

هندسة بروتينين خيمريين مآشوبين مثنوي ومثلوثي من GITRL الفأري المدمج بالمنطقة Fc γ للغلوبولين المناعي البشري واستعراف خصائصهما

د. لمى يوسف^{1,2}

دكتوراه فلسفة في العلوم الطبية الحيوية-صيدلة سريرية، أستاذ مساعد في الصيدلة السريرية والمناعة.

¹ قسم الصيدلانيات والتكنولوجيا الصيدلانية، كلية الصيدلة، جامعة دمشق، سورية.

² الهيئة العامة للتقانة الحيوية، دمشق، سورية.

الملخص:

خلفية: تضمّ فوق عائلة عامل نخر الورم (TNFSF) عدداً من اللجان والمستقبلات ذات الأدوار المحورية في تكاثر الخلايا المناعية وتمايزها وبقائها واستماتتها. يُعبّر عن لجان هذه العائلة كبروتينات وظيفية مثلوثية عابرة للغشاء الخلوي أو ذوابة باستثناء اللجين الفأري المثنوي لمستقبل عامل النخر الورمي المحرض بالغليكوكورتيكويد (mGITRL). يسهم التأثير بين GITR و GITRL في تنظيم ردّ الفعل المناعي ويمتلك استهدافه كموناً علاجياً مناعياً واعداداً مضاداً للسرطان وأمراض المناعة الذاتية. يشكل إنتاج بروتينين مآشوبين مثنوي ومثلوثي من GITRL الفأري خطوة مفتاحية تسهم في الاستقصاءات ما قبل السريرية حول الخصائص العلاجية المحتملة لـ GITRL. الهدف: إنتاج بروتينات GITRL مآشوية مثلوثية trimer ومثنوية dimer وتقييم خصائصها وقدرتها على الارتباط بـ GITR وتفعيل الخلايا التائية. الطرق: صمّم بروتينان خيمريان مآشوبان وأنتجا في الخط الخلوي لمبيض الهامستر الصيني (CHO). اكتنف البروتين المثنوي النطاق خارج الخلوي للبروتين الفأري mGITRL ملتحمًا مع الشدفة المتبلورة Fc γ للضد البشري hIgG1، في حين أنتج البروتين المثلوثي بتعبير مشترك لـ hFc γ . mGITRL مع mGITRL.HA. اختبرت قدرة البروتينين على الارتباط بـ mGITR المعبر عنه في Jurkat البشرية بمقاييس التدفق الخلوي والترسيب المناعي المشترك، وقيمت فعاليتيهما في تحريض للمفاويات التائية على التكاثر. النتائج: أنتج بروتين مثنوي (mGITRL.2) (hFc γ . mGITRL) وآخر مثلوث (mGITRL.HA.2) (Fc γ . mGITR)، وجرى انتقاء النسائل الأعلى تعبيراً. أبدى كلا البروتينان قدرة متشابهة على الارتباط بخلايا Jurkat المعيرة عن المستقبل الفأري mGITR وتفعيل للمفاويات التائية المساعدة الساذجة CD4+CD25- وتحريض تكاثرها، مع تفوق نسبي للبروتين المثلوث.

تاريخ القبول: 2022/1/18

تاريخ النشر: 2022/3/14



حقوق النشر: جامعة دمشق -
سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق
النشر بموجب الترخيص
CC BY-NC-SA 04

الاستنتاجات: تبرهن نتائجنا على امتلاك البروتينين المثنوي والمثلوث خصائص وظيفية متقاربة. تؤسس هذه النتائج لإمكانية إنتاج GITRL مثنوي مدمج ب Fcγ وتنقيته واختباره مستقبلاً في الحيّ *in vivo* لتقييم كمن استهداف GTR كعلاج مناعي للسرطان.

كلمات مفتاحية: لجين مستقبل عامل نخر الورم المحرض بالغليكوكورتيكويد، مثنوي، مثلوثي، بروتين مدمج ب Fcγ، لمفاويات تائية.

Engineering and Characterization of Recombinant Chimeric Dimeric and Trimeric Proteins of Murine GITRL Fused to the Fcγ Region of Human Immunoglobulin

Dr. Lama Youssef^{1,2}

PhD in Biomedical Sciences-Clinical Pharmacy, Associate Professor of Clinical Pharmacy and Immunology, Faculty of Pharmacy, Damascus University

¹Department of Pharmaceutics & Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy,

²Damascus University, Syria; ²National Commission for Biotechnology, Damascus, Syria.

Abstract:

Background: Tumor necrosis factor (TNF) superfamily (TNFSF) comprises different ligands and receptors with pivotal roles in cell proliferation, differentiation, survival, and apoptosis. TNF Ligands are produced as functional trimeric-transmembrane and soluble proteins, with the exception of the dimeric murine glucocorticoid-induced TNF receptor ligand (mGITRL). GITR-GITRL interaction contributes to controlling the immune response and holds the potential for being a promising anti-cancer and autoimmune disease immunotherapy. Production of dimeric and trimeric recombinant mGITRL is a key step towards preclinical investigations of the possible therapeutic characteristics of GITRL. **Aim:** Production, characterization and evaluation of dimeric versus trimeric recombinant GITRL proteins, based on binding to GITR and T cell activation. **Methods:** Two chimeric recombinant proteins were designed and produced in the Chinese Hamster Ovary (CHO) cell line. The dimer protein encompassed the ectodomain of mGITRL fused to the fragment crystallizable region (Fc region) of human immunoglobulin hIgG1,

whereas trimeric ligand was produced via co-expression of [hFcγ.mGITRL] and [mGITRL.HA], and selection of high co-expressing positive clones. Ligands binding to mGITR expressed in human Jurkat cells was assessed using flow cytometry and co-immunoprecipitation assays, and functionality was evaluated by means of T cell proliferation. **Results:** A dimeric (hFcγ.mGITRL)₂ and trimeric (hFcγ.mGITRL)₂:mGITRL.HA proteins were produced, and highly expressing clones were selected and expanded. Both proteins were capable of binding to mGITR and activating naïve T lymphocytes CD4⁺CD25⁻ to proliferate, with superiority of the trimer. **Conclusions:** Our findings prove comparable functionality of murine dimeric and trimeric ligands, and establish for the dimeric Fcγ fusion GITRL production and purification for *in vivo* testing to investigate the potential of GITRL as tumor immunotherapy.

Key Words: Glucocorticoid-Induced TNF Receptor Ligand (GITRL), Trimer, Dimer, Fcγ-Fusion Proteins, T Lymphocyte.

Received: 18/1/2022

Accepted: 14/3/2022



Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

المقدمة Introduction:

تضم "فوق عائلة عامل نخر الورم" Tumor Necrosis Factor (TNF) Superfamily (TNFSF) 19 لجيناً ligand، يقابلها 29 مستقبلات (مثل OX40، CD40، 4-1BB، GITR) وصفت خصائصها وصنفت في "فوق عائلة مستقبلات عامل النخر الورمي" (TNFRSF) (Elgueta, 2009؛ Wang, 2009؛ Hehlgans, 2009؛ Croft, 2010؛ Nocentini and Riccardi, 2009).

ينجم عن ارتباط المستقبلات بلجائنها قدح زناد شلال معقد من أحداث نقل الشارة داخل الخلية، والذي يعطي بالمحصلة طيفاً واسعاً من الوظائف يشمل تفعيل الخلايا المناعية وغير المناعية وتمايزها وبقيها واستماتتها (Nocentini & Riccardi, 2009). تُعبّر الخلايا عن معظم لجائن عائلة TNF بشكل بروتينات عبر غشائية من النمط الثاني type II transmembrane proteins بنطاقات خارج خلوية ectodomains تشكل مثلوثات يمكن أن تتوسّف بفعل إنزيمات بروتينازات فلزية metalloproteinases نوعية تؤدي بالمحصلة إلى توليد سيتوكينات ذوابة تحررها الخلايا، وتعدّ معظم اللجائن المنشطرة وغير المنشطرة فعالة كمثلوثات متماثلة homotrimers (Chattopadhyay, 2007). وعلى التقيض، عاد Chattopadhyay وبرهن عام 2008 على أنّ GITRL الفأري يبدي بنية بلورية مثنوية فريدة (Chattopadhyay, 2008). بالمقابل، تتسم مستقبلات عائلة الـ TNF بكون معظمها بروتينات قليلة الوحدات oligomeric من النمط الأول العابرة للغشاء type I transmembrane proteins (Wajant and Siegmund, 2019).

