

Original Article

Analysis of RNA Secondary Structure and qRT-PCR Related to Anti-CD25 CAR Expressed in NK-92 Cell Line

Moein Dehbashi¹ , Zohreh Hojati^{1*} , Majid Motovali-Bashi¹ , Mazdak Ganjalikhani-Hakemi^{2,3*} 

¹Division of Genetics, Department of Cellular and Molecular Biology and Microbiology, School of Biological Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

²Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

³Acquired Immunodeficiency Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

*Corresponding Author: **Zohreh Hojati**; Division of Genetics, Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology, School of Biological Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

Email:
z.hojati@sci.ui.ac.ir,
mbashi@sci.ui.ac.ir

*Corresponding Authors: **Mazdak Ganjalikhani-Hakemi**; Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Email:
modehbashi110@gmail.com,
mghakemi@med.mui.ac.ir

Received: 25 Jan, 2020
Accepted: 11 May, 2020

Abstract

Background and Objectives: Tumor-infiltrating regulatory T (TI-Treg) cells perform an important function in cancer immune escape. In this study, the third generation CAR construct was designed against human CD25 antigen as the cell surface biomarker of TI-Treg cells.

Methods: At first, the construct of anti-CD25 CAR was designed. Using RNAfold web server, the RNA secondary structure was evaluated. Also, NK-92 cell line was transduced using lentiviral vectors. Then, the expression level of anti-CD25 CAR RNA, was assessed by qRT-PCR in NK-92 cells transduced with CAR and mock transfer vectors as well as untreated cells.

Results: The RNA secondary structure was stable. Also, the expression level of anti-CD25 CAR RNA in the NK-92 cells transduced by pCDH-513B-1-anti-CD25 CAR transfer vector was significantly higher than NK-92 cells transduced by mock transfer vector and untreated cells ($P < 0.0001$).

Conclusion: The present study on anti-CD25 CAR RNA showed that this type of CAR transcripts were stable and expressed at a high level. In fact, this type of CAR can be further studied in the future as a tool to remove the cancer immune escape in all types of solid and liquid cancers.

Keywords: Computational Biology; Informatics; Bioinformatic; Real-Time Polymerase Chain Reaction; anti-CD25 CAR; Transduction; Tumor Escape- immunology.

DOI: 10.29252/qums.14.2.1

تجزیه و تحلیل‌های ساختار ثانویه RNA و qRT-PCR مرتبط با anti-CD25 CAR بیان‌شده در رده‌ی سلولی NK-92

معین دهباشی^۱، زهره حجتی^{۱*}، مجید متولی باشی^۲، مزدک گنجعلی خانی حاکمی^{۳،۲*}

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های T تنظیم‌کننده‌ی رخنه‌کننده در تومور (TI-Treg) عملکرد مهمی را در فرار سرطان از سیستم ایمنی اجرا می‌کنند. در این پژوهش، نسل سوم سازه‌ی CAR علیه آنتی‌ژن CD25 انسانی به‌عنوان نشانگر زیستی مهم سطح سلول‌های TI-Treg طراحی شده است. **روش بررسی:** ابتدا سازه‌ی anti-CD25 CAR طراحی شد. با استفاده از وب سرور RNAfold، ساختار ثانویه RNA ارزیابی شد. همچنین با استفاده از وکتورهای لنتی و ویروسی، رده‌ی سلولی NK-92 ترابرد شد. سپس سطح بیان anti-CD25 CAR RNA به‌وسیله qRT-PCR در سلول‌های NK-92 ترابردشده با وکتورهای انتقالی CAR و تقلیدی و همچنین سلول‌های تیمارنشده ارزیابی شد.

یافته‌ها: ساختار ثانویه‌ی RNA پایدار بود. همچنین سطح بیان anti-CD25 CAR RNA در سلول‌های NK-92 ترابردشده به‌وسیله‌ی وکتور انتقالی pCDH-513B-1-anti-CD25 CAR به‌طور معنی‌داری بیش از سلول‌های NK-92 ترابردشده با وکتور انتقالی تقلیدی و سلول‌های تیمارنشده بود ($P < 0.0001$).

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر روی anti-CD25 CAR RNA نشان داد رونوشت‌های این نوع CAR پایدار بود و در سطح بالایی بیان شد. در واقع، این نوع CAR می‌تواند در آینده همچون ابزاری برای حذف فرار سرطان از سیستم ایمنی در انواع سرطان‌های جامد و مایع بیشتر بررسی شود.

کلیدواژه‌ها: بیولوژی کامپیوتری؛ بیوانفورماتیک؛ انفورماتیک؛ واکنش زنجیره ای پلیمرز در زمان واقعی؛ anti-CD25 CAR؛ ترابرد؛ فرار تومور-ایمنی‌شناسی.

^۱بخش ژنتیک، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

^۲گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۳مرکز تحقیقات نقص ایمنی اکتسابی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

زهره حجتی؛ بخش ژنتیک، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:

z.hojati@sci.ui.ac.ir

مزدک گنجعلی خانی حاکمی؛ دانشیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران. مرکز تحقیقات نقص ایمنی اکتسابی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:

mghakemi@med.mui.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۲/۲۲

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Dehbashi M, Hojati Z, Motovali-Bashi M, Ganjalikhani-Hakemi M. Analysis of RNA Secondary Structure and qRT-PCR Related to Anti-CD25 CAR Expressed in NK-92 Cell Line. Qom Univ Med Sci J 2020;14(2):1-12. [Full Text in Persian]

مقدمه

پیشرفت‌های اخیر در زمینه سلول‌های T و NK مهندسی ژنتیک شده، به امیدهای فراوانی برای بهره‌گیری از سیستم ایمنی علیه بیماری‌های بدخیم همچون سرطان منجر شده است. یکی از فناوری‌های برجسته که امروزه استفاده‌ی روزافزونی دارد، گیرنده‌های آنتی‌ژنی کایمر یا Chimeric Antigen Receptors (CARs) است. به‌طور کلی، گیرنده‌های آنتی‌ژنی کایمر شامل توالی‌های cDNA کایمر مهندسی شده هستند که همراه با انواع مولکول‌های طراحی شده، شناسایی سطح سلول توموری را به‌منظور انتقال یک پیام سلولی فعال‌کننده T یا NK به عهده می‌گیرند. یکی از ویژگی‌های خاص این فناوری این است که برخلاف گیرنده‌های $\beta\alpha$ سلول T (TCR)، شناسایی آنتی‌ژن‌ها مستقیماً به‌وسیله مولکول‌های CAR صورت می‌گیرد؛ بنابراین، عموماً به اجزای ارائه‌کننده‌ی چند شکل از قبیل آنتی‌ژن‌های لوکوسیت انسانی (HLAs) محدود نیست.

