مقاله آموزشی

کاربرد DNA به‌عنوان ادجوانت در واکسن

غلامرضا نیکبخت بروجنی*، ریحانه قربان پور، ندا برجسته

چکیده

در طبیعت موجودات زنده با پاتوژن ها یا میکروارگانیسم های مختلفی مواجه می‌شوند و برای ادامه حیات خود به شناسایی و مبارزه با این پاتوژن‌ها نیاز دارند. پاتوژن ها در ساختار خود ترکیباتی از قبیل لیپوپلی ساکارید، نوکلئیک اسید و لیپوپروتئین دارند که دستگاه ایمنی موجود زنده می‌تواند آنها را شناسایی کند. از این ساختارهای مولکولی با عنوان الگوهای مولکولی پاتوژن نام می برند. شناسایی الگوهای مولکولی پاتوژن توسط دسته ای از گیرنده های سلولی (TLR) انجام می‌شود. تا کنون ۱۴ نوع از این گیرنده ها شناسایی شده است و هرکدام از آن ها مسؤول شناسایی گروهی از الگوهای مولکولی پاتوژن هستند. TLR۹ یکی از این گیرنده ها است و وظیفه شناسایی DNA باکتری و ویروس را بر عهده دارد. تحریک این گیرنده موجب آزادسازی تعدادی از واسطه‌های ایمنی و فعال شدن سامانه ایمنی اکتسابی می شود. این گیرنده یک توالی دی نوکلئوتید غیر متیله، یعنی CPG، را شناسایی می‌کند. امروزه نوع سنتتیک این توالی در تحقیقات ایمنی شناسی کاربرد های فراوانی یافته که از آن جمله می توان به کاربرد آن به‌عنوان ادجوانت واکسن ها اشاره کرد. به‌علاوه، دی نوکلئوتید CPG غیر متیله می‌تواند پاسخ لنفوسیت های T را در برابر تومورها القاء و پاسخ‌های ایمنی سلولی را تنظیم کند و در نهایت، ایمنی هومورال را فعال سازد.

واژه‌های کلیدی: جرایز CPG؛ رسپتوز Toll-like ؛ آدجوانت؛ ایمونولوژی

مقدمه

بدن موجود زنده، غیر از سدهای فیزیکی و شیمیایی، دارای دو دستگاه ایمنی ذاتی و اکتسابی است که از بـدن در برابر پاتـوژن ها محافظت می کنند. برای این مقابله ابتدا باید پاتوژن‌ها شناسایی شوند. مولکول های کوچکی در ساختار پاتوژن ها وجود دارند که توسط گیرنده های موجود در سامانه ایمنی ذاتی گیاهان و حیوانات شناسایی می شوند. به این مولکول‌ها که شامل لیپوپلی‌ساکاریدها،اسیدهای نوکلئیک و لیپوپپتیدهای باکتری ها، پپتیدوگلیکان‌ها و اسیدهای نوکلئیک ویروس‌ها، و پروتئین‌ها و گلیکولیپیدهای قارچ ها هستند، الگوهـای مولکولـی پاتوژن (PAMP)[1] می گویند. چنین الگوهای مولکولی در ساختار تمام میکروارگانیسم ها وجود دارند و در نتیجه، برخی پیشنهاد می کنند تا به‌جای عبارت PAMPs از واژه الگوی مولکولی میکروبی (MAMP)[2] استفاده شود (۱).

گیرنده‌های شناخت الگویی (PRR)[3] که مسؤول شناسایی PAMPها هستند، به دو گروه عمده طبقه‌بندی می‌شوند (۲):

* غلامرضا نیکبخت بروجنی
دانشیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
تهران، خیابان آزادی، تقاطع خیابان قریب تلفن ۰۹۱۲۲۱۸۲۱۶۸ / E.mail: nikbakht@ut.ac.ir
تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۱۸ تاریخ پذیرش: ۸۹/۸/۱۰

1. Pathogen-Associated Molecular Pattern
2. Microbe-Associated Molecular Pattern
3. Pattern Recognition Receptors

Archive of SID
www.SID.ir

۱- PRRهای پیغام‌رسان؛ مانند TLR [۴] و NLR [۵]
۲- PRRهای داخل سلولی؛ مانند گیرنده مانوز در ماکروفاژ و گیرنده پاک‌سازی‌کننده در فاگوسیت ها.

TLRها

TLRها گروهی از پروتئین ها هستند که در سامانه ایمنی ذاتی بدن موجودات زنده نقش مهمی بر عهده دارند. این گیرنده ها برای اولین بار در سال ۱۹۸۵ در دروزوفیلا کشف شدند، اما در سایر موجودات زنده، شامل بی مهرگان و مهره‌داران، نیز یافت می‌شوند و مولکول های اصلی آن ها در باکتریها و گیاهان نیز موجود است (۳). تخمین می زنند که پستانداران بین ۱۳تا ۱۵نوع TLR دارند. سیزده نوع از این گیرنده‌ها، شامل TLR1 تا TLR13، در انسان ها و موش ها شناسایی شده اند. این گیرنده ها در سلول های ایمنی بدن، مانند ماکروفاژها، سلول های دندریتیک، نوتروفیلها و مونوسیت ها بیان می شوند (۴).

به طور کلی، می توان TLRها را با توجه به لیگاند، به دو گروه تقسیم کرد (۴):

۱- گروه یک شامل TLR1، TLR2، TLR4 و TLR6 است که PAMPها را از طریق لیپیدها شناسایی می کنند.
۲- گروه دوم شامل TLR3، TLR7، TLR8 و TLR9 است که PAMPها را از طریق اسیدهای نوکلئیک شناسایی می کنند.

