

UDZIAŁ RECEPTORÓW TLR ROZPOZNAJĄCYCH WZORCE MOLEKULARNE ORGANIZMÓW PATOGENNYCH W MODULOWANIU AKTYWNOŚCI REGULATORYWYCH LIMFOCYTÓW T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺

Monika Anna Grygorowicz¹, Ewa Kozłowska^{1*}

¹Zakład Immunologii, Instytut Zoologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 00-096 Warszawa

Wpłynęło w maju 2010 r.

1. Wstęp. 2. Regulatorowe limfocyty T. 2.1. Charakterystyka fenotypowa. 2.2. Aktywacja. 2.3. Mechanizmy supresji. 2.4. Regulacja aktywności Treg. 3. Receptory TLR. 3.1. Odkrycie receptorów TLR. 3.2. Szlaki przekazywania sygnału. 3.3. Rola TLR w odporności wrodzonej i nabytej. 4. Regulacja aktywności limfocytów regulatorowych przez receptory TLR. 4.1. Wpływ egzogennych ligandów lipidowych. 4.1.1. TLR2. 4.1.2. TLR4. 4.2. Wpływ egzogennych ligandów białkowych. 4.2.1. TLR5. 4.2.2. TLR10. 4.3. Wpływ egzogennych kwasów nukleinowych. 4.3.1. TLR8. 4.3.2. TLR9. 4.4. Wpływ ligandów endogennych. 5. Podsumowanie

Involvement of receptors recognizing pathogen-associated molecular patterns – TLRs in modulation of regulatory T cell CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ activity

Abstract: Immune response is controlled by a complex system of direct cell-to-cell contact and interactions with secreted factors known as cytokines. CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells are the best known population of cells with suppressive functions and act to control the immune responses. The Toll-like receptor (TLR) family is capable of recognizing many different microbes by detecting a variety of conserved pathogen associated molecular patterns (PAMPs). Each class of microbe and ligand is recognized by a different type of TLR to influence the character and course of the developing immune response.

TLRs are expressed on the surface of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells (Treg). Triggering of TLR2, TLR8 and TLR9 abrogates Treg suppressive activity. Flagellin, a ligand of TLR 5 alternates Treg activity depending on the activation status of the immune system in a local environment. Without the presence of inflammation, activation of TLR 5 with flagellin, present also in commensal bacteria, aides the development of tolerance, whereas during inflammation it leads to the suppression of immunity. However, TLR7 triggering increases suppressive functions of Tregs both in vitro and in vivo. While the impact of the ligand for TLR4 – lipopolysaccharide (LPS) – on Tregs is controversial, further experiments are needed to elucidate this effect. This is crucial because of the common appearance of LPS in both commensal and pathogenic microorganisms. Similarly, the impact of TLR10 triggering on Treg activation requires further studies.

1. Introduction. 2. Regulatory T cells. 2.1. Phenotypic characteristics. 2.2. Activation. 2.3. Mechanisms of suppression. 2.4. Regulation of Treg activity. 3. TLR receptors. 3.1. Discovery of TLR. 3.2. Signaling. 3.3. Role of TLR in innate and adaptive immune responses. 4. Regulation of Treg activity by TLR. 4.1. Role of exogenous lipid ligands. 4.1.1. TLR2. 4.1.2. TLR4. 4.2. Role of exogenous protein ligands. 4.2.1. TLR5. 4.2.2. TLR10. 4.3. Role of exogenous nucleic acids ligands. 4.3.1. TLR7. 4.3.2. TLR8. 4.3.3. TLR9. 4.4. Role of endogenous ligands. 5. Summary

Słowa kluczowe: regulatorowe limfocyty T, Treg, receptory TLR, PRR, wzorce molekularne patogenów
Key words: regulatory lymphocytes T, TLR receptors, PRR, pathogen associated molecular patterns

1. Wstęp

Układ odpornościowy ssaków chroni organizm przed patogenami, takimi jak wirusy, bakterie i pasożyty. Posiada przy tym zdolność do zahamowania nadmiernej odpowiedzi immunologicznej zanim spowoduje ona uszkodzenia tkanek własnego organizmu. Wykazuje tolerancję na antygeny własne oraz antygeny mikroorganizmów komensalnych np. naturalnej flory przewodu pokarmowego. Nadmierna supresja odpowiedzi immunologicznej może zwiększać wrażliwość na infekcje mikroorganizmami i ułatwiać rozwój chorób nowotworowych, niewystarczająca może być przyczyną chorób autoimmunizacyjnych i alergii. Przebieg reakcji immunologicznych jest kontrolowany przez złożony

układ oddziaływań, zarówno w drodze bezpośredniego kontaktu komórek jak i za pośrednictwem cytokin. W utrzymaniu tolerancji zaangażowanych jest wiele różnych komórek układu odpornościowego: regulatorowe limfocyty T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, limfocyty T $\gamma\delta$, limfocyty T CD8⁺CD28⁻ oraz limfocyty NKT. Jak dotąd najlepiej poznano regulatorowe limfocyty T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Treg). Wśród regulatorowych limfocytów T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ można wyróżnić powstające w grasicy naturalne regulatorowe limfocyty T (nTreg) oraz powstające w obwodowych narządach limfatycznych z naiwnych limfocytów T pod wpływem aktywacji antygenowej – indukowane regulatorowe limfocyty T (iTreg). Jak dotąd nie odkryto specyficznych markerów umożliwiających odróżnienie, w obwodowych narządach limfatycznych,

* Autor korespondencyjny: Zakład Immunologii, Instytut Zoologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski; ul. Miecznikowa 1, 00-096 Warszawa; ekozlowska@biol.uw.edu.pl

limfocytów nTreg od iTreg. Do badań Treg *in vitro* najczęściej używane są izolowane z krwi lub obwodowych narządów limfatycznych limfocyty T CD4+CD25+, ponieważ czynnik transkrypcyjny FoxP3 nie może być wyznakowany przyżyciowo. Większość badań których wyniki cytowane są w tym opracowaniu uzyskano pracując na limfocytach T CD4+CD25+ z obwodowych narządów limfatycznych, a więc populacji zawierającej zarówno nTreg jak i iTreg [27].

Układ odpornościowy rozpoznaje antygeny mikroorganizmów za pośrednictwem receptorów w tym receptorów z rodziny TLR. Receptory TLR należą do grupy receptorów rozpoznających wzorce molekularne (PRR). Rozpoznają one cząsteczki mikroorganizmów patogennych o konserwowanej ewolucyjnie budowie (PAMPs). Podczas infekcji u kręgowców odpowiadają za indukcję wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej [19]. Rodzaj receptorów TLR zaangażowanych w rozpoznanie mikroorganizmu, a także ligandu wiążącego się z TLR decyduje o rodzaju i przebiegu rozwijającej się odpowiedzi immunologicznej. Receptory TLR ulegają ekspresji przede wszystkim na powierzchni komórek prezentujących antygen (APC) – głównie komórek dendrytycznych, makrofagów i limfocytów B, ale także na powierzchni regulatorowych limfocytów T CD4+CD25+FoxP3+. Rola receptorów TLR w modulacji odpowiedzi immunologicznej, w tym aktywności Treg jest przedmiotem intensywnych badań, których

wyniki mogą dostarczyć informacji potrzebnych do powstania bardziej skutecznych szczepionek i nowych rodzajów terapii chorób związanych z nieprawidłowym funkcjonowaniem układu odpornościowego.

2. Regulatorowe limfocyty T

Naturalne regulatorowe limfocyty T stanowią 5–10% limfocytów CD4⁺ w krwi obwodowej myszy [2] i około 6% w krwi obwodowej człowieka [27]. Ich podstawową funkcją jest utrzymanie stanu tolerancji na własne antygeny, ponadto utrzymują homeostazę w układzie odpornościowym hamując zarówno fizjologiczną jak i patologiczną odpowiedź immunologiczną. Są zaangażowane w regulację odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko komórkom nowotworowym, alergenom, patogennym i komensalnym mikroorganizmom oraz przeszczepom, a także biorą udział w utrzymaniu tolerancji na antygeny płodu. Udział nTreg w rozwoju tolerancji na antygeny własne wykazano w badaniach, w których tymektomii poddano 2–4 dniowe myszy. Zaobserwowano u nich brak limfocytów CD4+CD25+ oraz rozwój wielonarządowych chorób autoimmunizacyjnych, którym można było zapobiec poprzez adoptywny transfer limfocytów T CD4+CD25+ z myszy zdrowej [27].

Uważa się, że indukowane regulatorowe limfocyty T pełnią podobne funkcje jak nTreg, z tym że utrzymanie

Wykaz skrótów

AP-1	– activation protein 1 – białko aktywacji 1,
APC	– antigen presenting cell – komórka prezentująca antygen,
cAMP	– cykliczny adenylozomonofosforan,
CpG DNA	– fragmenty DNA zawierające dużą liczbę dinukleotydów zbudowanych z niemetylowanych cytozyn oraz guanin,
CpG-ODN	– CpG single stranded oligodeoxynucleotides – jednoniciowe oligonukleotydy zawierające wyspy CpG,
CTLA-4	– cytotoxic T lymphocyte-associated protein-4 – antygen 4 związany z limfocytami T cytotoksycznymi,
DC	– dendritic cell – komórka dendrytyczna,
FoxP3	– forkhead/winged-helix family transcriptional repressor p3 – represor transkrypcji 3 z rodziny forkhead/winged-helix,
GDF5	– growth differentiation factor 5 – czynnik wzrostu i różnicowania 5,
GITR	– glucocorticoid-induced TNF-family receptor – receptor z rodziny TNF indukowany przez glukokortykoidy,
gp96	– glikoproteina o masie cząsteczkowej 96 kDa,
Hsp60, Hsp70	– heat shock protein – białko szoku cieplnego o masie cząsteczkowej 60, 70 kDa,
IFN	– interferon – interferon,
IκB	– inhibitor of κB – inhibitor czynnika κB,
IKK	– IκB kinase – kinaza IκB,
IPEX	– immune dysregulation, polyendocrinopathy, and enteropathy X-linked syndrome – zespół upośledzenia odporności, poliendokrynopatii i enteropatii związany z chromosomem X,
IRAK	– interleukin-1 receptor-associated kinase – kinaza związana z receptorem dla interleukiny 1,
IRF3	– interferon regulatory factor 3,
LAG3	– lymphocyte activation gene 3 – 3 gen aktywacji limfocytów,
LBP	– LPS binding protein – białko wiążące LPS,
LPS	– lipopolysaccharide – lipopolisacharyd,
LRR	– leucine rich region – region bogaty w leucyny,
LTA-SA	– lipoteichoic acid from <i>Staphylococcus aureus</i> kwas lipoteichowy <i>Staphylococcus aureus</i> ,
MAP lub MAPK	– mitogen activated protein kinase – kinaza aktywowana przez mitogen,
MD-2	– myeloid differentiation 2,
MHC	– major histocompatibility complex – główny układ zgodności tkankowej,

tolerancji na antygeny własnego organizmu przypisywane jest jedynie nTreg.

