Original Article

Production and Characterization of Anti-Her2 Monoclonal Antibodies

A.S. Tabatabaei-Panah, Ph.D.[1], A.H. Zarnani, D.M.T, Ph.D. [2, 3], Sh. Montaser-Kouhsari, Ph.D.[1,4], M. Chamankhah, Ph.D.[5], R. Ghods, M.Sc.[6], A.A. Bayat, B.Sc.[6], G.E. Kazemi-Sefat, B.Sc.[2], S.A.R. Mahmoudi, M.Sc.[6], M. Ostad Karampour, M.Sc.[6], S. Shojaeian, M.Sc.[7], M. Jeddi-Tehrani, Ph.D.[6]

1. Science and Research Branch, Islamic Azad University
2. Reproductive Biotechnology Research Center, Avicenna Research Institute
3. Immunology Research Center, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences
4. Cellular and Molecular Biology Department, Faculty of Biology, Paradise of Science, Tehran University
5. Nanobiotechnology Research Center, Avicenna Research Institute
6. Monoclonal Antibody Research Center, Avicenna Research Institute
7. Biochemistry Department, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University

Corresponding Address: P.O.Box: 1985713831, Monoclonal Antibody Research Center, Avicenna Research Institute, Tehran, Iran
Email: mahjed@yahoo.com

Abstract

Received: 9/Dec/2007, Accepted: 13/Feb/2008

Objective: Breast cancer is the most common cancer among women in the world. Early diagnosis of this cancer is a key element for its treatment. One of the approaches for diagnosis of breast cancer is detection of its tumour-associated markers. Hence, Her2 has been the main focus of the researches in the field.

Materials and Methods: For diagnosis of Her2 overexpression, monoclonal antibodies (mAb) reacting against Her2 were produced in this study. For this purpose, two peptides from extracellular domain of Her2 were selected and the mAbs reacting against them were produced by hybrodoma technology. Reactivity of these antibodies were then evaluated in different immunological assays including ELISA, Immunoflurescence (IF), western blot (WB) and immunoprecipitation (IP).

Results: Total of 5 clones were produced from two separate fusions, and antibody isotyping revealed that all clones were IgM. These mAbs showed appropriate reactivities in the following assays: ELISA, immunofluresence by staining of breast cancer cell line (SKBR3), WB and IP by detecting the 185 KD band of Her2.

Conclusion: In conclusion, it seems that the mAbs are useful diagnostic tools for detection of Her2 expression in patients with breast cancer.

Keywords: Breast Cancer, Her2, Monoclonal Antibody, ELISA, Immunofluresence, Immunoprecipitation

Yakhteh Medical Journal, Vol 10, No 2, Summer 2008, Pages: 109-120

تعیین خصوصیات آنتی بادی های منوکلونال تولید شده بر علیه تومور مارکر Her2

اکرم سادات طباطبایی پناه .Ph.D[1]، امیر حسن زرنانی .D.M.T., Ph.D[2,3]، شیده منتصر کوهساری .Ph.D[4,1]، محمود چمن خواه .Ph.D[5]، رویا قدس .M.Sc[6]، علی احمد بیات .B.Sc[6]، گلناز انسیه کاظمی صفت .B.Sc[7]، سیداحمدرضا محمودی .M.Sc[6]، مهیار استاد کرم پور .M.Sc[6]، سرور شجاعیان .M.Sc[7]، محمود جدی تهرانی .Ph.D[6]*

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات
۲. پژوهشکده فناوری های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی، پژوهشکده ابن‌سینا، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولید مثل
۳. دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی
۴. دانشگاه تهران، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، گروه سلولی و مولکولی
۵. پژوهشکده فناوری های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی، پژوهشکده ابن‌سینا، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی زیستی
۶. پژوهشکده فناوری های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی، پژوهشکده ابن‌سینا، مرکز تحقیقات آنتی بادی منوکلونال
۷. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی

* آدرس نویسنده مسئول: تهران، صندوق پستی: ۱۹۸۵۷۱۳۸۳۱، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی، پژوهشکده ابن‌سینا، مرکز تحقیقات آنتی بادی منوکلونال
پست الکترونیک: **Email: mahjed@yahoo.com**

چکیده

دریافت مقاله: ۸۶/۹/۱۸، پذیرش مقاله: ۸۶/۱۱/۲۳

* **هدف:** تولیدآنتی بادی منوکلونال ضد Her-2 (Human Epidermal Growth Factor Recpector-2)
* **مواد و روش‌ها:** برای رسیدن به این هدف، دو پپتید بخش خارج سلولی Her2 طراحی و آنتی‌بادی‌های ضد آنها با استفاده از تکنولوژی هیبریدوما، تولید شد. ویژگی دو عدد از این آنتی‌بادی‌ها (کلون‌های 3E3 و 7F10) به روش‌های الایزا، ایمونوبلاتینگ و رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس مورد بررسی قرار گرفت.
* **یافته‌ها:** در مجموع ۵ کلون از ۲ فیوژن به دست آمد که ایزوتیپ همگی آنها از کلاس IgM بود. این آنتی‌بادی‌ها دارای واکنش‌گری مناسب در آزمون الایزا بودند. آزمون ایمونوبلاتینگ نشان داد این آنتی‌بادی‌ها همانند آنتی‌بادی تجاری ضد Her2 به نام Herceptin قادر به شناسایی Her2 با وزن مولکولی KD ۱۸۵ هستند. نتایج آزمون ایمونوفلورسانس غیرمستقیم نشان داد این آنتی‌بادی‌ها قادر به شناسایی Her2 سیتوپلاسمی و غشایی در رده سلولی سرطان پستان، SKBR3، هستند.
* **نتیجه‌گیری:** در مجموع به نظر می‌رسد که از آنتی‌بادی‌های منوکلونال تولید شده در این پژوهش می‌توان در تست‌های تشخیصی Her2 شامل روش‌های ایمونوهیستوشیمی و روش‌های سرولوژی بهره جست.

کلیدواژگان: سرطان پستان، گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال انسانی (Her2)، آنتی‌بادی منوکلونال، الایزا، ایمونوفلورسانس، ایمونوبلاتینگ

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دهم، شماره ۲، تابستان ۸۷، صفحات: ۱۲۰-۱۰۹

مقدمه

سرطان پستان، شایع‌ترین نوع سرطان زنان در سراسر دنیا و مهمترین دلیل مرگ آنها است (۱). در ایران نیز این سرطان از مهم ترین معضلات سلامتی زنان محسوب می‌شود، به طوری که طبق آمار معاونت سلامت وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، سرطان پستان با فراوانی نسبی حدود ۲۲درصد، شایع‌ترین سرطان در زنان ایرانی است (۲). از مهم‌ترین عوامل موثر در درمان این سرطان، تشخیص زود هنگام آن است و در صورت ایجاد راهکارهایی برای تشخیص هر چه سریع‌تر، امید برای درمان بیماران مبتلا به این سرطان با روش‌هایی نظیر جراحی افزایش چشم‌گیری می‌یابد (۳).

سرطان پستان در افرادی که سابقه خانوادگی دارند بیشتر است (۴) به طوری که در ۵۰ درصد از سرطان‌های پستان، زمینه فامیلی و ژنتیکی قوی وجود دارد (۵). به طور کلی فاکتورهای خطر این سرطان شامل تاریخچه خانوادگی و ژنتیک، وضعیت تولید مثلی/ هورمونی، بیماری خوش‌خیم پیش‌رونده پستان و دانسیته ماموگرافی است (۶).

در گذشته برای تشخیص درجه بدخیمی پستان از فاکتورهایی مثل وضعیت گره‌های لنفی، اندازه تومور و سابقه خانوادگی استفاده می‌شد، اما امروزه روش‌های تشخیصی جدیدی نظیر: ماموگرافی (Mammography)، اولتراسوند (Ultrasound)، اسکن ایزوتوپ (Isotope Scan) (۶)، متد رادیومتری ترموگرافی (Radiometry Thermography Method: RTM) (۷)، تصویربرداری رزونانس مغناطیسی (Magnetic Resonance Imaging) (۸)، آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ترانس کریپتاز معکوس مولتی‌ژن (Multigene RT-PCR assay) (۳)، روش اسپکترومتری (Mass Spectrometry Method) (۳)، تصویربرداری امپدانس الکتریکی (Electrical Impedance Imaging) (۹) و تکنولوژی میکروآری (Microarray Technology) (۳) استفاده می‌شود.

