

Gengenotypic Evaluation of Hsa-miR-433-3p Binding Site in the Regulatory Region of *TYMS* in Breast Cancer Patients

Ali Arash Anoushirvani¹, Azam Ahmadi^{2*}, Reza Aghabozorgi¹, Sara Khalili³, Maryam Sahraei⁴,
Taha Fereydouni⁵, Zoha Khademi⁵

1. Assistant Professor, Fellowship of Oncology, Ayatollah Khansari Hospital, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
2. PhD of Genetics, Infectious Diseases Research Center (IDRC), Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
3. Msc of Microbiology, Department of Microbiology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
4. Msc of Genetics, Department of Genetics, Arak University, Arak, Iran.
5. Student of General Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

Received: 30 Jan 2018, Accepted: 3 Mar 2018

Abstract

Background: Breast cancer is the most common cancer in women. It has been proven the association of cause of this disease with changes in several genes. One of the pathways associated with breast cancer is the folate reuptake pathway. The key enzyme of this pathway is coded by the *TYMS* gene. MicroRNAs control the expression of genes by binding to their regulatory regions. In this study, we evaluated changes in the regulatory region of *TYMS* gene with demographic characteristics (including the grade of cancer and metastasis) in breast cancer patients.

Materials and Methods: In this study, the regulatory region of *TYMS* gene was investigated using related bioinformatics software. After collecting cancerous samples and DNA extraction from blood samples of normal and patients, change in the miRNA binding region by digestion with *NlaIII* enzyme was assayed.

Results: Bioinformatics studies showed that the restriction site of some of the endonuclease enzymes in the 3'-UTR of the *TYMS* gene is related to the binding region of miRNAs, including Hsa-miR-433-3p. The results indicated the correctness of the genomic purification process, the PCR and enzymatic digestion reaction. In this study, in the regulatory region, CC homozygote, AC heterozygote and AA mutant homozygote variant had differences with control group (OR: 1.3465, %95 CI: 0.7275 to 2.4923, p<0.05). Also, the association of AA genotypes with metastasis and high grade of the patients was confirmed statistically.

Conclusion: Studies have shown that some of polymorphisms in the key genes involved in cancer are directly related to their diagnosis and treatment process, and given the importance of timely diagnosis of cancer, the achievement of diagnostic biomarkers in breast cancer in the early stages will be important. Probably, the nucleotide change at the site of the microRNA binding site could be used as a diagnostic biomarker for degree of tumor progression.

Keywords: Biomarker, Breast Cancer, *TYMS*, 3'-UTR

*Corresponding Author:

Address: Infectious Diseases Research Center (IDRC), Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
Email: azam.ahmadi@modares.ac.ir

بررسی ژنوتایپ محل اتصال hsa-miR-433-3P در ناحیه تنظیمی *TYMS* در نمونه‌های سرطان سینه

علی آرش انوشیروانی^۱، اعظم احمدی^{۲*}، رضا آقابزرگی^۱، سارا خلیلی^۱، مریم صحرائی^۱، طه فریدونی^۱، ضحی خادمی^۱

۱. استادیار، فوق تخصص خون و آنکولوژی، بیمارستان آیت اله خوانساری، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۲. دکترای تخصصی ژنتیک، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی (IDRC)، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۳. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۴. کارشناس ارشد ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشگاه اراک، اراک، ایران

۵. دانشجوی پزشکی عمومی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۱۰، تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: سرطان سینه شایع‌ترین سرطان در زنان سراسر جهان است. ارتباط این بیماری با وقوع تغییرات در ژن‌های متعدد اثبات شده است. یکی از مسیرهای مرتبط با سرطان سینه مسیر بازجذب فولات است. آنزیم کلیدی این مسیر پیام‌رسانی توسط ژن *TYMS* کد می‌شود. *miRNA*ها با اتصال به نواحی تنظیمی ژن‌ها بیان آن‌ها را کنترل می‌کنند. در این مطالعه، وجود تغییر در ناحیه تنظیمی *TYMS* در ارتباط با ویژگی‌های دموگرافیکی (شامل گرید و متاستاز) بیماران سرطان سینه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ابتدا ناحیه تنظیمی ژن *TYMS* با کمک نرم افزارهای بیوانفورماتیکی مرتبط، مورد بررسی قرار گرفت. پس از جمع‌آوری نمونه‌های سرطانی و استخراج *DNA* از نمونه‌های خون، تغییر در ناحیه اتصال *miRNA* مورد مطالعه توسط برش آنزیمی *NlaIII* بررسی شد.