W utrzymanie tolerancji obwodowej zaangażowane są także inne komórki układu odpornościowego: limfocyty T $\gamma\delta$, limfocyty T CD8⁺CD28⁻ oraz limfocyty NKT [27].

2.1. Charakterystyka fenotypowa

Jak dotąd nie udało się znaleźć unikalnych markerów powierzchniowych charakterystycznych dla Treg. Częstotki CD4, CD25, CD28, cząsteczki adhezyjne CD62L i CD103 oraz CTLA-4, GITR, LAG3 i mTGF- β obecne na powierzchni Treg są także obecne na innych komórkach układu odpornościowego [23, 27].

Powszechnie uważa się, że jedynym charakterystycznym markerem regulatorowych limfocytów T (zarówno iTreg jak i nTreg) jest czynnik transkrypcyjny FoxP3. Odgrywa on znaczącą rolę w rozwoju Treg. Myszy z mutacją w genie *FOXP3* rozwijają wielonarządowe choroby autoimmunizacyjne i mają zmniejszoną liczebność Treg. Ludzie ze zmutowanym genem *FOXP3* cierpią na syndrom IPEX i mają zmniejszoną liczbę regulatorowych limfocytów T. Białko FoxP3 jest represorem transkrypcji IL-2, IL-4 i IFN- γ działającym poprzez bezpośrednie oddziaływanie z NF- κ B i NF-AT. Kompleks NF-AT/FoxP3 wzmacnia natomiast ekspresję CD25 i CTLA-4 [2, 27, 48].

2.3. Mechanizmy supresji

Regulatorowe limfocyty T działają w węzłach chłonnych oraz w miejscu gdzie rozwija się stan zapalny. Treg mają niższe powinowactwo do chemokin niż efektorowe limfocyty T (Tef), dlatego ich chemotaksja do miejsca rozwijającego się stanu zapalnego przebiega wolniej. Postuluje się kilka hipotetycznych mechanizmów działania regulatorowych limfocytów T, większość z nich wymaga fizycznego zbliżenia limfocytów regulatorowych i komórek docelowych (limfocytów CD4⁺, CD8⁺, B, NK, NKT) najczęściej przy udziale komórek APC *in vivo* regulatorowe limfocyty T są zdolne do hamowania aktywności limfocytów efektorowych [2, 27].

In vitro Treg są zdolne do hamowania aktywacji i proliferacji oraz produkcji cytokin przez limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺, nawet przy braku obecności komórek prezentujących antygen. Wykazują także zdolność hamowania proliferacji limfocytów B oraz produkcji i przełączania klas immunoglobulin. Ponadto hamują cytotoksyczność komórek NK i NKT oraz funkcje i dojrzewanie komórek dendrytycznych (DC). W mniejszym stopniu hamują także czynności aktywowanych wcześniej limfocytów CD4⁺ oraz limfocytów pamięci [2, 27].

Pierwszy postulowany mechanizm (rys. 1a) oparty jest na działaniu cząsteczek CTLA-4 i LAG3. Treg wykazują konstytutywną ekspresję CTLA-4. Stymulacja limfocytów Treg przy udziale receptorów CTLA-4

Wykaz skrótów c.d.

mTGF- β	- membrane-bound transforming growth factor β - transformujący czynnik wzrostu β związany z błoną,
MALP2	- macrophage-activating lipopeptide-2, - lipopeptyd 2 aktywujący makrofagi,
MyD88	- myeloid differentiation primary response gene 88 - gen 88 pierwotnej odpowiedzi różnicowania szpiku,
NF- κ B	- nuclear factor κ B - jądrowy czynnik κ B,
NK	- natural killer cell - limfocyt NK,
NKT	- natural killer T cell - limfocyt NKT,
nTreg	- naturalne regulatorowe limfocyty T,
Pam3CysSK4	- triacylated synthetic lipoprotein - syntetyczna triacylowana lipoproteina,
PAMPs	- pathogen-associated molecular patterns - wzorce molekularne związane z patogenami,
PRR	- pattern recognition receptors - receptory rozpoznające wzorce molekularne,
SARM	- Sterile-alpha and TIR motif-containing protein - białko zawierające motywy sterile- α i TIR,
TAK	- TGF- β -activated kinase 1 - kinaza 1 aktywowana przez TGF- β ,
TAB	- TAK-binding protein - białko wiążące TAK,
TCR	- T cell receptor - receptor limfocytów T,
Tef	- limfocyt T efektorowy,
Th1	- T helper 1 cell - limfocyt T pomocniczy typu 1,
Th2	- T helper 2 cell - limfocyt T pomocniczy typu 2,
Treg	- CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ regulatory T cell - regulatorowy limfocyt T CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ ,
iTreg	- induced regulatory T cell - indukowany regulatorowy limfocyt T,
TGF- β	- transforming growth factor β - transformujący czynnik wzrostu β ,
TIR	- Toll/interleukin-1 receptor - motyw związany z Toll i receptorem dla interleukiny 1,
TIRAP	- TIR domain-containing adaptor protein - białko adaptorowe zawierające domenę TIR,
TLR	- Toll-like receptor - receptor podobny do białka Toll,
TNF- α	- tumor necrosis factor α - czynnik martwicy nowotworów α ,
TRAF6	- TNF receptor-associated factor 6 - czynnik 6 związany z receptorem dla TNF,
TRAM	- TRIF-related adaptor molecule - białko adaptorowe związane z TRIF,
TRIF	- TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β - białko adaptorowe zawierające domenę TIR i indukujące ekspresję interferonu β .

i TCR prowadzi do indukcji funkcji supresyjnych. Eksperymentalne zablokowanie CTLA-4 u myszy prowadzi do rozwoju chorób autoimmunizacyjnych. Mechanizm działania cząsteczki LAG3 nie jest znany, wiadomo jednak że komórki Treg pochodzące z myszy z wyciszonym genem *LAG3* wykazują obniżoną zdolność do hamowania proliferacji Tef, oraz że nadekspresja LAG3 w błonie naiwnych limfocytów CD4⁺ zmienia je w komórki o właściwościach supresyjnych [27].

Drugi mechanizm działania (rys. 1b) polega na zmianie środowiska cytokinowego w miejscu stanu zapalnego. Treg produkują cytokiny supresyjne: TGF- β i IL-10. TGF- β zmniejsza sekrecję cytokin przez limfocyty CD4⁺, choć równocześnie nie hamuje ich proliferacji i nie indukuje apoptozy. Pobudza limfocyty Th1 do produkcji IL-10, która indukuje w limfocytach efektorowych ekspresję receptora dla TGF- β , co zwiększa ich podatność na supresję. Ponadto, IL-10 zmniejsza produkcję IL-12 przez komórki APC. Hamuje to auto+ krynowe pobudzenie aktywności APC przez IL-12 oraz różnicowanie limfocytów naiwnych w kierunku limfocytów Th1 [2]. TGF- β , zwiększa w docelowych komórkach stężenie cAMP, co powoduje zmniejszenie ekspresji IL-2 i zahamowanie ich proliferacji [38].

Uważa się, że cząsteczka CTLA-4 obecna na powierzchni Treg może powodować indukcję ekspresji 2,3-dioksygenazy indoloaminy (IDO) w komórkach dendrytycznych (rys. 1c). IDO to enzym w szlaku katabolizmu tryptofanu. Zwiększenie stężenia IDO powoduje, że lokalnie powstaje środowisko immunosupresyjne [12].

Wydzielanie perforyn i grzymów przez Treg powoduje śmierć komórki docelowej (rys. 1d) [2, 12].

Kolejnym mechanizmem działania Treg jest inhibicja proliferacji i/lub produkcji cytokin przez efektorowe limfocyty T (rys. 1f). Treg hamują produkcję IL-2 na poziomie mRNA we wczesnych fazach aktywacji efektorowych limfocytów T (CD4⁺ i CD8⁺), co prowadzi do ich anergii. Ponadto Treg mogą zmniejszyć stężenie IL-2, poprzez zużycie tej cytokiny w miejscu swojego działania, co skutkuje osłabioną proliferacją i produkcją cytokin przez aktywowane efektorowe limfocyty T [2, 12, 27].

Jak dotąd, mimo licznych badań *in vivo* i *in vitro* nie ustalono jednoznacznie w jaki sposób działają regulatorowe limfocyty T.

