

ارتباط بین طول توالی تکراری CA در اینترون I ژن PIK3CA با خطر ابتلا به سرطان پستان

نجمه حشمت‌پور: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم دانشگاه اصفهان، اصفهان
 منوچهر توسلی*: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان
 سیمین همتی: گروه رادیوتراپی و انکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان
 سیدحسین حجازی: گروه قارچ و انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان
 فروزان صفری: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم دانشگاه اصفهان، اصفهان

چکیده

مقدمه: مسیر انتقال پیام فسفاتیدیل اینوزیتول ۳-کیناز (PI3K) تنظیم‌کننده طیف گسترده‌ای از فرایندهای مهم سلولی از جمله تکثیر سلولی، بقا، آپوپتوز، جنبش سلولی، مهاجرت سلولی و متابولیسم انسولین است. زیر واحد کاتولیتیکی آلفا انسانی بوسیله ژن فسفاتیدیل اینوزیتول ۴،۵ بیس فسفات (PIK3CA) کد می‌شود. بر اساس اطلاعات ما این اولین گزارش در مورد پلی‌مورفیسم تکرار دی نولتوتید CA در ژن PIK3CA و ارتباط آن با سرطان می‌باشد. در این مطالعه پلی‌مورفیسم ریز ماهواره دو نوکلئوتید CA در اینترون ۱ ژن PIK3CA بین بیماران سرطان پستان و افراد سالم تعیین و ارتباط بین تکرارهای CA با سرطان پستان مورد بررسی قرار می‌گیرد.

روش بررسی: پژوهش حاضر یک مطالعه مورد شاهدهی بود که بر روی ۲۰۰ زن مبتلا به سرطان پستان و ۲۰۰ زن سالم انجام شد. پس از استخراج DNA از خون افراد مورد مطالعه، توالی مورد نظر توسط تکنیک PCR تکثیر گردید و نمونه‌هایی با اندازه‌های متفاوت تعیین توالی شدند و به عنوان مارکر مورد استفاده قرار گرفتند. تعداد تکرار CA و توالی آن بوسیله الکتروفورز بر روی ژل پلی‌اکریل در مقایسه با مارکهای تعیین توالی شده به دست آمد.

یافته‌ها: پنج طول متفاوت از تکرار CA بین ۱۰ تا ۱۴ تکرار و ۱۰ ترکیب آلی (ژنوتیپ) مختلف در بین بیماران و افراد کنترل مشاهده شد. بیشترین فراوانی آلی در میان افراد بیمار و کنترل مربوط به آلل ۱۳ تکرار بود. زنانی که حامل یک آلل یا دو آلل کوچک‌تر از ۱۳ تکرار CA باشند به طور معنا داری ($P=0/003$) در خطر فزاینده‌ای برای ابتلا به سرطان پستان قرار دارند ($OR=2/05$). بیشترین خطر ابتلا به سرطان برای حاملین کوچکترین آلل (CA10) با نسبت فزاینده ۴/۲۶ است ($OR=4/26, P=0/006$)، برعکس زنان با یک آلل یا دو آلل بزرگتر از ۱۲ در خطر کمتری برای ابتلا به سرطان پستان هستند. نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که بین تعداد توالی تکراری اینترون ۱ ژن PIK3CA و خطر ابتلا به سرطان پستان رابطه مستقیمی وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: فسفاتیدیل اینوزیتول ۳-کیناز، میکروستلایت CA، سرطان پستان.

* نشانی نویسنده پاسخگو: اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، منوچهر توسلی.
 نشانی الکترونیک: manoochehr@biol.ui.ac.ir

