

## The Role of Toll-Like Receptors in CNS Rabies Infection

Sedigheh Ghasemi<sup>1</sup>, Alireza Gholami<sup>2</sup>, Fatemeh Jahanbakhsh<sup>2</sup>, Maryam Fazeli<sup>2</sup>, Shaghayegh Anvari<sup>3</sup>, Amir Ghaemi<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Alanbia Hospital, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Department of Virology, Institute Pasteur of Iran, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Infectious Diseases Research Center, Department of Microbiology, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

### Article Info:

Received: 24 Sep 2015

Accepted: 6 Nov 2015

## ABSTRACT

**Introduction:** Several investigations revealed that the activation of the innate immune system plays a crucial role in the pathogenesis of numerous diseases. The innate immune system activation occurs in response to pathogens or tissue injury via pattern-recognition receptors that recognize pathogen-associated molecular patterns. The innate immune system triggered by these interactions besides the general responses causes a specific response to pathogen. In addition, this pathogen-specific innate response affects the specificity of the adaptive immune response through directing the differentiation of T-cells into functionally distinct subtypes. Although the mechanism(s) by which different Rabies viruses induce differential immune responses are unknown, recent studies indicate that the consequence of rabies virus infection is dependent upon the rapid stimulation of innate and adaptive immunity. The responses prevent viral entry into the central nervous system (CNS), where it can escape immunity. Laboratory strains that reach the CNS can be cleared and this has obviously happened in individuals with rabies. Thus, during rabies virus infection, pattern-recognition receptors of rabies can be recognized in the periphery and the CNS. **Conclusion:** To study these possibilities, the consequence of rabies infection in mice lacking adaptor myeloid differentiation factor 88 (MyD88) was demonstrated. Toll-like receptors (TLRs) signals, except for TLR3, activate proinflammatory reaction via the adaptor protein MYD88. Only mice lacking TLR7 displayed a marked mortality compared with MyD88 negative and control mice with deficits in both the development of peripheral immunity and rabies virus clearance from the CNS. The review demonstrated that TLR7 plays a vital role in controlling and directing of immune response against the rabies virus.

### Key words:

1. Rabies virus
2. Central Nervous System
3. Toll-Like Receptors
4. Immunity

\* **Corresponding Author:** Amir Ghaemi

E-mail: ghaem\_amir@yahoo.com

## نقش گیرنده‌های شبه تول در عفونت سیستم عصبی مرکزی هاری

صدیقه قاسمی<sup>۱</sup>، علیرضا غلامی<sup>۲</sup>، فاطمه جهانبخش<sup>۲</sup>، مریم فاضلی<sup>۲</sup>، شقایق انوری<sup>۲</sup>، امیر قائمی<sup>۳\*</sup>

<sup>۱</sup>مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم الانبیاء، تهران، ایران

<sup>۲</sup>گروه ویروس شناسی، انیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

<sup>۳</sup>مرکز تحقیقات عفونی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

### اطلاعات مقاله:

تاریخ پذیرش: ۱۵ آبان ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: ۲ مهر ۱۳۹۴

### چکیده

**مقدمه:** مطالعات متعددی نشان داده‌اند که فعالسازی سیستم ایمنی ذاتی نقش مهمی در بیماری‌زایی بیماری‌های فراوانی ایفاء می‌کند. فعالسازی سیستم ایمنی ذاتی در پاسخ به عوامل بیماری‌زا یا آسیب بافتی از طریق گیرنده‌های شناساگر الگو رخ می‌دهد که الگوهای مولکولی مرتبط با عامل بیماری‌زا را شناسایی می‌کند. سیستم ایمنی ذاتی که توسط این فعل و انفعالات تحریک می‌شود در کنار پاسخ‌های عمومی موجب یک پاسخ اختصاصی در برابر عامل بیماری‌زا می‌شود. به‌علاوه این پاسخ ذاتی اختصاصی عامل بیماری‌زا بر اختصاصیت پاسخ ایمنی اکتسابی از طریق هدایت تمایز سلول‌های T به زیرگونه‌هایی که از نظر عملکردی متفاوت می‌باشند تأثیر می‌گذارد. اگرچه مکانیسم‌هایی که توسط ویروس‌های هاری متفاوت سبب القاء پاسخ‌های ایمنی متفاوت می‌شوند شناخته نشده‌اند، مطالعات اخیر نشان می‌دهد که نتیجه عفونت ویروس هاری وابسته به تحریک سریع ایمنی ذاتی و اکتسابی است. پاسخ‌ها از ورود ویروس به سیستم عصبی مرکزی در جایی که آن می‌تواند از ایمنی فرار کند جلوگیری می‌کنند. سویه‌های آزمایشگاهی که به سیستم عصبی مرکزی می‌رسند می‌تواند پاک شود و این به طور وضوح در افراد مبتلا به هاری رخ می‌دهد. بدین ترتیب در طی عفونت ویروس هاری، گیرنده‌های شناسایی الگوی هاری را می‌توان در سیستم عصبی مرکزی و محیطی شناخت. **نتیجه‌گیری:** به‌منظور مطالعه این احتمالات، نتیجه عفونت هاری در موش فاقد آداپتور میلونیدی تمایز یافته فاکتور ۸۸ (MyD88) نشان داده شد. سیگنال‌های گیرنده‌های شبه تول بجز TLR3 واکنش‌های پیش التهابی را از طریق پروتئین آداپتور MyD88 فعال می‌نمایند. تنها موش فاقد TLR7 مرگ و میر قابل توجهی را در مقایسه با موش فاقد MyD88 و موش کنترل با نقص در هر دو توسعه ایمنی محیطی و پاکسازی ویروس هاری از سیستم عصبی مرکزی نشان داد. بررسی نشان داد که TLR7 نقش حیاتی در کنترل و هدایت پاسخ ایمنی علیه ویروس هاری دارد.

