

## بیان آنتی بادی مونوکلونال هرپتین در سلول های یوکاریوتی و آنالیز کاهش بیان HER2 در رده های سلولی سرطان پستان

سحر شجاعی: پژوهشگر پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری.

موسی گردانه<sup>۱</sup>: استاد یار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، دپارتمان ژنتیک مولکولی.

### چکیده

HER2 از خانواده گیرنده‌ی تیروزین کینازها می‌باشد که بیان بیش از حد آن در ۲۵-۳۰٪ مبتلایان به سرطان پستان دیده می‌شود و هرپتین اولین آنتی بادی مونوکلونال humanized شده بر علیه HER2 می‌باشد. تولید این آنتی بادی تجاری در داخل کشور علاوه بر دستیابی به دانش فنی تولید آنتی بادی های مونوکلونال می‌تواند زمینه ساز تحقیقات در زمینه مسیره‌های سیگنال دهی داخل سلولی فراهم می‌آورد.

### مواد و روش ها

به منظور تولید هرپتین، توالی نوکلئوتیدی دو زنجیره سبک و سنگین هرپتین سنتز شیمیایی شد. سپس زنجیره سنگین و سبک در یک ناقل لنتی ویروسی برای انتقال هر دو زنجیره به سلول یوکاریوتی کلون گردید. سپس سازه حامل زنجیره سبک و سنگین با استفاده از روش DNA-کلیسیم فسفات به سلول های مولد ویروس ترانسفکت شد. پس از تولید لنتی ویروس های نوترکیب سلول های 293T با آن ها آلوده شد. هرپتین ترشح شده در محیط کشت سلول ها، جمع آوری و تغلیظ گردید. اتصال و تاثیرگذاری هرپتین بر رده های سلولی پستان HER2<sup>+</sup> با استفاده از تست ایمونوسیتوشیمی و MTT assay انجام شد. کاهش بیان گیرنده ی HER2 در سلول های تیمار شده با هرپتین با تکنیک RT-PCR انجام شد و نتایج حاصل از آن بر روی ژل آگارز تأیید گردید.

### یافته ها

نتایج آزمایشات همضم آنزیمی کلونینگ صحیح هر دو زنجیره را در وکتور لنتی ویروسی تایید کرد.

نتایج RT-PCR، پس از ترانسفکشن و ترانسدوکشن سلول HEK-293T بیان هر دو زنجیره را در سلول تایید کرد.

نتایج ایمونوسیتوشیمی و MTT assay اتصال و تاثیرگذاری هرپتین را بر سلول های سرطانی تایید کرد.

نتایج PCR در ۳ رده ی سلولی مختلف کاهش بیان گیرنده HER2 را در پاسخ به هرپتین نشان می‌دهد.

### نتیجه گیری

آنتی بادی تولید شده از فعالیت بیولوژیکی اختصاصی در اتصال به گیرنده HER2، مهار بیان و فعالیت بیولوژیکی گیرنده برخوردار است. این آنتی بادی می‌تواند رشد سلول های سرطانی را با کاهش بیان گیرنده HER2 مهار و مرگ را در این سلول ها القاء کند.

واژه های کلیدی: هرپتین، HER2، سرطان پستان.

<sup>۱</sup> [mossa65@nigeb.ac.ir](mailto:mossa65@nigeb.ac.ir)

## مقدمه

سرطان پستان یکی از شایع ترین انواع سرطان است که هر ساله باعث مرگ و میر های فراوانی در بین زنان می شود و علیرغم پیشرفت های بسیاری که در مورد تشخیص زود هنگام و درمان مناسب این بیماری صورت گرفته است کماکان یکی از مهمترین علل مرگ به علت سرطان در بین زنان است (۱). این سرطان شایع ترین سرطان در زنان است که ۳۳٪ از موارد سرطان را شامل می شود (۱). پس از سرطان ریه، شایع ترین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان محسوب می شود که عامل ۱۹٪ از مرگ و میر های وابسته به سرطان در زنان می باشد (۲). بنابراین سرطان پستان شایعترین نوع سرطان در ایران و جهان است با این تفاوت که به دلایل نامشخصی سن ابتلا به این نوع سرطان در ایران یک دهه کاهش یافته است (۳).

در بین درمان های متداول سرطان ها شیمی درمانی از موثرترین روش ها بوده است (۵). با وجود تمام موفقیت های این روش و همگام بودن بسیاری از کشورها از جمله ایران در راستای استفاده از داروها و پروتکل های شیمی درمانی نوین و به روز مشکل عدم پاسخ به درمان در تعداد قابل توجهی از بیماران به چشم می خورد (۵).

در اوایل سال ۱۹۸۰ نقش گیرنده Erb2 در تومورزایی در سرطان پستان مشخص شد (۶). ژن گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی انسانی که با نام C-Erb2/neu یا HER2/neu نیز خوانده می شود یک گیرنده گلیکوپروتئینی غشایی با ۱۲۵۵ آمینواسید و وزن ۱۸۵ KD را از خانواده تیروزین کینازها کد می کند.

HER2 دومین عضو خانواده HER از کلاس I گیرنده های تیروزین کینازی فاکتورهای رشد می باشد. خانواده HER شامل HER1، HER2، HER3 و HER4 است. این گیرنده به صورت هوموایمر یا هتروایمر با سایر اعضا خانواده گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی باعث انتقال پیام می شود (۶). هترو دایمر شدن آن بستگی به لیگاند سایر اعضای خانواده EGFR ها دارد (۶).

تکثیر و بیان بیش از حد HER2 در سلول های سرطان پستان با افزایش اندازه تومور، افزایش طول فاز S چرخه سلولی، آنیوپلوئیدی و کاهش بیان گیرنده های هورمون های استروژن و پروژسترون همراه است و در ۲۵-۳۰٪ مبتلایان به این سرطان افزایش بیان گیرنده HER2 دیده می شود (۷).

هرسپتین یا Trastuzumab از جمله آنتی بادیهای مونوکلونال Humanized شده است که بر علیه محصول پروتئین HER2 عمل می کند (۱۰). در واقع ناحیه CDR در MA۴D۵ کاملاً Humanized شده و هرسپتین را بوجود آورده که بر علیه دومن خارج سلولی HER2 وارد عمل میشود (۱۰).