یافته‌ها: بررسی‌های بیوانفورماتیکی نشان داد که محل اثر برخی از آنزیم‌های محدود کننده در 3'-UTR ژن *TYMS* مرتبط با ناحیه اتصال *miRNA*هایی از جمله Hsa-miR-433-3p قرار دارد. نتایج حاکی از صحت فرآیند تخلیص ماده ژنومی، PCR و برش آنزیمی بود. در ناحیه تنظیمی مورد بررسی، ژنوتایپ‌های هوموزیگوت CC، هتروزیگوت AC و واریانت هوموزیگوت موتانت AA با فراوانی متفاوت نسبت به نمونه‌های سالم مشاهده شد ($p < 0.05$ ، $2/4923$ تا 0.7275 ، CI: 95% ، $1/3465$ ، OR). هم‌چنین ارتباط ژنوتایپ AA با گرید بالا و متاستاز از نظر آماری تایید شد.

نتیجه‌گیری: در مطالعات متعدد مشخص شده است برخی از پلی‌مورفیسم‌ها در ژن‌های کلیدی مرتبط با سرطان با تشخیص و پروسه درمان آن‌ها ارتباط مستقیم دارد. با توجه به اهمیت تشخیص به موقع در درمان سرطان، دستیابی به بیومارکرهای تشخیصی در سرطان سینه در مراحل اولیه حائز اهمیت خواهد بود. احتمالاً تغییر نوکلئوتیدی در سایت اتصال *miRNA* مورد مطالعه می‌تواند به عنوان بیومارکر تشخیصی تومور مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: سرطان سینه، *TYMS*، 3'-UTR، بیومارکر

*نویسنده مسئول: ایران، اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی

Email: azam.ahmadi@modares.ac.ir

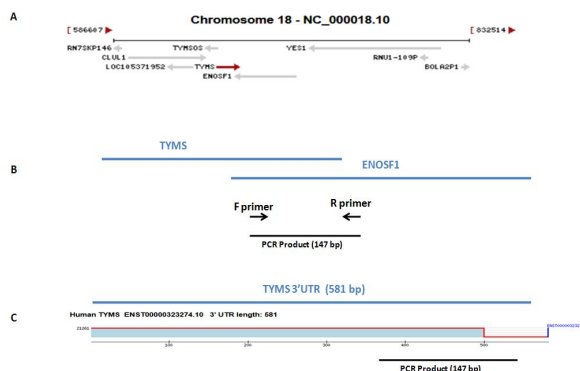
مقدمه

طبق محاسبات آمار مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها در ایالات متحده و انگلستان، سرطان سینه، بعد از سرطان ریه بیشترین عامل مرگ در زنان است؛ سالانه بیش از ۵۰۰ هزار مرگ ناشی از آن رخ می‌دهد و در سراسر جهان عامل ۱۴ درصد از مرگ خانم‌ها می‌باشد (۱). علل ژنتیکی این بیماری هتروژن وقوع تغییرات در ژن‌های متعدد می‌باشد. به طور کلی، ژن‌های دخیل در بروز سرطان سینه به چند گروه طبقه‌بندی می‌شوند، شامل آنکوژن‌ها و پروتوآنکوژن‌هایی مانند فاکتورهای رونویسی، فاکتورهای رشد، گیرنده فاکتورهای رشد مانند *Her2*، ژن‌های سرکوبگر تومور مانند *BRCA1,2*، *APC*، *Rb*، ژن‌های دخیل در متاستاز، ترمیم و آپوپتوز. تغییر در برخی از این ژن‌ها از جمله *TP53*، *BRCA1*، *BRCA2*، *CDHI*، *STK11* بروز سرطان سینه را افزایش می‌دهد (۱، ۲). محصولات هر کدام از این ژن‌ها در مسیرهای پیام‌رسانی متفاوتی وجود دارند. در مطالعه‌ای مروری در سال ۲۰۱۳ تعداد ۱۹ مسیر پیام‌رسانی KEGG از جمله مسیرهای گیرنده‌های تیروزین کینازی، مسیر *HSP90*، *PI3K/AKT*، *TLR* (toll like receptor)، *Her2* (*erb2*)، *ER* (estrogen receptor) و *Notch* در سرطان سینه بررسی شد. این مسیرها در خیلی از موارد با هم مرتبط هستند. میزان تغییر بیان ژن‌های این مسیرهای پیام‌رسانی در انواع سرطان به اثبات رسیده است. یکی از مسیرهای مرتبط با سرطان سینه مسیر بازجذب فولات است. نقص در این مسیر، متابولیسم پورین‌ها و تیمیدیلات و بنابراین متابولیسم ماده ژنتیکی DNA و RNA را با مشکل مواجه می‌کند. تغییر در ژن‌های این مسیر پیام‌رسانی از جمله ژنی به نام *TYMS* بر میتلاسیون DNA و سنتز نوکلئوتیدها موثر است (۳، ۴). *TYMS* یک آنزیم کلیدی مرتبط با متابولیسم فولات است. ژن *TYMS* که *HST422*، *TMS* و *TS* نیز نامیده می‌شود (ID: 7298)، کدکننده تیمیدیلات سنتاز (TS) است و میتلاسیون دئوکسی

