

RECEPTORY TOLL-PODOBNE (TLR) I ICH UDZIAŁ WE WRODZONEJ ODPOWIEDZI ODPORNOŚCIOWEJ NA PRZYKŁADZIE AKTYWACJI TLR4 PRZEZ LIPOPOLISACHARYD

TOLL-LIKE RECEPTORS AND THEIR CONTRIBUTION TO INNATE
IMMUNITY: FOCUS ON TLR4 ACTIVATION BY LIPOPOLYSACCHARIDE

Maciej CZERKIES, Katarzyna KWIATKOWSKA

Instytut Biologii Doświadczalnej PAN, Zakład Biologii Komórki, Warszawa

Streszczenie: Mechanizmy wrodzonej odpowiedzi odpornościowej uruchamiane są w wyniku rozpoznania elementów budulcowych mikroorganizmów o strukturze zachowanej w toku ewolucji, nazywanych wzorcami molekularnymi. W ich wiązaniu uczestniczą wyspecjalizowane receptory inicjujące kaskady sygnałów, które prowadzą do produkcji białek o charakterze prozapalnym oraz do aktywacji i regulacji mechanizmów nabytej odpowiedzi odpornościowej. Do receptorów tego typu należą receptory Toll-podobne (TLR), rozpoznające elementy ścian komórkowych, aparatu ruchu, jedno- i dwuniciowe RNA oraz motywy DNA typowe dla mikroorganizmów. Wszystkie receptory TLR zbudowane są z domeny wiążącej ligandy, która zawiera liczne motywy bogate w leucynę, pojedynczej domeny transbłonowej oraz domeny sygnałowej TIR. Pomimo znacznego strukturalnego zróżnicowania ligandów ich związanie prowadzi do dimeryzacji receptorów TLR, co z kolei umożliwia interakcję domeny TIR z białkami adaptorowymi i zapoczątkowuje kaskady sygnałowe. Receptory TLR angażują cztery wspólne białka adaptorowe, około dziesięciu kinaz o charakterze sygnałowym oraz aktywują docelowo kilka czynników transkrypcyjnych, w tym NFκB, IRF i AP-1. Szczególną uwagę poświęca się receptorowi TLR4 aktywowanemu przez lipopolisacharyd (LPS), budulec błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych, gdyż uruchomiona przez LPS reakcja zapalna może prowadzić do potencjalnie śmiertelnego w skutkach szoku septycznego. Badania ostatnich lat znacznie rozszerzyły naszą wiedzę na temat współdziałania szeregu białek, w tym CD14, kompleksu TLR4/MD-2 oraz receptorów zmiataaczy w modulacji odpowiedzi komórek na LPS. Ugruntowały też przekonanie o dychotomii ścieżek sygnałowych receptora TLR4, które zależą od udziału białek adaptorowych MyD88 i TRIF, oraz prowadzą do ekspresji genów kodujących cytokiny prozapalne i interferony typu I. Kluczowym wydarzeniem regulującym generację sygnału na ścieżce zależnej od TRIF jest internalizacja receptora TLR4.

Słowa kluczowe: receptory Toll-podobne, przekazywanie sygnału, lipopolisacharyd, sepsa, wrodzona odpowiedź odpornościowa

Summary: Mechanisms of innate immunity are triggered as a result of recognition of evolutionary conserved structures of microorganisms, named pathogen-associated molecular patterns. Their recognition is mediated by specialized receptors which initiate signaling cascades leading to expression of proinflammatory mediators and regulation of innate immunity. Among several classes of such receptors, Toll-like receptors (TLR) are extensively studied as sensing an array of microbial cell wall and membrane components as well as single- and double-stranded RNA and DNA motifs typical for microorganisms. Each TLR consists of a ligand-binding domain containing leucine-rich repeats, a single transmembrane domain and a signaling TIR domain. After ligand binding, TLR dimerize which facilitates the interaction of TIR domains with adaptor proteins triggering signaling cascades. TLR engage four common adaptor proteins, about ten signaling kinases and few transcription factors including NFκB, IRF and AP-1. Special attention is paid to TLR4 activated by lipopolysaccharide (LPS), a component of the outer membrane of Gram-negative bacteria, since an exaggerated response to LPS may lead to potentially deadly septic shock. In recent years clear progress has been made in our understanding how cooperation of several proteins including CD14, TLR4/MD-2 complex and scavenger receptors modulates the cell response to LPS. The studies revealed also a dichotomy of signaling pathways triggered by TLR4 which depend on participation of MyD88 and TRIF adaptor proteins and lead the expression of genes encoding pro-inflammatory cytokines and type I interferons, respectively. The key event in the TRIF-dependent pathway is internalization of activated TLR4.

Key words: Toll-like receptors, signal transduction, lipopolysaccharide, sepsis, innate immunity

WSTĘP

Kluczową rolę w funkcjonowaniu układu odpornościowego kręgowców pełnią starsze ewolucyjnie mechanizmy odpowiedzi wrodzonej, nazywanej też odpowiedzią nieswoistą. Umożliwiają one szybką, choć niespecyficzną odpowiedź, skierowaną przeciwko mikroorganizmom, którym udało się pokonać fizyczne bariery chroniące organizm. Zależy od nich także uruchomienie i kontrola mechanizmów odporności nabytej (swoistej), która zapewnia też długoterminową pamięć immunologiczną.

Jedną z najistotniejszych kwestii w indukcji odpowiedzi wrodzonej jest zdolność układu odpornościowego do rozróżnienia „obcych” cząsteczek mikroorganizmów od „własnych” cząsteczek organizmu gospodarza. Rozróżnienie to jest istotne ze względu na konieczność wczesnego wykrycia patogenów oraz uniknięcia groźnej w skutkach autoimmunizacji. Kolejnym problemem, który musi przezwyciężyć układ odpornościowy, jest rozpoznawanie ogromnej liczby potencjalnie niebezpiecznych organizmów, które należą do tak zróżnicowanych klas jak bakterie, wirusy, grzyby i pierwotniaki. Zadanie to wypełniają receptory rozpoznające wzorce (ang. *Pattern Recognition Receptors*, PRR) występujące w komórkach takich jak monocyty i makrofagi, neutrofile, komórki dendrytyczne oraz

nabłonkowe. Receptory te zdolne są do rozpoznawania zachowanych w ewolucji cząsteczek, charakterystycznych dla całych grup mikroorganizmów, a niespotykanych w organizmie gospodarza. Cząsteczki takie określa się mianem molekularnych wzorców związanych z patogenami (ang. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMP) [39].

RECEPTORY ROZPOZNAJĄCE WZORCE (PRR)

Typowym przykładem wzorców molekularnych rozpoznawanych przez receptory PRR są składniki budulcowe ściany komórkowej bakterii, a w przypadku bakterii Gram-ujemnych, także błony zewnętrznej. Struktury te zawierają typowe dla bakterii cząsteczki, takie jak peptydoglikany, lipopolisacharydy oraz specyficzne lipoproteiny. Drugą istotną grupą cząsteczek rozpoznawanych przez receptory PRR są kwasy nukleinowe. W tym przypadku ich rozróżnienie od analogicznych cząsteczek gospodarza jest możliwe dzięki tworzeniu przez nie charakterystycznych struktur, występowaniu specyficznych sekwencji oraz różnic w modyfikacji (np. brak metylacji motywów CpG).

Postuluje się, że poza rozpoznawaniem patogenów, dodatkową funkcją pełnioną przez receptory PRR jest ich współdziałanie w odpowiedzi na endogenne sygnały świadczące o uszkodzeniach tkanek. Do takich cząsteczek należą m.in. produkty proteolizy macierzy zewnątrzkomórkowej, które akumulują się podczas uszkodzeń tkanek oraz niektóre wewnątrzkomórkowe białka, jak HMGB-1 (ang. *High-Mobility Group Box-1*), uwalniane podczas apoptozy komórek [84]. Takie endogenne cząsteczki zdolne do aktywacji układu odpornościowego przy udziale receptorów PRR określa się mianem DAMP (ang. *Damage/Danger-Associated Molecular Patterns*) [3]. Należy jednak zauważyć, że niektóre badania stawiają w wątpliwość zdolności cząsteczek DAMP do bezpośredniej aktywacji receptorów PRR, sugerując, że czynniki endogenne zwiększają jedynie wrażliwość komórek na śladowe ilości PAMP [10].

Z uwagi na sposób funkcjonowania receptory PRR dzieli się na trzy klasy: wydzielane, inicjujące fagocytozę i sygnałowe (ryc. 1). Pierwszą z nich to cząsteczki rozpuszczalne o charakterze opsonin, które wiążą się z powierzchnią patogennych organizmów, ułatwiając ich fagocytozę oraz inicjując klasyczną i lektynową drogę aktywacji układu dopełniacza. Receptory PRR z grupy zaangażowanej w fagocytozę to białka transbłonowe pośredniczące w internalizacji patogenów, co prowadzi do degradacji pobranych cząstek i prezentacji uwolnionych z nich antygenów. Do trzeciej klasy zalicza się kilka rodzin receptorów posiadających domeny sygnałowe i zdolnych do aktywacji transkrypcji genów kodujących białka o charakterze prozapalnym. Należą do nich:

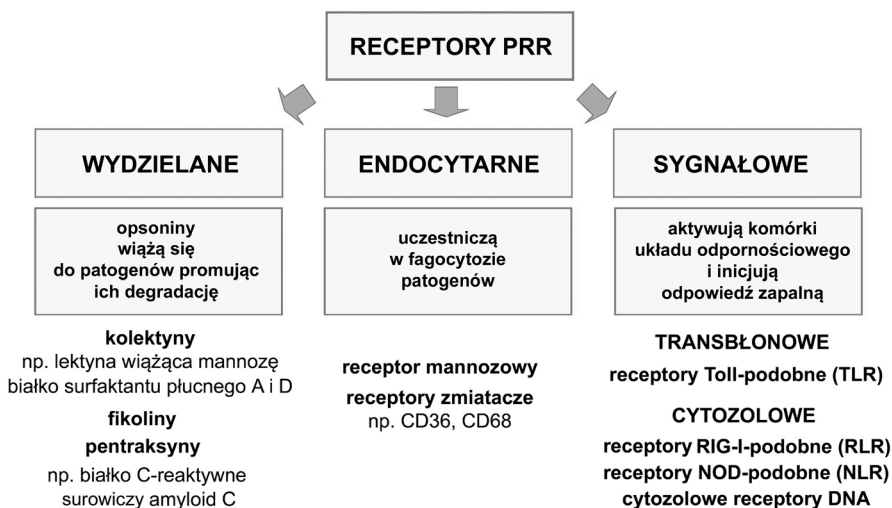
- receptory Toll-podobne (ang. *Toll-Like Receptors*, TLR) – najlepiej scharakteryzowana rodzina receptorów PRR, omówiona w dalszej części pracy;

- receptory RIG-I-podobne (ang. *RIG-I-Like Receptors*, RLR) – rodzina trzech cytoplazmatycznych helikaz wykrywających dwuniciowe wirusowe RNA. Dwie z nich – RIG-1 i MDA-5, posiadające domeny CARD (ang. *Caspase Activation and Recruitment Domain*), indukują ścieżkę sygnałową prowadzącą do syntezy interferonów typu I; trzeci członek tej rodziny – LPG, jest pozbawiony domeny CARD i funkcjonuje jako pozytywny regulator aktywności RIG-1 i MDA-5 [66]. Potwierdzono rolę receptorów RLR w rozpoznawaniu m.in. wirusów z rodzin Flaviridae (np. wirus zapalenia wątroby typu C), Picornaviridae (np. wirus Polio) i Paramyxoviridae (np. wirus choroby Newcastle);

