

Xây dựng đối chứng chuẩn cho kỹ thuật MS-PCR xác định methyl hóa promoter *BRCA1* ở mẫu bệnh phẩm ung thư vú

Vũ Duy Diệu, Đoàn Thị Hồng Vân, Tạ Bích Thuận, Võ Thị Thương Lan*

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 3.2.2015, ngày chuyển phản biện 9.2.2015, ngày nhận phản biện 4.3.2015; ngày chấp nhận đăng 10.3.2015

Trong nghiên cứu này, các tác giả sử dụng plasmid tái tổ hợp và ADN của dòng tế bào ung thư PC3 (có 1 bản sao của gen *BRCA1* bị methyl hóa) để xây dựng đối chứng chuẩn cho kỹ thuật MS-PCR (methylation-specific polymerase chain reaction), kỹ thuật phát hiện sự methyl hóa cytosine. Kết quả cho thấy, độ nhạy phát hiện cao nhất với plasmid dạng thẳng đạt 6 bản copy *BRCA1* bị methyl hóa/10000 bản copy *BRCA1* không bị methyl hóa, trong khi độ nhạy phát hiện với plasmid dạng vòng và siêu xoắn đạt 126 copy *BRCA1* bị methyl hóa/10000 bản copy *BRCA1* không bị methyl hóa. Khi sử dụng ADN tách chiết từ dòng tế bào PC3, kỹ thuật MS-PCR cho phép phát hiện 2 bản sao *BRCA1* bị methyl hóa. Kết quả thu được hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu trước đó khi sử dụng plasmid ở dạng thẳng đảm bảo độ nhạy cao hơn so với plasmid ở dạng siêu xoắn. Plasmid tái tổ hợp dạng thẳng được chọn làm đối chứng chuẩn trong bộ sinh phẩm phát hiện *BRCA1* bị methyl hóa ở các mẫu bệnh phẩm ung thư vú.

Từ khóa: gen *BRCA1* (breast cancer 1, early onset), khuếch đại đặc hiệu methyl MS-PCR (methylation-specific polymerase chain reaction), methyl hóa ADN, sự biến đổi di truyền ngoại gen, ung thư vú.

Chỉ số phân loại 1.6

Đặt vấn đề

Methyl hóa ADN là một dạng thông tin di truyền ngoại gen (epigenetics). Ở động vật có vú, methyl hóa xảy ra chủ yếu ở cytosine đứng trong phức CpG; phức này tập trung ở vùng promoter của các gen [1]. Nhiều kết quả nghiên cứu cho thấy hiện tượng methyl hóa bất thường là những biến đổi đầu tiên ở mức độ phân tử dẫn đến hình thành và phát triển ung thư [2]. Do đó, mức độ methyl hóa ở những gen liên quan đến ung thư, đặc biệt ở các gen ức chế khối u (tumor suppressor genes) được xem là chỉ thị phân tử hỗ trợ chẩn đoán sớm và tiên lượng tái phát của các bệnh ung thư, trong đó có ung thư vú [3]. Đáp ứng yêu cầu này, nhiều kỹ thuật phân tích methyl hóa ADN đã được phát triển, trong đó kỹ thuật khuếch đại đặc hiệu methyl MS-PCR được áp dụng rất phổ biến [4].

Ung thư vú là loại ung thư phổ biến thường gặp ở phụ nữ, có tỷ lệ phát triển nhanh tại các quốc gia đang phát triển, trong đó có Việt Nam. Hàng năm, ở châu Á, số ca mắc ung thư vú tăng 3%, trong khi ở các châu lục khác là 0,5% [5]. Trong ung thư vú,