مقدمه

بر اساس داده‌هایی نهاد تخصصی سازمان جهانی بهداشت در فرانسه درباره ۲۸ نوع سرطان در ۱۸۴ کشور دنیا در سال ۲۰۱۲، بعد از سرطان ریه (یک میلیون و ۸۰۰ هزار نفر، ۱۳٪ در مجموع)، سرطان پستان شایع‌ترین سرطان (یک میلیون و ۷۰۰ هزار نفر، ۱۱/۰۹٪ در مجموع) است (۱). علت واقعی بروز سرطان پستان و تعداد دقیق ژن‌هایی که در جمعیت‌های مختلف باعث خطر ابتلا به سرطان پستان می‌شوند، مشخص نیست. به هم خوردن تنظیم مسیر انتقال پیام گیرنده‌های تیروزین کیناز (RTKs) در سرطان پستان رایج است. در میان مهم‌ترین وقایع مولکولی پایین دست فعال شدن RTKها، فعال شدن فسفاتیدیل اینوزیتول ۳-کیناز (PI3K) می‌باشد (۲،۳). PI3K یکی از اعضای خانواده لیپید کینازها است که کاتالیز کننده فسفریلاسیون فسفاتیدیل اینوزیتول ۴،۵ بیس-فسفات (PIP2) در موقعیت کربن شماره ۳ و تولید پیامبر ثانویه به نام فسفاتیدیل اینوزیتول ۳،۴،۵ تری فسفات (PIP3) می‌باشد (۴). این لیپیدهای فسفریله شده هدف‌های پایین دست متنوعی را فعال می‌کند از جمله پروتئین کیناز B (PKB) که تنظیم‌کننده طیف گسترده‌ای از فرایندهای مهم سلولی از جمله تکثیر سلولی، ترانسفورماسیون، چسپندگی سلولی، آپوپتوز، بقا، جنبش سلولی و ترافیک داخل سلولی پروتئین‌ها است (۵). زیر واحد کاتالیتیکی آلفا بوسیله ژن فسفوتیدیل اینوزیتول (۴،۵) بیس فسفات (PIK3CA) کد می‌شود. مطالعات اخیر جهش‌های ژن PIK3CA را در سرطان‌های مختلف از جمله سرطان پستان نشان داده‌اند (۶،۷). بعد از ژن سرکوب‌کننده تومور TP53، ژن PIK3CA فراوان‌ترین ژن جهش یافته در سرطان پستان است (۸،۹). جهش‌های فعال‌کننده ژن PIK3CA و افزایش بیان پروتئین PIK3CA یکی از وقایع آغازی در سرطان پستان به نظر می‌رسد که در ایجاد تومور نقش بازی می‌کند ولی نه در مراحل تهاجمی تومور (۱۰). تکرارهای دو نوکلئوتیدی رایج‌ترین تکرارهای ساده پراکنده در ژنوم می‌باشند و اغلب توالی‌های تکراری بلند طول‌های متفاوتی نشان می‌دهند. تحقیقات نشان داده است که تکرارهای دو نوکلئوتیدی می‌توانند در کاهش یا افزایش بیان ژن موثر باشند (۱۱،۱۲). ۸۴٪ از ژن‌هایی که دارای پیرایش جایگزین هستند دارای جفت تکرارهای

مکمل در اینترون خود می‌باشند (۱۳، ۱۴ و ۱۵). در سال ۲۰۱۱ Lim و همکارانش بین حذف اگزون ۵ در ژن-7 kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma (KIT) و توالی‌های تکراری دو نوکلئوتید AT در اینترون‌های ۵ و ۴ پیوستگی کامل نشان دادند [LOD (logarithm of odds)=11/8] و از طرف دیگر توالی‌های تکراری با قرار گرفتن در توالی‌های افزایش‌دهنده (Enhancers) و تغییر در ساختار DNA می‌توانند در میزان بیان ژن تاثیرگذار باشد (۱۶). در اینترون ۱ ژن PIK3CA و خطر ابتلا به سرطان پستان با بررسی بیوانفورماتیکی ژن PIK3CA دو ناحیه از تکرارهای دو نوکلئوتیدی GT و CA در اینترون ۱ این ژن مشاهده شد که الگوی پراکندگی، تنوع و فراوانی آل‌های این دو ناحیه از ژن PIK3CA تا کنون مورد بررسی قرار نگرفته بود. در این مطالعه پلی‌مورفیسم ریز ماهواره CA در اینترون ۱ این ژن و ارتباط آن با سرطان پستان در جمعیت بیماران بیمارستان حضرت سیدالشهدای شهر اصفهان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری خون از ۲۰۰ زن مبتلا به سرطان پستان و ۲۰۰ زن سالم در سنین بین ۳۰-۷۴ سال، در واحد نمونه‌گیری بیمارستان حضرت سیدالشهدای شهر اصفهان انجام شد و برای انجام این مطالعه مورد شاهدی مورد آزمایش قرار گرفتند. زنان بیمار مورد مطالعه در بیمارستان سیدالشهدای اصفهان تحت شیمی‌درمانی یا پرتو درمانی بودند و گروه کنترل از بین زنانی که برای بررسی سلامتی خود به این بیمارستان مراجعه کرده بودند و به صورت متناسب با گروه مورد انتخاب شد. خون تام از بیماران و افراد شاهد با رضایت کامل افراد به صورت کتبی، از آنها گرفته شد. اطلاعات مربوط به سن شروع بیماری و سابقه فامیلی ابتلا به سرطان (در خویشاوندان درجه یک و دو) از پرونده افراد مورد مطالعه استخراج شد. از نمونه خون افراد مورد مطالعه DNA به روش رسوب‌دهی نمکی (Salting out) استخراج شد و ناحیه اینترون ۱ ژن PIK3CA توسط پرایمرهای پیشرو 5' CAGCACAGACATGCACATGCGCG 3' و پیرو 5' GTAATATGAATGACAATGCGAGTC 3' تکثیر شد. پرایمرها با کمک سایت اینترنتی Primer3Plus

