Archive of SID

بیان آنتی‌ژن نوترکیب گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال انسانی (HER-2) به عنوان واکسن شانگر علیه سرطان سینه و بررسی خصوصیات آن

سعیده فرومدی [۱](M.Sc)، معصومه رجبی بذل [۱*](Ph.D)، سید حسین حسینی [۱](M.Sc)، شیرین رجبی [۲](M.A)، سولماز شهیدی [۱](M.Sc)، اعظم دارایی [۱](B.Sc)، اتابک طوفانی میلانی [۱](M.Sc)

۱- گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: شایع‌ترین بدخیمی در زنان سرطان سینه است که امروزه از داروهای ایمونوتراپی در درمان سرطان رواج پیدا کرده است. در این روش آنتی‌بادی مونوکلونال علیه آنتی‌ژن سرطانی استفاده می‌شود که با قرار گرفتن روی آنتی‌ژن باعث عمل‌کرد آن می‌گردد. ثابت شده است که بیان بیش از حد فاکتور رشد اپیدرمال انسانی (HER-2) به عنوان یک فاکتور پیش‌آگهی‌دهنده و پیش‌بینی‌کننده در سرطان سینه با افزایش تهاجم و مرگ ناشی از سرطان سینه همراه است. هدف این پژوهش بیان آنتی‌ژن HER-2 با کیفیت عملکرد بالا در سیستم بیانی یوکاریوتی جهت استفاده از آن در مطالعات بعدی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: بیان بخشی از توالی گیرنده خارج سلولی HER-2 در وکتور pPICZα در میزبان پیکیا استوریس سویه X33 در محیط BMGY انجام شد. بیان پروتئین توسط SDS-PAGE و وسترن پروتئین بیان شده با تکنیک الایزا بررسی گردید.

یافته‌ها: بررسی بیان پروتئین Her-2 در روش SDS-PAGE 7% و وسترن بلات مارکر پروتئینی ۱۸۵ کیلودالتون نشان داد که بیان پروتئین پس از القا با IPTG افزایش یافته است. جهت ارزیابی خاصیت آنتی‌ژنی Her-2 بیان شده با آنتی‌بادی مونوکلونال هرسپتین از تست الایزا استفاده شد و نتایج نشان داد که آنتی‌ژن به دست آمده میزان ترکیبی الایزا با آنتی‌بادی هرسپتین دارد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه آنتی‌ژن Her-2 در سیستم بیانی مخمر تولید شد. با توجه به مزایای سیستم بیانی مخمر از جمله بیان ترشحی پروتئین، تاخوردگی پروتئین، گلیکوزیلاسیون و فعالیت پروتئین حاصل شده در pH گسترده آنتی‌ژن Her-2 بیان شده در مخمر از کیفیت و عملکرد مطلوبی برخوردار است و در مطالعات آتی می‌تواند مورد استفاده قرار خواهد گرفت.

واژه‌های کلیدی: سرطان سینه، HER-2، پیکیا استوریس

مقدمه

سرطان سینه، شایع‌ترین سرطان در زنان است و علت عمده مرگ به علت سرطان در زنان ۵۹-۲۰ ساله است [۱]. انتخاب درمان مناسب برای سرطان سینه نیازمند ارزیابی دقیق پیش‌آگهی و پیش‌بینی دقیق پاسخ به درمان است. متاسفانه بیومارکرهای اخیر سرطان سینه قابلیت برآورده ساختن هیچ‌کدام از این دو حالت را ندارند.

بیومارکرهای مختلفی در تشخیص، پیش‌آگهی و تاثیر

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۲۳۸۷۲۵۷۰

Email: rajabi_m@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۶/۶

www.SID.ir

Archive of SID

درمان جهت سرطان سینه شناخته شده است. از جمله رسپتورهای فاکتور رشد مثل فاکتور رشد اپیدرمی انسان (HER-2)، رسپتورهای فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR)، فاکتورهای رشد مشتق از پلاکت و خانواده فاکتورهای رشد شبه انسولینی می‌باشد [۲].(HER-2) به عنوان فاکتور پیش‌آگهی‌دهنده و پیش‌بینی‌کننده مهم در سرطان سینه مطرح می‌باشد. بیان بیش از حد این فاکتور باعث القای پرولیفراسیون، افزایش قابلیت تهاجم و متاستاز می‌گردد. حدود ۲۰٪ از بیماران، دارای تعداد بسیار زیادی گیرنده HER-2می‌باشد، این نوع سرطان که آن‌را HER-2 مثبت می‌نامند تمایل به گسترش سریع‌تری دارد.

