

The Role of MicroRNA-429 in E2F3 Expression in Breast Cancer Cell Lines

Saeedeh Darvishi¹,
Nahid Atyabi²,
Arshad Hosseini^{3,4},
Pouria Omid⁵,
Farhad Zaker⁶,
Arash Ghalyanchi Langeroudi⁷,
Siavash Moradi⁸

¹ PhD Student in Clinical Pathology, Department of Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

² Professor, Department of Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

³ Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology, School of Allied Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁵ MSc Student in Medical Biotechnology, School of Allied Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁶ Professor, Department of Hematology, School of Allied Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁷ Associate Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

⁸ Assistant Professor, Gastrointestinal Cancer Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received February 7, 2018 ; Accepted November 6, 2018)

Abstract

Background and purpose: MicroRNA regulation of cancer-related pathways has a major effect on cancer development. MiR-429 is a member of miR-200 family with an important role in metastasis. There are many studies on the association between miR-429 and liver, bladder, bowel, and gastric cancers. In this study, we investigated the expression changes of E2F3 genes after transfection of MCF-7 cells using pre-miR-429 and anti-miR-429 as the potential targets of miR-429.

Materials and methods: In this experimental study, E2F3 was predicted as the potential target of miR-429 using miRNA bioinformatics tools. MCF-7 cells were then transfected with both mir-429 precursor and inhibitory vectors. RNA extraction and cDNA synthesis were done after 48 hr. Expression of miR-429 and target gene were determined by qRT-PCR.

Results: The comparison between the results of untransfected cells group, transfected with pre-miR-429 group, and transfected with anti-miR-429 group showed that down-regulation of miR-429, increased the expression level of E2F3 in cells transfected with miR-429 inhibitory vector (9.38 folds). Expression level of E2F3 decreased in cells transfected with pre-miR-429 vector (5.3 folds).

Conclusion: Low expression level of miR-429 in breast cancer was found to be effective in bone metastasis, although in ovarian cancer and colorectal carcinoma, resulted in decreasing invasion and matastasis. In current study, the expression level of E2F3 decreased when transfected with pre-miR-429 vector and increased when transfected with anti-miR-429 vector, therefore, miR-429 could be a potential target in breast cancer therapy.

Keywords: breast cancer, MCF-7, miR-429, E2F3

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 28 (168): 29-39 (Persian).

* **Corresponding Author:** Arshad Hosseini - School of Allied Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, IR Iran. (E-mail: hoseini.a@iums.ac.ir)

بررسی نقش miR-429 با میزان بیان ژن *E2F3* در رده سرطان پستان

سعیده درویشی^۱
 ناهید اطمینانی^۲
 ارشد حسینی^{۳،۴}
 پوریا امیدی^۵
 فرهاد ذاکر^۶
 آرش قلیانچی لنگرودی^۷
 سیاوش مرادی^۸

چکیده

سابقه و هدف: یکی از عوامل کنترل کننده بسیاری از اجزای سلولی و عملکرد های بیولوژیک در سطح اپی ژنتیک، MicroRNA ها می باشند. miR-429 جزو خانواده miR-200 بوده و در متاستاز سرطان دخالت دارد. مطالعات بسیاری ارتباط miR-429 را با سرطان کبد، مثانه، روده و معده بررسی کرده اند. این مطالعه با هدف تغییر بیان ژن *E2F3* پس از ترانسفکت کردن سلول های MCF-7 با وکتورهای pre-miR-429 و anti-miR-429 به عنوان هدف احتمالی miR-429 انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، با استفاده از پایگاه های داده miR و ابزار های بیوانفورماتیکی *E2F3* به عنوان هدف miR-429 پیش بینی شد. سپس سلول های MCF-7 با دو وکتور pre-miR-429 و anti-miR-429 ترانسفکت شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت، استخراج RNA و سنتز cDNA انجام شد. میزان بیان miR-429 و ژن هدف با استفاده از روش Real-Time PCR بررسی شد.

یافته ها: نتایج حاصل از مقایسه گروه سلول های ترانسفکت نشده، ترانسفکت شده با pre-miR-429 و ترانسفکت شده با anti-miR-429 نشان دهنده افزایش بیان ژن هدف در اثر ترانسفکشن با anti-miR-429 (۹/۳۸ برابر) و کاهش بیان در اثر ترانسفکشن با pre-miR-429 می باشد (۵/۳ برابر).

استنتاج: کاهش بیان miR-429 در متاستاز به استخوان در سرطان پستان نقش داشته و در تومور تخمدان و کارسینومای کولورکتال کاهش بیان آن باعث کاهش متاستاز و تهاجم می گردد. در مطالعه حاضر نشان داده شد که میزان بیان *E2F3* در اثر ترانسفکت با pre-miR-429 کاهش و با anti-miR-429 افزایش می یابد، بنابراین miR-429 می تواند به عنوان ساپرس کننده تومور در سرطان پستان از طریق مهار *E2F3* عمل کند.

