

ZBIGNIEW KMIĘĆ<sup>1,2</sup>, PIOTR WIERZBICKI<sup>1</sup>, AGNIESZKA ŚLIWIŃSKA-JEWSIEWICKA<sup>2</sup>,  
KAROLINA KIRSTEIN-SMARDZEWSKA<sup>1</sup>, ALEKSANDRA ŁAWNICZAK<sup>1</sup>,  
AGNIESZKA RYBARCZYK<sup>1</sup>, MACIEJ WIERZBICKI<sup>3</sup>

## UDZIAŁ RECEPTORA TLR-5 W MECHANIZMACH ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ: FIZJOLOGIA I PATOLOGIA

### THE ROLE OF TOLL-LIKE RECEPTOR 5 IN NORMAL AND PATHOLOGICAL IMMUNE RESPONSES

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Histologii, Gdański Uniwersytet Medyczny  
kierownik: prof. dr Zbigniew Kmieć

<sup>2</sup>Katedra Histologii i Embriologii Człowieka, Wydział Nauk Medycznych,  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

kierownik: prof. dr Zbigniew Kmieć

<sup>3</sup>Zakład Immunologii Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
kierownik: prof. dr Ewa Brzezińska-Błaszczak

Celem pracy było przedstawienie roli receptora TLR-5 w przebiegu niespecyficznego i swoistego odpowiedzi immunologicznej. Pierwotnym zadaniem mechanizmów odpowiedzi wrodzonej jest odróżnienie potencjalnych czynników zakaźnych od antygenów własnych lub należących do fizjologicznej flory organizmu. Jest to realizowane przez szereg receptorów, wśród których receptory Toll-podobne (TLR, *toll-like receptors*) pełnią kluczową rolę rozpoznając struktury powierzchniowe drobnoustrojów, a także kwasy nukleinowe wirusów. Specyficzną cechą receptora TLR-5 jest rozpoznawanie flagelliny, strukturalnego białka filamentów tworzących rzęski bakterii. Rozpoznanie flagelliny zapoczątkowuje niespecyficzną odpowiedź odpornościową aktywując jednocześnie mechanizmy prowadzące do odpowiedzi specyficznego. Receptory TLR-5 odgrywają istotną rolę w odpowiedzi immunologicznej błon śluzowych, szczególnie w obrębie przewodu pokarmowego.

W toku ewolucji wytworzenie niespecyficznego odporności wrodzonej nastąpiło przed powstaniem swoistego w stosunku do antygenów odporności nabytej. Pierwotnym zadaniem mechanizmów odpowiedzi wrodzonej jest odróżnienie potencjalnych czynników zakaźnych od antygenów własnych lub należących do fizjologicznej flory organizmu. Jest to realizowane przez szereg receptorów, wśród których receptory Toll-podobne (TLR) pełnią kluczową rolę. Należą one do tzw. receptorów rozpoznających wzorce molekularne, PRR (*pattern recognition receptors*), które wykrywają określone struktury specyficznych cząsteczek występujących na

powierzchni drobnoustrojów, tzw. wzorców molekularnych związanych z patogenami (PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*) zapoczątkowują niespecyficzną odpowiedź odpornościową aktywując jednocześnie mechanizmy prowadzące do odpowiedzi specyficznej.

Mechanizmy odporności wrodzonej zaczynają działać wkrótce po kontakcie z czynnikiem infekcyjnym, a jej funkcje obronne ujawniają się w ciągu kilku minut do kilkunastu godzin od zakażenia. Do najważniejszych rodzajów komórek uczestniczących w odporności wrodzonej należą monocyty/makrofagi, komórki tuczne, komórki NK (*natural killers*), granulocyty obojętnochłonne i kwasochłonne, komórki nabłonkowe błon śluzowych oraz komórki śródbłonka naczyń. Przez szereg lat uważano, że główny mechanizm odporności wrodzonej polega na fagocytowaniu drobnoustrojów przez makrofagi, a proces ten miał się charakteryzować brakiem specyficzności wobec antygeny. Odkrycie rodziny receptorów TLR wykazało, że w obrębie odporności wrodzonej funkcjonują złożone systemy rozpoznawania struktur powierzchniowych i wewnętrznych drobnoustrojów, których aktywacja prowadzi do uruchomienia mechanizmów efektorowych odporności wrodzonej i uczestniczy w kształtowaniu odporności nabytej [1, 22]. Receptory TLR są występującymi u ssaków homologami receptorów Toll wykrytych w zarodkach muszki owocowej *Drosophila melanogaster*, które biorą udział w odporności dorosłych osobników [21]. Rodzina białek Toll jest ewolucyjnie konserwatywna, a cząsteczki o budowie i funkcji homologicznej do Toll wykryto nie tylko u owadów, ale u szeregu innych organizmów, włącznie z roślinami [1, 34].

