خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۹ شماره ۱ بهار ۹۱ (۱۸-۸)

مقاله پژوهشی

افزایش بیان گیرنده آنتی‌ژن کایمریک بر سطح لنفوسیت‌های T به کمک الحاق ژنومی

فرنوش جعفری ایری سفلی[۱]، فاطمه رهبری‌زاده[۲]، محمد جواد رسایی[۳]، سید حمید آقایی بختیاری[۴]، سپیده خالقی[۴]

چکیده

سابقه و هدف

فعال‌سازی اختصاصی سیستم ایمنی به ویژه لنفوسیت‌های T ، یکی از اهداف اساسی در حوزه ایمونوتراپی سرطان است. به منظور القای سلول‌های ایمنی فرد بیمار، از گیرنده‌های کایمریکی که حاوی خاصیت اتصال ویژه به آنتی‌ژن‌ها هستند، استفاده شده است تا لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک را فعال کنند. گیرنده کایمریک، متشکل است از قسمت متصل شونده به آنتی‌ژن از آنتی‌بادی که از طریق یک مولکول اتصال‌دهنده خارج سلولی به ناحیه داخل غشایی و نیز دومین‌های سیتوپلاسمی شروع کننده سیگنالینگ لنفوسیتی متصل می‌باشد. هدف از این بیان پایدار و افزایش یافته CAR (Chimeric Antigen Receptor) بر سطح سلول‌های T ، فعال شدن مؤثر سیستم ایمنی بر علیه سلول‌های توموری بود.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، نواحی متغیر آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین شتری(VHH یا نانوبادی) به جای قسمت هدف گیرنده آنتی ژن در ساختار گیرنده کایمریک استفاده شد. برای بیان پایدار و افزایش یافته گیرنده کایمریک حاوی VHH، از سیستم اینتگراز PhiC31 به منظور الحاق ژن گیرنده کایمریک در داخل ژنوم سلول‌های T استفاده شد. سازه‌های بیان‌کننده گیرنده‌های کایمریک و اینتگراز PhiC31 به داخل رده سلولی Jurkat ، کوترانسفکت گردیدند و بیان گیرنده‌های کایمریک در روزهای اول و سی‌ام بعد از ترانسفکشن، با روش semi-quantitative RT-PCR اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها

نتایج تحقیق در روز سی‌ام نشان داد که کوترانسفکشن سازه‌های بیانی اینتگراز فاژ PhiC31 و سازه‌های حاوی CAR ، منجر به بیان پایدار و افزایش یافته این گیرنده‌ها می‌شود.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج تحقیق، آنزیم اینتگراز PhiC31 ، قابلیت استفاده در ایمونوتراپی به واسطه سلول‌های T حاوی گیرنده کایمریک را دارد.

کلمات کلیدی: اینتگراز، کانسر، ایمونوتراپی

تاریخ دریافت : ۹۰/۳/۱
تاریخ پذیرش : ۹۰/۸/۱۱

۱ـ دانشجوی PhD بیوتکنولوژی پزشکی ـ دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران
۲ـ مؤلف مسؤول: PhD بیوشیمی بالینی ـ دانشیار گروه بیوتکنولوژی پزشکی ـ دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵
۳- PhD بیوشیمی ـ استاد گروه بیوتکنولوژی پزشکی ـ دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران
۴ـ دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی ـ دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-07-02]

مقدمه

سرطان، یک مشکل تهدیدکننده حیات در سرتاسر جهان و یکی از مهم‌ترین علل مرگ و میر می‌باشد. سرطان‌ها از تکثیر کنترل نشده و انتشار کلون‌های سلول‌های تغییر یافته ایجاد می‌شوند. این احتمال که سرطان می‌تواند به وسیله پاسخ‌های ایمنی اختصاصی ریشه‌کن شود، در حال بررسی است. سلول‌های توموری، از سلول‌های میزبان منشاء می‌گیرند و بنابراین در بسیاری از موارد، شبیه سلول‌های طبیعی هستند. از سوی دیگر، اکثر تومورها، آنتی‌ژن‌های کمی را بیان می‌کنند که ممکن است به عنوان بیگانه شناسایی شوند و در نتیجه، اکثر تومورها، ایمونوژنیسیته ضعیفی دارند(۲، ۱). مکانیسم اصلی ایمنی تومور، کشتن سلول‌های توموری به وسیله لنفوسیت‌های T سایتوتوکسیک +CD8 (T سل تراپی) است(۴، ۳). سه روش عمده برای T سل تراپی وجود دارد:

الف) جداکردن سلول‌های T علیه یک آنتی‌ژن خاص از بدن فرد؛ در این روش سلول‌های T مستقیماً از بیوپسی تومور جدا می‌شوند. بعد از جداسازی لنفوسیت‌ها، عملکرد آن‌ها علیه آنتی‌ژن‌های سرطانی خاص ارزیابی می‌شود و لنفوسیت‌های انتخاب شده با کمک سایتوکاین‌ها در محیط کشت تکثیر شده و به بیمار منتقل می‌شوند.

ب) تولید سلول‌های T علیه آنتی‌ژن‌های سرطانی با مهندسی ژنتیک TCR (گیرنده سلول T) .

ج) گیرنده آنتی‌ژن کایمریک(CAR= Chimeric Antigen Receptor)؛ در این روش نواحی متغیر رشته‌های α و β TCR با VH (ناحیه متغیر آنتی‌بادی از زنجیره سنگین) و VL (ناحیه متغیر آنتی‌بادی از زنجیره سبک) یک آنتی‌بادی منوکلونال جایگزین می‌شوند. با انتقال این گیرنده کایمریک به سلول‌های T ، این سلول‌ها قادر به شناسایی هدف‌های توموری خود و کشتن آن‌ها می‌باشند.

از بین این سه روش در این تحقیق، از روش گیرنده کایمریک استفاده شد.

دانشمندان بر آن بودند که خصوصیات منحصر به فرد سلول‌های T شامل نفوذ مؤثر در تومور، ترشح سایتوکاین و سایتوتوکسیسیتی را با خصوصیات آنتی‌بادی(ویژگی بالا علیه آنتی‌ژن‌ها) ادغام کنند تا اختصاصی‌ترین پاسخ‌ها را علیه تومورها ایجاد نمایند، به این منظور برای فایق آمدن به محدودیت‌های ایمونوتراپی سلولی انتخابی و برای ایجاد روش درمانی که به افراد بیمار با نوع خاصی از سرطان وابسته نباشد، برای اولین بار در جهان ساخت گیرنده کایمریک دارای نانو بادی در آزمایشگاه ما انجام شد، که از چهار جزء اصلی تشکیل شده است(۶، ۵). این اجزا شامل:

الف) مولکول متصل شونده به آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی که در بیشتر مطالعه‌ها از آنتی‌بادی تک رشته‌ای(scFv = single-chain variable fragment) که از اتصال VL و VH با کمک متصل‌کننده(linker) پپتیدی به وجود می‌آید استفاده شده است ولی در این تحقیق به جای scFv از آنتی‌بادی تک دومینی شتری(VHH یا نانوبادی) استفاده شد.

