# Functional and Bioinformatic Investigation of the Regulatory Region of HER2-Associated Enhancer GH17J039694, HER2-Enhancer1, in Breast Cancer (SKBR3 and MCF7) and non-Breast Cancer Cell Lines (HEK293) Using CRISPR/Cas9 Technology

**ARTICLE INFO**

***Article Type***

Original Article

***Authors***

Mahdieh Rojhannezhad [1*], Seyed Javad Mowla [2*], Bahram Soltani [3], Mohammad vasei [4], Sara Taghizadeh [5], Leila Mirsadeghi [6]

1- PhD student in molecular genetics, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Professor of Genetics, Department of Molecular Genetics, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3- Professor of Genetics, Department of Molecular Genetics, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
4- Department of Pathology, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5- Translational Ophthalmology Research Center, Farabi Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
6- Biochemistry and Biophysics Research Center, University of Tehran, Tehran, Iran

***Corresponding Authors:** 1- Mahdieh Rojhannezhad; PhD student, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, P.O. Box: 14115-154, Phone: +989364485007, Fax: +9821(82884717), E-mail: mhdhroji@gmail.com. 2- Seyed Javad Mowla; Ph.D., Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, P.O. Box: 14115-154, Phone: +989122181980, Fax: +9821(82884717), E-mail: sjmowla@modares.ac.ir.

Received: 16 November, 2022
Accepted: 21 December, 2022
e Published: 07 July 2023

***Article History***

**ABSTRACT**

**Introduction:** Her2 / neu gene (HER2) is a member of the family of epidermal growth factor receptors (EGFR) encoding a 185 kd protein with tyrosine kinase activity. This gene is expressed in a variety of tissues such as kidney, skin, colon, ovary and mammary glands and mostly is found in plasma membrane. Following amplifying or increasing of HER2 transcription, carcinogenesis or deterioration of tumorigenicity has been observed in some cancers. Epigenetic mechanisms and chromatin modifications play a significant role in gene expression, transcriptional regulation, and cancer progression. Studies have shown that these changes can also affect the sequence of enhancers, short DNA motifs that serve as binding sites for specific transcription factors. Chromatin regions such as DNase I sensitive sites and histone modifications such as H3K4me1 and H3K27ac are used to predict possible enhancers. Active enhancers that express eRNAs (non-coding transcriptional RNAs derived from enhancers) have two H3K4me1 and H3K4me3 histone marks. A therapeutic approach that directly targets genomic changes can be valuable because it has no effect on healthy cells. The development of genome editing tools such as the CRISPR system could provide such an opportunity. In this study, we aimed to investigate the regulatory role of the GH17J039694 region as an enhancer, which we called HER2-En1 (HER2-Enhancer1) for short, located in the HER2 gene in the 17q12 region: 37850592-37853472 (GRCh37/hg19.2009) with the help of bioinformatics studies and by using CRISPR/Cas9 technology for genetic manipulation.

**Materials and Methods:** Genetic editing of this region was done for cis and trans studies in HER2+ and HER2- breast cancer cells. Bioinformatics studies were conducted in different cell lines with the help of databases such as GEO gene, ChIP-Atlas and TCGA. The laboratory results showed the reduction of HER2 variants and expression changes of other studied genes. In general, according to bioinformatics and laboratory studies, it seems that this part of the HER2 gene can be considered as an integral regulatory region.

**Results:** The results showed the decrease in the expression of the variants in the studied cell lines after 24 hours in cis and the expression changes of other studied genes in trans. Also, bioinformatic studies such as histone modifications (H3K27ac) showed the importance of HER2-En1 as a regulatory region.

**Conclusion:** In general, according to bioinformatics and laboratory studies in the form of gene editing of the HER2-En1 region, it seems that this part of the HER2 sequence can be considered as an enhancer regulatory region.

**Keywords:** *HER2* Gene; CRISPR/Cas9 System; Enhancer; Genetic manipulation.

*Copyright© 2021, ASP Ins. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License which permits Share (copy and distribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-Noncommercial terms.*

[ Downloaded from saremjrm.com on 2026-10-30 ]

[ DOI: 10.61186/sjrm.7.3.177 ]

# بررسی عملکردی و بیوانفورماتیکی ناحیه تنظیمی GH17J039694، 1HER2-Enhancer مستقر در HER2 در رده های سلولی سرطان پستان ( SKBR3 و MCF7) و رده ی سلولی کلیه جنینی (HEK293) با استفاده از فناوری CRISPR/Cas9

مهدیه رجحان نژاد[۱*]، سید جواد مولی[۲*]، بهرام سلطانی[۳]، محمد واسعی[۴]، سارا تقی‌زاده[۵]، لیلا میرصادقی[۶]

[۱] دانشجوی دکترای ژنتیک مولکولی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران
[۲] استاد ژنتیک گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران
[۳] استاد ژنتیک گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران
[۴] بخش پاتولوژی بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
[۵] مرکز تحقیقاتی چشم پزشکی ترجمانی، بیمارستان فارابی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
[۶] مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، ایران

## چکیده

مقدمه: ژن *HER2* (Her2/neu) یک عضو از خانواده‌ی گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR) است که یک پروتئین ۱۸۵ کیلو دالتونی با فعالیت تیروزین کینازی را کد می‌کند. این ژن در بافت های مختلفی از جمله کلیه، پوست، کلون، تخمدان و غدد پستانی بیان شده و بیشتر در غشای پلاسمایی یافت می‌شود. با تکثیر یا افزایش رونویسی *HER2*، سرطان زایی و یا وخیم تر شدن وضعیت تومورزایی در بعضی از سرطان ها مشاهده می‌شود. تغییرات کروماتینی و مکانیزم‌های اپی‌ژنتیکی تا حد زیادی می‌توانند بر روی بیان ژن و تنظیم رونویسی تاثیرگذاشته و به پیشروی سرطان کمک کنند. مطالعات نشان داده اند که گاهی این تغییرات بر روی توالی انهنسرها (Enhancer) نیز اتفاق می‌افتند. توالی-های انهنسری شامل موتیف‌های کوتاه DNA است که به عنوان جایگاه های اتصال فاکتورهای رونویسی ویژه‌ی توالی عمل می‌کنند. مناطقی از کروماتین مانند جایگاه های حساس به DNase I و همچنین تغییرات هیستونی مانند H3K4me1 و H3K27ac برای پیش‌بینی انهنسرها استفاده می‌شوند. انهنسرهای فعال از لحاظ رونویسی که eRNAها (RNAهای رونویسی شونده‌ی غیرکد شونده‌ی مشتق از انهنسرها) را بیان می‌کنند، دارای دو نشان هیستونی H3K4me1 و H3K4me3 می‌باشند. یک رویکرد درمانی که تغییرات ژنومی را مستقیماً هدف قرار می دهد، از آن جهت می‌تواند ارزشمند باشد که هیچ تاثیری بر سلول های سالم نگذارد. توسعه ی ابزارهای ویرایش ژنوم مانند سیستم کریسپر (CRISPR) می تواند چنین فرصتی را فراهم کند. در این پژوهش ما با هدف بررسی نقش تنظیمی ناحیه GH17J039694 به عنوان انهنسر که به اختصار آن را HER2-En1 (HER2-Enhancer1) نامیدیم، مستقر در ژن *HER2* در ناحیه 17q12: 37850592-37853472 (GRCh37/hg19.2009) از فناوری کریسپر Cas9 برای دستورزی (ویرایش) ژنتیکی و مطالعات بیوانفورماتیکی بهره گرفتیم.

مواد و روش ها: ویرایش ژنتیکی این ناحیه به منظور بررسی های سیس و ترانس در سلول های سرطانی پستان $HER2^{+}$ و $HER2^{-}$ انجام گرفت. مطالعات بیوانفورماتیکی در رده های سلولی مختلف با جستجو در پایگاههای داده‌ای مانند GEO، ChIP-Atlas و recount3 انجام گرفت. نتایج آزمایشگاهی نشان‌دهنده کاهش واریانت های *HER2* و تغییرات بیانی دیگر ژن های مورد بررسی بود. بطور کلی با توجه به مطالعات بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی به نظر می‌رسد این بخش از توالی *HER2* را می‌توان به عنوان یک ناحیه تنظیمی انهنسری در نظر گرفت.

نتایج: یافته ها نشان‌دهنده‌ی کاهش بیان واریانت ها در رده‌های سلولی مورد مطالعه پس از ۲۴ ساعت بطور سیس و تغییرات بیانی دیگر ژن های مورد بررسی بطور ترانس می‌باشد. همچنین، بررسی های بیوانفورماتیکی مانند نشان‌های هیستونی، H3K4me1 نیز اهمیت HER2-En1 را به عنوان یک ناحیه تنظیمی نشان داد.

نتیجه گیری: بطور کلی، با توجه به مطالعات بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی بصورت حذف ژنتیکی ناحیه HER2-En1 در *HER2*، به نظر می‌رسد این بخش از توالی *HER2* را می‌توان به عنوان یک ناحیه تنظیمی انهنسری در نظر گرفت.

کلید واژه‌ها: ژن *HER2*؛ روش کریسپر cas9؛ انهنسر؛ ویرایش ژنتیکی.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۳۰

*نویسندگان مسئول: ۱- مهدیه رجحان نژاد؛ دانشجوی دکترا، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۵۴-۱۴۱۱۵، تلفن: ۹۸۹۳۶۴۴۸۵۰۰۷+، فکس: ۸۲۸۸۴۷۱۷(۹۸۲۱+)، پست الکترونیکی mhdhroji@gmail.com. ۲- سید جواد مولی؛ دکتری، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۵۴-۱۴۱۱۵، تلفن: ۹۸۹۱۲۲۱۸۱۹۸۰+، فکس: ۸۲۸۸۴۷۱۷(۹۸۲۱+)، پست الکترونیکی: sjmowla@modares.ac.ir.