جهت تشخیص آزمایشگاهی سرطان پستان از تومور مارکرهای متعددی استفاده می‌شود که از آن جمله می‌توان به مارکرهای مربوط به سیکل سلولی مانند P21، P27، Cyclin D، Cyclin E و Ki-67 (۱۰)، مارکرهای مربوط به گیرنده‌ها و فاکتورهای رشد مانند

Her2 (۱۱)، مارکرهای مربوط به پروتوانکوژن‌ها مانند C-jun, C- fos, ras (۱۱)، مارکرهای مربوط به ژن‌های ممانعت کننده تومور مانند P53، MDM2 (۱۱)، مارکرهای مربوط به مولکول‌های چسبنده سلولی مانند کمپلکس کادهرین- کاتنین، CD 44، لامینین و اینتگرین (۱۱)، مارکرهای مربوط به سرم مانند CA549، BR27.29T، CEA، MCA، CA15.3 (Carcino embryonic Antigen)، MUC-1، (Mucin)، و مارکرهای مربوط به بافت مانند PR (Progesterone Receptor)، ER (Estrogen Receptor)، PA2-1, UPA (۱۲، ۱۳) اشاره کرد.

مهمترین و شایع‌ترین تومور مارکر سرطان پستان از بین این تومور مارکرها، Her 2 است (۱۰). تکثیر ژن Her 2، نقش مهمی در پاتوژنیسیته سرطان پستان ایفا می‌کند (۳)، به طوری که در ۳۰-۲۵درصد از سرطان‌های مهاجم پستان، Her 2 به مقدار زیادی بیان می‌شود (۱۴).

Her 2 یک پروتوانکوژن است که بر روی کروموزوم شماره ۱۷ قرار دارد (۱۵). این ژن گلیکوپروتئینی را کد می‌کند که دارای ۱۲۵۵ آمینواسید بوده (۱۶) و به عنوان گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی عمل می‌کند. Her 2 دارای سه ناحیه است: ناحیه خارج سلولی که محل اتصال لیگاند بوده، ۶۳۲ اسیدآمینه دارد و گلیکوزیله است، ناحیه غشای گذر (Transmembrane) که هیدروفوب بوده و دارای ۲۲ اسیدآمینه است و ناحیه داخل سلولی که فعالیت تیروزین کینازی دارد و دارای ۵۸۰ آمینواسید است (۳، ۱۷). قسمت خارج سلولی، خود شامل چهار ناحیه به نام‌های ناحیه I، II، III وIV است که به دو منطقه تکرار شونده دو ناحیه‌ای تقسیم می‌شود. منطقه اول ۱۹۰ اسیدآمینه دارد و دارای نواحی I و III است، در حالی‌که منطقه دوم که یک منطقه غنی از سیستئین است، ۱۲۰ اسیدآمینه دارد و دارای نواحی II و IV است (۱۷، ۱۸). Her 2 قادر است همودایمر یا با اعضای دیگر خانواده Her، هترودایمر تشکیل دهد (۱۸). اتصال لیگاند به این کمپلکس روی سطح سلول باعث فعال شدن فعالیت تیروزین کیناز داخلی شده و سبب انتقال پیام می‌شود. این مسئله باعث انتقال سیگنال از طریق غشای سلول و فضای داخل سلولی به هسته شده و باعث تغییر در فعالیت ژن‌ها می‌گردد (۱۵، ۱۹).

رایج‌ترین روش آزمایشگاهی برای تشخیص سرطان پستان، بررسی بیان Her2 در بافت سرطانی است. از نظر آسیب‌شناسی، نه تنها مورفولوژی و آسیب‌شناسی بافت، جهت تشخیص سرطان پستان حائز اهمیت است، بلکه بیان تومور مارکر Her2 در آزمون IHC (Immunohistochemistry)، صحت تشخیص را به نحو قابل توجهی افزایش می‌دهد.

آنتی‌بادی منوکلونال ضد Her2 به طور وسیعی در آزمون‌های تشخیصی سرطان پستان و همچنین درمان این سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد و تاکنون هیچ کلونی در کشور بر علیه این تومور مارکر تولید نشده است. ذکر این نکته ضروری به نظر می‌رسد که دوره درمان با آنتی‌بادی منوکلونال ضد Her2 در بیماران مبتلا به سرطان پستان، هزینه‌ای معادل چهارصدمیلیون ریال را به بیماران تحمیل می‌کند. با توجه به اهمیت تشخیص زود هنگام سرطان پستان در پیش‌آگهی بیماری و به منظور استفاده در تست‌های تشخیصی Her2 و به ویژه ایمونوهیستوشیمی، در این پژوهش، آنتی‌بادی های منوکلونال ضد Her2 تولید و خصوصیات آنها مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

ایمن‌سازی موش‌ها (Immunization)

ایمن‌سازی بر روی موش‌های ماده نژاد سوری (Syrian) با سن ۸-۶ هفته انجام شد. کلیه مراحل کار با حیوانات آزمایشگاهی به تصویب کمیته اخلاق در پژوهشکده ابن‌سینا رسید. به عنوان ایمونوژن از دو پپتید Her2 P1(NH_2-QLFEDNYAL-COOH) (۱۰۶-۱۱۴) و Her2 P2(NH_2-ILHNGAYSL-COOH) (۴۳۵-۴۴۳) (Thermo Electron, Germany) استفاده شد. ابتدا دو پپتید با KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) با روش استاندارد گلوتارالدئید یک مرحله‌ای، کونژوگه (۲۰) شدند. تزریق کونژوگه‌های هر پپتید به طور هم‌زمان به سه موش و در چهار نوبت انجام گرفت. در نوبت اول، ۱۰۰ میکروگرم از هر یک از کونژوگه‌ها با نسبت حجمی مساوی با ادجوانت کامل فروند (sigma, U.S.A) مخلوط و در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر به شکل داخل صفاقی (Intraperitoneal Injectoin) به موش‌ها تزریق شد. تزریق‌های دوم، سوم و چهارم با فواصل زمانی ۲، ۳ و ۴ هفته با ۵۰ میکروگرم کونژوگه به همراه ادجوانت ناقص فروند (Sigma) به شکل داخل صفاقی انجام شد. یک هفته قبل از انجام فیوژن، از ناحیه دم موش‌ها خون‌گیری به عمل آمد و تیتر آنتی‌بادی ضدپپتید به روش الایزا بررسی گردید. موشی که دارای بالاترین تیتر آنتی‌بادی بود، جهت انجام فیوژن انتخاب شد. سه روز قبل از انجام فیوژن، ۲۰ میکروگرم کونژوگه به صورت داخل وریدی (Intravenous Injection) تزریق گردید.

آزمون الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) برای تعیین تیتر آنتی‌بادی ضدپپتید Her2 در موش‌های ایمن شده

ابتدا، چاهک‌های پلیت الایزا (Maxi sorp , Nunc , Denmark) با پپتیدهای مورد نظر با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در طول شب تحت دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، پوشانده شدند. پس از سه بار شست و شو با بافر PBS -0.05% Tween 20 (PBS-T)، پلیت‌ها به مدت نیم ساعت با شیر بدون چربی ۳ درصد بلاک شدند. پس از شست‌وشوی مجدد، سرم موش‌ها از رقت ۱:۲۰۰ به صورت سریال دوگانه به چاهک‌ها اضافه و انکوباسیون در ۳۷درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه ادامه یافت. پس از شست‌وشوی، کونژوگه پراکسیداز ضدایمونوگلوبولین موش (Avicenna Research Institute, Iran) با رقت ۱:۱۰۰۰ اضافه شد. پس از ۶۰ دقیقه انکوباسیون و شست و شوی مجدد، از سوبسترای TMB (3, 3', 5, 5'- Tetra Methyl Benzidine) (US Biological, U.S.A) به منظور تولید رنگ استفاده شد. واکنش رنگی پس از ۱۵-۱۰ دقیقه، با اسیدسولفوریک ۲۰درصد متوقف و جذب نوری (Optical Density) چاهک‌ها با دستگاه ELISA Reader (Anthos 2020, Austria) در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

تکثیر و آماده‌سازی سلول‌های میلوم، فیوژن و تولید سلول‌های هیبریدوم

دو روز قبل از انجام فیوژن، سلول های میلوم SP2/0 در محیط کشت RPMI1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium) (Gibco, U.K) حاوی ۱۰درصد سرم جنین گاو (Fetal Bovine Serum: FBS) (Sigma) و

آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین G (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر) (Sigma) و استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) (Sigma) در انکوباتور ۳۷ درجه با ۵ درصد CO_2 و رطوبت اشباع تکثیر شدند. میزان حیات (Viability) سلول‌ها به روش تریپان‌بلو تعیین شد.

فیوژن سلول‌های طحال موش با سلول‌های SP2/0 با استفاده از PEG 1500 (Poly Ethylen Glycol) (Sigma) و به نسبت ۱۰:۱ انجام شدند (۲۱). سلول‌های حاصل از فیوژن در محیط RPMI کامل حاوی ۲۰درصد سرم جنین گاو و در پلیت‌های ۹۶ حفره (Nunc, Denmark) در حجم ۱۰۰ میکرولیترکشت شدند. پس از یک روز انکوباسیون در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباتور CO_2، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط انتخابی HAT 2X (Sigma) به پلیت‌ها افزوده شد. میزان موفقیت فیوژن و تیتر مورد استفاده به عنوان مبنای انتخاب کلون بود.

