

بررسی اثر پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs137852595 موجود در ژن کدکننده گیرنده آندروژن بر مقاومت دارویی بیماران مبتلا به سرطان پروستات به داروی آنزالتامید

مریم علیزاده، حسین سازگار*، نوشا ضیاء جهرمی، فرزانه محمدی فارسانی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

سابقه و هدف: این بررسی به منظور مطالعه تأثیر پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs137852595 موجود در ژن کدکننده گیرنده آندروژن بر مقاومت دارویی بیماران دارای سرطان پروستات به داروی آنزالتامید طراحی شده است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش از ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان پروستات دارای مقاومت دارویی و ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان پروستات بدون مقاومت دارویی جهت انجام آنالیز ARMS-PCR استفاده شد و فراوانی آلی با استفاده از دو سرور Genepop و SISA انجام شد. در نهایت برهم کنش دارو و گیرنده با استفاده از روش داکینگ مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: بررسی نتایج نشان داد که فراوانی آلی پلی مورفیسم rs137852595 در گروه مقاوم به دارو برای آلل سالم (آلل C) برابر با ۰/۷۰ و برای آلل جهش یافته (آلل T) برابر ۰/۳۰ است. در گروه کنترل فراوانی آلی برای آلل سالم ۰/۹۲ و برای آلل جهش یافته ۰/۰۸ به دست آمد.

نتیجه گیری: بررسی نتایج به دست آمده نشان دهنده ارتباط معنادار بین وجود پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs137852595 و مقاومت دارویی است (P-Value = 0.005). به علاوه نتایج حاصل از روش داکینگ نشان داد که در افراد دارای این پلی مورفیسم، دارو به صورت صحیح به جایگاه فعال گیرنده آندروژن متصل نمی گردد و در نتیجه از میزان انرژی اتصال دارو به گیرنده آندروژن کاسته می شود.

واژه‌های کلیدی: سرطان پروستات، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی، آنزالتامید، مقاومت دارویی.

مقدمه

سرطان پروستات استفاده می شود که می تواند در بهبود و کنترل این بیماری نقش به سزایی داشته باشد (۱).

گیرنده آندروژن یکی از مهم ترین پروتئین های دخیل در پیشرفت سرطان پروستات بوده و می تواند نقش مهمی در کنترل سرطان پروستات داشته باشد (۶). بررسی ژن کدکننده گیرنده آندروژن نشان می دهد که این ژن دارای هشت اگزون است (۹) و هدف بسیاری از داروهای کنترل سرطان از جمله آنزالتامید است. آنزالتامید یک آنتاگونیست گیرنده آندروژن است که با مهار آندروژن در بدن بر روی گیرنده آندروژن عمل می کند. این دارو در درمان سرطان پروستات متاستاز داده مقاوم به درمان همراه با داروی دوسه تاکسل به کار می رود (۲۶، ۲۵، ۲۲، ۱۰). بررسی Labrie در سال ۲۰۱۵ نشان داد که آنزالتامید دارویی مهم در مهار گیرنده آندروژن بوده و

سرطان پروستات یک بیماری بسیار هتروژن است که تحت تأثیر عوامل متعدد ژنتیکی و محیطی قرار می گیرد. این بیماری یکی از فراگیرترین انواع سرطان در مردان میان سال است که در سنین کم تر از ۵۰ سال به ندرت مشاهده می شود (۱۲). بررسی ها نشان می دهد که سرطان پروستات یک بیماری با پیشرفت بسیار آهسته است و اغلب محدود به غده پروستات است (۳۰). به طور معمول از تست آنتی ژن اختصاصی پروستات (PSA) جهت تشخیص زود هنگام

نویسنده مسئول:

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد
پست الکترونیکی: hoseinsazgar@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۱۷

جدول ۱. پرایمرهای طراحی شده برای پلی مورفیسم (rs137852595) C/T

اندازه محصول (bp)	توالی (5' _ 3')	
۲۳۹	GAATGTCCTGGAAGCCATTGA GCCAGGT	پرایمر پیشرو خارجی
۲۳۹	AGAAAAGCACCAGACATGGT GGCTGGTC	پرایمر معکوس خارجی
۱۵۵	AGCCTCAATGAACTGGGAGA GAGACCGC	پرایمر پیشرو داخلی C
۱۵۵	AGCCTCAATGAACTGGGAGA GAGACCGT	پرایمر پیشرو داخلی T

شرایط دمایی بهینه برای تکثیر DNA ژنومی از طریق دستگاه ترموسایکلر به صورت ۵ دقیقه تحت دمای ۹۴ درجه سلیسیوس به منظور واسرشت رشته، ۳۵ چرخه به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۳ درجه سلیسیوس جهت اتصال پرایمرها، ۵۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس و در نهایت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به منظور گسترش نهایی رشته بود. شرایط واکنش ARMS-PCR برای مارکر rs137852595 بعد از بهینه سازی طبق جدول (۲) است.

