

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.

بررسی عملکردی و بیوانفورماتیکی ناحیه تنظیمی GH17J039694، 1HER2-Enhancer مستقر در HER2 در رده های سلولی سرطان پستان (MCF7 و SKBR3) ورده 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 تقی زاده^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 خانواده ی گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (*EGFR*) است که یک پروتئین ۱۸۵ کیلو دالتونی با فعالیت تیروزین کینازی را کد می کند. این ژن در بافت های مختلفی از جمله کلیه، پوست، کلون، تخمدان و غدد پستانی بیان شده و بیشتر در غشای پلاسمایی یافت می شود. با تکثیر یا افزایش رونویسی *HER2*، سرطان زایی و یا وخیم تر شدن وضعیت تومورزایی در بعضی از سرطان ها مشاهده می شود. تغییرات کروماتینی و مکانیزم های اپی ژنتیکی تا حد زیادی می توانند بر روی بیان ژن و تنظیم رونویسی تاثیر گذاشته و به پیشروی سرطان کمک کنند. مطالعات نشان داده اند که گاهی این تغییرات بر روی توالی انهنسرها (*Enhancer*) نیز اتفاق می افتند. توالی های انهنسری شامل موتیف های کوتاه DNA است که به عنوان جایگاه های اتصال فاکتورهای رونویسی ویژه ی توالی عمل می کنند. مناطقی از کروماتین مانند جایگاه های حساس به DNase I و همچنین تغییرات هیستونی مانند H3K4me1 و H3K27ac برای پیش بینی انهنسرها استفاده می شوند. انهنسرها فعال از لحاظ رونویسی که eRNA ها (RNA های رونویسی شونده ی غیرکد شونده ی مشتق از انهنسرها) را بیان می کنند، دارای دو نشان هیستونی H3K4me1 و H3K4me3 می باشند. یک رویکرد درمانی که تغییرات ژنومی را مستقیماً هدف قرار می دهد، از آن جهت می تواند 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 37850592-37853472: 17q12: (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 پایگاه های داده ای مانند GEO، ChIP-Atlas، و recount3 انجام گرفت. نتایج آزمایشگاهی نشان دهنده کاهش واریانت های *HER2* و تغییرات بیانی دیگر ژن های مورد بررسی بود. بطور کلی با توجه به مطالعات بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی به نظر می رسد این بخش از توالی *HER2* را می توان به عنوان یک ناحیه تنظیمی انهنسری در نظر گرفت.

نتایج: یافته ها نشان دهنده ی کاهش بیان واریانت ها در رده های سلولی مورد مطالعه پس از ۲۴ ساعت بطور سیس و تغییرات بیانی دیگر ژن های مورد بررسی بطور ترانس می باشد. همچنین، بررسی های بیوانفورماتیکی مانند نشان های 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 صورت حذف ژنتیکی ناحیه *HER2-En1* در *HER2* به نظر می رسد این بخش از توالی *HER2* را می توان به عنوان یک ناحیه تنظیمی انهنسری در نظر گرفت.

کلید واژه ها: 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 دکترای گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۱۵۴، تلفن: +۹۸۹۳۶۴۴۸۵۰۰۷، فکس: +۹۸۲۱)۸۲۸۸۴۷۱۷، پست الکترونیکی mhdhroji@gmail.com ۲- سید جواد مولی؛ دکتری، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۱۵۴، تلفن: +۹۸۹۱۲۲۱۸۱۹۸۰، فکس: +۹۸۲۱)۸۲۸۸۴۷۱۷، پست الکترونیکی: sjmowla@modares.ac.ir

مقدمه

ErbB2 یا گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی انسان (*HER2/neu*) یکی از اعضای خانواده تیروزین کینازهای گیرنده ی *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 *TGFβ/SMAD* از طریق آبخار سیگنالی *RAS*)، افزایش

برهم کنش آنهاست با پروموتورها منجر به فراخوانی RNA پلیمرز II و تنظیم رونویسی می‌شود. از نشانگرهای اپی ژنومی احتمالاً برای شناسایی آنهاست 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 H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac و H3K36me3 می‌باشد و آنهاست که مختص بافت غنی از H3K4me1 می‌باشند^[۱۵, ۱۴]. بطور کلی وضعیت کروماتینی مانند مناطق حساس به DNaseI و تغییرات هیستونی، مثل H3K4me1 و H3K27ac را می‌توان برای پیش بینی آنهاست بکار برد. تغییرات کروماتین می‌تواند تأثیر زیادی بر تنظیم رونویسی داشته باشد و به پیشرفت سرطان کمک نماید^[۱۶]. یکی از روش‌ها برای ارزیابی های عملکردی آنهاست، روش‌های مرتبط بر پایه کریسپر است که باعث ویرایش مستقیم توالی ژنومی DNA می‌شود^[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, GEO می‌باشد که می‌توان به بررسی هرچه بیشتر نواحی تنظیمی ژن‌ها 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 پروموتور و دو آنهاست 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 آنهاست به نظر می‌رسد و در ترانسکریپت واریانت های ۳،۲ و ۵ 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 می‌باشد. 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 ژن‌ها 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 ناحیه ی 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.

فعالیت‌های سیگنالینگ و بیان واریانت های 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 آن‌ها دخیل هستند، احتمالاً عامل اصلی حساسیت به داروها می‌باشند. شواهد نشان می‌دهد که HER2 همچنین یک تنظیم کننده مهم جمعیت سلول های بنیادی سرطان پستان در سرطان های HER2+ است. بیان بیش از حد HER2 باعث افزایش جمعیت سلولهای بنیادی در رده های سلولی سرطان پستان (BCSC)^۱ از طریق مسیریایی مانند PI3 کیناز و AKT می‌شود^[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 آنهاست رخ می‌دهد^[۹]. آنهاست موتیف‌های کوتاه DNA هستند که به عنوان جایگاه های اتصال برای فاکتورهای رونویسی ویژه‌ی توالی عمل می‌کنند و می‌توانند صدها کیلوباز از ژن هدفشان فاصله داشته باشند. آنهاست نه فقط در مرحله رشد و نمو در بیان ژن اهمیت دارند، بلکه در تکوین و بیماری نیز حائز اهمیت هستند^[۱۰, ۱۱]. ابر آنهاست^۲ نوعی از آنهاست 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 آنهاست تنظیم ژن های ویژه‌ی سلول (Cell-Type) را برعهده دارند. eaRNAها (enhancer derived RNAs)، RNAهای غیر کدشونده‌ی رونویسی شده از آنهاست عملکردی هستند که در ارتباط با نواحی ابر آنهاست می‌باشند. eaRNA نشان‌دهنده‌ی فعال بودن ژن های اطراف و غنی از H3K4me1 و H3K27ac هستند و در رونویسی از ژن های نزدیک نیز نقش دارند. رونویسی eaRNA از آنهاست در رده های سلولی متفاوت و در پاسخ به محرک های مختلف انجام می‌شود. علاوه بر نقشی که آنهاست در تنظیم بیان ژن دارند، eaRNAهای رونویسی شده از آن‌ها در عملکردهای بیولوژیک نیز دخیل هستند. به عنوان مثال، چندین eaRNA ویژه‌ی ایتروسیت نقش خود را در بلوغ سلولهای قرمز خون ایفا می‌کنند^[۱۲, ۱۳].