Receptory TLR wykazują różną swoistość wiązania ligandów. U myszy zbadano i opisano występowanie 10 receptorów z rodziny TLR o poznanej specyfice wiązania liganda oraz dwóch (TLR-12 i -13) o wciąż niezidentyfikowanej swoistości. U człowieka zidentyfikowano 11 receptorów Toll-podobnych. Ligandy receptorów TLR można zaliczyć do trzech głównych klas cząsteczek: kwasów nukleinowych (rozpoznawane przez cząsteczki TLR-3, -7, -9, -10), lipidów/liposacharydów/lipopetydów (TLR-4, -1/2, -2/6) oraz białek (TLR-5, wiążący się z flagelliną i TLR-11, wiążący się z profilino-podobnym białkiem *Toxoplasma gondii*) [22]. Należy podkreślić, że oprócz ligandów pochodzenia egzogenego (antygenów bakterii, wirusów, grzybów i pierwotniaków) ligandami TLR mogą być też autoantygeny, co wskazuje na możliwość udziału tej grupy receptorów w procesach autoimmunologicznych. Przedmiotem niniejszego opracowania jest rola flagelliny, głównego białka strukturalnego rzęsek i wici bakterii – liganda receptora TLR-5 [13,23], w przebiegu odpowiedzi odpornościowej.

Receptory TLR ulegają ekspresji na komórkach kontaktujących się bezpośrednio lub pośrednio z drobnoustrojami i substancjami pochodzenia zewnętrznego obecnymi w świetle przewodu pokarmowego, dróg oddechowych, układu wydalniczego i dróg płciowych, a także we krwi. Receptory te biorą udział w obronie organizmu gospodarza przeciw patogenom poprzez: (1) rozpoznawanie molekularnych wzorów obecnych na powierzchni drobnoustrojów, (2) indukcję efektorowych procesów przeciwdrobnoustrojowych, (3) pobudzenie wydzielania cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych, co stanowi proces łączący odporność wrodzoną z odpornością nabytą.

## BUDOWA RECEPTORÓW TLR I MECHANIZMY SYGNAŁOWANIA POPURZEC RECEPTOR TLR-5

Występująca u ssaków rodzina receptorów TLR to grupa 13 transbłonowych białek (obecnych w błonie komórkowej lub błonie endolizosomu) posiadających trzy wspólne cechy strukturalne:

obecność w części zewnątrzkomórkowej domen bogatych w leucynę, wiążących ligandy, krótki region przezbłonowy oraz występowanie cytoplazmatycznej domeny TIR (*toll/interleukin 1 receptor*), która jest niezbędna do zapoczątkowania kaskady sygnałowej.

Zewnątrzkomórkowa domena receptora TLR zawiera od 19 do 25 bogatych w leucynę tandemowych powtórzeń określanych jako LRR (*leucine rich repeats*). Powtórzenia te zbudowane są z 24 do 29 aminokwasów i posiadają bogatą w leucynę sekwencję XLXXLXLXX oraz towarzyszącą jej drugą, konserwatywną sekwencję XØXXØX4FXXLX (gdzie X to dowolny aminokwas, L – leucyna, zaś Ø to aminokwas hydrofobowy). Powtórzenia obejmują zarówno struktury alfa-helikalne jak i beta-harmonijkowe. Część odcinka cytoplazmatycznego cząsteczki receptora zawiera domenę TIR o długości ok. 200 aminokwasów. W jej obrębie trzy konserwatywne sekwencje obejmujące 20-30% aminokwasów stanowią regiony TIR, homologiczne dla receptora TLR i receptora interleukiny 1, które posiadają kluczowe znaczenie dla procesów przekazywania sygnałów [5, 15].

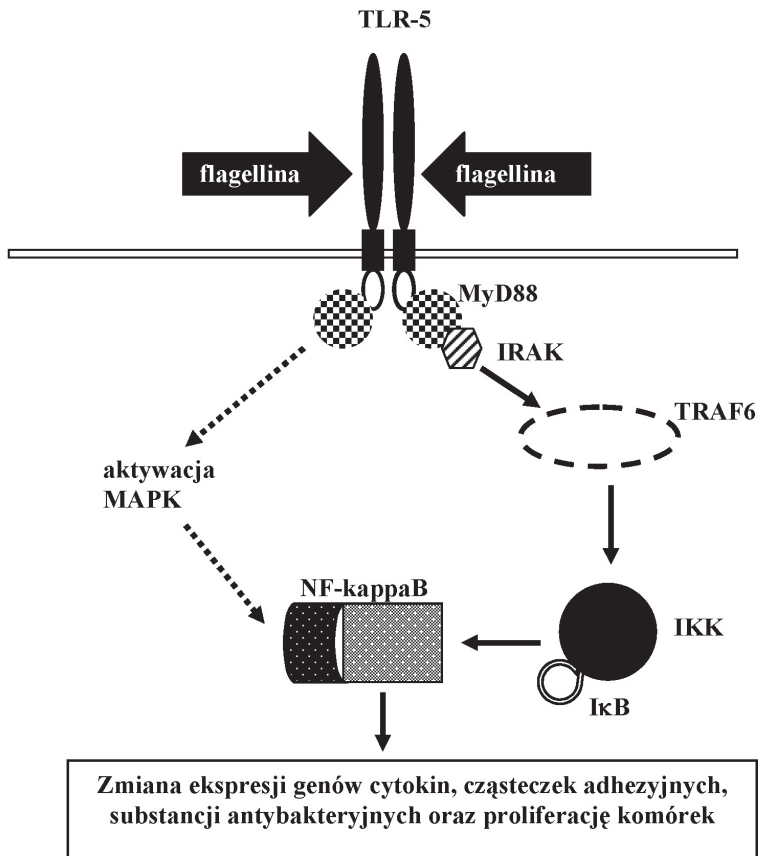
Większość TLR ma podobną drogę sygnalowania, w której różne rodzaje cząsteczek adaptorowych tworzą kompleks z domeną TIR uruchamiając w ten sposób kaskadę sygnału. Każdy TLR aktywuje indywidualną odpowiedź poprzez odmienną kombinację TIR-TLR i cząsteczki adaptorowej. Wyróżnia się dwie główne drogi transdukcji sygnału: zależne lub niezależne od cząsteczki adaptorowej MyD88 (*myeloid differentiation primary response protein 88*). Cytoplazmatyczne białko MyD88 posiada N-końcową „domenę śmierci”, która łączy się z domeną TIR przez krótką sekwencję łączącą. MyD88 uczestniczy w rekrutacji kinaz IRAK (*IL-1 receptor-associated kinase*), które fosforylują szereg białek regulatorowych kilku szlaków wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału. Zależny od MyD88 szlak sygnalizacji wewnątrzkomórkowej jest związany zarówno z aktywacją receptorów TLR-5, jak i innych receptorów TLR (TLR-2, -4, -7, -9). Natomiast transdukcja sygnału poprzez niezależną od MyD88 drogę aktywacji receptorów TLR-3 i TLR-4 uruchamia kaskadę sygnalowania za pomocą licznych cząsteczek adaptorowych posiadających domeny TIR: TIRAP (*TIR-domain-containing adaptor protein*), TRIF (*TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN-beta*), TICAM1 (*TIR domain-containing molecule 1*) oraz TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) [3,17].