HER-2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor type 2) به عنوان یک پروتوانکوژن شناخته شده است که در بازوی بلند کروموزوم ۱۷ انسانی (q12۱۷) قرار دارد. دلیل این نامگذاری به دلیل شباهت ساختاری به گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال انسانی (EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor) می‌باشد [۳].

گیرنده خانواده HER دارای چهار رسپتور ترانس ممبران تیروزین کیناز است شامل HER1 (ErbB1), HER2 (ErbB2) HER3 (ErbB3), و HER4 (ErbB4) می‌باشد [۴]. ساختار عمومی این رسپتورهای پروتئینی شامل دمین خارج سلولی با ۶۰۰ اسید آمینه که به شدت گلیکوزیله است که قابلیت ترشح به خون را نیز دارا می باشد [۵]. قطعه ترانس ممبران α-helix و یک دمین داخل سلولی با ۶۰۰ اسید آمینه است و یک انتهای c– ترمینال دارد که فعالیت کاتالیتیکی خاصی برای آن مشاهده نشده است [۶–۸]. دمین خارج سلولی به چهار ناحیه تقسیم می‌شود که مهم‌ترین آن دمین I که سایت اتصال لیگاند است، دمین II محل دایمریزه شدن می‌باشد که قابلیت ترشح به خون را نیز دارد، دمین III محل اتصالpertuzumab است و دمین IV سایت اتصال trastuzumabمی‌باشد [۹]. سه عامل لیگاند، رسپتور HER-2 و شریک دایمر شدن جهت شروع مسیر سیگنالینگ رسپتورهای HER-2 نیاز می‌باشد. لیگاندهای متصل شده به دمین I باعث القا تغییر کنفورماسیون می‌شوند که این عمل موجب در معرض قرار گرفتن دمین دایمریزه شونده می‌شود. دایمریزاسیون یک عمل حیاتی است و در نتیجه آن همو و یا هترو دایمریزاسیون رخ می‌دهد که رسپتورهای HER-2 نقش شریک در دایمر شدن را ایفا می‌کنند [۹].

فعال شدن نوع مسیر سیگنالینگ بسته به لیگاند و شریک دایمریزاسیون دارد [۱۰] همو دایمریزاسیون ضعیف‌ترین سیگنال را ایجاد می‌کند، در حالی که هترودایمریزاسیون به‌خصوص دایمر شدن Her-2 و Her-3 تولید سیگنال قوی‌تری برای فعال شدن مسیر PI3K/Akt می‌کند [۱۱]. دایمر شدن باعث فعال شدن خاصیت کینازی می‌شود و موجبdownstream شدن مسیرهای سیگنالینگی می‌گردد که اغلب موجب تکثیر و رشد تومورهای بدخیم می‌شود [۱۲].

هرسپتین (Trustuzumab) یک آنتی‌بادی منوکلونال انسانی شده علیه HER-2 می‌باشد که در سال ۱۹۹۸ توسط FDA برای استفاده در درمان سرطان‌های متاستاتیک سینه مورد تائید قرار گرفت [۱۳] این آنتی‌بادی با اتصال به دمین خارج سلولی گیرنده HER-2 آنرا بلاک کرده و مانع از شروع سیگنالینگ می‌شود. این آنتی‌بادی باعث بهبود پاسخ به درمان و کوتاه شدن دوره درمان می‌گردد. درمان با هرسپتین در مراحل ابتدایی سرطان سینه HER-2 مثبت موثر می‌باشد. استفاده هم‌زمان هرسپتین و شیمی‌درمانی استاندارد، در مراحل اولیه سرطان سینه HER-2 مثبت خطر عود و مرگ را کاهش می‌دهد، بنابراین نرخ بهبود بیماری و بقای بیمار افزایش می‌یابد [۱۴].