طراحی شدند (۲۴). واکنش زنجیره پلی‌مرز در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر حاوی ۱۰۰-۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۲۰۰ میکرو مولار dNTPs، ۱۰۰ نانومولار از هر یک از پرایمرهای پیشرو و پیرو، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۲/۵ میکرولیتر از ۱۰X بافر PCR و دو واحد آنزیم Smar Tag DNA polymerase (همه مواد PCR از شرکت سینا ژن خریداری شد) در دستگاه PCR از شرکت ژاپنی TAKARA انجام شد. بعد از واسرشت شدن اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۳ سیکل PCR با دمای ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه برای واسرشت شدن رشته‌ها، ۵۳ درجه به مدت ۱ دقیقه جهت اتصال پرایمرها و ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه برای گسترش پرایمرها انجام شد. یک سیکل انتهایی ۱۰ دقیقه‌ای در دمای ۷۲ درجه جهت تکثیر توالی‌های ناقص در نظر گرفته شد. محصولات حاصل از واکنش زنجیره پلی‌مرز بعد از بهینه‌سازی توسط ژل آگارز ۱٪ تایید شد. با توجه به توانایی کم ژل آگارز در جداسازی برای اندازه‌گیری دقیق تعداد تکرارهای توالی CA واقع در اینترون یک ژن PIK3CA، بررسی‌های بعدی محصول PCR بر روی ژل آکريل امید ۱۰٪ معمولی (non-PAGE denaturing) انجام شد. ژل توسط روش نیترا نقره رنگ‌آمیزی و نتایج توسط اسکینر ثبت شد. بعد از مشاهده پلی‌مورفیسم ۴ نمونه هتروزایگوت و ۲ نمونه هموزایگوت مشاهده شده در ژل‌های رنگ‌آمیزی شده که شامل ۶ الل بودند، توسط کیت استخراج DNA از ژل آگارز فرمنتاز خالص سازی شدند. سپس جهت تعیین توالی به روش سنکر در کشور آلمان به شرکت سیناکلون تهران ارسال تا به عنوان مارکر آلی مورد استفاده قرار گیرند (شکل ۱).

در جمعیت مورد مطالعه، تعیین شد. در نهایت ارتباط این تکرارها با بروز سرطان در جمعیت به کمک آزمون X^2 و رگرسیون لجستیک محاسبه شد.

یافته‌ها

همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده، پراکندگی تکرار آلی CA ژن PIK3CA در جمعیت زنان اصفهان بین ۱۴ تا ۱۰ بود. آلل ۱۳ تکرار بیشترین فراوانی آلی را در میان افراد بیمار (۷۸/۵٪) و شاهد (۸۴/۲۵٪) دارد. در مقایسه با افراد شاهد، فرکانس آلل‌های کوتاه ۲۰ تا ۱۰ تکرار (آلل‌های S) در افراد بیمار بیشتر بود، محاسبات آماری به کمک آزمون X^2 و نسبت شانس (Odds Ratio) توسط آزمون رگرسیون نشان می‌دهد که این افراد بطور معنی‌داری بیشتر در خطر ابتلا به سرطان پستان هستند ($OR=2/05$ ، $P=0/003$) و بیشترین خطر ابتلا به سرطان پستان برای حاملین آلل ۱۰ تکرار است، نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد که این افراد نسبت به افرادی که حامل آلل‌های دیگری (غیر از ۱۰) هستند ۴/۲۶ مرتبه بیشتر در خطر ابتلا به سرطان پستان می‌باشند ($OR=4/26$ ، $P=0/006$). اختلاف قابل ملاحظه‌ای در توزیع آلل‌های بلند ۱۴ و ۱۳ بین افراد شاهد و بیمار وجود ندارد ولی بعلاوه اختلاف موجود بین آلل‌های کوتاه این اختلاف معنی‌دار نشان می‌دهد ($OR=0/48$ ، $P=0/0038$). به عبارت دیگر افرادی که حامل آلل‌های بلند هستند نسبت به افراد حامل آلل‌های کوتاه، کمتر به سرطان مبتلا می‌شوند.