در سال‌های گذشته، زمانی که قطعات ژنی زنجیره‌ی متغیر سبک (V_L) یا سنگین (V_H) آنتی‌بادی‌ها توانستند هدف‌گیری آنتی‌ژن‌ها را صورت دهند، پیدایش فناوری گیرنده‌ی آنتی‌ژنی کایمر نیز صورت گرفت. این زمانی بود که اجزای مربوطه درون یک هترودایمر $\beta\alpha$ TCR جایگزین شدند (۱). گیرنده‌ی پروتئینی CD25 یا زیرواحد α از گیرنده‌ی IL-2 ($IL-2R\alpha$)، یک گلیکو پروتئین غشایی با وزن ۵۵ کیلودالتون است که به‌طور ذاتی و به میزان زیاد بر سطح سلول‌های T تنظیمی یا

Regulatory T cells (Treg) بیان می‌شود و شاخص اصلی این سلول‌هاست. سلول‌های Treg در سیستم ایمنی و به‌ویژه در ناحیه‌ی ریز توموری Tumor microenvironment (TME) با عنوان سلول‌های T تنظیم‌کننده‌ی رخنه‌کننده در تومورها یا (TI-) Tumor-infiltrating Tregs (Tregs) از سلول‌های مؤثر در مهار پاسخ‌های سیستم ایمنی علیه سرطان هستند و موجب فرار سرطان از سیستم ایمنی می‌شوند.

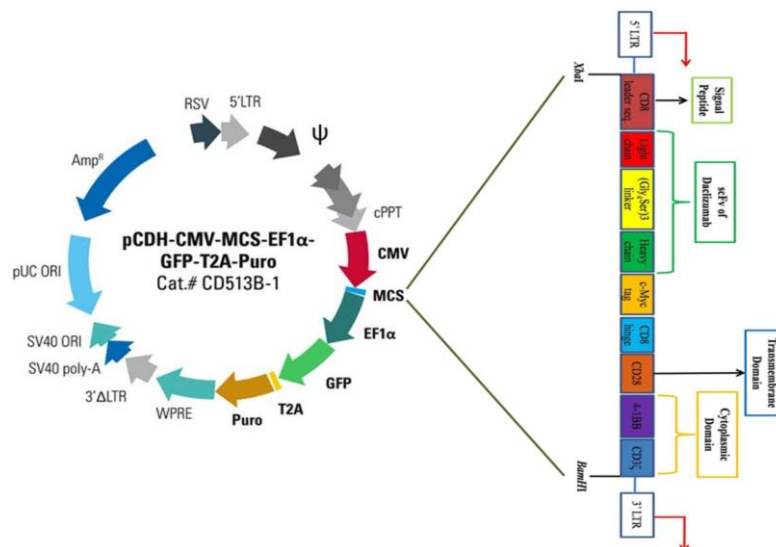
این سلول‌ها نشانگرهای زیستی CD25، CD4، FoxP3 و نقش مهمی در هوموستاز دارند. هوموستاز و توسعه‌ی سلول‌های Treg به‌طور عمده به سایتوکاین IL-2 وابسته است که به CD25 بیان‌شده بر سطح سلول‌های Treg متصل می‌شود. به‌دنبال این فرایند، این سلول‌ها با تولید سایتوکاین‌هایی نظیر IL-10، IL-35، TGF β سبب مهار پاسخ ایمنی می‌شوند (۲). با توجه به این مهم که CD25 نقش مهمی در هوموستاز و توسعه‌ی سلول‌های Treg دارد و آن را به‌عنوان نشانه‌ی پاراکلینیکی برخی از تومورها شناسایی کرده‌اند، آنتی‌بادی مونوکلونال نو ترکیب IgG1 انسانی شده داکلیزوماب (Daclizumab) ایجاد شده است. سازمان غذا و داروی ایالات متحده‌ی آمریکا (FDA) این آنتی‌بادی مونوکلونال را تأیید کرده است که با اتصال به CD25 بر سطح سلول‌های Treg باعث مهار اتصال IL-2 و توقف مسیر پیام‌رسانی JAK/STAT، MEK/Erk و PI3K/Akt برای جلوگیری از زنده‌مانی و تکثیر سلول‌های Treg می‌شوند.

در پژوهش حاضر برای اولین بار، طراحی سازه‌ی نسل سوم CAR علیه آنتی‌ژن CD25 انسانی و مطالعه‌ی بیوانفورماتیکی ساختار ثانویه‌ی anti-CD25 CAR RNA ارزیابی شده است. سپس به کمک سیستم لنتی ویروسی، تراپرد سلول‌های NK-92 با سازه‌ی anti-CD25 CAR صورت گرفت و سطح بیان رونوشت مربوطه با qRT-PCR سنجیده شد.

روش بررسی

ساخت سازه‌ی anti-CD25 CAR

سازه‌ی anti-CD25 CAR به طول ۱۵۵۱ bp، بین دو جایگاه برشی *Xba*I در انتهای ۵' و *Bam*HI در انتهای ۳' وکتور لنتی ویروسی انتقالی نوع کاذب VSV-G بر مبنای HIV-1 با نام pCDH-513B-1 یا CMV-MCS-EF1 α -copGFP-T2A-Puro طراحی شد. (شکل ۱).



شکل شماره ۱: نمودار سازی ژنی anti-CD25 CAR درون وکتور pCDH513B

فلاسک های حاوی رده های سلولی در انکوباتور کشت سلول با دمای 37°C و 5 CO_2 درصد نگهداری شد.