غربالگری و کلونینگ هیبریدوم ها

حدود ۱۰ روز پس از کشت سلول‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی چاهک‌های حاوی سلول‌های هیبریدوم جمع‌آوری شدند و از نظر تولید آنتی‌بادی اختصاصی به روش الایزا مورد بررسی قرار گرفتند. برای این کار از پپتیدهای Her2 P1 و Her2 P2، به عنوان آنتی‌ژن جهت پوشاندن کف چاهک‌های الایزا استفاده شد. چاهک‌های حاوی کلون های مثبت به روش Limiting Dilution Assay، ۴-۳ مرتبه کلون و هر بار بهترین چاهک‌ها از نظر تولید آنتی‌بادی و تراکم سلولی مناسب، انتخاب شدند. تک کلون‌های انتخابی، تکثیر و از پلیت ۹۶ حفره به پلیت ۲۴ حفره (Nunc) و پس از رشد کافی به فلاسک‌های ۵۰ میلی‌لیتری (Nunc) منتقل گردیدند. پس از تکثیر کافی، هیبریدوم‌ها به فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری (Nunc) منتقل و مقدار زیادی محلول رویی از آنها جمع‌آوری شد. همچنین هیبریدوم‌های مولد آنتی‌بادی، منجمد و در ازت مایع نگهداری شدند. در مجموع، از تعداد ۹۶۰ چاهک بررسی شده برای فیوژن پپتید Her2 P1، تعداد ۵۸ چاهک و از مجموع ۵۷۶ چاهک بررسی شده برای پپتید Her2 P2، تعداد ۳۲ چاهک، مولد آنتی‌بادی بودند.

تعیین ایزوتیپ آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد Her2

ایزوتیپ آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد Her2 با استفاده از استریپ‌های تجاری ایزواستریپ (Isostrip) (Roche, Germany) تعیین شد. ۱۵۰ میکرولیتر از سوپ غلیظ محتوی آنتی‌بادی با نسبت ۱:۱۰ در بافر PBS رقیق و به لوله ایزواستریپ اضافه گردید. پس از ورتکس، استریپ داخل لوله وارد و بعد از ۱۰-۵ دقیقه بر اساس باندهای تشکیل شده، ایزوتیپ و نوع زنجیره سبک آنتی‌بادی خوانده شد.

تخلیص آنتی‌بادی ازمحلول رویی کشت کلون‌های مولد آنتی‌بادی منوکلونال ضد Her2 و تغلیظ آن

برای تخلیص آنتی‌بادی، ابتدا محلول رویی کشت سلولی از ۲۰-درجه سانتی‌گراد خارج و پس از آب شدن، سانتریفیوژ گردید. پس از فیلتر کردن آن با فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر (Schleicher & Schuell, Germany)، مایع به دست آمده، ابتدا از ستون افینیتی پروتئین G (Protein G Affinity Column) (GE Health Care, Uppsala, Sweden) و سپس از ستون افینیتی Anti Mouse IgM عبور داده شد. پس از شستشو با PBS، پروتئین‌های متصل به هر دو ستون با استفاده از بافر Glycine- Hcl, pH=2.7 به طور جداگانه و در حجم‌های ۲ میلی‌لیتری elute شدند. جذب نوری لوله‌ها ملاحظه و لوله‌هایی که حاوی مقدار قابل قبولی آنتی‌بادی بودند، با یکدیگر مخلوط و تعیین غلظت شدند.

در مرحله بعد، آنتی‌بادی به مدت یک شب در مقابل PBS, pH=7.2 دیالیز شد. پس از سانتریفیوژ، بررسی مجدد جذب نوری و تعیین غلظت، از پلی‌اتیلن گلایکول جهت تغلیظ آنتی‌بادی استفاده شد. غلظت نهایی آنتی‌بادی به روش فتومتری با استفاده از ضریب خاموشی سنجش و جهت نگهداری با گلیسرول (غلظت نهایی ۵۰ درصد) مخلوط شد.

آزمون الایزا برای تعیین واکنش‌گری آنتی‌بادی‌های منوکلونال تخلیص شده ضد Her2 و بررسی خلوص آنها

پس از پوشاندن پلیت‌ها با پپتید مورد نظر با غلظت‌های نهایی ۱۰ و۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، واکنش‌گری غلظت‌های مختلف آنتی‌بادی (۰/۳۱۲، ۰/۶۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به روش الایزای غیرمستقیم و مطابق با روش ارائه شده قبلی بررسی شد.

به منظور بررسی خلوص، آنتی‌بادی‌های تخلیص شده، الکتروفورز شدند. بدین منظور ۵ میکروگرم از هر آنتی‌بادی در هر چاهک ژل پلی‌آکریل‌آمید (SDS-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis: SDS-PAGE) حاوی SDS با درصد ژل ۷ درصد الکتروفورز شدند. ژل‌های مربوطه با رنگ کوماسی‌بلو، رنگ‌آمیزی و سپس بی رنگ شدند تا باندهای پروتئینی ظاهر و از آنها عکس‌برداری شود.

رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس سلول‌های SKBR3 با استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد Her2

ابتدا رده سلولی SKBR3 (ATCC, U.S.A) که رده سلولی سرطان پستان انسان محسوب می‌شود، بعد از جدا شدن از کف فلاسک کشت سلولی و شست و شو با بافر PBS, pH=7.4 بر روی لام‌های ایمونوفلورسانس (ERIC Scientific, Germany) قرار داده شدند. بعد از خشک شدن سلول‌ها و فیکس کردن آنها توسط استون سرد به مدت دو دقیقه، سه بار شست و شو با TBS (Tris-buffered Saline)، هر بار به مدت ۵ دقیقه، انجام گرفت. مرحله بلاک کردن با استفاده از TBS حاوی ۵ درصد سرم گوسفند به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. در مرحله بعد، آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد Her2 با غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به مدت دو ساعت بر روی سلول‌ها اضافه شد. پس از شست‌وشو با TBS، سلول‌ها با Sheep anti mouse-biotin (Avicenna Research Institute) با غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به مدت ۶۰دقیقه مجاور شدند. پس از شست‌وشو با TBS،کونژوگه Streptavidin-FITC (Invitrogen, U.S.A) با رقت ۱: ۵۰ به مدت ۳۰ دقیقه بر روی اسلایدها اضافه شد. پس از شست‌وشو با TBS، لام‌ها با PBS حاوی ۹۰ درصد گلیسرول، مانته شدند. واکنش‌گری آنتی‌بادی توسط میکروسکوپ فلورسانس مورد بررسی قرار گرفت. در اسلایدهای کنترل منفی، به جای آنتی‌بادی اولیه از IgM موش غیرایمن با غلظت مشابه استفاده شد. در اسلایدهای کنترل مثبت، به جای آنتی‌بادی

اولیه از آنتی‌بادی Herceptin (Roche) و کونژوگه (Avicenna Research Institute) Sheep anti Human-FITC استفاده شد.

تهیه لیزات سلولی

سلول‌های SKBR3 با استفاده از (Corning Incroported, Mexico) cell scraper از کف فلاسک کنده شده و سه بار با PBS شست‌وشو داده شدند. سلول‌ها با استفاده از بافر لیزکننده حاوی Nonidet-P40 0.05%, Nacl 150 mM, Tris-Hcl 10Mm و مخلوط آنتی‌پروتئازها (Sigma)، به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد لیز شدند.

ایمونوبلاتینگ لیزات سلولی

پس از تعیین غلظت پروتئین لیزات سلولی به روش برادفورد (Bradford Assay) (۲۲)، ۲۰۰ میکرولیتر لیزات سلول SKBR3 با ۱۰۰میکرولیتر Herceptin با غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر مخلوط و یک ساعت بر روی روتاتور در دمای۴ درجه سانتی‌گراد، مخلوط شد. سپس به این مخلوط، ۲۰۰ میکرولیتر (GE Healthcare) protein A-Sepharose 6 ME اضافه شد. انکوباسیون به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت. بعد از ۵ بار شست‌وشو با بافر PBS، رسوب ژل به مدت ۱۰ دقیقه با بافر نمونه حاوی Tris-Hcl (0.5 M، pH=6.8)، SDS (10% W/V)، گلیسرول (50% V/V) و برومونفل بلو (0.5% W/V) جوشانده شد و پس از سانتریفیوژ، محلول رویی جمع‌آوری و بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۷درصد با ولتاژ ۱۰۰ ولت، الکتروفورز گردید. همچنین لیزات سلولی تهیه شده بدون انجام مرحله جذب آنتی‌ژن و به صورت مستقیم پس از تعیین غلظت پروتئین کل، الکتروفورز شد. بلاتینگ مطابق روش توبین و همکاران (۲۳) با کمی تغییرات انجام شد. برای آنتی‌بادی اولیه، از آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد Her2 تولید شده با غلظت ۵ میکروگرم در میلی لیتر استفاده شد و پس از ۵ بار شست‌وشو، هر بار به مدت ۱۵ دقیقه، از کونژوگه Goat anti mouse IgM-HRP (Sigma) با رقت ۱:۵۰۰۰ استفاده گردید. پس از شست‌وشو، فیلترهای نیتروسلولز با سوبسترای ECL (GE Healthcare) به مدت یک دقیقه مجاور شدند. به عنوان کنترل مثبت از آنتی بادی Herceptin و کونژوگه (Avicenna Research Institute) Rabbit anti Human-HRP و به عنوان کنترل منفی از PBS به جای آنتی‌بادی اول استفاده شد.

