

Received: 2009.03.10  
Accepted: 2009.06.25  
Published: 2009.07.20

## Udział receptorów TLR w procesach autoimmunologicznych\*

### TLR function in autoimmunological processes

Agnieszka Klonowska-Szymczyk<sup>1</sup>, Anna Wolska<sup>1</sup>, Ewa Robak<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Katedra i Klinika Hematologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

<sup>2</sup> Katedra i Klinika Dermatologii i Wenerologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

#### Streszczenie

Receptory TLR (Toll like receptors) występują u wielu gatunków kręgowców i bezkręgowców. Odgrywają one istotną rolę w aktywacji komórek odpowiedzi immunologicznej nieswoistej, a także pośrednio swoistej. Rozpoznają różnorodne ligandy egzogenne oraz endogenne. Znaczenie biologiczne receptorów TLR zależy od możliwości wiązania bardzo dużej liczby różnych agonistów i antagonistów, wśród których znajdują się antygeny bakterii, wirusów oraz autoantygeny kręgowców i bezkręgowców. Zdolność receptorów TLR do odpowiedzi na endogenne ligandy może się przyczyniać do rozwoju chorób autoimmunologicznych. Dlatego też w ostatnich latach coraz bardziej dąży się do lepszego poznania mechanizmów efektorowych i szlaków sygnałowych związanych z pobudzeniem receptorów TLR. Prowadzi to do wykrywania nowych białek związanych z przekazem sygnału zależnego od receptorów TLR. Podejmowane są także próby modyfikowania aktywności tych receptorów za pomocą syntetycznych ligandów. Do takich substancji należą krótkie fragmenty DNA nazwane oligo-DNA. Wymienione fragmenty DNA są badane klinicznie jako potencjalne leki w terapii układowego toczenia rumieniowatego.

**Słowa kluczowe:**

**receptory TLR • układowy toczeń rumieniowaty • oligo-DNA**

#### Summary

TLRs (Toll-like receptors) are found in many different vertebrate and invertebrate species. TLRs have important functions in cell activation of the nonspecific immune response as well as in the indirect specific immune response. These receptors recognize a broad range of exogenous and endogenous ligands. The biological importance of TLRs depends on their potential to recognize a great number of different agonists and antagonists, among them antigens of bacterial and viral origin as well as vertebrate and invertebrate autoantigens. The responsiveness of TLRs to endogenous ligands may contribute to the development of autoimmune diseases. Increasing interest is therefore directed towards understanding the effector mechanisms and signaling pathways associated with TLR activation. This leads to the discovery of new proteins associated with TLR signaling pathways. Furthermore, efforts are underway to modify the activity of TLRs by synthetic ligands. Among the factors used to modify TLR activity are short DNA fragments known as oligo-DNA. Oligo-DNA fragments are being evaluated in clinical trials as potential drugs to treat systemic lupus erythematosus.

**Key words:**

**TLR receptors • systemic lupus erythematosus • oligo-DNA**

\* Praca finansowana z funduszu prac własnych nr 502-11-727 oraz prac statutowych nr 503-101-91.

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=891387>

**Word count:** 3399

**Tables:** 3

**Figures:** –

**References:** 58

**Adres autorki:** prof. dr hab. med. Ewa Robak, Katedra i Klinika Dermatologii i Wenerologii UM w Łodzi, ul. Krzemieniecka 5, 94-017 Łódź; e-mail: ewarobak@onet.eu

**Wykaz skrótów:** **AP1** – czynnik transkrypcyjny AP1 (activator protein 1); **BAFF** – czynnik aktywujący limfocyty B (B cell activating factor); **HSP22** – białko szoku cieplnego 22 (heat shock protein 22); **ICAM** – międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna 1 (intercellular adhesion molecule 1); **IKK** – kinaza I kappa B (I kappa B kinase); **IRAK1** – kinaza 1 związana z receptorem interleukiny 1 (interleukin-1 receptor-associated kinase 1); **IRAK4** – kinaza 4 związana z receptorem interleukiny 1 (interleukin-1 receptor-associated kinase 4); **IRF** – czynnik regulatorowy interferonu (interferon regulatory factor); **IRS** – sekwencje DNA regulujące aktywność immunologiczną (immunoregulatory DNA sequences); **JNK** – jun n-końcowa kinaza (jun n-terminal kinase); **LRR** – powtórzenie bogate w leucynę (leucine rich repeat); **MAP** – kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny (mitogen-activated protein kinases); **MMP** – metaloproteinazy macierzy (matrix metalloproteinases); **MyD88** – białko MyD88 (myeloid differentiation primary response); **NF-κB** – czynnik jądrowy kappa B (nuclear factor kappa B); **PDC** – plazmocytoidalna komórka dendrytyczna (plasmacytoid dendritic cell); **RT-PCR** – reakcja łańcuchowa polimerazy z użyciem odwrotnej transkryptazy (reverse transcriptase-polymerase chain reaction); **SLE** – toczeń układowy rumieniowaty (systemic lupus erythematosus); **TAB1** – białko wiążące TAK-1 (TAK-1 binding protein); **TAB2** – białko 2 wiążące TAK-1 (TAK-1 binding protein 2); **TAK1** – kinaza 1 aktywowana przez TGF (TGF-activated kinase 1); **TIRAP** – białko adaptorowe zawierające domenę TIR (Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein); **TLR** – receptor toll- podobny (toll like receptor); **TNF-α** – czynnik nekrozy nowotworów alfa (tumor necrosis factor alfa); **TRAF6** – czynnik 6 związany z receptorem TNF (TNF receptor-associated factor 6); **TRAM** – cząsteczka adaptorowa zbliżona do TRIF (TRIF-related adapter molecule); **TRIF** – białko zawierające domenę TIR indukujące interferon beta (TIR-domain containing adapter inducing interferon-beta).