- receptory NOD-podobne (ang. *NOD-Like Receptors*, NLR) – liczna rodzina receptorów (zidentyfikowano dotychczas dwadzieścia trzy receptory NLR u ludzi oraz trzydzieści cztery u myszy) rozpoznających cząsteczki PAMP mikroorganizmów w cytoplazmie. Receptory te mogą posiadać kilka różnych domen efektorowych, z których najbardziej typowe to: domena CARD, PYD (ang. *Pyrin Domain*) oraz domena BIR (ang. *Baculovirus Inhibitor Repeats*). Do licznych ligandów rozpoznawanych przez te receptory zalicza się peptydoglikan, w tym jego składnik – kwas γ -D-glutamyl-mezodiaminopimelinowy, dipeptyd muramyłowy ze ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich, flagelinę, a także związki uwalniane w wyniku uszkodzenia komórek (np. kwas moczowy) i niektóre toksyny bakteryjne. Aktywacja tych receptorów może prowadzić do utworzenia wielocząsteczkowego kompleksu zwanego „inflamasomem” odpowiedzialnego za promowanie procesów zapalnych, a także mogącego inicjować specyficzną formę apoptozy, zwaną pyroptozą [39, 4];

- cytozolowe receptory DNA – grupa w znacznej mierze niezidentyfikowanych białek, odpowiedzialnych za inicjację produkcji interferonów typu I w obecności plazmidowego, wirusowego bądź bakteryjnego DNA w cytoplazmie komórek. Postuluje się udział w tym procesie białek DAI, STING oraz ATG9a [39].

Warto zauważyć, że pomimo znacznego strukturalnego zróżnicowania zarówno ligandów jak i wiążących je receptorów PRR, schemat aktywacji i przebiegu odpowiedzi zapalnej pozostaje zasadniczo taki sam. Charakterystyczny dla receptorów PRR jest efekt zawężania ilości zaangażowanych w aktywację komórek cząsteczek, od kilkuset rozpoznawanych PAMP, przez kilkadziesiąt receptorów i kilkanaście powiązanych z nimi białek adaptorowych, do zaledwie około dziesięciu głównych kinaz zaangażowanych w transdukcję sygnału oraz kilku czynników transkrypcyjnych, mających pod kontrolą całe grupy genów. Głównymi kinazami o charakterze sygnałowym są enzymy należące do rodzin IRAK (ang. *Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase*), TRAF (ang. *TNF Receptor-Associated Factor*), MAPK (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinase*) oraz IKK (ang. *I κ B Kinase*).



RYCINA 1. Klasyfikacja receptorów rozpoznających wzorce w oparciu o pełnione funkcje. Receptory inicjujące fagocytozę obecne są głównie na powierzchni komórek żernych, takich jak makrofagi i komórki dendrytyczne. TLR występują również w innych komórkach układu odpornościowego, a także w komórkach nabłonkowych, śródbłonkowych oraz fibroblastach. Receptory RLR i niektóre NLR (np. NOD1) są obecne w cytoplazmie większości typów komórek

FIGURE 1. Classification of pattern recognition receptors based on their functions. Receptors mediating phagocytosis are located in the plasma membrane of phagocytes, like macrophages and dendritic cells. TLR are also expressed in other immune cells, in epithelial and endothelial cells, and in fibroblasts. RLR and some NLR (e.g., NOD1) receptors are present in the cytoplasm of most cells

Docelowo, szlaki sygnałowe uruchamiane przez receptory TLR, RLR i NLR prowadzą do aktywacji zaledwie kilku głównych czynników transkrypcyjnych: NFκB (ang. *Nuclear Factor κ-light chain-enhancer of activated B cells*), AP-1 (ang. *Activator Protein-1*) oraz IRF 3, 7 i 5 (ang. *Interferon Regulatory Factor*). Pierwsze dwa z tych czynników uruchamiają ekspresję setek genów odpowiedzialnych za produkcję cytokin, chemokin i enzymów prozapalnych. Do najważniejszych związków tego typu należą: czynnik martwicy nowotworów (ang. *Tumor Necrosis Factor α*, TNFα), interleukiny IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15 i IL-18, chemokiny MIP-1 oraz MCP1, 2 i 3. Natomiast czynniki transkrypcyjne IRF3 i IRF7 regulują ekspresję genów kodujących interferony typu I, IFN-α i IFN-β.

Głównym efektem ekspresji genów znajdujących się pod kontrolą tych czynników transkrypcyjnych jest inicjacja i regulacja odpowiedzi zapalnej, a także aktywacja układu dopełniacza, pobudzenie aktywności fagocytów oraz apoptoza zainfekowanych komórek. Poza tym, na przestrzeni ostatniej dekady wzrosło też

zrozumienie roli receptorów PRR w aktywacji i regulacji mechanizmów nabytej odpowiedzi odpornościowej [24, 67]. Wiadomo, że aktywacja tych receptorów wpływa pozytywnie na ekspresję genów zarówno cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej, jak i cząsteczek ko-stymulujących, takich jak CD80 i CD86, promując aktywację limfocytów T pomocniczych. Natomiast cytokiny uwalniane przez komórki w odpowiedzi na aktywację receptorów PRR, powodują różnicowanie limfocytów T w kierunku jednej z subpopulacji (np. Th1 lub Th2), determinując dalszy kształt odpowiedzi odpornościowej [46]. Przykładowo, aktywacja receptora TLR4 stymuluje wydzielanie do środowiska interleukin, m.in. IL-1, IL-12 i IL-18, promując rozwój odpowiedzi typu Th1 [67]. Aktywacja receptorów TLR może również modulować przebieg reakcji odpornościowej poprzez wpływanie na funkcje komórek regulatorowych, takich jak limfocyty Treg CD4+ CD25+FoxP3+ [16].

RECEPTORY TOLL-PODOBNE (TLR)

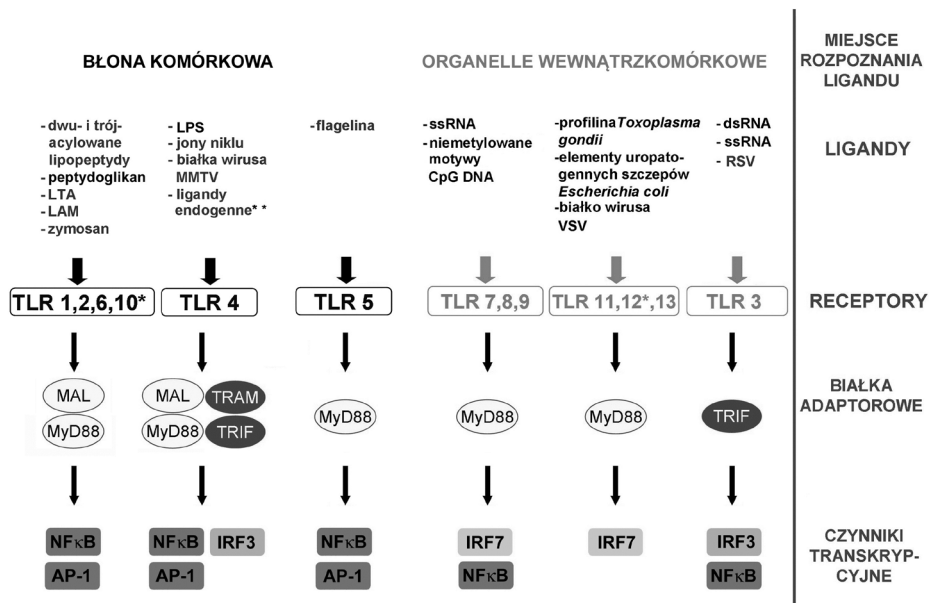
CHARAKTERYSTYKA OGÓLNA

Receptory TLR stanowią rodzinę białek transbłonowych o zbliżonej, trójdomenowej strukturze oraz wysokiej homologii do białka Toll *Drosophila melanogaster*. Słowo „Toll” w języku niemieckim oznacza „wspaniały”, „szalony” i zostało użyte po raz pierwszy przez Cristinę Nüsslein-Volhardi i Kathryn Anderson jako nazwa genu, którego mutacja w organizmie matki prowadzi do zaburzeń rozwoju zarodka muszki wzdłuż osi grzbietobrzusznej [1]. Późniejsze badania prowadzone pod kierunkiem Julesa A. Hoffmanna wykazały, że białko Toll jest kluczowe także dla odporności muszki owocowej na infekcje grzybowe [41]. Białko rodziny Toll po raz pierwszy powiązано z odpornością u kręgowców pod koniec lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku dzięki badaniom prowadzonym między innymi przez grupę Bruce’a Beutlera [48, 59]. Za swoje odkrycia związane z aktywacją odpowiedzi wrodzonej J. A. Hoffmann i B. Beutler zostali w 2011 roku uhonorowani Nagrodą Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii. Późniejsze przeszukiwanie zsekwencjonowanych genomów kręgowców pozwoliło na wykrycie około stu genów receptorów TLR. Geny kodujące receptory TLR odnaleziono również w genomach bezkręgowców tak zróżnicowanych jak nicień *Caenorhabditis elegans*, ostrogon *Tachypleus tridentatus* i jeżowiec *Strongylocentrotus purpuratus*. Ponieważ białka strukturalnie i funkcjonalnie podobne do TLR wykryto nawet w roślinach wydaje się, że receptory te są jednym z najstarszych elementów mechanizmów obronnych [42, 14].

Jak dotąd zidentyfikowano i opisano trzynaście receptorów TLR występujących u ssaków. Dwanaście z nich występuje u myszy, natomiast dziesięć u ludzi. Pogrupowano je w sześć rodzin na podstawie homologii sekwencji aminokwasowej (ryc. 2). Każda podrodzina receptorów rozpoznaje generalnie jedną obszerną klasę PAMP, przy czym większość kręgowców posiada co najmniej jeden receptor z każdej z nich. Receptory TLR obecne są w komórkach układu odpornościowego, a także w komórkach nabłonka jelit (TLR4 i 5) i pęcherza moczowego, płuc, wątroby oraz nerek (TLR11). Niedawno wykryto także obecność receptorów grupy TLR11-13 w komórkach ośrodkowego układu nerwowego ssaków [64, 50]. U ludzi cała podrodzina TLR11-13 jest obecna tylko w postaci pseudogenu, czemu przypisuje się wrażliwość ludzi na infekcje uropatogennymi szczepami *Escherichia coli*. U myszy natomiast nieaktywny jest gen kodujący TLR10 [18, 86].

Receptory TLR można też podzielić na dwie grupy ze względu na lokalizację w komórce (ryc. 2). Receptory z podrodziny TLR1 (do której należy TLR1, 2, 6 i 10), TLR4 i TLR5 występują przede wszystkim w błonie komórkowej. Dzięki swojej lokalizacji na powierzchni komórek rozpoznają one elementy ścian komórkowych, otoczek i aparatów ruchu patogennych mikroorganizmów. Z drugiej strony, receptory z podrodzin TLR3, TLR7-9 i TLR11-13 zlokalizowane są w organelach wewnątrzkomórkowych, takich jak endosomy i biorą głównie udział w detekcji kwasów nukleinowych patogenów. Do niedawna uważano, że TLR11 jest receptorem powierzchniowym, ostatnie badania potwierdziły jego wewnątrzkomórkową lokalizację [58].