^۱ Breast Cancer Stem Cells
^۲ Enhancers
^۳ Super Enhancers

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 نشان های هیستونی در رده های سلولی مختلف و مناطق حساس به DNaseI و از DAVID^۷ برای بررسی مسیرهای مشترک درگیر بهره گرفتیم.

طراحی اولیگونوکلوئوتیدها

الیگونوکلوئوتیدهای 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 نرم افزار CRISPOR (<http://crispor.org/>) طراحی و بهترین جفت ها 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. سلول ها در DMED/F12 (Thermo Fisher Scientific، ایالات متحده آمریکا)، حاوی ۱۰ درصد FBS (Thermo Fisher Scientific، ایالات متحده)، و ۱ درصد پنی سیلین/استرپتومایسین (Bio Basic، کانادا) کشت داده شدند و سپس آنکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد با CO₂ ۵ درصد انجام گرفت.

روش کلونینگ

در طول این تحقیق، gRNAها در وکتور PX459.v2 کلون شدند. برای ناکداون یا غیر فعال سازی ژن (Knockdown) نیز از TRE-KRAB-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 ترانسفورم شده با واکنش کلونی PCR (Colony Check PCR)، کشت کلونی های مثبت، استخراج پلازمید و تایید قطعات وارد شده به وکتور با توالی یابی می باشد. نمونه وکتورهای استخراج شده با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (GeneAll، South Korea) جهت تایید حضور توالی مورد نظر، برای سکناس به بیمارستان رجایی تهران ارسال شد.

ترانسفکت وکتورهای حامل Cas9 و gRNA

اولین مرحله دست ورزی 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 آنتی بیوتیک 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 ترانسفکشن توربوفاکت (Invitrogen، USA) به میزان ۲ میکرولیتر با وکتورهای حامل gRNA (مجموعاً 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 DNA سلولی را با استفاده از کیت (GeneAll) جهت اطمینان از ویرایش ژنتیکی استخراج کردیم. پس از حصول اطمینان از ویرایش توسط PCR، RNA 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 مشاهده ی 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 سلول های کنترل و ترانسفکت شده با استفاده از دستورالعمل کیت شرکت (Thermo Scientific) سنتز cDNA انجام گرفت. سپس از cDNA سنتز شده به عنوان الگو و از پرایمرهای

^۴ (<https://ma.recount.bio/docs/index.html#how-to-cite-recount3>)

^۵ (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) (GSE:96860)

^۶ (<https://chip-atlas.org/>)

^۷ (<https://david.ncifcrf.gov/>)

بخش از توالی HER2, GH17J039694, با ۲۸۸۱ جفت باز واقع در موقعیت UCSC (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, Craniofacial Atlas (GRCh38/hg38) پیش بینی شده است. این ناحیه از اینترون ۳ شروع می شود و تا اواسط اینترون ۴ ادامه می یابد (بر اساس NM_001289936.2). ناحیه تنظیمی HER2-En1 در بالادست مجموعه ای از واریانت های کوتاه HER2 یا رونوشت های نوع ۲ (۲-۳) kb بالادست پروموتور ۲ قرار دارد و احتمالاً بر نسبت بیان رونوشت های کوتاه و بلند ژن تاثیر می گذارد و با پروموتور ۲ برهم کنش بیشتری دارد (UCSC: interactions of GeneHancer regulatory elements). همچنین، ناحیه ی HER2-En1 حاوی برخی از ویژگی های عناصر تنظیم کننده ی سیس و بخش هایی از توالبیهای 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 می کند. طبق داده های ENCODE و ChIP-Atlas نشان های هیستونی مانند H3K4me3 و H3K27ac نشان دهنده نواحی پروموتوری و نشان های هیستونی مانند H3K4me1 نشان دهنده 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 ChIP-seq در UCSC و ChIP-Atlas، چندین فاکتور رونویسی مانند HDAC, POLR2A/G, EP300 در رده های سلولی مختلف مانند H1-hESC و HEPG2 به این ناحیه متصل می شوند. نقش انهنسری احتمالی این ناحیه در ژن های *GRB7*, *PGAP3*, *NEUROD2*, *ORMDL3*, *MIEN1*, *LRRC3C* نیز در برخی از رده های سلولی گزارش شده است (بر اساس داده های C₃ 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 می باشد. پروتئین آن نیز به میزان بیشتری در قلب، کولون، کبد، شش، جنین، غدد ترشچی، پروستات، پوست، تخمدان و بیضه بیان می شود. طبق اطلاعات بیوانفورماتیکی در UCSC (DASH RNA annotation) و GTEX RNA-seq خوانش های 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 می کند. همچنین، طبق آنالیزهای بیوانفورماتیکی که بر روی داده های RNA Seq حاصل از بافت نرمال و توموری پستان، HER2+ و HER2- ها از پایگاه داده recount3 بدست آمده خوانش های

GAPDH به عنوان 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 ژن های هدف و روش های 2^{-ddCt} و 2^{-dCt}، بیان نسبی ژن های 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 می رود: 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 کپی های ژن در ۱۰۰ نانوگرم از هر DNA (کنترل و ویرایش شده) بر اساس خط استاندارد بدست آمده از پلازمید حاوی قطعه مورد نظر از ۱۰^۷ تا ۱۰ کپی بدست آمد.

روش تجزیه و تحلیل داده ها

نتایج حاصل از qPCR در رده های سلولی متفاوت توسط نرم افزار Graph pad prism v 9.00 و $\Delta\Delta C_t$ تحلیل شدند. از آزمون t test و ANOVA، به منظور بررسی معنی داری تفاوت های مشاهده شده استفاده شد. (آستانه معنی داری 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 رده های سلولی نرمال و HER2-

با استفاده از مرورگر ژنوم GEO سه رده سلولی MCF7, MCF10A 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^۱ (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). 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

^۱ (<https://discover.nci.nih.gov/cimminer/oneMatrix.do>)

