

مقایسه تأثیر اجزای پروتئینی و اسید نوکلئیکی عصاره توکسوپلازما گوندی بر تولید IL-12 از سلول‌های دندریتیک و تکثیر سلول‌های T

افشین آماری^۱، سیدعلی‌رضا رضوی^۲، آرزو جمالی^۳، عباس‌علی امینی‌سردرود^۴، معصومه معتمدی^۱، سعیده شجاعی^۵،
بیبا انصاری‌پور^۶، جمشید حاجتی^{۷*}

- ۱- کارشناس ارشد، گروه ایمنولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۲- دانشیار، گروه ایمنولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۳- کارشناس ارشد، گروه ایمنولوژی، دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۴- کارشناس ارشد، گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
- ۵- دانشیار، گروه انگل‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۶- کارشناس، گروه ایمنولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۷- دانشیار، گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۷/۰۸/۲۰

دریافت مقاله: ۸۷/۰۶/۱۶

چکیده

هدف: بررسی تأثیر اجزای پروتئینی و اسید نوکلئیکی توکسوپلازما گوندی بر بلوغ سلول‌های دندریتیک و توانایی آن‌ها در تولید IL-12 و تکثیر لنفوسیت‌های T اختصاصی آنتی‌ژن‌های توموری
مواد و روش‌ها: سلول‌های مغز استخوان موش به مدت پنج روز در حضور GM-CSF و IL-4 کشت داده شدند. روز پنجم سلول‌های دندریتیک نابالغ به دست آمده با لیزات تومور و اجزای پروتئینی و اسید نوکلئیکی توکسوپلازما گوندی و لیپوپلی ساکارید به مدت دو روز کشت داده شدند. برای بررسی عملکرد سلول‌های دندریتیک در تحریک لنفوسیت‌های T از آزمون MLR استفاده شد. از کیت الایزا برای اندازه‌گیری میزان IL-12 استفاده و بلوغ سلول‌های دندریتیک با فلوسیتومتری بررسی شد.
نتایج: سلول‌های دندریتیک بالغ شده با اجزای پروتئینی توکسوپلازما باعث تکثیر معنی‌داری در سلول‌هایطحالی در مقایسه با دیگر گروه‌ها شد و میزان تولید IL-12 در این گروه بالاتر بود ($P < 0.001$).
نتیجه‌گیری: ترکیبات مختلف پیکره میکروبی مانند اجزای پروتئینی و اسید نوکلئیکی توکسوپلازما گوندی می‌توانند باعث افزایش قابلیت عرضه آنتی‌ژن سلول‌های دندریتیک به لنفوسیت‌ها شوند که در این میان تأثیر اجزای پروتئینی از اجزای اسید نوکلئیکی بیشتر بوده است.

کلیدواژگان: سلول دندریتیک، توکسوپلازما گوندی، IL-12

۱- مقدمه

سلول‌های دندریتیک (Dendritic Cells: DCs) سلول‌های جهت‌دهی پاسخ‌های اولیه و ثانویه سلول T دارند [۱]. DCs حرفه‌ای عرضه‌کننده آنتی‌ژن هستند که نقش کلیدی در آغاز و برحسب مرحله بلوغ، عامل محرک بلوغ، زیرگروه و نسبت

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه ایمنولوژی، صندوق پستی: ۶۴۴۷-۱۴۱۵۵

Email: hajatij@sina.tums.ac.ir

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- حیوانات و رده سلولی

در این مطالعه از موش‌های Balb/c ماده ۶ تا ۸ هفته استفاده شد که از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. سلول‌های WEHI-164 (فیروسارکومای موش Balb/c) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. برای کشت این سلول‌ها از محیط RPMI 1640 (Gibco, USA) حاوی ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین (Penicillin) و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین (Streptomycin)، ۲ میلی‌مول ال-گلوتامین و ۱۰ درصد سرم غیرفعال شده جنین گوساله استفاده شد.

۲-۲- تهیه لیزات توموری

برای تهیه لیزات تومور تعداد 4×10^6 سلول WEHI-164 را ۶ تا ۷ بار منجمد و ذوب نموده و پس از سانتریفوژ و تعیین میزان پروتئین مایع رویی به‌عنوان منبع آنتی‌ژن‌های توموری استفاده شد.