تتسم لجائن الـ TNF ببنية تشبه السويقة بأطوال متنوّعة موصولة مع نطاق عبر غشائي للمنطقة اللبية core region، والتي تحتوي بنية ذات سمة مميزة لجميع لجائن عائلة الـ TNF،

تُعرف بالنطاق التناودي لعامل النخر الورمي TNF Homology Domain (THD). يمتلك THD شكل شطيرة تشبه صحيفة بيتا مطوية متوازية ومتعاكسة في الاتجاه ذات توضع طوبولوجي مشابه للفاقة هلامية Jelly Roll (Chattopadhyay, 2007, 2008; Zhou, 2008). توفر الثمالات المصانة ضمن طيقان بيتا تماسات نوعية بين الوحدات، وتؤمن تثبيتاً للبنية المثلوثية. في حين تمنح التسلسلات في العرى loops الواصلة بين طيقان بيتا المتجاورة المميزة لكل لجين في عائلة الـ TNF نوعيته تجاه مستقبله (Vanamee, 2018) تتخرط لجائن ومستقبلات عائلة الـ TNF في العديد من عمليات التطور الطبيعي بما في ذلك الإستماتة (أو الموت الخلوي المبرمج apoptosis)، وتنظيم وظائف الخلايا المناعية، واستجابات إضافية نوعية بكل نمط خلوي. من جهة أخرى، يُعدّ بعض سيتوكينات هذه العائلة متورطاً في عددٍ من الأمراض لدى البشر بما في ذلك السرطانات وأمراض المناعة الذاتية).

(Elgueta 2009، Wang, 2009؛ Hehlgans, 2009، Croft, 2010، Nocentini & Riccardi, 2009).

يُعدّ لجين مستقبل عامل النخر الورمي المحرض بالغلوكوكورتيكويد Glucocorticoid-induced TNF receptor ligand (GITRL) أحد أفراد عائلة الـ TNF. اكتشف مستقبل الـ GITR أول الأمر في خلايا فأرية تائية ورمية هجينة T cell hybridoma معالجة بديكساميثازون dexamethasone، وتبين أنّه يرمز لبروتين عابر للغشاء الخلوي يقارب 20 كيلودالتون من النمط type I transmembrane protein I غنيّ بالسيستئين ومكوّن من 228 حمضاً أمينياً، وأطلق عليه في حينها اسم "فوق العائلة 18 لمستقبل عامل النخر الورمي" (TNFRSF 18)، ومن ثمّ عدّل هذا المسمى ليغدو "مستقبل طائفة مستقبلات TNF المحرّضة بالتفعيل" (AITR) أو CD357 (Known, 1999؛ Nocentini, 1997).

الرَّجَاج *in-vitro* (أي أنها لا تتكاثر استجابة لتفعيل مستقبل الخلية التائية T Cell Receptor (TCR) في المستنبتات)، غير أن من المعتقد أنها جمهرة قادرة على التكاثر في الحي *in vivo*. ثبت انخراط GITR في تكاثر الخلايا التائية الناضجة وتمايزها في الغدة الصعترية (Petrillo et al., 2015). كما تبين أن تفعيل GITR على سطوح الخلايا التائية الناضجة CD4+CD25+، سواء بأضداد ناهضة agonistic أم بأشكال مأسوية ذوابية من اللجين GITRL، يؤدي إلى إعادة برمجتها وتنشيطها وذلك من خلال تأثير شلال الأحداث الشاربية في مستويات التعبير عن عامل الانتساخ FoxP3، ما من شأنه معاكسة فعلها المثبط وتعزيز تكاثر كل من الخلايا التائية المستفحلة من النمطين CD8+ و CD4+، والذي ينجم عنه بالمحصلة زيادة في إنتاج السيوتوكينات وتراجع في نمو الورم. (McHugh, 2002; Shimizu, 2002; Tone, 2003)

شهدت العقود الثلاثة المنصرمة تطوير أدوية بيولوجية شملت أضعافاً وحيدة النسيلة وبروتينات مأسوية لاستهداف لجائن و/أو مستقبلات فوق عائلتي TNFSF-TNFRSF المنخرطتين في الآليات المرضية لأدواء التهابية inflammatory diseases أهمها؛ التهاب المفاصل الروماتويدي Rheumatoid Arthritis (RA)، وداء الأمعاء الالتهابي Inflammatory Bowel Disease (IBD) والتصلب المتعدد Multiple Sclerosis (MS) والذئبة الحمامية الجهازية Systemic Lupus Erythematosus (SLE). كما تعدّ لجائن و/أو مستقبلات TNFSF-TNFRSF، مثل BAFF و CD40 و OX40 و GITR و 4-1BB و CD27 و CD30، أهدافاً مناعية جزيئية جديدة لنقوية الاستجابة المناعية الكابحة للأورام. (Croft, 2013, Akinleye, 2019, Heinhuis, 2019, Montfort, 2019, Perez-Ruiz, 2019, Heinhuis, 2020)

يمرّ تطوير العلاجات الحيوية أو الأدوية البيولوجية بأطوار تشمل الدراسات في المختبر (*in vitro*) والدراسات ما قبل سريرية preclinical studies والتي تُعرف أيضاً بالدراسات في

تعبّر للمفاويات التائية الساذجة naïve T lymphocytes عن مستويات منخفضة جداً أو معتدلة من CD4+ و CD8+، وتزداد مستويات التعبير عنه عقب تفعيلها إلى خلايا مستفحلة، في حين تعبّر الخلايا للمفاوية التائية الناضجة Tregs عن GITR بصورة مستمرة (Clouthier and Watts, 2014)، كما تعبّر عن عامل الانتساخ FoxP3 (forkhead box P3) الذي ينتمي لعائلة عوامل الانتساخ ذات الحلزون الممتد/مترعرع الرأس (الشبيه بالشوكة) forkhead/winged-helix family، وهذا ما انعكس على تعريف هذه الخلايا، إذ باتت تُعرف بأنها الخلايا التائية الناضجة إيجابية عامل الانتساخ Foxp3 (Foxp3+regulatory T cells) إضافةً لتعبيرها عن السلسلة ألفا α -chain لمستقبل الإنترلوكين 2 (IL-2) receptor، والذي يُعرف ب-CD25، الأمر الذي أدى إلى توصيفها ب-CD4+CD25+FoxP3+ (Ono, 2006).

أعقب اكتشاف GITR، وخلال فترة وجيزة، توصيف اللجين GITRL الذي يُعدّ أحد أصغر عائلة لجائن TNF (125 حمضاً أمينياً)، وتعبّر عنه وبصورة مهيمنة الخلايا الاحترافية المقدّمة للمستضد بما في ذلك البلاعم macrophages والخلايا التغصنية dendritic cells والمفاويات البائية المفعلة، والخلايا الظهارية الصعترية اللبية medullary thymic epithelial cells، تلا ذلك تحديد خواص المستقبل البشري ولجينه بعد فترة وجيزة (Zhou Z, 2008, Nocentini, 2009, and Riccardi, 2009).

ينجم عن تأثير اللجين (GITRL) أو الضد الناهض agonistic antibody لـ GITR (DTA-1) مع مستقبله إلى تفعيل عامل الانتساخ NF-kB عبر سبيل يتواسطه العامل الثاني المرافق لـ TNFR. اكتنف الغموض الدور الذي يلعبه GITR في تنظيم الخلايا التائية CD4+CD25- لزمّن طويل نسبياً، وتبين لاحقاً أنه مسؤول عن تحسّن في تكاثر الخلايا التائية المستفحلة وتفعيلها. تُعدّ خلايا Tregs في حالة عطالة anergic في

باستعمال مشرعي PCR نوعيين؛ حيث استعمل مشرّع mGITRL sense ذو التسلسل النوكليوتيدي TCGGATCCTCACTCAAGCCAAGTGC والمشرّع ذو التسلسل النوكليوتيدي AAGAATTCAATCTCTAAGAGATGAATGG كمشرّع mGITRL antisense. نُسّلت الشدفة المضخمة بتفاعل الـ PCR مع شدفة مرمزة لـ Fcγ1 ضمن الإطار in frame في السلالة الجرثومية الإشريكية القولونية E.coli Top 10 كسلالة مضيفة في مرحلة التنسيل. تمّ توليد خلايا تعبر بشكل ثابت عن mGITRL hFcγ. أو تعبر عن mGITRL.HA و hFcγ.mGITRL سوياً باستعمال الناقل البلازميدي (pMTF vector) المخصّص للتعبير في حقيقيّات النوى والمتضمّن لمعزاز عامل الإطالة-1 elongation factor-1γ promoter وجين المقاومة للصاد الحيوي نيومايسين/G418 (Geneticin) لانتقاء النّسائل المعدّاة بـ (hFcγ.mGITRL pMTF) و/أو الصّاد الحيوي زيوسين ziocin لانتقاء النّسائل المعدّاة بـ (mGITRL.HA pMTF). جرى إعداء خلايا الخط الخلوي (CHO cells (American Type Culture Collection) بأحد أو كلا بلازميديّ التّعبير باستعمال التّقييب الكهربائيّ electroporation. كما تمّ الحصول على خلايا تعبر بصورة ثابتة ودائمة عن المستقبل mGITRL بإعداء خلايا الخط الخلوي الثّانيّ البشريّ Jurkat cells (Clone JE6.1) ببلازميد التّعبير mGITRL-pMTF (هدية من الباحث Masahide Tone). جرى انتقاء الخلايا ثابتة التّعبير التي تمّ إعداؤها باستعمال G418 (Geneticin) بتركيز 1ملغ/مل وأجريت تمديدات متسلسلة للخلايا بهدف الحصول على خلية مفردة (نسيلة) في كلّ بئر. حُضنت الخلايا في وسط الاستنبات المغذي DMEM والحاوي على مصّل الجنين البقري FBS بنسبة 10% والمضاف إليه الصّادان الحيويان بنسولين وستريبتومايسين، وذلك بدرجة حرارة 37 درجة مئوية، بتركيز CO2 5-10%، رطوبة 100%. حصدت

