

Fragmenty bakteryjnego DNA o właściwościach immunomodulacyjnych (CpG DNA) – związek z chorobami alergicznymi

Immunostimulatory sequences of bacterial DNA (CpG DNA) – connection with allergic diseases

MACIEJ CHAŁUBIŃSKI, MAREK L. KOWALSKI

Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź

Motywy CpG są to fragmenty bakteryjnego DNA składające się z niemetylowanego oligonukleotydu cytozyno-guaninowego (CpG) umieszczonego w tzw. „szczególnym kontekście zasad”. Na ich podstawie wrodzony układ immunologiczny człowieka i innych ssaków odróżnia DNA drobnoustrojów od komórek gospodarza. Motywy CpG okazały się silnym generatorem procesów zapalnych, bowiem – stymulując procesy typu Th1 – przyczyniają się do rozwoju odpowiedzi komórkowej i eliminacji patogenu wewnątrzkomórkowego. Z drugiej strony zmniejszają produkcję przeciwciał IgE oraz aktywność eozynofilów i komórek tucznych, a zatem hamują odpowiedź Th2-zależną, leżącą u podłoża zapalenia alergicznego. Zdolność koniugowanych z alergenem motywów CpG do przesuwania równowagi Th1/Th2 w kierunku Th1 stało się podstawą próby opracowania nowych form alergenowej immunoterapii chorób atopowych.

Alergia Astma Immunologia, 2003, 8(1), 1-7

Słowa kluczowe: *alergia, motywy CpG, odpowiedź immunologiczna Th1/Th2*

The human and mammalian immune system has the ability to recognize the presence of bacterial DNA on the basis of recognition of CpG motifs (unmethylated cytidine-guanosine dinucleotides) within a particular base context. Several reports have shown that CpG motifs are both potent inducers of Th1-response that eliminates intracellular pathogens and inhibitors of eosinophils and mast cells activation as well as IgE production, thus inhibiting Th2 type immune response characteristic for the allergic inflammation. It has been postulated that CpG DNA establishes Th1/Th2 balance, supporting the concept that the injection of allergen conjugated with appropriate CpG motifs may provide a novel immunotherapeutic approach for the treatment of allergic disorders.

Alergia Astma Immunologia, 2003, 8(1), 1-7

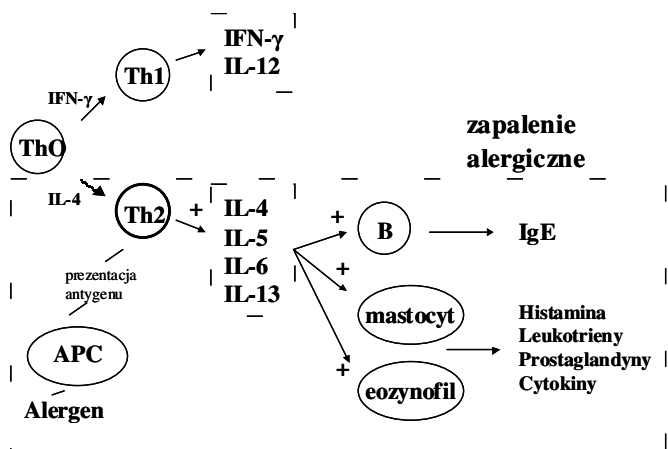
Key words: *allergy, CpG motifs, Th1/Th2 response*

W XIX wieku, kiedy to John Bostock po raz pierwszy opisał *catharus aestivus* – czyli katar sienny – a Charles Blackley zidentyfikował pyłek zbóż jako przyczynę tego zaburzenia, choroby alergiczne były rzadkością występującą raczej wśród przedstawicieli klasy wysoko uprzywilejowanej [1]. Dzisiaj, u progu XXI wieku, dotyczą one aż 20-30% populacji w różnych regionach świata [2].

Poszukiwanie przyczyn wzrostu częstości chorób alergiczych – obok analizy czynników sprzyjających alergizacji ogniskuje się wokół zjawisk immunologicznych o potencjalnym znaczeniu protekcyjnym. Szczególne zainteresowanie budzi oddziaływanie na układ odpornościowy czynników zakaźnych – wśród nich bakterii i ich fragmentów DNA, zwanych CpG DNA, charakteryzujących się silnym działaniem immunomodulacyjnym.

Rozwój choroby atopowej

W konfrontacji układu odpornościowego z mikroorganizmem inwazyjnym kluczową rolę odgrywa komórka Th CD4. To ona rozpoznaje antygen, a następnie podejmuje decyzje o wyborze mechanizmów efektorowych, będących w stanie skutecznie wyeliminować intruza [3,4]. Następstwem nadmiernej odpowiedzi układu immunologicznego na alergeny, nieszkodliwe w warunkach normalnych czynniki, jest zapalenie alergiczne. Jest ono uwarunkowane przez jeden z dwóch typów komórki Th CD4 – komórkę Th2 wraz z panelem cytokin (Interleukiny-4,5,13,3; (IL-4,5,13,3)), które – stymulując produkcję przeciwciał klasy IgE oraz aktywując komórki tuczne i eozynofile – są odpowiedzialne za rozwój jego podstawowych elementów [3,5,6] (ryc.1).