Po związaniu flagelliny przez receptor TLR-5 domeny TIR ulegają dimeryzacji i podlegają zmianom konformacyjnym wymaganych do wzbudzenia wewnątrzkomórkowego szlaku przekazywania sygnału. W procesach tych biorą udział cząsteczki adaptorowe MyD88, kinazy IRAK, kinazy związane z transformującym czynnikiem wzrostu beta TAK-1 (*TGFβ-activated kinases*), kinazy związane z TAB (białkiem wiążącym TAK-1, *TAK-1-binding protein 1*) oraz TRAF6 - czynnik 6 związany z receptorem TNF (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*). Po związaniu liganda przez receptor TLR-5 (a także receptory TLR-7 i -9) dochodzi do bezpośredniego połączenia białka MyD88 z domeną TIR cząsteczki receptora (w przypadku receptorów TLR-2 i -4 w połączeniu tym pośredniczy białko adaptorowe TIRAP) [5]. Następnie do My88 przyłącza się kinaza IRAK1, które ulega fosforylacji pod wpływem zaktywowanej kinazy IRAK4 oraz wskutek autofosforylacji. Aktywna kinaza IRAK1 zostaje uwolniona z kompleksu receptora TLR do cytoplazmy, gdzie fosforyluje białko TRAF6, co z kolei prowadzi do aktywacji powstałego wcześniej kompleksu TAK1/TAB1 [17]. Pobudzony kompleks TAK1/TAB fosforyluje i w efekcie aktywuje białko IKK, czyli kinazę inhibitora czynnika transkrypcyjnego NF-κB (*inhibitory protein of kappa B kinase*) oraz białka z rodziny MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). Aktywna kinaza IKK fosforyluje białko IκB, co prowadzi do jego degradacji, a w konsekwencji do uwolnienia czynnika transkrypcyjnego

NF- $\kappa$ B (*nuclear factor- $\kappa$ B*) z kompleksu I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B. Powstały aktywny czynnik NF- $\kappa$ B przemieszcza się z cytoplazmy do jądra komórkowego, gdzie indukuje ekspresję genów kodujących cytokiny prozapalne, chemokiny, cząsteczki adhezyjne i regulatory wzrostu, które uczestniczą w rozwoju zarówno nieswoistej, jak i swoistej odpowiedzi odpornościowej [22,34].

Jak wspomniano, kinaza TAK1 fosforyluje także kinazy z rodziny MAPK, które aktywują białka JNK (*Jun N-terminal kinase*) i p38 stymulujące czynnik transkrypcyjny AP1 (*activator protein 1*). Czynniki te pobudzają ekspresję szeregu genów kontrolujących m.in. procesy proliferacji komórek, w tym komórek prezentujących antygeny, niezbędnego etapu w amplifikacji odpowiedzi odpornościowej [3,22].

Rycina przedstawia uproszczony schemat głównej drogi sygnalowania receptora poprzez receptor TLR-5, która zależna jest od białka adaptorowego MyD88.



