

DOMINIK LENART, MAGDALENA DRUSZCZYŃSKA

Zakład Immunologii Komórkowej
Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej
Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
Banacha 12/16, 90-237 Łódź
E-mail: dominik_lenart@wp.pl

TLR11 — RECEPTOR DLA PROFILINY I FLAGELINY

RECEPTORY TOLL-PODOBNE

Receptory Toll-podobne (ang. Toll-like receptors, TLR) są błonowymi glikoproteinami o masie cząsteczkowej 90–115 kDa, które rozpoznają wzorce molekularne patogenów (ang. pathogen associated molecular patterns, PAMPs). Receptory te, wraz z innymi cząsteczkami z grupy PRR (ang. pattern recognition receptors), jako pierwsze reagują na wnikające do ustroju mikroorganizmy (CHANG 2010, BOTOS i współaut. 2011). Najczęściej cząsteczki te spotykane są na komórkach układu immunologicznego takich jak: neutrofile, monocyty/makrofagi, komórki dendrytyczne, komórki NK, indukując ich określoną odpowiedź po związaniu swoistego ligandu. Niektóre z receptorów TLR ulegają silnej ekspresji na limfocytach B i T oraz na komórkach nabłonka i śródbłonka, keratynocytach, fibroblastach, a także komórkach nowotworowych (CHANG 2010, BOTOS i współaut. 2011).

„Toll” w języku niemieckim oznacza „niesamowity”. Nazwa ta została zaproponowana dla receptora w 1985 r. przez Christiane Nüsslein-Volhard po odkryciu niespotykanego wcześniej wyglądu stadium rozwoju embrionalnego *Drosophila melanogaster*, muszki owocowej, której część brzuszna ciała była znacznie opóźniona w rozwoju w stosunku do reszty ciała. Po upływie dekady od tego odkrycia, zauważono, że receptory TLR są również niezbędne do powstania prawidłowej

odpowiedzi przeciwgrzybiczej u *D. melanogaster* (MAJEWSKA i współaut. 1996).

Dotychczas odkryto i opisano 13 receptorów TLR, z których dziesięć (TLR 1-10) występuje u ludzi, a dwanaście u myszy (TLR 1-9, TLR 11-13) (Tabela 1). W strukturze każdego receptora TLR wyróżnia się trzy części:

- C-końcową domenę cytoplazmatyczną TIR (Toll-IL-1-receptor) o dużej homologii do receptora dla IL-1, odpowiedzialną za transdukcję sygnału do wnętrza komórki;

- pojedynczą przezbłonową α -helisę zbudowaną głównie z aminokwasów zasadowych. W przypadku receptorów Toll-like wiążących kwasy nukleinowe helisa ta jest rozpoznawana przez białko UNC93B, co skutkuje transportem tych TLR do endosomów;

- N-końcową domenę rozpoznającą ligandy, zbudowaną z 19-25 powtórzeń bogatych w leucynę (ang. leucine rich repeats, LRR), o długości około 22-29 aminokwasów. Motyw ten spotykany jest w wielu białkach zwierzęcych, roślinnych oraz występujących u drobnoustrojów. LRR formują strukturę przypominającą kształtem podkowę, której wklęsła część odpowiada za wiązanie PAMPs (BOTOS i współaut. 2011) (Ryc. 1).

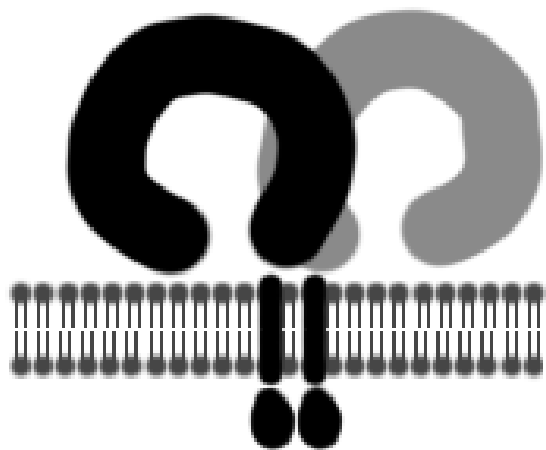
Na podstawie podobieństwa molekularnego poszczególnych receptorów TLR wyodrębnia się sześć głównych rodzin tych cząsteczek (TLR1, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR11). Receptory tworzące jedną rodzinę cechują się zbliżoną długością jednostek w

Tabela 1. Lokalizacja receptorów Toll-podobnych u człowieka i myszy (ROACH i współaut. 2005, KUMAR i współaut. 2009).

Receptor	Człowiek	Mysz	Zewnątrzkomórkowy	Wewnątrzkomórkowy
TLR1	✓	✓	✓	
TLR2	✓	✓	✓	
TLR3	✓	✓		✓
TLR4	✓	✓	✓	
TLR5	✓	✓	✓	
TLR6	✓	✓	✓	
TLR7	✓	✓		✓
TLR8	✓	✓		✓
TLR9	✓	✓		✓
TLR10	✓		✓	
TLR11		✓		✓
TLR12		✓	✓	
TLR13		✓	Brak danych	

obrębie LRR, a także rodzajem rozpoznawanych ligandów. Dla przykładu, domena zewnątrzkomórkowa receptorów rodziny TLR1 zbudowana jest z mniej niż 600 aminokwasów, a rodziny TLR7 z ponad 800. Nazwa każdej rodziny została utworzona od nazwy TLR o najniższym numerze, który do niej przynależy (ROACH i współaut. 2005). Każda z wyróżnionych rodzin TLR rozpoznaje związki konserwatywne ewolucyjnie, takie jak np.: peptydoglikan (PGN), lipopolisacharyd (LPS), czy CpG DNA (ROACH i współaut. 2005) (Tabela 2). Rodzina TLR1, do której należą TLR1, TLR2, TLR6, TLR10, rozpoznaje ligandy lipopeptydowe. Wszystkie receptory w obrębie tej rodziny funkcjonują jako heterodimery połączone z TLR2. Receptor TLR1 wiąże m.in. PGN i LPS, TLR2 - lipoproteiny i glikolipidy bak-