### کلید واژه‌ها:

۱. ویروس هاری
۲. سیستم عصبی مرکزی
۳. گیرنده‌های شبه تول
۴. ایمنی

\* نویسنده مسئول: امیر قائمی

آدرس الکترونیکی: ghaem\_amir@yahoo.com

## مقدمه

و هیالورونیک اسید نیز شناسایی شده‌اند (۹-۶). خلاصه‌ای از TLRs و لیگندهای بیرونی<sup>۱</sup> در جدول ۱ آمده است.

## مولکول‌های آداپتور و مسیرهای داخل سلولی

زمانی که لیگاند به ناحیه خارجی گیرنده‌های TLR متصل می‌شود، مسیرهای پیام‌رسانی<sup>۱۱</sup> از طریق دومین TIR با مولکول‌های آداپتور آغاز می‌شود که در نهایت منجر به فعال شدن فاکتورهای هسته‌ای و تولید سایتوکین‌های پیش التهابی می‌شود. مولکول‌های آداپتور شامل: میلوئید تمایز یافته فاکتور ۸۸ (MyD88)<sup>۱۲</sup>، MyD88 شبه آداپتور (MAL)<sup>۱۳</sup> یا دومین TIR محتوی پروتئین آداپتور (TIRAP)<sup>۱۴</sup>، دومین TIR محتوی آداپتور القاء کننده اینترفرون بتا (TRIF)<sup>۱۵</sup> یا دومین TIR محتوی مولکول ۱ (TICAM-1)<sup>۱۶</sup> و TIR محتوی پروتئین (TIRP)<sup>۱۷</sup> یا مولکول آداپتور وابسته به TRIF (TRAM)<sup>۱۸</sup> می‌باشد (۷، ۴).

مسیر وابسته به MyD88 منجر به فعالیت فاکتورهای هسته‌ای NFκB<sup>۱۹</sup> و پروتئین فعال کننده ۱ (AP1)<sup>۲۰</sup>، و تولید IL-6، IL-1، IL-10، IL-12 و TNF-α<sup>۲۱</sup> شده و مسیر غیر وابسته به MyD88 منجر به فعالسازی فاکتور تنظیمی اینترفرون (IRF)<sup>۲۲</sup> و تولید اینترفرون نوع یک می‌شود. نوع پاسخ‌های ایمنی القاء شده، با دو عامل نوع میکروب و محل قرار گرفتن TLR ارتباط دارد (۴-۱).

اینترفرون‌ها عوامل ضد ویروسی قوی هستند؛ به طوری که آن‌ها عمدتاً در پی تشخیص و شناسایی ماده ژنتیکی ویروس‌ها توسط TLR های داخل سلولی آزاد می‌شوند که این واکنش در اندولیزوم رخ می‌دهد. از سویی دیگر TLR های سطحی، میکروب‌های خارج سلولی را شناسایی کرده و پاسخ سایتوکینی را به‌منظور ایجاد یک پاسخ ضد باکتریایی/انگلی القاء می‌کنند (۱۱، ۶).

TLR-3 می‌تواند در یک مسیر وابسته به TRIF (مستقل از MyD88) دخیل باشد که در نهایت در طی آن فاکتور رونویسی IRF فعال شده که باعث تحریک ژن‌های اینترفرون نوع ۱ (IFN-α و IFN-β) می‌شود و ژن‌های القاگر اینترفرون که سبب کد کردن کموکین‌هایی مانند RANTES<sup>۲۳</sup> (CCL5)<sup>۲۴</sup> و IL-6 می‌شود را رمزگذاری می‌کند (۱۱، ۷).

TLR-7 و TLR-9 از مسیر MyD88-TRIF استفاده می‌کنند که در نهایت IRF را فعال کرده که به همین ترتیب بیان ژن‌های اینترفرون نوع یک و ژن‌های القایی اینترفرون را کنترل می‌کنند. در میان گیرنده‌های شبه تول، TLR-4 به دلیل هدایت، سیگنالی منحصر به فرد می‌باشد. این گیرنده قادر است

گیرنده‌های شبه تول (TLRs)<sup>۱</sup> همولوگ پستانداران از گیرنده‌های تول مگس سرکه<sup>۲</sup> هستند. گیرنده‌های تول ابتدا در پشه میوه کشف شدند. ابتدا گیرنده شماره ۱۰ (TR1-10)<sup>۳</sup> و سپس سایر گیرنده‌ها به طور کامل شناسایی شدند (۲، ۱). بعدها گیرنده‌های مشابهی در پستانداران به اسم گیرنده‌های شبه تول شناسایی شدند. مشخص شده که همه این گیرنده‌ها در ایمنی ذاتی نقش دارند. گیرنده‌های شبه تول در انواع سلول‌های ایمنی از جمله ماکروفاژها، سلول‌های دندریتیک (DCs)<sup>۴</sup>، ماست سل‌ها، سلول‌های کشنده طبیعی (NK)<sup>۵</sup> مونوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها، بازوفیل‌ها، سلول‌های T تنظیمی<sup>۶</sup> و همین‌طور سلول‌های تنفسی، روده‌ای، اپی تلیال و اندوتلیال وجود دارند.