تست HER-2 در بیماران مبتلا به سرطان سینه برای ارزیابی پیش‌آگهی و تعیین مناسب بودن برای درمان با هرسپتین انجام می‌شود. این مهم است که هرسپتین به افراد HER-2 مثبت محدود شود، چون علاوه بر قیمت بالا سمیت قلبی نیز بهمراه دارد، برای تومورهای HER-2 منفی، خطرات ناشی از هرسپتین با مضرات بسیاری نسبت به فوائد آن برخوردار است [۱۵].

www.SID.ir

Archive of SID

یکی از روش‌های اندازه‌گیری بیان HER-2، بررسی مقدار دمین خارج سلولی HER-2 رها شده به خون از سطح سلول‌های توموری با استفاده از روش الایزا (ELISA) می‌باشد که یک روش کم‌تر تهاجمی نسبت به نمونه‌برداری بافتی است و در نتیجه به طور گسترده انجام می‌شود [۱۶].

در این پروژه پروتئین HER-2 در سیستم مخمری پیکیاپاستوریس سویه X33 حاوی وکتور بیانی pPiczalpha دارای مقاومت آنتی‌بیوتیک زئوسین و پروموتور AOX1 بیان گردید. سویه مخمری از طرف دکتر Avgi Mamalaki از انیستیتوپاستور یونان (آتن) اهدا گردیده است. پس از بررسی بیان و ویژگی‌های آنتی‌ژن نوترکیب، از این آنتی‌ژن در مطالعات بعدی جهت تولید منوکلونال آنتی‌بادی استفاده گردید.

پیکیاپاستوریس میکروارگانیسم تک‌سلولی است که به آسانی دست‌کاری شده و کشت داده می‌شود. این میکروارگانیسم یوکاریوتی قادر به انجام بسیاری از تغییرات پس از ترجمه از جمله توانایی ایجاد باندهای دی سولفیدی و گلیکوزیلاسیون در پروتئین تولیدی را دارا می‌باشد. بدین طریق تعداد زیادی از پروتئین‌ها که در سیستم‌های باکتریایی به صورت پروتئین‌های غیر فعال هستند، می‌توانند در پیکیاپاستوریس به صورت ملکول فعال بیولوژیکی تولید شوند. سیستم پیکیاپاستوریس، بیانی سریع‌تر آسان‌تر و با هزینه کم‌تری نسبت به سایر سیستم‌های بیانی دیگر مشتق شده از یوکاریوت‌های پیشرفته از جمله سلول‌های کشت سلولی پستانداران و حشرات، را دارا می‌باشد. این ویژگی‌ها، پیکیاپاستوریس را یک سیستم بیانی بسیار مفید و مؤثر ساخته است. از ویژگی‌های منحصر به‌فرد آن پروموتور مشتق شده از ژن الکل اکسیداز (AOXI) می‌باشد که جهت بیان کنترل شده‌ی ژن‌های بیگانه بسیار مناسب است [۱۷-۱۹]، هم‌چنین رشد آن در pH حدود ۳ تا ۷ بدون هر گونه تغییر مهم در رشد اختصاصی، انجام می‌گیرد. لازم به ذکر است این pH، تکثیر بسیاری از میکروارگانیسم‌ها را از بین می‌برد [۲۰].

مواد و روش‌ها

در ابتدای جهت بررسی صحت سویه مخمر حاوی دمین خارج سلولی آنتی‌ژن HER-2، تک کلونی از آن بر روی پلیتYPD-Agar حاوی آنتی‌بیوتیک زئوسین کشت داده شد و پس از آن به بیان پروتئین پرداخته شد.