واژه های کلیدی: سرطان پستان، MCF7، miR-429، ژن *E2F3*

مقدمه

شایعترین سرطان در میان زنان ایرانی، سرطان پستان می باشد. میزان شیوع این بیماری از سال ۱۹۸۰ به بعد در ایران افزایش چشمگیری داشته است به طوری که نرخ رشد آن نسبت به کشورهای غربی بیش تر می باشد (۱). میزان

E-mail:hoseini.a@iums.ac.ir

مؤلف مسئول: ارشد حسینی - تهران: بزرگراه همت غرب، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پیراپزشکی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی

۱. دانشجوی دکتری تخصصی کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، گروه کلینیکال پاتولوژی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲. استاد، گروه کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳. استادیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۴. استادیار، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۵. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۶. استاد، گروه همانولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران

۷. دانشیار، گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده ی دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۸. استادیار، مرکز تحقیقات سرطان دستگاه گوارش، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

© تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۶/۱۱/۸ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۱۵/۱۵

بیماری مورد توجه قرار گیرد. می‌توان با بررسی ارتباط miR-429 با ژن‌هایی که به عنوان ژن هدف در مطالعات بیوانفورماتیک پیش‌بینی شده‌اند، به بررسی عملکرد این miRNA در بسیاری از فرآیندهای تنظیمی سلولی که در طی سرطان پستان رخ می‌دهد پرداخت. از طرفی در زمینه اهمیت انتخاب پروسه درمانی مناسب در سرطان پستان مشکلات فراوانی وجود دارد و عوارض برخی روش‌های درمانی و همچنین قیمت بسیار بالای برخی داروها، پروسه درمان را مشکل می‌کند. دسته‌بندی‌های رایج در جهت درمان بیماری هنوز در ایران چندان جای نیفتاده و به شکل یکنواختی در درمان بیماری به کار گرفته نمی‌شود. تاکنون مطالعه‌ای در این خصوص و با بررسی بیان بیومارکرهای مورد استفاده در سطح mRNA و پروتئین صورت نگرفته است. از miRNA ها در حیطه تحقیقات پزشکی، خصوصاً در زمینه سرطان استفاده‌های زیادی می‌شود. تشخیص بر مبنای پروفایل بیانی miRNA و طراحی داروهای هدفمند بر پایه miRNA نیز از جمله این موارد می‌باشد. نقش دو گانه miR-200 در سرطان پستان اولیه و متاستاز شده از جذابیت‌های آن برای درمان‌های آینده می‌باشد که درک فعل و انفعالات داخلی و اثرات متقابل آن را به‌طور جزئی‌تر دارای اهمیت می‌کند. خانواده miR-200 دارای پنج عضو miR-200a، miR-200b، miR-200c، miR-429 و miR-141 می‌باشد. براساس محل قرارگیری هر کدام از microRNA های خانواده ۲۰۰، این microRNA ها به دو گروه تقسیم‌بندی می‌شوند. miR-200a، miR-200b و mir-429 که بر روی کروموزوم 1p36، و miR-200c و miR-141 بر روی کروموزوم 12p13 قرار گرفته‌اند. اولین گزارشی که در آن به ارتباط بین miR-200 و بیماری در انسان اشاره شد، مربوط به الگوی بیانی سلول‌های عصبی مربوط به بویایی بوده است. پس از آن دیده شد که در طی بدخیمی‌های توموری، miR-200 به عنوان یک عامل بازدارنده کلیدی برای متاستاز و جلوگیری از انتقال حالت سلول‌های اپی‌تلیالی به

بروز سرطان پستان در ایران ۲۵ زن در هر ۱۰۰ هزار زن بوده و هر ساله ۷۵۰۰ مورد جدید ابتلا به این سرطان گزارش شده است (۴-۲). سرطان پستان بر اساس الگوهای مختلف بیان ژنی به چهار گروه تقسیم می‌شود. این چهار گروه شامل، دسته‌ای که در آن گیرنده استروژن بیان می‌شود که به نوع لومینال A شناخته می‌شود، گروهی که گیرنده استروژن در آن بیان می‌شود اما سطح گیرنده هورمونی پایینی داشته و به نام لومینال B شناخته می‌شود، گروهی که در آن گیرنده HER2 بیان می‌شود و گروهی که در آن هیچ یک از گیرنده‌های استروژن، پروسترون و HER2 بیان نمی‌شود و از نظر داشتن هر سه گیرنده، منفی است، می‌باشد. سرطان به عنوان یک بیماری ژنتیکی پیچیده شناخته شده است که در آن بسیاری از مکانیسم‌ها چه در سطح ژنتیک و چه در سطح اپی‌ژنتیک نقش دارند. از مکانیسم‌های کنترل اپی ژنتیکی می‌توان از توالی‌های کوتاه غیر کدکننده RNA که microRNA ها نیز نامیده می‌شوند، یاد کرد. microRNA ها با کنترلی که پس از انجام فرآیند رونویسی بر روی کل محتوای رونوشت ژن‌ها دارند می‌توانند در بسیاری از پروسه‌ها سرطان را به سمت بدخیمی یا بالعکس ببرد. microRNA ها می‌توانند در تغییر سیکل سلولی، آپوپتوز، مقاومت دارویی، تاثیر در محیط اطراف تومور، اثرات قابل توجهی در سرنوشت سلول‌های سرطانی داشته باشند. گفته می‌شود که تنظیم بیان ۳۰ درصد از ژن‌های کدکننده پروتئین پس از ترجمه توسط RNA غیر کدکننده صورت می‌گیرد (۵). ۵۰ درصد از ژن‌های microRNA در ناحیه ژنومی مربوط به سرطان قرار دارد و این یافته حاکی از آن است که microRNA ها می‌توانند در زیست‌شناسی سرطان نقش بسیار پررنگی داشته باشند (۶). با توجه به این که سرطان پستان شایع‌ترین نوع سرطان انسان و حیوان است، به‌طوری که سالیانه موارد متعدد و جدیدی از این بیماری در جهان تشخیص داده می‌شود، ضروری است نقش mRNA ها و مطرح شدن ژن‌های جدید و نقش آن‌ها در ایجاد و دسته‌بندی این