teryjne, PGN, kwasy lipotejchajowe (LTA) bakterii Gram-dodatnich, poryny *Neisseria*, zymosan grzybów i hemaglutyninę wirusa odry. TLR6 rozpoznaje szeroką gamę cząstek charakterystycznych dla bakterii i grzybów, w tym PGN, LTA i lipopeptydy. Nie zidentyfikowano dotychczas ligandów wiązanych przez receptor TLR10, który tworzy heterodimery z TLR1 i TLR2 i prawdopodobnie jest koreceptorem dla TLR2 (CHANG 2010). Trzy rodziny TLR zawierają tylko po jednym receptorze: TLR3, TLR4 i TLR5. TLR3 stymuluje układ odpornościowy po związaniu wirusowego dwuniciowego DNA oraz LPS bakterii Gram-ujemnych. TLR4, współpracujący z glikoproteiną adaptorową MD-2 i receptorem makrofagów CD14, jest głównym receptorem biorącym udział w rozpoznawaniu LPS i inicjowaniu stanu zapalnego. Po utworzeniu kompleksu z cząsteczką CD14 receptor TLR4 może rozpoznawać również PGN, antygeny fimbriowe, kwasy uronowe bakterii Gram-dodatnich, białka szoku cieplnego oraz białka wirusa RSV. Dotychczas odkryto tylko jeden ligand dla TLR5, którym jest flagelina bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich. W skład rodziny TLR7 wchodzi receptor TLR7, TLR8, TLR9 rozpoznające kwasy nukleinowe i cząsteczki bazujące na strukturze hemu (ROACH i współaut. 2005). Receptory TLR7 i TLR8 rozpoznają jednociowe RNA wirusów, podczas gdy TLR9 rozpoznaje DNA wirusów i bakterii. Wszystkie receptory z rodziny TLR7, wraz z TLR3 znajdują się w błonie endosomów. Do rodziny TLR11 należą TLR11, TLR12 i TLR13. TLR11 aktywuje układ odpornościowy po związaniu flageliny patogennych *Salmonella* i



Ryc. 1. Budowa strukturalna receptorów TLR.

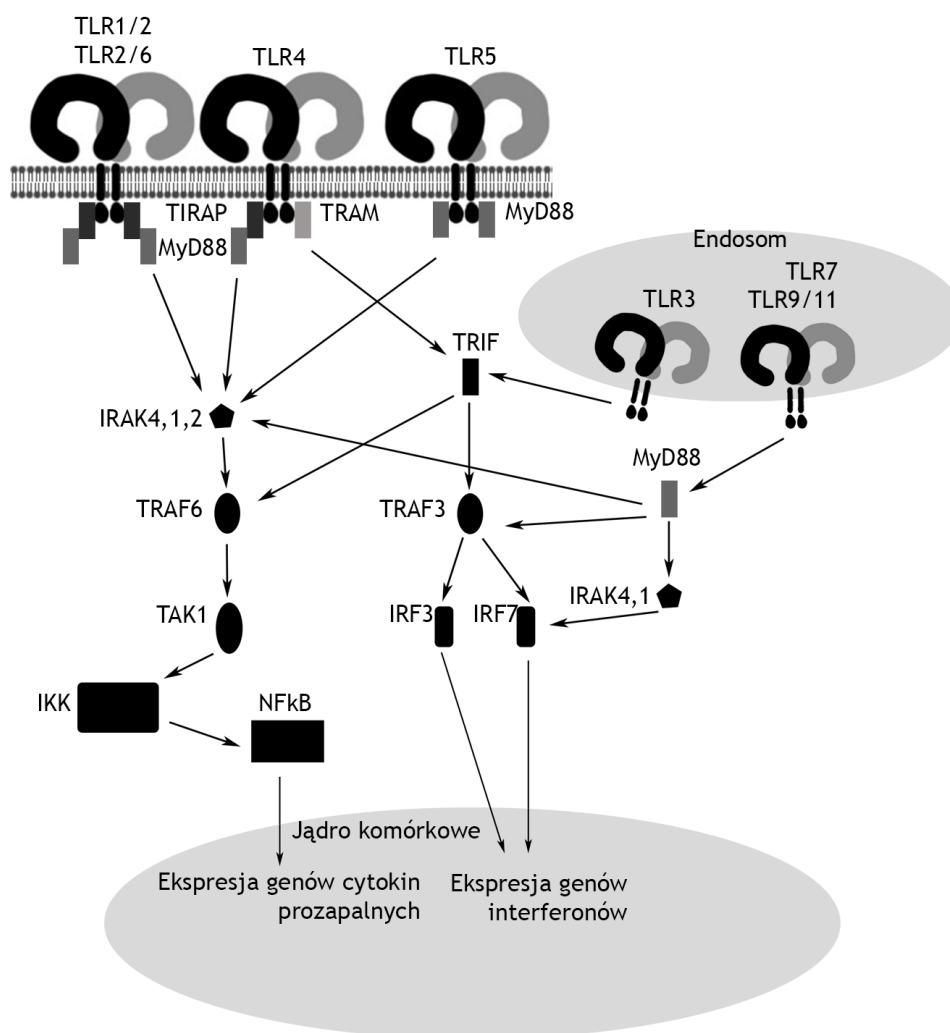
Tabela 2. Receptory TLR oraz ich ligandy (DEPTUŁA i i współaut. 2006, MAJEWSKA i SZCZEPANIK 2006).

Rodzina	Receptor	PAMP	Pochodzenie	
TLR1	TLR1	Peptydoglikan (PGN), lipoarabinomanan, lipopeptydy, lipoproteiny, modulina, LPS	<i>Mycobacterium</i> i inne	
		Lipoproteiny	<i>Neisseria meningitidis</i>	
		Lipoproteiny	Bakterie	
	TLR2	TLR2	Glikolipidy	Bakterie
			PGN, LTA	Bakterie Gram-dodatnie
		Zymosan	Grzyby	
		Hemaglutynina	Wirus odry	
	TLR2/TLR6 heterodimer	TLR2/TLR6 heterodimer	Poryny	<i>Neisseria</i> sp.
			HSP70	Komórki gospodarza
		MALP-2, białka tuberkulinowe	<i>Mycobacterium</i>	
Zymosan		Drożdże		
PGN		Bakterie Gram-dodatnie		
TLR6	TLR6	Modulina	<i>Staphylococcus</i> sp.	
		PGN, LTA, modulina, lipoproteiny	Bakterie Gram-dodatnie	
TLR10	TLR10	Składniki ściany komórkowej	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
		Lipopeptydy	Mykoplazmy	
TLR3	TLR3	Brak znanych ligandów		
		dsRNA	Wirusy	
		LPS	Bakterie Gram-ujemne	
TLR4	TLR4	poly(I:C)	Syntetyczne	
		LPS	Bakterie Gram-ujemne	
		HSP	Bakterie	
		Fibrynogen	Człowiek	
		Białka fuzyjne RSV	Wirus RSV	
TLR5	TLR5	LTA, białka fimbrii	Bakterie Gram-dodatnie	
		Flagelina	Bakterie Gram-ujemne i Gram-dodatnie	
TLR7	TLR7, TLR8	SsRNA	Wirusy	
	TLR9	Niemetylowane CpG DNA	Bakterie i wirusy	
TLR11	TLR11	Profilina	<i>Toxoplasma gondii</i>	
		Flagelina	UPEC, <i>Salmonella</i>	
	TLR12	Profilina	<i>Toxoplasma gondii</i>	
	TLR13	23s RNA	Bakterie	

profiliny *Toxoplasma gondii*. TLR12 tworzy heterodimer z TLR11 i uczestniczy w rozpoznawaniu profiliny (ANDRADE i współaut. 2013). TLR13 rozpoznaje 23sRNA bakterii (OLDENBURG i współaut. 2012).

