

CpG-ODN Yüklü DC-Kolesterol İçeren Nano-lipozomların İnflamazomu Tetiklemeleri ve İmmün Uyarıcı Etkileri

Inflammasome Induction and Immunostimulatory Effects of CpG-ODN Loaded Liposomes Containing DC-Cholesterol

Banu Bayyurt, İhsan Gürsel

Bilkent Üniversitesi, Thorlab, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Fen Fakültesi, Ankara, Türkiye

İletişim adresi:

İhsan Gürsel
Bilkent Üniversitesi, Thorlab, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Fen Fakültesi, 06800 Bilkent, Ankara, Türkiye
Tel: +90 538 - 648 20 10
e-posta: ihsangursele@bilkent.edu.tr

©2014 Turkish Journal of Immunology.
All rights reserved.

doi: 10.5606/tji.2014.324

Geliş tarihi: 22 Temmuz 2014
Kabul tarihi: 29 Ağustos 2014

Amaç: Bu çalışmada, lipozomların kolesterol içeriği ve katyonik karakterinin immün yanıt üzerindeki etkisi araştırıldı.

Gereç ve yöntemler: Yüksek miktarda 3β-[N-(N',N'-dimetilaminoetan)-karbamoyl] kolesterol hidroklorid (DC-kolesterol) içeren lipozomlar hazırlanarak, içlerine dehidrasyon-rehidrasyon (DRV) yöntemiyle K- veya D-tipi CpG oligonükleotid (CpG-ODN) yüklendi. Dalak hücreleri ve lipopolisakkarit (LPS) ile ön muamele edilmiş periton eksüdat hücreleri (PEC), farklı dozlarda serbest ve lipozomda yüklü CpG-ODN'lerle inkübe edildikten sonra süpernatantlar toplandı ve sitokin (IFN-γ, IL-12 ve IL-1β) ELISA'sında kullanıldı. Ayrıca, LPS ile ön muamele edilmiş PEC hücreleri, farklı dozlarda DC-kolesterol içeren lipozomlarla uyarılarak süpernatantlarından IL-1β tayini yapıldı.

Bulgular: Düşük doz CpG-ODN içeren lipozomal formülasyonların, aynı doz serbest CpG-ODN'den daha fazla immün etkinleşmeye neden olduğu belirlendi. Yüksek doz lipozomal formülasyonların, dalak hücrelerinde proinflamatuvar sitokin üretimini azaltırken IL-1β salgılattığı bulundu. LPS ile ön muamele edilen PEC'ler, boş lipozomlarla inkübe edildiklerinde, kendi başlarına inflamazomu lipozom miktarına bağlı olarak artırdığı görüldü. Değişik lipid molar oranlarında DC-kolesterol içeriği bulunan lipozomların IL-1β üretimini lipid molar oranlarına bağlı olarak artırdığı gösterildi.

Sonuç: Bu çalışma, lipozomdaki lipid oranı ve lipozomun tipine göre, içerisine yüklenen immün uyarıcı ajanın hücresele etkinliğini değiştirebileceğini ve inflamazomu etkinleştirme kabiliyetinin olduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar sözcükler: CpG-ODN; DC-kolesterol; immün yanıt; inflamazom; lipozom.

Objectives: This study aims to investigate the effects of cholesterol content and cationic property of liposomes on immune response.

Materials and methods: Liposomes containing high amounts of 3β-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl] cholesterol hydrochloride (DC-cholesterol) were prepared and loaded with K- and D-type CpG oligonucleotide (CpG-ODN) via dehydration-rehydration (DRV) method. After splenocytes and peritoneal exudate cells (PECs) primed with lipopolysaccharide (LPS) was incubated either with free or liposomal CpG-ODN counterparts, supernatants were collected and used in cytokine (IFN-γ, IL-12 and IL-1β) ELISA. Additionally, supernatants of PECs primed with LPS and stimulated with liposomes containing different doses of DC-cholesterol were collected and used in IL-1β ELISA assay.

Results: Low-dose CpG-ODN loaded liposomal formulations induced higher immune activation than free CpG-ODN at the same dose. While high-dose liposomal CpG-ODN formulations decreased pro-inflammatory cytokine production in splenocytes, they increased the secretion of IL-1β. Inflammasome activation was increased in a dose dependent manner when PECs primed with LPS were incubated with only liposomes. Varying lipid molar ratios of DC-Cholesterol containing liposomes increased IL-1β production based on increasing lipid molar ratio.

Conclusion: This study revealed that type and lipid ratio of liposomes may alter the cellular efficacy of the loaded immune-stimulatory agent and may initiate inflammasome activation.

Key words: CpG-ODN; DC-cholesterol; immune response; inflammasome; liposome.

Doğal bağışıklık sistemi, kendinden olanla kendinden olmayı patojenle ilişkili moleküler desenleri (patogen-associated molecular patterns; PAMPs) tanıma reseptörleri (pattern recognition receptors; PRRs) sayesinde tanıyarak ayırt eder.^[1,2] Toll-benzeri reseptörler (TLRs), en geniş kapsamda çalışılmış olan PRR'lerdir. Bu reseptörler hücre membranında ve endozomda bulunurlar. Endozomal TLR'ler nükleik asitleri algılamak için özelleşmiştir. Güçlü bir doğal bağışıklık etkinleşmesini başlatmasının yanı sıra yardımcı T hücre 1 (T helper 1; Th1) aşı adjuvanı, anti-kanser veya anti-alerjen veya immün koruyucu ajan olarak da kullanım potansiyellerinin yüksek olduğu gösterilmiştir.^[3-6] Ancak, nükleik asitlerin klinikte kullanımı nükleazlarca hızla yıkılım veya serum proteinlerince absorpsiyonu nedeniyle sorun oluşturmaktadır.^[7] Bu sorunu çözebilmek için, polimer tabanlı nanopartiküller, polisakarit kompleksler, katyonik peptidler ve lipozomlar gibi birçok taşıyıcı sistemler denenmiştir.^[8-13]