که بعد از دست‌ورزی تقریباً 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 سرطان‌های پستان رخ می‌دهد [۱۶]. تکثیر *HER2* و بیان بیش از حد پروتئین آن از عوامل مهم در پیش‌بینی حساسیت بالینی به درمان‌های ضد *HER2* در بیماران مبتلا به سرطان پستان، معده و مری می‌باشد [۱۷]. اهمیت *HER2* در درمان سرطان در نقش آن در تشکیل تومور و همچنین نقش آن به عنوان نشانگر در هدف‌گیری عوامل مختلف درمانی نهفته است [۱۷]. بنابراین، با توجه به اهمیت *HER2* و تکثیر و بیان بیش از حد آن در سرطان‌هایی مانند سرطان پستان، تشخیص و درمان اختصاصی سرطان‌های *HER2+* ضروری به نظر می‌رسد. 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 واریانت‌های 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* (شکل‌های ۱ و ۲، در انتهای صفحه) و در نهایت وجود رونوشت‌های کوتاه در پایگاه‌های داده *recount3* و مرورگر ژنوم *UCSC*، وجود ناحیه تنظیمی *HER2-En1* را در *HER2* پیشنهاد می‌کند. همچنین با آنالیز بیوانفورماتیکی داده‌های *GSE96860*، بیان ژن‌های افتراقی در سه رده سلولی پستان (رده سلولی *MCF10A*، رده سلولی *HER2+*: *SKBR3* و رده سلولی *HER2-*: *MCF7*) را بدست آوردیم. سپس با فیلترینگ سخت‌گیرانه ($p < 0.001$) و $\log_2(\text{FoldChange}) > 5$ ، ژن‌هایی را که اختلاف بیان بیشتری در این گروه‌بندی داشتند انتخاب نموده (شکل ۳، در انتهای صفحه) و به پایگاه‌های *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*، *p53* و *PI3K* کیناز اشاره نمود. تصور می‌شود که خواص آنکوژنی *HER2* به دلیل فعال شدن بیش از حد آشارهای سیگنالینگ پایین دست باشد. به طور خاص، سیگنال دهی از طریق مسیر *PI3K* اثرات ضد آپوپتوز و تقویت‌کننده رشد را اعمال می‌کند [23]. شواهد مبتنی بر ادبیات موضوع نشان می‌دهد که مسیر سیگنالینگ *PI3K-Akt* یک مسیر انتقال سیگنال است که بقا و رشد را در پاسخ به سیگنال‌های خارج سلولی افزایش می‌دهد [24]. سلول‌هایی که *HER2* را بیش از حد بیان می‌کنند (به عنوان مثال، رده سلولی آدنوکارسینوم *SKBR3*) به طور قابل توجهی مسیرهای

^۹ Phosphoinositide 3-Kinase -Akt

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 کلونی‌های مثبت جهت استخراج پلازمید *Px459* کشت داده شدند. صحت کلون شدن *gRNA*‌ها، پایین دست پروموتور U6 با تعیین توالی مشخص شد.

شناسایی کلونی‌های ویرایش شده

سلول‌ها ۲۴ ساعت پس از ترنسفکشن (شکل ۸، در انتهای صفحه) توسط وکتور نو ترکیب که بیان‌کننده‌ی *gRNA*‌های اختصاصی ناحیه *HER2-En1* بودند، با آنتی بیوتیک پورومایسین 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 نشان‌دهنده 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 واریانت‌ها و ترانس آن بر ژن‌های بنیادینگی مشاهده شد.

وضعیت بیانی واریانت‌های *HER2* در RNAهای استخراج شده از رده‌های سلولی مختلف با پرایمرهای اختصاصی واریانت‌های ۲ و ۱ بصورت کمی بررسی شد. این دسته پرایمرها برای نقاط مشترکی از واریانت‌های ۱ یا بلند و ۲ یا کوتاه بطور جداگانه طراحی شدند. در ۲۴ ساعت ابتدایی پس از ترنسفکشن افزایش مختصری در بیان واریانت‌ها به ویژه در واریانت‌های 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 واریانت‌ها 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 ژن‌های مرتبط با سلول‌های بنیادی *OCT4*، *NANOG* و *SOX2* در *SKBR3* و *MCF7* افزایش بیان نشان می‌دهند. (کنترل داخلی *GAPDH* و سطح معنی‌داری کمتر از ۰.۰۵ در نظر گرفته شد).

اندازه‌گیری تعداد کپی DNA با استفاده از *Real-Time PCR* و رسم نمودار منحنی استاندارد نشان‌دهنده‌ی کاهش تعداد کپی‌ها پس از ویرایش می‌باشد.

تعداد کپی‌های *HER2-En1* در ۱۰۰ نانوگرم از DNA سلول‌های کنترل و ویرایش شده به شرح زیر می‌باشد. در سلول‌های ویرایش نشده یا کنترل در رده‌های *SKBR3*، *HEK293* و *MCF7* در هر ۱۰۰ نانوگرم از غلظت سلولی به تعداد تقریباً ۲۰۰۰۰-۱۰۰۰۰ کپی از ژن موجود است

تائیری بر سلول های سالم نگذارد. توسعه ابزارهای ویرایش ژنوم مانند سیستم کریسپر می تواند چنین فرصتی را فراهم کند [۱۶]. کلان و همکاران با کمک ساختارهای فعال کننده dCas9 و کتابخانه های sgRNA 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 مدل های موشی ناک اوت شده شرطی HER2 در غده پستانی نشان داده اند که HER2 برای مورفوژنز طبیعی مجاری پستانی مورد نیاز است [۹]. در مطالعه ای توسط وانگ و همکاران، سیستم کریسپر با موفقیت در سلول های سرطان پستان با HER2 تکثیر یافته به کار گرفته شد و منجر به مهار تکثیر سلولی گردید [۱۷]. در مطالعه ای 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 [۱۶]. 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 می باشد [۲۲]. 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 صرف نظر از نوع سلول، هر دو رونوشت کوتاه و بلند HER2 کاهش یافته اند (شکل ۱۱، در انتهای صفحه).

همچنین تغییرات بیانی سه ژن بنیادینگی NANOG، SOX2 و OCT4 در نتیجه ویرایش ژنی HER2-En1 برخلاف انتظار ما نشان دهنده افزایش بیان هر سه ژن در MCF7 و افزایش بیان NANOG و OCT4 در SKBR3 بود. به نظر می رسد عناصر پاسخگوی عوامل رونویسی OCT4، NANOG و SOX2 در مناطقی غیر از ناحیه ویرایش شده قرار دارند و یا رونوشت های دیگر این عوامل باعث جبران عملکرد کاهش از طریق مسیرهای دیگر شدند. بنابراین یافته ها حاکی از اهمیت این ناحیه بر HER2 و تأثیر آن بر بیان ژنهای مرتبط با سلولهای بنیادی می باشد (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 می باشد.

