Studying the relationship between the gene expression level of the HOTAIR molecule and HER2 receptor in breast cancer

Dr. Faisal redwan[*]
Dr. Nader abedullaa[**]
Dr. Eyad alshatti[***]
Ansam Abdullah[****]

(Received 3 / 1 / 2024. Accepted 25 / 3 / 2024)

□ ABSTRACT □

Objective: The molecular classification of breast cancer contributes to following targeted treatment lines, and HER2 receptors constitute one of the important characteristics in the therapeutic decision for breast cancer, and within the framework of the search for molecular markers that contribute to understanding disease mechanisms with the aim of developing accurate and specific treatment lines. A number of interventional experimental studies have clarified the role of Long non-coding RNA (LncRNA) molecules in the pathogenesis of breast cancer. The HOTAIR molecule was studied as a tumor-stimulating LncRNA molecule through its control of gene expression at several molecular levels. This molecule also had a role in the occurrence of therapeutic resistance in breast cancer . Our study aims to measure the level of gene expression of the HOTAIR molecule in patients' serum and study its relationship with receptors HER2

Research materials and methods: An assay was conducted for the level of gene expression of the HOTAIR molecule in the plasma of 30 patients, by performing a transcription reaction.

Reverse qPCR, gene expression was evaluated using the Levack equation, and HER2 receptors were identified on tissue biopsies in the histopathology department, then a statistical analysis of the results was performed.

Results: The results of the study showed that there were significant differences ($P<0.05$) between the level of HOTAIR gene expression and HER2 receptor positivity.

Keywords: breast cancer, LncRNA, HOTAIR,HER2

Copyright **:**Tishreen University journal-Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

[*]**Associate Professor - Faculty of Human Medicine - Tishreen University - Lattakia - Syria.**
****Professor - Faculty of Human Medicine - Tishreen University - Lattakia - Syria.**
*****Professor - Faculty of Human Medicine - Damascus University - Damascus - Syria.**
******Master's degree - Faculty of Human Medicine - Tishreen University - Lattakia - Syria.**

دراسة العلاقة بين مستوى التعبير الجيني لجزيئة LncRNA HOTAIR ومستقبلات HER2 في سرطان الثدي

د. فيصل رضوان*
د. نادر عبد الله**
د. إياد الشطي***
أنسام عبد الله****

(تاريخ الإيداع 3 / 1 / 2024. قبل للنشر في 25 / 3 / 2024)

ملخّص

الهدف: يساهم التصنيف الجزيئي لسرطان الثدي في اتباع خطوط علاجية موجهة وتشكل مستقبلات HER2 احد الخصائص الهامة في القرار العلاجي لسرطان الثدي، وفي اطار البحث عن واسمات جزيئية تسهم في فهم الاليات الامراضية بهدف تطوير خطوط علاجية دقيقة ونوعية. قامت عدد من الدراسات التجريبية التداخلية بتوضيح دور جزيئات Long non coding RNA LncRNA في الالية الامراضية لسرطان الثدي ، وتمت دراسة جزيئة HOTAIR كجزيئة LncRNA محفزة لحدوث الورم من خلال تحكمها في التعبير الجيني على عدة مستويات جزيئية ، كما كان لهذه الجزيئة دور في حدوث مقاومة علاجية في سرطان الثدي . تهدف دراستنا الى مقايسة مستوى التعبير الجيني لجزيئة HOTAIR في مصل المرضى ودراسة علاقتها مع مستقبلات HER2

مواد وطرائق البحث: تم اجراء مقايسة لمستوى التعبير الجيني لجزيئة HOTAIR في بلازما 30 مريضة وذلك من خلال اجراء تفاعل الانتساخ

العكسي qPCR وتم تقييم التعبير الجيني باستخدام معادلة ليفاك و تم تحديد مستقبلات HER2 على خزعات نسيجية في قسم التشريح المرضي، ثم تم اجراء تحليل احصائي للنتائج.

