Journal of
Arak University of Medical Sciences

June & July 2020. Vol 23. Issue 2

Research Paper

The Association of Genetic Variant rs8506C>T at miR-526b Binding Site in the LincRNA-NR_024015 Exon With Breast Cancer Risk

Fatemeh Tavakoli[1], **Somayeh Reiisi**[1*]

1. Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation: Tavakoli F & Reiisi S. [The Association of Genetic Variant rs8506C>T at miR-526b Binding Site in the LincRNA-NR_024015 Exon With Breast Cancer Risk (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS). 2020; 23(2):222-235. https://doi.org/10.32598/JAMS.23.2.2627.4

https://doi.org/10.32598/JAMS.23.2.2627.4

CC BY NC

Article Info:
Received: 16 Jul 2019
Accepted: 21 Jan 2020
Available Online: 01 Jun 2020

Key words:
Polymorphism, LincRNA-NR_024015 exon, miR-526b binding site, Breast cancer

ABSTRACT

Background and Aim The long noncoding RNAs (lncRNAs) is an important type of RNAs that can regulate gene expression and, therefore, are involved in the development of various cancers. The genome-wide association study (GWAS) is used to identify phenotype-related loci within non-coding regions. However, the biological functions and exact relationships between phenotype-related loci and lncRNAs have not fully been identified. No study was found on the relationship between rs8506C>T polymorphisms in the lincRNA-NR_024015 exon and breast cancer susceptibility and clinical factors. Therefore, the present study aimed to evaluate the effect of polymorphism rs8506C>T on the breast cancer risk.

Methods & Materials In this case-control study, participants were 120 patients with breast cancer, 120 healthy controls. The genetic variant was genotyped by using the Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR–RFLP) method. Interactions between the polymorphism and clinical factors were further evaluated, and Odds Ratio (OR) was measured for risk assessment.

Ethical Considerations This study has been approved by the Research Ethics Committee at Shahrekord University of Medical Sciences (Code: 91-0215).

Results There was a correlation between rs8506 C>T polymorphism and breast cancer risk in the dominant model (CC and CT+TT genotypes; P=0.027; OR=1.84; 95% CI: 1.067-3.201). In the co-dominant model, CT genotype had a statistically significant association with breast cancer risk (P=0.038). Subjects with T allele in the rs8506 polymorphism had an increased risk of breast cancer (OR=1.69; 95% CI: 1.047-2.736; P=0.031). No relationship between rs8506 polymorphism and clinical factors including metastasis, tumor grade, and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) status was observed.

Conclusion Genetic variant rs8506 C>T polymorphism in the lincRNA-NR_024015 exon may contribute to the breast cancer risk. Allele T in this variant confers an increased risk of breast cancer. Further functional analyses are required to detect the detailed mechanism underlying the observed association.

Extended Abstract

Introduction

Breast cancer is the most common type of cancer and is responsible for the deaths of most women in the world [1]. Recent studies have shown that functional polymorphisms in lncRNA, as a non-coding RNA, may be associated with a higher risk of various cancers [10, 11]. Genetic variants at miRNA target sites within lncRNAs can also be associated with cancer risk [11, 12]. Based on studies of five functional polymorphisms in the

* *Corresponding Author:*
Somayeh Reiisi, MSc.
Address: Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
Tel: +98 (38) 32324410
E-mail: s.reiisi@yahoo.com; s.reiisi@sku.ac.ir

lincRNA-NR_024015 exon, it has been shown that rs8506 polymorphism in this lncRNA is associated with the risk of gastric cancer, and C-to-T transition within this region destroys the miR-526b binding site and increases the risk of gastric cancer [16]. In another study, the effect of rs8506 polymorphism in increasing the risk of esophageal squamous cell carcinoma was reported [17]. However, no study has been done on its association with breast cancer. In this regard, this study aimed to examine the role of rs8506G polymorphism in developing sporadic breast cancer.

Materials and Methods

In this case-control study, blood samples of people with breast cancer (n=120) and healthy peers (n=120) were used. A written consent was obtained from the participants and their demographic and clinical data were recorded by a questionnaire. Genomic DNA was extracted using the phenol-chloroform method and its quality and quantity were investigated. The polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method was used to identify the genotype of blood samples. To determine the PCR product genotype, it was affected by the BanII enzyme for cutting; if there is no nucleotide change in the position of study variant, there will be a cutting site for the enzyme, and two bands of 108 and 311 bp will be observed on the gel, but if there is a change in the sequencing, there will be no cutting position and the 419 bp band will be observed (Figure 1). The allele frequency of polymorphism for Hardy-Weinberg equilibrium was performed using the online statistical database and their validation [19], and chi-square test was used to examine the difference in the allele and genotype frequencies between patients and healthy peers. ANOVA test was used to calculate the risk and then the relationship between the various factors and genotypes. All statistical test were conducted in SPSS V. 20 software by considering the significance level of P<0.05.

Results

The studied samples had sporadic cancer and the age of the patients ranged from 26 to 77 years (Mean±SD=51.8±11 years) (Table 1). The frequency of heterozygous (CT) genotype was higher in cancer patients than in healthy individuals (36% vs. 24%). For homozygous (TT), it was two-fold higher in patients than in healthy peers. In the dominant genetic model, there was a significant association between the polymorphism and breast cancer in the presence of two TT and CT genotypes in the population (P=0.027). Examination of other models also revealed that the presence of TT genotype in the recessive model doubled the risk of disease (OR=2.01). In the presence of T allele genotype n both co-dominant and dominant models, the risk of disease was observed to be 2.43 and 1.84, respectively. Given the calculated risk, allele change increases the risk of disease, and this change was statistically significant (P=0.031). All of these results confirm the role of rs8506G polymorphism in the susceptibility to breast cancer. In examining the relationship between clinopathological factors and disease risk, no significant relationship was observed between this polymorphism and those factors. Table 2 shows the study of clinopathological factors in the dominant genetic model.