methyl hóa promoter gen *BRCA1* được quan tâm đặc biệt [6]. Tác giả Xu & cs. (2009) xác định được 59% khối u có promoter *BRCA1* bị methyl hóa ở 851 bệnh nhân chẩn đoán bị ung thư vú [7]. Các tác giả nhận thấy, mức độ methyl hóa promoter *BRCA1* tăng cao ở giai đoạn ung thư xâm lấn và có mối liên hệ chặt chẽ với các trường hợp tử vong ($p < 0,04$). Nghiên cứu của Mirza & cs. (2007) cho thấy, 23/50 bệnh nhân ung thư vú xâm lấn có promoter *BRCA1* bị methyl hóa quá mức [8]. Sharma & cs. (2014) trong nghiên cứu của mình đã cho thấy, methyl hóa promoter *BRCA1* có ý nghĩa trong tiên lượng bệnh ung thư vú đối với những bệnh nhân mà cả 3 dấu chuẩn hóa mô miễn dịch ER, PR và HER2 đều âm tính [9]. Các bệnh nhân có *BRCA1* bị methyl hóa đều đáp ứng tốt với hóa trị liệu sau phẫu thuật [10] hoặc với một số hóa chất đặc hiệu [11]. Như vậy, dấu chuẩn methyl hóa *BRCA1* giúp bác sĩ chỉ định thuốc điều trị đích cho bệnh nhân ung thư vú. Thực vậy, với ung thư vú, methyl hóa promoter *BRCA1* là chỉ thị sử dụng thuốc điều trị đích ức chế Poly (Adenosine Diphosphate) - Ribose Polymerase [12].

*Tác giả chính: email: vothithuonglan@hus.edu.vn

ESTABLISHING THE STANDARD CONTROL OF MS- PCR (METHYLATION - SPECIFIC PCR) REACTION TO DETERMINE METHYLATION OF BRCA1 GENE PROMOTER IN BREAST CANCER SAMPLES

Summary

In this study, genomic DNA from the PC3 cancer cell line and the recombinant plasmid containing the methylated BRCA1 sequence have been isolated from transformants. The linear plasmid DNA and bisulfite treated PC3 DNA which carry the methylated BRCA1 sequences have been used as templates for PCR with the MS-PCR primers. The results have shown that the MS-PCR has been capable of detecting 6 copies of the methylated BRCA1 sequence per 10000 copies of the non-methylated BRCA1 sequence from linear plasmid and 2 copies from PC3 genomic DNA. These results have been absolutely consistent with that of the previous reports, which has indicated that linear recombinant plasmid and genomic DNA extracted from breast cancer cell lines are suitable for establishing the standard control of the MS-PCR method. The authors have suggested that the linear plasmid DNA should be used as a positive control in the MS-PCR to determine the methylated BRCA1 sequence in breast cancer samples.

Keywords: BRCA1 (breast cancer 1, early onset), breast cancer, gene DNA methylation, genomics, methylation-specific PCR (MS-PCR).

Classification number 1.6

Ở Việt Nam, nghiên cứu methyl hóa ADN liên quan đến các loại ung thư ở bệnh nhân mới được triển khai trong vài năm gần đây [13]. Những kết quả này đặc biệt có ý nghĩa khi đối chiếu so sánh với kết quả nhận được từ các tộc người khác nhau; từ đó có những định hướng cụ thể về áp dụng các chỉ thị phân tử methyl hóa ADN và các thuốc điều trị đích cho bệnh nhân. Do ưu điểm đặc thù (đơn giản, chính xác, đặc hiệu) nên kỹ thuật MS-PCR được lựa chọn trong nhiều nghiên cứu phân tích mức độ methyl hóa ADN [4]. Để xác định được giới hạn phát hiện trong kỹ thuật này (tức