اتصال هرسپتین به دومین خارجی رسپتور تیروزین کیناز (RTK) منجر به داخلی شدن (Internalization) رسپتور و باعث مهار مسیر پیام رسانی PI3K میگردد (۱۱). در این مکانیسم با اتصال هرسپتین به HER2، کاهش فسفریلاسیون PTEN در اسید آمینه تیروزین اتفاق می افتد و PTEN بیشتر در غشا قرار می گیرد (۱۱). PTEN با فعالیت فسفاتازای باعث دفسفریلاسیون AKT شده و در نهایت مهار رشد و تقسیم سلولی را به دنبال دارد (۱۱). در این صورت مهار سیکل سلولی و نیز مسمومیت سلولی وابسته به آنتی بادی (ADCC) را بعلت پاسخهای ایمنی و فعال شدن سلول های NK و در نهایت لیز سلولی میتوان مشاهده کرد (۱۲). هرسپتین همچنین قادر است از برش و تجزیه HER2 جلوگیری نموده و مانع تشکیل یک رسپتور ناقص متصل به غشاء (P95) و در عین حال فعال همیشگی گردد (۱۳). P95 فعالیت کینازی دارد و در تکثیر سلول نقش اساسی دارد (۱۳). هرسپتین با مهار متالوپروتئینازها مانع از برش و تجزیه HER2 میگردد (۱۳). علاوه بر مهار فعالیت HER2 و نتیجتاً مهار تکثیر توموری، هرسپتین منجر به ایستایی و مرگ سلولی میشود (۱۱). در واقع هرسپتین با مهار Cyclin D1 و در نتیجه مهار Inhibitor cdk inhibitor P27 باعث آزاد شدن پروتئین P27 شده که نقش مهارکنندگی کمپلکس Cyclin E/CDK2 را دارد (۱۳). بنابراین سلول در G1 متوقف میگردد (۱۳ و ۵۹). هرسپتین همچنین با کاهش بیان VEGF باعث مهار رگ زایی و پیشرفت تومور می شود (۱۳).

یکی از راه های انتقال ژن به سلول های یوکاریوتی استفاده از ناقلین ویروسی می باشد. لنتی ویروسها همانند رتروویروسها میتوانند مورد Pseudotyping قرار گرفته و بنابراین بسته به نوع گلیکوپروتئین وارد شده به غشاء ویروسی میشوند هم انواع مختلف سلولهای هدف را آلوده نمایند و هم در ورود به سلولها هدفمند و گزینشی عمل کرده و به دسته خاصی از آنها وارد گردند (۱۴).

با توجه به تجاری بودن هرسپتین، در این پروژه به منظور تولید آنتی بادی مونوکلونال هرسپتین با تکیه بر روش های مهندسی ژنتیک ژن های زنجیره سبک و سنگین آنتی بادی هرسپتین با استفاده از داده هایی که در Drug Bank وجود دارد به همراه سایت های آنزیمی که به منظور کلون این زنجیره ها در ناقلین لنتی ویروسی مورد نیاز بود طراحی و سنتز شد و در ناقلین لنتی ویروسی کلون گردید. هرسپتین در سلول های یوکاریوتی 293T تولید گردید. پس از انجام آنالیزهای تائیدکننده تولید صحیح آنتی بادی، بیان آنتی ژن HER2 در رده های سلولی سرطان پستان HER2<sup>+</sup> بررسی گردید.

## روش بررسی

### ۱- سنتز DNA زنجیره های سبک و سنگین آنتی بادی

برای اینکار توالی اسید آمینه هر دو زنجیره LC و HC به یک کمپانی آلمانی عرضه شد تا از روی آن توالی نوکلئوتیدی مربوط به هر زنجیره ساخته شود ضمن آنکه چند سایت آنزیم محدود کننده در ابتدا و انتهای زنجیره ها تعبیه شد تا مراحل کلونینگ به ناقلین تسهیل شود.

### ۲- تولید ویروس های نو ترکیب حامل ژن های زنجیره سبک و سنگین آنتی بادی

#### ۲-۱- کلونینگ زنجیره ها در پلاسمید لنتی ویروسی

در این مرحله هدف ایجاد پلاسمید لنتی ویروسی واحدی بود که از آن لنتی ویروسهای نو ترکیب بیان کننده همزمان هر دو زنجیره تولید گردد. در این راستا ۳ واکنش متوالی زیر به انجام رسید:

واکنش اول: کلونینگ LC یا زنجیره سبک به بدنه ناقل لنتی ویروسی

واکنش دوم: کلونینگ IRES به کلون حاصل از واکنش اول

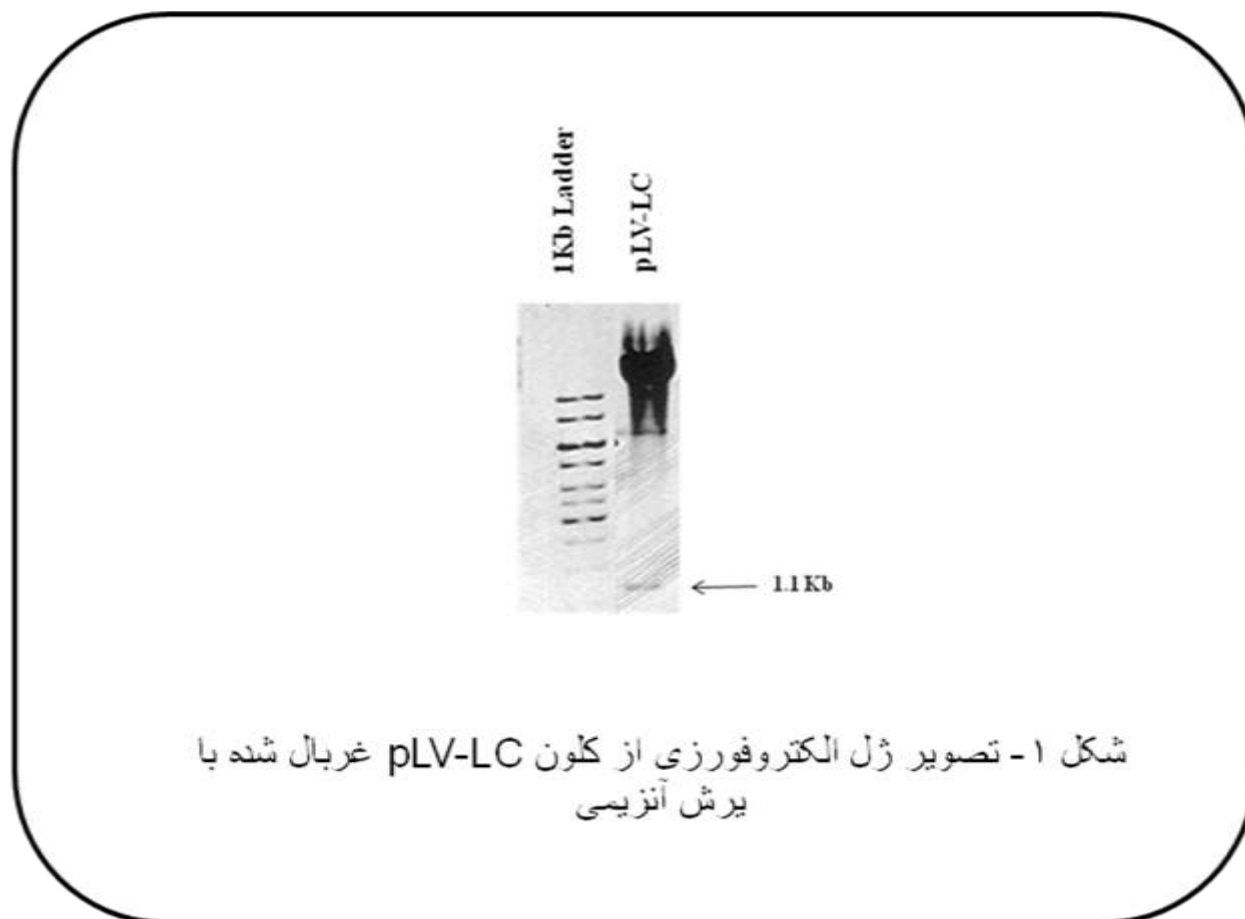
واکنش سوم: کلونینگ HC به کلون حاصل از واکنش دوم

خلاصه این سه واکنش در جدول (۱) جمع بندی شده و جزئیات هر کدام بشرح زیر است.