Discussion

The expression of target genes is regulated by miRNAs, and any change in miRNA binding site affects gene expres-

Table 1. Demographic and clinical characteristics of participants

Characteristics	Mean±SD		P
	Patients	Controls	
Age	49.8±3.1	48.6±2.1	0.41
BMI	23.8±3.1	24.1±2.8	0.094
Number of pregnancies	3.8±2.2	3.1±2.3	0.011
Total duration of breastfeeding	5.7±4.5	4.7±4.6	0.06
Age of diagnosis	50.5±11	-	-
Disease duration since diagnosis	1.45±1.5	-	-
Age at Menarche	13.4±1.1	13.25±1.2	0.427
Menopause age	50.7±4	48.8±4.4	* 0.226

* Mann-Whitney U test

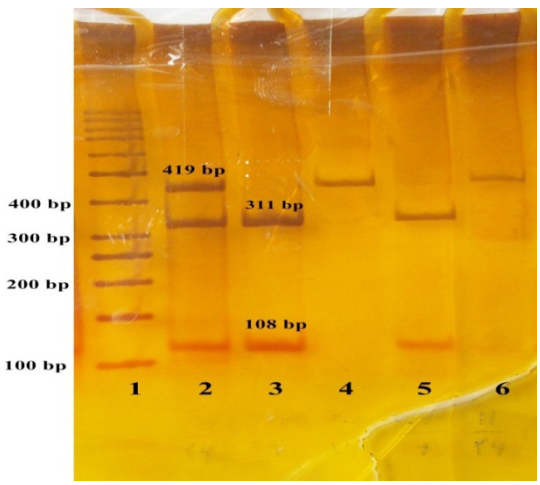
Table 2. Relationship between rs8506G polymorphism genotypes in lincRNA-NR_024015 exon and risk of breast cancer

Genotypes		No. (%)		Odds Ratio (95%CI)	P
		Controls	Patients		
Co-dominant model	CC	89 (74.16)	73 (60.83)	1	-
	CT	29 (16.14)	43 (35.83)	1.8 (1.029-3.176)	0.038
	TT	2 (1.67)	4 (3.33)	2.43 (0.434-13.690)	0.297
Dominant model	CC	89 (74.16)	73 (60.83)	1	-
	CT+ TT	31 (25.84)	47 (39.16)	1.84 (1.067-3.201)	0.027
Recessive model	CC + CT	118 (98.43)	116 (96.66)	1	-
	TT	2 (1.67)	4 (3.33)	2.034 (0.366-11.32)	0.408
Alleles	C	207 (86.25)	189 (78.75)	1	-
	T	33 (13.75)	51 (21.25)	1.69 (1.047-2.736)	0.031

Journal of
Arak University of Medical Sciences

sion [20]. The present study found that a nucleotide change in lincRNA-NR_024015 exon, which destroys the miR-526b binding site and subsequently removes the inhibitory effect of miRNA, increases the risk of breast cancer. There is ample evidence that lncRNAs are important in carcinogenesis, including breast cancer. HOTAIR rs920778 polymorphism, as a lncRNA, is associated with increased expression of this factor and the susceptibility to breast cancer. Therefore, genetic alteration of the lncRNA sequence increases malignancy and invasion of breast cancer cells [24].

Hahn et al. in a study on the effect of rs8506 polymorphism in the lincRNA-NR_024015 exon on esophageal squamous cell carcinoma found that the presence of this polymorphism disrupted the miR-526b binding site. This is accompanied by an increase in expression in the lincRNA-NR_024015 exon followed by an increase in malignancy [17]. Given that miR-526b expression is reduced in various cancers [25], the presence of such variant inhibits its binding to the lncRNA, thus increasing the risk of tumorigenesis and cancer progression for individuals with the TT genotype. It was found that in cancer patients, the expression level of lincRNA-NR_024015



Journal of
Arak University of Medical Sciences

Figure 1. PCR-RFLP polyacrylamide gel indicating: No. 1= Size marker, No. 2= CT genotype, No.3 and 5 = CC genotype, No. 4 and 6= TT genotype

increases and this mechanism (the effect of genetic variant in sequencing), intensifies the increase in expression.

Conclusion

The presence of a genetic variant in lincRNA-NR_024015 can be a risk factor for breast cancer; the allele C to T change in the lincRNA-NR_024015 disrupts the miR-526b binding site in this sequence and thus, by eliminating the inhibitory effect, increases the expression of this lncRNA.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was obtained ethical approval from the Research Ethics Committee of Shahrekord University of Medical Sciences (Code: 91-0215). All ethical principles were considered in this study including obtaining informed consent from participants, confidentiality of their information, and explaining study process to them.

Funding

The present paper was extracted from the MSc. thesis first author, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University.

Authors' contributions

Experiments and initial draft preparation: Fatemeh Tavakoli; Data analysis, editing and review: Somayeh Reiisi

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest

Acknowledgements

This study was extracted from the master thesis of first author. The authors would like to thank the Deputy for Research of Shahrekord University of Medical Sciences for their financial support.

This Page Intentionally Left Blank

بررسی همراهی تغییر ژنتیکی rs8506 C>T در توالی lincRNA-NR_024015 در جایگاه اتصالی miR-526b انسانی با خطر وقوع سرطان پستان

فاطمه توکلی[۱]، *سمیه رئیسی[۲]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۲۵ تیر ۱۳۹۸
تاریخ پذیرش: ۰۱ بهمن ۱۳۹۸
تاریخ انتشار: ۱۲ خرداد ۱۳۹۹

چکیده

زمینه و هدف RNA های بلند غیرکدکننده (lncRNA) به عنوان یک کلاس مهم از RNA ها با نقش‌های بنیادی در تنظیم بیان ژن گزارش شده‌اند و بنابراین در تکوین انواع سرطان‌ها درگیر هستند. مطالعه گسترده ژنومی GWAS برای شناسایی لوکوس‌های وابسته به فنوتیپ در توالی‌های غیرکدکننده استفاده می‌شود. باوجوداین عملکردهای بیولوژیک و ارتباطات دقیق میان لوکوس‌های وابسته به فنوتیپ و lncRNA ها هنوز به طور کامل شناسایی نشده‌اند. تاکنون هیچ داده‌ای در ارتباط با همراهی میان پلی‌مورفیسم lincRNA-NR_024015 (rs8506C>T) در جایگاه اتصالی miR-526b و استعداد ابتلا به سرطان پستان (BC) و فاکتورهای بالینی گزارش نشده است. بنابراین، هدف مطالعه حاضر ارزیابی اثر rs۸۵۰۶ روی ریسک سرطان پستان است.

مواد و روش‌ها در این مطالعه همراهی میان پلی‌مورفیسم rs8506 C>T و استعداد ابتلا به BC در یک مطالعه مورد-شاهدی (۱۲۰ نمونه سرطانی و ۱۲۰ شاهد سالم) بررسی شده است. ژنوتیپ پلی‌مورفیسم با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز-پلی‌مورفیسم طولی قطعات محدودشونده (PCR-RFLP) بررسی شد. در مرحله بعد میان‌کنش بین پلی‌مورفیسم و فاکتورهای بالینی ارزیابی و میزان OR برای محاسبه خطر مشخص شد.

ملاحظات اخلاقی این مطالعه از سوی کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد با کد ۰۲۱۵-۹۱ تأیید شده است.