là độ nhạy kỹ thuật cho phép phát hiện sự có mặt của ADN đích), các loại khuôn khác nhau (như plasmid tái tổ hợp hoặc ADN tách từ dòng tế bào ung thư) được sử dụng. Đối chứng dương là plasmid tái tổ hợp có nhiều ưu điểm như: tách chiết đơn giản, ADN plasmid bền vững... Tuy nhiên, cấu hình của plasmid là yếu tố quan trọng, ảnh hưởng trực tiếp đến độ nhạy của phản ứng PCR [14]. Đối chứng dương là ADN tách từ tế bào nuôi cấy đảm bảo tính tương đồng như ADN tách từ các mẫu bệnh phẩm; tuy nhiên so với nuôi cấy vi khuẩn, nuôi cấy tế bào đòi hỏi trang thiết bị đắt tiền và chi phí cao hơn nhiều. Vì vậy, để có được đối chứng chuẩn ổn định và có độ nhạy cao nhất, trong nghiên cứu này, chúng tôi so sánh hai loại khuôn là ADN của plasmid tái tổ hợp và ADN tổng số tách từ dòng tế bào PC3 để xác định độ nhạy cho kỹ thuật MS-PCR khi phân tích methyl hóa promoter BRCA1 trên các mẫu bệnh phẩm ung thư vú.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Hóa chất và dụng cụ: plasmid tái tổ hợp pBR-Me mang trình tự promoter *BRCA1* bị methyl hóa có kích thước 195 bp (cung cấp bởi Phòng thí nghiệm sinh y, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội); mẫu máu người khỏe mạnh (được cung cấp bởi Viện Huyết học và Truyền máu Trung ương - tháng 11.2013); 30 mẫu bệnh phẩm ung thư vú (được cung cấp bởi Bệnh viện K - năm 2013); dòng tế bào ung thư PC3 (được cung cấp bởi nhóm nghiên cứu Ung thư thực nghiệm, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội); các cặp mồi đặc hiệu cho kỹ thuật MS-PCR (được cung cấp bởi Hãng IDT - Hoa Kỳ). Trình tự các mồi được trình bày tại bảng 1.

Bảng 1: trình tự các mồi dùng trong phản ứng MS-PCR

Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Nguồn gốc	Kích thước (bp)
BRCA-F	AAATCTCAACGAACACGCCG	Esteller & cs. [15]	Vòng 1: 200
BM-R	GGGTAGATTGGGTGGTTAATT	Nghiên cứu này	
BM-F	TACACGAACACGCCGCGCAA	Nghiên cứu này	Vòng 2: 195
BM-R	GGGTAGATTGGGTGGTTAATT		

Phương pháp nghiên cứu: ADN plasmid được tách bằng kit High pure Plasmid Isolation (Roche). ADN tổng số được tách từ mẫu máu bằng kit ReliaPrep Blood gDNA (Promega); từ dòng tế bào PC3 hoặc từ các mẫu bệnh phẩm ung thư bằng kit E.Z.N.A DNA Tissue (Hãng Omega). ADN tổng số được xử lý bisulfite bằng kit MethylEdge Bisulfite Conversion System (Hãng

Promega). Sau xử lý, các cytosine không bị methyl hóa sẽ chuyển thành uracine, còn cytosine bị methyl hóa sẽ được giữ nguyên.

Plasmid được cắt mở vòng bằng enzyme giới hạn *EcoRI*: 10 µg ADN plasmid được cắt với 3 µl *EcoRI*, phản ứng cắt được ủ ở 37°C trong 2 giờ. Sau đó, sản phẩm cắt được tinh sạch bằng kit High Pure PCR product purification Kit (Hãng Roche). Kỹ thuật MS-PCR được thực hiện với các cặp mồi đặc hiệu khuếch đại promoter *BRCA1* bị methyl hóa từ khuôn ADN đã được xử lý bisulfite. Điều kiện và thành phần phản ứng được trình bày tại bảng 2.