Ryc. 1. Równowaga Th1/Th2 i rozwój zapalenia alergicznego (opis w tekście)

Kluczowe zdarzenia determinujące cytokinowy fenotyp swoistych komórek pamięci Th wydają się zachodzić już we wczesnym okresie życia, często wiele lat przed pojawieniem się choroby atopowej [1,7,8]. Uznaje się, że od momentu urodzenia dziecka kontakt jego układu odpornościowego z alergenem może prowadzić do dwóch przeciwstawnych zjawisk. Układ immunologiczny albo przedłuża lub/i nasila odpowiedź typu Th2 odziedziczoną jeszcze z okresu życia płodowego, czyniąc w ten sposób dziecko atopikiem, albo rozwija odpowiedź cytokinową typu Th1 (tzw. dewiacja immunologiczna) [9,10,11]. Prawdopodobnie to proces dewiacji immunologicznej pozwala ustalić optymalną równowagę Th1/Th2 i prawidłowe funkcjonowanie układu odpornościowego. Przypuszcza się zatem, że zaburzenie tego procesu może stanowić jeden z mechanizmów prowadzących do pojawienia się atopii i chorób atopowych u dzieci z krajów rozwiniętych [12,11,13].

Ostatnie badania sugerują, iż ważnym elementem determinującym naturalne postnatalne dojrzewanie odpowiedzi typu Th1 jest oddziaływanie na układ immunologiczny czynników infekcyjnych [11]. Zaobserwowano bowiem, że choroby alergiczne występują częściej u dzieci z rodzin o wysokim standardzie higienicznym, w których narażenie na czynniki infekcyjne jest znacznie zredukowane. Stało się to podstawą wysunięcia tzw. „higienicznej hipotezy alergizacji” [42]. Przyjmując założenie, że w procesie ustalania równowagi Th1/Th2 pewną rolę odgrywają właśnie drobnoustroje, higieniczna hipoteza alergizacji staje się jednym z elementów wielkiej układanki: „Co jest przyczyną alergii?”

Drobnoustroje wewnątrzkomórkowe a odpowiedź układu immunologicznego

Wyniki badań epidemiologicznych wskazują, że wzrost częstości atopowych zaburzeń alergicznych koreluje ze

spadkiem w dzieciństwie zapadalności na niektóre choroby zakaźne (m. in. gruźlicę, odrę, krztusiec, grypę) [14,15]. Badania Shirakawy wykazały mniejszą częstość alergii wśród japońskich dzieci z dodatnim testem tuberkulinowym. W związku z tym autor sugerował, że zakażenie prątkiem gruźlicy chroni je przed późniejszym rozwojem stanów atopowych [12,15]. Jednakże następne badania nie potwierdziły „protekcynowego” znaczenia infekcji prątkiem w stosunku do rozwoju alergii, co nadaje konieczność dalszych w tym zakresie badań.

Mycobacterium tuberculosis, sprawczy czynnik gruźlicy, jest drobnoustrojem wewnątrzkomórkowym. W walce z organizmem wewnątrzkomórkowym (np. *L. monocytogenes*, *F. tularensis*, wirusy) układ immunologiczny mobilizuje komórkowe mechanizmy efektorowe, tj. procesy cytotoksyczności, fagocytozy, produkcję rodników tlenowych i tlenku azotu, w których udział biorą m.in. makrofagi, komórki NK i limfocyty T cytotoksyczne (Tc). Wzmoczone wytwarzanie interferonu- γ (IFN- γ), czynnika martwicy nowotworów- α (TNF- α) oraz IL-12 i 18, czyli w większości cytokin profilu Th1, wskazuje, że infekcja patogenem wewnątrzkomórkowym prowadzi do różnicowania się prekursorowych limfocytów Th0 w kierunku Th1. Naturalnym następstwem powyższych zjawisk jest stłumienie fenotypu Th2 i spadek wydzielania IL-4,5,13 i 3, co przyczynia się do redukcji wydzielania przeciwciał klasy IgE i IgG2a oraz zmniejszenia aktywacji eozynofili i mastocytów.

Powyższa teoria poparta jest wynikami badań. DNA uzyskane ze szczepu BCG wzmagało aktywność komórek NK (*natural killer*) oraz stymulowało komórki mysiej śledziony i ludzkie PBL do produkcji IFN- α , β i γ , a prątek bydłęcy (*Mycobacterium bovis* – BCG) donosowo podany myszom hamował wywołaną ovalbuminą eozynofilię dróg oddechowych [15,16].

Okazało się, że elementem patogenu wewnątrzkomórkowego uruchamiającym rozwój immunologicznych mechanizmów Th1-zależnych są fragmenty DNA bogate w tzw. motywy CpG (CpG DNA) [17,18].

CpG DNA

Motywy CpG są fragmentami DNA składającymi się z niemetylowanego oligonukleotydu cytozyno-guaninowego (CpG) otoczonego od końca 5' dwiema zasadami purynowymi, a 3' dwiema zasadami pirymidynowymi. (5'-pur-pur-CpG-pyr-pyr-3'), np. AACGTT [5,19,20,21]. Jest to usytuowanie w tzw. „szczególnym kontekście zasad” [22,17]. Odkryto, że motywy CpG są cechą swoistą organizmów prokariotycznych. Genom organizmów prokariotycznych zawiera ich więcej, są w większości niemetylowane i częściej występują w owym szczególnym kontekście zasad, co wrodzony układ immunologiczny wykorzystuje do rozpoznawania tych organizmów [17,22,23].

