

بررسی نقش miR-1226-3p در سرطان پستان

زهرا محمدزاده¹، فروزنده محجوبی²، پریسا حسین پور³، بهرام محمدسلطانی^{4*}

1. کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
2. دکتری، گروه ژنتیک پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری، تهران، ایران
3. دکتری، مرکز تحقیقات سرطان پستان، پژوهشگاه معتمد، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران
4. دکتری، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: soltanib@modares.ac.ir

تلفن: 02182884703

کد پستی: 14115-111

چکیده

سرطان پستان از مهم ترین دلایل مرگ ناشی از سرطان در زنان کل دنیا به حساب می آید و در ایران 24,4% از سرطان های بدخیم در زنان را به خود اختصاص می دهد. از چالش های مهم پیشگیری و درمان این سرطان، زیاده بودن عوامل اتیولوژیک و همچنین پیچیدگی آن می باشند. تومورزایی در سرطان پستان فرایندی چندمرحله ای است که طی آن، سلول نرمال وارد تغییرات بدخیم می شود و تا جایی پیش می رود که به تومور پیشرفته حاصل از تجمع تغییرات ژنتیک و اپی ژنتیک تبدیل شود. مطالعات زیادی بر نقش مسیرهای پیام دهی سلولی در بروز و پیشرفت سرطان پستان تاکید دارند. از جمله گزارش شده است که بیش بیان ژن EGFR و سپس تشکیل زوج EGFR/HER2 سبب فعال شدن مسیر سیگنال دهی PI3K/AKT شده و پیشرفت سرطان پستان را القا می کند.

microRNA (miRNA) ها ریز RNA های کوچک غیر کد کننده درون زادی هستند که بیان ژن را در مرحله نسخه برداری و پس از نسخه برداری تنظیم می کنند. جفت شدن ناکامل miRNA ها با نواحی 3'-UTR رونوشت ژن های هدف، منجر به سرکوب ترجمه یا تجزیه mRNA می شود. در این مطالعه با استفاده از داده های حاصل از مطالعه بیوانفورماتیک miR-1226-3p به عنوان تنظیم کننده مسیر PI3K/AKT پیش بینی شده است. پس از بیش بیان این miRNA در سلول های SKBR3 بیان کننده مسیر PI3K/AKT، مشخص شد که بیان سه ژن هدف مهم EGFR، PIK3R5 و AKT2 کاهش یافت. برای تأیید این داده و بررسی اثر این کاهش بیان بر سلول ها، بیان ژن های پایین دست PCNA، C-MYC و CCND1 بررسی شد. کاهش بیان این ژن ها نشان داد که تکثیر سلولی در این رده سلولی سرطان پستان پس از بیش بیان شدن کاهش یافته است و می توان این miRNA را به عنوان سرکوب گر تومور در نظر گرفت.

کلید واژگان: سرطان پستان، miRNA، مسیرهای پیام دهی.

مقدمه

سرطان پستان در زنان به عنوان شایع ترین سرطان تهاجمی شناخته می شود. سرطان پستان حدود 22,9% از سرطان های تهاجمی و 16% از کل سرطان های زنان را به خود اختصاص داده است [1]. در سال 2008 سرطان پستان 458503 مورد مرگ (13,7% موارد مرگ ناشی از سرطان در زنان و 60% از کل سرطان در هر دو جنس مؤنث و مذکر) را در پی داشته است. بروز سرطان پستان در نقاط مختلف جهان متفاوت است و در کشورهای پیشرفته نسبت به کشورهای در حال توسعه شیوع بیشتری دارد [2]. از سال 1970 تعداد موارد ابتلا به سرطان در جهان بسیار افزایش یافته است که این پدیده را می توان با مدرن شدن شیوه زندگی مرتبط دانست [3, 4]. عامل سن در بروز سرطان پستان بسیار مهم است. فقط 5% این نوع از سرطان در سنین زیر 40 سال رخ می دهد [5]. در ایران نیز سرطان پستان در حال افزایش است و تشخیص بیماری در مراحل بالاتری اتفاق می افتد. زنان مبتلا در ایران، نسبت به زنان غربی 10 سال جوان تر هستند [6].