النتائج :أظهرت نتائج الدراسة وجود فروق ذات دلالة معنوية ($P<0,05$) بين مستوى التعبير الجيني للجزيئة HOTAIR وإيجابية مستقبلات HER2

الكلمات المفتاحية: سرطان الثدي ،LncRNA , HER2 , HOTAIR,

حقوق النشر :مجلة جامعة تشرين- سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY-NC-SA 04

* **أستاذ مساعد – كلية الطب البشري –جامعة تشرين- اللاذقية- سورية.**
** **أستاذ – كلية الطب البشري –جامعة تشرين- اللاذقية- سورية.**
*** **أستاذ – كلية الطب البشري –جامعة دمشق- دمشق- سورية.**
**** **ماجستير – كلية الطب البشري –جامعة تشرين- اللاذقية- سورية.**

مقدمة:

يشكل الجزء المرمز لبروتينات معينة في الخلايا البشرية 2% فقط من RNAs وعلى الرغم من أن معظمها لا تتم ترجمته إلى بروتينات إلا أنها تلعب دوراً تنظيمياً مهماً على مستوى النسخ وما قبل النسخ الجيني ويمكن تصنيف RNAs غير المشفرة إلى:

. micro RNA لا يتجاوز طولها 30 نكليوتيد.

. Longnon-coding RNA (LncRNA): يبلغ طولها أكثر من 200 نكليوتيد [1, 2] وأجمعت الأدلة التجريبية على الدور الإمراضي لجزيئات LncRNA في السرطانات والعديد من الأمراض [2].

ويمكن أن يتم تصنيفها لعدة أصناف بناءً على: موقعها الجيني أو الموقع الخلوي أو الوظيفة ويعود هذا التصنيف إلى محاولات فهم آليات عملها [3].

تعمل هذه الجزيئات عبر عدد من الآليات فوق الجينية، حيث أنها ممكن أن يكون لها دور بنائي Scafold تعمل من خلاله على ربط مركبات كيميائية تحدث تبدلات هيستونية (متيلة الهيستون واستلة الهيستون) تؤدي إلى إسكات الجين [4]، كما أنها ممكن أن تعمل على حجب بعض مواقع الارتباط على شريط الـ DNA [5]، وقد تلعب دوراً تنافسياً مع عديد من الجزيئات المنظمة للنسخ مثل جزيئات mi-RNA [6].

تؤثر جزيئات LncRNAs عبر هذه الآليات على التكاثر الخلوي والتطور الورمي والدارة الخلوية وحدوث النقائل والتهرب من الجهاز المناعي [7].

يعد سرطان الثدي أشيع السرطانات لدى النساء وأكثر أسباب الوفيات السرطانية حول العالم [8]، ويعتبر من الأمراض غير المتجانس Hetrogenous، حيث توجد اختلافات جزيئية مهمة تعدل على الاستراتيجية العلاجية مثل HER2و المستقبلات الهرمونية [9].

في عام 2000 قام Perou و Colleagues بوضع تصنيف جزيئي يعتمد على التعبير الجيني لعدد من الجزيئات وتم تنميطه إلى خمس أنماط Luminal A، Luminal B، (triple-negative breast), HER2 enriched، basl-like normal breast like [10].

في العشر سنوات الماضية مع بدء مفهوم الطب الدقيق او الطب الشخصي الذي يعتمد على التركيب الجيني للفرد مع ممارساته البيئية في تحديد الخطة العلاجية المناسبة ، بدأت الحاجة الملحة للتعرف على واسمات منذرة ومنبئة تعمل على وضع تدابير علاجية تنسجم مع المتغيرات الخاصة للمريض.