لیگاند TLR11 پروفیلین است و لیگاندهای TLR10، TLR12، TLR13 و TLR15 هنوز شناخته نشده اند (۳).

ژن کد کننده TLR10 در انسان و موش وجـــود دارد، ولی به نظـــر می رسد بیان آن در موش ها قبلاً توسط رتروویروس تخریب شده است. از سوی دیگر، ژن‌های TLR11، TLR12 و TLR13 در موش ها کشف شده‌اند، ولی در انسان بیان نمی‌شوند. در سایر پستانداران نیز ممکن است TLRهایی بیان شوند که در انسان بیان نمی‌شوند و این موضوع استفاده پژوهشی از حیوانات را به‌عنوان نمونه ایمنی ذاتی انسانی پیچیده می سازد (۴). بیشتر TLR ها روی غشاء سلول‌ها قرار دارند و به PAMP ها متصل می شوند. تنها چهار گیرنده TLR3، TLR7، TLR8 و TLR9 داخل اندوزوم و درون سلول قرار دارند و مسؤول شناسایی و اتصال به اسید نوکلئیک پاتوژن ها هستند.

سازوکارهای حاصل از تحریک TLRها

هر پاتوژنی از PAMPهای مختلفی تشکیل شده است و می تواند یک یا چند TLRرا فعال کند. هر پروتئین TLR از یک زنجیره خارج سلولی شامل توالی تکرار شونده لوسین تشکیل شده که وظیفه شناسایی و اتصال با PAMP را بر عهده دارد و یک زنجیره داخل سلولی شامل Toll/IL-1 R (TIR) دارد که برهم کنش های پروتئینی-پروتئینی را تحریک می‌کند و به فعال شدن گروهی از پروتئین های تطبیـــق دهنده[۶] و عوامل آبشـــاری منجر می شود. پنـــج پروتئین، با نـــام‌های MyD88، TIRAP[۷]، TRIF[۸]، TRAM[۹] و SARM[۱۰] شناخته شده‌اند (۴تا۶).

چهار پروتئین اول در پیام TLR نقشی اساسی دارند و تعیین مسیر فعال شدن آبشاری وابسته به این است که کدام یک از پروتئین های تطبیق دهنده توسط TLR استفاده شود. MyD88 اولین پروتئین ضروری در القاء پیام آبشاری TLR است و در بافت میلوئیدی یافت می شود. MyD نشان دهنده فعالیت تمایز میلوئیدی و ۸۸ تعداد ژن‌های القاء کننده بیان پروتئین MyD88 است. به‌طور کلی، این پروتئین میانجی پیام همه TLRها، به‌غیر از TLR3، است. TRIF پروتئین تطبیق دهنده ناشی از فعال شدن TLR3 است (۴،۷و۸). MyD88 و TRIFبه فعال شدن عامل ترجمه هسته ای (NF-κb)[۱۱] و MAPKs[۱۲]منجر می شوند که حاصل آن بیان ژن سیتوکین های پیش‌التهابی است و از طرف دیگر، عامل تنظیم کننده اینترفرون ها[۱۳] را نیز فعال می کنند که به القاء ترشح اینترفرون ها می‌انجامد (۴،۷و۸) (شکل۱). TLRها با این سازوکارها هر دو سامانه ایمنی ذاتی و اکتسابی را علیه پاتوژن ها فعال می کنند و در واقع پل ارتباطی سامانه ایمنی ذاتی و اکتسابی بدن هستند (۴).

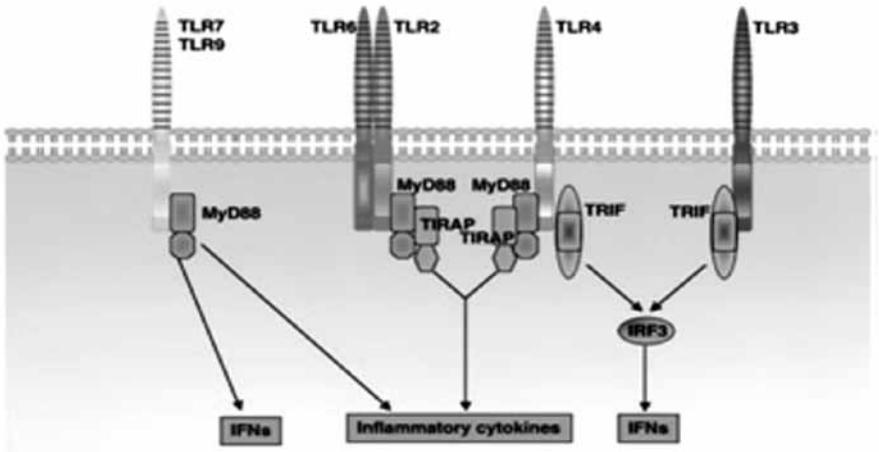
TLR9 مسؤول شناسایی DNA باکتری و ویروس

نام دیگر گیرنده TLR9، CD289 است و ۱۱۵ تا ۱۲۰ کیلودالتون وزن دارد. RNA پیام‌رسان TLR9 در بافت‌های ایمنی بدن، مثل گره‌های لنفاوی، مغز استخوان، لکوسیت های خون محیطی و به خصوص طحال، بیان می شود (۱۰). در انسان گیرنده TLR9 فقط در لنفوسیت های B خاطره‌ای و سلول های دندریتیک پلاسمایی (pDC) وجود دارد، اما در موش‌ها بیان TLR9 در مونوسیت ها، ماکروفاژ ها و سلول‌های دندریتیک نیز دیده می‌شود. وظیفه TLR9 شناسایی DNA باکتری، مایکوباکتری، ویروس و حتی انگل‌ها است (۱۱).