## مقدمه

ErbB2 یا گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی انسان(HER2/neu) یکی از اعضای خانواده تیروزین کینازهای گیرنده‌ی EGFR است و اعمال سیگنالینگ حیاتی در سلول های اپیتلیال طبیعی و بدخیم پستان را برعهده دارد [1]. افزایش بیان *HER2* در سرطان پستان از نوع *HER2* مثبت (HER2+) باعث از بین رفتن قطبیت و چسبندگی سلولی شده و منجر به آغاز رویدادهای فسفریلاسیون و فعال شدن مسیرهای مختلف (مانند TGFB/SMAD از طریق آبشار سیگنالی RAS)، افزایش



[ Downloaded from saremjrm.com on 2026-10-30 ]
[ DOI: 10.61186/sjrm.7.3.177 ]

فعالیتهای سیگنالینگ و بیان واریانت هایی از *HER2* مانند نوع هسته‌ای می‌شود [۲، ۳]. *HER2* در پیشرفت سرطان های پستان +HER2 نقش داشته و به شدت با پیش آگهی ضعیف ارتباط دارد. تکثیر *HER2* (Amplification) مکانیزم مهمی برای بیان بیش از حد آن است، با این وجود، میزان بالای رونویسی در هر کپی از ژن نیز در سلولهای سرطانی پستان با افزایش تکثیر *HER2* همراه است. به همین دلیل سطح رونویسی ژن در سلول های سرطان پستان +HER2 با تکثیر و بیان بالای ژن همبستگی دارد [۴]. بیان بالای *HER2* در حساسیت سلول های سرطانی به داروها نقش پیچیده‌ای دارد و مولکول هایی که در مسیر سیگنالینگ آن ها دخیل هستند، احتمالاً عامل اصلی حساسیت به داروها می‌باشند. شواهد نشان می دهد که *HER2* همچنین یک تنظیم کننده مهم جمعیت سلول های بنیادی سرطان پستان در سرطان های +HER2 است. بیان بیش ازحد *HER2* باعث افزایش جمعیت سلولهای بنیادی در رده های سلولی سرطان پستان (BCSC)[۱] از طریق مسیرهایی مانند PI3 کیناز و AKT می شود [۵-۸]. ارتباط بیان بیش از حد *HER2* با تومورهای انسانی، دسترسی خارج سلولی و نقش آن در چرخه سلولی و آپوپتوز، دخالت در متاستاز (EMT) و تهاجم تومور، همه عواملی هستند که این گیرنده را به عنوان یک هدف مناسب برای درمانهای ضد توموری ارائه می‌دهند. یکی از علل تغییرات بیان *HER2*، تغییراتی است که در توالی انهنسرها رخ می‌دهد [۹]. انهنسرها[۲] موتیف‌های کوتاه DNA هستند که به عنوان جایگاه های اتصال برای فاکتورهای رونویسی ویژه‌ی توالی عمل می کنند و می‌توانند صدها کیلوباز از ژن هدفشان فاصله داشته باشند. انهنسرها نه فقط در مرحله رشد و نمو در بیان ژن اهمیت دارند، بلکه در تکوین و بیماری نیز حائز اهمیت هستند [۱۰، ۱۱]. ابر انهنسرها[۳] نوعی از انهنسرها هستند که بخش بزرگی از DNAهای تنظیمی را در بر-می‌گیرند و با فاکتورهای رونویسی، نشان‌های هیستونی (مانند H3K27ac) و کمک فعال کننده‌ها پوشیده شده‌اند. ابر انهنسرها تنظیم ژن های ویژه‌ی سلول (Cell-Type) را برعهده دارند. eRNAها (enhancer derived RNAs)، RNAهای غیر کدشونده‌ی رونویسی شده از انهنسرهای عملکردی هستند که در ارتباط با نواحی ابر انهنسر می‌باشند. eRNAها نشان‌دهنده‌ی فعال بودن ژن های اطراف و غنی از H3K4me1 و H3K27ac هستند و در رونویسی از ژن های نزدیک نیز نقش دارند. رونویسی eRNAها از انهنسرها در رده های سلولی متفاوت و در پاسخ به محرک های مختلف انجام می شود. علاوه بر نقشی که انهنسرها در تنظیم بیان ژن دارند، eRNAهای رونویسی شده از آن ها در عملکردهای بیولوژیک نیز دخیل هستند. به عنوان مثال، چندین eRNA ویژه‌ی اریتروسیت نقش خود را در بلوغ سلولهای قرمز خون ایفا می‌کنند [۱۲، ۱۳].

برهم کنش انهنسرها با پروموترها منجر به فراخوانی RNA پلیمراز II و تنظیم رونویسی می‌شود. از نشانگرهای اپی ژنومی احتمالاً برای شناسایی انهنسرهای درگیر در رشد و نمو، به عنوان الگوهای بیان ژن برای یک بافت خاص، استفاده می‌شود. کروماتین فعال از لحاظ رونویسی دارای نشان‌های هیستونی ویژه‌ای همانند H3K27ac، H3K9ac، H3K4me3 و H3K36me3 می‌باشد و انهنسرهای مختص بافت غنی از H3K4me1 می‌باشند [۱۴، ۱۵]. بطور کلی وضعیت کروماتینی مانند مناطق حساس به DNaseIو تغییرات هیستونی، مثل H3K4me1 و H3K27ac را می‌توان برای پیش بینی انهنسرها بکار برد. تغییرات کروماتین می تواند تأثیر زیادی بر تنظیم رونویسی داشته باشد و به پیشرفت سرطان کمک نماید [۱۶]. یکی از روش ها برای ارزیابی های عملکردی انهنسرها، روش‌های مرتبط بر پایه کریسپر است که باعث ویرایش مستقیم توالی ژنومی DNA می شود [۱۰]. سیستم پروتئین ای مرتبط با کریسپر یک ابزار بسیار در دسترس برای مهندسی ژنوم است [۱۷]. از دیگر ابزارها مطالعات بیوانفورماتیکی RNA Seq و ChIP Seq و استفاده از پایگاه های داده مانند recount3 حاوی اطلاعات TCGA، DAVID و GEO می‌باشد که می‌توان به بررسی هرچه بیشتر نواحی تنظیمی ژن ها پرداخت.

ژن *HER2* با ۱۲۲۵ اسیدآمینه در موقعیت ۱۷q۱۲ (Ref-Seq:NG_007503) واقع شده است و تاکنون چندین ترانسکریپت شامل دو گروه واریانت بلند و کوتاه، دو پروموتر و دو انهنسر برای آن گزارش شده است [۱۶]. ناحیه ی chr17:39,694,339-39,697,219 (UCSC-hg38) که از اینترون ۳ شروع و تا میانه های اینترون ۴ ادامه پیدا کرده است، ناحیه ای شبه انهنسر به نظر می‌رسد و در ترنسکریپت واریانت های ۳،۲ و۵ نیز حضور دارد که در این مطالعه به بررسی هرچه بیشتر نقش احتمالی آن پرداختیم. با توجه به اهمیت زیاد *HER2* و تکثیر و بیان بالای آن در تومورهای سرطان پستان، تشخیص و درمان اختصاصی سرطان های +HER2 امری ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین، یافتن مارکری مرتبط با تکثیر *HER2* که بتواند در تشخیص یا درمان تومورهای +HER2 نقش داشته باشد، از اهمیت بالینی بسیار بالایی برخوردار می-باشد. با توجه به این موضوع در این مطالعه ما در ابتدا با آنالیزهای بیوانفورماتیکی و با استفاده از مرورگر ژنوم GEO چندین نمونه از رده‌های سلولی سرطانی و نرمال پستان را گرفته و ژن های دارای اختلاف بیان را مشخص نمودیم. سپس با بردن این ژن ها به ابزارهای آنلاین تعیین مسیر مانند DAVID [18] به مسیرهای سیگنالینگ متنوعی رسیدیم. در ادامه، آنالیزهای بیوانفورماتیکی خود را از طریق ابزار IGV [۱۹] و پایگاه های داده recount3 [۲۰] و ChIP-Atlas [۲۱] به ناحیه‌ی HER2-En1 محدود نمودیم و در نهایت بوسیله نتایج آزمایشگاهی و از لحاظ عملکردی علاوه بر مطالعات بیوانفورماتیکی، اهمیت *HER2* و ناحیه تنظیمی HER2-En1 و تغییرات احتمالی بوجود آمده در بیان واریانت های آن (که احتمالاً یکی از عوامل بدخیمی و مقاومت به درمان، حضور رونوشت‌ها و ایزوفرم های متفاوت می‌باشد) را از طریق سیستم بسیار دقیق کریسپر نیز نشان دادیم.

[۱] Breast Cancer Stem Cells
[۲] Enhancers
[۳] Super Enhancers



[ Downloaded from saremjrm.com on 2026-10-30 ]
[ DOI: 10.61186/sjrm.7.3.177 ]

## مواد و روش ها

**بیانیه اخلاقی:** این تحقیق شامل شرکت کنندگان انسانی و استفاده از نمونه های بیولوژیکی آن ها نبود. همچنین شامل آزمایش بر روی حیوانات زنده نمی شد. آزمایشات بر روی رده های سلولی تجاری به عنوان پایان نامه دکتری توسط کمیته اخلاقی پژوهشی تربیت مدرس (شماره مرجع IR.MODARES.REC.1399.067 ) تایید گردید.

**بررسی های بیوانفورماتیکی**

مرورگر ژنوم UCSC (https://genome.ucsc.edu) برای بررسی ناحیه ژنومی اطراف GH17J039694 واقع در توالی *HER2* در q12 ۱۷ استفاده گردید (شکل ۱ و ۲، در انتهای صفحه). تجزیه و تحلیل نمونه های سرطان پستان در پایگاه داده recount3[۴] برای خوانش RNAهای کوچک بیانی (Reads) در ناحیه ی تنظیمی GH17J039694، واقع در *HER2* (chr17:39694339-39697219) نیز انجام شد که در جدول ۱ نشان داده شده است. همچنین از پایگاه های داده GEO[۵] برای بررسی اختلاف بیان ژن ها در ۳ رده سلولی پستان، از ChIP-Atlas[۶] برای بررسی نشان‌های هیستونی در رده های سلولی مختلف و مناطق حساس به DNaseI و از DAVID[۷] برای بررسی مسیرهای مشترک درگیر بهره گرفتیم.

**طراحی اولیگونوکلئوتیدها**

الیگونوکلئوتیدهای مورد استفاده در روش PCR برای سنجش بیان واریانت های *HER2* و دیگر ژن های متاثر از آن قبل و بعد از ویرایش ژنتیکی با استفاده از نرم افزار Oligo Analyzer طراحی شده و به کمک پایگاه NCBI Primer-Blast مورد آنالیز کامل قرار گرفت. پرایمرهای طراحی شده از شرکت آلمانی Metabion و یا پیشگام تهیه شدند. توالی gRNAهای مربوط به سیستم کریسپر نیز توسط نرم‌افزار CRISPOR (http://crispor.org/) طراحی و بهترین جفت‌ها بصورت بیوانفورماتیکی مورد ارزیابی و انتخاب قرار گرفتند. توالی پرایمرهای طراحی شده برای این پژوهش در جدول ۲ آمده است.

**کشت سلولی:** رده های سلولی SKBR3، MCF7 و HEK293 از مرکز منابع بیولوژیکی ایران (IBRC، ایران) تهیه شد. سلول‌ها در DMED/F12 (Thermo Fisher Scientific، ایالات متحده آمریکا)، حاوی ۱۰ درصد FBS (Thermo Fisher Scientific، ایالات متحده)، و ۱ درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Bio Basic، کانادا) کشت داده شدند و سپس انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO2 ۵ درصد انجام گرفت.

**روش کلونینگ**

در طول این تحقیق، gRNAها در وکتور PX459.v2 کلون شدند. برای ناک‌داون یا غیر فعال‌سازی ژن (Knockdown) نیز از TRE-KRAB-dCas9-IRES-GFP به منظور کم‌نمودن اهداف خارج از هدف ( Off Targets) و مقایسه با نتایج ناک‌اوت یا حذف (Knockout) استفاده نمودیم. جهت تایید صحت امپلیکون های تکثیر شده توسط پرایمرهای طراحی شده در این پروژه، امپلیکون ها بعد از PCR و تایید اندازه بر روی ژل آگارز، خالص سازی شده و در TA وکتور کلون شدند. به طور کلی، کلونینگ دارای چند مرحله ی اصلی فراهم سازی قطعه اینسرت، هضم آنزیمی، الحاق، ترانسفورماسیون، بررسی کلونی های ترنسفورم شده با واکنش کلونی PCR (Colony Check PCR)، کشت کلونی های مثبت، استخراج پلازمید و تایید قطعات واردشده به وکتور با توالی‌یابی می‌باشد. نمونه وکتورهای استخراج شده با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (GeneAll, South Korea) جهت تأیید حضور توالی مورد نظر، برای سکانس به بیمارستان رجایی تهران ارسال شد.