Ryc. 1. Główne etapy sygnalowania wewnątrzkomórkowego aktywowane związaniem flagelliny przez receptor TLR. Opis w tekście

Fig. 1. Major steps of intracellular signal transduction released by flagellin binding to the TLR-5 receptor. Description in text

### WYSTĘPOWANIE RECEPTORÓW TLR-5

Receptory TLR-5 występują na komórkach nabłonka (jelit, dróg oddechowych i pęcherzyków płucnych, kanalików nerkowych i dróg moczowych, keratynocytach naskórka, rogówki i dziąseł), komórkach śródbłonka naczyń oraz na prawie wszystkich komórkach układu odpornościowego: dendrytycznych, monocytach i makrofagach, limfocytach B i T, limfocytach T regulatorowych (CD4+25+), komórkach NK (*natural killers*), granulocytach obojętnochłonnych i kwasochłonnych oraz na komórkach tucznych [4, 9]. Należy zaznaczyć, że występuje znaczna zmienność w tkankowej lokalizacji receptorów TLR-5. Np. u myszy w jelicie cienkim występują one głównie w blaszce właściwej błony śluzowej na rodzaju komórek dendrytycznych o fenotypie C11c<sup>+</sup> (CD11<sup>ch</sup>CD11b<sup>hi</sup>), a nie na enterocytach lub klasycznych komórkach dendrytycznych [36]. Wspomniana klasa komórek dendrytycznych po stymulacji flagelliną nie wydziela IL-10 i TNF (w przeciwieństwie do komórek dendrytycznych kępek Peyera), wydzielają one natomiast IL-6 oraz IL-12. W błonie śluzowej jelita myszy komórki CD11c<sup>hi</sup>CD11b<sup>hi</sup> wykazują jednocześnie niską ekspresję receptorów TLR-4, których głównym ligandem jest LPS [36].

### STRUKTURA I FUNKCJE FLAGELLINY

Obecność rzęsek, organelli motorycznych zbudowanych z filamentów utworzonych przez białko flagellinę, umożliwia bakteriom chemotaksję, adhezję i inwazję tkanek gospodarza. Rzęski pełnią zasadniczą rolę w wirulencji takich chorobotwórczych bakterii, jak *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* i inne [26]. W budowie rzęski bakteryjnej wyróżnia się trzy podstawowe struktury: ciało podstawowe działające napędowo, co uzależnione jest od aktywności pompy protonowej, obrotowy „hak” zakotwiczony w błonie oraz helikalnie zbudowany filament określany jako rzęska [20, 39]. Filament rzęskowy zbudowany jest z około 20 tysięcy podjednostek flagelliny, białka o masie cząsteczkowej od 28 do 50 kDa wydzielanego przez kanał centralny organellum i włączanego do filamentu w jego końcowej części [39]. Flagellina posiada stałe domeny, związane są z polimeryzacją filamentu, które wykazują podobną sekwencję u różnych bakterii. Koniec N- i C- terminalny łańcucha flagelliny tworzy upakowane, alfa-helikalne struktury, odpowiadające, odpowiednio, domenom D0 i D1. Zmienny region flagelliny ma formę  $\beta$ -harmonijki i tworzy domeny D2 i D3 w części zewnętrznej filamentu [20,39].

Proces uwalniania flagelliny przez bakterie podczas kolonizacji tkanek ma kluczowe znaczenie dla odpowiedzi związanej z TLR-5. Część bakterii „zrzuca” rzęski, gdy organellum to nie jest już potrzebne (np. po wnikięciu do komórki gospodarza), ale rzęska może być także usunięta z powierzchni bakterii przez enzymy proteolityczne gospodarza lub substancje powierzchniowo czynne [26]. Flagellina jest uwalniana do środowiska w postaci monomeru i tylko taka postać flageliny wykazuje zdolność wiązania się z receptorami TLR-5 [16]. Należy podkreślić, że flageliny różnych rodzajów bakterii wykazują różny wpływ na układ odpornościowy. Flagelliny najbardziej powszechnych rodzajów bakterii, takich jak *E. coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Listeria* i *Clostridia* aktywują receptory TLR-5 i układ immunologiczny, natomiast flagelliny takich rodzajów jak *Campylobacter* lub *Helicobacter* nie są rozpoznawane przez TLR-5, co może być istotne dla ich zdolności kolonizacji tkanek gospodarza [7].

## ROLA FLAGELINY I RECEPTORÓW TLR-5 W ODPOWIEDZI ODPORNOŚCIOWEJ

Spośród antygenów bakteryjnych flagellina jest szczególnie interesująca ze względu na jej rolę w odpowiedzi immunologicznej w obrębie błon śluzowych, które pozostają w ciągłym kontakcie z autochtoniczną florą bakteryjną oraz potencjalnymi patogenami. Będąc białkiem flagellina posiada silne właściwości antygenowe oraz immunomodulacyjne, a jej rozpoznanie przez receptor TLR-5 wywala zarówno niespecyficzną odpowiedź prozapalną (wzrost ekspresji genów cytokin prozapalnych, chemokin i cząsteczek adhezyjnych), specyficzną odpowiedź skierowaną przeciw flagelinie, jak też ko-stymuluje specyficzną odpowiedź przeciw innym antygenom bakteryjnym [28]. Wykazano, że po podaniu systemowym flagellina wykazuje właściwości adjuwanta, zarówno w odpowiedzi komórkowej, jak i humoralnej [7, 30]. Także u ludzi immunizacja ochotników różnymi dawkami wzorcowego szczepu urzędowej bakterii *Salmonella enterica* serovar Typhi prowadziła do indukowania zarówno odpowiedzi komórkowej typu Th1 i Th2, jak i humoralnej [27]. Flagellina indukuje również dojrzewanie komórek dendrytycznych, które posiadają na powierzchni TLR-5 oraz zwiększa ekspresję cząsteczek kostymulujących i zdolność do prezentowania antygeny przez te komórki [7].