تاکنون ۱۱ گیرنده شبه تول در پستانداران شناسایی شده است. آن‌ها گلیکوپروتئین‌های غشایی هستند که هم در سطح سلول و هم در درون وزیکول‌های درون سلولی بیان می‌شوند. گیرنده شبه تول شماره ۱۱، ۱۰، ۶، ۵، ۴، ۲، ۱ در سطح سلول و گیرنده شماره ۹، ۸، ۷، ۳ در قسمت اندوزوم / لیزوزوم قرار دارند. TLRs اعضای خانواده بزرگ گیرنده‌های تول / اینترلوکین ۱ (IL-1)<sup>۷</sup> هستند و دارای ۲ دومین با اهمیت می‌باشند: ۱- بخشی که یک آنتی‌ژن خارجی مشخص مسئول باند شدن لیگاند می‌باشد و شامل ۲۵-۱۹ موتیف تکراری لوسین است. ۲- باقیمانده سیتوپلاسمی تول / اینترلوکین ۱ است که شامل ۲۰۰ آمینواسید حفاظت شده در میان تمام TLRs می‌باشد. این دو دومین به وسیله یک سیگنال درون غشایی هلیکس به هم متصل می‌شوند (۶-۳).

## لیگندهای TLR یا الگوهای مولکولی مربوط به پاتوژن‌ها

PAMPs<sup>۸</sup> می‌توانند بر اساس ترکیب شیمیایی دسته‌بندی شوند: لیگندهای حاوی چربی، پروتئین و نوکلئیک اسید. همچنین تعدادی از لیگندهای درونی<sup>۹</sup> شامل پروتئین‌های شوک حرارتی

جدول ۱- خلاصه‌ای از TLR های شناخته شده در پستانداران.

منابع	TLRs	PAMPs
۱۰	۱، ۲، ۶	لیپو پروتئین‌های باکتریایی، لیپو پپتیدها
۸	۴	لیپو پلی ساکراید
۱۱، ۱۲	۳	RNA دو رشته‌ای
۱۳	۷، ۸	RNA تک رشته‌ای
۱۴	۹	DNA دارای جزایر CpG غیر متیله
۱۵	۵	فلاژلین
۳، ۴	۱۱	پروپیلین

