

بیان آنتی ژن نو ترکیب گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال انسانی (HER-2) به عنوان یک نشانگر سرطان سینه در سیستم مخمری 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

سابقه و هدف: بیش از دو دهه است که استفاده از داروهای ایمونوتراپی در درمان سرطان رواج پیدا کرده است. در این روش آنتی بادی منوکلونال علیه آنتی ژن سرطانی استفاده می شود که با قرار گرفتن روی آنتی ژن مانع عمل کردن آن می گردد. نشان داده شده است که بیان بیش از حد فاکتور رشد اپیدرمال انسانی (HER-2) به عنوان یک فاکتور پیش آگهی دهنده و پیش بینی کننده مهم در سرطان سینه، با افزایش خطر عود و مرگ ناشی از سرطان سینه همراه است. هدف این پروژه بیان آنتی ژن HER-2 با کیفیت و عمل کرد بالا در سیستم بیانی یوکاریوتی مخمر و استفاده از آن در مطالعات بعدی می باشد.

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

یافته ها: بررسی بیان پروتئین Her-2 بر روی ژل 7% SDS-PAGE به همراه مارکر پروتئینی ۱۸۶ کیلودالتون نشان داد که بیان پروتئین مورد نظر پس از القا با IPTG افزایش یافته است. جهت ارزیابی واکنش آنتی ژن Her-2 بیان شده با آنتی بادی منوکلونال هرسپتین از تست الایزا استفاده شد و نتایج نشان داد که آنتی ژن به دست آمده میل ترکیبی بالایی نسبت به آنتی بادی هرسپتین دارد.

نتیجه گیری: در این مطالعه آنتی ژن Her-2 در سیستم بیانی مخمر تولید شد. با توجه به مزایای سیستم بیانی مخمر از جمله بیان ترشحی پروتئین، تا خوردگی مناسب پروتئین، گلیکوزیلاسیون و فعالیت پروتئین حاصل شده در بازه گسترده pH، آنتی ژن Her-2 بیان شده در مخمر از کیفیت و عملکرد مطلوبی برخوردار بوده و در مطالعات آتی مورد استفاده قرار خواهد گرفت.

واژه های کلیدی: سرطان سینه، HER-2، پیکیاپاستوریس

مقدمه

سرطان سینه، شایع ترین سرطان در زنان است و علت عمده مرگ به علت سرطان در زنان ۲۰-۵۹ ساله است [۱]. انتخاب درمان مناسب برای سرطان سینه نیازمند ارزیابی دقیق

پیش آگهی و پیش بینی دقیق پاسخ به درمان است. متأسفانه بیومارکرهای اخیر سرطان سینه قابلیت برآورده ساختن هیچ کدام از این دو حالت را ندارند.

بیومارکرهای مختلفی در تشخیص، پیش آگهی و تاثیر

دمین I باعث القا تغییر کنفورماسیون می‌شوند که این عمل موجب در معرض قرار گرفتن دمین دایمیریزه شونده می‌شود. دایمیریزاسیون یک عمل حیاتی است و در نتیجه آن همو و یا هترو دایمیریزاسیون 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 دایمیریزاسیون دارد [۱۰] همو دایمیریزاسیون ضعیف‌ترین سیگنال را ایجاد می‌کند، در حالی که هترو دایمیریزاسیون به خصوص 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 موجب downstream شدن مسیرهای سیگنالینگ می‌گردد که اغلب موجب تکثیر و رشد تومورهای بدخیم می‌شود [۱۲].

هرسپتین (Trastuzumab) یک آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی شده علیه HER-2 می‌باشد که در سال ۱۹۹۸ توسط FDA برای استفاده در درمان سرطان‌های متاستاتیک سینه مورد تأیید 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 به همراه دارد، برای تومورهای HER-2 منفی، خطرات ناشی از هرسپتین با مضرات بسیاری نسبت به فواید آن برخوردار است [۱۵].

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 پیش‌آگهی دهنده و پیش‌بینی‌کننده مهم در سرطان سینه مطرح می‌باشد. بیان بیش از حد این فاکتور باعث القای پروليفراسیون، افزایش قابلیت تهاجم و متاستاز می‌گردد. حدود ۲۰٪ از بیماران، دارای تعداد بسیار زیادی گیرنده HER-2 می‌باشد، 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 پروتئین کوژن 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 می‌باشد [۵]. قطعه ترانس ممبران α -helix 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 دایمیریزه شدن می‌باشد که قابلیت ترشح به خون را نیز دارد، دمین III محل اتصال pertuzumab است و دمین IV سایت اتصال trastuzumab می‌باشد [۹]. سه عامل لیگاند، رسپتور HER-2 و شریک دایمر شدن جهت شروع مسیر سیگنالینگ رسپتورهای HER-2 نیاز می‌باشد. لیگاندهای متصل شده به