الحيّ (*in vivo*) وأطوار سريريّة ثلاثة (I، II، III) تشبه إلى حدّ بعيد تلك المعتمدة في تطوير الأدوية صغيرة الوزن الجزيئيّ التي تشكّل الغالبية العظمى من الأدوية الكيميائيّة التّقليديّة كشرط لازم لحيازتها موافقة الجهات الوصائيّة، مثل إدارة الأدوية والأغذية الأمريكيّة Food and Drug Administration (FDA) أو الوكالة الأوروبيّة للأدوية European Medicines Agency (EMA)، قبل إجازة استعمالها والسّماح للشركات المطوّرة بتسويقها. إلّا أنّ هذه العلاجات، ويعكس الأدوية التّقليديّة، تواجه تحدياتٍ تفرضها طبيعتها البروتينيّة من حيث التّصميم والاستعانة بطرق التّقانة الحيويّة لإنتاجها، وحميّة تصميم بروتينات مطابقة أو مماثلة للبروتينات الخاصّة بالنوع أو النّمودج الحيواني الذي ستختبر فيه، تقادياً لحدوث ردّ فعلٍ مناعيّ تجاه البروتينات العلاجيّة البشريّة التي سيعدها جهازه المناعيّ غيريّة.

يقتضي استهداف GITR بنواهض agonists بغية تعزيز المناعة المضادة للأورام كمحصلة لتفعيل الخلايا التّائيّة النوعيّة المهاجمة للورم من جهة وللاستفاد الموضعي للخلايا التّائيّة النازمة المتموضعة ضمن سرير الورم، تطوير نسخٍ فأريّة من هذه النّواهض البروتينيّة لاختبارها في الأطوار ما قبل السريريّة (في الحيّ *in vivo*). يشكّل إنتاج بروتين مثوئيّ مأسوب وثابت من GITRL الفأري تحدياً تقنيّاً يعيق التحري ما قبل السريري عن خصائصه. وبناءً على ما سبق، هدفت هذه الدراسة إلى إنتاج بروتينات GITRL مأسوبة مثلثة trimer ومثويّة dimer وتقييم خصائصها وقدرتها على الارتباط بـ GITR وتفعيل الخلايا التّائيّة من النّمط -CD4+CD25.

مواد البحث وطرائقه:

إعداء الخلايا وإنتاج البروتينين في الخط الخلوي Chinese Hamster Cells (CHO): ضخّم cDNA المرمز للنطاق خارج الخلوي لـ mGITRL (الأحماض الأمينيّة من 43-173)

بدرجة حرارة الغرفة. تلا فترة الحضانة غسل مكثف (خمس مرّات) للأطباق بدارئة الغسل. أضيفت أصداد الكشف الماعزيّة المقترنة بإنزيم بيروكسيداز الفجل الحار Horseradish Peroxidase (HRP) النوعيّة بالشدفة hFc γ (Jackson ImmunoResearch)، وكشف عن النسائل المعداة المعبرة عن البروتين المثلوث بواسطة مقياسي إليزا وباستعمال نوعين من أصداد الكشف؛ الضدّ الأول للكشف عن hFc γ (مماثل لضدّ الكشف المستعمل في مقايسة البروتين المثنوي)، والثاني ضدّ كشف جرذي وحيد النسيّلة -HRP Anti-(HA)- Tag Antibody (Roche) نوعي لتسلسل مكوّن من تسعة أحماض أمينيّة [YPYDVPDYA] مشتق من بروتين human influenza hemagglutinin (HA) protein الواسم لبروتين HA tagged-GITRL وذلك بتمديد قدره 1:5000 إلى 1:10000 في دارئة الحجب، حيث حضنت الأطباق مدّة ساعة، وتلا ذلك غسل مكثف لأربع مرّات. أضيف حجم قدره 100 مكل من الرّكازة (TMB) إلى الآبار، وتمّ إيقاف التفاعل الإنزيمي اللوني بعد 20 دقيقة بإضافة 100 مكل من محلول الإيقاف (حمض الكبريت الممدّد بنسبة 1%) إلى كلّ بئرٍ من الآبار. وجرت قراءة الامتصاص (الكثافة اللونيّة) للآبار باستخدام قارئٍ لأطباق الإليزا وبطول موجة \square قدرها 450 نانومتر.

تنقيّة البروتينات الخيمريّة المأشوبة:

تمّت تنقيّة الـ hFc γ .mGITRL و HA.mGITRL:2 (Fc γ .mGITR) المفرزين في وسط الاستنبات للنسائل الأعلى تعبيراً (بعد تكثيرها وإمرارها إلى فلاسكات بحجوم T175) وذلك اعتماداً على تقنيّة التفريق اللوني بالألفة affinity chromatography باستعمال حبيبات أغاروز البروتين A (Life Technologies, USA). أجريت معايرة لونيّة (BCA Protein Assay) لاستعراف

الطوافي وتمّ انتقاء النسائل الأعلى تعبيراً بناءً على نتائج مقايسة المُمْتَرِّ المَناعِيّ المُرتَبِّطِ بِالإنزِيمِ المصمّمة من قبلنا in-house ELISA.

مُقايِسة المُمْتَرِّ المَناعِيّ المُرتَبِّطِ بِالإنزِيمِ المصمّمة لهذِهِ الدَّرَاسَةِ in-house ELISA

جرى تلبيس أطباق عياريّة مكرّوبية مسطّحة القاع flat bottom وعالية الألفة للبروتينات مؤلفة من 96 بئراً بـ 50 مكل من الضدّ المراد امتزازه (الضدّ اللاقط capturing antibody الموجه لـ hFc γ من شركة Jackson ImmunoResearch (الولايات المتحدة الأمريكيّة) في دارئة بيكرينات/كربونات (pH 9.6) بتركيز نهائيّ قدره 5 مكل/مل. بعد التغطية الكاملة لكلّ طبق بواسطة لاصق بلاستيكيّ منعاً للتبخّر، جرت حضانة الأطباق بدرجة حرارة قدرها 4 $^{\circ}$ مئويّة ولمدة ليلة كاملة أو 12 ساعة، مع مراعاة الرّجّ المستمر. في اليوم التالي، أزيلت الفوائض من الأصداد اللاقطة وغسلت الأطباق 3 مرّات بماء الآبار بـ 300 مل من محلول الغسل (PBS الحاوي على التوين) وإفراغها مع الحرص على إزالة كامل سائل الغسل في كلّ مرّة. حُجبت المواقع التي لم تمتز عليها الأصداد اللاقطة على سطوح الآبار الملبّسة بإضافة 300 مكل من دارئة الحجب المكوّنة من دارئة الغسل TPBS المحضّرة بمزج الدارئة الفوسفاتيّة PBS (بتمديد 1X) ذات درجة حموضة/باهاه (pH 7.4) مع عامل فعّال على السّطح (Tween20) بنسبة 0.05% (حجم/حجم)، وألومين المصل البقري BSA بنسبة 4% (BSA in 4% PBS/Tween). وجرت تغطية الأطباق وحضنها مدّة 2-3 ساعات بدرجة حرارة الغرفة أو طوال ليلة كاملة بدرجة حرارة قدرها 4 $^{\circ}$ مئويّة. غُسلت الأطباق 3 مرّات بدارئة الغسل بعد انقضاء فترة الحجب. نقلت عيّات بحجم 150 مكل من وسط الاستنبات الطافي في آبار النسائل التي نمت بوجود G418 أو ziocin+G418 بعد تثليلها إلى آبار مناظرة في طبق الإليزا، جرت تغطية الأطباق بلاصق بلاستيكي وحُضنت مدّة ساعتين

الأمامي والجانبى forward and side scatter، وسجل وسطي شدة الفلورة بالمقارنة مع أعداد شاهدة سلبية.