نتیجه گیری

علاوه بر مطالعات بیوانفورماتیکی، حذف ژنتیکی ناحیه HER2-En1، منجر به کاهش بیان واریانتهای آن در رده های سلولی مورد مطالعه شد، که نشان دهنده نقش تنظیم کننده ای این ناحیه احتمالاً به عنوان یک انهنسر در HER2 می باشد. یافته های بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی ما

پایین دست را مانند PI3K/AKT در مقایسه با سلول هایی با بیان کمتر HER2 (مانند MCF10A) فعال می کنند [۲]. PKB/Akt کاملاً 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 بدست آمده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی، در سلول های بنیادی سرطانی (Cancer Stem Cells) نیز حضور دارند. در مطالعه ای که توسط Korkaya و همکارانش انجام شد مشاهده گردید که در زنان مبتلا به سرطان لومینال پستان، HER2 بطور ویژه در جمعیت CSC بیان می گردد و نقش مهمی در تنظیم ویژگی پرتوانی از طریق مسیرهای سیگنالینگ مانند PI3K/AKT و WNT ایفا می کند [۵]. مکانیزم های اپی ژنتیکی 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 پروموتور و انهنسر می باشند [۱۶]. در رده های سلولی HER2+ مانند SKBR3 افزایش در نشان هیستونی H3K9ac یا H3K36me3 و کاهش در نشان هیستونی H3K27me3 مشاهده می شود (شکل ۵، در انتهای صفحه) [۱۴].

بسیاری از انهنسرها عملکردی واحدهای رونویسی هستند و eaRNA را تولید می کنند [۲۷]. eaRNA، RNAهای غیر کدکننده رونویسی شونده از انهنسرها 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 eaRNA نسبت به نوع سلول و وضعیت آن می باشد [۱۳، ۱۲]. بررسی خوانش های RNA-seq (Reads) در UCSC نشان می دهد که رده سلولی MCF7 در ناحیه HER2-En1 دارای RNAهای غیر کدکننده رونویسی شونده یا خوانش (رید) می باشد (شکل ۶، در انتهای صفحه). علاوه بر این مطالعات بیوانفورماتیکی با به کارگیری ابزار IGV و مبتنی بر کاوش در داده های RNA Seq در recount3 نشان دادند که خوانش های 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 می باشد، 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 می شود، بنابراین منجر به عوارض جانبی نامطلوب شیمی درمانی می گردد. یک رویکرد درمانی که تغییرات ژنومی را مستقیماً هدف قرار می دهد، از آن جهت می تواند ارزشمند باشد که هیچ

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.

نقش تنظیم‌کنندگی سیس و ترانس HER2-En1 را که احتمالاً به عنوان eRNA نیز بیان می‌شود نشان می‌دهد. به طور کلی، به نظر می‌رسد درک عمیق مفاهیم مولکولی مهار HER2 برای طراحی استراتژی‌های 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 می‌شود.

تشکر و قدردانی

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

تأییدیه اخلاقی

آزمایشات عملی بر روی رده‌های سلولی تجاری به عنوان پایان‌نامه دکتری توسط کمیته اخلاق پژوهشی تربیت مدرس (شماره مرجع/شناسه اخلاق: IR.MODARES.REC.1399.067) تأیید شد.

تعارض در منافع

هیچ گونه تعارض منافی 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)