Bảng 2: thành phần và điều kiện phản ứng MS-PCR với DNA đã xử lý bisulfite và 2 cặp mồi khuếch đại vùng promoter *BRCA1* bị methyl hóa

Vòng 1		Vòng 2	
Thành phần	Thể tích (µl)	Thành phần	Thể tích (µl)
H ₂ O	10,3	H ₂ O	11,3
Đệm 10X	1,5	Đệm 10X	1,5
dNTP 2 mM	0,5	dNTP 2 mM	0,5
BRCA-F 10 µM	0,3	BM F 10 µM	0,3
BM R 10 µM	0,3	BM R 10 µM	0,3
JumpTaq polymerase	0,1	JumpStart Taq polymerase	0,1
ADN	2,0	ADN (sản phẩm vòng 1)	1,0
Tổng	15,0	Tổng	15,0
Điều kiện: 94°C 5 phút; 45 chu kỳ (94°C 30 giây, 65°C 10 giây, 72°C 10 giây). 72°C 5 phút.		Điều kiện: 94°C 5 phút; 45 chu kỳ (94°C 30 giây, 68°C 10 giây, 72°C 10 giây). 72°C 5 phút.	

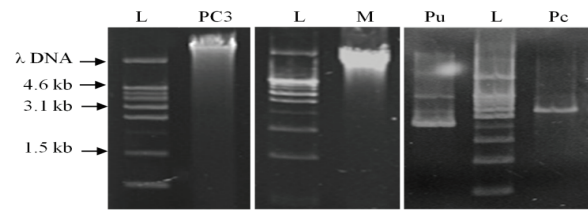
Nồng độ ADN được xác định bằng phương pháp đo độ hấp thụ ở bước sóng 260 nm trên máy NanoDrop (Thermo Fisher). Dựa vào nồng độ và chiều dài đoạn ADN, số bản copy được tính theo công thức sau:

Số bản copy = $\frac{X \cdot 10^{11} \cdot 1.1 \cdot 10^{11} \text{ bản copy/}\mu\text{l}}{Y}$; trong đó, 1 ng/µl của 1000 bp DNA = $9,1 \times 10^{11}$ bản copy/µl; X: nồng độ ADN plasmid (ng/µl); Y: kích thước của plasmid gồm cả đoạn chèn (bp).

Kết quả nghiên cứu

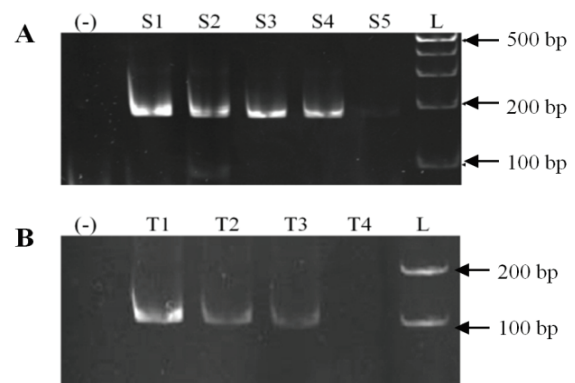
Plasmid tái tổ hợp pBR-Me mang đoạn *BRCA1* bị methyl hóa (có cytosine trong phức CpG được giữ nguyên) được cắt mở vòng với enzyme *EcoRI*. ADN tổng số được tách chiết từ dòng tế bào PC3 và từ máu của người cho tình nguyện. Tính nguyên vẹn không đứt gãy của các loại ADN được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% (hình 1). Độ sạch và nồng độ của

ADN được xác định bằng phương pháp đo độ hấp thụ OD₂₆₀ và OD₂₈₀.



Hình 1: kết quả điện di ADN tổng số tách từ tế bào PC3, từ máu (M) và plasmid pBR-Me không cắt (Pu) và cắt với enzym giới hạn (Pc) trên gel agarose 1 %. L: thang chuẩn ADN SY-4.6 kb