**ترانسفکت وکتورهای حامل Cas9 و gRNA**

اولین مرحله دست‌ورزی یا ویرایش ژنتیکی، وارد کردن وکتورهای کد کننده آنزیم Cas9 و توالی های gRNA به سلول های هدف بود (در این مطالعه از سلول های چسپنده HEK293، SKBR3 و MCF7 استفاده شد). به این صورت که پس از کشت سلول ها در فلاسک کشت سلولی T25 (محیط با آنتی‌بیوتیک ۱ درصد، FBS ۱۰ درصد و DMEM F12) به تعداد ۱۰۰۰۰۰ سلول در هر خانه از پلیت ۱۲ خانه ای سید شده و ۲۴ ساعت بعد به کمک محلول ترنسفکشن توربوفکت (Invitrogen, USA) به میزان ۲ میکرولیتر با وکتورهای حامل gRNA (مجموعا ۱ میکروگرم DNA) ترانسفکت شدند. پس از ۲۴ ساعت محیط کشت را تعویض و کنترل مثبت (PEGFP-C1) را زیر میکروسکوپ فلورسنت چک نمودیم. جهت از بین بردن سلول های ترانسفکت نشده، ۲۴ ساعت بعد به محیط این سلول ها، آنتی بیوتیک پورومایسین با غلظت ۱.۵ میکروگرم بر میلی لیتر به عنوان نشانگر انتخابی (Selection Marker) اضافه نمودیم. محیط سلول های باقی مانده را ۲۴ ساعت بعد از تیمار آنتی بیوتیکی تعویض نموده و DNAی سلولی را با استفاده از کیت (GeneAll) جهت اطمینان از ویرایش ژنتیکی استخراج کردیم. پس از حصول اطمینان از ویرایش توسط PCR، RNAی سلول های کنترل و ویرایش شده را نیز بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده با ترایزول Trizol ( ambion/Life technologies) استخراج نمودیم. تایید ویرایش توسط توالی یابی در بیمارستان قلب رجایی تهران صورت پذیرفت.

**سنجش بیان ژن با کمک qRT-PCR( Quantitative Reverse Transcription-PCR)**

برای مشاهده‌ی مهار بیان mRNA مربوط به واریانت های ۱ و ۲ *HER2* و ژن های مورد بررسی دیگر (جدول ۲، در انتهای صفحه) ابتدا از روی RNAهای استخراج شده از سلول‌های کنترل و ترنسفکت شده با استفاده از دستورالعمل کیت شرکت (Thermo Scientific) سنتز cDNA انجام گرفت. سپس از cDNA سنتز شده به‌عنوان الگو و از پرایمرهای

[۴] (https://rna.recount.bio/docs/index.html#how-to-cite-recount3)

[۵] (GSE:96860) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)

[۶] (https://chip-atlas.org)

[۷] (https://david.ncifcrf.gov)



[ Downloaded from saremjrm.com on 2026-10-30 ]

[ DOI: 10.61186/sjrm.7.3.177 ]

GAPDH به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد و محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱.۵ درصد مشاهده شد. به منظور سنجش کمی بیان ژن-های کاندید این مطالعه از تکنیک RT-qPCR استفاده شد. با استفاده از Ct های حاصل از تکثیر ژن‌های هدف و روش‌های $2^{-dCt}$ و $2^{-ddCt}$ ، بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه به دست آمد.

**سنجش تعداد کپی با استفاده از qPCR (Real-time PCR) و رسم منحنی استاندارد (Standard Curve)**

qPCR یک فناوری سریع و قابل اعتماد برای کمی سازی بیان ژن ارائه می دهد. این روش حساس به دو صورت بکار می‌رود: مطلق و نسبی. روش qPCR مطلق اجازه می دهد تا تعداد کپی ژن هدف را بر اساس منحنی استاندارد تشخیص دهیم. DNA پلاسمید اغلب به عنوان کنترل خارجی برای ایجاد منحنی استاندارد استفاده می شود. در این مطالعه تعداد کپی‌های ژن در ۱۰۰ نانوگرم از هر DNA (کنترل و ویرایش شده) بر اساس خط استاندارد بدست آمده از پلازمید حاوی قطعه مورد نظر از $10^{7}$ تا ۱۰ کپی بدست آمد.

**روش تجزیه و تحلیل داده‌ها**

نتایج حاصل از qPCR در رده‌های سلولی متفاوت توسط نرم‌افزار Graph pad prism v 9.00 و $\Delta\Delta C_t$ تحلیل شدند. از آزمون t test و ANOVA، به منظور بررسی معنی‌داری تفاوت‌های مشاهده شده استفاده شد. (آستانه معنی‌داری یا p-value : ۰.۰۵ در نظر گرفته شد).

**نتایج**

**بررسی های بیوانفورماتیکی**

**آنالیز بیان ژن های افتراقی در رده سلولی سرطانی +HER2 پستان نسبت به رده‌های سلولی نرمال و -HER2**

با استفاده از مرورگر ژنوم GEO سه رده سلولی MCF10A، MCF7 و SKBR3 (GSE96860) به ترتیب به عنوان گروه های کنترل یا نرمال، منفی و مثبت انتخاب شدند. پس از انتخاب ژنهایی که اختلاف بیان بیشتری داشتند و همچنین رسم heatmap مربوط به آن[۸] (شکل ۳، در انتهای صفحه)، مسیرهای بیولوژیکی نیز بدست آمدند (مسیر انتقال سیگنال (p-value:0.02)، مسیر بیماری آلزایمر (p-value:0.00004)، آنژیوژنز (p-value:0.00005)، مسیر سیگنالینگ wnt (p-value:0.00057)، MAP کیناز (p-value:0.00032)، TGF-beta (p-value:0.03)، P53 (p-value:0.04) و PI3K کیناز (p-value:0.00048)، Benjamini=1.0E0). همچنین وضعیت برهمکنش پروتئین ها در سه گروه مجزا نیز ترسیم گردید (شکل ۴، در انتهای صفحه).

**وضعیت HER2-En1 به عنوان ناحیه تنظیمی انهنسری در ژن HER2**

ژن HER2 حاوی ۲۷ اگزون کدکننده است که به یک گلیکوپروتئین گذرنده ی ۱۸۵ کیلو دالتونی با ۱۲۵۵ اسید آمینه تبدیل می شود. یک بخش از توالی HER2، GH17J039694، با ۲۸۸۱ جفت باز واقع در موقعیت chr17: 37,850,592-37,853,472(UCSC-hg19) از ژن، به عنوان یک منطقه تنظیم کننده انهنسری در پایگاه های داده شامل UCSC (Z-Lab) ENCODE، GeneCards and dbSUPER، Craniofatial Atlas (GRCh38/hg38) پیش بینی شده است. این ناحیه از اینترون ۳ شروع می‌شود و تا اواسط اینترون ۴ ادامه می‌یابد (بر اساس NM_001289936.2). ناحیه تنظیمی HER2-En1 در بالادست مجموعه ای از واریانت های کوتاه *HER2* یا رونوشت های نوع ۲ (≦۲-kb بالادست پروموتر ۲) قرار دارد و احتمالاً بر نسبت بیان رونوشت های کوتاه و بلند ژن تاثیر می‌گذارد و با پروموتر ۲ برهم‌کنش بیشتری دارد (UCSC: interactions of GeneHancer regulatory elements). همچنین، ناحیه ی HER2-En1 حاوی برخی از ویژگی‌های عناصر تنظیم‌کننده‌ی سیس و بخش هایی از توالیهای حفاظت شده و مناطق حساس به آنزیم DNase می باشد (شکل ۱ و ۲، در انتهای صفحه). این ناحیه به عنوان یک کروماتین باز در رده های سلول های بنیادی جنینی مانند H1-hESC، H7-hESC و همچنین رده سلولی سرطان کبدی HepG2 (UCSC GRCh38/hg38) وجود دارد (شکل ۲، در انتهای صفحه). این ویژگی ها نقش انهنسری این قطعه DNA را پر رنگ-تر می‌کند. طبق داده‌های ENCODE و ChIP-Atlas نشان‌های هیستونی مانند H3K4me3 و H3K27ac نشان‌دهنده نواحی پروموتری و نشان های هیستونی مانند H3K4me1 نشان‌دهنده مناطق انهنسری هستند. ناحیه HER2-En1 حاوی علائم هیستونی H3K4me1، H3K27ac و H3K36me3 می باشد که نشان دهنده وضعیت کروماتین باز و فعال است (شکل ۵، در انتهای صفحه). با توجه به داده های TF C ChIP-seq در UCSC و ChIP-Atlas، چندین فاکتور رونویسی مانند HDAC، POLR2A/G و EP300 در رده های سلولی مختلف مانند H1-hESC و HEPG2 به این ناحیه متصل می شوند. نقش انهنسری احتمالی این ناحیه در ژن‌های *GRB7*، *PGAP3*، *NEUROD2*، *ORMDL3*، *MIEN1*، *LRRC3C* نیز در برخی از رده‌های سلولی گزارش شده است (بر اساس داده‌های C۳ در ENCODE/UCSC).

**وضعیت بیانی HER2 و انهنسر HER2-En1**

داده های منتشر شده از RNAseq در پروژه هایی مانند ENCODE حاکی از بیان ERBB2 در بافت های مختلفی از جمله غدد لنفاوی، مغز، قلب، ماهیچه اسکلتی، کولون، کلیه، کبد، شش، تیروئید، پوست، پستان، تخمدان، رحم، بیضه و پروستات می‌باشد. پروتئین آن نیز به میزان بیشتری در قلب، کولون، کبد، شش، جنین، غدد ترشحی، پروستات، پوست، تخمدان و بیضه بیان می‌شود. طبق اطلاعات بیوانفورماتیکی در UCSC (DASh RNA annotation) و GTEX RNA-seq خوانش‌های متعددی (enhancer RNAs) نیز در این ناحیه وجود دارد (شکل ۶، در انتهای صفحه). بنابراین HER2-En1 احتمالاً به عنوان یک انهنسر بیانی (eRNA) عمل می‌کند. همچنین، طبق آنالیزهای بیوانفورماتیکی که بر روی داده‌های RNA Seq حاصل از بافت نرمال و توموری پستان، +HER2 و -HER2 ها از پایگاه داده recount3 بدست آمده خوانش‌های

[۸] (https://discover.nci.nih.gov/cimminer/oneMatrix.do)



[ Downloaded from saremjrm.com on 2026-10-30 ]

[ DOI: 10.61186/sjrm.7.3.177 ]

متعددی در ناحیه HER2-En1 در منطقه chr17:39694901-39694987 در تومورهای پستانی+HER2 وجود دارند (جدول ۱ و شکل ۷، در انتهای صفحه).

**تایید کلون سازی gRNA ها در وکتور PX459-V2**

پس از انجام واکنش کلونینگ، محصول واکنش به باکتری مستعد ترانسفورم شد. کلونی PCR با استفاده از پرایمر فوروارد قرار گرفته روی تنه وکتور (U6F) و اولیگوی آنتی سنس هر gRNA به عنوان پرایمر ریورس اختصاصی انجام شد و کلونی های مثبت جهت استخراج پلازمید Px459 کشت داده شدند. صحت کلون شدن gRNAها، پایین دست پروموتر U6 با تعیین توالی مشخص شد.

**شناسایی کلونی های ویرایش شده**

سلول ها ۲۴ ساعت پس از ترنسفکشن (شکل ۸، در انتهای صفحه) توسط وکتور نوترکیب که بیان کننده‌ی gRNAهای اختصاصی ناحیه HER2-En1 بودند، با آنتی بیوتیک پوروماسین تیمار شدند و پس از گذشت ۴۸ ساعت DNA آنها استخراج و برای تعیین وقوع حذف ژنومی، با جفت پرایمرهای ادیت تست (Edit-test) که در دو طرف ناحیه ویرایش قرار گرفته بود، PCR شد. نتیجه PCR نشان دهنده ویرایش و حذف ناحیه بود ( شکل ۹، در انتهای صفحه) که با توالی یابی (شکل ۱۰، در انتهای صفحه) مورد تایید قرار گرفت.