تعتبر جزيئة (HOX transcript antisense RNA AHOTAIR) من جزيئات LncRNA التي دُرست بشكل موسع في سرطان الثدي وتتألف من 6 إيكسونات وتقع على الصبغين 12q1313 بين الموقع HOX11 و HOX12(11) لا تعبر جزيئة HOTAIR عن بروتين معين وإنما تؤثر على التعبير الجيني للعديد من الجينات وذلك عبر تأثيرات ناظمة للتعبير الجيني للعديد من الجينات وتبين أن ارتفاع مستوى التعبير الجيني لجزيئة HOTAIR لها دور مهم في عدد من الخباثات أهمها سرطان الثدي [12, 13].

تعمل جزيئة HOTAIR على إحداث تعديل جيني وتغييرات فوق جينية وذلك عبر دورها البنائي بربط معقدات بروتينية PRC_2 وLSD_1 حيث ترتبط جزيئة ال HOTAIR عبر النهاية 3 في المعقد البروتيني وبالنهاية 5 في شريط ال DNA، وهذه المعقدات تعمل على إجراء تعديلات هيستونية مثل مؤدية إلى إسكات جينات معينة [14].

كما أنها ممكن أن تلعب دوراً تنافسياً مع جزيئات mi-RNA المؤدي إلى خفض التعبير عن هذه الحزيئات مما يؤثر على عدد من سبل الإشارة الخلوية التي تتوسطها هذه الجزيئات [15].

ومن الممكن أن يكون التأثير على مستوى التضفير Splicing عن طريق التحكم بالعوامل المضفرة كما يمكن أن يكون التأثير عن طريق التحكم بالترجمة وذلك عبر ارتباطه بالريبوزوم [16].

وبذلك فإنه عبر هذه الآليات المتعددة تتحكم جزيئات الـ HOTAIR في التعبير عن العديد من الجينات منها الجينات الناظمة للدارة الخلوية Rb-E2f, CyclinD, CKD6, CKD4 حيث تؤدي إلى تجاوز الحصر Restriction في الطور G_1 [17]، كما أنها تسكت العديد من الجينات الكابحة لحدوث الورم مثل جين HOXD الموجود على الصبغي 2 وهو من أهم الجينات التي تكبح حدوث النقائل [18] وكذلك تثبط فعالية سبل عدد من الجينات وذلك عبر تحكمها بعوامل ناظمة لهذه السبل وهي miRNA ومن هذه الجينات PENT وP21 وP53 حيث تعمل هذه الجينات على كبح تطور الورم بآليات مختلفة [19].

وتعمل جزيئات HOTAIR على تعزيز تأثير بعض الجينات الورمية مثل HER2 وVEGF وVimentin وB-catenin وهي كلها جينات محفزة للأورام [20, 21, 22].

ومن مجمل هذه التأثيرات يرتبط التعبير الجيني لجزيئة HOTAIR بشكل وثيق بتطور ودرجة ونكس الورم والتهرب من الجهاز المناعي وحدوث تكون وعائي والمقاومة الدوائية والتي تشكل أكبر التحديات في الاستراتيجية العلاجية لسرطان الثدي [23, 24].

تهدف دراستنا إلى توضيح علاقة مستوى التعبير الجيني لجزيئة HOTAIR مع إيجابية مستقبلات HER2 وذلك بهدف التمهيد لاستهدافها علاجياً للمساهمة بتحسين الاستجابة العلاجية.

طرائق البحث ومواده

1. جمع العينات Sample collection:

في هذه الدراسة تم جمع العينات من 30 مريضة مشخصة حديثاً بسرطان الثدي وقبل إجراء أي تداخل علاجي على المريضة وتم أخذ 10 من الشواهد الأصحاء (ماموغرافي سلبي) وذلك بين شهر آب 2022 وشهر نيسان 2023 في مشفى تشرين الجامعي في اللاذقية (مركز الأورام) وتضمنت أخذ العينات معايير اشتمال ومعايير استبعاد، فكانت معايير الاشتمال:

1. مريضة مشخصة حديثاً. 2. العمر فوق 19 عاماً. 3. دون أي تداخل علاجي.