یافته‌ها نتایج ما ارتباطی بین پلی‌مورفیسم rs8506 C>T و خطر وقوع BC در مدل غالب را نشان داد (CC در برابر CT+TT؛ P=۰/۰۲۷؛ OR=۱/۸۴؛ CI٪۹۵، ۲۰۱/۰۶۷-۳/۱). در مدل هم‌غالب، ژنوتیپ CT یک همراهی معناداری را با BC نشان داده است (P= ۰/۰۳۸). علاوه‌براین مشخص شد که افراد با آلل T در rs8506 خطر افزایش‌یافته‌ای برای سرطان پستان دارند (P=۰/۰۳۱؛ OR=۱/۶۹؛ CI٪۹۵، ۷۳۱/۰۴۷-۲/۱). هیچ نوع ارتباطی میان rs۸۵۰۶ و فاکتورهای بالینی شامل متاستاز، درجه توموری و HER2 مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری به‌طورکلی، حضور پلی‌مورفیسم rs8506 در توالی lincRNA-NR_024015 ممکن است به خطر وقوع سرطان پستان نسبت داده شود. آلل T در این واریانت، افزایش خطر برای وقوع سرطان پستان را ارائه می‌کند؛ بنابراین برای آشکارسازی مکانیسم جزئی همراهی مشاهده‌شده، آنالیزهای کاربردی بیشتری نیاز است.

کلیدواژه‌ها:
پلی مورفیسم، lin-cRNA-NR_024015، جایگاه اتصالی miR-526b، سرطان پستان

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین نوع بدخیمی و مسئول اغلب مرگ‌ها در زنان در سرتاسر جهان است. مطابق با مطالعات آماری سرطان در سال ۲۰۱۸ مشخص شده است که سرطان پستان و تخمدان ازجمله شایع‌ترین انواع سرطان در میان زنان به حساب می‌آیند. در ایجاد بیماری هم وراثت و هم محیط تأثیرگذار است؛ ازاین‌رو شناخت عوامل و مکانیسم‌های درگیر در بیماری می‌تواند در تشخیص، پیش‌آگهی، ملاحظات بالینی و انتخاب روش درمانی مفید باشد [۱]. از طرف دیگر، سرطان پستان یک بیماری هتروژن است و ژن‌های زیادی را درگیر می‌کند. درگیر بودن هر ژن خاص در بیماری ممکن است تومورهایی ایجاد کند که از نظر ویژگی‌های زیست‌شناسی با هم متفاوت باشند و نتایج درمانی و بالینی متفاوتی را طلب کنند [۲]. در این میان به‌تازگی نقش RNA های بلند غیرکدکننده (lncRNA) در شروع و پیشرفت بیماری‌هایی مانند سرطان به‌خوبی آشکار شده است [۳].

RNA های بلند غیرکدکننده (lncRNA) نوعی از RNA های غیرکدکننده هستند که بیشتر از ۲۰۰ نوکلئوتید طول

* نویسنده مسئول:
سمیه رئیسی
نشانی: شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک.
تلفن: ۳۲۳۲۴۴۱۰ (۳۸) ۹۸+
پست الکترونیکی: s.reiisi@yahoo.com, s.reiisi@sku.ac.ir

دارند. اصطلاح lncRNA، طیف بسیار گسترده‌ای را دربردارد و تقریباً ۸۰ درصد کل رونوشت‌های تهیه‌شده در سلول را شامل می‌شوند [۴، ۵]. ازآنجاکه ده‌ها هزار lncRNA به صورت پلی‌آدنیله و غیرپلی‌آدنیله به طور فعال از روی ژنوم انسان رونویسی می‌شوند، این مولکول‌ها نقش‌های مهمی را در تکامل و بیماری‌های انسانی ایفا می‌کنند [۶، ۷]. lncRNA ها از تنظیم‌کنندگان اصلی پرتوانی سلول‌های جنینی و الگوبندی محورهای بدن محسوب می‌شوند. آن‌ها بر خاموشی ژن، سیگنال‌های آدنیلاسیون، فاکتورهای مؤثر بر رونویسی و تغییرات هیستون‌ها اثر داشته و در سطوح رونویسی (مانند اپیژنتیک) و پس از رونویسی (مانند دینامیک‌های اجزاء سلولی)، مسیرهای رشد و تمایز در سلول‌های مختلف نقش دارند [۸، ۹].

در مطالعات اخیر مشخص شده است که موتاسیون و همچنین پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) در ژرم لاین، به‌خصوص پلی‌مورفیسم‌های عملکردی در lncRNA ممکن است با خطر سرطان‌های مختلف همراهی داشته باشند [۱۰، ۱۱]. بر اساس مطالعات چن و همکاران، همچنین اخیراً این ادعا نیز بیان شده است که واریانت‌های ژنتیکی در جایگاه‌های هدف miRNA ها، به عنوان دسته دیگری از RNA های غیرکدکننده، درون lncRNA ها می‌تواند با خطر سرطان همراه باشد [۱۱، ۱۲]. برای مثال، یک پلی‌مورفیسم indel درون ناحیه غیرترجمه‌شونده '۳ در ژن IL-۱A قرار دارد، اتصال miR-122 را تحت تأثیر قرار داده و تنظیم بیان آن توسط miRNA را تغییر می‌دهد [۱۳]. به‌علاوه، پلی‌مورفیسم در جایگاه‌های اتصال miRNA در درون توالی lncRNA ممکن است با تغییر سطح بیانی این فاکتورها و افزایش استعداد ابتلا به سرطان‌های خاص همراه باشد. وئو و همکاران گزارش کردند که miR-149* با وجود آلل rs11752942G محکم به lincRNA-uc003opf.1 متصل می‌شود، سطح بیانی آن و سپس رخداد سرطان سلول‌های سنگفرشی مری را کاهش می‌دهد [۱۴]. در مطالعه لی و همکاران نشان داده شد که پلی‌مورفیسم rs12325489 C>T درون ناحیه اگزونی lincRNA-ENST00000515084 سبب تخریب جایگاه اتصالی برای miR-370 می‌شود، به همین دلیل روی فعالیت رونویسی ژن تأثیر گذاشته و تکثیر و رشد سلولی در سرطان پستان را موجب می‌شود [۱۵]. بر اساس مطالعات همراهی کل ژنوم (GWAS) در نوعی سرطان معده، پنج پلی‌مورفیسم کاربردی در اگزون lincRNA-NR_024015 مشخص شد. در این مطالعه نشان داده شد که پلی‌مورفیسم rs۸۵۰۶ در این lncRNA با خطر سرطان معده همراه است و تغییر نوکلئوتیدی C به T در این ناحیه سبب از بین رفتن جایگاه اتصالی miR-526b می‌شود [۱۶]. این تغییر سبب افزایش استعداد ابتلا به سرطان معده می‌شود. در مطالعه دیگری اثر این پلی‌مورفیسم در سرطان سلول‌های سنگفرشی مری بررسی شده است و افزایش خطر برای این سرطان و همراهی با پلی‌مورفیسم rs۸۵۰۶ در توالی lincRNA-NR_024015 را نشان داد [۱۷]؛ اما در مورد سایر سرطان‌ها و ازجمله سرطان پستان هیچ‌گونه مطالعه‌ای در این مورد صورت نگرفته است؛ بنابراین هدف مطالعه ما تعیین نقش پلی‌مورفیسم rs8506G در همراهی با ریسک ابتلا به سرطان سینه اسپورادیک است. به‌علاوه، ما در این مطالعه همراهی بین پلی مورفیسم ذکرشده و خصوصیات بالینی-پاتولوژیکی را بررسی کردیم.