خانواده گیرنده های تیروزین کینازی ErbB چهار عضو مهم روی سطح سلول دارد که می توانند آغازگر آبشاری پیام های سلولی باشند. EGFR به عنوان یکی از اعضای مهم این خانواده چهار عضوی از گلیکوپروتئین ها، در سرطان های بسیاری چون سرطان پستان دخیل است [7]. در سلول های سرطانی، مکانیسم های مختلفی مانند افزایش بیان ژن، جهش های فعال کننده به ویژه در ناحیه پروموتور ژن و افزایش تعداد کپی های ژنی EGFR موجب شکل گیری و پیشروی سرطان می شود [8]. تمایل جفت شدن این گیرنده با عضو مهم و شناخته شده خانواده یعنی Her2 می تواند به فعال شدن مسیر پیام دهی PI3K/AKT منجر شود. پروتئین های PI3K و AKT درگیر در این مسیر در شکل گیری و پیشرفت سرطان پستان نقش مهمی دارند [9].

miRNA ها در بسیاری از فرایندهای کلیدی

بیولوژی از جمله رشد سلول، تمایز بافتی، تکثیر سلولی، نمو جنینی و آپوپتوز نقش های کلیدی و مهمی دارند [10]. از این رو، جهش در miRNA ها، نقص در عملکرد، سنتز و تنظیم بیان آنها و ژن های هدفشان در بسیاری از بیماری ها دخیل اند [11].

با توجه به اینکه هدف یا اهداف miRNA در سلول می تواند ژن سرکوب کننده تومور (ها) باشد، در سلول های سرطانی دیده شده است که این دسته از miRNA ها دچار افزایش بیان می شوند. در نتیجه، سرکوب کننده های تومور در این سلول ها کاهش پیدا می کنند که این امر می تواند یکی از دلایل توموری شدن این سلول ها هم باشد؛ این miRNA ها را OncomiR می نامند [12]. در مقابل، miRNA هایی هستند که پروتئین کوژن ها را هدف قرار می دهند و در سلول های سرطانی دچار کاهش یا حذف می شوند، و به این ترتیب به افزایش بیان پروتئین کوژن ها در سلول ها منجر می شوند.

در این پژوهش با توجه به پیش بینی بیوانفورماتیک، ژن های EGFR, PIK3R5 و AKT2 به عنوان اهداف miR-1226-3p در نظر گرفته و در مرحله تجربی با پیش بیان کردن و بررسی میزان بیان ژن های هدف در سلول های SKBR3 (که مسیر PI3K/AKT را بیش بیان می کند) این فرضیه بررسی شده است.

مواد و روش ها

مطالعات بیوانفورماتیک

برای بررسی اهداف miR-1226-3p از پایگاه اطلاعاتی Mirwalk و سایر الگوریتم های موجود در این پایگاه اطلاعاتی استفاده شده است.

طراحی پرایمر

به منظور طراحی پرایمرهای تکثیر کننده ناحیه پیش ساز miR-1226 از نرم افزارهای Gene Runner و پایگاه

داده‌های OligoAnalyzer و برای بررسی بیان ژن‌های هدف EGFR, PIK3R5 و AKT2 از پرایمرهای ارائه‌شده در لیست 1 استفاده شده است.

کلونینگ پیش‌ساز miR-1226

به‌منظور بررسی کلون‌سازی و بیش‌بیان miR-1226-3p و با استفاده از این پرایمرهای طراحی‌شده و DNA ژنومی به‌عنوان الگو، قطعه مورد نظر تکثیر شد. سپس، این قطعه در ناقل TA کلون و پس از هضم آنزیمی در ناقل بیانی کلون شد. پس از آن، قطعه پیش‌ساز به کمک آنزیم‌های محدودگر KpnI و HindIII در وکتور بیانی pmCherry کلون شد. کلون‌شدن قطعات در هر وکتور با انتخاب کلنی‌های رشد کرد و انجام PCR روی آنها تأیید شد.

ترانسفکشن miR-1226 در رده سلولی SKBR3

به‌منظور ترانسفکشن کردن miR-1226-3p، دو میکروگرم از وکتور pmCherry حاوی توالی پیش‌ساز miR-1226 برای ترانسفکشن رده سلولی SKBR3 در هر چاهک پلیت 12 خانه استفاده شد. عمل ترانسفکشن با استفاده از محلول لیپوفکتامین 2000 انجام گرفت و در هر چاهک حدود 120000 سلول وجود داشت. همچنین سازه خالی از کاست بیش‌بیانی نیز به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. بازدهی ترانسفکشن با ردیابی بیان پروتئین فلورسنت قرمز (که به‌عنوان ژن گزارشگر استفاده شده بود) تعیین شد.

استخراج RNA تام سلولی و سنتز cDNA

48 ساعت پس از ترانسفکشن کردن، سلول‌ها به‌وسیله Riboex لیز و RNA تام سلولی استخراج شد. برای تأیید کیفیت RNA استخراج‌شده، RNA در ژل آگارز 2% الکتروفورز و کمیت RNA استخراج‌شده با دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد. 1 میکروگرم از RNA تیمار شده با آنزیم DNase I، به همراه 1 میکرولیتر آنزیم Reverse Transcriptase، 1 میکرولیتر پرایمر oligodt (و آنزیم polymerase Poly A برای سنتز cDNA اختصاصی miRNA) به مدت 72 دقیقه در دمای 42°C دمادهی شد.