یافته‌ها

ایمن‌سازی موش‌ها

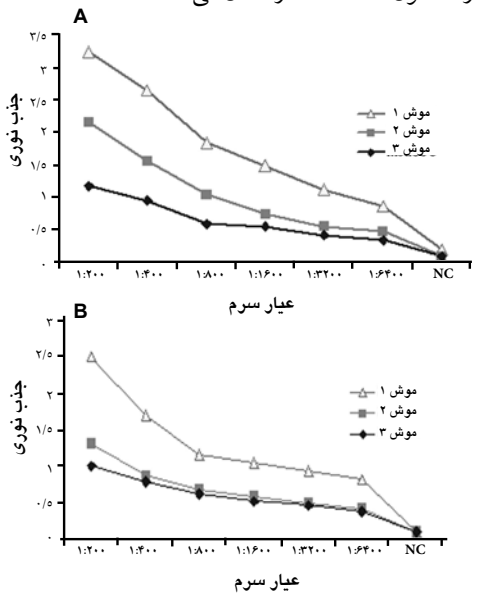
تیتراسیون سرم موش‌های ایمن شده با پپتیدهای Her2 نشان داد که تمام موش‌ها بعد از تزریق چهارم آنتی‌ژن، آنتی‌بادی با تیتر مناسب تولید کرده‌اند. شکل ۱A، منحنی تیتراسیون سرم موش‌های ایمن شده با پپتید Her2 P2 و شکل ۱B، منحنی تیتراسیون سرم موش‌های ایمن شده با پپتید Her2 P1 را نشان می‌دهد.

تولید و انتخاب هیبریدوم‌های مولد آنتی‌بادی ضد Her2

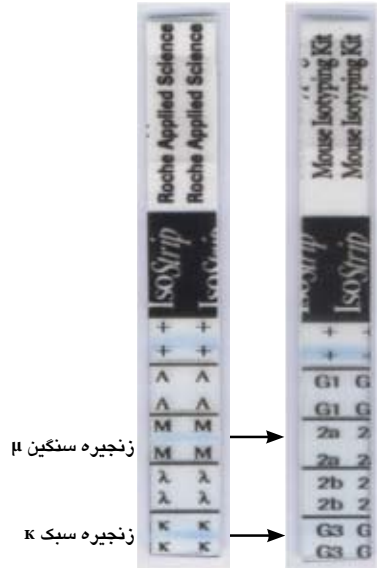
پس از غربالگری اولیه، از بین هیبریدوم‌های مثبت در حال رشد، چاهک‌های دارای جذب نوری بالاتر، انتخاب و کلون شدند. اختلاف جذب نوری ۰/۶ باکنترل منفی با سوبسترای TMB پس از یک ربع توقف واکنش، به عنوان ملاک انتخاب کلون مثبت در نظر گرفته شد. در نهایت در مورد پپتید Her2 P2، سه کلون 3E3، 3C5 و 4C12 و در مورد پپتید Her2 P1، دو کلون 1E3 و 7 F10 به دست آمد.

تعیین ایزوتیپ آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد Her2

تعیین ایزوتوپ به روش ایزواستریپ انجام و مشخص گردید تمام ۵ کلون آنتی‌بادی منوکلونال ضد Her2، از کلاس IgM و زنجیره سبک κ هستند. شکل ۲، نمونه استریپ یکی از ۵ کلون ضد Her2 را نشان می‌دهد.



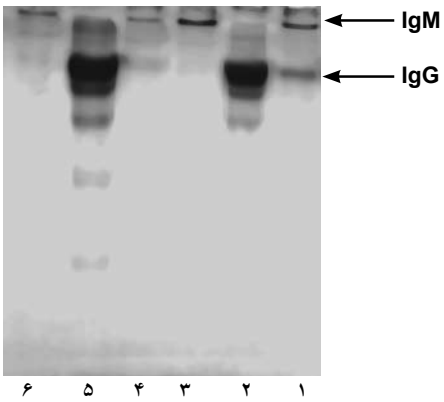
شکل ۱: منحنی تیتراسیون سرم موش‌های ایمن شده با پپتید Her2 P2 و Her2 P1
پس از چهار بار تزریق داخل صفاقی و یک تزریق داخل وریدی، سرم موش‌ها با رقت سریال دوگانه و به روش الایزا از نظر عیار آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضدپپتید Her2 P2 (A) و یا Her2 P1 (B) آزمایش شدند. (Negative Control: NC)



شکل ۲: استریپ یک کلون ضد Her2
ایزوتیپ آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد Her2 با استفاده از استریپ های تجاری و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده تعیین گردید. شکل فوق، واکنش‌گری آنتی‌بادی را با زنجیره سنگین μ و زنجیره سبک κ نشان می‌دهد.

مطالعه خلوص آنتی‌بادی‌های منوکلونال تولید شده به روش SDS-PAGE

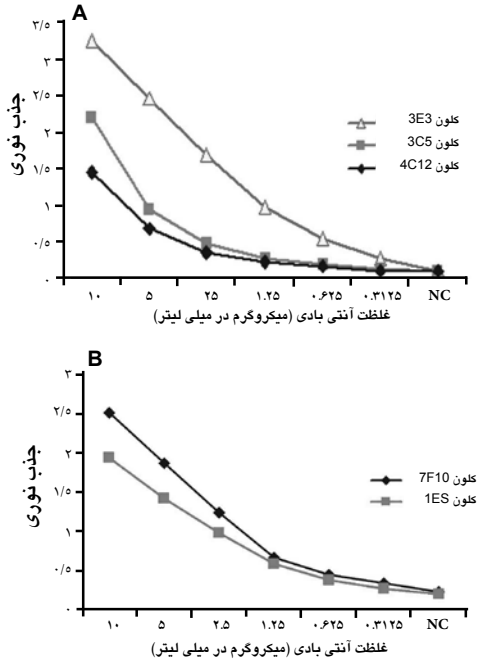
جهت بررسی خلوص آنتی‌بادی‌های منوکلونال تولید شده از SDS-PAGE ۷درصد در شرایط غیراحیا (Non-reducing SDS-PAGE) استفاده شد. نتایج حاصله نشان داد که آنتی‌بادی‌های تخلیص شده توسط ستون افینیتی anti mouse IgM دارای دو باند در محدوده‌های IgM و IgG هستند. همان‌گونه که در قسمت بحث به آن اشاره خواهد شد، باند IgG، مربوط به FBS مورد استفاده در کشت انبوه سلول‌های هیبریدوم بود. به همین منظور از ترکیبی از ستون های افینیتی protein G و Anti mouse IgM جهت تخلیص آنتی‌بادی‌های منوکلونال مورد نظر استفاده شد. نتایج SDS- PAGE از فراکسیون تخلیص شده ستون‌های protein G و anti mouse IgM نشان داد آنتی‌بادی‌های منوکلونال تخلیص شده تنها دارای یک باند در محدوده IgM هستند (شکل ۳).



شکل ۳: الکتروفورز SDS-PAGE آنتی‌بادی منوکلونال 3E3 و 7F10
محلول رویی کشت هیبریدوم‌های مولد آنتی‌بادی‌های منوکلونال 3E3 و 7F10 ابتدا از ستون protein G و سپس از افینیتی Anti mouse IgM عبور داده شدند. پروتئین‌های تخلیص شده از ستون protein G به تنهایی و یا پس از عبور از هر دو ستون، جمع‌آوری و به منظور بررسی محتوای پروتئینی الکتروفورز شدند.
Lane 1: آنتی‌بادی 3E3 تخلیص شده توسط ستون Anti mouse IgM
Lane 2: آنتی‌بادی 3E3 تخلیص شده توسط ستون protein G
Lane 3: آنتی‌بادی 3E3 تخلیص شده توسط ستون protein G و Anti mouse IgM
Lane 4: آنتی‌بادی 7F10 تخلیص شده توسط ستون Anti mouse IgM
Lane 5: آنتی‌بادی 7F10 تخلیص شده توسط ستون protein G
Lane 6: آنتی‌بادی تخلیص شده توسط ستون protein G و Anti mouse IgM

تخلیص محلول رویی هیبریدوم‌های حاوی آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد Her2 و تعیین واکنش‌گری آنها با پپتید اختصاصی در آزمون الایزا

پس از تخلیص آنتی‌بادی توسط ستون‌های protein G و Anti mouse IgM،آزمون الایزا برای هر ۵ کلون آنتی‌بادی منوکلونال ضد Her2 جهت تعیین میزان واکنش با پپتید اختصاصی انجام شد و برای هر پپتید، بهترین کلون (کلونی که با غلظت مشابه آنتی‌بادی، دارای جذب نوری بالاتری در آزمون الایزا بود) انتخاب شد. بدین ترتیب کلون 3E3 بهترین واکنش را با پپتید Her2 P2 و کلون 7F10 با پپتید Her2 P1 نشان داد (شکل ۴) و در ادامه کار، آزمون‌ها با این دو آنتی‌بادی انجام شد.
شکل A ۴، منحنی تیتراسیون آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد Her2 P2 و شکل ۴B منحنی تیتراسیون آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد Her2 P1 را نشان می‌دهد. همان‌گونه که در شکل ۴A, B و مشاهده می‌شود، تغییرات جذب نوری در غلظت‌های مختلف آنتی‌بادی‌های 3E3 و 7F10 از یک روند تبعیت می‌کنند.