Udział receptorów TLR w indukowaniu specyficznego odpowiedzi odpornościowej próbuje się ostatnio wykorzystywać do używania ich naturalnych lub zmodyfikowanych ligandów w postaci eksperymentalnych szczepionek. Pod tym względem flagellina stanowi ważny obiekt badań, ponieważ może stanowić składnik kompleksu białko fuzyjne-antygen lub też być wykorzystana jako adjuwant w połączeniu z DNA [14]. Wykazano [29], że u myszy pozbawionych genu TLR-5 (TLR5<sup>-/-</sup>), ale nie u myszy bez genu My88 (My88<sup>-/-</sup>) flagellina indukowała syntezę przeciwciał klasy IgG1, chociaż w mniejszym stopniu niż u myszy szczepu dzikiego, przy czym ta odpowiedź nie była zależna od aktywacji receptorów TLR-2, -4 lub -11. Dodatkowo, łączne podanie owalbuminy (klasycznego antygeny) i flagelliny myszom TLR-5 KO wykazało podobny efekt adjuwantowy flagelliny w generowaniu przeciwciał przeciw owalbuminie [29]. Wyniki te sugerują, że flagellina może jako adjuwant wspomagać wytworzenie specyficznego odpowiedzi przeciw określonym antygenom na drodze niezależnej od receptorów TLR-5, bez aktywacji odpowiedzi komórkowej, a więc spełnia kryteria silnego, ale bezpiecznego adjuwanta.

## UDZIAŁ TLR-5 W PATOGENEZIE NIESWOISTYCH PRZEWLEKŁYCH ZAPALEŃ JELIT

Nieswoiste przewlekłe zapalenia jelit (NPZJ – IBD, *Inflammatory Bowel Disease*) to grupa przewlekłych schorzeń zapalnych, charakteryzujących się brakiem swoistości przebiegu oraz nieznaną etiologią. Należą do nich przede wszystkim wrzodziejące zapalenie jelita grubego (WZJG, *colitis ulcerosa*) oraz choroba Leśniowskiego-Crohna. NPZJ to choroby przewlekłe, których przebieg cechuje się naprzemiennymi samoistnymi zwojnieniami i nawrotami oraz występowaniem groźnych powikłań (rozwój raka, zagrożenie resekcją jelita grubego, zwężenia i przetoki w chorobie Leśniowskiego-Crohna oraz upośledzenie rozwoju somatycznego u dzieci). Wśród głównych czynników uczestniczących w etiopatogenezie NPZJ (genetycznych, środowiskowych, immunologicznych i psychologicznych) największe znaczenie przypisuje się zaburzeniom równowagi immunologicznej w obrębie układu limfatycznego błony śluzowej

jelit (GALT *gut-associated lymphoid tissue*) w kontekście ciągłego napływu ze światła jelita różnorodnych antygenów, a szczególnie cząsteczek PAMP drobnoustrojów flory jelitowej. W warunkach prawidłowych komórki układu GALT wykazują tolerancję w stosunku do antygenów drobnoustrojów komensalnych i reaktywność w stosunku do antygenów bakterii chorobotwórczych. Chociaż nieznane są antygeny generujące odpowiedź immunologiczną w NPZJ, wydaje się, że rozwój procesu zapalnego wywołany jest zaburzoną pierwotnie funkcją układu immunologicznego wobec składników prawidłowej flory jelitowej, które przy zwiększonej przepuszczalności błony śluzowej mogą przełamywać stan tolerancji immunologicznej [32]. Ponieważ znaczną część flory jelitowej stanowią bakterie urzęsione (*Escherichia*, *Salmonella*, *Listeria*, *Clostridium*, *Pseudomonas*), a ponadto w NPZJ dochodzi do zmian w ilości i lokalizacji wielu rodzajów bakterii [33], można przypuszczać, że w patogenezie NPZJ istotną rolę mogą odgrywać flagellina i receptory TLR-5.

Dane eksperymentalne dostarczyły interesujących obserwacji. Z jednej strony wykazano, że u myszy pozbawionych genu TLR-5 (TLR5<sup>-/-</sup>) dochodzi do spontanicznego rozwoju zapalenia jelita grubego, co sugeruje, iż w prawidłowych warunkach oddziaływania flagelina-TLR-5 mogą mieć charakter interakcji chroniących przed progresją stale obecnego w błonie śluzowej jelita grubego słabo nasilonego odczynu o charakterze „miejscowego zapalenia” [36]. Z drugiej strony, u normalnych myszy po podaniu flagelliny wystąpiła silna odpowiedź komórkowa i humoralna, której jednak nie towarzyszyło zapalenie jelit [37]. Zaobserwowano także, że flagelina chroni enterocyty przed apoptozą [24], a podana dootrzewnowo myszom nie tylko nie powodowała silnej reakcji zapalnej, ale chroniła zwierzęta przed testowanymi toksynami, patogenami i promieniowaniem jonizującym [30, 38].