مواد و روش‌ها

افراد مورد مطالعه

در این مطالعه که به صورت مورد-شاهد انجام شد، نمونه‌های خونی افراد سرطانی و سالم استفاده شد. نمونه‌های مورد استفاده مربوط به مطالعات قبلی انجام‌شده بودند که با کد ۰۲۱۵-۹۱ در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد تأیید شد [۱۸]. نمونه‌گیری به صورت تصادفی ساده از میان ۱۲۰ فرد مراجعه‌کننده به بخش سرطان بیمارستان هاجر شهرکرد با تأیید پاتولوژیک بیماری توسط پزشک متخصص انجام شد. در روش نمونه‌گیری از افراد واردشده در مطالعه رضایت‌نامه کتبی دریافت و اطلاعات دموگرافیک و بالینی آن‌ها از طریق پرسش‌نامه جمع‌آوری شد. بیماران سرطانی دارای کارسینومای داکتال بودند و تاریخچه خانوادگی در مورد سرطان نداشتند. نمونه‌های دارای بدخیمی‌های ثانویه و عودکننده از مطالعه حذف شدند. از زنان سالمی که به پزشک مراجعه کرده بودند و هیچ‌گونه سابقه بیماری سرطان در آن‌ها یا خانواده‌شان وجود نداشت، ۱۲۰ نمونه به عنوان نمونه‌های شاهد گرفته شد. نمونه‌های شاهد و بیمار از نظر سن و منطقه جغرافیایی سکونت با افراد بیمار مطابقت داشتند. همچنین تمامی افراد بیمار و سالم بدون رابطه خویشاوندی با یکدیگر بودند. از هر فرد (کنترل و بیمار) به میزان ۲ سی‌سی خون برای آزمایش‌های مولکولی گرفته شد. نمونه‌ها تا زمان استخراج در دمای ۲۰- نگهداری شدند.

تعیین ژنوتیپ در نمونه‌های سرطانی و سالم

DNA ژنومیک با استفاده از روش فنل-کلروفرم استخراج شد و کیفیت و کمیت DNA استخراج‌شده با اسپکتروفتومتری (جن وی- انگلستان) بررسی شد. برای تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها از روش PCR-RFLP استفاده شد. ابتدا توالی ناحیه مورد نظر که شامل تغییر نوکلئوتیدی است، از پایگاه داده‌های ژنومی دریافت و سپس پرایمرهای مورد نظر برای تکثیر آن طراحی شد. پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه به صورت پرایمر مستقیم: '5'TTTACCAT-CAACATGGAAACTTGG3 و پرایمر معکوس: 5'GGTAAAT-GCTCAGAGTAAACTGC 3' بودند. شرایط انجام واکنش PCR برای بررسی تغییر مورد نظر روی نمونه‌های افراد سالم و سرطانی به صورت زیر است: مرحله واسرشت اولیه ۹۵ درجه به مدت ۵

دقیقه، ۳۵ سیکل شامل دناتوراسیون ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال پرایمرها ۶۰ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و سنتز قطعات ۷۲ درجه به مدت ۳۵ ثانیه و طویل‌سازی نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه. همه محصولات برای تأیید نهایی روی ژل آگارز ۱ درصد به مدت یک ساعت با ولتاژ ۹۸ الکتروفورز شد و محصولات دارای رنگ فلورسنت تحت تأثیر نور UV مشاهده شدند.

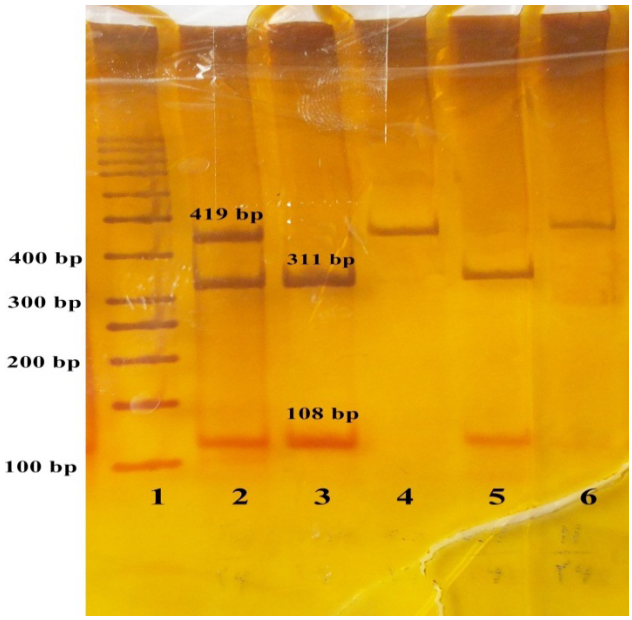
برای تعیین ژنوتیپ محصول PCR تحت تأثیر آنزیم BanII (فرمنتاز-لیتوانی) برای برش قرار گرفت. برای این منظور در هر میکروتیوب ۵۰۰ نانوگرم از محصولات PCR را با ۱ میکرولیتر آنزیم محدودکننده مورد نظر (فرمنتاز- ۵ واحد/میکرولیتر) و ۲ میکرولیتر بافر اختصاصی آنزیم و ۱۸ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز مخلوط شده و به مدت ۱۶ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده می‌شود؛ سپس محصولات به‌دست‌آمده روی ژل ۱۰ درصد پلی آکریل آمید به مدت ۱ ساعت و با ولتاژ ۱۲۰ الکتروفورز (پایا پژوهش–ایران) می‌شوند. در صورت عدم تغییر نوکلئوتیدی در جایگاه واریانت مورد نظر، جایگاه برش برای آنزیم وجود خواهد داشت و روی ژل دو قطعه ۱۰۸ و ۳۱۱ جفت بازی مشاهده می‌شود. در صورت وجود تغییر در توالی، جایگاه برش وجود نخواهد داشت و باند ۴۱۹ جفت بازی (محصول PCR) دیده می‌شود. افراد هتروزیگوت روی ژل، سه باند ایجاد می‌کنند (تصویر شماره ۱). برای تأیید نتایج، درنهایت از روش تعیین توالی استفاده شد. برای این منظور، حدود ۱۰ درصد نمونه‌های هموزیگوت و هتروزیگوت با حجم بیشتر توسط PCR تکثیر شده و برای تعیین توالی آماده شدند. واکنش تعیین توالی به وسیله دستگاه ABI 3730XL (Capillary System) انجام شد (تصویر شماره ۲).