یوریدیلات را به دئوکسی تیمیدیلات کاتالیز می‌کند. این عملکرد dTMP برای مراحل اولیه سنتز DNA در فرآیند همانندسازی و ترمیم حیاتی است. این آنزیم به عنوان هدفی در عوامل شیمی‌درمانی سرطان مطرح است. با مهار این آنزیم، تعادل نوکلئوتیدها به هم ریخته و میزان dUMP افزایش می‌یابد. این آنزیم می‌تواند در پیش‌بینی پتانسیل بدخیمی برخی سلول‌های سرطانی و هم‌چنین بررسی روند درمان مفید باشد. الگوی بیان این ژن در مراحل متفاوت سرطان سینه و سایر سرطان‌ها از جمله سرطان ریه تغییر می‌کند (۵-۷). تغییر بیان این ژن در سلول‌های انسانی در فاز G1 چرخه سلولی ایجاد می‌شود (۸). حساسیت TS به مهارکننده‌هایی مانند ۵-فلورواوراسیل عامل موفقیت‌آمیز درمان در سرطان‌های کولورکتال، پانکراس، تخمدان، گاستریک و برخی از سرطان‌های سینه گزارش شده است (۹، ۱۰). پلی‌مورفیسم در این ژن و ژن *MTHFR* به عنوان ریسک فاکتور ایجاد کارسینوما در جمعیت کره‌ای شناخته شده است (۱۱). اهمیت وجود چند پلی‌مورفیسم از جمله تغییر در یک ناحیه ۲۸ نوکلئوتیدی در ناحیه تنظیمی 5'-UTR ژن *TYMS* (ناحیه TSER) و یک ناحیه حذف/اضافه به طول ۶ نوکلئوتید در 3'-UTR این ژن در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۲ بررسی شده است (۱۲).

miRNAها، مولکول‌های غیر کدکننده حدود ۲۰ تا ۲۴ نوکلئوتیدی هستند که بیان برخی ژن‌ها را در سطوح متفاوت رونویسی و ترجمه، از طریق برهمکنش با ناحیه اتصال خود در این ژن‌ها تنظیم می‌کنند. مطالعات جدید مولکولی انجام شده نقش و اهمیت مولکول‌های miRNA را در رابطه با ایجاد تغییرات ژنتیکی در سرطان به اثبات رسانیده است. امروزه نقش این مولکول‌ها به عنوان بیومارکرهای تشخیصی بسیار مورد توجه قرار گرفته است، تا جایی که در برخی مطالعات بر مبنای تغییر بیان آن‌ها تومورها را طبقه‌بندی می‌کنند (۱۳).

مربوطه اجرا شد. نمونه ها بر روی ژل آگارز (سیناژن، ایران) ۱ درصد بارگذاری شدند و میزان غلظت آن‌ها بررسی گردید. به منظور انجام واکنش تکثیر، پرایمرهای اختصاصی در غلظت مناسب ۱۰ پیکومول به همراه (۱/۵ میلی مول $MgCl_2$ Red master mix (آمپلیکون، UK) در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) استفاده شدند. دمای اتصال برای پرایمرهای مورد استفاده (۱۴)، بر اساس T_m در دمای ۶۴ درجه سانتی-گراد بهینه گردید. یک نمونه فاقد DNA به عنوان کنترل منفی واکنش تکثیر به کار گرفته شد. شکل ۱ محل اتصال پرایمرهای مورد استفاده را نشان می دهد. ترادف این پرایمرها در جدول ۱ ارائه شده است.