بیان آنتی‌ژن HER-2 در محیط BMGY انجام شد. بدین صورت که به ۲۵ ml از محیط BMGY

(yeast extract 10gr/ peptone 20gr/ potassium phosphate 1M 100ml/ YNB 10X 100ml/ Biotin 0.02% 2ml/ Glycerol 10% 100ml) حاوی آنتی‌بیوتیک زئوسین تک کلونی از مخمر حاوی آنتی‌ژن HER-2 القا گردید و به مدت ۱۶ h در دمای ۲۸-۳۰ °C و ۲۰۰ rpm انکوبه شد، پس از رسیدن به OD600=۲-۶ حجم محیط به ۱۰۰ ml افزایش یافت و به مدت سه روز و در هر روز مقدار ۱ ml متانول مطلق جهت فعال شدن پروموتر الکل اکسیداز به محیط اضافه گردید و محیط از نظر pH و آلودگی باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت [۲۱]. از آن‌جا که پروتئین HER-2 نوعی پروتئین ترشحی است کافی است جهت به‌دست آوردن آن، محیط کشت تغلیظ گردد. لذا جهت جداسازی آن از محیط کشت، محیط کشت در دور ۳۰۰۰ rpm و به مدت ۱۰ min در دمای ۴ °C سانتریفیوژ شد. جهت حذف سایر مواد از کیسه دیالیز با ۱۲۰۰۰cut off و محلول (Buffer Saline PBS1X (Phosphate استفاده گردید و محلول حاوی پروتئین به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ °C دیالیز گردید. جهت بررسی بیان از ژل SDS-PAGE ۷٪ و جهت تعیین غلظت پروتئین تخلیص شده از تست برادفورد استفاده شد. محلول برادفورد در pH اسیدی قهوه‌ای رنگ بوده و به اسیدهای آمینه موجود در پروتئین مثل آرژنین و هیستیدین و لیزین متصل می‌گردد. اتصال معرف به پروتئین موجب تغییر رنگ معرف به آبی روشن شده که در طول موج ۵۹۵ نانومتر بیش‌ترین جذب را دارد.

جهت بررسی کیفیت آنتی‌ژن بیان شده از تکنیک الایزا استفاده شد که در آن از آنتی‌بادی منوکلونال تجاری هرسپتین علیه HER-2 استفاده گردید. همان‌طور که در بالا توضیح داده شد هرسپتین جهت درمان سرطان سینه HER-2 مثبت استفاده

www.SID.ir

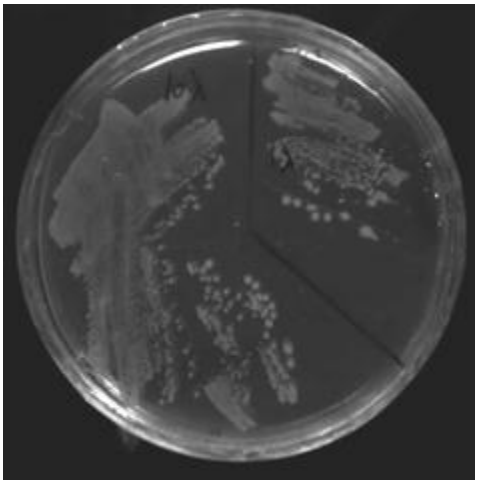
Archive of SID

می‌گردد و تمایل بالایی به دمین خارج سلولی HER-2 دارد و انتظار داریم در صورت بیان درست آنتی‌ژن HER-2 با فولدینگ مناسب، هرسپتین به این آنتی‌ژن با تمایل بالایی متصل گردد.

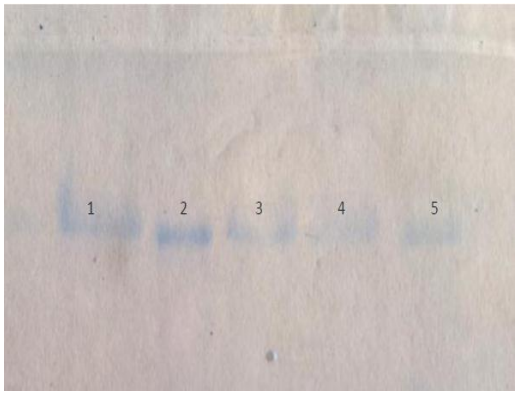
الایزا بدین صورت انجام پذیرفت که مقدار ۱۰۰ µl از آنتی‌ژن HER-2 و BSA (Bovine Serum Albumin) به عنوان Non-specific binding (NSB) به غلظت ۱۰µg/µl، با استفاده از PBS تهیه در چاهک‌های پلیت الایزا به مدت یک شب در دمای ۴ °C انکوبه شد. روز بعد و بعد از شستشو با TBS، عمل بلاکینگ توسط ۳٪ PBS+BSA به مدت ۹۰ min انجام شد، پس از طی این مدت و بعد از شستشو مجدد غلظت و حجمی مساوی با مقدار آنتی‌ژن انکوبه شده از هرسپتین تهیه و به چاهک‌های فوق اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه شد. بعد از شستشو مجدد مقدار ۱۰۰ µl از آنتی‌بادی ثانویه Anti human کونژوگه با HRP به رقت ۱/۵۰۰ به آن افزوده گردید و انکوباسیون به مدت یک ساعت انجام شد و در پایان پس از شستشو و افزودن سوبسترا TMB (ترا متیل بنزیدین) زمان تغییر رنگ را بررسی و واکنش با Hcl 1M متوقف گردید و جذب در طول موج ۴۵۰ nm توسط دستگاه الایزا ریدر قرائت شد [۲۲].