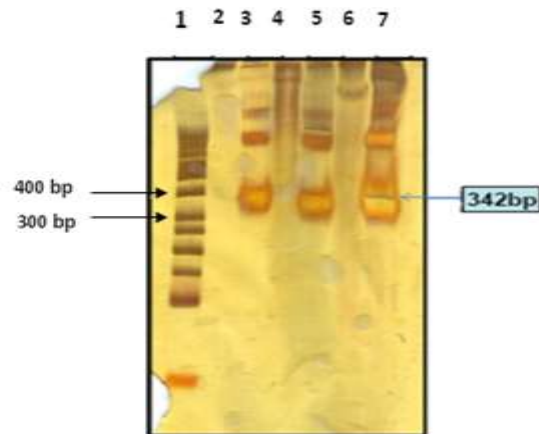
جدول ۱- واکنش لیگاسیون برای کلونینگ زنجیره های سبک و سنگین هرسپتین به ناقل لنتی ویروسی pLV-EGFP			
Ligation	Vector	Insert Vector	Final Product
Ligation 1	PLV-EGFP NheI/XhoI	pBSK-Her2- LC NheI/XhoI	pLV- LC

Ligation 2	pLV-LC NotI/ Klenow	pIRES-GTX SmaI	pLV-IRES-LC
Ligation 3	pLV-IRES-LC EcoRI	pBSK-Her2-HC EcoRI	pLV-HC-IRES-LC

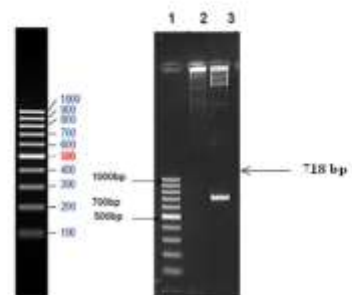
واکنش اول: در طی این واکنش توالی نوکلئوتیدی زنجیره سبک به پلاسمید لنتی ویروسی بنام پلاسمید ترانسفر pLV-EGFP کلون گردید. بدین منظور هم پلاسمید لنتی ویروسی و هم پلاسمید pBSK-Her2-LC با NheI/XhoI برش داده شده و بهمدیگر کلون شدند. کلون بدست آمده از این واکنش pLV-LC نامگذاری شد که برای اطمینان از درستی اش، آن را با آنزیم محدود کننده KpnI تست کردیم (شکل ۱).



واکنش دوم: در طی این واکنش توالی نوکلئوتیدی مربوط به IRES را از یک پلاسمید تجاری جدا کرده و در بالادست LC در پلاسمید لنتی pLV-LC (که در واکنش اول تولید شد) کلون کردیم. خلاصه این واکنش نیز در جدول ۱ آمده است. کلون بدست آمده از این واکنش pLV-IRES-LC نامگذاری شد که برای اطمینان از درستی اش، آن را با آنزیمهای RI/AgeI تست کردیم (جدول ۱). نتایج الکتروفورز مربوط به این کلونینگ در شکل ۲ آمده است.



**شکل ۲- تصویر ژل الکتروفورزی از کلون pLV-IRES-LC غربال شده با برش آنزیمی.** بر طبق جدول (۵) کلونها با آنزیمهای **EcoRI/AgeI** برش داده شدند و قطعات مورد نظر از کلون مثبت حاصل آمد. ۱. مارکر 1kb. ۲. pIRES-GTX که دارای توالی **polio-IRES** می باشد. این پلاسمید حدوداً 8kb طول دارد. ۳. pIRES-GTX که با آنزیم های **Rl/AgeI** بریده شده است. پاندهای مورد انتظار آن 1kb و 6kb میباشد. ۴. pLV-LC که با آنزیم های **Rl/AgeI** بریده شده است و با توجه به وجود جایگاه آنزیمی **Rl** و عدم وجود جایگاه **AgeI** انتظار خطی شدن را داشتیم. ۶. کلون جدید (pLV-IRES-LC) بدون برش. ۷. کلون جدید که با آنزیم های **Rl/AgeI** بریده شده است. پاندهای مورد انتظار 342 bp و 9.4 kb.



**شکل ۳- تصویر ژل الکتروفورزی از واکنش PCR کلون pLV-HC-IRES-LC این واکنش با پرایمرهای اختصاصی HC**  
شرح زیر انجام شده و با استفاده از آنالیز ۹۸ بخت بزرگی را بوجود آورد.

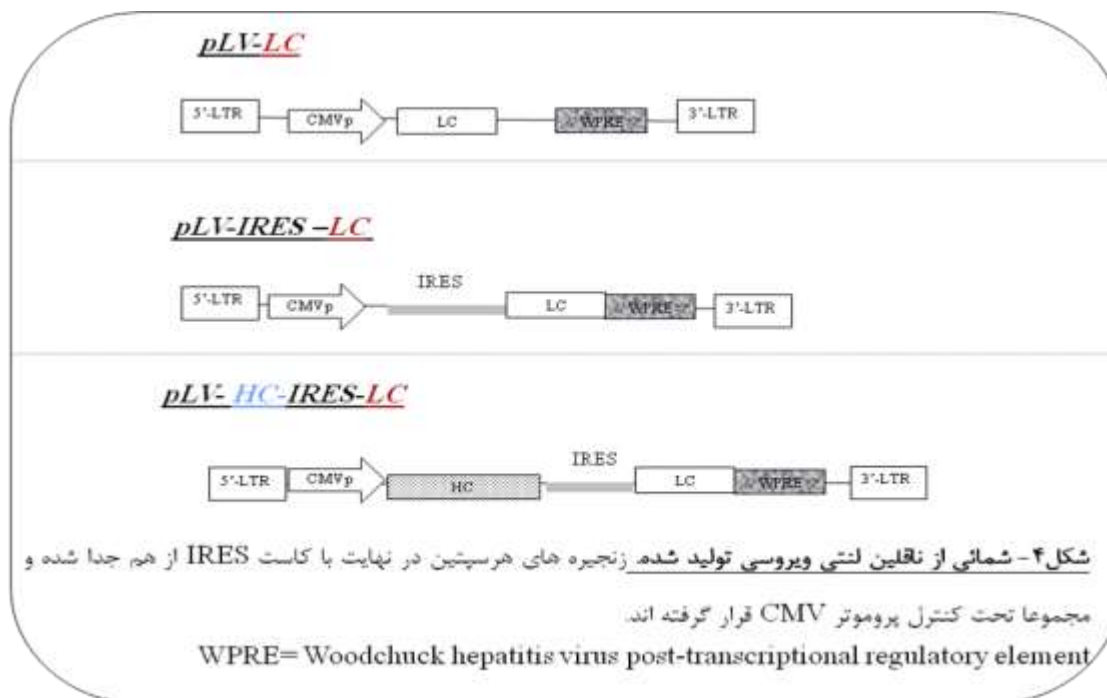
Forward primer: CATATATCCATGTGGTGCGCCAG

Reverse primer: GCTAACGTCAACCACCAAGCATG

۱- 1kb مارکر ۲- pLV-IRES-LC - r - pLV-HC-IRES-LC

واکنش سوم- در طی این واکنش توالی نوکلئوتیدی مربوط به **HC** را از پلاسمید **pBSK-Her2-HC** جدا کرده و به بالادست **IRES** در پلاسمید لنتی **pLV-IRES-LC** که در واکنش دوم تولید شد کلون کردیم. خلاصه این واکنش نیز در جدول ۱ آمده است. کلون بدست