ب) بازوی خارج سلولی فضاساز(Extracellular spacer region) که در این مطالعه نواحی CH2 و CH3 مولکول IgG3 با یک و دو ناحیه لولا به عنوان بازوی خارج سلولی فضاساز به کار گرفته شد.

ج) قطعه سیگنال‌دهنده که در این تحقیق CD3ζ به عنوان قطعه سیگنال‌دهنده به کار رفت.

د) قطعه کمک محرک که در این تحقیق از قطعه CD28 به عنوان قطعه کمک محرک در ساخت گیرنده کایمریک استفاده شد.

برای اولین بار اشهار و همکاران رویکرد گیرنده کایمریک را بنا نهادند و در آن خصوصیات سلول‌های T با خصوصیات آنتی‌بادی تلفیق شد و برای اولین بار ویلکی و همکاران گزارش کردند که تومور مارکر MUC1 را می‌توان با سلول‌های بیان‌کننده گیرنده کایمریک هدف‌گیری کرد(۸، ۷). آن‌ها از scFv که از هیبریدومای HMFG2 جداسازی شده بود و دومین‌های سیگنالینگ CD28 و CD3ζ استفاده کردند و نشان دادند که در رشد تومورها در موش، تاخیر ایجاد شد(۸). هدف از این مطالعه بیان پایدار و افزایش یافته CAR بر سطح سلول‌های T جهت فعال شدن مؤثر سیستم ایمنی بر علیه سلول‌های توموری بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. مشکل اصلی

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-07-02]

گیرنده‌های کایمریک، منشاء موشی مولکول scFv می‌باشد که در بدن انسان ایجاد ایمونوژنیسیته می‌کند(۹). برای حل این مشکلات باید از نوعی آنتی‌بادی که همولوژی بالایی با آنتی‌بادی‌های انسانی داشته و دارای اندازه کوچکی نیز باشد استفاده کرد. در سال ۱۹۹۳در سرم انواع شترهای یک کوهانه و لاما، نوع منحصر به فردی از آنتی‌بادی‌هایی که فاقد رشته سبک هستند شناسایی شد. این آنتی‌بادی‌های شتری که به آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین (HCAb=Heavy Chain Antibody) معروف شده‌اند، نسبت به همتای خود در آنتی‌بادی‌های معمولی به علت غیاب اولین دومین CH1 وزن کمتری دارند و فقط از طریق تک دومین VHشان(که برای تفاوت نسبت به VH معمولی VHH گفته می‌شود)، به آنتی‌ژن وصل می‌شوند. به این ترتیب تک دومین VHH، کوچک‌ترین قطعه آنتی‌بادی متصل شونده به آنتی‌ژن است که قطعه کامل آن وزنی در حدود ۱۵-۱۲ کیلودالتون دارد(۱۱، ۱۰).

نانوبادی‌ها، ویژگی‌های منحصر به فردی دارند که باعث شده بتوان از آن‌ها جهت هدف‌گیری آنتی‌ژن‌های توموری استفاده کرد. از آن جمله می‌توان به ایمونوژنیسیته کم، تمایل و اختصاصیت بالا به آنتی‌ژن اشاره کرد(۱۳، ۱۲). انسانی کردن رزیدوهای خاصی در مولکول نانوبادی(به خصوص در ۱۰ اسید آمینه سطحی آن‌ها)، اثری بر ویژگی‌های نانوبادی نداشته است و حتی در مواردی باعث پایدارتر شدن ساختار آن‌ها شده است(۹). در گروه تحقیقاتی ما، برای اولین بار از مولکول VHH یا نانوبادی به عنوان قطعه متصل شونده به آنتی ژن توموری در ساختار گیرنده‌های کایمریک استفاده شده است(۱۴). آنتی‌ژنی که در مطالعه حاضر مورد هدف‌گیری قرار می‌گیرد، آنتی‌ژن MUC1 است که از آنتی‌ژن‌های سطحی در دسترس برای هدف‌گیری با آنتی‌بادی بوده و در طیف وسیعی از سرطان‌ها بیان آن مشاهده شده است.

مشکل دیگر این روش، الحاق ناخواسته و بیان پایین گیرنده کایمریک در سلول‌های ترانسفکت شده است، که برای استفاده از آن‌ها در موارد کلینیکی و درمانی خوب نیست. ویجتنز و همکارانش این گونه گزارش کرده‌اند که تراکم بالای گیرنده‌های کایمریک روی سطح سلول‌های T، منجر به لیز شدن بهتر سلول‌های توموری شده است(۱۵).

تاکنون بیشتر از وکتورهای رتروویروسی به منظور بیان بالای این گیرنده‌ها بر روی سطح سلول استفاده شده است. به همین دلیل در این تحقیق تلاش شد که این گیرنده را به صورت پایدار و در محل‌های ویژه در داخل ژنوم الحاق کنیم تا بیان بالا و پایدار در سلول‌های T ایجاد شود. برای الحاق اختصاصی پلاسمید بیان‌کننده گیرنده کایمریک، از آنزیم اینتگراز فاژ PhiC31 باکتری Streptomyces lividans استفاده شده است. اینتگراز PhiC31 منجر به الحاق پلاسمید در موقعیت‌های ترجیحی از ژنوم پستانداران می‌شود و باعث بیان پایدار و طولانی مدت ژن خارجی الحاق شده در ژنوم می‌گردد(۱۶).

اینتگراز فاژ PhiC31 ، موجب نوترکیبی مؤثر بین توالی attP ژنوم فاژ و توالی attB در کروموزم باکتری می‌شود. هر دو این توالی‌ها یعنی هم attB و هم attP ، تکرارهای معکوسی را دارند که ناحیه کراسینگ اور مرکزی را در بر می‌گیرند و آنزیم ریکامبیناز بعد از اتصال به این قطعات، موجب بریده شدن آن‌ها از مرکز(ناحیه کراسینگ اور) می‌شود. سپس این قطعات به یکدیگر متصل شده و به این ترتیب منجر به الحاق ژنوم فاژ در ژنوم باکتری می‌شوند.