نتایج

رشد مخمر روی پلیت حاوی زئوسین بررسی گردید (شکل ۱). محصول بیان ژن HER-2 بر روی ژل SDS-PAGE ۷٪ بررسی شد و نمونه قبل و بعد از القا با یک‌دیگر مقایسه گردید. با توجه به این‌که پروتئین HER-2 دارای وزن ۱۸۰ کیلودالتون می‌باشد جهت کنترل از مارکر پروتئینی با وزن ۱۸۵ کیلو دالتون استفاده شد، مشاهده گردید نمونه بعد از القا ۳ روزه نسبت به نمونه قبل القا از شدت رنگ بیش‌تری برخوردار است و در مقایسه با مارکر در جای مناسبی قرار گرفته است و بیان پروتئین تائید گردید (شکل۲). غلظت پروتئین بیان شده با استفاده از تست برادفورد سنجیده شد و با استفاده از نرم‌افزار Excel نمودار و معادله مربوطه به‌دست آمد و با قرار دادن جذب به‌دست آمده از نمونه مجهول در معادله غلظت، غلظت پروتئین بیان شده ۱/۰۲۲ mg/ml محاسبه گردید (شکل۳).



شکل ۱. مخمر کشت داده شده روی پلیت YPD-Agar حاوی آنتی بیوتیک زئوسین جهت تائید کلونینگ آنتی‌ژن HER-2 در مخمر پیکیاپاستوریس.



شکل۲. تصویر ژل SDS-PAGE 7% جهت بررسی بیان HER-2 :۱- مارکر پروتئینی با وزن مولکولی ۱۸۵کیلو دالتون، ۲-نمونه بیان بعد از القا سه روزه با متانول خالص ۳ و۴- نمونه بیان در روزهای اول و دوم ۵- نمونه قبل القا. همانطور که مشاهده میشود باند بیان روز سوم(شماره ۲) نسبت به روزهای دیگر و نمونه قبل القا از شدن رنگ بیشتری برخوردار است. پروتئین HER-2 دارای وزن ۱۸۰ کیلو دالتون می باشد که در مقایسه با مارکر در جای درستی قرار گرفته است. نتایج بیان درست آنتی ژن HER-2 را تائید می کند.

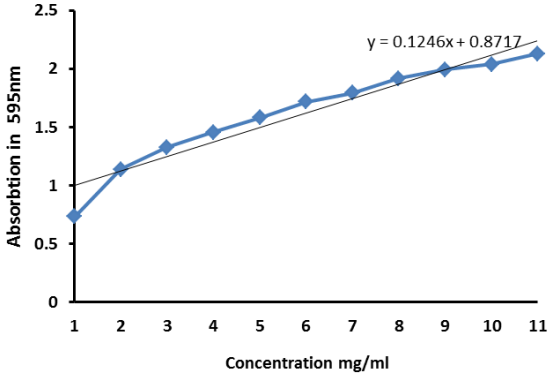
صحت پروتئین بیان شده با تست الایزا بررسی گردید که در آن علیه آنتی‌ژن HER-2 بیان شده از آنتی‌بادی منوکلونال هرسپتین (مورد استفاده در درمان سرطان سینه) استفاده گردید (شکل۴)، همان‌طور که مشاهده می‌شود تمایل آنتی‌ژن HER-2 استخراج شده به هرسپتین بیش از ۲/۵ برابر نسبت به BSA

www.SID.ir

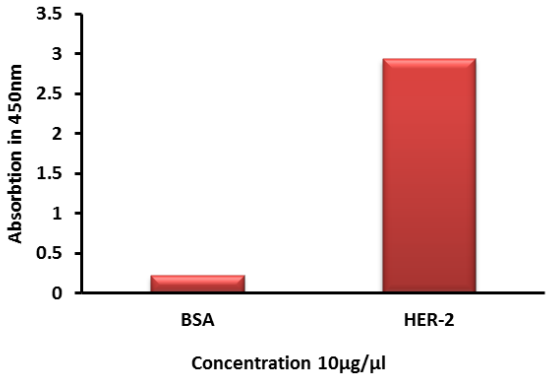
Archive of SID

به عنوان NSB می‌باشد که این خود دلیلی بر کارآیی بالای سیستم بیانی مخمر و دقت و صحت کار انجام شده می‌باشد.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	sampe–l
جذب	0.733	1.136	1.327	1.455	1.58	1.715	1.792	1.918	1.993	2.036	2.127	0.999



