Journal of
Arak University of Medical Sciences

February & March 2021. Vol 23. Issue 6

Review Paper

Recombinant Lactococcus, a New Approach to Oral Vaccines

Marzieh Rezaei[1], ***Mohammad Rabbani Khorasgani**[1], **Mohammad Reza Aliramaei**[1]

1. Department of Cell & Molecular Biology and Microbiology, Faculty of Science and Biotechnology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation: Rezaei M, Rabbani-Khorasgani M, Aliramaei MR. [Recombinant Lactococcus, a New Approach to Oral Vaccines (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS). 2021; 23(6):786-805. https://doi.org/10.32598/JAMS.23.6.5030.3

https://doi.org/10.32598/JAMS.23.6.5030.3

CC BY NC

Article Info:
Received: 26 Feb 2020
Accepted: 12 Aug 2020
Available Online: 01 Feb 2021

Keywords:
Immunity, Lactococcus lactis, Mucosal, Vaccine

ABSTRACT

Background and Aim The genus of Lactococcus lactis belonging to the Lactic Acid Bacteria (LAB) group, is a gram-positive, faculative anaerobic, non-spore-forming, and non-motile bacterium. The present study aimed to introduce LAB, especially non-pathogenic, non-invasive, and safe Lactococcus lactis. Accordingly, we examined the previous studies concerning the advantages, limitations, promotion methods, and future prospects of oral vaccines based on this bacterium. This is because it is a potentially promising strategy for the vaccine production and prevention of some infectious diseases.

Methods & Materials In this review article, 62 studies related to Lactococcus lactis and its application in producing oral vaccines were collected through searching databases, such as PubMed, Google Scholar, Scopus published from 1981 to 2020.

Ethical Considerations This article was approved by the Ethical Research Committee of Arak University of Medical Sciences with the number 1396/99.

Results Lactococcus lactis, as a safe microorganism, is widely used in the food industry. Live recombinant Lactococcus lactis as a "biologic drug" is orally administered as one of the live vaccines expressing viral and bacterial antigens.

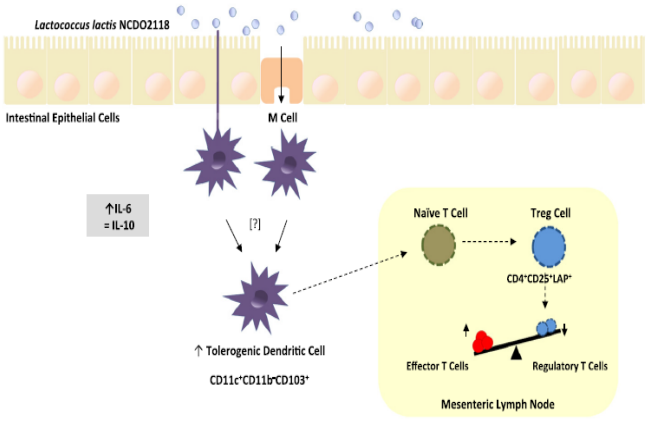
Conclusion Recombinant Lactococcus-based vector can be suitable substitutes for live attenuated vaccines. Moreover, it can be a safe and food-grade host for manufacturing the desired products of human consumption over other systems. It also presents a high potential for vaccine delivery, especially through mucosal methods to prevent or treat certain diseases.

Extended Abstract

1. Introduction

Vaccines used to prevent and control pathogens include DNA vaccines, subunit vaccines, attenuated live vaccines, as well as vector (carrier) vaccines. Current strategies have focused on developing novel vaccines against infectious diseases; they are based on identifying the immunogenic antigens capable of eliciting the necessary immune response to fight pathogens and their delivery system [7]. The present review study aimed to introduce non-pathogenic, non-invasive, and safe Lactococcus lactis bacteria. Furthermore, we evaluated the advantages and limitations of using recombinant Lactococcus lactis-based vaccines; review studies on oral vaccines based on them; vaccine promotion methods and future prospects, as a promising strategy for vaccine production, and preventing some infectious diseases.

* *Corresponding Author:*
Mohammad Rabbani Khorasgani, PhD.
Address: Department of Cell & Molecular Biology and Microbiology, Faculty of Science and Biotechnology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.
Tel: +98 (313) 7932469
E-mail: m.rabbani@biol.ui.ac.ir



Journal of Arak University of Medical Sciences

Figure 1. The mechanism of the anti-inflammatory effect of the oral administration of Lactococcus lactis strain NCDO2118 [31]

2. Materials and Methods

In this review article, 62 articles related to Lactococcus and its wide applications concerning oral vaccine production were collected from 1998 to 2020. Accordingly, we searched the following databases: Scopus, PubMed, and Google Scholar databases. The keywords used in this study included "Immunity, Lactococcus lactis, and Mucosal, Vaccine" (Figures 1, 2, 3, 4 & Table 1).

3. Results

Lactococcus lactis is Generally Recognized As Safe (GRAS) and can be widely used in the food industry. Live recombinant Lactococcus lactis, as a biopharmaceutical, is administered orally as a live vaccine expressing viral and bacterial antigens.

4. Discussion and Conclusion

Vectors based on recombinant lactococci can be desirable alternatives to attenuated strain vaccines. Furthermore, they can be considered as a food-grade and safe host for producing human products, compared to other manufacturing systems. It also has a high potential for vaccine delivery, especially through mucosal methods for the prevention or treatment of some diseases. Additionally, Lactococcus lactis is among the most suitable cellular plants for the expression and secretion of heterologous proteins. A reason for the widespread use of this bacterium is the rapid secretion of protein in this bacterium and the feasible purification of the protein. Moreover, Lactococcus lactis is an efficient host for producing recombinant proteins for therapeutic purposes [34]. Lactococci, for several main reasons, can induce mucosal immunity (secretory IgA secretion) and systemic immunity, resist acidic gastric conditions, bind to the intestinal

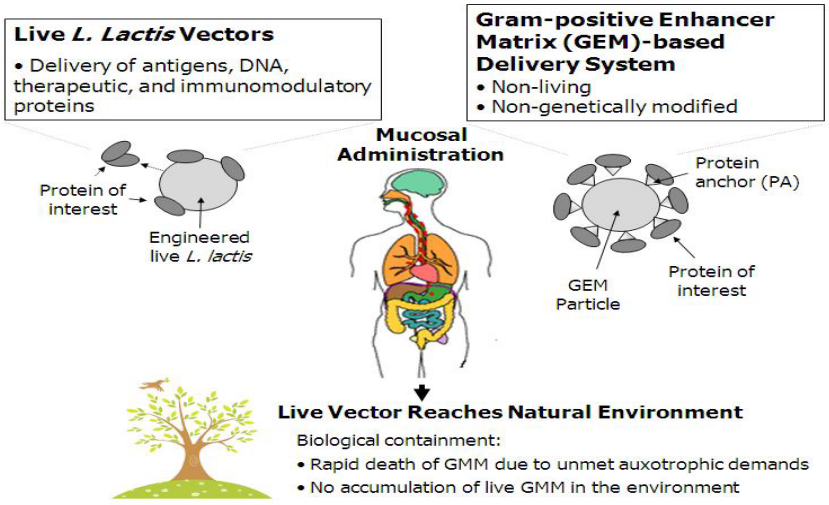
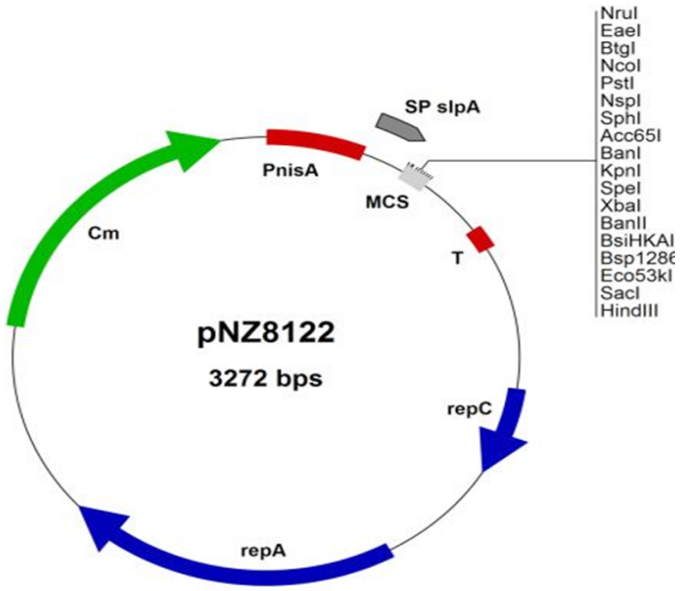


Figure 2. Anchor protein antigens delivery system purified with GEM particles [33]

Journal of Arak University of Medical Sciences



	Type	Start	End	Name	Description
	Promoter	3	203	PnisA	*nisin A* promoter region
	Region	204	296	SP slpA	Signal sequence of *slpA* gene
	Region	297	352	MCS	Multiple Cloning Site
	Terminator	498	550	T	Termination sequence of *pepN* gene
	Gene	893	1102	*repC*	Replication gene *C*
	Gene	1371	2069	*repA*	Replication gene *A*
	Selectable Marker	2529	3179	Cm (*cat*)	Chloramphenicol resistance

Figure 3. The gene map of pNZ8122 expression vector in Lactococcus lactis host [36, 49]

Journal of
Arak University of Medical Sciences

epithelium, and enhance the immune response as an adjuvant. Besides, the poor immune response against them, less immunity tolerance to them, also less adverse effects make it an appropriate option of live vectors in immunotherapy and immunoprophylaxis. With these characteristics, LAB-based vectors are a suitable alternative to vaccines for the attenuated strains of pathogenic microorganisms, liposomes, and microparticles [1]. Recombinant lactococcus, as a food-grade safe host for producing the desired product, food, or other human consumption is safer than other production systems. However, using such genetically modified microorganisms requires extensive clinical and controlled

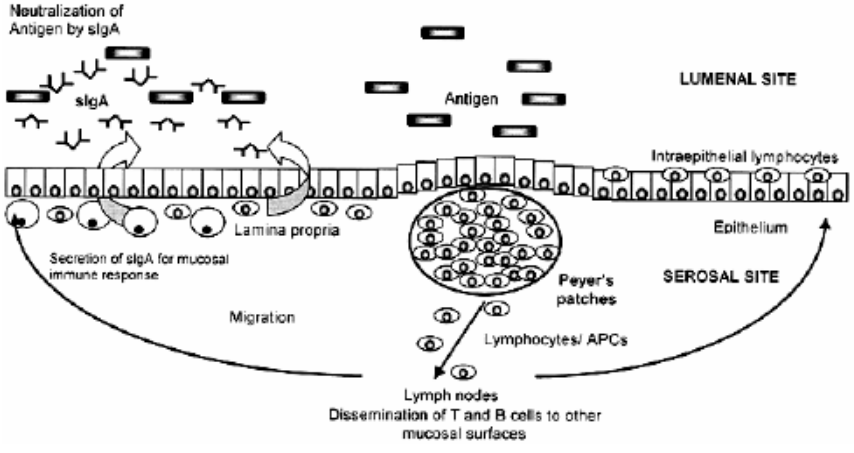


Figure 4. The induction of mucosal immune response during oral vaccine use

Journal of
Arak University of Medical Sciences

Table 1. Experiences with using recombinant Lactococcus lactis as an oral vaccine