شکل ۱. موقعیت ژنومی ژن *TYMS* در پایگاه NCBI (A). نمایی شماتیک از محل اتصال پرایمرهای مورد استفاده در ناحیه تنظیمی *TYMS* (B). شکل C موقعیت آمپلیکون حاصل از تکثیر پرایمرهای مورد استفاده در ناحیه تنظیمی *TYMS* را در targetscan نشان می دهد

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7298>)

(http://www.targetscaan.org/vert_71)

جدول ۱. ترادف پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

ID پرایمر	توالی (5'-3')
TS 3'-UTR F	CAAATCTGAGGGAGCTGAGT
TS 3'-UTR R	CAGATAAGTGGCAGTACAGA

اجرای واکنش تکثیر

واکنش برش آنزیمی با استفاده از آنزیم

محدودکننده *NlaIII* (فرمتاز، USA) با افزودن ۱۰

هدف این مطالعه بررسی وجود تغییرات نوکلئوتیدی در ناحیه تنظیمی 3'-UTR ژن *TYMS*، مرتبط با ناحیه اتصال miR-433 در بیماران مبتلا به سرطان سینه در استان مرکزی است. این پژوهش به منظور دستیابی به ارتباط این تغییرات و برخی از ویژگی‌های دموگرافیکی نمونه‌های مورد مطالعه و دستیابی احتمالی به یک مارکر تشخیصی اجرا شد.

مواد و روش‌ها

بررسی‌های بیوانفورماتیکی

در دیتابانک NCBI و Ensemble خصوصیات

TYMS و ناحیه تنظیمی 3'-UTR آن از نظر طول، تعداد اگزون و اینترون‌ها و پروتئین کدکننده بررسی شد. miRNAهای متاثرکننده ناحیه تنظیمی *TYMS* توسط نرم افزارهایی مانند Targetscan و MIRWalk پیشگویی شد. هر نرم افزار بر اساس الگوریتمی اختصاصی پیشگویی را انجام می دهد. به منظور بررسی محل اثر آنزیم‌های برش مورد استفاده از نرم افزارهای Geneytx win5.0، Webcutter، و Mega 4.0 استفاده شد.

جمع آوری نمونه‌های بالینی

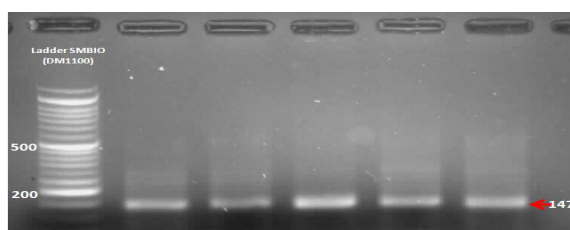
نمونه‌های خون استفاده شده از بیمارستان آیت الله خوانساری شهر اراک جمع آوری شد. از هر فرد ۳ سی سی خون جمع آوری و از بیماران فرم رضایت آگاهانه اخذ شد. در مجموع، اطلاعات کامل پاتولوژیک و کلینیکی ۳۰ نمونه سرطان سینه از نوع Invasive ductal carcinoma در قالب یک سری جداول دسته بندی گردید. سن افراد مورد مطالعه بین ۳۲ تا ۸۵ سال بود. درصد نمونه‌های با ER، PR، HER2 و متاستاز مثبت به ترتیب ۲۳/۵۲، ۲۳/۵۲، ۴۴/۱۱ و ۱۷/۶۴ بود.

اجرای واکنش تکثیر

استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج

(Cat No. s120796.PZP، ایران) بر اساس پروتکل

اندازه باندهای حاصل از الکتروفورز نشان دهنده صحت اجرای واکنش تکثیر و برش آنزیمی است. نمونه های DNA استخراج شده غلظت ۲۰ تا ۵۰ نانوگرم داشتند. شکل ۳ میزان محصول ۱۴۷ جفت بازی هوموزیگوت مرتبط با ناحیه تنظیمی ژن *TYMS* را با استفاده از پرایمرهای جدول ۱ نشان می دهد.



شکل ۳. محصول ۱۴۷ جفت بازی بر روی ژل آگارز ۱ درصد

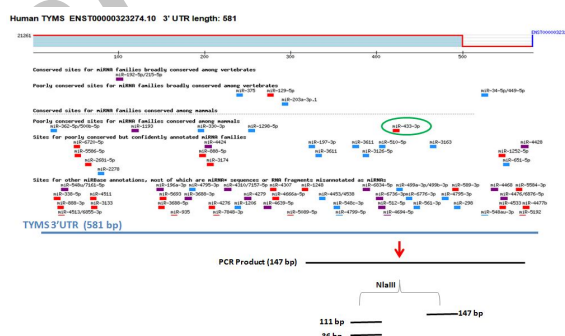
نتایج برش حاکی از تغییر نوکلئوتیدی در اکثر نمونه های توموری است.

محصول ۱۴۷ جفت بازی پس از اجرای پروتکل برش آنزیمی چندین الگوی باند را ایجاد نمود: حالت A (باند ۱۴۷ جفت باز، عدم برش) هوموزیگوت، حالت B (باندهای ۱۴۷، ۱۱۱ و ۳۶ جفت باز) هتروزیگوت، حالت C (باندهای ۱۱۱ و ۳۶ جفت باز) هوموزیگوت. این اطلاعات در جدول ۲ نشان داده شده است.