تولید ذرات لنتی ویروسی حاوی سازه

در ادامه، شرکت System Bioscience آمریکا سازه ی مدنظر را سنتز کرد و درون وکتور انتقالی مذکور قرار گرفت. به منظور تولید ذرات لنتی ویروسی، رده ی سلولی Lenti-X 293 T و وکتورهای ps-PAX2.2 و pMD2.G ساخت شرکت آمریکایی Addgene به ترتیب به عنوان رده ی سلولی بسته بندی کننده، وکتور بسته بندی کننده و وکتور پوششی مورد استفاده قرار گرفتند. به طور خلاصه، رده ی سلولی Lenti-X 293 T به تعداد ۶ میلیون سلول در یک فلاسک T75 در ۸ ml محیط DMEM کشت داده شد. به منظور ترادپسی از سویه ی *E. coli* TOP10 و روش شوک حرارتی استفاده شد. به منظور ایجاد ذرات لنتی ویروسی، ترآلودگی هم زمان با $21\ \mu\text{g}$ وکتور ps-PAX2.2، $10/5\ \mu\text{g}$ وکتور pMD2.G و $21\ \mu\text{g}$ وکتور انتقالی حاوی سازه ی pCDH-anti-CD25 CAR در رده ی سلولی Lenti-X 293T با روش رسوب کلسیم-فسفات صورت گرفت. بعد از گذشت ۱۶ ساعت محیط کشت تعویض شد و به کمک میکروسکوپ فلورسنت راندمان ترآلودگی هم زمان ارزیابی شد. محیط رویی حاوی ذرات لنتی ویروسی در زمان های ۴۸، ۷۲ و بعد از ترآلودگی جمع آوری شدند (۴).

از قطعه ی متغیر تک زنجیره ای یا (scFv) Single chain variable fragment مربوط به آنتی بادی مونوکلونال داکلیزوماب به همراه اتصال دهنده ی غنی از گلیاسین و سرین یعنی $(\text{Gly4Ser})_3$ باهدف طراحی و تولید anti-CD25 CAR استفاده شد.

تجزیه و تحلیل محاسباتی در زمینه ی ساختار ثانویه ی رونوشت anti-CD25 CAR

به دنبال طراحی سازه ی مدنظر، به کمک وب سرور RNAfold نشانی

<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi> (۳) ساختار ثانویه anti-CD25 CAR RNA ارزیابی شد.

رده های سلولی و کشت سلول

رده ی سلولی Lenti-X 293T در محیط کشت DMEM ساخت شرکت ایرانی Bio-Idea و رده ی سلولی Jurkat در محیط کشت RPMI 1640 ساخت شرکت ایرانی Bio-Idea غنی شده با ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پنی سیلین-استرپتومایسین کشت داده شد. رده ی سلولی NK-92 در محیط کشت Alpha MEM ساخت شرکت آمریکایی Sigma-Aldrich بدون ریبونوکلئوزیدها و دزوکسی ریبونوکلئوزیدها همراه با $2\ \text{mM}$ L-گلوتامین و $1/5\ \text{mM}$ سدیم بی کربنات کشت داده شد. به منظور غنی سازی آن $0/2\ \text{mM}$ اینوزیتول، $0/1\ \text{mM}$ -۲ مرکاپتواتانول، $0/02\ \text{mM}$ فولیک اسید، $100-200\ \text{U/ml}$ IL-2 نوترکیب انسانی، ۱ درصد پنی سیلین-استرپتومایسین، $12/5$ درصد سرم اسب و $12/5$ درصد FBS به محیط کشت اضافه شد.

تغلیظ و تعیین تیترو ویروس ها

به منظور تغلیظ ذرات لنتی ویروسی ایجاد شده، محیط رویی جمع آوری شده به کمک فیلتر سرنگی $0.45 \mu\text{m}$ فیلتر شد. سپس این مایع رویی به کمک PEG-8000 تغلیظ شد. به دنبال آن، تعیین تیترو با اضافه کردن حجم های متفاوت $1 \mu\text{l}$ ، $4 \mu\text{l}$ و $16 \mu\text{l}$ از ویروس های تغلیظ شده به رده ی سلولی Lenti-X 293T با جمعیت 6×10^6 هزار سلول صورت گرفت. بعد از گذشت ۷۲ ساعت، تعیین تیترو ویروسی به کمک فلوسایتومتر بر اساس میزان بیان GFP به عنوان واحدهای برابر در هر میلی لیتر یا Transducing units/ml (TU/ml) ارزیابی شد (۵).

تراپرد رده ی سلولی NK-92

به طور خلاصه، رده ی سلولی NK-92 در پلیت کشت سلولی ۲۴ خانه ای با جمعیت 6×10^6 هزار سلول در $1/5$ میلی لیتر محیط کشت کامل Alpha MEM کشت داده شد. حدود ۲ ساعت قبل از تراپرد، به میزان 100 U/ml IL-2 به محیط کشت اضافه شد. ذرات ویروسی تعیین تیترو شده با فراوانی آلودگی یا Multiplicity of infection (MOI) ۵۰ و پلی برن با غلظت نهایی $8 \mu\text{g/ml}$ به محیط کشت حاوی NK-92 اضافه شد. به منظور بهبود راندمان تراپرد، سانتریفوژ پلیت کشت سلول حاوی رده ی سلولی NK-92 با دور 360 g به مدت ۹۰ دقیقه در دمای 32°C انجام شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، محیط کشت تعویض و محیط تازه به سلول های NK-92 اضافه شد. بعد از گذشت ۷۲ ساعت، سلول های NK-92 تراپرد شده به کمک میکروسکوپ فلورسنت و تجزیه و تحلیل فلوسایتومتر ارزیابی شدند. در ادامه، سلول های تراپرد شده با آنتی بیوتیک پورومایسین با غلظت $2 \mu\text{g/ml}$ ساخت شرکت Sigma-Aldrich آمریکا گزینش و تا رسیدن به جمعیت مطلوب کشت داده شدند (۶).