جدول ۲. مواد و مقادیر مورد نیاز برای یک PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر

ماده	مقدار	غلظت
Taq DNA polymerase	۰/۲۵	۱/۲۵ u/ μl
Buffer PCR(10X)	۲/۵	۱ X
MgCl ₂ (50mM)	۰/۷۵	۱/۵ Mm
dNTP (10mM)	۰/۵	۰/۲ Mm
Primer (Mix F& R100PMol/ μl)	۲/۵ μl	۱۰ Pmol
Primer F Inner	۲ μl	۱۰ Pmol
DNA Tempelat	۲ μl	۲ μg
Deionised dH ₂ O	۱۴/۵μl	-

آنالیز ARMS-PCR

آنالیز ARMS-PCR شامل دو واکنش PCR است که با استفاده از یک DNA الگو در دو ویال جداگانه انجام می شود. یکی از واکنش ها حاوی پرایمر جهش یافته و دیگری حاوی پرایمر طبیعی است (۱۶). برای بررسی وجود پلی مورفیسم در هر واکنش، پرایمرهای مشترک به همراه یکی از دو پرایمر اختصاصی آلل مورد استفاده قرار گرفته و نتایج حاصل از تکنیک ARMS-PCR بر روی ژل آگارز مشاهده می شود.

داکینگ

در این مطالعه از نرم افزار AutoDock 4.2 و MGLTools 1.5.6 برای انجام محاسبات داکینگ استفاده شد (۱۹). در

می توانند باعث کنترل سرطان پروستات در زمان طولانی و درمان سرطان پروستات قبل از متاستاز شود (۱۳). امروزه داکینگ یکی از مهم ترین و دقیق ترین روش ها برای به دست آوردن مکانیسم برهم کنش بسیاری از داروها با گیرنده های پروتئینی است. اساس این روش جستجوی سطح پروتئین توسط لیگاند و جستجوی بهترین نقطه اتصال لیگاند و پروتئین بر مبنای پارامتر انرژی اتصال است (۱۷، ۱۸).

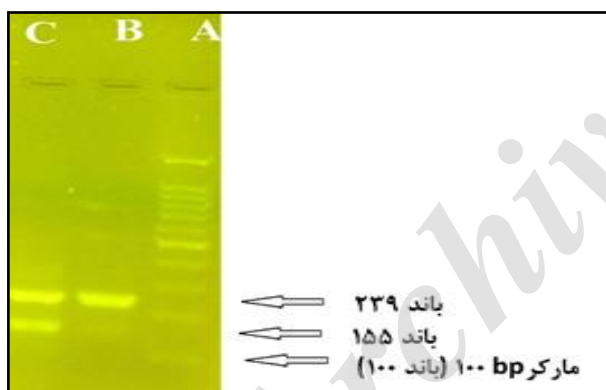
اگرچه تاکنون مطالعه های بسیاری برای بررسی نقش پلی-مورفیسم های مختلف در مقاومت دارویی گیرنده آندروژن انجام گرفته است. اما تا به امروز تأثیر بسیاری از پلی مورفیسم های موجود در ژن این گیرنده در مقاومت دارویی مشخص نشده است. در این راستا به بررسی نقش پلی مورفیسم rs137852595 در ایجاد مقاومت دارویی افراد دارای سرطان پروستات پرداخته شده است. در ابتدا به آنالیز ژنی نمونه ها با استفاده از تکنیک ARMS-PCR پرداخته شد. سپس مکانیسم ایجاد مقاومت دارویی با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت صحت مطالعه ها با استفاده از آنالیزهای آماری ارزیابی شدند.