2.4. Regulacja aktywności Treg

Aktywność Treg podlega ścisłej kontroli, jest modulowana między innymi przez hormony i cytokiny. Wśród hormonów najlepiej poznano wpływ glukokortykoidów. Określono także wpływ niektórych cytokin na aktywność regulatorowych limfocytów T. Wysokie stężenia IL-2, z jednoczesną stymulacją antygenową

powodują proliferację antygenowo specyficznych Treg, które wykazują później silniejsze właściwości supresyjne. IL-15 w pewnym stopniu zastępuje działanie IL-2. IL-4 działa jako czynnik wzrostowy dla Treg i wzmacnia ich właściwości supresyjne, natomiast IL-7 jest czynnikiem podtrzymującym przeżycie Treg w obwodowych narządach limfatycznych [27, 40]. Od szeregu lat badany jest efekt jaki na aktywność Treg wywierają cząsteczki kostymulacyjne, ostatnio w kręgu zainteresowań wielu grup badawczych na świecie pozostaje rola modulacyjna receptorów TLR.

Efekt supresyjny jaki wywierają Treg zależy nie tylko od ich stanu funkcjonalnego, ale także od wrażliwości docelowych limfocytów efektorowych oraz wpływu komórek APC na limfocyty regulatorowe. I tak, zwiększona ekspresja cząsteczek CD80 i CD86 na komórkach APC powoduje, że efektorowe limfocyty T stają się niewrażliwe na supresję. W tych warunkach Treg proliferują i tracą właściwości supresyjne. Zwiększenie ekspresji CD134 (OX40) i receptora dla TNF- α na APC oraz stymulacja GITR na komórkach regulatorowych powoduje częściowe zablokowanie supresji. Ponadto silna aktywacja limfocytów efektorowych wywołana przez stymulację TCR i GITR powoduje, że wykazują one brak wrażliwości na działanie Treg. Podobne efekty dają wysokie stężenia IL-2, TNF- α , IL-6 i IL-12. TGF- β aktywuje Treg, co prowadzi do ich ekspansji oraz zwiększenia ekspresji FoxP3, to z kolei wzmacnia aktywność supresyjną Treg. W wielu przypadkach nie udało się jednoznacznie stwierdzić czy dany czynnik działa na limfocyty efektorowe, blokuje funkcje Treg czy działa na oba rodzaje komórek jednocześnie [12, 27, 38, 40].

W regulację aktywności Treg zaangażowane są także receptory TLR. Receptory te występują przede wszystkim na APC. Zaobserwowano także obecność TLR w Treg oraz Tef, przy czym poziom ekspresji TLR (na poziomie mRNA) był znacznie wyższy w Treg niż w Tef, co sugeruje że TLR mogą wpływać na funkcjonowanie limfocytów regulatorowych zarówno bezpośrednio jak i w sposób pośredni [40].

3. Receptory TLR

U ssaków receptory TLR występują głównie na komórkach prezentujących antygen. Ich aktywacja indukuje produkcję cytokin prozapalnych, chemokin, interferonów (IFN) i zwiększenie ekspresji cząsteczek kostymulacyjnych (CD28, CTLA-4) na komórkach APC [15, 19].

TLR należą do białek transbłonowych typu I. Zewnętrzna część receptora, która wiąże PAMPs zawiera motywy bogate w leucyny. Za przekazywanie sygnału do wnętrza komórki odpowiada część cytoplazmatyczna, w której znajduje się domena TIR (rys. 2) [15].

U ssaków receptory TLR (Toll-like) to najlepiej poznana grupa receptorów z rodziny PRR. Pomiedzy poszczególnymi gatunkami występują różnice w liczbie genów dla TLR. Większość ssaków posiada ich od dziesięciu do piętnastu [14]. U ludzi zidentyfikowano jedenaście receptorów TLR, a u myszy trzynaście [15]. Człowiek posiada funkcjonalny TLR10, natomiast u myszy gen ten zawiera mutację powodującą, że produkt jest niefunkcjonalny. Podobnie, mysz TLR11 jest funkcjonalny, a u ludzi produkt genu TLR11 nie powstaje [41].

3.1. Odkrycie receptorów TLR

Pierwsze białko z rodziny Toll (Toll1) zostało zidentyfikowane w 1985 roku jako czynnik odpowiedzialny za ustalenie grzbietobrzusznej polarności wczesnego zarodka *Drosophila melanogaster*. Następne badania wykazały, że Toll1 i Toll2 odgrywają rolę w embriogenezie i późniejszym rozwoju np. podczas powstawania mięśni i motoneuronów. W dalszej kolejności odkryto, że białko Toll1 u *D. melanogaster* bierze udział w zapoczątkowaniu reakcji odpornościowych przeciwko grzybom i bakteriom Gram-dodatnim. W procesie tym pośredniczą czynniki transkrypcyjne z rodziny NF-κB. Białko Toll1 nie rozpoznaje wzorców molekularnych bezpośrednio, a jest aktywowane przez endogenne ligandy – białko Spätzle. Udział receptorów TLR w procesach rozwoju i obrony organizmu jest różny zarówno na poziomie białek aktywujących TLR jak i odmiennego udziału czynników z rodziny NF-κB [19]. Fakt iż tylko białko Toll1 u *D. melanogaster* pośredniczy w odpowiedzi immunologicznej, a białka od Toll2 do Toll9 nie pełnią takiej roli wskazuje, że pierwotną ich funkcją nie była regulacja odporności [19, 41].

W roku 1998 odkryto, że za brak wrażliwości myszy szczepów C3H/HeJ i C57BL/10ScCr na składnik ścian komórkowych bakterii Gram-ujemnych – lipopolisacharyd (LPS) odpowiada mutacja unieczynnająca ssaczy homolog białka Toll1 – TLR4. Ponadto okazało się, że u myszy, TLR4 wpływa na indukcję ekspresji genów stanu zapalnego. [43] Dalsze badania wykazały, że białka z tej rodziny nie odgrywają żadnej roli we wczesnym rozwoju ssaków. Biorą natomiast udział w bezpośrednim rozpoznawaniu cząsteczek patogenów i indukowaniu, poprzez czynnik transkrypcyjny NF-κB, wrodzonej i nabytej odpowiedzi odpornościowej. Co ciekawe, niedawno wykazano, że u myszy receptory TLR obecne są w neuronach i komórkach progenitorowych neuronów i prawdopodobnie biorą udział w regulacji wzrostu aksonów i tworzeniu połączeń nerwowych [19].

3.2. Szlaki przekazywania sygnału

Motyw LRR znajdujący się w zewnątrzkomórkowej części receptora TLR posiada strukturę umożliwiającą oddziaływanie białko-białko. Domena ta może także

wiązać lipidy, węglowodany i kwasy nukleinowe [19]. Rozpoznanie PAMPs prowadzi do dimeryzacji lub nawet oligomeryzacji receptorów TLR oraz rekrutacji wewnątrzkomórkowych cząsteczek pośredniczących także posiadających domenę TIR, w tym MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM i SARM [47]. Białka te łączą się z TLR dzięki oddziaływaniom pomiędzy dwiema domenami TIR, z których jedna jest częścią receptora TLR, a druga białka pośredniczącego.

Szlak transdukcji sygnału prowadzący od receptorów TLR jest przedstawiony na rysunku 3. MyD88 jest uniwersalną cząsteczką adaptorową szlaków aktywujących stan zapalny prowadzących od wszystkich TLR z wyjątkiem TLR3. Połączenie MyD88 z TLR prowadzi do aktywacji kinazy MAP i czynnika transkrypcyjnego NF-κB, który kontroluje ekspresję genów dla cytokin prozapalnych, takich jak TNF-α i IL-2 [15, 41].

TIRAP pośredniczy w przekazywaniu sygnału z TLR2 oraz TLR4 i aktywuje drogę zależną od MyD88. TRIF natomiast przyłącza się do TLR3 i TLR4 aktywując alternatywną ścieżkę (TRIF-zależną), która prowadzi do aktywacji NF-κB, kinazy MAP i czynnika transkrypcyjnego IRF3 (interferon regulatory factor 3), który reguluje ekspresję interferonów typu I (I IFN), głównie IFN-β [15].

Oddziaływanie TLR i MyD88 poprzez domeny TIR stymuluje rekrutację białek z rodziny IRAK. IRAK-4 łączy się z MyD88 dzięki oddziaływaniom domen śmierci, co umożliwia pojedynczą fosforylację cząsteczki IRAK-1, która oddysocjowuje od MyD88 i oddziałuje z TRAF6. Prowadzi to do uruchomienia dwóch ścieżek sygnałowych. Jedna z nich skutkuje aktywacją czynnika transkrypcyjnego AP-1. Druga ścieżka aktywuje kompleks TAK z TAB, który aktywuje kompleks kinazy IκB (IKK). Po aktywacji IKK fosforyluje ona inhibitor czynnika NF-κB i kieruje tę cząsteczkę na drogę degradacji, co prowadzi do przemieszczenia NF-κB do jądra komórkowego [41]. Zarówno NF-κB i AP-1 odpowiadają za ekspresję cytokin prozapalnych [15].

W ścieżce niezależnej od MyD88 czynnik TRIF powoduje aktywację nietypowych IKK – IKKε/IKKδ i TBK1. Prowadzi to do fosforylacji i przemieszczenia czynnika IRF-3 do jądra komórkowego, który aktywuje produkcję IFN-β oraz aktywuje czynnik NF-κB. TRAM natomiast jest cząsteczką pośredniczącą w wiązaniu się TRIF do TLR4 [41].

Istnieje wiele mechanizmów negatywnej regulacji szlaków sygnałowych z TLR, co zapobiega nadmiernej odpowiedzi immunologicznej na patogeny. Na przykład stymulacja TLR4 przez LPS powoduje zmniejszenie ekspresji TLR4 na powierzchni komórki, a ligandy TLR2, TLR4 i TLR7 powodują zmniejszenie ekspresji IRAK-1 [41]. Negatywnym regulatorem jest także cząsteczka SARM, która oddziałuje z TRIF i blokuje aktywację NF-κB [47].

3.3. Ligandy receptorów TLR

Receptory TLR można podzielić na dwie grupy ze względu na ich lokalizację w komórce. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 i TLR6 znajdują się na powierzchni błony komórkowej, natomiast TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 występują wewnątrzkomórkowo w endosomach. Receptory TLR wiążą ligandy egzogenne (tab. I) i endogenne [14, 15].