۲-۳- تهیه اجزای پروتئینی و اسید نوکلئیکی

توکسوپلازما گوندی

سویه توکسوپلازما (RH) از گروه انگل‌شناسی بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شد. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول حاوی توکسوپلازما به داخل صفاق موش تزریق شد. سه یا چهار روز بعد از تزریق موش‌ها کشته شده و بعد از تزریق بافر فسفات به حفره صفاقی، محتویات صفاقی جمع‌آوری شد. برای تهیه آنتی‌ژن، محتویات صفاق چند بار (۸-۱۰) از سر سوزن ۲۷ عبور داده شد تا ماکروفاژها پاره شده و تاکی‌زوییت‌ها (Tachyzoite) آزاد شوند. برای لیز کردن تاکی‌زوییت‌ها از سونیکاتور (Sonicator) (۴ بار به مدت ۵ دقیقه با قدرت ۵ و چرخه ۵۰ درصد) استفاده شد. برای

DCs به لئوسیت‌های T قادر به ایجاد طیف متنوعی از پاسخ‌های ایمنی از تحمل (Tolerance) تا ایجاد پاسخ ایمنی سلولی هستند [۲]. DCs نابالغ اغلب در بافت‌های محیطی مستقر هستند و با قدرت زیاد اندوسیتوز و بروز اندک مولکول‌های سطحی CD80، CD40، CD86 و کمپلکس سازگاری نسجی اصلی کلاس ۲ (Major Histocompatibility Complex class II: MHCII) شناسایی می‌شوند [۳، ۴].

این سلول‌ها محصولات ترشحی و متابولیزه شده توسط میکروب‌ها را از طریق گیرنده‌های شناسایی‌کننده مانند گیرنده‌های شبه تول (Toll-like receptor: TLR) شناسایی می‌کنند [۵]. شناسایی عوامل میکروبی از این طریق موجب ترشح سیتوکین‌های (Cytokines) التهابی، کموکین‌ها (Chemokins)، بروز مولکول‌های کمک محرک و MHC می‌شوند [۶، ۷].

اجزا و ترکیبات میکروارگانیسم‌های داخل سلولی مثل توکسوپلازما گوندی (*Toxoplasma gondii*) نیز از طریق TLRها شناسایی می‌شوند. اتصال این گیرنده‌ها به لیگاند خود موجب بلوغ سلول‌های دندریتیک، ترشح اینترلوکین-۱۲ (Interleukin-12: IL12) [۸] و ایجاد پاسخ لئوسیتی نوع ۱ (TH1) می‌شوند [۹].

DCs نابالغ پس از برخورد با عصاره کامل توکسوپلازما گوندی از طریق TLR-2، TLR-4، TLR-9 و TLR-11 با افزایش میزان بروز مولکول‌های CD80، MHCII و CD86 بالغ شده و مقدار فراوانی IL-12 تولید می‌کنند [۱۰-۱۲].

با توجه به تجربیات قبلی که استفاده از عصاره کامل توکسوپلازما گوندی موجب تقویت عملکرد DCs می‌شود، در مطالعه حاضر ضمن جداسازی اجزای پروتئینی و اسید نوکلئیکی توکسوپلازما گوندی، آثار هر یک از اجزای مذکور در عملکرد DCs برای تحریک لئوسیت‌های T و تولید IL-12 توسط این سلول‌ها بررسی شد.

۱ میلی‌گرم لیپوپولی ساکارید (Lipopolysaccharide: LPS) (Sigma) و ۱۰ نانوگرم DNA به ازای 10^6 سلول به مدت ۲ روز به منظور القای بلوغ DCs به سلول‌ها اضافه شد.

۲-۵- تأثیر اجزای پروتئینی و اسید نوکلئیکی

بر بلوغ DCs

فنونایپ DCs در روز پنجم و هفتم توسط فلوسیتومتری با استفاده از آنتی‌بادی‌های کونژوگه ضد نشانگرها FITC CD80، MHCII، CD40، CD86، (Fluorescein isothiocyanate) و CD11C PE (BD Pharmingen) تعیین شد. سلول‌های جدا شده از کشت DC در مجاورت آنتی‌بادی منوکلونال (Monoclonal) به مدت ۴۵ دقیقه در تاریکی و سرما قرار گرفتند. سپس برای خارج کردن آنتی‌بادی اضافی سلول‌ها با بافر فسفات شستشو داده شد. سپس قرائت نتایج توسط دستگاه فلوسیتومتری انجام پذیرفت (Partech, Germany) و با نرم‌افزار WinMDI-2.7 تجزیه و تحلیل شد.

