

Badania roli receptorów Toll-podobnych (TLR) w odpowiedzi żywiciela na inwazję pasożytniczą na tle współczesnej wiedzy o TLR u ssaków i modelowego nicienia *Caenorhabditis elegans*

The investigations of the role of toll-like receptors (TLR) in host response to parasitic infection on the current background regarding TLR in mammals and the model nematode *Caenorhabditis elegans*

Agnieszka Wojtkowiak

Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, ul. Fredry 10, 61-701 Poznań; E-mail: agawojtk@wp.pl

ABSTRACT. Toll-like receptors (TLRs) are amongst the most highly conserved in the evolution of receptor family, being found in both immune and other cells. TLRs were observed in vascular endothelial cells, epithelial cells, microglia cells, adipocytes, and intestinal and renal cells. TLRs plays a key role in the innate immune response to a variety of pathogens. At present, very little is known about the role of TLRs in host defense against parasitic pathogen infections. The first study shows that TLRs contribute to both innate and adaptive immune responses following infection with protozoan parasite *Leishmania major*. The TLRs recognizing PAMPs associated with the parasite *L. major* are essential for the activation of the innate and adaptive immune responses to infection. A study concerning recognition of the role of TLRs in the host-parasite relationship would be an interesting challenge for future study.

Key words: innate and adaptive immune response, PAMP — pathogen associated molecular patterns, parasitic infec-

Receptory Toll-podobne

Układ odpornościowy nadaje kręgowcom zdolność rozróżnienia „swego” od „obcego” i odpowiedzi immunologicznej, dzięki której zwalczają one infekcje wirusów, bakterii i pierwotniaków, a także przeciwstawiają się rozwijającym się w jego obrębie pasożytniczym robakom, uruchamiając szlaki prowadzące do zniszczenia patogenów. Na każdym etapie odpowiedzi immunologicznej istnieje ścisła kooperacja i uzupełnianie się mechanizmów swoistych i nieswoistych. Na powierzchni komórek odpowiedzialnych za szybką reakcję organizmu, a mianowicie komórek dendrytycznych, tucznych

i makrofagów, występują receptory należące do rodziny białek Toll pozwalające na natychmiastowe rozpoczęcie działań obronnych i w wielu przypadkach opanowanie infekcji bez angażowania limfocytów. Przyłączenie odpowiedniego wzorca molekularnego do TLR (Toll like receptor), poprzez skomplikowaną kaskadę transdukcji sygnału do komórki, powoduje szybką aktywację odporności wrodzonej poprzez wzmożenie reakcji zapalnej i pobudzenie wybuchu tlenowego.

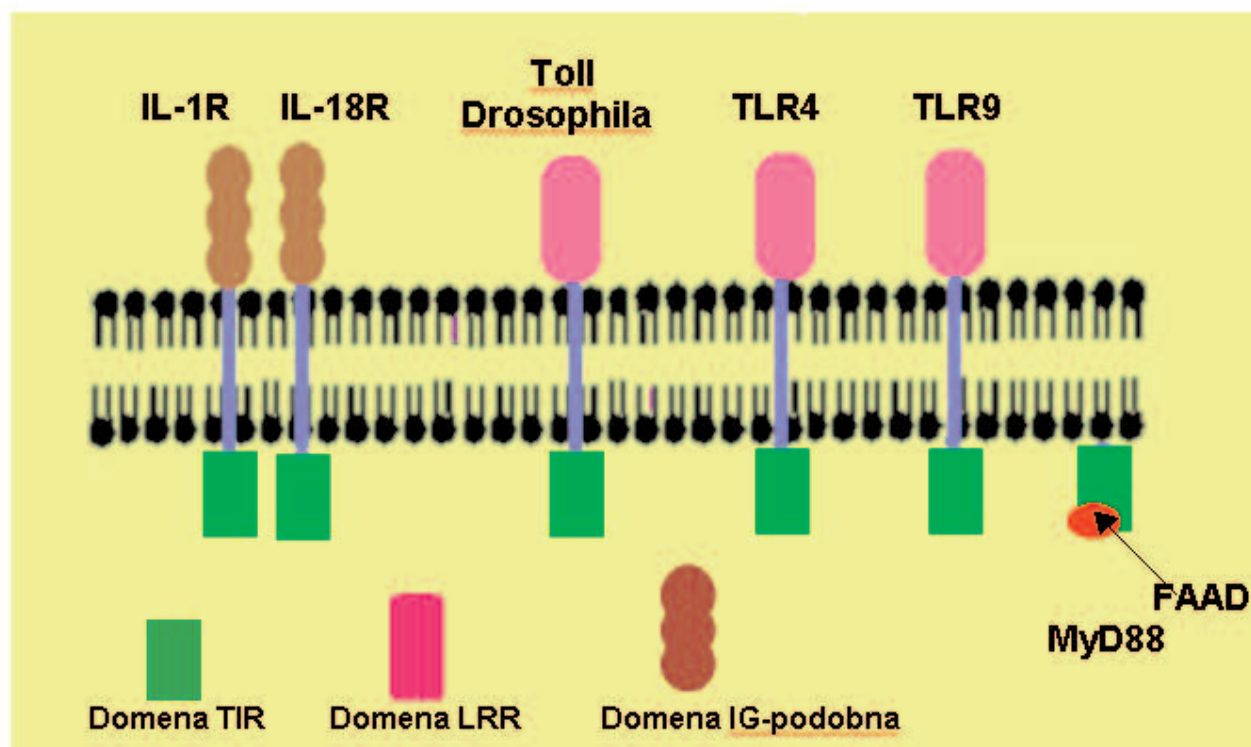
W ostatnich latach naukowcy skupili swoją uwagę na badaniach nad wrodzonym układem immunologicznym jako głównym obrońcą organizmu przed patogenami. Głównym zadaniem tej

odporności jest rozróżnienie charakterystycznych struktur związanych z patogenami (PAMP-pathogen associated molecular patterns, którymi są np. lipopolisacharydy-LPS, lipoproteiny, peptydoglikany, polisacharydy bakterii; receptory dla cząsteczek PAMP nazywamy receptorami rozpoznającymi wzorce — PRR) i szybka odpowiedź organizmu na patogen poprzez uruchomienie mechanizmów efektorowych oraz aktywowanie i orientację odporności nabytej.