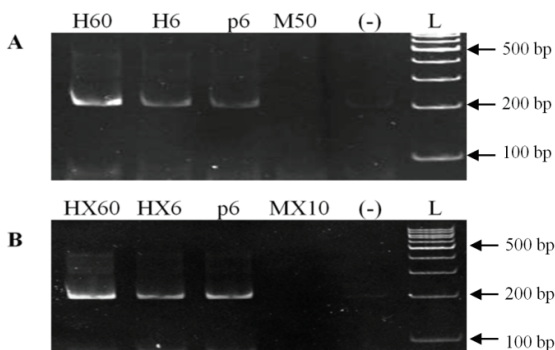
ADN plasmid pBR-Me tách chiết chủ yếu ở dạng siêu xoắn (hình 1). Cấu trúc plasmid có ảnh hưởng đến độ nhạy của phản ứng PCR, trong đó cấu trúc dạng thẳng có độ nhạy cao nhất [14]. Vì vậy, ADN plasmid được cắt mở vòng với enzyme *EcoRI*. Sau đó, sản phẩm cắt được tinh sạch bằng kit và được xác định nồng độ thông qua giá trị OD₂₆₀. ADN plasmid pBR-Me chưa mở vòng (dạng siêu xoắn) và plasmid ADN dạng thẳng được pha loãng bậc 10 từ 100 ng đến 1 ag và được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR. Thí nghiệm được tiến hành lặp lại tối thiểu 5 lần, thể tích một phản ứng là 15 µl. Kết quả phản ứng PCR được trình bày tại hình 2.



Hình 2: (A) Kết quả xác định độ nhạy phát hiện *BRCA1* từ pBR-Me chưa mở vòng có số bản copy từ 126.10³ (S1) đến 126 (S5) (bậc pha loãng 10 lần). (B) Kết quả xác định độ nhạy phát hiện *BRCA1* từ pBR-Me dạng thẳng có số bản copy từ 600 (T1) đến 0,6 (T4) (bậc pha loãng 10 lần). Mẫu (-): đối chứng âm không có ADN khuôn. L: thang chuẩn ADN

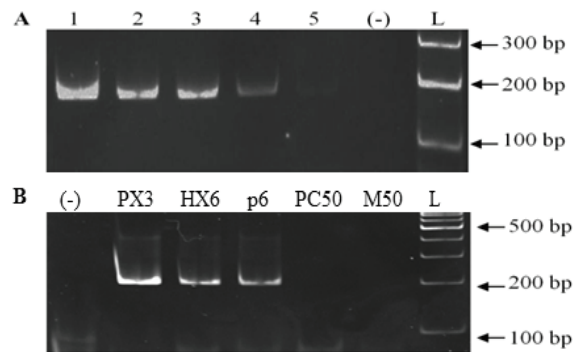
Dựa vào công thức tính số bản copy theo nồng độ ADN, độ nhạy phát hiện pBR-Me dạng siêu xoắn là 126 bản copy, trong khi độ nhạy phát hiện ADN plasmid dạng thẳng là 6 bản copy. Kết quả này khẳng định ADN plasmid dạng thẳng có độ nhạy cao hơn dạng

siêu xoắn. ADN tổng số tách từ máu là ADN không bị methyl hóa; do đó loại ADN này sau khi xử lý bisulfite được dùng làm đối chứng dương cho các cặp mỗi phát hiện ADN không methyl hoặc được trộn với ADN bị methyl hóa để xác định độ nhạy [16]. Vì vậy, ADN plasmid pBR-Me được trộn với ADN tách từ máu đã xử lý bisulfite sẽ đảm bảo khuôn cho phản ứng MS-PCR tương tự như ADN tách từ tế bào nhân chuẩn. 50 ng ADN tổng số chưa xử lý và 10 ng ADN đã xử lý (~1.500 tế bào) được trộn với 60 và 6 copy plasmid pBR-Me dạng thẳng. Kết quả PCR với cặp mỗi đặc hiệu phát hiện BRCA1 bị methyl hóa được trình bày tại hình 3. Kết quả cho thấy, sự có mặt của ADN tổng số tách từ máu chưa hoặc đã bị xử lý bisulfite không làm ảnh hưởng đến độ nhạy phát hiện 6 bản copy BRCA1 bị methyl hóa. Khi sử dụng pBR-Me dạng thẳng làm đối chứng chuẩn thì độ nhạy phát hiện trình tự BRCA1 bị methyl hóa với cặp mỗi MS-PCR và điều kiện, thành phần phản ứng tối ưu đạt 6 bản copy/1500 tế bào (3.000 allen), tương đương 0,2%.