Poszczególne podrodziny TLR różnią się również pod względem doboru białek adaptorowych, które oddziałują z receptorami i umożliwiają uruchomienie szlaków sygnałowych (ryc. 2). Zidentyfikowano dotychczas pięć białek adaptorowych wykorzystywanych przez TLR: MyD88 (ang. *Myeloid Differentiation primary response gene 88*), TIRAP/Mal (*TIR domain-containing Adaptor Protein/MyD88-adaptor-like*), TRIF/TICAM-1 (ang. *TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β /TIR-Containing Adaptor Molecule 1*), TRAM/TICAM2 (ang. *TRIF-Related Adaptor Molecule/TIR-Containing Adaptor Molecule 2*) oraz SARM (ang. *Sterile α - and HEAT/armadillo motif-containing protein*), z których pierwsze cztery uczestniczą w różnych kombinacjach w zapoczątkowaniu sygnału, natomiast SARM jest negatywnym regulatorem białka TRIF [77, 5]. Większość receptorów TLR, z wyjątkiem TLR3, uruchamia ścieżki sygnałowe z udziałem MyD88, podczas gdy TRIF włączony jest w przekazywanie sygnału tylko przez TLR3 i TLR4 [77, 34]. Wiązanie odmiennych białek adaptorowych przez receptory TLR prowadzi do uruchomienia różnych ścieżek sygnałowych, co stanowi jeden z mechanizmów pozwalających na lepsze dostosowanie odpowiedzi komórki do zaistniałego zagrożenia.



RYCINA 2. Klasyfikacja i właściwości receptorów TLR ssaków. *Dla receptorów TLR10 i TLR12 nie odnaleziono jak dotąd ligandów. **Wyniki badań sugerowały zdolność receptorów TLR4 i TLR2 do wiązania wielu endogennych ligandów, których obecność wskazuje na uszkodzenia tkanek. Postulowane ligandy tego typu to białka szoku cieplnego, białka jądrowe i elementy macierzy zewnątrzkomórkowej [3]. Inne badania postawiły jednak w wątpliwość te doniesienia, sugerując, że czynniki endogenne zwiększają jedynie wrażliwość komórek na śladowe ilości PAMP [10]. LTA – kwas lipoteichowy, LAM – lipoarabinomannan, RSV – wirus syncytium nabłonka oddechowego, MMTV – wirus raka sutki myszy, VSV – wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej, ssRNA – jednociowy kwas rybonukleinowy wirusów, dsRNA – dwuniciowy kwas rybonukleinowy wirusów. Opracowano wg [34, 39]

FIGURE 2. Classification and properties of mammalian TLR. *Ligands of TLR10 and TLR12 have not yet been identified. **Some studies indicated that TLR4 and TLR2 are able to bind endogenous molecules generated upon tissue and cell damage. A putative list of such molecules includes heat shock proteins, nuclear proteins and components of the extracellular matrix [3]. Other studies argue against this possibility and indicate that endogenous molecules can increase sensitivity of cells toward minute amounts of PAMP [10]. LTA – lipoteichoic acid, LAM – lipoarabinomannan, RSV – respiratory syncytial virus, MMTV – mouse mammary tumor virus, VSV – vesicular stomatitis virus, ssRNA – single-stranded viral RNA, dsRNA – double-stranded viral RNA. Based on [34, 39]

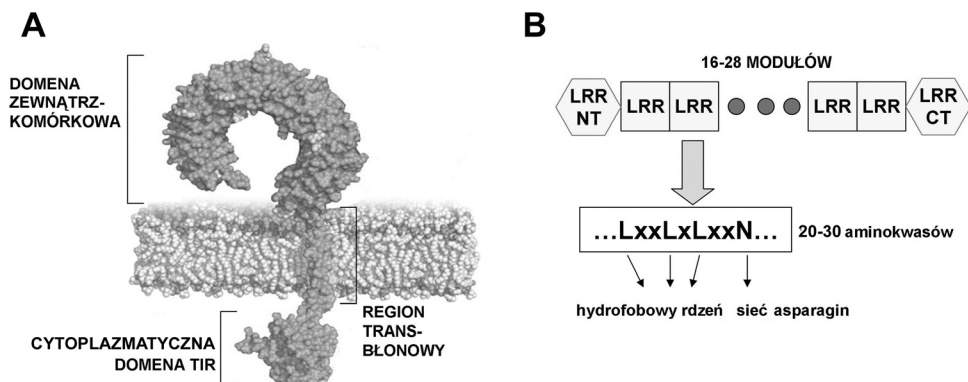
BUDOWA RECEPTORÓW TLR

Receptory TLR są glikoproteinami typu I, posiadającymi pojedynczą transbłonową helisę, która łączy domenę odpowiadającą za wiązanie ligandu zlokalizowaną na końcu aminowym białka, z domeną sygnałową z końca karboksylowego receptora (ryc. 3A). Analiza sekwencji i struktury krystalicznej kilku receptorów TLR

wskazuje na podobny, zachowany w ewolucji model ich budowy [7, 27, 36, 45, 57]. Domenę zlokalizowaną na końcu aminowym receptorów określa się zazwyczaj mianem „zwnątrzkomórkowej”, choć należy pamiętać, że w przypadku receptorów zlokalizowanych wewnątrz komórki jest ona skierowana do światła organelli. Domena ta u wszystkich receptorów TLR jest zbudowana z 16-28 powtórzeń bogatych w leucynę (ang. *Leucine-Rich Repeats*, LRR) [47] (ryc. 3B). Jeden z najlepiej scharakteryzowanych receptorów tej rodziny, receptor TLR4 aktywowany przez lipopolisacharyd (LPS) zawiera 22 takie motywy. Motyw LRR jest zbudowany z 20-30 aminokwasów, które tworzą zachowaną ewolucyjnie sekwencję LxxLxLxxN (gdzie L – leucyna, N – asparagina, x – dowolny aminokwas) oraz region zmienny. Domenę zwnątrzkomórkową zawierającą od kilku do kilkudziesięciu motywów LRR wykryto w ponad 6000 białek. Poznano dotąd strukturę krystaliczną około 50 z tych białek, w tym kilku receptorów TLR – wszystkie z nich przyjmują charakterystyczny kształt przypominający podkowę (ryc. 3A). Sekwencje LxxLxLxxN zlokalizowane są po stronie „wklęsłej” podkowy wchodząc w skład formujących ją β -nici; regiony zmienne tworzą natomiast zwnętrzną, eksponowaną powierzchnię podkowy i mogą pełnić istotne role w interakcjach z ligandami. Reszty leucyny wraz z innymi hydrofobowymi aminokwasami motywów LRR tworzą ciągły hydrofobowy rdzeń domeny zwnętrznej receptorów TLR. Struktura domeny jest dodatkowo stabilizowana przez liczne wiązania wodorowe reszt asparagin wchodzących w skład motywów LRR [26, 38].

Domeny zwnątrzkomórkowe wielu spośród poznanych receptorów TLR odpowiadają tej charakterystyce, właściwej dla tzw. rodziny „typowych” białek zawierających motywy LRR. Jednak w przypadku receptora TLR4, a także całej podrodziny TLR1, sekwencja aminokwasowa motywów LRR w centralnej części domeny zwnątrzkomórkowej odbiega od zachowanego ewolucyjnie wzorca. W motywach tych brak jest typowej sieci asparagin stabilizującej ich strukturę, są też one zróżnicowane pod względem liczby budujących je aminokwasów. Konsekwencją tych różnic w strukturze motywów LRR jest podział domeny zwnątrzkomórkowej receptorów na trzy części, a także odsłonięcie wwnętrzných kieszonek o charakterze hydrofobowym [27, 32, 36]. Obecnie postuluje się rolę tych strukturalnych odchyłeń w dostosowaniu receptorów do wiązania ligandów o określonym charakterze chemicznym. Receptory o typowej strukturze, takie jak TLR3 i TLR7-9, wiążą ligandy hydrofilowe, takie jak kwasy nukleinowe, przy użyciu zwnętrznej powierzchni domeny zwnątrzkomórkowej. Z drugiej strony, receptory o wydzielonych trzech subdomenach wykazują zdolność do wiązania ligandów hydrofobowych za pomocą odsłoniętych wwnętrzných kieszonek o takim charakterze chemicznym. W taki właśnie sposób receptory TLR1, 2 oraz 6 rozpoznają dwu- i trójacylowane lipopeptydy i lipoproteiny bakteryjne [32].

Receptor TLR4 stanowi szczególny przypadek. Jako jedyny poznany receptor z rodziny TLR nie wiąże on bezpośrednio swojego ligandu, jakim jest LPS, lecz



RYCINA 3. Budowa receptorów z rodziny Toll. **A** – Model monomeru receptora TLR w błonie komórkowej na przykładzie TLR3 (wg [45], zmodyfikowany). **B** – Schemat budowy domeny zewnątrzkomórkowej receptora TLR, zawierającej powtórzenia bogate w leucynę LRR (wg [31], zmodyfikowany). Sekwencje LxxLxLxxN wchodzi w skład równoległych β -nici stanowiących wewnętrzną („wkłesłą”) część domeny. Pozostała część każdego motywu LRR (region zmienny, niezaznaczony na schemacie) tworzy helisy i pętle składające się na zewnętrzną część domeny.

FIGURE 3. Structure of Toll-like receptors. **A** – A model of a monomer of TLR in the plasma membrane exemplified by TLR3 (acc. [45], changed). **B** – Composition of the extracellular domain of TLR containing leucine-rich repeats LRR (acc. [31], changed). The LxxLxLxxN sequences form parallel β -strands which constitute the concave part of the domain. The convex part of the domain consists of variable residues of the LRR motifs (not shown) which form helices and loops

wymaga udziału ko-receptora, białka MD-2 [35, 52, 55]. Uważa się, że kieszonki hydrofobowe obecne w domenie zewnątrzkomórkowej TLR4 pozwalają na dimeryzację receptora poprzez wiązanie jednego z sześciu lipidowych łańcuchów lipopolisacharydu przez jeden z receptorów, podczas gdy pozostałe łańcuchy lipidowe LPS są pogrążone w kieszeni hydrofobowej białka MD-2 zasocjowanego z sąsiadującą częścią TLR4 [61].

Należy też dodać, że receptory TLR, podobnie jak inne białka zawierające moduły LRR, posiadają na końcu aminowym oraz karboksylowym tzw. domeny LRRNT i LRRCT (ryc. 3B). W ich obrębie brak jest motywów LRR, zawierają natomiast skupiska reszt cysteinowych tworzących mostki dwusiarczkowe, które dodatkowo stabilizują strukturę domeny zewnątrzkomórkowej, chroniąc jej hydrofobowy rdzeń przed ekspozycją do środowiska. Kolejną właściwością TLR jest obecność zachowanych ewolucyjnie sekwencji aminokwasowych w domenie zewnątrzkomórkowej (głównie na jej powierzchni), w obrębie których zachodzi N-glikozylacja. Modyfikacja ta pełni najprawdopodobniej istotne funkcje w procesie rozpoznawania ligandów, a także w lokalizacji i transporcie receptorów [70, 78].