TLR4 w kompleksie z MD-2 i CD14 rozpoznaje LPS bakterii Gram-ujemnych [15], a także białka szoku cieplnego Hsp60 i Hsp70. W przeciwieństwie do LPS inne ligandy TLR4 muszą osiągnąć stosunkowo wysokie stężenie, aby aktywować odpowiedź immunologiczną [41]. TLR2 tworzy heterodimery z TLR1 i TLR6 lub z cząsteczkami innymi niż TLR np. z CD36 rozpoznając peptydoglikan, lipopeptydy i lipoproteiny bakterii Gram-dodatnich, lipopeptydy *Mycoplasma* sp. oraz zymozan grzybów. Kompleks TLR1/2 rozpoznaje triacylolipopeptydy, a heterodimer TLR2/6 diacylolipopeptydy [15]. TLR2 może także rozpoznawać LPS (bakterii innych szczepów niż enteropatogennych), który różni się od lipopolisacharydu rozpoznawanego przez TLR4 liczbą łańcuchów kwasów tłuszczowych w cząsteczce lipidu A [41]. U ludzi, TLR10 tworzy heterodimery z TLR1 lub TLR2, ligandy tych kompleksów nie są znane. Ligandami TLR5 jest 11 białek [15], z których największe znaczenie ma flagellina. TLR5 jako jedyny rozpoznaje wyłącznie ligandy białkowe i wydaje się pełnić ważną rolę w rozpoznaniu patogenów w błonach śluzowych [41]. Mysi TLR11 rozpoznaje nieznaną ligand pochodzący z bakterii wywołujących infekcje układu moczowego i cząsteczkę podobną do profiliny pochodzącą z organizmu pasożytniczego *Toxoplasma gondii* [15, 21].

Receptory TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 występują w przedziałach wewnątrzkomórkowych i swoje ligandy wiążą w dojrzałym endosomie połączonym z lizosomem, gdzie w normalnych warunkach nie występują kwasy nukleinowe gospodarza. Rozpoznają kwasy nukleinowe patogenów (wirusów i w mniejszym stopniu bakterii), dzięki różnicom w ich budowie w porównaniu do kwasów nukleinowych gospodarza a także odmiennym miejscu występowania [14]. Jako adaptorów używają MyD88 lub TRIF. TLR3 rozpoznaje dwuniciowe RNA, które jest produkowane podczas replikacji wielu wirusów. Ludzkie TLR7 i TLR8 są bardzo podobne strukturalnie i rozpoznają wirusowe, jednoniciowe RNA bogate w guaniny lub uracyl, małe interferujące RNA oraz syntetyczne pochodne imidazochinolonów i analogi guanozyny. TLR9 jest receptorem dla CpG DNA obecnego w genomach bakterii i wirusów. Receptor ten wiąże także inne ligandy, np. hemozoinę produkowaną przez pasożyty *Plasmodium* sp. z hemoglobiny pochodzącej z erytrocytów gospodarza [15] (tab. I).

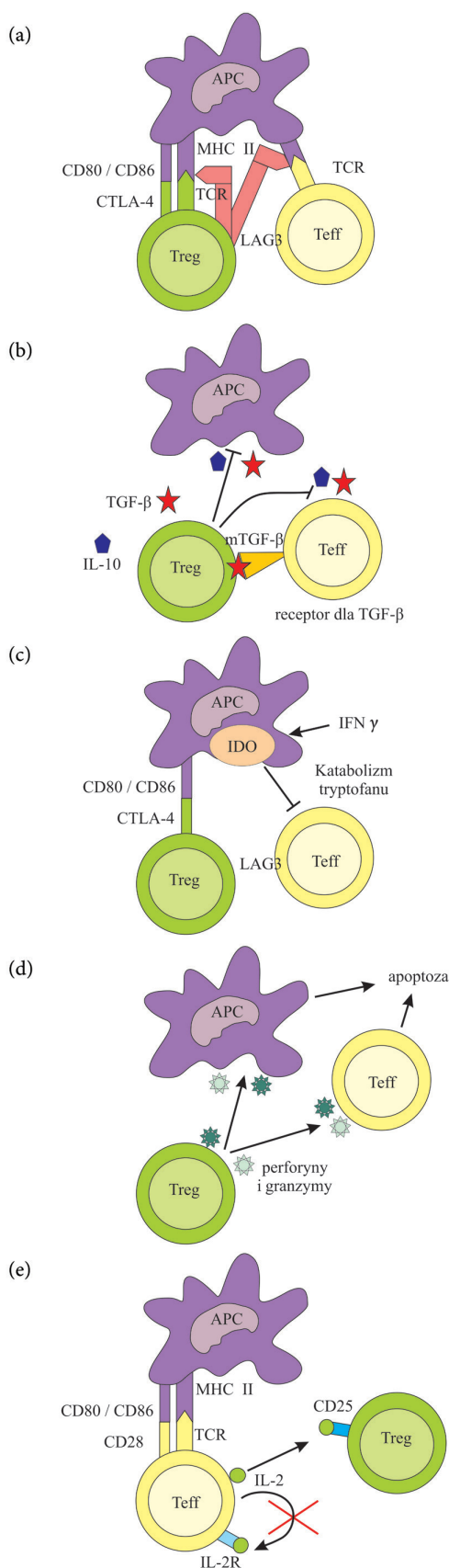
3.4. Rola w generowaniu odporności nabytej

Rozpoznanie wzorców molekularnych patogenów przez receptory TLR inicjuje migrację i gromadzenie się leukocytów w miejscu inwazji mikroorganizmów, co prowadzi do rozwoju stanu zapalnego. Migracja zachodzi dzięki zwiększeniu ekspresji cząsteczek (selektyn, chemokiny i receptorów dla chemokiny), które odpowiadają za adhezję leukocytów do ścian nabłonka naczyń włosowatych, wynaczynienie oraz przemieszczanie się komórek do miejsca stanu zapalnego [14].

Tabela I

Ligandy receptorów TLR

TLR	Ligandy endogenne	Ligandy egzogenne
TLR1	Nieznany	Bakteryjne triacylowane lipopeptydy, białka pasożytów (TLR1/2)
TLR2	Hsp70, gp96, komórki nekrotyczne	Kwas lipotejchowy bakterii Gram-dodatnich, zymozan ściany komórkowej drożdży
TLR3	mRNA	Dwuniciowe RNA wirusów
TLR4	Hsp60, Hsp70, hialuronian, fibronektyna, fibrynogen, heparan, β -defensyna 2	LPS bakterii Gram-ujemnych
TLR5	Nieznany	Flagellina
TLR6	Nieznany	Bakteryjne diacylowane lipopeptydy (TLR2/6)
TLR7	Nieznany	Jednoniciowe RNA wirusów
TLR8	Nieznany	Jednoniciowe RNA wirusów
TLR9	Kompleksy przeciwciała-chromatyna	CpG DNA wirusów i bakterii
TLR10	Nieznany	Nieznany
TLR11	Nieznany	Profilina pierwotniaka <i>Toxoplasma gondii</i> , komponenty bakterii powodujących infekcje dróg moczowych
TLR12	Nieznany	Nieznany
TLR13	Nieznany	Nieznany



Rys. 1. Mechanizmy supresji – objaśnienia w tekście

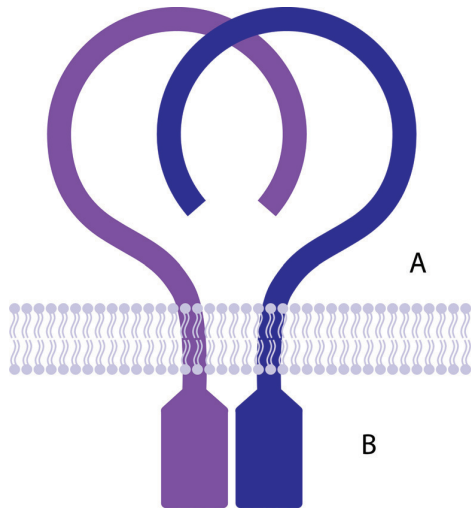
Stymulacja receptorów TLR występujących na komórkach dendrytycznych prowadzi do przesunięcia odpowiedzi immunologicznej w kierunku odpowiedzi typu Th1, Th2 lub supresji (rys. 4). Indukcja odpowiedzi nabytej rozpoczyna się wraz z wchłonięciem antygeny przez niedojrzałą komórkę dendrytyczną, wykazującą niską ekspresję MHC II i cząsteczek kostymulacyjnych (z rodziny B7). Jednocześnie, po rozpoznaniu patogenu przez receptory PRR, w tym TLR, komórki dendrytyczne dojrzewają – zwiększają ekspresję cząsteczek MHC oraz cząsteczek z rodziny B7 (CD80/86) [31]. Następnie komórki DC migrują do najbliższego węzła chłonnego [14, 24]. W węzle chłonnym DC prezentują antygeny naiwnym limfocytom Th. Kierunek różnicowania naiwnych limfocytów Th (Th1, Th2 lub Treg) zależy od stanu funkcjonalnego komórek APC, a ten jest determinowany przez rodzaj PAMPs, które związały się z PRR (rys. 4c). I tak, związanie ligandu z receptorem TLR prowadzi do indukcji dojrzewania DC, produkcji IL-12 oraz IL-2 i różnicowania naiwnych limfocytów Th w kierunku Th1 (rys. 4a). Powstawanie Th2 i Treg jest związane z aktywacją innych PRR występujących na APC. Jednym z takich PRR jest CD11b/CD18, który wiąże np. toksyny cholery (CT) lub cząsteczki występujące u pasożytów (rys. 4b, 4c). Kolejne badania wykazały, że za indukcję Treg odpowiadają także filamentarna hemaglutynina (FHA), toksyna cyklazy adenylowej *Bordetella pertussis* (CyaA) oraz niestrukturalne białko 4 (NS4) wirusa zapalenia wątroby typu C. Być może na ten kierunek różnicowania ma również wpływ jednoczesne rozpoznanie ligandów różnych receptorów TLR [24].