انجام روش qRT-PCR

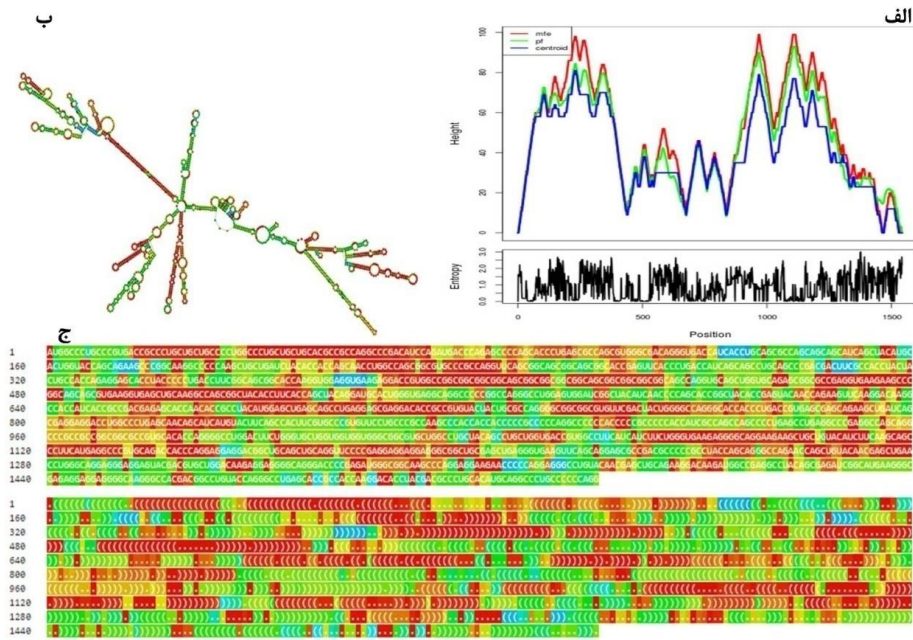
بر اساس پروتکل مربوط به NucleoSpin[®] RNA/Protein kit ساخت شرکت آلمانی Macherey-Nagel GmbH & Co. KG استخراج RNA از رده ی سلولی NK-92 anti-CD25 CAR انجام شد. سنتز cDNA تک رشته ای با 2X RT Pre-Mix Kit ساخت شرکت Biofact کره جنوبی و پروتکل مربوط به آن انجام شد.

سپس آغازگرهای اختصاصی anti-CD25 CAR طراحی شده با نرم افزار AlleleID 7.7 با توالی های F CAR: GACGACTTCGCCACCTACT و R CAR: GTCCTCTTCACCTCCACCTT در نظر گرفته شد.

در این پژوهش از آغازگرهای اختصاصی مربوط به GAPDH به عنوان ژن مرجع شامل F (GAPDH): CGGGAAGCTTGTGATCAATGG و R (GAPDH): GGCAGTGATGGCATGGACTG استفاده شد. میزان بیان رونوشت anti-CD25 CAR با دستگاه Step-One Real-Time thermal cycler ساخت شرکت آمریکایی ABI با سه تکرار و در نظر گرفتن شاهد بدون الگو یا Non-template control (NTC) انجام شد. واکنش qRT-PCR شامل $10 \mu\text{l}$ SYBR Green Master Mix 2x از شرکت Biofact کره جنوبی، $10 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ از هر پرایمر و $1 \mu\text{l}$ از cDNA ($50 \text{ ng}/\mu\text{l}$) در حجم نهایی $20 \mu\text{l}$ تهیه شد. برنامه ی qRT-PCR شامل واسرشت سازی آغازین، 95°C به مدت ۱۵ دقیقه، 95°C به مدت ۲۰ ثانیه، 58°C به مدت ۳۵ ثانیه و 72°C به مدت ۳۰ ثانیه در 40 چرخه و 72°C به مدت ۳ دقیقه برای گسترش نهایی در نظر گرفته شد. همچنین منحنی ذوب دستگاه با اعمال دمای $95-55^\circ\text{C}$ ترسیم و ارزیابی شد. تجزیه و تحلیل میزان بیان رونوشت مدنظر با فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ تعیین شد.

یافته ها**ساختار ثانویه RNA**

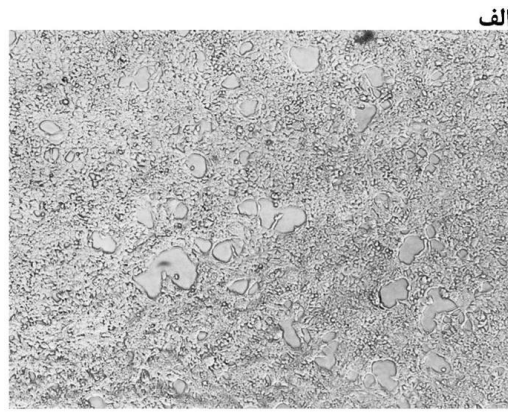
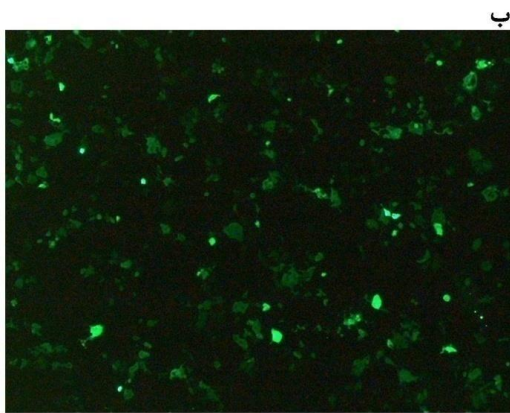
تجزیه و تحلیل ساختار ثانویه ی RNA anti-CD25 نشان داد انرژی آزاد کمینه یا Minimum free energy (MFE) و انرژی آزاد گروه ترمودینامیکی یا Free energy of the thermodynamic ensemble به ترتیب $-701/90 \text{ kcal/mol}$ و $-722/46 \text{ kcal/mol}$ به دست آمد. همچنین ساختار ثانویه ی مرکزی با انرژی آزاد کمینه یا Centroid secondary structure with a minimum free energy برابر $-554/10 \text{ kcal/mol}$ ارزیابی شد. به دنبال آن، ساختار ثانویه ی MFE احتمال تشکیل جفت باز و mountain plot ترسیم شد (شکل ۲).



شکل شماره ۲: نتایج بیوانفورماتیکی ساختار ثانویه ی RNA مربوط به anti-CD25 CAR (الف) mountain plot، (ب) ساختار ثانویه بر اساس انرژی آزاد کمینه، (ج) احتمال تشکیل جفت باز

Lenti-X 293T بیان کننده ی GFP به عنوان سلول هایی با درخشش سبزرنگ بعد از گذشت ۱۶ ساعت در زیر میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شدند (شکل ۳).