أما معايير الاستبعاد فكانت: 1. دون أي قصة خباثات سابقة. 2. دون أي قصة علاج كيميائي أو علاج غدي. 3. دون قصة أمراض مناعة ذاتية. 4. العمر تحت 18 عام.

تم سحب عينات دموية على انابيب EDTA لاجراء اختبار qPCR وتم اخذ خزعات نسيجية من المريضات وارسالها الى قسم التشريح المرضي في مشفى تشرين الجامعي لدراسة خصائص الورم وتم تحديد مستقبلات HER2 في قسم التشريح المرضي باستخدام التلوينات النسيجية وتصنيفها الى سلبية وإيجابية وإيجابية بشدة

2. RNA extraction: بعد جمع العينات على أنابيب EDTA تم تثقيل العينات بسرعة 12000 g بدرجةحرارة 4 C لمدة 10 دقائق وبعدها ننقل الطافي إلى أنابيب العمل، تم استخدام كيت Triazol لاستخراج كل الـ RNA وذلك

حسب التعليمات المدرجة في الكيت، تم التأكد من تركيزه ونقاوة الـ RNA وذلك عبر القياس بجهاز Nano Drop في وحدة الPCR في المخبر المركزي في مشفى تشرين الجامعي وهيئة الطاقة الذرية في دمشق.

3. CDNA Synthesis: تم استخدام كيت Revert AID First strand CDNA حيث تم إضافة 5 مك من RNA من العينة للكيت والذي يحتوي على برايمر random hexamer primer mix يعمل على تحويل كامل الـ RNA إلى CDNA.

4. Quantitatve reverse transcription:

Polymerase chain reaction QPCR:

تم تقييم التغير بمستوى التعبير الجيني لجزيئة HOTAIR لدى المرضى وذلك عبر إجراء تفاعل qPCR باستخدام جهاز rotor gene (Qiagen, Germany) تم تصميم برايمرات عن طريق هيئة الطاقة الذرية لدى شركة macrogen باستخدام برنامج OLIGO لجزيئة HOTAIR:

For word (GGTAGAAAAAGCAACCACGAAGC)
reverse (ACATAAACCTCTGTGTGTGAGTGCC)

وتم تصميم برايمرات لـ GAPDH وهو من جينات House keeping gene (HKg):

For word (GTGAAGGTCGGTGTGTGAACGG)
reverse (GATGCAGGGATGATGTTCTG)

وتم استخدام كيت Rox qPCR Mastermix/ Maxima SYBR Green وذلك بحسب التعليمات المذكورة ضمن الكيت حيث كان البروتوكول كالتالي: تهيئة 10 دقائق بدرجة 95 C° ثم 40 دورة حرارية 15 ثا على درجة حرارة 95 C° ثم 1 دقيقة على حرارة 60 C°. تم إجراء Melting Carve للتأكد من نوعية منتجات الـ PCR ثم تم إجراء حساب التعبير الجيني باستخدام معادلة ليفاك $2^{-\Delta\Delta CT}$.

النتائج والمناقشة :

