

مطالعه مهار ژن HMGA2 با shRNA و siRNA اختصاصی و بررسی تأثیر آن‌ها بر بیان ژن‌های پایین‌دست در سلول‌های سرطانی MDA-MB-231: مطالعه بیوانفورماتیکی و تجربی

فریدون عابدی گبلو^۱، بهزاد منصوری^۲، غلامرضا دهقان^۳

تاریخ دریافت ۱۳۹۸/۰۱/۳۰ تاریخ پذیرش ۱۳۹۸/۰۵/۱۴

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: امروزه استفاده از siRNA برای خاموش‌سازی ژن‌ها به‌صورت فزاینده‌ای در حال افزایش است. هدف از مطالعه حاضر بررسی بیوانفورماتیکی و تجربی مهار ژن HMGA2 و تأثیر آن بر میزان بیان ژن‌های پایین‌دست (ژن‌های انکوژنی و سرکوب‌کننده توموری) در سلول‌های MDA-MB-231 تیمار شده با shRNA و siRNA اختصاصی HMGA2 است.

مواد و روش کار: برای انجام این پژوهش بیوانفورماتیکی و تجربی، ابتدا داده‌های میکروآرایه از پایگاه داده GEO جمع‌آوری شده و با استفاده از جعبه‌ابزار شبکه عصبی (PNN) در نرم‌افزار MATLAB 2018a آنالیز شد. سپس siRNA اختصاصی HMGA2 طراحی و تهیه شد. انتقال siRNA به‌وسیله لیپوفکتامین صورت گرفته و بیان ژن HMGA2 و ژن‌های انکوژنی و سرکوب‌کننده توموری به روش Real-time PCR ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از مطالعه بیوانفورماتیکی نشان داد که ژن HMGA2 ارتباط نزدیکی با ژن‌های پایین‌دست دارد، به‌طوری‌که تغییر در بیان ژن HMGA2 بیان ژن‌های پایین‌دست را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد. انتقال siRNA اختصاصی HMGA2 به داخل سلول MDA-MB-231 باعث مهار معنی‌دار ($p < 0.05$) بیان ژن HMGA2 در مقایسه با گروه کنترل شد. به‌علاوه به دنبال سرکوب بیان ژن HMGA2، بیان ژن‌های انکوژنی (TERT) و سرکوب‌کننده تومور (DEDD) به‌صورت معنی‌داری ($p < 0.05$) به ترتیب کاهش و افزایش یافتند.

بحث و نتیجه‌گیری: ژن HMGA2 به دلیل ارتباط گسترده با ژن‌های انکوژنی و سرکوب‌کننده تومور انتخاب معقول برای هدف‌گیری و خاموش‌سازی به‌وسیله siRNA اختصاصی است. نتیجه مهار موفقیت‌آمیز بیان ژن HMGA2 و تأثیرپذیری بیان ژن‌های TERT و DEDD بعد از ترانسفکشن siRNA اختصاصی با نتایج حاصل از مطالعه بیوانفورماتیکی مطابقت دارد.

کلیدواژه‌ها: بیوانفورماتیک، ژن HMGA2، انکوژن، سرکوب‌کننده تومور، بیان ژن

مجله پزشکی ارومیه، دوره سی‌ام، شماره ششم، ص ۴۸۶-۴۷۵، شهریور ۱۳۹۸

آدرس مکاتبه: تبریز، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تلفن: +۹۸۳۳۳۹۲۷۱۷

Email: dehghan2001d@yahoo.com

مقدمه

می‌یابد (۱، ۲). طی تحقیقات انجام‌شده مشخص شده است میزان فراوانی سرطان پستان در ایران در مقایسه با کشورهای توسعه‌یافته کم‌تر است با این حال، اطلاعات موجود نشان می‌دهد که این بدخیمی از شایع‌ترین سرطان‌ها در میان زنان ایرانی بوده و میزان شیوع آن در دو دهه گذشته افزایش یافته است (۳). تاکنون روش‌های درمانی

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌های نئوپلاستیک زنان در جهان است و از مهم‌ترین دلایل مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در خانم‌ها به‌شمار می‌آید. اگرچه شیوع سالانه این بیماری در جهان به‌طور فزاینده‌ای در حال افزایش است، با این حال شیوع آن در کشورهای مختلف متفاوت است. باوجود آنکه شیوع این بیماری مربوط به کشورهای توسعه‌یافته است، اما تحقیقات حاکی از آن است که این بدخیمی با شیب بالایی در کشورهای در حال توسعه افزایش

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

^۲ دانشجوی دکتری ایمنی‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۳ استاد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران (نویسنده مسئول)

مختلفی از جمله جراحی^۱، شیمی‌درمانی^۲ و رادیوتراپی^۳ برای درمان و کنترل سرطان پستان به کار گرفته شده است ولی باین حال میزان مرگ‌ومیر در بیماران مبتلا به این بیماری بالا است که نشان از ناکارآمدی این راهکارهای درمانی دارد (۴، ۵). شاید با توجه بیشتر به ساختار ریز مولکولی و اساس زیست‌شناسی این بدخیمی بتوان با دانسته‌های بیشتری از چگونگی پیدایش این بیماری از سطح سلول‌ها، اطلاعات گسترده‌ای در مورد رشد و متعاقباً درمان این بیماری مهلك به دست آورد. شناخت مکانیسم‌های دخیل در ایجاد سرطان برای پیشبرد هدفمند انواع روش‌های درمانی، برای درمان سرطان بسیار مهم می‌باشد. مولکول siRNA^۴ یا RNAهای کوچک مداخله‌گر طی دو مرحله که شامل مرحله شروع و مؤثر است تولید می‌شوند. در مرحله شروع، RNA بلند دو رشته‌ای (۵۰۰ - ۲۰۰ جفت باز) توسط آنزیم Dicer به قطعاتی با طول ۲۱-۲۳ نوکلئوتیدی برش داده شده و siRNA تولید می‌شود. siRNA یک مولکول عملکردی است و منشأ این RNA دو رشته‌ای می‌تواند از ژنوم ویروسی، DNA باکتریایی یا RNA سنتتیک تولیدشده بر پایه داده‌های بیوانفورماتیک باشد (۶، ۷). در مرحله مؤثر، دو رشته siRNA توسط هلیکاز از هم جدا می‌شود و رشته سنس توسط اندونوکلازهای اندروژن تشخیص داده می‌شود و رشته آنتی سنس به سمت کمپلکس القا خاموش‌کننده RNA (RISC^۵) هدایت شده و این کمپلکس سپس به سمت mRNA هدف هدایت می‌شود. آرگونات، یکی از اعضای کمپلکس RISC با فعالیت ریبونوکلازای mRNA هدف را تخریب می‌کند. در نهایت بیان ژن mRNA هدف توسط کمپلکس RISC متوقف می‌شود (۸، ۹). ژن high mobility group AT-hook 2 (HMGA2) پروتئینی به نام high mobility group (HMG) از خانواده پروتئینی غیر هیستونی را کد می‌کند. این پروتئین قادر است به DNA متصل شود و این اتصال از طریق شیار کوچک DNA و از ناحیه غنی از AT انجام می‌گیرد (۱۰). به دنبال اتصال HMGA2 به DNA، تغییرات ساختاری در کونفورماسیون DNA صورت گرفته و این امر منجر به تشکیل enhanceosomes و کمپلکس‌های رونویسی می‌شود که قادر هستند به توالی‌های تقویت‌کننده در ژن هدف متصل شده و میزان رونویسی آن‌ها را تنظیم کنند (۱۱). از آنجایی که تغییرات در بیان ژن خاصی می‌تواند میزان بیان ژن‌های پایین دست خود (انکوژن‌ها