۲-۶- آزمون MLR (Mixed leukocyte reaction)

برای بررسی عملکرد DCs

DCs بالغ شده (روز هفتم) با اجزای پروتئینی و اسید نوکلئیکی توکسوپلازما گوندی در دو غلظت 5×10^3 و 2×10^3 در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت تهیه و اشعه گاما (۳۰۰ راد) دریافت نمودند. سلول‌های طحالی به میزان 10^5 در ۱۰۰ میکرولیتر تهیه و به سلول‌های فوق اضافه شدند. از روش Brdu (Roche) برای انجام آزمون استفاده شد. طبق دستور کیت، بعد از ۵ روز کشت توام DCs و سلول‌های طحالی، در روز پنجم محلول Brdu به سلول‌ها اضافه شد و به مدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از این مدت آنتی Brdu به سلول‌ها اضافه شده و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس سوبسترا را اضافه کرده و بعد

جداسازی اجزای پروتئینی از کیت شرکت Qiagen (37900, USA) استفاده شد. برای اثبات عدم آلودگی DNA با پروتئین و اثبات اجزای پروتئینی جدا شده از روش SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis) استفاده شد.

برای جداسازی DNA از کیت شرکت Qiagen (51304, USA) استفاده شد و میزان جذب $260/280$ با دستگاه بیوفتومتر (Biophotometer) تعیین شد.

۲-۴- تولید و بلوغ DCs میلوئید

برای تولید DCs از مغز استخوان استفاده شد [۱۳]. به‌طور خلاصه بعد از کشتن موش Balb/c استخوان ران و ساق جدا و با استفاده از محیط ناقص (RPMI بدون سرم) محتویات داخل استخوان‌ها خارج شد.

گلوبول‌های قرمز با آمونیوم کلراید [۰/۱۵ مول NH_4Cl ، ۱ میلی‌مول KHCO_3 ، ۰/۱ میلی‌مول EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)] به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق لیز شدند. سلول‌ها با غلظت 10^6 در میلی‌لیتر در محیط RPMI 1640 (Gibco, USA) حاوی ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم استریتوماکسین، ۲ میلی‌مول ال-گلوتامین و ۱۰ درصد سرم غیرفعال شده گوساله (Gibco, USA)، ۰/۱ درصد ۲-مرکاپتواتانول (2-mercaptoethanole) (Sigma, USA)، سدیم پیروات (Sigma) و اسیدهای آمینه غیرضروری (Sigma) و در حضور ۲۰ نانوگرم GM-CSF (Granulocyte macrophage-colony stimulating factor) (Peprotech, USA) و ۱۰ نانوگرم IL-4 (Peprotech) در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای کشت داده شد. روز سوم سلول‌های غیرچسبان جدا شده و در پلیت‌های ۶ خانه‌ای کشت داده شد. در روز پنجم ۱۰۰ میکروگرم لیزات تومور به ازای 10^6 سلول به سلول‌ها اضافه و بعد از ۶ تا ۸ ساعت، ۷۰ میکروگرم اجزای پروتئینی توکسوپلازما گوندی و

۳- نتایج

۳-۱- تأثیر اجزای پروتئینی و اسید نوکلئیکی

بر بلوغ DCs

فنونایپ DCs در روز پنجم در مقایسه با ایزوتایپ کنترل، با بروز نشانگر CD11c و افزایش کمی در سایر نشانگرها همراه و بیانگر DC نابالغ است. در روز هفتم بعد از برخورد DCs با اجزای پروتئینی و اسید نوکلئیکی توکسوپلازما گوندی و LPS، بروز مولکول‌های سطحی در تمام گروه‌ها افزایش یافته که DCهای مجاور شده با اجزای پروتئینی تمام نشانگرها را در سطح بالاتری نشان می‌دهند. شکل ۱ (الف) میزان بیان مولکول CD11c⁺ در DCs روز پنجم را نشان می‌دهد که نشان‌دهنده میزان خلوص DCs تولید شده است. شکل ۱ (ب) DCs بالغ شده با اجزای پروتئینی و اسید نوکلئیکی توکسوپلازما گوندی و LPS در مقایسه با سلول‌های نابالغ روز پنجم را نشان می‌دهد.