	Target Microorganisms	Antigen	Findings	Study Methods	Reference
Bacterial infectious agents	Brucela Milli Tennessee	Omp16-IL2	Producing recombinant Omp16 fusion protein (interleukin-2 incorporated) & producing recombinant Lactococcus lactis MG1363 strain carrying this immunogenic antigen as an oral vaccine against brucellosis.	In vivo on animals	[38, 50]
	Helicobacter pylori	CagL	Expressing CagL and developing a recombinant strain of Lactococcus lactis MG1363 expressing CagL protein as an oral vaccine against Helicobacter pylori.	In vivo on animals	[51]
	Clostridium difficile	Toxin B	Toxin B cloning and expression in Lactococcus lactis with the aim of future oral vaccine use.	In vitro	[52]
	Helicobacter pylori	UreB	Developing the recombinant strain of Lactococcus lactis expressing UreB, increase in serum IgG and fecal IgA levels after the oral administration of the recombinant strain and protective effect after challenge with Helicobacter pylori.	In vivo on animals	[53]
	Enterotoxic Escherichia coli ETEC K88	F4	Increase in serum IgG and fecal IgA levels after the oral administration of recombinant Lactococcus lactis and protective effect during challenge with ETEC.	In vivo on animls	[17]
	Listeria monocytogenes	LLO	Increase in IgG and lethal T lymphocyte levels after the oral administration of recombinant Lactococcus lactis and protective effect during challenge with Listeria monocytogenes.	In vivo on animals	[54]
	Yersiniasodotuberculosis	LcrV	Increased serum IgG and IgA levels and increased cellular immune response after the oral administration of recombinant Lactococcus strain and protective effect during challenge with Yersiniasodotuberculosis.	In vivo on animals	[55]
	Ariziplottrix rosiopathy	SpaA	Increase in serum IgG and fecal IgA levels after the oral administration of recombinant strain of Lactococcus lactis and protective effect against inoculation with Ariziplotrix rosiopathy.	In vivo on animals	[56]
Viral infectious agents	HIV	V2-V4 Loop Coating Protein	Increase in serum IgG and fecal IgA levels and increase cellular immune response after the oral administration of recombinant Lactococcus lactis strain and decrease in viral load after challenge with HIV vaccine expressing HIV coat protein.	In vivo on animals	[45]
	Dengue virus	EDIII	The elevation of IgG and virus-neutralizing antibodies after the oral administration of recombinant Lactococcus strain expressing a viral antigen.	In vivo on animals	[57]
	Rotavirus	VP7	The elevation of IgG and virus-neutralizing antibodies after the oral administration of recombinant Lactococcus strain expressing a viral antigen.	In vivo on animals	[58]
	Rotavirus	VP4	Increase in serum IgG level, IgA level in feces and secretions, cellular immune response, and virus-neutralizing antibodies after the oral administration of recombinant Lactococcus strain expressing the viral antigen.	In vivo on animals	[59]
	TGEV	S protein	Increase in serum IgG level, IgA level in feces, and virus-neutralizing antibodies after the oral administration of recombinant Lactococcus strain expressing the viral antigen.	In vivo on animals	[60]
Parasitic infectious agents	Rodent malaria	Msp1	Increase in serum IgG and decrease in parasitism after the oral administration of recombinant Lactococcus strain expressing the antigen and during challenge with Plasmodium parasites.	In vivo on animals	[61]
	Giardia Lamblia	CWP2	Increase in fecal IgA and decrease in the number of excretory cysts after the oral administration of recombinant antigen-expressing Lactococcus strain during challenge with Giardia.	In vivo on animals	[62]
Non-infectious agents	Inflammatory bowel disease (crown shape)	Interleukin 10	The expression of interleukin 10 in recombinant Lactococcus lactis by replacement with thymidylate synthase gene.	In vivo on humans; phase one: clinical	[30, 43]
	Inflamed intestine (colitis with the ulcer)	Interleukin 10	The expression of interleukin 10 in recombinant Lactococcus lactis by replacement with thymidylate synthase gene.	In vivo on humans	[30]
	Oral mucositis (inflammation of the oral mucosa)	TFF1 factor	The expression of trophovirus factor in recombinant Lactococcus lactis by replacement with thymidylate synthase gene.	In vivo on humans; phase one: clinical	[44]

studies and the proper evaluation of the performance and safety of such drugs, especially for humans.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This article was approved by the Ethical Research Committee of Arak University of Medical Sciences with the number 1396/99.

Funding

This research did not receive any grant from funding agencies in the public, commercial, or non-profit sectors.

Authors' contributions

All authors met the standard criteria for writing based on the recommendations of the International Committee of Publishers of Medical Journals (ICMJE).

Conflicts of interest

The authors stated no conflicts of interest.

مقاله مروری

لاکتوکوکوس نوترکیب: رهیافتی نوین برای دست‌یابی به واکسن‌های دهانی

مرضیه رضایی[۱]، *محمد ربانی خوراسگانی[۱]، محمدرضا علی‌رمایی[۱]

۱. گروه سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۰۷ اسفند ۱۳۹۸
تاریخ پذیرش: ۲۲ مرداد ۱۳۹۹
تاریخ انتشار: ۱۳ بهمن ۱۳۹۹

چکیده

زمینه و هدف لاکتوکوکوس لاکتیس جزو گروه باکتری‌های لاکتیک اسید، گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری، غیراسپورزا و غیرمتحرک است. اهداف این مطالعه مروری، معرفی باکتری‌های زنده لاکتیک اسید؛ به ویژه لاکتوکوکوس لاکتیس غیربیماری‌زا، غیرتهاجمی و ایمن، بررسی محاسن، محدودیت‌های استفاده از واکسن‌های مبتنی بر لاکتوکوکوس لاکتیس نوترکیب، بررسی مطالعات انجام‌شده در زمینه واکسن دهانی مبتنی بر آن‌ها، روش‌های ارتقای واکسن و چشم‌اندازهای آینده به عنوان یک استراتژی امیدبخش جهت تولید واکسن و پیشگیری از بروز برخی بیماری‌های عفونی است.

مواد و روش‌ها در این مقاله، ۶۲ مقاله مرتبط با لاکتوکوکوس و کاربرد گسترده آن در زمینه تولید واکسن دهانی، در فاصله سال‌های ۱۹۹۸ تا ۲۰۲۰ از طریق پایگاه‌های جست‌وجوی مقالات از پایگاه‌های اطلاعاتی گوگل اسکالر، پابمد و اسکوپوس جمع‌آوری شد.

ملاحظات اخلاقی این مقاله توسط کمیته تحقیقات اخلاقی دانشگاه علوم‌پزشکی اراک با شماره ۱۳۹۶/۹۹ تأیید شده است.

یافته‌ها لاکتوکوکوس لاکتیس به عنوان یک میکروارگانیسم ایمن (GRAS) با قابلیت استفاده گسترده در صنایع غذایی محسوب می‌شود. لاکتوکوکوس لاکتیس نوترکیب زنده به عنوان «داروی زیستی» به صورت تجویز خوراکی به عنوان یکی از واکسن‌های زنده بیان‌کننده آنتی‌ژن‌های ویروسی و باکتریایی است.

نتیجه‌گیری وکتورهای مبتنی بر لاکتوکوکوس‌های نوترکیب می‌توانند جایگزین مناسبی برای واکسن‌های سویه‌های ضعیف‌شده باشند و می‌توان به عنوان میزبانی از نوع درجه غذایی و ایمن برای تولید محصولات مورد نظر انسانی نسبت به سایر سیستم‌های تولید در نظر گرفت. همچنین پتانسیل بالایی برای تحویل واکسن‌ها، به‌خصوص از طریق روش‌های مخاطی جهت پیشگیری یا درمان برخی بیماری‌ها دارد.

کلیدواژه‌ها:
ایمنی، لاکتوکوکوس لاکتیس، مخاطی، واکسن

مقدمه

واکسن‌های مورد استفاده جهت پیشگیری و کنترل عوامل بیماری‌زا شامل DNA واکسن‌ها، واکسن‌های تحت واحد، واکسن‌های زنده ضعیف‌شده و همچنین واکسن‌های مبتنی بر وکتور (حامل) هستند. دو نوع اصلی حاملین باکتریایی زنده شامل باکتری‌های زنده غیربیماری‌زا و باکتری‌های بیماری‌زای زنده ضعیف‌شده هستند.

بیشتر حاملین واکسن‌ها، سویه‌های باکتری‌های بیماری‌زای ضعیف‌شده شامل سالمونلاتیفی موریوم، یرسینیا انتروکولیتیکا، ویبریو کلرا، مایکوباکتریوم بویس، شیگلا سونئی، لیستریا مونوسایتوجنز (که به طور ویژه جهت تحریک پاسخ ایمنی سیتوتوکسیک محدود به MHC کلاس ۱ مناسب است)، باسیلوس آنتراسیس و بوردتلا هستند و می‌توانند حامل ژن مورد نظر و به عنوان وکتور مورد استفاده قرار گیرند [۱، ۲].

این وکتورها (سویه‌های ضعیف‌شده) به طور ویژه‌ای برای اتصال با سطوح مخاطی سازگار شده‌اند. بسیاری از آن‌ها از این سطوح برای شروع عفونت استفاده می‌کنند. واکسن‌های زنده ضعیف‌شده با وجود کارایی مناسب و خوب، برای انسان غیرایمن و بیماری‌زا هستند [۳] و منجر به بروز واکنش متقاطع و اختلال در آزمون‌های تشخیص آزمایشگاهی [۴]، مقاومت به آنتی‌بیوتیک در بعضی سویه‌ها و گاهی سقط جنین در حیوانات باردار هنگام تزریق می‌شوند [۵]. همچنین خطر برگشت‌پذیری بیماری به دلیل امکان بروز جهش برگشت‌پذیر در واکسن زنده قابل انتظار است [۶].

بنابراین توجه محققان به توسعه واکسن تحت واحد جهت یافتن

* نویسنده مسئول:
دکتر محمد ربانی خوراسگانی
نشانی: اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، گروه سلولی مولکولی و میکروبیولوژی.
تلفن: ۷۹۳۲۴۶۹ (۳۱۳) ۹۸+
پست الکترونیکی: m.rabbani@biol.ui.ac.ir

گزینه‌های جایگزین تولید واکسن جدید و عاری از معایب ناشی از واکسن‌های ضعیف‌شده علیه بیماری‌های عفونی، ضروری و منطقی به نظر می‌رسد. استراتژی‌های کنونی به توسعه واکسن‌های جدید علیه بیماری‌های عفونی، بر اساس شناسایی آنتی‌ژن‌های ایمونوژنیک قادر به بروز پاسخ ایمنی لازم جهت مقابله با عوامل بیماری‌زا و سیستم تحویل آن‌ها معطوف شده است [۷].

هدف از این تحقیق، معرفی باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس غیربیماری‌زا، غیرتهاجمی و ایمن، بررسی محاسن، محدودیت‌های استفاده از واکسن‌های مبتنی بر لاکتوکوکوس لاکتیس نوترکیب، بررسی مطالعات انجام‌شده در زمینه واکسن دهانی مبتنی بر آن‌ها، روش‌های ارتقای واکسن و چشم‌اندازهای آینده به عنوان یک استراتژی امیدبخش جهت تولید واکسن و پیشگیری از بروز برخی بیماری‌های عفونی است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، ۶۲ مقاله مرتبط با لاکتوکوکوس و کاربرد گسترده آن در زمینه تولید واکسن دهانی، بین سال‌های ۱۹۹۸ تا ۲۰۲۰ از طریق پایگاه‌های جست‌وجوی مقالات از پایگاه‌های اطلاعاتی گوگل اسکالر[1]، پابمد[2] و اسکوپوس[3] جمع‌آوری شد. واژگان کلیدی مورد استفاده شامل ایمنی[4]، لاکتوکوکوس لاکتیس[5]، مخاطی[6] و واکسن[7] می‌شود.

یافته‌ها

لاکتوکوکوس لاکتیس

جنس لاکتوکوکوس، گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری غیراسپورزا و غیرمتحرک و جزء گروه باکتری‌های تولیدکننده لاکتیک اسید[8] محسوب می‌شود. این باکتری‌ها با تخمیر قند، اسید لاکتیک تولید می‌کنند. باکتری‌های هتروفرمانتاتیو مزوفیل (دمای بهینه رشد حدود ۳۰ درجه) و غیر کومنسال هستند که در دستگاه گوارش سیطره پیدا نمی‌کنند (کلنیزه نمی‌شوند).

بنابراین خطر عوارض جانبی طی استفاده دهانی آن‌ها را کاهش می‌دهد [۸]. به دلیل ایمن بودن آن‌ها کاربرد گسترده‌ای در صنایع غذایی و لبنی [۹] دارند. با تولید یکسری ترکیبات ضد میکروبی از قبیل اسیدهای آلی، باکتریوسین و پپتیدهای ضد قارچی در فراوری و نگهداری مواد غذایی نقش بسزایی دارند. همچنین به عنوان مایه آغازگر تولید پنیر، ماست، خمیرترش نان و دیگر غذاهای تخمیرشده (به عنوان مثال سبزیجات، ماهی و سوسیس) و جهت پیشگیری از فساد سبزی استفاده می‌شوند [۱۰].

سازمان غذا و داروی ایالات متحده آمریکا، این باکتری‌ها را به عنوان «عموماً سالم قلمدادشده (GRAS)» طبقه‌بندی کرده است [۸].

لاکتوکوکوس لاکتیس نه‌تنها به دلیل اهمیت اقتصادی، بلکه به دلیل ویژگی‌های مهمی همچون تعیین توالی کامل ژنوم [۱۱]، آسان بودن دستکاری ژنتیکی آن [۱۲]، تولید و گسترش بسیاری از ابزارهای ژنتیکی در حال حاضر برای آن‌ها [۱۳]، مسیر متابولیسمی ساده و غیرپیچیده کسب انرژی با تبدیل قندها به پیروات از مسیر گلیکولیتیک و از طریق فسفریلاسیون در سطح سوبسترا [۱۴] به عنوان بهترین عضو LAB و میکروارگانیسم مدل این گروه مشخص شده است [۱۵].

کاربردهای جدید و مهمی از لاکتوکوکوس غیر از استفاده در فراورده‌های غذایی به عنوان مثال تولید تجاری و مقرون به صرفه برخی پروتئین‌های مهم در فرمانتور، تولید برخی مواد غذایی حاوی پروتئین‌های نوترکیب و همچنین تولید واکسن‌های زنده مطرح شده است [۱۶].

از ویژگی‌های مهم LABها به عنوان حامل آنتی‌ژن در واکسیناسیون می‌توان به غیربیماری‌زا بودن با توجه به استفاده طولانی‌مدت آن‌ها در صنایع غذایی، غیرتهاجمی بودن، عدم کلنیزاسیون در دستگاه گوارش، تحمل شرایط اسیدی (زنده ماندن هنگام عبور از معده)، پایداری بالا در حضور نمک‌های صفراوی [۱۷]، تولید بیشتر چاپرون‌های پروتئین شوک گرمایی GroEL و GroES جهت تحمل بهتر حلال و دمای بالاتر [۱۸] و عدم وجود لیپوپلی‌ساکارید (اندوتوکسین) در ساختار سلولی آن‌ها اشاره کرد [۱۹].