شکل۳. نتایج تست براد فورد و منحنی و معادله بدست آمده از نرم افزار Excel جهت تعیین غلظت پروتئین نوترکیب بیان شده HER-2. با قرار دادن جذب نمونه مجهول در معادله بدست آمده، غلظت نمونه مجهول 1.022mg/ml محاسبه گردید.



شکل۴. نتایج حاصل از الایزای تمایل آنتی ژن HER-2 به Herceptin در مقایسه با BSA بعنوان NSB. منوکلونال آنتی بادی تجاری هرسپتین تمایل بالایی به دمین خارج سلولی HER-2 دارد، انتظار می رود در صورت بیان درست آنتی ژن HER-2 و داشتن فولدینگ مناسب، هرسپتین به این آنتی ژن با تمایل بالایی متصل گردد. همانطور که مشاهده می شود هرسپتین تمایل بالایی به پروتئین نوترکیب بیان شده HER-2 دارد که تائیدی بر بیان درست آن می باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

HER-2 نقش مهمی در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک دارد. گزارش‌ها حاکی از نقش HER-2 در انواع مختلف سرطان‌ها می‌باشد [۹]. مطالعات روی رده‌های سلول‌های سرطانی انسانی نشان داده است که بیان HER-2 ممکن است تقویت شده و غلظت محصول ژن آن افزایش یابد [۲۳]. با اتصال آنتی‌بادی به دمین خارج سلولی و یا از طریق مهار کردن فعالیت تیروزین کینازی توسط مولکول‌هایی می‌توان آن‌ها را مهار نمود [۲۴].

افزایش بیان HER-2 ابتدا در سرطان سینه انسانی مشاهده شد و بعد از آن در سرطان تخمدان و سایر انواع سرطان‌ها دیده شده است [۲۵]. افزایش بیان HER-2 بین ضایعات سینه و متاستاز در غدد لنفاوی و همچنین مغز استخوان به شدت حفاظت شده می‌باشد [۲۶] و در سرتاسر طول درمان باقی می‌ماند [۲۷] بنابراین ارزیابی دقیق سطح بیان HER-2 برای شناسایی مبتلایان به سرطان سینه و بهره‌مندی از درمان HER-2 مفید خواهد بود.

در طول دو دهه گذشته سیستم‌های بیانی مخمر برای تولید انواع پروتئین‌های نوترکیب استفاده شده است. در دسترس بودن سیستم‌های بیانی مخمر و عدم وجود آلودگی‌های اندوتوکسین سبب گردیده که مخمر به‌عنوان یکی از رایج‌ترین سیستم‌های بیانی برای تولید پروتئین نوترکیب به‌کار رود. در میان انواع مخمرها، مخمر پیکیاپاستوریس بسیار مورد استفاده قرار گرفته به‌طوری که از سال ۱۹۸۴ تا کنون بیش از ۳۰۰ پروتئین در آن بیان شده است [۲۸]. هم‌چنین در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۰ در دانشگاه تربیت مدرس تهران توسط شیخ‌الاسلامی و همکارانش روی بیان آنتی‌ژن HER-2 در سیستم مخمر پیکیاپاستوریس انجام شد، نشان داد که این مخمر قابلیت مناسبی برای تولید پروتئین دارد [۲۱]. با وجود کارایی مناسب و مطلوب سیستم مخمر در بیان پروتئین و فولدینگ مطلوب، مطالعات دیگری وجود دارد که نشان می‌دهد پس از درمان پروتئین بیان شده با α-mannosidase، واکنش آنتی‌بادی منوکلونال هرسپتین به‌طور قابل توجهی

www.SID.ir

Archive of SID

افزایش یافته است. این پدیده به علت گلیکوزیلاسیون از طریق مانوز است که در HER-2 اتفاق می‌افتد که بیش از اپی‌توپهای آنتی‌ژن است که توسط هرسپتین شناخته می‌شود [۲۹].