Receptory TLR występują w postaci dimerów, w tym w większości jako homodimery. Przykładem heterodimeru jest receptor TLR1, który wiąże ligandy i przekazuje sygnał aktywacji do wnętrza komórki we współpracy z cząsteczką TLR2. Receptor TLR2 tworzy również heterodimery z TLR6 oraz innymi cząstkami nie należącymi do grupy TLR, takimi jak CD14 i CD36 (CHANG 2010).

Przekazywanie wewnątrzkomórkowych sygnałów z TLR może odbywać się dwiema drogami. W jednej z nich, powszechnie nazywanej drogą MyD88-zależną, uczestniczą dwa białka adaptorowe zawierające domenę TIR: MyD88 (ang. myleoid differentiation factor 88) i TIRAP/Mal (ang. MyD88 adaptor-like protein). Białko MyD88 jest niezbędne do indukcji reakcji zapalnej rozwijanej na skutek aktywacji receptorów z rodzin: TLR1, TLR3, TLR5, TLR7 oraz TLR11. Wzajemne interakcje domen TIR receptorów Toll-like i białka MyD88 oraz zlokalizowanej na N-końcu białka MyD88 domeny śmierci (ang. death



Ryc. 2. Proces wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnałów po aktywacji receptorów TLR.

domain) i kinazy IRAK4 indukują autofosforylację tego enzymu. IRAK4 jest jednym z czterech białek należących do rodziny kinaz serynowo-treoninowych, które po aktywacji fosforyluje kolejną kinazę zwaną IRAK1. Równocześnie z aktywacją kinaz IRAK następuje rekrutacja receptorowego kompleksu białka TRAF6. Ufosforylowana kinaza IRAK1 wraz ze związanym z nią TRAF6 oddziela się od receptora, a następnie wiąże się z kompleksem składającym się z kinazy TAK1 oraz dwóch białek TAB1 i TAB2. Nieaktywny kompleks zostaje związany z błoną komórkową. Po przyłączeniu się białek IRAK1 i TRAF6 do kompleksu następuje jego uwolnienie z błony, z wyjątkiem kinazy IRAK1, która ulega degradacji. W cytoplazmie następuje przyłączenie ubikwityn do TRAF6, które powodują aktywację kinazy TAK1. Aktywna kinaza TAK1 fosforyluje i aktywuje kompleks trzech podjednostek IκK: dwóch podjedno-

stek katalitycznych IκKα, IκKβ i jednej podjednostki regulacyjnej NEMO/IκKγ oraz kinazę MKK6. Kompleks IκK fosforyluje białko rodziny inhibitorów NFκB – Iκβ, co powoduje jego rozpad i uwolnienie czynnika transkrypcyjnego NF-κB, który przedostaje się do jądra komórkowego. Ponadto, kinaza MKK6 aktywuje enzymy należące do rodziny MAP, włączających następnie czynnik transkrypcyjny AP-1.

W alternatywnej drodze aktywacji receptorów TLR, zwanej drogą MyD88-niezależną, uczestniczą zawierające domenę TIR białka: TRIF (ang. TIR-domain containing adaptor inducing interferon-β, TICAM1) oraz TRAM (TRIF-related adapter molecule; TICAM-2) (Ryc. 2). Przykładem receptora przekazującego sygnał na drodze alternatywnej jest TLR3, który wykorzystuje białko TRIF zamiast MyD88. Kaskada sygnałów indukowana przez TRIF prowadzi do opóźnionej w stosunku do

drogi MyD88-zależnej produkcji cytokin prozapalnych oraz interferonu β . Warto zauważyć, że niektóre receptory, np. TLR4, mogą aktywować zarówno drogę MyD88-zależną, jak i MyD88-niezależną (KUMAR i współaut. 2009, CHANG 2010).

Efektom końcowym aktywacji receptorów TLR występujących na powierzchni makrofagów jest zwiększenie syntezy cytokin prozapalnych, takich jak IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 i TNF- α , zwiększenie zdolności fagocytarnych oraz nasilone powstawanie reaktywnych form tlenu i azotu. Zapoczątkowana przez receptory TLR aktywacja komórek, np. komórek dendrytycznych i makrofagów, powoduje też zwiększoną ekspresję cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej (ang. major histocompatibility complex, MHC) klasy I i II, a także cząstek kostymulujących CD80 i CD86, czego konsekwencją jest ułatwiona prezentacja antygenów limfocytom T (CHANG 2010).

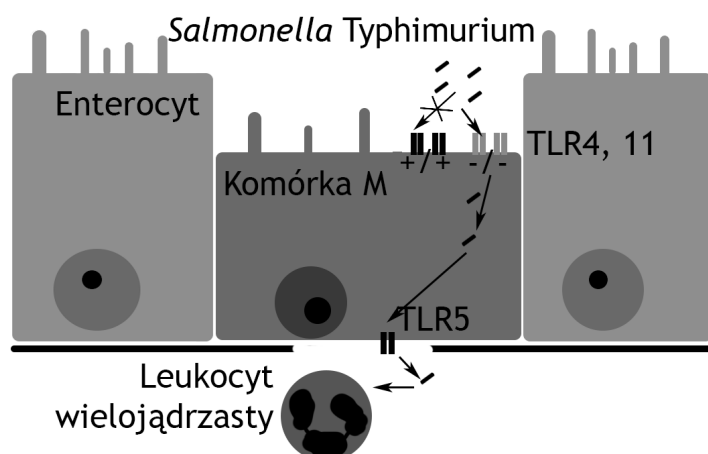
Rodzina TLR11, do której należą receptory TLR11, 12 i 13 nie występuje u ludzi. Nie ustalono wspólnych struktur PAMP rozpoznawanych przez receptory należące do tej rodziny, jednak dużo wskazuje na współdzielenie agonistów pomiędzy receptorem 11 i 12 oraz na ich obligatoryjną heterodimeryzację w rozpoznawaniu profiliny *Toxoplasma gondii* (ZHANG i współaut. 2004, ANDRADE i współaut. 2013). Obecność receptorów TLR11 stwierdzono w błonie endosomów mysich komórek dendrytycznych, makrofagów, komórek nabłonka jelita cienkiego, pęcherza moczowego i nerek (YAROVINSKY i współaut. 2005, PIFER i współaut. 2011, MATTHUR i współaut. 2012). W genomie ludzkim w obrębie genu kodującego ten receptor występują kodony stop, co skutkuje brakiem ekspresji tego receptora u ludzi (ROACH i współaut. 2005).