آنالیز آماری

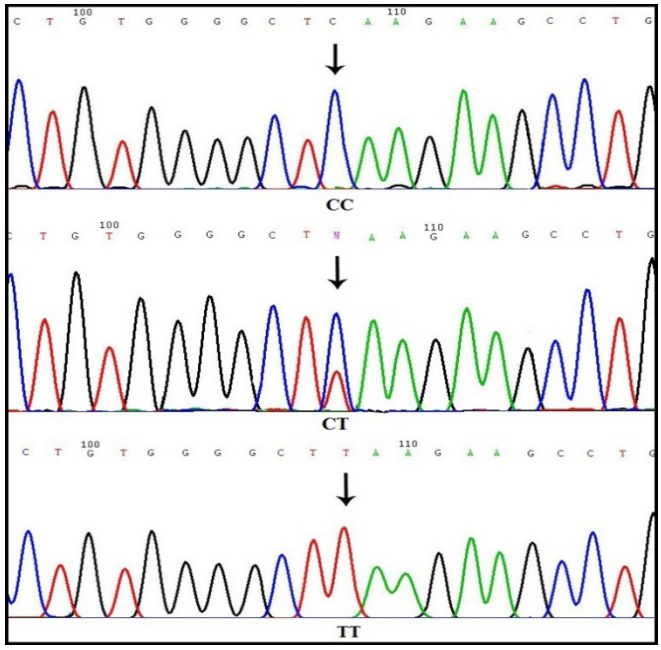
فرکانس آللی پلی‌مورفیسم برای تعادل هاردی-واینبرگ با استفاده از پایگاه آنلاین آمار عمومی و با اعتبارسنجی انجام شد [۱۹] و برای بررسی فرکانس آللی و ژنوتیپی بین افراد بیمار و سالم از آزمون کای اسکوئر استفاده شد. همچنین برای محاسبه خطر و سپس ارتباط بین فاکتورهای مختلف و ژنوتیپ‌های مورد بررسی از آزمون ANOVA استفاده شد. همه آزمون‌ها از طریق نرم‌افزار SPPSS V. 20.0 انجام شد. میزان معناداری برای آزمون‌های استفاده‌شده کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نمونه‌های مورد مطالعه دارای سرطان اسپورادیک بودند و سن بیماران در دامنه ۲۶ تا ۷۷ سال با میانگین ۱۱±۵۱/۸ سال و سن افراد شاهد در دامنه ۱۶ تا ۷۰ سال با میانگین ۱۰/۱± ۳۶/۹ سال بود (P=۰/۴۱). هیچ ارتباط معناداری در خصوص فاکتورهای وزن، BMI، زمان شیردهی و همچنین یائسگی و سن منارک بین دو گروه مشاهده نشد (جدول شماره ۱). بعد از تعیین ژنوتیپ پلی‌مورفیسم rs8506G در افراد شاهد و سرطانی، از آزمون مربع کای برای بررسی پیروی جمعیت از تعادل هاردی واینبرگ استفاده شد. برای گروه‌های شاهد و بیمار میزان ۲ χ به‌ترتیب برابر ۰/۰۴ و ۰/۶ محاسبه شد. این مورد نشان می‌دهد که جمعیت کنترل از تعادل هاردی واینبرگ پیروی می‌کند (تصویرشماره ۳). برای مشخص کردن میزان خطر و همراهی واریانت مورد نظر با سرطان پستان، توزیع واریانت میان افراد



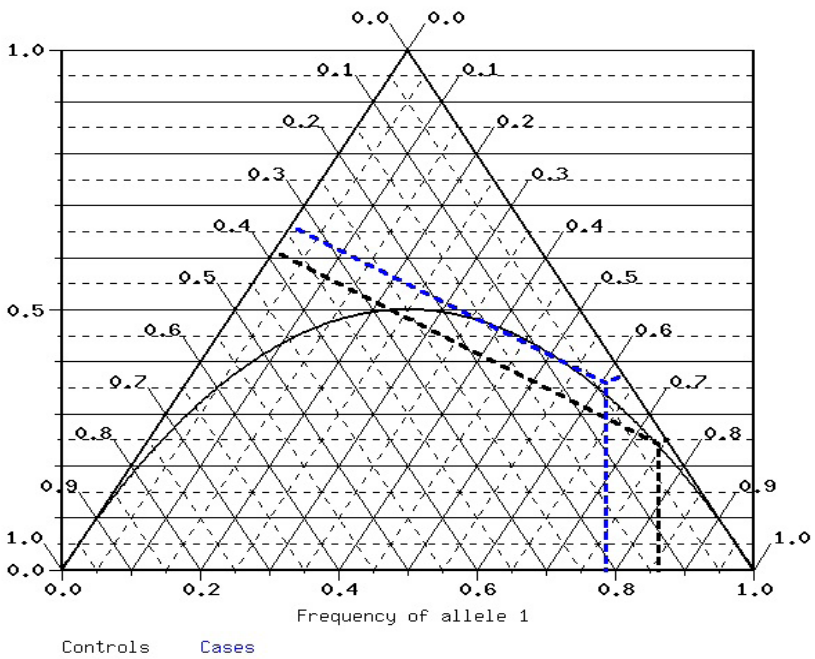
تصویر ۱. ژل پلی‌اکریل آمید محصولات RFLP- شماره ۱ نشانگر اندازه، نمونه‌های ۳ و ۵ نمونه دارای ژنوتیپ CC ، نمونه شماره ۲ نمونه دارای ژنوتیپ CT، نمونه‌های۴ و ۶ نمونه‌های دارای ژنوتیپ TT



تصویر ۲. کروماتوگرام مربوط به تعیین توالی نمونه‌های هموزیگوت بدون واریانت (بالا)، هتروزیگوت (وسط) و هموزیگوت دارای واریانت مورد نظر (پایین).

شاهد و سرطانی بررسی و نتایج آن به صورت خلاصه در جدول شماره ۲ ارائه شده است.

مطابق با داده‌های به‌دست‌آمده، فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت (CT) و هموزیگوت (TT) در افراد سرطانی نسبت به افراد سالم بیشتر است، به صورتی که این میزان برای ژنوتیپ هتروزیگوت حدود ۳۶ درصد در افراد سرطانی و ۲۴ درصد در افراد سالم است. فراوانی ژنوتیپ TT در افراد سرطانی حدوداً دو برابر افراد سالم نشان داده شد؛ بنابراین مدل‌های ژنتیکی مختلف برای پلی‌مورفیسم بررسی شد تا بهترین وضعیت برای ژنوتیپ‌ها



تصویر ۳. گراف De Finetti برای پلی‌مورفیسم مورد نظر که تعادل هر دو گروه شاهد و بیمار را نشان می‌دهد. گروه‌های سرطانی با رنگ آبی نشان داده شده‌اند.