DNA پروکاریوت ها از توالی‌های دی نوکلئوتیدی سیتوزین و گوآنوزین

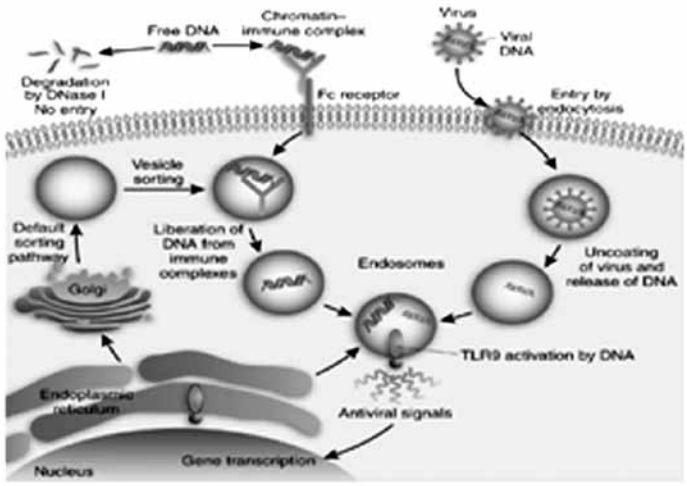
4. Toll-like Receptors
5. NOD-like Receptors
6. Adaptor Proteins
7. TLR Domain-containing Adaptor Protein
8. TIR Domain-containing Adapter-Inducing Interferon-β
9. TRIF-Related Adaptor Molecule
10. Sterile α and HEAT-Armadillo Motifs
11. Transcription Factor Nuclear Factor Kappa-B
12. Mitogen-Activated Protein Kinases
13. Interferon Regulatory Factor

www.SID.ir
Archive of SID



شکل ۱: شرکت پروتئین های تطبیق‌دهنده در مسیر پیام‌رسانی TLR. پروتئین MyD88 جهت تولید سیتوکین های التهابی در پاسخ به تمام لیگاندهای TLR، به‌جز TLR3، ضروری است. پروتئین TIRAP برای تولید سیتوکین های التهابی وابسته به TLR2 وTLR4 ضروری است، ولی در مسیر پیام‌رسانی مستقل TLR4 شرکت ندارد. پروتئین TRIF جهت پیام‌رسانی TLR3 و نیز در مسیر پیام‌رسانی TLR4 غیروابسته به MyD88 ضروری است. پروتئین های تطبیق‌دهنده دیگری نیز ممکن است در القاء اینترفرون توسط سایر TLRها، مانند TLR7 و TLR9، شرکت داشته باشند (برگرفته از مرجع ۹).

(CPG)، با فراوانی حدود ۲۰ برابر بیشتر از DNA یوکاریوت‌ها، تشکیل شده است. در ضمن، دی‌نوکلئوتید CPG در پروکاریوت ها غیر متیله و در یوکاریوت ها متیله است (۷). از طرف دیگر، DNA خودی پیش از ورود به داخل سلول، توسط آنزیم DNase I تجزیه می‌شود و وارد سلول نمی شود. در سلول‌های غیرفعال ایمنی، TLR9ها در شبکه رتیکولواندوپلاسمیک تجمع می‌یابند. با فعال شدن سلول، TLR9 به سمت بخش های اندوزومی و لیزوزومی می رود و در آنجا با CPG-DNA اندوسیتوز شده، در pH اسیدی (که به‌نظر می‌رسد برای شناسایی DNA ضروری است) واکنش می دهد (۴). بنابراین ترکیباتی مانند کلروکین و بافیلومایسین A۱، که اسیدی بودن اندوزوم را بر هم می‌زنند، سبب جلوگیری از فعالیت TLR9، پس از اتصال با CPG-DNA، می شوند. پیغام‌ها و سازوکارهایی که به این پیامد منجر می شود، هنوز کاملاً شناخته نشده‌اند (۱۲) (شکل ۲). TLR9 در سلول های اپیتلیوم، روی سطح و غشاء بازولترال، ظاهر می شود و بسته به جایگاه‌های مخصوص TLR9، پیام آن متفاوت است. تحریک TLR9در غشاء بازولترال، هنگامی که در معرض DNA باکتریایی داخل لومن روده قرار می گیرد، به فعال سازی مسیر NF-κB منجر می شود، ولی تحریک TLR9 سطحی از فعالیت NF-κB با تجمع پروتئین‌های مهارکننده NF-κB ممانعت می کند. این خاصیت در سلول های اپیتلیوم روده ای باعث کنترل التهابات روده ای می‌شود (۴).



شکل ۲: TLR9 در شبکه رتیکولواندوپلاسمیک متمرکز می شود و بعد از فعال شدن سلول به بخش های لیزوزومی و اندوزومی می‌رود (۱۲).

Archive of SID
www.SID.ir

فرایند حاصل از واکنش CpG و TLR9

سازوکارهای ایمنی ناشی از تحریک TLR9 که به‌صورت آبشاری و در پی هم فعال می شوند، به شرح زیراست (۴تا۶و۹):

۱- فعال سازی سلول های NK و سلول های عرضه کننده آنتی ژن مثل ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک.

۲- بلوغ سلول‌های دندریتیک نابالغ به سلول های عرضه کننده آنتی ژن (APC) [۱۴] و تولید سیتوکین های سلول‌های دندریتیک بالغ.

۳- افزایش مهاجرت یاخته های شجری.

۴- بیان بالای مولکول های MHC کلاس II، CD80، CD40 و CD86.

۵- آغاز القاء پاسخ ایمنی Th1 توسط یاخته‌های شجری و در نتیجه، کاهش ساخت IgE توسط Th1 و افزایش ترشح IgG و IFN-γ.