التربيع المناعي Immuno-Precipitation والتربيع المناعي Western Blotting:

حضنت حالات الخلايا أو طوافي أوساط الاستنابات والممددة بنسبة 1:1 بوقاء الربط أو البروتينات المنقاة مع حبيبات آغاروز البروتين A (Life Technologies, USA) مدة أربع ساعات بالدرجة 4 درجة مئوية لتحقيق اقتران البروتينات المدمجة بالشدفة hFc γ إلى الركازة الصلبة، أزيل الجزء غير المرتبط وغسلت الحبيبات ومزجت مع 2x وقاء العينات sample buffer ومسخت البروتينات بالتسخين في حمام مائي بدرجة حرارة 100 درجة مئوية مدة خمس دقائق ثم رحلت البروتينات المرتبطة بالحبيبات على هلام SDS-PAGE ذات مدرج تراكيز بمجال 4-12%. نقلت البروتينات إلى أغشية PVDF وحضرت/حجبت بـ PBS الحاوي على BSA بنسبة 5%. وحضنت مع أحد ضدتين: HRP-Anti(HA)-Tag Antibody (Roche) الواسم لبروتين HA tagged-GITRL أو Anti-hFc γ (HRP) بتمديد قدره 1:5000 إلى 1:10000 في دائرة الحجب، وظهرت البروتينات المرتبطة بالصد الموسوم بـ HRP بحضن الأغشية مع ركازة TMB المولدة للون (ThermoFisher). لتقييم تعبير خلايا Jurkat البشرية المعدة بـ بلازميد التعبير pMTF-GITRL، رُسب بروتين المستقبل mGITR من حالات لأعداد متكافئة من خلايا Jurkat وذلك باستعمال الصد الجرذي anti-GITR (rat IgG2b, k) المثبت على حبيبات بروتين L (الطور الصلب) وحملت كميات متكافئة من البروتينات في آبار هلام SDS-PAGE (4-12%) واستعمل ضد الكشف anti-western blotting (HRP) GITR (Goat IgG) للتربيع المناعي western blotting.

المردود من البروتينات المأسوية. تم التحقق من الأوزان الجزيئية للبروتينات المنقاة باستعمال الرحلان الكهربائي على هلام SDS-PAGE بشرط مرجعة reducing وغير مرجعة non-reducing، ولونت البروتينات المرحلة على الهلام بزرقه كومازي Coomassie Blue، وتم التحقق من الأوزان الجزيئية بالمقارنة مع سلم متدرج من بروتينات عيارية معروفة الأوزان الجزيئية. حفظت الخلايا بالتجميد في الأزوت السائل وأعيد استناباتها عند الحاجة في الوسط المغذي DMEM والحاوي على مصل الجنين البقري FBS بنسبة 10% والمضاف إليه الصادان الحيويان بنسولين وستريومايسين. قُيِّمت قدرة البروتينين المأسوبين على الارتباط بـ mGITR بطريقتي التدفق الخلوي Flow Cytometry والتربيع المناعي المشترك co-immunoprecipitation.

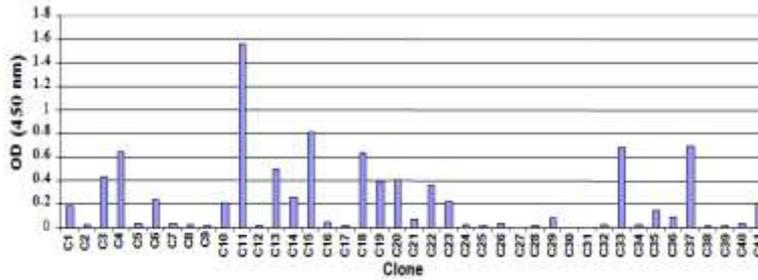
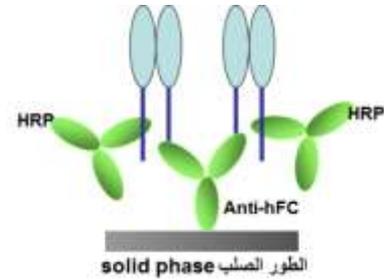
الجريان/التدفق الخلوي Flow Cytometry:

أجريت تجارب التدفق الخلوي أحادي أو ثنائي اللون على جهاز الجريان الخلوي FACScan من شركة بيكتون ديكنسون (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). ورعت الخلايا في الأنابيب المخصصة للجريان الخلوي (2×10^5 / الأنبوب)، وغسلت بوقاء PBS مزود بـ 2% EDTA+FBS، وبعثرت الخلايا في 100 مكل من الوقاء، وحضنت خلايا Jurkat البشرية المعدة بـ mGITR مع طوافي النسائل المعدة بالبروتين المثنوي أو المثلوث من اللجين الخيمري المأسوب، تلا ذلك غسل مكثف بالوقاء متبوع بالحضن مع أعداد وحيدة النسيلة IgG مفلورة أو مع شدفها (Cy5-Fab2) موجبة للقطعة Fc γ البشرية مدة نصف ساعة في الظلام، وأزيل الفائض من الأضداد غير المرتبطة بالغسل بـ 3 مل من الوقاء. تم إمرار الخلايا المصونة عبر بوابة الانتثار

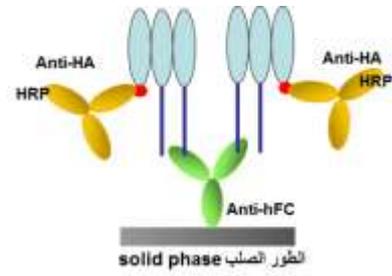
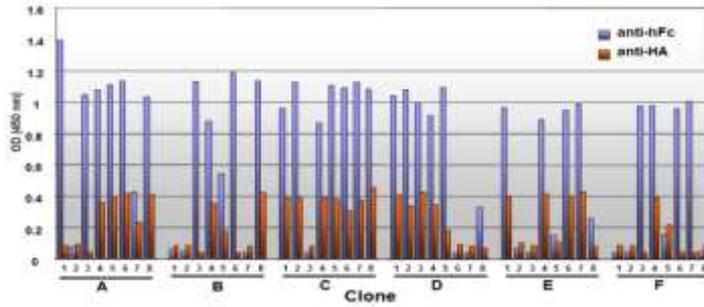
بتراكيز 0 و 1 و 5 مكغ/مل، أو الضدّ الجرذي rat anti-GITR (□, IgG2) بتركيز 5 مكغ/مل بهدف المقارنة، في الوسط الزّرعِي DMEM المزود بـ 10% من مصل الجنين البقري FBS ودرجة حرارة 37 درجة مئوية. بعد انقضاء 48 ساعة، تمّت إضافة ثيميدين موسوم بـ 3H بتركيز يبلغ 1 ميكرو كوري μ Ci في البئر، ومن ثمّ حصدت الخلايا بعد 64 ساعة. قمنا بقياس وتحليل اندخال الـ 3H-thymidine باستعمال العدّادة Betaplate liquid scintillation counter (من شركة Wallac Oy, Turku, Finland). أمّا خلايا Jurkat التّائِيّة البشريّة المعبّرة عن mGITR، فقد تمّ توزيعها في أطباق زرع مسطحة القعر بوجود PHA كمحرّضٍ على الإنقسام، وقيس الإنترلوكين 2 (IL-2) المفرز في الوسط الزرعِي المكيف لتقصي تراكيز الـ IL-2 بعد 24 ساعة، وذلك باستعمال عتيدة ELISA (R&D systems) وتبعاً لتعليمات المصنّع.

تكاثر الخلايا ومقايسة الإنترلوكين-2 في الزّجاج in vitro: أجريت مقايسات وظيفيّة للبروتينين المأسوبين المثنوي والمثلوث ومقارنة تفعيلهما في الزّجاج *in-vitro* للخلايا التّائِيّة الفأريّة $CD4^+CD25^-$ وتحريضهما لتكاثرها استجابة لأضداد موجهة لـ CD3 (Anti-CD3 Ab) أو البيبتيد H—Y كمستضد (H-Y peptide) وإنتاج خلايا Jurkat البشريّة المعداة بـ mGITR للسيتوكين 2 (IL-2) كما تمّ تقصي قدرتهما على تثبيط للمفاويات التّائِيّة النّازمة $CD4^+CD25^+$. حيث وزعت خلايا الطحال spleenocytes أو الخلايا التّائِيّة أو الخلايا المساعدة helper cells ($CD4^+$) المعزولة والمنقّاة من فئران BALB/c mice ضمن أطباق 96 بئراً مسطحة القاع، بحيث استتبتت 1×10^5 خلية في البئر الملبّسة مسبقاً بأضداد خالية من الأزيد وموجهة ضد CD3 الفأري بتركيز تراوحت بين 0.5، 1، 5، 10 مكغ/مل. حُصنت الخلايا مع البروتين المأسوب

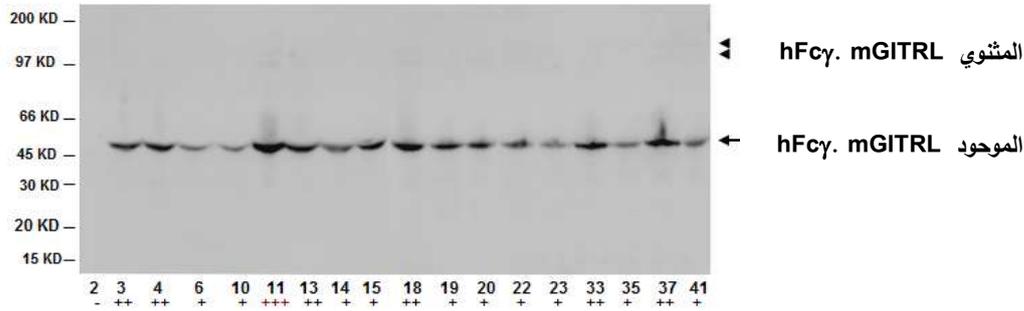
A

(hFc γ . mGITRL)2 "Dimer"