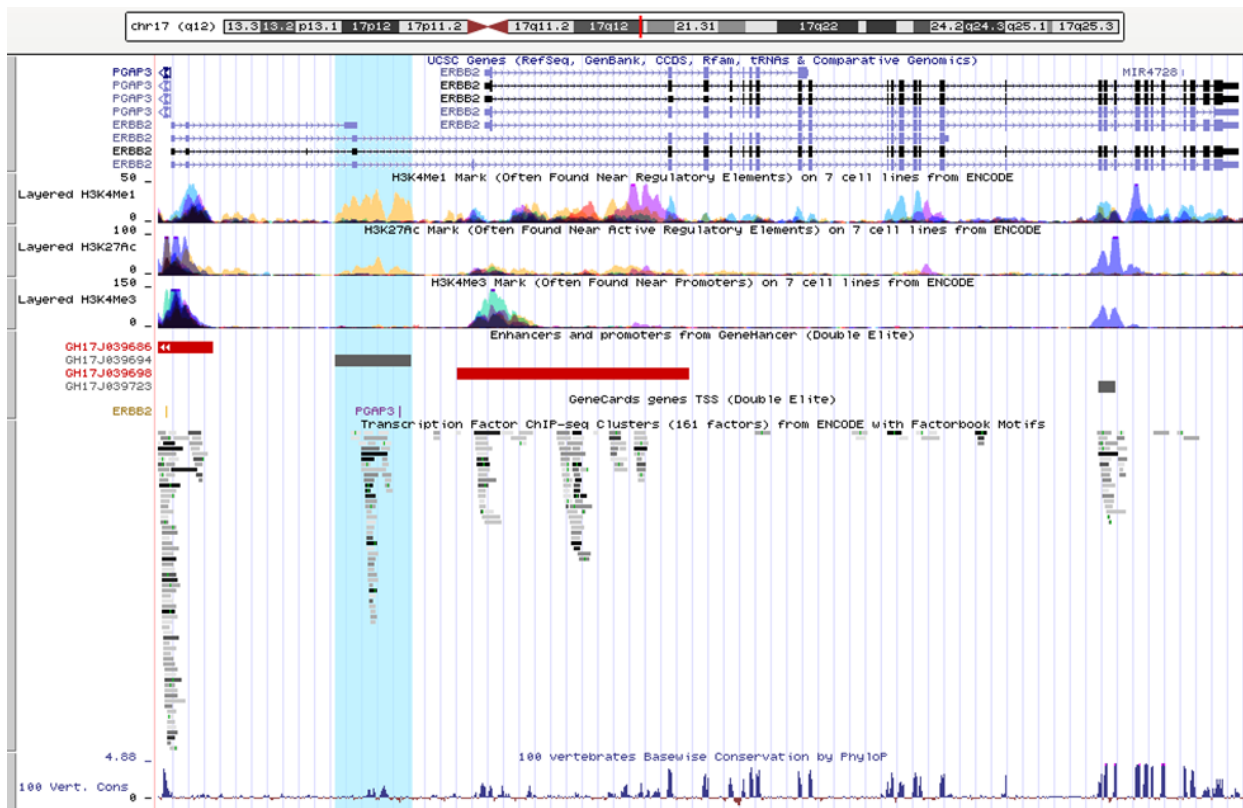
منابع مالی

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

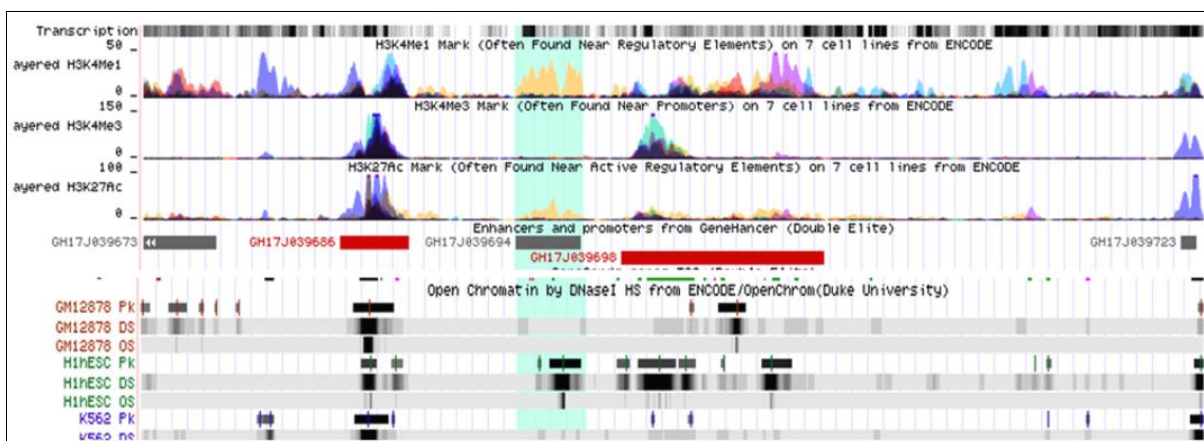
منابع

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.

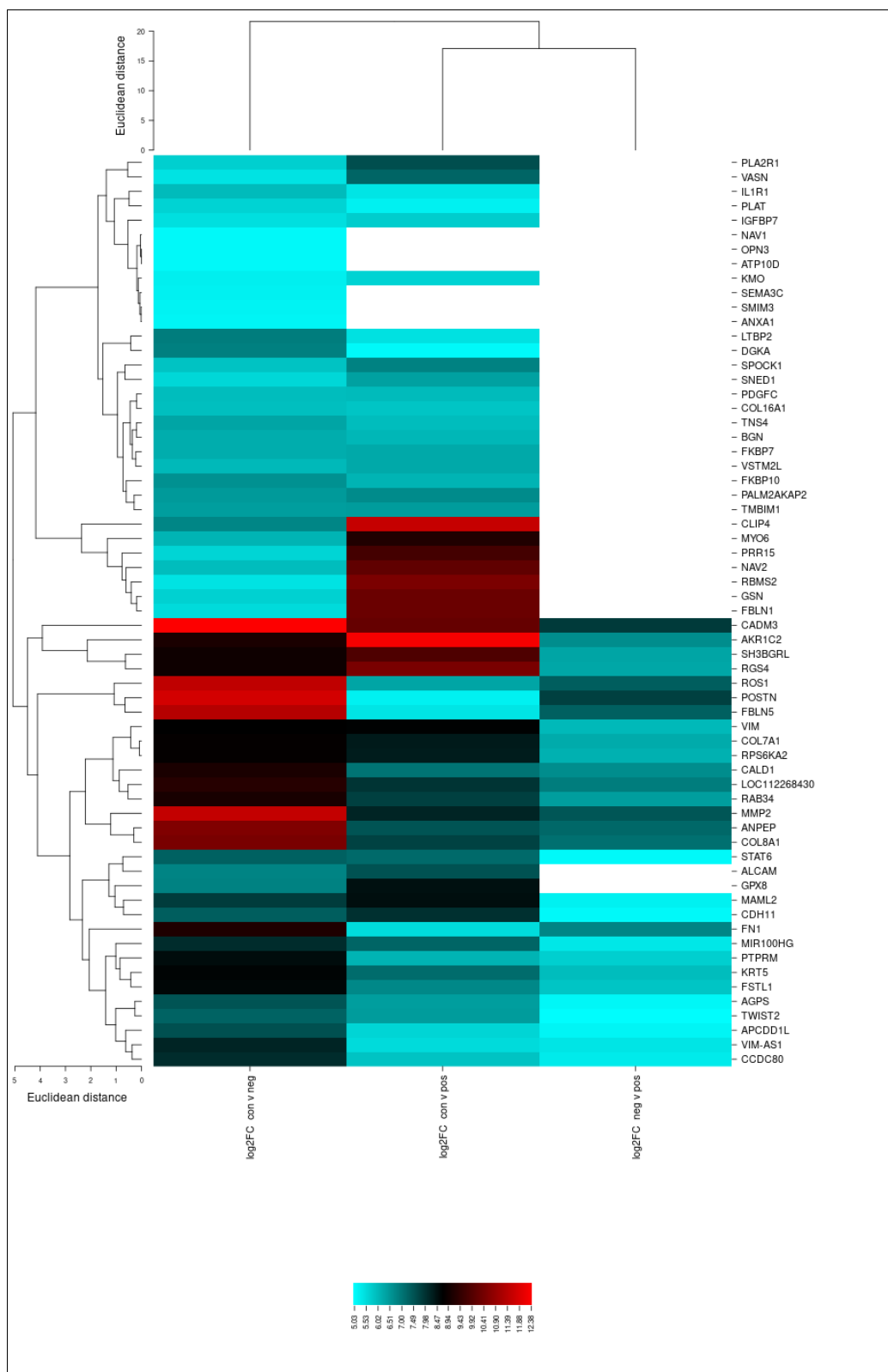
27. Stanimir, M., et al., Mullerianosis of the urinary bladder: a rare case report and review of the literature. *Rom J Morphol Embryol*, 2016. 57(2 Suppl): p. 849-852.
28. Klann, T.S., et al., CRISPR-Cas9 epigenome editing enables high-throughput screening for functional regulatory elements in the human genome. *Nature biotechnology*, 2017. 35(6): p. 561-568.
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.