مروری بر تجارب مربوط به استفاده از لاکتوکوکوس لاکتیس به عنوان واکسن جهت پیشگیری یا درمان برخی بیماری‌ها

درمان عفونت‌های میکروبی نیازمند مصرف آنتی‌بیوتیک است. تحقیقات نشان داده که افزایش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به افزایش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک می‌شود و از سوی دیگر مطالعات نشان می‌دهد که عفونت‌های ایجادشده توسط این دسته از باکتری باعث افزایش عوارض ناشی از عفونت، مرگ‌ومیر و هزینه‌های درمان می‌شود.

یکی از روش‌های کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، استفاده از واکسن‌ها است [۲۰-۲۲]. امروزه واکسن‌های مبتنی بر میکروارگانیسم‌های نوترکیب زنده به عنوان «داروی زیستی» و به صورت تجویز خوراکی جهت پیشگیری یا درمان برخی بیماری‌ها کاربرد دارند.

1. Google Scholar
2. PubMed
3. Scopus
4. Immunity
5. Lactococcus lactis
6. Mucosal
7. Vaccine
8. Lactic Acid Bacteria (LAB)

تاکنون چند محصول تجاری حاوی سویه‌های LAB پروبیوتیک برای مصارف انسانی و یا پیشگیری‌کننده عفونت‌های روده‌ای حیوانات خانگی در دسترس قرار گرفته‌اند [۱۰]. همچنین LAB به عنوان یک سد در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مانع تجمع عوامل بیماری‌زا در سیستم گوارش می‌شود [۱، ۲۳].

کاهش بیماری‌زایی آنفولانزای مرغی

رخداد بیماری‌های ویروسی، از جمله بیماری آنفولانزا به عنوان نگرانی ویژه در صنعت پرورش طیور مطرح است؛ چراکه با آنتی‌بیوتیک‌ها قابل کنترل نیستند. بررسی‌های چندین محقق نشان داده است که لاکتوکوکوس‌های جدید بیان‌کننده آنتی‌ژن پپتیدازی M2 ویروس آنفولانزای مرغی با بیماری‌زایی بالا سویه H5N1، شانس زنده ماندن مرغ‌ها را افزایش می‌دهند [۲۴].

پروتئین M2یکی از سه پروتئین ویروس آنفلوآنزای مرغی و حاوی دومین‌هایی در سطح ذرات ویروس است. دومین خارجی (Me2) M2 حاوی ناحیه پپتیدی است که بین تمام زیرگونه‌ها حفاظت شده است. به همین دلیل تهیه واکسن آنفلوآنزای جهانی مورد توجه قرار گرفته است. طی چالش عفونت با ویروس آنفلوآنزا در موش و مرغ، آنتی‌بادی‌های ضد پپتید Me2منجر به کاهش بیماری‌زایی و افزایش بقا شده است [۲۴].

کنترل عفونت ویروس پاپیلومای انسانی نوع ۱۶

روش‌های متعددی برای واکسیناسیون ویروس HPV-16 ارائه شده است. این روش‌ها برای جلوگیری یا درمان عفونت ویروس HPV-16 پیشنهاد شده‌اند، اما هزینه آن‌ها بسیار بالاست و واکسن‌های مؤثرتر و مقرون به صرفه نیاز است. در حال حاضر روش‌هایی برای دریافت آنتی‌ژن HPV از طریق واکسن به دست آمده از پاتوژن‌های باکتریایی زنده وجود دارند که البته برای بیمارانی که سیستم ایمنی ضعیف و سرکوب‌شده دارند با خطرات زیادی همراه است؛ بنابراین از لاکتوکوکوس لاکتیس ایمن و غیربیماری‌زا به عنوان وکتور دریافت آنتی‌ژن استفاده می‌شود [۲۵].

لوئیس و همکاران، به بررسی و ارزیابی اثرات محافظتی سویه زنده لاکتوکوکوس لاکتیس بیان‌کننده آنتی‌ژن E7 متصل به دیواره باکتری و ترشح‌کننده اینترلوکین ۱۲ که به صورت مخاطی مصرف شده، در درمان تومور سلولی TC-1 ناشی از HPV-16 در مدل موشی پرداخته‌اند. لاکتوکوکوس زنده بیان‌کننده آنتی‌ژن E7 ویروس HPV-16، با تحریک اینترلوکین ۱۲، به عنوان واکسن جدید و مخاطی در نظر گرفته می‌شود [۲۵].

اینترلوکین ۱۲ یکی از سایتوکاین‌های هترودایمریک است که در تعادل واکنش‌های ایمنی نقش‌های مهمی، از جمله القای سلول‌های TH1، افزایش پاسخ ایمنی وابسته به CTL، القای فعالیت سلولی NK و همچنین تحریک تولید IFN گاما به عهده دارد. در بررسی‌های قبلی دو سویه لاکتوکوکوس لاکتیس طراحی شدند.

یکی از این دو سویه آنتی‌ژن E7، ویروس HPV-16 را در سطح خود بیان می‌کند و دومی، ترشح‌کننده اینترلوکین ۱۲ است. واکسن داخل بینی این سویه‌های نوترکیب لاکتوکوکوس لاکتیس توانست پاسخ ایمنی اختصاصی E7 در موش‌ها را القا کند [۲۵].

کنترل برخی عفونت‌های تنفسی

مصرف خوراکی لاکتوکوکوس لاکتیس ترشح‌کننده پروتئین N نوکلئوکپسید کروناویروس SARS در موش منجر به تولید ایمونوگلوبین اختصاصی ضد پروتئین N در سرم می‌شود و پاسخ چشمگیری ایجاد می‌کند [۲۶]. همچنین مصرف لاکتوکوکوس لاکتیس نوترکیب بیان‌کننده پروتئین A حفاظتی نوموکوکی (PppA) نوعی ایمنی مخاطی مقابل عفونت نوموکوکی تنفسی ایجاد شده است [۲۷].

کنترل بیماری‌های آلرژیک

بیماری‌های آلرژیک بیش از ۳۰ درصد جامعه غربی را تحت تأثیر قرار می‌دهد و شیوع آن‌ها در حال افزایش است. پروبیوتیک‌ها قادرند پاسخ ایمنی مخاطی را تعدیل نمایند. استفاده از پروبیوتیک‌های نوترکیب به عنوان یکی از استراتژی‌های ممکن برای ایمونوتراپی بیماری‌های آلرژیک ارزیابی شده‌اند. تولید و رها شدن آلرژن‌ها توسط LABهای نوترکیب با قابلیت کاهش پاسخ ایمنی نوع Th2، نشانگر یک استراتژی واکسیناسیون مخاطی ثمربخش است [۲۸].

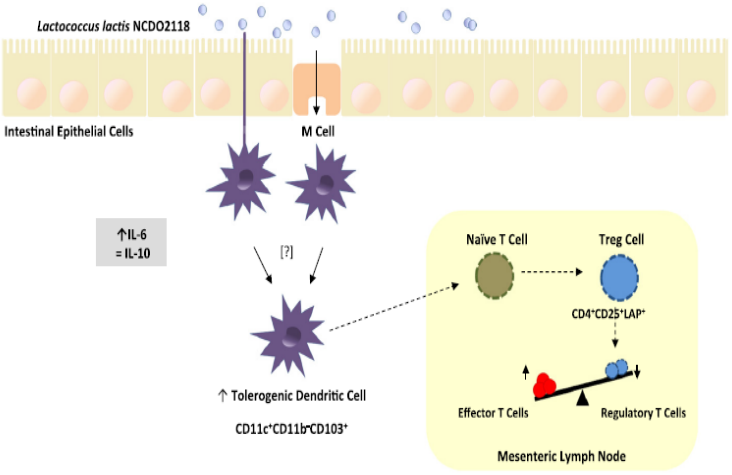
در مطالعه آدریان و همکاران، استفاده از مصرف دهانی لاکتوکوکوس لاکتیس سویه NCC2287، به طور معناداری باعث کاهش بیان سایتوکاین‌های القاکننده 2Th، اینترلوکین ۱۳، کموکاین CCL11 و CCL17 در ایلئوم روده می‌شود. نتایج این محققان نشان داد که این باکتری به عنوان یک سویه پروبیوتیک مناسب نشانه‌های آلرژی را در موش‌های حساس در مقایسه با گروه کنترل به شدت کاهش داده است [۲۹].

بهبود بیماری روده ملتهب[9]

بیماری روده ملتهب یک بیماری مزمن است که به دو شکل مختلف تحت عنوان کراون یا کولیت همراه با زخم شناخته می‌شود. تورم مخاط روده باعث به وجود آمدن این دو شکل بیماری می‌شود. در مورد تکوین این بیماری دیدگاه‌های مختلفی وجود دارد. بر اساس یک فرضیه، بروز تورم روده ناشی از به هم خوردن ترکیب میکروبی روده است که باعث ایجاد و القای پاسخ ایمنی شدید روده و التهاب مخاطی می‌شود.

فرضیه دیگر به بروز پاسخ اولیه سیستم ایمنی اشاره می‌کند که منجر به التهاب اولیه می‌شود. سپس ترکیب میکروبی روده به هم

9. Inflammatory Bowel Disease (IBD)



تصویر ۱. مکانیسم اثر ضدالتهابی مصرف دهانی سویه لاکتوکوکوس لاکتیس NCDO2118 [۳۱]

خورده و پاسخ ایمنی شدیدتر ایجاد می‌شود. استفاده از داروهای ضد التهاب و یا استفاده از داروهای تضعیف‌کننده سیستم ایمنی از روش‌های قدیمی بهبود علائم این بیماری هستند. به هر حال اثرات جانبی و اثربخش نبودن این گونه درمان‌ها باعث شده است که نیاز به روش‌های جدید درمان احساس شود.

یک روش امیدوارکننده جدید، استفاده از اینترلوکین ۱۰ انسانی است که تضعیف‌کننده سیستم ایمنی است. درمان با اینترلوکین ۱۰ به دلیل عدم توزیع مناسب در بافت‌ها به طور محدود می‌تواند بیماری را درمان کند و اثرات کلینیکی آن خفیف است. تحویل مستقیم اینترلوکین ۱۰ به سیستم مخاط ملتهب با مصرف دهانی لاکتوکوکوس لاکتیس امکان‌پذیر است [۳۰].

سویه جدید از لاکتوکوکوس لاکتیس که مولکول‌های درمانگر را ارائه می‌دهد با نام تجاری اکتوبایوتیک عرضه می‌شود. سویه‌های مختلف لاکتوکوکوس لاکتیس مهندسی شده‌اند تا فاکتور مؤثر در درمان زخم، آسیب و تورم بافت‌ها[10] را ترشح کنند. این سویه‌های لاکتوکوکوس قادر به تحویل TFF به کولون بوده و شدت بیماری التهابی روده را کاهش می‌دهند و معایب روش استفاده از داروهای ضد فاکتور نکروزدهنده تومور[11] را ندارند [۲۷].

در مطالعه لورس و همکاران، مکانیسم اثر ضدالتهابی باکتری لاکتوکوکوس در کاهش اثرات کولیت نشان داده شده است. در این مطالعه با مصرف دهانی سویه لاکتوکوکوس لاکتیس NCDO2118 در موش‌های با کولیت القاشده با سدیم دکستران سولفات، ابتدا افزایش در تولید اینترلوکین ۶ و ثابت ماندن سطح تولید اینترلوکین ۱۰ مشاهده شد.

علی‌رغم فعالیت ضدالتهابی لاکتوکوکوس لاکتیس NCDO2118، مصرف آن فراوانی جمعیت سلول‌های T تنظیمی را افزایش نمی‌دهد، بلکه نوع دیگری از سلول‌های T تنظیمی که در سطح خود (در شکل نهایی بلوغ خود) پیش‌ساز TGF-β را بیان می‌کنند، در گره‌های لنفی مزانتریک و طحال موش افزایش یافت [۳۱].

این مطالعه یک سویه جدید پروبیوتیک را که نقش بسزایی در درمان IBD دارد، شناسایی کرده است. مکانیسم اثر ضدالتهابی این سویه در تصویر شماره ۱ نشان می‌دهد که مصرف دهانی لاکتوکوکوس لاکتیس NCDO2118 در موش‌های با کولیت القاشده با سدیم دکستران سولفات منجر به افزایش در تعداد سلوهای دندریتیک تحمل‌زا می‌شود.

سپس این سلول‌ها به گره‌های لنفاوی مزانتریک مهاجرت و تولید رده خاصی از سلول‌های T تنظیمی مانند $CD4^+CD25^+LAP^+$ (دارای CD25، CD4 و LAP در سطح سلول) را القا می‌کنند و نهایتاً منجر به کاهش اثرات کولیت خواهد شد [۳۱].