Badania nad receptorami Toll rozpoczęły się w latach 80. XX wieku, kiedy odkryto szereg genów i białek biorących udział w polaryzacji grzbietowo-brzusznej larw *Drosophila melanogaster*. Nazwę „toll” przydzielono zmutowanemu genowi kodującemu jeden z receptorów uczestniczących w rozwoju embrionalnym muszek owocowych [1]. W dalszych badaniach stwierdzono znaczącą rolę tego receptora indukującego wytwarzanie przeciw-

grzybiczych drosomycyn oraz przeciwbakteryjnej miedznikowiny w reakcjach obronnych tych owadów. W 1997 zidentyfikowano ludzki gen będący homologiem genu kodującego białko Toll muszki owocowej. Ze względu na podobieństwo do białka Toll, nazwano go Toll-podobnym (Toll like receptor — TLR 4) [2]. Rodzina receptorów Toll należy do nadrodziny białek receptora typu I dla interleukiny IL-1 (IL-1 RI). Część cytoplazmatyczna receptorów Toll jest homologiczna z cytoplazmatyczną domeną receptora dla IL-1, a duże podobieństwo drogi transdukcji sygnału obu receptorów sugeruje, że odpowiedź immunologiczna inicjowana przez Toll receptory może stanowić stary ewolucyjnie mechanizm obrony żywiciela przed patogenami [3].

Rodzina receptorów Toll to transbłonowe białka posiadające dwie charakterystyczne domeny [3]. Zewnątrzkomórkowa domena występująca na końcu N receptora zawiera powtórzenia bogate w leucynę



Rys. 1. Rodzina białek z domeną TIR.

W części zewnątrzkomórkowej białko IL-1R i IL-18R zawiera trzy domeny immunoglobulino-podobne, a białka TLR (np. TLR4 i TLR9) liczne powtórzenia leucynowe (LRR) podobnie jak Toll u *Drosophila melanogaster*. W części cytoplazmatycznej białka wykazują wysoką homologię w domenie TIR. Dodatkowo białko MyD88 oprócz domeny TIR zawiera domenę śmierci — FADD — Fas Associated Death Domain (wg: Gołąb i Jakóbsiak, [30] zmodyfikowane).

Fig. 1. The family of proteins, which share an intracellular domain, called Toll-IL-1R (TIR).

The extracellular domain protein IL-1R and IL-18R contains three immunoglobuline-like domains, and TLR proteins (for example TLR4 and TLR9) of mammals contain extracellular domain with multiple leucine-rich repeats (LRR), similar to Toll in *Drosophila melanogaster*. The cytoplasmic domain proteins display high homology in domain TIR. In addition to domain TIR, protein MyD88 contains Fas associated death domain (FADD) (according to Gołąb and Jakóbsiak, [30] modified).

(leucine-rich repeats, LRR) oraz jeden lub dwa regiony bogate w cysteinę. Wewnątrzkomórkowa domena na końcu C receptora nie ma aktywności enzymatycznej, wykazuje duże podobieństwo do domeny wewnątrzkomórkowej występującej w receptorach dla IL-1 i dlatego nazwano ją Toll/IL-1R (TIR-Toll-Interleukin-1R domain) (Rys. 1.).

Dotychczas zidentyfikowano w genomie muszki owocowej *Drosophila melanogaster* 9 genów kodujących białka należące do rodziny Toll (ponumerowano je kolejno: Toll 1, Toll 2, Toll 3 itd.), a np. 10 genów odkryto w genomie *Anopheles gambiae*. U *Caenorhabditis elegans* odkryto w genomie tylko 1 gen *tol-1* będący homologiem receptora Toll [4]. Białko TOL-1 zlokalizowane jest w układzie nerwowym i przypuszcza się, że białko to może pełnić rolę w zachowaniu się organizmu w sytuacji zagrożenia.

U kręgowców zidentyfikowano 11 funkcjonalnych genów kodujących receptory toll-podobne u myszy i 10 genów u człowieka (oznaczonych kolejno numerami TLR 1, TLR 2, TLR 3 itd.)

Receptory Toll-podobne zidentyfikowano u wielu innych kręgowców np. u *Rattus norvegicus* (szczur), *Xenopus laevis* (żaba szponiasta), czy *Danio rerio* (ryba akwariowa) wykazując znaczącą rolę tych receptorów w układzie odpornościowym, natomiast brakuje dowodów na ich udział w rozwoju embrionalnym (oprócz *Xenopus laevis*, gdzie stwierdzono udział białka MyD88 związanego z receptorami Toll-podobnymi, co nie dowodzi udziału samych receptorów w rozwoju embrionalnym) [5].

Receptory Toll-podobne ulegają ekspresji nie tylko na komórkach limfoidalnych, ale również innych — na przykład TLR 4 ma stosunkowo wysoką ekspresję w sercu człowieka [6], a poziom ekspresji TLR 4 i TLR 2 w płucach myszy wzrasta wraz z jej wiekiem [7]. TLR ulegają ekspresji także w naczyniowych komórkach śródbłonna [8], adypocytach [9], komórkach nerkowych [10], komórkach nabłonkowych, komórkach mikroglejowych [11], komórkach dendrytycznych, komórkach jelitowych [12]. Obecność receptorów TLRs, a mianowicie ich rozpuszczalnych form TLR 2, wykryto w mleku karmiących matek i surowicy krwi. Receptorem o najszerzym występowaniu jest TLR 4, ponieważ wykazano jego ekspresję mRNA na wielu komórkach (monocytach, makrofagach, neutrofilach, komórkach dendrytycznych, komórkach śródbłonna i komórkach nabłonkowych) [3]. Nie ma do tej pory żadnych danych na temat roli TLRs w embriogenezie człowieka, tak jak to wykazano u muszki owocowej.