TLR11 JAKO RECEPTOR DLA FLAGELINY *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR TYPHIMURIUM

Flagelina jest elementem składowym bakteryjnych wici rozpoznawanym przez receptor TLR11. Wici są jednym z czynników wirulencji bakterii, w których budowie można wyróżnić trzy elementy: (1) ciało podstawowe, które posiada zdolność wzbudzania ruchu wici, (2) hak oraz (3) pusty w środku helikalny filament zbudowany z polimeru flageliny. Monomery flageliny ulegają polimeryzacji na końcu wici, gdzie docierają przez kanał znajdujący się w jej środku. Czapeczka na końcu wici pełni rolę w polimeryzacji i zapobiega uwolnieniu podjednostek do środowiska. W budowie flageliny można wyróżnić cztery domeny: D0 i D1, tworzące α -helisę zlokalizowaną wewnątrz wici, oraz hiper-zmienne domeny D2 i D3, tworzące β -harmonijkę znajdującą się na powierzchni wici. Domena D1 jest rozpoznawana przez receptor TLR5, natomiast domeny hiper-zmienne nie biorą udziału w tej interakcji (EAVES-PYLES i współaut. 2001). Istotne jest, że tylko monomery flageliny są rozpoznawane przez receptor TLR5 (SMITH i współaut. 2003). Nie zostało jeszcze zbadane, które z domen flageliny są rozpoznawane przez TLR11.

Wyniki licznych badań wskazują na rozpoznawanie przez receptor TLR11 flageliny pałeczek z rodzaju *Salmonella*, względnie bez-tlenowych, Gram-ujemnych bakterii z rodziny

Enterobacteriaceae. Według WHO, infekcje wywołwane przez *Salmonella* u ludzi można podzielić na trzy grupy: (1) dur brzuszny wywołwany przez *S. enterica* serovar Typhi, (2) dur rzekomy wywołwany przez *S. enterica* serovar Paratyphi, (3) biegunki wywołwane przez NTS (ang. non-typhoidal *S. serovars*, w tym *S. enterica* serovar Typhimurium). W organizmie ludzkim *S. enterica* serovar Typhimurium wywołuje niezbyt żołądka i jelit, podczas gdy u myszy infekcja tą bakterią skutkuje systemową chorobą o przebiegu zbliżonym do duru brzuszego u ludzi (DOUGAN i współaut. 2011). Po przedostaniu się do jelita, bakterie szybko penetrują śluzówkę poprzez transcytozę komórek M, po czym są one fagocytowane przez leukocyty wielojądrzaste, w których blokują fuzję lizosomów z fagosomem, co umożliwia proliferację bakterii w ich wnętrzu. Komórki M występują między enterocytami błony śluzowej jelita cienkiego, pobierają antygeny ze światła jelita i przekazują je położonym głębiej komórkom dendrytycznym i makrofagom. Po uwolnieniu z leukocytów pałeczki *Salmonella* rozprzestrzeniają się w organizmie osiedlając się w obrębie śledziony i wątroby, gdzie ulegają ponownemu podziałowi i wysiewowi do krwi (DOUGAN i współaut. 2011) (Ryc. 3). Badania ZHANG i współaut. (2004) wykazały, że flagelina *S. enterica* serovar Typhimurium

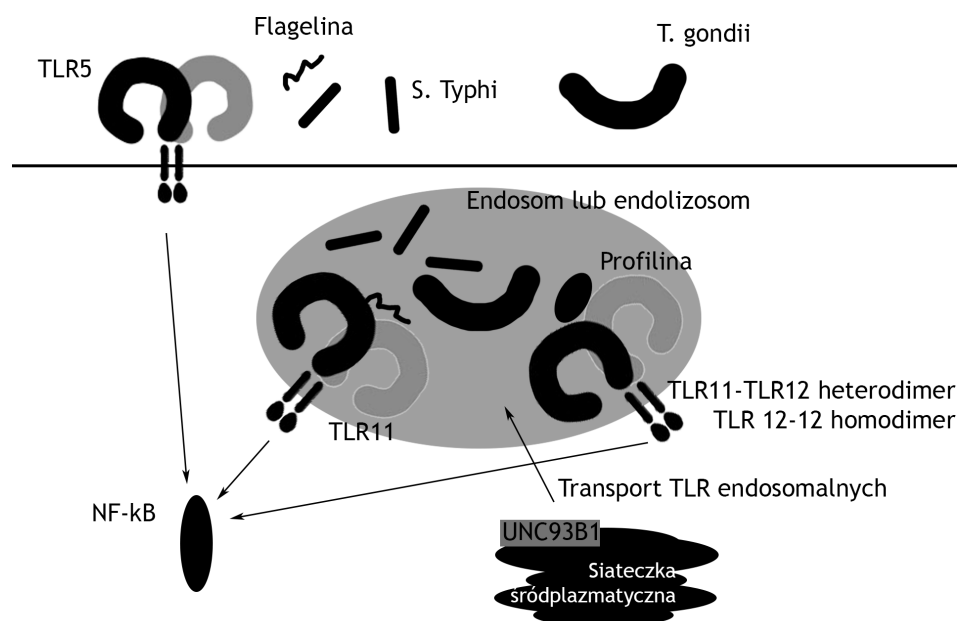


Ryc. 3. Inwazja komórek nabłonkowych przewodu pokarmowego w zakażeniu *Salmonella enterica serovar* Typhimurium u myszy.

jest głównym agonistą receptora TLR11. Wykorzystując wykazującą ekspresję TLR11 linię komórek RAW stwierdzono, że kaskada sygnałowa wzbudzana przez receptor TLR11 ulegała zahamowaniu, gdy zastosowany do stymulacji komórek lizat *Salmonella* Typhimurium poddano inkubacji z proteinazą K. Efektu takiego nie obserwowano traktując uzyskany lizat bakteryjny rybonukleazą, deoksurybonukleazą lub konkanawaliną A (ConA) (ZHANG i współaut. 2004). W celu identyfikacji czynnika odpowiedzialnego za blokowanie aktywacji receptora TLR11, lizat *S. enterica serovar* Typhimurium rozdzielono na frakcje, z których dwie, frakcja 8 i 14, okazały się być zdolne do wzbudzania bioluminescencji białka reporterowego lucyferazy w systemie, w którym jego produkcja zależała od obecności czynnika NF- κ B. Aby wykluczyć indukcję sygnału przez lipopolisacharyd (LPS), antygen ten usunięto zarówno z frakcji 8, jak i 14 lizatu bakteryjnego. W rezultacie, po stymulacji makrofagów otrzewnowych myszy frakcją 14 lizatu pozbawionego LPS, nie obserwowano wzbudzania sygnału i aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, natomiast aktywację taką obserwowano w przypadku stymulacji frakcją 8 lizatu pozbawionego LPS. Wykorzystując stymulowane tą frakcją makrofagi otrzewnowe izolowane od myszy pozbawionych (tlr11^{-/-}) lub nie pozbawionych (tlr11^{+/+}) receptorów TLR11 obserwowano aktywację czynnika NF- κ B wyłącznie w komórkach, które posiadały ten receptor. Analiza przeprowadzona metodą SDS-PAGE wykazała obecność we frakcji 8 kilku białek, w tym białka o masie cząsteczkowej