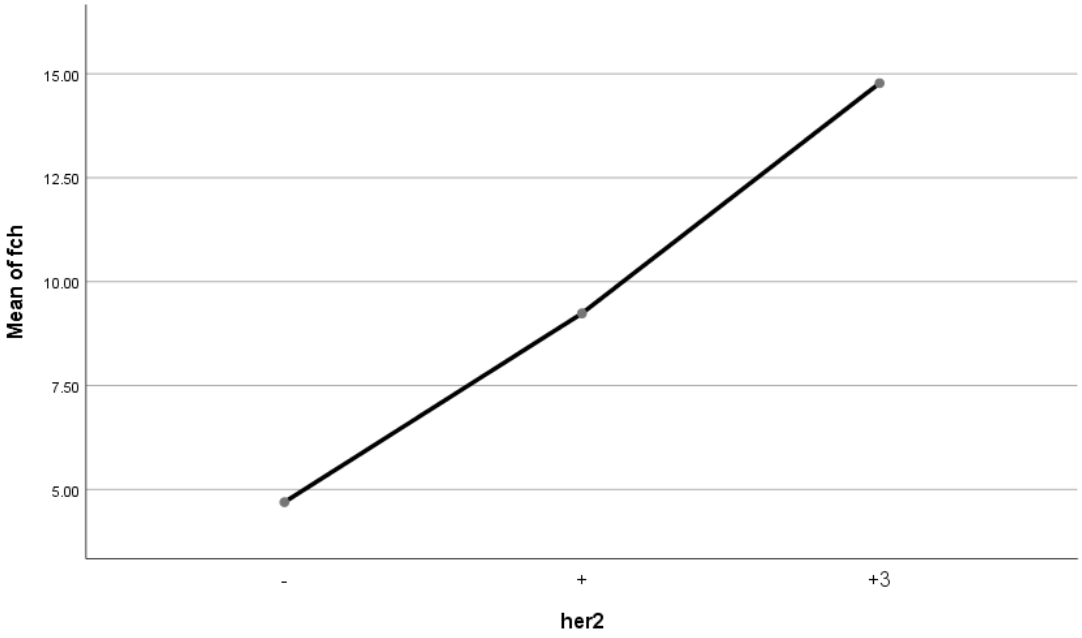
تم اجراء تفاعل qPCR لقياس التعبير الجيني لجزيئة HOTAIR لـ30 مريضة وتم تحديد مستقبلات HER2 لديهم ، وتم اجراء تحليل احصائي باستخدام برنامج spss 2019 ،نوع الدراسة حشدية مستقبلية، فكانت النتائج كالتالي

الجدول (1) العلاقة بين مستوى التغيير في التعبير الجيني HOTAIR ومستقبلات HER2:

Descriptives								
fch								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
-	19	4.6942	2.59564	.59548	3.4431	5.9453	.90	10.26
+	6	9.2367	6.76316	2.76105	2.1392	16.3342	2.18	18.12
+3	5	14.7740	11.12408	4.97484	.9616	28.5864	3.34	29.00
Total	30	7.2827	6.63264	1.21095	4.8060	9.7593	.90	29.00

ANOVA					
fch					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	430.811	2	215.406	6.883	.004
Within Groups	844.955	27	31.295		
Total	1275.766	29			

بلغ متوسط F_Ch لدى مجموعة Her2 (−) 4.6942 بانحراف معياري 2.59564 بينما بلغ متوسط F_Ch لدى مجموعة Her2 (+) 9.2367 بانحراف معياري 6.76316 و بلغ متوسط F_Ch لدى مجموعة Her2 (3+) 14.7740 بانحراف معياري 11.12408 ولمعرفة فيما إذا كانت هذه الفروق دالة إحصائياً تم استخدام اختبار ANOVA حيث بلغت قيمة الدلالة الاحصائية 0.004 وهي اقل من مستوى الدلالة البالغ 0.05 وبالتالي الفروق ذات دلالة إحصائية.



وجاءت هذه النتائج تتوافق مع عدد من الدراسات فقد وجد Wang et al عام 2015في دراسة قام بها دور مستقبلات HER2 في تحفيز B-catenin الذي بدوره يعمل على تحفيز تعبير HOTAIR وذلك عبر ارتباطه بمواقع LEF/TCF في المنطقة المحفزة لجزيئة HOTAIR(25).

وفي دراسة أجراها Yuan عام 2019 وآخرون أكد وجود علاقة بين HOTAIR وHER2 وذلك من خلال إجراء تحليل QPCR للدم المحيطي للمرضى كما أوضح الدور المؤدي انخفاض تعبير HOTAIR استجابة لمثبطات HER [26].