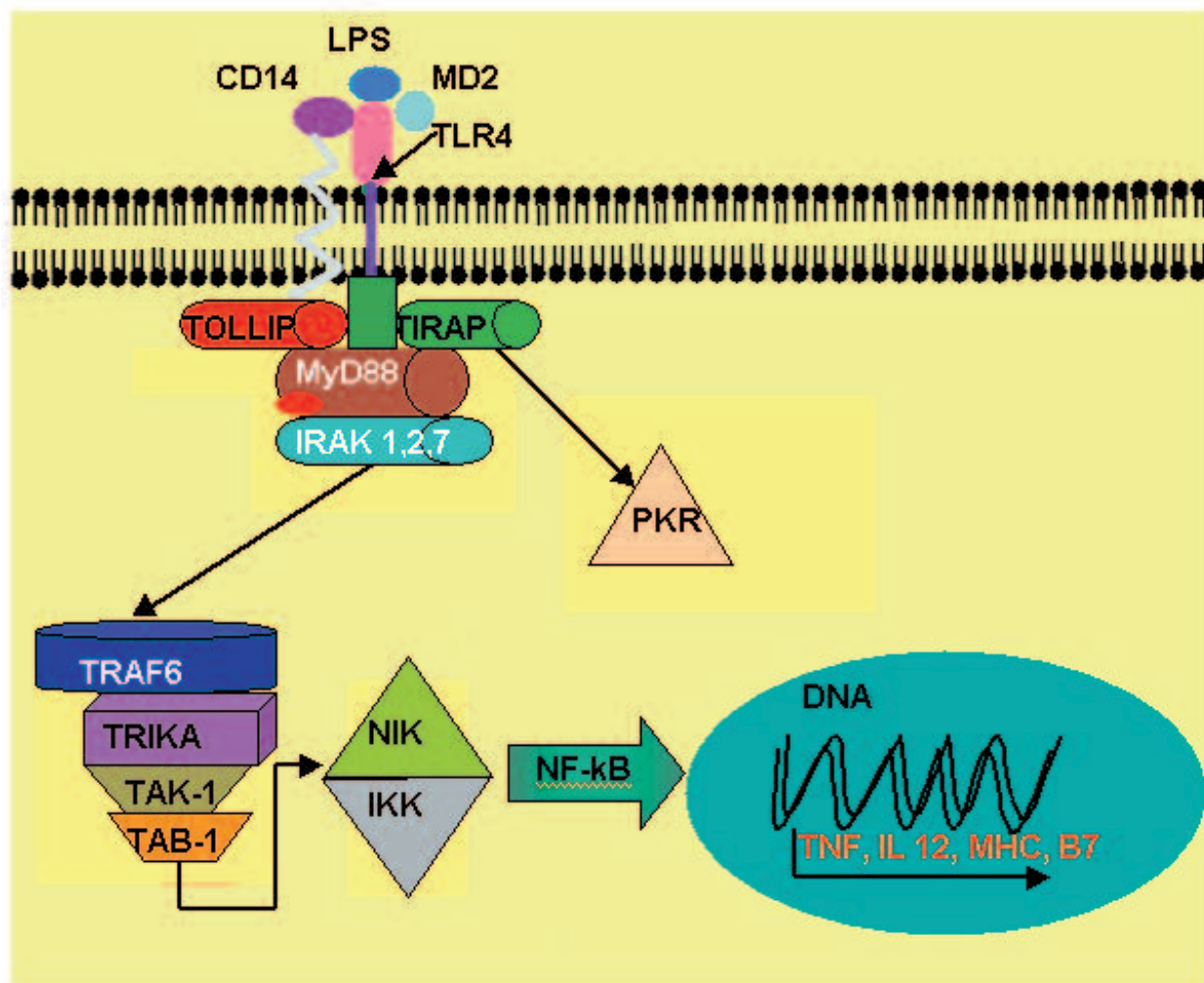
Poznane są też ligandy TLR, które pochodzą głównie z drobnoustrojów (egzogenne), ale także u żywiciela (endogenne). Na przykład TLR 2 jest receptorem dla peptydoglikanów, lipoprotein bakteryjnych oraz zymosanu [13] i kwasu lipoteichojuowego; TLR 3 rozpoznaje wirusową podwójną nić RNA (Poli I:C) [14]; TLR 4 wiąże LPS, kwas lipoteichojuowy i lipid A; TLR 5 rozpoznaje bakterie z flageliną [15]; TLR 6 wraz z TLR 2 są receptorami dla peptydoglikanu, zymosanu, bakterii gram-dodatnich; TLR 7 i TLR 8 rozpoznają pojedynczą wirusową nić RNA (ssRNA) [16], a TLR 9 jest receptorem dla niemetylowanych oligonukleotydów CpG [17]. Ligandami endogennymi są najczęściej białka powstające w czasie uszkodzenia tkanek, stresu komórkowego, a mianowicie TLR 2 jest receptorem dla produktów rozpadu martwych komórek [18], TLR 4 receptorem białek szoku cieplnego (HSP 60, HSP 70, HSP 90 i HSP Gp 96) [19], a TLR 9 wiąże kompleks chromatyna-IgG [20].