و مهارکننده‌های توموری) را تحت تأثیر قرار دهد، لذا شناخت عملکرد ژن‌های پایین دست حیاتی می‌باشد. ژن DEDD^۶ در سرطان‌های مختلف بیان می‌شود و این ژن پروتئینی به نام death effector domain (DED) را رمزگذاری می‌کند که در مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (القای آپوپتوز) نقش دارد (۱۲). ژن TERT^۷ آنزیمی به نام رونویس معکوس تلومراز (Telomerase Reverse Transcriptase) را تنظیم می‌کند (۱۳). میزان بیان ژن TERT در سلول‌های سرطانی افزایش یافته و موجب بهبود رشد سلول‌های سرطانی می‌شود. در حدود ۳۰٪ از انواع سرطان‌ها، جهش در پروموتور ژن TERT رخ داده و به دنبال آن میزان بیان آن در حالت سرطانی نسبت به نرمال افزایش می‌یابد و نقش آنکوژنی ایفاء می‌کند (۱۴، ۱۵). سرکوب بیان ژن در سطح پس از رونویسی^۸ یکی از استراتژی‌های مهم در ژن‌درمانی است که در مقایسه با دیگر روش‌های درمانی، دارای مزیت‌هایی از قبیل دقت، کارایی و اختصاصیت بالا بوده و فاقد اثرات جانبی و توکسیک است (۱۶). هم‌اکنون تحقیقات گسترده‌ای در راستای استفاده از siRNA ها به‌عنوان درمان برای انواع سرطان‌ها به‌ویژه سرطان پستان در حال انجام است (۱۷). باین حال گام نخست در استفاده از siRNA انتخاب مناسب ژن هدف است، که قرار است توسط siRNA هدف‌گیری شود. چراکه تغییرات در بیان ژن هدف ممکن است مجموعه‌ای از ژن‌های پایین دست خود را نیز تحت تأثیر قرار دهد (۱۸). لذا، استفاده از روندهای محاسباتی بیوانفورماتیکی ممکن است ابزار مناسبی برای پیش‌بینی بهترین ژن هدف باشد که به واسطه ارتباط شبکه‌ای نقش به‌سزایی در تنظیم بیان سایر ژن‌های عملکردی سلول (انکوژن‌ها و ژن‌های سرکوب‌کننده تومور) دارد. برای این منظور، در مطالعه حاضر سعی شد برای اولین بار با استفاده از ارزیابی‌های بیوانفورماتیکی ارتباط ژن HMGA2^۹ با ژن‌های انکوژنی و سرکوب‌کننده تومور جهت هدف قرار دادن با siRNA مورد بررسی قرار گیرد. در مرحله دوم siRNA اختصاصی ژن HMGA2 به داخل سلول‌های MDA-MB231 (به‌عنوان مدل سرطان پستان) ترانسفکت شده و برای تأیید یافته‌های بیوانفورماتیکی، بیان ژن HMGA2 به همراه تعدادی از ژن‌های انکوژنی و سرکوب‌کننده تومور با استفاده از روش Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

⁶ Death Effector Domain Containing

⁷ Telomerase Reverse Transcriptase

⁸ Post transcriptional

⁹ High Mobility Group protein A2

¹ Surgery

² Chemotherapy

³ Radiotherapy

⁴ Small interfering RNA

⁵ RNA-induced silencing complex

سلول‌های دفریز شده به فلاسک ۷۵ میلی‌لیتر منتقل شده و بعد از رسیدن سلول‌ها به تراکم بالای ۷۰ در صد، سلول‌ها با استفاده از تریپسین ۲۵٪، درصد از کف فلاسک جدا شدند. عمل پاساژ سلولی روی سلول‌ها انجام گرفت و سلول‌های پاساژ سوم برای مطالعات بعدی به کار گرفته شدند.

ترانسفکشن siRNA:

ابتدا siRNA سنتتیک دو رشته‌ای با توالی‌های سنس 5'-3' GCACUUCAAUCUCAAAUCUtt و آنتی سنس 5'-3' AGAUUGAGAUUGAAAGUGCtt از شرکت Microsynth تهیه شد. در مرحله بعد، سلول‌ها در محیط RPMI-1640 بدون سرم و آنتی‌بیوتیک به مدت یک ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. ترانسفکشن^۴ siRNA با غلظت ۸۰ پیکومولار توسط لیپوفکتامین^۵ ساخت شرکت Invitrogen آمریکا صورت گرفت. برای این منظور siRNA و محیط ترانسفکشن رقیق و به مدت زمان ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند، سپس siRNA با محیط ترانسفکشن مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از آن، محیط فاقد آنتی‌بیوتیک چاهک‌ها را به آرامی خارج و در ابتدا ۸۰۰ میکرولیتر محیط ترانسفکشن و سپس محیط ترانسفکشن حاوی siRNA به چاهک‌ها اضافه شد. پلیت کشت سلول به مدت ۶ ساعت در انکوباتور CO₂ دار ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از ۶ ساعت یک میلی‌لیتر محیط RPMI-1640 به همراه FBS به چاهک‌ها اضافه شد. در نهایت اثر siRNA اختصاصی HMGA2 بر بیان ژن HMGA2 و تعدادی از ژن‌های انکوژنی و سرکوب‌کننده تومور توسط quantitative real time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

استخراج RNA:

به‌منظور بررسی بیان ژن‌ها، ۲۰۰ هزار سلول درون هر یک از چاهک‌های شش‌خانه توزیع شدند و با غلظت ۸۰ پیکومول siRNA در بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت به صورت تکرار دوتائی تحت تیمار با siRNA اختصاصی HMGA2 کمپلکس شده با لیپوفکتامین قرار گرفتند. پس از گذشت زمان مورد نظر RNA کلی سلول‌ها توسط کیت استخراج TRIZOL استخراج گردید. روش استخراج به این صورت بود که ۱ میلی‌لیتر از این کیت بر روی حدود یک میلیون سلول اضافه می‌شود و سپس پیپتاژ کامل سلولی انجام شد. در مرحله بعد انکوباسیون در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. سپس مراحل بعدی که عبارت‌اند از: اضافه

مواد و روش کار

بررسی‌های بیوانفورماتیکی برای مشخص کردن ارتباط

ژن هدف با سایر ژن‌ها:

برای انجام این مطالعه بیوانفورماتیکی و تجربی، ابتدا در مرحله اول ژن‌های انکوژنی و سرکوب‌کننده تومور که تحت تأثیر تغییرات ژن HMGA2 قرار می‌گیرند بررسی شدند. برای این منظور روش‌های آنالیز داده‌ها به وسیله تکنیک‌های بیوانفورماتیکی مورد استفاده قرار گرفت. در این مسیر برنامه‌ها و الگوریتم‌های متنوعی توسعه یافته‌اند. برای انجام این پژوهش، ابتدا داده‌های بیان چندین هزار ژن که توسط فناوری‌های میکروآرایه به دست آمده از بانک داده‌های GEO^۱ Dataset پایگاه داده NCBI با کد دسترسی GSE47378 جمع‌آوری شد. در مرحله دوم پیش‌پردازش‌هایی روی این داده‌ها انجام گرفت. در مرحله سوم داده‌های پیش‌پردازش شده، توسط الگوریتم‌های بیوانفورماتیکی شبکه عصبی که تحت عنوان روش (PNN) Probabilistic neural networks گفته می‌شود آنالیز شدند (۱۹). این روش بر پایه جستجو بین ژن‌ها عمل می‌کند و از بین آن‌ها ژن‌هایی را که با بیشترین دقت، حساسیت و اختصاصیت می‌توانند بین نمونه‌های کنترل و غیر کنترل تمایز قائل شوند را انتخاب می‌کند. در مرحله چهارم ۱۵ ژن که دارای بیشترین امتیازها بود توسط الگوریتم انتخاب و دسته‌بندی شدند. تمامی پیاده‌سازی‌ها توسط نرم‌افزار MATLAB 2018 a انجام گردید. در مرحله پنجم اعتبار بیولوژیکی ژن‌های انتخاب شده با بررسی مقالات منتشر شده و سایت Gene MANIA سنجیده شد. در مرحله نهایی شبکه بیانی ژن‌های انتخاب شده توسط نرم‌افزار Cytoscape رسم شد. برای این منظور، به ژن‌های انتخاب شده نمره داده شد و سپس با داده‌های دانلود شده از دیفالت Gene MANIA مرج (merge) شدند و بعد از آنالیز در نرم‌افزار Cytoscape رسم شد (شکل ۲).

کشت رده سلولی سرطان پستان:

رده سلولی MDA-MB-231 از انستیتوی پاستور ایران تهیه شد. بر اساس راهنمای استفاده از این سلول‌ها در مرکز تحقیقات ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز در داخل ۷ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640^۲ حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین ۱۰۰ U/ml و استرپتوماسین ۱۰۰ mg/ml و ۱۰ درصد سرم گوساله تازه متولد شده (FBS^۳) عمل یخ‌زدائی سلول‌ها انجام شد.

⁴ Transfection

⁵ Lipofectamine -2000

¹ Gene Expression Omnibus

² Roswell Park Memorial Institute 1640

³ Fetal Bovine Serum

سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترمو سایکلر قرار داده شد. به منظور مهار عملکرد آنزیم DNase I، یک میکرولیتر EDTA¹ به میکروتیوب اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترمو سایکلر قرار گرفت. در مرحله بعد، ۳/۵ میکرو لیتر کیت سنتز cDNA به RNA تیمار شده با آنزیم DNase I اضافه شده و طبق پروتکل شرکت به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در ادامه به مدت ۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

طراحی پرایمر:

در تحقیق حاضر، بیان ژن HMGA2 و ژن‌های انکوژنی و سرکوب‌کننده تومور به روش quantitative PCR یا Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ژن β -actin به عنوان ژن کنترل داخلی در نظر گرفته شد. تمامی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه (جدول ۱) با استفاده از نرم‌افزار oligo7 طراحی و اختصاصیت پرایمرها توسط سایت NCBI در Primer Blast تأیید شد.

کردن $200 \mu\text{l}$ کلروفورم و تکان شدید میکروتیوب به مدت ۱۵ ثانیه، سانتریفیوژ با دور 12000 rpm به مدت ۲۰ دقیقه، انتقال فاز آبی به میکروتیوب جدید و اضافه کردن ایزوپروپرانول هم حجم مایع رویی جدا شده، انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 20°C ، سانتریفیوژ با دور 12000 rpm به مدت ۲۰ دقیقه، حذف مایع رویی و شستشوی رسوب RNA با $500 \mu\text{l}$ اتانول 70°C در صد در دور 7500 rpm سانتریفیوژ و اضافه کردن آب تیمار شده با DEPC پس از خشک شدن رسوب RNA و نهایتاً بررسی کمی غلظت RNA با دستگاه نانو درآپ.

سنتز cDNA:

برای اینکه بتوان بیان ژن‌ها را مورد ارزیابی قرار داد باید بعد از استخراج RNA آن را به توالی DNA تبدیل کرد. بدین منظور از تکنیک RT-PCR استفاده می‌شود. در این روش با استفاده از توالی‌های شش نوکلئوتیدی تصادفی که به طور تصادفی به توالی RNA متصل می‌شوند واکنش RT-PCR شروع می‌گردد. برای سنتز cDNA ابتدا ۲ میکروگرم از RNA را در میکروتیوب ریخته و یک میکرولیتر DNase I و بافر آن به میکروتیوب اضافه شد.

جدول (۱): پرایمرهای مورد استفاده به همراه توالی آن‌ها

پرایمر	Tm	توالی (5'-3')
Beta-actin	F	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC
	R	AGCACTGTGTGGCGTACAG
HMGA2	F	ACTACTCTGTCTCTGCC
	R	GATTGAGATTGAAAGTGCCTTG
TERT	F	GCGACTACTCCAGCTATGCC
	R	GACACTTCAGCCGAAGACC
DEDD	F	CCCGTAATGTGTCTCTACAGC
	R	GCCAGAAGTATTGATAACTCT

میکرو لیتر پرایمر اختصاصی ۴ پیکومول، ۴ میکرو لیتر آب مقطر و ۰/۵ میکرو لیتر cDNA انجام شد.

تجزیه تحلیل داده‌ها:

تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به بیان ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS PASW Statistic 18 و با استفاده از آزمون‌های student's t-Test و Bivariate Correlate مورد ارزیابی قرار

ارزیابی بیان ژن‌های مورد مطالعه با دستگاه Real-

Time PCR:

میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه با دستگاه Real time PCR (ساخت شرکت applied biosystem مدل StepOnePlus) در ۱۰ میکرو لیتر واکنش که شامل ۵ میکرو لیتر مستر میکس سایبرگرین ساخت شرکت (Bio Fact South Korea)، ۰/۵