نتایج مطالعه‌ها نشان می‌دهد که قطعاتی مشابه attB و attP ، در ژنوم انسان و پستانداران وجود دارد که به ترتیب Pseudo attB و Pseudo attP نامیده می‌شوند و نوترکیبی بین attB که در پلاسمید گذاشته شده است با Pseudo attP های ژنومی انسانی انجام می‌شود(۱۸، ۱۷).

بهترین راه برای استفاده از سیستم PhiC31 در سلول‌های پستانداران این است که attB را روی سازه ژنی که قرار است در ژنوم الحاق شود، قرار دهند تا در جایگاه‌های Pseudo attP موجود در ژنوم الحاق گردد. به منظور افزایش کارایی آنزیم اینتگراز PhiC31 و تسریع در ورود این آنزیم به هسته، توالی هدایت به هسته (NLS یا Nuclear Localization Signal) را به ناحیه انتهای C آن اضافه کردیم. این توالی اسیدآمینه‌ای، امکان بازشناسی و انتقال پروتئین‌ها توسط کمپلکس منفذ هسته‌ای را فراهم می‌کند(۱۹).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-07-02]

تکثیر قطعه attB و کلون کردن این قطعه به داخل سازه‌های حاوی CAR :

وکتورهای pCMV-1 Hinge CAR و pCMV-2 Hinge CAR، وکتورهای بیان‌کننده گیرنده‌های کایمریک هستند که گیرنده‌های کایمریک آن‌ها از قطعات: ۱) CD3ζ به عنوان قطعه سیگنال‌دهنده، ۲) CD28 به عنوان قطعه کمک تحریک کننده ۳) ناحیه CH2 و CH3 با یک و دو منطقه لولا از مولکول IgG3 به عنوان ناحیه فضاساز و ۴) منطقه VHH ویژه MUC1 ، تشکیل شده است(۹). برای الحاق ژن‌های این گیرنده‌ها به داخل ژنوم سلول‌های T ، لازم است که قطعه attB به داخل این سازه‌ها کلون گردد. بدین منظورقطعه attB با استفاده از آغازگرهای attB جلوبرنده: 5'- GTA CGA GAT CTG TCG ACA TGT AGG TCAC- 3' و attB معکوس: 5'- AGC TGA GAT CTT GCC CGC CGT GAC CG -3' و از روی سازه حاوی این قطعه یعنی سازه PTA-attB (Michele Calos از دانشگاه استنفورد) توسط واکنش PCR تکثیر شد و پس از هضم آنزیمی قطعه attB و نیز سازه‌های pCMV-1 Hinge CAR و pCMV-2 Hinge CAR با آنزیم Bgl II ، این قطعه به داخل سازه‌های مذکور کلون گردید. سپس با واکنش هضم آنزیمی و تعیین توالی مورد بررسی قرار گرفت.

ساخت سازه pCMV-INT-NLS :

در این تحقیق به منظور بررسی اثرات قطعه NLS (Nuclear Localization Signal) در انتقالPhiC31 به داخل هسته و نیز عملکرد اینتگراز PhiC31 و به منظور بررسی بیان ژن INT-NLS تحت کنترل پروموتر CMV و هم چنین مقایسه آن با پروموتر CAG ، ژن آنزیم و NLS را در وکتور pCDNA3.1/HYGRO$^{(+)}$ کلون نمودیم که روش این کلونینگ به شرح زیر است: توالی آنزیم و NLS (INT-NLS) از وکتور pCAG-INT-NLS (دکتر Ralf Kuehn از Institute of Developmental Generics, Helmholtz, Germany) با استفاده از آنزیم XbaI که اولاً می‌توانست INT-NLS را به طور کامل خارج کند و ثانیاً در جایگاه کلونینگ(MCS) از pCDNA3.1/HYGRO$^{(+)}$ وجود داشته باشد، هضم کردیم. سپس این قطعه را در وکتور pCDNA3.1/HYGRO$^{(+)}$ ساب کلون نموده، جهت تایید حضور این ژن در پلاسمید pCDNA3.1/HYGRO$^{(+)}$ ، واکنش هضم آنزیمی و تعیین توالی بر روی وکتور حاصله انجام شد.

انتقال هم زمان سازه‌های CAR و سازه‌های بیان‌کننده آنزیم اینتگراز PhiC31 به سلول‌های Jurkat (E6.1) :

قدم بعدی در این تحقیق، آماده‌سازی رده سلولی لنفوسیتی T به منظور کوترانسفکشن آن‌ها توسط سازه‌های فوق بود. از رده سلولی Jurkat (E6.1) به این منظور استفاده شد. کشت سلول‌های Jurkat در محیط کشت RPMI-1640 (حاوی ۱۰٪ FBS) و در انکوباتور حاوی ۵٪ CO_2 صورت گرفت. به منظور ترانسفکشن سلول‌ها، از محلول لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (اینویتروژن) استفاده شد که برای ترانسفکشن سلول‌های یوکاریوتی، یک عامل بسیار مناسب به شمار می‌رود. محلول لیپوفکتامین حاوی زیر واحدهای لیپیدی است که در محیط آبی به شکل لیپوزوم در می‌آید و با ماده‌ای(DNA) که لازم است به داخل سلول ترانسفکت شود، کمپلکس تشکیل می‌دهد. این لیپوزوم‌های حاوی DNA ، می‌توانند به غشای پلاسمایی سلول‌های زنده فیوژ شوند و به سلول وارد شوند، سپس اسیدهای نوکلئیک وارد سیتوپلاسم و یا هسته سلول(یعنی محل بیان یا رونویسی) می‌شوند. تفاوت استفاده از لیپوفکتامین و الکتروپوریشن در این است که در روش الکتروپوریشن، سلول‌ها در اثر جریان الکتریکی دچار مرگ و میر می‌شوند و در نتیجه نهایتاً میزان بازده ترانسفکشن پایین‌تر است، در حالی که در لیپوفکشن با استفاده از عوامل لیپیدی(مثل لیپوفکتامین)، انتقال اسیدهای نوکلئیک به درون سلول‌ها بدون آسیب رساندن به این سلول‌ها انجام می‌شود.

یک روز قبل از ترانسفکشن، در هر چاهک پلیت ۶ خانه، $۴/۸ \times ۱۰^{۵}$ سلول اضافه شد و روز بعد محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک (۶۱ mg/mL پنی‌سیلین و ۱۰۰ mg/mL استرپتومایسین) از روی سلول‌ها برداشته شد و سپس محیط بدون آنتی‌بیوتیک و حاوی ۱٪ FBS به آن‌ها اضافه شد. روز ترانسفکشن، ابتدا با محیط تازه RPMI-1640 بدون آنتی‌بیوتیک حاوی ۱٪ FBS ، تعویض محیط انجام شد. ۸ میکرولیتر از لیپوفکتامین با ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-07-02]

RPMI-۱۶۴۰ خام (بدون FBS و آنتی‌بیوتیک) مخلوط شد. ۲/۵ µg از هر کدام از سازه‌های CAR و آنزیم اینتگراز با هم مخلوط و سپس به ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ خام(بدون FBS و آنتی‌بیوتیک) اضافه و به آرامی تکان داده شد.