Rozpoznanie tych ligandów prowadzi do aktywacji receptora i zaangażowania wielu białek wewnątrz komórki, co prowadzi do przekazania sygnału do jądra komórkowego i ekspresji różnych genów (Rys. 2.).

Dane o TLR wskazują na ich rolę w odpowiedzi immunologicznej, a mianowicie w inicjowaniu procesów zapalnych i naprawczych w przypadku uszkodzenia tkanek/komórek, w sygnalizowaniu zagrożenia infekcją i szybkiej eliminacji patogenów przed powstaniem odpowiedzi nabytej.

Udział drogi Toll-sygnałowej w indukowaniu wrodzonej odpowiedzi immunologicznej u modelowego nicienia *Caenorhabditis elegans*

Interesujące podejście do problemu udziału TLR w odpowiedzi immunologicznej na patogeny prostych organizmów wielokomórkowych, które mają swoje odpowiedniki w organizmach pasożytniczych, jest przedstawione w pracy Pujola i wsp. [4] poświęconej wynikom badań nad tymi strukturami u wolno żyjącego nicienia *Caenorhabditis elegans*. Nicień ten stanowi modelowy organizm w wielu badaniach nad fizjologią nicieni i dlatego warto omówić te badania jako wzorcowe dla analizy udziału TLR w odpowiedzi żywiciela na obecność innych nicieni. W badaniach udziału drogi Toll-sygnałowej w indukowaniu systemu wrodzonej odporności u modelowego nicienia *C. elegans* scha-



Rys. 2. Transdukcja sygnału przez receptor TLR4.

W transdukcji sygnału z udziałem receptora TLR4 najważniejszą rolę odgrywa lipopolisacharyd (LPS), który jest wiązany przez LBP (białka wiążące — białko obecne w surowicy krwi) i następnie przekazuje sygnał noreceptorowi CD14 znajdującemu się na powierzchni makrofagów i limfocytów B. Powstały kompleks TLR4, CD14 dodatkowo stabilizowany przez białko MD-2, przekazuje sygnał na białko adaptorowe MyD88. Białko to, oprócz domeny TIR znajdującej się na C-końcu, posiada na N-końcu „domenę śmierci” (FADD) i TOLLIP (białko oddziałujące z Toll), TIRAP (białko adaptorowe zawierające domenę TIR). Dalej następuje asocjacja z kinazami IRAK 1, 2 i 7 (kinazy aktywujące IL-1R), które aktywują kolejne białka — TRAF6 (czynnik 6 związany z receptorem czynnika martwicy nowotworów). Białko TRAF6 aktywuje kolejną kinazę TRIKA (TRAF 6 — aktywator IKK); TAK-1 (kinaza 1 aktywująca transformujący czynnik wzrostu- β) i TAB-1 (białko 1 wiążące Tak-1), które fosforylują NIK (kinaza indukująca czynnik jądrowy kB) i IKK (kinaza I kappa- β), aktywując czynnik transkrypcyjny (NFkB). NFkB wnika do jądra komórkowego i po przyłączeniu do miejsc promotorowych indukuje między innymi transkrypcję mRNA dla cytokin prozapalnych, IL-12, cząstek kostymulujących B7.1 i B7.2, antygenów głównego kompleksu zgodności tkankowej obydwu klas (wg: Gołąb i Jakóbsiak [30] zmodyfikowane).

Fig. 2. The signal transduct by TLR4 receptore.

In signal transduct by TLR4 an important role plays LPS (lipopolisaccharidae), which is bound by LBP (LPS binding protein — protein present in serum) and next it transfers signal to noreceptore CD14 localized on a surface of macrophages and lymphocytes B. Thus organized complex TLR4-CD14 additionally stabilized by protein MD-2 transfers signal to the adapter protein MyD88 (myeloid-differentation marker, this protein besides domain TIR posses Fas associated death domain — FADD) and TOLLIP (Toll interacting protein), TIRAP (TIR — domain containing adapter protein). Next the association with IL-1R- activating kinases (IRAK 1, 2, 7), which leads to it activation of the another protein — TRAF6 (TNF receptor associated factor 6) takes place. TRAF 6 protein activates another kinases: TRIKA (TRAF-6-regulated IKK activator), TAK 1 (TGF- β activating kinase1) and TAB1 (Tak-1 binding protein1), which after the phosphorylation of NIK (NFkB- inducing kinase) and IKK (I kappa — β kinase) activates nuclear factor kB. NFkB factors penetrate the nucleus where they induce transcription of mRNA for pro-inflammatory cytokines, IL-12, costimulating molecules B7.1 and B7.2, antygene MHC — major histocompatibility complex of both classes (according to Gołąb and Jakóbsiak [30] modified).

rakteryzowano mutanty dla genów homologicznych do genów *Drosophila melanogaster* zaangażowanych w obronę organizmu przed patogenami. Okazało się, że spośród tych genów tylko *tol-1* jest konieczny dla prawidłowego rozwoju nicienia *C. elegans*. Zbadano wpływ temperatury na recesywne homozygotyczne mutanty *tol-1* (mutanty nr 2013 z delecją 690bp w domenie zewnątrzkomórkowej LRR oraz mutanty nr 2033 z delecją 134 aminokwasów w konserwatywnym regionie domeny TIR). W temperaturze 25°C mutanty *tol-1* (2013) są niezdolne do normalnego rozwoju; w tej temperaturze obserwuje się większą liczbę embrionów i nicienie zatrzymują się w rozwoju na etapie zdeformowanych larw. W temperaturze 15°C mniej niż 10% mutantów *tol-1* (2013) rozwija się w postaci dorosłe, które są prawie bezpłodne, podczas gdy większość nicieni zatrzymuje swój rozwój na etapie różnych stadiów rozwojowych i wszystkie one wykazują znaczące defekty w procesie morfogenezy. Mutanty *tol-1* (2033) rozwijają się w płodne postaci dorosłe, ale niewielki procent (<10%) mutantów zatrzymuje się w rozwoju jako larwy lub obumarłe jaja. Potwierdza to fakt, że domena TIR w białku TOL-1 jest w dużej mierze odpowiedzialna za rozwój *C. elegans*.