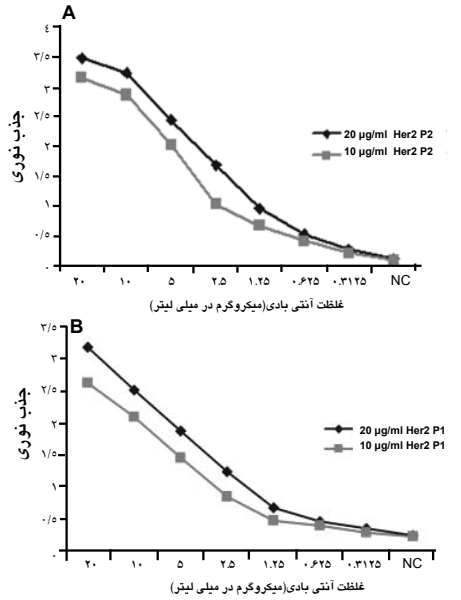
شکل ۴: منحنی تیتراسیون آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد Her2 P2 و Her2 P1
چاهک‌های پلیت الایزا با پپتید Her2 P2 (A) و یا Her2 P1 (B) پوشانده شدند و در مراحل بعد مطابق توضیحات ارائه شده در بخش مواد و روش‌ها ،آنتی‌بادی‌های منوکلونال با رقت سریال دوگانه و سپس کونژوگه پراکسیداز ضدایمونوگلوبولین موش به چاهک اضافه شد. پس از اضافه کردن کروموژن TMB و توقف واکنش، جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.
NC: Negative Control

براساس محاسبات، از هریک میلی‌لیتر سوپ کلون 3E3 مربوط به پپتید Her2 P2، ۱۸ میکروگرم و از هر یک میلی‌لیتر سوپ کلون 7F10 مربوط به پپتید Her2 P1، ۱۵ میکروگرم آنتی بادی منوکلونال به دست آمده است.

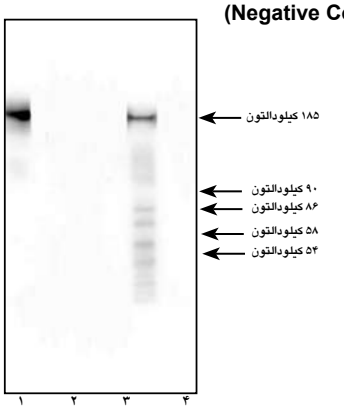
به منظور تعیین غلظت بهینه پپتیدهای مورد استفاده در پوشاندن چاهک‌های پلیت الایزا و همچنین تعیین عیار بهینه آنتی‌بادی های منوکلونال 3E3 و 7F10، آزمون الایزای غیرمستقیم با استفاده از غلظت‌های مختلف پپتید و آنتی‌بادی، طراحی شد. نتایج حاصله نشان داد هر دو آنتی‌بادی 3E3 و 7F10 (در غلظت‌های ۲۰-۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) دارای واکنش‌گری مناسبی علیه پپتیدهای مربوطه (با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) هستند (شکل‌های B و ۵A). برای کنترل منفی آزمون الایزا از روش‌های مختلفی مانند حذف آنتی‌بادی لایه اول، حذف پپتید و نیز جایگزینی آنتی‌بادی لایه اول با آنتی‌بادی غیرمرتبط با ایزوتیپ یکسان، استفاده شد.

نتایج به دست آمده نشان داد که تمام چاهک‌های کنترل منفی در مقایسه با چاهک‌های مثبت دارای جذب نوری بسیار پایین (۰/۲-۰/۱) هستند. با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد که در روش الایزای غیرمستقیم، غلظت بهینه برای آنتی‌بادی منوکلونال 3E3 حدود ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای آنتی‌بادی منوکلونال 7F10، آنتی‌بادی حدود ۱۰ میکروگرم در

میلی‌لیتر است. همچنین غلظت بهینه پپتید جهت پوشاندن پلیت‌ها ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شد.



شکل ۵: منحنی تیتراسیون آنتی‌بادی منوکلونال 3E3 و 7F10 پس از پوشاندن چاهک‌های پلیت الایزا با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از پپتید Her2 P2 (A) و یا Her2 P1 (B) مطابق توضیحات ارائه شده در بخش مواد و روش‌ها، آنتی‌بادی‌های 3E3 (A) و یا 7F10 (B) با رقت سریال دوگانه و سپس کونژوگه پراکسیداز ضد ایمونوگلوبولین موش به چاهک‌ها اضافه شد. پس از اضافه کردن کروموژن و توقف واکنش، جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. (Negative Control: NC)

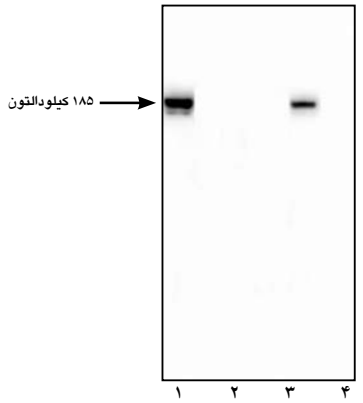


شکل ۶: ایمونوبلات لیزات سلولی SKBR3 با استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال 3E3
لیزات سلولی SKBR3 بر روی غشای نیتروسلولز بلات شد و واکنش‌گری آنتی‌بادی منوکلونال 3E3 مورد بررسی قرار گرفت. از Herceptin به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.
Lane 1: Herceptin، Lane 2: کنترل منفی Herceptin، Lane 3: آنتی‌بادی منوکلونال 3E3، Lane 4: کنترل منفی 3E3

مطالعه واکنش‌گری آنتی‌بادی منوکلونال 3E3 با لیزات سلولی SKBR3 با استفاده از روش ایمونوبلات

به منظور بررسی واکنش‌گری آنتی‌بادی‌های منوکلونال تولید شده ضد Her2 با آنتی‌ژن‌های مربوطه در ایمونوبلات، سلول‌های SKBR3 لیزو لیزات حاصل به صورت مستقیم و یا پس از جذب توسط آنتی‌بادی تجاری ضد Her2 (Herceptin) الکتروفورز و بلات شدند. از آنتی‌بادی منوکلونال 3E3 تولید شده به عنوان آنتی‌بادی‌های لایه اول و از کونژوگه پراکسیداز Goat anti mouse IgM جهت شناسایی باندها استفاده شد. نتایج به دست آمده نشان داد آنتی‌بادی منوکلونال 3E3 در لیزات سلولی SKBR3 یک باند اصلی با وزن مولکولی ۱۸۵کیلودالتون و چهار باند فرعی با اوزان مولکولی ۹۰، ۸۶، ۵۸ و ۵۴ کیلودالتون را شناسایی می‌کند (شکل ۶). پس از جذب آنتی‌ژن توسط Herceptin، آنتی‌بادی منوکلونال 3E3 تنها یک باند ۱۸۵ کیلودالتونی را شناسایی کرد.

پروتئین کامل Her2 دارای وزن مولکولی ۱۸۵ کیلودالتون است که این باند توسط آنتی‌بادی منوکلونال 3E3 تولید شده مورد شناسایی قرار گرفت (شکل ۷).