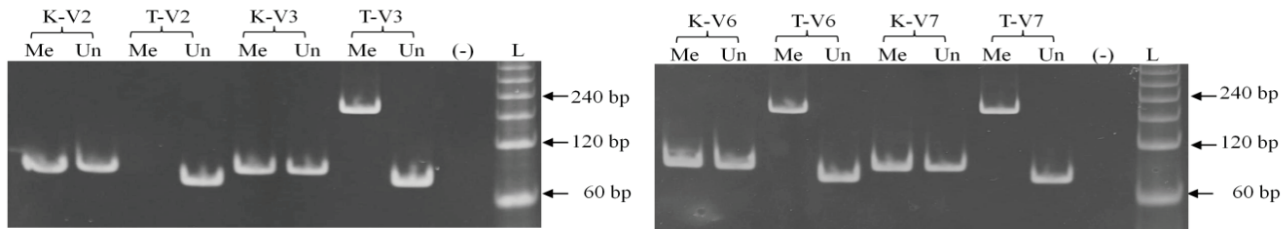
Hình 3: (A) Kết quả PCR khuếch đại BRCA1 bị methyl hóa từ 6 copy pBR-Me (p6) hoặc từ hỗn hợp 50 ng ADN máu trộn với 6 copy ADN plasmid (H6), trộn với 60 copy ADN plasmid (H60). Mẫu M50: 50 ng ADN tổng số tách từ máu. (B) Kết quả PCR khuếch đại BRCA1 bị methyl hóa từ 6 copy pBR-Me (p6) hoặc từ hỗn hợp 10 ng ADN máu đã xử lý bisulfite trộn với 6 copy plasmid (HX6), trộn với 60 copy plasmid (HX60). Mẫu MX10: 10 ng ADN máu đã xử lý bisulfite. Mẫu (-): đối chứng âm không có ADN khuôn. L: thang chuẩn ADN 100 bp. Tất cả pBR-Me plasmid đều ở dạng thẳng

Bên cạnh việc sử dụng plasmid tái tổ hợp, ADN tổng số tách từ dòng tế bào PC3 được thử nghiệm để xây dựng đối chứng chuẩn. Sau khi xử lý với bisulfite, ADN tổng số được pha loãng theo dải nồng độ từ 0,01-10 ng, và được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR để xác định độ nhạy. Plasmid pBR-Me dạng thẳng được sử dụng cùng với ADN của PC3 để so sánh độ nhạy và độ ổn định. Kết quả điện di sản phẩm PCR thể hiện ở hình 4.



Hình 4: (A) Kết quả PCR khuếch đại BRCA1 bị methyl hóa từ ADN của PC3 đã xử lý bisulfite ở các nồng độ 10 ng (giếng 1); 1 ng (2); 0,1 ng (3); 0,01 ng (4) và 0,001 ng (5). (B) Kết quả PCR khuếch đại BRCA1 bị methyl hóa từ 0,01 ng ADN-PC3 đã xử lý bisulfite (PX3), từ hỗn hợp 10 ng ADN máu xử lý bisulfite và 6 copy pBR-Me (HX6) và từ 6 copy pBR-Me (p6). Mẫu PC50, M50: 50 ng ADN tổng số không xử lý tách từ PC3 hoặc từ máu. Mẫu (-): đối chứng âm không có ADN khuôn. L: thang chuẩn ADN 100 bp

