زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس

بررسی نقش miR-1226-3p در سرطان پستان

زهرا محمدزاده،[1] فروزنده محجوبی،[2] پریسا حسین‌پور،[3] 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 فن‌آوری، تهران، ایران
3. دکتری، مرکز تحقیقات سرطان پستان، پژوهشکده معتمد، جهاددانشگاهی، 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 مهم‌ترین دلایل مرگ ناشی از سرطان در زنان کل دنیا به حساب می‌آید و در ایران 24,4% از سرطان‌های بدخیم در زنان را به خود اختصاص می‌دهد. از چالش‌های مهم پیشگیری و درمان این سرطان، زیادبودن عوامل اتیولوژیک و همچنین پیچیدگی آن می باشند. تومورزایی در سرطان پستان فرایندی چندمرحله‌ای است که طی آن، سلول نرمال وارد تغییرات بدخیم می‌شود و تا جایی پیش می‌رود که به تومور پیشرفته حاصل از تجمع تغییرات ژنتیک و اپی ژنتیک تبدیل شود. مطالعات زیادی بر نقش مسیرهای پیام‌دهی سلولی در بروز و پیشرفت سرطان پستان تاکید دارند. از جمله گزارش شده است که بیش‌بیان ژن EGFR و سپس تشکیل زوج EGFR/HER2 سبب فعال شدن مسیر سیگنال‌دهی PI3K/AKT شده و پیشرفت سرطان پستان را القا می‌کند.

microRNA (miRNA) ها ریز RNAهای کوچک غیر کد کننده درون‌زادی هستند که بیان ژن را در مرحله نسخه‌برداری و پس از نسخه‌برداری تنظیم می‌کنند. جفت‌شدن ناکامل miRNA ها با نواحی 3'-UTR رونوشت ژن‌های هدف، منجر به سرکوب ترجمه یا تجزیه mRNA می‌شود. در این مطالعه با استفاده از داده‌های حاصل از مطالعه بیوانفورماتیک miR-1226-3p به‌عنوان تنظیم‌کننده مسیر PI3K/AKT پیش‌بینی شده است. پس از بیش‌بیان این miRNA در سلول‌های SKBR3 بیان‌کننده 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 سلول‌ها، بیان ژن‌های پایین‌دست PCNA, C-MYC و CCND1 بررسی شد. کاهش بیان این ژن‌ها نشان داد که تکثیر سلولی در این رده سلولی سرطان پستان پس از بیش‌بیان‌شدن کاهش یافته است و می‌توان این miRNA را به‌عنوان سرکوب‌گر تومور در نظر گرفت.

کلید واژگان: سرطان پستان، miRNA، مسیرهای پیام‌دهی.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-03]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.4.1.3]

مقدمه

سرطان پستان در زنان به‌عنوان شایع‌ترین سرطان تهاجمی شناخته می‌شود. سرطان پستان حدود 22,9% از سرطان‌های تهاجمی و 16% از کل سرطان‌های 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 درپی 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 می‌توان با مدرن‌شدن 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 می‌دهد [5]. در ایران نیز سرطان پستان در حال افزایش است و تشخیص بیماری در مراحل بالاتری اتفاق می‌افتد. زنان مبتلا در ایران، نسبت به زنان غربی 10 سال جوان‌تر هستند [6].

خانواده گیرنده‌های تیروزین کینازی ErbB چهار عضو مهم روی سطح سلول دارد که می‌توانند آغازگر آبشاری پیام‌های سلولی باشند. EGFR به‌عنوان یکی از اعضای مهم این خانواده چهار عضوی از گلیکوپروتئین‌ها، در سرطان‌های بسیاری چون سرطان پستان دخیل است [7]. در سلول‌های سرطانی، مکانیسم‌های مختلفی مانند افزایش بیان ژن، جهش‌های فعال‌کننده به‌ویژه در ناحیه پروموتر ژن و افزایش تعداد کپی‌های ژنی EGFR موجب شکل‌گیری و پیشروی سرطان می‌شود [8]. تمایل جفت‌شدن این گیرنده با عضو مهم و شناخته‌شده خانواده یعنی Her2 می‌تواند به فعال‌شدن مسیر پیام‌دهی PI3K/AKT منجر شود. پروتئین‌های PI3K و AKTدرگیر در این مسیر در شکل‌گیری و پیشرفت سرطان پستان نقش مهمی دارند [9].