مواردی از کاربرد لاکتوکوکوس لاکتیس نوترکیب به عنوان واکسن دهانی جهت کنترل برخی بیماری‌ها؛ به ویژه بیماری‌های عفونی ناشی از عوامل باکتریایی، ویروسی و انگلی در جدول شماره ۱ همراه با آنتی‌ژن تولیدشده توسط آن، سطح مطالعه انجام‌شده و نتیجه حاصل از ایمن‌سازی مخاطی شامل قابلیت تحریک سیستم ایمنی مخاطی و عمومی و ایجاد پاسخ‌های آنتی‌بادی IgA مخاطی ذکر شده است.

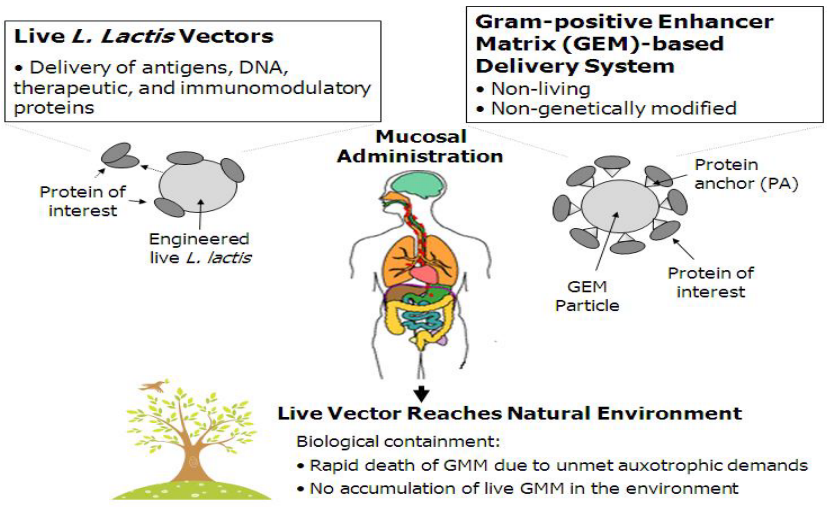
لاکتوکوکوس لاکتیس به عنوان یک ادجوان و تعدیل‌کننده پاسخ ایمنی

در برخی پژوهش‌های انجام‌شده، لاکتوکوکوس علاوه بر عرضه آنتی‌ژن، به عنوان ادجوان مخاطی نیز عمل می‌کند. به عنوان مثال، برخی سویه‌های لاکتوکوکوس لاکتیس نوترکیب، تولیدکننده هم‌زمان آنتی‌ژن و هم اینترلوکین‌های ۶ و ۲ هستند. تجویز مخاطی لاکتوکوکوس‌های نوترکیب، پاسخ‌های ایمنی اختصاصی نسبت

10. Trefoil Factor
11. Tumor Necrosing Factor (TNF)

جدول ۱. تجارب مربوط به استفاده از لاکتوکوکوس لاکتیس نوترکیب به عنوان واکسن دهانی

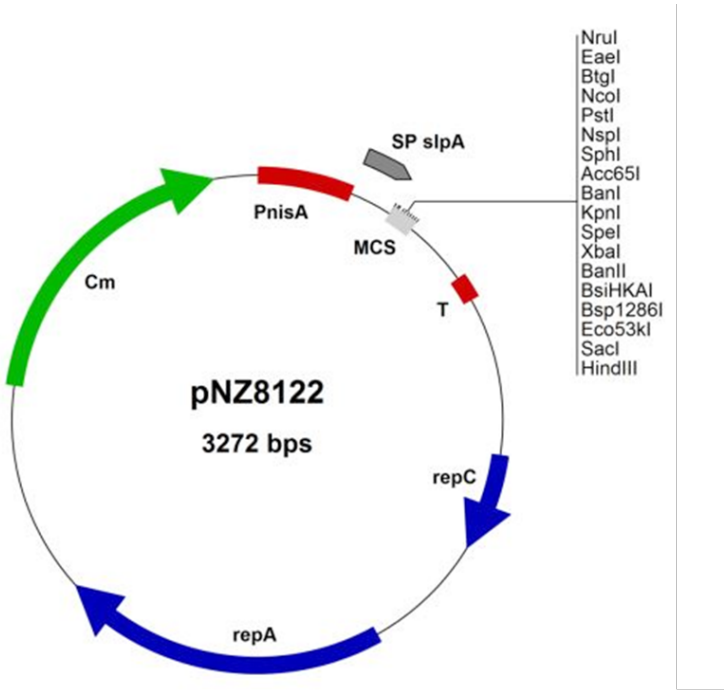
	میکروارگانیسم مورد هدف	آنتی‌ژن	یافته‌ها	سطح مطالعه	منبع
عوامل عفونی باکتریایی	بروسلا ملی تنسیس	Omp16-IL2	تولید پروتئین نوترکیب Omp16 فیوژن (الحاق‌یافته به اینترلوکین ۲) و تولید سویه لاکتوکوکوس لاکتیس MG1363 نوترکیب حامل این آنتی‌ژن ایمونوژن به عنوان واکسن دهانی علیه بروسلوز.	Invivo روی حیوان	[۳۸، ۵۰]
	هلیکوباکتر پایلوری	CagL	بیان CagL و ایجاد سویه نوترکیب لاکتوکوکوس لاکتیس MG1363 بیان‌کننده پروتئین CagL به عنوان واکسن دهانی علیه هلیکوباکتر پایلوری	Invivo روی حیوان	[۵۱]
	کلستریدیوم دیفیسیل	Toxin B	کلونینگ و بیان Toxin B در لاکتوکوکوس لاکتیس با هدف کاربرد واکسن دهانی در آینده.	Invitro	[۵۲]
	هلیکوباکتر پایلوری	UreB	ایجاد سویه نوترکیب لاکتوکوکوس لاکتیس بیان‌کننده UreB، افزایش سطح IgG سرمی و IgA مدفوعی پس از مصرف دهانی سویه نوترکیب و اثر حفاظت‌بخش پس از چالش با هلیکوباکتر پیلوری.	Invivo روی حیوان	[۵۳]
	اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک ETEC K88	F4	افزایش سطح IgGسرمی و IgA مدفوعی پس از مصرف دهانی سویه نوترکیب لاکتوکوکوس لاکتیس و اثر حفاظت‌بخش طی چالش با ETEC	Invivo روی حیوان	[۱۷]
	لیستریا مونوسایتوجنز	LLO	افزایش سطح IgG و لنفوسیت T کشنده پس از مصرف دهانی سویه نوترکیب لاکتوکوکوس لاکتیس و اثر حفاظت‌بخش طی چالش با لیستریا مونوسایتوجنز.	Invivo روی حیوان	[۵۴]
	یرسینیاسودوتوبرکلوزیس	LcrV	افزایش سطح IgG سرمی و IgA و افزایش پاسخ ایمنی سلولی پس از مصرف دهانی سویه لاکتوکوکوس نوترکیب و اثر حفاظت‌بخش طی چالش با یرسینیاسودوتوبرکلوزیس.	Invivo روی حیوان	[۵۵]
	اریزیپلوتریکس روزیوپاتیه	SpaA	افزایش سطح IgG سرمی و IgA مدفوعی پس از مصرف دهانی سویه نوترکیب لاکتوکوکوس لاکتیس و اثر حفاظت‌بخش علیه تلقیح با اریزیپلوتریکس روزیوپاتیه.	Invivo روی حیوان	[۵۶]
عوامل عفونی ویروسی	HIV	V2-V4 Loop پروتئین پوشش	افزایش سطح IgG سرمی و IgA مدفوعی و افزایش پاسخ ایمنی سلولی پس از مصرف دهانی سویه نوترکیب لاکتوکوکوس لاکتیس و کاهش بار ویروسی پس از چالش با واکسینیا ویروس بیان‌کننده پروتئین پوششی HIV	Invivo روی حیوان	[۴۵]
	دنگو ویروس	EDIII	افزایش سطح IgG و آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده ویروس پس از مصرف دهانی سویه لاکتوکوکوس نوترکیب بیان‌کننده آنتی‌ژن ویروسی.	Invivo روی حیوان	[۵۷]
	روتا ویروس	VPV	افزایش سطح IgG و آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده ویروس پس از مصرف دهانی سویه لاکتوکوکوس نوترکیب بیان‌کننده آنتی‌ژن ویروسی.	Invivo روی حیوان	[۵۸]
	روتا ویروس	VP4	افزایش در سطح IgG سرمی، سطح IgA در مدفوع و ترشحات، پاسخ ایمنی سلولی و آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده ویروس پس از مصرف دهانی سویه لاکتوکوکوس نوترکیب بیان‌کننده آنتی‌ژن ویروسی.	Invivo روی حیوان	[۵۹]
	TGEV	S protein	افزایش در سطح IgG سرمی، سطح IgA در مدفوع و آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده ویروس پس از مصرف دهانی سویه لاکتوکوکوس نوترکیب بیان‌کننده آنتی‌ژن ویروسی.	Invivo روی حیوان	[۶۰]
عوامل عفونی انگلی	مالاریای جوندگان	Msp1	افزایش سطح IgG سرمی و کاهش پارازیتمی پس از مصرف دهانی سویه لاکتوکوکوس نوترکیب بیان‌کننده آنتی‌ژن و طی چالش با پارازیت‌های پلاسمودیوم.	Invivo روی حیوان	[۶۱]
	ژیاردیا لامبلیا	CWP2	افزایش IgA مدفوعی و کاهش تعداد کیست‌های خروجی پس از مصرف دهانی سویه لاکتوکوکوس نوترکیب بیان‌کننده آنتی‌ژن و طی چالش با ژیاردیا.	Invivo روی حیوان	[۶۲]
عوامل غیرعفونی	بیماری روده ملتهب (شکل کراون)	اینترلوکین ۱۰	بیان اینترلوکین ۱۰ در لاکتوکوکوس لاکتیس نوترکیب از طریق جایگزینی با ژن تیمیدیلات سنتاز.	Invivo روی انسان فاز یک کلینیکی	[۳۳، ۳۰]
	روده ملتهب (کولیت همراه با زخم)	اینترلوکین ۱۰	بیان اینترلوکین ۱۰ در لاکتوکوکوس لاکتیس نوترکیب از طریق جایگزینی با ژن تیمیدیلات سنتاز.	Invivo روی انسان	[۳۰]
	موکوزیتیس دهانی (التهاب مخاط دهان)	TFF1 فاکتور	بیان فاکتور تروفویل در لاکتوکوکوس لاکتیس نوترکیب از طریق جایگزینی با ژن تیمیدیلات سنتاز.	Invivo روی انسان فاز یک کلینیکی	[۴۴]



تصویر ۲. سیستم تحویل آنتی‌ژن‌های پروتئین لنگر خالص‌شده با ذرات MEG [۳۳]

به آنتی‌ژن را ۱۰ تا ۱۵ مرتبه افزایش می‌دهد [۱۵]. گونه‌های LAB مصرف‌شده ممکن است به صورت مجزا یا به صورت ترکیب با گونه‌های دیگر به عنوان ادجوان‌های مخاطی استفاده شوند.

سیستم تحویل آنتی‌ژن یا ترکیبات دارویی با واسطه لاکتوکوکوس نیاز به خالص‌سازی مولکول‌ها در حد وسیع را رفع می‌کنند و امکان تحویل پروتئین به مخاط را ممکن می‌کنند [۱۰].



	Type	Start	End	Name	Description
	Promoter	3	203	PnisA	*nisin A* promoter region
	Region	204	296	SP slpA	Signal sequence of *slpA* gene
	Region	297	352	MCS	Multiple Cloning Site
	Terminator	498	550	T	Termination sequence of *pepN* gene
	Gene	893	1102	*repC*	Replication gene *C*
	Gene	1371	2069	*repA*	Replication gene *A*
	Selectable Marker	2529	3179	Cm (*cat*)	Chloramphenicol resistance

تصویر ۳. نقشه ژنی وکتور بیانی pNZ8122 در میزبان لاکتوکوکوس لاکتیس [۳۶، ۴۹]

کاربرد یک سویه لاکتوکوکوس لاکتیس نوترکیب بیان‌کننده اینترلوکین ۱۲، با توجه به نقش بسیار مهم این سایتوکاین در بروز پاسخ ایمنی علیه عفونت‌های انگلی، ویروسی و باکتریایی در ایمونوتراپی سرطان مفید شناسایی شده است. همچنین در صورت مصرف هم‌زمان با واکسن‌های DNA می‌تواند خاصیت ادجوان داشته باشد.

درمان با کمک اینترلوکین ۱۲ و به صورت سیستمیک به دلیل سمیت بالا با محدودیت روبه‌روست، اما بیان القایی و ترشح اینترلوکین ۱۲ توسط باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس ایمن می‌تواند گزینه مناسبی برای ایمنی‌درمانی سرطان و یا از بین بردن بیماری‌های عفونی باشد.

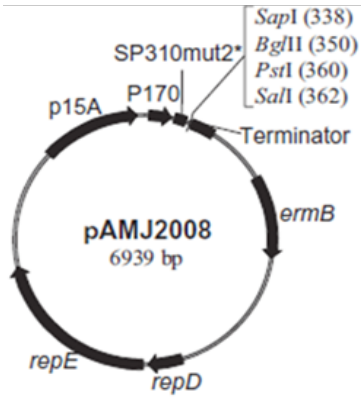
مطالعه مین نشان داد لاکتوکوک‌ها به دلیل آزاد شدن پپتیدوگلیکان دیواره سلولی آن‌ها به درون روده کوچک، فعالیت ادجوان نیز دارند [۳۲]. در بررسی‌های باهی و کورماک، ماتریکس تقویت‌کننده گرم مثبت[12] باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس کشته‌شده به عنوان یک ادجوان و سیستم تحویل جدید عمل کرده و توسط محققان به طور گسترده استفاده شده است.