około 50 kDa, które po zbadaniu metodą spektrometrii mas okazało się flageliną *Salmonella* Typhimurium (ZHANG i współaut, 2004). Jak wykazały kolejne badania (MATHUR i współaut, 2012), obecność receptora TLR11 czyni myszy bardziej odpornymi na zakażenie wywołane przez pałeczki *Salmonella*. Poddane zakażeniu *per os* myszy typu knockout (tlr 11^{-/-}) były bardziej wrażliwe na rozwój choroby i umierały szybciej niż myszy bez takiego defektu genetycznego. Badania histologiczne ujawniły nasilone zniszczenie nabłonka jelit u myszy typu knockout, w porównaniu ze szczepem myszy typu dzikiego. Zwiększona liczba żywych bakterii *Salmonella* Typhimurium izolowanych z tkanek wątroby, śledziony i nerek myszy tlr11^{-/-} dodatkowo potwierdziła znacznie silniejszy rozwój infekcji. W surowicach takich myszy wykazano podwyższoną zawartość IL-12, IL-6 i TNF- α , w porównaniu do poziomu tych cytokin obserwowanego u myszy tlr11^{+/+}, co sugeruje rozwój bardzo silnej reakcji zapalnej (MATHUR i współaut. 2012).

Jak wspomniano, inicjowana przez receptory Toll-podobne droga sygnałowa prowadzi do aktywacji jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (Ryc. 2). W celu sprawdzenia, czy kaskada sygnałów zachodząca po aktywacji TLR11 prowadzi do powstania takich samych cząsteczek końcowych (NF- κ B i AP-1), jak w przypadku innych receptorów Toll-podobnych, ZHANG i współaut. (2004) skonstruowali linię komórkową HEK293 z nadprodukcją kompleksu receptorowego CD4-TLR11. Poprzednie badania wykazały, że kompleksy CD4 z domenami TIR innych receptorów TLR mogą wywoływać spontaniczną aktywację NF- κ B. Do badanej linii komórek HEK 293 wprowadzono gen kodujący lucyferazę, sygnalizujący aktywację czynników NF- κ B lub AP-1. Kontrolą w prowadzonych eksperymentach była linia komórkowa cechująca się nadprodukcją kompleksu CD4-TLR4. Przeprowadzone badania wykazały podobny poziom aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B w komórkach z nadprodukcją CD4-TLR11 oraz CD4-TLR4, co potwierdziło, że receptor TLR11 zdolny jest inicjować klasyczną MyD88-zależną drogę sygnałową. (ZHANG i współaut, 2004).



Ryc. 4. Aktywacja receptorów TLR odpowiedzialnych za wiązanie flageliny lub profiliny.

Ze względu na fakt, że flagelina jest rozpoznawana zarówno przez receptor TLR5, jak i TLR11, MATHUR i współaut. (2012) potraktowali linię komórkową HEK293 z obecnym TLR11 lub TLR5 albo TLR11 i TLR5 lizatami rekombinowanych komórek *S. enterica serovar* Typhimurium, w których flagelina miała dołączoną etykietkę histydynową. Uzyskane wyniki wskazywały, że oba receptory partycypują w rozpoznawaniu flageliny i zdolne są do tworzenia zarówno homodimerów (TLR11/TLR11), jak i heterodimerów (TLR11/TLR5). W badaniach ustalono ponadto, że myszy pozbawione ekspresji receptora TLR5 są bardziej odporne na infekcję *Salmonella* Typhimurium niż myszy z ekspresją tego receptora (UEMATSU i współaut. 2006), sugerując znaczny udział receptora TLR11 w transporcie sygnału do wnętrza komórki. Prawdopodobnie wynika to ze zwiększonej ekspresji receptora TLR11 u myszy typu knockout *tlr5*^{-/-} (BROZ i współaut. 2013). Ze względu na brak funkcjonalnej formy receptora TLR11 na komórkach nabłonka u ludzi wydaje się prawdopodobne, że funkcję przekaźnika sygnału do wnętrza komórki w momencie rozpoznania flageliny pełni receptor TLR5 (MATHUR i współaut. 2012).

Obecność receptorów TLR11 i TLR5 stwierdzono na mysich komórkach dendrytycznych warstwy podstawnej błony śluzowej nabłonka jelita (LP-DC), podczas gdy ma-

krofragi błony śluzowej (LP-MQ) wykazywały tylko obecność TLR11 (UEMATSU i współaut. 2006). W celu oceny ekspresji receptorów TLR11 na komórkach LP-MQ myszy transgenicznym (*tlr5*^{-/-}) i myszy szczepu dzikiego, makrofagi poddano stymulacji zawiesiną *Salmonella* Typhimurium. Zaobserwowano znaczne nasilenie ekspresji receptora TLR11 na komórkach makrofagowych myszy typu knockout. Makrofagi takich myszy cechowała ponadto zwiększona liczba znaczników aktywacji CD86 oraz MHC klasy II, a także produkowały one blisko dwukrotnie więcej IL-6 w odpowiedzi na stymulację *Salmonella* Typhimurium niż makrofagi myszy typu dzikiego. Sugeruje się, że wzmożona produkcja IL-6 może skutkować rozwojem silniejszej reakcji zapalnej związanej ze zwiększoną rekrutacją limfocytów T CD4⁺ do nabłonka jelita i skuteczniejsze zwalczanie bakterii. Ponadto, zwiększona ekspresja cząstek CD86 i MHC klasy II pozwala na lepszą prezentację antygenów na powierzchni komórek. Sugestia taka została potwierdzona *in vivo* po podaniu *per os* różnym szczepom myszy zawiesiny *Salmonella* Typhimurium. Wszystkie myszy z delecją typu *tlr5*^{-/-}/*tlr11*^{-/-} oraz *tlr11*^{-/-} nie przeżyły więcej niż 10 dni, natomiast w grupie myszy bez defektu genetycznego ponad połowa osobników żyła jeszcze po upływie 15 dni. Wyniki takie sugerują, że u myszy pozbawionych TLR5, ale posiadających TLR11,

odporność na *Salmonella* Typhimurium jest większa, natomiast szczepy pozbawione TLR11 (bez względu na obecność TLR5)

wykazują drastycznie zmniejszoną odporność (MATHUR i współaut. 2012) (Ryc. 4).

