

Dorota Plewik^{1*}, Maria Koziol-Montewka¹

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
ul. Chodźki 1, 20-059 Lublin

Wpłynęło w marcu 2010 r.

1. Wstęp. 2. Budowa i szlak aktywacji. 3. Funkcja TLR. 4. TLR w zakażeniach grzybiczych. 5. Polimorfizm genów *TLR*. 6. Wnioski

Toll-like receptor participation in fungal infections

Abstract: Immune system dysfunction is the major risk factor for developing invasive fungal infection. Toll Like Receptors (TLR) are present on cells of the immune system as well as on other cells localized at sites that can potentially be portals of entry for pathogens. TLRs recognize a number of fungal structures and play an important role in the immune response against fungal pathogens. The receptor-ligand binding triggers protein cascade, translocation of NF- κ B into the cell nucleus and activation of target genes. Receptors' activation induces the production of some proinflammatory factors, and the activation of innate and adaptive immune responses. Among the discovered 13 different TLRs, fungal ligands are specifically recognized by TLR2, 4 and 9. Scientific research of the recent years confirm the relationship between TLR gene polymorphism in humans and susceptibility to invasive fungal infections.

1. Introduction. 2. Structure and activation pathway. 3. Function of TLRs. 4. TLR in fungal infections. 5. Polymorphisms in *TLR* genes. 6. Conclusions

Słowa kluczowe: grzyby, polimorfizm genów, receptory Toll-like

Key words: fungus, genes polymorphism, Toll-like receptors

1. Wstęp

Receptory Toll-like (TLR) po raz pierwszy wykryto u muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*), kolejne badania wykazały, że bardzo podobne receptory występują u ssaków, tej zbieżności budowy zawdzięczają swoją nazwę. Występowanie tego mechanizmu immunologicznego u tak odległych ewolucyjnie organizmów świadczy o jego skuteczności w obronie przed inwazją drobnoustrojów. Receptory Toll-like należą do grupy receptorów PRR (pattern recognition receptors) nazywanych receptorami rozpoznającymi wzorce. Ligandami dla nich są cząsteczki PAMP (pathogen associated molecular patterns) – wzorce molekularne związane z patogenami. Są to substancje niezbędne do przeżycia i charakterystyczne dla całych grup drobnoustrojów [2]. U ludzi znane jest 13 różnych receptorów TLR oznaczonych kolejnymi numerami od 1 do 13. Ligandem dla TLR1 są bakteryjne tri-acyl lipopeptydy, dla TLR2 peptydoglikan, lipopeptydy, kwas lipotejchowy, poryny, nietypowy lipopolisacharyd, fosfolipomannan, dla TLR3 dwuniciowe RNA, dla TLR4 lipopolisacharyd, mannany, białka otoczek wirusów, HSP 60 i HSP 70, a dla TLR5 – flagellina. Natomiast dla TLR6 ligandami są diacetylowane lipopeptydy i kwas teichojowy. Receptory TLR7 i TLR8 wiążą ssRNA, zaś niemetylowane oligonukleotydy CpG i he-

mozoina są rozpoznawane przez TLR9. Poszczególne receptory mogą się łączyć i w postaci heterodimerów rozpoznawać inne ligandy, np. zymosan jest wiązany tylko przez połączone receptory TLR2 i TLR6. TLR występują na powierzchni komórek układu odpornościowego monocytach/makrofagach, komórkach tucznych, limfocytach B, limfocytach T, komórkach dendrytycznych, komórkach nabłonkowych skóry, przewodu pokarmowego, układu oddechowego, narządów moczowo-płciowych, adypocytach, komórkach śródbłonna, kardiomiocytach i fibroblastach [10, 17, 18]. Znane są również receptory Toll-like funkcjonujące wewnątrzkomórkowo, przykładem są TLR9 obecny w fagolizosomach. Aktywują je ligandy uwolnione podczas fagocytozy [10].