Katyonik lipozomlar, transfeksiyon ajanı, ilaç taşıma aracı veya aşılarda ko-adjuvan olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Daha önceki çalışmalarda, metillenmiş CpG oligonükleotid (CpG-ODN) katyonik, polietilen glikol (PEG) polimeri kaplı lipozom (sterically stabilized cationic liposome; SSCL) içerisine yüklendiğinde, CpG-ODN'nin immün tetikleyici özelliğinin arttığı gösterilmiştir.^[12] Ayrıca CpG-ODN ile birlikte model antijen olan ovalbumin lipozoma yüklendiğinde, antijene özgü interferon gama (IFN- γ) ve IFN- γ 'ya bağlı antijene özgü immünooglobulin G (IgG)2a üretimleri artmıştır.^[12,13]

Lipozomun boyutu, yükü ve yüzey özellikleri farklı tip lipidler kullanılarak ya da antikor gibi farklı moleküller ile lipidler karıştırılarak değiştirilebilir. Lipid tipi ve miktarı, lipozomun hücre içine alınış yolunu ve lipozomun aktive ettiği yolları değiştirebilir.^[13-15] Bazı katyonik lipozomlar sitokin ve kemokin üretimini tetikler ve NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) veya inflamazom yollarını etkinleştirebilirler.^[16] Bu çalışmada, 3 β -[N-(N',N'-dimetilaminoetan)-karbamoil] kolesterol hidroklorid (DC-kolesterol) molar oranı artırılarak modifiye edilmiş SSCL kullanıldı ve bu lipozoma, K- veya D-tipi CpG-ODN yüklendi. Modifiye olmuş katyonik lipozomun, CpG-ODN'nin immün tetikleyici özelliği üzerine etkisi ve inflamazomu etkinleştirici özelliği araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Materyaller

Tüm hücre kültürü besiyeri malzemeleri Hyclone (Thermo Fisher Scientific/Hyclone Laboratories, Inc., Logan, Utah, USA) firmasından temin edildi. Sitokin ELISA reaktifleri; i \mathcal{S} aretsiz ve biyotinli interlökin (IL)-12,

IL-1 β ve IFN- γ monoklonal antikorları sırasıyla Biolegend (Biolegend, San Diego, CA, USA) ve Pierce Endogen (Pierce Endogen Inc., Rockford, IL, USA) firmalarından temin edildi. Rekombinant sitokin ve streptavidin-alkalen fosfataz (SA-ALP) da sırasıyla Biolegend ve Endogen firmalarından, p-nitrofenil fosfat, disodyum tuzu (PNPP; alkalen fosfatazın substratı) Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific, Inc. Logan, Utah, USA) firmasından elde edildi.

3 β -[N-(N',N'-dimetilaminoetan)-karbamoil] kolesterol hidroklorid (DC-kolesterol), 1,2-Dioleoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin-N-[metoksi(polietilen glikol)-2000] (amonyum tuzu) (PEG-PE), 1,2-Dioleoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin (DOPE) ve L- α -fosfatidilkolin (PC) Avanti Polar Lipids (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA) firmasından temin edildi.

Lipozom yapımı

Kullanılan tüm fosfolipidlerin stoğu (20 mg/ml) kloroform içerisinde hazırlandı ve kullanılabildiği kadar -20 °C'de saklandı. Lipidler farklı oranlarda kullanılarak önceki çalışmalarda anlatıldığı gibi lipozomlar hazırlandı.^[12,13] Kısaca, kloroform içerisindeki lipid karışımları döner evaporatör (ILMVAC, GmbH, Ilmenau, Germany) kullanılarak kloroformdan uzaklaştırıldı ve lipid film oluşturuldu. Çözücüden arındırılmış lipid filmler argon veya nitrojen gazına maruz bırakılarak ortamdaki eser miktardaki kloroform ile oksijen uzaklaştırıldı. Boş multilamellar kesecikler (MLV), 20 μ mol kuru lipid içerisine cam boncuklar ve 1 ml fosfat tampon çözeltisi (PBS) eklenerek oluşturuldu. Bu veziküller, küçük unilamellar kesecikler (SUV) oluşturmak için beş kez Vibra Cell sonikasyon (Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, USA) cihazı 30 saniye açık, 30 saniye kapalı kullanılarak parçalara ayrıldı. Ligandları yüklemek için, SUV'ler TLR ligandları (TLRLs, 1 mg/ml) ile karıştırıldı ve sıvı nitrojenle donduruldu. Bu karışım daha sonra gece boyunca liyofilize edildi (VirTis Company, Gardiner, NY, USA). Kurutulmuş lipozom/TLR ligandları karışımına steril dH₂O (100 μ l; orijinal hacmin 1/10 oranı) eklendi ve 15 saniye oda sıcaklığında karıştırıldı. Bu süreç, 3-5 dakika aralıklarla, 30 dakika boyunca tekrarlanarak sürdürüldü. On dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra, bu karışıma PBS (900 μ l) eklendi. Lipozom formülasyonları kullanılabildiği kadar +4 °C'de saklandı.

Atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) ve dinamik ışık saçılımı (DLS) ile lipozom karakterizasyonu

Silikon plakının üzerine lipozomlar aktarıldı ve kurutuldu. AFM görüntüleri temas olmayan mod kullanılarak (XE-100E; PSIA Corp., Suwon, South Korea) elde edildi. Lipozomların boyutları, Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) cihazı ile incelendi.

İn vitro dalak hücrelerinin serbest ve lipozomal ligandlar ile uyarılması

Serbest veya lipozoma yüklü CpG-ODN'ler, 96 kuyucuklu/plaka içerisinde 2×10^5 dalak hücresi/kuyucuk üzerine eklendi ve 36 saat 37°C 'de %5 CO_2 inkübatöründe bekletildi. İnkübasyondan sonra, süpernatantlar toplandı ve sitokin ELISA'sında kullanıldı.