Domena cytoplazmatyczną receptorów TLR, odpowiedzialną za inicjację procesu przekazywania sygnału jest domena TIR (ang. *Toll/IL-1receptor homology domain*), występująca również w receptorach dla interleukin oraz białkach adaptorowych TLR; ze względu na jej obecność te trzy rodziny białek przyporządkowuje się do jednej nadrodziny. Domena ta zbudowana jest z około 200 reszt aminokwasowych. Tworzą one centralnie umiejscowioną β -kartkę złożoną z pięciu nici, oznaczonych βA - βE , otoczoną pięcioma helisami, αA - αE . Pętle łączące te elementy wystają ponad powierzchnię domeny i najprawdopodobniej odgrywają rolę w jej multimeryzacji, która jest warunkiem utworzenia kompleksu sygnałowego [54, 81].

Poznanie struktur krystalicznych kilku receptorów TLR z różnych podrodzin w kompleksach z ich ligandami [27, 32, 45, 57] bądź antagonistami [36, 55] pozwoliło nie tylko na dostrzeżenie wspólnych dla wszystkich TLR właściwości, ale także na zaproponowanie ogólnego modelu aktywacji receptorów tej rodziny [26, 31]. Związanie ligandu powoduje jedynie lokalne, niewielkie odkształcenia konformacji receptora, pozwala jednak na jego dimeryzację, która, za wyjątkiem kompleksów TLR1-TLR2 i TLR2-TLR6, ma charakter homodimeryzacji. Pomimo różnic w miejscu wiązania ligandów pomiędzy różnymi TLR, powstający kompleks ma zasadniczo ten sam kształt przypominający literę M, co spowodowane jest zbliżeniem do siebie domen zewnątrzkomórkowych w rejonie przyblonowym. Prowadzi to z kolei do zbliżenia cytoplazmatycznych domen TIR dwu receptorów i ustawieniem ich w orientacji promującej ich dimeryzację. Towarzyszą temu zmiany konformacyjne domeny TIR receptorów umożliwiające przyłączenie domen TIR białek adaptorowych i utworzenie kompleksu sygnałowego z kinazami pierwszego rzędu, takimi jak kinazy IRAK [53].

Niedawne badania sugerują, że receptor TLR4 różni się pod tym względem od innych receptorów TLR. Domeny cytoplazmatyczne i transbłonowe TLR4 wykazują immanentną zdolność do silnej, konstytutywnej dimeryzacji, w przeciwieństwie do innych receptorów tej rodziny [56]. Rolą domeny zewnątrzkomórkowej w powyższym układzie jest hamowanie tych interakcji, dopóki nie zostanie związany specyficzny ligand – lipopolisacharyd. Wydaje się, że taki układ prowadzi do znacznie silniejszej aktywacji komórek niż w przypadku pozostałych receptorów TLR. Badania nad konstytutywnie aktywnymi receptorami TLR, których domenę zewnątrzkomórkową zastąpiono domeną białka CD4, pozwoliły ustalić, że TLR4 kilkusetkrotnie silniej aktywuje promotory genów prozapalnych niż pozostałe receptory tej rodziny [17]. Z uwagi na fakt, że szok septyczny, który może być skutkiem zakażenia bakteriami Gram-ujemnymi stanowi duże zagrożenie dla pacjentów oddziałów intensywnej opieki medycznej, zarówno receptor TLR4 jak i mechanizmy jego aktywacji przez LPS są szczególnie intensywnie badane przez grupy zajmujące się wrodzonymi mechanizmami odpowiedzi odpornościowej.

RECEPTOR TLR4 URUCHAMIA REAKCJĘ ZAPALNĄ W ODPOWIEDZI NA LPS

ROZPOZNAWANIE LPS PRZEZ RECEPTOR TLR4

Lipopolisacharydy to zbiorcze określenie dla grupy związków o zbliżonej strukturze, które stanowią główny składnik błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych [69]. Ze względu na istotną rolę, jaką pełnią w utrzymywaniu struktury komórki bakteryjnej, ich budowa została w znacznym stopniu zachowana w toku ewolucji, stanowiąc modelowy przykład PAMP. LPS silnie aktywuje komórki układu odpornościowego, wywołując odpowiedź zapalną. Nadmierna reakcja na LPS i obecność jego dużych stężeń może prowadzić do ogólnoustrojowej reakcji zapalnej zwanej sepsą [65]. Ciężka sepsa wiąże się z wystąpieniem zagrażających życiu zaburzeń czynności podstawowych narządów, a następująca niewydolność układu sercowo-naczyniowego jest podstawą zdiagnozowania szoku septycznego, który w ponad 30% przypadków kończy się śmiercią.

Struktura LPS izolowanego z kilku rodzajów bakterii oraz jej modyfikacje zostały dość szczegółowo poznane i wnikliwie opisane w kilku wcześniejszych pracach przeglądowych [11, 60, 62]. LPS składa się z trzech części: łańcucha polisacharydowego zwanego antygenem O, rdzenia oraz lipidu A, zakotwiczonego do błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych. Największemu zróżnicowaniu ulega skład i liczba reszt cukrowych, które budują antygen O. Zidentyfikowano ponad 60 reszt cukrowych oraz 30 modyfikujących je elementów nie cukrowych spotykanych w łańcuchach O-swoistych. Najczęściej spotykane cukry to heksozy, takie jak glukoza, fruktoza, galaktoza, mannoza i ramnoza. U niektórych gatunków bakterii, bądź też w specyficznych warunkach ich wzrostu, łańcuch O-swoisty może nie występować, bądź występować w skróconej formie. Skutkuje to tzw. „szorstkim” (ang. *rough*) fenotypem kolonii bakterii, w odróżnieniu od typowego fenotypu kolonii „gładkich” (ang. *smooth*). Najczęściej uznaje się, że długość i skład cukrowy antygeny O nie ma wpływu na biologiczną aktywność LPS, a jego duża zmienność powoduje, że nie jest on dobrym celem dla receptorów z grupy PRR. Niemniej jednak, całkowity brak łańcucha O-swoistego moduluje proces rozpoznawania LPS przez komórki układu odpornościowego, co zaobserwowano w przypadku LPS z bakterii z rodzaju *Brucella* i *Salmonella*, a także *Escherichia coli* [8, 25, 63]. LPS tego typu, w przeciwieństwie do LPS z pełnym łańcuchem O-swoistym, aktywuje niektóre reakcje komórek bez udziału białka CD14 [25, 21].

Rdzeń cząsteczki LPS ma charakter oligosacharydu i zawiera resztę kwasu 3-deoksy- D-manno-oktulozonowego (KDO), która przyłączona jest do proksymalnej reszty glukozoaminy lipidu A. Reszty kwasu KDO są zwykle podstawione przez kolejne reszty kwasu KDO oraz reszty L-glicero-D-mannoheptozy (Hep). Układ

1-3 KDO i 2-3 Hep tworzy tzw. „wewnętrzny rdzeń”, do którego dołączone są zazwyczaj trzy heksozy („zewnątrzny rdzeń”). Struktura tej części jest znacznie mniej zmienna niż w przypadku antygeny O, może jednak zawierać różne modyfikacje. Uważa się, że oligosacharyd rdzeniowy nie jest istotny dla pełnej biologicznej aktywności LPS, może jednak mieć efekt modulujący [11].

Lipid A jest najlepiej zachowaną ewolucyjnie częścią cząsteczki lipopolisacharydu. Jest to również część rozpoznawana przez receptory układu odpornościowego, odpowiada ona zatem za prozapalną aktywność LPS [62]. Podstawą budowy lipidu A są dwie cząsteczki glukozoaminy połączone wiązaniem glikozydowym β -1,6. Do tego cukrowego szkieletu dołączonych jest, w zależności od gatunku bakterii, 4-7 reszt kwasów tłuszczowych o zróżnicowanej długości. Ilość i długość podstawionych reszt kwasów tłuszczowych jest głównym źródłem heterogenności lipidu A wśród bakterii i jednocześnie najistotniejszym czynnikiem wpływającym na aktywność biologiczną LPS. Obecność sześciu łańcuchów węglowych zawierających 12-14 atomów węgla stanowi optymalną strukturę z punktu widzenia aktywacji komórek, a dodanie lub usunięcie tylko jednego łańcucha obniża aktywność prozapalną LPS ponad stukrotnie [11, 62]. Drugim ważnym czynnikiem warunkującym pełną zdolność LPS do aktywacji układu odpornościowego jest fosforylacja glukozoamin lipidu A [62]. Obie te strukturalne właściwości mają decydujący wpływ na siłę wiązania LPS z białkami MD-2 i TLR4.

Rozpoznanie lipopolisacharydu jest wieloetapowym procesem i wymaga współdziałania szeregu białek – LBP (ang. *LPS-Binding Protein*), CD14 (ang. *Cluster of Differentiation 14*) oraz kompleksu białek TLR4/MD-2. LBP uczestniczy w odrywaniu monomerów LPS z micelli, lub bezpośrednio z błony zewnętrznej bakterii. Jest to glikoproteina o masie cząsteczkowej 60 000, która wiąże pojedyncze cząsteczki LPS i umożliwia ich transport do białka CD14. Blisko spokrewnione i podobne strukturalnie białko BPI (ang. *Bactericidal/Permeability Increasing Protein*) znacznie silniej wiąże LPS, nie przekazuje go jednak na CD14. Postuluje się natomiast jego rolę w procesie detoksykacji lipopolisacharydu [79]. LBP i CD14 pozwalają na koncentrację cząsteczek LPS przed przekazaniem ich na kompleks TLR4/MD-2, co pozwala na silną i szybką odpowiedź komórki nawet przy niewielkich stężeniach lipopolisacharydu w środowisku (1 ng/ml i mniejszych).