2. Budowa i szlak aktywacji

Część zewnątrzkomórkowa TLR zawiera domeny bogate w leucynę, natomiast wewnątrzkomórkowa domenę TIR (Toll/IL-1R), która wykazuje znaczną homologię z receptorem typu 1 interleukiny 1. Struktura ta powszechnie występuje w komórkach roślin i zwierząt; białka posiadające domenę TIR to, poza receptorami TLR i receptorami dla IL-1, między innymi białka indukujące ekspresję antybiotyków peptydowych

* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, ul. Chodźki 1, 20-059 Lublin; tel/fax (81) 74223781 lub tel 509228295; e-mail: dorotaplewik@yahoo.pl

u lnu, tytoniu i muszek owocowych. Związanie ligandu z receptorem TLR uruchamia wewnątrz komórki kaskadę białek, następnie przyłączenie i aktywacja kolejnych elementów szlaku. Sygnał z aktywowanego TLR jest przekazywany przez kompleksy białkowe. Pierwszy kompleks zawierający aktywowany TLR, molekułą łączącą MyD88 (myeloid differentiation primary response) i kinazę IRAK (kinaza związana z receptorem interleukiny), gromadzi się wokół receptora w odpowiedzi na sygnał. Ten kompleks aktywuje kolejny kompleks, następuje fosforylacja, ubikwitynacja i degradacja białka inhibitorowego I κ B. Uwolniony NF- κ B przemieszcza się do jądra komórkowego i aktywuje docelowe geny. Kodują one cytokiny prozapalne, chemokiny, receptory immunologiczne, cząsteczki adhezyjne związane z powierzchnią komórki. Mediatorzy zapalne pobudzają drugi szlak sygnałowy, który zwrotnie aktywuje NF- κ B [1, 15].

3. Funkcja TLR

Receptory TLR znajdują się między innymi na powierzchni komórek nabłonkowych dróg oddechowych i jelit oraz komórkach śródbłonka, dzięki takiej lokalizacji drobnoustroje mogą być rozpoznawane już we wrotach zakażenia. Aktywowane komórki nabłonka wydzielają cytokiny, chemokiny i defensyny, dzięki czemu już na tym etapie zakażenie może zostać powstrzymane. Jeśli komórki nabłonka nie powstrzymają inwazji drobnoustrojów, walkę z nimi podejmują komórki układu odpornościowego [10].

Czynniki wydzielane przez komórki nabłonka przyciągają i wstępnie aktywują leukocyty. Monocyty/makrofagi posiadają wszystkie znane receptory TLR poza TLR3. Związanie przez receptor Toll-like struktury drobnoustroju będącej ligandem, prowadzi do aktywacji komórki. Rozpoczynają one wytwarzanie cytokin prozapalnych: IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF, zwiększa się zdolność komórek do fagocytozy, wytwarzania reaktywnych form tlenu, wydzielania NO i prezentacji antygenów limfocytom T [17].

Ekspresja receptorów TLR w komórkach dendrytycznych jest zależna od populacji i dojrzałości komórek. Szpikowe komórki dendrytyczne krążące we krwi posiadają TLR1, 2, 4, 5 i 8, natomiast w populacji plazmatycznych komórek dendrytycznych obecne są wyłącznie TLR7 i TLR8. Ekspresja TLR1, 2, 4 i 5 występuje na niedojrzałych komórkach, spada natomiast w komórkach dojrzałych. Przeciwnie TLR3 jest obecny tylko w komórkach dojrzałych. Połączenie ligandu z receptorem Toll-like powoduje natychmiastową aktywację i dojrzewanie komórki dendrytycznej. Przechodzi ona z tkanek do węzła chłonnego, rozpoczyna wytwarzanie TNF, IL-12, IL-18 i innych cytokin, staje się

również komórką prezentującą antygeny. Aktywacja komórek dendrytycznych prowadzi do zapoczątkowania swoistej odpowiedzi immunologicznej [13, 21].

Wyjątkowo obficie receptory TLR występują na powierzchni komórek tucznych. Wydaje się, że główną rolą tych komórek jest wzmocnienie początkowych sygnałów o inwazji drobnoustrojów. Temu zadaniu sprzyja umiejscowienie ich w rejonach organizmu mogących stanowić wrota zakażenia: w pobliżu naczyń krwionośnych, skórze, błonie śluzowej dróg oddechowych i przewodu pokarmowego, narządów moczowo-płciowych. Na powierzchni komórek tucznych obecne są TLR2, 4, 6 i 8. Po aktywacji wywołanej związaniem ligandu z receptorami TLR mastocyty wydzielają szereg mediatorów prozapalnych, co powoduje zwiększenie przepuszczalności naczyń krwionośnych, napływ przeciwciał, składników dopełniacza i komórek układu immunologicznego oraz ich aktywację. Dodatkowo komórki tuczne mają zdolność prezentowania antygenów [12].