از ۲۰-۳۰ دقیقه با دستگاه قرائت گر الایزا (ELISA Reader) در طول موج ۴۵۰ و مرجع ۶۹۰ نانومتر قرائت شد.

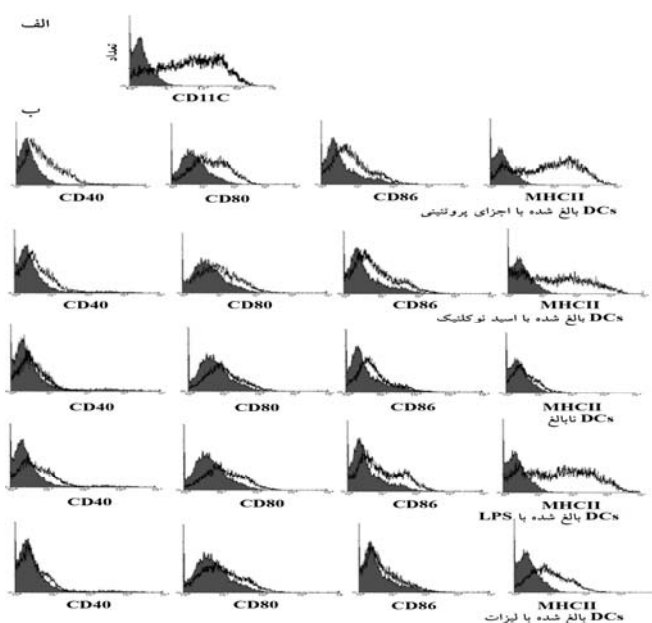
۲-۷- ارزیابی میزان IL-12 مترشحه از DCs بر

اثر تحریک اجزای پروتئینی و اسید نوکلئیکی

برای بررسی IL-12 تولید شده توسط DCs، سوپ رویی کشت DCs بالغ شده با اجزای پروتئینی و اسید نوکلئیکی توکسوپلازما گوندی و LPS در روز هفتم جمع‌آوری و با کیت الایزا (R&D) اندازه‌گیری شد. تمام نمونه‌ها به صورت سه‌تایی انجام و غلظت IL-12 براساس منحنی استاندارد و برحسب پیکوگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد.

۲-۸- روش آماری

آزمون کروسکال-والیس (Kruskal-Wallis) برای بررسی تفاوت بین گروه‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۲ انجام شد و سطح معنی‌داری $P < 0/05$ انتخاب شد.



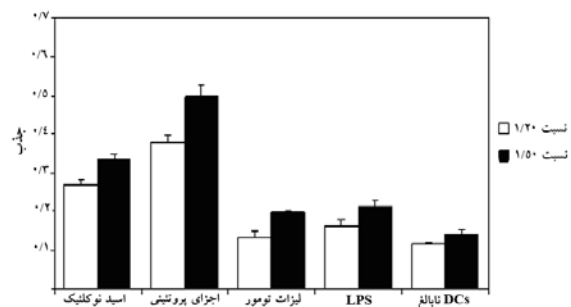
شکل ۱ (الف) بروز نشانگر CD11c بر DCs نابالغ به صورت (توخالی) در مقایسه با ایزوتایپ کنترل (توپر) که میزان خلوص DCs تولید شده را نشان می‌دهد. (ب) بروز نشانگرهای بلوغ بر DCs بالغ (توخالی) در مقایسه با DCs نابالغ (توپر) در گروه‌های مختلف سلول‌ها که تحت تأثیر ترکیبات مختلف قرار گرفته‌اند را نشان می‌دهد. میزان بروز نشانگرهای بلوغ در گروه DCs بالغ شده با اجزای پروتئینی از گروه‌های دیگر بیشتر است.