شد. هر چند میزان تغییر بیان miR-141 و miR-200C نتایج متفاوتی داشت اما نشان داده شد که در هر صورت در بیماران مبتلا به سرطان پستان این دو miRNA نقش کنترلی داشته‌اند و میزان آن‌ها با چگونگی پیشرفت سرطان پستان ارتباط مستقیمی داشته است (۱۰). اولین گزارشی که ارتباط mir-200 را با cancer stem cell نشان داد در سال ۲۰۰۹ بود که در این مطالعه Shimono و همکاران در بررسی میزان بیان ۳۷ نوع miRNA در سلول‌های بنیادی سرطانی پستان و همچنین سلول‌های سرطانی غیر تومور زا نشان دادند که بیان هر ۵ عضو خانواده miR-200 در سلول‌های بنیادی سرطانی پستان، سلول‌های عادی شیری انسانی و موشی کاهش یافته است و miR-200 در جلوگیری از ایجاد سلول‌های سرطانی پستان و سلول‌های سرطانی جنینی نقش بسزایی دارد (۹). در مطالعه شکرالله زاده و همکاران، افزایش بیان معنی‌دار E2F3 به میزان ۶/۷ برابر با کاهش بیان miR-141 پس از ترانسفکت با anti-miR-141 نشان داده شد (۱۲). با توجه به موارد ذکر شده، مطالعه حاضر با هدف بررسی نقش miR-429 با میزان بیان ژن E2F3 در رده سرطان پستان، انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

کشت سلول‌های MCF-7

در این مطالعه تجربی، سل لاین MCF7 (رده سلولی انسانی آدنوکارسینوما پستان) سلول‌ها در محیط DMEM-F12 که حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو و ۳۵ درصد سانتی‌گراد و آتمسفر مرطوب حاوی ۵ درصد کربن دی‌اکسید بود کشت داده شدند. سلول‌ها با غلظت $10^4 \times 10^4$ در یک پلیت ۲۴ خانه‌ای به مدت ۲۴ ساعت قبل از انتقال قرار داده شد.

وکتور بازدارنده miRNA-429 و پیش‌ساز miRNA-429 وکتور بازدارنده و پیش‌ساز و ماک به صورت آماده از شرکت abm-goods کانادا خریداری گردید. این وکتور از نوع لنتی ویروسی می‌باشد که برای کاهش

مزانشیمی یا EMT می‌شود. به علاوه، miR-200 دارای توانایی بازدارندگی نوزایی سلول‌های سرطانی شبه بنیادی و همچنین بازدارندگی از مقاومت به شیمی درمانی می‌باشد (۷-۹). miR-429 جزو خانواده miR-200 می‌باشد و نقش مهمی در پروگنوز تومور دارد. ژن‌های این خانواده در پیشرفت و متاستاز تومور، در جایی که EMT (Epithelial Mesenchymal Transition) رخ می‌دهد، به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. miR-429 در هپاتوسلولار سل کارسینوما باعث افزایش تکثیر سلولی و مهار آپوپتوز شده و در آن افزایش بیان داریم. بنابراین ساپرس شدن بیان miR-429 باعث ممانعت از تکثیر سلولی و تحریک آپوپتوز سلولی می‌شود. miR-429 دارای نقش دوگانه در تومور می‌باشد و نقش‌های متفاوت miR-429 در انواع مختلف سرطان‌ها ممکن است به علت تفاوت در ژن‌های هدف و نوع سلول باشد. بر اساس مطالعات گوناگون، miR-429 در سرطان‌های pancreatic، gastric، colorectal، ductal adenocarcinoma نقش انکوژنیک دارد و در آن‌ها ژن‌های c-myc، Ep-300، Sox-2 را هدف قرار می‌دهد (۱۰). miR-429 در سرطان پستان می‌تواند این سرطان را ساپرس کند. بیان این miR در cancer stem cell کاهش می‌یابد و هم‌اکنون اعضای miR-200 در آن‌جا که رده سلولی MCF-7 دارای گیرنده ER می‌باشد، مطالعات زیادی اثرات مقاومت به داروهای ضد استروژنی را با مواجه قرار دادن این رده سلولی با تاموکسیفن و داروهای هم‌خانواده آن مثل رلوکسیفن مورد سوال قرار داده‌اند. بررسی miRNA در نمونه‌های بافتی و خون بیماران می‌تواند اطلاعات بسیار مفیدی در مورد پیش‌آگهی و پیشرفت سرطان در اختیار قرار دهد. در مورد سرطان پستان در مطالعه Antolin و همکاران بر روی ۵۷ بیمار مبتلا به درجه ۴ سرطان پستان و مقایسه آن‌ها با ۲۰ نمونه کنترل، میزان بیان miR-141 و miR-200C گردشی در خون با روش Real-timePCR اندازه‌گیری

۳۹۵ نانومتر تحریک می‌شود و انرژی الکترون‌های آن به تراز بالاتری برده می‌شود تا این که در طول موج ۵۰۷ نانومتر از خود تابش سبز رنگی را ساطع کرده که در زیر میکروسکوپ با استفاده از فیلتر ۳۹۵ نانومتر دیده می‌شود.

تست MTT

سلول‌های سرطان سینه در یک پلیت ۹۶ خانه ای قرار داده شدند. این تست ۴۸ ساعت بعد از انتقال و کتورها انجام شد. $100 \mu\text{l}$ از محلول MTT که حاوی 5 mg/ml (سوبسترای فورمازان) می‌باشد درون هر چاهک ریخته و ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از خارج کردن مایع MTT، و با اضافه کردن $200 \mu\text{l}$ ایزوپروپانول که حاوی اسید هیدروکلریک 0.4 M می‌باشد، به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه گردید. جذب رنگ بنفش ایجاد شده در هر چاهک در 450 nm با استفاده از microplate reader اندازه گیری شد.