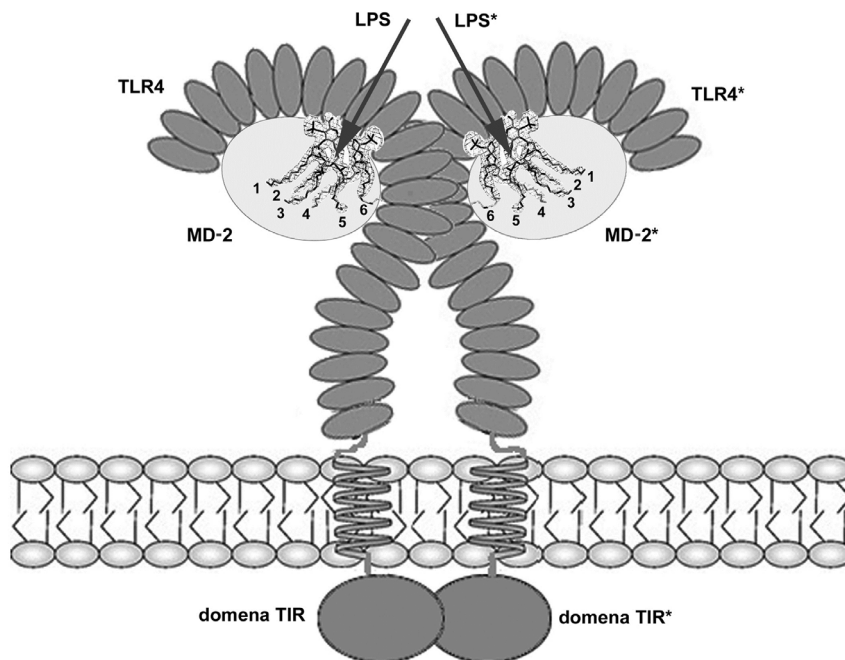
CD14 to białko o masie cząsteczkowej 56 000, w części zewnątrzkomórkowej zawierające powtórzenia LRR, w czym przypomina receptory TLR. CD14 tworzy homodimery i w tej postaci wiąże LPS za pomocą hydrofobowej kieszonki zlokalizowanej na zewnętrznej powierzchni dimeru [49, 37]. CD14 jest pozbawione domeny transbłonowej i jest zakotwiczone w zewnętrznej warstwie błony komórkowej poprzez łącznik glikozylofosfatydyloinozytolu (GPI), zlokalizowany na końcu karboksylowym białka. Zewnątrzkomórkowa fosfolipaza C może katalizować hydrolizę wiązania estrowego, które wiąże grupę acylową, zakotwiczącą CD14 w błonie komórkowej, z pozostałym fragmentem łącznika GPI. Prowadzi to do uwolnienia

CD14 w formie rozpuszczalnej (sCD14), która umożliwia rozpoznanie LPS przez komórki pozbawione CD14 w postaci białka błonowego (mCD14). Obecność kotwicy GPI w błonowej formie CD14 wskazuje na powiązanie tego receptora z tzw. tratwami lipidowymi. Są to mikrodomeny błony komórkowej wzbogacone w sfingolipidy i cholesterol, które wyodrębniają się z otoczenia bardziej płynnych obszarów błony, zawierających głównie glicerofosfolipidy. Aktualne spojrzenie na strukturę tratw zakłada, że są to dynamiczne, nanoskalowej wielkości skupiska lipidów i nielicznych białek, które w czasie aktywacji immunoreceptorów, takich jak receptor limfocytów T, tworzą stabilniejsze platformy ułatwiające organizację konglomeratów białek biorących udział w transdukcji sygnału [44]. Zakotwiczenie CD14 w tratwach lipidowych sugeruje istnienie podobnego mechanizmu w procesie formowania kompleksu sygnałowego CD14/MD-2/TLR4 [71]. Szczególnie interesujące dane doświadczalne, które potwierdzają to założenie pochodzą z ostatnich badań opierających się na manipulacjach poziomem lipidów budujących tratwy lipidowe w błonie komórkowej. Wykazano, że wzbogacenie błony komórkowej w cholesterol na skutek mutacji białka transporterowego ABCA1 lub inkorporacja nasyconych kwasów tłuszczowych do błony indukowały asocjację receptora TLR4 z frakcją tratw, wywoływały jego dimeryzację oraz ekspresję docelowych genów kodujących cytokiny prozapalne [80, 87].

Najczęściej przyjmuje się, że CD14 razem z LBP pełni rolę „anteny” efektywnie wychytującej lipopolisacharyd i przekazującej go na kompleks białek TLR4/MD-2. CD14 może jednak pełnić również inne funkcje w procesie stymulacji komórek przez lipopolisacharyd. Stwierdzono, że w makrofagach i komórkach dendrytycznych izolowanych z myszy pozbawionych białka CD14 w odpowiedzi na stymulację LPS upośledzona jest jedna z dwóch ścieżek sygnałowych uruchamianych przez receptor TLR4 (patrz niżej). Jest to ścieżka zależna od udziału białka adaptorowego TRIF, która związana jest z endocytozą aktywowanego receptora TLR4 i prowadzi do produkcji interferonów typu I [85]. CD14 bierze też udział w internalizacji LPS przez komórki na drodze nieprowadzącej do ich aktywacji, lecz pozwalającej na zmniejszenie jego stężenia w środowisku i wewnątrzkomórkową detoksykację LPS [9].

W szlaku aktywującym odpowiedź prozapalną komórek przekazanie LPS z CD14 na kompleks TLR4/MD-2 stanowi ostatni etap rozpoznania tej cząsteczki i rozpoczyna proces transdukcji sygnału. MD-2 posiada rzadko spotykaną strukturę β -kubka zbudowaną z dwóch równoległych β -kartek, które tworzą obszerną kieszonkę wiążącą lipidową część cząsteczki lipopolisacharydu [55]. Białko MD-2 jest powiązane z zewnętrzną powierzchnią receptorów TLR4 za pomocą wiązań wodorowych i jonowych. Po związaniu LPS do kieszonki MD-2 dochodzi do utworzenia kompleksu złożonego z dwóch heterodimerów TLR4/MD-2 (ryc. 4). Cząsteczka lipopolisacharydu pełni w tym procesie rolę mostka: w przypadku optymalnej struktury LPS, zawierającej sześć reszt kwasów tłuszczowych, pięć z nich wypełnia kie-

szonkę MD-2, podczas gdy szósty jest częściowo odsłonięty i wchodzi w interakcje z hydrofobową kieszką sąsiedniej cząsteczki TLR4. Wiązanie to jest dodatkowo stabilizowane przez dwie grupy fosforanowe lipidu A, które tworzą jonowe i wodorowe wiązania z resztami lizyny i arginyiny na powierzchni sąsiadujących cząsteczek TLR4 i MD-2 [57]. Bezpośrednie oddziaływania między dwoma cząsteczkami TLR4, pomimo ich zbliżenia, pozostają słabe. Model ten pozwala zrozumieć znaczenie roli modyfikacji strukturalnych lipidu A dla aktywności biologicznej LPS,



RYCINA 4. Struktura kompleksu TLR4/MD-2 po związaniu LPS. Pięć spośród sześciu reszt kwasów tłuszczowych cząsteczki LPS jest pograżonych w hydrofobowej kieszeni białka MD-2, szósty jest ekspozowany do środowiska i oddziałuje z hydrofobowym fragmentem sąsiedniego receptora TLR4, co indukuje dimeryzację receptora i prowadzi do zbliżenia cytoplazmatycznych domen TIR obu cząsteczek receptorów, uruchamiając kaskadę ich interakcji z białkami adaptorowymi. Kompleks przyjmuje charakterystyczną strukturę przypominającą literę M. Na schemacie przedstawiono tzw. Re-LPS, pozbawiony części oligosacharydowej. Opracowano wg [55-57]

FIGURE 4. Structure of TLR4/MD-2 complex after LPS binding. Five of six fatty acid residues of LPS molecule are buried in a hydrophobic pocket of MD-2 protein while the sixth residue interacts with a hydrophobic fragment of the adjacent TLR4 molecule. This interactions induce dimerization of TLR4 which brings into proximity cytoplasmic signaling TIR domains of the two TLR4 molecules facilitating their interactions with adaptor proteins. The complex of two TLR4/MD-2 heterodimers with LPS bound is similar to the letter M. In the Figure, Re-LPS is shown devoid of the O-antigen carbohydrate chain. Based on [55-57]

jako że brak grup fosforanowych lub odstępstwa od optymalnej liczby podstawionych reszt kwasów tłuszczowych nie pozwalają na uformowanie stabilnego kompleksu sygnałowego.

Fakt, że receptor TLR4 odpowiada za inicjację kaskad sygnałowych w odpowiedzi na LPS wykryto dopiero w 1998 roku [59]. Wcześniejsze prace wskazywały na udział w tym procesie innych receptorów, takich jak integryny CD11/CD18b, białko regulatorowe układu dopełniacza CD55 i receptory zmiatacze (ang. *Scavenger Receptors*, SR) [12]. Prowadzone w ostatnim dziesięcioleciu badania opierające się na technice rezonansowego przekazywania energii pomiędzy wyznakowanymi fluorescencyjnie białkami oraz na analizie biochemicznej frakcji komórkowych wykazały, że aktywacja komórek przez LPS prowadzi do formowania w błonie komórkowej kompleksów szeregu białek towarzyszących CD14 i TLR4; należą do nich białka szoku cieplnego, CD55 oraz receptor chemokinowy CXCR4 [72]. Formowanie wieloskładnikowego kompleksu białek w odpowiedzi na LPS może być ułatwione poprzez ich akumulację w obrębie wspomnianych wcześniej tratw lipidowych. Dobór białek wchodzących w skład takiego kompleksu podyktowany jest między innymi właściwościami strukturalnymi LPS i może modulować ścieżki sygnałowe indukowane przez LPS [73]. Badania nad mechanizmami stymulacji komórek przez LPS zdominowane są aktualnie przez prace nad rolą receptora TLR4 w tym procesie. Nadal jednak utrzymuje się zainteresowanie rolą receptorów z rodziny zmiataczy w odpowiedzi zapalnej, a z prowadzonych w tym kierunku badań wyłania się skomplikowany obraz ich udziału w reakcjach komórek na LPS [28]. Istnieją dane wskazujące, że receptory zmiatacze klasy B, takie jak CD36 i SR-B1/Cla-1, indukują produkcję cytokin prozapalnych w wyniku aktywacji przez LPS, niezależnie od udziału TLR4 [2, 40]. Z kolei receptor zmiatacz klasy A, SR-A1, zdaje się pełnić rolę protekcyjną wobec nadmiernej stymulacji komórek przez LPS. Wynika ona ze zdolności tego receptora do internalizacji wysokich dawek LPS na ścieżce, która nie indukuje syntezy cytokin prozapalnych, prowadzi natomiast do detoksykacji LPS [19, 51].

ŚCIEŻKI SYGNAŁOWE RECEPTORA TLR4

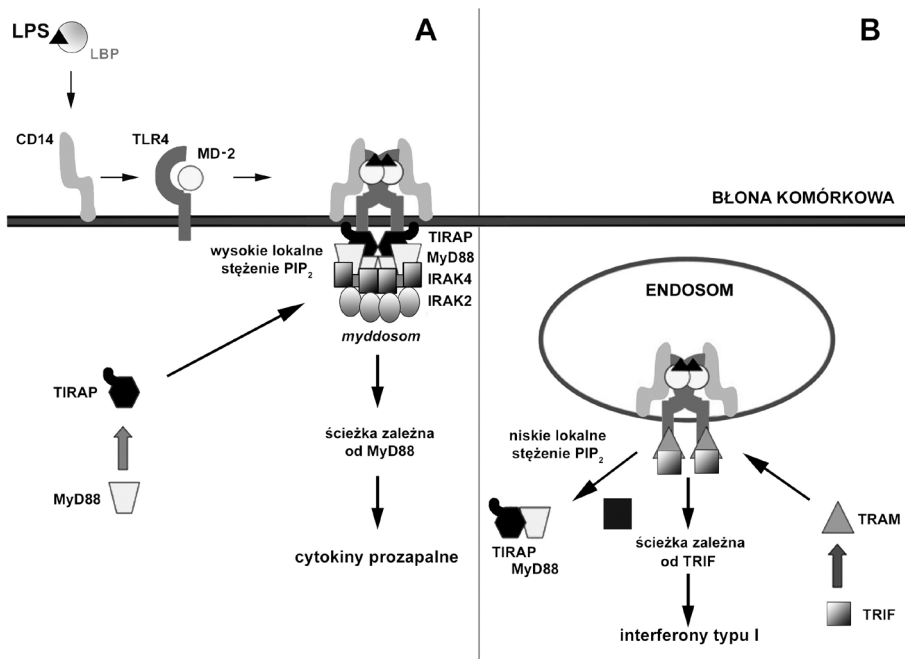
Receptor TLR4, jako jedyny spośród członków rodziny receptorów Toll, oddziałuje z wszystkimi czterema poznanymi białkami adaptorowymi posiadającymi domeny TIR, uruchamiając dwa szlaki sygnałowe nazywane ścieżkami zależnymi od MyD88 lub TRIF (ryc. 5). W interakcji białka MyD88 z receptorem TLR4 pośredniczy dodatkowe białko adaptorowe TIRAP/Mal [20]. Oprócz domeny TIR, pozwalającej na oddziaływanie MyD88 z receptorem TLR4 i białkiem TIRAP, MyD88 posiada tzw. domenę śmierci DD (ang. *Death Domain*) zlokalizowaną w części karboksylowej, poprzez którą MyD88 oddziałuje z kinazami IRAK4 oraz IRAK1 (która może być zastąpiona przez IRAK2). Badania krystalograficzne ujawni-