Interesujące są badania mutantów *Caenorhabditis elegans* pod kątem ich obrony przed patogenami takimi jak: gram-dodatnia bakteria *Microbacterium nematophilum*, gram-ujemna bakteria *Pseudomonas aeruginosa* i *Serratia marcescens* (szczep DB11 i DB1140) oraz grzyb *Drechmeria coniospora*. W przypadku infekcji bakterią *Pseudomonas aeruginosa* i *Microbacterium nematophilum* oraz grzybem *Drechmeria coniospora* nie otrzymano znaczących różnic w odpowiedzi na patogeny pomiędzy dzikim typem *C. elegans* i mutantami *C. elegans* (nr 2013, 2033). Za pomocą nieznanymi mechanizmów nicien *Caenorhabditis elegans* jest zdolny do wychwycenia różnic pomiędzy szczepami bakterii *Serratia marcescens* (DB11 i DB1140). Szczep DB11 bakterii *S. marcescens* silniej zaraża nicienia *C. elegans* od typu dzikiego i szczepu DB1140 czy szczepu bakterii *E. coli* OP50. Mutanty *C. elegans* były bardziej narażone na infekcje bakterią *Serratia marcescens* niż formy dzikie, dlatego sugeruje się, że białko TOL-1 funkcjonuje u nicienia w trakcie odpowiedzi na patogeny.

Autorzy tych badań sugerują, że nicien *C. elegans* rozróżnia szczepy bakterii *S. marcescens* (DB11 i Db1140) za pomocą rozpoznania ich indywidualnych struktur LPS, a białko TOL-1 może być

ich ligandem.

Z przedstawionych badań wynika, że białko TOL-1 jest niezbędne dla rozwoju nicienia, ale funkcjonuje również w rozpoznawaniu patogena, w całkowicie niespodziewany sposób umożliwiając *C. elegans* „ucieczkę” przed potencjalnymi patogenami.

Reakcja obronna żywiciela na inwazje wewnątrzkomórkowym pasożytniczym pierwotniakiem *Leishmania major*

Pierwotniaki i robaki pasożytnicze, a także pasożytnicze stawonogi wykształciły w trakcie ewolucji mechanizmy pozwalające unikać wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej żywiciela. Wiele mikroorganizmów wnika do wnętrza komórek, gdzie znajdują się poza zasięgiem przeciwciał i układu dopełniacza. Na sposób, w jaki układ odpornościowy walczy z zarażeniem wewnątrzkomórkowym, wskazują wyniki badań zarażenia pasożytniczym pierwotniakiem *Leishmania*. Obiektem ataku leishmanii jest makrofag, który pochłania pasożyta i umieszcza go w wakuoli. Następnie wakuole zlewają się z lizosomami zawierającymi enzymy proteolityczne, które potrafią zabić i strawić większość mikroorganizmów. *Leishmania* potrafi przetrwać ten chemiczny atak, przekształca się w nową formę (postać amastigota) i namnaża się w wakuoli, dopóki natężenie infekcji nie przekroczy zdolności adaptacyjnych makrofaga i doprowadzi do jego śmierci [21].

Zdolność układu odpornościowego do pokonywania infekcji pasożytniczym pierwotniakiem *Leishmania* jest niezwykła. W przypadku zarażenia makrofaga przez *L. major* cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej klasy II (MHCII) wiążą się z peptydami pochodzącymi z pasożytów. Te kompleksy cząsteczek MHC i peptydów przemieszczają się na zewnętrzną błonę makrofaga. Następnie subpopulacje limfocytów T CD4, które mają komplementarne cząsteczki receptorów, są pobudzone przez kompleks peptyd-cząsteczka MHC (klasa II) i dodatkowo przez cząsteczkę B7 (zlokalizowaną na powierzchni makrofaga), która jest rozpoznawana przez białko CD28 znajdujące się na powierzchni limfocytów T. Kiedy subpopulacja limfocytów T CD4 otrzyma podwójny sygnał, wydziela ona cytokiny, a mianowicie interferon gamma, czynnik martwicy nowotworów (TNF) i związki chemiczne takie jak tlenek azotu i toksyczne formy tlenu zabijające pasożyty [21].

Wyniki większości badań nad leiszmaniozą prowadzono na myszach, które są wrażliwe na pasożyta *Leishmania major*. Niektóre szczepy myszy BALB/c potrafią zwalczyć doświadczalne zarażenie przez *L. major*, dlatego że subpopulacje limfocytów T CD4 pobudzone antygenami produkują interferon gamma. Natomiast inne szczepy myszy BALB/c nie potrafią pokonać infekcji leiszmanią, a postępujące zmiany prowadzą do śmierci; w takim przypadku subpopulacje limfocytów T CD4 pobudzone antygenami wydzielają interleukinę-4 i interleukinę-10, a nie interferon gamma. Przebieg choroby jest zależny od cytokin wydzielanych przez limfocyty T w odpowiedzi na zakażenie wewnątrzkomórkowe, i dlatego może się różnić u poszczególnych osobników. Dotyczy to także człowieka: u niektórych osób organizm potrafi zwalczyć pasożyta nie ulegając chorobie, a u innych osób infekcje rozwijają się w leiszmaniozę.