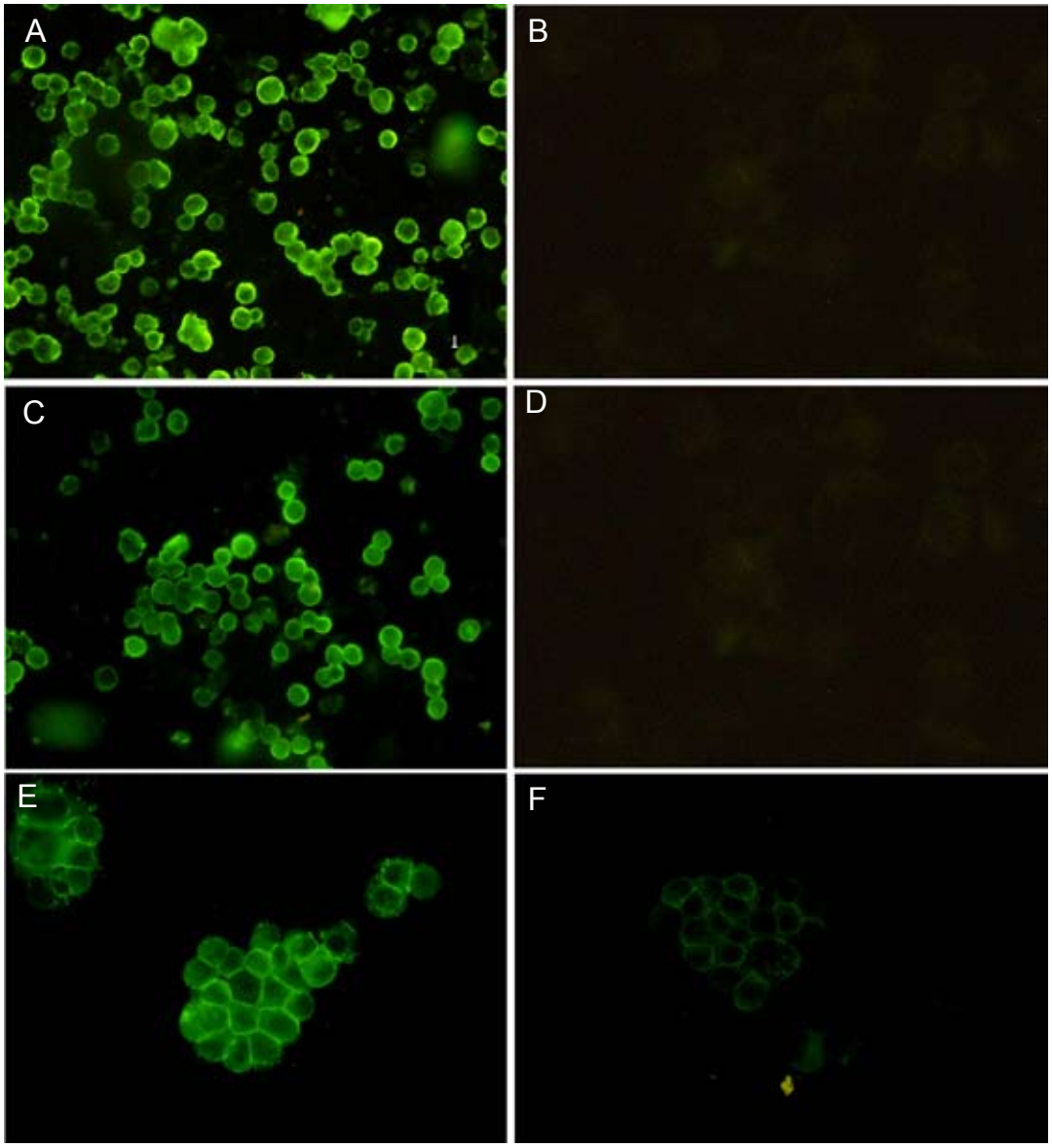
شکل ۷: ایمونوپرسیپیتاسیون Her2
ایمونوپرسیپیتاسیون لیزات سلولی SKBR3 توسط Herceptin انجام شد و آنتی‌ژن‌های به دست آمده بر روی غشای نیتروسلولز بلات شدند. واکنش‌گری آنتی‌بادی منوکلونال 3E3 با این آنتی‌ژن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. از Herceptin به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.
Lane 1: Herceptin، Lane 2: کنترل منفی Herceptin، Lane 3: آنتی‌بادی منوکلونال 3E3
Lane 4: کنترل منفی 3E3

مطالعه رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت سلول‌های SKBR3 با استفاده ازآنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد Her2

قابلیت استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال 3E3 و 7F10 در آزمون‌های ایمونوسیتوشیمی به روش ایمنوفلورسانس و با استفاده از رده سلولی SKBR3 مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج حاصله از این آزمون نشان داد که هر دو آنتی‌بادی 3E3 (شکل ۸A) و 7F10 (شکل ۸C) همانند Herceptin (شکل ۸E) به خوبی قادر به شناسایی Her2 بر روی سلول‌های SKBR3 هستند.

جهت تعیین عیار بهینه هر آنتی‌بادی، رنگ‌آمیزی ایمنوفلوروسانس غیرمستقیم با استفاده از غلظت‌های مختلف آنتی بادی منوکلونال، آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با بیوتین و کونژوگه Streptavidin- FITC انجام شد.

مطابق با نتایج به دست آمده، در تمام غلظت‌های مورد استفاده، آنتی‌بادی‌های منوکلونال 3E3 و 7F10 به خوبی سلول‌های SKBR3 را مورد شناسایی قرار دادند. با توجه به بالاترین نسبت سیگنال به رنگ زمینه (Signal/noise ratio)، غلظت بهینه آنتی‌بادی 3E3، ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و غلظت بهینه آنتی‌بادی 7F10، ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شد. عیار بهینه آنتی‌بادی‌ثانویه کونژوگه با بیوتین، ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و عیار بهینه کونژوگه streptavidin-FITC ۱:۵۰ تعیین شد. در تمام موارد رنگ‌آمیزی، اسلایدهای کنترل منفی،



شکل ۸: رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس سلول‌های SKBR3 توسط آنتی‌بادی‌های منوکلونال 7F10، 3E3 و Herceptin
سلول‌های SKBR3 بر روی لام‌های ایمونوفلورسانس قرار گرفتند و پس از مراحل فیکس و شست‌وشو، مطابق روش ارائه شده در قسمت مواد و روش‌ها، با آنتی‌بادی‌های منوکلونال 7F10 (C)، 3E3 (A) و Herceptin (E) مجاور شدند. پس از اضافه کردن آنتی‌بادی لایه دوم کونژوگه با بیوتین و استرپت اویدین کونژوگه با FITC، لام‌ها توسط میکروسکوپ فلورسانس بررسی شدند. عکس‌های (B)، (D) و (F) به ترتیب لام‌های کنترل منفی 7F10، 3E3 و Herceptin را نشان می‌دهند. (بزرگ‌نمایی ۲۰۰×: A-D، بزرگ‌نمایی ۴۰۰ ×: E-F)

بدون واکنش‌گری و یا دارای واکنش‌گری بسیار ضعیفی بودند (شکل ۸B, D, F).

بحث

پیش‌گیری از سرطان پستان که شایع‌ترین سرطان در میان زنان محسوب می‌شود، غالبا امکان‌پذیر نیست. بهترین راه برای درمان این سرطان، تشخیص سریع آن است. یکی از مهمترین راه‌های تشخیصی، بررسی تومورمارکرهای سرطان پستان است. سرطان پستان دارای انواع زیادی از تومورمارکرهاست که مهمترین آنها Her2 است. در ۳۰-۲۵درصد از بیماران مبتلا به سرطان پستان، Her2 توسط سلول‌های سرطانی به میزان زیاد بیان می‌شود (۲۳). Her2 یک گیرنده تیروزین کیناز از خانواده Her است (۲۴). این خانواده مشتمل بر چهار عضو Her1-Her4 است و پروتئین‌های متعلق به این خانواده، نقش مهمی در تنظیم رشد و تمایز سلول ایفا می‌کنند (۲۶-۲۵). برای شناخت Her2، روش‌های مختلفی وجود دارد که از آن جمله می‌توان به IHC (Immunohistochemistry)، PCR (Polymerase Chain Reaction)، FISH (Fluorescence in Situ Hybridization)، CISH (Chromogen in Situ Hybridization) و ELISA اشاره کرد (۲۷، ۲۸). اما استانداردترین روشی که برای تعیین بیان Her2 در بافت پستان مورد استفاده قرار می‌گیرد، روش ایمونوهیستوشیمی (IHC) است (۲۹، ۳۰).

تا به حال ۸ آنتی‌بادی منوکلونال ضد Her2 در دنیا تولید شده

است که آنتی‌بادی‌های منوکلونال Mouse anti Human Her2 از کلون‌های 9G6، 3B5، 2C4، 10C7، 3B1، 4B8، 4C10 و 4E5 هستند و توسط تکنولوژی هیبریدوما تولید شده‌اند (۳۳-۳۱). اما با توجه به نبود هیبریدوم تولیدکننده این آنتی‌بادی در ایران، ضرورت تولید این آنتی‌بادی احساس می‌شد.