niły, że sześć-osiem cząsteczek białka MyD88 oraz cztery cząsteczki kinazy IRAK4 i cztery kinazy IRAK2 (bądź IRAK1) asocjują w sposób hierarchiczny, tworząc kompleks sygnałowy nazywany myddosomem [15, 43]. Formowanie myddosomu zapewnia bliskie sąsiedztwo kinaz IRAK, umożliwiając fosforylację kinazy IRAK1 (lub IRAK2) przez IRAK4. Po fosforylacji, kinaza IRAK1 oddysocjowuje od kompleksu receptorowego i wchodzi w interakcje z ligazą E3 ubikwityny TRAF6 (ang. *Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor 6*), a ta indukuje poliubikwitynację kolejnego przekaźnika sygnału, kinazy TAK1 (ang. *Transforming growth factor β -Associated Kinase-1*) [83]. Aktywowana w ten sposób kinaza TAK1 jest zdolna do fosforylacji substratów z dwóch grup kinaz: IKK (kinaza inhibitora czynnika NF κ B) oraz MAPK (kinaza aktywowana mitogenami). Prowadzi to ostatecznie do aktywacji transkrypcji genów cytokin prozapalnych, przy użyciu dwóch czynników transkrypcyjnych – NF κ B oraz AP-1, przemieszczających się do jądra komórki. Główną cytokiną prozapalną produkowaną na tej ścieżce jest TNF α [34].

Ścieżka sygnałowa zależna od białka adaptorowego MyD88 jest charakterystyczna dla niemal wszystkich receptorów TLR, za wyjątkiem TLR3 (ryc. 2). Dla odmiany, drugi szlak sygnałowy zależny od białka adaptorowego TRIF jest inicjowany tylko przez receptory TLR4 i TLR3. Receptor TLR4 wymaga do jej uruchomienia dodatkowego białka adaptorowego TRAM, które pośredniczy w interakcji między receptorem i białkiem TRIF [82]. Białko TRIF, wraz z grupą białek asystujących, oddziałuje z kompleksem kinaz TBK1 (ang. *TANK Binding Kinase-1*) i IKK ϵ /IKK ι , które fosforylują czynniki transkrypcyjny IRF3 i, w mniejszym stopniu, IRF7 [13]. Białka te są obecne w nieaktywnej formie w cytoplazmie, natomiast po ufosforylowaniu w regionach C-końcowych ulegają homodimeryzacji i przemieszczają się do jądra, gdzie aktywują transkrypcję genów kodujących interferony typu I. Na ścieżce zależnej od TRIF, oprócz fosforylacji IRF3 i IRF7, dochodzi również do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF κ B. Sugeruje się, że ścieżka TRIF-zależna odpowiada za późną aktywację NF κ B, związaną z autokrynną aktywacją komórek przez TNF α , podczas gdy ścieżka MyD88-zależna prowadzi do wczesnej, szybkiej aktywacji NF κ B bezpośrednio po związaniu lipopolisacharydu. Niemniej jednak, transdukcja sygnału na obu ścieżkach jest wymagana do pełnej aktywacji produkcji cytokin prozapalnych w odpowiedzi na LPS [34].

Interesującą modyfikację tego szlaku wykryto w odniesieniu do receptorów TLR7 i TLR9 komórek dendrytycznych, które wykorzystują MyD88 do indukcji syntezy interferonów typu I w odpowiedzi na infekcję wirusową. W tym przypadku wielocząsteczkowy kompleks enzymów formowany wokół białka MyD88 umożliwia fosforylację czynnika transkrypcyjnego IRF7 przez kinazy IRAK1 i IKK α , co indukuje jego translokację do jądra oraz indukcję ekspresji genów kodujących interferony typu I [33].

Przez wiele lat przyjmowano, że receptor TLR4 uruchamia obie ścieżki sygnałowe jako białko błony komórkowej. Uważano to za wyjątkową właściwość recep-



RYCINA 5. Schemat sekwencyjnej aktywacji ścieżek sygnałowych TLR4 regulowanej przez internalizację receptora. **A** – związanie LPS prowadzi do utworzenia kompleksu receptorowego przez białka CD14, TLR4 i MD-2. Wysokie lokalne stężenie PI(4,5)P₂ pozwala na interakcję domeny plekstrynowej białka adaptorowego TIRAP i jego związanie z błoną komórkową, z kolei domena TIR tego białka umożliwia jego interakcję z domeną TIR receptora i białka MyD88. Do powstającego kompleksu za pomocą domen DD, obecnych też w MyD88, wiążą się cztery cząsteczki kinazy IRAK4 i cztery kinazy IRAK2 tworząc tzw. myddosom. Stwierdzona obecność od sześciu do ośmiu cząsteczek białka MyD88 w myddosomie wskazuje na możliwość oddziaływania tego białka z innymi dimerami TLR4, sugerując tworzenie przez nie skupisk wyższego rzędu [15, 43]. Formujący się myddosom uruchamia zależną od MyD88 ścieżkę sygnałową. **B** – Po internalizacji receptora stężenie PI(4,5)P₂ w błonie endosomu spada, co powoduje oddysocjowanie kompleksu TIRAP-MyD88. Do uwolnionych domen TIR receptora wiążą się białka adaptorowe TRAM i TRIF, rozpoczynając przekazywanie sygnału na ścieżce niezależnej od udziału białka MyD88. Opracowano wg [29, 34]

FIGURE 5. A scheme of a sequential activation of TLR4 signaling pathways dependent on internalization of the receptor. **A** – Binding of LPS leads to an assembly of a complex containing CD14, TLR4 and MD-2. A high local concentration of PI(4,5)P₂ allows binding of the pleckstrin homology domain of TIRAP adaptor protein. On the other hand, the TIR domains of TIRAP molecules interact with TIR domains of TLR4 and MyD88 protein. To the complex, four IRAK4 kinases and four IRAK2 kinases bind via DD domains present also in MyD88. A myddosome is assembled triggering MyD88-dependent signaling pathway. The presence of six-eight molecules of MyD88 was found in a myddosome suggesting a possibility of an assembly of high-order clusters of activated TLR4 [15, 43]. **B** – After internalization of TLR4, the concentration of PI(4,5)P₂ in the endosome membrane decreases leading to a dissociation of TIRAP-MyD88 complexes. Adaptor proteins TRAM and TRIF bind to TIR domains of TLR4 triggering generation of the signaling pathway independent on participation of MyD88. Based on [29, 34]

tora TLR4, jako że wszystkie inne poznane receptory PRR (w tym pozostałe TLR, patrz ryc. 2) zdolne do aktywacji produkcji interferonów, inicjują transdukcję sygnału z błony organelli wewnątrzkomórkowych bądź z cytoplazmy. Alternatywny model uruchamiania ścieżek sygnałowych przez TLR4 został zaprezentowany przez Kagana i współpracowników [29, 30]. Model ten zakłada, że aktywacja ścieżek sygnałowych zależnych od białek MyD88 i TRIF jest rozdzielona w czasie i przestrzeni (ryc. 5). Kluczowym wydarzeniem regulującym generację sygnału na ścieżce zależnej od TRIF jest internalizacja receptora TLR4. Według proponowanego modelu, błonowy kompleks receptorowy złożony z CD14, TLR4 i MD-2 formuje się w rejonach błony komórkowej bogatych w fosfatydyloinozitol-(4,5)-bisfosforan [(PI(4,5)P₂)]. Obecność domeny (tzw. domeny plekstrynowej) wiążącej PI(4,5)P₂ w obrębie białka adaptorowego TIRAP umożliwia jego asocjację z błoną komórkową, co z kolei ułatwia interakcję domen TIR tego białka, MyD88 i receptora TLR4. Po aktywacji ścieżki zależnej od MyD88 dochodzi do internalizacji receptora TLR4. W błonie powstającego endosomu znacząco spada stężenie PI(4,5)P₂, na skutek czego kompleks MyD88-TIRAP oddysocjowuje od receptorów TLR4. Umożliwia to z kolei przyłączenie drugiego zestawu białek adaptorowych, TRAM i TRIF oraz aktywację ścieżki zależnej od TRIF [29]. Warto zauważyć, że białko TRAM pozbawione jest domeny wiążącej PI(4,5)P₂, dlatego nie oddziałuje ono z błoną komórkową i nie konkuruje z MyD88 w wiązaniu domen TIR receptorów TLR4 [30]. Białka TIRAP i TRAM odgrywają zatem rolę „sortujących” adaptorów, zapewniających uruchomienie kaskad sygnałowych z konkretnych przedziałów komórki.

Powyższy model pozostawia otwartą kwestię regulacji internalizacji receptora TLR4 oraz ścieżki endocytozy, na której może ona zachodzić. Istnieją dane wskazujące na udział w tym procesie dynaminy i klatryny, co sugeruje endocytozę TLR4 na klasycznej ścieżce w obrębie pęcherzyków opłaszczonych przez klatrynę, podobnie jak ma to miejsce w przypadku receptora transferyny. Pierwotnie dane te opierały się na mikroskopowej analizie współwystępowania receptora TLR4 i LPS z transferyną i hamującego wpływu wywieranego na internalizację TLR4 przez zmutowane formy dynaminy lub ciężkiego łańcucha klatryny [22]. Ostatnio w badaniach nad tym zagadnieniem znalazły zastosowanie inhibitory aktywności enzymatycznej dynaminy i związki blokujące asocjację klatryny z asystującymi jej białkami. Pod ich wpływem hamowana jest internalizacja aktywowanego TLR4 i w znaczącym stopniu redukcji ulega fosforylacja czynnika IRF3 oraz synteza interferonu β [30, 76]. Doniesienie z roku 2011 wskazuje natomiast, że internalizacja aktywowanego TLR4 zachodzi na drodze makropinozytozy kontrolowanej przez aktywność kinazy tyrozynowej Syk, fosfolipazy C γ 2 oraz napływ jonów Ca²⁺ do komórki [85]. Zgodnie z tym doniesieniem wykryto, że zależny od aktywności fosfolipazy C γ 2 wzrost stężenia jonów Ca²⁺ w cytoplazmie kontroluje aktywację IRF3 i ekspresję jego genów docelowych [6]. Czynnikiem nadrzędnym sterującym internalizacją TLR4 wydaje się być jego ko-receptor – białko CD14. W makrofagach izolowanych z myszy pozbawionych białka

CD14 internalizacja TLR4 i produkcja interferonu β była znikoma [85], aczkolwiek mechanizmy takiej zależności pozostają nieznane.