استخراج RNA سنتز cDNA و Real-Time qRT-PCR

کارایی ترانسفکشن پس از ۴۸ ساعت چک شد و به منظور تغییر بیان ژن هدف توسط ورود و کتور جدید به سلول، RNA توتال سلول توسط کیت استخراج RNA ی GeneAll (korea) استخراج شد. سنتز cDNA برای miRNA توسط پرایمرهای stem-loop در کیت (biorbyte, England) انجام شد و جهت بررسی تغییر میزان بیان mir از کیت اختصاصی Real-Time PCR (biorbyte, England) حاوی پرایمرهای اختصاصی این microRNA استفاده گردید. علاوه بر چک کردن میزان بیان mir با استفاده از روش Real-Time qRT-PCR microRNA استفاده گردید. علاوه بر چک کردن میزان تغییر بیان ژن هدف نیز در هر دو گروه از سلول‌های ترانسفکت شده و تیمار نشده بررسی شد. جهت سنتز cDNA برای ژن هدف از کیت یکتا تجهیز آزما (ایران) استفاده شد و Real-Time qRT-PCR توسط SYBR® Premix Ex Taq™ IITaKaRa (Japan) انجام شد. در پایان تغییر میزان بیان ژن‌ها با استفاده از متد ΔCt تحلیل شد. توالی پرایمر مربوط به ژن هدف در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

بیان miRNA با اتصال به ناحیه 3P و یا 5P طراحی شده است. از سویه Top10 برای تکثیر و انجام ترانسفورماسیون و کتور استفاده گردید. پس از انجام واکنش ترانسفورماسیون جهت اطمینان از انتقال پلاسمید به باکتری، پلاسمیدهای نو ترکیب با استفاده از کیت استخراج پلاسمید استخراج شده و اندازه آن‌ها با ژل الکتروفوز آگارز مشخص و تایید گردید. محلول حاصل از استخراج پلاسمید توسط دستگاه نانو دراپ تعیین غلظت شد.

ترانسفکشن موقت سلول

برای انجام ترانسفکشن با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰، سلول‌های MCF-7 در پلیت ۲۴ خانه seed شدند. از آنجایی که آنتی‌بیوتیک یک عامل ممانعت کننده برای ترانسفکشن می‌باشد، در هنگام seed کردن سلول‌ها از محیط کامل حاوی FBS ۲۰ درصد بدون آنتی‌بیوتیک استفاده شد. ۲۴ ساعت قبل از ترانسفکشن، ۱۰۰۰۰ سلول را در پلیت ۲۴ خانه Seed گردید. confluency سلول‌ها در روز ترانسفکشن باید بین ۹۰ تا ۹۵ درصد باشد. جهت انجام ترانسفکشن، در یک میکروتیوب $50 \mu\text{l}$ DMEM بدون سرم و بدون آنتی‌بیوتیک ریخته شد. سپس $2 \mu\text{l}$ از لیپوفکتامین به آن اضافه گردید. در میکروتیوب دوم نیز $50 \mu\text{l}$ DMEM بدون سرم و بدون آنتی‌بیوتیک ریخته شد. $1 \mu\text{g}$ از وکتور به محیط اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از ۵ دقیقه محلول حاوی DNA را با محلول حاوی لیپوفکتامین مخلوط کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید تا DNA و لیپوفکتامین در این زمان به خوبی باهم برهمکنش داشته باشند. سپس $100 \mu\text{l}$ از مخلوط موجود در میکروتیوب‌ها به هر چاهک اضافه گردید. ۶-۴ ساعت بعد از تعویض محیط آن و جایگزینی با محیط حاوی FBS، در انکوباتور قرار داده شد. کارایی ترانسفکشن بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن با استفاده از بررسی میزان فلورسنس حاصل از GFP بررسی شد. و کتورهای استفاده شده در این مطالعه دارای توالی GFP می‌باشند. GFP در طول موج

جدول شماره ۱: توالی و خصوصیات پرایمر ژن E2F3

	Sequence (5'-3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	GCCTGACTCAATAGAGAGCCTAC	۲۳	۵۹/۹۹	۵۲/۱۷
Reverse primer	AGTCTTTGGAAGCGGGTTTAGG	۲۲	۶۰/۵۵	۵۰/۰۰
Product length		۱۵۵		
Exon junction	1326/1327 (forward primer) on template NM_001949.4			

ترانسفکشن سلول

تصویر فلورسنت و تصویر نوری سلول MCF-7 ترانسفکت شده با وکتور anti-miR-429 و همچنین وکتور pre-miR-429 سیگنال‌های حاصل از پروتئین GFP را نشان می‌دهد. از آنجا که قطعه مورد نظر در این مطالعه با این پروتئین فیوز شده است، می‌توان نتیجه گرفت که عملیات ترانسفکشن با موفقیت انجام شده و سلول‌های MCF-7 این توالی را بیان کرده‌اند (تصویر شماره ۱).

تغییر بیان miR-429 پس از ترانسفکشن سلول MCF-7 این مطالعه بر روی سلول‌های MCF-7 در سه گروه انجام شد که شامل، گروه اول سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور پیش‌ساز miR-429، گروه دوم سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور بازدارنده miR-429 و گروه سوم سلول‌های ترانسفکت نشده به عنوان گروه کنترل، می‌باشد. سلول‌های MCF-7، ترانسفکت شدند و پس از استخراج RNA و سنتز cDNA میزان بیان miR-429 در هر سه گروه سلول با استفاده از Real-Time PCR سنجیده شد. تغییرات میزان بیان miR-429 در سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور بازدارنده miR-429 نسبت به گروه کنترل با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ کاهش ۶/۷ برابری را نشان داد. از طرفی، با استفاده از آزمون آماری مربع کای دو در مقایسه تغییرات میزان بیان بین دو گروه سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور بازدارنده miR-429 و گروه کنترل که ترانسفکت نشده، تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($p < 0/05$). در مورد سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور پیش‌ساز miR-429 نسبت به گروه کنترل نتایج نشان داد که میزان بیان miR-429 در این سلول‌ها افزایش داشته است و با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ افزایش ۴/۲ برابری بوده است. سیگنال مثبت نیز دیده شده است و این افزایش بیان، معنادار بود ($p < 0/05$). نمودار شماره ۱، تغییرات بیان miR-429 در سه گروه ترانسفکت شده با وکتور پیش‌ساز و مهارکننده miRNA و گروه کنترل را نشان می‌دهد.