**با مهار عملکردی HER2-En1 توسط سیستم CRISPR/Cas9، اثرات تنظیمی سیس بر واریانت ها و ترانس آن بر ژن های بنیادینگی مشاهده شد.**

وضعیت بیانی واریانت های HER2 در RNAهای استخراج شده از رده های سلولی مختلف با پرایمرهای اختصاصی واریانت های ۱و۲ بصورت کمی بررسی شد. این دسته پرایمرها برای نقاط مشترکی از واریانت های ۱یا بلند و۲ یا کوتاه بطور جداگانه طراحی شدند. در ۲۴ ساعت ابتدایی پس از ترنسفکشن افزایش مختصری در بیان واریانت ها به ویژه در واریانت های گروه ۱ در رده‌ی SKBR3 مشاهده می‌شود (شکل ۱۱ الف، در انتهای صفحه). بعد از ۲۴ ساعت شاهد کاهش بیان واریانتهای ۱ و ۲ در هر سه رده سلولی بودیم (شکل ۱۱ ب، در انتهای صفحه). علاوه بر این، زمانیکه بیان واریانت ها با یک جفت پرایمر مشترک بررسی شد نتیجه مشابهی بدست آمد (شکل ۱۱ ج، در انتهای صفحه). همچنین در شکل ۱۱ د نیز مشاهده می‌شود که ژن های مرتبط با سلول‌های بنیادی *NANOG*، *OCT4* و *SOX2* در SKBR3 و MCF7 افزایش بیان نشان می‌دهند. (کنترل داخلی *GAPDH* و سطح معنی‌داری کمتر از ۰.۰۵ در نظر گرفته شد).

**اندازه گیری تعداد کپی DNA با استفاده از Real-Time PCR و رسم نمودار منحنی استاندارد نشان دهنده‌ی کاهش تعداد کپی ها پس از ویرایش می‌باشد.**

تعداد کپی‌های HER2-En1 در ۱۰۰ نانوگرم از DNAی سلول های کنترل و ویرایش شده به شرح زیر می‌باشد. در سلول های ویرایش نشده یا کنترل در رده‌های SKBR3 ، HEK293 و MCF7 در هر ۱۰۰ نانوگرم از غلظت سلولی به تعداد تقریبا ۲۰۰۰۰-۱۰۰۰ کپی از ژن موجود است که بعد از دست‌ورزی تقریبا به تعداد ۱۰۰۰ کپی یا بیشتر تقلیل می‌یابد که نشان‌دهنده‌ی حذف ناحیه می‌باشد (شکل ۱۲، در انتهای صفحه).

**بحث**

گیرنده ۲ فاکتور رشد اپیدرمی انسان (*HER2*)، یک عضو از خانواده آنکوژن شبه ErbB است، که بیان بیش از حد آن در حدود ۲۰ الی ۳۰ درصد از سرطان های پستان رخ می دهد [۱۶]. تکثیر *HER2* و بیان بیش از حد پروتئین آن از عوامل مهم در پیش بینی حساسیت بالینی به درمانهای ضد *HER2* در بیماران مبتلا به سرطان پستان ، معده و مری می باشد [۲۲]. اهمیت *HER2* در درمان سرطان در نقش آن در تشکیل تومور و همچنین نقش آن به عنوان نشانگر در هدف گیری عوامل مختلف درمانی نهفته است [17]. بنابراین، با توجه به اهمیت *HER2* و تکثیر و بیان بیش از حد آن در سرطان هایی مانند سرطان پستان، تشخیص و درمان اختصاصی سرطان های +HER2 ضروری به نظر می رسد. یافتن یک نشانگر که با تکثیر *HER2*، تشخیص و درمان تومورهای +HER2 مرتبط باشد نیز از اهمیت بالینی بالایی برخوردار است. در این پژوهش نقش HER2-En1 را در تعادل رونویسی انواع واریانت های کوتاه و بلند *HER2* و ژن‌های مرتبط با سلولهای بنیادی در سرطان پستان بررسی نمودیم. وضعیت حفاظت شدگی ویژه در مقایسه با توالی‌های جانبی، نشان H3K27Ac، وجود عناصر تنظیمی سیس، مناطق باز کروماتینی حساس به آنزیم DNaseI (شکل های ۱ و ۲، در انتهای صفحه) و در نهایت وجود رونوشت‌های کوتاه در پایگاه های داده recount3 و مرورگر ژنوم UCSC، وجود ناحیه تنظیمی HER2-En1 را در *HER2* پیشنهاد می‌کند. همچنین با آنالیز بیوانفورماتیکی داده‌های GSE96860، بیان ژن های افتراقی در سه رده سلولی پستان (رده سلولی نرمال MCF10A، رده سلولی +HER2: SKBR3 و رده سلولی -HER2: MCF7) را بدست آوردیم. سپس با فیلترینگ سخت‌گیرانه (padj<0.001 و log2FoldChange>5)، ژن هایی را که اختلاف بیان بیشتری در این گروهبندی داشتند انتخاب نموده (شکل ۳، در انتهای صفحه) و به پایگاههای REACTOME، KEGG، DAVID، PANTHER و Enrichr برده و مسیرهای بیوشیمیایی/بیولوژیکی مرتبط را پیدا نمودیم. از جمله‌ی این مسیرها می‌توان به مسیر انتقال سیگنال، مسیر بیماری آلزایمر، آنژیوژنز، مسیر سیگنالینگ wnt، MAP کیناز، TGF-beta، P53و PI3K کیناز اشاره نمود. تصور می شود که خواص انکوژنی *HER2* به دلیل فعال شدن بیش از حد آبشارهای سیگنالینگ پایین دست باشد. به طور خاص، سیگنال دهی از طریق مسیر PI3K[۹] اثرات ضد آپوپتوز و تقویت کننده رشد را اعمال می کند [23]. شواهد مبتنی‌بر ادبیات موضوع نشان می‌دهد که مسیر سیگنالینگ PI3K-Akt یک مسیر انتقال سیگنال است که بقا و رشد را در پاسخ به سیگنال های خارج سلولی افزایش می دهد [24]. سلول هایی که *HER2* را بیش از حد بیان می کنند (به عنوان مثال، رده سلولی آدنوکارسینوم SKBR3) به طور قابل توجهی مسیرهای

[۹] Phosphoinositide 3-Kinase -Akt



[ Downloaded from saremjrm.com on 2026-10-30 ]
[ DOI: 10.61186/sjrm.7.3.177 ]

پایین دست را مانند PI3K/AKT در مقایسه با سلول هایی با بیان کمتر *HER2* (مانند MCF10A) فعال می‌کنند [2]. PKB/Akt کاملا فعال، واسطه عملکردهای سلولی متعددی از جمله رگزایی، متابولیسم، رشد، تکثیر، بقا، سنتز پروتئین، رونویسی و آپوپتوزمی باشد [۲۵].

پس از پیدا نمودن مسیرهای بیولوژیکی ، ژن های افتراقی بدست آمده از سه گروه کنترل و +HER2، کنترل و -HER2 و +HER2 با -HER2 را جداگانه به پایگاه داده STRING [۲۶] برده و وضعیت برهمکنشهای پروتئینی را بررسی نمودیم. همچنین شبکه پروتئینی خود *HER2* را نیز ترسیم نمودیم (شکل ۴، در انتهای صفحه). مقایسه اختلاف بیان ژن ها در سه گروه ذکر شده نشان داد که ژن های افتراقی بدست‌آمده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی، در سلول های بنیادی سرطانی ( Cancer Stem Cells) نیز حضور دارند. در مطالعه‌ای که توسط Korkaya وهمکارانش انجام شد مشاهده گردید که در زنان مبتلا به سرطان لومینال پستان، *HER2* بطور ویژه در جمعیت CSC بیان می‌گردد و نقش مهمی در تنظیم ویژگی پرتوانی از طریق مسیرهای سیگنالینگ مانند PI3K/AKT و WNT ایفا می‌کند [۵]. مکانیزم های اپی‌ژنتیکی بر روی بیان ژن تاثیر گذار و برای تنظیم رونویسی مهم هستند و سلول های با تکثیر و بیان بالای *HER2* غنی از H3K4me3 و H3K9ac بر روی پروموتر و انهنسر می‌باشند [۱، ۱۶]. در رده‌های سلولی +HER2 مانند SKBR3 افزایش در نشان هیستونی H3K9ac یا H3K36me3 و کاهش در نشان هیستونی H3K27me3 مشاهده می‌شود (شکل ۵، در انتهای صفحه) [۱، ۱۴].

بسیاری از انهنسرهای عملکردی واحدهای رونویسی هستند و eRNAها را تولید می کنند [27]. eRNAها، RNAهای غیر کدکننده رونویسی شونده از انهنسرهای مرتبط با ابر انهنسرها هستند و همچنین در رونویسی ژن های مجاور دخیل هستند. اندازه گیری سطوح eRNA می تواند در شناسایی ویژگی های انهنسرها در مقیاس بسیار بزرگتر و گسترده تر، از جمله نمونه های انسانی در شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی استفاده شود، که به طور بالقوه اهداف تشخیصی و درمانی برای بیماری های انسانی بر اساس ویژگی استثنایی eRNAها نسبت به نوع سلول و وضعیت آن می‌باشد [۱۲، ۱۳]. بررسی خوانش‌های RNA-seq (Reads) در UCSC نشان می‌دهد که رده سلولی MCF7 در ناحیه HER2-En1 دارای RNAهای غیر کدکننده رونویسی شونده یا خوانش (رید) می‌باشد (شکل ۶، در انتهای صفحه). علاوه بر این مطالعات بیوانفورماتیکی با به‌کارگیری ابزار IGV و مبتنی بر کاوش در داده‌های RNA Seq **در** recount3 نشان دادند که خوانش‌های HER2-En1 در ناحیه chr17:39694901-39694987 در تومورهایی که +HER2 هستند بیشتر حضور دارند ( شکل ۷ و جدول ۱، در انتهای صفحه).

هدف اکثر رویکردهای درمانی، فنوتیپ سرطان می‌باشد، مانند تقسیم سلولی سریع، مسیر سیگنال دهی نامنظم و یا کیناز فعال شده که منجر به رشد می شود. متأسفانه، اکثر این ویژگی ها توسط سلول های طبیعی نیز به اشتراک گذاشته می‌شود، بنابراین منجر به عوارض جانبی نامطلوب شیمی درمانی می‌گردد. یک رویکرد درمانی که تغییرات ژنومی را مستقیماً هدف قرار می‌دهد، از آن جهت می‌تواند ارزشمند باشد که هیچ تاثیری بر سلول های سالم نگذارد. توسعه ابزارهای ویرایش ژنوم مانند سیستم کریسپر می تواند چنین فرصتی را فراهم کند [۱، ۱۶]. کلان و همکاران با کمک ساختارهای فعال کننده dCas9 و کتابخانه های sgRNAی لنتی ویروسی، جایگاه های حساس به DNase I در اطراف ژن مورد نظرشان را هدف گیری و هر دو غربالگری از دست دادن و بدست آوردن عملکرد را برای شناسایی عناصر تنظیمی β-گلوبین و *HER2* در سلول های انسانی انجام دادند [۲۸]. مطالعات با استفاده از مدل‌های موشی ناک اوت شده شرطی *HER2* در غده پستانی نشان داده‌اند که *HER2* برای مورفوژنز طبیعی مجاری پستانی مورد نیاز است [9]. در مطالعه ای توسط وانگ و همکاران، سیستم کریسپر با موفقیت در سلول های سرطان پستان با *HER2*ی تکثیر یافته به کار گرفته شد و منجر به مهار تکثیر سلولی گردید [17]. در مطالعه‌ای دیگر که توسط لیو و همکاران انجام گرفت، حذف نواحی متصل به یک فاکتور رونویسی مهم در انهنسر *HER2* به نام HGE، با استفاده از سیستم Cas9 منجر به کاهش تنظیم *HER2* گردید [16]. بنابراین در این مطالعه به منظور بررسی عملکرد HER2-En1، از فناوری کریسپر برای حذف ناحیه مذکور از ژن *HER2* بهره گرفتیم. با روش ادیت تست PCR حذف موفقیت آمیز مناطق انتخابی را تأیید نمودیم (شکل های ۹ و ۱۰، در انتهای صفحه).