B

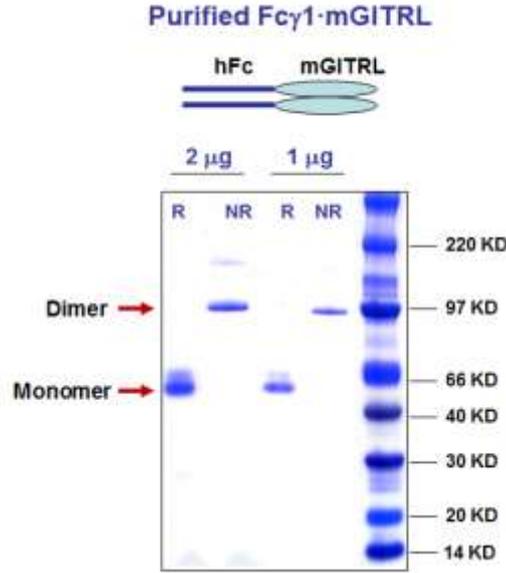
(Fc γ . mGITR)2:mGITRL.HA "Trimer"

C



الشكل (1): نتائج نخل نسانل خلايا CHO المعدة بالبلازميد (pMTF) الحامل للشدفة المرمة لـ hFc γ .mGITRL والبلازميد الحامل للشدفة المرمة لـ mGITRL.HA بمقايسة الإليزا والتبقيع المناعي. يمثل A و B مخططي أعمدة لقراءات الكثافة الضوئية بطول موجة $\gamma = 450$ نانومتر لمقايستي الإليزا ELISA المتناسبة مع تراكيز الشدفة hFc γ (اللون الأزرق) والـ HA tag (اللون البرتقالي) في طوافي وسط الاستنبات تم انتقاء النسانل الأعلى تعبيراً عن البروتين المثنوي (hFc γ . mGITRL)2 (A) و المثلوث (Fc γ . (B) mGITR)2:mGITRL.HA. (C) نتائج التبقيع المناعي بشروط مرجعة باستعمال ضد Anti-hFc γ المقترن بـ HRP لبروتينات حلالات خلوية للنسانل المعدة الأعلى تعبيراً (n=17) المقيمة بناءً على نتائج مقايسة الإليزا في (A) وذلك بعد ترجيلها على هلامة SDS-PAGE بمدروج تركيز يتراوح بين 4-12% ونقلها إلى أغشية PVDF. تظهر العصاب بروتيناً موحداً monomer بوزن جزيئي يقارب الـ 50-55 كيلودالتون للبروتين الخميري المأسوب hFc γ .mGITRL.

A



الشكل (2): تقييم نقاوة البروتين الخيمري المأشوب hFc γ .mGITRL المنقى ووزنه الجزيئي باستعمال الزحلان الكهربائي لـ 1 مكغ و2مكغ من البروتين على هلامة الأكريلاميد (SDS-PAGE) وذلك في شروط مرجعة (R) وغير مرجعة (NR) وبالتلوين بزرقه كومازي. المساق أقصى اليمين سلم ladder لبروتينات عيارية معلومة الوزن الجزيئي.

النتائج Results:

و (mGITRL.HA معاً). وجرى انتقاء النسائل الأعلى تعبيراً والتحقق من الوزن الجزيئي للبروتينات المأشوبة في حالات خلاياها المرحلة على هلامة الـ SDS-PAGE والمنقولة إلى أغشية PVDF بطريقة التبقيع المناعي، والتي برهنت نتائجها على امتلاك البروتين الموحود hFc γ .mGITRL monomer للوزن الجزيئي المتوقع (50-55 كيلو دالتون). بين ترحيل البروتين المأشوب hFc γ .mGITRL المنقى على هلامة SDS-PAGE والتلوين بزرقه كومازي تواجد كموحود monomer بوزن جزيئي يقارب (50-55) كيلو دالتون في الشروط المرجعة وتثانيه (تشكيله لمثنوي) dimerization في الشروط غير المرجعة وبوزن جزيئي يمكن تقديره تقريبياً بـ (100-110) كيلو دالتون (أي قرابة ضعف الوزن الجزيئي للبروتين الموحود). كما جرى التأكد من ارتباط البروتين mGITRL.HA بالبروتين (hFc γ .mGITRL)₂ لتشكيل بلمر مثلوث بإجراء الترسيب المناعي بالبروتين A على حبيبات

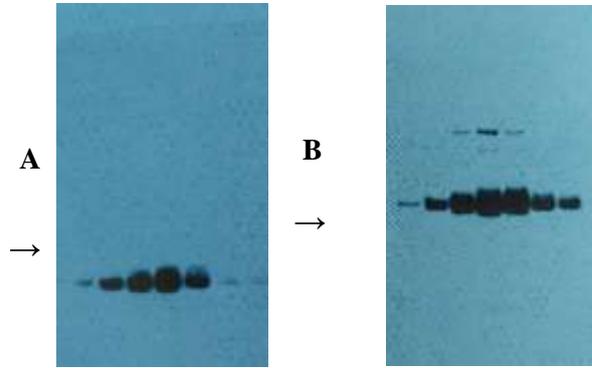
تقييم إنتاج البروتينين الخيمريين المأسوبين في CHO نُخلت النسائل المعدة ببلازميد التعبير (pMTF) في خلايا حقيقيات النوى والحاوي على الشدف الجينية المراد التعبير عنها وذلك بناءً على مستويات البروتينات المأشوبة داخل الخلية مقيمةً بطريقة التبقيع المناعي باستعمال أضداد موجهة للمنطقة Fc γ من الغلوبولين المناعي البشري Anti-hFc γ (HRP) أو المفرزة في أوساط الاستنابات والمقيمة بإحدى أو كلتا مقايستي الإليزا المصممتين للكشف عن البروتين المثنوي أو المثلوث، على الترتيب. برهنت نتائج مقايسة الإليزا نجاح عملية الإعداد وإنتاج كلا البروتينين الخيمريين المأسوبين بمستويات متفاوتة من حيث التعبير بين النسائل، كما بين الشكل 1 (حيث يمثل 1A مستويات التعبير عن البروتين المثنوي hFc γ .mGITRL و 1B مستويات التعبير عن كلا البروتينين hFc γ .mGITRL

المناعي بالصدّ anti-GITR (Goat Ig) للبروتينات المرسبة والمرحلة على SDS-PAGE والمنقولة لأغشية PVDF تعبيراً بمستويات مرتفعة عن البروتين mGITR في النسائل H2، H1، M (الشكل 4A)، واعتمدنا مقياسه الجريان الخلوي للتيقن من أن البروتين معبر عنه على سطوح الخلايا، حيث حُضنت خلايا Jurkat مع الصدّ rat anti-murine GITR مع الصدّ IgG وتلا ذلك كشف النسائل المعبرة عن neo-mGITR على سطوحها بأضداد ثانوية مفلورة موجهة ضد الصدّ الجرذي. يبين الشكل (الشكل 4) زيادة في الفلورة مقدرة بوسطي الومضان/الفلورة بالمقارنة مع شاهدين؛ الأول خلايا Jurkat غير معدة بـ mGITR لقياس الفلورة الذاتية، والثاني ضد شاهد isotype لتقييم الارتباط غير النوعي (الشكل 4B). برهنت النتائج تعبيراً عالياً للنسائل M، H1، H2 (الشكل 4) عن المستقبل الفأري mGITR، الأمر الذي يتيح استعمالها لتقييم قدرة البروتينين الخيمريين المأسوبين على الارتباط بالمستقبل GITR الفأري.

تقييم قدرة البروتينين الخيمريين المأسوبين المثوي 2 (hFc γ .mGITRL) والمثوي Fc γ .mGITRL:2 بالمستقبل الفأري GITR:

قيمت قدرة البروتينين المثوي والمثوي على الارتباط بالمستقبل GITR الفأري المعبر عنه في خلايا Jurkat التائية البشرية المعدة ببلازميد التعبير pMTF- mGITR- بطريقتي الجريان الخلوي والترسيب المناعي. بينت نتائج حضان طوافي النسائل المعبرة عن البروتين المثوي أو البروتين المثوي مع خلايا Jurkat-mGITR وقيس وسيط الفلورة المعبرة عن شدة الارتباط باستعمال شدف Cy5-Fab2 موجهة للقطعة hFc γ ، وانتقت بموجب ذلك النسيلتان γ و بوصفهما الأعلى إنتاجاً للمستقبل على سطوح خلاياهما، واعتمدنا لاختبار قدرة البروتينين الخيمريين على الارتباط بالمستقبل mGITR

أغاروز ومن ثم التيقن المناعي للبروتين المرسل بأضداد مفلورة موجهة لـ HA، حيث بينت النتائج ترسيباً مشتركاً لـ GITRL الموصوم بـ HA (mGITRL.HA)، بوزن جزئي يقارب 20 كيلو دالتون، مع البروتين mGITRL (الشكل 3)، اقتصر على الخلايا المعدة ببلازميدي التعبير سوياً والمنقاة بناءً على إيجابية بمقايستي الإليزا للكشف عن hFc γ و HA معاً وغاب كما هو متوقع في الخلايا المعبرة عن البروتين المثوي فحسب (الشكل 3).