محلول‌های حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. بعد از این مرحله، هر دو با هم مخلوط شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند و سپس کمپلکس نهایی قطره قطره در نقاط مختلف هر چاهک ریخته شد. بعد از انجام ترانسفکشن، ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 انکوبه گردیدند. سپس محیط کشت سلول‌ها تعویض شد و این بار از محیط RPMI-۱۶۴۰ کامل(حاوی آنتی‌بیوتیک و ۱۰٪ FBS) استفاده شد. موارد تیمار سلولی شامل:

۱- سلول‌های بدون تیمار

۲- سلول‌های ترانسفورم شده با وکتور خالی / pCDNA3.1 HYGRO (+)

۳- سلول ترانسفورم با سازه pCMV-1 Hinge CAR

۴- سلول ترانسفورم با سازه pCMV-2 Hinge CAR

۵- سلول‌های کوترانسفورم با pCMV-1 Hinge CAR-attB و pCAG-INT-NLS

۶- سلول‌های کوترانسفورم با pCMV-1 Hinge CAR-attB و pCMV-INT-NLS

۷- سلول‌های کوترانسفورم با pCMV-2 Hinge CAR-attB و pCMV-INT-NLS است.

بررسی بیان ژن در سطح mRNA:

به منظور بررسی بیان ژن گیرنده‌های کایمریک در هر کدام از تیمارهای مختلف، واکنش semi-quantitative RT-PCR صورت گرفت. برای این آزمون، تعداد ۵×۱۰^{۵} از سلول‌های هر چاهک استفاده شد.

در این مرحله از سلول‌های تیمار شده و کنترل، تخلیص RNA صورت گرفت. بر روی mRNA ها، واکنش ساخت cDNA طبق دستورالعمل کیت سنتز cDNA (شرکت فرمنتاز) انجام شد. بر طبق این دستورالعمل بعد از اضافه کردن ۰/۵ µg آغازگر oligodT به ۵۰۰ ng از Total RNA و انکوباسیون در دمای ۷۰ ºC به مدت ۵ دقیقه، به ترتیب آنزیم RT ، dNTP ، Rnase inhibitor اضافه شدند و مخلوط واکنش به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ ºC انکوبه گردید. در نهایت آنزیم Reverse transcriptase به مخلوط اضافه شد و مخلوط در دمای ۴۲ ºC به مدت یک ساعت انکوبه گردید. سپس با استفاده از نمونه cDNAهای تهیه شده، واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای P2: 5´-TGC TCT AGA TGG CTG TTA GCG AGG-3´ و P3: 5´-CCG CTC GAG TTT TGG GTG CTG GTG GTG GTT G-3´ که قطعه CD28-CD3ζ را تکثیر می‌کنند، انجام شد.

این قطعه در سلول‌های ترانسفکت نشده به دلیل عدم حضور گیرنده کایمریک بیان نمی‌شود بنابراین میزان بیان آن در سلول‌های ترانسفکت شده، نشانگر میزان بیان در سلول‌هایی است که ترانسفکشن آن‌ها با موفقیت صورت گرفته است. در این تحقیق از بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد و برای هر نمونه یک واکنش PCR نیز با آغازگرهای بتا اکتین جلوبرنده 5'-TCC CTG GAG AAG AGC TAC G-3' و معکوس 5'-GTA GTT TCG TGG ATG CCA CA-3' انجام شد.

ارزیابی محصول PCR:

برای ارزیابی نتایج PCR ، از الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز و آنالیز با نرم‌افزار Uvitec استفاده گردید. تمام مراحل تخلیص RNA ، ساخت cDNA و انجام PCR در روز یک و نیز روز سی بعد از ترانسفکشن انجام و تکرار شد. تخلیص RNA با استفاده از کیت MN (آلمان، Macherey Nagel) طبق دستورالعمل زیر انجام شد. پس از لیز سلولی با بافرهای لیزکننده، لیزات سلولی بر روی ستون‌های سیلیکا ژل برده شد و بعد از چندین مرحله شستشو توسط محلول‌های موجود در کیت، در نهایت RNA از ستون جدا شده و در آب مقطر عاری از آنزیم Rnase حل گردید. میزان کمی RNA استخراج شده با قرائت جذب نوری(OD) آن در ۲۶۰nm اندازه‌گیری شد. برای ساخت cDNA برای این که به میزان مساوی RNA برای همه واکنش‌ها استفاده شود، از نمونه حاوی کمترین غلظت، ۱۰۸ برداشته شد و از طریق فرمول N1V1=N2V2

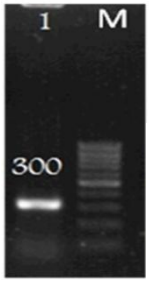
[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-07-02]

مقادیر لازم برای بقیه موارد محاسبه شد. به این ترتیب برای واکنش‌های ساخت cDNA ، مقادیر مساوی RNA ریخته شد و سپس واکنش PCR بر روی cDNA حاصل از مرحله قبل انجام شد. میزان بیان توسط نرم‌افزار Uvitec اندازه‌گیری شد و اعداد، نمایانگر میزان بیان گیرنده کایمریک و کنترل داخلی بتا اکتین، برای رسم نمودار به کار گرفته شدند.