¹ Ethylenediamine tetraacetic acid

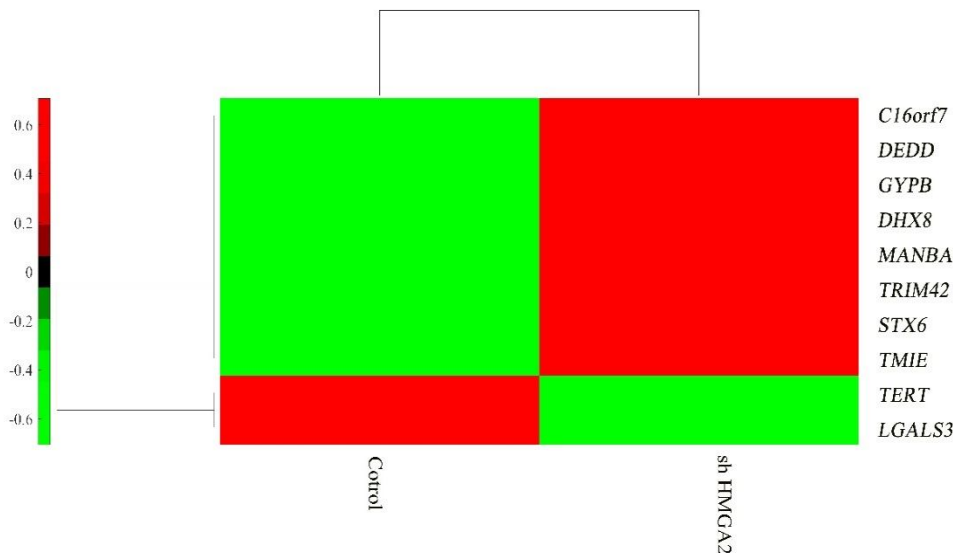
را در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده را نشان می‌دهد. از بین چندین هزار ژن مورد مطالعه و آنالیز شده، ژن‌هایی که با بیشترین شدت تحت تأثیر تغییر بیان ژن HMGA2 قرار گرفته‌اند در شکل ۱ نشان داده شده است. رنگ قرمز نشان‌دهنده افزایش بیان و رنگ سبز نشان‌دهنده کاهش بیان ژن‌های مورد مطالعه می‌باشد و همان‌طور که مشخص است بعد از تیمار سلول‌های MDA-MB-231 با shRNA اختصاصی HMGA2، میزان بیان ژن‌های TMIE^۲، STX6^۳، TRIM42^۴، MANBA^۵، DHX8^۶، GYPB^۷، DEDD و C16orf72^۸ نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است. این در حالی است که بعد از تیمار سلول‌ها با shRNA میزان بیان ژن‌های TERT و LGALS3^۹ نسبت به گروه کنترل (تیمار نشده) کاهش یافته است.

گرفتند. تمامی نمودارها نیز با استفاده از نرم‌افزارهای GraphPad PRISM Version 6.01 رسم شدند.

یافته‌ها

نتایج ارزیابی بیوانفورماتیکی:

در مطالعه حاضر ابتدا بررسی‌های بیوانفورماتیکی بر روی داده‌های بیان ژن موسوم به میکرو آرایه حاصل از مطالعه سون (Sun) و همکاران در سال ۲۰۱۴ که طی آن سلول‌های MDA-MB-231 را با shRNA^۱ اختصاصی HMGA2 تیمار کرده بودند، انجام شد. داده‌های این مطالعه با کد دسترسی GSE47378 تهیه شده و مورد آنالیز قرار گرفتند. شکل ۱ نتایج مربوط به تغییر بیان ژن‌های مرتبط (انکوژنی و سرکوب‌کننده تومور) با ژن HMGA2 در سلول‌های MDA-MB-231 تیمار شده با shRNA



شکل (۱): سلول‌های تیمار شده با shRNA اختصاصی HMGA2 جهت هدف قرار دادن ژن HMGA2 در سلول‌های MDA-MB-231، هیئت مپ بیانگر ژن‌هایی است که تحت تأثیر تغییرات بیان ژن HMGA2 تغییر می‌کنند و این مقایسه بین گروه‌های کنترل و تیمار شده می‌باشد.

می‌دهد. در این شبکه سه نوع دایره با رنگ‌های سبز، زرد و آبی مشاهده می‌شود که به ترتیب ژن HMGA2، ژن‌هایی که به صورت

شکل ۲ مربوط به نمودار شبکه‌ای است که ارتباط بین ژن HMGA2 را با ژن‌های انکوژنی و سرکوب‌کننده تومور را نشان

⁶ DEAH-box helicase 8

⁷ Glycophorin B (MNS blood group)

⁸ Chromosome 16 open reading frame 72

⁹ Galectin 3

¹ Short hairpin RNA

² Transmembrane Inner Ear

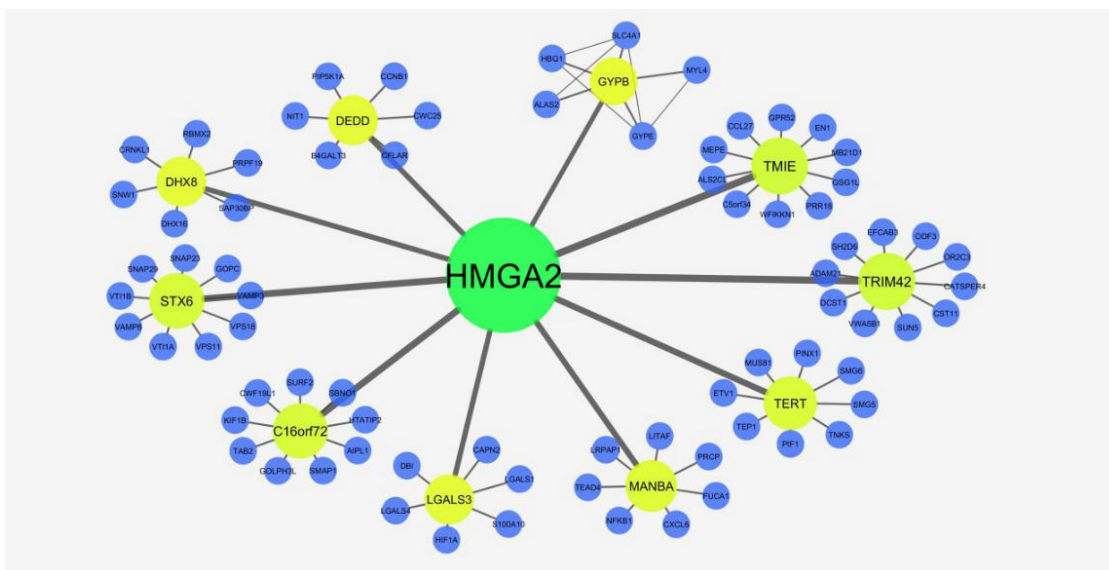
³ Syntaxin 6

⁴ Tripartite motif containing 42

⁵ Mannosidase beta

زرد نشان‌گر بیشتر بودن ارتباط ژنتیکی است. همچنین اندازه دایره‌های شبکه با توجه به میزان تأثیرشان در شبکه و همچنین ارتباطشان با ژن هدف تغییر می‌کند. با توجه به آنالیزهای انجام شده ژن‌هایی که ارتباط بیشتری دارند اندازه بزرگ‌تری را هم دارا می‌باشند.