طی بررسی‌های انجام‌شده، لاکتوکوکوس لاکتیس غیرزنده و اصلاح ژنتیکی‌نشده تحت تیمار اسیدی قرار گرفته و منجر به تشکیل ذرات لاکتوکوکوس لاکتیس کشته‌شده تحت عنوان ذرات GEM می‌شود. این ذرات GEM با دیواره مستحکم پپتیدوگلیکان و بدون ترکیبات داخل سلولی، لیپوتایکوئیک اسید و اسید نوکلئیک، مورفولوژی خارجی شبیه به لاکتوکوکوس لاکتیس از خود نشان می‌دهند.

آنتی‌ژن‌های هدف در میزبان بیانی لاکتوکوکوس لاکتیس به طور مجزایی بیان شده و برای اتصال به پروتئین لنگر[13] طراحی و ترشح می‌شوند [۳۳]. پروتئین لنگر مشتق از AcmA هیدرولاز دیواره سلولی لاکتوکوکوس لاکتیس می‌تواند به طور محکم و غیرکوالان به پپتیدوگلیکان ذرات GEM متصل شود. برای تهیه سیستم تحویل آنتی ژن، سوپرناتانت کشت حاوی آنتی‌ژن‌های پروتئینی لنگر خالص‌شده با ذرات GEM به‌راحتی مخلوط می‌شود [۳۳].

سیستم تحویل آنتی‌ژن‌های پروتئین لنگر خالص‌شده با ذرات GEM در تصویر شماره ۲ به طور خلاصه ذکر شده است. پروتئین‌های لنگر سریع‌تر و مؤثرتر به ذرات GEM متصل می‌شوند. فرآورده نهایی این سیستم، ذرات GEM غیر زنده همراه با آنتی‌ژن مورد نظر که به طور محکم به سطح خارجی متصل‌اند، است.

از مزیت‌های قابل توجه این روش، عدم وجود یک ارگانیسم اصلاح ژنتیکی یا فقدان اسید نوکلئیک در رسوب نهایی است. در



تصویر ۴. نقشه ژنی وکتور بیانی pAMJ2008 در میزبان لاکتوکوکوس لاکتیس سویه MG1363 [۳۵]

ضمن ذرات GEM فعالیت ادجوانت ذاتی دارند که پاسخ ایمنی علیه آنتی‌ژن اتصالی را قوی‌تر می‌سازد. درحقیقت، ذرات GEM می‌تواند ادجوانت مؤثری برای واکسن‌های موجود باشد؛ به ویژه هنگامی که به روش دهانی به طور هم‌زمان تحویل داده می‌شود.

علاوه بر این، سیستم مبتنی بر GEM می‌تواند برای هر دو نوع واکسن‌های تک ظرفیتی و چند ظرفیتی استفاده شود. همچنین به طور شگفت‌انگیزی استفاده از سیستم عرضه GEM هنگام مقایسه با استفاده ناقل‌های لاکتوکوکوس لاکتیس زنده، پاسخ ایمنی ضعیف و جزئی علیه ترکیبات GEM لاکتوکوکوس را برمی‌انگیزد.

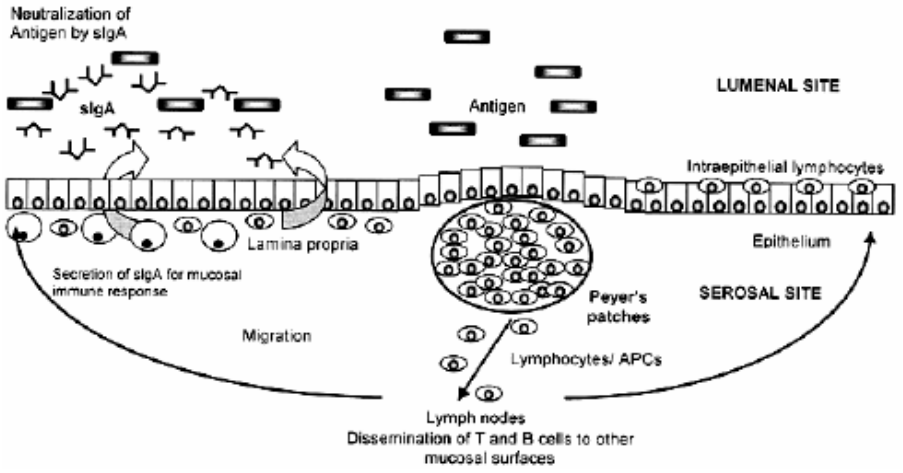
به طور کلی سیستم نمایش GEM، روش جدیدی جهت استفاده از واکسن‌های غیر زنده و بدون اصلاح ژنتیکی با ادجوان خودی ارائه می‌کند که به دلیل استفاده در انسان ارزش تحقیقات در آینده را دارد [۳۳].

لاکتوکوکوس لاکتیس، کارخانه سلولی تولید پروتئین هترولوگ

تلاش‌های زیادی از سه دهه اخیر برای مطالعه و شناخت خصوصیات ژنتیکی باکتری‌های لاکتیک اسید به منظور دست‌یابی به محصولات صنعتی بهتر انجام شده است. امروزه لاکتوکوکوس لاکتیس به یکی از مناسب‌ترین کارخانه‌های سلولی بیان و ترشح پروتئین هترولوگ تبدیل شده است. یکی از دلایل کاربرد وسیع این باکتری، ترشح سریع پروتئین در این باکتری و خالص‌سازی آسان پروتئین است. لاکتوکوکوس لاکتیس میزبان کارایی برای تولید پروتئین نوترکیبی جهت مقاصد درمانی است [۳۴].

در دوره اخیر شناخت وسیع در زمینه ژنتیک منجر به توسعه چندین سیستم بیان ژن بر پایه لاکتوکوکوس لاکتیس شده است. بسیاری از ابزارهای ژنتیکی گسترده شده و ژنوم کامل لاکتوکوکوس لاکتیس اخیراً تعیین توالی شده است؛ بنابراین دستکاری ژنتیکی آن برای محققان آسان‌تر می‌شود. چندین

12. Gram-Positive Enhancer Matrix (GEM)
13. Protein anchor



تصویر ۵. القای پاسخ ایمنی مخاطی طی استفاده از واکسن خوراکی

پروتئین هترولوگ تولیدشده توسط لاکتوکوکوس لاکتیس شامل مولکول‌های گزارشگر، آنتی‌ژن‌های ویروسی، یوکاریوتی و باکتریایی، اینترلوکین، آلرژن، فاکتورهای بیماری‌زایی، باکتریوسین ها و آنزیم‌ها هستند [۳۴].

تولید بالای پروتئین‌های هترولوگ در لاکتوکوکوس لاکتیس بسته به هدف مورد مطالعه با استفاده از پروموتورهای القایی یا ساختمانی لاکتوکوکی حاصل شده است [۳۴]. پروموتورهای القایی در زمینه‌های صنعتی کاربرد بیشتری دارند. در صورت وجود محرک در محیط این پروموتورها بیان پروتئین را آغاز می‌کنند.

چندین پروموتور لاکتوکوکوس لاکتیس شناخته‌شده از طریق شرایط استرس مانند حمله فاژ، تغییرات دما، pH و یا در حضور قند خاص قابل القا هستند. بیان، افزایش و کنترل تولید پروتئین‌های هترولوگ در لاکتوکوکوس لاکتیس با وجود پیشرفت‌های ژنتیکی و توسعه روش‌های زیست‌شناسی مولکولی تسهیل شده است [۱].

یکی از قوی‌ترین سیستم‌های بیان برای استفاده در LAB بر اساس ژن‌های درگیر در بیوسنتز و تنظیم پپتید ضدمیکروبی نیسین (محصول ژن nisA) است. سیستم‌های بیان القاشونده توسط نیسین توسعه پیدا کرده‌اند.

در حال حاضر وکتورهای بیانی متعددی که حاوی پروموتور A Pnis و در دنباله چندین جایگاه برای قرار دادن ORFهای بیانی هستند، در دسترس‌اند. غلظت نیسین مورد نیاز برای القای بیان حداقل (۱۰-۰/۰۱ نانوگرم در هر میلی‌لیتر) است. لاکتوکوکوس لاکتیس می‌تواند به عنوان یک تولیدکننده نیسین برای بیان یک پروتئین خاص با حداکثر توان استفاده شود [۳۵].

سیستم بیان ژن کنترل‌شده با نیسین[۱۴] برای بیان کنترل‌شده ژن‌های همولوگ و هترولوگ در باکتری‌های گرم مثبت توسعه یافته است. این سیستم بر اساس ویژگی‌های خود تنظیمی بیوسنتز ترکیب ضد میکروبی نیسین که توسط برخی از سویه‌های لاکتوکوکوس لاکتیس تولید می‌شود، است. در دیگر LAB از قبیل لوکونوستوک لاکتیس، لاکتوباسیلوس هلویتکوس، استرپتوکوکوس sp، انتروکوکوس sp و لاکتوباسیلوس پلنتاروم بررسی شده که نشان از تنوع این سیستم است.

پروتئین‌های هترولوگ مختلف در حال حاضر با استفاده از این سیستم بیان شده‌اند. از بین همه سیستم‌های بیانی توسعه یافته، استفاده از این سیستم آسان‌تر و بازده تولید آن بیشتر است. نیاز به تولید پروتئین هترولوگ در سطح بالا، باعث تلاش‌هایی برای بهتر کردن سیستم NICE شده است.

به تازگی ژن ایمنی نیسین nisI، در وکتور گزارشگری که حاوی کل سیستم NICE روی یک شاتل وکتورE. coli-LAB با تعداد کپی بالا است، جایگزین شده است. سویه لاکتوکوکوس لاکتیس دربردارنده این وکتور جدید، با پنج برابر حداکثر غلظت کشندگی القاکننده نیسین القا شده، که این باعث افزایش ۱/۸ برابری در بیان پروتئین فلورسنت سبز[۱۵] شده است. این سیستم جدید NICE پارامترهای القا را برای بیان پروتئین هترولوگ در LAB بهبود بخشیده است [۳۵].

به عنوان مثال، وکتور pNZ8122 جهت تولید پروتئین در لاکتوکوکوس لاکتیس سویه NZ9000 و با استفاده از سیستم بیانی مبتنی بر نایزین (NICE) در تصویر شماره ۳ با مشخصات اندازه پلازمید، ناحیه پروموتور nisin A، توالی سیگنال slpA، محل چندگانه کلونینگ و همچنین ژن مقاومت به کلرامفنیکل نشان داده شده است [۳۶].

چندین پروموتور لاکتوکوکوس تنظیم‌شده با شرایط محیطی

14. Nisin Controlled Gene Expression System (NICE)

15. Green Fluorescent Protein (GFP)

جداسازی شده‌اند. از بین آن‌ها P۱۷۰ یک پروموتور قوی است که فقط در pHپایین (pH<۶) و هنگامی‌که سلول در محیط کشت‌های حاوی گلوکز، وارد فاز ثابت رشد می‌شود، فعال است. مزیت عمده P170 نسبت به سیستم NICE برای تولید پروتئین، خودالقایی از طریق تجمع اسیدلاکتیک در طول رشد است [۳۵].

همچنین یکی از وکتورهای مورد استفاده در میزبان لاکتوکوکوس لاکتیس سویه MG1363، وکتور بیانی pAMJ2008 است که با استفاده از پروموتور القایی P170، پروتئین مورد نظر تولید خواهد شد. نقشه ژنی ناقل (وکتور) تصویر شماره ۴ با مشخصات اندازه پلازمید، پروموتور P170 القایی، سیگنال ترشحی SP310mut2 بهینه‌سازی شده مشتق از توالی سیگنال SP310 لاکتوکوکوس لاکتیس با شماره دسترسی AJ238086، محل چندگانه کلونینگ[16] جهت الحاق چند ژن در جایگاه‌های برش PstI، BglII، SapI و SalI، پایان‌دهنده رونویسی، انتخابگر اریترومایسین جهت غربالگری کلون‌های حاوی این پلاسمید ذکر شده است [۳۷، ۳۸].

ایمن‌سازی پس از مصرف خوراکی لاکتوکوکوس لاکتیس نوترکیب

با توجه به اینکه سطوح مخاطی، مسیر ورودی برای بسیاری از پاتوژن‌ها هستند؛ ایجاد ایمنی ویژه مخاطی، از جمله القای آنتی‌بادی‌های IgA ترشحی توسط واکسیناسیون مخاطی به روش‌های خوراکی، داخل بینی، واژینالی و مقعدی می‌تواند به حذف زودهنگام و کارآمد عفونت کمک کند.