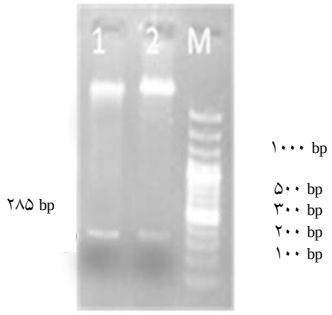
یافته‌ها

نتیجه تکثیر قطعه attB و کلون کردن این قطعه به داخل سازه‌های pCMV-1 Hinge CAR و سازه pCMV-2 Hinge CAR :

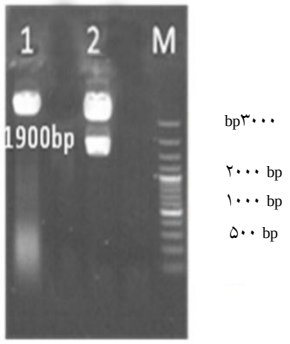
بعد از انجام PCR ، محصول بر روی ژل ۱٪ برده شد و در ناحیه حدود ۲۸۵ bp باند، قطعه attB مشاهده شد(شکل ۱). این قطعه سپس در سازه‌های سازه pCMV-1 Hinge CAR و سازه pCMV-2 Hinge CAR کلون شد. برای تایید کلونینگ با روش هضم آنزیمی، از آنزیم BglII استفاده شد. سازه‌ها قبل از کلونینگ دارای یک جایگاه برش برای آنزیم BglII می‌باشند. در صورتی که قطعه attB وارد سازه شده باشد، آنزیم BglII در دو جایگاه وکتور را می‌شکند و یک باند ۲۸۵ جفت بازی از سازه خارج خواهد شد. محصول واکنش هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شده و خروج باند ۲۸۵ جفت بازی در اثر هضم تایید شد(شکل ۲). پس از تایید کلونینگ به روش هضم آنزیمی، بر روی دو نمونه سازه حاوی attB (pCMV-1 Hinge CAR-attB و pCMV-2 Hinge-attB CAR) تعیین توالی انجام شد(شرکت فزابیوتک) و نتیجه تعیین توالی مؤید عمل کلونینگ بود.



شکل۱: نتیجه تکثیر قطعه attB . ستون ۱ نمایانگر باند ۲۸۵ bp قطعه attB می‌باشد و M نمایانگر مارکر است.



شکل ۲: نتیجه هضم آنزیمی تایید کلونینگ قطعه attB . ستون ۱ پلاسمید pCMV-1 Hinge CAR-attB و ستون ۲ پلاسمید pCMV-2 Hinge CAR-attB را نشان می‌دهد. M نمایانگر مارکر است.



شکل ۳: نتیجه هضم آنزیمی وکتورهای pCAG-INT-NLS و pCDNA3.1/Hygro(+) با آنزیم *XbaI* . ستون ۱ نمایانگر وکتور pCDNA3.1/HYGRO(+) خطی شده و ستون ۲ نشانگر وکتور pCAG-INT-NLS است که قطعه INT-NLS از آن خارج شده است. M نمایانگر مارکر است.

نتیجه ساخت سازه pCMV-INT-NLS :

سازه‌های pCAG-INT-NLS و pCDNA3.1/ HYGRO (+) هر دو توسط آنزیم XbaI مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند که در نتیجه آن وکتور pCDNA3.1 خطی می‌شود و از وکتور pCAG-INT-NLS ژن INT-NLS که ۱۹۰۰ bp است خارج می‌شود(شکل ۳). وکتور pCDNA3.1/ HYGRO (+) خطی شده و قطعه INT-NLS از روی ژل تخلیص شدند. وکتور حاصل (pCMV-INT-NLS) با تعیین توالی و هضم آنزیمی تایید شد.

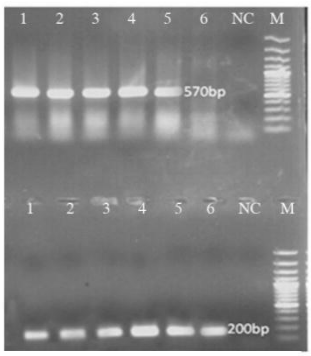
نتایج اندازه‌گیری میزان بیان در روز یک و سی‌ام بعد از ترانسفکشن:

نتایج حاصل از بیان mRNA در روز یک در سلول‌های

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-07-02]

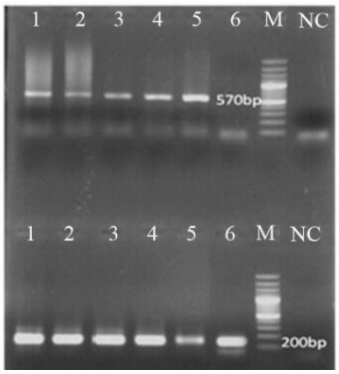
جدول ۱ : میزان بیان CD28-ZETA و بتا اکتین در سلول‌های Jurkat در روز ۱ و ۳۰ بعد از ترانسفکشن

تیمارهای مختلف	بیان CD28-ZETA روز ۱	بیان بتا اکتین روز ۱	بیان CD28-ZETA روز ۳۰	بیان بتا اکتین روز ۳۰
pCMV-1 hinge CAR	۵۳۳۳۶ ± ۴/۶	۲۶۵۴۱ ± ۳/۴	۷۳۹۸ ± ۲/۵	۲۶۲۵۴ ± ۴/۶۱
pCMV-2 hinge CAR	۴۹۴۴۳ ± ۴/۲	۲۶۳۳۷ ± ۳/۸	۱۵۸۲ ± ۲/۳	۲۶۴۹۶ ± ۵
pCAG-INT-NLS و pCMV-1 hinge CAR-attB	۴۹۶۹۴ ± ۴/۳	۲۶۹۴۵ ± ۳/۵	۲۵۲۶ ± ۲/۵	۲۶۳۴۳ ± ۴/۲
pCMV-INT-NLS و pCMV-1 hinge CAR-attB	۳۷۷۰۳ ± ۳/۸	۲۶۷۲۹ ± ۳/۵	۸۴۱۶ ± ۳/۲	۲۶۳۱۰ ± ۳/۸
pCMV-INT-NLS و pCMV-2 hinge CAR-attB	۶۱۸۲۰ ± ۴/۵	۲۶۷۲۵ ± ۳/۸	۴۰۰۴۷ ± ۲/۶	۲۷۰۰۵ ± ۴/۳
pCDNA3.1 HYGRO (+)	۰ ± ۰	۲۶۷۰۰ ± ۴/۱	۰ ± ۰	۲۶۳۹۴ ± ۳/۵



شکل۴: نتایج PCR سلول‌های Jurkat در روز ۱ بعد از ترانسفکشن. ستون ۱ نمایانگر PCR روی نمونه pCMV-1 Hinge CAR ، ستون ۲ نمایانگر PCR روی نمونه pCMV-2 Hinge CAR، ستون ۳ نمایانگر PCR روی نمونه کوترانسفکت pCMV-1 Hinge pCAG-INT-NLS CAR-attB ، ستون ۴ نمایانگر PCR روی نمونه کوترانسفکتpCMV-1 Hinge CAR -attB وpCMV-INT-NLS ، ستون ۵ نمایانگر PCR روی نمونه کوترانسفکت pCMV-2 Hinge CAR -attB و pCMV-INT-NLS ، ستون ۶ نمایانگر PCR روی نمونه(+)pCDNA3.1/HYGRO است. NC نمایانگر سلول‌های تیمار نشده و M نمایانگر مارکر است و ردیف پایین عیناً نمونه‌های ردیف بالا است ولی با آغازگرهای بتا اکتین.