۶-آغاز تولید IL-6، IL-18، IL-12، IFN-ß، IFN-α، IFN-γ و TNF-α که همگی به بهبود پاسخ ایمنی Th1 منجر می‌شوند و لنفوسیت‌های سیتوتوکسیک را نیز تحریک می کنند.

این فرایندها به پاسخ ایمنی سلولی در برابر پاتوژن های اختصاصی و تومورهای سیتوتوکسیک منجر می شوند. به این ترتیب، ممکن است بتوان از واکنش TLR9-CPG برای اهداف درمانی مختلف استفاده کرد. از جمله می توان از CPG-DNA به‌عنوان ادجوانت واکسن، در درمان سرطان، و نیز به عنوان ضد آلرژن و تقویت کننده ایمنی استفاده کرد (۸و۱۳).

عوارض جانبی CPG-DNA

با وجود تمام مزایای ذکرشده، CPG معایب و عوارضی هم دارد که عبارتند از (۶):

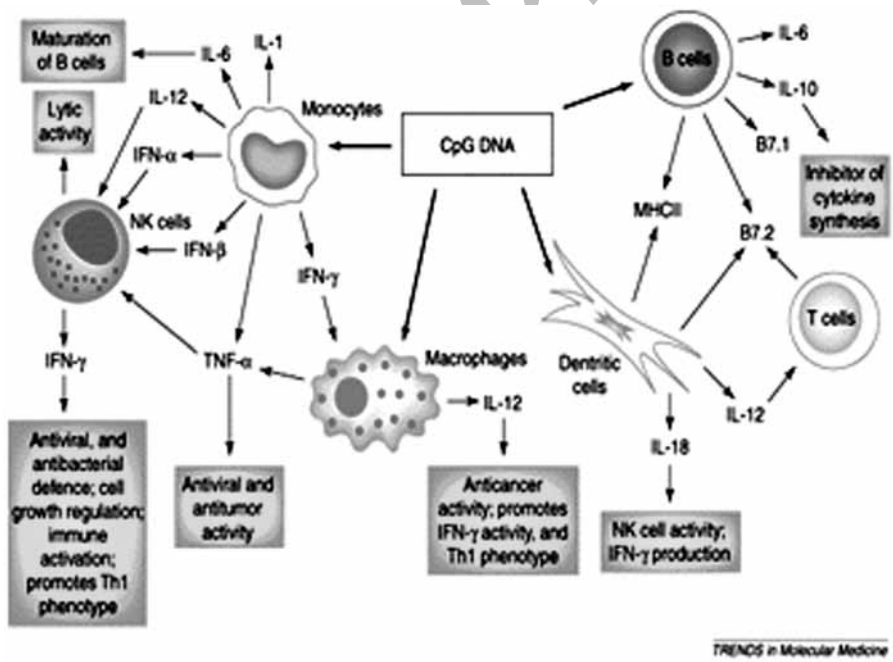
۱- ترشح سیتوکین های التهابی و ایجاد پاسخ های التهابی.

۲- ترشح مقادیر بالای IL-6 و TNF-α و ایجاد التهاب موضعی.

۳- ایجاد التهاب موضعی در تزریق عضلانی واکسن حاوی CPG، اگرچه خوشبختانه هنوز موردی از تخریب بالینی ناشی از CPG-DNA باکتری گزارش نشده است.

۴- القاء بیماری های خودایمن که سازوکار آن شامل موارد زیر است (۱۴):

الف- تحریک تولید و فعال سازی پلی کلونال لنفوسیت‌های B



شکل۳: آثار CPG-DNA بر سلول های ایمنی میزبان. سیتوکین های مختلفی که در درمان مفید هستند، در پاسخ به فعال سازی سلول های ایمنی میزبان بوسیله CPG -DNA تولید می شوند (۵).

14. Antigen-presenting Cell

www.SID.ir

ب- ایجاد مقاومت در برابر فرایند آپوپتوز در لنفوسیت های B که مسؤول شناسایی آنتی‌ژن های خودی هستند.
ج- فعال کردن بنیانی لنفوسیت‌های B و تولید آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن های خودی.
CpG-DNA در افراد مستعد بیماری های خودایمن، به‌ویژه ابتلاء به لوپوس اریتروماتوز سیستمیک (SLE) و آرتریت روماتوئید را افزایش می دهد. اما در این موارد، داروی کلروکین ممکن است با مهار IgG، جلوی بروز علایم بالینی این بیماری‌ها را بگیرد.

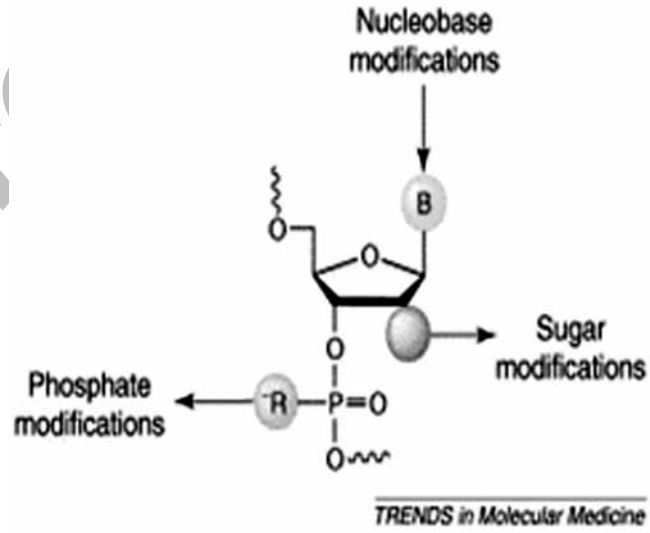
اثر توالی DNA بدون حضور دی‌نوکلئوتید CPG