TLR4 pojawia się też w błonie fagosomów, w obrębie których internalizowane są bakterie *Escherichia coli*. Proces ten prowadzi do uruchomienia ścieżki sygnałowej zależnej od TRIF i syntezy interferonów typu I [23]. Autorzy tego doniesienia dowodzą, że TLR4 jest transportowany do błony fagosomów z frakcji wczesnych endosomów, a ten etap wewnątrzkomórkowego transportu TLR4 jest kontrolowany przez GTPazę z rodziny Rab (ang. *Ras-related protein*) – białko Rab11. Wątek ten wspierają inne doniesienia, według których kompleks TLR4/MD-2 jest konstytutywnie obecny w błonie endosomów i aparacie Golgiego makrofagów, skąd może być wbudowywany w błonę komórkową, ale też jest w stanie rozpoznawać LPS i inicjować zarówno TRIF- jak i MyD88-zależne ścieżki sygnałowe [68, 75].

Szlak endocytarny współuczestniczy też w wygaszaniu aktywacji receptora TLR4. Po związaniu LPS receptor TLR4 przemieszcza się do późnych endosomów i lizosomów i podlega degradacji w ich obrębie. W procesie tym bierze udział inna GTPaza z rodziny Rab – białko Rab7b, asocjujące z błoną lizosomów. Aktywność tego białka odgrywa istotną rolę w promowaniu degradacji TLR4 i negatywnej regulacji transdukcji sygnału tego receptora [74]. W nurt negatywnej regulacji odpowiedzi prozapalnej indukowanej przez LPS wpisuje się też omówiona powyżej internalizacja dużych dawek LPS, zależna od receptorów zmiataczy [51].

PODSUMOWANIE

Badania nad mechanizmami przekazywania sygnału przez receptory TLR prowadzone w ciągu ostatnich piętnastu lat za pomocą różnorodnych metod genetycznych, krystalograficznych i immunologicznych w zasadniczym stopniu poszerzyły nasze pojmowanie funkcjonowania układu odpornościowego. Szczególne zainteresowanie skupia się na mechanizmach aktywacji receptora TLR4 z uwagi na wysoką śmiertelność przypadków szoku septycznego. Istotny przełom na tym polu przyniosły prace wskazujące na rolę endocytozy w aktywacji jednej ze ścieżek sygnałowych receptora TLR4. Odkryciom tym towarzyszą jednak niepowodzenia na polu praktycznego zastosowania zdobytej wiedzy, tj. powstrzymania sepsy i niepewny los opracowywanych na jej podstawie leków, takich jak eritoran, antagonistą TLR4 (patrz: <http://www.eisai.com/news/enews201108pdf.pdf>). Wydaje się, że konieczne jest bardziej syntetyczne spojrzenie na funkcjonowanie receptorów TLR w kontekście innych receptorów i białek zaangażowanych w reakcje odpornościowe, takich jak receptory zmiatacze, oraz zwrócenie uwagi na ich wzajemne interakcje. Tego typu badania mają szansę przynieść nowe dane na temat mechanizmów negatywnej regulacji aktywacji receptorów TLR, szczególnie cenne z punktu widzenia przeciwdziałania potencjalnie śmiertelnej reakcji zapalnej organizmu.

PODZIĘKOWANIA

Praca finansowana w ramach projektu N N303 809040 Narodowego Centrum Nauki.

LITERATURA

- [1] ANDERSON KV, NÜSLEIN-VOLHARD C. Information for the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature* 1984; **311**: 223-227.
- [2] BARANOVA IN, KURLANDER R, BOCHAROV AV, VISHNYAKOVA TG, CHEN Z, REMALEY AT, CSAKO G, PATTERSON AP, EGGERMAN TL. Role of human CD36 in bacterial recognition, phagocytosis, and pathogen-induced JNK-mediated signaling. *J Immunol* 2008; **181**: 7147-7156.
- [3] BIANCHI ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007; **81**: 1-5.
- [4] BORTOLUCI KR, MEDZHITOV R. Control of infection by pyroptosis and autophagy: role of TLR and NLR. *Cell Mol Life Sci* 2010; **67**: 1643-1651.
- [5] CARTY M, GOODBODY R, SCHRODER M, STACK J, MOYNAGH PN, BOWIE AG. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol* 2006; **7**: 1074-1081.
- [6] CHIANG CY, VECKMAN V, LIMMER K, DAVID M. Phospholipase *Cy-2* and intracellular calcium are required for lipopolysaccharide-induced Toll-like receptor 4 (TLR4) endocytosis and interferon regulatory factor 3 (IRF3) activation. *J Biol Chem* 2012; **287**: 3704-3709.
- [7] CHOE J, KELKER MS, WILSON IA. Crystal structure of human Toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science* 2005; **309**: 581-585.
- [8] DUERR CU, ZENK SF, CHASSIN C, POTT J, GUTLE D, HENSEL M, HORNEF MW. O-antigen delays lipopolysaccharide recognition and impairs antibacterial host defense in murine intestinal epithelial cells. *PLoS Pathog* 2009; **5**: e1000567.
- [9] DUNZENDORFER S, LEE HK, SOLDAU K, TOBIAS PS. TLR4 is the signaling but not the lipopolysaccharide uptake receptor. *J Immunol* 2004; **173**: 1166-1170.
- [10] ERRIDGE C. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *J Leukoc Biol* 2010; **87**: 989-999.
- [11] ERRIDGE C, BENNETT-GUERRERO E, POXTON IR. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect* 2002; **4**: 837-851.
- [12] FENTON MJ, GOLENBOCK DT. LPS-binding proteins and receptors. *J Leukoc Biol* 1998; **64**: 25-32.
- [13] FITZGERALD KA, MCWHIRTER SM, FAIA KL, ROWE DC, LATZ E, GOLENBOCK DT, COYLE AJ, LIAO SM, MANIATIS T. IKK ϵ and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* 2003; **4**: 491-496.
- [14] GAY NJ, GANGLOFF M. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem* 2007; **76**: 141-165.
- [15] GAY NJ, GANGLOFF M, O'NEILL LA. What the Myddosome structure tells us about the initiation of innate immunity. *Trends Immunol* 2011; **32**: 104-109.
- [16] GRYGOROWICZ MA, KOZŁOWSKA E. Udział receptorów TLR rozpoznających wzorce molekularne organizmów patogennych w modulowaniu aktywności regulatorowych limfocytów T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. *Post. Mikrobiol* 2011; **50**: 141-154.
- [17] HASAN UA, DOLLET S, VLACH J. Differential induction of gene promoter constructs by constitutively active human TLRs. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **321**: 124-131.
- [18] HASAN U, CHAFFOIS C, GAILLARD C, SAULNIER V, MERCK E, TANCREDI S, GUIET C, BRIERE F, VLACH J, LEBECQUE S, TRINCHIERI G, BATES EE. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and

- plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol* 2005; **174**: 2942-2950.
- [19] HAWORTH R, PLATT N, KESHAV S, HUGHES D, DARLEY E, SUZUKI H, KURIHARA Y, KODAMA T, GORDON S. The macrophage scavenger receptor type A is expressed by activated macrophages and protects the host against lethal endotoxic shock. *J Exp Med* 1997; **186**: 1431-1439.
- [20] HORNG T, BARTON GM, MEDZHITOV IR. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2001; **2**: 835-841.
- [21] HUBER M, KALIS C, KECK S, JIANG Z, GEORGEL P, DU X, SHAMEL L, SOVATH S, MUDD S, BEUTLER B, GALANOS C, FREUDENBERG MA. R-form LPS, the master key to the activation of TLR4/MD-2-positive cells. *Eur J Immunol* 2006; **36**: 701-711.
- [22] HUSEBYE H, HALAAS O, STENMARK H, TUNHEIM G, SANDANGER O, BOGEN B, BRECH A, LATZ E, ESPEVIK T. Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *EMBO J* 2006; **25**: 683-962.
- [23] HUSEBYE H, AUNE MH, STENVIK J, SAMSTAD E, SKJELDAL F, HALAAS O, NILSEN NJ, STENMARK H, LATZ E, LIEN E, MOLLNES TE, BAKKE O, ESPEVIK T. The Rab11a GTPase controls Toll-like receptor 4-induced activation of interferon regulatory factor-3 on phagosomes. *Immunity* 2010; **33**: 583-596.
- [24] IWASAKI A, MEDZHITOV R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 2010; **327**: 291-295.
- [25] JIANG Z, GEORGEL P, DU X, SHAMEL L, SOVATH S, MUDD S, HUBER M, KALIS S, KECK S, GALANOS C, FREUDENBERG M, BEUTLER B. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat Immunol* 2005; **6**: 565-570.
- [26] JIN MS, LEE JO. Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity* 2008; **29**: 182-191.
- [27] JIN MS, KIM SE, HEO JY, LEE ME, KIM HM, PAIK SG, LEE H, LEE JO. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* 2007; **130**: 1071-1082.
- [28] JÓZEFOWSKI S. The role of the class A scavenger receptors, SR-A and MARCO, in the immune system. Part 1. The structure of receptors, their ligand binding repertoires and ability to initiate intracellular signaling. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2012; **6**: 104-119.
- [29] KAGAN JC, MEDZHITOV R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* 2006; **125**: 943-955.
- [30] KAGAN JC, SU T, HORNG T, CHOW A, AKIRA S, MEDZHITOV R. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon- β . *Nat Immunol* 2008; **9**: 361-368.
- [31] KANG JY, LEE JO. Structural biology of the Toll-like receptor family. *Annu Rev Biochem* 2011; **80**: 917-941.
- [32] KANG JY, NAN X, JIN MS, YOUN SJ, RYU JH, MAH S, HAN SH, LEE H, PAIK SG, LEE JO. Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity* 2009; **31**: 873-884.
- [33] KAWAI T, AKIRA S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* 2008; **1143**: 1-20.
- [34] KAWAI T, AKIRA S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; **11**: 373-384.
- [35] KENNEDY MN, MULLEN GE, LEIFER CA, LEE C, MAZZONI A, DILEEPAN KN, SEGAL DM. A complex of soluble MD-2 and lipopolysaccharide serves as an activating ligand for Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2004; **279**: 34698-34704.
- [36] KIM HM, PARK BS, KIM JI, KIM SE, LEE J, OH SC, ENKHBAYAR P, MATSUSHIMA N, LEE H, YOO OJ, LEE JO. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell* 2007; **130**: 906-917.
- [37] KIM JI, LEE CJ, JIN MS, LEE CH, PAIK SG, LEE H, LEE JO. Crystal structure of CD14 and its implications for lipopolysaccharide signaling. *J Biol Chem* 2005; **280**: 11347-11351.