۲-۳- بررسی میزان تکثیر سلول‌های طحالی توسط

DCs مجاور شده با اجزای پروتئینی و اسید نوکلئیکی

برای بررسی میزان تکثیر سلول‌های طحالی توسط DCs مجاور شده با اجزای پروتئینی و اسید نوکلئیکی توکسوپلازما گوندی از آزمون MLR استفاده شد. نتایج به دست آمده نشان دادند که DCs در تمام گروه‌ها موجب تکثیر سلول‌های طحالی نسبت به گروه DCs نابالغ می‌شوند. DCs مجاور شده با اجزای پروتئینی توکسوپلازما گوندی نسبت به DCs مجاور شده با اسید نوکلئیک، LPS، DCs نابالغ و DCs مجاور شده با لیزات تومور افزایش معنی‌داری در تکثیر سلول‌های طحالی دارند ($P < 0/001$). در بین گروه‌ها کمترین تکثیر مربوط به DCs نابالغ است ($P < 0/001$).

DCs بالغ شده با اسید نوکلئیک توکسوپلازما گوندی بعد از گروه DCs بالغ شده با پروتئین نسبت به گروه‌های دیگر، تکثیر بیشتری داشته و تفاوت معنی‌داری را نسبت به دیگر گروه‌ها نشان می‌دهد. ($P < 0/001$) (نمودار ۱).

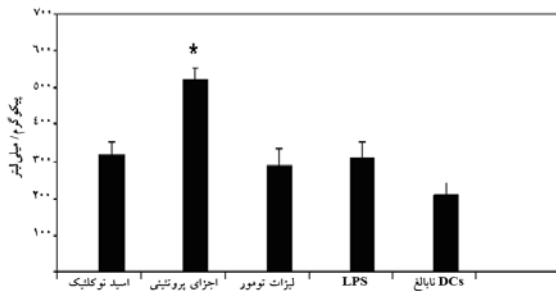


نمودار ۱ میزان تکثیر سلول‌های طحالی در کشت همزمان با انواع DCs بالغ شده با اجزای پروتئینی و اسید نوکلئیکی توکسوپلازما گوندی، لیزات تومور و LPS در نسبت‌های ۱/۲۰ و ۱/۵۰ (سلول‌های طحالی/DCs)؛ در هر دو نسبت DCs بالغ شده با اجزای پروتئینی باعث تکثیر بیشتر سلول‌های طحالی نسبت به سایر گروه‌ها شده است و اختلاف معنی‌داری با سایر گروه‌ها دارند ($P < 0/001$).

۳-۳- IL-12 مترشح از DCs بر اثر تحریک

اجزای پروتئینی و اسید نوکلئیکی

همان‌گونه که در شکل ۳ ملاحظه می‌شود، DCs بالغ شده با اجزای پروتئینی در مقایسه با سایر گروه‌ها به‌طور معنی‌داری بالاترین میزان ترشح IL-12 را دارند ($P < 0/001$). در بین سایر گروه‌ها، DCs مجاور شده با اسید نوکلئیک تفاوت معنی‌داری با DCs مجاور شده با لیزات تومور و DCs نابالغ ندارند ($P < 0/001$) ولی تفاوت معنی‌داری با DCs مجاور شده با LPS ندارند. کمترین مقدار ترشح IL-12 مربوط به DCs نابالغ است ($P < 0/873$) (نمودار ۲).



نمودار ۲ میزان ترشح IL-12 از DCs بالغ شده با اجزای پروتئینی و اسید نوکلئیکی توکسوپلازما گوندی، لیزات تومور و LPS برحسب پیکوگرم در میلی‌لیتر را نشان می‌دهد. * بالاترین میزان ترشح IL-12 مربوط به DCs بالغ شده با اجزای پروتئینی است که اختلاف معنی‌داری با سایر گروه‌ها دارد ($P < 0/001$).