توالی های DNA فاقد نوکلئوتید CPG نیز لنفوسیت‌های B را فعال می کنند، اما سیتوکین‌های Th1 و کموکین‌های مترشحه ناشی از آن‌ها بسیار محدود است (۴). برای مثال، توالی 5́-TC- از نوع فسفوتیوات، با تحریک TLR9 به پاسخ ایمنی Th۲ منجر می شود و توالی‌های حاوی داکسی اینوزین و داکسی سیتیدین (5́-TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT) پاسخ ایمنی Th1 را فعال می‌کنند. هم‌چنین توالی‌های غنی از T و A، مانند 5́-TATAATTTTTACCAACTAGC، نیز TLR9 را تحریک می‌کنند. برای نشان دادن اهمیت تحریک TLR9، محققان در آزمایشگاه با ایجاد نقص ژنتیکی، موش هایی بدون توان بیان پروتئین TLR9 تولید کردند. این موش ها در برابر CPG هیچ‌گونه اثری از تکثیر سلول های طحالی، تولید سیتوکین های التهابی از ماکروفاژها و بلوغ سلول های دندریتیک را نشان ندادند (۶و۱۵).

CPG الیگو داکسی نوکلئوتید های سنتتیک (C_pG-ODN)

آثار مفید پاسخ ایمنی ناشی از DNA باکتریایی در بدن باعث شد که محققان در آزمایشگاه، با الگو قرار دادن توالی C_pG باکتریایی، الیگو داکسی نوکلئوتید های سنتتیک حاوی توالی C_pG را بسازند (۶و۱۱). دیده شده است که تحریک ایمنی توسط C_pG-ODN در گونه های مختلف حیوانی به خصوصیات ساختاری الیگو داکسی-نوکلئوتید ها (ODN)، مانند طول، تعداد و موقعیت واحدهای C_pG در یک ODN، بستگی دارد (۶). محققان حدس می زنند که تغییرات تکاملی بین مولکول های TLR9 باعث تفاوت ویژه گونه‌ها در شناسایی DNA باکتری ها شده است. هنوز دقیقاً روشن نیست که کدام ساختار و گروه عملکردی در C_pG نقش حیاتی در شناسایی و واکنش گیرنده برای فعالیت تحریک ایمنی دارد.
یک مولکول DNA از سه جایگاه تشکیل شده است و هرگونه تغییری در این سه جایگاه باعث تغییر در واکنش C_pG- TLR9 می‌شود. این سه جایگاه عبارتند از (۵):
۱- واحد هتروسیکلیک (پورین و پریمیدین)
۲- قند (۲-داکسی ریبوز)
۳- زنجیره فسفات با بار منفی.

در آزمایش‌های مختلف برای ساخت CPG-ODN نتایج زیر به‌دست آمده است (۵):
۱- توالی ODN حداقل باید حاوی یک نسخه از CPG غیرمتیله باشد.
۲- وجود چند نسخه از CPG غیر متیله در واکسن های DNA تحریک بیشتری ایجاد می کند.



شکل٤: نمونه ای از ۲ داکسی نوکلئوتید. سه جایگاه مهم که روی عملکرد DNA-CPG در شناسایی و واکنش با گیرنده ها در مسیر تحریک ایمنی نقش دارند، در این تصویر مشاهده می شوند (۵).

Archive of SID
www.SID.ir

۳- زمینه فسفودی‌استر و فسفروتیوات و موقعیت نوکلئوتید ها در ODN مهم است؛ به‌طوری‌که پاسخ ایمنی ناشی از ODN با زمینه فسفوتیوات خیلی بیشتر تحریک می شود.
۴- در CPG، برخلاف انتهای 3́، هرگونه تغییری در انتهای 5́ نقش مهمی در ایجاد پاسخ ایمنی ایفا می کند.
۵- حذف هرکدام از نوکلئوتیدهای C و یا G در CPG باعث کاهش تحریک ایمنی می شود.
۶- TLR۹، CPG را از انتهای 5́ به 3́ می خواند.
۷- ایمونومرها که CPGهایی با دو انتهای 5́ هستند، تحریک ایمنی بسیار قوی تری ایجاد می‌کنند (۱۳،۱۶و۱۷).
بررسی‌ها نشان داده است که می‌توان ODNها را در دو گروه اصلی جای داد (۴تا۶):
۱- نوع D که باعث آغاز تمایز مونوسیت به سلول های دندرتیک بالغ می شود. ساختار این نوع ODN از نوع K پیچیده تر و الگوی آن شامل پریمیدین/پورین/ CG/پریمیدین/پورین است که توسط ۴-۳ باز در پهلوها کامل می شود. یک D ODN بهینه شامل زمینه فسفودی استر و انتهای پلی گوانوزین و حدود۶-۴ باز در انتهای 3́ است. کمترین طول فعال D ODN حدود۱۸ باز است.
۲- تیپ K که باعث القاء مونوسیت به تکثیر و ترشح IgM و IL-10 و IL-6 می شود. یک K ODN بهینه شامل یک یا چند CPG غیر متیله با باز تیمیدین نزدیک موقعیت 5́ و یک دی نوکلئوتید TPT یا APT در موقعیت 3́ است. حداقل طول فعال کننده ایمنی K ODN بیشتر از ۱۲ باز است.
در بررسی های آزمایشگاهی دیده شده است که سلول های ایمنی جداشده از پریمات های غیر از انسان، مانند شامپانزه و میمون رزوس، به K ODN و D ODN با الگویی مشابه با سلول های مونوسیت خون محیطی انسان پاسخ می‌دهند.
در جدیدترین تقسیم بندی، ODNهای سنتتیک را در سه گروه قرار می دهند (۶):
۱- CPG-A: در بخش اندوزومی جمع و به القاء مقادیر بالایی از IFN-α در یاخته‌های شجری پلاسمایی (pDC) منجر می‌شود و شامل یک CPG پالیندروم با انتهای 5́ و 3́ حاوی پلیG است.
۲- CPG-B: در بخش لیزوزومی سلول متمرکز می‌شود و به القاء کم IFN-α، ولی تحریک قوی لنفوسیت‌های B و ترشح سیتوکین‌های پیش التهابی می‌انجامد و توالی آن شامل یک انتهای 5́ حاوی TCGTCG و یک GTCGTT است.
۳- CPG-C: ترکیب ساختاری آن مشابه گروه‌های A و B است و به فعال سازی لنفوسیت‌های B و القاء IFN-α در pDC می‌انجامد. CPG-C از یک توالی CPG پالیندروم در مرکز و مشابه با CPG-A، بدون انتهای پلیG، تشکیل شده است و در انتهای 5́ حاوی توالی TCGTCG و GTCGTT مشابه با CPG-B است. از CPG-C، به‌علت دارا بودن خواص هر دو نوع A و B، در درمان سرطان و مبارزه با بیماری¬های عفونی استفاده شده است.