در جدول ۲، توزیع میزان فراوانی هر ترکیب آلی در بین بیماران و افراد کنترل خلاصه شده است. در افراد تحت بررسی ۱۰ ترکیب آلی (ژنوتیپ) مختلف مشاهده شد. ترکیب آلی ۱۳/۱۳ بیشترین فراوانی را در بیماران (۷۰/۵٪) و افراد کنترل (۷۸/۰٪) دارد.

همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، اختلاف معنی‌داری در توزیع ترکیبات آلی شامل دو آلل کوچکتر از ۱۳ (SS) در بیماران و افراد شاهد وجود دارد و زنانی که حامل دو آلل SS باشند ۲/۵ مرتبه بیشتر در خطر ابتلا به سرطان پستان هستند ($OR=2/56$ ، $P=0/003$).

به کمک این مارکرها طول تکرار آلل‌های بیمار و شاهد تعیین و فراوانی آلی تکرار CA در ژن PIK3CA محاسبه شد. با توجه به تعداد ترکیبات آلی، آلل‌ها در دو گروه کوتاه تر از ۱۳ تکرار (S) و مساوی یا بلندتر از ۱۳ تکرار (L) و ترکیبات آلی در سه گروه SS، SL و LL تقسیم شدند. پس از ورود اطلاعات جمع‌آوری شده بررسی‌های آماری به کمک نرم‌افزار SPSS V20 انجام شد. ابتدا فراوانی ترکیبات آلی و آلل‌های ژن PIK3CA

جدول ۱: توزیع فراوانی آلل‌های مختلف تکرار CA در ناحیه اینترون ۱ ژن PIK3CA و ارتباط آنها با خطر ابتلا به سرطان پستان (n=۴۰۰)

P-value	OR (95% CI)	تکرار CA	
		بیمار تعداد (درصد)	کنترل تعداد (درصد)
۰/۰۰۶	۴/۲۶ (۱/۴۰-۱۲/۹۸)	۱۶(۴/۰)	۴(۱/۰)
۰/۲۶	۱/۸۸(۰/۶۸-۵/۱۹)	۱۱(۲/۷۵)	۶(۱/۵)
۰/۲۴	۱/۴۹(۰/۷۶- ۲/۹۲)	۲۳(۵/۷۵)	۱۶(۴/۰)
۰/۰۰۳۸	۲/۰۵(۱/۲۵- ۳/۳۷)	۵۰(۱۲/۵)	۲۶(۶/۵)
۰/۰۳۶۷	۰/۶۸(۰/۴۷ - ۰/۹۸)	۳۱۴(۷۸/۵)	۳۳۷(۸۴/۲۵)
۰/۱	۰/۹۶ (۰/۵۸- ۱/۶۱)	۳۶(۹/۰)	۳۷(۹/۲۵)
۰/۰۰۳۸	۰/۴۸(۰/۲۹- ۰/۸۰)	۳۵۰(۸۷/۵)	۳۷۴(۹۳/۵)

S (Short): آللهایی که تعداد تکرار CA آنها کمتر از ۱۳

L (Large): آللهایی که تعداد تکرار CA آنها مساوی یا بزرگتر از ۱۳

جدول ۲: توزیع فراوانی انواع ترکیبات آلی مشاهده شده در اینترون ۱ ژن PIK3CA در دو گروه بیمار و شاهد (n=۴۰۰)