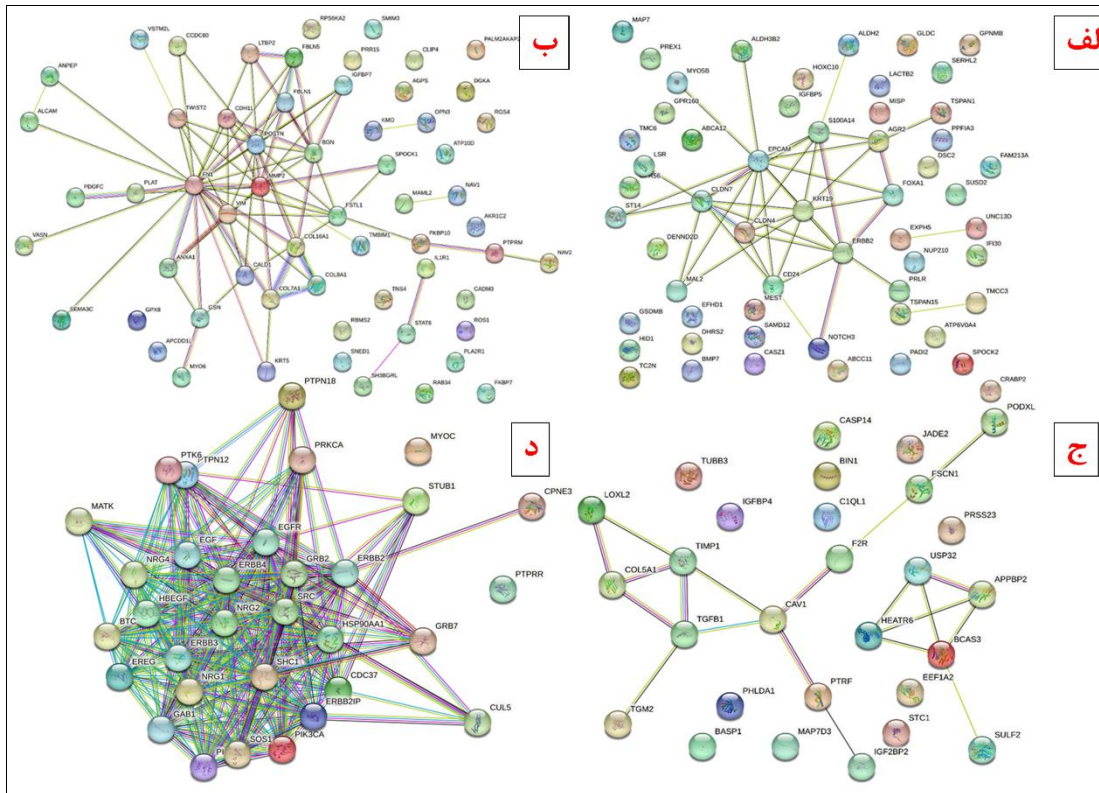
شکل ۱: ناحیه HER2-En1 و انواع رونوشت ها و پروموتورهای آن. ناحیه HER2-En1 در مرورگر UCSC در شکل بصورت هایلیت آبی مشخص شده است. میزان حفاظت شدگی HER2 در بین مهره داران و نشان هیستونی H3K27Ac که اغلب در کنار عناصر تنظیمی وجود دارد نشانگر اهمیت HER2-En1 به عنوان یک ناحیه تنظیمی می‌باشد. (<https://genome.ucsc.edu>)



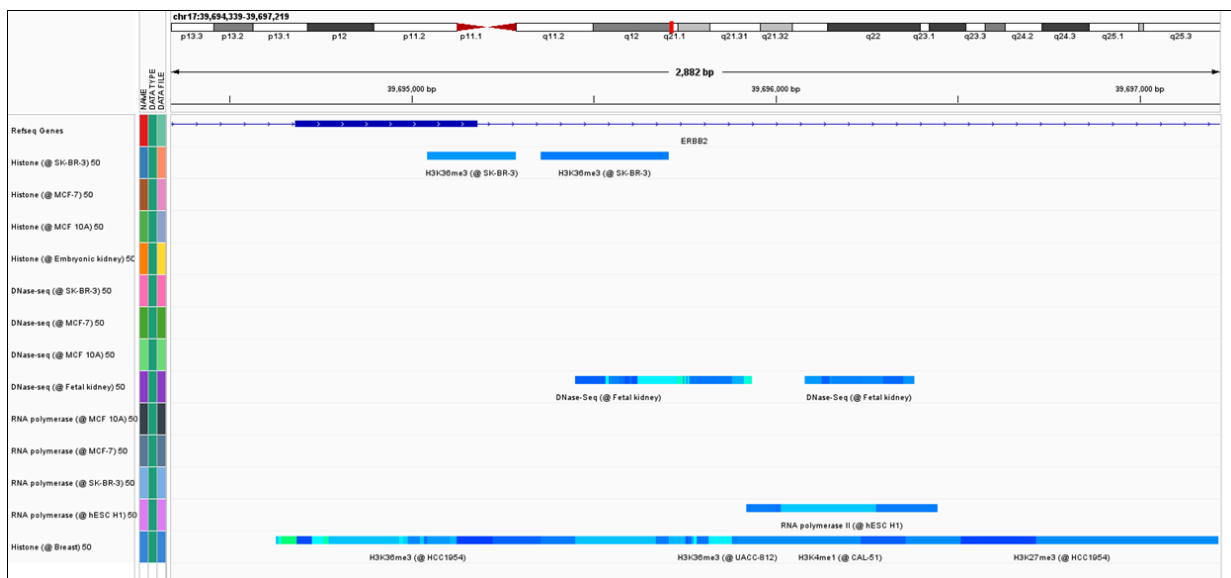
شکل ۲: نواحی کروماتین باز حساس به DNaseI و نشان‌های هیستونی (UCSC).



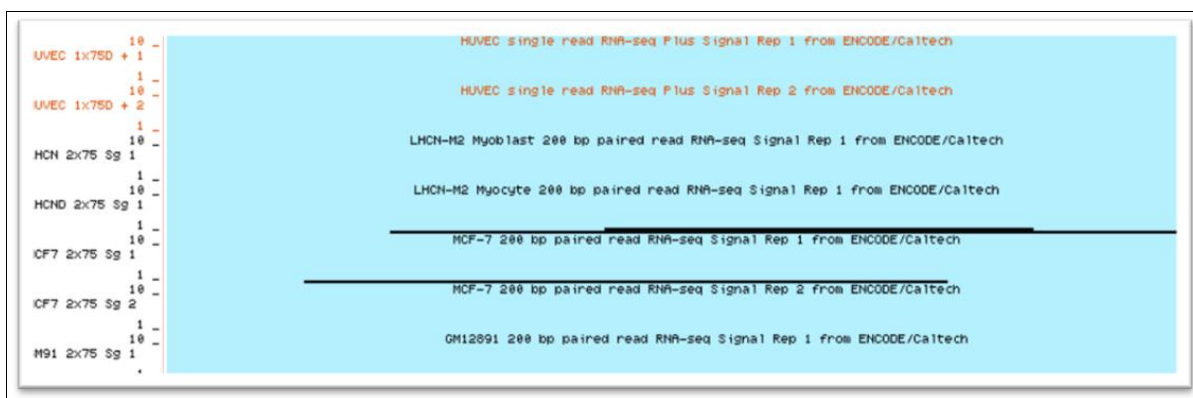
شکل ۳: نمودار heatmap برای ژنهای افتراقی (ژنهای دارای اختلاف بیان) در گروههای کنترل (con) و HER2+/HER2- (pos/neg) در رده های سلولی نرمال و سرطانی پستان. Log2FoldChange: log2FC. (<https://discover.nci.nih.gov/cimminer/oneMatrix.do>)



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 پروتئین‌ها 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=bGcHJrQDsNu&input_page_active_form=annot_proteome)