İnflamazom etkinlik düzeyinin belirlenmesi

Farelere, %4 tiyoglikolat intraperitoneal yolla enjekte edildi ve dört gün sonra periton eksüdat hücreleri (PEC) steril PBS ile toplandı. Doksan altı-kuyucuklu plakalara, 2.5×10^5 hücre/kuyucuk ekildi. Dört saat LPS (100 ng/ml) ile ön muameleden sonra, hücreler uyarıcı ile 20 saat 37°C 'de %5 CO_2 inkübatöründe inkübe edildi. Hücrelerdeki IL-1 β üretimi, sitokin ELISA yöntemi ile tayin edildi.

ELİSA analizi

Immulon 2 HB plakaları (Thermo Fisher Scientific, Inc., Logan, Utah, USA), anti-sitokin (IL-12; 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, IL-1 β ; 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, veya IFN- γ ; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) antikorları ile kaplandı ve bir gece $+4^\circ\text{C}$ 'de (veya 4 saat oda sıcaklığında) bekledikten sonra bovin serum albumin (%5 BSA) solüsyonuyla bloklandı. Plakalar beş kez (~5 dakika ara ile Tween/PBS, son yıkama ise sadece dH_2O ile) yıkandıktan sonra, seri olarak seyreltilen standartlar ve hücre kültürü süpernatantları plakalara eklendi. Süpernatantlardaki sitokin miktarı; plakaları, iki saatliğine önce biyotinli anti-sitokin antikorları (1/1000 seyreltilmiş) sonra bir saatliğine de alkalin fosfataz-streptavidin (1/5000 seyreltilmiş) ile bekletilip, son yıkamadan sonra da PNPP substratı eklenerek OD405 nm'de 4-6 saatlik bir sürede ELISA Biotek μQuant plate reader (BioTek, Winooski, Vermont, USA) cihazında okunarak tayin edildi.

İstatistiksel analiz

GraphPad version 5.03 programı ile tek yönlü ANOVA ve Tukey's post hoc analizleri yapılarak gruplar arasında istatistiksel olarak belirgin bir farkın olup olmadığı belirlendi. $P < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

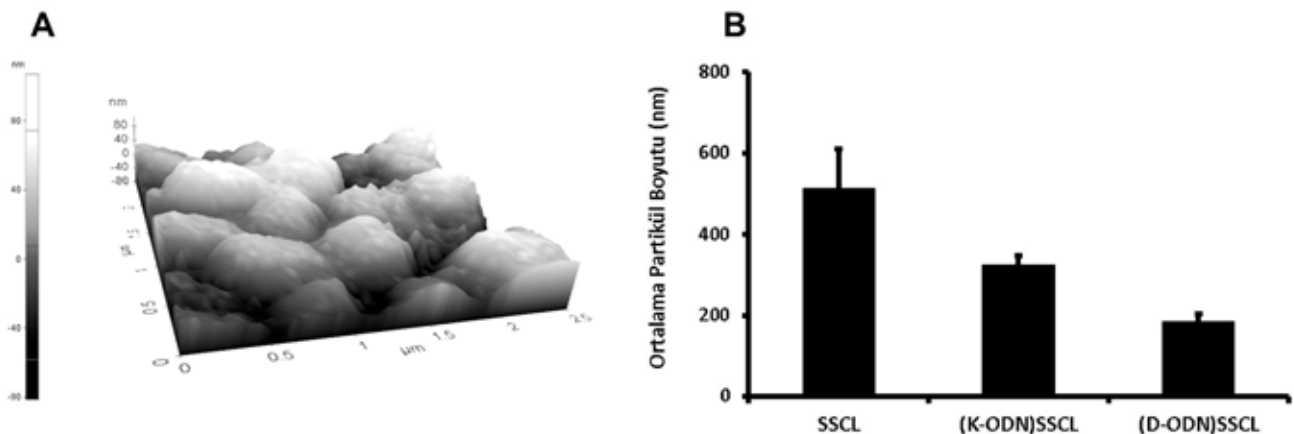
BULGULAR

Lipozom karakterizasyonu

SSCL, DC-kolesterol, DOPE, PEG-PE lipidleri, 6: 1: 0.06 lipid oranında karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan lipozomlara, CpG-ODN, rehidrasyon-dehidrasyon yöntemi ile yüklendi. Bu yöntem ile lipozomların içerisine CpG-ODN'nin çok etkili bir şekilde yüklendiği (%75-95 yükleme oranıyla) daha önceki çalışmalarımızda gösterilmiştir.^[11,12] Lipozomları karakterize etmek için boyutu ve şekli DLS ve AFM kullanılarak incelendi. Boş lipozomlar yuvarlak ve 512.1 ± 98.6 nm boyutunda iken (Şekil 1a) içerisine K- veya D-ODN yüklendiğinde boş lipozoma göre boyutunun küçüldüğü gözlemlendi. Buna göre ODN yüklü SSCL'nin boyutları sırası ile 324.8 ± 23.2 (K-ODN için) ve 184.5 ± 14.1 (D-ODN için) olarak elde edildi (Şekil 1b).