روش کار

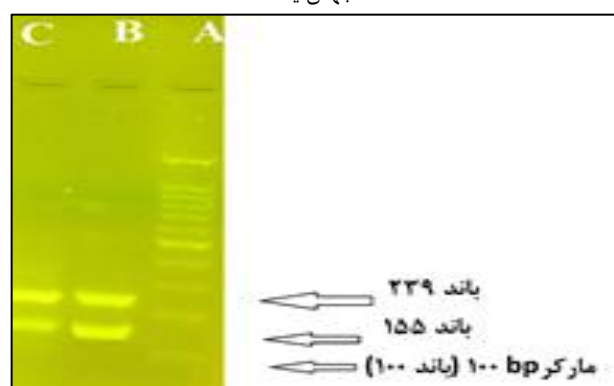
جمع آوری نمونه ها و طراحی پرایمرها

در این مطالعه به منظور انجام آنالیز ARMS-PCR پس از رضایت نامه کتبی، تعداد ۵۰ نمونه خون از بیماران مبتلا به سرطان پروستات مقاوم به درمان با داروی آنزالتامید و ۵۰ نمونه خون از بیماران مبتلا به سرطان پروستات بدون مقاومت دارویی جمع آوری شد. این نمونه ها از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان های امید و الزهرای استان اصفهان جمع آوری گردید. هم چنین به علت حضور پلی مورفیسم در ژن وابسته به جنس، جهت تعیین فراوانی آللی و درجه هتروزیگوستی از ۲۵ نمونه زن به صورت تصادفی استفاده و نتایج آن مورد بررسی قرار گرفت. پس از استخراج DNA از نمونه های خون، پرایمرهای مورد نیاز جهت انجام آنالیز ARMS-PCR توسط سرور PRIMER1 طراحی شدند (۴) و سپس توسط نرم افزار Gene Runner از نظر دمای اتصال و تشکیل دایمر مورد بررسی قرار گرفتند (۲۷). در نهایت به منظور بررسی عملکرد گزینشی این پرایمرها و عدم اتصال آنها با قسمت های دیگر ژنوم از برنامه BLAST استفاده شد (۸). مشخصه های پرایمر مورد استفاده برای انجام آنالیز ARMS-PCR در جدول (۱) آورده شده است.

نتایج به دست آمده از آنالیز ARMS-PCR بر روی نمونه های خون مردان دارای پلی مورفیسم و افراد سالم باندهایی مطابق با شکل (۱) را نشان داد. در این آنالیز باند (bp) ۲۳۹ در هر دو گروه سالم و جهش یافته مشترک بود در حالی که وجود باند (bp) ۱۵۵، سالم و یا جهش یافته بودن ژن گیرنده آندروژن را در فرد نشان می داد. پس از بررسی نتایج ARMS-PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد، بررسی فراوانی ها برای rs137852595 نشان داد که در گروه مقاوم به دارو ۱۵ نفر دارای جهش بوده در حالی که در گروه فاقد مقاومت دارویی تنها ۴ نفر دارای جهش هستند. به علاوه بررسی نتایج به دست آمده از آنالیز ARMS-PCR برای تعیین هتروزیگوتی در زنان نشان داد که در از میان ۲۵ نفر جمعیت زنان، برای rs137852595، تعداد ۲۰ نفر هموزیگوت سالم، ۱ نفر هموزیگوت بیمار و ۴ نفر هتروزیگوت بودند. در تفسیر باندهای مشاهده شده بر روی ژل آگارز در نمونه های زن هتروزیگوت و سالم می توان به این نکته اشاره کرد که در زنان هتروزیگوت بر خلاف مردان برای هر دو چاهک دارای آلل سالم و جهش یافته، باند مشاهده می شود، شکل (۲).



شکل ۱. بررسی نتایج ARMS-PCR پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs137852595 در مردان. A: چاهک ۱۰۰ bp، B: چاهک ۲۳۹ bp، C: چاهک ۱۵۵ bp. چاهک B: پرایمر پیش رو و معکوس خارجی و هم چنین پرایمر پیش رو داخلی سالم، چاهک C: پرایمر پیش رو و معکوس خارجی و هم چنین پرایمر پیش رو داخلی جهش یافته