miRNA ها در بسیاری از فرایندهای کلیدی بیولوژی ازجمله رشد سلول، تمایز بافتی، تکثیر سلولی، نمو جنینی و آپوپتوز نقش‌های کلیدی و مهمی دارند [10]. ازاین‌رو، جهش در miRNA ها، نقص در عملکرد، سنتز و تنظیم بیان آنها و ژن‌های هدفشان در بسیاری از بیماری‌ها دخیل‌اند [11].

با توجه به اینکه هدف یا اهداف miRNA در سلول می‌تواند ژن سرکوب‌کننده تومور(ها) باشد، در سلول‌های سرطانی دیده شده است که این دسته از miRNA ها دچار افزایش بیان می‌شوند. درنتیجه، سرکوب‌کننده‌های تومور در این سلول‌ها کاهش پیدا می‌کنند که این امر می‌تواند یکی از دلایل توموری‌شدن این سلول‌ها هم باشد؛ این miRNA ها را OncomiR می‌نامند [12]. درمقابل، miRNA هایی هستند که پروتوانکوژن‌ها را هدف قرار می‌دهند و در سلول‌های سرطانی دچار کاهش یا حذف می‌شوند، و به‌این‌ترتیب به افزایش بیان پروتوانکوژن‌ها در سلول‌ها منجر می‌شوند.

در این پژوهش با توجه به پیش‌بینی بیوانفورماتیک، ژن‌های EGFR,PIK3R5 و AKT2 به‌عنوان اهداف miR-1226-3p در نظر گرفته و در مرحله تجربی با پیش‌بیان‌کردن و بررسی میزان بیان ژن‌های هدف در سلول‌های SKBR3 (که مسیر PI3K/AKT را پیش‌بیان می‌کند) این فرضیه بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

مطالعات بیوانفورماتیک

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

طراحی پرایمر

به‌منظور طراحی پرایمرهای تکثیرکننده ناحیه پیش‌ساز miR-1226 از نرم‌افزارهای Gene Runner و پایگاه

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-03]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.4.1.3]

داده‌های OligoAnalyzer و برای بررسی بیان ژن‌های هدف EGFR,PIK3R5 وAKT2 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.

ترنسفکت miR-1226 در رده سلولی SKBR3

به‌منظور ترانسفکت‌کردن 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 ترنسفکت‌کردن، 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. 1مایکروگرم از RNA تیمارشده با آنزیم DNase I، به همراه 1 مایکرولیتر آنزیم Reverse Transcriptase ، 1 مایکرولیتر پرایمر oligodt (و آنزیم Poly A polymerase برای سنتز cDNA اختصاصی miRNA) به مدت 72 دقیقه در دمای 42°c دمادهی شد. برای تأیید کیفیت cDNA سنتزشده 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 در72° 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.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-03]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.4.1.3]

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

تأیید کلون‌شدن قطعه حاوی پیش‌ساز miR-1226 در وکتور بیانی pmCherry

نتایج کلنی PCR نشان می‌دهد که قطعه حاوی پیش‌ساز miR-1226 به‌طور معکوس در TA Vector کلون شده است. برای اصلاح جهت‌گیری قطعه مورد نظر، این قطعه با دو آنزیم محدودگر KpnI و HindIII هضم و با توجه به عکس‌بودن جایگاه این دو آنزیم در وکتور بیانی pmCherry نسبت به جایگاه آنها در TA Vector ، قطعه حاوی پیش‌ساز 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 گرفته‌شده از سلول‌های ترنسفکت‌شده با وکتوربیش بیان‌کننده 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 ترنسفکت‌کردن 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 سنتزشده از این RNA را تأیید کرد (شکل 3 ج).