Molekularny mechanizm oddziaływania CpG DNA na komórki odpornościowe nie jest jasny. Uważa się, że białko rozpoznające CpG DNA należy do rodziny receptorów Toll-podobnych (TLR9), bowiem motywy CpG nie wzbudzają odpowiedzi immunologicznej u myszy genetycznie go pozbawionych. W wyniku jego pobudzenia dochodzi do rekrutacji adaptorowej cząsteczki MyD88 i kinazy IRAK – elementów ścieżki receptora TLR-1 – następnie aktywacji kinaz MAP oraz jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Przypuszcza się, że TLR-9 jest prawdopodobnie zlokalizowany wewnątrzkomórkowo, choć pewne doniesienia tego nie potwierdzają, i pobudzony aktywuje wrodzoną odpowiedź immunologiczną do obrony przeciw wirusom, wewnątrzkomórkowym bakteriom i pasożytom, których kwasy nukleinowe są dla TLR9 łatwo dostępne [17,18,24].

Wpływ CpG DNA na układ immunologiczny

DNA bogate w motywy CpG jest bardzo silnym czynnikiem pobudzającym układ odpornościowy i generującym procesy zapalne [25]. Podane zwierzętom doświadczalnym, powoduje rozwój miejscowej odpowiedzi zapalnej, lokalną limfadenopatię, splenomegalię oraz przejściowe układowe uwolnienie cytokin [12,26]. CpG DNA bezpośrednio aktywuje komórki prezentujące antygen (APC), takie jak: komórki dendrytyczne, limfocyty B, NK i komórki Langerhansa [5,6,17,19,27,20,28,29,30,31]. Wydaje się to logiczne, bowiem są to pierwsze komórki układu odpornościowego stykające się z patogenem, po wchłonięciu którego mają swobodny dostęp do jego DNA.

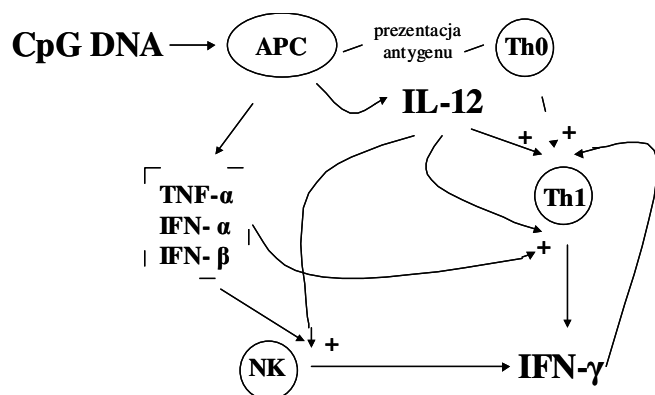
Spośród komórek prezentujących antygen CpG DNA najsilniej pobudza komórkę dendrytyczną (DC) [17] (ryc.2). Uważa się, że komórka ta jest główną APC zaangażowaną w pierwotną odpowiedź immunologiczną, gdyż podczas prezentacji antygeny najsilniej stymuluje proliferację limfocytów Th [4]. Motywy CpG silnie aktywują komórki dendrytyczne do różnicowania i dojrzewania (wzrost CD83), a poprzez wzmaganie ekspresji MHC klasy II i cząstek kostymulujących (ICAM-1 {CD54}, B72 {CD86} i CD40) przygotowują je do prezentacji an-

tygeny [17,19,21,27]. Stymulują również produkcję cytokin, z których decydujące znaczenie ma IL-12 [21,32,33]. Ona bowiem w czasie prezentacji antygeny determinuje różnicowanie się komórek Th0 w limfocyty Th1 [21,32]. Pod wpływem CpG DNA komórka dendrytyczna, makrofag i inne APC wydzielają również TNF- α , IFN- α i β , które wraz z IL-12 stymulują komórki NK oraz już zróżnicowane limfocyty Th1 do produkcji IFN- γ [6,17,34]. IFN- γ zaś jest głównym elementem mikrośrodowiska promującego aktywność komórek Th1, ponieważ – wzmagając ekspresję łańcucha β -2 receptora IL-12 – uwrażliwia je na tę ważną cytokinę [5,24]. Hamuje jednocześnie proliferację komórek Th2 i produkcję cytokin tego fenotypu [32]. A zatem obecność IFN- γ w mikrośrodowisku zapalnym ukształtowanym przez CpG DNA mobilizuje rozwój procesów Th1-zależnych [34].

Powyższa teoria pozwala przyjąć, że motywy CpG oddziałują na limfocyty Th także w sposób pośredni, poprzez cytokiny produkowane przez komórki prezentujące antygen. Sugeruje się również istnienie bezpośredniego oddziaływania za pomocą fragmentów poli-G [35].

Za wybór mechanizmów efektorowych w konfrontacji układu odpornościowego z organizmem inwazyjnym odpowiedzialny jest początkowy profil cytokinowy środowiska, w którym zachodzi prezentacja antygeny [12]. Stwierdzono, że motywy CpG w DNA patogenów wewnątrzkomórkowych warunkują obecność IL-12 i IFN- γ w trakcie prezentacji antygeny i w efekcie prowadzą do różnicowania się limfocytów Th0 w limfocyty Th1 [36]. Pozwala to układowi immunologicznemu generować mechanizmy obronne odpowiednie do eliminacji tego rodzaju drobnoustrojów [5,6,17,22].