جدول ۱. ویژگی‌های فیزیولوژیک و بالینی افراد مورد مطالعه

اطلاعات دموگرافیک	میانگین±انحراف معیار		P
	سرطان پستان	شاهد سالم	
سن	۴۹/۸±۳/۱	۴۸/۶±۲/۱	۰/۴۱
BMI	۲۳/۸±۳/۱	۲۴/۱±۲/۸	۰/۰۹۴
تعداد حاملگی	۳/۸±۲/۲	۳/۱±۲/۳	۰/۰۱۱
کل مدت شیردهی	۵/۷±۴/۵	۴/۷±۴/۶	۰/۰۶
سن تشخیص بیماری	۵۰/۵±۱۱	–	–
مدت بیماری از زمان تشخیص	۱/۴۵±۱/۵	–	–
سن منارک	۱۳/۴±۱/۱	۱۳/۲۵±۱/۲	۰/۴۲۷
سن یائسگی	۵۰/۷±۴	۴۸/۸±۴/۴	۰/۲۲۶*

*بر اساس آزمون من ویتنی

مشخص شود. در مدل غالب، همراهی معناداری میان پلی‌مورفیسم و سرطان پستان هنگام حضور دو ژنوتیپ TT و CT در جمعیت دیده می‌شود (P=۰/۰۲۷). با بررسی سایر مدل‌ها نیز مشخص شد که حضور ژنوتیپ TT در مدل مغلوب خطر بیماری را تا حدود دو برابر افزایش می‌دهد (OR =۲/۰۱). در مدل هم‌غالب و غالب نیز در حالت‌های حضور ژنوتیپ دارای آلل T میزان خطر بیماری به‌ترتیب برابر با ۲/۴۳ و ۱/۸۴ مشاهده شد. در این بررسی مشخص شد که فراوانی آلل T در گروه شاهد برابر با ۱۳ درصد است، ولی در افراد بیمار فراوانی آن بیشتر و به میزان ۲۱ درصد محاسبه شده است. با توجه به میزان خطر محاسبه‌شده، تغییر آللی سبب افزایش خطر برای وقوع بیماری می‌شود و این تغییر از نظر آماری ارتباط معناداری را نشان داد (۰/۰۳۱).

تمامی این نتایج تأییدکننده نقش پلی‌مورفیسم برای استعداد ابتلا به سرطان پستان است. در بررسی ارتباط میان فاکتورهای کلینوپاتولوژی و خطر بیماری هیچ‌گونه ارتباط معناداری میان پلی‌مورفیسم مورد نظر و این فاکتورها مشاهده نشد. در این مورد با توجه به اطلاعات بیماران، فاکتورهای متاستاز به گره لنفی، درجه توموری و فاکتور HER2 بررسی شد. از نظر درجه توموری (درجه ۱ تا ۳) با توجه به توزیع متغیر در سه گروه، افراد به دو گروه درجه پایین و درجه بالا تقسیم شدند. در بررسی بین گروه‌های بالینی و پلی‌مورفیسم مورد مطالعه هیچ اختلاف معناداری یافت نشد. جدول شماره ۳ بررسی این فاکتورها را در مدل ژنتیکی غالب نشان می دهد.

جدول ۲. ارتباط همراهی بین ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم rs8506G در lincRNA-NR_024015 و خطر سرطان پستان

	ژنوتیپ/مدل ژنتیکی	افراد سالم (درصد) n =۱۲۰	سرطان سینه (درصد) n =۱۲۰	OR (۹۵%CI)	P
مدل هم‌غالب	CC	(۷۴/۱۶) ۸۹	(۶۰/۸۳) ۷۳	۱	–
	CT	(۲۴/۱۶) ۲۹	(۳۵/۸۳) ۴۳	۱/۸ (۱/۰۲۹ –۳/۱۷۶)	۰/۰۳۸
	TT	(۱/۶۷) ۲	(۳/۳۳) ۴	۲/۴۳ (۰/۴۳۴ –۱۳/۶۹۰)	۰/۲۹۷
مدل غالب	CC	(۷۴/۱۶) ۸۹	(۶۰/۸۳) ۷۳	۱	–
	CT+ TT	(۲۵/۸۴) ۳۱	(۳۹/۱۶) ۴۷	۱/۸۴ (۱/۰۶۷ –۳/۲۰۱)	۰/۰۲۷
مدل مغلوب	CC + CT	(۹۸/۳۳) ۱۱۸	(۹۶/۶۶) ۱۱۶	۱	–
	TT	(۱/۶۷) ۲	(۳/۳۳) ۴	۲/۰۳۴ (۰/۳۶۶ –۱۱/۳۲)	۰/۴۰۸
آلل‌ها	آلل C	(۸۶/۲۵) ۲۰۷	(۷۸/۷۵) ۱۸۹	۱	–
	آلل T	(۱۳/۷۵) ۳۳	(۲۱/۲۵) ۵۱	۱/۶۹ (۱/۰۴۷ –۲/۷۳۶)	۰/۰۳۱

جدول ۳. ارتباط بین پلی‌مورفیسم rs۸۵۰۶C>T و ویژگی‌های بالینی در بیماران سرطان پستان

متغیر		کنترل/ مورد	ژنوتیپ (کنترل/ مورد)		OR (95% CI)	P
			CC	CT/TT		
کل افراد مطالعه		۱۲۰/۱۲۰	۷۳/۸۹	۴۷/۳۱	۱/۸۴ (۱/۰۶۷ –۳/۲۰۱)	۰/۰۲۷
متاستاز به گره لنفی	+	۶۸/–	۴۲/–	۲۶/–	۱	۱
	–	۵۲/–	۳۱/–	۲۱/–	۰/۹۱۴ (۱/۹۱۳–۰/۴۶۳)	۰/۸۵
درجه تومور	پایین	۸۲/–	۵۱/–	۳۱/–	۱	۱
	بالا	۳۸ /–	۲۲/–	۱۶/–	۰/۸۳۶ (۱/۸۳۰ –۰/۳۸۲)	۰/۶۹
HER2	+	۷۶ /–	۴۸ /–	۲۸/–	۱	۱
	–	۴۴/–	۲۵/–	۱۹/–	۰/۷۶۸ (۱/۶۳۶–۰/۳۶۰)	۰/۵۶

بحث

بیان ژن‌های هدف توسط miRNA ها به وسیله اتصال آن‌ها به ناحیه 3′-UTR تنظیم می‌شود، بنابراین هرگونه تغییر در این ناحیه ممکن است جایگاه اتصالی miRNA را تخریب کند و به دنبال آن روی عملکرد بیانی ژن تأثیر بگذارد [۲۰]. در مطالعه حاضر، ما همراهی میان واریانت عملکردی در lincRNA-NR_۰۲۴۰۱۵ و خطر سرطان پستان را بررسی کردیم. در مطالعات محتلف نقش lincRNA-NR_۰۲۴۰۱۵ در تومورزایی به طور کامل مشخص نشده است، اما با نتایج حاصل از این مطالعه می‌توانیم این احتمال را در نظر بگیریم که تغییر نوکلئوتیدی در lincRNA-NR_۰۲۴۰۱۵ که سبب از بین رفتن جایگاه اتصالی miR-526b و به دنبال آن برداشته شدن اثر مهاری miRNA از روی می‌شود، افزایش خطر سرطان پستان را به همراه دارد.