Mỗi tế bào có chứa khoảng 6,6 pg ADN tổng số, trong đó có 2 bản sao của BRCA1. Trong tế bào PC3, BRCA1 chỉ bị methyl hóa trên 1 bản sao. Do đó, 0,01 ng ADN (nồng độ cho phép phát hiện rõ nét) tương đương với 2 bản sao BRCA1 bị methyl hóa. Như vậy, độ nhạy phản ứng MS-PCR với cặp mỗi đặc hiệu và các thành phần, điều kiện tối ưu cho phép phát hiện 2 bản sao BRCA1 bị methyl hóa trong phản ứng 15 µl. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định được độ nhạy phát hiện BRCA1 bị methyl hóa khi sử dụng khuôn plasmid dạng siêu xoắn hoặc plasmid dạng thẳng là 126 bản copy hoặc 6 bản copy. Kết quả này cho thấy ảnh hưởng của cấu hình plasmid đến độ nhạy của phản ứng PCR. Kết quả thu được hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu trước đó là khi sử dụng plasmid ở dạng thẳng đảm bảo độ nhạy cao hơn so với plasmid ở dạng siêu xoắn [15]. Bên cạnh đó, kết quả xác định độ nhạy phát hiện BRCA1 bị methyl hóa trong dòng tế bào ung thư PC3 cho thấy khả năng phát hiện 2 bản copy BRCA1 bị methyl hóa. Để đạt được độ nhạy này, đòi hỏi phải sử dụng kỹ thuật MS-PCR hai vòng (trong khi chỉ cần một vòng đối với ADN plasmid dạng thẳng). Khi sử dụng pBR-Me dạng thẳng làm đối chứng dương cho phản ứng MS-PCR với 30 mẫu ADN tách chiết từ các mẫu bệnh phẩm ung thư vú thu được kết quả minh họa trên hình 5.



Hình 5: kết quả xác định *BRCA1* bị methyl bằng bộ Kit thương mại (ký hiệu K) hoặc bằng bộ mồi của nghiên cứu (ký hiệu T) trên các mẫu ADN đối chứng (Ck, Ct) hoặc của mẫu ung thư vú (V). Mẫu có *BRCA1* bị methyl hóa (Me) phát hiện bằng bộ Kit có kích thước 87 bp, phát hiện bằng bộ sinh phẩm có kích thước 195 bp. Mẫu có *BRCA1* không methyl hóa (Un) phát hiện bằng bộ Kit có kích thước 87 bp, phát hiện bằng bộ mồi trong nghiên cứu có kích thước 77 bp. Mẫu (-): đối chứng âm không có ADN khuôn. L: thang chuẩn ADN.

Kết luận

Với các kết quả nêu trên, có thể kết luận như sau: 1- Xác định được độ nhạy MS-PCR phát hiện 126 và 6 bản copy *BRCA1* bị methyl hóa khi sử dụng khuôn là plasmid dạng xoắn/vòng hoặc dạng thẳng; 2- Đã xác định được độ nhạy MS-PCR phát hiện 2 copy *BRCA1* bị methyl hóa trong dòng tế bào ung thư PC3; 3- Sử dụng plasmid dạng thẳng làm đối chứng chuẩn có ưu điểm đơn giản, giảm giá thành, phù hợp cho kỹ thuật MS-PCR phát hiện *BRCA1* bị methyl hóa ở các mẫu bệnh phẩm ung thư vú.

Lời cảm ơn

Các tác giả trân trọng cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ đã tài trợ cũng như sự hợp tác, giúp đỡ của Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện K Hà Nội để nghiên cứu này được triển khai thực hiện với các kết quả nêu trên.