Teorię tą potwierdzają wyniki badań nad zwierzętami. Otóż okazuje się, że niektóre organizmy infekcyjne potrafią kreować niewłaściwą odpowiedź układu odpornościowego gospodarza, zapewniając sobie w ten sposób dogodne warunki do rozwoju [4]. W przebiegu zakażenia wewnątrzkomórkowym pierwotniakiem *Leishmania major* dochodzi u myszy do rozwoju nieefektywnej w tym przypadku odpowiedzi Th2-zależnej, co uniemożliwia obronę immunologiczną gospodarza i prowadzi do jego śmierci. Natomiast badania wykazały, że myszy, którym podano CpG DNA, potrafiły sobie z tym patogenem poradzić [21]. Wykazano również, że podanie CpG DNA zabezpiecza myszy przed infekcją drobnoustrojami, takimi jak: *Listeria monocytogenes* czy *Francisella tularensis* [37,38]. W surowicy krwi tych zwierząt wykazano wzrost poziomu IFN- γ i IL-12 [21]. DNA bogate w motywy CpG warunkowało także długotrwałą ochronę myszy przed rozwojem malarii oraz zakażeniem przywrą *Schistosoma*, bakterią wąglika, wirusem Ebola, a podane donosowo razem z wirusem grypy i HBV wzmagało odpowiedź humoralną przeciw ich powierzchniowym antygenom [17,37,38,39,40].



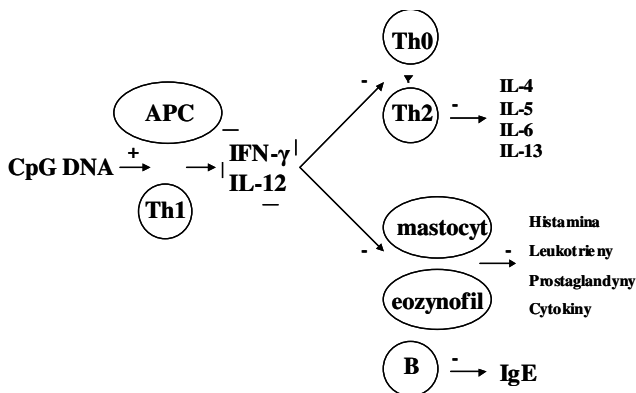
Ryc. 2. Obecność CpG DNA sprzyja rozwojowi mikrośrodowiska typu Th1 (opis w tekście)

Wpływ CpG DNA na zapalenie alergiczne

Wyniki badań przemawiają za tym, że CpG DNA jest silnym induktorem odpowiedzi Th1-zależnej i jednocześnie inhibitorem reakcji typu Th2. Dlatego zbadano jego oddziaływanie na procesy immunologiczne zachodzące w przebiegu zapalenia alergicznego. Wiadomo, że zapalenie alergiczne zapoczątkowane jest prezentacją alergenu prekursorowym limfocytom Th0 przez komórkę prezentującą antygen (APC), a zjawisko to zachodzi w mikrośrodkowisku cytokin faworyzujących różnicowanie limfocyta Th0 w limfocyt Th2. Komórka Th2 pobudza limfocyt B do produkcji swoistych przeciwciał klasy IgE, które wiążą się z odpowiednimi receptorami na mastocytach. Ponowne zetknięcie IgE z alergenem powoduje degranulację mastocytów i w efekcie ostrą fazę reakcji alergicznej, a następnie napływ eozynofili i innych komórek zapalnych prowadzących do rozwoju przewlekłego zapalenia alergicznego [11].

Okazało się, że podanie myszom z astmą doświadczalną fragmentów CpG DNA, a następnie ekspozycja tych myszy na alergen zmniejsza eozynofilię dróg oddechowych, obniża ilość swoistych komórek B oraz produkcję swoistych przeciwciał klasy IgE [6,5,12,32,41]. W ten sposób hamuje aktywność kluczowych elementów biorących udział w alergicznym procesie zapalnym (ryc.3). Zaobserwowano również redukcję okołooskrzelowego i okołonaczyniowego nacieku zapalnego w płucach oraz zmniejszenie nadreaktywności oskrzeli przez 6 tygodni po ekspozycji na ostatnią dawkę [5,6,32]. Co ciekawe, podobny efekt uzyskano po podaniu myszom czynnika blokującego IL-4 (anty-IL-4) oraz cytokin takich jak IFN- γ i IL-12, które – jak wykazały badania – promują odpowiedź Th1-, a hamują Th2-zależną [6].

Powyższe spostrzeżenie należy powiązać z faktem, że u myszy poddanych działaniu CpG DNA zaobserwowano lokalny wzrost poziomu właśnie IL-12 i IFN- γ oraz produkujących te związki komórek, jak i spadek pozio-



Ryc. 3. Mikrośrodkowisko typu Th1 wytworzone pod wpływem CpG DNA przeciwdziała rozwojowi odpowiedzi typu Th2 i zapalenia alergicznego

mu IL-4 i pozostałych cytokin tego fenotypu oraz samych limfocytów Th2 [6,32]. Odnotowano również redukcję stężenia IgG1 i wzrost IgG2 [6]. Warto zauważyć, że synteza IgG1 zależy od IL-4 i jest jednym z czynników zapalenia alergicznego w płucach, natomiast produkcja IgG2 jest zależna od IFN- γ i hamuje to zapalenie.