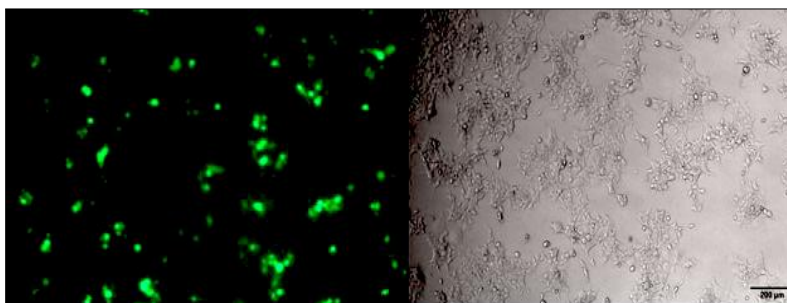
شکل ۵. پایگاه داده CHIP-Atlas نشان‌های هیستونی و مناطق حساس به DNaseI در رده های سلولی مختلف. همانطور که نمایش داده شده است نشان هیستونی H3K36me3 در رده SKBR3 و برخی رده های دیگر سرطان پستان وجود دارد. همچنین نشان هیستونی H3K4me1 نیز در بعضی از رده های پستان مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده فعال بودن این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



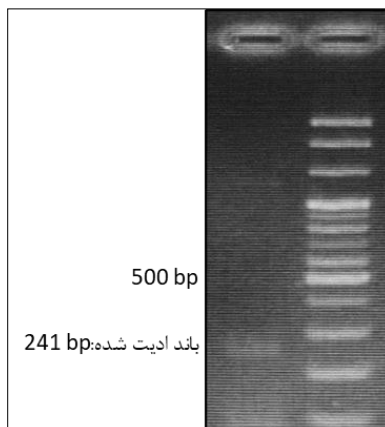
شکل ۶: بررسی خوانش‌ها (Reads) در برخی از رده‌های سلولی (UCSC). همانطور که نمایش داده شده است مناطقی از HER2-En1 در MCF7 دارای خوانش می‌باشند.



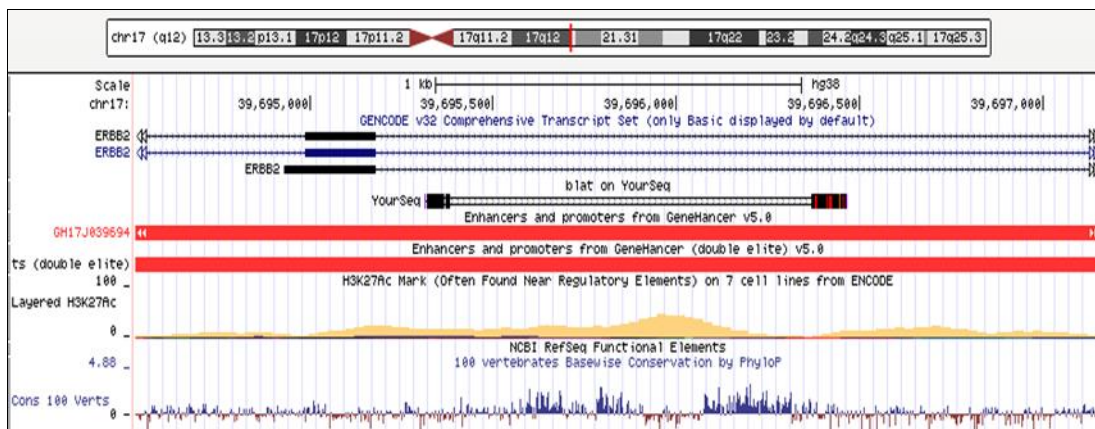
شکل ۷: تجزیه و تحلیل نمونه‌های سرطان پستان در پایگاه داده recount3 برای بررسی خوانش‌ها در ناحیه انهنسری HER2-En1 (GH17J039694). خوانش‌ها در ناحیه chr17:39694901-39694987 در تومورهایی که HER+ هستند بیشتر حضور دارند. (<https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga>)



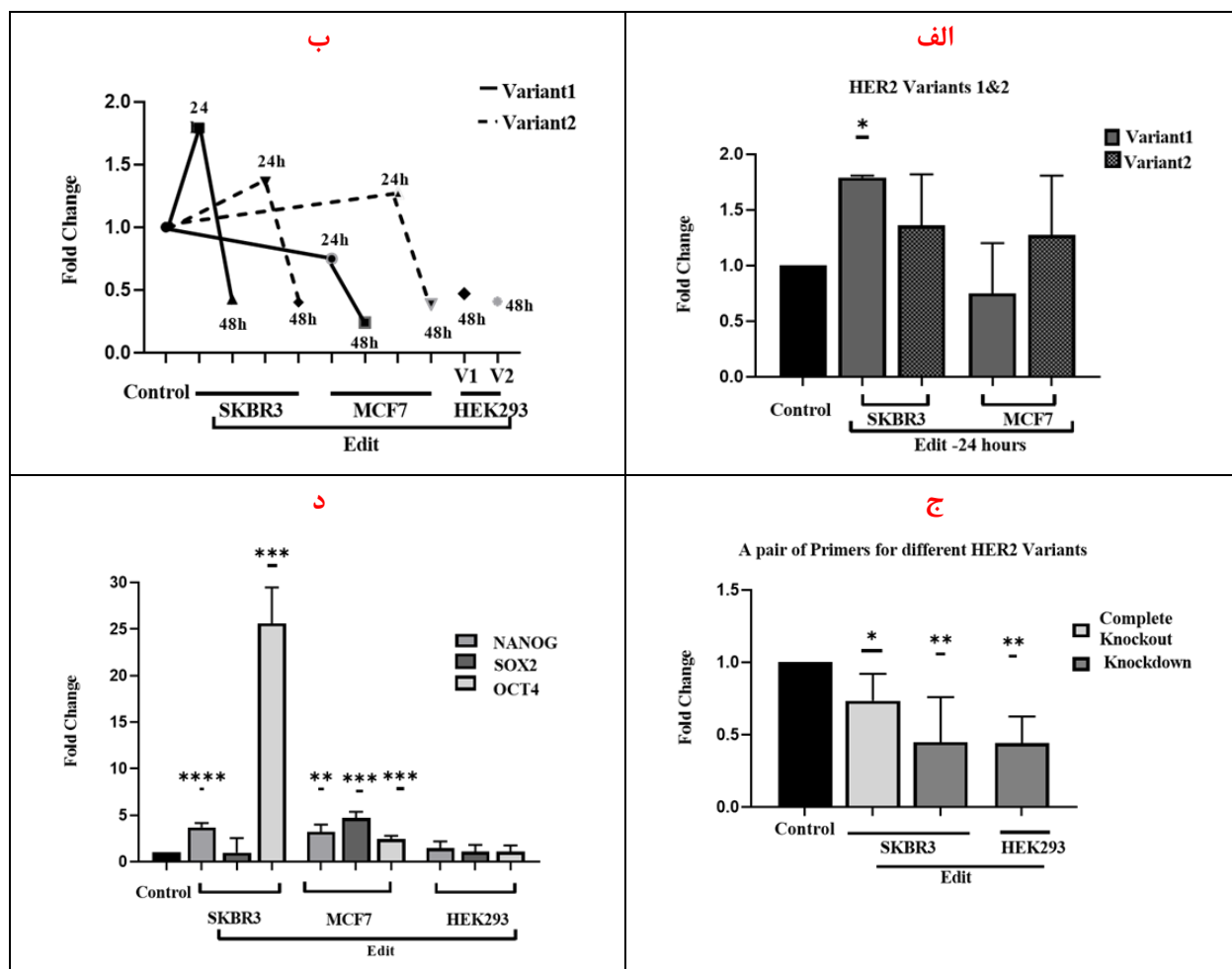
شکل ۸: ترنسفکشن سلول‌ها. در هر خانه از دیش‌های ۱۲ خانه به تعداد ۱۰۰ هزار سلول سید شد. ۱ میکروگرم از DNA وکتورها با ۲ میکرولیتر از تورپوفکتی که در ۱۰۰ میکرولیتر محیط بدون FBS و آنتی بیوتیک (OPTIMEM) حل شده بود به سلول‌ها تزریق گردید.