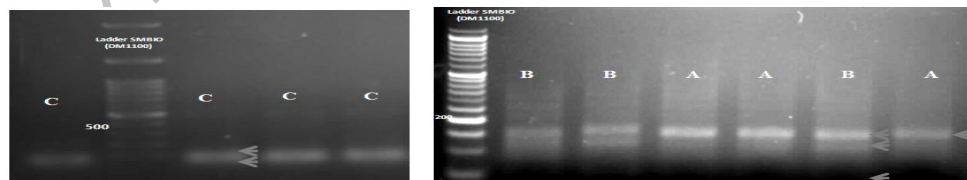
میکرولیتر محصول PCR (۱۵ نانوگرم)، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۱ میکرولیتر آنزیم و آب تا حجم ۲۰ میکرولیتر در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴ ساعت اجرا شد.

یافته ها

بررسی های بیوانفورماتیکی حاکی از محل اثر آنزیم استفاده شده در سایت اتصال miR-433 است. ژن *TYMS* حاوی ۱۷ اگزون می باشد و در موقعیت کروموزومی 18p11.32 قرار گرفته است. نتایج بررسی با نرم افزارهایی مانند MIRWalk و Targetscan نشان دهنده این بود که محصول PCR مربوط به فواصل ۳۸۹ تا ۵۳۹ جفت بازی از ناحیه تنظیمی ۵۸۱ جفت بازی از ژن *TYMS* است و محل اثر آنزیم برش *NlaIII* در ناحیه اتصال Hsa-miR-433-3p قرار دارد (شکل ۲).



شکل ۲. طرحی شماتیک از نرم افزار targetscan از ناحیه تنظیمی ژن *TYMS* و ناحیه اتصال miRNA ها. محل اثر آنزیم مورد مطالعه در ناحیه اتصال mir-433-3p نشان داده شده است.



شکل ۴. محصولات حاصل از برش آنزیمی با *NlaIII* چندین الگوی برش A، B و C ایجاد می کنند.

C در این ناحیه مانع از این برش آنزیمی می شود. توزیع ژنوتیپ ها در بین نمونه های سرطانی مورد مطالعه، ۳۱/۰۳

ناحیه شناسایی شده و برش داده شده توسط ناحیه شناسایی شده و برش داده شده توسط *NlaIII* 5'CATC3' می باشد. هرگونه تغییر در نوکلئوتید

معنی دار بود ($p < 0.05$). فراوانی الگوهای ذکر شده B و C در افراد نرمال به ترتیب ۵۵/۱ و ۴۴/۹ درصد بود. در افراد نرمال الگوی A مشاهده نشد.

درصد از نوع A، ۴۱/۳۷ درصد از نوع B و ۲۷/۵۸ درصد از نوع C بودند. در بین الگوهای بیان شده، ۶۰ درصد نمونه های با گرید بالاتر و حاوی متاستاز در بین نمونه های نوع A (عدم برش توسط آنزیم) بودند و این ارتباط از نظر آماری

جدول ۲. الگوی حاصل از برش توسط NlaIII و ژنوتایپ های مرتبط با این الگوها

p	بازه اطمینان	OR	بیماران(درصد)	ژنوتیپ	باند(bp)	الگوی واکنش برش	ردیف
$p < 0.05$	۲/۴۹۲۳ تا ۰/۷۲۷۵	۱/۳۴۶۵	۳۱/۰۳	هوموزیگوت AA	۱۴۷	الگوی A	۱
$p < 0.05$	۱/۲۳۳۴ تا ۰/۴۰۶۱	۰/۷۰۷۵	۴۱/۳۷	هتروزیگوت AC	۳۶، ۱۱۱، ۱۴۷	الگوی B	۲
$p < 0.05$	۶/۸۴۲۶ تا ۲/۲۲۸۶	۳/۹۰۵۱	۲۷/۵۸	هوموزیگوت CC (WT)	۱۱۱، ۳۶	الگوی C	۳