برای تأیید کیفیت cDNA سنتز شده از پرایمر ژن‌های کنترل داخلی U48 و GAPDH استفاده شد.

واکنش Real time PCR

برای انجام واکنش Real-Time PCR برنامه آن از قبل طراحی و به دستگاه داده شد. این واکنش در پلیت‌ها و استریپ‌های ABI صورت گرفت. برای آماده‌کردن مواد واکنش، ابتدا مخلوط اصلی (master mix) از آغازگرها، آب و SYBR Green در چاهک‌ها توزیع شد. آنگاه به هر چاهک cDNA خاص آن چاهک اضافه و برای هر نمونه دو تکرار در نظر گرفته شد. برای هر مخلوط آغازگر یک واکنش کنترل منفی (NTC)، و برای هر cDNA یک واکنش noRT نیز طراحی و انجام شد.

در اغلب واکنش‌های Real-Time PCR در این پروژه از برنامه دمایی و زمانی زیر استفاده شد:

مرحله واسرشتگی و فعال‌کردن پلیمراز برای SYBR Green، 5 دقیقه، سپس 40 سیکل با شرایط واسرشتگی در 95°C، 30 ثانیه، اتصال آغازگرها در 61°C، 20 ثانیه، و پلیمرازی در 72°C، 30 ثانیه بود.

آنالیز آماری

میزان بیان به‌دست‌آمده از بررسی بیان ژن‌های تحت مطالعه از طریق آزمون t-test در GraphPad Prism 6.07 آنالیز آماری شد. سطح معنی‌داری تفاوت‌ها، 0,05 تعریف شد.

نتایج

آنالیز بیوانفورماتیک

به‌منظور بررسی بیوانفورماتیکی میزان حفاظت‌شدگی MRE اختصاصی miR-1226-3p با به‌کارگیری پایگاه اطلاعاتی UCSC Genome Browser و همچنین برای بررسی اهداف ژنی احتمالی miR-1226-3p، دیتابیس miRWalk همراه تمامی الگوریتم‌های آن استفاده شد.

کاهش بیان ژن‌های هدف

در مرحله بعد برای تأیید تأثیر مهارى miR-1226-3p بر بیان ژن‌های هدف، بیان این ژن‌ها در سلول‌های ترنسفکت شده با وکتور بیانی miR-1226 با سلول‌های ترنسفکت شده با وکتور کنترل Mock مقایسه شد. در نهایت، کاهش بیان تقریباً دوبرابری ژن‌های PIK3R5، EGFR و AKT2 در سلول‌هایی که miR-1226-3p را بیش بیان می‌کردند، تأیید شد (شکل 5).

کاهش بیان ژن‌های پایین دست AKT2

داده‌های حاصل از Real time PCR نشان داد که کاهش بیان معنادار پروتئین AKT2 به دنبال بیش بیان miR-1226-3p در سلول‌های SKBR3 به تنظیم منفی بیان ژن‌های پایین دست C-MYC، PCNA و CCND1 منجر شده است.

بحث

سرطان پستان شایع‌ترین بیماری تهاجمی و دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در میان زنان به شمار می‌آید. سرطان پستان مانند سرطان‌های دیگر به دلیل برهم‌کنش میان محیط و ژن دچار نقص ایجاد می‌شود [13]. معمولاً بیشترین جهش‌های ژنی در ژن‌های کدکننده پروتئین‌های گیرنده تیروزین کینازی رخ می‌دهد. EGFR به عنوان یکی از مهم‌ترین گیرنده‌های تیروزین کینازی در سطح سلول پس از برقراری میان‌کنش با لیگاند‌هایی چون فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)، فاکتور رشد تغییر شکل دهنده α (TGF α)، فاکتور رشد اپیدرمی متصل شونده به هپارین (Heparin-binding EGF)، آمفی رگولین (Amphiregulin) و اپی رگولین (Epiregulin)، فعال می‌شود و با تشکیل همودایمر یا هتروداایمر با اعضای دیگر خانواده به‌ویژه Her2 مسیر پیام‌دهی PI3K/AKT را فعال می‌کند. در نهایت، فعال شدن این مسیر فاکتورهای رونویسی را به کار می‌گیرد که به بیان ژن‌های مسئول تکثیر سلولی و

همان‌طور که در جدول زیر آورده شده است، درمجموع شش الگوریتم، EGFR و پنج الگوریتم، PIK3R5 و AKT2 را به عنوان اهداف ژنی احتمالی این microRNA معرفی می‌کنند (شکل 1).