آمده از این واکنش pLV-HC- IRES-LC نامگذاری شد که برای اطمینان از درستی اش، آن را با واکنش PCR برای قطعه ۷۸۱ جفت بازی HC تست کردیم. نتایج الکتروفورز مربوط به این کلونینگ در شکل ۳ آمده است.



بدین ترتیب پلاسمید نهایی که مشتمل بر هر دو زنجیره سبک و سنگین هرسپتین بود ساخته شده و pLV-HC-IRES-LC نامگذاری شد. شکل (۴) محصول هر سه واکنش متوالی را نشان میدهد.

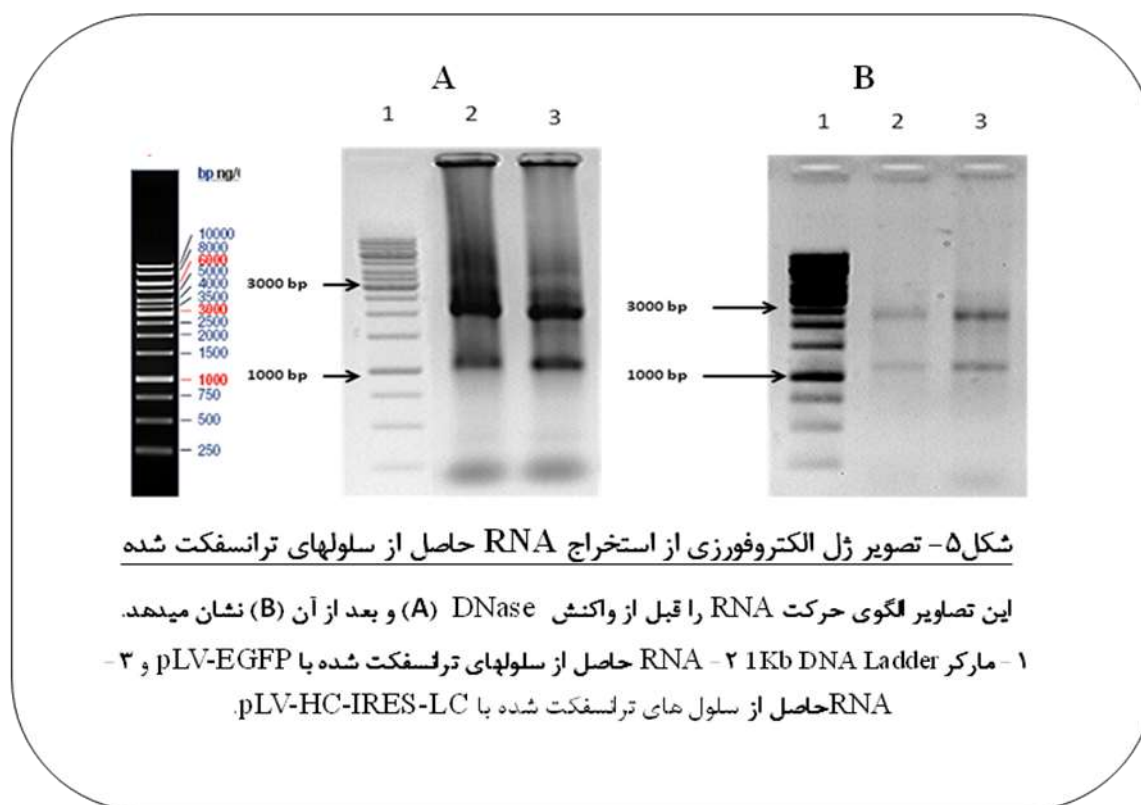
### تولید لنتی ویروسی و نوترکیب

برای تولید لنتی ویروسی نوترکیب و فعال، سلولهای HEK-293T مولد ویروس همزمان با سه ناقل لنتی ویروسی بمیزان  $15 \mu\text{g}$  از ناقل ترانسفر (pLV-HC-IRES-LC یا pLV-EGFP (بعنوان کنترل)، و  $10 \mu\text{g}$  میکروگرم از هر یک از ناقلین بسته بندی و غشائی با روش رسوب DNA- فسفات کلسیم ترانسفکت شدند. سپس بیان پروتئین گزارشگر EGFP از ترانسفکشن زیر میکروسکوپ فلورسنت پس از ترانسفکشن مشاهده شد که حاکی از صحت آزمایشات ترانسفکشن بود. محیط کشت سلولهای مولد در مقاطع زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت جمع آوری و پس از تغلیظ به کشت جدیدی از همان رده سلولی HEK-293T افزوده شد که در ۲۴ ساعت بیان EGFP را بعنوان اولین نشان تولید لنتی ویروسها مشاهده کردیم. به این ترتیب با اطمینان از درستی روشهای تولید و تغلیظ ویروس نوترکیب به آنالیز لنتی ویروسیهای مولد هرسپتین پرداختیم که مشروح این آزمایشات در زیر خواهد آمد.

### بررسی بیان زنجیره های هرسپتین در سلولهای انسانی

بیان آنتی بادی هرسپتین در سلول های انسانی ترانسفکت شده با pLV-HC-IRES-LC

بدین منظور RNA سلولهای ترانسفکت شده استخراج شده و در واکنش RT-PCR مورد بهره برداری قرار گرفت (شکل ۵).



### رونوشت برداری معکوس (Reverse Transcription):

سنتز cDNA از روی نمونه های RNA تیمار شده با DNAase به عنوان الگو توسط آنزیم رونوشت بردار معکوس M-MuIV و با استفاده از پرایمرهای هگزامر تصادفی طبق روش استاندارد صورت گرفت.

### واکنش اصلی PCR

در این واکنش از cDNA های تولید شده در بالا بعنوان الگو استفاده کرده و با پرایمرهای اختصاصی دو زنجیره، DNA های مربوطه را تکثیر نمودیم. جدول ۳ توالی پرایمرها و محصولات مورد انتظار PCR را نشان میدهد.