Chociaż modele zwierzęce NPZJ dostarczają wielu informacji o potencjalnych patomechanizmach rozwoju tej grupy schorzeń, nie oddają one złożonego charakteru rzeczywistych chorób, colitis ulcerosa i choroby Leśniowskiego-Crohna. Uważa się, że pomimo częściowo podobnej symptomatologii inne mechanizmy immunologiczne kierują rozwojem WZJG i choroby Leśniowskiego-Crohna. Pierwsza z nich ma charakter zaburzonej odpowiedzi komórkowej z przewagą odpowiedzi cytokinowej typu Th2 (nadmierna produkcja IL-5 oraz IL-13), w drugiej zaś obserwowany jest profil odpowiedzi cytokinowej typu Th1 z udziałem limfocytów Th17 (nadmierna produkcja interferonu gamma, TNF, IL-12 oraz IL-17, IL-21, IL-23) [32]. Dostępne dane wskazują na odmienny udział flagelliny i TLR-5 w patogenezie WZJG i choroby Leśniowskiego-Crohna. Przy pomocy PCR w czasie rzeczywistym oraz techniki immunocytochemicznej wykazaliśmy wyraźnie obniżoną ekspresję receptora TLR-5 w biopsjach błony śluzowej 99 chorych na *colitis ulcerosa* w porównaniu do biopsji 34 pacjentów kontrolnych [31]. Uważamy, że zmniejszenie ilości receptorów TLR-5 na podstawno-bocznej domenie błony komórkowej enterocytów w warunkach nasilonego zapalenia może stanowić adaptacyjną odpowiedź wobec zwiększonej ilości cząsteczek flagelliny między enterocytami w warunkach zwiększonej przepuszczalności bariery jelitowej.

W przeciwieństwie do *colitis ulcerosa*, flagellina i TLR-5 mogą stanowić istotny czynnik w patogenezie choroby Leśniowskiego-Crohna. Wykazano, że w większości surowic krwi chorych na chorobę Leśniowskiego-Crohna, ale nie na WZJG, występują w stosunkowo wysokim mianie przeciwciała przeciwko flagellinie [18]. U części chorych wykryto przeciwciała skierowane przeciwko jednej z dominant antygenowych flagelliny, które rozpoznawało TLR-5 jako własny antygen, co wskazuje na możliwość udziału odpowiedzi autoimmunologicznej w tym schorzeniu [19]. Zaobserwowano, że osobnicy z grupy Żydów aszkenazyjskich (popu-

lacja o wysokim ryzyku rozwoju choroby Leśniowskiego-Crohna) wykazujący dominujący negatywny polimorfizm stop genu TLR-5 (jego obecność redukuje o ok. 75% odpowiedź na flagellinę), znacznie rzadziej chorują na tę postać NPZJ, przy czym zależność taka nie wystąpiła w przypadku *colitis ulcerosa* [8]. Obserwacja ta pośrednio wskazuje na niekorzystny udział flageliny i TLR-5 w rozwoju choroby Leśniowskiego-Crohna (nosiciele wspomnianego negatywnego allelu TLR-5 STOP mieli także niższe miano przeciwciał antyflagelinowych w surowicy krwi), ale dopiero dalsze badania mogą potwierdzić tę hipotezę.

#### UDZIAŁ TLR-5 W PATOGENEZIE CHORÓB UKŁADU ODDECHOWEGO

Obok innych receptorów rodziny TLR, także receptory TLR-5 występują na komórkach nabłonka dróg oddechowych i pęcherzyków płucnych, mimo że przeciwieństwie do jelit, w ich świetle rzadko występują urzęsione bakterie. W badaniach *ex vivo* komórek nabłonka dróg oddechowych flagellina silnie stymulowała wydzielanie przez nie cytokin prozapalnych [25]. W modelach zapalenia płuc wywołanych przez u *Pseudomonas aeruginosa* wykazano istotną rolę oddziaływań flageliny z receptorami TLR-5 w rozwoju pneumonii, co sugeruje podobny patomechanizm także w przypadku ludzi. Gen dla TLR-5 leży w regionie 1q41, a jego polimorfizm związany jest z zaburzeniem przekazywania sygnału i podatnością na infekcje. U ludzi polimorfizm w obrębie kodonu STOP w wiążącej ligand domenie TLR-5 (TLR-5329STOP) uniemożliwia wiązanie flageliny i zwiększa podatność na zakażenie urzęsioną bakterią *Legionella pneumophila*, czynnika etiologicznego tzw. choroby legionistów, która przebiega pod postacią ciężkiego zapalenia płuc [11]. Obserwacje te wskazują na istotną rolę flageliny i receptora TLR-5 w prawidłowej odpowiedzi obronnej układu oddechowego w stosunku do niektórych urzęsionych drobnoustrojów.

#### UDZIAŁ FLAGELINY I RECEPTORÓW TLR-5 W PATOGENEZIE INNYCH CHORÓB

Receptory TLR, w tym receptor TLR-5, występujące w nerkach i drogach moczowych odgrywają pewną rolę w patomechanizmach zakażeń dróg moczowych. Wykazano, że myszy pozbawione genu TLR-5 są znacznie bardziej podatne na zakażenia dróg moczowych wywołane uropatogennymi szczepami *E. coli* [2]. U ludzi polimorfizm w genie TLR5 (TLR5-C1174T), który prowadzi do zahamowania sygnałowania na szlaku flagelina-TLR5, koreluje ze zwiększoną podatnością na nawracające zapalenia pęcherza moczowego u kobiet [10].

Wirus zapalenia wątroby typu C (HCV) jest częstą przyczyną występowania przewlekłych zapaleń tego narządu, przy czym u chorych nierzadko występują infekcje bakteryjne i wirusowe. Zaobserwowano zwiększoną ekspresję receptorów TLR-5 (a także innych receptorów TLR) w monocytach pacjentów HCV-pozytywnych [6].