Jurkat ، دال بر این است که نتایج کوترانسفکشن وکتورهای pCMV-INT و pCMV-1 Hinge CAR– attB ، ۱/۵ برابر بیشتر از تیمار بدون اینتگراز است و نتایج بیان mRNA بقیه حالات کوترانسفکشن، بیشتر و یا حداقل برابر تیمار بدون اینتگراز است در حالی که در روز سی، نتایج کوترانسفکشن وکتورهای pCMV-2 Hinge CAR – attB و pCMV-INT-NLS حدوداً سی برابر بیشتر از pCMV-2 Hinge CAR بدون اینتگراز می‌باشد و این نتایج به وضوح قدرت Integrase-NLS را در افزایش بیان و نیز پایداری بیان نشان می‌دهد(شکل‌های ۴ و ۵ و جدول ۱).



شکل۵: نتایج PCR سلول‌های Jurkat در روز ۳۰ بعد از ترانسفکشن. ستون ۱ نمایانگر PCR روی نمونه pCMV-1 Hinge CAR و ستون ۲ نمایانگر PCR روی نمونه pCMV-2 Hinge CAR، ستون ۳ نمایانگر PCR روی نمونه کوترانسفکت pCMV-1 Hinge CAR-attB و pCAG-INT-NLS ، ستون ۴ نمایانگر PCR روی نمونه کوترانسفکت pCMV-1 Hinge CAR -attB وpCMV-INT-NLS ، ستون ۵ نمایانگر PCR روی نمونه کوترانسفکت pCMV-2 Hinge CAR -attB و pCMV-INT-NLS ، ستون ۶ نمایانگر PCR روی نمونه (+)pCDNA3.1/HYGRO است. NC نمایانگر سلول‌های تیمار نشده و M نمایانگر مارکر است و ردیف پایین عیناً نمونه‌های بالا است ولی با آغازگرهای بتا اکتین.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-07-02]

بحث

در طی دهه گذشته، ایمونوتراپی یکی از محورهای توجه در درمان سرطان بوده است و دانشمندان امید فراوانی به درمان سرطان با این روش دارند. پیشرفت‌های دانش ما از سیستم ایمنی و نیز شناسایی آنتی‌ژن‌های موجود بر روی سلول‌های توموری، باعث پیشبرد استراتژی‌های جدید در ایمونوتراپی شده و ایمونوتراپی را به یکی از اختصاصی‌ترین روش‌های درمان سرطان تبدیل نموده است(۲۰). یکی از روش‌های مهم در درمان ایمونوتراپی غیر فعال، ایمونوتراپی سلولی انتخابی می‌باشد. ایمونوتراپی سلولی نیز خود دارای استراتژی‌های متنوعی است که یکی از این استراتژی‌ها، استفاده از گیرنده‌های کایمریک در سطح سلول‌های T می‌باشد. در این روش از اختصاصیت آنتی‌بادی، برای شناسایی آنتی‌ژن‌های سرطانی و خصوصیت ترشح سایتوکاین و کشندگی سلولی لنفوسیت‌های T استفاده می‌شود. با استفاده از یک سازه ژنی حاوی گیرنده کایمریک، سلول‌های T قابلیت شناسایی آنتی‌ژن‌های سرطانی مختلف را به دست می آورند. در این سازه ژنی، آنتی بادی نقش شناسایی آنتی‌ژن را به عهده دارد و قسمت‌هایی که از لنفوسیت T جدا شده‌اند(CD28 و CD3ζ) نقش ایجاد پیام در لنفوسیت T را دارا هستند. ایجاد پیام نهایتاً در لنفوسیت T منجر به فعالیت سیتوتوکسیسیتی می‌شود(۲۲، ۲۱). برای اولین بار اشهار و همکاران، گیرنده کایمریک هترودایمر را در سال ۱۹۸۹ با جایگزینی ژن‌های ناحیه متغیر رشته‌های α و TCR β با VH و VL یک آنتی‌بادی مونوکلونال در دو سازه مجزا ابداع کردند(۲۲). سپس این سازه‌ها به داخل سلول‌های T ترانسفکته شدند و با انتقال این گیرنده به سلول‌های T، این سلول‌ها قادر به شناسایی هدف‌های توموری خود و کشتن آن‌ها گردیدند. اولین طراحی گیرنده کایمریک اثبات کرد که سلول‌های T بیان‌کننده این گیرنده‌ها، می‌توانند فعال شوند و هدف سلولی خودرا دریک مسیر غیر وابسته به MHC لیز کنند. در سال ۱۹۹۳ ، نسل دوم گیرنده‌های کایمریک پا به عرصه ظهور گذاشت که در آن‌ها اشهار و همکاران از آرایه تک زنجیره‌ای برای ساخت گیرنده کایمریک استفاده کردند. در این روش، scFv یک آنتی بادی، از طریق یک رابط خارج سلولی به دومین‌های داخل غشایی و داخل سلولی سلول‌های T متصل شده است. این آرایه جدید، شناسایی آنتی‌بادی را با پیام‌رسانی سلول‌های T با یک پروتئین منفرد انجام می‌دهد. یکی از موارد عدم موفقیت در استفاده از گیرنده‌های کایمریک که در بسیاری از کارآزمایی‌های بالینی هم به آن برخورد شده است، مشکل ایمونوژنیسیته scFv با دلیل منشا موشی آن است. هر چند که پیشرفت‌های فراوانی در انسانی کردن این آنتی بادی‌ها صورت گرفته است ولی هنوز هم این آنتی‌بادی‌ها ایمنی‌زا هستند(۲۳، ۱۷). آنتی بادی‌های زنجیره سنگین طبیعی سرم شترسانان که فاقد زنجیره سبک و دومین CH1 می‌باشند، دارای خصوصیات منحصر به فردی از نظر حلالیت و پایداری هستند که می‌توانند جایگزینی مناسب برای scFv در گیرنده کایمریک باشند. قطعه آنتی‌بادی تک دومینی(VHH)، ویژگی بسیار خوبی برای آنتی‌ژن‌های مربوطه دارند و از نظر ویژگی و تمایل، قابل مقایسه با scFv هستند. از طرف دیگر و مهم‌تر این که VHH شباهت بسیار زیادی با اعضای خانواده VH3 انسانی دارد که به جهت همولوژی بالا، بر خلاف scFv ایمونوژنیسیته ایجاد نمی‌کند. ضمناً VHH به خاطر اندازه بسیار کوچک، قابلیت شناسایی اپی‌توپ‌های منحصر به فرد فضایی که از دسترس بقیه انواع آنتی بادی دور هستند را دارد. با در نظر گرفتن خصوصیات VHH ، برای حل مشکل ایمنی‌زایی گیرنده‌های کایمریک و به منظور کوچک کردن اجزای این گیرنده در آزمایشگاه، به جای scFv از VHH برای ساخت گیرنده کایمریک استفاده شد. به این منظور در گام اول، آنتی‌بادی نوترکیب تک دومینی، از کتابخانه ژنی شتر ایمن شده با بافت های سرطانی وآنتی‌ژن سرطانی MUC1 جدا سازی شد. قطعه CD3ζ به عنوان قطعه سیگنال دهنده، CD28 به عنوان قطعه کمک محرک و ناحیه CH2 و CH3 با یک و دو ناحیه لولا از مولکول IgG3 به عنوان ناحیه فضاساز انتخاب شدند و به داخل وکتور pCDNA3.1/HYGRO(+) کلون و سازه‌های pCMV-1 Hinge CAR و pCMV-2 Hinge CAR ساخته شدند(۱۴). مشکل دیگر استفاده از گیرنده‌های کایمریک، الحاق ناخواسته و بیان پایین آن‌ها در سلول‌های موقتاً ترانسفکت