وفي دراسة حول الاستجابة على العلاج بالتراستوزماب (اضداد وحيدة نسيلة تعاكس مستقبلات HER2)قام بها Tianwen 2019وآخرون وجدت هذه الدراسة أن ارتفاع تعبير HOTAIR يعمل على تنشيط عدد من السبل الورمية عبر تنشيط TGF-B حيث يعمل على تحفيز السبيل MEK/MAPK وهذا السبيل بدوره يحفز حدوث فرط تكاثر خلوي وغزو ورمي وينشط مستقبلات HER2 وبالتالي فإن ارتفاع تغير HOTAIR يعمل على تعزيز المقاومة العلاجية على التراستوزماب.

وبإجراء تداخل على مستوى التعبير الجيني لجزيئة HOTAIR عن طريق Oligo antisense وجد Tianwan أن هذا الانخفاض يؤدي إلى مثيلة TGF-B وبالتالي إسكاته وتنشيط جينات P23 و PENT وهي جينات مقاومة لحدوث الورم [27].

قام Zhang وزملائه عام 2016بدراسة على بلازما 148 مريض سرطان ثدي ووجد علاقة ارتباط قوية بين مستوى تعبير HOTAIR وتعبير HER2 [28].

كما أن دراسة أجراها Tanget عام 2019 وجد أن مستوى تعبير HOTAIR له علاقة وثيقة بسوء الإنذار اعتماداً على التصنيف الجزيئي لسرطان الثدي [29].

الاستنتاجات والتوصيات:

وضحت نتائج دراستنا وجود علاقة ارتباط قوية بين مستوى تعبير الجيني لجزيئة HOTAIR وإيجابية مستقبلات HER2. يمكن للدراسات المستقبلة التركيز على استهداف جزيئة HOTAIR وذلك بهدف تحسين الاستجابة العلاجية.

References

[1]- Wiluz JE., Sunwoo H., Spector DL., long non coding RNAs functional surprise from the RNA world. Gene Dev 2009; 23: 1494 - 1504.
[2]- Wapinski O, Chang Hy., et al. long non coding RNAs and human discaese. Trends Cell Biol 2001; 21: 354 - 61.
[3]- Iyer, M.K., Niknafs, Y.S., Malik, R., et al. The landscape of long non coding RNAs in the human transcriptome. Nat. Genet. 2015, 47, 199 - 208.
[4]- Yang. L., Froberg, J.E., et al. long non coding RNAs: Fresh perspective into the RNA world. Trends Biochem. Sci. 2014, 39, 35 - 43.
[5]- Kallen, A.N., Zhou, X.B.; et al the imprinted H19 LncRNA antagonizes let-7 micro RNAs. Mol. Cell 2013, 52, 101 - 112.
[6] Ingolia, N. T., lareau, I. F., et al. Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammation proteomes. Cell 2011, 147, 789 - 802.
[7]- Guttman, M., Amit, I., et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non coding RNAs in mommals. Nature 2009, 458, 223 - 227.
[8]- Lakhani, S.R.Ellis, I. O., et al. Who classification of the Breast, IARC Press: Lyon, france. 2020.
[9]- Polyak K. Heterogeneity in breast cancer. J Clin Invest 2011; 121: 3786 - 8.
[10]- Perou, CM, Sorlie, T., et al. Moleculan portrails of human breast tumers. Nature 2000, 406: 747 - 52.
[11]- Rinn, J. Kertesz, M. et al functinal demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by non coding RNAs. Cell 2007, 129, 1311 - 1323.