در حال حاضر، lncRNA ها به عنوان یک دسته از RNA های تنظیمی غیرکدکننده، دارای توجه ویژه برای مطالعات مختلف هستند. این مولکول‌های شبه mRNA، فاقد یک چارچوب خوانش مشخص هستند و معمولاً فرایندهای کلاهک‌گذاری، پردازش و پلی‌آدنیله شدن در آن‌ها رخ می‌دهد. چنین ویژگی در lncRNA ها سبب شده است که آن‌ها در فرایندهای مختلف بیولوژیک نقش داشته باشند. علاوه‌براین، مطالعات مختلف، عملکرد lncRNA ها را در انواع بیماری‌ها و ازجمله سرطان‌ها گزارش کرده‌اند. برای مثال در مطالعه کوتاک و همکاران مشخص شد که یک lincRNA غالب، ANRIL به طور عملکردی در پیشرفت سرطان با مهار بیان ژنی به صورت اپی ژنتیک با فراخوانی کمپلکس‌های تغییر کروماتین نقش دارد [۲۱]. در مطالعه موریسون و همکاران روی سرطان پستان، GAS۵ به عنوان یک lincRNA معروف در تومورزایی گزارش شده است [۲۲]. این شواهد اهمیت lncRNA ها را در سرطان‌زایی، ازجمله سرطان پستان تأیید می‌کند.

مطالعات میکایلیدو و همکاران روی سرطان پستان توسط آنالیز کل ژنوم (GWAS)، توانسته است تعدادی زیادی از لوکوس‌هایی را که با تکوین سرطان پستان همراه هستند، شناسایی کند [۲۳]. در این میان، تعداد زیادی از lncRNA ها یافت شدند که به این لوکوس‌ها نزدیک بودند و علاوه‌براین، تغییرات ژنتیکی در توالی این lncRNA ها نیز مشخص شد؛ بنابراین پلی‌مورفیسم‌های عملکردی در این توالی‌ها ممکن است روی تکوین و استعداد ابتلا به تومور تأثیر بگذارد. پلی‌مورفیسم rs۹۲۰۷۷۸ در توالی HOTAIR، به عنوان یک lncRNA، با افزایش بیان این فاکتور و استعداد ابتلا به سرطان پستان همراه است؛ بنابراین وجود تغییر ژنتیکی در توالی lncRNA مورد نظر سبب افزایش بدخیمی و تهاجم سلولی در سرطان پستان می‌شود [۲۴]. لی و همکاران با بررسی ژنوم توسط آنالیز GWAS نشان دادند که پلی‌مورفیسم rs12325489C>T در توالی اگزونی lincRNA-ENST00000515084 به طور قابل‌توجهی با کاهش خطر سرطان پستان همراه است.

در این مطالعه مشخص شد که احتمالاً واریانت یافت‌شده یک اصلاح‌کننده ژنتیکی برای سرطان پستان باشد [۱۵]. در مطالعه هان و همکاران در مورد پلی‌مورفیسم rs۸۵۰۶ در توالی lincRNA-NR_024015 نیز این مورد مشاهده شده است. مطابق با این مطالعه در سرطان سلول‌های سنگفرشی مری، وجود پلی‌مورفیسم باعث از بین رفتن جایگاه اتصالی miR-526b می‌شود و این اثر با افزایش بیان بیشتر در lincRNA-NR_۰۲۴۰۱۵ همراه بوده که افزایش بدخیمی را در این سلول‌ها موجب می‌شود [۱۷]. با توجه به اینکه در سرطان‌های مختلف بیان miR-526b دچار کاهش شده است [۲۵]، وجود چنین واریانتی سبب مهار اتصال آن به lncRNA مورد نظر می‌شود، بنابراین خطر تکوین تومورزایی و پیشرفت سرطان برای افراد با ژنوتیپ TT افزایش بیشتری خواهد یافت. مشخص شده است که

در بیماران سرطانی، میزان بیان lincRNA-NR_۰۲۴۰۱۵ دچار افزایش بوده و این مکانیسم یا همان اثر تغییر ژنتیکی در توالی، افزایش بیان را تشدید می‌کند.

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی، مطالعه حاضر نشان داد که حضور واریانت ژنتیکی در lincRNA-NR_۰۲۴۰۱۵ می‌تواند یک فاکتور افزایش خطر برای سرطان پستان باشد، به صورتی که تغییر آلل C به T در توالی ژنی lincRNA-NR_024015 سبب از بین رفتن جایگاه هدف miR-526b روی این توالی شده و درنتیجه با از بین رفتن اثر مهاری، افزایش بیان این lncRNA را به دنبال خواهد داشت. این افزایش با تکوین و پیشرفت سرطان پستان و پیش‌آگهی بد در این سرطان همراه خواهد بود؛ باوجوداین به دلیل اینکه هیچ‌گونه مطالعه‌ای در مورد سرطان پستان و این lncRNA وجود ندارد، به نظر می‌رسد بررسی در سایر قسمت‌ها مانند بررسی در تعداد نمونه بیشتر و اثر در لاین‌های سلولی ضروری باشد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه از سوی کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد با کد ۹۱-۰۲۱۵ تأیید شده است. کلیه‌ی اصول اخلاقی در این مقاله رعایت شده است. شرکت‌کنندگان اجازه داشتند هر زمان که مایل بودند از پژوهش خارج شوند. همچنین همه شرکت‌کنندگان در جریان روند پژوهش بودند و اطلاعات آن‌ها محرمانه نگه‌داشته شد

حامی مالی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم فاطمه توکلی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته ژنتیک در گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد است.

مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین‌المللی ناشران مجلات پزشکی را دارا بودند.

تعارض منافع

بدین‌وسیله نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد که حامی مالی و معنوی این مطالعه بود، اعلام می‌دارند.

همچنین از همه افرادی که در این مطالعه ما را یاری کردند، سپاس‌گزاری می‌کنیم.