بحث

میزان شیوع سرطان سینه طی ۲۰ سال گذشته دو برابر شده است (۱۵). زمانی که سرطان سینه در مراحل اولیه تشخیص داده می شود اغلب قابل درمان است. روش های معمول تشخیصی سرطان سینه شامل ماموگرافی، سونوگرافی، MRI، بررسی بیوپسی، بررسی گیرنده های استروژن (ER) و پروژسترون (PR)، آزمایش HER2، آزمایشات ژنتیکی تومور، آزمایشات خون و بررسی نشانگرهای تومور در خون می باشد (۱۶). شناخت بهتر شبکه های ژنی و مسیرهای سلولی به بهبود درک ما از پاتوژنز سرطان سینه کمک می کند و وقایع جدیدی از پیشرفت روش های درمانی بیماران مبتلا به سرطان سینه ارائه می دهد (۱۷، ۱۸). یکی از مسیرهای پیام-رسان مرتبط با سرطان سینه مسیر بازجذب فولات است. این ماده در بدن انسان به مشتقات مختلفی متابولیزه شده که برای فرآیندهای همانندسازی، ترمیم و متیلاسیون ماده ژنتیکی ضروری هستند (۳، ۴). تغییر در ژن های مسیر پیام رسانی فولات از جمله ژن *TYMS* در اجرای این فرآیندها اثرگذار است. موقعیت کروموزومی p۱۸ این ژن در نواحی hotspot مرتبط با سرطان سینه قرار دارد (۱۹). سطوح بیان این ژن در مراحل مختلف تمایز و تکثیر برخی سرطان ها مانند آدنوکارسینوماهای ریه، متفاوت است. چندین فاکتور رونویسی و کیناز مرتبط با سیکل سلولی روی سطوح بیان این

ژن موثرند و منجر به افزایش بیان آن در فاز سنتز DNA چرخه سلولی می شوند (۱۰). اکثر مهارکننده های TS مانند ۵-فلورواوراسیل این آنزیم را توسط مکانیسم اتصال رقابتی برگشت ناپذیر مهار می کنند (۲۰، ۲۱). در برخی مطالعات مشخص شده است این مهارکننده در ترکیب با لوکوورین اثربخشی بیشتری در کاهش بیان ژن های آنکوژنی در سرطان گاستریک دارد (۲۲). فلورواوراسیل و مشتقات آن برای درمان برخی از سرطان های سینه در مراحل متاستاتیک نیز استفاده می شوند (۹). مشخص شده است که کاهش سطوح بیان TS منجر به پاسخدهی بهتر به فلورواوراسیل و افزایش میزان بقا در سرطان های کبد و کولون می گردد (۱۰). در انسان حدود چند صد نوع مولکول تنظیمی به نام miRNA شناسایی شده است. هر کدام از این مولکول ها در بافت های خاصی بیان شده و با مکانیسم تنظیمی خاص خود در تنظیم بیان برخی ژن ها نقش دارند. امروزه نقش این مولکول ها در شناسایی و درمان انواع سرطان بسیار مورد توجه قرار گرفته است. با وجود تلاش های گسترده، هنوز هم پتانسیل و مکانیسم این مولکول های تنظیمی به خوبی شناخته نشده است (۱۳، ۲۵-۲۳). در مطالعات متعدد نقش و اهمیت miRNAها در بیان ژن های وابسته به متاستاز سرطان سینه اثبات شده است (۲۶، ۲۷). در مطالعه حاضر با استفاده از بررسی های بیوانفورماتیکی، miRNAهای موثر بر ناحیه تنظیمی ژن

قرار گیرد. این در حالی است که تمام نمونه های سالم مورد مطالعه توسط آنزیم برش خوردند. ناحیه seed ناحیه شناسایی ژن هدف متشکل از نوکلئوتیدهای ۲ تا ۸ miRNA است که به 3'-UTR ژن هدف و در برخی موارد به ناحیه کد کننده متصل می شود (۲۳). در مطالعه حاضر با بررسی بیوانفورماتیکی مشخص شد که سایت برش آنزیم دقیقاً درون این ناحیه حفاظت شده ۸ نوکلئوتیدی قرار دارد. miRNA ها دو مکانیسم کاهش بیان شامل برش mRNA و توقف ترجمه دارند، هرچند علاوه بر نواحی تنظیمی UTR، اینترون ۱ ژن *TYMS* نیز حاوی تعداد سه ترادف GC است که قابلیت تنظیمی دارند (۲۴). با توجه به وجود ارتباط منطقی بین بیان یک miRNA و ژن هدف آن (۲۵)، در مطالعات بعدی می توان میزان بیان ژن miR-433-3p را در ارتباط با ژن هدف *TYMS* بررسی نمود. هرچند لازم است در مطالعات آتی میزان تغییر بیان این ژن در انواع دیگر سرطان و جمعیت های دیگر نیز مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد بررسی میزان تغییر در سایت اتصال miR-433-3p به ژن *TYMS*، با روش ساده برش آنزیمی می تواند به عنوان یک مارکر احتمالی تشخیصی در ارتباط با گرید توموری و وجود متاستاز نمونه های سرطانی سینه مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت تحقیقات و فن آوری و نیز مرکز تحقیقات بیماری های عفونی دانشگاه علوم پزشکی اراک به دلیل تأمین هزینه های مالی و پشتیبانی تجهیزات و امکانات و همچنین کلیه کسانی که مجریان را در انجام این پژوهش یاری نمودند، تشکر به عمل می آید.