ژنوتیپ	بیمار		کنترل
	آلل ۱/آلل ۲	تعداد (درصد)	
SS	۱۰/۱۰	۴(۲/۰)	۱(۰/۵)
	۱۰/۱۲	۳(۱/۵)	۱(۰/۵)
	۱۱/۱۱	۵(۲/۵)	۲(۱/۰)
	۱۲/۱۲	۵(۲/۵)	۳(۱/۵)
مجموع SS		۱۷(۸/۵)	۷(۳/۵)
	۱۰/۱۳	۵(۲/۵)	۱(۰/۵)
LS	۱۱/۱۳	۱(۰/۵)	۲(۱/۰)
	۱۲/۱۳	۱۰(۵/۰)	۹(۴/۵)
مجموع LS		۱۶(۸/۰)	۱۲(۶/۰)
	۱۳/۱۳	۱۴۱(۷۰/۵)	۱۵۶(۷۸/۰)
LL	۱۳/۱۴	۱۶(۸/۰)	۱۳(۶/۵)
	۱۴/۱۴	۱۰(۵/۰)	۱۲(۶/۰)
مجموع LL		۱۶۷(۸۳/۵)	۱۸۱(۹۰/۵)

S (Short): آللهایی که تعداد تکرار CA آنها کمتر از ۱۳

L (Large): آللهایی که تعداد تکرار CA آنها مساوی یا بزرگتر از ۱۳

جدول ۳: نتایج ارتباط بین ژنوتیپ‌های مختلف تکرار CA در اینترون ۱ ژن PIK3CA با خطر ابتلا به سرطان پستان

P value	OR (95% CI)	ژنوتیپ	
		بیمار	کنترل
		تعداد(درصد)	تعداد(درصد)
۰/۰۳	۲/۵۶ (۱/۰۴- ۶/۳۲)	۷(۳/۵)	۱۷(۸/۵)
۰/۰۳۷	۰/۵۳(۰/۲۹- ۰/۹۷)	۱۸۱(۹۰/۵)	۱۶۷(۸۳/۵)
۰/۱۷	۴/۰۶(۰/۴۵- ۳۶/۶۶)	۱(۱/۵)	۴(۲/۰)
۰/۱	۵/۱۰(۰/۵۹- ۴۴/۰۷)	۱(۰/۵)	۵(۲/۵)

آل (S (Short): آل‌هایی که تعداد تکرار GT آنها مساوی و یا کمتر از ۱۳

آل (L (Large): آل‌هایی که تعداد تکرار GT آنها بزرگتر از ۱۴

بحث

صلیبی DNA در این نواحی شود (۲۳). علاوه بر این توالی‌های تکراری به طور اختصاصی با یک فراوانی بالا در ژنوم یوکاریوتی در اطراف نواحی پروموتور و عناصر رونویسی قرار می‌گیرند و نشان داده شده است که تعدادی از وقایع زیستی از قبیل همانندسازی DNA، نوترکیبی در جایگاه خاص و رونویسی درگیر هستند (۲۳).

مطالعات مختلف حاکی از تاثیر توالی‌های تکراری دو نوکلئوتیدی CA/GT واقع در اینترون ۱ تعدادی از ژن‌ها بر روی بیان آنها است (۲۵، ۲۶) و در بیشتر مطالعات پیشین مشخص شده است که فراوانی تکرارهای دو تایی و بیان ژن به شکلی معکوس با هم مرتبط می‌باشند و تکرارهای بلند CA/GT تاثیر منفی بر رونویسی داشته که این اثر منفی با افزایش طول تکرارها بیشتر می‌شود (۲۷، ۲۸)، فرضیه‌ای که نتایج بدست آمده از این تحقیق نیز از آن حمایت می‌کند. از آنجایی که ژن PIK3CA نقش آنکوژنی در سرطان‌ها ایفا می‌کند، افزایش تعداد تکرارهای CA در اینترون ۱ احتمالا منجر به کاهش بیان آن شده و منجر به نقش محافظت‌کنندگی آل‌های بلند تکرارهای CA اینترون ۱ ژن PIK3CA در برابر سرطان پستان می‌شود. برعکس آل‌های کوتاه احتمالا باعث افزایش بیان و در نتیجه افزایش خطر ابتلا به سرطان می‌شوند.

به‌طور خلاصه نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که آل‌های کوتاه تکرار CA واقع در ژن PIK3CA، ممکن است با خطر افزایش یافته ابتلا به سرطان پستان مرتبط باشند.