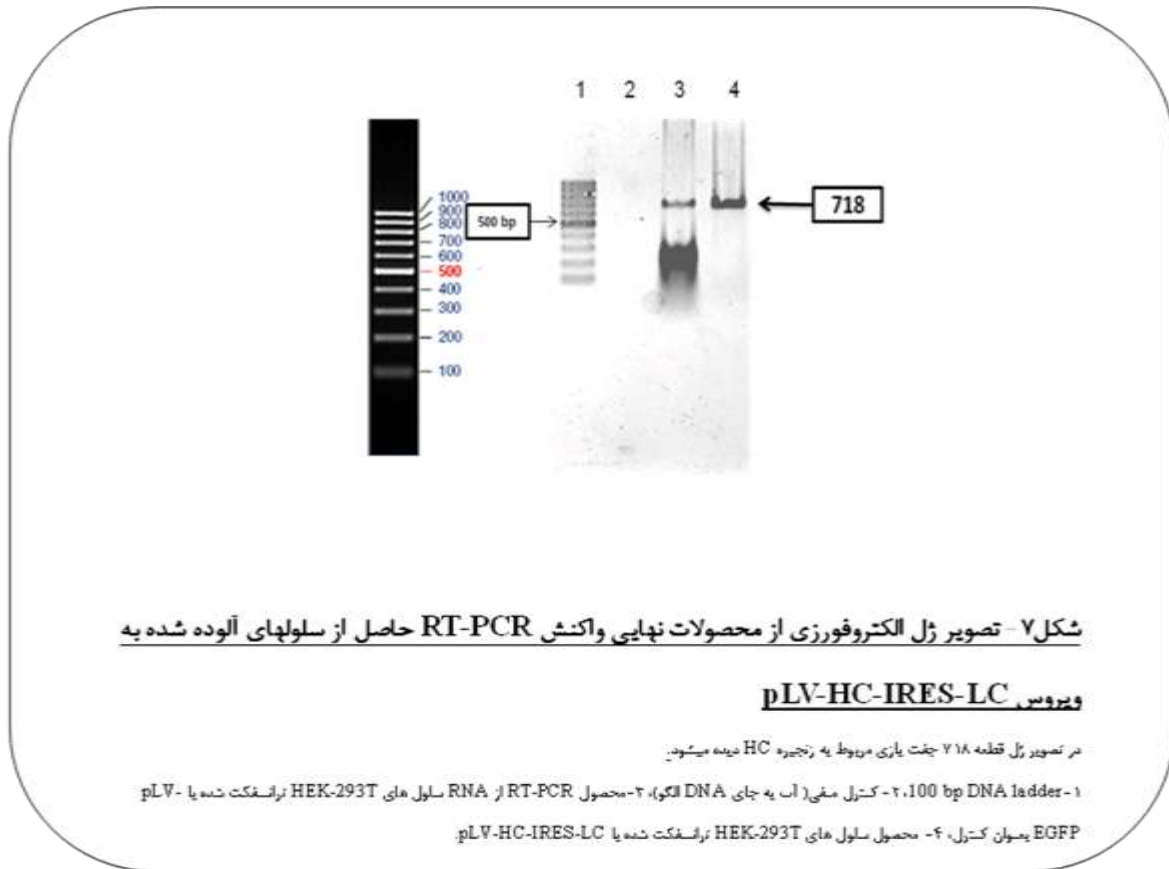
جدول ۲- توالی پرایمرها و طول محصولات مورد انتظار		
Primer	Heavy chain	Light chain
Forward	CATATATCCATTGGGTGCGCCAG	CAGATGACCCAATCACCTAGCAG
Reverse	GCTAACGTCAACCACCACGCATG	ACTTTGTACGGGTGAGGAGAG
Length of Product	718 bp	615 bp

آنالیز محصولات نهایی RT-PCR : محتویات واکنشهای RT-PCR را روی ژل آگاروز برده و با انجام الکتروفورز تصاویر مربوطه را بدست آوردیم که در شکل (۶) نشان داده شده است.

#### بررسی بیان mRNA زنجیره های هرسپتین در سطح آلودگی ویروسی (Infection):

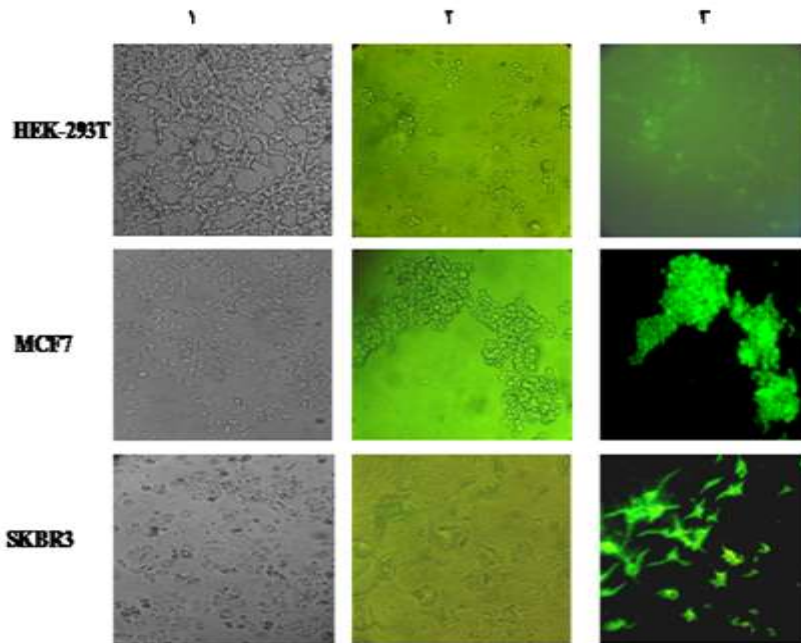
بدین منظور RNA سلولهای آلوده شده با لنتی ویروس نوترکیب pLV-HC-IRES-LC استخراج شده و در واکنش RT-PCR که مراحل آن در بخش قبلی توضیح داده شد مورد بهره برداری قرار گرفت. ما در این بخش تنها بیان mRNA مربوط به زنجیره سنگین (HC) را که در ابتدای IRES واقع است بررسی کردیم که این موضوع میتواند بر بیان زنجیره سبک (LC) در انتهای IRES نیز دلالت نماید (شکل ۷).





### اتصال هر سپتین به سلول های سرطانی

دو رده از سلول های سرطان پستان، MCF7 و SKBR3 به همراه سلولهای HEK-293T بعنوان کنترل مورد مطالعه ایمونوسیتوشیمی قرار گرفتند. بدین منظور محیط کشت تغلیظ شده از سلولهای HEK-293T مولد لنتی ویروس نو ترکیب pHC-IRES-LC (۷۲ ساعت پس از ترانسدوکشن ویروسی این سلولها) تهیه شده و مستقیماً به سلولهای سرطانی در حال رشد افزوده شد. واکنش ایمونوسیتوشیمیایی ۲۴ ساعت پس از این مرحله صورت پذیرفت. نتایج این مطالعه در شکل (۸) منعکس شده است.