مستقیم با ژن HMGA2 در ارتباط هستند و ژن‌هایی به صورت غیرمستقیم با ژن HMGA2 در ارتباطند را نشان می‌دهد. تفاوت در ضخامت خطوط ارتباطی بین دایره سبز با دایره‌های زرد نشان‌دهنده تفاوت در ارتباط انواع ژن‌های مورد مطالعه با ژن HMGA2 است، و افزایش ضخامت خطها در بین دایره‌های سبز و

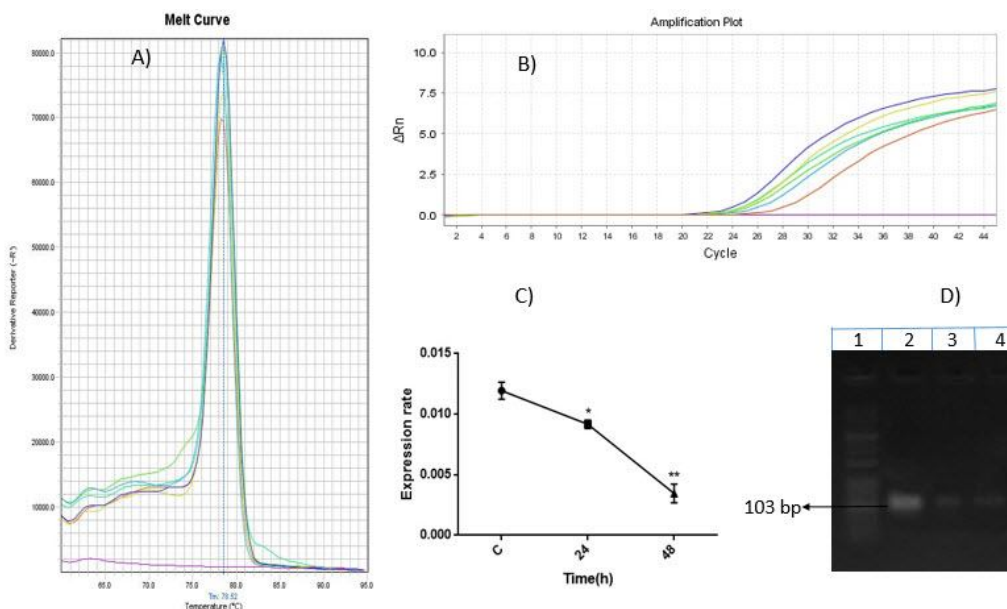


شکل (۲): نمودار مربوط به ارتباط شبکه‌ای ژن HMGA2 با ژن‌های پایین‌دست (ژن‌های انکوژنی و مهار کننده توموری) خود در سلول‌های سرطانی MDA-MB-231 که با shRNA اختصاصی HMGA2 تیمار کرده بودند.

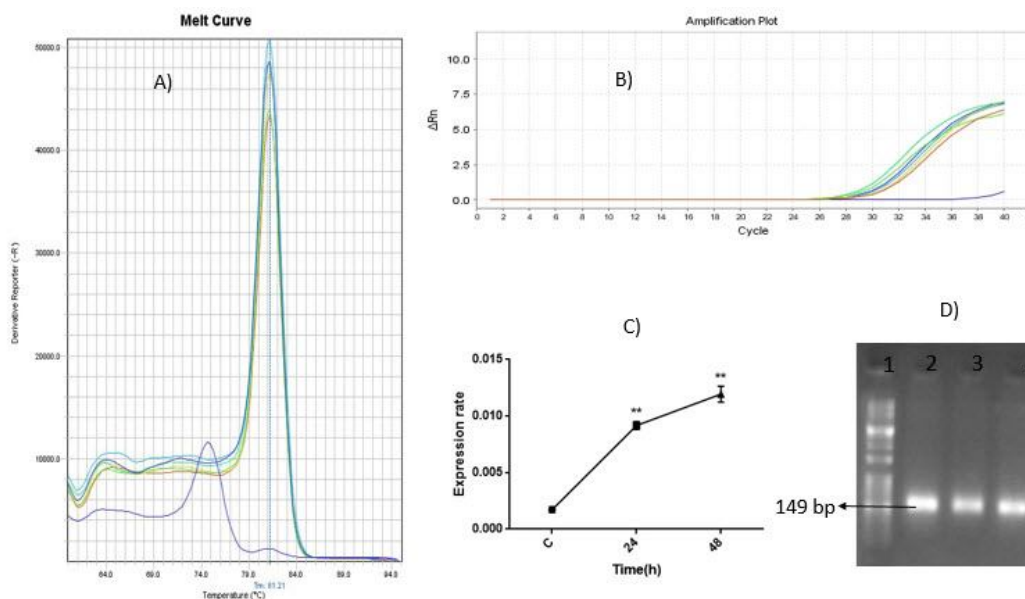
گرفته شد توسط روش $2^{-\Delta Ct}$ محاسبه شد. برای تأیید یافته بیوانفورماتیکی دو مورد از ژن‌های مرتبط با ژن HMGA2 به نام‌های DEDD و TFRT انتخاب شدند و این انتخاب حاصل یافته‌های بیوانفورماتیکی و مطالعات قبلی بود. به دنبال ترانسفکشن siRNA اختصاصی HMGA2 به داخل سلول‌های سرطانی MDA-MB-231، میزان بیان ژن DEDD در مقایسه با گروه کنترل در ۲۴ و ۴۸ ساعت افزایش معنی‌داری ($p < 0.05$) نشان داد (شکل ۴-۳). بررسی کیفی بیان ژن DEDD قبل و بعد از ترانسفکشن siRNA تغییرات قابل توجهی نشان نداد (شکل ۴-۴). میزان بیان ژن TERT بعد از ترانسفکشن siRNA با استفاده از Real-time PCR و ژل الکتروفورز ارزیابی شد. نتایج حاصل از ارزیابی Real-time PCR نشان داد که کاهش معنی‌داری ($p < 0.05$) در میزان بیان ژن HMGA2 در گروه‌های تیمار شده با siRNA در مقایسه با گروه کنترل در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت مشاهده می‌شود (شکل ۵-۳). نتایج بررسی کیفی بیان ژن TERT هم راستا با نتایج بررسی کمی بیان این ژن می‌باشد.

نتایج مربوط به Real time PCR:

نتایج مربوط به Real-time PCR نشان داد که میزان بیان ژن HMGA2 در سلول‌های MDA-MB-231 تیمار شده با ۸۰ پیکومول siRNA اختصاصی HMGA2 در مقایسه با گروه کنترل (تیمار نشده) در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت بصورت معنی‌داری ($p < 0.05$) کاهش یافت و این کاهش به صورت وابسته به زمان اتفاق افتاده است (شکل ۳-۳). برای مشاهده تغییر کیفی در میزان بیان ژن HMGA2، محصول PCR قبل و بعد از ترانسفکشن بر روی ژل الکتروفورز لود شد و همانطور که نمایان است میزان بیان ژن HMGA2 بعد از ترانسفکشن siRNA در دو زمان مورد مطالعه در مقایسه با گروه ترانسفکشن نشده به صورت وابسته به زمان کاهش یافته است (شکل ۳-۴). این نتیجه هم راستا با یافته Real-time PCR می‌باشد. غلظت ۸۰ پیکومول siRNA مورد استفاده در مطالعه حاضر برای تیمار سلول‌های سرطانی MDA-MB-231 بر پایه مطالعات قبلی انتخاب شده است. (۲۰-۲۲). داده‌های کمی در هر نمونه در برابر β -actin نرمالیزه شد و بیان نسبی ژن‌های مرتبط با نمونه کنترل متناظر (گروه تیمار نشده)، که ۱۰۰ درصد در نظر