مسیر انتقال پیام PI3K یکی از مهم‌ترین مسیرهای انتقال پیام در سرطان است (۱۰-۶). مهار این مسیر انتقال پیام می‌تواند سبب توقف رشد سلولی شود. بنابراین اجزای این مسیر می‌توانند هدف مناسبی برای درمان سرطان باشند. تکرارهای دو نوکلئوتیدی چند شکلی در طول ژنوم به طور معمول وجود دارند و به طور گسترده‌ای به عنوان مارکرهای ژنتیکی استفاده می‌شوند. بعضی از تکرارهای دو نوکلئوتیدی نشان داده شده است که در تنظیم رونویسی ژن نقش عملکردی دارند (۱۶-۱۴). در این مطالعه پراکندگی و فراوانی آل‌ها و ژنوتیپ‌های مختلف توالی تکراری CA ژن PIK3CA در جمعیت بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان حضرت سیدالشهدای شهر اصفهان مشخص شد. نتایج این مطالعه نشان داد که آل‌های کوچک S و ژنوتیپ‌های SS یک عامل خطر برای بروز سرطان محسوب می‌شوند. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تکرارهای CA کوتاه‌تر ممکن است که نسبتا اتصال پایدارتری نسبت به تکرارهای CA بلندتر با فاکتورهای هسته ایجاد کنند. در مطالعات قبلی که بر اساس سیستم *in vitro* و ژن‌های گزارشگر انجام شده بود ارتباط بین طول تکرارهای GT و بیان ژن در ژن‌های STAT6 (۱۹)، کلاژن نوع یک انسانی a² (۲۰)، گیرنده هورمون رشد انسانی (۲۱) و ماتریکس متالو پروتئیناز ۹ (۲۲) نشان داده شده است. تاثیر این تکرارها در اتصال به پروتئین‌ها، فعالیت پروموتور و تنظیم رونویسی می‌تواند با تغییر ساختارهای DNA از شکل B به فرم‌های H, Z یا

مطالعات بیشتر روی جمعیت‌های مختلف و بررسی ارتباط این تکرارها با میزان بیان ژن PIK3CA برای تصدیق این ارتباط ژنتیکی مورد نیاز است.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که بین تعداد توالی تکراری CA اینترون ۱ ژن PIK3CA و خطر ابتلا به سرطان پستان رابطه مستقیمی وجود دارد. بنابراین شاید بتوان از این تکرار آلی به عنوان یک مارکر پیش‌آگاهی سرطان پستان استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

در پایان از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه اصفهان جهت انجام این پروژه، از کلیه بیماران محترم و خانم الهه جان‌نثاری به خاطر یاری ایشان در جمع‌آوری نمونه‌ها و کلیه افرادی که به صورت مادی و معنوی ما را در انجام این پژوهش یاری رساندند، تشکر و قدردانی می‌نماییم.

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed December 2013.
2. Miron A, Varadi M, Carrasco D, Li H, Luongo L, Kim HJ, Park SY, Cho EY, Lewis G, Kehoe S, Iglehart JD, Dillon D, Allred DC, Macconail L, Gelman R, Polyak K: PIK3CA mutations in in situ and invasive breast carcinomas. *Cancer Res* 2010; 70: 5674-8.
3. Nout RA, Bosse T, Creutzberg CL, Jürgenliemk-Schulz IM, Jobsen JJ, Lutgens LC, van der Steen-Banasik EM, van Eijk R, Ter Haar NT, Smit VT. Improved risk assessment of endometrial cancer by combined analysis of MSI, PI3K-AKT, Wnt/ β -catenin and P53 pathway activation. *Gynecol Oncol* 2012; 126(3): 466-73.
4. Huang W, Jiang D, Wang X, Wang K, Sims CE, Allbritton NL, Zhang Q. Kinetic analysis of PI3K reactions with fluorescent PIP2 derivatives. *Anal Bioanal Chem* 2011; 401(6): 1881-8.
5. Wells V, Mallucci L. Phosphoinositide 3-kinase targeting by the beta galactoside binding protein cytokine negates akt gene expression and leads aggressive breast cancer cells to apoptotic death. *Breast Cancer Res* 2009; 11(1): 1-10.
6. Zhao L, Vogt PK. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene* 2008; 27: 5486-96.
7. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53: 457-81.
8. Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X, Yu JS, Malmström PO, Mansukhani M, Enoksson J, Hibshoosh H, Borg A, Parsons R. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65: 2554-9.
9. Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo WL, Davies M, Carey M, Hu Z, Guan Y, Sahin A, Symmans WF, Pusztai L, Nolden LK, Horlings H, Berns K, Hung MC, van de Vijver MJ, Valero V, Gray JW, Bernardis R, Mills GB, Hennessy BT. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 6084-91.
10. Janku F, Wheeler JJ, Westin SN, Moulder SL, Naing A, Tsimberidou AM, Fu S, Falchook GS, Hong DS, Garrido-Laguna I, Luthra R, Lee JJ, Lu KH, Kurzrock R. PI3K/AKT/mTOR inhibitors in patients with breast and gynecologic malignancies harboring PIK3CA

- mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 20: 402-5.
11. Okladnova O, Syagailo YV, Tranitz M, Stöber G, Riederer P, Mössner R, Lesch KP. A promoter associated polymorph repeat modulates PAX6 expression in human brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248: 402-5.
 12. Searle S, Blackwell JM. Evidence for a functional repeat polymorphism in the promoter of the human NRAMP1 gene that correlates with autoimmune versus infectious disease susceptibility. *J Med Genet* 1999; 36(4): 295-9.
 13. Rich A. DNA comes in many forms. *Gene* 1993; 135: 99-109.
 14. Lian Y, Garner HR. Evidence for the regulation of alternative splicing via complementary DNA sequence repeats. *Bioinformatics* 2005; 21(8): 1358-64.
 15. Hegyi H, Kalmar L, Horvath T, and Tompa P. Verification of alternative splicing variants based on domain integrity, truncation length and intrinsic protein disorder. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(4): 1208-19.
 16. Lim HT, Zhong T, Cho IC, Seo BY, Kim JH, Lee SS, Ko MS, Park HB, Kim BW, Lee JH, Jeon JT. Novel alternative splicing by exon skipping in KIT associated with whole-body roan in an intercrossed population of Landrace and Korean Native pigs. *Anim Genet* 2011; 42(4): 451-5.
 17. Heshmatpour N1, Hematti S, Hejazi SH, Safari F, Tavassoli M. Association between the lengths of GT dinucleotide repeat in the PIK3CA gene with breast cancer risk. *Med Oncol* 2014; 31(7): 29-33.
 18. کمیته دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله. ششم مرداد ۱۳۹۲. <http://bmsusr.ir/post/237>
 19. Gao PS, Heller NM, Walker W, Chen CH, Moller M, Plunkett B, Roberts MH, Schleimer RP, Hopkin JM, Huang SK. Variation in dinucleotide (GT) repeat sequence in the first exon of the STAT6 gene is associated with atopic asthma and differentially regulates the promoter activity in vitro. *J Med Genet* 2004; 41(7): 535-9.
 20. Li YC, Ross J, Scheppeler JA, Franza BR Jr. An in vitro transcript ion analysis of early responses of the human immuno deficiency virus type I long terminal repeat to different transcriptional activators. *Mol Cell Biol. Mol Cell Biol* 1991; 11(4): 1883-93.
 21. Akai J, Kimura A, Hata RI. Transcript ional regulat ion of the human type I collagen a 2 (COLIA2) gene by the combi nation of two dinucleotide repe ats. *Gene* 1999; 239(1):65-73.
 22. Shimajiri S, Arima N, Tanimoto A, Murata Y, Hamada T, Wang KY, Sasaguri Y. Shortened microsatellite (CA) 21 sequence down-regulates promoter activity of matrix metalloproteinase 9 gene. *FEBS Lett* 1999; 455(1-2): 70-4.
 23. Travers AA, Klug A. DNA topology and its biological effects. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1990; 11: 57-106.
 24. <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>
 25. Weber JL, Wong C. Mutation of human short tandem repeats. *Human molecular genetics* 1993; 2(8), 1123-8.
 26. Hui J, Hung LH, Heiner M, Schreiner S, Neumüller N, Reither G, et al. Intronic CA-repeat and CA-rich elements: a new class of regulators of mammalian alternative splicing. *The EMBO journal* 2005; 24(11): 1988-98.
 27. Zhang W, He L, Liu W, Sun C, Ratain MJ. Exploring the relationship between polymorphic (TG/CA) n repeats in intron 1 regions and gene expression. *Human genomics* 2009; 3: 236.
 28. Levinson G, Gutman GA. High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research* 1987; 15(13): 5323-38.