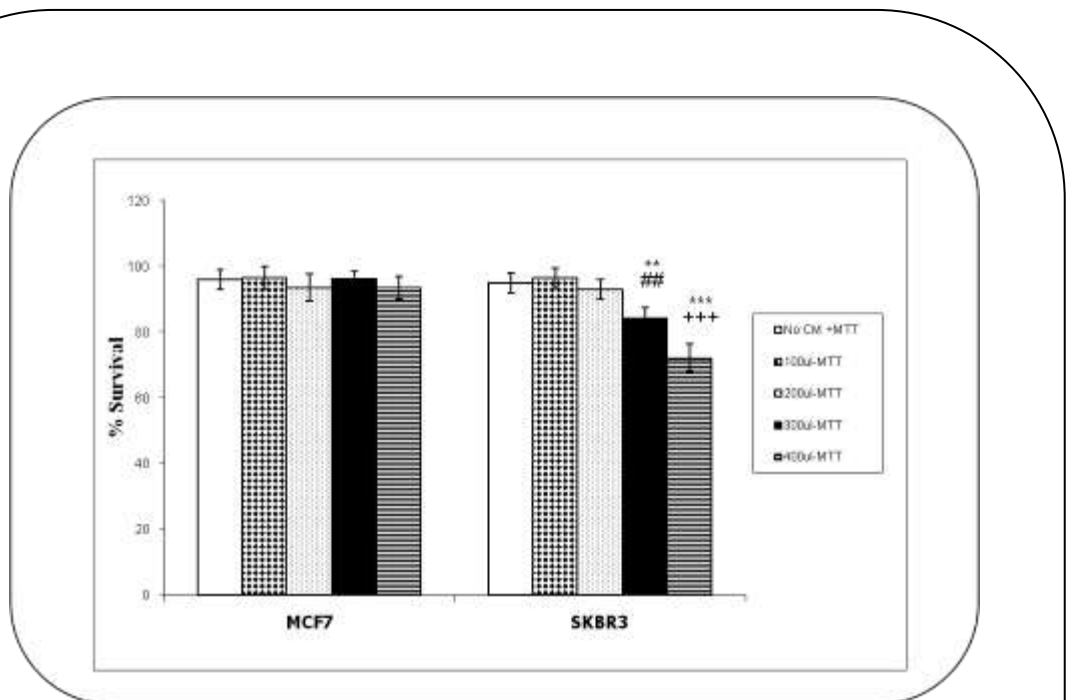
شکل ۸- تصاویر میکروسکوپ فلورسنت از واکنش هرسپتین با سلولهای سرطانی

تصویر قرمز کنترل سلولهای تیل (۱) و بعد (۲) از تیمار با محیط حاوی هرسپتین، ۳- تصویر فلورسنت همان سلولها بعد از تیمار

### تأثیر هرسپتین بر رشد سلولهای سرطانی

در آخرین قسمت از پروژه در صدد برآمدیم تا فعالیت هرسپتین بر رشد سلولهای سرطان پستان را بطور ابتدائی بسنجیم. در این راستا، محیط سلولهای HEK-293T مولد لنتی ویروس pLV-HC-IRES-LC را بصورت خام (Crude) به سلولهای سرطانی در حال رشد اضافه کردیم. پس از ۲۴ ساعت با محلول MTT، میزان رشد سلولها را سنجیدیم. شکل (۹) نتایج این آزمایشات را نشان میدهد. این شکل نشان میدهد که هرسپتین در غلظتهای استفاده شده تأثیر چندانی بر رشد سلولهای رده MCF7 نداشته است در حالیکه ۳۰۰ μl و ۴۰۰ μl از محیط هرسپتین دار رشد سلولهای رده SKBR3 را بترتیب ۱۶٪ و ۲۸٪ کاهش داده است. مقایسه این دو دسته سلول تیمار شده با سلولهایی که محیط هرسپتین دار دریافت نکرده بودند نشان داد که کاهش رشد در هر دو دسته سلول از نظر آماری خیلی چشمگیر بوده است.

(Student T-Test,  $P < 0.001$ )

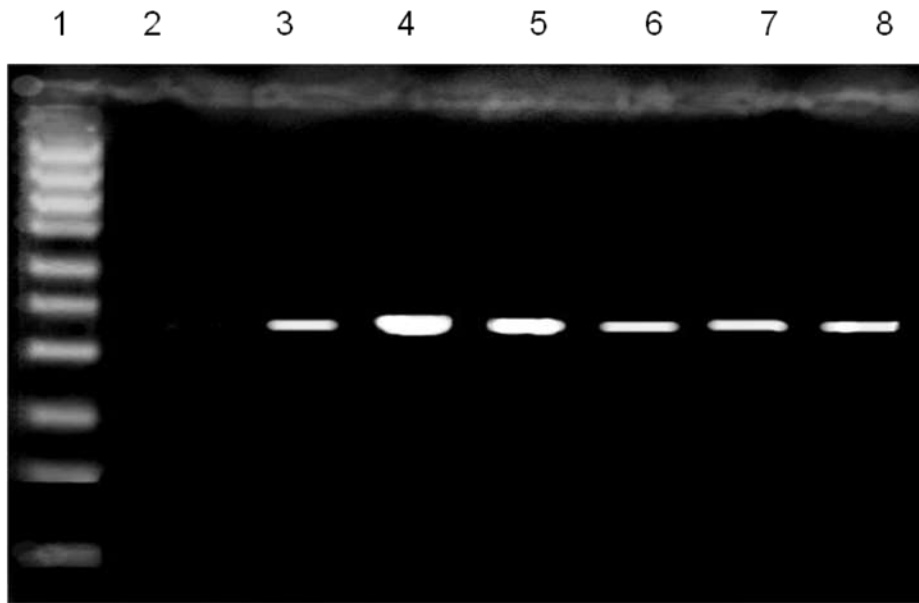


شکل ۹- دیاگرام مربوط به نتایج MTT

این شکل درصد سلولهای زنده مانده پس از تیمار با رفتهای سریال از محیط کشت مشروط سلولهای مولد ویروس pLV-HC-IRES-LC را نشان میدهد. هر ستون نماینده متوسط سه آزمایش مستقل که هر کدام بصورت تریپلیکیت (۳ تایی) صورت گرفته است. علامت \*\*\* بیانگر تفاوت خیلی چشمگیر نتایج ستون مربوطه در مقایسه با ستون اول از هر گروه میباشد که با Student T-Test بدست آمده است. CM: محیط کشت مشروط.

#### بررسی کاهش بیان ژن HER2 در سلول های سرطانی تحت تیمار با هرسپتین

به منظور بررسی تاثیر هرسپتین بر رده های سلولی سرطانی پستان، سلول های SKBR3، MCF7 و 293T در پلیت ۶ خانه به صورت دو سری کشت داده شد. یک سری تحت تیمار با هرسپتین قرار گرفتند و سری دوم بدون تیمار و به عنوان کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. پس از ۷۲ ساعت RNA سلولی استخراج و RT-PCR برای دمین خارجی HER2 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی این ناحیه انجام شد.



شکل ۱۰- RT-PCR برای بررسی بیان گیرنده HER2 در سلول های تحت تیمار با هرسپتین. ۱. 100bp DNA ladder، ۲. کنترل منفی ۳. 293T H، ۴. SKBR3، ۵. MCF7، ۶. 293T H، ۷. Herceptin MCF7 H، ۸. SKBR3 H، ۹.