تکثیر و بیان بیش از حد پروتئین *HER2* فاکتور مهمی در پیش بینی حساسیت بالینی به درمان های ضد *HER2* در بیماران مبتلا به سرطان پستان، معده و مری می‌باشد [22]. در مطالعه حاضر، هدف گیری HER2-En1 مبتنی بر CRISPR به طور قابل توجهی بیان واریانتهای *HER2* را تحت تاثیر قرار داد. روش RT-qPCR نشان داد که صرف‌نظر از نوع سلول، هر دو رونوشت کوتاه و بلند *HER2* کاهش یافته‌اند (شکل ۱۱، در انتهای صفحه).

همچنین تغییرات بیانی سه ژن بنیادینگی NANOG، SOX2 و OCT4 در نتیجه ویرایش ژنی HER2-En1 برخلاف انتظار ما نشان‌دهنده افزایش بیان هر سه ژن درMCF7 و افزایش بیان NANOG و OCT4 در SKBR3 بود. به نظر می‌رسد عناصر پاسخگوی عوامل رونویسی *OCT4*، *NANOG* و *SOX2* در مناطقی غیر از ناحیه ویرایش شده قرار دارند و یا رونوشت‌های دیگر این عوامل باعث جبران عملکرد کاهش از طریق مسیرهای دیگر شدند. بنابراین یافته‌ها حاکی از اهمیت این ناحیه بر *HER2* و تأثیر آن بر بیان ژنهای مرتبط با سلولهای بنیادی می‌باشد (شکل ۱۱ د، در انتهای صفحه).

تحقیقات بیشتر برای تعیین رویدادهای مولکولی دقیق مورد نیاز است. به طور کلی، نتایج آنالیزهای عملکردی و بیوانفورماتیکی مطالعه حاضر نشان دهنده نقش تنظیمی احتمالی ناحیه HER2-En1 به عنوان یک انهنسر در ژن *HER2* می‌باشد.

## نتیجه گیری

علاوه بر مطالعات بیوانفورماتیکی، حذف ژنتیکی ناحیه HER2-En1، منجر به کاهش بیان واریانت های آن در رده‌های سلولی مورد مطالعه شد، که نشان‌دهنده نقش تنظیم‌کنندگی این ناحیه احتمالاً به عنوان یک انهنسر در *HER2* می باشد. یافته‌های بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی ما



[ Downloaded from saremjrm.com on 2026-10-30 ]

[ DOI: 10.61186/sjrm.7.3.177 ]

نقش تنظیم‌کنندگی سیس و ترانس HER2-En1 را که احتمالا به عنوان eRNA نیز بیان می‌شود نشان می‌دهد. به طور کلی، به نظر می رسد درک عمیق مفاهیم مولکولی مهار *HER2* برای طراحی استراتژی های درمانی برای غلبه بر مقاومت دارویی و بهبود نتایج بالینی حیاتی باشد. در اینجا، با توجه به تأثیر HER2-En1 بر بیان *HER2* این ناحیه به عنوان هدف بالقوه برای مقابله با درمان سرطان پستان پیشنهاد می شود.

**تشکر و قدردانی**

تحقیق حاضر بخشی از رساله دانشجویی دکتری ژنتیک مولکولی مصوب دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس است.

**تاییدیه اخلاقی**

آزمایشات عملی بر روی رده های سلولی تجاری به عنوان پایان نامه دکتری توسط کمیته اخلاق پژوهشی تربیت مدرس (شماره مرجع/شناسه اخلاق: IR.MODARES.REC.1399.067) تایید شد.

**تعارض در منافع**

هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

**سهم نویسندگان**

مهدیه رجحان نژاد (طراحی اجرایی-علمی) و نگارنده مقاله، سید جواد مولی (طراحی علمی)، بهرام سلطانی (طراحی علمی) و محمد واسعی(مشاور علمی)، سارا تقی‌زاده (ویرایش مقاله)، لیلا میرصادقی (آنالیزهای بیوانفورماتیکی)

**منابع مالی**

حمایت مالی این مطالعه توسط دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

**منابع**

1. Mungamuri, S.K., et al., Chromatin modifications sequentially enhance ErbB2 expression in ErbB2-positive breast cancers. Cell reports, 2013. 5(2): p. 302-313.
2. Moasser, M.M., The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. Oncogene, 2007. 26(45): p. 6469-6487.
3. Sirkisoon, S.R., et al., EGFR and HER2 signaling in breast cancer brain metastasis. Frontiers in bioscience (Elite edition), 2016. 8: p. 245.
4. Choudhury, A., et al., Small interfering RNA (siRNA) inhibits the expression of the Her2/neu gene, upregulates HLA class I and induces apoptosis of Her2/neu positive tumor cell lines. International journal of cancer, 2004. 108(1): p. 71-77.
5. Korkaya, H. and M.S. Wicha, HER2 and breast cancer stem cells: more than meets the eye. Cancer research, 2013. 73(12): p. 3489-3493.
6. El Hadi, H., et al., Development and evaluation of a novel RT-qPCR based test for the quantification of HER2 gene expression in breast cancer. Gene, 2017. 605: p. 114-122.
7. Thariat, J. and P.-Y. Marcy, Neck dissection and chemoradiation in head and neck cancer. The Lancet Oncology, 2010. 11(3): p. 224-225.
8. Ménard, S., et al., Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma. Journal of cellular physiology, 2000. 182(2): p. 150-162.
9. Merry, C.R., et al., Transcriptome-wide identification of mRNAs and lincRNAs associated with trastuzumab-resistance in HER2-positive breast cancer. Oncotarget, 2016. 7(33): p. 53230.
10. Shlyueva, D., G. Stampfel, and A. Stark, Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions. Nature Reviews Genetics, 2014. 15(4): p. 272-286.
11. Zlotorynski, E., Gene expression: Developmental enhancers in action. Nature Reviews Genetics, 2018. 19(4): p. 187.
12. Li, W., D. Notani, and M.G. Rosenfeld, Enhancers as non-coding RNA transcription units: recent insights and future perspectives. Nature Reviews Genetics, 2016. 17(4): p. 207-223.
13. Shin, H.Y., Targeting super-enhancers for disease treatment and diagnosis. Molecules and cells, 2018. 41(6): p. 506.
14. Nebbioso, A., et al., Cancer epigenetics: moving forward. PLoS genetics, 2018. 14(6): p. e1007362.
15. Xi, Y., et al., Histone modification profiling in breast cancer cell lines highlights commonalities and differences among subtypes. BMC genomics, 2018. 19(1): p. 1-11.
16. Liu, Q., et al., A novel HER2 gene body enhancer contributes to HER2 expression. Oncogene, 2018. 37(5): p. 687-694.
17. Wang, H. and W. Sun, CRISPR-mediated targeting of HER2 inhibits cell proliferation through a dominant negative mutation. Cancer letters, 2017. 385: p. 137-143.
18. Huang, D.W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nature protocols, 2009. 4(1): p. 44-57.
19. Viewer, I.G., Broad Institute. URL: https://software. broadinstitute. org/software/igv/[accessed 2022-05-12].
20. Wilks, C., et al., recount3: summaries and queries for large-scale RNA-seq expression and splicing. Genome biology, 2021. 22(1): p. 1-40.
21. Oki, S., et al., Ch IP-Atlas: a data-mining suite powered by full integration of public Ch IP-seq data. EMBO reports, 2018. 19(12): p. e46255.
22. Chao, W.-R., et al., HER2 amplification and overexpression are significantly correlated in mucinous epithelial ovarian cancer. Human pathology, 2014. 45(4): p. 810-816.
23. Nencioni, A., et al., Grb7 upregulation is a molecular adaptation to HER2 signaling inhibition due to removal of Akt-mediated gene repression. PloS one, 2010. 5(2): p. e9024.

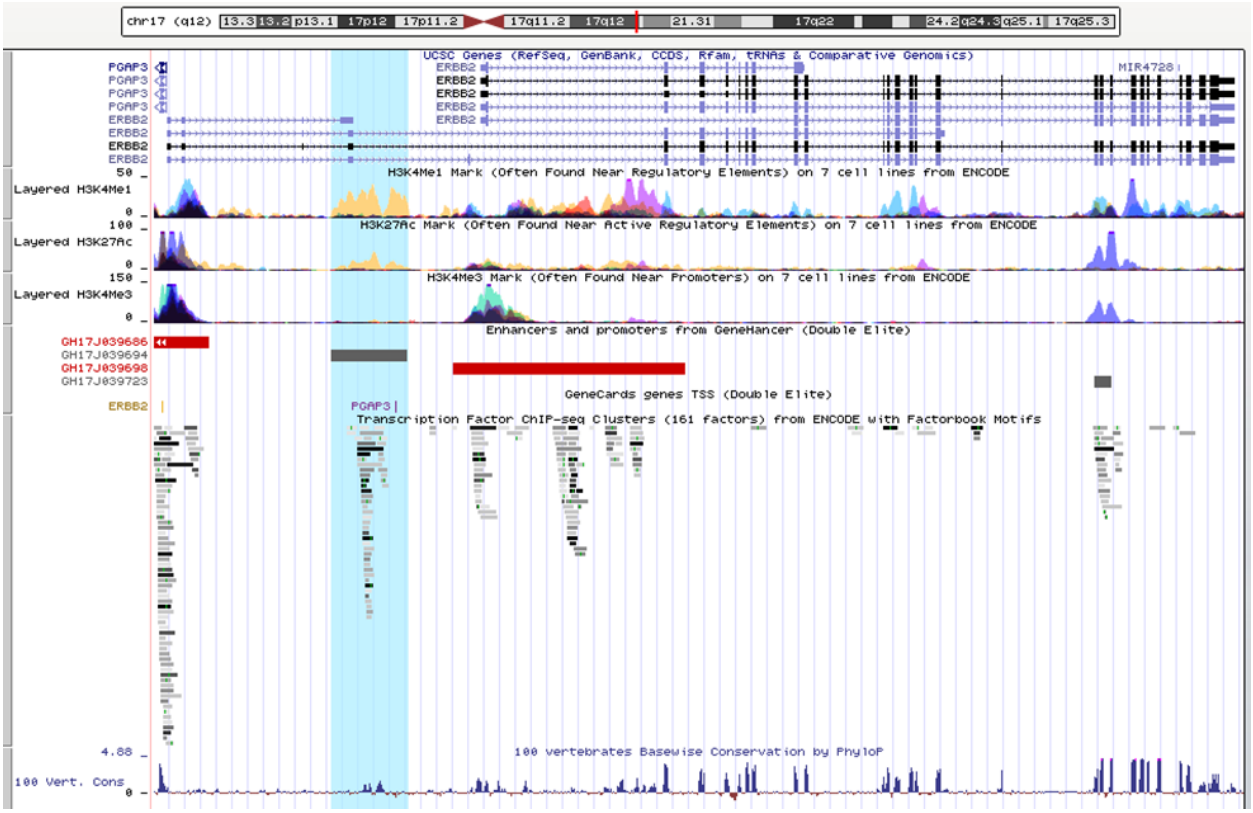
[ Downloaded from saremjrm.com on 2026-10-30 ]