الشكل (3) نتائج التيقن المناعي بضدي anti-HA وضد anti-Fc γ لكشف mGITRL.HA المترسب بصورة مشاركة مع hFc γ .mGITRL المنقى بالارتباط بالبروتين A على حبيبات الأغاروز في النسائل المعدة بصورة مزدوجة بكل بلازميدي التعبير pMTF-mGITRL و pMTF-GITRL.HA. (A). التيقن المناعي بضد HRP-anti-HA يظهر البروتين (mGITRL.HA) بوزن جزئي يقارب الـ 20 كيلودالتون. (B) التيقن المناعي بأضداد anti-hFc γ بعد تجريد الغشاء من أضداد anti-HA، حيث يتبين امتلاك البروتين لوزن جزئي يقارب (50-55) كيلو دالتون، كما تظهر عصابات بأوزان جزئية أعلى قد تكون بلمرات من الـ hFc γ .mGITRL.

تقييم تعبير خلايا Jurkat التائية البشرية المعدة عن المستقبل الفأري GITR (mGITR): تم التحقق من نجاح الإعداد وقدرة الخلايا التائية البشرية Jurkat على التعبير عن المستقبل الفأري mGITR بطريقة الترسيب المناعي، حيث رسب البروتين mGITR بالضد الجرذي (rat anti-GITR IGg2b, k) وأثبتت نتائج التيقن

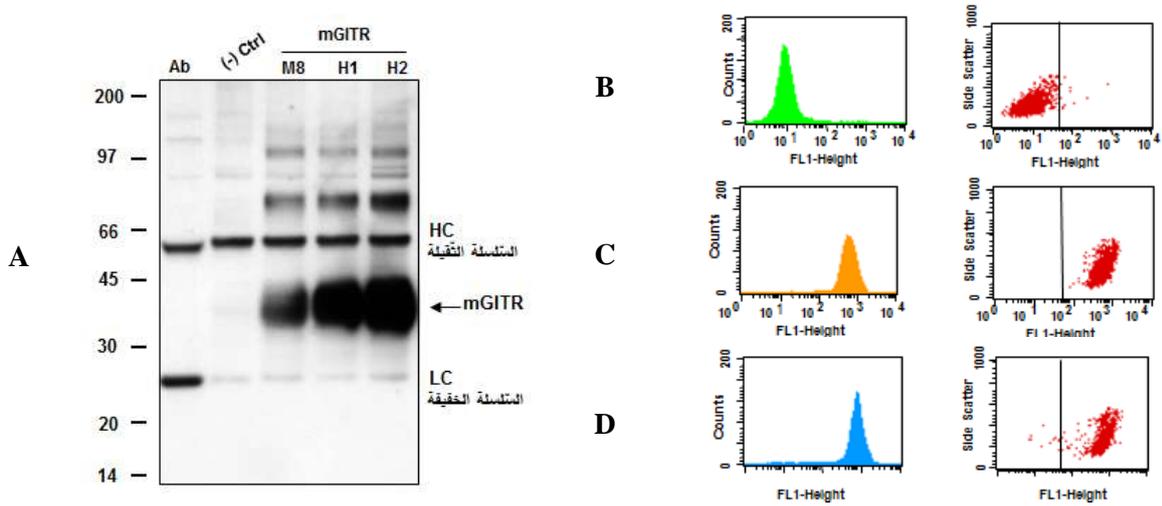
المناقشة Discussion:

يعدّ تعزيز المناعة المضادة للأورام عن طريق حصر نقاط التدقيق (التحقق) المناعي أحد السبل الحديثة المتبعة في معالجة السرطانات. وتتجلى صوابية هذه المنهجية العلاجية في النجاح الذي أحرزته الأضداد الموجهة ضد أهداف تشمل مستضد الخلايا التائية السامة cytotoxic T-lymphocyte antigen (CTLA-4) (مثل Ipilimumab)، وحاصرات محور لجين الموت المبرمج (PD-1) ومستقبل الموت الخلوي المبرمج (PD-1) (مثل cemiplimab، nivolumab، pembrolizumab)، والتي تقوم جميعها بحصر الشارات التنشيطية الواردة إلى الخلايا التائية، وقد حظيت هذه الأدوية بموافقة إدارة الأدوية والأغذية FDA ورخصت للاستعمال في علاج أشكالٍ متعدّدة من السرطان. غير أنّ تطوير الخلايا السرطانية لآليات مقاومة متنوعة منبهة لردّ الفعل المناعي قد حثّ البحث عن أهداف مناعية جزيئية جديدة لتقوية الاستجابة المناعية الكابحة للأورام. يعدّ تصميم نواض لمستقبل عامل النخر الورمي المحرض بالغليكوكورتيكويد (GITR) أحد الأهداف الجزيئية العلاجية الواعدة. (Heinhuis KM, Sukumar S, 2017; Tran B) (2020) قمنا في هذه الدراسة بتصميم بروتينين خيمريين أحدهما مثوي والآخر مثلوث من لجين المستقبل الفأري mGITR ملتحمين fused بالقطعة الثابتة hFc γ من الغلوبولين المناعي IgG البشري، وهدفنا من خلال هذا التصميم إلى تحقيق جملة من الفوائد كان أهمها سهولة التنقية باستعمال التقنيات المعتمدة في تنقية الأضداد وحيدة النسيلة وذلك اعتماداً على ألفتها العالية للبروتين A، إضافة إلى منحها البروتين المدمج القدرة على التثاني dimerization نتيجة لتشكل جسور ثنائية الكبريت بين قطعتي Fc γ ، وإطالة عمره النصفى لدى البشر المتواسط بمستقبل Fc γ الوليدي (FcRn) neonatal Fc receptor، والذي يحمي

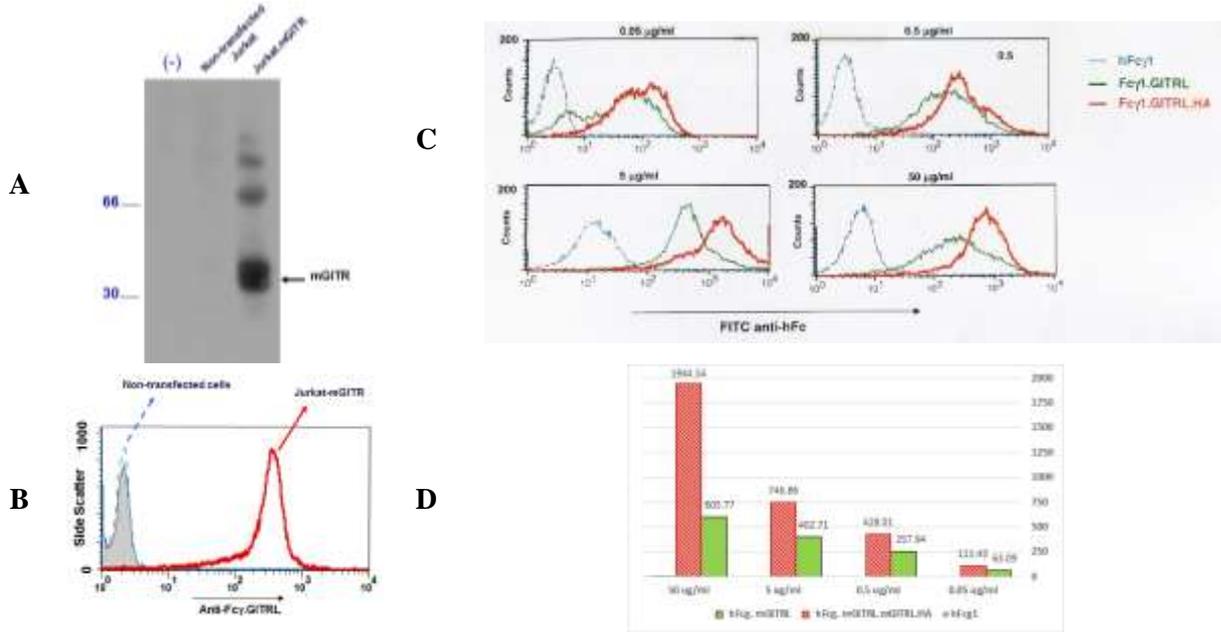
بطريقتي الترسيب المناعي والجريان الخلوي. برهنت نتائج كلتا المقايستين خصائص ارتباط نوعي للبروتينين الخيمريين المأسوبين بالمستقبل الفأري كما يبيّن الشكل 5، حيث أمكن ترسيب المستقبل باللجين المرتبط من خلال القطعة hFc γ بالطور الصلب (حبيبات آغاروز حاملة ل البروتين A) (الشكل 5A). كما أمكن للبروتينين المأسوبين الارتباط بالمستقبل المعبر عنه على سطوح خلايا Jurkat-mGITR (الشكل 5B). **تقييم فعالية البروتينين الخيمريين المأسوبين المثوي (hFc γ mGITR)2 والمثلوث HA:mGITRL.2 (Fc γ mGITR)2 في تحريض الخلايا التائية** قمنا لاحقاً بتقييم الاستجابات الإنقسامية في الزجاج *in-vitro* للخلايا التائية الطحالية المعزولة من الفأر (الشكل 5A)، ولنفي إمكانية توفير الخلايا المقدمّة للمستضد للشارة الثانية والتي قد تسهم في تعزيز تفعيل الخلايا التائية ونكاتها، قمنا باختبار التأثير التحريضي المشارك لكل من البروتينين كذلك على الخلايا التائية الفأرية المنقاة CD4⁺CD25⁻ (بغيا بآية إضافة لخلايا مساعدة خارجية المنشأ) (الشكل 5B) لدى تفعيلها بحد وحيدة النسيلة (anti-CD3 mAb) (2c11) موجّه ل CD3 في معقد مستقبل الخلايا التائية الفأرية، بوجود أحد البروتينين الخيمريين المأسوبين كعامل محرّض مشارك costimulator أو غيابه. حضنت الخلايا في أطباق زرع خلوي تحتوي على كميات دون مثالية suboptimal من الضدّ الموجه نوعياً ل CD3 والمرتبطة بقاع أبار الأطباق. يظهر الشكل 6 نكاث الخلايا بفعالية أعلى بوجود البروتين الخيمري المثوي أو المثلوث بالمقارنة مع استجابة الخلايا في غياب GITRL حيث كانت الاستجابة التكاثرية أصغر تجاه anti-CD3 بمفرده. تثبت هذه النتائج تأثيراً محرّضاً مشاركاً أدى إلى زيادة ملحوظة في انقسام الخلايا التائية في الشروط دون المثلى من تراكيز شارة التفعيل الأولى لمستقبل الخلايا التائية TCR والتي يوقرها الضد النوعي anti-CD3 mAb (الشكل 6).