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-07-02]

شده، می‌باشد. به عبارتی چون پلاسمید در داخل سلول‌های یوکاریوتی تکثیر نمی‌شود، بعد از ترانسفکشن به مرور زمان تعداد سلول‌های T حاوی پلاسمید نوترکیب ضمن تکثیر سلول‌ها، رقیق و کم خواهند شد. از طرفی حتی در مواردی که الحاق تصادفی (Random Integration) وجود دارد، پلاسمید یوکاریوتی در محل‌های نامشخص و حتی شاید نزدیک به ژن‌های انکوژن الحاق می‌شود که برای استفاده از سلول‌های T ترانسفکت شده حاوی وکتور دارای گیرنده کایمریک، یک مشکل عمده محسوب می‌شود. در راستای حل این مشکل، در این تحقیق تلاش شد که گیرنده کایمریک حاوی VHH را به صورت پایدار و در محل‌های ویژه در داخل ژنوم سلول های T الحاق کنیم تا بیان بالا و پایدار به دست آوریم. به منظور بررسی میزان بیان گیرنده کایمریک حاوی نانو بادی علیه آنتی‌ژن MUC1 با استفاده از آنزیمPhiC31 و نیز آنزیمPhiC31 متصل به توالی NLS ، به دو گیرنده ساخته شده توسط بختیاری(pCMV-1 Hinge CAR و pCMV-2 Hinge CAR)، قطعه ژنی attB اضافه شد و پس از کوترانسفکشن همراه با وکتورهای حاوی اینتگراز و نیز حاوی اینتگراز به همراه NLS (تحت پروموتر CMV و CAG) به داخل سلول‌های Jurkat بیان شده در سطح RNA ، مورد بررسی قرار گرفت(۱۴). با توجه به نتایج RT-PCR که بعد از سی روز بر روی سلول‌های ترانسفکت شده انجام شد، بیان پایدار و افزایش یافته ژن گیرنده کایمریک در سلول‌های Jurkat به اثبات رسید، که مؤید الحاق ژن در ژنوم و تائید تاثیر اینتگراز PhiC31 در افزایش و پایداری بیان در سلول‌های T می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد که بالاترین عملکرد مربوط به گیرنده کایمریک با منطقه فضاساز حاوی دو لولا (pCMV-2 Hinge CAR -attB) در شرایط کوترانسفکشن با pCMV-INT-NLS است که می‌توان گفت گیرنده حاوی دو ناحیه لولا، دارای بیان بالاتری در سطح mRNA است که این منجر به افزایش تراکم بالاتر پروتئین گیرنده در سطح سلول خواهد شد و بیان طولانی مدت‌تر گیرنده یعنی افزایش حدود سی برابری بیان(نسبت به نمونهpCMV-2 Hinge CAR بدون آنزیم اینتگراز) در روز سی بعد از ترانسفکشن، دال بر کارایی آنزیم اینتگراز PhiC31 می‌باشد. ویجتنز و همکارانش گزارش کرده‌اند که تراکم بالای CAR بر روی سطح سلول‌های T، منجر به لیز سلول‌های توموری حاوی مقادیر متوسط از آنتی‌ژن وابسته به تومور می‌شود(۱۴). انتقال ژن توسط رترو ویروس‌ها منجر به بیان پایدار CAR در سلول‌های T می‌گردد ولی از طرفی خطر الحاق تصادفی نیز وجود دارد. ولی در مورد آنزیم اینتگراز PhiC31 ، تنها تعداد جایگاه‌های معدودی در ژنوم گزارش شده است و تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر فعال شدن انکوژن‌های سلولی به دنبال الحاق توسط این آنزیم وجود ندارد. این جایگاه‌ها در ژنوم سلول‌های T نیز مطالعه و بررسی شده‌اند(۲۴). گروهی از محققین، پلاسمید بیان‌کننده اینتگراز PhiC31 و پلاسمید حاوی attB را به داخل رده‌های سلولی T شامل (−)ED40515 و Jurkat ، کوترانسفکت کرده‌اند و ورود پلاسمید حاوی attB را به داخل ژنوم سلول‌های T ردیابی کرده‌اند. آن‌ها چندین جایگاه الحاق را در ژنوم معرفی کرده‌اند که دو جایگاه در نواحی بین ژنی روی کروموزوم‌های ۱۳ و ۱۸ قرار گرفته‌اند و بیشترین نرخ الحاق در سلول‌های هماتوپوئیتیک در این نواحی بوده است(۲۵).

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق، بیان‌کننده کارآیی مؤثر آنزیم اینتگراز PhiC31 در الحاق ژن‌های گیرنده‌های کایمریک به داخل ژنوم سلول‌های T است و استفاده از این آنزیم یک راه مؤثر برای تولید سلول‌های T دارای سازه گیرنده کایمریک ضد سرطانی به صورت پایدار و با بیان افزایش یافته به منظور استفاده در ایمونوتراپی سرطان می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی است و با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و نیز کمیته زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس(TMU-88-8-67) انجام شده است.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-07-02]

References :