<sup>۱۴</sup> Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein

<sup>۱۵</sup> TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β

<sup>۱۶</sup> Toll-like receptor adaptor molecule 1

<sup>۱۷</sup> TIR domain-containing adapter protein

<sup>۱۸</sup> TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β

<sup>۱۹</sup> Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

<sup>۲۰</sup> Activator protein 1

<sup>۲۱</sup> Tumor necrosis factor alpha

<sup>۲۲</sup> Interferon regulatory factor

<sup>۲۳</sup> Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted

<sup>۲۴</sup> Chemokine (c-c motif) ligand 5

<sup>۱</sup> Toll like receptors

<sup>۲</sup> Drosophila melanogaster

<sup>۳</sup> Toll receptors

<sup>۴</sup> Dendritic cells

<sup>۵</sup> Natural killer cell

<sup>۶</sup> Regulatory T cell

<sup>۷</sup> Interleukin-1

<sup>۸</sup> Pathogen-associated molecular patterns

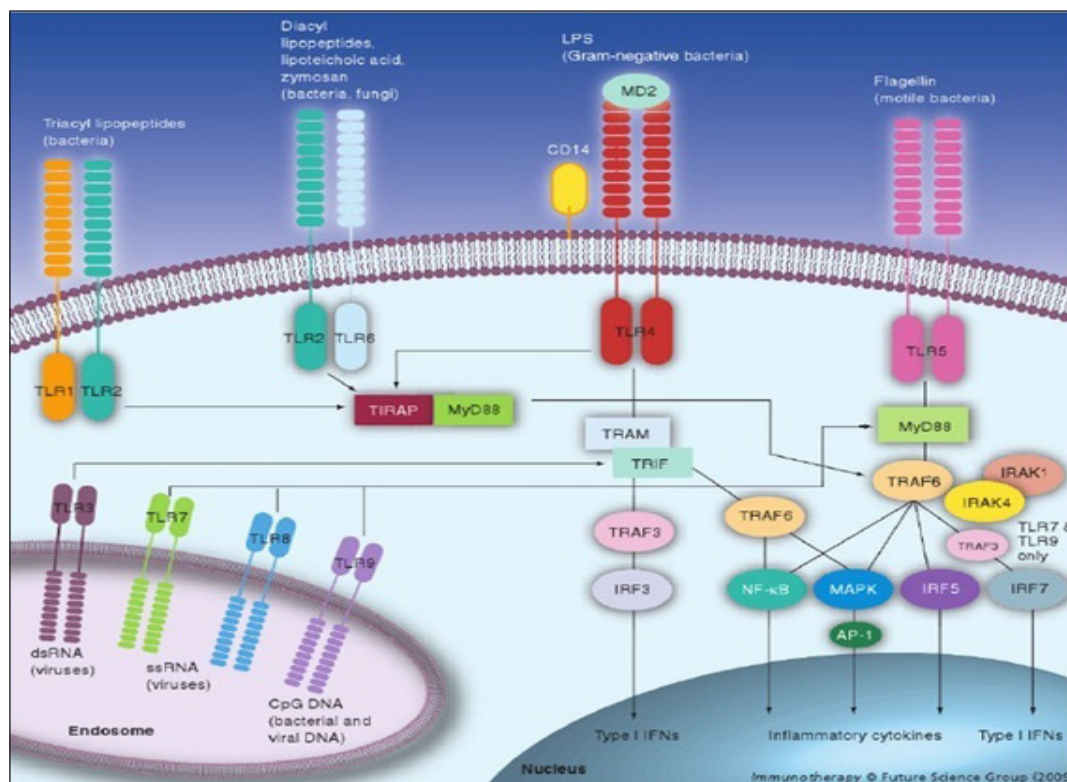
<sup>۹</sup> Endogenous

<sup>۱۰</sup> Exogenous

<sup>۱۱</sup> Signaling

<sup>۱۲</sup> Myeloid differentiation primary response gene 88

<sup>۱۳</sup> MyD88-adaptor-like



تصویر ۱- مسیرهای پیام‌رسانی TLR. گیرنده‌های شبه‌تول، محصولات میکروبی و لیگندهای داخلی را شناسایی نموده و به دنبال دایمر شدن گیرنده، مسیرهای پیام‌رسانی شکل گرفته و راه اندازی می‌شوند. همه TLR ها به غیر از TLR-3 از مسیر MyD88 عمل نموده، درحالی‌که TLR-3 از طریق آداپتور TRIF عمل می‌کند، در نهایت فعال شدن گیرنده‌های مذکور سبب القای سایتوکین‌های التهابی و تولید اینترفرون‌ها می‌شود (۱۶).

از طریق مسیر اتوفژی، اندوزوم‌ها را هدف قرار دهند (۱۳). به‌علاوه TLR-2 و TLR-4 ممکن است در القای ایمنی ضد ویروس‌های از طریق تشخیص اجزای سلولی میزبان مانند پروتئین‌های شوک حرارتی (که در زمان این عفونت ایجاد می‌شوند) مشارکت کنند (۱۰).

#### بیماری‌های در موش دارای نقص MYD88

در موش بدون MYD88 (یک پروتئین آداپتور که در تمامی مسیرهای پیام‌رسانی گیرنده‌ها بجز TLR-3 دخالت دارد) (۲۱-۲۰)، یک نقص ایمنی به وجود می‌آید که سبب عدم توانایی در توسعه پاسخ  $Th1$  می‌شود (۲۳، ۲۲). در نتیجه، پاسخ به آلودگی با ویروس‌های تخفیف حدت یافته، محدود به تولید آنتی‌بادی‌های ایمونوگلوبولین G1 (IgG1)  $^{28}$  و ایمونوگلوبولین G2b (IgG2b) است.

موش فاقد MYD88، به دنبال عفونت داخل مغزی با واکسن TriGAS زنده می‌ماند که این در حقیقت یک واکسن بسیار ضعیف شده از ویروس‌های می‌باشد که سه نسخه از ژن گلیکوپروتئین‌های ویروسی را بیان می‌کند و برای موش ۵ روزه، غیر بیماری‌زا می‌باشد. با این حال، برخلاف گروه‌های کنترل، موش MYD88 منفی در برابر تزریق داخل مغزی با ترکیبی از TriGAS و ویروس‌های بدخیم (با منشأ سگی) از پای در می‌آید (۲۴).

هر دو مسیر سیگنالی MyD88 و TRIF-dependent را القاء کند (۱۲-۷، تصویر ۱)

نقش گیرنده‌های شبه‌تول در عفونت‌زایی ویروس‌های به تازگی در حال بررسی می‌باشد. یافته‌های اولیه نشان داد که یک رده سلولی  $^{25}$  نورو انسانی دارای TLR-3، به دنبال آلودگی با ویروس‌های تحت شرایط آزمایشگاهی سبب افزایش بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی ذاتی می‌شود (۱۷) و بیان TLR-3 در سلول‌های پورکیتر انسانی، هنگام آلودگی با این ویروس بالا می‌رود (۱۸). اخیراً TLR-3 به‌عنوان بخشی از اجسام نگری  $^{26}$  (اجزای سلولی مشخصه بیماری‌های هاری) شناخته شده است. مطالعات در موش‌های فاقد TLR-3 نیز این فرضیه را قوت بخشیده که ممکن است TLR-3 در بیماری‌زایی هاری نقش داشته باشد (۱۹).

از منظر القاء ایمنی محافظتی ضد ویروسی، بعید است که TLR-3 به‌عنوان یک سنسور dsRNA در عفونت ویروس‌های فعال باشد. این ویروس از یک الگوی RNA منفی پوشیده شده با آنزیم همانندسازی کننده برای تولید mRNAs یا RNAs ژنومی بهره می‌برد که سبب عدم تشکیل dsRNAs می‌شود. با این حال TLR-7 در موش و TLR-8 و TLR-7 در انسان احتمالاً در طی آلودگی با ویروس‌های از طریق باند شدن با RNA تک رشته ویروسی فعال می‌شوند، که ممکن است

<sup>25</sup> Cell line

<sup>26</sup> Negri bodies

<sup>27</sup> T helper cells 1

<sup>28</sup> Immunoglobulin G1



مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد، ظهور پاسخ خنثی‌سازی آنتی بادی علیه ویروس هاری در موش TLR-7 منفی، در مقایسه با موش‌های کنترلی نرمال به تأخیر افتاد.

زمانی که پاسخ هومورال ظاهر می‌شود، موش‌های عفونی شده با TLR-7 منفی تفاوت قابل ملاحظه‌ای با موش نرمال از نظر آنتی بادی اختصاصی ویروس ایزوتیپ IgG1 دارد و این امر نشان دهنده تمایل بیشتر پاسخ‌ها در موش نرمال به سمت Th2 است. اگرچه، ده روز بعد از عفونت، در موش‌های فاقد TLR-7، تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی ویروس هاری از ایزوتیپ‌های IgG2a و IgG2b رو به تزاید می‌گذارد و به سطح نمونه‌های کنترل نزدیک می‌شود. در نتیجه این فرضیه مطرح می‌شود که به کارگیری TLR-7 به منظور القاء منظم فرایندهایی که منجر به پاسخ اختصاصی هاری می‌شوند اهمیت دارند و تأخیر به علت عدم حضور TLR-7، منجر به گسترش وسیع‌تر ویروس در CNS<sup>29</sup> شده و بیماری‌زایی ویروس را افزایش می‌دهد (۲۷).