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

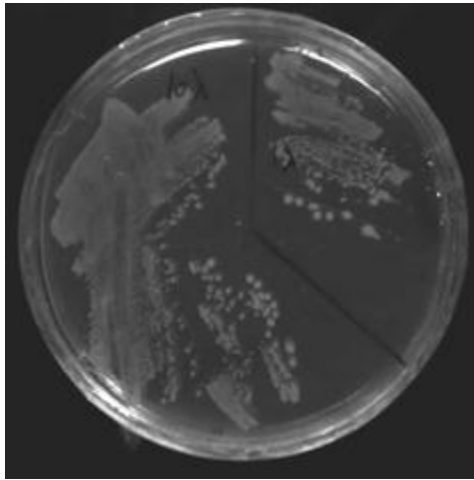
بیان آنتی ژن HER-2 در محیط BMGY انجام شد. بدین صورت که به ۲۵ ml از محیط BMGY (yeast extract 10gr/ peptone 20gr/ potassium phosphate 1M 100ml/ YNB 10X 100ml/ Biotin 0.02% 2ml/ Glycerol 10% 100ml) زئوسین تک کلونی از مخمر حاوی آنتی ژن HER-2 القا گردید و به مدت ۱۶ h در دمای ۲۸-۳۰ °C و ۲۰۰ rpm انکوبه شد، پس از رسیدن به ۲-۶ OD600= حجم محیط به ۱۰۰ ml افزایش یافت و به مدت سه روز و در هر روز مقدار ۱ ml متانول مطلق جهت فعال شدن پروموتور 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 به دست 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 cut off ۱۲۰۰۰ و محلول (Buffer Saline Phosphate) PBS1X 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 آنتی ژن بیان شده از تکنیک الایزا استفاده شد که در آن از آنتی بادی منوکلونال تجاری هرسپتین علیه HER-2 استفاده گردید. همان‌طور که در بالا توضیح داده شد هرسپتین جهت درمان سرطان سینه HER-2 مثبت استفاده

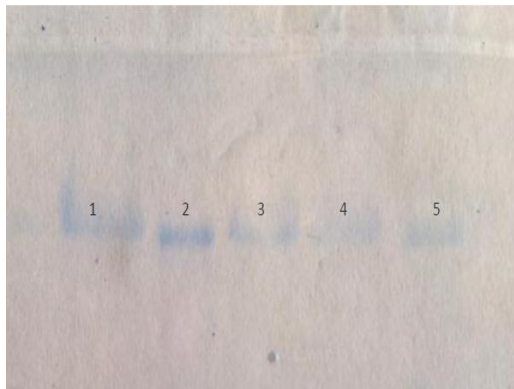
یکی از روش‌های اندازه‌گیری بیان HER-2، بررسی مقدار دمین خارج سلولی HER-2 رها شده به خون از سطح سلول‌های توموری با استفاده از روش الایزا (ELISA) می‌باشد که یک روش کم‌تر تهاجمی نسبت به نمونه‌برداری بافتی است و در نتیجه به طور گسترده انجام می‌شود [۱۶].

در این پروژه پروتئین HER-2 در سیستم مخمری پیکیاپاستوریس سویه X33 حاوی وکتور بیانی pPicZalpha دارای مقاومت آنتی بیوتیک زئوسین و پروموتور AOX1 بیان گردید. سویه مخمری از طرف دکتر Avgi Mamalaki از انیستیتو پاستور یونان (آتن) اهدا گردیده است. پس از بررسی بیان و ویژگی‌های آنتی ژن نو ترکیب، از این آنتی ژن در مطالعات بعدی جهت تولید منوکلونال آنتی بادی استفاده گردید. پیکیاپاستوریس میکروارگانسیم تک سلولی است که به آسانی دست‌کاری شده و کشت داده می‌شود. این میکروارگانسیم 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 به فرد 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 میکروارگانسیم‌ها را از بین می‌برد [۲۰].

و با قرار دادن جذب به دست آمده از نمونه مجهول در معادله غلظت، غلظت پروتئین بیان شده $1/0.22 \text{ mg/ml}$ محاسبه گردید (شکل ۳).



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



شکل ۲. تصویر ژل 7% SDS-PAGE جهت بررسی بیان HER-2: ۱- مارکر پروتئینی با وزن مولکولی ۱۸۵ کیلو دالتون، ۲- نمونه بیان بعد از القا سه روزه با متانول خالص ۳ و ۴- 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 تأیید 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 (شکل ۴)، همان‌طور که مشاهده می‌شود تمایل آنتی‌ژن HER-2 استخراج شده به هرسپتین بیش از $2/5$ برابر نسبت به BSA

