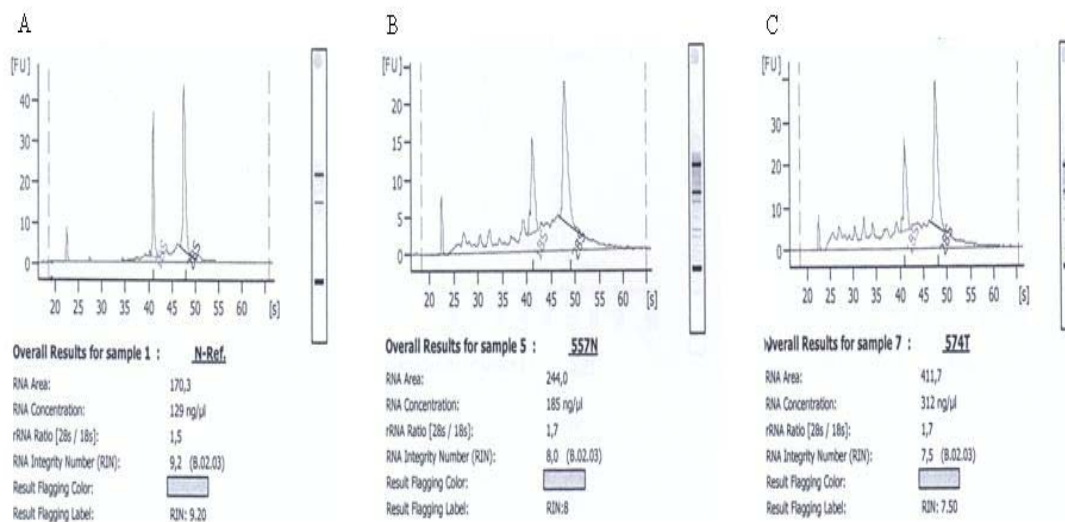
2- Epithelial-mesenchymal transition(EMT)

موجود در این بافت‌ها با استفاده از RNeasy Mini Kit (Qiagen) استخراج و کیفیت و کمیت آن با استفاده از چیپ-های Nano Agilent (شکل شماره ۱) و اسپکتروفتومتر Nano-Drop ND-1000TM (Thermo Scientific) مورد بررسی قرار گرفت. همان گونه که شکل شماره ۱ نشان می‌دهد نمونه‌ی کنترل مثبت (A) دارای پیک‌های مشخص rRNAهای 28S و 18S می‌باشد. بنابراین، با مقایسه‌ی الگوی باندینگ نمونه‌ی کنترل مثبت (A) با الگوی باندینگ rRNA کل استخراجی از بافت‌های طبیعی (B) و سرطانی (C)، کیفیت مناسب rRNA کل استخراجی از بافت‌ها مشخص گردید.

شکل ۱- تایید کیفیت و تمامیت RNA (Integrity) ی استخراجی با استفاده از نانو Agilent chips

Tumor Samples	Stage	Gleason Grade
Ptu 36	pT3b	7
Ptu121	pT2b	6
Ptu139	pT3b	9
Ptu217	pT2b	8
Ptu219	pT4	7
Ptu247	pT3b	7

استخراج rRNA کل (Total RNA) از بافت: جهت بررسی میزان بیان ژن‌های Snail در بافت‌های توموری، RNA



شکل ۱- تایید کیفیت و تمامیت RNA (Integrity) ی استخراجی با استفاده از نانو Agilent chips

(Roche) استفاده شد. ژن TBP به عنوان کنترل داخلی انتخاب [۳۳] و از پرایمرهای طراحی شده توسط شرکت Qiagen، جهت کمی نمودن بیان آن استفاده شد؛ بدین صورت که با استفاده از رقت‌های پی در پی cDNA تولید شده، منحنی استاندارد رسم گردید و سپس بر اساس آن بازدهی واکنش و بیان ژن‌ها تعیین گردید. نتایج حاصل در دو گروه نمونه‌های توموری و طبیعی نخست از نظر طبیعی بودن توزیع متغیر مورد بررسی (بیان نسبی ژن‌های Snail) با استفاده از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف تایید شد و سپس با استفاده از Student t-test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

انجام واکنش رونویسی معکوس: دو میکروگرم RNA با استفاده از آنزیم SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) و دستور کار شرکت سازنده به cDNA تبدیل شد. پرایمری که برای تولید نخستین رشته cDNA مورد استفاده گرفت، پرایمر (Roche) Oligo (dT)₁₅ می‌باشد که به دنباله‌ی Poly A mRNA متصل می‌شود.