K- ve D-tipi CpG-ODN yüklü SSCL'in immün tetikleyici etkileri

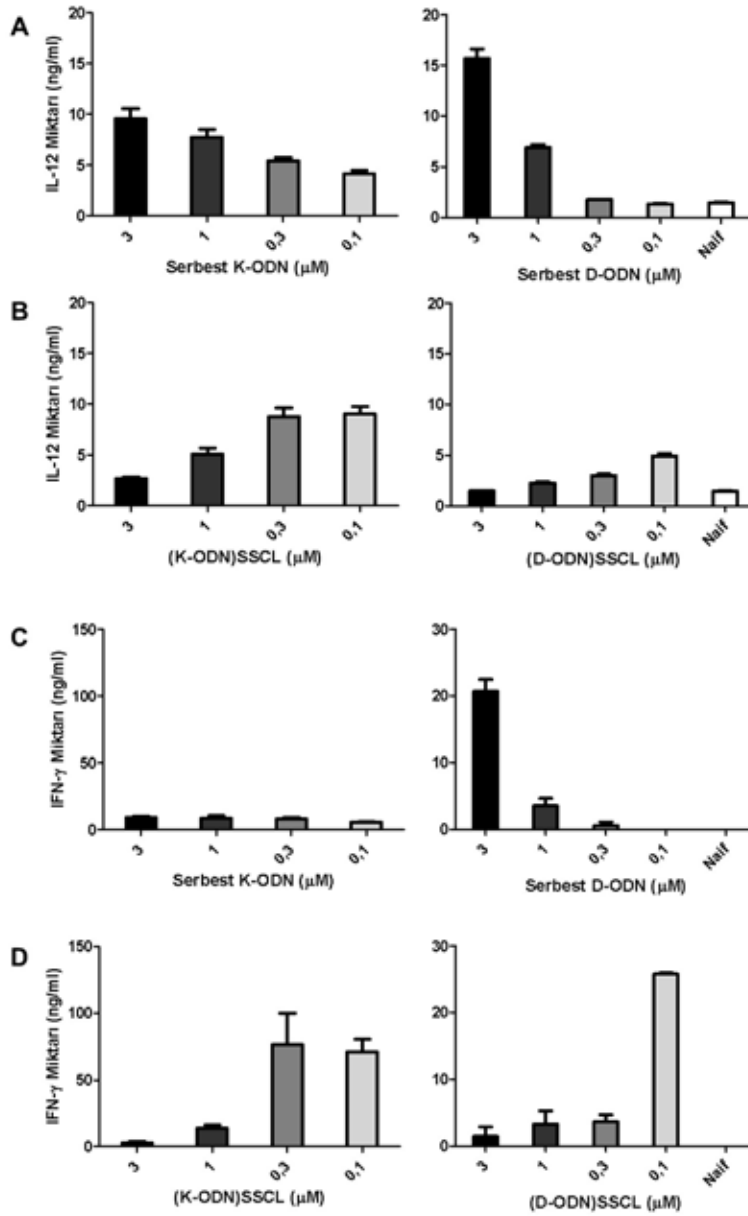
Fare dalak hücreleri, farklı dozlarda, serbest ya da lipozomda yüklenmiş CpG-ODN ile uyarılarak, hücrelerin ürettikleri IL-12, IFN- γ ve IL-1 β gibi Th1-karakterli sitokin salgılama düzeyleri ELISA yöntemi ile tayin edildi. Serbest K-tipi ODN, IL-12 üretimini doza bağlı olarak artırırken (Şekil 2a), lipozomal K-ODN, IL-12 salımını sadece düşük doz ODN yüklü halinde serbest K-ODN'ye göre daha fazla artırdığı görüldü (Şekil 2b). Yüksek doz



Şekil 1. (a) Atomik kuvvet mikroskopisi ve **(b)** dinamik ışık saçılımı analizleri ile, boş ve CpG-ODN yüklü steril olarak stabilize katyonik lipozomun (DC-cholesterol: DOPE: PEG-PE; lipid oranları: 6:1:0.06) boyut ve şekil analizleri.

K-ODN (3 μM) yüklü lipozomal formülasyonlar, aynı doz serbest K-ODN'ye göre 3.5 kat daha az IL-12 salımına neden olurken, düşük doz lipozomal K-ODN (0.1 μM), aynı dozda serbest K-ODN'den iki kat daha fazla IL-12 üretimine neden oldu. D-ODN içeren lipozomlarla yapılan deneyde ise; 3 μM lipozomal D-ODN ile hücreler muamele edildikten sonra serbest D-ODN uygulamasıyla karşılaştırıldığında IL-12 seviyesi 10 kat daha az idi. Bununla birlikte, 0.1 μM D-ODN yüklü lipozom, aynı doz serbest D-ODN'ye göre yaklaşık dört kat IL-12 düze-

yini artırdı. Th1 yanıtının oluşumunu destekleyen önemli bir sitokin olan IFN- γ 'nın ODN uyarımından sonraki miktarlarını karşılaştırmalı olarak analiz ettiğimizde, beklenildiği gibi serbest K-ODN, hücrelerden IFN- γ salımına yol açmazken; serbest D-ODN, sadece en yüksek iki dozda IFN- γ salımına yol açtı (Şekil 2c, sağ panel, 3 μM serbest D-ODN= 20 ± 3.1 ng/ml; 1 μM = 3.5 ± 1.6 ng/ml). Lipozomal CpG-ODN'lerde ise IL-12'de gözlemlendiğimiz eğilime benzer bir tablo ortaya çıktı (Şekil 2b'ye karşın 2d). Düşük dozlarda, hem K- (0.3 ve 0.1 μM)



Şekil 2. Serbest, K- veya D-tipi CpG ODN yüklü SSCL ile uyarılan dalak hücrelerinden sitokin salımı. Dalak hücreleri değişik dozlarda serbest ve lipozoma yüklenmiş CpG-ODN'lerle 36 saat uyarıldıktan sonra, süpernantantlardan, IL-12 (a, b) ve IFN γ (c, d) miktarları ELISA yöntemiyle belirlenmiştir.

hem de D-tipi (0.1 μM) CpG-ODN ile yüklenmiş lipozomlardan IFN- γ üretimi elde edildi (Şekil 2d). Düşük doz (0.1 μM) K-ODN yüklü lipozom, aynı dozda serbest K-ODN ile karşılaştırıldığında, 12 kat daha fazla IFN- γ üretimine neden olduğu görüldü. D-ODN karşılaştırması sonunda, 0.1 μM lipozomal D-ODN, serbest D-ODN'ye göre 25 kat fazla IFN- γ salınımına neden oldu.