بررسی‌های بیوانفورماتیک جهت تعیین ژن هدف و آنالیزهای آماری

از پایگاه‌های داده میکرو RNA و ابزارهای بیوانفورماتیکی (miRWalk، miRBASE، miRMap، miRanda و TargetScan) به منظور تعیین پیش‌بینی ژن‌های هدف miRNA-429 استفاده گردید و E2F3 به عنوان هدف miR-429 پیش‌بینی شد. در مقایسه بیان ژن از محاسبه با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد و میزان فولدینگ گزارش گردید. تفاوت معنی‌دار بین میزان بیان ژن‌ها با آزمون کای اسکوئر و با مقایسه با گروه کنترل، منفی می‌باشد.

یافته‌ها

پیش‌بینی ژن هدف توسط پایگاه‌های داده و ابزارهای بیوانفورماتیک

در این مطالعه با استفاده از پایگاه‌های داده و ابزارهای بیوانفورماتیک ژن‌هایی که احتمال دارند با miR-429 کنترل شوند، پیش‌بینی شده‌اند. در جدول شماره ۲، نحوه اتصال seed در ژن هدف مورد نظر، miR-429 و همچنین محل اتصال آن‌ها به صورت گرافیک نمایش داده شده است. لازم به ذکر است که این اطلاعات از پایگاه داده Target scan استخراج گردید.

ترانسفورمیشن برای وکتورهای وکتور بازدارنده و تحریک کننده mir-429

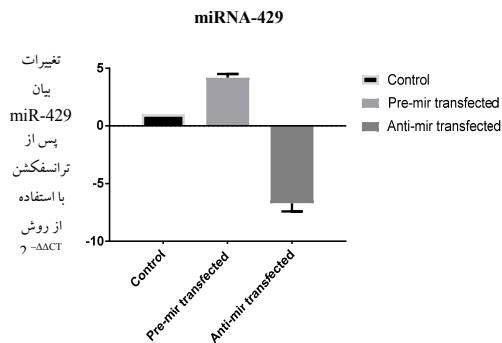
بر روی محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین، باکتری‌های دریافت کننده ی وکتور رشد کرده است. کلونی‌هایی که به صورت تکی در پلیت هستند برای استخراج برداشته شد.

جدول شماره ۲: نحوه اتصال ژن‌های پیش‌بینی شده و miR-429

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type
Position 2436-2442 of E2F3 3' UTR hsa-miR-429	5' ...AGUGGGUAGUACUACAGUAAUU... 3' UGCCAAAUGGUCU-GUCAUAAU	7mer-m8
Position 2857-2863 of E2F3 3' UTR hsa-miR-429	5' ...CUGUAAAUAUUUUGCAGUAAUU... 3' UGCCAAAUGGUCUGUCAUAAU	7mer-m8

* 7mer-m8: An exact match to positions 2-8 of the mature miRNA (the seed + position 8)

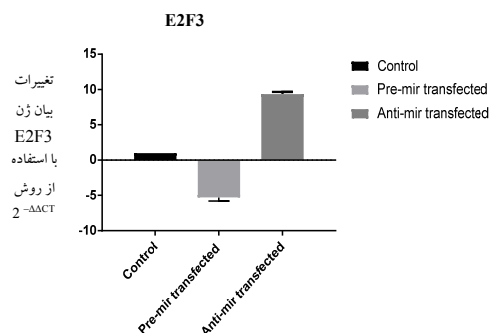
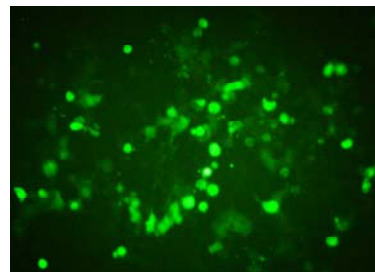
** 8 mer: An exact match to positions 2-8 of the mature miRNA (the seed + position 8) followed by an 'A'



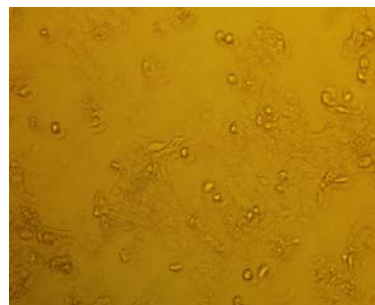
نمودار شماره ۱: تغییرات بیان miR-429 در سه گروه ترانسفکت شده با وکتور پیش ساز و مهار کننده ی miRNA و گروه کنترل

ارتباط بیان ژن *E2F3* و miR-429

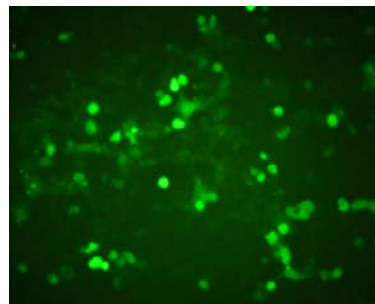
برای بررسی تغییر بیان ژن تست Real-Time PCR به صورت سه بار تکرار انجام شد. CT ژن *E2F3* در اثر ترانسفکشن با anti-miR-429 کاهش یافت که این کاهش معنی دار است (افزایش بیان ژن به میزان ۹/۳۸ برابر) ($p < 0/05$). در سلول‌های ترانسفکت شده با pre-miR-429 نسبت به گروه کنترل، کاهش معنی دار در بیان ژن *E2F3* پس از ترانسفکشن مشاهده شد (۵/۳ برابر) (نمودار شماره ۲).