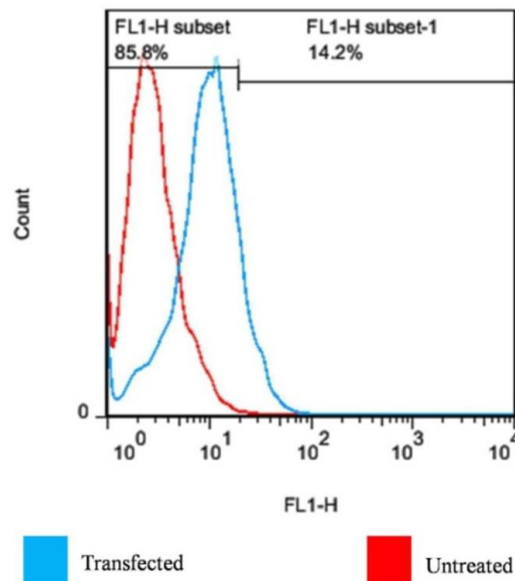
ایجاد رده ی سلولی NK-92 بیان کننده anti-CD25 CAR
به دنبال ترآلودگی هم زمان سه وکتور مذکور، سلول های



شکل شماره ۳: تصاویر میکروسکوپ (الف) نوری و (ب) فلورسنت معکوس با بزرگ نمایی ۴۰ مربوط به سلول های Lenti-X 293T پس از ترآلودگی

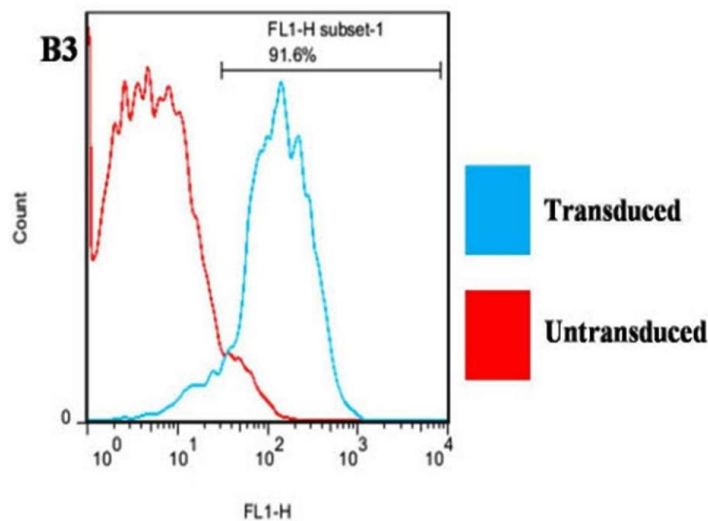
این سلول ها میزان بیان ۱۴/۲ درصد با استفاده از حجم ۱۶ μl از سوپ ویروسی داشتند (شکل ۴).

به منظور تعیین تیترو ویروس های تولید شده، سلول های Lenti-X 293T با فلوسایتمتر تجزیه و تحلیل شدند.

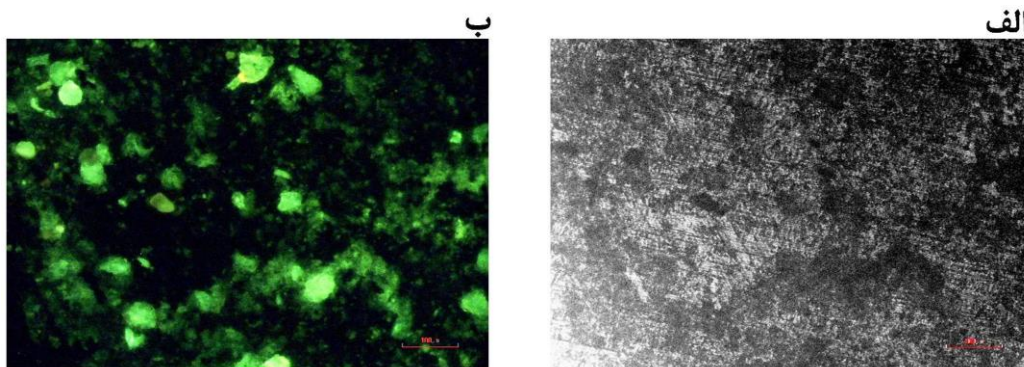


شکل شماره ۴: اندازه‌گیری درصد بیان GFP در سلول‌های Lenti-X 293T حاوی ۱۶ μl ویروس تغلیظ شده دارای سازهی anti-CD25 CAR توسط فلوسایتومتری

بر اساس $MOI=50$ ویروس‌های تغلیظ شده به تراپرد ردهی سلولی NK-92 به میزان ۹۱/۶ درصد منجر شدند (شکل ۵). این یافته با میکروسکوپ فلورسنت (شکل ۶) و زنده‌مانی در برابر غلظت پورومایسین مذکور تأیید شد.



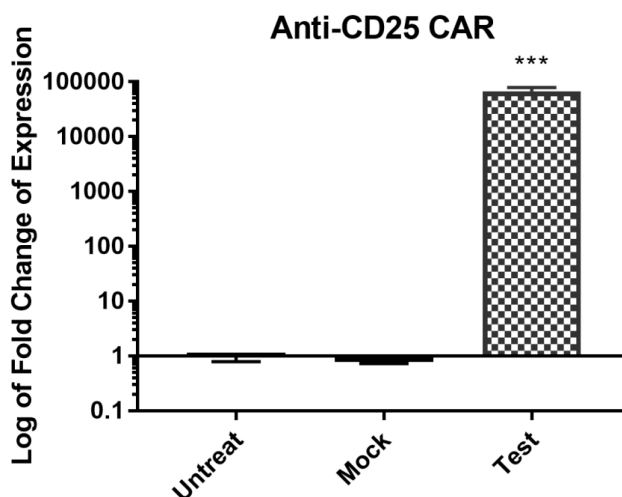
شکل شماره ۵: اندازه‌گیری درصد بیان GFP در سلول‌های NK-92 تراپرد شده با لنتی ویروس‌های حاوی سازهی anti-CD25 CAR توسط فلوسایتومتری



شکل شماره ۶: تصاویر میکروسکوپ (الف) نوری و (ب) فلورسنت معکوس با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ مربوط به ردهی سلولی NK-92 تراپرد شده حاوی سازهی CAR

تراپردشده با وکتور تقلیدی (Mock) و در سلول‌های NK-92 تراپردنشده (شاهد منفی) به کمک qRT-PCR ارزیابی شد. نتایج نشان داد سطح بیان رونوشت anti-CD25 CAR نسبت به نمونه‌ی تقلیدی و شاهد منفی و معنی‌دار است ($P < 0.0001$).