CpG-ODN yüklü lipozomların inflamazom aktivitesi

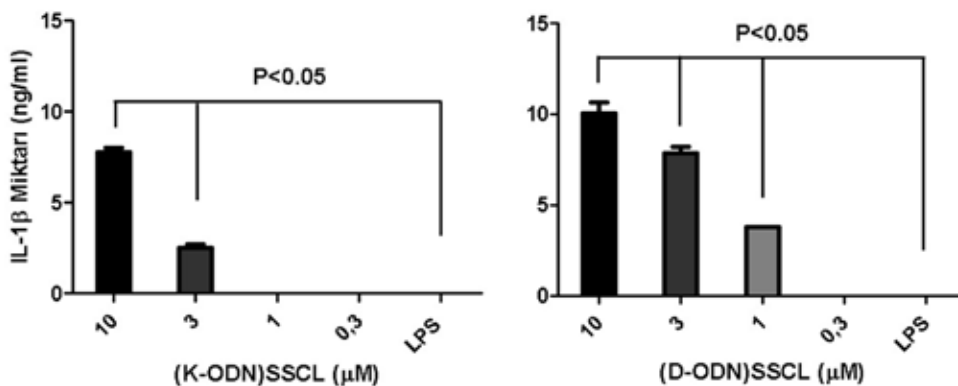
Sadece düşük dozlarda stimüle edildiğinde K- veya D-ODN yüklü lipozomlar IL-12 ve IFN- γ üretimini, serbest CpG-ODN'den daha fazla artırırken serbest CpG-ODN'ler yüksek dozda daha etkin uyarıya yol açtığı sonucunu elde edince yüksek dozlarda bu lipozomların sitotoksik olabileceği yargısı gündeme gelmiştir. Bir hücre ölümü çeşidi olan pyroptosis, inflamazom kompleksinin oluşumu ile tetiklenir.^[17,18] İnflamazomu ise kolesterol ya da silika gibi kristaller, lipidler veya kitosanın etkinleştirdiği bildirilmiştir.^[19-22] Bu nedenle, çalışmamızda yüksek dozda K- veya D-ODN yüklü lipozomların inflamazomu tetikleyip tetiklemediğinin incelenmesine karar verildi. Bu deneylerde, inflamazom oluşumunu göstermek için %4 tiyoglikolat enjekte edilmiş fare PEC'leri kullanıldı. İntraperitoneal tiyoglikolat enjeksiyonundan dört gün sonra, PEC'ler toplandı. Pro-IL-1 β üretimi için gerekli olan sinyal, LPS ile oluşturuldu (100 ng/ml, 4 saat inkübasyonla), IL-1 β üretiminin sağlanması için (ikinci sinyal olarak) serbest ya da lipozomda yüklü K- veya D-ODN'li formülasyonlarla hücreler muamele edildi. Ne serbest K-ODN ne de D-ODN, IL-1 β üretimine neden oldu. Öte yandan, lipozomlara yüklenmiş olan K-ODN (10, 3 μM) ve D-ODN (10, 3, 1 μM) IL-1 β üretimine yol açtı. Sadece LPS ile muamele edilen hücreler ile yüksek dozlardaki K- ve D-ODN yüklü lipozomal

formülasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (Şekil 3; $p < 0.05$).

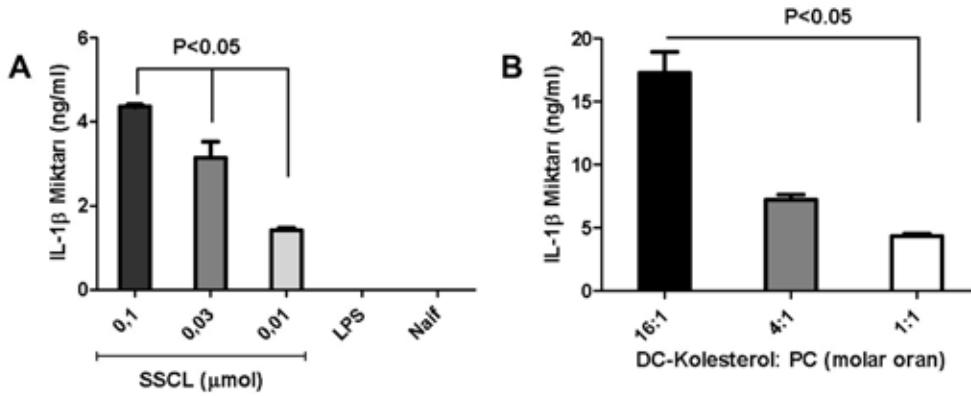
DC-kolesterol içeren lipozomların inflamazom etkinleştirici özellikleri

CpG-ODN'nin hücrelere serbest halde ve yüksek dozda dahi verildiğinde inflamazom kompleksinin oluşumunu (LPS'ye rağmen) tetiklememesi ve buna karşın yüksek dozda lipozomal formülasyonlarla inflamazom etkinliğinin oluşması (Şekil 3), bizi boş lipozomların inflamazomu tek başlarına etkinleştirip etkinleştiremediğini araştırmaya yönlendirdi. Periton eksüdat hücreleri plakalara aktarıldıktan sonra daha önce belirtildiği gibi LPS ile muamele edildi, daha sonra hücrelere değişik miktarlarda lipid içeren farklı dozlardaki lipozomlar ilave edildi. Hiçbir uyarana maruz kalmamış (naif grup) veya sadece LPS ile inkübe edilmiş hücreler beklendiği gibi IL-1 β üretimine yol açmazken, yüksek DC-kolesterol içeren SSCL, doza bağlı olarak IL-1 β üretimini artırdı (Şekil 4a). Bu gruplar arasındaki fark, istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$).