۴- بحث

یکی از شرایط اولیه تحریک مناسب سلول‌های T بروز مناسب و کافی انواع مولکول‌های دخیل در روند عرضه آنتی‌ژن بر سطح DCs است [۲]. براساس برخی مطالعات، DCs نابالغ پس از مجاورت با عصاره کامل توکسوپلازما گوندی بروز مولکول‌های محرک کمکی CD80، CD86، CD40، MHCII را افزایش داده و پس از بلوغ مقدار فراوانی IL-12 تولید می‌کنند

یکی دیگر از اجزای توکسوپلازما، سایکلوپیلین (Cyclophilin) است که مولکولی شبیه چاپرون (Chaperone) بوده و توسط تاکی‌زوئیت‌ها و سلول‌های آلوده به توکسوپلازما آزاد می‌شود [۱۷]. این مولکول با اتصال به گیرنده کموکین ۵ [Chemokine (C-C motif) receptor 5: CCR5]، گیرنده کموکین مورد نیاز برای مهاجرت DCs به ناحیه سلول‌های T طحال، باعث تحریک این گیرنده و افزایش مهاجرت و تولید IL-12 توسط DCs می‌شود [۱۸].

اخیراً نشان داده‌اند که DCs در مجاورت CpG مجاور شده‌اند می‌توانند باعث ایجاد پاسخ‌های تنظیمی و ایجاد سلول‌های T تنظیمی (Treg) شوند [۱۹]. در مطالعه حاضر با توجه به این که DNA میکروبی می‌تواند در مواردی سبب بروز پاسخ تنظیمی شود و وجود اجزای پروتئینی که به برخی از آن‌ها اشاره شد و همچنین پروتئین‌های دیگری که هنوز شناسایی نشده‌اند، احتمالاً اجزای پروتئینی توکسوپلازما گوندی باعث تحریک و افزایش عملکرد DCs در ترشح IL-12 و تکثیر سلول‌های طحالی شده‌اند. در نتیجه اجزای پروتئینی توکسوپلازما در تحریک پاسخ‌های ایمنی به‌ویژه پاسخ‌های تیپ یک مؤثرتر از اجزای اسید نوکلئیکی عمل می‌نمایند. مطالعات آینده می‌تواند با تعیین دقیق‌تر اجزای مؤثر در بخش پروتئینی عصاره توکسوپلازما، به استفاده از این میکروارگانسیم در تقویت عملکرد DCs در القای پاسخ‌های ایمنی تیپ یک از جمله پاسخ‌های ضد توموری کمک نماید.

۵- تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره ۷۰۱۹ به تاریخ ۸۷/۶/۱۲ است.

[۱۴]. در مطالعه حاضر DCs مجاور شده با اجزای پروتئینی بیشترین میزان بروز مولکول‌های کمک محرک را دارند.

مواجهه DCs با بیماری‌زها یا آنتی‌ژن‌ها از طریق گیرنده‌های سطحی مانند TLRها موجب بلوغ DCs شده که این امر برای مهاجرت DCs به بافت‌های لنفاوی، عرضه مناسب آنتی‌ژن به لنفوسیت‌های T و القای پاسخ ایمنی الزامی است [۶، ۷].

اولین بار مینز (Minns) و همکاران نشان دادند که TLR-9 که لیگاند DNA غیرمیتیل‌بکتتری (CpG) باکتریایی است برای ایجاد پاسخ ایمنی در روده بر علیه توکسوپلازما بسیار مهم است و موش‌هایی که در ژن TLR-9 دچار اختلال باشند، دارای نقص در DCs خود بوده و نمی‌توانند پاسخ‌های TH1 در لامینا پروپریا (Lamina propria) ایجاد کنند [۱۰]. TLR-2 و TLR-4 علاوه بر اهمیت در ایجاد پاسخ در برابر بسیاری از عفونت‌های باکتریایی برای ایجاد پاسخ‌های ایمنی بر علیه توکسوپلازما نیز ضروری هستند [۱۲]. واکنش بین TLR-11 روی DCs و توکسوپلازما گوندی باعث تولید IL-12 از DCs موش می‌شود [۱۱]. در این مطالعه میزان ترشح IL-12 و تکثیر سلول‌های طحالی در DCs بالغ شده با اجزای پروتئینی به‌طور معنی‌داری از گروه‌های دیگر بیشتر بود.