علاوه بر این، واکسیناسیون مخاطی توانایی ایجاد پاسخ‌های ایمنی سیستمیک و مخاطی را دارد [۳۶، ۳۹]. طی مصرف دهانی باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس به دلیل غیرکومنسال بودن و عدم کلونیزاسیون در دستگاه گوارش، تحویل واکسن به سلول‌های M مخاط روده‌ای شبیه سیستم‌های تحویل واکسن میکروذره‌ای انجام می‌شود [۳۳].

با توجه به تصویر شماره ۵، طی استفاده دهانی این واکسن، باکتری‌ها توسط سلول‌های M پلاک‌های پیر گرفته‌شده، از اپی‌تلیوم عبور کرده و به سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن (بیشتر سلول‌های دندریتیک) می‌رسد. آنتی‌ژن‌های فراوری شده، توسط سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن[17] عرضه و باعث بروز پاسخ ایمنی می‌شوند [۳۳].

مصرف دهانی آن نسبت به میکروارگانیسم‌های تخفیف حدت‌یافته مانند سالمونلا تایفی و ویبریوکلرا مزایای بیشتری دارد و همچنین لاکتیک اسید باکتری‌ها قادرند در لومن دستگاه گوارش انسان و سایر حیوانات با زمان ماندگاری دو تا سه روز زنده بمانند، اما به مخاط گوارش حمله نمی‌کنند و کولونیزاسیون انجام نمی‌دهد [۳۴].

بیشتر واکسن‌های مورد استفاده تزریقی‌اند؛ بنابراین جهت برنامه‌های واکسیناسیون گسترده؛ به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه به دلیل هزینه و نیاز به آموزش فردی مناسب نیستند. واکسن‌های مخاطی همانند مواردی که از راه دهان، بینی و یا احتمالاً واژن استفاده می‌شوند، راحت‌تر از واکسن‌های سیستماتیک هستند؛ چراکه آن‌ها آسان‌تر استفاده می‌شوند و تولید آن‌ها به نسبت ارزان‌تر است.

به علاوه، واکسن‌های مخاطی می‌توانند IgG سرم و IgA ترشحی را تحریک کرده (جهت خنثی کردن سموم و ویروس‌ها) و باعث القای فعالیت‌های CTL شوند. ایمونوگلوبولین IgA ترشحی خط دفاعی اولیه هنگام محافظت سلول‌های پوششی روده در مقابل سموم روده‌ای و میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا محسوب می‌شود. IgA ترشحی با ممانعت از دسترسی عوامل بیماری‌زا به گیرنده‌های سطح سلول‌های پوششی روده، به دام انداختن در مخاط و همچنین تسهیل راندن از طریق حرکات پریستالتیک و مخاطی موجب پاک‌سازی و حذف عوامل بیماری‌زا از لومن روده می‌شود [۴۰].

علاوه بر این، به دلیل آنکه واکسن‌های مخاطی حالت تهاجمی کمتری دارند، ایمن‌سازی مخاطی برای کودکان یا بیمارانی که سیستم ایمنی آن‌ها ضعیف است، کاربرد بیشتری می‌یابد [۴۱].

بحث

بنا بر اهمیت واکسیناسیون مخاطی در پیشگیری از برخی بیماری‌های عفونی به چند مزیت واکسن‌های دهانی بر پایه لاکتوکوکوس اشاره می‌شود:

۱. استفاده گسترده این باکتری در صنایع غذایی، لبنی و کاربردهای جدید به عنوان سیستم تحویل واکسن، تحویل ژن، بیان پروتئین‌های غیرمشابه و تحویل دارو طی پژوهش‌های مولکولی و ژنتیکی متمرکز دو دهه گذشته [۳۳]؛

۲. فقدان اندوتوکسین و لیپو پلی ساکاریدهای باکتری‌های گرم منفی [۳۳]؛

۳. وجود اگزوپروتئین‌های کمتر و متعاقباً آلودگی کمتر نمونه‌ها در روند تولید پروتئین‌های هترولوگ نسبت به اشرشیا کلی [۳۳]؛

۴. توانایی تحریک پاسخ‌های ایمنی به دلیل وجود ترکیبات خاص در دیواره سلولی مانند پپتیدوگلیکان، پلی‌ساکارید و تایکوئیک اسید و همچنین فعالیت ادجوان به دلیل آزاد شدن پپتید و گلیکان از دیواره سلولی به درون روده کوچک [۳۲]؛

۵. غیرتهاجمی و غیرانگلی بودن و پتانسیل کمتر جهت ایجاد تحمل ایمنی و اثرات جانبی کمتر طی مصرف دهانی باکتری به دلیل غیرکومنسال بودن و عدم کلونیزاسیون در دستگاه گوارش،

16. Multiple cloning site
17. Antigen Presenting Cell (APC)

تحویل واکسن به سلول‌های M مخاط روده‌ای شبیه سیستم‌های تحویل واکسن میکروذره‌ای [۳۳].

استفاده از ارگانیسم‌های اصلاح‌شده ژنتیکی، نگرانی‌هایی مانند خطر انتقال افقی ژن به دیگر ارگانیسم‌های موجود در بافت مخاطی میزبان، تأثیر محصول بیان‌شده توسط ژن‌های تحویل داده‌شده یا جایگزین‌شده و استفاده از ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیک به عنوان نشانگرهای انتخاب را نیز افزایش می‌دهد.

لاکتوکوکوس لاکتیس به عنوان واکسن زنده باید چندین معیار، از جمله دارا بودن ویژگی‌های بهداشتی تأییدشده از سوی مراکز علمی معتبر، اثبات ایمن بودن آن‌ها، ویژگی‌های فناوری مناسب جهت تولید در سطح انبوه، پایداری زیستی و کارایی عملی، عدم وجود بافت یا طعم ناخوشایند در ترکیبات به کار رفته یا در محصولات غذایی، پایداری بالا در فرایندهای پایین‌دستی و هنگام ذخیره‌سازی در محصولات غذایی، پایداری بالا هنگام عبور از دستگاه گوارش و بخش فعال روده را داشته باشند.

با توجه به رویکرد جدید مبنی بر استفاده از لاکتوکوکوس لاکتیس به عنوان واکسن زنده، توسعه راهکار مناسب در برنامه‌های بالینی آینده جهت محدود کردن آلودگی محیطی ضروری به نظر می‌رسد [۱].

استفاده از وکتورهای زنده محدودیت‌های زیستی به همراه خواهد داشت. این محدودیت‌های زیستی شامل مرگ سریع باکتری به دلیل عدم تأمین نیازهای غذایی آکسوتروف‌ها و همچنین عدم تجمع ذرات GEM زنده در محیط است. این محدودیت‌ها منجر به انجام تلاش‌های زیادی به منظور استفاده لاکتوکوس‌های کشته‌شده به عنوان ناقل‌های واکسن و محدود کردن گسترش سویه‌های مهندسی‌شده (دارای محدودیت زیستی) در محیط شده است [۳۴].

مطالعه خیلی دقیق شیمیایی، ساخت و کنترل محصولات دارویی جدید تولید شده از سویه‌های مهندسی شده لاکتوکوکوس ضروری است. تأیید استفاده از باکتری‌های زنده به عنوان یک دارو با چالش‌های ویژه‌ای روبه‌رو است. به عنوان مثال، تحقیق و تولید در زمینه این محصولات نیاز به استانداردهای تأییدشده از سوی صنایع داروسازی دارد.

دستورالعمل‌های منتشرشده از سوی کنفراس‌های بین‌المللی در زمینه هماهنگ کردن ملزومات تکنیکی جهت ثبت محصولات دارویی مورد استفاده برای انسان[18] رعایت شود، تولید محصولات دارویی باید الزاماً روش ساخت مناسب[19] را دربرداشته باشد. کیفیت محصول و ملزوماتی که طی ساخت باید لحاظ شود شامل شناسایی، خلوص، پایداری و ایمن بودن محصول دارویی است. مطالعات دقیق در زمینه سمیت محصول برای حیوان، ایمن بودن محصول دارویی قبل از استفاده انسانی را تعیین می‌کند [۴۲].

به منظور رفع خطر ناشی از انتشار سویه‌های اصلاح ژنتیکی در محیط و جلوگیری از انتقال ژن‌ها به سایر میکروارگانیسم‌ها؛ به ویژه ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک، یک نمونه استفاده از این سویه‌ها برای اهداف درمانی انسان، ایجاد سیستم محدودیت زیستی برای سویه‌های اصلاح ژنتیکی‌شده جهت تحویل اینترلوکین ۱۰ به روده است.

در مطالعه انجام‌شده توسط استیدلر و همکاران به منظور اطمینان از آکسوتروفی تیمیدین در سویه لاکتوکوکوس لاکتیس MG1363 اصلاح ژنتیکی و طراحی‌شده برای ترشح اینترلوکین ۱۰ انسانی، سیستم حذف سنتز پیریمیدین را به کار بردند. در این بررسی ژن ضروری thyA در لاکتوکوکوس لاکتیس MG1363 کدکننده آنزیم سنتزکننده تیمیدیلات سنتاز با ژن اینترلوکین ۱۰ انسانی به روش نوترکیبی همولوگ جایگزین شد [۴۳].

در این مطالعه سویه آکسوتروف حاصل، فاقد نشانگر آنتی‌بیوتیک بوده و ژن اینترلوکین ۱۰ انسانی در کروموزوم لاکتوکوکوس لاکتیس الحاق شده است. سویه ترشح‌کننده اینترلوکین ۱۰ انسانی برای رشد و بقا نیاز به تیمیدین داشته و بنابراین موتانت‌های اصلاح ژنتیکی‌شده[20] در محیط طبیعی با میزان کم تیمین و تیمیدین نمی‌تواند بقا داشته باشد. اخیراً این سویه، Thy 12 طراحی‌شده تحت بررسی کلینیکی برای درمان بیماری تورم روده‌ای (IBD) قرار گرفته است [۴۳].

گرچه مرگ باکتری‌ها به دلیل فقدان تیمین در خیلی از مقاله‌ها گزارش شده، اما همچنان استفاده از ناقل‌های لاکتوکوکوس لاکتیس به منظور کاربردهای انسانی گسترده شده است. پذیرش لاکتوکوکوس لاکتیس فاقد ThyA به عنوان یک استاندارد محدودیت بیولوژیکی در جهان گسترش یافته و توسط شورای مشاوره ایمنی زیستی بلژیک، آژانس فرآورده‌های پزشکی سوئد، آژانس حفاظت محیطی کانادا تصویب شده است.

طی بررسی‌های دیگر محققان، از سیستم محدودیت زیستی سویه واکسن لاکتوکوکوس لاکتیس مشابه حذف پیریمیدین، اما حاوی ژن سیتیدین تری فسفات سنتاز؛ یعنی pyr G نسبت به thy A استفاده کرده‌اند [۴۴]. ژن pyr G سویه لاکتوکوکوس لاکتیس MG1363 با ژن کدکننده آنتی‌ژن لیستریولایزین باکتری لیستریا مونوسایتوجنز به روش کراسینگ‌آور دوگانه جایگزین شد.

سویه آکسوتروف حاصل به عنوان یک واکسن القاکننده پاسخ ایمنی محافظتی در موش علیه لیستریا مونوسایتوجنز بسیار کارآمد بوده است. به طور کلی جایگزینی ژن اینترلوکین ۱۰ با ژن

18.The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH)

19. Good manufacturing practice (GMP)

20. Genetically Modified Microorganisms (GMM)

تیمیدیلات باکتری لاکتوکوکوس‌لاکتیس منجر به ایجاد سویه‌ای خواهد شد که در محیط فاقد تیمیدین یا تیمین رشد نخواهد کرد.

این سویه فاقد ژن تیمیدیلات (سویه فاقد Thy A) و به دلیل تیمیدین آکسوتروفی، فاقد نشانگر مقاومت به آنتی‌بیوتیک است، در نتیجه ژن مقاومت در محیط منتشر نمی‌شود؛ بنابراین این سویه بدون هیچ‌گونه عوارض شدیدی حتی با مهندسی ژنتیک به ایمن‌ترین سویه اصلاح ژنتیکی‌شده تبدیل شده است [۴۴].

برخی روش‌های ارتقای تحویل واکسن دهانی شامل تحویل هم‌زمان با یک ادجوان، استفاده هم‌زمان لاکتوکوکوس لاکتیس با ترکیبی سمی و ایمنوژن قوی، مصرف توأم سویه لاکتوکوکوس لاکتیس بیان‌کننده آنتی‌ژن و سویه لاکتوکوکوس لاکتیس بیان‌کننده‌اینترلوکین هستند.

بقای لاکتوکوکوس لاکتیس و آنتی‌ژن همراه آن تحت تأثیر شرایط فیزیکی و شیمیایی می‌تواند واکسیناسیون خوراکی سویه لاکتوکوکوس لاکتیس را به چالش بکشد. بیان بالای آنتی‌ژن‌های ذره‌ای توسط لاکتوکوکوس لاکتیس موجب بقای بیشتر این ناقل در معده و روده می‌شود.

زین و همکاران نشان دادند که ایمن‌سازی ناشی از مصرف خوراکی سویه لاکتوکوکوس لاکتیس بیان‌کننده پروتئین پوشش سطحی ویروس HIV هم‌زمان با سم کلرا، غیرفعال شده به عنوان ادجوان بیشترین کارایی را داشته است [۴۵].