1- Duong CP, Westwood JA, Berry LJ, Darcy PK, Kershaw MH. Enhancing the specificity of T-cell cultures for adoptive immunotherapy of cancer. Immunotherapy 2011; 3(1): 33-48.
2- Stagg J, Johnstone RW, Smyth MJ. From cancer immunosurveillance to cancer immunotherapy. Immunol Rev 2007; 220: 82-101.
3- Eshhar Z. Adoptive cancer immunotherapy using genetically engineered designer T-cells: First steps into the clinic. Curr Opin Mol Ther 2010; 12(1): 55-63.
4- Tey SK, Bollard CM, Heslop HE. Adoptive T-cell transfer in cancer immunotherapy. Immunol Cell Biol 2006; 84(3): 281-9.
5- Hombach A, Abken H. Costimulation tunes tumor-specific activation of redirected T cells in adoptive immunotherapy. Cancer Immunol Immunother 2007; 56(5): 731-7.
6- Eshhar Z. The T-body approach: redirecting T cells with antibody specificity. Handb Exp Pharmacol 2008; 181: 329-42.
7- Gross G, Gorochov G, Waks T, Eshhar Z. Generation of effector T cells expressing chimeric T cell receptor with antibody type-specificity. Transplant Proc 1989; 21(1 Pt 1): 127-30.
8- Wilkie S, Picco G, Foster J, Davies DM, Julien S, Cooper L, *et al*. Retargeting of human T cells to tumor-associated MUC1: the evolution of a chimeric antigen receptor. J Immunol 2008; 180 (7): 4901-9.
9- Vincke C, Loris R, Saerens D, Martinez-Rodriguez S, Muyldermans S, Conrath K. General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. J Biol Chem 2009; 284(5): 3273-84.
10- Revets H, De Baetselier P, Muyldermans S. Nanobodies as novel agents for cancer therapy. Expert Opin Biol Ther 2005; 5(1): 111-24.
11- Van Bockstaele F, Holz JB, Revets H. The development of nanobodies for therapeutic applications. Curr Opin Investig Drugs 2009; 10(11): 1212-24.
12- Ulrichts H, Silence K, Schoolmeester A, de Jaegere P, Rossenu S, Roodt J, *et al*. Antithrombotic drug candidate ALX-0081 shows superior preclinical efficacy and safety compared with currently marketed anti platelet drugs. Blood 2011; 118(3): 757-65.
13- Bakhtiari SH, Rahbarizadeh F, Hasannia S, Ahmadvand D, Iri-Sofla FJ, Rasaee MJ. Anti-MUC1 nanobody can redirect T-body cytotoxic effector function. Hybridoma (Larchmt) 2009; 28(2): 85-92.
14- Weijtens ME, Hart EH, Bolhuis RL. Functional balance between T cell chimeric receptor density and tumor associated antigen density: CTL mediated cytolysis and lymphokine production. Gene Ther 2000; 7(1): 35-42.
15- Sorrell DA, Kolb AF. Targeted modification of mammalian genomes. Biotechnol Adv 2005; 23(7-8): 431-69.
16- Calos MP. The phiC31 integrase system for gene therapy. Curr Gene Ther 2006; 6(6): 633-45.
17- Chalberg TW, Portlock JL, Olivares EC, Thyagarajan B, Kirby PJ, Hillman RT, *et al.* Integration specificity of phage phiC31 integrase in the human genome. J Mol Biol 2006; 357(1): 28-48.
18- Andreas S, Schwenk F, Küter-Luks B, Faust N, Kühn R. Enhanced efficiency through nuclear localization signal fusion on phage PhiC31-integrase: activity comparison with Cre and FLPe recombinase in mammalian cells. Nucleic Acids Res 2002; 30(11): 2299-306.
19- Krüger C, Greten TF, Korangy F. Immune based therapies in cancer. Histol Histopathol 2007; 22(6): 687-96.
20- Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-call receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. Proc Natl Acad Sci U S A 1989; 86(24): 10024-8.
21- Stancovski I, Schindler DG, Waks T, Yarden Y, Sela M, Eshhar Z. Targeting of T lymphocytes to Neu/HER2-expressing cells using chimeric single chain Fv receptors. J Immunol 1993; 151(11): 6577-82.
22- Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, Wang G, Eshhar Z, Mavroukakis SA, *et al*. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. Clin Cancer Res 2006; 12(20 Pt 1): 6106-15.
23- Thistlethwaite F, Mansoor W, Gilham DE, Hawkins RE. Engineering T-cells with antibody-based chimeric receptors for effective cancer therapy. Curr Opin Mol Ther 2005; 7(1): 48-55.
24- Chalberg TW, Portlock JL, Olivares EC, Thyagarajan B, Kirby PJ, Hillman RT, *et al.* Integration specificity of phage phiC31 integrase in the human genome. J Mol Biol 2006; 357(1): 28-48.
25- Ishikawa Y, Tanaka N, Murakami K, Uchiyama T, Kumaki S, Tsuchiya S, *et al.* Phage phiC31 integrase-mediated genomic integration of the common cytokine receptor gamma chain in human T-cell lines. J Gene Med 2006; 8(5): 646-53.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-07-02]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2012; 9(1): 8-18

Original Article

High-expression of chimeric antigen receptor on T lymphocytes by genomic insertion

Jafari Iri Sofla F.[1], Rahbarizadeh F.[1], Rasaee MJ.[1], Aghaii Bakhtiari H.[1], Khaleghi S.[1]

[1]Depatment of Medical Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares Medical University, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

The specific activation of the immune system especially T lymphocytes has been a long-term goal of cancer immunotherapy. In an approach to induce the patient's own immune cells, chimeric antigen receptors (CAR) were used to activate cytotoxic T lymphocytes. The CAR consists of an antigen binding domain of antibody molecule linked through an extracellular linker to transmembrane and cytoplasmic domains of lymphocyte-triggering moieties.

Materials and Methods

In our research group, variable domains of heavy chain antibodies (VHH or nanobody) derived from camelids were used instead of the antigen-binding domain in chimeric receptors constructs. To obtain a stable and increased expression of VHH harboring CAR, the PhiC31 integrase system was used for CAR gene integration into the T-cell genome. Constructs expressing CAR and PhiC31 integrase were co-transfected into the Jurkat cell line and CAR expression was quantified after one day and 30 days after transfection by a semi-quantitative RT-PCR method.

Results

Our results on day 30 confirmed that co-transfection of PhiC31 integrase constructs and CAR expressing constructs resulted in stable and high expression of the receptors.

Conclusions

Based on our results, we conclude that PhiC31 integrase enzyme can be used for immunotherapy of cancer mediated by T cells expressing chimeric recetors.

Key words: Integrase, Cancer, Immunotherapy

Received:22 May 2011
Accepted:2 Nov 2011

Correspondence: Rahberizadeh F., PhD of Medical Biochemistry. Associate Professor of Medical Biotecnology. Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University.
P.O. Box: 14115-331, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82883884 ; Fax : (+9821) 88013030
E-mail: *Rahbarif@modares.ac.ir*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-07-02]