سطح بیان رونوشت anti-CD25 CAR در رده‌ی سلولی NK-92
همان‌طور که در شکل ۷ نشان داده شده است، سطوح بیان رونوشت مذکور در سلول‌های NK-92 تراپردشده با وکتور pCDH-513B-1-anti-CD25 CAR، در سلول‌های NK-92



شکل شماره ۷: نمودار افزایش بیان رونوشت anti-CD25 CAR در سلول‌های NK-92 بیان‌کننده‌ی CAR در مقایسه با سلول‌های تقلیدی و تراپردنشده (کنترل منفی) ($P < 0.0001$)

بحث

درباره‌ی سرطان معده، افزایش میزان سلول‌های Treg با پیش‌آگهی ضعیف در این نوع سرطان همراه بوده است؛ اما همبستگی بین سلول‌های TI-Treg و سرطان معده هنوز مبهم است.

درباره‌ی سرطان روده‌ی بزرگ مشخص شده است که میزان سلول‌های Treg فعال‌شده‌ی تجمع‌یافته بین سلول‌های TI-Tregs با مرحله‌ی پیشرفت تومور مرتبط است که می‌توان از آن به‌عنوان عامل مهمی برای بهبود کارایی روش‌های درمانی استفاده کرد (۱۷). در سرطان لوسمی حاد میلوئیدی یا (AML) Acute myeloid leukemia، سلول‌های بلاست لوسمی به افزایش سلول‌های Treg در ریز محیط توموری (TME) منجر می‌شوند (۱۸).

اوستن و همکاران در سال ۲۰۱۱ دریافتند هدف‌گیری و کاهش جمعیت سلول‌های Treg ممکن است به‌عنوان درمان نویدبخشی برای سرطان AML مورد توجه واقع شود.

سلول‌های Treg اصلی‌ترین مانع درمان موفق سرطان محسوب می‌شوند. در واقع، کاهش نسبت سلول‌های CD8+T به سلول‌های Treg که در ریز محیط توموری (TME) نیز تجمع می‌یابند، با پیش‌آگهی ضعیف، درمان ناموفق و کاهش زنده‌مانی بیماران مبتلا به انواع مختلف سرطان همچون لنفوم غیرهوجکین (۷)، سرطان تخمدان (۸)، سرطان ریه (۹)، گلیوبلاستوما (۱۰)، آدنوکارسینوم پانکراس داکتال (۱۱)، سرطان پستان (۱۲)، سرطان کبد (۱۳)، سرطان دهانه‌ی رحم (۱۴)، ملانوما و دیگر بدخیمی‌ها همبستگی دارد. همچنین برخی گزارش‌ها قاطعانه بر شاخص پیش‌آگهی ضعیف تأکید دارد که با افزایش تعداد سلول‌های Treg در سرطان سر و گردن همبستگی نشان می‌دهد (۱۵).

به‌طور بحث‌برانگیز، دیگر گزارش‌ها وضعیت کاملاً متفاوتی را با افزایش سطح سلول‌های Treg نشان داد که در آن بهبود موضعی و افزایش زنده‌مانی بیماران مبتلا به سرطان سر و گردن را مشخص کرد (۱۶).

سلولی بر پایه‌ی تغییرات ژنتیکی است که در سلول‌های T و NK انجام می‌پذیرد و با عنوان گیرنده‌های آنتی‌ژنی کایمر (CAR) قلمداد می‌شود.

در این پژوهش با بهره‌گیری از داده‌های موجود در انواع سرطان‌های جامد و مایع پیرامون مکانیزم مشترک فرار سرطان‌ها از سیستم ایمنی، برای اولین بار بر این نکته تلاش شد که گیرنده‌ی آنتی‌ژنی کایمر نسل سوم در پرمزیت‌ترین نوع سلول ایمنی یعنی NK علیه آنتی‌ژن CD25 انسانی طراحی شود. در این مطالعه به کمک تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی، ساختار ثانویه‌ی رونوشت anti-CD25 CAR باهدف بررسی پایداری ارزیابی شد. در ادامه، بیان رونوشت مدنظر بعد از ترا برد سلول‌های NK-92 به کمک qRT-PCR سنجیده شد.

به‌طور کلی، بر اساس اصول ترمودینامیک، منفی‌ترین میزان انرژی آزاد در یک ساختار ثانویه RNA، به‌عنوان پایدارترین ساختار RNA شناخته می‌شود. همچنین پیش‌بینی یک ساختار RNA از یک توالی، دربرگیرنده‌ی موضوع اساسی تجزیه و تحلیل این مولکول است. ساختار RNA معمولاً در دو سطح از پیچیدگی شناخته می‌شود. سطح اول، ساختار ثانویه‌ی را تشکیل می‌دهد که نشان‌دهنده‌ی جفت‌شدگی بازی متداول است. این نکته از اینکه هر ریبونوکلئوتید، یک جفت‌شدگی بازی را شکل دهد یا ندهد، متفاوت است. برهمکنش‌های ایجادکننده‌ی ساختار ثانویه معمولاً قدرتمندتر از آن‌هایی است که تعیین‌کننده‌ی سطح بعدی پیچیدگی ساختاری یعنی ساختار سوم باشد؛ بنابراین، این امر تفسیر ساختار سوم برهمکنش‌ها را از اجزای ساختار ثانویه امکان‌پذیر می‌سازد. ساختار ثانویه‌ی anti-CD25 CAR RNA، نشان داد شاخص‌های مهمی شامل انرژی آزاد کمینه (MFE)، انرژی آزاد گروه ترمودینامیکی و ساختار ثانویه‌ی مرکزی با انرژی آزاد کمینه در سطح مناسبی قرار داشتند که نشان‌دهنده‌ی پایداری ساختار این RNA طویل بود که از نظر طولی از نه توالی رمزگردان تشکیل شده بود.