### بحث و نتیجه گیری

در این مقاله، سازه لنتی ویروسی نهایی که ساخته شد توالی هر دو زنجیره سبک و سنگین را شامل میشود که با توالی IRES آنها از هم تفکیک می شوند. با تکیه بر این سازه، لنتی ویروسهای نوترکیب ساخته شد که قادر به آلوده ساختن سلولهای جدید بودند. افزایش بیان هر دو زنجیره هم در مرحله ترانسفکشن و هم در مرحله ترانسدوکشن ویروسی به اثبات رسید. محیط حاصل از سلولهای مولد زنجیره ها به محیط دو رده سلول سرطان پستان که در حال رشد بودند افزوده شد. واکنش ایمنوسیتوشیمی با آنتی بادی ثانویه FITC-conjugated هیچگونه نور فلورسنت که ناشی از واکنش بین هرسپتین تولید شده در محیط با گیرنده های غشاء سلول HEK-293T باشد را نشان نداد. لیکن این واکنش با غشاء هر دو سلولهای سرطان پستان نور فلورسنت را با شدت بالا بروز داد. این نتایج نشان داد که اولاً سازه لنتی ویروسی ما توانسته است هر دو زنجیره را بیان کند. دوماً سلولهای آلوده شده به ویروس نوترکیب قادر به سنتز و ترشح آنتی بادی بالغ و فعال به محیط بیرون خود شده اند. سوم آنکه آنتی بادی فوق فعالانه قادر به واکنش با گیرنده یا گیرنده های موجود در سطح سلولهای سرطانی می باشد. نهایتاً بعلت آنکه سلولهای HEK-293T فاقد گیرنده HER2 بوده ولی هر دو سلول سرطان پستان این گیرنده را بیان میکنند نتایج ما واکنش آنتی بادی را با HER2 اثبات کرد. از طرفی تاثیر بر بیان ژن HER2 و کاهش بیان آن نشان دهنده ی مهار سیگنال ترانسدوکشن گیرنده ی غشایی و موثر بودن هرسپتین است.

### ساخت سازه های ژنی ویروسی

هدف اصلی این پروژه در استفاده از ناقلین لنتی ویروسی و ایجاد سازه آنها برای انتقال و بیان همزمان توالی هر دو زنجیره به سلول هدف یعنی سلول های 293T بود. بدین جهت مراحل کلونینگ این دو ژن به نحوی طراحی و اجرا شد که بعد از پروموتور ابتدا توالی HC و سپس توالی IRES و در انتها توالی LC قرار بگیرد. تجربیات مختلف حاکی از کاهش بیان ژنهای پایین دست توالی IRES میباشد و از طرفی نسبت های مختلف از بیان زنجیره ها را برای تولید آنتی بادی کامل داده اند با این حال ترتیب استقرار توالی HC و LC در سازه لنتی ویروسی ما منجر به تولید آنتی بادی کامل در شرایطی شد که نسبت بیان زنجیره سنگین به سبک همانطور که در ژل SDS-PAGE مشاهده شد بیشتر است

توالی IRES انتخاب شده سازه لنتی ویروسی از ژنوم ویروس پولیو (Polio IRES) مشتق شده است که یکی از قویترین IRES های مورد استفاده در سازه های دو ژنی است. بدین ترتیب پلاسمید نهایی که مشتمل بر هر دو زنجیره سبک و سنگین هرسپتین بود ساخته شده و **pLV-HC-IRES-LC** نامگذاری شد.

ناقلین لنتی ویروسی برای عرضه آنتی بادی در سطح (یا آنچه Antibody Display) نامیده میشود بکار گرفته شده اند (17). اخیراً چنین روشی برای عرضه هرسپتین به سلولهای سرطان پستان نیز بکار گرفته شده است (18). اما تحقیق ما اولین گزارش در مورد استفاده مستقیم از لنتی ویروس در بیان هر دو زنجیره به صورت همزمان میباشد.

### بیان آنتی بادی در سلول های 293T

در مرحله بعد برای بیان پروتئین هرسپتین به عنوان پروتئینی که **Humanized** شده است و فرآیند پس از ترجمه در شکل گیری پروتئین کارا بسیار مهم است سلول های 293T که سلول های کلیه جنینی انسان هستند و به دلیل رشد آسان و ترانسفکشن با درصد بالا برای تولید پروتئین های درمانی و تولید ویروس برای ژن درمانی استفاده می شود انتخاب گردید. ترانسفکشن این سلولها با روش رسوب کلسیم فسفات موفقیت آمیز بود و **RT-PCR** بیان mRNA هر دو زنجیره را به اثبات رساند. ترانسدوکشن این سلول ها با استفاده از ویروس های سنتز شده نیز موفقیت آمیز بود و **RT-PCR** بیان mRNA مربوط به ژن HC به عنوان ژن اول را در سلولهای آلوده به ویروس نشان داد. در نتایج **RT-PCR** مشاهده شد که سلول های 293T بیان پایه از **IgG I** را دارند که پس از **BLAST** توالی پروتئینی **IgG I** در **NCBI** با توالی پروتئینی هرسپتین مشخص شد که این دو توالی در ناحیه ای که **PCR** شده است کاملاً مشابه هستند. در آنالیز بیان با استفاده از ژل **SDS-PAGE** نیز الگوی حرکت آنتی بادی **IgG I** روی ژل **SDS-PAGE** کاملاً واضح و منطبق با نتایج سایر محقق در این زمینه بوده است. بنابراین سلول های 293T به دلیل جنینی بودن تولید آنتی بادی را در سطح پایه انجام میدهند. بهمین علت باند مربوط به هر دو زنجیره سبک و سنگین در سلولهای کنترل دیده میشود. بدلیل تشابه و همپوشانی سطح بالای این زنجیره های طبیعی و زنجیره های آنتی بادی هرسپتین در نواحی بین دو پرایمر قاعدتاً ظهور این باندها مورد انتظار است.

در سلولهای ترانسفکت شده و ترانسداکت شده با **pLV-HC-IRES-LC** شدت بیان زنجیره ها بیش از ۳ برابر افزایش نشان میدهد که حاکی از موفقیت ترانسفکشن و ترانسدوکشن میباشد. بدین ترتیب به این نتیجه رسیدیم که زنجیره های هرسپتین در این سلولها بیان شده است و لیکن تمایز آنها از زنجیره های **IgG** طبیعی در این سطح از آزمایشات امکانپذیر نبوده و این موضوع به واکنشهای مربوط به فعالیت بیولوژیکی آنتی بادی موکول گردید.