واکنش Real-time PCR: جهت انجام Real-time PCR و بررسی بیان نسبی ژن‌های Snail از پرایمرهای ویژه طراحی شده برای هر ژن (جدول ۲)، LightCycler FastStart DNA Master^{plus} SYBR Green I دستگاه LightCycler

ژنهای Snail و Slug

Primer Name	annealing	Primer Sequence	Direction	Gene
Hs_TBP_1_SG Quantitect Primer Assay(QT00000721)	55	TGGCAGCCCTTCTCAAG	F&R	TBP (NM-003194)
ATTGCATAGTTAGTCACACCTC	60	GAGTCTGTAATAGGATTTCCCATAG	F	Snail (NM_005985)
CTTTAGTTCAACAATGGCAAC	60		R	Slug (NM_003068)

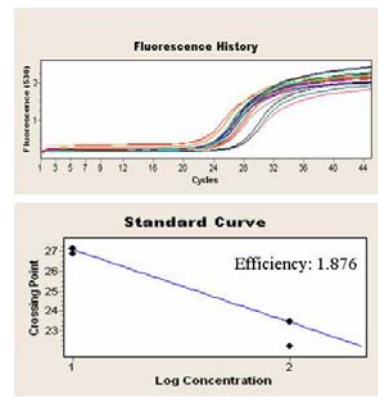
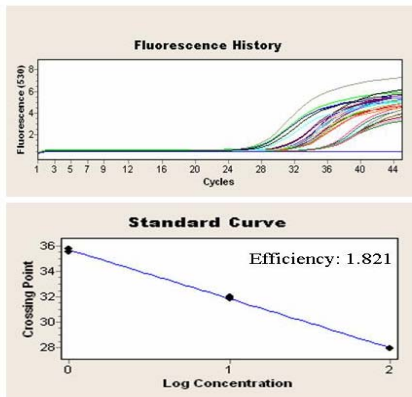
نتایج

داده‌های cDNA نمونه مرجع تهیه شده بود، استفاده شد. همان گونه که شکل ۲ نشان می‌دهد، بازدهی واکنش Real-time PCR برای ژنهای Snail و کنترل داخلی حداقل ۱/۸۲ می‌باشد که به معنای دو برابر شدن تقریبی DNA در هر سیکل است.

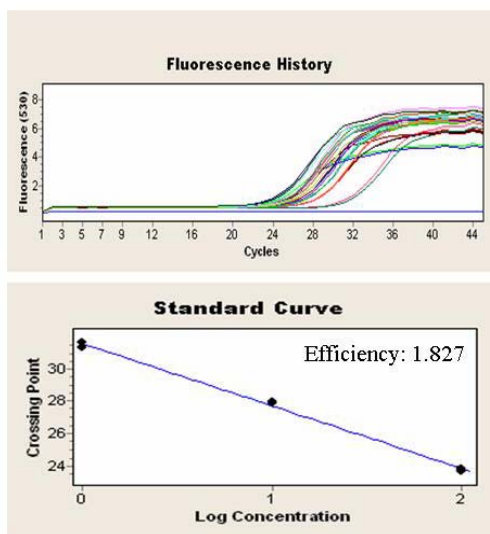
تعیین بازدهی (Efficiency) واکنش PCR: جهت تعیین بازدهی واکنش PCR برای هر یک از ژن‌ها، از منحنی استاندارد استفاده از سه رقت ۱/۱۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۱۰۰۰

الف

ب



ج



شکل ۲. منحنی استاندارد و تاریخچه فلورسانس برای واکنش Real-time PCR ژنهای Snail، Slug و TBP