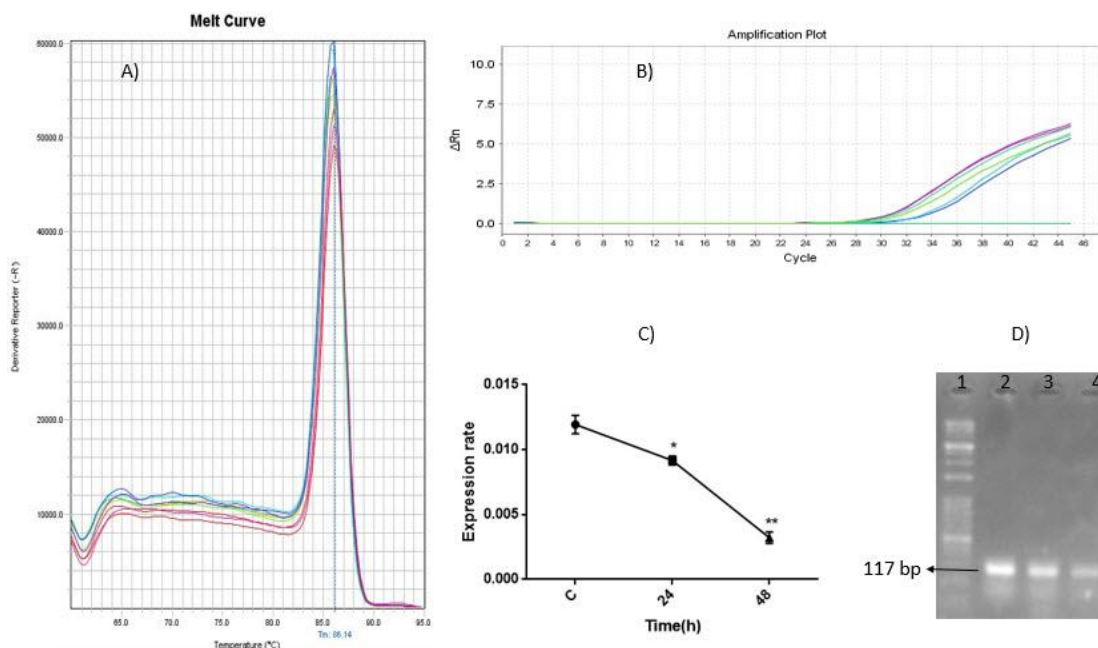


شکل (۳): ارزیابی مهار بیان ژن HMGA2 به دنبال تیمار سلول‌های سرطانی MDA-MB-231 با siRNA اختصاصی HMGA2 در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت. (A) نمودار مربوط به دمای ذوب ژن‌ها. (B) نمودار مربوط به تکثیر ژن‌ها. (C) نمودار خطی مربوط به بیان ژن HMGA2 به روش Real-time PCR (p < 0.05 و p < 0.01). شکل مربوط به بررسی کیفی بیان ژن (ژل الکتروفورز) HMGA2. چاهک‌های ۱ تا ۴ به ترتیب مربوط هستند به DNA ladder، محصول PCR قبل از ترانسفکشن siRNA، محصول PCR بعد از ترانسفکشن (siRNA ۲۴ ساعت) و محصول PCR بعد از ترانسفکشن siRNA (۴۸ ساعت).



شکل (۴): بررسی تأثیرپذیری بیان ژن DEDD به دنبال تیمار سلول‌های سرطانی MDA-MB-231 با siRNA اختصاصی HMGA2 در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت. (A) نمودار مربوط به دمای ذوب ژن‌ها. (B) نمودار مربوط به تکثیر ژن‌ها. (C) نمودار خطی مربوط به بیان ژن DEDD به روش Real-time PCR (p < 0.01). شکل مربوط به بررسی کیفی بیان ژن (ژل الکتروفورز) DEDD. چاهک‌های ۱ تا ۴ به ترتیب

مربوط هستند به DNA ladder، محصول PCR قبل از ترانسفکشن siRNA، محصول PCR بعد از ترانسفکشن siRNA (۲۴ ساعت) و محصول PCR بعد از ترانسفکشن siRNA (۴۸ ساعت).



شکل (۵): ارزیابی تأثیرپذیری بیان ژن TERT در سلول‌های سرطانی MDA-MB-231 تیمار شده با siRNA اختصاصی HMGA2 در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت. (A) نمودار مربوط به دمای ذوب ژن‌های مورد مطالعه. (B) نمودار مربوط به تکثیر ژن‌های مورد آزمایش. (C) نمودار خطی مربوط به بیان ژن TERT به روش Real-time PCR ($p < 0.05$ و $p < 0.01$). (D) شکل مربوط به بررسی کیفی بیان ژن (ژل الکتروفورز) TERT. چاهک‌های ۱ تا ۴ به ترتیب مربوط هستند به DNA ladder، محصول PCR قبل از ترانسفکشن siRNA، محصول PCR بعد از ترانسفکشن siRNA (۲۴ ساعت) و محصول PCR بعد از ترانسفکشن siRNA (۴۸ ساعت).

بحث و نتیجه‌گیری

ژن‌ها در فرایند سرطانی‌زایی انواع سرطان‌ها دخیل هستند، بنابراین سرکوب بیان این ژن‌ها جهت درمان سرطان حیاتی است. (۲۶، ۲۷) با این حال شناسایی و انتخاب ژن هدف جهت سرکوب، یکی از مقوله‌های بسیار مهم در درمان هدفمند می‌باشد، چراکه ژن هدف بسته به میزان ارتباط آن با سایر ژن‌های عملکردی سلول از جمله انکوژن‌ها و تومور ساپروسورها ارزش هدف درمانی را بیشتر می‌کند (۱۸، ۲۸، ۲۹). در مطالعه حاضر ژن HMGA2 به عنوان ژن هدف انتخاب شد و ارتباط آن با سایر ژن‌ها با استفاده از بررسی‌های بیوانفورماتیکی ارزیابی گردید. نتایج تحقیق حاکی از آن است که سرکوب بیان ژن HMGA2 با shRNA یک راهکار مناسب برای تنظیم بیان ژن‌های انکوژنی و سرکوب‌کننده توموری می‌باشد و این به دلیل ارتباط گسترده این ژن با سایر ژن‌های پایین دست سلول می‌باشد. برای مثال به دنبال تغییر در بیان ژن HMGA2، ژن DEDD (یک ژن سرکوب‌کننده توموری) نیز تغییر می‌کند که نشان‌دهنده ارتباط نزدیک دو ژن مذکور می‌باشد (۱۲). به علاوه یافته بیوانفورماتیکی نشان می‌دهد که در صورت مهار ژن HMGA2

با توجه به ضعف روش‌های درمانی رایج (عمل جراحی، شیمی‌درمانی و رادیوتراپی)، توسعه روش‌های درمانی مدرن و کارا برای درمان سرطان پستان ضروری و حیاتی می‌باشد (۲۳). لذا، درمان‌های جدید به سمت درمان‌های اختصاصی‌تر حرکت کرده تا بلکه بتواند اثربخشی درمانی را افزایش و میزان عوارض جانبی را کاهش دهد. از جمله راهکارهای نوین درمانی می‌توان به ژن‌درمانی اشاره کرد. از روش‌های ژن‌درمانی رایج خاموش کردن ژن‌های مرتبط با سرطان است که از مزایای این روش می‌توان به درجه بالایی از اختصاصیت در خاموش‌سازی ژن، قدرت بالا و کارایی زیاد، قابلیت القا خاموشی در مراحل پیشرفته رشد، قابلیت انتقال خاموشی ژن به نسل بعد و هزینه کم آن نسبت به دیگر روش‌های ژن‌درمانی اشاره نمود (۲۴). استفاده از siRNA به عنوان یک روش درمانی نوین در دو دهه اخیر مورد توجه محققین قرار گرفته است. به طوری که امروزه داروهایی بر پایه siRNA برای درمان بسیاری از بیماری‌ها به ویژه سرطان وارد مطالعات بالینی شده است (۱۷، ۲۵) بسیاری از