تأیید کلون‌شدن قطعه حاوی پیش ساز miR-1226 در وکتور بیانی pmCherry

نتایج کلنی PCR نشان می‌دهد که قطعه حاوی پیش ساز miR-1226 به طور معکوس در TA Vector کلون شده است. برای اصلاح جهت گیری قطعه مورد نظر، این قطعه با دو آنزیم محدودگر KpnI و HindIII هضم و با توجه به عکس بودن جایگاه این دو آنزیم در وکتور بیانی pmCherry نسبت به جایگاه آنها در TA Vector، قطعه حاوی پیش ساز در جهت درست در این وکتور کلون شد (شکل 2).

ترنسفکت موفق سلول‌های SKBR3 با وکتور miR-1226 و استخراج RNA و سنتز cDNA

عکس‌های گرفته شده از سلول‌های ترنسفکت شده با وکتور بیش بیان کننده miR-1226 نشان داد که بیش از 60% سلول‌ها با موفقیت ترنسفکت شدند و پروتئین RFP در آنها بیان شده است. 48 ساعت پس از ترنسفکت کردن سلول‌ها RNA تام سلولی استخراج شد (شکل 3 الف). الکتروفورز RNA در ژل آگارز 2% بیانگر کیفیت مطلوب این RNA بود (شکل 3 ب). همچنین، ژن‌های کنترل داخلی U48 و GAPDH کیفیت cDNA سنتز شده از این RNA را تأیید کرد (شکل 3 ج).

بیش بیان موفق miR-1226-3p در سلول‌های SKBR3 نتایج Real time PCR مؤید بیش بیان 50 برابری miR-1226-3p در سلول‌های ترنسفکت شده با وکتور بیانی حاوی قطعه پیش ساز این miRNA نسبت به سلول‌های ترنسفکت شده با وکتور کنترل Mock بود (شکل 4).

ممانعت از آپوپتوز منجر می‌شود. مطالعات متعددی نشان داده است که ژن‌های PIK3R5 و AKT2 عملکردهای مهمی در این مسیر پیام‌دهی دارند؛ به‌گونه‌ای که نقش بیش‌باین این ژن‌ها در پیشرفت سرطان پستان گزارش شده است [14, 15].

مطالعات آزمایشگاهی نشان می‌دهند که miRNA ها از اصلی‌ترین تنظیم‌کنندگان مسیر پیام‌دهی PI3K/AKT هستند [16].

در سال 2010 Kufe و همکاران نشان دادند که miR-1226 با هدف قراردادن ژن MUCIN1، ژن درگیر در جلوگیری از آپوپتوز و نکروز، از پیشروی سرطان پستان جلوگیری می‌کند [17]. Gou و همکاران نیز در سال 2018 در مطالعه‌ای به این نتیجه رسیدند که miR-539 در نمونه‌های توموری سرطان پستان بیان کمتری نسبت به بافت نرمال حاشیه آن دارد. همچنین، ثابت کردند این microRNA با هدف‌گیری مستقیم ژن EGFR می‌تواند مانع از پیشروی سرطان پستان شود [18]. مطالعه Liu و همکاران در سال 2017 نشان داد، تنظیم AKT2 توسط miR-200c بود [20]. بررسی‌های بیوانفورماتیک ژن‌های EGFR، PIK3R5 و AKT2 را به‌عنوان اهداف بالقوه miR-1226-3p معرفی کرد. با توجه به اینکه فعالیت مسیر PI3K/AKT در سلول‌های SKBR3 از رده‌های سلولی دیگر بالاتر بود، سازه حاوی پیش‌ساز miR-1226 به داخل این سلول‌ها ترنسفکت شد. نتایج Real time PCR نشان داد که miR-1226-3p به‌عنوان miRNA بالغ از پردازش پیش‌ساز miR-1226 حاصل می‌شود. بیان رونوشت ژن‌های EGFR، PIK3R5 و AKT2 در سلول‌هایی که با وکتور pmCherry حاوی پیش‌ساز miR-1226 ترنسفکت شده بودند، به‌طور معناداری نسبت به بیان رونوشت آن در سلول‌های ترنسفکت‌شده با وکتور کنترل Mock کاهش یافته بود. این امر تأییدکننده پیش‌بینی بیوانفورماتیک (مبنی بر اینکه این سه ژن احتمالاً اهداف