هدف ما در این پروژه بیان آنتی‌ژن با کیفیت و عمل‌کرد بالا و استفاده از آن جهت مطالعات بعدی و تولید آنتی‌بادی علیه آن می‌باشد. با توجه به یافته‌های گزارش شده سیستم بیانی پیکیاپاستوریس توانایی بیان این آنتی‌ژن را دارا می‌باشد. هم‌چنین با مقایسه نتایج به‌دست آمده از این مطالعه و مطالعه شیخ‌الاسلامی مشخص گردید بیان پروتئین از کیفیت بالاتری برخوردار می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از آقای دکتر Avgi Mamalaki در انیستیتو پاستور یونان که با در اختیار قرار دادن سویه مخمری پیکیاپاستوریس سویه X33 حاوی وکتور بیانی pPiczalpha، در انجام این پروژه کمک شایان توجه‌ای داشتند تشکر و قدردانی می‌گردد. این مقاله برگرفته از بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به شماره۴۵۳ می باشد.

منابع

[1] Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. Cancer J Clin 2008; 58: 71-96.

[2] von Minckwitz G, Du Bois A, Schmidt M, Maass N, Cufer T, de Jongh FE, et al. Trastuzumab beyond progression in human epidermal growth factor receptor 2–positive advanced breast cancer: A German Breast Group 26/Breast International Group 03-05 study. J Clin Oncol 2009; 27: 1999-2006.

[3] Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. Science 1985; 230: 1132-1139.

[4] Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, Linette GP, Stec J, Symmans WF, et al. Targeted therapy in breast cancer the HER-2/neu gene and protein. Mol Cell Proteomics 2004; 3: 379-398.

[5] Brandt-Rauf PW, Pincus MR, Carney WP. The c-erbB-2 protein in oncogenesis: molecular structure to molecular epidemiology. CRO 1994; 5.

[6] Ferguson KM, Darling PJ, Mohan MJ, Macatee TL, Lemmon MA. Extracellular domains drive homo-but not hetero-dimerization of erbB receptors. EMBO 2000; 19: 4632-4643.

[7] Mitsudomi T, Yatabe Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. FEBS 2010; 277: 301-308.

[8] Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. EMBO 2000; 19: 3159-3167.

[9] Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. Nat Rev Mol Cell Biol 2001; 2: 127-137.

[10] Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney DW, et al. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. Nature 2003; 421: 756-760.

[11] Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunagaran D, Lavi S, et al. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. Mol Cell Biol 1996; 16: 5276-5287.

[12] Mishani E, Hagooly A. Strategies for molecular imaging of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase in cancer. J Nucl Med 2009; 50: 1199-1202.

[13] Press MF, Slamon DJ, Flom KJ, Park J, Zhou J-Y, Bernstein L. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression: comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens. J Clin Oncol 2002; 20: 3095-3105.

[14] Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer Jr CE, Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. N Engl J Med 2005; 353: 1673-1684.

[15] Telli ML, Hunt SA, Carlson RW, Guardino AE. Trastuzumab-related cardiotoxicity: calling into question the concept of reversibility. J Clin Oncol 2007; 25: 3525-3533.

[16] Ali SM, Carney WP, Esteva FJ, Fornier M, Harris L, Köstler W, et al. Serum HER-2/neu and relative resistance to trastuzumab-based therapy in patients with metastatic breast cancer. Cancer 2008; 113: 1294-1301.

[17] Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR. Recombinant protein expression in Pichia pastoris. Mol Biotechnol 2000; 16: 23-52.

[18] Yousefian S, Ranaei siadat O, Dehnavi E, Borjian Burojeni M, Nikzad jamnani F. Secretive expression of bacterial β-xylosidase gene including hexahistidin-tag in Pichia pastoris. Koomesh 2013; 14: 389-395.

[19] Akbari Eidgahi MR, Nasr R, Shaebani AA, Moghbeli M. Isolation and cloning of the β subunit of human follicle stimulating Hormone (hFSHβ) with its native gene's signal sequence in methylotroph yeast Pichia pastoris pPIC9 shuttle vector. Koomesh 2006; 8: 11-18.