[ DOI: 10.61186/sjrm.7.3.177 ]

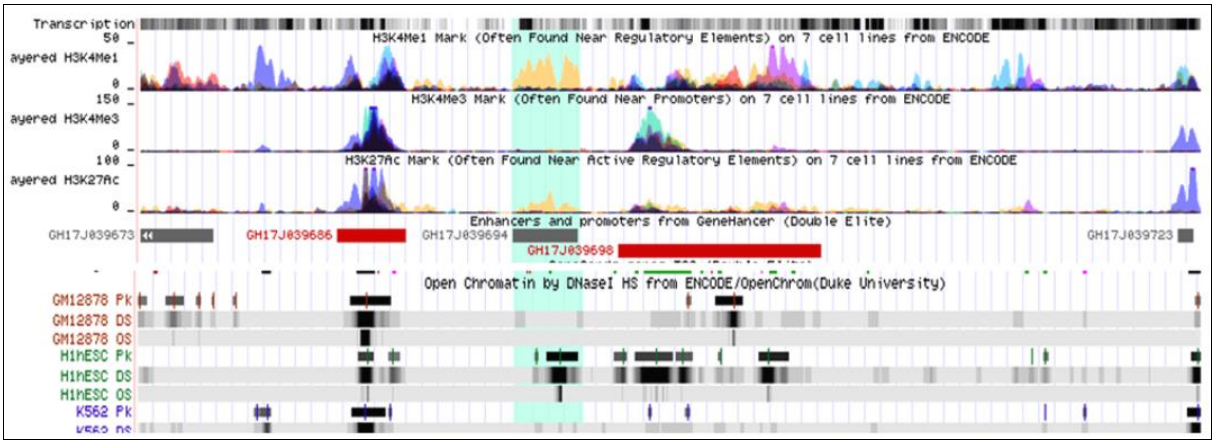
24. Manning, B.D. and L.C. Cantley, AKT/PKB signaling: navigating downstream. Cell, 2007. 129(7): p. 1261-1274.
25. Hemmings, B.A. and D.F. Restuccia, Pi3k-pkb/akt pathway. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2012. 4(9): p. a011189.
26. Szklarczyk, D., et al., The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. Nucleic acids research, 2016: p. gkw937.
27. Stanimir, M., et al., Mullerianosis of the urinary bladder: a rare case report and review of the literature. Rom J Morphol Embryol, 2016. 57(2 Suppl): p. 849-852.
28. Klann, T.S., et al., CRISPR–Cas9 epigenome editing enables high-throughput screening for functional regulatory elements in the human genome. Nature biotechnology, 2017. 35(6): p. 561-568.

[ Downloaded from saremjrm.com on 2026-10-30 ]

[ DOI: 10.61186/sjrm.7.3.177 ]



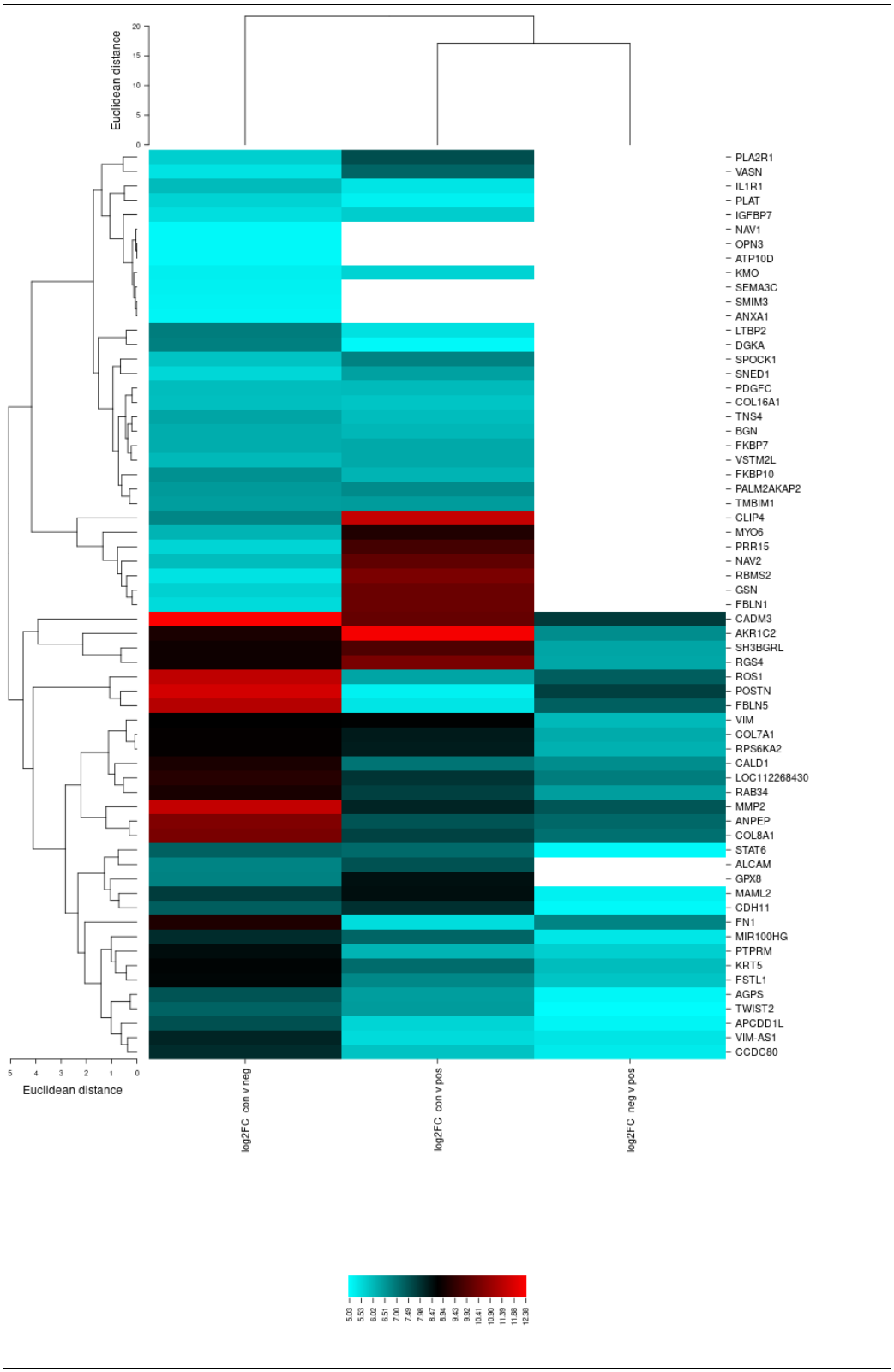

**شکل ۱:** ناحیه HER2-En1 و انواع رونوشت ها و پروموترهای آن. ناحیه HER2-En1 در مرورگر UCSC در شکل بصورت هایلایت آبی مشخص شده است. میزان حفاظت شدگی HER2 در بین مهره داران و نشان هیستونی H3K27Ac که اغلب در کنار عناصر تنظیمی وجود دارد نشانگر اهمیت HER2-En1 به عنوان یک ناحیه تنظیمی می‌باشد. (https://genome.ucsc.edu)




**شکل ۲:** نواحی کروماتین باز حساس به DNaseI و نشان‌های هیستونی (UCSC).

[ Downloaded from saremjrm.com on 2026-10-30 ]

[ DOI: 10.61186/sjrm.7.3.177 ]

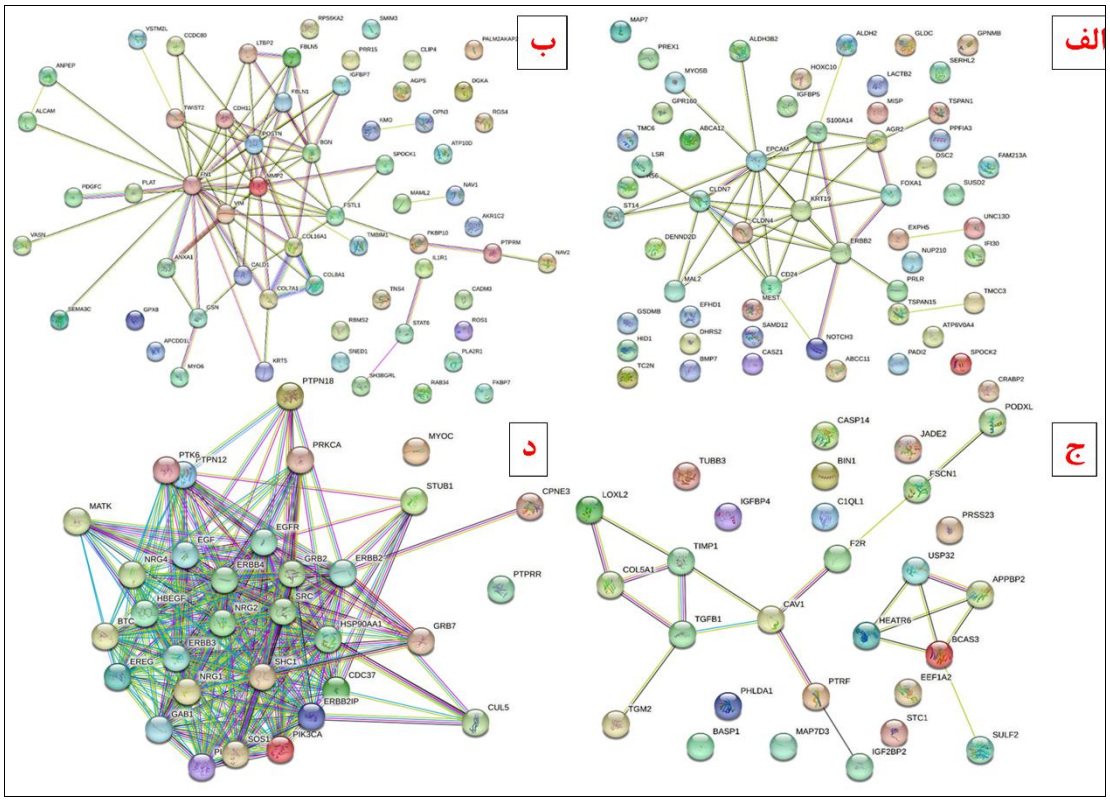



**شکل ۳:** نمودار heatmap برای ژنهای افتراقی (ژنهای دارای اختلاف بیان) در گروههای کنترل(con) و HER2+/HER2- (pos/neg) در رده های سلولی نرمال و سرطانی پستان. Log2FoldChange: log2FC (https://discover.nci.nih.gov/cimminer/oneMatrix.do)