بیش‌بیان موفق miR-1226-3p در سلول‌های SKBR3

نتایج Real time PCR مؤید بیش‌بیان 50برابری miR-1226-3p در سلول‌های ترنسفکت‌شده با وکتور بیانی حاوی قطعه پیش‌ساز این miRNA نسبت به سلول‌های ترنسفکت‌شده با وکتور کنترل Mock بود (شکل 4).

کاهش بیان ژن‌های هدف

در مرحله بعد برای تأیید تأثیر مهاری miR-1226-3p بر بیان ژن‌های هدف، بیان این ژن‌ها در سلول‌های ترنسفکت‌شده با وکتور بیانی miR-1226 با سلول‌های ترنسفکت‌شده با وکتور کنترل Mock مقایسه شد. درنهایت، کاهش بیان تقریباً دوبرابری ژن‌هایPIK3R5 ، AKT2وEGFR در سلول‌هایی که miR-1226-3p را بیش بیان می‌کردند، تأیید شد (شکل 5).

کاهش بیان ژن‌های پایین‌دست AKT2

داده‌های حاصل از Real time PCR نشان داد که کاهش بیان معنادار پروتئین AKT2 به‌دنبال بیش‌بیان miR-1226-3p در سلول‌های SKBR3 به تنظیم منفی بیان ژن‌های پایین‌دست PCNA, C-MYC و CCND1 منجر شده است.

بحث

سرطان پستان شایع‌ترین بیماری تهاجمی و دومین عامل مرگ‌ومیر 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 به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گیرنده‌های تیروزین کینازی در سطح سلول پس از برقراری میان‌کنش با لیگاندهایی چون فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)، فاکتور رشد تغییر شکل‌دهنده α (TGF α)، فاکتور رشد اپیدرمی متصل‌شونده به هپارین (Heparin-binding EGF)، آمفی رگولین (Amphiregulin) و اپی رگولین (Epiregulin)، فعال می‌شود و با تشکیل همودایمر یا هترودایمر با اعضای دیگر خانواده به‌ویژه Her2 مسیر پیام‌دهی PI3K/AKT را فعال می‌کند. درنهایت، فعال‌شدن این مسیر فاکتورهای رونویسی را به‌کار می‌گیرد که به بیان ژن‌های مسئول تکثیر سلولی و

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-03]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.4.1.3]

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 بیش‌بیان 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 ار 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 ترنسفورم‌شدن 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 Kinas 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 غیرفعال‌کردن GSK-3 مانع تجزیه Cyclin D1 می‌شود. در این مطالعه کاهش فعالیت مسیر PI3K/AKT به دنبال بیش‌بیان miR-1226-3p به کاهش بیان معنی‌دار در ژن CCND1 منجر شد که این اتفاق ممکن است به دلیل ناتوانی AKT1 در فسفریله و غیرفعال‌کردن GSK-3 باشد [23].

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-03]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.4.1.3]

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

تشکر و قدردانی: نویسندگان از پژوهشکده سرطان پستان معتمد بابت حمایت‌هایشان تشکر و قدردانی می‌کنند.

تأییدیه اخلاقی: نویسندگان موردی را ذکر نکرده‌اند.

تعارض منافع: هیچگونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: زهرا محمدزاده (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/نگارنده بحث (50%) ؛ فروزنده محجوبی و پریسا حسین‌پور (نویسنده دوم و سوم)، تأمین مواد مورد نیاز آزمایش‌ها، هر کدام (10%) بهرام محمدسلطانی (نویسنده چهارم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/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.

زیرنویس شکل‌ها

شکل1)

الف- 3'UTR ژن‌های EGFR, PIK3R5 و AKT2 و میزان حفاظت‌شدگی MRE اختصاصی miR-1226-3p را روی آن‌ها را به‌طور شماتیک نشان می‌دهد.

ب- جدول پایگاه اطلاعاتی miRWalk که نشان‌دهنده الگوریتم‌هایی است که ژن‌های EGFR, PIK3R5 و AKT2 را به‌عنوان هدف miR-1226-3p تأیید می‌کنند.