#### مشارکت پیام‌رسانی TLR-7 برای کنترل پخش ویروس هاری در CNS و پاکسازی از بافت‌های سیستم اعصاب مرکزی

هدف اولیه پاسخ‌های ایمنی-درمانی اختصاصی علیه ویروس هاری، جلوگیری از پخش شدن ویروس در CNS می‌باشد. یک تأخیر در القای ایمنی ذاتی و اکتسابی در بخش محیطی ممکن است باعث دستیابی بیشتر ویروس به CNS شود. به محض آن که ویروس وارد بافت‌های CNS می‌شود، راهبردهای<sup>30</sup> ایمنی ذاتی و اکتسابی بیشتری برای پاکسازی آن مورد نیاز است. این راهبردها شامل: تولید سایتوکین‌های پیش التهابی و کموکاین‌ها توسط بافت‌های عفونی (۲۸) و تغییرات سلول‌های ایمنی ذاتی و سلول‌های دندریتیک در سطح سد خونی مغزی (BBB)<sup>31</sup> می‌باشد که سبب تسهیل ورود ایمنی به درون بافت اعصاب مرکزی و در نهایت تولید آنتی بادی در پارانشیم CNS می‌شود (۲۹، ۳۰).

به‌عنوان یک پیامد توسعه آرام ایمنی اختصاصی علیه ویروس هاری در بخش محیطی، انتظار می‌رود که انتشار ویروس هاری از محیط به CNS در موش‌های فاقد TLR-7 افزایش یابد. هر چند این مسئله محتمل است که پیام‌رسانی TLR-7 شامل شناسایی ویروس در CNS و القای مکانیسم‌های ایمنی ذاتی نیز در پاکسازی بافت‌های CNS از ویروس مشارکت داشته باشد. ۱۴ روز بعد از عفونت SNBG سطوح نوکلئوپروتئین mRNA در ویروس هاری به طور قابل ملاحظه‌ای در بافت‌های CNS موش‌های TLR-7 منفی نسبت به موش‌های C57BL/6 بیشتر می‌شود که این امر نشان دهنده این است که پخش شدن یا همانندسازی در بافت‌های CNS در موش‌های نرمال بهتر کنترل می‌شود. در همین زمان سطوح اینترفرون گاما mRNA، به طور قابل ملاحظه‌ای در CNS موش‌های TLR-7 منفی بیشتر است که این مطلب نشان دهنده این است که پروسه‌های مسئول تجمع عوامل ایمنی در بافت‌های CNS ممکن است تحت تأثیر قرار نگرفته باشند (۲۹).

برای بررسی این که آیا کاهش توانایی پاکسازی ویروس در برابر عفونت ترکیبی ممکن است نتیجه تمایل ایمنی به سمت Th2 یا نبود پیام‌رسانی TLR باشد، مطالعه‌ای طراحی شد که در طی آن عفونت در موش‌های دارای نقص در تولید سلول‌های Th1 که البته در پیام‌رسانی TLR نقصی نداشتند مورد بررسی قرار گرفتند.

در موش دارای نقص در تولید سلول‌های Th1 ثابت شده است که در برابر تزریق داخل مغزی ترکیب TriGAS و ویروس هاری بدخیم سگی حساس می‌باشد. با این حال این موش‌ها، از عفونت داخل عضلانی با ویروس هاری نوترکیب SNBG که برای موش‌های MyD88 منفی کشنده است، بهبود می‌یابند. SNBG یک ویروس با منشأ ویروس هاری خفاش می‌باشد که در نتیجه دارای بیماری‌زایی متوسط است که سبب یک عفونت کشنده در درصد کمی (۲۰٪) از موش‌های نژاد وبستر پس از تلقیح داخل عضلانی می‌شود (۲۵). این نتایج نشان می‌دهد که نبود پیام‌رسانی وابسته به MyD88 نسبت به نقص در پاسخ Th1 ممکن است باعث عوارض شدیدتر میزبان در برابر ویروس هاری شود.

#### نقش TLR 7 در پاسخ میزبان به عفونت هاری

اصلی‌ترین TLR وابسته به MyD88، که دارای قابلیت بیشتری برای تشخیص RNA ویروس هاری می‌باشد TLR-7 است، که گیرنده انتقال RNA تک رشته‌ای به درون اندوزوم را تشخیص می‌دهد. به‌علاوه، TLR-2 و TLR-4 ممکن است از طریق تشخیص محصولات سلول‌های عفونی مانند پروتئین‌های شوک حرارتی در ایجاد پاسخ میزبان به هاری شرکت داشته باشند. به‌منظور اثبات این که آیا نقش این TLR ها در پاسخ میزبان به هاری، دارای عملکرد محافظتی یا پاتولوژیکی است، ما موش‌های فاقد TLR-7، TLR-2، TLR-4 یا TLR-2 و TLR-9 را توسط ویروس SNBG که برای موش‌های فاقد MyD88 بیماری‌زا و برای موش‌های نرمال اثر بیماری‌زایی ندارند، به صورت داخل عضلانی عفونی کردیم. فقط موش‌های TLR-7 منفی، یک فنوتیپ متفاوت از حیوانات نرمال با مرگ و میر ۶۰٪ را نشان دادند.