مستقیم miR-1226-3p هستند) نیز است. پروتئین AKT2 با فسفریله‌کردن سوبستراهای متعددی در پیشرفت چرخه سلول سرطانی نقش دارد. انتظار می‌رود که با کاهش بیان این پروتئین تا حدی از پیشروی چرخه سلولی ممانعت شود. این ممانعت از پیشروی با بررسی بیان تعدادی از ژن‌های دخیل در ادامه چرخه سلولی تأیید شد. به‌گونه‌ای که پس از ترنسفکشن سلول‌ها با پیش‌ساز miR-1226 کاهش بیان رونوشت ژن PCNA مشاهده شد. پروتئین PCNA در سلول‌های یوکاریوتی در عمل به‌عنوان یک پردازش‌گر عامل برای DNA POL دلتا به حساب می‌آید. درواقع، PCNA باعث افزایش سرعت عمل DNA POL دلتا می‌شود [21]. Buchard و همکاران در مطالعه‌ای نقش غیرمستقیم مسیر PI3K/AKT را روی فعالیت C-MYC اثبات کردند. AKT با فسفریله‌کردن فاکتور رونویسی FoxO از عملکرد ممانعتی آن بر ژن هدف C-MYC می‌کاهد و بدین طریق مسیر را برای ترنسفورم شدن با میانجی‌گری C-MYC هموار می‌کند [22]. در این مطالعه کاهش بیان موفق C-MYC به‌دلیل تنظیم منفی miR-1226-3p بر بیان AKT2 مشهود بود. در اثر کاهش فعالیت مسیر PI3K/AKT بیان ژن CYCLIN D1 نیز کاهش یافت. محصول پروتئینی این ژن با همکاری Cyclin Dependent Kinases های چرخه سلولی باعث ورود سلول‌ها از فاز G1 به S می‌شود. پروتئین cyclin D1 یکی از اهداف مستقیم مسیر PI3K/AKT به حساب می‌آید. فسفریله‌شدن پروتئین Cyclin D1 توسط GSK-3 باعث یوبیکوئیتینه و تجزیه Cyclin D1 می‌شود، اما AKT با فسفریله و غیرفعال کردن GSK-3 مانع تجزیه Cyclin D1 می‌شود. در این مطالعه کاهش فعالیت مسیر PI3K/AKT به دنبال بیش‌باین miR-1226-3p به کاهش بیان معنی‌دار در ژن CCND1 منجر شد که این اتفاق ممکن است به دلیل ناتوانی AKT1 در فسفریله و غیرفعال کردن GSK-3 باشد [23].

از روی DNA ژنومی در TA Vector الحاق شد. سپس این قطعه از این وکتور خارج و در وکتور بیانی pmCherry کلون شد.

شکل (3)

الف - تصویر میکروسکوپ نوری و فلورسنت گرفته شده از سلول های ترنسفکت شده با وکتور pmCherry حاوی پیش ساز miR-1226 و وکتور کنترل Mock با بزرگنمایی 40.

ب - عکس ژل الکتروفورز RNA استخراج شده از سلول های ترنسفکت شده با وکتور pmCherry حاوی پیش ساز miR-1226 و وکتور کنترل Mock (لدر 100bp).
ج - عکس ژل الکتروفورز cDNA سنتز شده از RNA استخراج شده از سلول های ترنسفکت شده با وکتور pmCherry حاوی پیش ساز miR-1226 و وکتور کنترل Mock (لدر 100bp).

شکل 4.

الف - نمودار بیش بیان miR-1226-3p نسبت به کنترل Mock نشانگر بیش بیان تقریباً 50 برابری این miRNA بود.

ب - نمودار بیان ژن های EGFR, PIK3R5 و AKT2 به دنبال بیش بیان miR-1226-3p در سلول های SKBR3 کاهش بیان معناداری در ژن های هدف EGFR, PIK3R5 و AKT2 مشاهده شد.

شکل 5.

نمودار تغییرات بیان ژن های پایین دست AKT2, CCND1 و C-MYC که به عنوان سوپستراهای مستقیم AKT به حساب می آیند و همچنین PCNA به عنوان شاخصی برای تکثیر سلول ها، کاهش بیان معناداری را در سلول های SKBR3 به دنبال بیش بیان miR-1226-3p نشان دادند.

درمجموع، در این پژوهش نشان داده شد که می توان miR-1226-3p را به عنوان سرکوبگر تومور بالقوه معرفی کرد؛ چراکه این miRNA می تواند با هدف قراردادن ژن های مهم مسیر PI3K/AKT، به میزان زیادی مانع از پیشرفت سرطان پستان شود.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از پژوهشکده سرطان پستان معتمد بابت حمایت هایشان تشکر و قدردانی می کنند.

تأییدیه اخلاقی: نویسندگان موردی را ذکر نکرده اند.
تعارض منافع: هیچگونه تعارض منافی وجود ندارد.
سهام نویسندگان: زهرا محمدزاده (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش شناس/نگارنده بحث (50%)؛ فروزنده محجوبی و پریسا حسین پور (نویسنده دوم و سوم)، تأمین مواد مورد نیاز آزمایش ها، هر کدام (10%) بهرام محمدسلطانی (نویسنده چهارم)، نگارنده مقدمه/روش شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (30%)؛

منابع مالی: این مطالعه با پشتیبانی مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور انجام شده است.