ارتقای سطح پاسخ ایمنی با استفاده هم‌زمان لاکتوکوکوس لاکتیس با ترکیبی سمی وایمنوژن قوی امکان‌پذیر است. مطالعه استدیلر و همکاران نشان داد مصرف داخل بینی لاکتوکوکوس لاکتیس بیان‌کننده توأم قطعه C ترکیب سمی کزاز، اینترلوکین ۶ و اینترلوکین ۲ باعث ترشح بیشتر IgG ضد TTFC در سرم در مقایسه با بیان TTFC به‌تنهایی شده است [۴۶].

مصرف توأم لاکتوکوکوس لاکتیس بیان‌کننده اینترلوکین ۱۲ و دیگر سویه لاکتوکوکوس لاکتیس بیان‌کننده آنتی‌ژن E7 ویروس HPV-16 متصل به دیواره به روش داخل بینی منجر به پاسخ ایمنی سلولی اختصاصی ضد E7 شد [۴۷].

امروزه از طریق انتخاب سویه‌های جدید یا دستکاری ژنتیکی‌شده لاکتوکوکوس لاکتیس به منظور افزایش ویژگی مقاومت به استرس و صفرا در ناحیه فوقانی روده کوچک، تحویل داخل بدن، کپسوله شدن ارگانیسم‌های زنده جهت محافظت بیشتر ناقل‌های زنده علیه اسید معده می‌توان نحوه تحویل دهانی واکسن‌های لاکتوکوکوس لاکتیس را ارتقا داد.

استیدلر و همکارانش، ناقل لاکتوکوکوس لاکتیس کپسوله و خشک‌شده با روش فریز دراینگ را برای مصرف خوراکی در انسان استفاده کردند. تحمل به صفرا لاکتوکوکوس لاکتیس از طریق بیان هترولوگ پروتئین تحمل به صفرا مشتق از لیستریا مونوسایتوجنز ارتقا یافت [۳۳]. این سویه لاکتوکوکوس لاکتیس مهندسی‌شده بقای بیشتری در دستگاه گوارش موش‌ها هنگام مقایسه با سویه وحشی نشان داد.

چشم‌اندازهای آینده

از جمله اهداف پیش‌رو، گسترش دادن ناقل واکسن لاکتوکوکی چندظرفیتی علیه انواع مختلفی از پاتوژن‌ها است که از طریق مسیرهای مخاطی می‌تواند تحویل داده شود. منظور از واکسن‌های چندظرفیتی، تولید چندین آنتی‌ژن هترولوگ در باکتری لاکتوکوکوس نوترکیب است و این یکی از محاسن مهم استفاده از باکتری‌های زنده به عنوان واکسن در مقایسه با ویروس‌هاست؛ زیرا برخلاف ویروس‌ها، ژنوم باکتری‌ها توانایی حمل چندین ژن بیگانه را دارند [۲۵]. موارد مهمی که در مطالعات آینده جهت تهیه واکسن‌های مؤثر و ایمن از لاکتوکوکوس لاکتیس باید ملاحظه شود، شامل موارد ذیل هستند:

- حذف ژن‌های ضروری و استفاده از سویه‌های اگزوتروف با هدف اینکه باکتری‌های LAB مهندس ژنتیکی‌شده از نظر زیستی فعال باشند. برای ارتقای سیستم‌های بیانی بر اساس لاکتوکوکوس لاکتیس از سیستم‌های القایی استفاده شود.

- افزایش پاسخ ایمنی با هدف‌گیری آنتی‌ژن‌های داخل سلولی (الحاق آنتی‌ژن با پروتئین‌های ویروسی، پروتئین‌های متصل‌شونده به سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن)، بقایای آنتی‌ژن‌های تحت سلولی (مانند شبکه اندوپلاسمی)، تنظیم‌کننده‌هایی مانند اینترلوکین و پروتئین‌های شوک حرارتی و ویروسی.

- مطالعه تأثیر محیطی سویه‌هایی جایگزین با کاربردهای متنوع، از جمله آنالیز بقای سویه‌ها در خاک و سایر سیستم های محیطی.

- افزایش بیان پروتئین با بهینه‌سازی کدون برای لاکتوکوکوس، پروموتورهای سنتزی و سویه‌های فاقد پروتئاز [۴۸].

نتیجه‌گیری

لاکتوکوک‌ها به چند دلیل عمده شامل توانایی القای ایمنی مخاطی (ترشح IgA ترشحی) و ایمنی سیستمیک، توانایی مقاومت در شرایط اسیدی معده، توانایی اتصال به اپی‌تلیوم روده، توانایی تقویت پاسخ ایمنی به عنوان ادجوان، بروز پاسخ ایمنی ضعیف میزبان علیه آن‌ها، تحمل ایمنی کمتر نسبت به آن‌ها و همچنین اثرات جانبی کمتر می‌توانند گزینه مناسبی به عنوان وکتورهای زنده در ایمونوتراپی و ایمونوپروفیلاکسی کاربرد داشته باشند.

ایمنی‌سازی پیشگیری‌کننده (پروفیلاکتیک) باعث ایمنی طولانی‌مدت بدن می‌شود. با ویژگی‌های عنوان‌شده، وکتورهای مبتنی بر LAB جایگزین مناسبی برای واکسن‌های سویه‌های ضعیف‌شده از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، لیپوزوم و ریزذره

است [۱].

لاکتوکوک نوترکیب به عنوان میزبانی ایمن از نوع درجه غذایی برای تولید محصول موردنظر، مصرف خوراکی یا مصارف دیگر انسانی را نسبت به سایر سیستم‌های تولید ایمن‌تر می‌کند، سویه‌های لاکتوکوکوس کاملاً ایمن در محیط مناسب رشد کرده و در طول مرحله رشد خود نیاز به هوادهی ندارد؛ بنابراین کار کردن با این سویه می‌تواند آسان باشد. با وجود این، استفاده از چنین میکروارگانیسم‌های اصلاح ژنتیکی‌شده، نیاز به مطالعات گسترده کلینیکی کنترل‌شده و ارزیابی مناسب از عملکرد و امنیت چنین داروهایی؛ به‌ویژه برای انسان دارد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مقاله توسط کمیته تحقیقات اخلاقی دانشگاه علوم‌پزشکی اراک با شماره ۱۳۹۶/۹۹ تأیید شده است.

حامی مالی

این تحقیق هیچ گونه کمک مالی از سازمان‌های تأمین مالی در بخش‌های عمومی ، تجاری یا غیرانتفاعی دریافت نکرد.

مشارکت‌نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین‌المللی ناشران مجلات پزشکی را داشتند (ICMJE) و همگی به یک اندازه در نگارش مقاله سهیم بودند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

References

[1] Pontes DS, de Azevedo MS, Chatel JM, Langella P, Azevedo V, Miyoshi A. Lactococcus lactis as a live vector: Heterologous protein production and DNA delivery systems. Protein Expr Purif. 2011; 79(2):165-75. [DOI:10.1016/j.pep.2011.06.005] [PMID]

[2] Chen S, Zhang R, Duan G, Shi J. Food-grade expression of Helicobacter pylori ureB subunit in Lactococcus lactis and its immunoreactivity. Curr Microbiol. 2011; 62(6):1726-31. [DOI:10.1007/s00284-011-9920-6] [PMID]

[3] Izadjoo MJ, Bhattacharjee AK, Paranavitana CM, Hadfield TL, Hoover DL. Oral vaccination with Brucella melitensis WR201 protects mice against intranasal challenge with virulent Brucella melitensis 16M. Infect Immun. 2004; 72(7):4031-9. [DOI:10.1128/IAI.72.7.4031-4039.2004] [PMID] [PMCID]

[4] Alton GG. Control of Brucella melitensis infection in sheep and goats-a review. Trop Anim Health Prod. 1987; 19(2):65-74. [DOI:10.1007/BF02297320] [PMID]

[5] Minas A, Minas M, Stournara A, Tselepidis S. The "effects" of Rev-1 vaccination of sheep and goats on human brucellosis in Greece. Prev Vet Med. 2004; 64(1):41-7. [DOI:10.1016/j.prevetmed.2004.03.007] [PMID]

[6] Wallach J, Ferrero M, Victoria Delpino M, Fossati C, Baldi P. Occupational infection due to Brucella abortus S19 among workers involved in vaccine production in Argentina. Clin Microbiol Infect. 2008; 14(8):805-7. [DOI:10.1111/j.1469-0691.2008.02029.x] [PMID]

[7] Miyoshi A, Bermúdez-Humarán LG, Ribeiro LA, Le Loir Y, Oliveira SC, Langella P, et al. Heterologous expression of Brucella abortus GroEL heat-shock protein in Lactococcus lactis. Microb Cell Fact. 2006; 5(1):14. [DOI:10.1186/1475-2859-5-14] [PMID] [PMCID]

[8] Song AA, In LLA, Lim SHE, Rahim RA. A review on Lactococcus lactis: From food to factory. Microb Cell Fact. 2017; 16(1):55. [DOI:10.1186/s12934-017-0669-x] [PMID] [PMCID]

[9] Khorasgani MR, Shafiei R. Traditional Yogurt as a Source of Lactobacilli and Other Lactic Acid Bacteria in Iran. In: Nagendra PS, editoe. Yogurt in health and disease prevention. Cambridge, Ma: Academic Press; 2017. pp. 285-94. [DOI:10.1016/B978-0-12-805134-4.00016-X]

[10] D'Silva I. Recombinant technology and probiotics. Int J Eng Technol. 2011; 3(4):288-93. http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.411.7661&rep=rep1&type=pdf

[11] Margolles A, Moreno JA, Ruiz L, Marelli B, Magni C, de Los Reyes-Gavilán CG, et al. Production of human growth hormone by Lactococcus lactis. J Biosci Bioeng. 2010; 109(4):322-4. [DOI:10.1016/j.jbiosc.2009.10.006] [PMID]

[12] Zhang XJ, Duan G, Zhang R, Fan Q. Optimized expression of Helicobacter pylori ureB gene in the Lactococcus lactis Nisin-Controlled Gene Expression (NICE) system and experimental study of its immunoreactivity. Curr Microbiol. 2009; 58(4):308-14. [DOI:10.1007/s00284-008-9349-8] [PMID]

[13] Langella P, Le Loir Y. Heterologous protein secretion in Lactococcus lactis: A novel antigen delivery system. Braz J Med Biol Res. 1999; 32(2). 191-8. [DOI:10.1590/S0100-879X1999000200007] [PMID]

[14] Papagianni M. Recent advances in engineering the central carbon metabolism of industrially important bacteria. Microb Cell Fact. 2012; 11(1):50. [DOI:10.1186/1475-2859-11-50] [PMID] [PMCID]

[15] Nouaille S, Ribeiro LA, Miyoshi A, Pontes D, Le Loir Y, Oliveira SC, et al. Heterologous protein production and delivery systems for Lactococcus lactis. Genet Mol Res. 2003; 2(1):102-11. https://www.researchgate.net/profile/Yves-Le-Loir-2/publication/224901319_Heterologous_protein_production_and_delivery_systems_for_Lactococcus_lactis/links/0fcfd509905bc589f5000000/Heterologous-protein-production-and-delivery-systems-for-Lactococcus-lactis.pdf

[16] Mozzi F, Raya R, Vignolo GM, Love JC. Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel Applications. New Jersey: Wiley Online Library; 2015. [DOI:10.1002/9781118868386]

[17] Hu CX, Xu ZR, Li WF, Dong N, Lu P, Fu LL. Secretory expression of K88 (F4) fimbrial adhesin FaeG by recombinant Lactococcus lactis for oral vaccination and its protective immune response in mice. Biotechnol Lett. 2009; 31(7):991-7. [DOI:10.1007/s10529-009-9966-8] [PMID]

[18] Desmond C, Fitzgerald GF, Stanton C, Ross RP. Improved stress tolerance of GroESL-overproducing Lactococcus lactis and probiotic Lactobacillus paracasei NFBC 338. Appl Environ Microbiol. 2004; 70(10):5929-36. [DOI:10.1128/AEM.70.10.5929-5936.2004] [PMID] [PMCID]

[19] Sasan H. Cloning of EprA1 gene from Aeromonas hydrophila in Lactococcus lactis. Iran J Biotechnol. 2010; 8(3):192-7. http://www.ijbiotech.com/article_7120_464477b340289dbffcc78f80c3a5c492.pdf

[20] Komijani M, Bouzari M, Rahimi F. Detection of TEM, SHV and CTX-M antibiotic resistance genes in escherichia coli isolates from infected wounds. Med Lab J. 2017; 11(2):30-5. http://mlj.goums.ac.ir/article-1-972-en.html

[21] Komijani M, Shahin K, Barazandeh M, Sajadi M. Prevalence of extended-spectrum β-lactamases genes in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Med Lab J. 2018; 12(5):34-41. [DOI:10.29252/mlj.12.5.34]

[22] Shahin K, Bouzari M, Komijani M, Wang R. A new phage cocktail against multidrug, ESBL-Producer isolates of Shigella sonnei and Shigella flexneri with highly efficient bacteriolytic activity. Microb Drug Resist. 2020; 26 (7):831-41. [DOI:10.1089/mdr.2019.0235] [PMID]