به‌علاوه مشخص گردید که موش‌های فاقد گیرنده اینترفرون نوع ۱ که به MyD88 برای سیگنال‌دهی وابسته هستند و همچنین موش‌های فاقد گیرنده اینترفرون آلفا و بتا حساسیت بالاتری برای ابتلاء به عفونت SNBG ندارند. این مشاهدات، پیشنهاد می‌کند که فعالیت TLR-9، TLR-4، TLR-2۰ در عفونت ویروس هاری نمی‌تواند سیگنال‌دهی TLR-7 را جبران نماید و این که نقص در کنترل عفونت ویروس هاری در عدم حضور پیام‌رسانی TLR-7 در اثر کاهش تولید IL-1 یا اینترفرون نوع ۱ نمی‌باشد (۲۶).

به‌منظور نشان دادن این مسئله که آیا قابلیت و توانایی متوسط موش‌های فاقد TLR-7 نسبت به موش‌های نرمال و موش‌های MyD88 منفی در برابر عفونت با SNBG، منشأ گرفته از یک پاسخ متمایل به سمت Th2 یا یک نقص در تشخیص زودرس ویروس می‌باشد، روند توسعه پاسخ آنتی بادی در موش‌های عفونی شده با TLR-7 منفی و موش‌های نرمال C57BL/6 مورد

<sup>29</sup> Central nervous system

<sup>30</sup> Strategies

<sup>31</sup> Blood-brain barrier

گونه‌های<sup>۳۲</sup> مختلف هاری (۳۵) میزان بیان TLR-7 متغیر می‌باشد (۳۲). یک پدیده شناخته شده در مورد هاری این مسئله است که گونه‌هایی که سطح بالایی از گلیکوپروتئین را بیان می‌کنند سیتوتوکسیک هستند که سبب القای ایمنی بیشتر و بیماری‌زایی کمتر می‌شوند که به نظر می‌رسد این مسئله به دلیل فعالیت اتوفاژی و فعال شدن TLR-7 باشد که ممکن است منجر به عفونت سلول هدف گردد که در نهایت منجر به مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در بعضی از انواع سلول‌ها می‌شود که همچنین با افزایش فعالیت ایمنی ذاتی و عرضه آنتی‌ژن همراه است.

تفاوت در توانایی TLR-7 برای تشخیص عفونت با ویروس‌های هاری ضعیف شده یا بیماری‌زا، انعکاس دهنده میزان پاسخ ایمنی ذاتی CNS می‌باشد. سطح کمتر تولید برخی کموکاین‌ها در بافت‌های CNS موش آلوده شده با گونه‌های بیماری‌زا در مقایسه با ویروس‌های هاری ضعیف شده، نشان داده شده است (۳۶). به علاوه عملکرد BBB مورد نیاز برای ورود عوامل ایمنی به CNS توسط عفونت با ویروس‌های ضعیف شده بسیار بیشتر از گونه‌های بیماری‌زا القا می‌شوند (۲۷). بنابراین به نظر می‌رسد که القای متفاوت پیام‌رسانی TLR-7 ممکن است سبب تفاوت در پاسخ‌های ایمنی ذاتی در برابر ویروس‌های هاری شود.

### نتیجه‌گیری

این یافته که TLR-7 نقش مهمی در کنترل و القاء ایمنی به سمت پاسخ‌های ایمنی سلولی در برابر ویروس‌های هاری ایفاء می‌کند در حوزه واکسیناسیون علیه این ویروس بسیار حائز اهمیت می‌باشد. درگیری TLR-7، وابسته به انتقال RNA ویروسی به بخش اندوزومی می‌باشد که این مسئله با واکنش‌های غیرفعال که در آن‌ها RNA ویروس با پروتئین پوشیده شده است، غیر محتمل می‌باشد. از این رو یافته‌هایی که به نقش تشخیص TLR-7 در توسعه پاسخ‌های حفاظتی می‌پردازد پیش‌بینی می‌کنند که عفونت سلول‌های ارائه‌گر آنتی‌ژن یعنی سلول‌های دندریتیک و مونوسیت‌ها (۳۱) در این فرایند نقش ایفاء می‌کنند.

در حقیقت ایمن سازی موش‌های نرمال با ویروس هاری ضعیف شده سبب تحریک تولید آنتی بادی‌های مشخصه پاسخ ایمنی سلولی می‌شود، درحالی‌که واکسیناسیون با ویروس غیرفعال یک الگوی ایمنی همورال را فعال می‌کند (۳۰). همان گونه که نشان داده شد پاسخ ایمنی در برابر عفونت هاری ضعیف شده در موش‌های فاقد TLR-7 گرایش به سمت ایمنی همورال دارد. قبلاً نیز این مسئله نشان داده شد که پاکسازی ویروس‌های از سیستم اعصاب مرکزی مستلزم وجود ایمنی سلولی می‌باشد (۳۸، ۳۷). بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که پیام‌رسانی TLR-7 در القای پاسخ‌های منظم با توانایی پاکسازی ویروس‌های از بافت‌های سیستم اعصاب مرکزی نقش کلیدی ایفاء می‌نماید.