[20] Cregg JM, Tolstorukov I, Kusari A, Sunga J, Madden K, Chappell T. Expression in the yeast Pichia pastoris. Methods Enzymol 2009; 463: 169-189.

[21] Sheikholeslami F, Rasaee MJ, Shokrgozar MA, Dizaji MM, Rahbarizadeh F, Ahmadvande D. Isolation of a novel nanobody against HER-2/neu using phage displays technology. Lab Med 2010; 41: 69-76.

[22] Sohi AN, Rajabibazl M, Rasaee M, Omidfar K. The use of camel antibodies in development of EGFRvIII enzyme-linked immunosorbent assay. Appl Biochem Microbiol 2015; 51: 374-380.

[23] Kraus MH, Popescu N, Amsbaugh S, King CR. Overexpression of the EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms. EMBO 1987; 6: 605.

[24] Corso S, Ghiso E, Cepero V, Sierra JR, Migliore C, Bertotti A, et al. Activation of HER family members in

www.SID.ir

Archive of SID

gastric carcinoma cells mediates resistance to MET inhibition. Mol Cancer 2010; 9.

[25] Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science 1989; 244: 707-712.

[26] Tuefferd M, Couturier J, Penault-Llorca F, Vincent-Salomon A, Broët P, Guastalla J-P, et al. HER2 status in ovarian carcinomas: a multicenter GINECO study of 320 patients. PloS One 2007; 2: e1138.

[27] Wilking U, Karlsson E, Skoog L, Hatschek T, Lidbrink E, Elmberger G, et al. HER2 status in a population-derived breast cancer cohort: discordances during tumor progression. Breast Cancer Res Treat 2011; 125: 553-561.

[28] Boettner M, Prinz B, Holz C, Stahl U, Lang C. High-throughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast Pichia pastoris. J Biotechnol 2002; 99: 51-62.

[29] Vlahopoulos S, Gritzapis AD, Perez SA, Cacoullos N, Papamichail M, Baxevanis CN. Mannose addition by yeast Pichia Pastoris on recombinant HER-2 protein inhibits recognition by the monoclonal antibody herceptin. Vaccine 2009; 27: 4704-4708.

www.SID.ir

Archive of SID

Expression and characterization of recombinant human epidermal growth factor receptor antigene (HER-2) as an indicator of breast cancer in yeast fermented systems

Saeideh Foroumadi (M.Sc)[1], Masoumeh Rajabibazl (Ph.D)[*1], Seyed Hossein Hosseini (M.Sc)[1], Shirin Rajabi (M.A.)[2],Solmaz Shahidi (M.Sc)[1], Azam Daraei (B.Sc)[1], Attabak Toofani Milani (M.Sc)[1]

1 - Dept of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2 - University of Tehran

(Received: 21 Dec 2015; Accepted: 27 Aug 2016)

Introduction*:* Immunotherapy has been practiced for more than two decades in the treatment of cancer. In this method, monoclonal antibodies bind to tumor specific antigens and inhibit their function. Therefore, scientists are looking for special targets on cancer cells that can be differentiate cancer cells from normal cells. In some cancers, including breast cancer human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2) is significantly higher than the normal level. The goal for this project was to obtain expression with high quality of HER-2 with high activity in yeast expression system and its use in future studies.

Materials and Methods*:* In order to express the extracellular domain of the HER-2 receptor we have used pPICZα and *Pichia pastoris wild type X33* as a sequence vector and host cell respectively. Expression of HER-2 was analyzed using Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis 7% and accuracy of expression was confirmed by ELISA.

Results: The expression of Her-2 antigen was evaluated by 7% SDS-PAGE with 185 KDa protein ladder. The results indicated that the expression of Her-2 antigen has been increased by IPTG induction. Moreover, the activity of Her-2 antigen was studied by ELISA technique using commercial anti Her-2 monoclonal antibody (Herceptin) and Her-2 antigen has shown high affinity to Herceptin.

Conclusion: In this study, we have produced the Her-2 antigen in yeast expression system. With regards to yeast expression system advantages including secretory expression, protein folding, protein glycosylation, and activity of expressed protein in a wide range of pH, the Her-2 antigen which expressed in yeast host has great quality and will be used in future studies

Keywords*:* Brest Cancer, HER-2, *Pichia pastoris*

* Corresponding author. Tel: ++98 21 23872570

rajabi_m@sbmu.ac.ir

www.SID.ir