Tài liệu tham khảo

- [1] Johns A, Lechner M, Fourkala E.O, Kristeleit R, Widschwendter M (2010), "Emerging promise of epigenetics and DNA methylation for the diagnosis and management of women's cancers", *Epigenomics* **2**, 9-21.
- [2] Feinberg A.P, Ohlsson R, Henikoff S (2006), "The epigenetic progenitor origin of human cancer", *Nat Rev Genet* **7**, 21-33.
- [3] Miyamoto K, Ushijima T (2005), Diagnostic and therapeutic applications of epigenetics, *Jpn J Clin Oncol* **35**, 293-01.
- [4] Herman J.G, Graff J.R, Myohanen S, Nelkin B.D, Baylin S.B (1996), "Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands", *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 9821-6.
- [5] Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari R.C, Ghafoor A, Feuer E.J, Thun M.J (2005), "Cancer statistics 2005", *Cancer J for clin*, **55**, 10-30.
- [6] Bagadi S.A, Prasad C.P, Kaur J, Srivastava A, Prashad R, Gupta S.D, Ralhan R (2008), "Clinical significance of promoter hypermethylation of *RASSF1A*, *RARβ2*, *BRCA1* and *HOXA5* in breast

cancers of Indian patients", *Life Sciences*, **82**, 1288-92.

- [7] Xu X, Gammon M.D, Zhang Y, Bestor T.H, Zeisel S.H, Wetmur J.G, Wallenstein S, Bradshaw P.T, Garbowski G, Teitelbaum S.L, Neugut A.I, Santella R.M, Chen J (2009), "BRCA1 promoter methylation is associated with increased mortality among women with breast cancer", *Breast Cancer Res Treat*, **115**, 397-04.
- [8] Mirza S, Sharma G, Prasad C.P, Parshad R, Srivastava A, Gupta S.D, Ralhan R (2007), "Promoter hypermethylation of *TMS1*, *BRCA1*, *ERα* and *PRB* in serum and tumor DNA of invasive ductal breast carcinoma patients", *Life Sciences*, **81**, 280-7.
- [9] Sharma P, Stecklein S.R, Kimler B.F, Sethi G, Petroff B.K, Phillips T.A, Tawfik O.W, Godwin A.K, Jensen R.A (2014), "The prognostic value of BRCA1 promoter methylation in early stage triple negative breast cancer", *J Cancer Therapeutics & Res*, doi: 10. 7243/2049-7962.
- [10] Xu Y, Diao L, Chen Y, Liu Y, Wang C, Ouyang T, Li J, Wang T, Fan Z, Fan T, Lin B, Deng D, Narod S.A, Xie Y (2013), "Promoter methylation of BRCA1 in triple-negative breast cancer predicts sensitivity to adjuvant chemotherapy", *Annals of Oncology*, **24**, 1498-05.
- [11] Turner N.C, Ashworth A (2011), "Biomarkers of PARP inhibitor sensitivity", *Breast Cancer Res Treat*, doi: 10. 1007/s10549-011-1375-8.
- [12] Veeck J, Roper S, Setien F, Gonzalez-Suarez E, Osorio A, Benitez J, Herman J.G, Esteller M (2010), "BRCA1 CpG Island Hypermethylation Predicts Sensitivity to Poly(Adenosine Diphosphate) - Ribose Polymerase Inhibitors", *J Clin Oncol*, **28**, e563-e564.
- [13] Lan T.V, Thuan B.T, Thu D.M et al (2013), "Methylation profile of BRCA1, RASSF1A and ER in Vietnamese women with ovarian cancer", *Asian Pac J Cancer Prev*, **14**, 7713-18.
- [14] Hou Y, Zhang H, Miranda L, Lin S (2010), "Serious overestimation in quantitative PCR by circular (supercoiled) plasmid standard: Microalgal PCNA as the model gene", *PLoS ONE*, **5**, e9545.
- [15] Esteller M, Silva J.M, Dominguez G, Bonilla F, Matias X, Lerma E, Bussaglia E (2000), "Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors", *J Natl Cancer Inst*, **92**, 564-9.z
- [16] Guo Y, Pakneshan P, Gladu J, Slack A, Moshe Szyf M, Shafaat A. Rabbani S (2002), "Regulation of DNA methylation in human breast cancer", *J Biological Chem*, **277**, 41571-79.