تاکنون هیچ مطالعه‌ای بر اساس تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی ساختار ثانویه‌ی RNA در انواع سازه‌های CAR صورت نگرفته است. در اینجا می‌توان پیشنهاد کرد که در صورت استفاده از این تجزیه و تحلیل، راندمان میزان بیان رونوشت سازه‌های پیچیده‌ی

همچنین گزارش شده است سطوح بالاتر جمعیت سلول‌های Treg توانسته است به‌عنوان نشانگر تشخیصی زودهنگام برای سرطان لوسمی مزمن لنفوئیدی یا Chronic lymphocytic leukemia (CLL) محسوب شود (۱۹).

دونل و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان دادند حذف سلول‌های Treg در بیماران لوسمی حاد لنفوئیدی یا

(Acute lymphoblastic leukemia) ALL پیش‌ساز B ممکن است آن‌ها را از وضعیت بدون پاسخ به درمان با آنتی‌بادی مونوکلونال بلیناتوموماب (Blinatumomab) به وضعیت پاسخگو به درمان با این آنتی‌بادی تبدیل کند (۲۰). همچنین نشان داده شده است نیولوماب (Nivolumab) به‌عنوان آنتی‌بادی بلوکه‌کننده PD-1 ممکن است از تهاجم ایمنی تومور در بیماران مبتلابه لنفوم هوجکین بازگشت‌کننده و مقاوم جلوگیری کند.

نتیجه‌گیری شده است که در سرطان‌های پروستات (۲۱)، ریه (۲۲)، معده و مری (۲۳)، دهان (۲۴) و ALL (۲۵) با وضعیت پیشرفته، سلول‌های CD4+CD25high T cell رخنه‌کننده در تومورها به‌شکل وسیعی اطراف تومورها تجمع می‌یابند. همچنین در برخی سرطان‌ها همچون پستان و ریه، جمعیت سلول‌های CD4+CD25+FOXP3+ Tregs به‌طور گسترده‌ای همراه با گسترش بیماری افزایش می‌یابد (۲۶).

یکی از مهم‌ترین سرنخ‌ها مربوط به نقش پررنگ این سلول‌ها در درمان ناموفق سرطان به مطالعه‌ی اونیزوکا و همکاران و شیمیزو و همکاران در سال ۱۹۹۹ بازمی‌گردد. در این دو مطالعه نشان داده شد حذف سلول‌های CD4+CD25+ Tregs به کمک درمان با آنتی‌بادی ضد CD25 می‌تواند حذف انواع تومورها را در شرایط *in vivo* و *in vitro* افزایش دهد که نتیجه‌ی آن گسترش ایمنی‌زایی موفق علیه تومورهاست (۲۷، ۲۸).

بر اساس داده‌های گسترده‌ی موجود، طیف وسیعی از سرطان‌های جامد و مایع مکانیزم مشترکی برای فرار از سیستم ایمنی دارند. بدین ترتیب، مبارزه با فرار انواع تومورها از سیستم ایمنی و شکستن مقاومت و ویژگی بازگشت‌کننده‌ی این نوع سرطان‌ها می‌تواند نویدبخش درمان‌های موفق برای بیماران باشد. جدیدترین نوع درمان سرطان از بین روش‌های درمانی که در حال حاضر نتایج بسیار موفق‌تری را در پی داشته است، روش‌های ایمنی درمانی

هدف برای اولین بار نوع جدیدی از این گیرنده در سلول‌های NK-92 به منظور هدف‌گیری آنتی‌ژن CD25 انسانی طراحی شد. مطالعه‌ی حاضر پیرامون رونوشت anti-CD25 CAR، با دیدگاه بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی نشان داد رونوشت این نوع CAR پایدار بود و در سطح بالایی بیان شد. در واقع، این نوع CAR آینده می‌تواند به‌عنوان ابزاری برای برطرف کردن فرار سرطان از سیستم ایمنی در انواع سرطان‌های جامد و مایع بیشتر بررسی شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان‌نامه‌ی دکترای تخصصی رشته‌ی زیست‌شناسی-ژنتیک مولکولی گرفته شده که آقای معین دهباشی آن را انجام داده است. پروپوزال مربوطه با شماره‌ی ۸۴۸۹ در معاونت پژوهشی دانشگاه اصفهان تصویب شده است. بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه اصفهان، ریاست محترم دانشکده‌ی علوم و فناوری‌های زیستی و ریاست محترم گروه سلولی و مولکولی و میکروبیولوژی به دلیل فراهم‌آوری امکانات و تجهیزات پژوهشی لازم کمال قدردانی و سپاس را داریم.

CAR افزایش یابد که هر یک از قطعات cDNA متعددی تشکیل شده است و هزینه‌های تولید این دسته از مولکول‌های درمانگر گران‌قیمت کاهش خواهد یافت.

در گام بعدی این پژوهش، میزان بیان رونوشت anti-CD25 CAR ارزیابی شد. نتایج مربوط به آن نشان داد در رده‌ی سلولی NK-92 تراپردشده با وکتور انتقالی pCDH-513B-1-anti-CD25 CAR نسبت به سلول‌های NK-92 تراپردشده با وکتور تقلیدی و سلول‌های تراپردشده افزایش بیان چشمگیر و معنی‌داری وجود دارد.