خاصیت ویژه گونه در CPG-ODN

هرکدام از CPG-ODها با توالی خاص خود خطری برای دستگاه ایمنی بیشتر حیوانات هستند، اما توالی متعارف آنها از گونه ای به گونه دیگر متفاوت است (۱۳). متأسفانه اطلاعات کمی درباره آثار CPG-ODN در حیوانات اهلی وجود دارد و بررسی و تحقیق درباره کارایی CPG-ODN در گونه های دامپزشکی به‌تازگی آغاز شده است. مطالعات آزمایشگاهی نشان داده‌اند که توالی GTCGTT بر تحریک لنفوسیت های گونه های مختلف، مانند گاو، گوسفند، بز، اسب،خوک، سگ، گربه و مرغ، مؤثر است (۶). مطالعات in vivo نیز نشان داده‌اند که توالی معمول محرک ایمنی CPG در انسان و جوندگان دارای الگوی P1P2CGP3P4 است. P1P2 شامل d(GT)-D(AA)-d(GA) و یا d(TT) است که در گونه های مختلف متفاوت است. P3P4 عموماً یک ۲- داکسی پیریمیدین، مانند تیمیدین، است (۵). بنابراین، در موش بیشتر هگزامر AACGTT و GAC GTT و در انسان هگزامر GTCGTT مطرح است. در رابطه با فعال سازی مونوسیت های خون محیطی خوک برای تکثیر و ترشح IL-6، IL-10 و TNF-α هگزامر پالیندروم ATCGAT شناسایی شده است (۵).
بررسی ها در مورد تحریک ایمنی توسط ODN در ماهی آتلانتیک نشان داده است که هگزامر 5-GTCGTT-3 پاسخ ایمنی بیشتری را القاء می کند و در ماهی می تواند مشابه تحریک ایمنی ذاتی مهره داران، باعث ایجاد ایمنی اولیه غیر اختصاصی ضد ویروس شود. در مقایسه القاء ایمنی یک ODN در دو گونه مختلف، اثر دو توالی ODN به شماره‌های ۲۲۱۶ از نوع A و ۲۰۰۷ از نوع B را توسط مونوسیت های خون محیطی گاو و گوسفند بررسی کرده‌اند. نتایج نشان داده است که اثر واضح وابسته به دوز در ترشح فقط در ODN شماره ۲۲۱۶ و در مونوسیت‌های خون محیطی گاو مشاهده می‌شود و در مورد مونوسیت های خون محیطی گوسفند چنین اثری دیده نمی‌شود. اما القاء وابسته به دوز در ترشح IFN-α توسط ODN شماره ۲۰۰۷ در مونوسیت های خون محیطی گوسفند دیده شده است (۶). این بررسی ها تفاوت واضحی در القاء CPG-ODN در پاسخ ایمنی ذاتی بین دو گونه مشخص را نشان می دهند (جدول ۱). نتیجه استفاده از CPG-ODN های مختلف در القاء پاسخ ایمنی انسان و گونه های متفاوت حیوانی در مطالعات in vitro (جدول ۱) و in vivo (جدول ۲) به‌اختصار آمده است (۶).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱: تحریک ایمنی CpG-ODN در مطالعات in vitro