منابع

1. National Institute for Health and Clinical Excellence (Great Britain). Early and locally

TYMS مشخص شد. یکی از این مولکول ها -miR-433-3p بود. miR-433-3p منجر به مهار رشد سلولی و افزایش حساسیت به شیمی درمانی در گلیومای انسانی می شود. هم چنین، این miRNA در فرآیند EMT منجر به مهار Creb در سرطان مثانه می گردد. در مطالعات متعدد وابستگی پلی-مورفیسم ها در سایت اتصال miRNA و تنوع در بیان ژن های وابسته به سرطان و اثرات احتمالی مثبت و منفی آن ها روی استعداد ابتلای جمعیت مورد مطالعه به سرطان بررسی شده است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد توزیع ژنوتیپ ها و فراوانی آللی در گروه بیمار و کنترل تفاوت معنی داری دارد. همان طور که در جدول ۲ بیان شده است، ژنوتیپ AA در گروه بیمار فراوانی بیشتری نسبت به گروه کنترل دارد. در افراد با این ژنوتیپ احتمال ابتلا به بیماری بیشتر است. از بین نمونه های سرطانی مورد مطالعه، بیشترین ژنوتیپ مربوط به الگوی برشی نوع B، ژنوتیپ هتروزیگوت با فراوانی ۴۱/۳۷ درصد بود.

فاکتورهای مولکولی و هیستولوژیکی تشخیصی سرطان سینه شامل سن، درجه و اندازه تومور، گره لنفی، وجود متاستاز، نوع هیستولوژیک و وضعیت گیرنده هورمونی آن است و در این مطالعه میزان ارتباط برخی از این عوامل مانند درجه تومور و وجود متاستاز با ژنوتیپ های ذکر شده بررسی گردید. نتایج نشان داد که ۶۰ درصد نمونه های حاوی متاستاز در بین نمونه های برش نخورده توسط آنزیم *NlaIII* بودند. این نمونه ها به دلیل تغییر در جایگاه اتصال آنزیم برش، توسط این آنزیم شناسایی نشده و برش نخورده اند. این جایگاه برش محل اتصال miR-433-3p است و احتمالاً در اثر ایجاد تغییر در نمونه های توموری با گرید بالاتر، این miRNA قادر به شناسایی آن و اتصال به جایگاه تنظیمی ژن *TYMS* و تنظیم به موقع آن نخواهد بود. این تغییر نوکلئوتیدی می تواند به عنوان یک مارکر تشخیصی احتمالی برای شناسایی متاستاز در نمونه های سرطان سینه مورد استفاده