إطالة العمر النَّصفيَّ لهذه البروتينات ذات المأمولية العلاجية لدى البشر، في حال تمَّ الانتقال بها إلى الدَّراسات السريرية بعد إثبات نجاعتها ومأمونيتها في الدَّراسات ما قبل السريرية. برهنت دراستنا على وظيفية functionality وفعالية البروتين المثلوث مقاسةً بارتباطه بمستقبله سواء في تجارب الترسيب المشترك أم دراسات الارتباط على سطوح الخلايا، وقدرته على تأمين الشَّارة المفعلة الثانية اللازمة لتكاثر الخلايا النَّائية الساذجة -CD4+CD25 والمحرَّض بـ anti-CD3.

IgG من النَّدرِك داخل الخلوي، ما يمنحه عمراً نصفياً طويلاً في الدَّوران يقارب الـ 21 يوماً ومستويات بلازمية مرتفعة لدى الإنسان (Patel DD and Bussel JB (2020)). تمكنا في هذا البحث من دمج اللجين GITRL الفأري مع الشدفة Fc γ البشرية، ما منح البروتين المدمج القدرة على تشكيل مثنويات وأتاح لنا غريلة النَّائل المنتجة للبروتين المأشوب وانتقاء الأعلى إنتاجية وتنقية البروتينين المثنوي والمثلوث باستعمال الحبيبات المطلية بالبروتين A إضافةً إلى



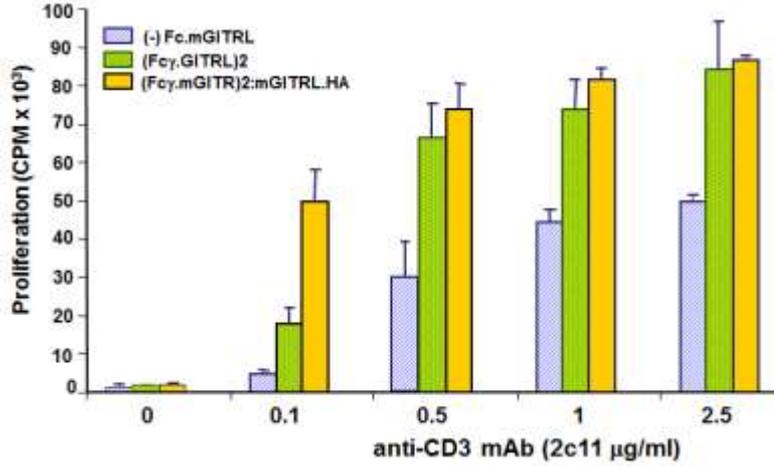
الشكل (4) انتقاء نائل خلايا Jurkat النَّائية البشرية عالية التَّعبير عن المستقبل الفأري (mGITRL) اعتماداً على مقايستي الترسيب المناعي المتبوع بالتبقيع المناعي (A) والجريان الخلوي لكشف التَّعبير عن mGITRL على سطوح الخلايا (B, C, D). بيَّنت النَّاتج امتلاك النَّائل M, H1, H2 لمستويات تعبيرٍ مرتفعة عن بروتين GITRL الفأري الكلي، وتموضعه على الغشاء الخلوي في النسيلتين H1 الممثلة في (C) و H2 الممثلة في (D) بالمقارنة مع ضد غير نوعي isotype شاهد (B)



الشكل (5): تقييم ارتباط البروتينين المأسوبين المثنوي والمثلوث بالمستقبل GITRL الفأري (mGITR) المعبر عنه في خلايا Jurkat التائية البشرية المعدة ببلازميد التعبير mGITR-pMTF (النسيلة عالية التعبير (H1) وذلك بطريقتي الترسيب المناعي (A) للمستقبل mGITR في الحالة الخلوية باستعمال البروتين A كطور صلب (مثبت على حبيبات الأغاروز) لربط القطعة hFc γ من البروتين المأسوب متبوعاً بالرحلان الكهربائي على هلام SDS-PAGE والتبقيع المناعي باستعمال أضداد anti-GITRL Ab، والجريان الخلوي (B) للتحقق من القدرة على الارتباط بالمستقبل على سطوح الخلايا، استعملت خلايا Jurkat غير المعدة للمقارنة كشاهد سلبي. أبدى البروتين المثلوث قدرة ارتباط أعلى بالمستقبل mGITR بالمقارنة مع البروتين المثنوي بالتراكيز المستعملة (0.05، 0.5، 5، 50 مكغ/مل) (C). مقارنة لمتوسطات شدة الفلورة mean fluorescence (MF) بين البروتينين (D). واستعمل بروتين hFc γ بمثابة شاهد سلبي في C و D.

كبروتينات عبر غشائية من النمط الثاني بنطاقات خارج خلوية ectodomains مثلوثية تقابلها ثلاثة مستقبلات، يشكل كل مستقبل منها بارتباطه باثنين من موحودات اللجان ligand monomers وحدة رئيسية لنقل الإشارة الخلوية، حيث يتطلب النقل الفعال للإشارات داخل الخلوية بدءاً من المستقبلات عملية تعتمد clustering لوحيدات متعددة من المستقبل. تقترح بعض الدراسات الحديثة بأن المستقبلات تكون مرتبة بشكل مسبق على سطوح الخلايا في حالة "الراحة resting" غير الناقلة للإشارة "non-signaling" الخلوية في بنى سداسية مؤلفة من مثنويات متوازنة ومتعاكسة الاتجاه anti-parallel. يتطلب تفعيل المستقبل ارتباط اللجين وتثبيت الحالة "الفعالة شاربياً" (Vanamee and Faustman, 2018).

وعلى النقيض مما توصلت إليه البحوث التي وصفت خصائص جميع بروتينات عائلة TNF الأخرى على أنها مثلوثات متماثلة الوحيدات homotrimers، فقد برهن Chattopadhyay (2008) على أن GITRL الفأري يبدي بنية بلورية مثنوية فريدة كما أنه يوجد كمتنوي ثابت في المحلول. غير أن الجديد الذي أفضت إليه دراستنا الحالية تجلّي بامتلاك البروتين المثنوي لخصائص وظيفية مشابهة للبروتين المثلوث من حيث القدرة على الارتباط بالمستقبل mGITR وتفعيل الخلايا التائية المساعدة الساذجة، وإن بدرجة أقل نسبياً من نظيره المثلوث. يشكل تفسير هذه النتائج تحدياً، نظراً لتعارضها مع المنظور السائد لنقل الإشارة الخلوية المحرض بـ لجان "فوق عائلة عامل نخر الورم" (TNFSF) والتي يُعبر عنها على سطوح الخلايا



الشكل (6): تعزيز الاستجابة التكاثرية للخلايا التائية المساعدة الفأرية الساذجة Naïve mouse CD4+ T Cells بتحفيز البروتين المأسوب المثنوي (Fc γ .mGITRL)2 أو المثلوث (Fc γ .mGITR)2:mGITRL.HA بتركيز قدره 0.05 مكغ/مل استجابةً لتراكيز متزايدة من anti-CD3.