TLR11 A FLAGELINA *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR TYPHI

Salmonella enterica serovar Typhi jest pałeczką chorobotwórczą wyłącznie dla ludzi. Ligandem *Salmonella* Typhi rozpoznawanym przez receptor TLR11 jest również flagelina, podobnie jak w przypadku *Salmonella* Typhimurium. Ciekawi zatem fakt, dlaczego myszy są odporne na infekcje wywołane przez *Salmonella* Typhi, zaś bardzo wrażliwe na zakażenie *Salmonella* Typhimurium. Odpowiedź na pytanie, dlaczego *Salmonella* Typhi ma dużo węższe grono gospodarzy niż *Salmonella* Typhimurium można prawdopodobnie znaleźć w genomie *Salmonella* Typhi, który w porównaniu z *Salmonella* Typhimurium cechuje się znacznie mniejszą długością i zawiera mniejszą liczbę genów kodujących czynniki wirulencji (MATHUR i współaut. 2012). Najprawdopodobniej ze względu na znaczną redukcję genomu flagelina wici wykazująca powinowactwo do receptorów TLR11 jest ważnym czynnikiem wirulencji *Salmonella* Typhi. W badaniach wykorzystujących urzęsione i nieurzęsione szczepy *Salmonella* Typhi, którymi infekowano myszy $tlr11^{+/+}$ oraz $tlr11^{-/-}$ stwierdzono, że szczepy bakterii pozbawione flageliny nie były zdolne do wywołania zakażenia u żadnej z grup myszy. W odróżnieniu od *Salmonella* Typhi, pozbawione flageliny szczepy *Salmonella* Typhimurium były zdolne do wywo-

łania infekcji zarówno u myszy $tlr11^{+/+}$, jak i $tlr11^{-/-}$, co wskazuje na znaczenie innych niż jedynie flagelina czynników wirulencji (MATHUR i współaut. 2012). W licznych badaniach potwierdzono, że *Salmonella* Typhi ma zdolność do zmiany składu własnej flageliny po przeniknięciu przez nabłonek jelita myszy. Prawdopodobne jest więc, że ekspresja receptora TLR11 w endosomach komórek nabłonka może pełnić kluczową rolę w obronie przed chorobotwórczymi bakteriami. Hipoteza ta została udowodniona eksperymentalnie poprzez podanie *per os* *Salmonella* Typhi myszom z lub bez defektu genetycznego receptorów TLR11. Konsekwencją zakażenia był brak objawów chorobowych u myszy $tlr11^{+/+}$, natomiast rozwój infekcji i w konsekwencji śmierć wszystkich myszy z defektem genetycznym. Infekcji *Salmonella* Typhi u myszy $tlr11^{-/-}$ towarzyszył nasilony poziom prozapalnych cytokin IL-12 i TNF- α , silne uszkodzenie nabłonka jelit oraz obecność żywych bakterii w tkankach wątroby, nerek, śledziony, płuc i śródpiersiowych węzłach chłonnych. Jak wskazują niektórzy badacze, brak receptorów TLR11 u ludzi może być jednym z ważnych elementów determinujących podatność na zakażenie pałeczkami *Salmonella* Typhi (MATHUR i współaut. 2012).

TLR11 JAKO RECEPTOR DLA PROFILINY

Profiliny są małymi monomerycznymi białkami odgrywającymi istotną rolę w regulacji polimeryzacji aktyny w komórkach eukariotycznych, poprzez przyłączanie ATP na miejsce ADP w monomerze aktyny i dostarczanie ATP-aktyny na miejsce wzrostu filamentu aktynowego. Białka o charakterze profilin występują również u pierwotniaka *Toxoplasma gondii*, obligatoryjnego wewnątrzkomórkowego pasożyta z szerokim gronem żywicieli pośrednich, do których należy również człowiek (MONTROYA i LIESENFELD 2004). Pasożyt ten jest czynnikiem etiologicznym toksoplazmozy, jednej z najczęstszych chorób pasożytniczych na świecie. Szacuje się, że około 1/3 populacji

ludzkiej jest nosicielami tego pierwotniaka (PAPPAS i współaut. 2009). Najcięższe, często śmiertelne postaci toksoplazmozy rozwijają się u osób z zaburzeniami systemu odpornościowego oraz noworodków, których matka uległa infekcji w czasie ciąży. Osoby zdrowe zazwyczaj przechodzą chorobę bezobjawowo, a jeśli pojawiają się symptomy, to przypominają one grype (powiększone węzły chłonne, bóle mięśni itp.) i ustępują po kilku tygodniach od infekcji. Ważnym czynnikiem indukującym silną odpowiedź odpornościową u zarażonych *T. gondii* osób jest profilina (TgPRF), białko wiążące aktynę (YAROVINSKY i współaut. 2005). Jak wykazano, TgPRF jest ważnym czynnikiem chorobotwórczości

T. gondii, gdyż pierwotniaki pozbawione profiliny są awirulentne (KUCERA i współaut. 2010). TgPRF wykazuje 18–24% homologii w stosunku do profilin występujących u innych gatunków pasożytów należących do podtypu Apicomplexa. Analiza strukturalna profiliny *T. gondii* wykazała, że na powierzchni tego białka występują dwie unikatowe struktury: pętla kwasowa (ang. acidic loop) i tzw. zakręt beta (ang. beta hairpin). TgPRF jest profiliną o nietypowej funkcji, która polega na wiązaniu monomerów G-aktyny, uniemożliwiając utworzenie filamentów aktynowych (SKILLMAN i współaut. 2012).

Receptorem z grupy cząsteczek Toll-podobnych zaangażowanym w rozpoznawanie i wiązanie profiliny *T. gondii* jest cząsteczka TLR11. W licznych badaniach oceniono interakcje receptora TLR11 z profilinami tego pasożyta zmodyfikowanymi metodami inżynierii genetycznej. Modyfikacje te polegały między innymi na: (1) wprowadzeniu dwóch reszt glicyny w miejsce pętli kwasowej profiliny *T. gondii* pozwalającej uzyskać sekwencję homologiczną do obecnej w profilinie *Saccharomyces cerevisiae* lub profilinie mysiej, (2) usunięciu ze struktury profiliny tzw. zakrętu beta, (3) usunięciu ze struktury tego białka zarówno pętli kwasowej, jak i zakrętu beta, (4) zmianie sekwencji struktury beta zakrętu tak, by była homologiczna do analogicznej struktury u *Plasmodium falciparum*. Wszystkie zmodyfikowane profiliny badano pod względem ich zdolności do indukcji produkcji IL-12 przez makrofagi otrzewnowe izolowane od myszy cechujących się ekspresją receptorów TLR11 (*tlr11^{+/+}*) oraz od myszy typu knockout (*tlr11^{-/-}*). W odróżnieniu od makrofagów myszy szczepu dzikiego makrofagi myszy typu knockout, stymulowane niemodyfikowanym TgPRF, nie wykazywały produkcji IL-12. Komórki myszy bez defektu genetycznego były zdolne do sekrecji tej cytokiny w odpowiedzi na niektóre profiliny zmodyfikowane genetycznie, tzn. z wprowadzonymi w miejsce pętli kwasowej resztami glicyny lub usuniętą strukturą zakrętu beta. Usunięcie z profiliny obydwu charakterystycznych dla tego białka struktur skutkowało brakiem odpowiedzi makrofagów zarówno szczepu myszy *tlr11^{-/-}*, jak i *tlr11^{+/+}*. Przedstawione wyniki pozwalają sugerować, że decydującą rolę w rozpoznawaniu TgPRF przez TLR11 odgrywają unikalne struktury, pętla kwasowa i zakręt beta. W celu potwierdzenia, że to te struktury są agonistami receptora TLR11, dokonano ich fuzji z profiliną

drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, która nie jest rozpoznawana przez cząsteczkę TLR11. Makrofagi stymulowane zmodyfikowaną profiliną *S. cerevisiae* produkowały IL-12 na poziomie porównywalnym do wzbudzanego przez TgPRF, co bezpośrednio udowodniło, że uniktowe struktury profiliny *T. gondii* są molekularnymi wzorcami rozpoznawanymi przez receptor TLR11 (KUCERA i współaut. 2010).

Interakcja receptora TLR11 z profiliną *T. gondii* indukuje szereg zdarzeń prowadzących do aktywacji białka adaptorowego MyD88 i inicjacji kaskady kinaz serynowo-treoninowych, czego konsekwencją jest przekazanie sygnału do jądra komórkowego i ekspresja genów kodujących cytokiny, w tym IL-12 (Ryc. 4). IL-12 jest silnym stymulatorem odpowiedzi typu komórkowego, która odrywa kluczową rolę w odporności gospodarza na zakażenie *T. gondii*. Działanie tej cytokiny polega na stymulowaniu proliferacji i aktywacji limfocytów T i komórek NK, wzmacnianiu aktywności populacji limfocytów Th1, a także nasileniu produkcji interferonu gamma (IFN- γ) przez komórki T i NK. Jak wskazały badania prowadzone przez YAROVINSKY'EGO i współaut. (2005), rozpoznanie profiliny *T. gondii* przez receptor TLR11 jest niezbędne dla indukcji wyrażania IL-12 przez mysie komórki dendrytyczne. Myszy typu knockout (*tlr11^{-/-}*) cechowały się upośledzoną zdolnością produkcji IL-12 w trakcie infekcji tym pasożytem. Komórki dendrytyczne takich myszy wykazywały również ograniczoną zdolność migracji do węzłów chłonnych, co przyczyniało się zniaczeniu do hamowania rozwoju adaptacyjnej odpowiedzi przeciwprzywrotniakowej. Jednak mimo znacznego defektu w produkcji IL-12, myszy *tlr11^{-/-}* były zdolne do przeżywania infekcji *T. gondii* dzięki intensywnej sekrecji IFN- γ przez komórki NK (YAROVINSKY i współaut. 2005).

W regulacji aktywacji komórek dendrytycznych rozpoznających profilinę *T. gondii* z udziałem cząsteczki TLR11 uczestniczą zlokalizowane w siateczce śródplazmatycznej białka transportowe UNC93B1 (Ryc. 4). Cząsteczki te odpowiedzialne są za transport innych, oprócz TLR11, receptorów Toll-like zlokalizowanych w przedziałach wewnątrzkomórkowych, czyli TLR 3, TLR7, TLR9, TLR12 i TLR13. Badania PIFER i współaut. (2011) wykazały, że niedobór funkcjonalnego białka UNC93B1 prowadził do upośledzenia wydzielania IL-12 przez komórki dendrytyczne, osłabienia komórkowej odpowiedzi immu-

nologicznej typu Th1 przeciwko *T. gondii* i znacznie zwiększonej podatności myszy na pasożyta. Dla potwierdzenia wewnątrzkomórkowej lokalizacji receptora TLR11 posłużono się linią komórek HEK293, w której receptor TLR11 posiadał etykietkę białka GFP. Obserwacja mikroskopowa jednoznacznie wykazała występowanie tych struktur w obrębie siateczki śródplazmatycznej (PIFER i współaut. 2011). Jak wskazują wyniki ostatnich

badań, UNC93B1-zależna odpowiedź komórkowa wymaga ścisłego współdziałania receptora TLR11 z cząsteczką TLR12 (ANDRADE i współaut. 2013). Oba receptory zlokalizowane są w obrębie siateczki śródplazmatycznej i są transportowane do błony endosomalnej przez białko UNC93B1 tworząc heterodimery rozpoznające wspólnie profilinę *T. gondii* i wzbudzające intensywną produkcję IL-12 (Ryc. 4).

PODSUMOWANIE

Obecność receptora TLR11 w znacznym stopniu chroni organizm myszy przed infekcjami wywołanymi przez *Salmonella enterica serovar Typhi* i *Toxoplasma gondii*. Konieczna jest kontynuacja badań mających na celu ustalenie powinowactwa receptora

TLR11 do innych ligandów, co może pomóc w lepszym zrozumieniu roli tej cząsteczki w odporności przeciwwakaźnej. Warta zainteresowania jest również przyczyna braku receptorów TLR11 u ludzi, a także jej ewentualne konsekwencje.

TLR11 – RECEPTOR DLA PROFILINY I FLAGELINY

Streszczenie

Rodzina receptorów Toll-podobnych jest grupą transbłonowych białek rozpoznających konserwatywne wzorce molekularne patogenów (ang. pathogen associated molecular patterns, PAMPs). Ich cechą charakterystyczną jest występowanie wielu powtórzeń bogatych w leucynę w domenie zewnątrzkomórkowej i obecność domeny TIR w ich części cytoplazmatycznej. Kluczowa rola receptorów Toll-podobnych, będących swoistymi łącznikami odporności wrodzonej i nabytej, polega na inicjacji i regulacji odpowiedzi odpornościowej indukowanej przez wnikaające do organizmu patogeny. Dotychczas odkryto 13 receptorów Toll-podobnych, z których dziesięć wykryto u ludzi (TLR1-10), a dwanaście u myszy (TLR1-9 i TLR11-13). Każdy z receptorów rozpoznaje zachowane w ewolucji związki, a wiążąc je prowadzi

do aktywacji szeregu białek i wzbudzenia ekspresji wielu różnych genów. Cząsteczka TLR11 należy wraz z TLR12 i TLR13 do rodziny receptorów TLR11 występujących w błonie endosomów mysich komórek dendrytycznych, makrofagów oraz komórek nabłonkowych. Głównymi ligandami rozpoznawanymi przez ten receptor są flagelina wici bakteryjnych oraz profilina *T. gondii*. Mimo obecności homologicznego genu w komórkach ludzkich, ze względu na liczne kodony stop, nie ulega on transkrypcji. Wyniki wielu badań sugerują, że brak ekspresji cząsteczek TLR11 u ludzi może być jednym z ważnych elementów determinujących podatność na zakażenia wywołane przez niektóre patogeny, których struktury PAMP rozpoznawane są przez ten receptor.