جاندار	توالی مؤثر CpG-ODN (نوع)	سلول مؤثر	پاسخ	اثر	منبع
انسان	2006 tcgtcgttttgtcgttttgtcgtt(B)	سلول HEK293 + hTLR9	↑	عامل هسته‌ای کاپا B (NF-κB) و IL-8 (۲۰۰۶)	۱۸
		سلول B	↑	تکثیر سلولی (۲۰۰۶)	
		سلول دندریتیک محیطی	↑	IL-8 (۲۰۰۶)	
		سلول شجری مشتق از منوسیت (MoDC)	–	تکثیر سلولی	
موش	2395 tcgtcgttttcggcgcgcgccg(C)	سلول طحال	↑	IL-6IL-6 (۲۰۰۶، ۱۸۲۶ و ۲۳۹۵)؛ IL-12 (۱۸۲۶، ۲۰۰۶>۲۳۹۵ و ۲۲۱۶)؛ IFN-γ (۲۰۰۶، ۲۲۱۶>۲۳۹۵)	۱۹
گاو	2007 tcgtcgttgtcgttttgtcgtt(B)	سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC)	↑	تولید IFN-α و IFN-γ (۲۲۱۶)	۲۰
	2216 ggGGGACGATCGTCgggggg(A)		–	سیتوتوکسیسیتی مشابه سلول کشنده طبیعی (NK) (۲۰۰۷)	
گوسفند	2007 tcgtcgttgtcgttttgtcgtt(B)	سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC)	↑	تکثیر سلولی (۲۰۰۷)؛ IFN-α (۲۰۰۷)؛ فعالیت 2′–5′ A سنتتاز (۲۲۱۶، ۲۰۰۷)؛ سیتوتوکسیسیتی مشابه سلول کشنده طبیعی (NK) (۲۲۱۶>۲۰۰۷)	۲۱
	2216 ggGGGACGATCGTCgggggg(A)		–	IFN-γ (۲۲۱۶>۲۰۰۷)	
خوک	D19 ggTGCATCGATGCAgggggg(A)	PBMC	↑	IgM و مجموعه سازگار نسجی دسته II (MHC-II) (D19)	۲۲
ماهی	1681 accgatgtcgttgccggtgacg(B)	لکوسیت‌های خون محیطی	↑	تکثیر سلولی	۲۳
		لکوسیت‌های رأس کلیوی	↑	تولید عوامل مشابه INF	
سگ	ODN2 ggTGC ATCGAT GCAGgggggg(A)	PBMC	↑	IFN-γ و IL-12p40 (ODN2)	۲۴
خرگوش	1760 ataatcgacgttcaagcaag(B)	PBMC	↑	تکثیر سلولی (۱۷۶۰، ۱۸۲۶، ۲۰۰۰، ۲۰۰۲)	۲۵

www.SID.ir

جدول۲: تحریک ایمنی CpG–ODNدر مطالعات in vivo

جاندار	توالی مؤثر CpG-ODN (نوع)	آنتی‌ژن	پاسخ	اثر	منبع
میمون رزوس (SIV)	D29 ggTGCACCGGTGCAGgggg gg(A)	لیشمانیا	↑	جراحت جلدی (K ODN- > D ODN-mix)	۲۶
	K3 atcgactctcgagcgttctc(B)		↓	تعداد انگل‌ها در جراحت (D ODN-mix)	
موش	1826 tccatgacgttcctgacgtt (B)	آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B (HBsAg)	↑	IgG1 > IgG2a در موش‌های جوان ۱ و ۳ و ۷ روزه؛ لنفوسیت T کشنده در موش‌های بالغ (۱۴ روزه یا ۶–۸ هفته) (۱۸۲۶)	۲۷
گاو	2006 tcgtcgttttgtcgttttgtcgtt (B) 2007 tcgtcgttgtcgttttgtcgtt (B) 2008 gcgtgcgttgtcgttgtcgtt (B)	پروتئین ۲ سطحی آناپلاسما مارژیناله (MSP2)[1]	↑	تکثیر سلول‌های B (۲۰۰۸، ۲۰۰۷>۲۰۰۶)؛ IgG و MSP2 سلول‌های ترشح‌کننده ویژه IFN-γ در PBMC، IFN-γ، ولی IL-4 کم (۲۰۰۶)	۲۸
			–	بیان mRNA اینترلوکین–۱۰	
گاو	2007 tcgtcgttgtcgttttgtcgtt (B)	مایکوباکتریوم بوویس CFP	↑	IFN-γ و پاسخ‌های آنتی‌بادی سرمی (۲۰۰۷)	۲۹
گوسفند	2135 tcgtcgtttgtcgttttgtcgtt (B)	tgB[2]	↑	تیتر IgG و تیتر خنثی‌کننده ویروس (۲۱۳۵)	۲۵
گوسفند	2007 tcgtcgttgtcgttttgtcgtt (B)		↑	2′5′ الیگوآدنیلات (A2′-5′)؛ فعالیت الیگوآدنیلات سنتتاز (۲۰۰۷)	۳۰
خوک	2007 tcgtcgttgtcgttttgtcgtt (B)	تاکی‌زوآیت	↑	IgG (۲۰۰۷)	۳۱
جوجه	2007 tcgtcgttgtcgttttgtcgtt (B)	اشریشیا کولی	↑	بقاء (۲۰۰۷)	۳۲
ماهی	TCCATGACGTTCCTGAT GCT	ادواردشیلا تاردا	↑	بقاء	۳۳

1. Anaplasma marginale mahor surface protein; 2. Truncated versions of glycoprotein B

نتیجه گیری

در مجموع تحقیقات اخیر درباره عملکرد TLRها نشان داده است که چگونه سامانه ایمنی ذاتی پاتوژن های مهاجم را شناسایی و پاسخ ایمنی اکتسابی را تحریک می‌کند. تحقیقات بسیاری بر روی TLR9 و اثر مستقیم آن بر سلول های ایمنی ذاتی و ایمنی اکتسابی متمرکز شده است و محققان در تلاشند تا از این دانش برای درمان آلرژی‌ها، بیماریهای عفونی و سرطان ها استفاده کنند. تحقیقات بیشتر برای جلوگیری از عوارض جانبی CPG–DNA و شناسایی مولکول های کوچک، به‌عنوان آگونیست‌های TLR9، در حال انجام است.