References

[1] Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, Van Loo P, Greenman C, Wedge DC, et al. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. Nature. 2012; 486(7403):400-4. [DOI:10.1038/nature11017] [PMID] [PMCID]

[2] Shah R, Rosso K, Nathanson SD. Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. World J Clin Oncol. 2014; 5(3):283-98. [DOI:10.5306/wjco.v5.i3.283] [PMID] [PMCID]

[3] Huarte M. The emerging role of lncRNAs in cancer. Nature Medicine. 2015; 21(11):1253-61. [DOI:10.1038/nm.3981] [PMID]

[4] Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: Insights into functions. Nature reviews genetics. 2009; 10(3):155-9. [DOI:10.1038/nrg2521] [PMID]

[5] Cao J. The functional role of long non-coding RNAs and epigenetics. Biological procedures online. 2014; 16:11. [DOI:10.1186/1480-9222-16-11] [PMID] [PMCID]

[6] Yu AD, Wang Z, Morris KV. Long noncoding RNAs: A potent source of regulation in immunity and disease. Immunology and cell biology. 2015; 93(3):277-83. [DOI:10.1038/icb.2015.2] [PMID]

[7] Spurlock CF 3rd, Crooke PS 3rd, Aune TM. Biogenesis and Transcriptional Regulation of Long Noncoding RNAs in the Human Immune System. J Immunol. 2016; 197(12):4509-17. [DOI:10.4049/jimmunol.1600970] [PMID] [PMCID]

[8] Mattick JS. The genetic signatures of noncoding RNAs. PLoS Genet. 2009; 5(4):e1000459. [DOI:10.1371/journal.pgen.1000459] [PMID] [PMCID]

[9] Batista PJ, Chang HY. Long noncoding RNAs: Cellular address codes in development and disease. Cell. 2013; 152(6):1298-307. [DOI:10.1016/j.cell.2013.02.012] [PMID] [PMCID]

[10] Wojcik SE, Rossi S, Shimizu M, Nicoloso MS, Cimmino A, Alder H, et al. Non-codingRNA sequence variations in human chronic lymphocytic leukemia and colorectal cancer. Carcinogenesis. 2009; 31(2):208-15. [DOI:10.1093/carcin/bgp209] [PMID] [PMCID]

[11] Jendrzejewski J, He H, Radomska HS, Li W, Tomsic J, Liyanarachchi S, et al. The polymorphism rs944289 predisposes to papillary thyroid carcinoma through a large intergenic noncoding RNA gene of tumor suppressor type. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012; 109(22):8646-51. [DOI:10.1073/pnas.1205654109] [PMID] [PMCID]

[12] Chen K, Song F, Calin GA, Wei Q, Hao X, Zhang W. Polymorphisms in microRNA targets: A gold mine for molecular epidemiology. Carcinogenesis. 2008; 29(7):1306-11. [DOI:10.1093/carcin/bgn116] [PMID]

[13] Gao Y, He Y, Ding J, Wu K, Hu B, Liu Y, et al. An insertion/deletion polymorphism at miRNA-122-binding site in the interleukin-1α 3′ untranslated region confers risk for hepatocellular carcinoma. Carcinogenesis. 2009; 30(12):2064-9. [DOI:10.1093/carcin/bgp283] [PMID]

[14] Wu H, Zheng J, Deng J, Hu M, You Y, Li N, et al. A genetic polymorphism in lincRNA-uc003opf. 1 is associated with susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma in Chinese populations. Carcinogenesis. 2013; 34(12):2908-17. [DOI:10.1093/carcin/bgt252] [PMID]

[15] Li N, Zhou P, Zheng J, Deng J, Wu H, Li W, et al. A polymorphism rs12325489C> T in the lincRNA-ENST00000515084 exon was found to modulate breast cancer risk via GWAS-based association analyses. PloS one. 2014; 9(5):e98251. [DOI:10.1371/journal.pone.0098251] [PMID] [PMCID]

[16] Fan Q-H, Yu R, Huang W-X, Cui X-X, Luo B-H, Zhang L-Y. The has-miR-526b binding-site rs8506G> a polymorphism in the lincRNA-NR_024015 exon identified by GWASs predispose to non-cardia gastric cancer risk. PloS one. 2014; 9(3):e90008. [DOI:10.1371/journal.pone.0090008] [PMID] [PMCID]

[17] Han L, Liu S, Liang J, Guo Y, Shen S, Guo X, et al. A genetic polymorphism at miR-526b binding-site in the lincRNA-NR_024015 exon confers risk of esophageal squamous cell carcinoma in a population of North China. Mol Carcinog. 2017; 56(3):960-71. [DOI:10.1002/mc.22549] [PMID]

[18] Barjui SP, Reiisi S, Ebrahimi S, Shekari B. Study of correlation between genetic variants in three microRNA genes (hsa-miR-146a, hsa-miR-502 binding site, hsa-miR-27a) and breast cancer risk. Current research in translational medicine. 2017; 65(4):141-7. [DOI:10.1016/j.retram.2017.10.001] [PMID]

[19] Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. American journal of epidemiology. 2009; 169(4):505-14. [DOI:10.1093/aje/kwn359] [PMID] [PMCID]

[20] Saunders MA, Liang H, Li W-H. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007; 104(9):3300-5. [DOI:10.1073/pnas.0611347104] [PMID] [PMCID]

[21] Kotake Y, Nakagawa T, Kitagawa K, Suzuki S, Liu N, Kitagawa M, et al. Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15p15 INK4B tumor suppressor gene. Oncogene. 2011; 30(16):1956-62. [DOI:10.1038/onc.2010.568] [PMID] [PMCID]

[22] Morrison LE, Jewell SS, Usha L, Blondin BA, Rao RD, Tabesh B, et al. Effects of ERBB2 amplicon size and genomic alterations of chromosomes 1, 3, and 10 on patient response to trastuzumab in metastatic breast cancer. Genes, Chromosomes and Cancer. 2007; 46(4):397-405. [DOI:10.1002/gcc.20419] [PMID]

[23] Michailidou K, Lindström S, Dennis J, Beesley J, Hui S, Kar S, et al. Association analysis identifies 65 new breast cancer risk loci. Nature. 2017; 551(7678):92-4. [DOI:10.1038/nature24284] [PMID] [PMCID]

[24] Bayram S, Sümbül AT, Batmacı CY, Genç A. Effect of HOTAIR rs920778 polymorphism on breast cancer susceptibility and clinicopathologic features in a Turkish population. Tumor Biology. 2015; 36(5):3863-70. [DOI:10.1007/s13277-014-3028-0] [PMID]

[25] Zhang Z-y, Fu S-l, Xu S-q, Zhou X, Liu X-s, Xu Y-j, et al. By downregulating Ku80, hsa-miR-526b suppresses non-small cell lung cancer. Oncotarget. 2015; 6(3):1462-77. [DOI:10.18632/oncotarget.2808] [PMID] [PMCID]

This Page Intentionally Left Blank