Dojrzałe DC, wykazujące wysoką ekspresję MHC II, CD80, CD86, CD40, ICAM-1 oraz produkujące IL-12 indukują powstanie limfocytów Th1. Różnicowanie Treg jest indukowane przez niedojrzałe DC, które wykazują ekspresję MHC II, CD80 oraz CD86 na średnim, a CD40 i ICAM-1 na niskim poziomie oraz wydzielają duże ilości IL-10. Podobny fenotyp, połączony dodatkowo z wysoką ekspresją OX40 charakteryzuje DC indukujące różnicowanie limfocytów T w kierunku Th2 [24].

Aktywacja receptorów PRR, w tym TLR, na makrofagach i komórkach dendrytycznych odgrywa znaczącą rolę w kierowaniu limfocytów Th na różne ścieżki różnicowania. Obecność ligandów receptorów TLR indukuje powstawanie głównie odpowiedzi typu Th1, ale może też prowadzić do pojawienia się indukowanych regulatorowych limfocytów T, które hamują działanie limfocytów Th1.

4. Modulacja aktywności Treg przez stymulację TLR

Regulatorowe limfocyty T wykazują ekspresję szerokiego wachlarza receptorów TLR, co sugeruje udział receptorów TLR w regulacji aktywności Treg [31].



Rys. 2. Dimer receptorów TLR. (A) część zewnątrzkomórkowa zawierająca motywy LRR, (B) część wewnątrzkomórkowa zawierająca domeny TIR

4.1. Wpływ egzogennych ligandów lipidowych

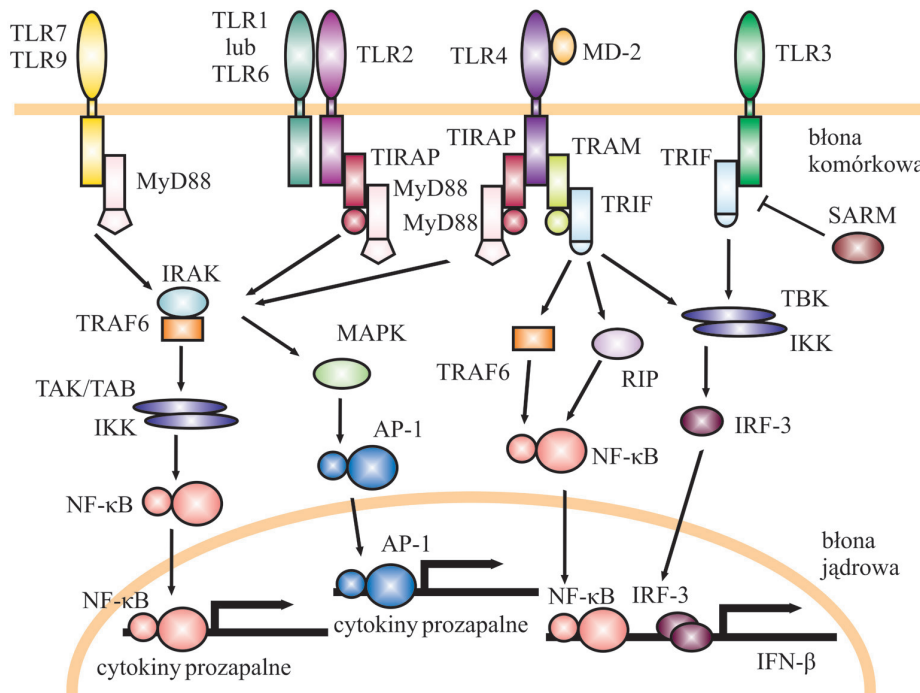
4.1.1. TLR2

TLR2 jest obecny w cytoplazmie spoczynkowych limfocytów efektorowych CD4+ i Treg, po aktywacji zależnej od TCR pojawia się na powierzchni błony komórkowej. Zapobiega to nadmiernej aktywacji limfocytów przez występujące powszechnie u mikroorganizmów cząsteczki będące ligandami TLR2 [22].

Wydaje się, że TLR2 odpowiada za utrzymanie odpowiedniej liczby Treg u myszy. Dowodzą tego doświad-

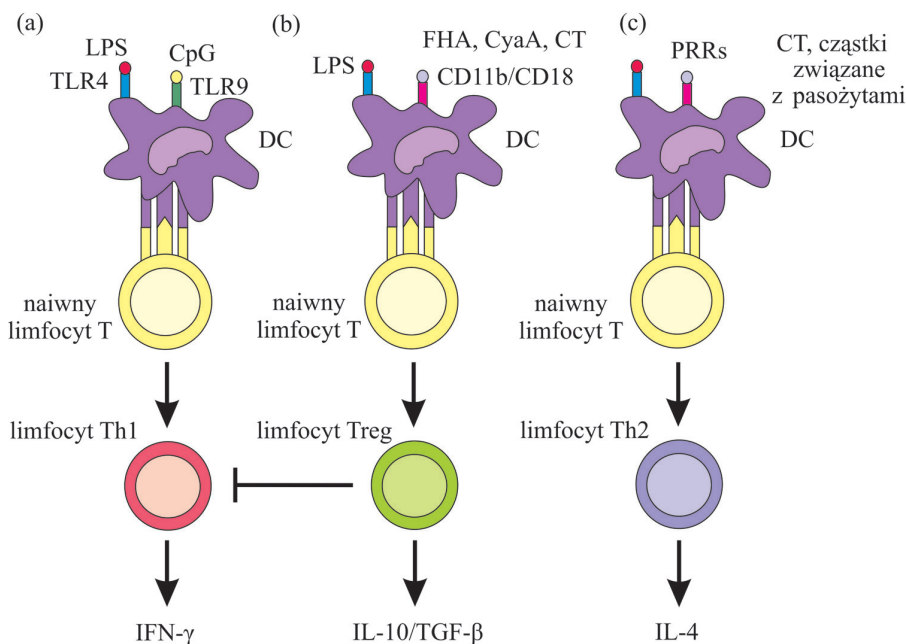
czenia, w których po podaniu antygeny u myszy knock-out TLR2^{-/-} obserwowano znacznie niższą liczbę limfocytów CD4+CD25+FoxP3+ niż u myszy szczepu dzikiego (WT). Takich różnic nie zaobserwowano przy braku stymulacji antygenem [18]. Inni badacze zaobserwowali jednak zmniejszoną liczbę Treg także u myszy knock-out TLR2^{-/-}, które nie miały kontaktu z antygenem. Zauważono także mniejszą podatność myszy TLR2^{-/-} na ogólnoustrojową infekcję *Candida albicans* (składniki ściany komórkowej tych grzybów są ligandami dla TLR2 i TLR4). Jednocześnie u tych samych myszy obserwowano znacznie cięższy przebieg infekcji pasożytem *Schistosoma mansoni* (fosfatydyloseryna jaj *S. mansoni* jest ligandem dla TLR2). Przebieg obu infekcji może być związany z obniżoną zdolnością do supresji rozwijającej się odpowiedzi immunologicznej, co może być związane ze zmniejszoną liczbą Treg. Przy czym w przypadku *C. albicans* dochodzi w tych warunkach do szybszej eliminacji patogenu, podczas gdy infekcja *S. mansoni* wywołuje, przy braku supresji, długotrwałą i nadmierną odpowiedź immunologiczną, która uszkadza tkanki gospodarza. Podobnie reagowały myszy knockout MyD88^{-/-} (MyD88 jest cząsteczką adaptorową dla wielu TLR, w tym TLR2). Podobny efekt zaobserwowano u myszy po usunięciu Treg za pomocą przeciwciał anti-CD25 [18, 28, 39].

Odmienne efekty obserwowano, gdy do aktywacji TLR2 użyto innych ligandów, np. syntetycznej bakteryjnej lipoproteiny, Pam3CysSK4 (ligand heterodimeru TLR1/2). Działanie Pam3CysSK4 bezpośrednio na aktywowane Treg w warunkach *in vitro* powoduje ich pro-



Rys. 3. Szlaki przekazywania sygnału z receptorów TLR

Rys. 4. Kierunek różnicowania limfocytów Th w zależności od cząsteczek aktywujących makrofagi i komórki dendrytyczne (wyjaśnienia w tekście)



liferację, podwyższa poziom ekspresji CD25 oraz obniża ich właściwości supresyjne [22, 39]. Obserwowany w tych warunkach u Treg zanik zdolności do hamowania proliferacji limfocytów efektorowych wynikał zarówno z utraty właściwości supresyjnych Treg, jak i z wzmożonej produkcji IL-2 przez Tef. Wysokie stężenie IL-2 skutkuje utratą wrażliwości Tef na działanie Treg oraz proliferacją limfocytów Treg, podczas której tracą one właściwości supresyjne [22]. Po usunięciu ligandu TLR2 aktywność supresyjna Treg zostaje przywrócona [22, 39]. U podłoża zahamowania właściwości supresyjnych obserwowanego w tym eksperymencie leżał spadek poziomu ekspresji FoxP3. Podobnie, w hodowlach *in vitro* Treg z APC, obecność Pam3CysSK4 powoduje proliferację Treg. Podobny efekt obserwowano w obecności MALP2 – syntetycznego ligandu heterodimeru TLR2/6 oraz naturalnych ligandów tego heterodimeru – peptydoglikanu, zanieczyszczonego LPS i termicznie zabitych *C. albicans* [28, 39].

Limfocyty Treg pobrane od transgenicznych myszy FoxP3-GFP stymulowane w hodowlach *in vitro* przeciwciałami anty-CD3, IL-2 oraz Pam3CysSK4 proliferują zarówno w obecności jak i braku APC, ekspresja FoxP3 i aktywność supresyjna Treg pozostały nie zmienione. W tych warunkach obecność Pam3CysSK4 przedłuża żywotność Treg poprzez indukcję czynnika antyapoptotycznego Bcl-xL oraz wzmacnia proliferację swoistych antygenowo Treg. Komórki Treg hodowane w obecności Pam3CysSK4 nie tracą zdolności do hamowania rozwoju chorób autoimmunizacyjnych *in vivo* [5].