شکل ۲. بررسی نتایج ARMS-PCR برای تعیین هتروزیگوتی

تمامی محاسبات از الگوریتم ژنتیک لامارکی برای جستجوی بهترین محل اتصال دارو به سطح گیرنده استفاده شد. برای هر یک از ساختارهای طبیعی و جهش یافته تعداد ۲۰۰ اجرا گذاشته شد که در هر اجرا فاکتور جمعیت اولیه در جستجو برابر با ۱۵۰ بود و در مجموع ۲۷ هزار ساختار برای محاسبات ساخته شد. جهت بررسی برهمکنش های الکتروستاتیک از مدل بار جزئی گستیگر استفاده شد و جستجو بر روی سطح گیرنده در شبکه ای به ابعاد ۶۰×۶۰×۶۰ انجام گرفت. در نهایت نتایج بهترین نقطه اتصال داروی آنزوتامید بر روی سطح گیرنده در گیرنده طبیعی و جهش یافته مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مقایسه این برهم کنش به صورت شماتیک توسط نرم افزار لیگ پلات نمایش داده شد (۲۹).

آماده سازی ساختار گیرنده آندروژن

جهت آماده سازی ساختار سه بعدی گیرنده آندروژن از ساختار کمپلکس گیرنده جهش یافته آندروژن با داروی بیکالوتامید با کد دسترسی 1Z95 از پایگاه اطلاعاتی پروتئین PDB (www.pdb.org) استفاده شد. در این ساختار سه بعدی ابتدا ساختار بیکالوتامید از کمپلکس خارج و در ادامه با استفاده از وب سرور RosettaBackrub (۱۴) جهش در اسید آمینه شماره ۷۴۱ حذف شد و هم چنین با ایجاد جهش در اسید آمینه لوسین ۷۱۳ و تبدیل آن به فنیل آلانین ساختار پلی-مورفیسم با شماره rs137852595 طراحی گردید. هم چنین ساختار داروی آنزوتامید با استفاده از وب سرور DrugBank (www.drugbank.ca) به دست آمد و برای انجام داکینگ مورد استفاده قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

جهت بررسی تعادل هاردی واینبرگ، تعیین فراوانی آلی و برآورد درجه هتروزیگوتی از سرور Genepop (۲۳) استفاده شد. به علاوه بررسی میزان اطلاع دهندگی rs137852595 با استفاده از فاکتور ظرفیت اطلاعاتی چندشکلی (PIC) انجام شد. در ادامه جهت بررسی تعادل هاردی واینبرگ از آزمون دقیق فیشر استفاده شد. در نهایت بررسی ارتباط وجود پلی-مورفیسم rs137852595 و مقاومت دارویی در بیماران مبتلا به سرطان پروستات با استفاده از آزمون دقیق فیشر و به واسطه سرور SISA بررسی گردید (۲۸).

یافته ها

برد (۷). در سال ۲۰۱۶، Bassetto و همکارانش با طراحی داروهای بیکالوتامید و آنزالتامید و شبیه‌سازی این داروها و با استفاده از داکینگ و دینامیک مولکولی به مطالعه جایگاه این دو دارو در گیرنده آندروژن پرداختند. نتایج نشان داد که این دو ساختار در گیرنده آندروژن به‌طور تقریب در یک موقعیت قرار دارند (۲). سرطان پروستات، در میان تمامی انواع سرطانی که سبب مرگ در مردان می‌گردند، در رتبه دوم قرار دارد. با این حال، در میان مردان ۴۵ ساله، سرطان پروستات پنجمین عامل مرگ و میر است (۲۲). با توجه به اهمیت موضوع این مطالعه با هدف بررسی نقش پلی‌مورفیسم rs137852595 در مقاومت دارویی گیرنده آندروژن در سرطان پروستات طراحی گردید. در این راستا بررسی روی ۱۰۰ بیمار مبتلا به سرطان پروستات که داروی آنزالتامید مصرف می‌کنند صورت گرفت و فراوانی این پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی مورد بررسی قرار گرفت. آنالیزهای جمعیتی برای rs137852595 در مردان مقاوم به دارو نشان داد که فراوانی آلی در این گروه برای آلل سالم برابر ۰/۷۰ و برای آلل جهش ۰/۳۰ است در حالی که این مقادیر برای گروه فاقد مقاومت دارویی برای آلل سالم ۰/۹۲ و برای آلل جهش یافته ۰/۰۸ به‌دست آمد. برای تعیین درجه هتروزیگوسیتی و بررسی وجود تعادل هاردی-وینبرگ در جمعیت مورد مطالعه فراوانی آلی برای این پلی-مورفیسم در جمعیت زنان محاسبه شد که برای rs137852595 آلل سالم برابر ۰/۸۸ و برای آلل جهش یافته برابر ۰/۱۲ به‌دست آمد. بررسی وجود تعادل هاردی-واینبرگ برای پلی‌مورفیسم rs137852595 در جمعیت استان اصفهان نشان داد که این پلی‌مورفیسم در تعادل هاردی-واینبرگ قرار دارد (P-Value = 0.28).