در این پروژه، آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد Her2 با استفاده از دو پپتید Her2 (P1 و P2) که دارای بخشی از توالی ناحیه خارج سلولی Her2 بودند، تولید و خصوصیات آنها مورد بررسی قرار گرفت. علت طراحی و استفاده از پپتیدهای بخش خارج سلولی Her2 در تولید آنتی‌بادی منوکلونال، استفاده آتی از این آنتی‌بادی‌ها جهت بررسی سطح Her2 آزاد در مایعات بیولوژیک بود. این نکته به این دلیل است که بیشتر Her2 آزاد در مایعات بدن فاقد ناحیه کینازی و بخش داخل سلولی این مولکول است. همچنین از آنتی‌بادی‌های ضد بخش خارج سلولی مولکول Her2 به طور بالقوه می‌توان در ایمونوتراپی سرطان پستان استفاده کرد. علت طراحی این پپتیدها، وجود سکانس‌های هیدروفیل در سطح پپتیدها، مناسب بودن پپتید از نظر کونژوگاسیون و نداشتن واکنش متقاطع بود. در مجموع، ۵ کلون آنتی‌بادی منوکلونال ضد Her2 به دست آمد که سه کلون بر ضدپپتید P2 و دو کلون بر ضدپپتید P1 بودند و بررسی ایزوتیپ آنتی‌بادی‌ها نشان داد همگی آنها از کلاس IgM هستند. دلیل IgM شدن کلون‌ها احتمالا مربوط به نوع ایمونوژن به کار گرفته شده (پپتید)، کوتاه بودن طول پپتیدها و همولوژی زیاد بین پپتیدها و سکانس Her2 موشی (تفاوت فقط در یک اسیدآمینه است) می‌باشد. با بررسی کامل بین سکانس Her2 موشی و پپتیدهای Her2 P1 و Her2 P2 مشخص شد سکانس هر دو پپتید با سکانس Her2 موشی مشابهت دارند و تفاوت تنها در یک اسیدآمینه است.

برای تخلیص آنتی‌بادی‌ها از محلول رویی کشت سلول‌های هیبریدوم، ابتدا از ستون Anti mouse IgM استفاده شد. نتایج SDS-PAGE نشان داد آنتی‌بادی تخلیص شده از این ستون، هم دارای IgM و هم دارای IgG است. با توجه به اطمینان از نتیجه تست تعیین ایزوتیپ و منوکلونالیتی آنتی‌بادی‌ها و با توجه به احتمال وجود IgG گاوی در FBS، سرم جنین گاو از ستون افینیتی Protein G عبور داده شد و نتایج حاصل نشان داد FBS حاوی مقادیر قابل توجهی از IgG است. به همین جهت برای خالص‌سازی IgM منوکلونال مورد نظر از IgG گاوی، دو ستون افینیتی Protein G و Anti mouse IgM به هم متصل و سوپ کشت سلولی از هر دو عبور داده شد.

علت جذب IgG گاوی به ستون Anti mouse IgM مربوط به نوع آنتی‌بادی استفاده شده در ساخت این ستون است. برای تهیه آنتی‌بادی خرگوشی ضد IgM موش از IgM خالص شده موشی به عنوان آنتی‌ژن استفاده شد. با توجه به اینکه IgM مورد استفاده جهت تزریق به خرگوش، آنتی‌بادی کامل یعنی زنجیره سنگین μ و زنجیره سبک κ بوده، آنتی‌بادی تولید شده در خرگوش نیز علیه هر دو قسمت IgM بوده است. از این نظر، آنتی‌بادی تولید شده در خرگوش، هم قادر به شناسایی زنجیره سنگین μ و هم زنجیره سبک κ است. بنابراین ستون ساخته شده با این آنتی‌بادی نه تنها قادر به جذب و تخلیص IgM موشی، بلکه قادر به جذب سایر ایزوتیپ‌های آنتی‌بادی است که زنجیره سبک κ موشی دارند. از آنجا که ترادف اسیدهای آمینه آنتی‌بادی‌ها بین گونه‌های مختلف، همولوژی بالایی دارد، بنابراین به نظر می‌رسد که آنتی‌بادی مذکور قادر به جذب IgG گاو نیز می‌باشد. صحت این مدعا با عبور FBS از ستون یاد شده و تخلیص IgG گاو به اثبات رسید.

نتایج ژلSDS-PAGE نشان داد فراکسیون خارج شده از ستون anti mouse IgM دارای تک باند IgM و فراکسیون خارج شده از ستون protein G دارای تک باند IgG است. با توجه به نتایج اولیه آزمون‌های الایزا و ایمونوفلورسانس بر روی محلول رویی کلون‌های مثبت، در نهایت بر اساس شدت واکنش‌گری آنتی‌بادی‌ها در آزمون‌های مذکور کلون 3E3 بر ضدپپتید Her2 P2 و 7F10 بر ضدپپتید Her2 P1 انتخاب و پس از تخلیص نهایی به روش یاد شده، مراحل بعدی کار فقط با این دو آنتی‌بادی انجام شد. نتایج آزمون الایزا نشان داد که هر دو آنتی‌بادی دارای واکنش‌گری مناسبی علیه پپتیدهای مورد نظر است و احتمالا از آنها می‌توان در تعیین عیار Her2 آزاد موجود در مایعات بیولوژیک استفاده کرد. در مطالعه‌ای که به تازگی توسط قیومی و همکارانش (۳۴) انجام گرفت از آنتی‌بادی منوکلونال ضدHer2 در تشخیص Her2 سرمی به روش الایزا استفاده شده است. تحقیقات بعدی در زمینه امکان استفاده از این آنتی‌بادی منوکلونال برای کاربرد آن در تشخیص سرمی و زود هنگام فرم محلول Her2، کارایی این محصول را مشخص خواهد کرد. به منظور بررسی واکنش‌گری آنتی‌بادی‌های تولید شده با سلول‌های بیان کننده Her2، از سلول‌های SKBR3 و روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم استفاده شد. نتایج رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس نشان داد آنتی‌بادی‌های منوکلونال تولید شده می‌توانند به خوبی Her2 را در سلول‌های SKBR3 تشخیص دهند. بنابراین به نظر می‌رسد از این آنتی‌بادی‌ها بتوان در تست های تشخیصی IHC جهت بررسی بیان Her2 در نمونه‌های بافتی بیماران مبتلا به سرطان پستان استفاده کرد. تشخیص Her2 در سطح سلول‌های SKBR3 توسط محققان دیگر با استفاده از رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس و آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد Her2 گزارش شده است (۳۵).

با توجه به اینکه Her2 سطحی رده سلولی SKBR3 توسط آنتی‌بادی‌های منوکلونال تولید شده در این پژوهش قابل شناسایی است امکان استفاده از این آنتی‌بادی‌ها به شکل کونژوگه در شناسایی مستقیم تومور مارکر مذکور در روش‌های حساسی مانند فلوسایتومتری وجود دارد، اما این امکان نیز وجود دارد که روش رنگ‌آمیزی مستقیم در روش‌های با حساسیت پایین‌تر نظیر ایمونوهیستوشیمی نتواند بیان Her2 را به خوبی نشان دهد.

جهت بررسی وزن مولکولی آنتی‌ژن‌هایی که توسط آنتی‌بادی‌های منوکلونال تولید شده شناسایی می‌شوند، از تست وسترن‌بلات استفاده شد. نتایج بلاتینگ سلول‌های لیز شده SKBR3 نشان داد آنتی‌بادی 3E3 قادر به تشخیص باند ۱۸۵ کیلودالتونی Her2 است و این باند دقیقا مشابه باندی است که توسط Herceptin مورد شناسایی قرار می‌گیرد. چهار باند دیگر

هم توسط این آنتی‌بادی شناسایی شد که دارای وزن‌های مولکولی ۹۰، ۸۶، ۵۸ و ۵۴ کیلودالتون هستند. دلیل باندهای اضافی در وسترن بلات می‌تواند به دو دلیل زیر باشد: اول اینکه این باندهای اضافی می‌تواند به دلیل واکنش آنتی‌بادی با اپی‌توپ‌های دیگر باشد.آنتی بادی که در این مطالعه تولید شد، از کلاس IgM است و IgM ایمونوگلوبولینی است که احتمال ایجاد واکنش متقاطع توسط آن زیاد است. با توجه به ضعیف بودن این چهار باند اضافی نسبت به باند اصلی و IgM بودن آنتی‌بادی، این چهار باند اضافی می‌تواند حاصل واکنش متقاطع آنتی‌بادی باشد. دلیل دوم: این پدیده در مورد اپی‌توپ‌هایی دیده می‌شود که شکست داخل مولکولی آنتی‌ژن، ساختار فضایی اپی‌توپ را تخریب نمی‌کند و اپی‌توپ مورد نظر در قطعات مولکولی مختلف با وزن‌های مولکولی متنوع حضور دارد. در صورتی که شکست داخل مولکولی پروتئین منجر به از بین رفتن کامل اپی‌توپ شود، فقط پروتئین کامل توسط آنتی‌بادی شناسایی شده و قطعات حاصل از شکست مولکول قابل ردیابی نیست و به نظر می‌رسد اپی‌توپ قابل شناسایی توسط Herceptin از این نوع باشد.

نتایج سایر محققان هم وجود باند اصلی ۱۸۵ کیلودالتونی و چند باند دیگر مربوط به Her2 را نشان می‌دهد (۳۶، ۳۷).