4. TLR w zakażeniach grzybiczych

Wszelkie stany chorobowe oraz procedury diagnostyczne i lecznicze prowadzące do zachwiania równowagi immunologicznej pacjenta predysponują do występowania grzybic. Rozwój chirurgii w tym transplantologii, procedur leczenia nowotworów prowadzących do głębokiej immunosupresji pacjenta oraz powszechne stosowanie antybiotyków, szczególnie o szerokim spektrum działania, spowodował wzrost liczby zachorowań na grzybicę [8]. Receptory TLR2, TLR4 oraz TLR9 odgrywają istotną rolę w rozpoznawaniu zakażeń grzybiczych. Choć nie są dokładnie określone elementy komórki grzybów stanowiące ligandy dla TLR, receptory te samodzielnie oraz w połączeniu z receptorami lektynowymi biorą udział w odpowiedzi na zakażenia *Candida* sp., *Aspergillus* sp. oraz *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis jiroveci*, *Coccidioides posadasii*, *Paracoccidides brasiliensis* [4, 7, 14, 16, 22].

Interakcja *Candida albicans* z receptorami gospodarza jest kluczowym czynnikiem w patogenezie candidemii. Rozpoznanie różnych morfologicznie form *C. albicans* przez TLR i inne receptory znajdujące się na powierzchni monocytów, makrofagów i komórek dendrytycznych decyduje o polaryzacji odpowiedzi immunologicznej i zachowaniu równowagi w produkcji prozapalnych i przeciwzapalnych cytokin [9]. Pobudzenie TLR4 wzmacnia produkcję chemokin i aktywuje neutrofile, TLR2 pobudza proliferację komórek T regulatorowych, co hamuje rozwój stanu zapalnego, natomiast aktywacja TLR9 prowadzi do wytwarzania cytokin [20].

W rozpoznawaniu zakażeń wywołanych przez grzyby z rodzaju *Aspergillus* biorą udział głównie receptory TLR2, TLR4 i TLR9, nadal nie są dokładnie określone struktury PAMP (pathogen associated molecular patterns – cząsteczki – wzorce molekularne związane z patogenami) rozpoznawane przez receptory. Z badań przeprowadzonych na zwierzętach wynika, że zmiana postaci morfologicznej grzyba z konidiów na strzępki powoduje modulację odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Receptory TLR4, znajdujące się na powierzchni monocytów, rozpoznają konidia *Aspergillus fumigatus* i aktywują odpowiedź zapalną. Jednak kiełkowanie grzybów i tworzenie strzępek powoduje, że TLR4 nie przekazuje sygnału pobudzającego układ immunologiczny, natomiast TLR2 aktywuje wydzielanie cytokin przeciwzapalnych, co może być mechanizmem chroniącym grzyby *Aspergillus* sp. przed odpowiedzią immunologiczną gospodarza [14].

5. Polimorfizm genów *TLR*

Chantal i wsp. [6] przeprowadzili badania w których oceniali zależność między polimorfizmem genów *TLR4* a występowaniem zakażeń krwi u ludzi wywołanych przez *Candida*. U pacjentów z polimorfizmem *TLR4* Asp299Gly zaobserwowano wyższą podatność na candidemie. Jednocześnie komórki jednojądrzaste krwi, pochodzące od pacjentów z tym rodzajem polimorfizmu, po stymulacji antygenami *Candida* wytwarzały więcej IL-10. Wyniki badań sugerują, że wyższa zachorowalność na zakażenia krwi wywołane przez *Candida*, u pacjentów z polimorfizmem *TLR4*, związana jest ze zwiększoną produkcją przeciwzapalnej IL-10, hamującej odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciw grzybom. Nie zaobserwowano natomiast zależności pomiędzy polimorfizmem *TLR4* Asp299Gly lub TLR2 Arg677Trp a występowaniem u pacjentów przewlekłej candidemi śluzówek i skóry [19].