Bu set deneylerde kullanılan modifiye SSCL'ler düşük miktarda DOPE ve PEG-PE içerir iken yüksek miktarda DC-kolesterol içermektedir. İnflamazomu, lipozomun içerdiği lipid tipi ve miktarının etkileyip etkilemediğinin anlaşılması için, PEC'ler, farklı molar oranlarla DC-kolesterol ve nötral bir lipid olan PC kullanılarak hazırlanmış lipozomlarla muamele edildi ve IL-1 β salımı belirlendi. Bu deneylerin sonunda lipozomdaki DC-kolesterol miktarına göreceli olarak inflamazom etkinleşmesinin arttığı dolayısı ile IL-1 β salımının çok daha fazla üretildiği belirlendi (Şekil 4b). Bu sonuçlara göre 16:1 ile 1:1 molar oranları arasında anlamlı bir fark saptandı ($p < 0.05$). Bu sonuçlar bize, lipozom içerisinde



Şekil 3. K- veya D- tipi CpG ODN yüklü lipozomların inflamazomu tetikleme düzeyleri. Farelere, %4 tiyoglikolat enjekte edildikten dört gün sonra periton eksüdat hücreleri steril olarak toplandı. 2.5×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde plakalara eklendi ve dört saat LPS ile ön muamele edildikten sonra, serbest veya lipozomal CpG-ODN'ler, hücrelerle 20 saat süre ile uyarıldı. Süpernatantdaki IL-1 β düzeyi ELISA yöntemiyle analiz edildi.



Şekil 4. Lipozom içerisindeki katyonik lipid molar oranının inflamazomu etkinleştirme kabiliyeti. Periton eksüdat hücreleri, LPS ön muamelesinden sonra farklı total lipid (μmol) miktarlarıyla hazırlanan modifiye SSCL ile (a) veya farklı DC-kolesterol lipid molar oranlarıyla hazırlanan lipozomlarla muamele edildi. (b) Süpernatantlardaki IL-1 β düzeyi ELISA ile analiz edildi. SSCL: Sterically stabilized cationic liposome; ODN: Oligonükleotid; DC-kolesterol: 3 β -[N-(N',N'-dimetilaminoetan)-karbamoil] kolesterol hidroklorid; PC: Fosfatidilkolin; LPS: Lipopolisakarit.

bulunan DC-kolesterol miktarının IL-1 β üretimini yönlendirdiğini açıklamaktadır (Şekil 4b).

TARTIŞMA

Memeli DNA'sında nadiren rastlanan ve çoğunlukla bakteri ve virüs genomunda bulunan farklı sekanslardaki ve yüksek frekansta ifade edilen CpG motiflerinin (TLR9 ligandı), doğal immün yanıtı artırdığı bilinmektedir. D-ODN (CpG-A olarak da adlandırılır), tip I ve tip II-IFN'lerin üretimlerini, doğal öldürücü (natural killer; NK) ve pDC hücrelerinde başlatırken, antijen sunum hücrelerinin ko-stimulan moleküllerini artırıp aynı zamanda olgunlaşmalarını MyD88 bağlı NF- κ B üzerinden etkinleştirir. K-tipi CpG DNA (CpG-B tipi ODN olarak da adlandırılır), fosforotiyoat omurgasından oluşur ve birden çok CpG motifi içerir. IL-12, IL-6 ve tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) gibi inflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını ve hücre çoğalmasını sağlar.^[3,4] Bu ligandlar, birçok terapötik uygulama için klinik denemelerde değişik faz aşamasına girmektedir. Maalesef bu ligandların biyokararlılıklar ve biyoyararlılıklarının düşük olması klinikteki kullanımlarını ciddi düzeyde tehlikeye sokmaktadır.^[4-7] Lipozomlar, farklı fizikokimyasal özellikleri olan lipidler ile oluşturulan doğala yakın nano-keseciklerdir ve daha önceki çalışmalarda CpG-ODN'nin immün tetikleyici etkilerini artırdığı in vitro ve in vivo koşullarda gösterilmiştir.^[12,13] Bu çalışmada, daha önce CpG-ODN'nin etkisini artırdığı bilinen bir lipozom tipi yüksek miktarlarda DC-kolesterol (katyonik lipid) içerecek şekilde SSCL tipi lipozom olarak hazırlandı. Bu lipozoma, K- ve D-tipi CpG-ODN yüklenerek immün tetikleyici özellikleri araştırıldı. Serbest CpG-ODN grupları ile karşılaştırıldıklarında, düşük miktarda lipozomal CpG-ODN'nin, yüksek miktardaki lipozomal formü-

lasyonlarına göre çok daha fazla proinflamatuvar sitokin üretimini yönlendirdiği bulundu. Bu beklenmedik sonuç, yüksek miktardaki lipozomun hücre ölümüne neden olabileceği sonucunu düşündürdü. Hücre ölümlerinden biri olan pyroptosis, inflamazom kompleksinin oluşumu ve IL-1 β sitokininin ortaya çıkışı sonrasında gerçekleşmektedir.^[17,18]