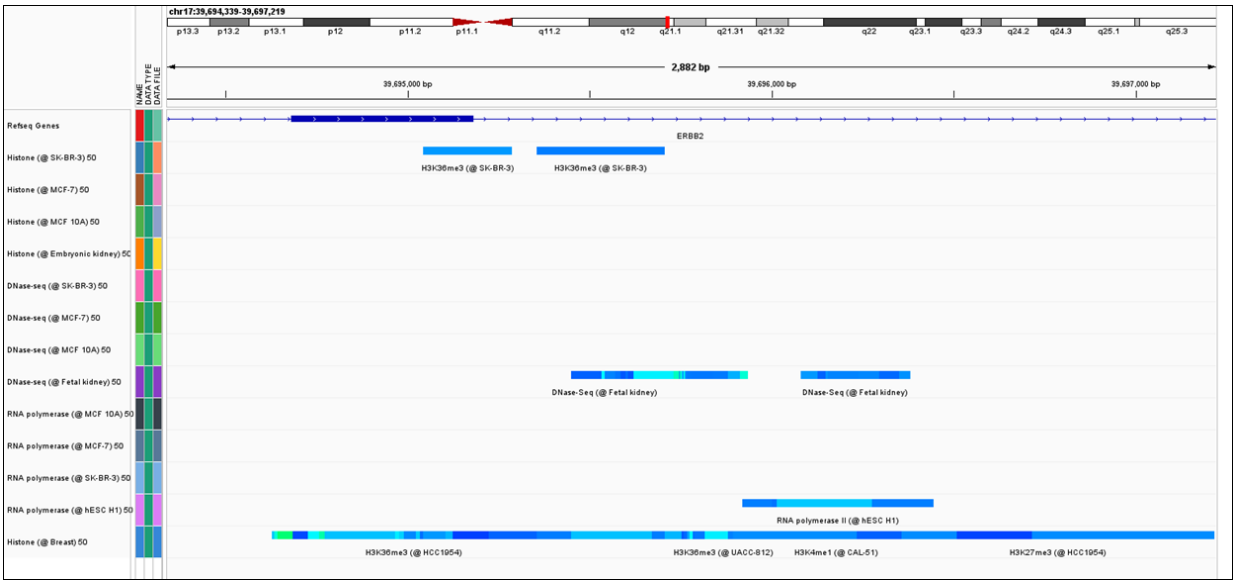


[ Downloaded from saremjrm.com on 2026-10-30 ]

[ DOI: 10.61186/sjrm.7.3.177 ]




**شکل ۴:** وضعیت شبکه‌ای پروتئینهای افتراقی در پایگاه STRING در سه گروه کنترل، +HER2 و -HER2 (به ترتیب MCF10A، SKBR3 و MCF7). الف. وضعیت برهمکنش پروتئین ها در رده سلولی نرمال پستان و +HER2. ب. در رده سلولی نرمال و -HER2. ج. در رده سلولی +HER2 و -HER2. د. شبکه برهمکنش HER2. (https://string-db.org/cgi/input?sessionId=bGcHJIrqDsNu&input_page_active_form=annot_proteome)

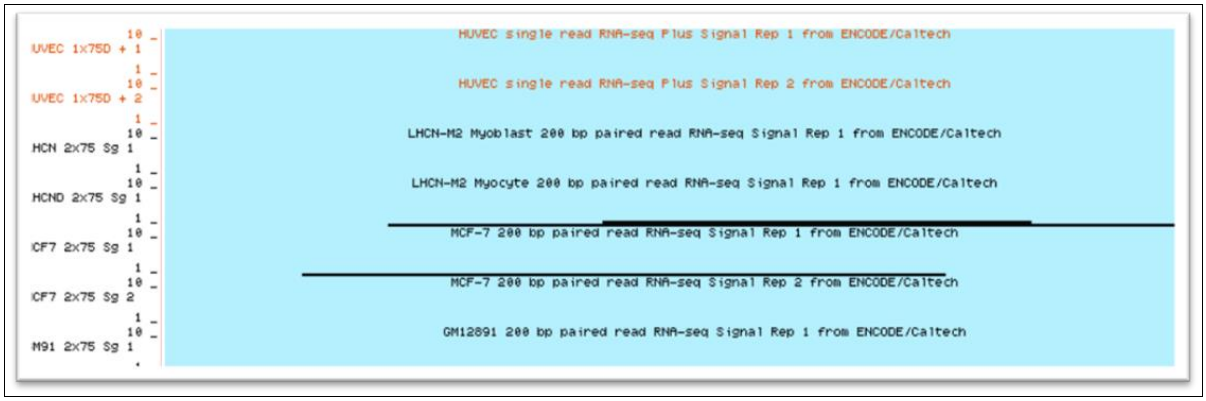



**شکل ۵.** پایگاه داده ChIP-Atlas. نشان‌های هیستونی و مناطق حساس به DNaseI در رده های سلولی مختلف. همانطور که نمایش داده شده است نشان هیستونی H3K36me3 در رده SKBR3 و برخی رده های دیگر سرطان پستان وجود دارد. همچنین نشان هیستونی H3K4me1 نیز در بعضی از رده های پستان مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده فعال بودن این ناحیه می‌باشد. اتصال RNA پلیمرازII به HER2-En1 درردہ سلولی H1 hESC نیز حکایت از ناحیه کروماتینی فعال در این منطقه دارد. (https://chip-atlas.org)

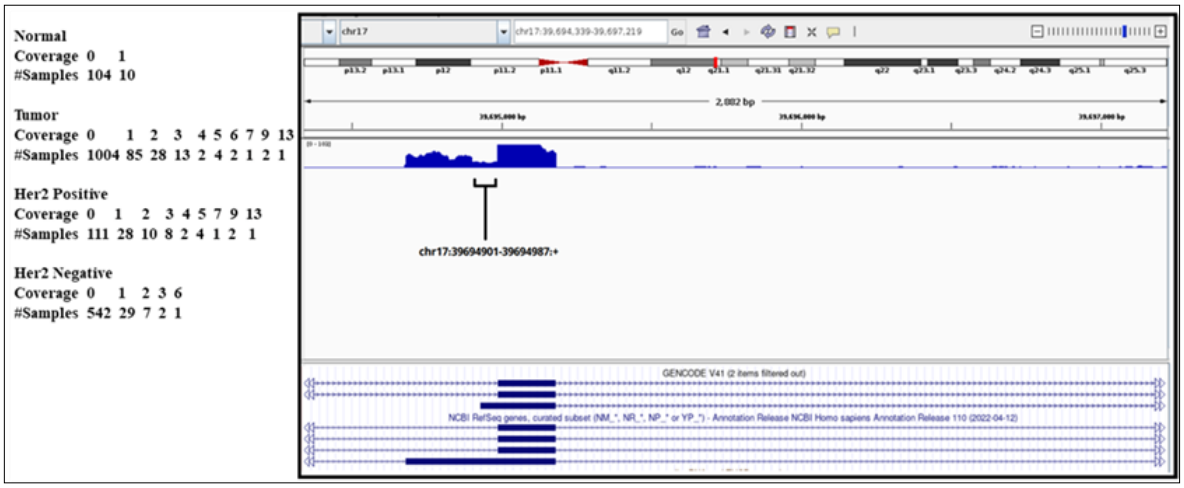


[ Downloaded from saremjrm.com on 2026-10-30 ]

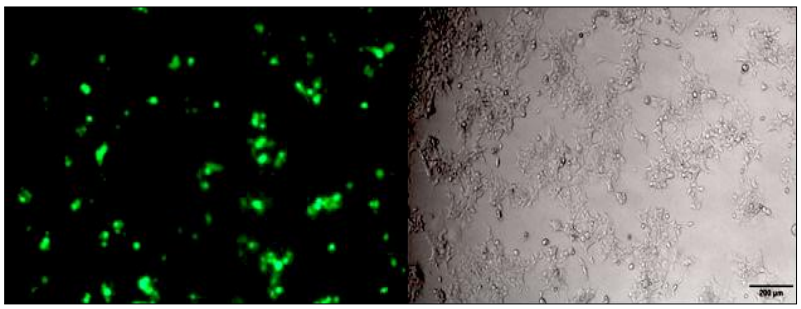
[ DOI: 10.61186/sjrm.7.3.177 ]




**شکل ۶:** بررسی خوانش‌ها (Reads) در برخی از رده‌های سلولی (UCSC). همانطور که نمایش داده شده است مناطقی از HER2-En1 در MCF7 دارای خوانش می باشند.



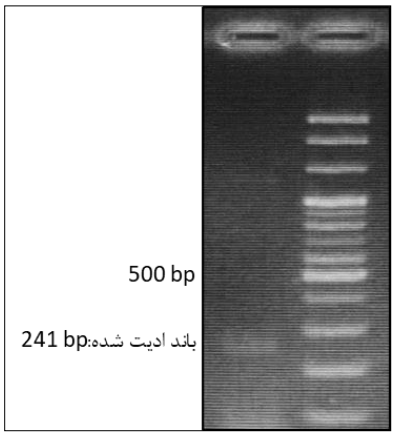

**شکل ۷:** تجزیه و تحلیل نمونه های سرطان پستان در پایگاه داده recount3 برای بررسی خوانش‌ها در ناحیه انهنسری HER2-En1 (GH17J039694). خوانش‌ها در ناحیه chr17:39694901-39694987 در تومورهایی که +HER هستند بیشتر حضور دارند.
(https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga)



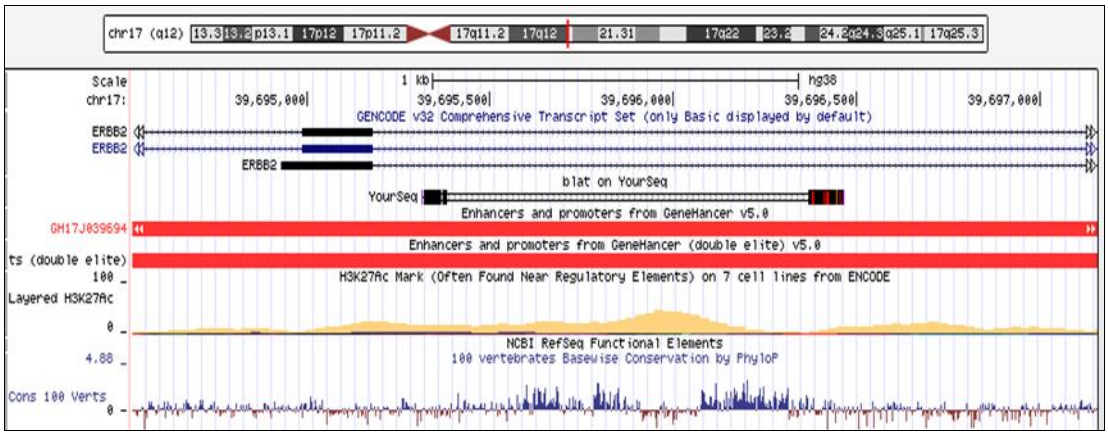
**شکل ۸:** ترنسفکشن سلول ها. در هر خانه از دیش های ۱۲خانه به تعداد ۱۰۰ هزار سلول سید شد. ۱ میکروگرم از DNAی وکتورها با ۲ میکرولیتر از توربوفکتی که در ۱۰۰ میکرولیتر محیط بدون FBS و آنتی بیوتیک (OPTIMEM) حل شده بود به سلول ها تزریق گردید.