در مطالعه‌های آماری آنالیز PIC یکی از فاکتورهای مهم جهت بررسی، میزان بیان کنندگی یک مارکر است. در این مطالعه بررسی مقادیر پارامتر PIC نشان می‌دهد که مقدار PIC برای پلی‌مورفیسم rs137852595 برابر با ۰/۱۸۸۹ است که بیان-گر اطلاع دهندگی پایین این پلی‌مورفیسم است.

در نهایت بررسی ارتباط مقاومت دارویی و وجود پلی‌مورفیسم با استفاده از آزمون دقیق فیشر در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام شد. نتایج این بررسی نشان داد که در گروه مقاوم به دارو فراوانی آلی برای آلل جهش یافته به‌صورت معناداری افزایش پیدا می‌کند (P-Value = 0.005) و در نتیجه می‌توان بیان داشت ارتباط معناداری میان مقاومت دارویی و وجود پلی-مورفیسم rs137852595 وجود دارد. به‌علاوه ارزیابی‌های تئوری با استفاده از تکنیک داکینگ نیز نشان داد

مطالعه‌های زیادی بر روی ژن گیرنده آندروژن صورت گرفته است. این مطالعه‌ها نشان می‌دهد که وجود پلی‌مورفیسم در ژن گیرنده آندروژن می‌تواند به‌صورت معناداری موجب افزایش احتمال ابتلا به سرطان پروستات گردد (۱۵). بر اساس مطالعه‌های اخیر جهش در گیرنده آندروژن می‌تواند باعث مقاومت دارویی نسبت به آنزالتامید شود. برای مثال، وقتی جهش L876F در گیرنده آندروژن رخ دهد، آنزالتامید به-عنوان یک آگونیست تشخیص داده می‌شود و بدین ترتیب مقاومت دارویی در محیط داخل بدن رخ می‌دهد (۱۱). به-طور کلی آنزالتامید به‌عنوان یک آنتاگونیست گیرنده آندروژن با مهار آندروژن در بدن بر روی گیرنده آندروژن عمل می‌کند. آنزالتامید در درمان سرطان پروستات متاستاز داده مقاوم به درمان با داروی دوسه تاکسل به کار می‌رود (۲۶، ۲۵، ۲۲، ۱۰). در سال ۲۰۱۲، Cabot و همکاران در مطالعه‌های خود روی ژن گیرنده آندروژن دریافتند که بیماران مبتلا به سرطان پروستات مقاوم به درمان که تحت درمان با داروی آنزالتامید قرار گرفته‌اند بعد از شیمی‌درمانی شانس بقای آن‌ها تا ۳۷ درصد افزایش خواهد یافت (۳). Sasaki و همکارانش در سال ۲۰۰۳ اظهار داشتند که پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی واقع در کدون ۲۱۱ که در بین تکرارهای CAG و GGN در اگرون شماره یک ژن گیرنده آندروژن قرار دارد و توسط آنزیم محدودکننده StuI قابل شناسایی است، در ایجاد سرطان پروستات نقش بسزایی دارد (۲۴). هم‌چنین Gottlieb و همکارانش در سال ۲۰۱۲ اظهار داشتند گرچه جهش‌های گیرنده آندروژن در سرطان پروستات در دامنه‌های عمکردی مختلف شناسایی شده‌اند، اما به‌ندرت در مناطق ۵' و مناطق ۳' ترجمه نشده (UTRs) به چشم می‌خورند. بسیاری از این جهش‌ها از نوع جهش‌های جایگزینی تک نوکلئوتیدی هستند که ۵۱ درصد از این جهش‌ها در مناطق مربوط به دومین باند شونده به DNA (DBD)، ۴۱ درصد در مناطق مربوط به دومین انتهای آمینی (NTD) و ۷ درصد در دومین اتصال به لیگاند (LBD) رخ می‌دهد (۵). در سال ۲۰۱۳ Nadiminty و همکاران با آنالیز سطح بیان واریانت‌های متصل به گیرنده آندروژن بیان کردند که فعال شدن گیرنده آندروژن و واریانت-هایش به واسطه NF-κB2/p52 می‌تواند باعث مقاومت دارویی در برابر آنزالتامید شود (۲۰). در سال ۲۰۱۵ Huang و همکاران روی پلی‌مورفیسم‌های ژن آندروژن مطالعه کردند. آن‌ها چندین SNP را یافتند که در تشخیص زود هنگام سرطان پروستات مؤثر است. از جمله این SNPها rs7201637، rs4243229 و rs16934641 را می‌توان نام