Odmienne wyniki uzyskała grupa badaczy pracująca na szczurzych Treg. Ustalili oni, że ligandy dla heterodimeru TLR2/6 (peptydoglikan) oraz TLR2 – HKLM

(zabite termicznie komórki *Listeria monocytogenes*) nie powodują wzmożonej proliferacji Treg i nie obniżają ich aktywności supresyjnej [6]. Przyczyną może być także bark aktywności receptora TLR2 w Treg szczurów lub rodzaj użytego ligandu. Proliferację Treg najsilniej indukuje aktywacja heretodimeru TLR1/TLR2 (ligandem Pam3CysSK4), słabiej aktywacja homodimeru TLR2/TLR2 (ligandem LTA-SA) oraz heterodimeru TLR2/TLR6 (ligandem Pam2CysSK4) [5].

4.1.2. TLR4

U myszy wykazano obecność mRNA dla TLR4 w limfocytach Treg. *In vitro* ligand TLR4 - LPS indukował proliferację Treg oraz wzmacniał ich właściwości supresyjne. Efekt ten nie był widoczny gdy użyto komórek Treg izolowanych od myszy C3H/HeJ lub C57BL/10ScCr [4].

W późniejszych badaniach nie udało się potwierdzić obecności TLR4 na powierzchni mysich Treg, ponadto LPS działając bezpośrednio na Treg nie indukował ich proliferacji ani wydzielania cytokin [22]. W warunkach *in vitro* nie miał także wpływu na ich aktywność supresyjną oraz nie powodował wzrostu ekspresji CD25 na powierzchni Treg [9].

In vitro, Treg traktowane LPS i hodowane z APC izolowanymi ze śledziony oraz Tef, proliferowały i wykazywały wzrost ekspresji CD25 [39]. Obserwowano także zależny od IL-6 brak wrażliwości Tef na działanie Treg traktowanych LPS [30]. Inne doświadczenia pokazały jednak, iż zablokowanie aktywności supresyjnej Treg przez mieloidalne DC różnicowane *in vitro* (z komórek szpiku kostnego) i stymulowane LPS nie jest zależne od IL-6 i IL-1, polega na zwiększeniu wrażliwość Treg na IL-2 [16].

Izolowane z ludzkiej krwi obwodowej Treg poddane działaniu LPS hamują wydzielanie cytokin i reaktywnych związków tlenu przez neutrofile oraz stymulują ich apoptozę, działanie to zależy częściowo od wydzielania przez Treg IL-10 i TGF- β . Do badań użyto limfocytów CD4⁺CD25⁺ izolowanych z krwi obwodowej, wśród których oprócz Treg mogą znajdować się mające podobny fenotyp aktywowane efektorowe limfocyty T. [19, 20].

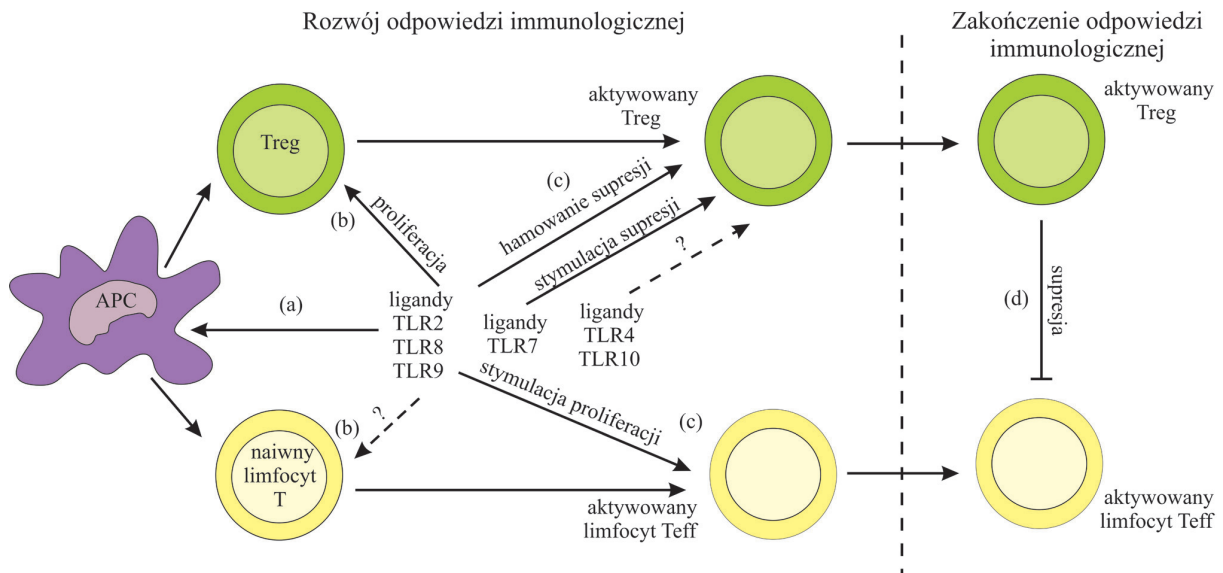
Jednocześnie LPS nie powoduje proliferacji i nie ma wpływu na aktywność supresyjną Treg szczurów [6]. Nie powoduje także proliferacji ludzkich Treg i nie wpływa na ekspresję FoxP3, natomiast nieznacznie hamuje proliferację Tef. Po aktywacji ludzkich Treg obserwowano niewielkie ilości mRNA w cytoplazmie i białka TLR4 na powierzchni Treg [7]. Jednak nie potwierdzono wpływu LPS na aktywność ludzkich Treg, ani w obecności komórek APC, ani Tef [32, 49].

Występujący na komórkach odpowiedzi wrodzonej (makrofagach i DCs) kompleks receptorowy rozpoznający LPS składa się z dwóch łańcuchów TLR4 z których każdy jest związany z białkiem MD-2. Obecność MD-2 związanego z zewnątrzkomórkową częścią TLR4 jest niezbędna do agregacji TLR4, związania ligandu i przekazania sygnału do wnętrza komórki. Białko MD-2 jest także wydzielane w formie rozpuszczalnej, w tym także przez komórki dendrytyczne podczas rozwijającego się stanu zapalnego. Kolejne cząsteczki istotne dla rozpoznania LPS to glikoproteina CD14 – wiążąca LPS i przekazująca go kompleksowi TLR4/MD-2 oraz białko LBP znajdu-

jące się w osoczu krwi bądź na powierzchni komórek, które ułatwia wiązanie LPS z CD14. Wykazano, że wiązanie LPS do kompleksu TLR4/MD-2 bez udziału białek pomocniczych powoduje uruchomienie jedynie ścieżki zależnej od MyD88 skutkującej aktywacją NF- κ B i produkcją TNF- α . Natomiast udział tych białek uruchamia także ścieżkę zależną od TRAM prowadzącą do aktywacji czynnika IRF3 i produkcji IFN- β [25, 26]. Brak LBP czy CD14 skutkuje zatem znacznie obniżonym siłą wiązania LPS do kompleksu TLR4/MD-2 [26]. Sugeruje się, że w skład kompleksu rozpoznającego LPS może wchodzić więcej białek m.in. Hsp70, Hsp90, CXCR4 (receptor dla chemokin) i GDF5 [44]. Jak dotąd nie udało się potwierdzić ekspresji cząsteczek wchodzących w skład kompleksu wiążącego LPS takich jak CD14, MD-2 i innych na powierzchni Treg.

Obserwowane zmiany w aktywności Treg zachodzące pod wpływem LPS mogą być pochodną wielu czynników w tym składzie podłoża hodowlanego (z surowicą lub bez) w jakim prowadzono eksperymenty *in vitro*, a w szczególności rodzaju surowicy (inaktywowana termicznie lub nie), która jest źródłem LPB i innych białek [4, 6, 9, 22, 49]. Obecność innych białek w tym cytokin może zmieniać odpowiedź komórek na LPS np. makrofagi w obecności IFN- γ wykazują zwiększoną ekspresję TLR4 pod wpływem LPS [13].

Myszy transgeniczne 96-tmT (z nadekspresją gp96-czaperonem TLR1, 2 i 4) wykazują zależną od TLR4 nadwrażliwość na LPS i rozwijają objawy podobne do



Rys. 5. Wpływ ligandów TLR na aktywność regulatorowych limfocytów T

Przed infekcją komórki APC znajdują się w tkankach a naiwne limfocyty T i Treg w węzłach chłonnych, (a) napotkanie patogenu przez APC powoduje ich migrację do węzłów chłonnych, prezentację antygenów limfocytom T i pobudzenie ich proliferacji, (b) ligandy TLR mogą także dostać się do węzłów chłonnych, gdzie razem z stymulacją poprzez TCR pochodzącą od APC stymulują proliferację Treg i zablokowanie ich funkcji supresyjnych, nie jest znany wpływ ligandów TLR na naiwne limfocyty T. (c) TLR wspomagają proliferację Tef i niewrażliwość na hamowanie przez Treg, dzięki wzrostowi produkcji IL-2, dalej wstrzymują funkcje supresyjne Treg. (d) po eliminacji patogenów i usunięciu ligandów TLR zwiększona pula Treg odzyskuje zdolność hamowania Tef, co zapobiega uszkodzeniu tkanek i przywraca równowagę w układzie immunologicznym.

tocznia rumieniowatego. U myszy 96mT aktywność Treg w obecności APC jest zwiększona w porównaniu do myszy dzikich w badaniach prowadzonych zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Stwierdzono także, że aktywność ta zależy od obecności TLR4 [8].