[ Downloaded from saremjrm.com on 2026-10-30 ]
[ DOI: 10.61186/sjrm.7.3.177 ]



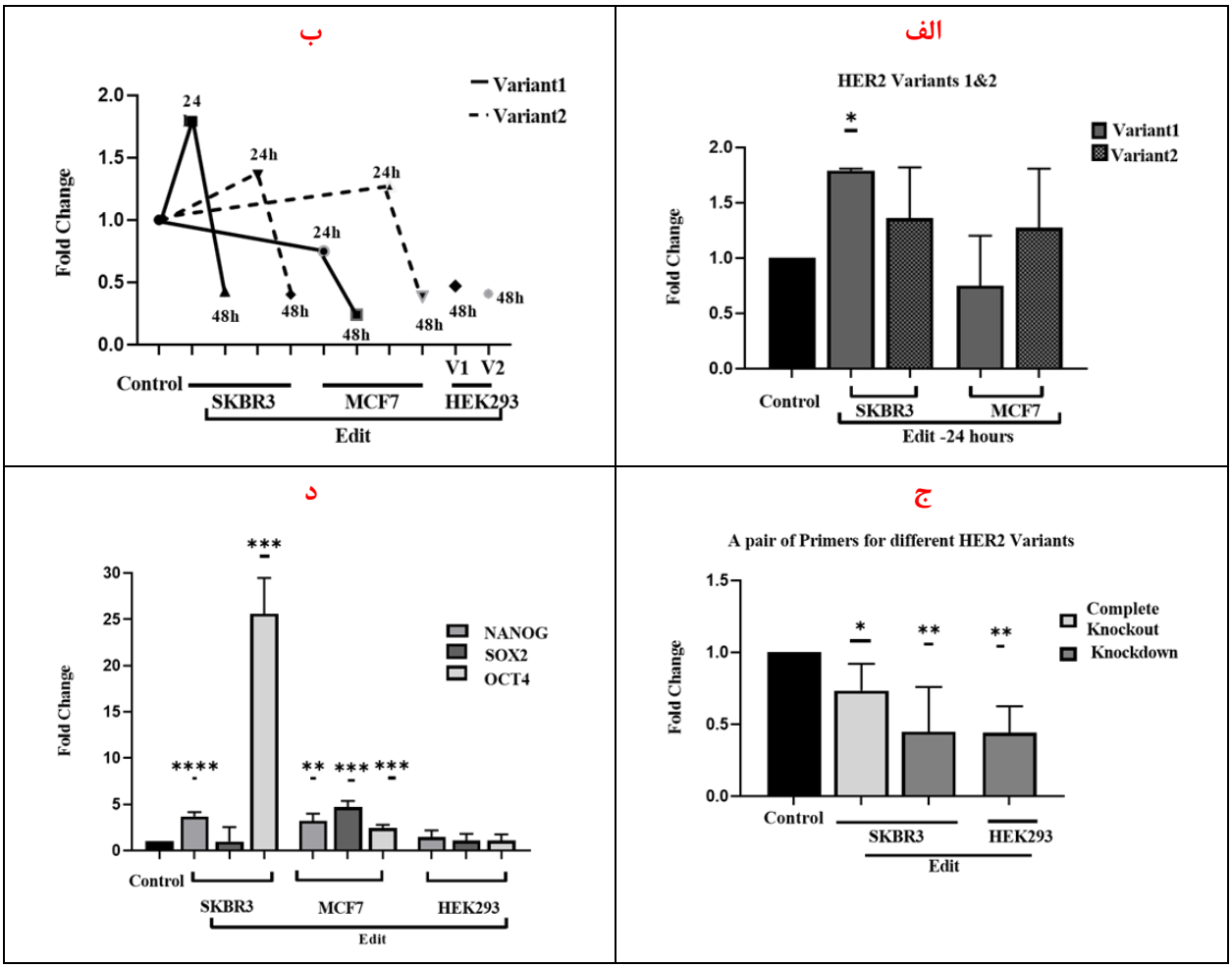

**شکل ۹:** PCR ادیت تست برای تایید ناک اوت/ حذف ناحیه HER2-En1. پس از استخراج DNA از محصول ویرایش و گذاشتن PCR با پرایمرهایی که دو طرف ناحیه حذف شده را در برمیگیرند، باند ویرایش شده با ۲۴۱ باز مشاهده شد.




**شکل ۱۰:** توالی یابی ناحیه حذف شده با پرایمرهای ادیت تست که در UCSC نمایش داده شده است. ۹۹۵ باز از توالی اصلی ناحیه تنظیمی HER2-En1 حذف شده است.

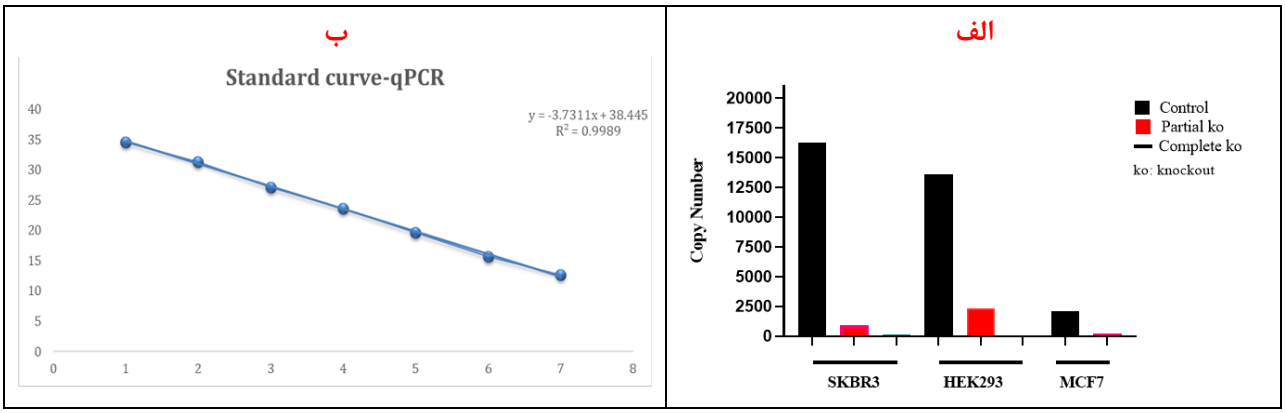
[ Downloaded from saremjrm.com on 2026-10-30 ]

[ DOI: 10.61186/sjrm.7.3.177 ]




**شکل۱۱:** نتیجه آنالیز رونوشت‌های HER2 و ژن های بنیادینگی در رده های سلولی مختلف. الف. بررسی بیان ژن در ۲۴ ساعت اول نشاندهنده‌ی افزایش در بیان واریانتهای گروه ۱ و افزایش مختصری در بیان واریانتهای گروه ۲ می‌باشد. ب. مقایسه بیان بصورت خطی در ۲۴ ساعت ابتدایی و پس از آن که روند کاهشی نشان می‌دهد. ج. نتیجه آنالیز واریانتها در رده های سلولی HEK293 و SKBR3 (در سازه های ناک اوت کامل و ناک داون) زمانی‌که جفت پرایمر بکار گرفته شده برای نقطه مشترکی از واریانتهای مختلف تعبیه شده است. بطور کلی کاهش بیان در واریانتها مشاهده می‌گردد. د. نتیجه آنالیز ژن های مرتبط با سلولهای بنیادی *NANOG*، *SOX2* و *OCT4*،OCT4وNANOG در SKBR3 افزایش بیان نشان می‌دهند. در MCF7 در هر سه ژن افزایش بیان رخ داده است. (سطح معنی‌داری کمتر از ۰.۰۵ در نظر گرفته شده است). *: ۰.۰۱, ****: <۰.۰۰۰۱

[ Downloaded from saremjrm.com on 2026-10-30 ]
[ DOI: 10.61186/sjrm.7.3.177 ]




**شکل ۱۲:** سنجش تعداد کپی DNAی سلول ها پس از ویرایش با رسم منحنی استاندارد (Standard Curve). الف. نمودار ستونی تعداد کپی‌ها که از فرمول X (copy number?)=38.45- Y (CT mean of samples)/3.731 محاسبه می‌شود. ب. نمودار خطی منحنی استاندارد. نتایج نشان‌دهنده کاهش تعداد کپی‌ها بعد از حذف و ویرایش ژنتیکی می‌باشد.

**جدول ۱:** مطالعات بیوانفورماتیکی در پایگاه داده recount3. بررسی ها نشان دادند که خوانش‌ها در ناحیه chr17:39694901-39694987 در تومورهایی که HER+ هستند بیشتر حضور دارند.

| Position | Width | Normal(114) | Tumor(1142) | Her2+ (167) | Her2-(581) | Normal(avg) | Tumor(avg) | Her2+ (avg) | Her2-(avg) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| chr17:39694718-39694987:+ | 270 | 0 | 4 | 0 | 1 | 0 | 0/004 | 0 | 0/002 |
| chr17:39694772-39694987:+ | 216 | 2 | 49 | 34 | 5 | 0/018 | 0/043 | 0/204 | 0/009 |
| chr17:39694785-39694835:+ | 51 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0/001 | 0/006 | 0 |
| chr17:39694881-39694987:+ | 107 | 3 | 36 | 16 | 12 | 0/026 | 0/032 | 0/096 | 0/021 |
| **chr17:39694901-39694987:+** | **87** | **10** | **258** | **138** | **55** | **0/088** | **0/226** | **0/826** | **0/095** |
| chr17:39695182-39696897:+ | 1716 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0/001 | 0 | 0/002 |
| chr17:39695182-39696918:+ | 1737 | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 | 0/003 | 0 | 0/005 |

[ Downloaded from saremjrm.com on 2026-10-30 ]

[ DOI: 10.61186/sjrm.7.3.177 ]

**جدول ۲:** لیست توالی پرایمرهای طراحی شده.

| Gene Symbol | Sequences |
|---|---|
| Guide1: gRNA1 (HER2) | Sense: CACCGCACTTGTATCCTAACCATG<br>Antisense: AAACCATGGTTAGGATACAAGTGC |
| Guide2: gRNA2 (HER2) | Sense: CACCGTCCCGGTGGGCGGTAGAGA<br>Antisense: AAACTCTCTACCGCCCACCGGGAC |
| Guide۳: gRNA۳ (HER2) | Sense: CACCGCAGGAGAATCACTCGAATCC<br>Antisense: AAACGGATTCGAGTGATTCTCCTGC |
| Guide۴: gRNA۴ (HER2) | Sense: CACCGCCCTGATCCTAACATCCCGA<br>Antisense: AAACTCGGGATGTTAGGATCAGGGC |
| PX459 | R: AGCCATTTGTCTGCAGAATTGG |
| Variant 1 HER2 Isoform a | F: GAGCCGCAGTGAGCACCAT<br>R: AGCAGGTAGGTGAGTTCCAG |
| Variant 2 HER2 Isoform b | F: AGAGGCGATAGGGTTAAGGG<br>R: GTGGTGAACAGGACAGCAAA |
| Primers for different HER2 Variants | F: TTCACCCACCAGAGTGATGTG<br>R: ACATTCAGAGTCAATCATCCAACATT |
| HER2 Primers (Deletion test) | F1: CATTCCTGAGATGTGGGTAAGAG<br>R1: TAACTGTAGGTCCCTCCCTCTAC<br>F2: TAGCTGGATGTGGTGGTGCATG<br>R2: GGTGGAGTTTTGTACAGGTATC |
| U6 Promoter | F: GAGGGCCTATTTCCCATGATT |
| Copy number primers | F: AAACTCTCTACCGCCCACCGGGAC<br>R: TAACTGTAGGTCCCTCCCTCTAC |
| GAPDH | F: TCACTGTTCTCTCCCTCCG<br>R: CATTGATGGCAACAATATCC |
| OCT4 Variant 1 | F: CAAGCCCTCATTTCACCAG<br>R: AGCCAGGTCCGAGGATCAA |
| NANOG Variant 1 | F: AATACCTCAGCCTCCAGCAGATG<br>R: TGCGTCACACCATTGCTATTCTTC |
| SOX2 Variant 1 | F: AAGACTAGGACTGAGAGAAAGAAGAG<br>R: AAGAGAGAGAGGCAAACTGGAATC |

[ Downloaded from saremjrm.com on 2026-10-30 ]

[ DOI: 10.61186/sjrm.7.3.177 ]