Rola TLRs w inicjowaniu odpowiedzi immunologicznej na infekcje pasożytniczym pierwotniakiem *Leishmania major*

Zasadnicza rola TLR w inicjowaniu odpowiedzi immunologicznej na patogeny bakteryjne jest coraz lepiej poznawana, natomiast mało wiadomo o roli TLRs w odpowiedzi organizmu na infekcje patogenami pasożytniczymi. Ostatnio podjęto próby zbadania roli TLRs we wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej po infekcji wewnątrzkomórkowym pasożytem *Leishmania major* [22]. W tych badaniach zarażano myszy typu dzikiego (TLR4^{+/+}) i myszy, które miały homozygotyczną delecję trzech egzonów w genie *tlr4* (TLR4^{0/0}), pasożytem *L. major*. Badania prowadzone od 6 do 10 tygodnia po zarażeniu wykazały, że w 24 h po infekcji u myszy TLR4^{0/0} obecność pasożytów była znacząco statystycznie ($p < 0.05$) wyższa niż u myszy typu dzikiego. Wykazano również ekspresję mRNA iNOS u myszy typu dzikiego i brak ekspresji mRNA iNOS u myszy TLR4^{0/0}; natomiast ekspresja mRNA arginazy 1 zachodziła u myszy obu grup.

Powyższe wstępne wyniki badań nad rolą TLRs w odpowiedzi immunologicznej świadczą o udziale TLR4 we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej na zarażenie myszy pasożytem *L. major*. Dodatkowo w celu określenia udziału TLR4 w specyficznej odpowiedzi na pasożyta prześledzono ilość pasożytów w 5 dniu po infekcji, 28 dniu po infekcji oraz 11 tygodniu. Podczas, gdy ilość pasożytów stale wzrastała do 28 dnia infekcji u myszy TLR4^{0/0}.

u typu dzikiego zmniejszała się. W 11 tygodniu po infekcji nie można było znaleźć pasożytów u myszy typu dzikiego, natomiast u myszy TLR4^{0/0} nadal były obecne. Potwierdza to ponownie, że myszy pozbawione TLR4 nie mogą kontrolować rozwoju pasożyta i zwalczyć skutecznie leiszmaniozy. Dlatego aktywacja TLR4 jest nie tylko decydująca dla wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, ale także zasadnicza dla właściwej, nabytej odpowiedzi immunologicznej na infekcję pasożytniczą *L. major*. Zbadano również poziom wydzielanych cytokin i chemokin u myszy obu grup. Wysoki poziom IL-10, IL-6 i IL-13 wykryto u myszy TLR4^{0/0}, natomiast nie wykryto IL-4. Warto zaznaczyć, że poziom interferonu gamma był wyższy u myszy TLR4^{0/0} niż u typu dzikiego.

W omawianej pracy Kropfa i wsp. [22] przedstawiono również próbę sprawdzenia, czy makrofagi u myszy TLR4^{0/0} stwarzają większe możliwości dla rozwoju pasożyta i czy nieobecność TLR4 wpływa na przeżywalność pasożytów w makrofagach w warunkach *in vitro*. Uzyskane wyniki świadczą, że rozwój *L. major* jest wzmożony w makrofagach aktywowanych cytokinami Th2 u myszy pozbawionych TLR4. Te wyniki potwierdzają tezę, że białko TLR4 na powierzchni makrofagów zmniejsza możliwości rozwojowe dla *L. major*. Pod nieobecność egzogennej cytokin makrofagi u myszy TLR4^{0/0} umożliwiają bardziej skuteczny rozwój pasożyta niż u myszy typu dzikiego. Wynika stąd, że aktywowanie makrofagów typem I cytokin powoduje zabijanie pasożytów, podczas gdy aktywacja typem II cytokin powoduje rozwój pasożyta.

Wewnątrzkomórkowa infekcja leiszmanią powoduje odpowiedź z udziałem komórek typu Th (Th1, Th2) zależnie od ich stanu aktywacji; makrofagi mogą być żywicielem pasożyta albo powodować jego śmierć. Cytokiny wydzielane przez komórki typu Th1 indukują iNOS, podczas gdy cytokiny wydzielane przez komórki typu Th2 indukują arginazę. Indukcja iNOS prowadzi do utleniania aminokwasu L-argininy i późniejszej produkcji cytruliny i tlenku azotu (NO). Synteza NO odpowiada w warunkach *in vitro* i *in vivo* za śmierć *L. major*, a u myszy pozbawionych iNOS zawodzi kontrolowanie infekcji *in vivo*. Cytokiny Th2 promują alternatywną aktywację makrofagów, co powoduje zmniejszenie zdolności zabijania i indukcję podwyższonego poziomu arginazy. Arginaza katalizuje hydrolizę L-argininy do mocznika i L-ornityny — związków później używanych przez pasożyta do syntezy poliamin, które są niezbędne do rozwoju *L.*

major. A więc aktywność tych dwóch enzymów: iNOS i arginazy wg Kropfa i wsp. [22] decyduje o zabijaniu lub rozwoju pasożyta. Aktywacja zarażonych makrofagów przez IL-4 zarówno u myszy typu dzikiego, jak i TLR4^{0/0} indukuje wyższą ekspresję mRNA arginazy 1, podczas gdy makrofagi aktywowane I typem cytokin (IFN- γ + TNF- γ) uzyskują wyższy poziom ekspresji mRNA iNOS zarówno u myszy typu dzikiego, jak i TLR4^{0/0}. Dodatkowo wykazano w warunkach *in vitro*, że makrofagi stymulowane w tych warunkach za pomocą IL-4 indukują podobną aktywność arginazy u myszy szczepu dzikiego i TLR4^{0/0}. Natomiast makrofagi zarażone pasożytem *L. major* i indukowane IL-4 w warunkach *in vitro* mają wyższą aktywność arginazy u myszy TLR4^{0/0} niż u myszy typu dzikiego. Takie wyniki potwierdzają, że przy braku TLR4 aktywowane alternatywnie zarażone makrofagi w warunkach *in vitro* wykazują wyższą aktywność arginazy, co ma zasadnicze znaczenie dla syntezy poliamin niezbędnych dla rozwoju pasożyta.