زیر نویس شکل ها

شکل (1)

الف - 3'UTR ژن های EGFR, PIK3R5 و AKT2 و میزان حفاظت شدگی MRE اختصاصی miR-1226-3p را روی آن ها را به طور شماتیک نشان می دهد.
ب - جدول پایگاه اطلاعاتی miRWalk که نشان دهنده الگوریتم هایی است که ژن های EGFR, PIK3R5 و AKT2 را به عنوان هدف miR-1226-3p تأیید می کنند.

شکل (2)

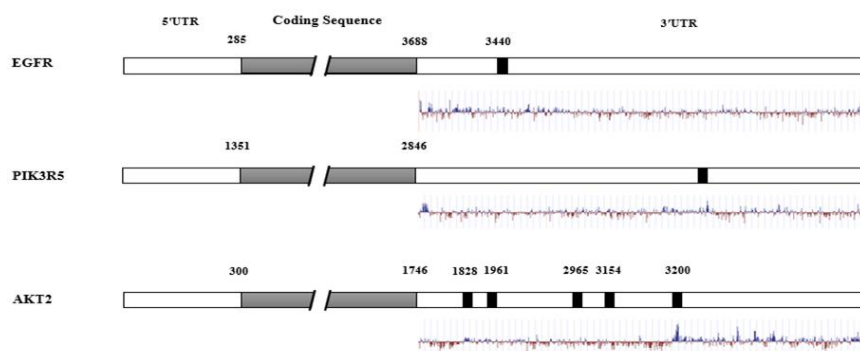
تأیید کلون شدن پیش ساز miR-1226 در وکتور بیانی. در این راستا ابتدا قطعه پیش ساز miR-1226 پس از تکثیر

جدول 1. جدول پرایمرهای به کار گرفته شده برای کلون سازی و بیان ژن.

Primer name	Primer sequence, 5' to 3'
<i>U48</i>	TGACCCCAGGTAAGTCTGAGTGTGT
<i>Universal</i>	AACTCAAGGTTCTTCCAGTCACG
<i>GAPDH</i>	Forward: GCCACATCGCTCAGACAC Reverse: GGCAACAATATCCACTTTACCAG
<i>has-miR-1226</i> cloning	Forward: CATCCTGCTGCACAAGTCGACC Reverse: GCCATCGGCTCCGTAACCG
<i>has-miR-1226-3p</i> Real time	Forward: TCACCAGCCCTGTGTTCCCTAG
<i>EGFR</i> Real time	Forward: CCCACTCATGCTCTACAACCC Reverse: TCGCACTTCTTACACTTGCGG
<i>AKT2</i> Real time	Forward: AAGAAGCTCCTGCCACCCTT Reverse: CAGTAAGCCCAGGCTGTCATAG
<i>PIK3R5</i> Real time	Forward: CCCCTGGTATGAGCGCAATG Reverse: CGGCAGTAGTAGAGTAGCATGT
<i>PCNA</i> Real time	Forward: AACTAAGGGCCGAAGATAACG Reverse: ACAGCATCTCCAATATGGCTGA
<i>CCND1</i> Real time	Forward: CAATGACCCCGCACGATTTC Reverse: CATGGAGGGCGGATTGGAA
<i>C-MYC</i> Real time	Forward: CTCCTACGTTGCGGTCACAC Reverse: CGGGTCGCAGATGAAACTCT

1.

(الف)

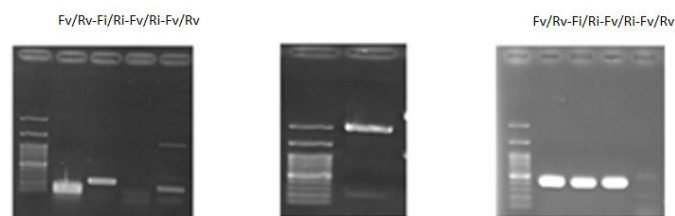


(ب)

miRNA	Gene	RefseqID	miRWalk	MicroT	miRanda	mirbridge	miRDB	miRMap	miRNAmap	Pictar2	PITA	RNA22	RNAhybrid	Targetscan	SUM
hsa-miR-1226-3p	EGFR	XM_005271746	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	6
hsa-miR-1226-3p	PIK3R5	NM_001251851	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	5
hsa-miR-1226-3p	AKT2	XM_005258645	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	5

2.

Fv پرایمر فوروارد وکتور
Rv پرایمر ریورس وکتور
Fi پرایمر فوروارد قطعه
Ri پرایمر ریورس قطعه



قطعه پیش ساز *miR-1226* که به
TA Vector صورت برعکس در
کلون شده است

هضم وکتور با آنزیم های
محدودکننده KpnI و HindIII جهت
قرارگیری این دو آنزیم در دو
وکتور برعکس هم می باشد.