[12]- Raju G.S., Paritra E,, et al. HOTAIR: apotential metastatic, drug resistant and prognostic regulator of breast cancer. Molecular cancer 2023, 22: 65.
[13]- Chen, T.; Liu, Z.; Zeng, W.; Huang, T.; et al. Down regulation of long non coding RNA HOTAIR sensitizes breast cancer to trastuzumab. Sci. Rep. 2019, 9. 1 - 12.
[14]- Fernandes, J. C.; Acura, S. M.; Aoki, J. I.; et al. long nan coding RNA, in the regulation of gene expression: Physiology and disease. Non coding - RNA. 2019; 5(1): 17.
[15]- Kim, H. J.; Lee, D. W.; Yim, G. W.; et al. Long non coding RNA HOTAIR is associated with human. Cervical cancer progression. Int J Oncol. 2015, 46(2): 521 - 30.
[16]- Han, B.; Peng, X.; Cheng, D.; Zhu, Y.; et al Delphindin suppress breast carcinogenesis through the HOTAIR/micro RNA - 340 axis. Cancer Sci. 2019, 110, 3089 - 3097.
[17]- Biswas, S.; Feng, B.; Chen, S.; et al the long non coding RNA HOTAIR is a critical epigenetic mediator of angiogenesis in diabetic retinopathy. Ophthalmol Vis Sci. 2021; 62(3): 20.
[18]- Weng, S. L.; Wu. W. J.; Hsiao, et al. Significant association of long non coding RNA_S HOTAIR genetic pdymorphisms with Cancer recurrence and patient survival in patients with uterine cervical cancer. Int J Med Sci. 2018; 15 (12): 1312 - 19.
[19]- Wang, Y.; Yi. K.; Liu, X.; Tan, Y.; et al. HOTAIR up regulation activates NF-KB to induce immunoescape in gliomas. Front Immunol. 2021; 12: 785463.
[20]- Fu. W. M.; Lu, Y. F.; Hu, B. G.; et al. long non coding RNA HOTAIR mediated angiogenesis in nasopharyngeal carcinoma by direct and indirect Signaling pathways. Once target. 2016: 7(4): 4712-23.
[21]-Wang, B-r.; Chu. D-x.; Cheng. M. y.; et al. Progress of HOTAIR micro RNA in hepato cellular carcinoma. Hered Cancer Clin Pract. 2022; 20 (1) - 10.
[22]- Yao, J.; Ma, R; Wang. C.; et al. Lnc RNA-HOTAIR inhibits H9c2 apoptosis after acute myo cardial infarction Via miR-206/FN1 axis. Biochem Genet. 2022; 60: 1781-92.
[23]- Bossaghzadeh, F.; Hajjari, M.; Sheikhi, A.; et al. HOTAIR induces the down regulation of miR-200 family members in gastric cancer cell lines. Iran Biomed J. 2022.; 26 (1): 77.
[24]- Bhan. A, Hussain, I.; Ansari, K. I.; et al. Bisphenol-A and diethylstilbestrol exposure induces the expression on of breast cancer associated long non coding RNA HOTAIR in vitro andin vivo. J steroid Biochem Mol Bid. 2014, 141: 160 - 70.
[25]- Wang Y. L., Overstreet A, M., et al. Combined inhibition of EGFR and c-ABL suppress the of triple negative breast cancer growth through inhibition of HOTAIR. Oncotarget. 2015; G (13): 11150 - 61.
[26]- Yaun L. W., Liang C. L., et al. Long non coding RNA HOTAIR in circulatory exosomes is correlated with HER2 positivity in breast cance. The Breast, 2019. 05. 003.
[27]- Tian Wenchen, Zeming L., Wen Z., Tao H., Down regulation of long non coding RNA HOTAIR sensitizes breast cancer to transtuzamab, Scientific Reports. 2019, 9: 19881.
[28]- Zhang, Y., Zhang. K., et al. Circulating long non coding HOX transcript antisense intergenic ribonudeic acid in plasma as a potential biomarker for diagnos is of breast cancer. Thorac. Cancer 2016, 7, 627 - 632.
[29]- Tang, S., Zheng K., et al, Over expression serum exosomal HOTAIR is correlated with poor survival and poor response to chemo therapy Resistance in Breast cancer 2019, 69, 152 - 163.