داده‌های میکرو آرایه مورد استفاده برای آنالیز بیوانفورماتیکی در مطالعه حاضر مربوط به تیمار سلول‌های MDA-MB-231 با shRNA اختصاصی HMGA2 که مربوط به پژوهشی انجام شده در گذشته می‌باشد، لذا پیشنهاد می‌شود که در مطالعات بعدی داده‌های میکرو آرایه مربوط به قبل و بعد از ترانسفکشن siRNA اختصاصی HMGA2 باشد تا مقایسه نتایج آنالیز بیوانفورماتیکی با نتایج تجربی بصورت کامل‌تر مشخص شود. در مطالعه حاضر به دلیل محدودیت در هزینه مالی به تعداد دو تا از ژن‌های پایین‌دست (یک ژن آنکوژنی و یک ژن مهار کننده توموری) بصورت تجربی جهت مقایسه با یافته‌های بیوانفورماتیکی مورد استفاده قرار گرفت و این محدودیت آشکار در مطالعه حاضر می‌باشد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی، تمام ژن‌های مهم انتخاب شده در آنالیز بیوانفورماتیکی در مدل تجربی هم ارزیابی شود تا نتیجه مقایسه آنالیز بیوانفورماتیکی و تجربی بصورت کامل مشخص گردد. به طور کلی نتایج حاصل از بررسی بیوانفورماتیکی نشان داد که ژن HMGA2 با بسیاری از ژن‌های عملکردی و حیاتی سلول از جمله آنکوژن‌ها مثل TRET و ژن سرکوب‌کننده تومور مثل DEDD ارتباط نزدیکی داشته و گزینه مناسبی برای هدف‌گیری با استفاده از siRNA می‌باشد. نتایج حاصل از بررسی آزمایشگاهی میزان بیان ژن‌های HMGA2، DEDD و TRET به روش Real-time PCR نیز تأییدی برای یافته‌های بیوانفورماتیکی است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی صمیمانه خود را از جناب آقای دکتر بهزاد برادران رئیس محترم مرکز تحقیقات ایمونولوژی و همکاران این مرکز بابت همکاری بی دریغ‌شان اعلام می‌دارند. همچنین از آقایان علی امامی و عباس نوبخت که به ترتیب در قسمت بررسی بیوانفورماتیکی مطالعه و ویرایش علمی مقاله کمک کردند، نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

با shRNA اختصاصی این ژن، میزان بیان ژن TERT که یک آنکوژن است کاهش می‌یابد (۳۰). TERT یک آنزیم هسته‌ای است که طول تلومرها را افزایش می‌دهد و میزان بیان ژن این آنزیم در سلول‌های توموری زیاد شده و مانع از آپوپتوز سلول‌های سرطانی می‌شود (۳۱). استفاده از بررسی‌های بیوانفورماتیکی جهت شناسایی و انتخاب ژن هدف به همراه ارتباط آن با سایر ژن‌ها در گذشته صورت پذیرفته است (۲۳، ۳۲). بنابراین هدف قرار دادن ژن HMGA2 با siRNA اختصاصی این ژن در سلول‌های MDA-MB-231 ارزش هدف‌گیری را دارد و مطالعات مشابهی در گذشته گزارش شده است. در مطالعه‌ای رواری و همکاران siRNA اختصاصی HMGA2 را به داخل سلول‌های سرطانی PC3 آدنوکارسینوم پروستات ترانسفکت کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که ترانسفکشن siRNA، بیان ژن HMGA2 را کاهش داده و باعث القاء آپوپتوز می‌شود (۱۶). همچنین وانگ و همکاران نشان دادند که هدف قرار دادن ژن HMGA2 با siRNA اختصاصی در سلول‌های A549 (سرطان ریه) می‌تواند آپوپتوز را القاء کرده و باعث مهار تکثیر و مهاجرت سلول‌ها شود (۳۳). نتایج حاصل از سرکوب بیان ژن HMGA2 با استفاده از siRNA اختصاصی این ژن در مطالعه حاضر با مطالعات قبلی مطابقت دارد (۲۱، ۳۴، ۳۵). مطالعات نشان داده که ژن DEDD نقش سرکوب‌کننده تومور را در سرطان پستان ایفاء می‌کند. در مطالعه حاضر سرکوب بیان ژن HMGA2 باعث افزایش بیان ژن DEDD شده است که این یافته می‌تواند تأییدی بر یافته‌های بیوانفورماتیکی باشد. کاهش بیان ژن‌هایی که عملکرد آنکوژنی دارند از راهبردهای مهم درمان سرطان می‌باشد (۳۶). در مطالعه حاضر میزان بیان ژن TERT (آنکوژن) بعد از هدف قرار دادن ژن HMGA2 کاهش یافته است که با یافته بیوانفورماتیکی هم تطابق دارد. بنابراین هدف قرار دادن ژن HMGA2 با استفاده از siRNA علاوه بر اینکه باعث سرکوب بیان ژن HMGA2 شده است، حتی باعث کنترل تنظیم منفی بیان ژن TERT و تنظیم مثبت بیان ژن DEDD می‌شود. از آنجایی که

References:

- Shibuya K, Mathers CD, Boschi-Pinto C, Lopez AD, Murray CJ. Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: II. Results for the global burden of disease 2000. *BMC Cancer* 2002;2: 37.
- Farooq S, Coleman MP. Breast cancer survival in South Asian women in England and Wales. *J Epidemiol Community Health* 2005;59: 402-6.
- Harirchi I, Kolahdoozan S, Karbakhsh M, Chegini N, Mohseni S, Montazeri A, et al. Twenty years of breast cancer in Iran: downstaging without a formal screening program. *Ann Oncol* 2010;22: 93-7.
- Ghaffari M, Dehghan G, Abedi-Gaballu F, Kashanian S, Baradaran B, Dolatabadi JEN, et al. Surface functionalized dendrimers as controlled-release