أهمية البحث الحالي الذي يقترح أن كلا اللجينين الفأريين المثنوي والمثلوث، وظيفيان وفعالان بصورة شبه متكافئة لكن مع أفضلية للمثلوث، وقد يعود ذلك لتشكيلهما بلمرات قليلة الوحدات عالية الترتيب قادرة في كلتا الحالتين على نقل الشارة الضرورية لتفعيل الخلايا التائية، غير أن إثبات صحة الفرضية في البشر تقتضي مزيداً من البحوث وعقد المقارنات بين اللجينين البشريين المثنوي والمثلوث. وفي حال ثبتت فعالية البروتين البشري المثنوي، فسيكون لذلك تداعياته الإيجابية من حيث اليسر من الناحيتين التقنية والإنتاجية، ما يمهد الطريق لتطبيقات سريرية واعدة.

شكر وعرافان Acknowledgements

يتقدم الباحث بوافر الشكر والعرافان للأستاذ الدكتور مارك تيكوسينسكي Mark Tycosinski للاستضافة في مخبره والعمل مع فريقه، وعلى الأخص الدكتور ماثيو وبيير Matthew C. Weber وما قدمه من دعم تقني في تنقية الأضداد وحيدة النسيلة والبروتينات المدمجة بالقطعة Fc γ ، وذلك في فترات

كشفت دراسة حديثة لـ Wang F وزملائه نُشرت مؤخراً (2021) عن تشارك النوعين الفأري والبشري بوجود نمطين من التأثيرات؛ الأول تأثر من نمط مستقبل-لجين-receptor interface، والثاني تأثر من نمط مستقبل-مستقبل-receptor interface، حيث تمكّن التأثيرات الفريدة بين المستقبلات، والتي تتواسطها النهايات الكربوكسيلية، من تشكيل بنى عالية الترتيب على سطح الغشاء الخلوي، مع وجود فارق جوهري بين اللجين الفأري والبشري يتفق مع نتائجنا ويُفسرها، حيث تبين أن تأثر المستقبل البشري مع لجينه (hGITR-hGITRL) يؤدي لتشكيل شبكة مسدوسية hexameric network مؤلفة من معقدات غشائية، في حين يكون المعقد الفأري للجين ومستقبله (mGITR-mGITRL) سلسلة خطية نظراً لتأثيرات مثنوية (Wang, 2021)

وكنتيجة لما ذكر آنفاً، فإن الدراسات ما قبل السريرية في الحي *in vivo* على الفئران بلجائن مثنوية قد تبدي سلوكيات مختلفة عن تلك الناجمة عن اللجائن المثلوثية البشرية. ومن هنا تبرز

متعددة بدءاً من 2005 وحتى 2014، وللباحثين الدكتور
ماساهيدي تون Masahide Tone مكتشف الـ GITRL لتقديره
بلازميد التعبير pMTF-mGITR- والـ cDNA المرمز للنطاق
العامة
للتقانة
الحيوية.

خارج الخلوي لـ mGITRL. كما يتقدم بجزيل الامتنان للأستاذ
الدكتور عصام القاسم للدعم والاستضافة في مخابر الهيئة

References:

1. Akinleye A, Rasool Z. Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics. *J Hematol Oncol.* 2019 Sep 5;12(1):92. doi: 10.1186/s13045-019-0779-5.
2. Chattopadhyay K, Ramagopal UA, Mukhopadhaya A, Malashkevich VN, DiLorenzo TP, Brenowitz M, Nathenson SG, and Almo C. Assembly and structural properties of glucocorticoid-induced TNF receptor ligand: Implications for function. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2007; 104:19452–19457.
3. Chattopadhyay K, Ramagopal UA, Brenowitz M, Nathenson SG, Almo SC. Evolution of GITRL immune function: murine GITRL exhibits unique structural and biochemical properties within the TNF superfamily. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2008; 105:635–640.
4. Clouthier DL and Watts HT, Cell-specific and context-dependent effects of GITR in cancer, autoimmunity, and infection. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 2014; 25:91-106.
5. Croft M. Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134). *Annu Rev. Immunol.* 2010; 28: 57–78.
6. Croft M, Benedict CA, Ware CF. Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. *Nat Rev Drug Discov.* 2013; 12:147-168. doi: 10.1038/nrd3930.
7. Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiukn A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol. Rev.* 2009; 229: 152–172.
8. Hehlhans T and Pfeffer K, The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology.* 2005; 115: 1–20
9. Heinhuis KM, Ros W, Kok M, Steeghs N, Beijnen JH, Schellens JHM. Enhancing antitumor response by combining immune checkpoint inhibitors with chemotherapy in solid tumors. *Ann Oncol.* 2019; 30:219-235.
10. Heinhuis KM, Carlino M, Joerger M, Di Nicola M, Meniawy T, Rottey S, et al., Safety, tolerability, and potential clinical activity of a glucocorticoid-induced tnfr receptor-related protein agonist alone or in combination with nivolumab for patients with advanced solid tumors: a phase 1/2a dose-escalation and cohort-expansion clinical trial. *JAMA Oncol.* 2020; 6:100–107.
11. Kwon B, Yu KY, Ni J, Yu GL, Jang IK, Kim YJ, Xing L, Liu D, Wang SX, Kwon BS, Identification of a novel activation-inducible protein of the tumor necrosis factor receptor superfamily and its ligand, *J Biol. Chem.* 1999; 274: 6056–6061.
12. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002; 16: 311-323.
13. Montfort A, Colacios C, Levade T, Andrieu-Abadie N, Meyer N, Ségui B. *Front Immunol.* The TNF Paradox in Cancer Progression and Immunotherapy. 2019; 10:1818. doi: 10.3389/fimmu.2019.01818
14. Nocentini G, Giunchi L, Ronchetti S, Krausz LT, Bartoli A, Moraca R, et al. A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1997; 94: 6216-6221.
15. Nocentini, G. & Riccardi, C. GITR: a modulator of immune response and inflammation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2009; 647: 156–173.
16. Ono M, Shimizu J, Miyachi Y, and Sakaguchi S, Control of autoimmune myocarditis and multiorgan inflammation by glucocorticoid-induced TNF receptor family-related protein high, Foxp3-expressing CD25+ and CD25– regulatory T cells, *J Immunology,* 2006; 176:4748–4756.
17. Patel DD and Bussel JB. Neonatal Fc receptor in human immunity: Function and role in therapeutic intervention. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2020: 146, 467-478.
18. Perez-Ruiz E, Minute L, Otano I, Alvarez M, Ochoa MC, Belsue V, de Andrea C, Rodriguez-Ruiz ME, Perez-Gracia JL, Marquez-Rodas I, Llacer C, Alvarez M, de Luque V, Molina C, Teijeira A, Berraondo P, Melero I. Prophylactic TNF blockade uncouples efficacy and toxicity in dual CTLA-4 and PD-1 immunotherapy. *Nature.* 2019; 569:428-432.
19. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol.,* 2002; 3:135-142

20. Sukumar S, Wilson DC, Yu Y, Wong J, Naravula S, Ermakov G, Riener R, Bhagwat B, Necheva AS, Grein J, et al. Characterization of MK-4166, a clinical agonistic antibody that targets human GITR and inhibits the generation and suppressive effects of T regulatory cells. *Cancer Res.* 2017;77:4378–4388.
21. Tigue NJ, Bamber L, Andrews J, Ireland S, Hair J, Carter E, Sridharan S, Jovanović J, Rees DG, Springall JS, et al. MEDI1873, a potent, stabilized hexameric agonist of human GITR with regulatory T-cell targeting potential *OncoImmunology*, 6 2017, p. e1280645
22. Tran B, et al. Dose escalation results from a first-in-human, phase 1 study of glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein agonist AMG 228 in patients with advanced solid tumors. *J. Immunother. Cancer.* 2018; 6:93.
23. Vanamee ÉS and Faustman DL. Structural principles of tumor necrosis factor superfamily signaling. *Sci Signal.*, 2018; 11: 511 DOI: 10.1126/scisignal.aao4910
24. Wajant H and Siegmund D, TNFR1 and TNFR2 in the Control of the Life and Death Balance of Macrophages. *Front Cell Dev Biol.* 2019; 7: 91.
25. Wang F, Chau B, West SM, Kimberlin CR, Cao F, Schwarz F, Aguilar B, Han M, Morishige W, Bee C, Dollinger G, Raipal, and Strop P. Structures of mouse and human GITR–GITRL complexes reveal unique TNF superfamily interactions. *Nature Communications*, 2021; 12: 1378
26. Zhou Z, Tone Y, X. Song X, Furuuchi K, Lear JD, Waldmann H, Tone M, Greene MI, Murali R, Structural basis for ligand-mediated mouse GITR activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 641-645.