4.2. Wpływ egzogennych ligandów białkowych

4.2.1. TLR5

Ludzkie Treg wykazują ekspresję mRNA dla TLR5 na wyższym poziomie niż Tef (CD4⁺CD25⁻), ale na powierzchni komórek białko TLR5 występuje w podobnej ilości w obu tych populacjach [3, 7]. *In vitro* w hodowlach Treg z Tef i APC równoczesna stymulacja TCR oraz TLR5 (flageliną) nie powoduje przełamania anergii Treg, natomiast limfocyty efektorowe produkują IL-2 i proliferują. Przy braku APC pod wpływem flageliny zwiększa się ekspresja FoxP3 i właściwości supresyjne Treg. Natomiast w sytuacji, gdy APC są obecne w hodowli, właściwości supresyjne Treg zostają zahamowane [7].

Podanie myszom flageliny jednocześnie z przeszczepieniem komórek immunogenego nowotworu powoduje szybszy wzrost guza oraz zwiększenie liczebności populacji limfocytów Treg. Natomiast podanie flageliny po 8–10 dniach od wszczepienia komórek nowotworowych skutkuje zahamowaniem wzrostu guza i zmniejszeniem liczebności populacji Treg na obwodzie. Sugeruje to, że Treg w obecności aktywowanych, dojrzałych APC pod wpływem flageliny tracą właściwości supresyjne, a w obecności niedojrzałych APC indukują tolerancję [36]. Inna grupa zaobserwowała natomiast, że traktowanie flageliną aktywowanych szczurzych Treg nie powoduje ich proliferacji i nie zmienia ich właściwości supresyjnych [6].

4.2.2. TLR10

U ludzi, potwierdzono obecność mRNA w cytoplazmie oraz białka TLR10 na powierzchni błony komórkowej Treg. Wydaje się, że w regulację ekspresji genu *TLR10* zaangażowany jest czynnik transkrypcyjny FoxP3. Jak dotąd nie opisano wpływu TLR10 na funkcjonowanie Treg [3].

4.3. Wpływ egzogennych kwasów nukleinowych

4.3.1. TLR7

W porównaniu do limfocytów T CD4⁺CD25⁻, mysie regulatorowe limfocyty T CD4⁺CD25⁺ wykazują wyższą ekspresję mRNA dla TLR7 [4]. Inne badania nie potwierdziły takich różnic w poziomie mRNA, choć wykazały, że poziom białka TLR7 jest trzykrotnie wyższy w endosomach mysich limfocytów T regulatorowych w porównaniu do naiwnych limfocytów T

efektorowych. W badaniach *in vitro*, ligand receptora TLR7 – imikwimod, zwiększał właściwości supresyjne Treg równocześnie nie indukując proliferacji ani Treg ani Tef. Podobne wyniki uzyskano przy użyciu innych ligandów TLR7 – gardikwimodu i jednoniciowego RNA poli(U). Komórki Treg pochodzące z myszy knockout MyD88^{-/-} stymulowane *in vitro* ligandami TLR7 zachowywały niezmienną właściwość supresyjną, co potwierdza, że obserwowane zmiany właściwości supresyjnych były zależne od stymulacji TLR. W warunkach *in vitro*, Treg stymulowane ligandami TLR7 hamują wydzielanie IL-2 i IFN- γ przez Tef, wykazują podwyższoną ekspresję CD25 i większą wrażliwość na IL-2 oraz wyższą ekspresję FoxP3 w obecności IL-2. W eksperymentach *in vivo*, Treg izolowane z myszy, którym podano gardikwimod wykazywały zwiększoną aktywność supresyjną wobec Tef. Działanie liganów TLR7 może mieć modulujący wpływ na przebieg infekcji wirusami RNA, zapewniając równowagę między rozwojem odpowiedzi komórkowej skierowanej przeciw zakażonym komórkom, a jej wyciszeniem przez Treg. [10]

4.3.2. TLR8

TLR 8 został wykryty w ludzkich Treg zarówno na poziomie mRNA jak i w postaci białka powierzchniowego [3]. *In vitro*, ligandy TLR8 takie jak oligonukleotydy kwasów nukleinowych, dwuniciowe DNA oraz jednoniciowe RNA zawierające fragment poliguaninowy powodują zahamowanie właściwości supresyjnych ludzkich Treg zarówno w obecności jak i przy braku DC. Proces ten zależy od cząsteczek MyD88 i IRAK4. Podanie myszom z przeszczepionym nowotworem stymulowanym ligandem TLR8 limfocytów Treg intensyfikuje odpowiedź przeciwnowotworową, efekt ten nie był obserwowany po transferze niestymulowanych Treg [32]. Świadczy to o obniżeniu tolerogenicznej aktywności Treg wywołanej stymulacją TLR8.

4.3.3. TLR9

U szczurów wykazano obecność mRNA dla TLR9 zarówno w regulatorowych limfocytach T jak i limfocytach efektorowych CD4⁺. Podanie ligandu dla tego receptora – CpG-ODN z jednoczesną stymulacją TCR powoduje wzmożoną proliferację obu tych populacji. CpG-ODN hamuje supresyjne działanie nTreg w stosunku do Tef. Przyczyną obserwowanych zmian było zniesienie wrażliwości Tef na supresję oraz proliferacja Treg, podczas której ich aktywność supresyjna jest zahamowana [17]. Nie potwierdzono wpływu stymulacji TLR9 na ekspresję czynnika FoxP3 w Treg [6].

Zmiana aktywności Treg w wyniku bezpośredniej stymulacji ligandem TLR9 jest dyskusyjna, w innych badaniach wykazano, że proliferacja Treg oraz wzrost ekspresji CD25 mogą być indukowane przez ligand TLR9 tylko w obecności APC [30, 39].

4.4. Wpływ ligandów endogennych

W ostatnich latach wykazano, że receptory z rodziny TLR oprócz ligandów egzogennych rozpoznają ligandy endogenne. Skutki aktywacji receptorów TLR ligandami endogennymi są często odmienne niż w przypadku ligandów egzogennych.

Odmienne działanie na aktywność Treg niż ligandy bakteryjne ma endogenne ligandy TLR2 – ludzkie białko Hsp60, nie ustalono składu kompleksu receptorowego z którym się ono łączy [45]. Niezależnie od obecności APC, Treg podane działaniu Hsp60 zmniejszają produkcję cytokin pozapalnych (IFN- γ i TNF- α) oraz zwiększają wydzielanie IL-10 przez limfocyty efektorowe. Treg aktywowane w obecności Hsp60 mają także hamujący wpływ na limfocyty CD8⁺. Wykazano także, że efekt supresyjny zależy od bezpośredniego kontaktu Treg z komórką docelową przy udziale CTLA-4, oraz czynników rozpuszczalnych takich jak IL-10 i TGF- β . Hsp60 łącząc się z TLR2 pobudza aktywność Treg na drodze zależnej od kinaz MAP, a Treg działając na Tef powodują hamowanie przemieszczenia się czynnika NF- κ B do jądra komórkowego, co skutkuje zahamowaniem produkcji IFN- γ [49].

W doświadczeniach *in vitro* na transfekowanych TLR4 ludzkich komórkach nerki HEK-293, które nie wykazują ekspresji receptorów TLR oraz CD14 wykazano, że fibronektyna wiąże się z TLR4/MD2, co powoduje aktywację czynnika NF- κ B, obecność CD14 nie wpływa na wiązanie fibronektyny [29]. Podobnie, rozpoznanie hialuronianu przez TLR4 wymaga obecności MD-2, ale nie CD14. W procesie tym bierze udział cząsteczka CD44, która oddziałuje z TLR4 w trakcie rozpoznania ligandu [42]. Cząsteczka CD14 jest natomiast wymagana przy rozpoznaniu Hsp70 przez TLR4 oraz TLR2. W obu przypadkach dochodzi do aktywacji czynnika NF- κ B. Hsp70 silniej stymuluje komórki wykazujące ekspresję równocześnie: TLR2, TLR4 i CD14, co sugeruje, że receptory te mogą tworzyć kompleksy rozpoznające Hsp70 [1]. W komórkach CHO-K1 pochodzących z jajnika chomika chińskiego CD14 jest wymagane do rozpoznania przez TLR4 występującego w płucach białka powierzchniowego A [11]. Endogenne ligandy TLR4 powodują także aktywację i dojrzewanie komórek układu odpornościowego np. fibrynogen stymuluje sekrecję chemokin przez makrofagi [37], a Hsp22 powoduje dojrzewanie komórek dendrytycznych [33].

5. Podsumowanie

Receptory TLR są ważnym elementem regulacji odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko patogenom, decydującym o rozpoczęciu usuwania mikroorganizmów bądź indukcji tolerancji. Wiązanie ligandów

przez receptory TLR limfocytów, może zmieniać aktywność Treg, bądź też sprawiać, że limfocyty T efektorowe nie wykazują wrażliwości na supresję (rys. 5). Ligandy tych receptorów mogą blokować aktywność supresyjną Treg, jak w przypadku TLR2, TLR8 i TLR9, co pozwala na skuteczną eliminację patogenów przez aktywowane limfocyty T i B. Flagelina, ligand TLR5, zmienia aktywność Treg zależnie od stanu aktywacji układu odpornościowego w lokalnym środowisku. Przy braku rozwijającego się stanu zapalnego aktywacja TLR5 flageliną, białkiem występującym także u bakterii komensalnych, promuje tolerancję natomiast podczas infekcji prowadzi do zahamowania supresji i rozwoju odpowiedzi immunologicznej. Z kolei, stymulacja TLR7 wzmacnia aktywność supresyjną Treg zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. nierozstrzygnięty pozostaje wpływ ligandu TLR4 – lipopolisacharydu na regulatorowe limfocyty T, a wyjaśnienie tej kwestii wydaje się być istotne ze względu na powszechność występowania tej substancji wśród bakterii komensalnych i patogennych. Podobnie nie określono wpływu aktywacji TLR10 na aktywność Treg. Dalszych badań wymaga ekspresja receptorów TLR na limfocytach regulatorowych, szczególnie u ludzi, oraz poznanie szlaków przekazywania sygnału, które łączą sygnał wiodący od receptora TLR z ekspresją czynników odpowiedzialnych za indukcję lub zahamowanie aktywności supresyjnej tych komórek.