Geny podatności na zachorowanie na chorobę autoimmunizacyjną, toczeń układowy (SLE) zlokalizowane są w obrębie chromosomu 1q41-1q42, podobnie jak gen TLR-5. Wykazano, że chorzy na SLE z polimorfizmem kodonu STOP w genie dla TLR-5 (TLR-5329STOP) wytwarzają zdecydowanie mniejsze ilości cytokin prozapalnych w porównaniu do chorych na SLE z normalnym genotypem, co wyraża się mniejszym nasileniem objawów klinicznych [12], zaś wystąpienie tego polimorfizmu redukowało prawdopodobieństwo zachorowania na



SLE wśród rodzeństwa i rodziców chorych. Przytoczone dane wskazują na możliwość udziału flagelliny i TLR-5 w patomechanizmach rozwoju SLE.

## PODSUMOWANIE

Mimo, że wśród receptorów Toll-podobnych receptor TLR-5 zajmuje szczególne miejsce ze względu na to, że jego ligand, flagellina, jest silnie immunogennym białkiem stanowiącym składnik komensalnych i patogennych gatunków bakterii, rola tych receptorów w indukowaniu swoistej odpowiedzi immunologicznej jest ciągle jeszcze słabo poznana. Dalsze badania na niedawno pozyskanych modelach genetycznych myszy pozbawionych receptorów TLR-5 i poszczególnych składników wewnątrzkomórkowej drogi sygnałowej pozwolą na pełniejsze wyjaśnienie roli tych receptorów w odpowiedzi odpornościowej w stanach fizjologii i patologii.

## PIŚMIENNICTWO

1. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O.: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006, 124, 4, 783-801. – 2. Andersen-Nissen E., Hawn T.R., Smith K.D., Nachman A. [i in.]: Cutting edge: Tlr5<sup>-/-</sup> mice are more susceptible to Escherichia coli urinary tract infection. *J. Immunol.* 2006, 178, 8, 4717-4720. – 3. Beutler B., Jiang Z., Georgel P., Crozat K. [i in.]: Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu. Rev. Immunol.* 2006, 24, 353-389. – 4. Brzezińska-Błaszczyk E., Wierzbicki M.: Receptory Toll-podobne (TLR) komórek tucznych. *Postępy Hig. Med. Dośw. (online)*, 2010, 64, 11-21. – 5. Kawai T., Akira S.: TLR signaling. *Semin. Immunol.* 2007, 19, 1, 24-32. – 6. Dolganiuc A., Garcia C., Kodys K., Szabo G.: Distinct toll-like receptor expression in monocytes and T cells in chronic HCV infection. *World J. Gastroenterol.* 2006, 12, 8, 1198-1204. – 7. Gewirtz A.T.: Flag in the crossroads: flagellin modulates innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2006, 22, 1, 8-12. – 8. Gewirtz A.T., Vijay-Kumar M., Brant S.R., Duerr R.H. [i in.]: Dominant-negative TLR5 polymorphism reduces adaptive immune response to flagellin and negatively associates with Crohn's disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 2006, 290, 6, 1157-1163. – 9. Gribar S.C., Richardson W.M., Sodhi C.P., Hackam D.J.: No longer an innocent bystander: epithelial toll-like receptor signaling in the development of mucosal inflammation. *Mol. Med.* 2008, 14, 9-10, 645-659. – 10. Hawn T.R., Scholes D., Li S.S., Wang H. [i in.]: Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to urinary tract infections in adult women. *PLoS One.* 2009, 4, 6, e5990. – 11. Hawn T.R., Verbon A., Lettinga K.D., Zhao L.P. [i in.]: A common dominant TLR-5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to Legionnaires' disease. *J. Exp. Med.* 2003, 198, 10, 1563-1572. – 12. Hawn T.R., Wu H., Grossman J.M., Hahn B.H. [i in.]: Stop codon polymorphism of Toll-like receptor 5 is associated with resistance to systemic lupus erythematosus. *PNAS* 2005, 102, 30, 10593-10597. – 13. Hayashi F., Smith K.D., Ozinsky A., Hawn T.R. [i in.]: The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001, 410, 6832, 1099-1103. – 14. Honko A.N., Sriranganathan N., Lees C.J., Mizel S.B.: Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with Yersinia pestis. *Infect. Immun.* 2006, 74, 2, 1113-1120. – 15. Ivison S.M., Khan M.A., Graham N.R., Bernales C.Q. [i in.]: A phosphorylation site in the Toll-like receptor 5 TIR domain is required for inflammatory signalling in response to flagellin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, 352, 4, 936-941. – 16. Jacchieri S.G., Torquato R., Brentani R.R.: Structural study of binding of flagellin by Toll-like receptor 5. *J. Bacteriol.* 2003, 185, 14, 4243-4247. – 17. Kumar H., Kawai T., Akira S.: Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009, 388, 4, 621-625. – 18. Lodes M.J., Cong Y., Elson C.O., Mohamath R. [i in.]: Bacterial

flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J. Clin. Invest.* 2004, 113, 9, 1296-1306. – 19. Lunardi C., Bason C., Dolcino M., Navone R. [i in.]: Antiflagellin antibodies recognize the autoantigens toll-Like Receptor 5 and Pals 1-associated tight junction protein and induce monocytes activation and increased intestinal permeability in Crohn's disease. *J. Intern. Med.* 2009, 265, 2, 250–265. – 20. Macnab R.M.: How bacteria assemble flagella. *Ann. Rev. Microbiol.* 2003, 57, 77-100.