- delivery nanosystems for tumor targeting. *Eur J Pharm Sci* 2018.
5. Abedi-Gaballu F, Dehghan G, Ghaffari M, Yekta R, Abbaspour-Ravasjani S, Baradaran B, et al. PAMAM dendrimers as efficient drug and gene delivery nanosystems for cancer therapy. *Appl Mater Today* 2018;12: 177-9.
 6. Wang J, Lu Z, Wientjes MG, Au JL-S. Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers. *AAPS J* 2010;12: 492-503.
 7. Aigner A. Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: strategies based on the direct application of siRNAs. *J Biotechnol* 2006;124: 12-25.
 8. Pearson AS, Bouvet M, Evans DB, Roth JA. Gene therapy and pancreatic cancer. *Front Biosci* 1998;3: E230-7.
 9. Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003;22: 85.
 10. Kuipers A, Zhang Y, Cauley JA, Nestlerode CS, Chu Y, Bunker CH, et al. Association of a high mobility group gene (HMGA2) variant with bone mineral density. *Bone* 2009;45: 295-300.
 11. Noro B, Licheri B, Sgarra R, Rustighi A, Tessari MA, Chau K-Y, et al. Molecular dissection of the architectural transcription factor HMGA2. *Biochemistry* 2003;42: 4569-77.
 12. Lv Q, Hua F, Hu Z-W. Use of the tumor repressor DEDD as a prognostic marker of cancer metastasis. *Methods Mol Biol* 2014; 197-222.
 13. Čukušić A, Vidaček NŠ, Sopta M, Rubelj I. Telomerase regulation at the crossroads of cell fate. *Cytogenet Genome Res* 2008;122: 263-72.
 14. Low KC, Tergaonkar V. Telomerase: central regulator of all of the hallmarks of cancer. *Trends Biochem Sci* 2013;38: 426-34.
 15. Barthel FP, Wei W, Tang M, Martinez-Ledesma E, Hu X, Amin SB, et al. Systematic analysis of telomere length and somatic alterations in 31 cancer types. *Nat Genet* 2017;49: 349.
 16. Ravari SK, Baradaran B. Apoptotic Effect of Specific siRNA against HMGA2 on PC3 Prostate Adenocarcinoma Cell Line. *J Ardebil Univ Med Sci* 2016;16: 159-68.
 17. Kaczmarek JC, Kowalski PS, Anderson DG. Advances in the delivery of RNA therapeutics: from concept to clinical reality. *Genome Med* 2017;9: 60.
 18. Emily Guo X, Ngo B, Sandaldjian Modrek A, Lee W-H. Targeting tumor suppressor networks for cancer therapeutics. *Curr Drug Targets* 2014;15: 2-16.
 19. Wasserman PD. *Advanced methods in neural computing*: John Wiley & Sons, Inc.; 1993.
 20. Mansoori B, Mohammadi A, Shirjang S, Baradaran B. HMGI-C suppressing induces P53/caspase9 axis to regulate apoptosis in breast adenocarcinoma cells. *Cell Cycle* 2016;15: 2585-92.
 21. Mansoori B, Mohammadi A, Goldar S. Silencing of high mobility group isoform IC (HMGI-C) enhances paclitaxel chemosensitivity in breast adenocarcinoma cells (MDA-MB-468). *Adv Pharm Bul* 2016;6: 171.
 22. Esmailzadeh S, Mansoori B, Mohammadi A, Shanebandi D, Baradaran B. siRNA-mediated silencing of HMGA2 induces apoptosis and cell cycle arrest in human colorectal carcinoma. *J Gastrointest Cancer* 2017;48: 156-63.
 23. Yazdi SH, Paryan M, Mohammadi-Yeganeh S. An integrated approach of bioinformatic prediction and in vitro analysis identified that miR-34a targets MET and AXL in triple negative breast cancer. *Cell Mol Biol Lett* 2018;23: 51.
 24. Fire AZ. Gene silencing by double - stranded RNA (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 2007;46: 6966-84.
 25. Chakraborty C, Sharma AR, Sharma G, Doss CGP, Lee S-S. Therapeutic miRNA and siRNA: moving

- from bench to clinic as next generation medicine. *Mol Ther Nucleic Acids* 2017;8: 132-43.
26. De Wever I. *Introduction to Tumor Biology*: Leuven University Press; 1999.
27. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature* 2009;458: 719.
28. Hoelder S, Clarke PA, Workman P. Discovery of small molecule cancer drugs: successes, challenges and opportunities. *Mol Oncol* 2012;6: 155-76.
29. Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist* 2004;9: 361-77.
30. Khattar E, Kumar P, Liu CY, Akıncılar SC, Raju A, Lakshmanan M, et al. Telomerase reverse transcriptase promotes cancer cell proliferation by augmenting tRNA expression. *J Clin Invest* 2016;126: 4045-60.
31. Li Y, Tergaonkar V. Telomerase reactivation in cancers: Mechanisms that govern transcriptional activation of the wild-type vs. mutant TERT promoters. *Transcription* 2016;7: 44-9.
32. Heyn H, Schreek S, Buurman R, Focken T, Schlegelberger B, Beger C. MicroRNA miR-548d is a superior regulator in pancreatic cancer. *Pancreas* 2012;41: 218-21.
33. Wang Q, Gong Y, Lü Y, Fei L, Liu H, Diao Y, et al. Selection and anti-cancer effects of siRNAs targeting HMGA2 gene. *Yao Xue Xue Bao* 2011;46: 1444-50.
34. Shi Z, Wu D, Tang R, Li X, Chen R, Xue S, et al. Silencing of HMGA2 promotes apoptosis and inhibits migration and invasion of prostate cancer cells. *J Biosci* 2016;41: 229-36.
35. Malek A, Bakhidze E, Noske A, Sers C, Aigner A, Schäfer R, et al. HMGA2 gene is a promising target for ovarian cancer silencing therapy. *Int J Cancer* 2008;123: 348-56.
36. Heppler LN, Frank DA. Targeting oncogenic transcription factors: Therapeutic implications of endogenous STAT inhibitors. *Trends Cancer* 2017;3: 816-27.

STUDY OF HMGA2 GENE INHIBITION WITH SPECIFIC SHRNA AND SIRNA AND INVESTIGATION OF CORRESPONDING EFFECTS ON DOWNSTREAM GENE EXPRESSION IN MDA-MB-231 CANCER CELLS: A BIOINFORMATIC AND EXPERIMENTAL STUDY

Fereydoon Abedi Gaballu¹, Behzad Mansoori², Gholamreza Dehghan³

Received: 19 Apr, 2019; Accepted: 05 Aug, 2019

Abstract

Background & Aims: The use of siRNA to silence gene expression is increasingly expanding today. The aim of this study is to bioinformatically and experimentally investigate the inhibition of the HMGA2 gene and its corresponding effects on downstream genes expression rate in MDA-MB-231 cancer cell treated by shRNA and siRNA specific to HMGA2.

Materials & Methods: To perform this bioinformatic and experiment study, first microarray data were collected from Gene Expression Omnibus (GEO) and then analyzed by Probabilistic neural networks (PNN) in MATLAB 2018a software as a bioinformatics tool. Next, the HMGA2 siRNA was designed and obtained. SiRNA transfection was carried out using lipofectamine as a carrier. The expression of HMGA2 gene, oncogene, and tumor suppressor genes were evaluated by real-time PCR.

Results: The bioinformatics result revealed that HMGA2 gene can nearly correlate with downstream genes (oncogene or tumor suppressor genes). Transfection of siRNA into MDA-MB231 cancer cells significantly ($p < 0.05$) inhibits HMGA2 gene expression in comparison with the control group. In addition, following HMGA2 gene suppression, the oncogene (TERT) and tumor suppressor gene (DEDD) expressions were significantly ($p < 0.05$) reduced and increased, respectively.

Conclusion: The HMGA2 gene due to wide correlations with oncogenes and tumor suppressor genes is a reasonable option for targeting and silencing specific siRNA. The successful inhibition of HMGA2 gene expression and impressing of TERT and DEDD expressions after transferring specific siRNA finding is in accordance with bioinformatics results.

Keywords: Bioinformatic, HMGA2 gene, oncogene, tumor suppressor, gene expression

Address: Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Tel: +9833392717

Email: dehghan2001d@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2019; 30(6): 486 ISSN: 1027-3727

¹ MSc of Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

² Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

³ Professor, Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.