Zatem wysoce prawdopodobne jest, że IFN- γ i stymulująca jego syntezę IL-12 są istotnymi czynnikami pośredniczącymi w oddziaływaniu CpG DNA na stabilizację równowagi Th1/Th2. Za tym przemawia również fakt, że motywy CpG podane transgenicznym myszom z inaktywowanym genem IFN- γ (IFN- γ knock-out mice) nie wywołują efektu przeciwalergicznego [6].

Potencjalne możliwości terapeutycznego wykorzystania CpG DNA

Istnieją dzisiaj co najmniej dwie potencjalne możliwości terapeutycznego zastosowania CpG DNA. Pierwsza – wydaje się, że bliższa realizacji – to CpG DNA jako adjuwant dodawany do szczepionek stosowanych w leczeniu chorób alergicznych i druga – bardziej hipotetyczna jak na razie – poddanie układu immunologicznego dzieci na CpG DNA celem prewencji rozwoju alergii [5,12,17,22,43].

Jedną z metod leczenia chorób alergicznych jest immunoterapia swoista. Polega ona na poddawaniu układu odpornościowego pod oddziaływanie wzrastających dawek alergenów, na które jest on uczulony [22]. Chociaż uważa się, że immunoterapia jest w pewnym sensie przy czynowym leczeniem alergii atopowych, jej obecna forma nie daje całkiem zadowalających i tym bardziej oczekiwanych efektów [5,44]. Dlatego podejmuje się próby stosowania związków ogólnie zwanych adjuwantami w celu zwiększenia jej efektywności. Jednym z nich mogą okazać się właśnie fragmenty DNA zawierające motywy CpG, które obecnie nietrudno jest zsyntetyzować (CpG ODN) [43].

Badania Tighe i wsp. wykazały, że myszy immunizowane alergenem ambrozji (Amb a 1) chemicznie związanym z CpG ODN generowały wysoki poziom przeciwciał IgG2a oraz komórek produkujących IFN- γ i rozwijały odpowiedź typu Th1, podczas gdy sam alergen aktywował komórki T wydzielające IL-5 oraz indukował syntezę przeciwciał klasy IgE i IgG2 (odpowiedź typu Th2). Natomiast alergen ambrozji związany z DNA pozbawionym – z powodu zmiany sekwencji CpG na CC lub AG – właściwości immunostymulujących (non-ISS ODN) nie wykazywał takiego działania. Co więcej, swoista wobec alergenu ambrozji odpowiedź typu Th2 istniejąca już u myszy nie zapobiegła rozwinięciu reakcji Th1-zależnych po stymulacji koniugatami Amb a 1 – CpG ODN, co wydaje się mieć potencjalnie duże znaczenie kliniczne.

Warto również zauważyć, że jednoczesna iniekcja niepołączonych ze sobą chemicznie alergenu Amb a 1 i CpG ODN również indukowała odpowiedź Th1, aczkolwiek była ona słabsza niż ta wywołana przez koniugaty [45].

W innych badaniach wcześniejsza ekspozycja myszy na mieszaninę ślinowego antygeny moskita (rAed a 2) i CpG ODN hamowała później indukowaną antygenem produkcję swoistych przeciwciał IgE (ale nie IgG1) oraz syntezę przez komórki śledzionowe IL-4 i IL-5. Jednocześnie zaobserwowano wzrost poziomu przeciwciał IgG2, IL-12 i IFN- γ [46].

W mysim modelu astmy wywołanej jajami przywry *Schistosoma* lub ich antygenem (SEA) doszło do produkcji IgE, eozynofilii w drogach oddechowych, płucnej sekrecji IL-4 i nadreaktywności oskrzeli. Okazuje się, że powyższe procesy nie miały miejsca, gdy jednocześnie z jajami *Schistosoma* podawano CpG ODN [12].

Przytoczone badania dowodzą, że podawanie alergenów wraz z DNA zawierającym motywy CpG indukuje przewagę odpowiedzi Th1-zależnej silnie hamując procesy alergiczne w zwierzęcych modelach ludzkich chorób [22]. Stwarza to potencjalne podstawy do wykorzystania CpG DNA jako adjuwanta w klasycznej formie immunoterapii chorób alergicznych [5]. Klasyczna immunoterapia z samym alergenem wiąże się z ryzykiem wystąpienia poważnego powikłania, jakim jest reakcja anafilaktyczna [22]. Okazuje się, że dodatkowym atutem immunoterapii z użyciem CpG DNA mogłaby być lepsza tolerancja. Stwierdzono bowiem, że koniugaty Amb a 1 – CpG mają znacząco mniejszą zdolność wiązania się z IgE i w mniejszym stopniu stymulują uwalnianie histaminy z bazofilów, efektem czego jest słabsza zdolność do wywoływania natychmiastowej odpowiedzi w testach skórnych [47,48]. W ten sposób koniugaty alergen – CpG mogą stanowić bardziej efektywną i jednocześnie bezpieczniejszą swoistą formę immunoterapii zaburzeń alergicznych w porównaniu z użyciem samego alergenu [22].

Przedstawione powyżej dane dotyczące możliwości wykorzystania koniugatu alergen – CpG ODN w immunoterapii swoistej pochodzą z badań doświadczalnych na zwierzętach. W chwili obecnej szczepionki takie znajdują się już w próbach klinicznych u ludzi, lecz z ostateczną oceną ich przydatności w praktyce trzeba poczekać na wyniki tych badań.