نمودار شماره ۲: تغییرات بیان ژن *E2F3* در هر سه گروه سلول MCF-7

الف



ب



ج

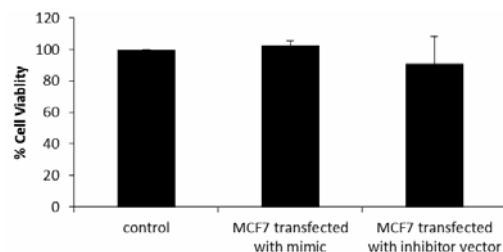


د

تصویر شماره ۱: الف: تصویر فلورسنت سلول MCF-7 ترانسفکت شده با وکتور anti-miR-429، ب: تصویر نوری منطبق بر شان قبلی، ج: تصویر فلورسنت سلول MCF-7 ترانسفکت شده با وکتور pre-miR-429، د: تصویر نوری منطبق بر شان قبلی

داروها در مراحل پیش کلینیکی ارائه داده است. به علاوه، در نواحی غیر کدکننده، علاوه بر miRNA ها توالی‌های دیگری مثل LncRNA یا توالی طویل غیر کدکننده نیز دیده می‌شوند. به طور مثال گفته می‌شود که برخی از ژن‌ها در نتیجه‌ی برهمکنش یک miRNA و LncRNA می‌توانند یک ژن را مورد هدف قرار دهند. در مطالعه حاضر که بر روی رده سلولی MCF-7 انجام گرفته است، ابتدا با استفاده از پایگاه‌های داده‌ی miRNA و ابزارهای بیوانفورماتیک ژن *E2F3* به عنوان هدف احتمالی این miRNA در نظر گرفته شد و بیان miR-429 و ژن‌های هدف سه گروه سلول ترنسفکت شده با وکتور پیش ساز miR-429، بازدارنده‌ی miR-429 و سلول‌های ترنسفکت نشده به عنوان کنترل اندازه گیری شده است. مطالعات دیگری میزان بیان این miRNA را در رده‌ی سلولی MCF-7 سنجیده‌اند، اما هدف آن‌ها یا مقایسه‌ی پروفایل بیانی miR-429 با سایر miRNA ها و یا مقایسه‌ی آن با رده‌های مقاوم به دارو بوده است. همچنین مطالعاتی به صورت موردی ارتباط ژن *E2F3* را با miR-429 نشان داده‌اند. تفاوت این مطالعات با مطالعه‌ی حاضر انتخاب رده‌ی سلولی و نوع سرطان می‌باشد. E2F، نام یک خانواده از فاکتورهای رونویسی می‌باشد که در کنترل چرخه سلولی نقش دارد. این خانواده از فاکتورهای رونویسی، دارای ۹ پروتئین *E2F1*، *E2F2*، *E2F3a*، *E2F3b*، *E2F4*، *E2F5*، *E2F6*، *E2F7*، *E2F8* و *E2F9* می‌باشد که هر کدام نقش‌های متفاوتی ایفا می‌کنند. از میان پروتئین‌های این خانواده، *E2F3* دو ایزوفرم *E2F3a* و *E2F3b* دارد. محل قرارگیری این ژن بر روی کروموزوم ۶ می‌باشد، البته نسخه‌هایی از ژن‌های کاذب آن نیز بر روی کروموزوم ۲ و ۷ وجود دارد. اطلاعاتی که Uniprot KB در اختیار ما قرار می‌دهد حاکی از آن است که *E2F3* با برهمکنش مجموعه‌ی پروتئینی DRTF1/E2F کنترل چرخه‌ی سلولی را از مرحله‌ی G1 به S در دست می‌گیرد و در مورد سلول‌های چربی نیز با جلوگیری از چسبیدن ژن CEBPA به پروموتور ژن‌های

تغییرات زنده مانی سلول پس از انجام عملیات ترانسفکشن برای مشاهده‌ی اثر عملیات ترانسفکشن بر روی سلول و این که استفاده از محلول ترانسفکشن بر روی زنده مانی سلول چه اثری دارد، پس از انجام ترانسفکشن روی سلول در پلیت ۹۶ خانه، ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن تست MTT انجام شد. نتایج این تست نشان داد که ترانسفکشن سلول‌ها با دو وکتور پیش ساز و بازدارنده‌ی miR-429 اثر قابل توجهی بر روی زنده مانی ندارد و در واقع استفاده از محلول ترانسفکشن سمیت سلولی را بالا نمی‌برد. می‌توان گفت که تغییرات بیان ژن فقط ناشی از عملیات ترانسفکشن می‌باشد. تعداد سلول‌های زنده مانده پس از ۴۸ ساعت از گذشت ترانسفکشن با تعداد سلول seed شده اولیه برابر می‌باشد و تغییر بیان ژن را می‌توان با قطعیت بیش تری گزارش کرد (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۳: تغییرات زنده مانی در هر سه گروه سلول پس از انجام تست MTT

بحث

بیش از ۹۹ درصد از ژنوم انسان مربوط به نواحی غیر کدکننده می‌باشد. این نواحی که در گذشته به نام junkDNA شناخته می‌شدند کم کم در مطالعات زیست‌شناسی مولکولی جایگاه خود را پیدا کردند و اهمیت آن در بسیاری از بیماری‌های متابولیک، ایمنی و بیماری‌های پیچیده ژنتیکی مثل سرطان آشکار شد. برجستگی مطالعات این شاخه از زیست‌شناسی مولکولی در کم‌تر از سه دهه آن قدر حائز اهمیت بود که کمپانی‌های مختلفی تصمیم به طراحی داروهای از جنس miRNA گرفتند. کمپانی Therapeutics miRNA لیستی از این