www.SID.ir

References

1. Tsan MF, Gao B. Pathogen-associated molecular pattern contamination as putative endogenous ligands of Toll-like receptors. J Am Acad Orthop Surg 2008;16:S56-62.
2. Lata S, Raghava GP. PRRDB: A comprehensive database of Pattern-Recognition Receptors and their ligands. BMC Genomics 2008;9:108.
3. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. Annu Rrv Immunol 2003;21:335-76.
4. Unmatsu S, Akira S, Toll-like receptors (TLRs) and their ligands. In: Bauers, Hartmann G. Editors. Toll-like receptors (TLRs) and innate immunity. Heidelberg: Springer; 2008.
5. Agrawal S, Kandimalla ER. Medicinal chemistry and therapeutic potential of CpG DNA. Trends Mol Med 2002;8:114-21.
6. Chaung HC. CpG oligodeoxynucleotides as DNA adjuvants in vertebrates and their applications in immunotherapy. Int Immunopharmacol 2006;6:1586-96
7. Wagner H. Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. Curr Opin Microbiol 2002;5:62-9.
8. Takeshita F, Gursel I, Ishii KJ, et al. Signal transduction pathways mediated by the interaction of CpG DNA with Toll-like receptor 9. Semin Immunol 2004;16:17-22.
9. Akira Sh. Toll-like receptor signaling. The Journal of Biological Chemestry 2003; 40:38105-8.
10. Kandimalla ER, Zhu FG, Bhagat L, et al. Toll-like receptor 9: modulation of recognition and cytokine induction by novel synthetic CpG DNAs. Blochemical Society Transactions 2003;31:part 1.
11. Wang Y, Wang W, Li N, et al. Activation of antigen-presenting cells by immunostimulatory plant DNA: a natural resource for potential adjuvant. Vaccine 2002;20:2764-71.
12. Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, et al. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. Nat Immunol 2004;5:190-8.
13. Agrawal S, Kandimalla ER. Modulation of Toll-like receptor 9 responses through synthetic immunostimulatory motifs of DNA. Ann NY Acad Sci 2003;1002:30-42.
14. He B, Qiao X, Cerutti A. CpG DNA induces IgG class switch DNA recombination by activating human B cells through an innate pathway that requires TLR9 and cooperates with IL-10. J Immunol 2004;173:4479-91.
15. Vollmer J, Weeratna RD, Jurk M, et al. Oligodeoxynucleotides lacking CpG dinucleotides mediate Toll-like receptor 9 dependent T helper type 2 biased immune stimulation. Immunology 2004;113:212-23.
16. Kandimalla ER, Bhagat L, Wang D, et al. Divergent synthetic nucleotide motif recognition pattern: design and development of potent immunomodulatory oligodeoxyribonucleotide agents with distinct cytokine induction profiles. Nucleic Acids Res 2003;31:2393-400.
17. Li Y, Kandimalla ER, Yu D, et al. Oligodeoxynucleotides containing synthetic immunostimulatory motifs augment potent Th1 immune responses to HBsAg in mice. Int Immunopharmacol 2005;5:981-91.
18. Bauer S, kirschning CJ, Hacker H, et al. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98:9237-42.
19. Vollmer J, Weeratna R, Payette P, et al. Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. Eur J Immunol 2004:34:251-62.
20. Mena A, Nichani AK, Popowych Y, et al. Bovine and ovine blood mononuclear leukocytes differ markedly in innate immune responses induced by Class A and Class B CpG-ligodeoxynucleotide. Oligonucleotides 2003;13:245-59.
21. Mena A, Nichani AK, Popowych Y, et al. Innate immune responses induced by CpG-ligodeoxynucleotide stimulation of ovine blood mononuclear cells. Immunology 2003;110:250-7.
22. Van der Stede Y, Verdonck F, Verfaillie T, et al. CpG-ligodeoxynucleotide activates B-cells and increases the expression of MHC-II molecules on lymphocytes. Vet Immunol Immunopathol 2005;105:115-24.

Archive of SID

www.SID.ir

23. Jorgensen JB, Johansen LH, Steiro K, et al. CpG DNA induces protective antiviral immune responses in Atlantic salmon (Salmo salar L.). J Virol 2003;77:11471-9.
24. kurata K, Iwata A, Masuda K, et al. Identification of CpG-ligodeoxynucleotide sequences that induce IFN- gamma production in canine peripheral blood mononuclear cells. Vet Immunol Immunopathol 2004;102:441-50.
25. Rankin R, Pontarollo R, Ioannou X, et al. CpG motif identification for veterinary and laboratory species demonstrates that sequence recognition is highly conserved. Antisense Nucleic Acid Drug Dev 2001;11:333-40.
26. Verthelyi D, Klinman DM. Immunoregulatory activity of CpG-ligodeoxynucleotides in humans and nonhuman primates. Clin Immunol 2003;109:64-71.
27. Brazolot Millan CL, Weeratna R, Krieg AM, et al. CpG DNA can induce strong TH1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:15553-8.
28. Zhang Y, Shoda LK, Brayton KA, et al. Induction of interleukin-6 and nterleukin-12 in bovine B lymphocytes, monocytes, and macrophages by a CpG oligodeoxynucleotide (ODN 2059) containing the GTCGTT motif. J Interferon Cytokine Res 2001;21:871-81.
29. Wedlock DN, Skinner MA, de Lisle GW, et al. Vaccination of cattle with Mycobacterium bovis culture filtrate proteins and CpG oligodeoxynucleotides induces protection against bovine tuberculosis. Vet Immunol Immunopathol 2005;106:53-63.
30. Nichani AK, Mena A, Popowych Y, et al. In vivo immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotide in cattle and sheep. Vet Immunol Immunopathol 2004;98:17-29.
31. Kringel H, Dubey JP, Beshah E, et al. CpG-oligodeoxynucleotides enhance porcine immunity to Toxoplasma gondii. Vet Parasitol 2004;123:55-66.
32. 32. Gomis S, Babiuk L, Godson DL, et al. Protection of chickens against Escherichia coli infections by DNA containing CpG motifs. Infect Immun 2003;71:857-63.
33. Lee CH, Jeong HD, Chung JK, et al. CpG motif in synthetic ODN primes respiratory burst of olive flounder Paralichthys olivaceus phagocytes and enhances protection against Edwardsiella tarda. Dis Aquat Organ 2003;56:43-8.

Archive of SID

www.SID.ir