با این حال، این احتمال وجود دارد که نقص یا تأخیر در پاسخ‌های ایمنی در سیستم اعصاب مرکزی در برابر ویروس هاری در موش‌های فاقد TLR-7 که در نهایت منجر به بقای یک سوم موش‌ها در اثر تزریق داخل مغزی با ترکیب TriGAS و ویروس سگی می‌شود نشان دهنده تفاوت پاسخ‌های موش‌های فاقد TLR-7 در برابر چالش درون مغزی و چالش درون عضلانی می‌باشد و این احتمال را مطرح می‌کند که تزریق درون عضلانی با ویروس واکسن هاری ضعیف شده، اثر آشکاری روی TLR-7 منفی یا TLR-7 C57BL/6 ندارد و اکثر نمونه‌ها در برابر دوز کشنده ویروس سگی تا ۱۴ روز بعد محافظت می‌شوند.

وقتی که موش‌های واکسینه در برابر یک چالش عضلانی کشنده، در معرض تزریق داخل مغزی با سویه سگی قرار می‌گیرند، یک الگوی متفاوت نمایان می‌شود. به طوری که تمام موش‌های C57BL/6 نرمال، زنده می‌مانند و حداکثر چهل درصد موش‌های فاقد TLR-7، در برابر تزریق داخل مغزی از بین می‌روند. از این رو حضور یک پاسخ ایمنی که برای حفاظت در مقابل چالش عضلانی کافی است در موش‌های TLR-7 منفی نمی‌تواند در مقابل یک چالش داخل مغزی محافظت ایجاد نماید. این امر نشان دهنده این است که فرایندهای با واسطه TLR-7، ممکن است در ارسال عوامل ایمنی به درون CNS، مشارکت داشته باشد. TLR-7 توسط برخی سلول‌های CNS شامل: آستروسیت‌ها، میکروگلیا و نورون‌ها بیان می‌شوند (۳۱) و به کارگیری آگونیست امیکویمود TLR-7 در مغز نوزادان موش، سبب بیان  $TNF-\alpha$ ، اینترفرون بتا و سایتوکین‌های پیش التهابی CXCL10<sup>۳۲</sup> و CCL2 می‌شود (۳۳، ۳۲). این تصور وجود دارد که تشخیص RNA ویروس توسط TLR-7 در ایجاد مکانیسم‌های حفاظت ایمنی CNS، حین عفونت ویروس هاری اهمیت دارد و این محافظت از طریق اثرات ضد ویروسی اینترفرون نوع ۱ با تسهیل تولید فاکتورهای ایمنی که وارد مغز می‌شوند، انجام می‌شود.

### TLR-7 و بیماری‌زایی وارینت‌های مختلف ویروس هاری

در عدم حضور TLR-7، سویه‌های خاصی از هاری، بیماری‌زاتر هستند و روش‌های واکسیناسیون هاری کمتر مؤثرند. این مفهوم که TLR-7 سنسور مهمی برای عفونت ویروس هاری می‌باشد توسط این مسئله تأیید شده که سویه‌های هاری بیماری‌زاتر به اندازه سویه‌های ضعیف شده، TLR-7 را تحریک نمی‌کنند. جنبه‌های متعددی از عفونت ویروس‌های هاری بیماری‌زا وجود دارد که ممکن است سبب کاهش پیام‌رسانی TLR-7 شود. از آن جمله می‌توان کاهش میزان همانندسازی اکثر ویروس‌های بیماری‌زای هاری را نام برد (۳۴) که منجر به کاهش تشخیص TLR-7 می‌شود.