ژن‌های *E2F3* و *BMI1* را مورد هدف قرار داده و بیان آن‌ها را تنظیم نمود. *BMI1* فاکتور انکوژن در سرطان‌های مختلف انسانی و *E2F3* نیز به عنوان عامل اصلی در تنظیم تکثیر سلولی می‌باشند. در این مطالعه افزایش بیان miR-429 بعد از ترانسفکت کردن سلول‌ها توسط Pre-miR-429 باعث مهار *BMI1* و *E2F3* گردید (۱۵). مطالعات حاکی از آن می‌باشد که بیان ژن *E2F3* در بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان کبد، سرطان مثانه، سرطان پروستات، و سرطان ریه افزایش پیدا کرده است (۱۶-۱۹). برای پی بردن به ارتباط بین پاسخ به شیمی درمانی در سرطان ریه و کنترل درمان توسط خانواده‌ی *Feng miR-200* و همکاران در سال ۲۰۱۲ هنگام مطالعه بر روی رده‌ی سلولی SPC-A1 به این نتیجه رسیدند که ترانسفکشن miR-200b به این سلول‌ها باعث می‌شود که پاسخ این سلول‌های سرطانی به داروی دوستاکسل بهتر شود. با انجام تست لوسیفراز در این مطالعه دیده شد که این miRNA از طریق هدف قرار دادن ژن *E2F3* با جلوگیری از رشد سلولی، افزایش آپوپتوز و توقف چرخه‌ی سلولی در فاز G2/M موجب بهبود پاسخ به درمان می‌شود (۷). Liu و همکاران در سال ۲۰۱۴، طی مطالعه‌ای بر روی بافت بیماران مبتلا به سرطان مثانه و مقایسه‌ی آن با نمونه‌های افراد سالم، نتیجه گرفتند که مهاجرت و رشد سلول در این بیماران از جمله فاکتورهای مهمی هستند که توسط ژن *E2F3* کنترل می‌شوند. در این مطالعه ضمن اشاره به نقش miR-200c به عنوان عامل سرکوب کننده‌ی تومور در بیماران، نشان داده شد که miR-200c از طریق هدف قرار دادن ژن *E2F3* می‌تواند رفتار سلول سرطانی را جهت دهد (۲۰). مطالعه شکرالله زاده و همکاران، افزایش بیان معنی‌دار *E2F3* را به میزان ۶/۷ برابر با کاهش بیان miR-141 پس از ترانسفکت با anti-miR-141 نشان داده است (۱۲).

در مطالعه‌ی حاضر میزان بیان *E2F3* در اثر ترانسفکت با pre-miR-429 کاهش و با کاهش بیان

هدفش مانع از تکثیر این سلول‌ها می‌شوند. این پروتئین با برهمکنش‌هایی که با دومین‌های پروتئین سرکوب‌کننده توموری رتینوبلاستما دارد، می‌تواند در پیشبرد چرخه سلولی از فاز G1 به S نقش کلیدی ایفا کند. در حالت عادی پروتئین Rb با کنترلی که از نظر ساختاری بر روی پروتئین *E2F3* دارد، آن را به حالت خاموش نگه می‌دارد. داستیله شدن Rb توسط هیستون داستیلازها یا HDACS با تغییرات ساختاری که بر روی Rb ایجاد می‌کند می‌تواند ابتدا گروهی از کینازهای وابسته به سیکلین و سپس *E2F3* را آزاد کند. از آنجا که کنترل بسیاری از ژن‌هایی که در مسیر فاز S چرخه سلولی هستند در گروه بیان ژن *E2F3* می‌باشد، شروع بیان این ژن باعث افزایش بیان ژن‌های تیمیدیلات سنتاز و دهیدروفولات ردوکنز می‌شود (۱۳، ۱۴). خانواده‌ی miR-200 نقش مهمی در ایجاد تومور و هم ساپرس تومور و همچنین در پیشرفت تومور، متاستاز، تهاجم و پاسخ به درمان ایفا می‌کنند. miRNA-429 به عنوان عضوی از خانواده‌ی miR-200 تقسیم‌بندی می‌شود که نقش مهمی در پیشرفت تومور ایفا کرده و کاهش بیان miR-429 در متاستاز به استخوان سرطان پستان نقش دارد. کاهش بیان آن باعث کاهش متاستاز و تهاجم تومور تخمدان و کارسینومای کولورکتال می‌گردد. miR-429 نقش مهمی در EMT در انواع تومورها ایفا می‌کند. این میکروآرنا ژن‌های *BMI1* و *E2F3* و مارکرهای EMT از جمله p16، p14، Vimentin، E-Cadherin را مورد هدف قرار می‌دهد. در مطالعه‌ای که Qui M و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام دادند، نشان داده شد که ترانسفکت سلول‌های کارسینومای کلیه توسط miR-429 باعث مهار بیان *E2F3* و *BMI1* و در نتیجه کاهش تکثیر و تهاجم سلول‌های توموری گردید. این در حالی است که با کاهش بیان miR-429 بیان *E2F3* و *BMI1* افزایش پیدا کرده و در نتیجه منجر به افزایش تکثیر سلول‌های توموری و متاستاز گردید. همین طور نشان داده شد که miR-429 به طور مستقیم ناحیه‌ی 3'UTR مربوط به

چگونگی هدف قرار دادن این ژن ها توسط miR-429 بررسی شود. میزان بیان miR-429 و میزان بیان ژن E2F3 در زیرگروه‌های مختلف سرطان پستان با وضعیت کلینیکو پاتولوژیک متفاوت بررسی شود و با بررسی بر روی شبکه‌ی PPI ساخته شده، به وسیله‌ی EnrichR می‌توان ۱۰ دارویی که اثر سیستمیک دارند را به عنوان کاندیدا پیشنهاد کرد. منظور از داروی سیستمیک، دارویی می‌باشد که می‌تواند شبکه‌ی خاصی از پروتئین‌های مورد نظر را مورد هدف قرار داده و در آن اختلال ایجاد کند.