İnflamazom, NALP, PYD, ASC, kaspaz-1 veya kaspaz-5 içeren sitozolik multiprotein oligomerik kompleksidir. NLRP1, NLRP3 ve NLRC4 gibi NLR'ler veya AIM-2, hasar ile ilişkili moleküler desenler (damage-associated molecular patterns; DAMPs) ve patojenle ilişkili moleküler desenler (PAMP) içeren ligandları sitozolde tanırlar. ATP, partiküller ve kristal haldeki steril moleküllerin yanı sıra PAMP içeren moleküller de inflamazom oluşumunu başlatır.^[18] İnflamazom kompleksinde, pro-kaspaz 1, CARD (caspase recruitment domain) yardımı ile NLR'lerle etkileşime girer. Prokaspaz 1, inflamazom kompleksine geldiğinde otoproteolitik ayrılma gerçekleşir ve aktif kaspaz 1 enzimine dönüşür. Bu, sitoplazmada üreilmeye başlanan pro-IL-1 β ve pro-IL-18 sitokinlerini parçalayarak etkin formdaki IL-1 β ve IL-18 sitokinlerinin hücre dışı salgısına yol açar. Bunun yanında, hücrelerdeki apoptozis ve nekrozis gibi bir başka programlı hücre ölümü tipi olan pyroptosisin de gerçekleşmesine neden olur.^[17,18] Açıklandığı gibi inflamazom etkinliği ile aktif IL-1 β üretiminin gerçekleşmesi için iki sinyale ihtiyaç duyulmaktadır. PEC'lerle yaptığımız deneylerde, birinci sinyal LPS muamelesi ile oluşturuldu ve pro-IL-1 β sentezine yol açıldı. Aktif IL-1 β oluşumuna neden olacak kaspaz etkinleşmesi ise ikinci sinyal ile oluşmaktadır. Bu işlevi CpG-ODN'nin ya da lipozomların yerine getirmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada, serbest CpG-ODN'nin değil de lipozomal K- ve D-ODN'lerin IL-1 β üretimini tetiklediği gösterildi. Bir PAMP olan CpG-ODN motiflerinden bağımsız (Şekil 3), lipozomlardaki katyonik karakterli DC-kolesterolün (Şekil 4) bu sürece ikinci sinyali oluşturan etmen olarak katkı sağladığını bu çalışmadaki bulgularımıza dayanarak iddia etmekteyiz. Bu durum, boş lipozomun belki de hücre içi dağılımını değiştirerek, endozomu destabilize ederek inflamazomu tek başına etkinleştirdiğini düşündürmektedir.

Polimerik implantlar ve nanopartiküller gibi bazı biyomalzemelerin, inflamazom kompleksinin oluşmasına neden oldukları bildirilmiştir.^[23-25] Poli(laktid-ko-glikolid) (PLG) mikropartiküllerini kullanan bir çalışmada gösterildiği gibi; partiküller, hücre içerisine alınırken endozomda/lizozomda sızıntıya neden olabilir veya zarar verebilirler.^[24] LPS kullanmadan CpG-ODN bazı polimerik partiküllerle birlikte hücrelere verildiğinde, hücre içine alımdan, lizozomal asidifikasyondan ve katepsin B aktivitesinden dolayı inflamazom kompleksine neden olan partiküllerin IL-1 β üretimini artırdığı gösterilmiştir.^[24] Bizim çalışmamızda, CpG-ODN yüklü veya boş lipozomal formülasyonlar arasında bahsedildiği gibi inflamazom etkinleşmesinde bir artış gözlemlenmedi. Bunun nedeni ise LPS ön muamelesi sırasında üretilen pro-IL-1 β miktarının fazla olması olabilir. CpG-ODN ile lipid ya da lipozomlar arasında böyle bir sinerjinin olup olmadığını araştırmak için LPS kullanmadan hücreler sadece lipozomal formülasyonlarla inkübe edilebilirdi. Bunun yanında, alum, kitosan ve bazı emülsiyonlar gibi adjuvanların doğal bağışıklık sistemini tetiklediği ve immün yanıt ile inflamazomu birlikte yönlendirdiği de literatürde bildirilmiştir.^[25-27] Ancak, bizim çalışmamızda, IL-1 β artışı sonucu Th1 sitokin üretiminde azalma görüldü. Th1 yolu immünitenin yüksek dozlarda serbest ODN'lere göre daha düşük olması ve bu dozlarda lipozom yolu inflamasyonun etkinleştirdiğini belirlememiz şöyle yorumlanabilir: IL-1 β salımı Th1 yolu immüniteyi engellemektedir. Bu duruma yol açan neden ise inflamazomla etkinleşmiş hücrelerin pyroptosis girişidir.

Sterol bir lipid molekülü olan kolesterol, NLRP3 inflamazomunu, lizozomu destabilize ederek ve katepsin B sızıntısına yol açarak aktive eder.^[28] DC-kolesterol, katyonik bir kolesteroldür ve çoğunlukla potent bir ko-adjuvan ve DNA, antijen ve adjuvan taşıma aracı olan katyonik lipozom yapımında kullanılır.^[12,13,29] İnflamazom kompleksinin oluşumunu yönlendirici özelliği bu çalışmaya kadar bildirilmemiştir ancak katyonik partiküllerin inflamazoma neden olabileceği bilinmektedir.^[16,21] Örneğin, DiC14'ün, inflamazomu tetiklediği ve alum'un adjuvan özelliğini sinerjik ola-

rak artırdığı bildirilmiştir.^[21] Bu nedenle, lipozomun içerisindeki yüksek miktardaki katyonik lipidin inflamazomu tetiklediği bu çalışmadaki verilerle ilk kez gösterilmiştir.

Sonuç olarak, lipozomlar çok farklı ve değişik lipidlerle farklı oranlarda karıştırılarak hazırlanabilir. Lipozoma eklenen her lipidin veya değiştirilen lipid oranlarının, lipozomun hücre içine alınmasını ve hücre içindeki kaderini ve hücre içi dağılımını etkileyebilmektedir. Değişik hücre içi yolları da etkinleştirebilmektedir. Bazı durumlarda içine yüklenen ligand ya da ajanlarla sinerjik olarak etkileşip hücrenin davranışını ve ortaya çıkacak tepkilerin yelpazesini bu yüzden değiştirebileceği gözden kaçmamalıdır. Bu nedenle, ilaç taşıma aracı olarak ya da transfeksiyon ajanı olarak da sık sık kullanılan lipozomların immünetikleyici etkileri, ko-adjuvan ya da antijen ve adjuvan taşıma aracı olarak aşılarda kullanılmadan önce göz önüne alınarak lipozomlar tasarlanmalıdır.