جهت تایید نتایج وسترن بلات از آزمون ایمونوپرسیپیتاسیون استفاده شد و نتایج حاصل نشان داد که آنتی‌بادی منوکلونال 3E3 قادر است پروتئین‌های جذب شده توسط Herceptin را به خوبی شناسایی کند.

نتایج تحقیقات سایر دانشمندان نیز نشان داده است که آنتی‌بادی‌های آنها، قادرند پروتئین‌های جذب شده توسط Herceptin را در نقطه ۱۸۵ کیلودالتونی تشخیص دهند (۳۸).

در ایمونوپرسیپیتاسیون به دلیل مجاور کردن آنتی‌بادی با پروتئین طبیعی، باندهای اضافی که در وسترن بلات دیده می‌شود، حذف می‌شود. در ایمونوپرسیپیتاسیون به علت اینکه ابتدا لیزات سلولی SKBR3 با Herceptin مجاور می‌شود، بیومارکرهای Her2 به Herceptin متصل می‌شود. سپس با جوشاندن با بافر نمونه، بیومارکرهای Her2 در مایع رویی به شکل آزاد در می‌آید. بنابراین فقط Her2 خالص و جذب شده در ژل الکتروفورز تزریق می‌شود و آنتی بادی منوکلونال مذکور فقط به باند Her2 که ۱۸۵ کیلو دالتون است متصل می‌شود و باندهای اضافی به این صورت حذف می‌شود. گواه این مسئله، Herceptin است که به عنوان کنترل مثبت استفاده شده و یک باند دارد. اما در وسترن بلات به علت اینکه جذب Her2 در لیزات سلولی صورت نمی‌گیرد و کل لیزات در ژل الکتروفورز بارگذاری می‌شود، آنتی‌بادی منوکلونال با اپی‌توپ‌های دارای واکنش متقاطع یا اپی‌توپ‌های دارای شکست مولکولی واکنش می‌دهد.

نتیجه‌گیری

در مجموع به نظر می‌رسد آنتی‌بادی‌های منوکلونال تولید شده در این طرح پژوهشی، علی‌رغم اینکه از کلاس IgM هستند، واکنش‌گری خوبی علیه Her2 دارند و می‌توان از آنها در آزمون‌های مختلفی نظیر الایزا، وسترن‌بلات و ایمونوفلورسانس استفاده کرد.

References

1. World health organization. Fact sheet, 2006; 297: Cancer. retrieved on 2007; 4-26
2. Iranian Annual of National Cancer Registration Report 2004, Center for Disease Control, Noncommunicable Deputy, Cancer Control Office.
3. Early breast cancer Trialists' collaborative group. Systematic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy-133 randomized trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. Lancet .1992; 1-15
4. Sainsbury JRC, J Anderson T, Morgan DAL. Breast cancer. BMJ. 2000; 321: 745-750
5. Limer JL, Parkes AT, Waterworth A, Murphy CE, Tait CR, Witton CJ. 8th Nottingham International Breast Cancer Conference, Nottingham, UK, 16-19 September 2003.Breast Cancer Res. 2004; 6(1): 236-245
6. Malone KE, Daling JR, Thompson JD, O'Brien CA, Francisco LV, Ostrander EA. BRCA1 mutations and breast cancer in the general population: analyses in women before age 35 years and in women before age 45 years with first-degree family history. JAMA. 1998; 25; 279(12): 922-929
7. Gomez Cuadra MO.5th Milan Breast Cancer Conference, Milan, Italy, 11-13 June 2003.Breast Cancer Res. 2003; 5(5): 276-279
8. Fogiel M, Zbroch T, Knapp P, Knapp P. Microwave thermography in the assessment of breast pathology Med Wieku Rozwoj. 2002; 6(1): 63-73
9. Lehman CD, Gatsonis C, Kuhl CK, Hendrick RE, Pisano ED, Hanna L, et al. ACRIN Trial 6667 Investigators Group. MRI evaluation of the contralateral breast in women with recently diagnosed breast cancer N Engl J Med. 2007; 29; 356(13):1295-1303
10. Stojadinovic A, Nissan A, Gallimidi Z, Lenington S, Logan W, Zuley M, et al. Electrical impedance scanning for the early detection of breast cancer in young women: preliminary results of a multicenter prospective clinical trial. J Clin Oncol. 2005; 23(12): 2703-2715
11. Ross JS, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Leschly N, et al. Breast cancer biomarkers and molecular medicine.

Expert Rev Mol Diagn. 2003; 3(5): 573-585
12. Ross JS, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Leschly N, et al. Breast cancer biomarkers and molecular medicine: part II. 2004; 4(2): 169-188
13. Molina R, Barak V, van Dalen A, Duffy MJ, Einarsson R, Gion M, et al. Tumor markers in breast cancer-European Group on Tumor Markers recommendations.Tumour Biol. 2005; 26(6): 281-293
14. Levenson VV. Biomarkers for early detection of breast cancer: what, when, and where? Biochim Biophys Acta. 2007; 1770(6): 847-856
15. Nahta R, Esteva FJ. HER-2-targeted therapy: lessons learned and future directions. Clin Cancer Res. 2003; Nov 1; 9(14): 5078-5084
16. Olyvioye MA. Update on Her2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathway of ErbB2/ Her2 and family methods. Breast cancer Res. 2001; 3(6): 385-389
17. Yamamoto TS, Ikawa T, Akiyama K, Semba N, Nomura N, Miyajima T, et al. Toyoshima Similarity of protein encoded by the human c-erbB2 gene to epidermal growth factor receptor. Nature (London). 1986; 319: 230-234
18. Reiter JL, Maihle NJ. A 1.8 kb alternative transcript from the human epidermal growth factor receptor gene encodes a truncated form of the receptor. Nucleic Acids Res. 1996; 24(20): 4050-4056
19. Cho HS, Lehy DJ. Structure of the extracellular region of Her2 reveals an interdomain tether. Science. 2002; 297: 1330-1333
20. Avrameas S, Ternynck T257. The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents. Immunochemistry. 1969; 6(1): 53-66
21. Köhler G, Milstein C.Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975; 256(5517): 495-497
22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72: 248-254
23. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA. 1979; 76(9): 4350-4354
24. Caroline J. Witton. Structure of HER receptors and intracellular localization of downstream effector elements gives insight into mechanism of tumor growth promotion. Breast Cancer Recearch. 2003; 5(4): 206-207
25. Carpenter G. Nuclear localization and possible functions of receptor tyrosine kinases. Curr Opin Cell Biol. 2003; 15(2): 143-148
26. Chan SD, Antoniucci DM, Fok KS, Alajoki ML, Harkins RN, Thompson SA, Wada HG. Heregulin activation of extracellular acidification in mammary carcinoma cells is associated with expression of HER2 and HER3. J Biol Chem. 1995; 270(38): 22608-22603
27. Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. EMBO J. 1997; 16(7): 1647-1655
28. Miles DW. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: herceptin in the clinical setting. Breast Cancer Res. 2001; 3(6): 380-384
29. Chavez-Blanco A, Perez-Sanchez V, Gonzalez-Fierro A, Vela-Chavez T, Candelaria M, Cetina L, et al. HER2 expression in cervical cancer as a potential therapeutic target. BMC Cancer. 2004; 4: 59
30. Horton J. Her2 and trastuzumab in breast cancer. Cancer Control. 2001; 8(1): 103-110
31. www.biocompare.com
32. Kitano Y, Umemura S, Ohbayashi H, Takenaga M, Osamura RY. Assessment of a new anti-HER2 monoclonal antibody, a best concordance with HER2 FISH. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2007; 15(4): 389-393
33. Faress JA, Nethery DE, Kern EF, Eisenberg R, Jacono FJ, Allen CL, et al. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is attenuated by a monoclonal antibody targeting HER2. J Appl Physiol. 2007; 103(6): 2077-2083
34. Ghayumi SMA, Aghasadeghi K, Doroudchi M, Ghaderi A. Determination of soluble HER-2/neu (sher-2/neu) in iranian patients with lung cancer. Iranian Journal of immunology (IJI). 2006; 3(2): 61-65
35. Wu X, Liu H, Liu J, Haley KN, Treadway JA, Larson JP, et al. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. Nat Biotechnol. 2003; 21(1): 41-46
36. Fischer BM, Cuellar JG, Byrd AS, Rice AB, Bonner JC, Martin LD, et al. ErbB2 activity is required for airway epithelial repair following neutrophil elastase exposure. FASEB J. 2005; 19(10): 1374-1376
37. De Lorenzo C, Cozzolino R, Carpentieri

A, Pucci P, Laccetti P, D'Alessio G. Biological properties of a human compact anti-ErbB2 antibody. Carcinogenesis. 2005; 26(11): 1890-1895
38. Giri DK, Ali-Seyed M, Li LY, Lee DF, Ling P, Bartholomeusz G, et al. Endosomal transport of ErbB-2: mechanism for nuclear entry of the cell surface receptor. Mol Cell Biol. 2005; 25(24): 11005-11018