Potencjalne efekty uboczne stosowania CpG DNA

Próby zastosowania CpG DNA u ludzi wiążą się również z możliwością wystąpienia działań niepożądanych. Ponieważ CpG DNA aktywuje komórki Th1 i procesy immunologiczne od nich zależne, istnieją teoretyczne podstawy pozwalające sądzić, że jest ono czynnikiem przyczyniającym się do zapoczątkowania agresji układu

odpornościowego wobec własnych tkanek i rozwoju chorób autoimmunizacyjnych [32]. Istnieje bowiem potencjalne niebezpieczeństwo, że fragmenty CpG DNA podane człowiekowi okażą się czynnikiem przyczyniającym się do zaostrzenia, a nawet rozwoju reumatoidalnego zapalenia stawów. Iniekcja CpG DNA myszom z zapaleniem stawów indukowanym kolagenem (CIA) zdecydowanie pogarsza przebieg tej choroby, a wstrzyknięcie CpG DNA do stawów myszy zdrowych indukuje przemijające zapalenie stawów [49,50]. Istnieją również obawy, że motywy CpG DNA mogą wzbudzać toczkę układową rumieniowaty (SLE) [51]. CpG DNA użyte jako adjuwant do antygenów bakterii *Chlamydia* indukowało autoimmunologiczne zapalenie mięśnia sercowego [52]. Ponieważ między antygenem mięśnia sercowego i jednym z antygenów *Chlamydia* istnieje duże podobieństwo strukturalne, zgodnie z teorią mimikry antygenowej układ odpornościowy po kontakcie z bakterią może rozwinąć odpowiedź immunologiczną wobec tkanek serca. Przypuszczalnie CpG DNA może tę odpowiedź wzmacniać. Podejrzewa się również, że CpG DNA jest w stanie zaostrzyć choroby demielinizacyjne, takie jak stwardnienie rozsiane [53,54].

Wpływ CpG DNA na układ immunologiczny człowieka i innych naczelnych

W przeciwieństwie do dużej liczby badań na zwierzętach niewiele jest publikacji dotyczących wpływu CpG DNA na układ immunologiczny człowieka [19]. Choć CpG DNA jest aktywatorem ludzkich leukocytów, charakterystyka sekwencji motywów CpG odpowiedzialnych za tę aktywację i generalne oddziaływanie na układ odpornościowy człowieka są mniej jasne i wydają się bardziej skomplikowane [5,19,29,55,56,57].

Stwierdzono, że wiele oligonukleotydów CpG (CpG ODN), które stymulująco oddziaływały na układ immunologiczny w mysich modelach doświadczalnych, nie wykazywało równorzędnego i tak silnego działania wobec komórek odpornościowych człowieka [57,58,59]. Wydaje się, że wynika to z różnic strukturalnych w budowie motywów CpG optymalnie stymulujących mysz i ludzki układ odpornościowy. Oddziaływanie bakteryjnego DNA zdeterminowane jest bowiem nie tylko przez zawartą w nim liczbę nukleotydów CpG, lecz również istotną rolę zdają się odgrywać zasady, w otoczeniu których sekwencje CpG są ulokowane [59]. Najbardziej optymalny dla komórek mysich jest oligonukleotyd o sekwencji GACGTT, natomiast najsilniej działającym na ludzkie komórki okazał się oligonukleotyd o strukturze TCGTCGTT umieszczony we fragmencie DNA o sekwencji TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GT [55]. Motywy CpG wykazują immunomodulujące działanie również u innych naczelnych, takich jak małpy *Atous*, orangutany

czy szympanasy [45,58,60]. Ale, co ciekawe, nawet wśród samych naczelnych dopatrzono się pewnych różnic w sile odpowiedzi immunologicznej na te same rodzaje ODN.

Można zatem przypuszczać, że poszczególne gatunki zwierząt, podobnie jak człowiek, wytworzyły w toku tysięcy lat ewolucji najbardziej optymalne dla siebie mechanizmy rozpoznawania DNA zagrażających im patogenów. A ponieważ różne drobnoustroje atakują poszczególne gatunki zwierząt, toteż nie wszystkie gatunki muszą w ten sam sposób reagować na te same drobnoustroje. Być może powyższe stwierdzenie jest odpowiedzią na pytanie, dlaczego motywy CpG, które silnie oddziałują na układ immunologiczny myszy, nie mają takiego wpływu na komórki odpornościowe człowieka. Dlatego identyfikacja motywów CpG silnie oddziałujących na układ odpornościowy człowieka wydaje się sprawą zasadniczą, aby opracowane na zwierzętach strategie terapeutyczne można było przenieść do badań klinicznych u ludzi.

Czy za pomocą CpG DNA uda się zahamować rozwój alergii?

Przytoczone wyniki badań w dużej mierze pozwalają stwierdzić, iż CpG DNA jest w stanie wywołać takie procesy, które prowadzą do ograniczenia odpowiedzi Th2-zależnej, której to przewagę obserwujemy w mechanizmach alergii atopowej. Ponieważ motywy CpG znajdują się w obrębie genomu bakterii i wirusów, wpływ niektórych czynników infekcyjnych na organizm może naturalnie zapobiegać rozwojowi alergii. Dlatego wydaje się, że w przyszłości człowiek będzie mógł tak manipulować kodem genetycznym drobnoustrojów, aby – oddziałując na układ immunologiczny – odpowiednio ukierunkować jego aktywność. Można zatem założyć, że przywrócenie oddziaływania niektórych czynników infekcyjnych na układ odpornościowy człowieka – oczywiście w znacznie bardziej kontrolowany sposób być może w formie terapii fragmentami CpG DNA – zahamuje rozwój alergii.