Çıkar çakışması beyanı

Yazarlar bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çakışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansman

Bu yazının hazırlanmasında TÜBİTAK, SBAG-113S316 numaralı proje desteğinden yararlanılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 2002;20:197-216.
2. Schenten D, Medzhitov R. Chapter 3 – The control of adaptive immune responses by the innate immune system. *Adv Immunol* 2011;109:87-124.
3. Klinman DM, Currie D, Gursel I, Verthelyi D. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunol Rev* 2004;199:201-216.
4. Duthie MS, Windish HP, Fox CB, Reed SG. Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. *Immunol Rev* 2010;239:178-196.
5. Ishii KJ, Kawakami K, Gursel I, Conover J, Joshi BH, Klinman DM, Puri RK. Antitumor therapy with bacterial DNA and toxin: complete regression of established tumor induced by liposomal CpG oligodeoxynucleotides plus interleukin-13 cytotoxin. *Clin Cancer Res.* 2003;9:6516-6522.
6. Fonseca DE, Kline JN. Use of CpG oligonucleotides in treatment of asthma and allergic disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61:256-262.
7. Barry ME, Pinto-Gonzalez D, Orson FM, McKenzie GJ, Petry GR, Barry MA. Role of endogenous endonucleases and tissue site in transfection and CpG-mediated immune activation after naked DNA injection. *Hum Gene Ther* 1999;10:2461e80.
8. Kasturi SP, Skountzou I, Albrecht RA, Koutsonanos D, Hua T et al. Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature* 2011;470:543-547.

9. Xie H, Gursel I, Ivins BE, Singh M, O'Hagan DT, Ulmer JB, Klinman DM. CpG oligodeoxynucleotides adsorbed onto polyactide-co-glycolide microparticles improve the immunogenicity and protective activity of the licensed antrax vaccine. *Infect Immun* 2005;73:828-833.
10. Tincer G, Yerlikaya S, Yagci FC, Kahraman T, Atanur OM, Erbatur O, Gursel I. Immunostimulatory activity of polysaccharide-poly(I:C) nanoparticles. *Biomaterials* 2011;32:4275-4282.
11. Gungor B, Yagci FC, Tincer G, Bayyurt B, Alpdundar E, Yildiz S, Ozcan M, Gursel I, Gursel M. Production from Plasmacytoid Dendritic Cells and Demonstrate Potent Vaccine Adjuvant Activity. *Sci Transl Med* 2014;6:235ra61.
12. Gursel I, Gursel M, Ishii KJ, Klinman DM. Sterically stabilized cationic liposomes improve the uptake and immunostimulatory activity of CpG oligonucleotides. *J Immunol* 2001;167:3324-3328.
13. Eriksi E, Gursel M, Gursel I. Differential immune activation following encapsulation of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide in nanoliposomes. *Biomaterials* 2011;32:1715-1723.
14. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:145-60.
15. Watson DS, Endsley AN, Huang L. Design considerations for liposomal vaccines: Influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens. *Vaccine* 2012;30:2256-2272.
16. Loney C, Vandenbranden M, Ruyschaert JM. Cationic lipids activate intracellular signaling pathways. *Adv Drug Deliv Rev* 2012;64:1749-1758.
17. Lamkanfi M, and Dixit VM. Mechanisms and Functions of Inflammasomes. *Cell* 2014;157:1013-1022.
18. Schroder K and Tschopp J. The Inflammasomes. *Cell* 2010;140:821-832.
19. Duester P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nuñez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 2010;464:1357-1361.
20. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, Latz E. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature Immunology* 2008;9:847-856.
21. Wilmar A, Loney C, Vermeersch M, Andrianne M, Pérez-Morga D, Ruyschaert JP, Vandenbranden M, Leo O, Temmerman ST. The cationic lipid, diC14 amidine, extends the adjuvant properties of aluminum salts through a TLR-4- and caspase-1-independent mechanism. *Vaccine* 2012;30:414-424.
22. Bueter CL, Lee CK, Rathinam VAK, Healy GJ, Taron CH, Specht CA, Levitz SM. Chitosan but Not Chitin Activates the Inflammasome by a Mechanism Dependent upon Phagocytosis. *J Biol Chem* 2011;286:35447-35455.
23. Malik AF, Hoque R, Ouyang X, Ghani A, Hong E, Khan K, Moore LB, Gilbert Ng, Munro F, Flavell RA, Shi Y, Kyriakides TR, Mehal WZ. Inflammasome components Asc and caspase-1 mediate biomaterial-induced inflammation and foreign body response. *PNAS* 2011;108:20095-20100.
24. Sharp FA, Ruane D, Claass B, Creagh E, Harris J, Malyala P, Singh M, O'Hagan DT, Petrilli V, Tschopp J, O'Neill LAJ, Lavella EC. Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *PNAS* 2009;106:870-875.
25. Demento SL, Eisenbarth SC, Foellmer HG, Platt C, Caplane MJ, Saltzman WM, Mellman I, Ledizet M, Fikrig E, Flavell RA, Fahmy TM. Inflammasome-activating nanoparticles as modular systems for optimizing vaccine efficacy. *Vaccine* 2009;27:3013-3021.
26. Li H, Willingham SB, Ting JP, Re F. Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J Immunol* 2008; 181(1):17-21.
27. Bueter CL, Lee CK, Rathinam VA, Healy GJ, Taron CH, Specht CA, Levitz SM. Chitosan but not chitin activates the inflammasome by a mechanism dependent upon phagocytosis. *J Biol Chem* 2011;286(41):35447-55.
28. Rajamaki K, Lappalainen J, Öörni K, Valimäki E, Matikainen S, Kovanen PT, Eklund KK. Cholesterol Crystals Activate the NLRP3 Inflammasome in Human Macrophages: A Novel Link between Cholesterol Metabolism and Inflammation. *PLoS ONE* 2010;5(7):e11765. doi:10.1371/journal.pone.0011765.
29. Barnier-Quer C, Elsharkawy A, Romeijn S, Kros A, Jiskoot W. Adjuvant Effect of Cationic Liposomes for Subunit Influenza Vaccine: Influence of Antigen Loading Method, Cholesterol and Immune Modulators. *Pharmaceutics* 2013;5:392-410; doi:10.3390/pharmaceutics5030392.