به علاوه، بسته به نوع سلول‌های عفونی در CNS توسط

<sup>۳۲</sup> C-X-C motif chemokine 10

<sup>۳۳</sup> Strain

1. Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med.* 2007; 13(5): 552-9.
2. Romagne F. Current and future drugs targeting one class of innate immunity receptors: the toll-like receptors. *Drug Discov Today.* 2007; 12(1-2): 80-7.
3. Rezaei N. Therapeutic targeting of pattern-recognition receptors. *Int Immunopharmacol.* 2006; 6(6): 863-9.
4. Pandey S, Agrawal DK. Immunobiology of toll-like receptors: emerging trends. *Immunol Cell Biol.* 2006; 84(4): 333-41.
5. Gearing AJ. Targeting toll-like receptors for drug development: a summary of commercial approaches. *Immunol Cell Biol.* 2007; 85(6): 490-4.
6. Miyake K. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface toll-like receptors. *Semin Immunol.* 2007; 19(1): 3-10.
7. Chen K, Huang J, Gong W, Iribarren P, Dunlop NM, Wang JM. Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer. *Int Immunopharmacol.* 2007; 7(10): 1271-85.
8. Mata-Haro V, Cekic C, Martin M, Chilton PM, Casella CR, Mitchell TC. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science.* 2007; 316(5831): 1628-32.
9. Sajadian A, Tabarraei A, Soleimanjahi H, Moradi A, Fotouhi F, Gorji A, et al. Comparing the effect of Toll-like receptor agonist adjuvants on the efficiency of the DNA vaccine. *Arch Virol.* 2014; 159(8): 1951-60.
10. Prosniak M, Hooper DC, Dietzschold B, Koprowski H. Effect of rabies virus infection on gene expression in mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(5): 2758-63.
11. Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R. TRAM couples endocytosis of toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol.* 2008; 9(4): 361-8.
12. Ghaemi A, Sajadian A, Khodaie B, Lotfinia A, Lotfinia M, Aghabarari A, et al. Immunomodulatory effect of Toll-like receptor-3 ligand poly I:C on cortical spreading depression. *Mol Neurobiol.* 2014; 53(1): 143-54.
13. Delgado M, Singh S, DeHaro S, Master S, Ponpuak M, Dinkins C, et al. Autophagy and pattern recognition receptors in innate immunity. *Immunol Rev.* 2009; 227(1): 189-202.
14. Togha M, Jahanshahi M, Alizadeh L, Jahromi SR, Vakilzadeh G, Alipour B, et al. Rapamycin augments immunomodulatory properties of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Neurobiol.* 2016; 12: 1-13.
15. Gableh F, Saeedi M, Hamdi K, Gorji A, Ghaemi A. Combination of the Toll like receptor agonists and  $\alpha$ -galactosylceramide as an efficient adjuvant for cancer vaccine. *J Biomed Sci.* 2016; 25(23):16. doi: 10.1186/s12929-016-0238-3.
16. Adams S. Toll-like receptor agonists in cancer therapy. *Immunotherapy.* 2009; 1(6): 949-64.
17. Menager P, Roux P, Megret F, Bourgeois JP, Le Sourd AM, Danckaert A, et al. Toll-like receptor 3 (TLR3) plays a major role in the formation of rabies virus Negri bodies. *PLoS Pathog.* 2009; 5(2): 5:e1000315. doi: 10.1371/journal.ppat.1000315.
18. Jackson AC, Rossiter JP, Lafon M. Expression of Toll-like receptor 3 in the human cerebellar cortex in rabies, herpes simplex encephalitis, and other neurological diseases. *J Neurovirol.* 2006; 12(3): 229-34.
19. Lahaye X, Vidy A, Pomier C, Obiang L, Harper F, Gaudin Y, et al. Functional characterization of Negri bodies (NBs) in rabies virus-infected cells: evidence that NBs are sites of viral transcription and replication. *J Virol.* 2009; 83(16): 7948-58.
20. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4: 499-511.
21. Kopp E, Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol.* 2003; 15(4): 396-401.
22. Akira S. The role of IL-18 in innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2000; 12(1): 59-63.
23. Scanga CA, Bafica A, Feng CG, Cheever AW, Hieny S, Sher A. MyD88- deficient mice display a profound loss in resistance to mycobacterium tuberculosis associated with partially impaired Th1 cytokine and nitric oxide synthase 2 expression. *Infect Immun.* 2004; 72(4): 2400-4.
24. Faber M, Li J, Kean RB, Hooper DC, Alugupalli KR, Dietzschold B. Effective preexposure and postexposure

prophylaxis of rabies with a highly attenuated recombinant rabies virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106(27): 11300-5.

25. Pulmanausahakul R, Li J, Schnell MJ, Dietzschold B. The glycoprotein and the matrix protein of rabies virus affect pathogenicity by regulating viral replication and facilitating cell-to-cell spread. *J Virol*. 2008; 82(5): 2330-8.

26. Detrick B, Hamilton RG, Folds JD. *Manual of molecular and clinical laboratory immunology*. 7<sup>th</sup> ed. Amer Society for Microbiology. 2006. P. 791-7.

27. Roy A, Phares TW, Koprowski H, Hooper DC. Failure to open the blood-brain barrier and deliver immune effectors to central nervous system tissues leads to the lethal outcome of silver-haired bat rabies virus infection. *J Virol*. 2007; 81(3): 1110-8.

28. Phares TW, Kean RB, Mikheeva T, Hooper DC. Regional differences in blood-brain barrier permeability changes and inflammation in the apathogenic clearance of virus from the central nervous system. *J Immunol*. 2006; 176(12): 7666-75.

29. Hooper DC, Phares TW, Fabis MJ, Roy A. The production of antibody by invading B cells is required for the clearance of rabies virus from the central nervous system. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009; 3(10):e535. doi: 10.1371/journal.pntd.0000535.

30. Hooper DC, Roy A, Barkhouse DA, Li J, Kean RB. Rabies virus clearance from the central nervous system. *Adv Virus Res*. 2011; 79: 55-71.

31. Butchi NB, Pourciau S, Du M, Morgan TW, Peterson KE. Analysis of the neuroinflammatory response to TLR7 stimulation in the brain: comparison of multiple

TLR7 and/or TLR8 agonists. *J Immunol*. 2008; 180: 7604-12.

32. Butchi NB, Du M, Peterson KE. Interactions between TLR7 and TLR9 agonists and receptors regulate innate immune responses by astrocytes and microglia. *Glia*. 2010; 58(6): 650-64.

33. Li J, McGettigan JP, Faber M, Schnell MJ, Dietzschold B. Infection of monocytes or immature dendritic cells (DCs) with an attenuated rabies virus results in DC maturation and a strong activation of the NFkappaB signaling pathway. *Vaccine*. 2008; 26(3): 419-26.

34. Yan X, Prosnjak M, Curtis MT, Weiss ML, Faber M, Dietzschold B, et al. Silver-haired bat rabies virus variant does not induce apoptosis in the brain of experimentally infected mice. *J Neurovirol*. 2001; 7(6): 518-27.

35. Morimoto K, Patel M, Corisdeo S, Hooper DC, Fu ZF, Rupprecht CE, et al. Characterization of a unique variant of bat rabies virus responsible for newly emerging human cases in North America. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93(11): 5653-8.

36. Kuang Y, Lackay SN, Zhao L, Fu ZF. Role of chemokines in the enhancement of BBB permeability and inflammatory infiltration after rabies virus infection. *Virus Res*. 2009; 144(1-2): 18-26.

37. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Irschning C, Akira S, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. 2004; 303(5663): 1526-9.

38. Hooper DC, Morimoto K, Bette M, Weihe E, Koprowski H, Dietzschold B. Collaboration of antibody and inflammation in clearance of rabies virus from the central nervous system. *J Virol*. 1998; 72: 3711-9.