می‌گردد و تمایل بالایی به دمن 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 $100 \mu\text{l}$ از آنتی‌ژن HER-2 و BSA (Bovine Serum Albumin) به عنوان Non-specific binding (NSB) به غلظت $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ، با استفاده از PBS تهیه در چاهک‌های پلیت الایزا به مدت یک شب در دمای 4°C انکوبه شد. روز بعد و بعد از شستشو با TBS، عمل بلاکینگ توسط $3\% \text{ PBS+BSA}$ به مدت 90 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 37°C انکوبه شد. بعد از شستشو مجدد مقدار $100 \mu\text{l}$ از آنتی‌بادی ثانویه Anti human کونزوگه با HRP به رقت $1/500$ به آن افزوده گردید و انکوباسیون به مدت یک ساعت انجام شد و در پایان پس از شستشو افزودن سوبسترا TMB (تترا متیل بنزیدین) زمان تغییر رنگ را بررسی و واکنش با 1M HCl متوقف گردید و جذب در طول موج 450 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 بررسی شد و نمونه قبل و بعد از القا با یکدیگر مقایسه گردید. با توجه به این‌که پروتئین HER-2 دارای وزن 180 کیلودالتون می‌باشد جهت کنترل از مارکر پروتئینی با وزن 185 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 تأیید گردید (شکل ۲). غلظت پروتئین بیان شده با استفاده از تست برادفورد سنجیده شد و با استفاده از نرم‌افزار Excel نمودار و معادله مربوطه به دست آمد

بحث و نتیجه گیری

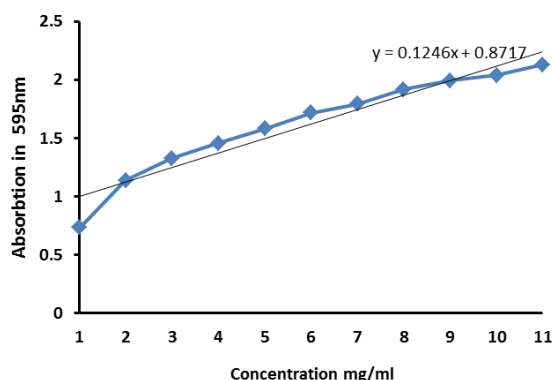
HER-2 نقش مهمی در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک دارد. گزارش‌ها حاکی از نقش HER-2 در انواع مختلف سرطان‌ها می‌باشد [۹]. مطالعات روی رده‌های سلول‌های سرطانی انسانی نشان داده است که بیان HER-2 ممکن است تقویت شده و غلظت محصول ژن آن افزایش یابد [۲۳]. با اتصال آنتی‌بادی به دمین خارج سلولی و یا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

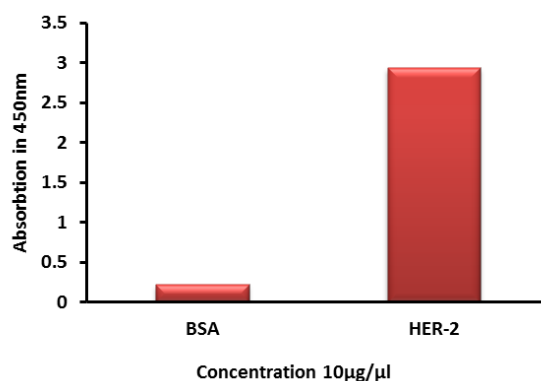
در طول دو دهه گذشته سیستم‌های بیانی مخمر برای تولید انواع پروتئین‌های نو ترکیب استفاده شده است. در دسترس بودن سیستم‌های بیانی مخمر و عدم وجود آلودگی‌های اندوتوکسین سبب گردیده که مخمر به‌عنوان یکی از رایج‌ترین سیستم‌های بیانی برای تولید پروتئین نو ترکیب به‌کار رود. در میان انواع مخمرها، مخمر پیکیاپاستوریس بسیار مورد استفاده قرار گرفته به طوری 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 هرستپتین به‌طور قابل توجهی

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

جدید	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	sample
	0.733	1.136	1.327	1.455	1.58	1.715	1.792	1.918	1.993	2.036	2.127	0.999



شکل ۳. نتایج تست براد فورد و منحنی و معادله بدست آمده از نرم افزار Excel جهت تعیین غلظت پروتئین نو ترکیب بیان شده HER-2. با قرار دادن جذب نمونه مجهول در معادله بدست آمده، غلظت نمونه مجهول 1.022mg/ml محاسبه گردید.



شکل ۴. نتایج حاصل از الیزای تمایل آنتی ژن HER-2 به Herceptin در مقایسه با BSA بعنوان NSB. منوکلونال آنتی بادی تجاری هرستپتین تمایل بالایی به دمین خارج سلولی HER-2 دارد، انتظار می‌رود در صورت بیان درست آنتی ژن HER-2 و داشتن فولدینگ مناسب، هرستپتین به این آنتی ژن با تمایل بالایی متصل گردد. همانطور که مشاهده می‌شود هرستپتین تمایل بالایی به پروتئین نو ترکیب بیان شده HER-2 دارد که تأییدی بر بیان درست آن می‌باشد.

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, Hagooley 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 (hFSH β) 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, Rasaei 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, Rasaei 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

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 هر سیتین 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 به دست 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 سوبه مخمری پیکیاپاستوریس سوبه X33 حاوی وکتور بیانی pPicalpha، 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 شماره ۴۵۳ می‌باشد.

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

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.

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

Expression and characterization of recombinant human epidermal growth factor receptor antigen (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