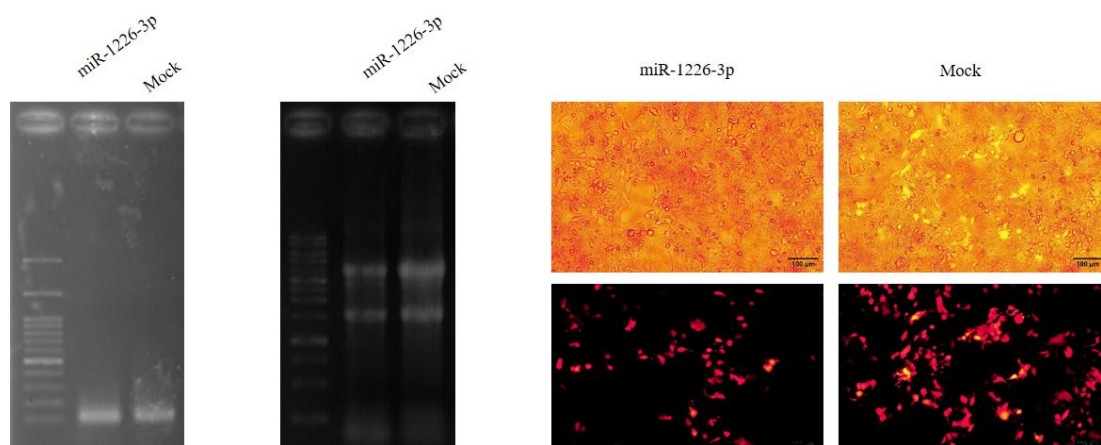
تایید کلون شدن قطعه پیش ساز
miR-1226 در وکتور بیباتی
pmCherry

3.

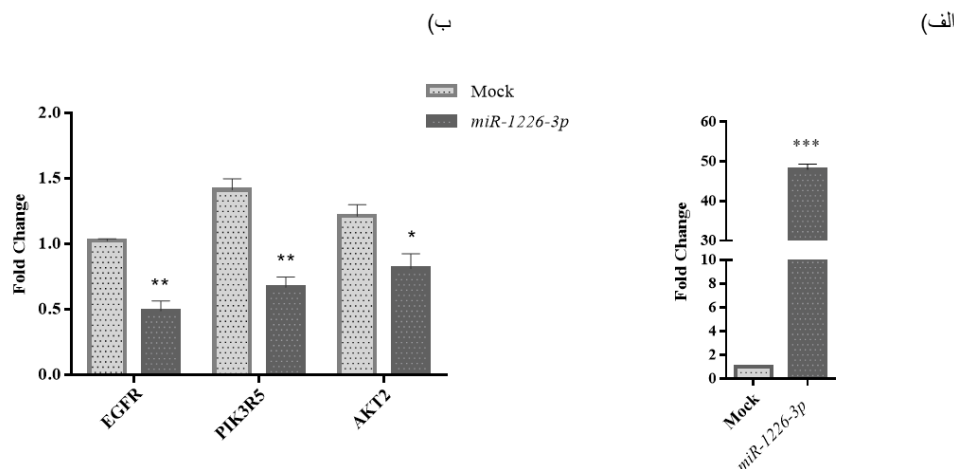
(الف)

(ب)

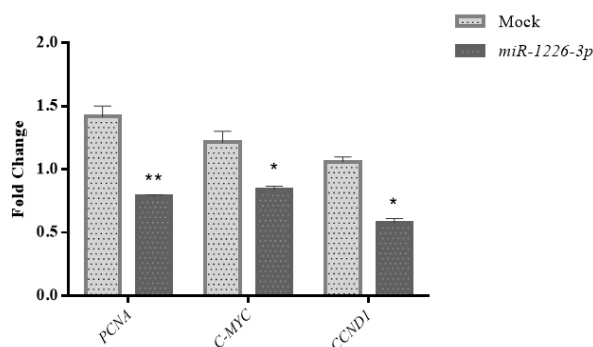
(ج)



4.



5.



5. Ronckers, C.M., C.A. Erdmann, and C.E. Land, *Radiation and breast cancer: a review of current evidence*. Breast Cancer Research, 2004. 7(1): p. 21.

6. Ingvarsson, S., *Molecular genetics of breast cancer*. International Journal of Human Genetics, 2003. 3(2): p. 69-78.

7. Baselga, J. and S.M. Swain, *Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB 3*. Nature Reviews Cancer, 2009. 9(7): p. 463.

8. Pal, S.K. and J. Mortimer, *Triple-negative breast cancer: novel therapies and new directions*. Maturitas, 2009. 63(4): p. 269-274.

9. Carey, L., et al., *TBCRC 001: EGFR inhibition with cetuximab added to carboplatin in metastatic triple-negative (basal-like) breast*

منابع

1. Sellers, T.A., *Genetic factors in the pathogenesis of breast cancer: their role and relative importance*. The Journal of nutrition, 1997. 127(5): p. 929S-932S.