Podsumowując przedstawione wyniki Kropfa i wsp. [22] można wnioskować, że TLR odgrywają dużą rolę w odpowiedzi żywiciela na infekcję pasożytniczym pierwotniakiem. Po infekcji myszy pasożytem *L. major* białko TLR4 na powierzchni makrofagów bierze udział w obu rodzajach odpowiedzi immunologicznej — wrodzonej i nabytej. Wyższa skuteczność w kontrolowaniu pasożyta *L. major* u myszy ze składnikiem TLR4 już w 1 dniu po infekcji współdziała z ekspresją iNOS w lokalnych miejscach infekcji, a myszy TLR4^{0/0} mniej skutecznie zwalczają leiszmaniozę. Alternatywnie aktywowane makrofagi były bardziej podatne na rozwój pasożyta przy braku TLR4 w warunkach *in vitro* i wiązało się to z aktywnością arginazy. Badania te wskazują, że równowaga pomiędzy aktywnością arginazy i iNOS jest znaczącym mechanizmem kontroli funkcjonowania makrofagów. Interesujące jest, że LPS po połączeniu z TLR4 powoduje indukcję IFN α/β i wczesną ekspresję iNOS. IFN α/β pełni ochronną rolę w eksperymentalnej leiszmaniozie, bo skuteczne kontrolowanie infekcji w przypadku *L. major* po części wiąże się z udziałem TLR4, który pośredniczy we wczesnej indukcji IFN α/β . Z przebadanego udziału cytokin wynika, że IL-10 tworzy synergizm z IL-4 w trakcie infekcji w podwyższeniu aktywności arginazy 1 w warunkach *in vitro*. Potwierdzają to również prace Mundera i wsp. [23, 24] wskazując, że ekspresja arginazy 1 jest indukowana przez IL-4 i IL-13, i że IL-10 wykazuje synergizm z cytokinami Th2 w procesie indukcji argina-

zy w warunkach *in vitro*. Stwierdzenie, że makrofagi alternatywnie aktywowane pasożytem *L. major* u myszy z brakiem TLR4^{0/0} miały w warunkach *in vitro* podwyższoną aktywność arginazy sugeruje, że TLR4 jest pośrednikiem sygnałowego modulowania funkcji makrofagów na rzecz procedury kończącej się zabijaniem pasożyta.

W pracy Kropfa i wsp. [22] przedstawiono także udział MCP-1 w infekcji pasożytem *L. major*, a wyniki badań świadczą o tym, że wyższy poziom MCP-1 u myszy TLR4^{0/0} wiąże się z wyraźniej intensywniejszą odpowiedzią typu Th2, mniej skuteczną kontrolą replikacji pasożyta i zwalczaniem leiszmaniozy. O roli MCP-1 w tworzeniu synergizmu z IFN- γ w inicjowaniu zabijania pasożytów w warunkach *in vitro* świadczy fakt, że myszy, które są niezdolne do ekspresji receptora CCR2, liganda MCP-1, są wrażliwe na infekcje *L. major*, podczas gdy podwyższony poziom MCP-1 znajdowano u pacjentów z samowyleczeniem leiszmaniozy [25].

Dotychczasowe wyniki badań różnych autorów potwierdzają tezę, że TLR4 pomaga makrofagom bardziej skutecznie zabijać wewnątrzkomórkowego pasożyta *L. major* i kontrolować aktywność arginazy, co w efekcie można nazwać balansowaniem odpowiedzią Th1 i Th2. Rzeczywiście sygnalizowanie poprzez TLRs łączy się z indukcją odpowiedzi Th1, a brak sygnału z indukcją odpowiedzi Th2 [26]. Chociaż wyniki pokazują, że TLR4 ma udział w skutecznym kontrolowaniu pasożyta *L. major* podczas obu: wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej, nie można wykluczyć, że naturalne mutacje w *locus* genu *tlr4* prowadzą do zmiany w odpowiedzi wpływającej na przeżycie pasożyta [27].

TLR 4 nie tylko oddziałuje z PAMPs, ale również może rozpoznawać endogenne ligandy, takie jak białka szoku termicznego [28] i wewnątrzkomórkowe składniki macierzy [29]. Na podstawie dotychczasowych badań nie można zdecydować, czy aktywacja TLR po infekcji pasożytem *L. major* jest spowodowana rozpoznaniem pasożytniczych PAMPs czy wiąże się to z oddziaływaniem z endogennymi ligandami.

Wydaje się, że TLRs mogą reprezentować potencjalne nowe punkty uchwytu dla aktywacji nabytej odpowiedzi immunologicznej, a ich agoniści mogą mieć zastosowanie w zapobieganiu i leczeniu leiszmaniozy.

Dalsze badania nad poznaniem udziału drogi transdukcji Toll-sygnałowej w reakcji na wiele różnych infekcji mogą okazać się niezwykle interesują-

ce. Zarówno poznawanie nowych struktur (takich jak TLR), jak i poszczególnych reakcji biochemicznych (np. z udziałem iNOS czy arginazy) w tej wzajemnej grze pasożyt-żywicieli i rozważanie jej zarówno z pozycji żywiciela, jak i pasożyta, jest wyzwaniem na nadchodzące lata.

Podziękowania

Serdecznie dziękuję Pani Prof. Krystynie Bochoń za zasugerowanie tytułu pracy oraz krytyczne i wnikliwie uwagi.