جدول ۳. نتایج داکینگ آنزالتامید و گیرنده آندروژن طبیعی و جهش یافته

$\Delta G_{\text{Binding}}$ Kcal/mol	Intermolecular Energy	Internal Energy	Torsional Energy	Unbond Energy	ساختار
-۲/۱۳	-۲/۳۳	-۰/۳۵	۱/۱۹	-۰/۳۵	AR
۲/۶۰	۲/۳	-۰/۹۷	۱/۱۹	-۰/۹۷	rs137852595

که وجود جهش در ساختار گیرنده آندروژن باعث عدم اتصال دارو به جایگاه مناسب و در نتیجه کم شدن قدرت اتصال دارو به گیرنده می‌گردد. هم چنین تحلیل نتایج داکینگ انواع مختلف اسیدآمین‌های درگیر در برهم‌کنش دارو با گیرنده آندروژن مشخص نمود.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه بررسی نقش پلی مورفیسیم rs137852595 در مقاومت دارویی بیماران مبتلا به سرطان پروستات مقاوم به درمان با داروی آنزالتامید نشان داد که ارتباط معناداری بین وجود این پلی مورفیسیم و مقاومت دارویی به درمان با داروی آنزالتامید وجود دارد که وجود تعادل هاردی-واینبرگ در جمعیت مورد مطالعه صحت اطلاعات به‌دست آمده را تأیید می‌کند. هم‌چنین نتایج به‌دست آمده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی درک صحیحی از ماهیت اتصال دارو به گیرنده آندروژن به دست می‌دهد و می‌تواند مکانیسم عمل دارو، مقاومت دارویی و اسید آمینه‌های درگیر در واکنش را مورد مطالعه قرار دهد. به‌علاوه خصوصیت‌های ژنتیکی پلی مورفیسیم ذکر شده از جمله درجه هتروزیگوسیتی و میزان بیان‌کنندگی مورد بررسی قرار گرفته است که می‌تواند برای مطالعه‌های بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد و تحت حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد شهرکرد است. بدین وسیله نویسندگان از تمام افرادی که در جمع‌آوری نمونه در این پژوهش یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایند.