Oddzielnym zagadnieniem, którego szczegółowe omówienie przekracza ramy tego opracowania jest rola endogennych ligandów receptorów TLR i związana z nim teoria „sygnału o niebezpieczeństwie”.

Zrozumienie złożonych mechanizmów kontrolujących odpowiedź immunologiczną poszerzy wiedzę na temat sposobu w jaki receptory TLR wpływają na przebieg odpowiedzi immunologicznej. Wiedza ta może posłużyć do opracowania terapii pozwalających na wykorzystanie Treg do modulowania aktywności układu odpornościowego w przebiegu chorób przebiegających z zaburzeniem jego funkcji [34, 46].

Praca powstała w ramach grantu MNiSW nr NN303 395436

Piśmiennictwo

1. Asea A., Rehli M., Kabingu E., Boch J.A., Bare O., Auron P.E., Stevenson M.A., Calderwood S.K.: Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* **277**, 15028–15034 (2002)
2. Askenasy N., Kaminitz A., Yarkoni S.: Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmun. Rev.* **7**, 370–375 (2008)
3. Bell M.P., Svingen P.A., Rahman M.K., Xiong Y., Faubion W.A. Jr.: FOXP3 regulates TLR10 expression in human T regulatory cells. *J. Immunol.* **179**, 1893–1900 (2007)
4. Caramalho I., Lopes-Carvalho T., Ostler D., Zelenay S., Haury M., Demengeot J.: Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **197**, 403–411 (2003)

5. Chen Q., Davidson T.S., Huter E.N., Shevach E.M.: Engagement of TLR2 does not reverse the suppressor function of mouse regulatory T cells, but promotes their survival. *J. Immunol.* **183**, 4458–4466 (2009)
6. Chiffolleau E., Heslan J.M., Heslan M., Louvet C., Condamine T., Cuturi M.C.: TLR9 ligand enhances proliferation of rat CD4+ T cell and modulates suppressive activity mediated by CD4+ CD25+ T cell. *Int. Immunol.* **19**, 193–201 (2007)
7. Crellin N.K., Garcia R.V., Hadisfar O., Allan S.E., Steiner T.S., Levings M.K.: Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. *J. Immunol.* **175**, 8051–8059 (2005)
8. Dai J., Liu B., Ngoi S.M., Sun S., Vella AT., Li Z.: TLR4 hyper-responsiveness via cell surface expression of heat shock protein gp96 potentiates suppressive function of regulatory T cells. *J. Immunol.* **178**, 3219–3225 (2007)
9. Fehérvári Z., Sakaguchi S.: Control of Foxp3+ CD25+CD4+ regulatory cell activation and function by dendritic cells. *Int. Immunol.* **16**, 1769–1780 (2004)
10. Forward N.A., Furlong S.J., Yang Y., Lin T.J., Hoskin D.W.: Signaling through TLR7 enhances the immunosuppressive activity of murine CD4+CD25+ T regulatory cells. *J. Leukoc. Biol.* **87**, 117–125 (2010)
11. Guillot L., Balloy V., McCormack F.X., Golenbock D.T., Chignard M., Si-Tahar M.: Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *J. Immunol.* **168**, 5989–5992 (2002)
12. Gupta S., Shang W., Sun Z.: Mechanisms regulating the development and function of natural regulatory T cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, **56**, 85–102 (2008)
13. Hu X., Chakravarty S.D., Ivashkiv L.B.: Regulation of interferon and Toll-like receptor signaling during macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms. *Immunol. Rev.* **226**, 41–56 (2008)
14. Iwasaki A., Medzhitov R.: Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **5**, 987–995 (2004)
15. Kawai T., Akira S.: TLR signaling. *Semin. Immunol.* **19**, 24–32 (2007)
16. Kubo T., Hatton R.D., Oliver J., Liu X., Elson C.O., Weaver C.T.: Regulatory T cell suppression and anergy are differentially regulated by proinflammatory cytokines produced by TLR-activated dendritic cells. *J. Immunol.* **173**, 7249–7258 (2004)
17. LaRosa D.F., Gelman A.E., Rahman A.H., Zhang J., Turka L.A., Walsh P.T.: CpG DNA inhibits CD4+CD25+ Treg suppression through direct MyD88-dependent costimulation of effector CD4+ T cells. *Immunol. Lett.* **108**, 183–188 (2007)
18. Layland L.E., Rad R., Wagner H., da Costa C.U.: Immunopathology in schistosomiasis is controlled by antigen-specific regulatory T cells primed in the presence of TLR2. *Eur. J. Immunol.* **37**, 2174–2184 (2007)
19. Leulier F., Lemaitre B.: Toll-like receptors-taking an evolutionary approach. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 165–178 (2008)
20. Lewkowicz P., Lewkowicz N., Sasiak A., Tchórzewski H.: Lipopolysaccharide-activated CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death. *J. Immunol.* **177**, 7155–7163 (2006)
21. Liu G., Zhao Y.: Toll-like receptors and immune regulation: their direct and indirect modulation on regulatory CD4+ CD25+ T cells. *Immunology*, **122**, 149–156 (2007)
22. Liu H., Komai-Koma M., Xu D., Liew F.Y.: Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 7048–7053 (2006)
23. Maggi E., Cosmi L., Liotta F., Romagnani P., Romagnani S., Annunziato F.: Thymic regulatory T cells. *Autoimmun. Rev.* **4**, 579–586 (2005)
24. Mills K.H., McGuirk P.: Antigen-specific regulatory T cells—their induction and role in infection. *Semin. Immunol.* **16**, 107–117 (2004)
25. Miyake K.: Roles for accessory molecules in microbial recognition by Toll-like receptors. *J. Endotoxin. Res.* **12**, 195–204 (2006)
26. Miyake K.: Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Semin. Immunol.* **19**, 3–10 (2007)
27. Miyara M., Sakaguchi S.: Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol. Med.* **13**, 108–116 (2007)
28. Netea M.G., Suttmüller R., Hermann C., Van der Graaf C.A., Van der Meer J.W., van Krieken J.H., Hartung T., Adema G., Kullberg B.J.: Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J. Immunol.* **172**, 3712–3718 (2004)
29. Okamura Y., Watari M., Jerud E.S., Young D.W., Ishizaka S.T., Rose J., Chow J.C., Strauss J.E. 3rd: The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* **276**, 10229–10233 (2001)
30. Pasare C., Medzhitov R.: Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science*, **299**, 1033–1036 (2003)
31. Pasare C., Medzhitov R.: Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect.* **6**, 1382–1387 (2004)
32. Peng G., Guo Z., Kiniwa Y., Voo K.S., Peng W., Fu T., Wang H.Y., Li Y., Wang H.Y., Wang R.F.: Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science*, **309**, 1380–1384 (2005)
33. Roelofs M.F., Boelens W.C., Joosten L.A., Abdollahi-Roodsaz S., Geurts J., Wunderink L.U., Schreurs B.W., van den Berg W.B., Radstake T.R.: Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* **176**, 7021–7027 (2006)
34. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Shimizu J., Yamazaki S., Sakihama T., Itoh M., Kuniyasu Y., Nomura T., Toda M., Takahashi T.: Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.* **182**, 18–32. (2001)
35. Sakaguchi S.: Control of immune responses by naturally arising CD4+ regulatory T cells that express toll-like receptors. *J. Exp. Med.* **197**, 397–401 (2003)
36. Sfondrini L., Rossini A., Besusso D., Merlo A., Tagliabue E., Ménard S., Balsari A.: Antitumor activity of the TLR-5 ligand flagellin in mouse models of cancer. *J. Immunol.* **176**, 6624–6630 (2006)
37. Smiley S.T., King J.A., Hancock W.W.: Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J. Immunol.* **167**, 2887–2894 (2001)
38. Sojka D.K., Huang Y.H., Fowell D.J.: Mechanisms of regulatory T-cell suppression – a diverse arsenal for a moving target. *Immunology*, **124**, 13–22 (2008)
39. Suttmüller R.P., den Brok M.H., Kramer M., Bennink E.J., Toonen L.W., Kullberg B.J., Joosten L.A., Akira S., Netea M.G., Adema G.J.: Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J. Clin. Invest.* **116**, 485–494 (2006)
40. Suttmüller R.P., Morgan M.E., Netea M.G., Grauer O., Adema G.J.: Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. *Trends Immunol.* **27**, 387–393 (2006)
41. Takeda K., Akira S.: Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* **17**, 1–14 (2005)
42. Taylor K.R., Yamasaki K., Radek K.A., Di Nardo A., Goodarzi H., Golenbock D., Beutler B., Gallo R.L.: Recognition of

- hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on Toll-like receptor 4, CD44, and MD-2. *J. Biol. Chem.* **282**, 18265–18275 (2007)
43. Triantafilou M., Triantafilou K.: Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol.* **23**, 301–304 (2002)
44. Triantafilou M., Triantafilou K.: The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. *J. Endotoxin Res.* **11**, 5–11 (2005)
45. van Maren W.W., Jacobs J.F., de Vries I.J., Nierkens S., Adema G.J.: Toll-like receptor signalling on Tregs: to suppress or not to suppress? *Immunology*, **124**, 445–452 (2008)
46. Wang R.F.: Regulatory T cells and innate immune regulation in tumor immunity. *Springer Semin. Immunopathol.* **28**, 17–23 (2006)
47. Watters T.M., Kenny E.F., O'Neill L.A.: Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins *Immunol. Cell. Biol.* **85**, 411–419. (2007)
48. Yi H., Zhen Y., Jiang L., Zheng J., Zhao Y.: The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ T cells. *Cell. Mol. Immunol.* **3**, 189–195 (2006)
49. Zanin-Zhorov A., Cahalon L., Tal G., Margalit R., Lider O., Cohen I.R.: Heat shock protein 60 enhances CD4+ CD25+ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *J. Clin. Invest.* **116**, 2022–2032 (2006)