21. Miao E.A., Andersen-Nissen E., Warren S.E., Aderem A.: TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. *Semin. Immunopathol.* 2007, 29, 3, 275-288. – 22. Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A.: A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997, 388, 6640, 394-397. – 23. Medzhitov R.: Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007, 449, 7164, 819–826. – 24. Neish A.S.: TLR5 in the gut. II. Flagellin-induced inflammation and antiapoptosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2007, 292, 2, G462-466. – 25. Prince A.: Flagellar activation of epithelial signaling. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2006, 34, 5, 548-551. – 26. Ramos H.C., Rumbo M., Sirard J.C.: Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol.* 2004, 12, 11, 509-517. – 27. Salerno-Goncalves R., Wyant T.L., Pasetti M.F., Fernandez-Vina M. [i in.]: Concomitant induction of CD4+ and CD8+ T cell responses in volunteers immunized with *Salmonella enterica* serovar typhi strain CVD 908-htrA. *J. Immunol.* 2003, 170, 5, 2734–2741. – 28. Sanders C.J., Yu Y., Moore III D.A., Williams I.R. [i in.]: Humoral immune response to flagellin requires T cells and activation of innate immunity. *J. Immunol.* 2006, 177, 5, 2810 – 2818. – 29. Sanders C.J., Franchi L., Yarovinsky F., Uematsu S. [i in.]: Induction of adaptive immunity by flagellin does not require robust activation of innate immunity. *Eur. J. Immunol.* 2009, 39, 2, 359-371. – 30. Sanders C.J., Moore D.A., Williams I.R., Gewirtz A.T.: Both radioresistant and hemopoietic cells promote innate and adaptive immune responses to flagellin. *J. Immunol.* 2008, 180, 11, 7184-7192.

31. Stanislawowski M., Wierzbicki P.M., Golab A., Adrych K. [i in.]: Decreased Toll-like receptor-5 (TLR-5) expression in the mucosa of ulcerative colitis patients. *J. Physiol. Pharmacol.* 2009, 60, 4, 71-75. – 32. Strober W., Fuss I., Mannon P.: The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.* 2007, 117, 3, 514-521. – 33. Swidsinski A., Weber J., Loening-Baucke V., Hale L.P. [i in.]: Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43, 7, 3380–3389. – 34. Takeda K., Akira S.: Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 2005, 17, 1, 1-14. – 35. Uematsu S., Jang M.H., Chevrier N., Guo Z. [i in.]: Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells. *Nat. Immunol.* 2006, 7, 8, 868–874. – 36. Uematsu S., Akira S.: Immune responses of TLR5(+) lamina propria dendritic cells in enterobacterial infection. *J. Gastroenterol.* 2009, 44, 8, 803–811. – 37. Vijay-Kumar M., Sanders C.J., Taylor R.T., Kumar A. [i in.]: Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *J. Clin. Invest.* 2007, 117, 12, 3909–3921. – 38. Vijay-Kumar M., Aitken J.D., Sanders C.J., Frias A.: Flagellin treatment protects against chemicals, bacteria, viruses, and radiation. *J. Immunol.* 2008, 180, 12, 8280-8285. – 39. Yonekura K., Maki-Yonekura S., Namba K.: Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* 2003, 424, 6949, 643-650.

Z. Kmieć, P. Wierzbicki, A. Śliwińska-Jewsiewicka, K. Kirstein-Smardzewska, A. Rybarczyk, M. Wierzbicki

#### THE ROLE OF TOLL-LIKE RECEPTOR 5 IN NORMAL AND PATHOLOGICAL IMMUNE RESPONSES

##### Summary

The innate immune system is equipped with receptors that recognize microbe specific molecular structures (also called pathogen-associated molecular patterns or PAMPs). Responses to extracellular PAMPs

are mediated through transmembrane receptors such as the Toll-like receptors (TLRs). Out of 13 known mammalian TLRs, a special role may be attributed to TLR-5 since it recognizes flagellin, a major structural protein of bacterial flagella. Similarly to other TLRs, ligation of TLR-5 induces the expression of proinflammatory cytokines, chemokines, adhesion molecules and other antimicrobial defense molecules by the activation of transcription factor NFκB. Apart from activating innate immune responses flagellin is also an efficient antigen that stimulates both B and T lymphocytes. The adjuvant properties of flagellin have been exploited for the preparation of experimental vaccines. Recent observations indicate an important role of the flagellin-TLR-5 interactions in the pathomechanisms of Crohn's disease and pneumonia caused by the *Pseudomonas aeruginosa*. Polymorphisms in the TLR-5 gene may be associated with protection from Crohn's disease and systemic lupus erythematosus (SLE). Further studies on recently created genetic models of TLR-5 and other TLRs knockout mice will expand our knowledge about flagellin and TLR-5 function in health and disease.

Adres: prof. dr Zbigniew Kmieć  
Katedra i Zakład Histologii GUMed  
ul. Dębinki 1, 80-210 Gdańsk  
e-mail: zkmiec@gumed.edu.pl