بحث

در این مطالعه که برای نخستین بار، بیان ژن‌ها در سرطان پروستات سنجیده شد، نتایج حاکی از آن هستند که بیان ژن-های Snail ویژه به بافت‌های توموری نیست و در بافت‌های طبیعی نیز بیان قابل توجهی را نشان می‌دهد. همان گونه که اشاره شد اصلی‌ترین علت مرگ و میر در سرطان پروستات، متاستاز سلول‌های سرطانی به استخوان می‌باشد [۷] و از آنجا که نخستین مراحل متاستاز با افزایش تحرک و مهاجم، تعیین خصوصیت می‌شود، لذا فرضیه آن است که این مراحل با EMT مرتبط می‌شوند [۸]. ناپایداری میانکنش‌های سلول - سلول^۱ و تحریک ارتباط پویای سلول با ماتریکس که برای تحرک سلولی ضروری هستند، تغییرهای کلیدی EMT هستند که از طریق رویدادهای مولکولی پیچیده رخ می‌دهند. در حالی که سلول‌های توموری از به دست آوردن ویژگی‌های شبه‌مزانشیمی که آنها را قادر می‌سازد تا به استرومای اطراف خود حمله کنند، بهره‌مند می‌شوند؛ اما این احتمال وجود دارد که آنها در طی مراحل آشکار متاستازی و در مواجهه با محیط‌های دیگر، دوباره فنوتیپ اپیتلیالی چسبنده را به دست آورند. در واقع، به مانند EMT جنینی که اغلب با فرآیند معکوس تغییر مزانشیما^۲ (MET) دنبال می‌شود، EMT می‌تواند یک پدیده‌ی گذرا در طی پیشرفت بسیاری از سرطان‌ها باشد؛ بنابراین آنگاه که سلول‌های توموری مرحله‌ی مهاجم را به انجام رسانند، آنها دوباره ویژگی‌های اپیتلیالی را به دست خواهند آورد [۹، ۲۵]. EMT می‌تواند به طور مستقیم از طریق عواملی که پیوند سلول - سلول و یا اسکلت سلولی را تغییر می‌دهند، تسهیل شود؛ اما در بیشتر موارد، فعال‌سازی عوامل رونویسی هسته‌ای در وقوع آن نقش دارند [۹]. ژن‌های Snail از جمله این عوامل رونویسی هسته‌ای هستند که عملکرد آنها در القای EMT به خوبی شناخته شده است [۲۵]. استنتاجی که از مطالعات فراوان اخیر در مورد پروتئین‌های Snail به ذهن می‌رسد، آن است که عملکرد این پروتئین‌ها به طور اساسی تنظیم حرکت سلولی و فراهم نمودن ویژگی‌های بقا برای سلول‌ها است [۲۵]. هرچند این عملکردها برای تکوین جنینی ضروری هستند، اما در حالت‌های پاتولوژیک کشته می‌باشند. بنابراین، فعال شدن پاتولوژیکی Snail منجر به، به دست آوردن ویژگی‌های مهاجمی توسط تومورهای اپیتلیالی می‌شود؛ همچنان که این موضوع پس از نخستین نشانه دخالت ژن‌های Snail در القای EMT پیشنهاد شد [۲۲]. برای مثال، Snail در بخش پیشین مهاجم تومورهای ایجاد

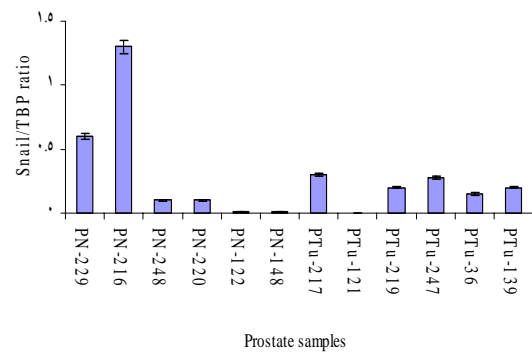
کمی نمودن بیان ژن TBP: جهت کمی نمودن بیان

ژن TBP از منحنی استاندارد که با استفاده از سه رقت ۱/۱۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۱۰۰۰ نمونه طبیعی PN229 تهیه شده بود، استفاده شد. بیان ژن نیز به صورت دوگانه برای هر نمونه سنجیده شد و سپس از دو مقدار به دست آمده، میانگین گرفته شد.