شکل 2)

تأیید کلون‌شدن پیش‌ساز miR-1226 در وکتور بیانی. در این راستا ابتدا قطعه پیش‌ساز miR-1226 پس از تکثیر از روی DNA ژنومی در TA Vector الحاق شد. سپس این قطعه از این وکتور خارج و در وکتور بیانی pmCherry کلون شد.

شکل3)

الف- تصویر میکروسکوپ نوری و فلورسنت گرفته‌شده از سلول‌های ترنسفکت‌شده با وکتور pmCherry حاوی پیش‌ساز miR-1226 و وکتور کنترل Mock با بزرگ‌نمایی 40.

ب- عکس ژل الکتروفورز RNA استخراج‌شده از سلول‌های ترنسفکت‌شده با وکتور pmCherry حاوی پیش‌ساز miR-1226 و وکتور کنترل Mock (لدر bp100).

ج- عکس ژل الکتروفورز cDNA سنتزشده از RNA استخراج‌شده از سلول‌های ترنسفکت‌شده با وکتور pmCherry حاوی پیش‌ساز *miR-1226* و وکتور کنترل Mock (لدر bp100).

شکل 4.

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

ب- نمودار بیان ژن‌های EGFR, PIK3R5 و AKT2. به دنبال بیش‌بیان miR-1226-3p در سلول‌های SKBR3 کاهش بیان معناداری در ژن‌های هدف EGFR, PIK3R5 و AKT2 مشاهده شد.

شکل 5.

نمودار تغییرات بیان ژن‌های پایین‌دست AKT2، ژن‌هایC-MYC و CCND1 که به‌عنوان سوبستراهای مستقیم AKT به حساب می‌آیند و همچنین PCNA به‌عنوان شاخصی برای تکثیر سلول‌ها، کاهش بیان معناداری را در سلول‌های SKBR3 به دنبال بیش‌بیان miR-1226-3p نشان دادند.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-03]

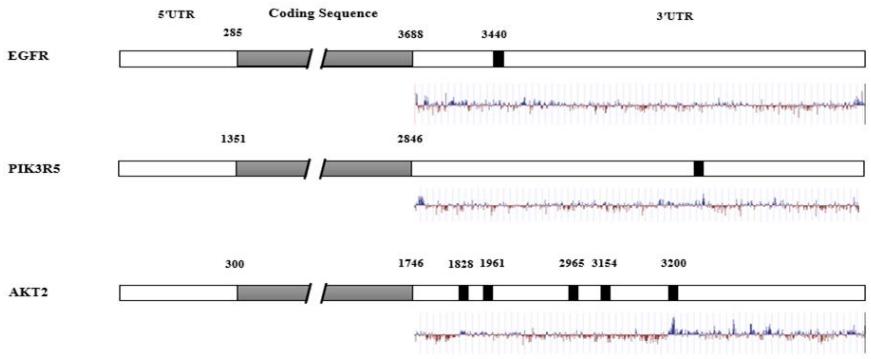
[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.4.1.3]

جدول1.جدول پرایمرهای به‌کارگرفته‌شده برای کلون‌سازی و بیان ژن.

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

1.

الف)



ب)