Piśmiennictwo

- Holgate ST. The epidemic of allergy and asthma. *Nature* 1999; 402 (Suppl): B2-B4.
- The ISAAC Steering Committee. Worldwide variation in the prevalence of symptoms of asthma, allergic conjunctivitis and atopic eczema: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *Lancet* 1998; 351: 1225-1232.
- Corry DB, Kheradmand F. Induction and regulation of the IgE response. *Nature* 1999; (Suppl): B18-B23.
- Roitt I, Brostoff J, Male D. Reakcje immunologiczne typu komórkowego. w *Immunologia*, wyd. pierwsze polskie pod red. J. Żeromskiego. Wydawnictwo Medyczne Słowiński Verlag. Brema 1996; 9.1-9.15.
- Parronchi P, Brugnolo F, Maggi E i wsp. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides promote the in vitro development of human allergen-specific CD4+ T cells into Th1 effectors. *J Immunol* 1999; 163: 5946-5953.
- Sur S, Wild JS, Klinman DM i wsp. Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 1999; 162: 6284-6293.
- Cookson W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature*. 1999; Supl. To Vol 402, No 6760: B5-B11.
- Holt PG, McMenamin C, Nelson D. Primary sensitization to inhalant allergens during infancy. *Pediatr Allergy Immunol* 1990; 1: 3-15.
- Prescott SL i wsp. Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T-cells responses towards the Th-2 cytokine profile. *J Immunol* 1998; 160: 4730-4737.
- Wegman TG, Lin H, Mosmann TR i wsp. Bidirectional cytokine in the maternal – fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 1993; 14: 353-356.
- Holt PG, Macaubas C, Sly PD i wsp. The role of allergy in the development of asthma. *Nature* 1999; 402 (Suppl): B12-B17.
- Kline JN, Waldschmidt TJ, Krieg AM i wsp. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol* 1998; 160: 2555-2559.
- Holt PG, Macaubas C, Sly PD i wsp. Microbial stimulation as an etiologic factor in atopic disease. *Allergy* 1999; 54: 12-16.
- Cookson WOCM, Moffat MF. Asthma: an epidemic in the absence of infection? *Science* 1997; 275: 41-42.
- Shirakawa T, Enomoto T, Hopkin JM i wsp. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 1997; 275: 77.
- Erb KJ, Holloway JW, Le Gros G i wsp. Infection of mice with mycobacterium bovis – Bacillus Calmette – Guérin (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia. *J Exp Med* 1998; 187: 561-569.
- Krieg AM: The role of CpG motifs in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 35-43.
- Hemmi H, Takeuchi O, Akira S i wsp. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408: 740-745.
- Hartmann G, Weiner GJ, Krieg AM. CpG DNA: A potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9305.
- Yamamoto T, Yamamoto S, Tokunaga T i wsp. Lipofection of synthetic oligodeoxyribonucleotide having a palindromic sequence of AACGTT to murine splenocytes enhances interferon production and natural killer activity. *Microbiol Immunol* 1994; 38: 831-836.
- Lipford GB, Sparwasser T, Wagner H i wsp. CpG-DNA-mediated transient lymphadenopathy is associated with a state of Th1 predisposition to antigen-driven responses. *J Immunol* 2000; 165: 1228-1235.
- Askenase PW, [Medline Lookup]< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Geewhiz>: CpG DNA in allergy therapy!
- Krieg AM. Direct immunologic activities of CpG DNA and implications for gene therapy. *J Gene Med* 1999; 1: 56-63.
- Weighardt H, Feterowski C, Holzmann B i wsp. Increased resistance against acute polymicrobial sepsis in mice challenged with immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides is related to an enhanced innate effector cell response. *J Immunol* 2000; 165: 4537-4543.