نتیجه‌گیری

امروزه با وجود پیشرفت‌های خیره‌کننده در هدف‌گیری آنتی‌ژن‌های توموری با انواع CAR، هنوز مسائل مهمی همچون بازگشت سرطان، درمان ناموفق و فرار سرطان از سیستم ایمنی بی‌پاسخ مانده است. بر اساس منابع مذکور، به‌نظر می‌رسد حذف سلول‌های TI-Treg در خلال درمان ممکن است به‌طور بالقوه نتایج مثبتی را در انواع سرطان‌های جامد و مایع، بر اساس مکانیزم مشابه، به‌همراه داشته باشد؛ بنابراین، در مطالعه‌ی حاضر با این

References:

1. Kuwana Y, Asakura Y, Utsunomiya N, Nakanishi M, Arata Y, Itoh S, et al. Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;149(3):960-8. PMID: 3122749
2. Cheng J, Li L, Liu Y, Wang Z, Zhu X, Bai X. Interleukin-1 α induces immunosuppression by mesenchymal stem cells promoting the growth of prostate cancer cells. *Mol Med Rep* 2012;6(5):955-60. PMID: 22895682
3. Lorenz R, Bernhart SH, Höner Zu Siederdisen C, Tafer H, Flamm C, Stadler PF, et al. ViennaRNA package 2.0. *Algorithm Mol Biol* 2011;6(1):26. PMID: 22115189
4. Klages N, Zufferey R, Trono D. A stable system for the high-titer production of multiply attenuated lentiviral vectors. *Mol Ther* 2000;2(2):170-6. PMID: 10947945
5. Kutner RH, Zhang XY, Reiser J. Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nat Protoc* 2009;4(4):495-505. PMID: 19300443
6. Savan R, Chan T, Young, HA. Lentiviral gene transduction in human and mouse NK cell lines. *Methods Mol Biol* 2010;612:209-21. PMID: 20033643
7. Yang ZZ, Novak AJ, Stenson MJ, Witzig TE, Ansell SM. Intratumoral CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2006;107(9):3639-46. PMID: 16403912

8. Leffers N, Gooden MJ, de Jong RA, Hoogeboom BN, ten Hoor KA, Hollema H, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58(3):449-59. PMID: 18791714
9. Tao H, Mimura Y, Aoe K, Kobayashi S, Yamamoto H, Matsuda E, et al. Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. *Lung Cancer* 2012;75(1):95-101. PMID: 21719142
10. Sayour EJ, McLendon P, McLendon R, De Leon G, Reynolds R, Kresak J, et al. Increased proportion of FoxP3+ regulatory T cells in tumor infiltrating lymphocytes is associated with tumor recurrence and reduced survival in patients with glioblastoma. *Cancer Immunol Immunother* 2015;64(4):419-27. PMID: 25555571
11. Tang Y, Xu X, Guo S, Zhang C, Tang Y, Tian Y, et al. An increased abundance of tumor-infiltrating regulatory T cells is correlated with the progression and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One* 2014;9(3):e91551. PMID: 24637664
12. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol* 2006;24(34):5373-80. PMID: 17135638
13. Gao Q, Qiu SJ, Fan J, Zhou J, Wang XY, Xiao YS, et al. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol* 2007;25(18):2586-93. PMID: 17577038
14. Shah W, Yan X, Jing L, Zhou Y, Chen H, Wang Y. A reversed CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes and a high percentage of CD4(+)/FOXP3(+) regulatory T cells are significantly associated with clinical outcome in squamous cell carcinoma of the cervix. *Cell Mol Immunol* 2011;8(1):59-66. PMID: 21200385
15. Liang YJ, Liu, HC, Su YX, Zhang TH, Chu M, Liang LZ, et al. Foxp3 expressed by tongue squamous cell carcinoma cells correlates with clinicopathologic features and overall survival in tongue squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol* 2011;47(7):566-70. PMID: 21641272
16. Mandal R, Şenbabaoğlu Y, Desrichard A, Havel JJ, Dalin MG, Riaz N, et al. The head and neck cancer immune landscape and its immunotherapeutic implications. *JCI Insight* 2016;1(17):e89829. PMID: 27777979
17. Lin YC, Mahalingam J, Chiang JM, Su PJ, Chu YY, Lai HY, et al. Activated but not resting regulatory T cells accumulated in tumor microenvironment and correlated with tumor progression in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer* 2013;132(6):1341-50. PMID: 22907255
18. Zhou Q, Munger ME, Highfill SL, Tolar J, Weigel BJ, Riddle M, et al. Program death-1 signaling and regulatory T cells collaborate to resist the function of adoptively transferred cytotoxic T lymphocytes in advanced acute myeloid leukemia. *Blood* 2010;116(14):2484-93. PMID: 20570856
19. Weiss L, Melchardt T, Egle A, Grabmer C, Greil R, Tinhofer I. Regulatory T cells predict the time to initial treatment in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2011;117(10):2163-9. PMID: 21523729
20. Duell J, Dittrich M, Bedke T, Mueller T, Eisele F, Rosenwald A, et al. Frequency of regulatory T cells determines the outcome of the T-cell-engaging antibody blinatumomab in patients with B-precursor ALL. *Leukemia* 2017;31(10):2181-90. PMID: 28119525
21. Yokokawa J, Cereda V, Remondo C, Gulley JL, Arlen PM, Schlom J, et al. Enhanced functionality of CD4+ CD25highFoxP3+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14(4):1032-40. Link
22. Liu L, Yao J, Ding Q, Huang S. CD4+ CD25 high regulatory cells in peripheral blood of NSCLC patients. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2006;26(5):548-51. PMID: 17219964

23. Kono K, Kawaida H, Takahashi A, Sugai H, Mimura K, Miyagawa N, et al. CD4(+)CD25 high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55(9):1064-71. PMID: 16328385
24. Lim KP, Chun NA, Ismail SM, Abraham MT, Yusoff MN, Zain RB, et al. CD4+CD25hiCD127low regulatory T cells are increased in oral squamous cell carcinoma patients. *PLoS One* 2014;9(8):e103975. PMID: 25153698
25. Niedźwiecki M, Budziło O, Zieliński M, Adamkiewicz-Drożyńska E, Maciejka-Kemblowska L, Szczepański T, et al. CD4⁺CD25^{high}CD127^{low/-} FoxP₃⁺ regulatory T cell subpopulations in the bone marrow and peripheral blood of children with ALL: brief report. *J Immunol Res* 2018;2018:1292404. PMID: 30003111
26. Okita R, Saeki T, Takashima S, Yamaguchi Y, Toge T. CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with breast cancer and non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2005;14(5):1269-73. PMID: 16211295
27. Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor α) monoclonal antibody. *Cancer Res* 1999;59(13):3128-33. PMID: 10397255
28. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+ CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 1999;163(10):5211-8. PMID: 10553041