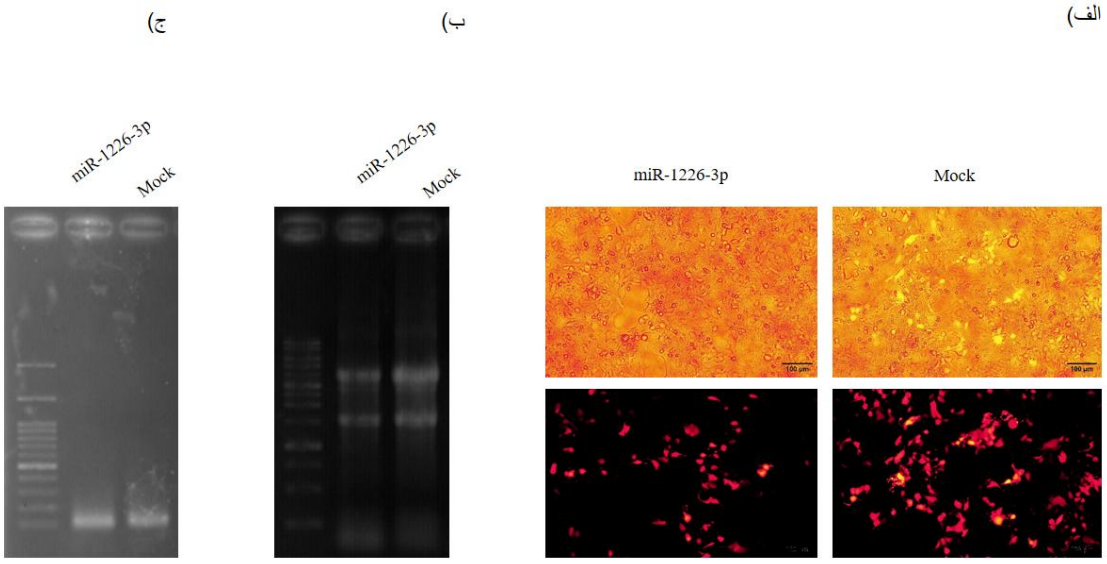
miRNA	Gene	RefseqID	miRWalk	Microt4	miRanda	mirbridge	miRDB	miRMap	miRNAMap	Pictar2	PITA	RNA22	RNAhybrid	Targetscan	SUM
hsa-miR-1226-3p	EGFR	XM_005271746	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	6
hsa-miR-1226-3p	PIK3R5	NM_001251851	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	5
hsa-miR-1226-3p	AKT2	XM_005258645	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	5

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-03]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.4.1.3]

2.

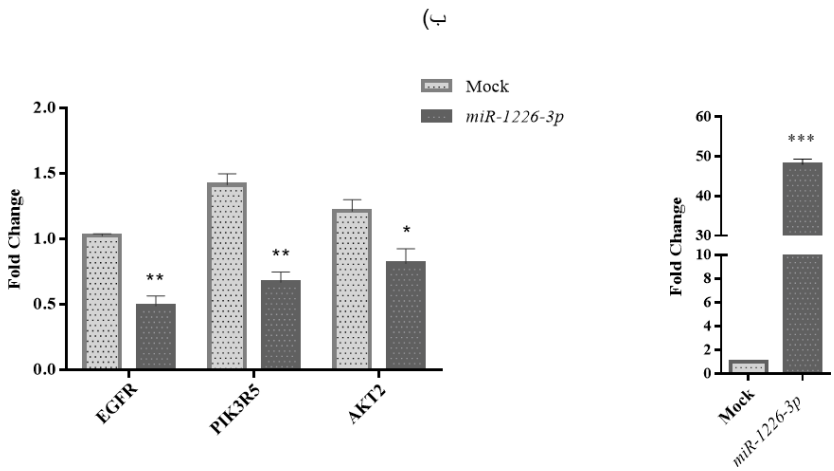
3.



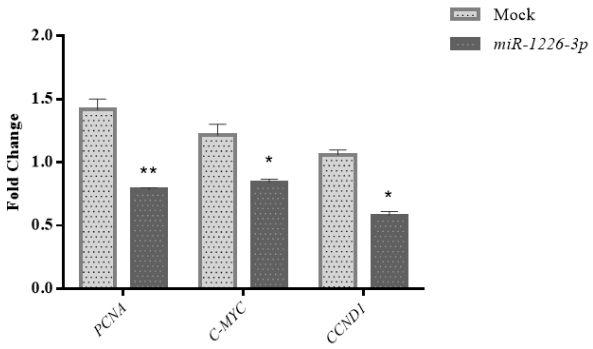
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-03]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.4.1.3]

4.



5.



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.

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*

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-03]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.4.1.3]

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 p110β and p110δ 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*

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-03]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.4.1.3]

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

Zahra Mohammadzadeh[1], Forouzandeh Mahjoobi[2], Parisa Hosseinpour[3], Bahram Mohammad Soltani[4]

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.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-03]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.4.1.3]