25. Bauer M, Wagner H, Lipford GB i wsp. DNA activates human immune cells through a CpG sequence dependent manner. *Immunol* 1999; 97: 699.
26. Takeshita S, Takeshita F, Klinman DM i wsp. CpG oligodeoxynucleotides induce murine macrophages to up-regulate chemokine mRNA expression. *Cell Immunol* 15; 206: 1001-1006.
27. Tascon RE, Rango S, Colston MJ i wsp. Immunostimulatory bacterial DNA sequences activate dendritic cells and promote priming and differentiation of CD8+ T cells. *Immunology* 2000; 99: 1-7.
28. Krieg AM, Yi AK, Klinman DM i wsp. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; 374: 546.
29. Liang H, Nishioka Y, Lipsky PE i wsp. Activation of human B cells by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *J Clin Invest* 1996; 98: 1119-1129.
30. Sun S, Zhang X, Sprent J i wsp. Multiple effects of immunostimulatory DNA on T cells and the role of type I interferons. *Springer Semin Immunopathol* 2000; 22: 77-84.
31. Brunner C, Krieg AM, Hartmann G i wsp. Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo. *J Immunol* 2000; 165: 6278-6286.
32. Shirota H, Sano K, Shirato K i wsp. Regulation of T-helper type 2 cell and airway eosinophilia by transmucosal coadministration of antigen and oligodeoxynucleotides containing CpG motifs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22: 176-182.
33. Warren TL, Bhatia SK, Weiner GJ i wsp. APC stimulated by CpG oligodeoxynucleotide enhance activation of MHC class I-restricted T cells. *Immunol* 2000; 165: 6244-6251.
34. Boehm U, Klamp T, Howard JC i wsp. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 749.
35. Lipford G i wsp. Poly-guanosine motifs costimulate antigen reactive CD8 T cells while bacterial CpG-DNA affect T cell activation via APC derived cytokines. *Immunology*, 2000, 101: 46-52.
36. Parronchi P, Brugnolo F, Maggi E. Genetic and environmental factors contributing to the onset of allergic disorders. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 121: 2-9.
37. Krieg AM, Love-Homan L, Harty JT i wsp. CpG DNA induces sustained Il-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge. *J Immunol* 1998; 161: 2428.
38. Elkins KL, Rhinehart-Jones TR, Klinmann DM i wsp. Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria. *J Immunol* 1999; 162: 2291.
39. McCluskie MJ, Davis HL: CpG DNA is a potent enhancer of systemic and mucosal immune responses against hepatitis B surface antigen with intranasal administration to mice. *J Immunol* 1998; 161: 4463-4466.
40. McCluskie MJ, Weeratna RD, Davis HL i wsp. CpG DNA is an effective oral adjuvant to protein antigens in mice. *Vaccine* 2000; 19: 950-957.
41. Broide D, Schwarze J, Tighe H i wsp. Immunostimulatory DNA sequences inhibit Il-5, eosinophilic inflammation, and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol* 1998; 161: 7054-7062.
42. Strachan DP. Hay fever, hygiene and household size. *Brit Med J* 1989; 299: 1259-1260.
43. Verthelyi D, Ishii K, Klinman D i wsp. Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CpG motifs. *J Immunol* 2001; 166: 2372-2377.
44. Kowalski ML, Jutel M. Mechanisms of specific immunotherapy of allergic diseases. *Allergy* 1998; 53: 485-492.
45. Tighe H, Takabayashi K, Raz E. Conjugation of immunostimulatory DNA to the short ragweed allergen Amb a 1 enhances its immunogenicity and reduces its allergenicity. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 124-134.
46. Peng Z, Wang H, Simons FE i wsp. CpG oligodeoxynucleotide vaccination suppresses IgE induction but may fail to down-regulate ongoing IgE responses in mice. *Int Immunol* 2001; 13: 3-11.
47. Kleine JN, Businga TR, Hussein J i wsp. Oral administration of CpG oligodeoxynucleotides provide protection against inflammation in asthma. *J Respir Clin Care Med* 2000; 161: A21.
48. Creticos PS, Eiden JJ, Tuck SF i wsp. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides conjugated to Amb a 1: safety, skin test reactivity, and basophil histamine release. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 70.
49. Miyata M, Kobayashi H, Kasukawa R i wsp. Unmethylated oligo-DNA containing CpG motifs aggravates collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2578-2582.
50. Deng GM, Nilsson JM, Tarkowski A i wsp. Intra articular localized bacterial DNA containing CpG motifs induces arthritis. *Nat Med* 1999; 5: 702-705.
51. Tuetken RS, Yi A-K, Krieg AM. The immune effects of bacterial DNA and their possible role in the pathogenesis of lupus. In *Lupus: Molecular and Cellular Pathogenesis*. Edited by Tsokos GC, Krammar G, Totowa NJ: Humana Press 1999: 79-100.
52. Bachmaier K, Neu N, Penninger JM i wsp. Chlamydia infections and heart disease linked through antigenic mimicry. *Science* 1999; 283: 1335-1339.
53. Schluesener HJ, Seid K, Schwab J i wsp. Transient in vivo activation of rat brain macrophages/microglial cells and astrocytes by immunostimulatory multiple CpG oligonucleotides. *J Neuroimmunol* 2001; 113: 89-94.
54. Tsunoda I, Tolley ND, Fujinami RS i wsp. Exacerbation of viral and autoimmune animal models for multiple sclerosis by bacterial DNA. *Brain Pathol* 1999; 9: 481-493.
55. Hartman G, Krieg AM. Mechanism and Function of a Newly Identified CpG DNA Motif in Human Primary B Cells. *J Immunol* 2000; 164: 944-952.
56. Bohle B, Jahn-Schmid B, Ebner C i wsp. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs induce Il-12, Il-18 and IFN-g production in cells from allergic individuals and inhibit IgE synthesis in vitro. *Eur J Immunol* 1999; 29: 2344-2353.
57. Hartmann G, Weiner G, Krieg AM. CpG DNA as a signal for growth, activation and maturation of human dendritic cells *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9305.
58. Hartmann G, Weeratna RD, Ballas ZK i wsp. Delineation of a CpG Phosphorothioate Oligodeoxynucleotide for Activating Primate Immune Responses In Vitro and In Vivo. *J Immunol* 2000; 164: 1617-1624.
59. Krieg AM and Wagner H. Causing a commotion in the blood: immunotherapy progresses from bacteria to bacterial DNA. *Immunol Today* 2000; 10: 521-526.
60. Jones TR i wsp. Synthetic oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance immunogenicity of a peptide malaria vaccine in Atous monkeys. *Vaccine* 1999; 17: 3065-3071.