TLR11 AS A RECEPTOR FOR PROFILIN AND FLAGELLIN

Summary

Family of Toll-like receptors (TLR) is a group of transmembrane proteins, which recognize pathogen associated molecular patterns (PAMPs). Unique feature of these molecules is the presence of multiple leucine-rich repeats in the extracellular domain and a TIR domain located in the cytoplasmic part of the receptor. The key role of TLR receptors stems from their ability to connect innate and acquired immunity by regulating the immune responses against invading pathogens. Until now, thirteen TLRs have been discovered, out of which ten have been found in humans (TLR1-TLR10), and twelve (TLR1-9 and TLR11-13) in mice. Each TLR receptor recognizes and binds evolutionarily conserved molecules; in consequence

a cascade of proteins is activated which leads to the expression of many different genes. TLR11 molecule belongs, along with TLR12 and TLR13, to Toll-like 11 receptor family found in the endosomal membrane of murine dendritic cells, macrophages and epithelial cells. Flagellin which builds bacterial flagella and *T. gondii* profilin are main ligands for that receptor. Although humans have an orthologue of TLR11 gene, it is nonfunctional due to the presence of many stop codons. Plentiful publications suggest that the lack of expression of TLR11 in humans can be one of the causes for increased susceptibility to some of the pathogens whose PAMPs are recognized by that receptor.

LITERATURA

- ANDRADE W. A., SOUZA MDO C., RAMOS-MARTINEZ E., NAGPAL K., DUTRA M. S., MELO M. B., BARTHOLOMEU D. C., GHOSH S., GOLENBOCK D. T., GAZZINELLI R. T., 2013. *Combined action of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to Toxoplasma gondii in mice*. Cell Host Microb. 13, 42–53.
- BOTOS I., SEGAL D. M., DAVIES D. R., 2011. *The structural biology of Toll-like receptors*. Structure 19, 447–459.
- BROZ P., OHLSON M. B., MONACK D. M., 2013. *Innate immune response to Salmonella typhimurium, a model enteric pathogen*. Gut Microb. 3, 62–70.
- CHANG Z. L., 2010. *Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways*. Inflamm. Res. 59, 791–808.
- DEPTUŁA W., TOKARZ-DEPTUŁA B., NIEDŹWIEDZKA P., 2006. *Rola i znaczenie receptorów Toll-podobnych w odporności*. Post. Mikrobiol. 45, 221–231.
- DOUGAN G., JOHN V., PALMER S., MASTROENI P., 2011. *Immunity to salmonellosis*. Immunol. Rev. 240, 196–210.
- EAVES-PYLES T. D., WONG H. R., ODOMS K., PYLES R. B., 2001. *Salmonella flagellin-dependent proinflammatory responses are localized to the conserved amino and carboxyl regions of the protein*. J. Immunol. 167, 7009–7016.
- KUCERA K., KOBLANSKY A. A., SAUNDERS L. P., FREDERICK K. B., DE LA CRUZ E. M., GHOSH S., MODIS Y., 2010. *Structure-based analysis of Toxoplasma gondii profilin: a parasite-specific motif is required for recognition by Toll-like receptor 11*. J. Mol. Biol. 403, 616–629.
- KUMAR H., KAWAI T., AKIRA S., 2009. *Toll-like receptors and innate immunity*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 388, 621–625.
- MAJEWSKA M., SZCZEPANIK M., 2006. *The role of Toll-like receptors (TLR) in innate and adaptive immune responses and their function in immune response regulation*. Post. Hig. Med. Dosw. 60, 52–63.
- MATHUR R., OH H., ZHANG D., PARK S. G., SEO J., KOBLANSKY A., HAYDEN M. S., GHOSH S., 2012. *A mouse model of Salmonella typhi infection*. Cell 151, 590–602.
- MONTOYA J. G., LIESENFELD O., 2004. *Toxoplasmosis*. Lancet 363, 1965–1976.
- OLDENBURG M., KRUGER A., FERSTL R., KAUFMANN A., NEES G., SIGMUND A., BATHKE B., LAUTERBACH H., SUTER M., DREHER S., KOEDEL U., AKIRA S., KAWAI T., BUER J., WAGNER H., BAUER S., HOCHREIN H., KIRSCHNING C.J., 2012. *TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification*. Science 337, 1111–1115.
- PAPPAS G., ROUSSOS N., FALAGAS M. E., 2009. *Toxoplasmosis snapshots: global status of Toxoplasma gondii seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis*. Int. J. Parasitol. 39, 1385–1394.
- PIFER R., BENSON A., STURGE C. R., YAROVINSKY F., 2011. *UNC93B1 is essential for TLR11 activation and IL-12-dependent host resistance to Toxoplasma gondii*. J. Biol. Chem. 286, 3307–3314.
- ROACH J. C., GLUSMAN G., ROWEN L., KAUR A., PURCELL M. K., SMITH K. D., HOOD L. E., ADEREM A., 2005. *The evolution of vertebrate Toll-like receptors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 9577–9582.
- SKILLMAN K. M., DAHER W., MA C. I., SOLDATI-FAVRE D., SIBLEY L. D., 2012. *Toxoplasma gondii profilin acts primarily to sequester G-actin while formins efficiently nucleate actin filament formation in vitro*. Biochemistry 51, 2486–2495.
- SMITH K. D., ANDERSEN-NISSEN E., HAYASHI F., STROBE K., BERGMAN M. A., BARRETT S. L., COOKSON B. T., ADEREM A., 2003. *Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility*. Nat. Immunol. 4, 1247–1253.
- UEMATSU S., JANG M. H., CHEVRIER N., GUO Z., KUMAGAI Y., YAMAMOTO M., KATO H., SOUGAWA N., MATSUI H., KUWATA H., HEMMI H., COBAN C., KAWAI T., ISHII K. J., TAKEUCHI O., MIYASAKA M., TAKEDA K., AKIRA S., 2006. *Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells*. Nat. Immunol. 7, 868–874.
- YAROVINSKY F., ZHANG D., ANDERSEN J. F., BANNENBERG G. L., SERHAN C. N., HAYDEN M. S., HIENY S., SUTTERWALA F. S., FLAVELL R. A., GHOSH S., SHER A., 2005. *TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein*. Science 308, 1626–1629.
- ZHANG D., ZHANG G., HAYDEN M. S., GREENBLATT M. B., BUSSEY C., FLAVELL R. A., GHOSH S., 2004. *A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria*. Science 303, 1522–1526.