2. Kolstad, H.A., *Nightshift work and risk of breast cancer and other cancers—a critical review of the epidemiologic evidence*. Scandinavian journal of work, environment & health, 2008: p. 5-22.

3. Davies, L. and H.G. Welch, *Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002*. Jama, 2006. 295(18): p. 2164-2167.

4. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. 100(7): p. 3983-3988.

growth factor receptor in breast cancer. Scientific reports, 2018. **8**(1): p. 2073.

19. Jiang, X., et al., *Phosphoinositide 3-kinase pathway activation in phosphate and tensin homolog (PTEN)-deficient prostate cancer cells is independent of receptor tyrosine kinases and mediated by the p110 β and p110 δ catalytic subunits*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(20): p. 14980-14989.

20. Liu, Y., et al., *MiR-200c regulates tumor growth and chemosensitivity to cisplatin in osteosarcoma by targeting AKT2*. Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 13598.

21. Olaisen, C., et al., *PCNA-interacting peptides reduce Akt phosphorylation and TLR-mediated cytokine secretion suggesting a role of PCNA in cellular signaling*. Cellular signalling, 2015. **27**(7): p. 1478-1487.

22. Swords, R.T., et al. *Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR Pathway Leads to Down-Regulation of c-Myc and Overcomes Resistance to ATRA in Acute Myeloid Leukemia*. in Blood. 2015. AMER SOC HEMATOLOGY 2021 L ST NW, SUITE 900, WASHINGTON, DC 20036 USA.

23. Shimura, T., et al., *Activation of the AKT/cyclin D1/Cdk4 survival signaling pathway in radioresistant cancer stem cells*. Oncogenesis, 2012. **1**(6): p. e12.

cancer. Journal of Clinical Oncology, 2008. **26**(15_suppl): p. 1009-1009.

10. Cai, Y., et al., *A brief review on the mechanisms of miRNA regulation*. Genomics, proteomics & bioinformatics, 2009. **7**:(4)p. 147-154.

11. Farazi, T.A., et al., *miRNAs in human cancer*. The Journal of pathology, 2011. **223**(2): p. 102-115.

12. Manikandan, J., et al., *Oncomirs: the potential role of non-coding microRNAs in understanding cancer*. Bioinformation, 2008. **2**(8): p. 330,

13. Tao, Z., et al., *Breast cancer: epidemiology and etiology*. Cell biochemistry and biophysics, 2015. **72**(2): p. 333-338.

14. Roskoski Jr, R., *The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer*. Pharmacological research, 2014. **79**: p. 34-74.

15. Lemmon, M.A. and J. Schlessinger, *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2010. **14**:(7)1p. 1117-1134.

16. Iorio, M.V., et al., *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer*. Cancer research, 2005. **65**(16): p. 7065-7070.

17. Jin, C., H. Rajabi, and D. Kufe, *miR-1226 targets expression of the mucin 1 oncoprotein and induces cell death*. International journal of oncology, 2010. **37**(1): p. 61-69.

18. Guo, J., G. Gong, and B. Zhang, *miR-539 acts as a tumor suppressor by targeting epidermal*

The effect of miR-1226-3p on breast cancer

Zahra Mohammadzadeh¹, Forouzandeh Mahjoobi², Parisa Hosseinpour³, Bahram Mohammad Soltani⁴

1. Genetics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. PhD Clinical Genetics Department, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.
3. Motamed Institute, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran
4. Genetics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Abstract:

Breast cancer is the leading cause of cancer-related mortality among women worldwide. In Iran, breast cancer ranks first among cancers diagnosed in women comprising 24.4% of all malignancies. Currently, the large number of etiological factors and the complexity of breast cancer present challenge for prevention and treatment. Breast cancer tumorigenesis can be described as a multi-step process in which a normal cell undergoes malignant transformation to a fully developed tumor through accumulations of genetic and epigenetic changes. On the other hand, several studies indicated the signaling pathways role in Breast cancer. EGFR gene has been shown to be overexpressed in breast cancer. Dimerization of EGFR/HER2 induces breast cancer progression via activation of PI3K/AKT signaling cascade.

MicroRNAs are endogenous, small non-coding RNAs that regulate gene expression at the transcriptional and posttranscriptional level. MicroRNAs pair with partially complementary sites in the 3'untranslated regions (UTRs) of target mRNAs, leading to translational repression and/or mRNA degradation. In present study we applied bioinformatics data to predict miR-1226-3p as the regulator of PI3K/AKT pathway. Then significant down regulation of three target genes EGFR, PIK3R5 and AKT2 was observed post transfection of miR-1226-3p. To validate the effect of this down regulation on cells, expression of downstream genes PCNA, C-MYC and CCND1 was evaluated. Down regulation of these genes demonstrated that cell proliferation in this breast cancer cell line was inhibited and this miRNA could be considered as a tumor suppressor.