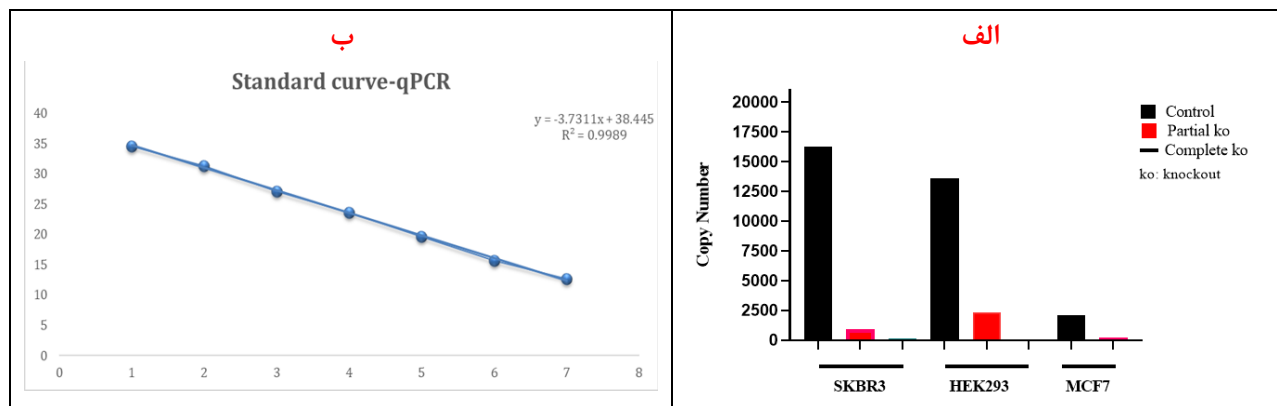
شکل ۹: PCR ادیت تست برای تایید ناک اوت/ حذف ناحیه HER2-En1 پس از استخراج DNA از محصول ویرایش و گذاشتن PCR با پرایمرهایی که دو طرف ناحیه حذف شده را در برمیگیرند، باند ویرایش شده با ۲۴۱ باز مشاهده شد.



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.



شکل ۱۱: نتیجه آنالیز رونوشت‌های HER2 و ژن‌های بنیادینگی در رده‌های 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 واریانتهای در رده‌های سلولی SKBR3 و HEK293 (در سازه‌های ناک اوت کامل و ناک داون) زمانی که جفت پرایمر بکار گرفته شده برای نقطه مشترکی از واریانتهای مختلف تعبیه شده است. بطور کلی کاهش بیان در واریانتهای مشاهده می‌گردد. د. نتیجه آنالیز ژن‌های مرتبط با سلولهای بنیادی *NANOG*، *SOX2* و *OCT4* 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 >



شکل ۱۲: سنجش تعداد کپی DNA سلول ها پس از ویرایش با رسم منحنی استاندارد (Standard Curve). الف. نمودار ستونی تعداد کپی ها که از فرمول $X(\text{copy}) = 38.45 - Y(\text{CT mean of samples})/3.731$ محاسبه می شود. ب. نمودار خطی منحنی استاندارد. نتایج نشان دهنده کاهش تعداد کپی ها بعد از حذف و ویرایش ژنتیکی می باشد.

جدول ۱: مطالعات بیوانفورماتیکی در پایگاه داده recount3. بررسی ها نشان دادند که خوانش ها 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

جدول ۲: لیست توالی پرایمرهای طراحی شده.

Gene Symbol	Sequences
Guide1: gRNA1 (HER2)	Sense: CACCGCACTTGTATCCTAACCATG Antisense: AAACCATGGTTAGGATACAAGTGC
Guide2: gRNA2 (HER2)	Sense: CACCGTCCC GG TGGGCGGTAGAGA Antisense: AAAC TCTCTACCGCCCACCGGGAC
Guide۳: gRNA۳ (HER2)	Sense: CACCGCAGGAGAATCACTCGAATCC Antisense: AAACGGATTTCGAGTGATTCTCTG
Guide۴: gRNA۴ (HER2)	Sense: CACCGCCCTGATCCTAACATCCCCGA Antisense: AAAC TCGGGATGTTAGGATCAGGGC
PX459	R: AGCCATTTGTCTGCAGAATTGG
Variant 1 HER2 Isoform a	F: GAGCCGCAGTGAGCACCAT R: AGCAGGTAGGTGAGTTCAG
Variant 2 HER2 Isoform b	F: AGAGGCGATAGGGTTAAGGG R: GTGGTGAACAGGACAGCAAA
Primers for different HER2 Variants	F: TTCACCCACCAGAGTGATGTG R: ACATTCAGAGTCAATCATCCAACATT
HER2 Primers (Deletion test)	F1: CATTCTGAGATGTGGGTAAGAG R1: TAACTGTAGGTCCCTCCCTCTAC F2: TAGCTGGATGTGGTGGTGCATG R2: GGTGGAGTTTGTACAGGTATC
U6 Promoter	F: GAGGGCCTATTCCCATGATT
Copy number primers	F: AAAC TCTCTACCGCCCACCGGGAC R: TAACTGTAGGTCCCTCCCTCTAC
GAPDH	F: TCACTGTTCTCTCCCTCCG R: CATTGATGGCAACAATATCC
OCT4 Variant 1	F: CAAGCCCTCATTTCACCAG R: AGCCAGGTCCGAGGATCAA
NANOG Variant 1	F: AATACCTCAGCCTCCAGCAGATG R: TGCGTCACACCATTGCTATTCTTC
SOX2 Variant 1	F: AAGACTAGGACTGAGAGAAAGAAGAG R: AAGAGAGAGAGGCCAAACTGGAATC