Ze względu na zwiększającą się liczbę pacjentów z zaburzeniami odporności narasta problem oportunistycznych zakażeń wywołanych przez grzyby z rodzaju *Aspergillus*. Na inwazyjne zakażenia grzybicze (IZG) wywołane przez grzyby z rodzaju *Aspergillus* sp. szczególnie narażeni są pacjenci leczeni z powodu schorzeń onkohematologicznych, takich jak białaczki i chłoniaki oraz poddawani procedurze przeszczepienia komórek macierzystych. Badania przeprowadzone przez Kesh i wsp. [11] wykazały zależność między częstością występowania inwazyjnej aspergilozy, u pacjentów po przeszczepach komórek macierzystych, a polimorfizmem genów *TLR*. Obecność polimorfizmu Arg80Thr (*TLR1*) lub występowanie jednocześnie polimorfizmu Asn248Ser (*TLR1*) i Ser249Pro (*TLR6*)

u biorcy związane jest z wzrostem ryzyka wystąpienia inwazyjnej aspergilozy po przeszczepie.

Zależność między polimorfizmem genu *TLR4* u dawców komórek krwiotwórczych i występowaniem inwazyjnej aspergilozy u biorców przeszczepów wykazali w swoich badaniach Bochud i wsp. [3]. Obecność haplotypu S4 *TLR4* u dawcy przeszczepu komórek krwiotwórczych zwiększa ryzyko wystąpienia inwazyjnej aspergilozy u niespokrewnionego biorcy. Zależność taka nie występuje w przypadku przeszczepów od spokrewnionych dawców, nie jest znana przyczyna tego zjawiska, możliwe że jest to związane z głębszą immunosupresją pacjentów, u których przeprowadza się przeszczep od niespokrewnionego dawcy. Haplotyp S4 *TLR4* u biorcy przeszczepu nie zwiększał ryzyka wystąpienia inwazyjnej aspergilozy po przeszczepie.

Natomiast Carvalho i wsp. [5] przeprowadzili badania nad zależnością pomiędzy polimorfizmem genów *TLR*, a częstością występowania różnych form nieinwazyjnej aspergilozy płuc. U pacjentów z przewlekłą jamistą aspergilozą płuc zaobserwowana częstsze występowanie allelu G na Asp229Gly (*TLR4*) niż w grupie kontrolnej. Natomiast wzrost częstości zachorowań na alergiczną oskrzelowopłucną aspergilozę był związany z obecnością allelu C na T-1237C (*TLR9*). Nie zaobserwowano statystycznie istotnej zależności pomiędzy polimorfizmem w obrębie genów TLR2, TLR4 i TLR9, a częstością występowania ciężkiej astmy z uczuleniem na grzyby [5].

6. Wnioski

Receptory Toll-like biorą udział w odpowiedzi immunologicznej na zakażenia wywołane przez wiele grzybów chorobotwórczych dla człowieka. Określenie roli poszczególnych TLR wymaga dalszych badań zarówno na modelach zwierzęcych, jak i oceny polimorfizmu genów kodujących poszczególne białka biorące udział w szlaku przekazywaniu sygnałów przez TLR u ludzi. Zrozumienie interakcji między grzybami a układem immunologicznym, w tym receptorami Toll-like, może w przyszłości zaowocować opracowaniem nowych strategii leczenia i leków przeciwgrzybiczych.

Piśmiennictwo

1. Anderson K.: Toll signaling pathways in the innate immune response. *Current Opinion in Immunology*, **12**, 13–19 (2000)
2. Belvin M., Anderson K.: A Conserved Signaling Pathway: The *Drosophila* Toll-Dorsal Pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 393–416 (1996)
3. Bochud P., Chien J., Marr K., Leisenring W., Upton A., Janer M., Rodrigues S., Li S., Hansen J., Zhao L., Aderem A.,