1. Bartsch G, Horninger W, Klocker H. Decrease in prostate cancer mortality following introduction of prostate specific antigen screening in the federal state of Tyrol. *J Urol*, 2000;163(88): 417-424.
2. Bassetto M, Ferla S, Pertusati F, Kandil S, Westwell AD, Brancale A, McGuigan C. Design and synthesis of novel bicalutamide and enzalutamide derivatives as antiproliferative agents for the treatment of prostate cancer. *Eur J Med Chem*. 2016;118:230-43.
3. Cabot RC, Harris NL, Rosenberg ES, Shepard J-AO, Cort AM, Ebeling SH, et al. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy, *NEJM*. 2012; 367(13): 1187-97.
4. Collins A, Ke X. Primer1: primer design web service for tetra-primer ARMS-PCR. *Open Bioinforma J*. 2012;6:55-58.
5. Gottlieb B, Beitel LK, Nadarajah A, Paliouras M, Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Human mutation*. 2012;33(5): 887-894.
6. Grasso CS, Wu YM, Robinson DR, Cao X, Dhanasekaran SM, Khan AP, Quist MJ, Jing X, Lonigro RJ, Brenner JC, Asangani IA. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature*. 2012;487(7406):239-243.
7. Huang TY, Chien TM, Liu CC, Lee HY, Yu CC, Huang CY, Chang CF, Huang CH, Wu WJ, Bao BY, Huang SP. Prognostic significance of genetic polymorphisms in disease progression and survival in prostate cancer after androgen deprivation therapy. *Urol Sci*. 2015;26(2):81-84.
8. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic acids research*. 2008;36(suppl 2):W5-9.
9. Joseph JD, Lu N, Qian J, Sensintaffar J, Shao G, Brigham D, et al. A Clinically Relevant Androgen Receptor Mutation Confers Resistance to Second-Generation Antiandrogens Enzalutamide and ARN-50. *Cancer Discov*, 2013;1, 3(9):1020-1929.
10. Kim TH., Jeong JW, Song JH, Lee KR, Ahn S, Ahn SH, et al. Pharmacokinetics of enzalutamide, an anti-prostate cancer drug, in rats. *Arch Pharm Res*, 2015; 38(11):2076-2082.
11. Korpál M, Korn JM, Gao X, Rakiec DP, Ruddy DA, Doshi S, Yuan J, Kovats SG, Kim S, Cooke VG, Monahan JE. An F876L mutation in androgen receptor confers genetic and phenotypic resistance to MDV3100 (enzalutamide). *Cancer Discov*. 2013;3(9):1030-1043.
12. Kumar v, Majumder P. Prostate gland: structure, functions and regulation. *Int Urol Nephrol*, 1995; 27:231-243.
13. Labrie F. Combined blockade of testicular and locally made androgens in prostate cancer: a highly significant medical progress based upon intracrinology. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015;145:144-156.
14. Lauck F, Smith CA, Friedland GF, Humphris EL, Kortemme T. RosettaBackrub—a web server for flexible backbone protein structure modeling and design. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(suppl 2):W569-75.
15. Mansouri F. The role of the clinical and molecular assays in prostate cancer detection. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2017; 10(6):11-15
16. Medrano RF, de Oliveira CA. Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development. *Mol Biotechnol*. 2014;56(7):599-608.
17. Morris GM, Goodsell DS, Pique ME, Lindstrom W, Huey R, Forli S, et al. AutoDock 4.2 User guide. 2011.
18. Morris GM. Huey R. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*. 2009;30:2785-2791.
19. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*. 2009; 30(16): 2785-2791.
20. Nadiminty N, Tummala R, Liu C, Yang J, Lou W, Evans CP, et al. NF-κB2/p52 induces resistance to enzalutamide in prostate cancer: role of androgen receptor and its variants, *Molecular cancer therapeutics*. 2013;12(8):1629-37.
21. Penson DF, Armstrong AJ, Concepcion R, Agarwal N, Olsson C, Karsh L, et al. Enzalutamide versus bicalutamide in castration-resistant prostate cancer: the STRIVE trial. *J Clin Oncol*, 2016; 34(18):2098-2106.
22. Prostate Cancer Screening, A Decision Guide. The U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), (www.cdc.gov).
23. Raymond M. GENEPOP (version 1.2.): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.*. 1995;86:248-9.
24. Sasaki M, Nomoto M, Yonezawa S, Nakagawa M, Sakuragi N, Fujimoto S, Carroll PR, Dahiya R. Distribution of a single nucleotide polymorphism on codon 211 of the androgen receptor gene and its correlation with human renal cell cancer in Japanese patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2004; 321(2):468-471.
25. Scher HI, Beer TM, Higano CS, Taplin M, Efstathiou E, Anand A, Hung D, Hirmand M, Fleisher M. Antitumor activity of MDV3100 in a phase I/II study of castration-resistant prostate cancer (CRPC). *J Clin Oncol*. 2009;27(15S):5011.

26. Scher HI, Fizazi K, Saad F, Taplin ME, Sternberg CN, Miller K, de Wit R, Mulders P, Chi KN, Shore ND, Armstrong AJ. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N Engl J Med* 2012;367(13):1187-1197.
27. Spruyt M, and F. Buquicchio. Gene Runner version 3.05. Website [http://www. generunner.net/](http://www.generunner.net/)[accessed 10 2015] (1994).
28. Uitenbroek DG. SISA binomial. Southampton: DG Uitenbroek. Retrieved January. 1997;1:2004.
29. Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng.* 1995;8(2): 127-134.
30. Wolf A, Wender RC, Etzioni RB, Thompson IM, D'Amico AV, Volk RJ, et al. American Cancer Society guideline for the early detection of prostate cancer. *CA Cancer J Clin*, 2010; 60(2):70-79.