### بررسی تولید آنتی بادی بالغ و کارا

به منظور بررسی ترشحی بودن یا نبودن این آنتی بادی و همچنین تولید آنتی بادی کارا تست ایمنوسیتوشیمی بر روی سلول های **SKBR3** و **MCF-7** که دو الگوی متفاوت از نظر رشد و میزان بیان گیرنده **HER2** و همچنین نقش در ایجاد سرطان های بدخیم دارند

استفاده شد. همانطور که از مشاهده این نتایج آشکار است اولاً واکنش خاصی بین هرسپتین و سلولهای کنترل (HEK-293T) صورت نگرفته است در حالیکه این واکنش بین دو رده سلول سرطانی HER2<sup>+</sup> بوضوح روی داده و حکایت از وجود آنتی بادی بالغ و فعال هرسپتین در نمونه های مورد آزمایش ما دارد. ثانیاً الگوی این واکنش بین دو رده سلول سرطانی متفاوت است و این امر هم از نظر تفاوت در الگوی رشد سلولها حائز اهمیت است و هم تفاوت آنها در الگو و شدت بیان رسپتور HER2 و نیز توزیع درون سلولی رسپتور مزبور را منعکس میکند. برای نمونه در سلول های SKBR3 بیان گیرنده HER2 ناشی از تکثیر ژن آن است ولی در MCF7 شدت بیان ژن بالاست بدین علت نور فلورسنت در نمونه های MCF7 در شکل با شدت بیشتری نسبت به نمونه های SKBR3 پدیدار شده است. در سلول های SKBR3 که الگوی رشد اپیتلیالی دارند رنگ فلورسنت در سطح سلول ها مشاهده می شود و در سلول های MCF7 که الگوی رشد اپیتلیالی ندارند و به صورت توده ای در می آیند رنگ فلورسنت در سطح سلول ها مشاهده می شود. از آنجایی که FITC-Cojugated Anti Human IgG تنها در صورتی به آنتی بادی متصل می گردد که آنتی بادی دارای folding مناسب باشد و از طرفی چون گیرنده HER-2 در سطح سلول وجود دارد انتظار داشتیم که سطح سلول که پوشیده از آنتی بادی شده است را به رنگ فلورسنت ببینیم و این نتیجه اتصال صحیح هرسپتین ترشح شده در محیط را نشان می دهد. از طرفی در سلول های SKBR3 هرسپتین بیان ژن هایی که در پردازش mRNA مانند (SIP1) snRNAs، ERCC2، MRE11، MSH5 DNA تعمیر و CPSF4، PRPF31 مانند c-FOS و c-KIT و ژن های که پروتئین های اتصالات سلولی را کد می کنند مانند CNTN1، CTNND2، JUP، را کاهش میدهد در حالی که این موضوع در مورد سلول های MCF-7 صدق نمی کند (۱۹).

#### استفاده از روش MTT:

به منظور بررسی عملکرد هرسپتین بر روی رشد این دو رده سلولی از روش MTT استفاده شد. سلولها تحت تاثیر هرسپتین دچار نکروز یا آپوپتوز شده و سرعت تکثیر یا رشدشان کاهش می یابد. جذب نوری محلول بدست آمده در طول موج ۵۷۰ نانومتر و بررسی آن به کمک منحنی استاندارد رشد و بقای سلولها را نشان داد. برای هر رده سلولی ارتباط خطی بین تعداد سلولها و جذب نوری محلول نهائی وجود دارد لذا جهت بررسی هر نوع سلول منحنی استاندارد مربوط به همان رده رسم گردید. این منحنی ها کاهش رشد ۲۸٪ را برای سلول های SKBR3 نشان داد ولی در مورد سلول های MCF7 کاهش رشد مشاهده نشد. این موضوع با این گزارشات که بیشترین تاثیر هرسپتین بر روی رشد سلولهای SKBR3 است که تواما تکثیر کروموزومی ژن HER2 و تشدید بیان آن را بروز میدهند (۱۹) انطباق دارد.

#### نتیجه گیری کلی

در طی این پروژه، یک سازه لنتی ویروسی تولید شد که قادر است دو زنجیره آنتی بادی هرسپتین را تواما بیان کند بطوریکه سلولهای پستاندار قادر به سنتز و ترشح هرسپتین بالغ به محیط بیرون خود میباشند. این آنتی بادی ترشحي قادر به اتصال به گیرنده اختصاصی خود یعنی HER2 بر روی غشاء سلولهای سرطان پستان بوده و با این واکنش میتواند رشد و تکثیر این سلولها را متوقف کند. با اتصال هرسپتین به گیرنده HER2 باعث فعال شدن مسیرهای پیام رسانی می شود که در نهایت منجر به کاهش بیان ژن Her2 می شود.

## References:

1. Thongsuksai P, Chongsuvivatwong V, Sriplung H. Delay in breast cancer care: a study in Thai women. *Medical Care*.2000 ;38:08–114
2. Jemal A, Siegel R, Ward E et al. Cancer statistics, 2008. *Cancer J Clin* 58:71–96
3. Harirchi I, Ebrahimi M, Zamani N, Jarvandi S, Montazeri A. Breast cancer in Iran: a review of 903 case records. *Public Health*. 2000; **114**:143–145.
4. Ebrahimi M, Vahdaninia M, Montazeri A. Risk factors for breast cancer in Iran: a case-control study. *Breast Cancer Research*.2002 4:R10.
5. Pierga JY, Robain M, Jouve M et al. Response to chemotherapy is a major parameter influencing long-term survival of metastatic breast cancer patients. *Ann Oncol* 2001 12:231–237
6. Bartlett JMS, Going JJ, Mallon EA et al. Evaluating HER2 amplification and expression in breast cancer. *J Pathol* 2001 195:422–428.
7. Yarden Y. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology*.2001 61(suppl2):1 13.
8. Horton J. Trastuzumab use in breast cancer: clinical issues. *Cancer Control*.2002 ;9(6):499-507. Review.
9. Brekke O, Sandlie I. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nature Rev* 2003 2: 52-62.
10. Arnould L, Gelly M, Penault-Llorca F, et al. Trastuzumab-based treatment of HER2+ breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *Br J Cancer* 2006.94(2):259-267.
11. Yakes FM, Chinratanalab W, Ritter CA, et al. Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt Is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res*. 2002 62(14):4132-4141.

12. Cooley S, Burns LJ, Repka T et al. Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity against LFA-3 and HER2/neu. *Exp Hematol* 1999 27: 1533–1541.
13. Valabrega G, Montemurro F, Aglietta M. Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Oncol* 2007 18: 977-984.
14. Quinonez R, Sutton RE. Lentiviral vectors for gene delivery into cells. *DNA Cell Biol* 2002. 937-51. Review.
15. Mitchell, R. S., et al. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biol* 2004 2: E234.
16. Wu Z, Asokan A, Samulski RJ. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther.* 2004;14(3):316-27.
17. Taube R, Zhu Q, Xu C, Diaz-Griffero F, Sui J, Kamau E, Dwyer D, Aird D, and Marasco WA Lentivirus Display: Stable Expression of Human Antibodies on the Surface of Human Cells and Virus Particles. *PLoS ONE* 2004 3(9): e3181.
18. Zhang KX, Kim C, Chow E, Chen IS, Jia W, Rennie PS. Targeting trastuzumab-resistant breast cancer cells with a lentivirus engineered to bind antibodies that recognize HER-2. *Breast Cancer Res Treat.* 2004 Mar 16.
19. Kauraniemi P, Hautaniemi S, Autio R, Astola J, Monni O, Elkahoulun A and Kallioniemi A Effects of Herceptin treatment on global gene expression patterns in HER2-amplified and nonamplified breast cancer cell lines. *Oncogene* 2004; 23, 1010–1013.