سپاسگزاری

محققین از تمامی کسانی که ما را در انجام این کار تحقیقاتی یاری رساندند، نهایت قدردانی و تشکر را دارند.

miR-429 افزایش می‌یابد. بنابراین miR-429 می‌تواند به عنوان ساپرس کننده‌ی تومور در سرطان پستان از طریق مهار E2F3 عمل کند.

با توجه به نتایج حاصله و محدودیت‌های این مطالعه پیشنهاد می‌شود که بررسی میزان بیان miR-429 در دیگر رده‌های سلولی سرطان پستان، در مدل حیوانی که توالی‌های پیش‌ساز و بازدارنده‌ی miR-429 به آن تزریق شده است، در نمونه‌های بیماران مبتلا به سرطان پستان، مورد بررسی قرار بگیرد. همچنین با استفاده از تست‌های مکمل کاربردی علاوه بر مطالعه‌ی حاضر که در سطح ترانسکریپتوم انجام شده است، ارتباط بیان miR-429 با ژن‌ها در سطح پروتئومیک نیز مورد ارزیابی قرار گیرد و با استفاده از تست لوسیفراز و کلون کردن قطعات ژنی E2F3 در پایین دست توالی miR-429

References

1. Mousavi S M, Montazeri A, Mohagheghi M A, Jarrahi A M, Harirchi I, Najafi M, et al. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *Breast J* 2007; 13(4): 383-391.
2. Akbari A, Razzaghi Z, Homaei F, Khayamzadeh M, Movahedi M, Akbari M E. Parity and breastfeeding are preventive measures against breast cancer in Iranian women. *Breast Cancer* 2011; 18(1): 51-55.
3. Haghghat S, Akbari M E, Ghaffari S, Yavari P. Standardized breast cancer mortality rate compared to general female population of Iran. *Asian Pacific Journal Cancer Prevention* 2012; 13(11): 5525-5528.
4. Li C I, Uribe D J, Daling J R. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer* 2005; 93(9): 1046-1052.
5. Drakaki MJ, Ding L, Shen D, Luo J, et al. MicroRNA Gene Networks in Oncogenesis. *Curr Genomics* 2009; 10(1): 33-41.
6. Appasani K. *MicroRNAs: From Basic Science to Disease Biology*. Cambridge: Cambridge university press. 2008.
7. Feng B, Wang R, Song HZ, Chen LB. MicroRNA-200b reverses chemoresistance of docetaxel-resistant human lung adenocarcinoma cells by targeting E2F3. *Cancer* 2012; 118(3): 3365-3376.
8. Feng X, Wang Z, Fillmore R, Xi Y. MiR-200, a new star miRNA in human cancer. *Cancer Lett* 2014; 344(2): 166-173.
9. Shimono Y, Zabala M, Cho R W, Lobo N, Dalerba P, Qian D, et al. Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell* 2009; 138(3): 592-603.
10. Huang X, Yao J, Huang H, Wang Ch, et al. MicroRNA-429 Modulates Hepatocellular Carcinoma Prognosis and Tumorigenesis. *Gastroenterology Research and Practice* 2013.

11. Antolin S, Calvo L, Blanco-Calvo M, Santiago M P, Lorenzo-Patino M J, Haz-Conde M, et al. Circulating miR-200c and miR-141 and outcomes in patients with breast cancer. *BMC Cancer* 2015; 15: 297.
12. Shokrollahzade S, Sarhadi S, Safa M, Hosseini A. Differential Expression of EGFR, MAP2K4 and E2F3 Genes as Targets of miR141 and its Association with Immune System Pathway. *J Cell Biol Mol Sci* 2017; 9(1): 6-15.
13. Giangrande PH, Zhu W, Rempel RE, Laakso N, Nevins JR. Combinatorial gene control involving E2F and E Box family members. *EMBO J* 2004; 23(6): 1336-1347.
14. Good L, Dimeri GP, Campisi J, Chen KY. Regulation of dihydrofolate reductase gene expression and E2F components in human diploid fibroblasts during growth and senescence. *J Cell Physiol* 1996; 168(3): 580-588.
15. Qiu M, Liang Z, Chen L, Tan G, Wang K, Liu L, et al. MicroRNA-429 suppresses cell proliferation, epithelial-mesenchymal transition, and metastasis by direct targeting of BMI1 and E2F3 in renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2015; 33(7): 332.e9-18.
16. Xu T, Zhu Y, Xiong Y, Ge YY, Yun JP, Zhuang SM. MicroRNA-195 suppresses tumorigenicity and regulates G1/S transition of human hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 2009; 50(1): 113-121.
17. Feber A, Clark J, Goodwin G, Dodson AR, Smith PH, Fletcher A, et al. Amplification and overexpression of E2F3 in human bladder cancer. *Oncogene* 2004; 23(8): 1627-1630.
18. Tao T, Liu D, Liu C, Xu B, Chen S, Yin Y, et al. Autoregulatory feedback loop of EZH2/miR-200c/E2F3 as a driving force for prostate cancer development. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1839(9): 858-865.
19. Cooper CS, Nicholson AG, Foster C, Dodson A, Edwards S, et al. Nuclear overexpression of the E2F3 transcription factor in human lung cancer. *Lung Cancer* 2006; 54(2): 155-162.
20. Liu L, Qiu M, Tan G, Liang Z, Qin Y, Chen L, et al. miR-200c inhibits invasion, migration and proliferation of bladder cancer cells through down-regulation of BMI-1 and E2F3. *J Transl Med* 2014; 12: 305.