- Boeckh M. Toll-like Receptor 4 Polimorphisms and Aspergillosis in Stem-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **23**, 1766–1777 (2008)
4. Calich V., Pina A., Felonato M., Bernardino S., Costa S., Loures F. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **53**, 1–7 (2008)
 5. Carvalho A., Pasqualotto A., Pitzurra L., Romani L., Denning D., Rodrigues F. Polimorphisms in Toll-Like Receptor and Susceptibility to Pulmonary Aspergillosis. *J. Inf. Dis.* **197**, 618–621 (2008)
 6. Chantal A., Van der Graaf, Netea M., Morre S., Heijer M., Verweij P., Van der Meer J., Kullberg B. Toll-like receptor 4 AspGly/Thr399Ile polymorphisms are risk factor for Candida bloodstream infection. *Eur. Cytokine Netw.* **17**, 29–34 (2006)
 7. Ding K., Shibui A., Wang Y., Takamoto M., Matsuguchi T., Sugane K.: Impaired recognition by Toll-like receptor 4 responsible for exacerbated murine Pneumocystis pneumonia. *Microbes and Infection*, **7**, 195–203 (2005)
 8. Dzierżanowska D.: Zakażenia szpitalne. Alfa-Medica Press Bielsko-Biała 2008, s. 409
 9. Filler S. Candida-host cell receptor-ligand interactions *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 333–339 (2006)
 10. Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek., Stokłosa T. (Red.): Immunologia. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2009, s. 80–89
 11. Kesh S., Mensah N., Peterlongo P., Jaffe D., Hsu K., Van den Brink M., O'Reilly R., Pamer E., Satagopan J., Papanicolaou G. TLR1 and TLR6 Polymorphism Are Associated with Susceptibility to Invasive Aspergillosis after Allogeneic cell Transplantation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1062**, 95–103 (2005)
 12. Kirshenbaum AS., Swindle E., Kulka M., Wu Y., Metcalfe DD.: Effect of lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan (PGN) on human mast cell numbers, cytokine production, and protease composition. *BMC Immunol.* **7**, 9–45(2008)
 13. Muzio M., Bosisio D., Polentarutti N., D'amico G., Stoppacciaro A., Mancinelli R., van't Veer C., Penton-Rol G., Ruco LP., Allavena P., Mantovani A.: Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.* **164**, 5998–6004 (2000)
 14. Netea M., Van der Meer J., Kullberg B.: Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors. *Immunology of Fungal Infections*. red. Brown G., Netea M., Springer, Dordrecht 2007 s. 259–272
 15. Li X., Stark G.: NF κ B-dependent signaling pathways. *Exp. Hematol.* **30**, 285–296 (2002)
 16. Shoham S., Huang C., Chen J., Golenbock D., Levitz S.: Toll-Like Receptor 4 Mediates Intracellular Signaling Without TNF- α Release in Response to *Cryptococcus neoformans* Polysaccharide Capsule. *J. Immunol.* **166**, 4620–4626 (2001)
 17. Tekada K., Kaisho T., Akira S.: Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 335–76 (2003)
 18. Uematsu S., Akira S.: Toll-like receptors and innate immunity. *J. Mol. Med.* **84**, 712–725 (2006)
 19. Van der Graaf C.A., Netea M.G., Drenth I.P., te Morsche R.H., van der Meer JW, Kullberg BJ. Candida-specific interferon-gamma deficiency and toll-like receptor polymorphisms in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *Neth. J. Med.* **61** (11), 365–369 (2003)
 20. Van de Veerdonk F., Netea M., Jansen T., Jacobs L., Verschueren I., Van der Meer J., Kullberg B.: Redundant role of TLR9 for anti-Candida host defense. *Immunobiology*, **213**, 613–620 (2008)
 21. Van Kooten C., Fiore N., Trouw L.A., Csomor E., Xu W., Castellano G., Daha M.R., Gelderman K.A.: Complement production and regulation by dendritic cells: molecular switches between tolerance and immunity. *Mol. Immunol.* **45**, 4064–4072 (2008)
 22. Viriyakosol S., Fierer J., Brown G., Kirkland T.: Innate Immunity to the Pathogenic Fungus *Coccidioides Posadasii* Is Dependent on Toll-Like Receptor 2 and Dectin-1. *Infect. Immun.* **73**, 1553–1560 (2005)