- advanced breast cancer: diagnosis and treatment. National Institute for Health and Clinical Excellence; 2009.
2. Israyelyan AH. The development of molecular diagnostics for breast cancer.
 - 3- Assaraf YG. Molecular basis of antifolate resistance. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2007 Mar 1; 26(1):153-81.
 4. Behera RK, Nayak R. Expression Profiling of Nucleotide Metabolism-Related Genes in Human Breast Cancer Cells After Treatment with 5-Fluorouracil. *Cancer investigation*. 2009 Jan 1; 27(5):561-7.
 5. Cabibi D, Calascibetta A, Martorana A, Campione M, Barresi E, Rausa L, Aragona F, Sanguedolce R. Different expression of thymidylate synthase in primary tumour and metastatic nodes in breast cancer patients. *Anticancer research*. 2007 Jul 1; 27(4B):2227-30.
 6. García V, García JM, Peña C, Silva J, Domínguez G, Lorenzo Y, Diaz R, Espinosa P, de Sola JG, Cantos B, Bonilla F. Free circulating mRNA in plasma from breast cancer patients and clinical outcome. *Cancer letters*. 2008 May 18; 263(2):312-20.
 7. Grossi F, Dal Bello MG, Salvi S, Puzone R, Pfeffer U, Fontana V, Alama A, Rijavec E, Barletta G, Genova C, Sini C. Expression of ribonucleotide reductase subunit-2 and thymidylate synthase correlates with poor prognosis in patients with resected stages I-III non-small cell lung cancer. *Disease markers*. 2015 Nov 17; 2015.
 8. Le Francois BG, Maroun JA, Birnboim HC. Expression of thymidylate synthase in human cells is an early G1 event regulated by CDK4 and p16INK4A but not E2F. *British journal of cancer*. 2007 Nov 5; 97(9):1242-50.
 9. Fujishima M, Inui H, Hashimoto Y, Azumi T, Yamamoto N, Kato H, Hojo T, Yamato M, Matsunami N, Shiozaki H, Watatani M. Relationship between thymidylate synthase (TYMS) gene polymorphism and TYMS protein levels in patients with high-risk breast cancer. *Anticancer research*. 2010 Oct 1; 30(10):4373-9.
 10. Peters GJ, Backus HH, Freemantle S, Van Triest B, Codacci-Pisanelli G, Van der Wilt CL, Smid K, Lunec J, Calvert AH, Marsh S, McLeod HL. Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2002 Jul 18; 1587(2):194-205.
 11. Ko KH, Kim NK, Yim DJ, Hong SP, Park PW, Rim KS, Kim S, Hwang SG. Polymorphisms of 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T) and thymidylate synthase enhancer region (TSER) as a risk factor of cholangiocarcinoma in a Korean population. *Anticancer research*. 2006 Nov 1; 26(6B):4229-33.
 12. Zhao HY, Huang H, Hu ZH, Huang Y, Lin SX, Tian Y, Lin TY. Evaluations of biomarkers associated with sensitivity to 5-fluorouracil and taxanes for recurrent/advanced breast cancer patients treated with capecitabine-based first-line chemotherapy. *Anti-cancer drugs*. 2012 Jun 1; 23(5):534-42.
 13. Tanic M, Yanowsky K, Rodriguez-Antona C, Andrés R, Márquez-Rodas I, Osorio A, Benitez J, Martinez-Delgado B. Deregulated miRNAs in hereditary breast cancer revealed a role for miR-30c in regulating KRAS oncogene. *PloS one*. 2012 Jun 11; 7(6):e38847
 14. Kumamoto K, Ishibashi K, Okada N, Tajima Y, Kuwabara K, Kumagai Y, Baba H, Haga N, Ishida H. Polymorphisms of GSTP1, ERCC2 and TS-3'UTR are associated with the clinical outcome of mFOLFOX6 in colorectal cancer patients. *Oncology letters*. 2013 Sep 1; 6(3):648-54.
 15. McCafferty MP, Healy NA, Kerin MJ. Breast cancer subtypes and molecular biomarkers. *Diagnostic Histopathology*. 2009 Oct 31; 15(10):485-9.
 16. Joensuu K. Tumor Dormancy in Breast Cancer. *Academic Dissertation* 2012.
 17. Natarajan A, Venugopal SK. Translational Research on Breast Cancer: miRNA, siRNA and Immunoconjugates in Conjugation with Nanotechnology for Clinical Studies. *InBreast*

Cancer-Recent Advances in Biology, Imaging and Therapeutics 2011. InTech.

18. Guille A, Chaffanet M, Birnbaum D. Signaling pathway switch in breast cancer. *Cancer cell international*. 2013 Jun 27; 13(1):66.

19. Kaneda S, Nalbantoglu J, Takeishi K, Shimizu K, Gotoh O, Seno T, Ayusawa D. Structural and functional analysis of the human thymidylate synthase gene. *Journal of Biological Chemistry*. 1990 Nov 25; 265(33):20277-84.

20. Papamichael D. The use of thymidylate synthase inhibitors in the treatment of advanced colorectal cancer: current status. *Stem Cells*. 2000 May 1; 18(3):166-75.

22. Nicolini A, Conte M, Rossi G, Ferrari P, Duffy M, Barak V, Carpi A, Miccoli P. Additional 5-FU-LV significantly increases survival in gastrointestinal cancer. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*. 2011; 3:1475-82.

23. Hamfjord J, Stangeland AM, Hughes T, Skrede ML, Tveit KM, Ikdahl T, Kure EH.

Differential expression of miRNAs in colorectal cancer: comparison of paired tumor tissue and adjacent normal mucosa using high-throughput sequencing. *PloS one*. 2012 Apr 17; 7(4):e34150.

24. Martinez-Sanchez A, Murphy CL. MicroRNA target identification—experimental approaches. *Biology*. 2013 Jan 25; 2(1):189-205.

25. Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, Thomson JA, Kosik KS. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell*. 2009 May 15; 137(4):647-58.

26. Ahmadi A, Khansarinejad B, Hosseinkhani S, Ghanei M, Mowla SJ. miR-199a-5p and miR-495 target GRP78 within UPR pathway of lung cancer. *Gene*. 2017 Jul 15; 620:15-22.

27. Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, Spiteri I, Chin SF, Dunning MJ, Barbosa-Morais NL, Teschendorff AE, Green AR, Ellis IO, Tavaré S. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome biology*. 2007 Oct 8; 8(10):R214.