- [38] KOBE B, KAJAVA AV. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* 2001; **11**: 725-732.
- [39] KUMAR H, KAWAI T, AKIRA S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 2011; **30**: 16-34.
- [40] LEEAHAVANICHKUL A, BOCHAROV AV, KURLANDER R, BARANOVA IN, VISHNYAKOVA TG, SOUZA AC, HU X, DOI K, VAISMAN B, AMAR M, SVIRIDOV D, CHEN Z, REMALEY AT, CSAKO G, PATTERSON AP, YUEN PS, STAR RA, EGGERMAN TL. Class B scavenger receptor types I and II and CD36 targeting improves sepsis survival and acute outcomes in mice. *J Immunol* 2012; **188**: 2749-2758.
- [41] LEMAITRE B, NICOLAS E, MICHAUT L, REICHHART JM, HOFFMANN JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; **86**: 973-983.
- [42] LEULIER F, LEMAITRE B. Toll-like receptors – taking an evolutionary approach. *Nat Rev Genet* 2008; **9**: 165-178.
- [43] LIN SC, LO YC, WU H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signaling. *Nature* 2010; **465**: 885-890.
- [44] LINGWOOD D, SIMONS K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 2010; **327**: 46-50.
- [45] LIU L, BOTOS I, WANG Y, LEONARD JN, SHILOACH J, SEGAL DM, DAVIES DR. Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science* 2008; **320**: 379-381.
- [46] MACLEOD H, WETZLER LM. T cell activation by TLRs: a role for TLRs in the adaptive immune response. *Sci STKE* 2007; **2007(402)**: e48.
- [47] MATSUSHIMA N, TANAKA T, ENKHBAYAR P, MIKAMI T, TAGA M, YAMADA K, KUROKI K. Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics* 2007; **8**: 124.
- [48] MEDZHITOV R, PRESTON-HURLBURT P, JANEWAY CA JR. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; **388**: 394-397.
- [49] MENG J, PARROCHE P, GOLENBOCK DT, MCKNIGHT CJ. The differential impact of disulfide bonds and N-linked glycosylation on the stability and function of CD14. *J Biol Chem* 2008; **283**: 3376-33784.
- [50] MISHRA BB, GUNDRU UM, TEALE JM. Expression and distribution of Toll-like receptors 11-13 in the brain during murine neurocysticercosis. *J Neuroinflammation* 2008; **5**: 53.
- [51] MUKHOPADHYAY S, VARIN A, CHEN Y, LIU B, TRYGGVASON K, GORDON S. SRA/MARCO-mediated ligand delivery enhances intracellular TLR and NLR function, but ligand scavenging from cell surface limits TLR4 response to pathogens. *Blood* 2011; **117**: 1319-1328.
- [52] NAGAI Y, AKASHI S, NAGAFUKU M, OGATA M, IWAKURA Y, AKIRA S, KITAMURA T, KOSUGI A, KIMOTO M, MIYAKE K. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* 2002; **3**: 667-672.
- [53] NUNEZ MIGUEL R, WONG J, WESTOLL JF, BROOKS HJ, O'NEILL LA, GAY NJ, BRYANT CE, MONIE TP. A dimer of the Toll-like receptor 4 cytoplasmic domain provides a specific scaffold for the recruitment of signalling adaptor proteins. *PLoS One* 2007; **2**: e788.
- [54] NYMAN T, STENMARK P, FLODIN S, JOHANSSON I, HAMMARSTROM M, NORDLUND P. The crystal structure of the human Toll-like receptor 10 cytoplasmic domain reveals a putative signaling dimer. *J Biol Chem* 2008; **283**: 11861-11865.
- [55] OHTO U, FUKASE K, MIYAKE K, SATOW Y. Crystal structures of human MD-2 and its complex with anti-endotoxic lipid IVa. *Science* 2007; **316**: 1632-1633.
- [56] PANTER G, JERALA R. The ectodomain of the Toll-like receptor 4 prevents constitutive receptor activation. *J Biol Chem* 2011; **286**: 23334-13344.
- [57] PARK BS, SONG DH, KIM HM, CHOI BS, LEE H, LEE JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 2009; **458**: 1191-1195.
- [58] PIFER R, BENSON A, STURGE CR, YAROVINSKY F. UNC93B1 is essential for TLR11 activation and IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 2011; **286**: 3307-3314.

- [59] POLTORAK A, HE X, SMIRNOVA I, LIU MY, VAN HUFFEL C, DU X, BIRDWELL D, ALEJOS E, SILVA M, GALANOS C, FREUDENBERG M, RICCIARDI CASTAGNOLI P, LAYTON B, BEUTLER B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; **282**: 2085-2088.
- [60] RAETZ CR, WHITFIELD C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 2002; **71**: 635-700.
- [61] RESMAN N, VASL J, OBLAK A, PRISTOVSEK P, GIOANNINI TL, WEISS JP, JERALA R. Essential roles of hydrophobic residues in both MD-2 and toll-like receptor 4 in activation by endotoxin. *J Biol Chem* 2009; **284**: 15052-15060.
- [62] RIETSCHEL ET, KIRIKAE T, SCHADE FU, MAMAT U, SCHMIDT G, LOPPNOW H, ULMER AJ, ZAHNINGER U, SEYDEL U, DI PADOVA F, SCHREIER M, BRADE H. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J* 1994; **8**: 217-225.
- [63] RITTIG MG, KAUFMANN A, ROBINS A, SHAW B, SPRENGER H, GEMSA D, FOULONGNE V, ROUOT B, DORNAND J. Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of *Brucella* induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes. *J Leukoc Biol* 2003; **74**: 1045-1055.
- [64] ROLLS A, SHECHTER R, LONDON A, ZIV Y, RONEN A, LEVY R, SCHWARTZ M. Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nat Cell Biol* 2007; **9**: 1081-1088.
- [65] SALOMAO R, BRUNIALTI MK, RAPOZO MM, BAGGIO-ZAPPIA GL, GALANOS C, FREUDENBERG M. Bacterial sensing, cell signaling, and modulation of the immune response during sepsis. *Shock* 2012; **38**: 227-242.
- [66] SATOH T, KATO H, KUMAGAI Y, YONEYAMA M, SATO S, MATSUSHITA K, TSUJIMURA T, FUJITA T, AKIRA S, TAKEUCHI O. LGP2 is a positive regulator of RIG-I and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010. **107**: 1512-517.
- [67] SCHNARE M, BARTON GM, HOLT AC, TAKEDA K, AKIRA S, MEDZHITOV R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2001; **2**: 947-950.
- [68] SHIBATA T, MOTOI Y, TANIMURA N, YAMAKAWA N, AKASHI-TAKAMURA S, MIYAKE K. Intracellular TLR4/MD-2 in macrophages senses Gram-negative bacteria and induces a unique set of LPS-dependent genes. *Int Immunol* 2011; **23**: 503-510.
- [69] SILHAVY TJ, KAHNE D, WALKER S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; **2**: a000414.
- [70] SUN J, DUFFY KE, RANJITH-KUMAR CT, XIONG J, LAMB RJ, SANTOS J, MASARAPU H, CUNNINGHAM M, HOLZENBURG A, SARISKY RT, MBOW ML, KAO C. Structural and functional analyses of the human Toll-like receptor 3. Role of glycosylation. *J Biol Chem* 2006; **281**: 11144-11151.
- [71] TRIANTAFILOU M, MORATH S, MACKIE A, HARTUNG K, TRIANTAFILOU K. Lateral diffusion of Toll-like receptors reveals that they are transiently confined within lipid rafts on the plasma membrane. *J Cell Sci* 2004; **117**: 4007-4014.
- [72] TRIANTAFILOU M, LEPPER PM, BRIAULT CD, AHMED MA, DMOCHOWSKI JM, SCHUMANN C, TRIANTAFILOU K. Chemokine receptor 4 (CXCR4) is part of the lipopolysaccharide "sensing apparatus". *Eur J Immunol* 2008; **38**: 192-203.
- [73] TRIANTAFILOU M, LEPPER PM, OLDEN R, DIAS IS, TRIANTAFILOU K. Location, location, location: Is membrane partitioning everything when it comes to innate immune activation? *Mediators Inflamm* 2011; **2011**: 186093.
- [74] WANG Y, CHEN T, HAN C, HE D, LIU H, AN H, CAI Z, CAO X. Lysosome-associated small Rab GTPase Rab7b negatively regulates TLR4 signaling in macrophages by promoting lysosomal degradation of TLR4. *Blood* 2007; **110**: 962-971.
- [75] WANG D, LOU J, OUYANG C, CHEN W, LIU Y, LIU X, CAO X, WANG J, LU L. Ras-related protein Rab10 facilitates TLR4 signaling by promoting replenishment of TLR4 onto the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 13806-13811.
- [76] WANG Y, YANG Y, LIU X, WANG N, CAO H, LU Y, ZHOU H, ZHENG J. Inhibition of clathrin/dynamin-dependent internalization interferes with LPS-mediated TRAM-TRIF-dependent signaling pathway. *Cell Immunol* 2012; **274**: 121-129.

- [77] WATTERS TM, KENNY EF, O'NEILL LA. Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins. *Immunol Cell Biol* 2007; **85**: 411-419.
- [78] WEBER AN, MORSE MA, GAY NJ. Four N-linked glycosylation sites in humantoll-like receptor 2 cooperate to direct efficient biosynthesis and secretion. *J Biol Chem* 2004; **279**: 34589-34594.
- [79] WEISS J. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and lipopolysaccharide-binding protein (LBP): structure, function and regulation in host defence against Gram-negative bacteria. *Biochem Soc Trans* 2003; **31**: 785-790.
- [80] WONG SW, KWON MJ, CHOI AM, KIM HP, NAKAHIRA K, HWANG DH. Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. *J Biol Chem* 2009; **284**: 27384-27392.
- [81] XU Y, TAO X, SHEN B, HORNG T, MEDZHITOV R, MANLEY JL, TONG L. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature*, 2000; **408**: 111-115.
- [82] YAMAMOTO M, SATO S, HEMMI H, UEMATSU S, HOSHINO K, KAISHO T, TAKEUCHI O, TAKEDA K, AKIRA S. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 2003; **4**: 144-1150.
- [83] YAMAMOTO M, OKAMOTO T, TAKEDA K, SATO S, SANJO H, UEMATSU S, SAITOH T, YAMAMOTO N, SAKURAI H, ISHII KJ, YAMAOKA S, KAWAI T, MATSUURA Y, TAKEUCHI O, AKIRA S. Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat Immunol* 2006; **7**: 962-970.
- [84] YANG H, HREGGVIDSDOTTIR HS, PALMBLAD K, WANG H, OCHANI M, LI J, LU B, CHAVAN S, ROSAS-BALLINA M, AL-ABED Y, AKIRA S, BIERHAUS A, ERLADSSON-HARRIS H, ABDERSSON U, TRACEY KJ. A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 11942-11947.
- [85] ZANONI I, OSTUNI R, MAREK LR, BARRESI S, BARBALAT R, BARTON GM, GRANUCCI F, KAGAN JC. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell* 2011; **147**: 868-880.
- [86] ZHANG D, ZHANG G, HAYDEN MS, GREENBLATT MB, BUSSEY C, FLAVELL RA, GHOSH IS. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004; **303**: 1522-1526.
- [87] ZHU X, OWEN JS, WILSON MD, LI H, GRIFFITHS GL, THOMAS MJ, HILTBOLD EM, FESSLER MB, PARKS JS. Macrophage ABCA1 reduces MyD88-dependent Toll-like receptor trafficking to lipid rafts by reduction of lipid raft cholesterol. *J Lipid Res* 2010; **51**: 3196-3206.

Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz

Otrzymano: 06.11.2012

Przyjęto: 19.11.2012

Katarzyna Kwiatkowska

Zakład Biologii Komórki

Instytut Biologii Doświadczalnej PAN

ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

tel.: +22 58 92 463

e-mail: k.kwiatkowska@nencki.gov.pl