در مطالعاتی که به بررسی اثر برخی از اجزای پروتئینی توکسوپلازما پرداخته‌اند نشان داده شده که پروتئین شوک حرارتی ۷۰ (Heat-shock protein 70: HSP70) باعث بلوغ DCs و افزایش مولکول‌های محرک کمکی CD80، CD86، CD40، MHCII و کاهش خاصیت فاگوسیتوز و افزایش قابلیت عرضه آنتی‌ژن در DCs می‌شود [۱۵]. HSP70 از طریق اتصال به TLR-4 باعث بلوغ DCs و افزایش تولید IL-12 می‌شود [۱۶].

۶- منابع

[1] Mashino K, Sadanaga N, Tanaka F, Ohta M, Yamaguchi H, Mori M. Effective strategy of

dendritic cell-based immunotherapy for advanced tumor-bearing hosts: the critical role

- of Th1-dominant immunity. *Mol Cancer Ther* 2002; 1(10): 785-94.
- [2] Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 621-67.
- [3] Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat Immunol* 2001; 2(3): 203-9.
- [4] Svane IM, Soot ML, Buus S, Johnsen HE. Clinical application of dendritic cells in cancer vaccination therapy. *APMIS* 2003; 111(7-8): 818-34.
- [5] Seya T, Akazawa T, Tsujita T, Matsumoto M. Role of Toll-like receptors in adjuvant-augmented immune therapies. *Evid Based Complement Alternat Med* 2006; 3(1): 31-8.
- [6] Re F, Strominger JL. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem* 2001; 276(40): 37692-9.
- [7] Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 2003; 85(2): 85-95.
- [8] Bourguin I, Moser M, Buzoni-Gatel D, Tielemans F, Bout D, Urbain J, Leo O. Murine dendritic cells pulsed in vitro with *Toxoplasma gondii* antigens induce protective immunity in vivo. *Infect Immun* 1998; 66(10): 4867-74.
- [9] Kasper L, Courret N, Darche S, Luangsay S, Mennechet F, Minns L, Rachinel N, Ronet C, Buzoni-Gatel D. *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. *Int J Parasitol* 2004; 34(3): 401-9.
- [10] Minns LA, Menard LC, Foureau DM, Darche S, Ronet C, Mielcarz DW, Buzoni-Gatel D, Kasper LH. TLR9 is required for the gut-associated lymphoid tissue response following oral infection of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 2006; 176(12): 7589-97.
- [11] Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S, Sher A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 2005; 308(5728): 1626-9.
- [12] Mun HS, Aosai F, Norose K, Chen M, Piao LX, Takeuchi O, Akira S, Ishikura H, Yano A. TLR2 as an essential molecule for protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *Int Immunol* 2003; 15(9): 1081-7.
- [13] Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1992; 176(6): 1693-702.
- [14] Barratt-Boyes SM, Watkins SC, Finn OJ. In vivo migration of dendritic cells differentiated in vitro: a chimpanzee model. *J Immunol* 1997; 158(10): 4543-7.
- [15] Kang HK, Lee HY, Lee YN, Jo EJ, Kim JI, Aosai F, Yano A, Kwak JY, Bae YS. *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70 stimulates the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322(3): 899-904.
- [16] Aosai F, Rodriguez Pena MS, Mun HS, Fang H, Mitsunaga T, Norose K, Kang HK, Bae YS, Yano A. *Toxoplasma gondii*-derived heat

- shock protein 70 stimulates maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells via Toll-like receptor 4. *Cell Stress Chaperones* 2006; 11(1): 13-22.
- [17] Aliberti J, Reis e Sousa C, Schito M, Hieny S, Wells T, Huffnagle GB, Sher A. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. *Nat Immunol* 2000; 1(1): 83-7.
- [18] Aliberti J, Valenzuela JG, Carruthers VB, Hieny S, Andersen J, Charest H, Reis e Sousa C, Fairlamb A, Ribeiro JM, Sher A. Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. *Nat Immunol* 2003; 4(5): 485-90.
- [19] Jarnicki AG, Conroy H, Brereton C, Donnelly G, Toomey D, Walsh K, Sweeney C, Leavy O, Fletcher J, Lavelle EC, Dunne P, Mills KH. Attenuating regulatory T cell induction by TLR agonists through inhibition of p38 MAPK signaling in dendritic cells enhances their efficacy as vaccine adjuvants and cancer immunotherapeutics. *J Immunol* 2008; 180(6): 3797-806.