Literatura

- [1] Hashimoto C., Hudson K.L., Anderson K.V. 1988. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52: 269–279.
- [2] Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388: 394–397.
- [3] Szczepański M.J., Góralski M., Lisewska I.M., Samara H., Żeromski J. 2004. Rola receptorów Toll-podobnych w odporności. *Postępy Biologii Komórki* 31: 543–561.
- [4] Pujol N., Lind E.M., Lin L.X., Kurz C.L., Alloing G., Tan M-W., Ray K.P., Solari R., Johnson C.D., Ewbank J.J. 2001. A reverse genetic analysis of components of Toll signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology* 11: 809–821.
- [5] Prothmann C., Armstrong N.J., Rupp R.A.W. 2000. The Toll/IL-1 receptor binding protein MyD88 is required for *Xenopus* axis formation. *Mechanism of Development* 97: 85–92.
- [6] Frantz S., Kobzik L., Kim Y-D., Fukazawa R., Medzhitov R., Lee R.T., Kelly R.A. 1999. Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *The Journal of Clinical Investigation* 104: 271–280.
- [7] Harju K., Glumoff V., Hallman M. 2001. Ontogeny of Toll-like receptors Tlr2 and Tlr4 in mice. *Pediatric Research* 49: 81–83.
- [8] Hijiya N., Miyake K., Akashi S., Matsuura K., Higuchi Y., Yamamoto S. 2002. Possible involvement of toll-like receptor 4 in endothelial cell activation of larger vessels in response to lipopolysaccharide. *Pathobiology* 70: 18–25.
- [9] Lin Y., Lee H., Berg A.H., Lisanti M.P., Shapiroand L., Scherer P.E. 2000. The lipopolysaccharide-activated Toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 24255–24263.
- [10] Tsuboi N., Yoshikai Y., Matsuo S., Kikuchi T., Iwami K.I., Nagai Y., Takeuchi O., Akira S., Matsuguchi T. 2002. Roles of Toll-like 4 receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells. *The Journal of Immunology* 169: 2026–2033.
- [11] Bsibsi M., Ravid R., Gveric D., van Noort J.M. 2002. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 61: 1013–1021.
- [12] Ortega-Cava C.F., Ishihara S.M., Rumi A.K., Kawashima K., Ishimura N., Kazumori H., Udagawa J., Kadowaki Y., Kinoshita Y. 2003. Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut. *The Journal and Immunology* 170: 3977–3985.
- [13] Underhill D.M., Ozinsky A., Hajjar A.M., Stevens A., Wilson C.B., Bassetti M., Aderem A. 1999. The Toll like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401: 811–815.
- [14] Johansen P., Senti G., Martinez Gomez J.M., T. Storni T., von Beust B.R., Wuthrich B., Bot A., Kundig T.M. 2005. Toll-like receptor ligands as adjuvants in allergen-specific immunotherapy. *Clinical and Experimental Allergy* 35: 1591–1598.
- [15] Hayashi F., Smith K.D., Ozinsky A., Hawn T.R., Yi E.C., Goodlett D.R., Eng J.K., Akira S., Underhill D.M., Aderem A. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410: 1099–1103.
- [16] Heil F., Hemmi H., Hochrein H., Ampenberger F., Kirschning C., Akira S., Lipford G., Wagner H., Bauer S. 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303: 1526–1529.
- [17] Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740–745.
- [18] Sauter B., Albert M.L., Francisco L., Larsson M.L., Somersan S., Bhardwaj N. 2000. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine* 191: 423–434.
- [19] Vabulas R.M., Braedel S., Hilf N., Singh-Jasuja H., Herter S., Ahmad-Nejad P., Kirsch-Ning C.J., Da Costa C., Rammensee H.G., Wagner H., Schild H. 2002. The endoplasmic reticulumresident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *Journal of Biological Chemistry* 277: 20847–20853.
- [20] Leadbetter E.A., Rifkin I.R., Hohlbaum A.M., Beaudette B.C., Shlomchik M.J., Marshak-Rothstein A. 2002. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 416: 603–607.
- [21] Paul W.E. 1993. Choroby zakaźne a układ odpornościowy. *Świat Nauki* 11: 59–65.

- [22] Kropf P., Freudenberg M.A., Modolell M., Price H.P., Herath S., Antoniazzi S., Galanos Ch., Smithand D.F., Muller I. 2004. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infection and Immunity* 72: 1920–1928.
- [23] Munder M., Eichman K., Modolell M. 1998. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD 4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *The Journal of Immunology* 160: 5347–5354.
- [24] Munder M., Eichman K., Moran J.M., Centeno F., Soler G., Modolell M. 1999. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *The Journal of Immunology* 163: 3771–3777.
- [25] Ritter U., Moll H., Laskay T., Brocker E., Velazco O., Becker I., Gillitzer R. 1996. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases* 173: 699–709.
- [26] Schnare M., Barton G.M., Czopik Holt A., Takeda K., Akira S., Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nature Immunology* 2: 947–950.
- [27] Poltorak A., Smirnova I., Clisch R., Beutler B. 2000. Limits of a deletion spanning Tlr4 in C57/BL/10 ScrCr mice. *Journal of Endotoxin Research* 6: 51–56.
- [28] Ohashi K., Burkart V., Flohe S., Kolb H. 2000. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the Toll-like receptor-4 complex. *The Journal of Immunology* 164: 558–561.
- [29] Termeer C., Bendix F., Sleemann K., Fieber C., Voith U., Ahrens T., Miyake K., Freudenberg M., Galanos C., Simon J.C. 2002. Oligosaccharides of hyaluronan activate dendritic cells via Toll-like receptor 4. *The Journal of Experimental Medicine* 195: 99–111.
- [30] Gołab J., Jakóbsiak M. 2000. Immunologia PWN.

Wpłynęło 28 sierpnia 2006

Zaakceptowano 12 lutego 2007