[23] Heyman M, Ménard S. Probiotic microorganisms: How they affect intestinal pathophysiology. Cell Mol Life Sci. 2002; 59(7):1151-65. [DOI:10.1007/s00018-002-8494-7] [PMID]

[24] Reese KA, Lupfer C, Johnson RC, Mitev GM, Mullen VM, Geller BL, et al. A novel lactococcal vaccine expressing a peptide from the M2 antigen of H5N2 highly pathogenic avian influenza A virus prolongs survival of vaccinated chickens. Vet Med Int. 2013; 2013:316926. [DOI:10.1155/2013/316926] [PMID] [PMCID]

[25] Bermúdez-Humarán LG, Cortes-Perez NG, Lefèvre F, Guimarães V, Rabot S, Alcocer-Gonzalez JM, et al. A novel mucosal vaccine based on live Lactococci expressing E7 antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16-induced tumors. J Immunol. 2005; 175(11):7297-302. [DOI:10.4049/jimmunol.175.11.7297] [PMID]

[26] Pei H, Liu J, Cheng Y, Sun C, Wang C, Lu Y, et al. Expression of SARS-coronavirus nucleocapsid protein in Escherichia coli and Lactococcus lactis for serodiagnosis and mucosal vaccination. Appl Microbiol Biotechnol. 2005; 68(2):220-7. [DOI:10.1007/s00253-004-1869-y] [PMID] [PMCID]

[27] Bahey-El-Din M, Gahan CG, Griffin BT. Lactococcus lactis as a cell factory for delivery of therapeutic proteins. Curr Gene Ther. 2010; 10(1):34-45. [DOI:10.2174/156652310790945557] [PMID]

[28] de Azevedo MS, Innocentin S, Dorella FA, Rocha CS, Mariat D, Pontes DS, et al. Immunotherapy of allergic diseases using probiotics or recombinant probiotics. J Appl Microbiol. 2013; 115(2):319-33. [DOI:10.1111/jam.12174] [PMID]

[29] Zuercher AW, Weiss M, Holvoet S, Moser M, Moussu H, van Overtvelt L, et al. Lactococcus lactis NCC 2287 alleviates food allergic manifestations in sensitized mice by reducing IL-13 expression specifically in the ileum. Clin Dev Immunol. 2012; 2012:485750. [DOI:10.1155/2012/485750] [PMID] [PMCID]

[30] Steidler L, Rottiers P, Coulie B. Actobiotics™ as a novel method for cytokine delivery. Ann N Y Acad Sci. 2009; 1182(1):135-45. [DOI:10.1111/j.1749-6632.2009.05067.x] [PMID]

[31] Luerce TD, Gomes-Santos AC, Rocha CS, Moreira TG, Cruz DN, Lemos L, et al. Anti-inflammatory effects of Lactococcus lactis NCDO 2118 during the remission period of chemically induced colitis. Gut Pathog. 2014; 6:33. [DOI:10.1186/1757-4749-6-33] [PMID] [PMCID]

[32] Liong MT. Probiotics: A critical review of their potential role as antihypertensives, immune modulators, hypocholesterolemics, and perimenopausal treatments. Nutr Rev. 2007; 65(7):316-28. [DOI:10.1111/j.1753-4887.2007.tb00309.x] [PMID]

[33] Bahey-El-Din M, Gahan CG. Lactococcus lactis -based vaccines: Current status and future perspectives. Hum Vaccin. 2011; 7(1):106-9. [DOI:10.4161/hv.7.1.13631] [PMID]

[34] D'Souza R, Pandeya DR, Hong S-T. Review: Lactococcus lactis: An efficient Gram positive cell factory for the production and secretion of recombinant protein. Biomed Res. 2012; 23(1):1-7. https://www.biomedres.info/biomedical-research/review-lactococcus-lactis-an-efficient-gram-positive-cell-factory-for-the-production-and-secretion-of-recombinant-protein.html

[35] JJørgensen CM, Vrang A, Madsen SM. Recombinant protein expression in Lactococcus lactis using the P170 expression system. FEMS Microbiol Lett. 2014; 351(2):170-8. [DOI:10.1111/1574-6968.12351] [PMID]

[36] Mohseni AH, Razavilar V, Keyvani H, Razavi MR, Khavari-Nejad RA. Oral immunization with recombinant Lactococcus lactis NZ9000 expressing human papillomavirus type 16 E7 antigen and evaluation of its immune effects in female C57BL/6 mice. J Med Virol. 2019; 91(2):296-307. [DOI:10.1002/jmv.25303] [PMID]

[37] Aliramaei MR, Khorasgani MR, Rahmani MR, Zarkesh Esfahani SH, Emamzadeh R. Expression of Helicobacter pylori CagL gene in Lactococcus lactis MG1363 and evaluation of its immunogenicity as an oral vaccine in mice. Microb Pathog. 2019; 142:103926. [DOI:10.1016/j.micpath.2019.103926] [PMID]

[38] Rezaei M, Rabbani Khorasgani M, Zarkesh Esfahani SH, Emamzadeh R, Abtahi H. Production of Brucella melitensis Omp16 protein fused to the human interleukin 2 in Lactococcus lactis MG1363 toward developing a Lactococcus-based vaccine against brucellosis. Can J Microbiol. 2020; 66(1):39-45. [DOI:10.1139/cjm-2019-0261] [PMID]

[39] Shigemori S, Watanabe T, Kudoh K, Ihara M, Nigar S, Yamamoto Y, et al. Oral delivery of Lactococcus lactis that secretes bioactive heme oxygenase-1 alleviates development of acute colitis in mice. Microb Cell Fact. 2015; 14:189. [DOI:10.1186/s12934-015-0378-2] [PMID] [PMCID]

[40] Mantis NJ, Rol N, Corthésy B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. Mucosal Immunol. 2011; 4(6):603-11. [DOI:10.1038/mi.2011.41] [PMID] [PMCID]

[41] Bermúdez-Humarán LG. Lactococcus lactis as a live vector for mucosal delivery of therapeutic proteins. Hum Vaccin. 2009; 5(4):264-7. [DOI:10.4161/hv.5.4.7553] [PMID]

[42] Robert S, Steidler L. Recombinant Lactococcus lactis can make the difference in antigen-specific immune tolerance induction, the type 1 Diabetes case. Microb Cell Fact. 2014; 13 Suppl 1(Suppl 1):S11. [DOI:10.1186/1475-2859-13-S1-S11] [PMID] [PMCID]

[43] Steidler L, Neirynck S, Huyghebaert N, Snoeck V, Vermeire A, Goddeeris B, et al. Biological containment of genetically modified Lactococcus lactis for intestinal delivery of human interleukin 10. Nat Biotechnol. 2003; 21(7):785-9. [DOI:10.1038/nbt840] [PMID]

[44] Bahey-El-Din M, Casey PG, Griffin BT, Gahan CG. Efficacy of a Lactococcus lactis Δ pyrG vaccine delivery platform expressing chromosomally integrated hly from Listeria monocytogenes. Bioeng Bugs. 2010; 1(1):66-74. [DOI:10.4161/bbug.1.1.10284] [PMID] [PMCID]

[45] Xin KQ, Hoshino Y, Toda Y, Igimi S, Kojima Y, Jounai N, et al. Immunogenicity and protective efficacy of orally administered recombinant Lactococcus lactis expressing surface-bound HIV Env. Blood. 2003; 102(1):223-8. [DOI:10.1182/blood-2003-01-0110] [PMID]

[46] Steidler L, Robinson K, Chamberlain L, Schofield KM, Remaut E, Le Page RW, et al. Mucosal delivery of murine Interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of Lactococcus lactis coexpressing antigen and cytokine. Infect Immun. 1998; 66(7):3183-9. [DOI:10.1128/IAI.66.7.3183-3189.1998] [PMID] [PMCID]

[47] Adachi K, Kawana K, Yokoyama T, Fujii T, Tomio A, Miura S, et al. Oral immunization with a Lactobacillus casei vaccine expressing human papillomavirus (HPV) type 16 E7 is an effective strategy to induce mucosal cytotoxic lymphocytes against HPV16 E7. Vaccine. 2010; 28(16):2810-7. [DOI:10.1016/j.vaccine.2010.02.005] [PMID]

[48] Villatoro-Hernandez J, Montes-de-Oca-Luna R, Kuipers OP. Targeting diseases with genetically engineered Lactococcus lactis and its course towards medical translation. Expert Opin Biol Ther. 2011; 11(3):261-7. [DOI:10.1517/14712598.2011.542138] [PMID]

[49] Taghinezhad-S S, Razavilar V, Keyvani H, Razavi MR, Nejadsattari T. Extracellular overproduction of recombinant Iranian HPV-16 E6 oncoprotein in Lactococcus lactis using the NICE system. Future Virol. 2018; 13(10):697-710. [DOI:10.2217/fvl-2018-0026]

[50] Rezaei M, Rabbani-Khorasgani M, Zarkesh-Esfahani SH, Emamzadeh R, Abtahi H. Prediction of the Omp16 Epitopes for the development of an Epitope-based vaccine against Brucellosis. Infect Disord Drug Targets. 2019; 19(1):36-45. [DOI:10.2174/1871526518666180709121653] [PMID]

[51] Mohseni AH, Taghinezhad-S S, Keyvani H, Razavilar V. Extracellular overproduction of E7 oncoprotein of Iranian human papillomavirus type 16 by genetically engineered Lactococcus lactis. BMC Biotechnology. 2019; 19(1):1-3. https://link.springer.com/article/10.1186/s12896-019-0499-5

[52] Rahimi Y, Rabbani-Khorasgani M, Zarkesh-Esfahani SH, Emamzadeh R, Keyvani Amineh H, Rezaei M. [Cloning of immunogenic domain of clostridium difficile toxin B in Lactococcus lactis to develop an oral vaccine based on Lactococcus against Clostridium difficile associated Colitis (Persian)]. J Ilam Univ Med Sci. 2019; 27(4):25-34. [DOI:10.29252/sjimu.27.4.25]

[53] Gu Q, Song D, Zhu M. Oral vaccination of mice against helicobacter pylori with recombinant Lactococcus lactis expressing urease subunit B. FEMS Immunol Med Microbiol. 2009; 56(3):197-203. [DOI:10.1111/j.1574-695X.2009.00566.x] [PMID] [PMCID]

[54] Bahey-El-Din M, Casey PG, Griffin BT, Gahan CG. Lactococcus lactis-expressing listeriolysin O (LLO) provides protection and specific CD8(+) T cells against Listeria monocytogenes in the murine infection model. Vaccine. 2008; 26(41):5304-14. [DOI:10.1016/j.vaccine.2008.07.047] [PMID] [PMCID]

[55] Daniel C, Sebbane F, Poiret S, Goudercourt D, Dewulf J, Mullet C, et al. Protection against Yersinia pseudotuberculosis infection conferred by a Lactococcus lactis mucosal delivery vector secreting LcrV. Vaccine. 2009; 27(8):1141-4. [DOI:10.1016/j.vaccine.2008.12.022] [PMID]

[56] Cheun HI, Kawamoto K, Hiramatsu M, Tamaoki H, Shirahata T, Igimi S, et al. Protective immunity of SpaA-antigen producing Lactococcus lactis against Erysipelothrix rhusiopathiae infection. J Appl Microbiol. 2004; 96(6):1347-53. [DOI:10.1111/j.1365-2672.2004.02283.x] [PMID]

[57] Sim AC, Lin W, Tan GK, Sim MS, Chow VT, Alonso S. Induction of neutralizing antibodies against dengue virus type 2 upon mucosal administration of a recombinant Lactococcus lactis strain expressing envelope domain III antigen. Vaccine. 2008; 26(9):1145-54. [DOI:10.1016/j.vaccine.2007.12.047] [PMID]

[58] Perez CA, Eichwald C, Burrone O, Mendoza D. Rotavirus vp7 antigen produced by Lactococcus lactis induces neutralizing antibodies in mice. J Appl Microbiol. 2005; 99(5):1158-64. [DOI:10.1111/j.1365-2672.2005.02709.x] [PMID]

[59] Li YJ, Ma GP, Li GW, Qiao XY, Ge JW, Tang LJ, et al. Oral vaccination with the porcine rotavirus VP4 outer capsid protein expressed by Lactococcus lactis induces specific antibody production. J Biomed Biotechnol. 2010; 2010:708460. [DOI:10.1155/2010/708460] [PMID] [PMCID]

[60] Tang L, Li Y. Oral immunization of mice with recombinant Lactococcus lactis expressing porcine transmissible gastroenteritis virus spike glycoprotein. Virus Genes. 2009; 39(2):238-45. [DOI:10.1007/s11262-009-0390-x] [PMID] [PMCID]

[61] Zhang ZH, Jiang PH, Li NJ, Shi M, Huang W. Oral vaccination of mice against rodent malaria with recombinant Lactococcus lactis expressing MSP-119. World J Gastroenterol. 2005; 11(44):6975-80. [DOI:10.3748/wjg.v11.i44.6975] [PMID] [PMCID]

[62] Lee P, Faubert GM. Expression of the Giardia lamblia cyst wall protein 2 in Lactococcus lactis. Microbiology (Reading). 2006; 152(Pt 7):1981-1990. [DOI:10.1099/mic.0.28877-0] [PMID]