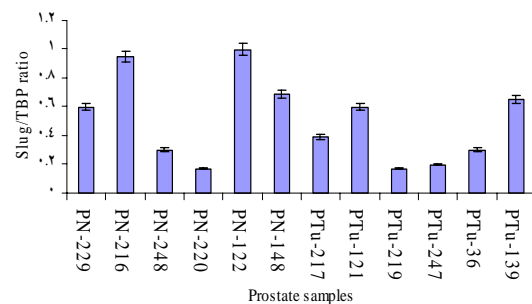
کمی نمودن بیان ژن‌های Snail: جهت کمی نمودن

بیان ژن‌های Snail از منحنی استاندارد که با استفاده از سه رقت ۱/۱۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۱۰۰۰ رده‌ی سلولی سرطانی UMUC-3 و PC-3 تهیه شده بود، استفاده شد. بیان هر ژن نیز به صورت دوگانه برای هر نمونه سنجیده شد و سپس از دو مقدار به دست آمده میانگین گرفته شد و بر میانگین TBP هر نمونه تقسیم گردید تا بیان نسبی ژن‌های Snail بر حسب Mean±SD برای هر نمونه به دست آید. همان گونه که نمودارهای شکل ۳ نشان می‌دهند، بیان ژن‌های Snail ویژه به بافت‌های توموری نیست و در بافت‌های طبیعی نیز بیان قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌دهد (p value= 0.35 برای ژن Snail و p value=0.06 برای ژن Slug). علاوه، در مورد نمونه‌های توموری نیز ارتباط معنی‌داری بین بیان این ژن‌ها و درجه بدخیمی تومور وجود ندارد.

۳۵



۳۶



۳۷

۳۸

1-Cell-cell interactions

2- Mesenchymal-epithelial transition(MET)

معیارهای هیستوپاتولوژیک ندارد؛ هر چند لازم است که نمونه‌های بیشتری در این زمینه و با لحاظ نمودن موارد ذکر شده، مورد مطالعه قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

این پژوهش در زمینه بررسی بیان ژن‌های Snail در سرطان پروستات بیانگر آن است که بیان این ژن‌ها در بافت پروستات هتروژن است به طوری که بیان آنها محدود به بافت‌های سرطانی نمی‌باشد. این هتروژنی می‌تواند بیانگر پویایی و عدم پایایی تغییر اپیتلیال به مزانشیمال در طی پیشرفت و متاستاز تومور باشد. لذا جهت بررسی دقیق بیان ژن‌های Snail در سرطان پروستات و نقش احتمالی آنها در القای EMT و اعطای قابلیت مهاجمی به سلول‌های سرطانی، نیاز است تا بیان این ژن‌ها در بخش پیشین مهاجم تومورها مورد بررسی قرار گیرد.

شده در پوست موش فعال می‌شود [۲۱]. بنابراین، بر اساس آنچه در فوق به آنها اشاره گردید، به نظر می‌رسد که نتایج این مطالعه که حاکی از بیان هتروژن ژن‌های Snail در نمونه‌های بافتی پروستات می‌باشد؛ ناشی از نوع نمونه‌گیری و نبود اطلاعات لازم در زمینه ترکیب سلولی بافت‌های جمع‌آوری شده باشد. به عبارت دیگر، با توجه به آنکه در سرطان انتظار بر آن است که EMT در طی مراحل مهاجم و متاستاز تومورها مشاهده گردد [۹]؛ لذا احتمالاً خاستگاه بیان ژن‌های Snail در نمونه‌های مورد مطالعه، سلول‌هایی به جز سلول‌های توموری باشند. بنابراین، جهت بررسی دقیق میزان بیان این ژن‌ها در سرطان پروستات استفاده از سلول‌های توموری جدا شده با استفاده از Laser microdissection بسیار مفید و سودمند به نظر می‌رسد. از طرف دیگر، با توجه به آنکه در نمونه‌های مورد بررسی که به صورت تصادفی انتخاب شده بودند، نمونه‌هایی با Stage و Grade متفاوتی وجود دارد؛ چنین به نظر می‌رسد که بیان این ژن‌ها ارتباط چندانی با این

References:

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA cancer J clin.* 2005;55(2):74-108.
- [2] Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA: a CA cancer J clin* 2007;57(1):43-66.
- [3] Rubin MA, Putzi M, Mucci N, Smith DC, Wojno K, Korenchuk S, et al. Rapid ("warm") autopsy study for procurement of metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6(3):1038-45.
- [4] Jacobs SC. Spread of prostatic cancer to bone. *Urology* 1983;21(4):337-44.
- [5] Koutsilieris M. Skeletal metastases in advanced prostate cancer: cell biology and therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1995;18(1):51-64.
- [6] Storey JA, Torti FM. Bone metastases in prostate cancer: a targeted approach. *Curr Opin Oncol* 2007;19(3):254-58.
- [7] Cheville JC, Tindall D, Boelter C, Jenkins R, Lohse CM, Pankratz VS, et al. Metastatic prostate carcinoma to bone: clinical and pathologic features associated with cancer-specific survival. *Cancer* 2002;95(5):1028-36.
- [8] Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene.* 2005; 24(50):7443-54.
- [9] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15(6):740-6.
- [10] Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7(5):619-27.
- [11] Kemler R. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet* 1993;9(9):317-21.
- [12] Tepass U, Truong K, Godt D, Ikura M, Peifer M. Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1(2):91-100.
- [13] Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1994;1198(1):11-26.
- [14] Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol.* 1998;153(2):333-9.
- [15] Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, de Leeuw WJ, van de Vijver M, Cornelisse C, van Roy F. E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J* 1995; 14(24):6107-15.
- [16] Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, Boyd J. Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers. *Nat Genet* 1994;7(1):98-102.
- [17] Yoshiura K, Kanai Y, Ochiai A, Shimoyama Y, Sugimura T, Hirohashi S. Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(16): 7416-9.

- [18] Hennig G, Lowrick O, Birchmeier W, Behrens J. Mechanisms identified in the transcriptional control of epithelial gene expression. *J Biol Chem* 1996;271(1):595-602.
- [19] Rodrigo I, Cato AC, Cano A. Regulation of E-cadherin gene expression during tumor progression: the role of a new Ets-binding site and the E-pal element. *Exp Cell Res* 1999;248(2):358-71.
- [20] Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2000;2(2):84-9.
- [21] Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000;2(2):76-83.
- [22] Nieto MA, Sargent MG, Wilkinson DG, Cooke J. Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science* 1994;264(5160):835-39.
- [23] Hajra KM, Chen DY, Fearon ER. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res* 2002;62(6):1613-8.
- [24] Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschuere K, van Grunsven L, Bruyneel E, et al. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* 2001;7(6):1267-78.
- [25] Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 2005;132(14):3151-61.
- [26] Elloul S, Elstrand MB, Nesland JM, Trope CG, Kvalheim G, Goldberg I, Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer* 2005;103(8):1631-43.
- [27] Rosivatz E, Becker I, Specht K, Fricke E, Luber B, Busch R, et al. Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am J Pathol* 2002;161(5):1881-91.
- [28] Sugimachi K, Tanaka S, Kameyama T, Taguchi K, Aishima S, Shimada M, et al. Transcriptional repressor snail and progression of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003;9(7):2657-64.
- [29] Palmer HG, Larriba MJ, Garcia JM, Ordonez-Moran P, Pena C, Peiro S, et al. The transcription factor SNAIL represses vitamin D receptor expression and responsiveness in human colon cancer. *Nat Med* 2004;10(9):917-9.
- [30] Saito T, Oda Y, Kawaguchi K, Sugimachi K, Yamamoto H, Tateishi N, et al. E-cadherin mutation and Snail overexpression as alternative mechanisms of E-cadherin inactivation in synovial sarcoma. *Oncogene* 2004;23(53):8629-38.
- [31] Uchikado Y, Natsugoe S, Okumura H, Setoyama T, Matsumoto M, Ishigami S, et al. Slug Expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11(3):1174-80.
- [32] Tripathi MK, Misra S, Khedkar SV, Hamilton N, Irvin-Wilson C, Sharan C, et al. Regulation of BRCA2 gene expression by the SLUG repressor protein in human breast cells. *J Biol Chem* 2005;280(17):17163-71.
- [33] Linja MJ, Savinainen KJ, Saramaki OR, Tammela TL, Vessella RL, Visakorpi T. Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 2001;61(9):3550-5.