## WSTĘP

Receptory TLR (Toll like receptor) opisane u wielu gatunków kręgowców, reprezentują grupę białek zbliżonych do receptora Toll wykrytego u muszki owocowej *Drosophila melanogaster* [46,52].

Gen kodujący białko receptora Toll opisano w latach 80. ub.w. jako czynnik odpowiedzialny za polaryzację grzbietowo-brzuszną w czasie rozwoju zarodkowego [20]. Dalsze badania nad dorosłymi osobnikami *Drosophila melanogaster* ujawniły, że geny *Toll* są odpowiedzialne za utrzymanie i rozwój odporności przed różnymi infekcjami [52].

Przyjmuje się, że funkcja receptora TLR kręgowców jest związana z odpowiedzią immunologiczną i procesami autoimmunizacyjnymi [2,10,42–45].

W ostatnich latach istotne znaczenie przypisuje się próbom modyfikacji aktywności TLR za pomocą syntetycznych agonistów i antagonistów. Substancje te w przyszłości mogą zostać wykorzystane jako potencjalne leki w leczeniu chorób autoimmunizacyjnych.

## 1. DOMENY STRUKTURALNE RECEPTORÓW TLR

Receptory TLR są zbudowane z następujących części strukturalnych: zewnątrzkomórkowej, przezbłonowej i cytoplazmatycznej. W części zewnątrzkomórkowej LRR (leucine rich repeat) wyodrębnia się domenę zawierającą powtórzenia bogate w leucynę, natomiast w części cytoplazmatycznej – domenę wykazującą wysoką homologię z receptorem typu I interleukiny 1 (IL-1R), stąd jej nazwa TIR (Toll IL – receptor) [3,33,46].

Obecnie znanych jest 11 rodzajów ludzkich TLR umiejscowionych w błonie komórkowej makrofagów, komórek dendrytycznych, komórek tucznych, eozynofiliów, neutrofilów, limfocytów B (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10, TLR11) oraz w obrębie pęcherzyka endosomalnego (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9). Takie umiejscowienie TLR sprawia, iż domena LRR jest zwrócona na zewnątrz komórki lub do światła endosomu. Domena TIR zawsze skierowana jest w kierunku cytoplazmy komórki [29].

Domena LRR odpowiedzialna jest za wiązanie liganda swojego dla danego TLR.

W wyniku tej interakcji dochodzi do transdukcji sygnału do jądra komórkowego poprzez domenę przezbłonową

Tabela 1. Ligandy wiązane przez TLR

Receptor	Ligand
TLR 1	lipopeptydy mikobakterii, rozpuszczalne substancje z <i>Neisseria meningitidis</i>
TLR 2	lipoproteidy, peptydoglikan, kwasy tejchojowe, lipoarabinomannany, modulina ( <i>S. epidermidis</i> ), glikolipidy bakterii, glikoinozytofosfolipidy ( <i>Trypanosoma cruzi</i> ), poryny, nietypowy LPS ( <i>Leptospira</i> ), zymosan, hemaglutynina wirusa odry, białka wirusów cytomegalii, herpeswirusów HSV-1 i HSV-2 oraz białko Hsp70 (gospodarz)
TLR 3	dwuniciowy RNA (wirusy)
TLR 4	białka wirusów: białka uczestniczące w fuzji lub obecne w otoczce, Hsp60 <i>Chlamydia pneumoniae</i> , taksol (taxol – substancja o działaniu przeciwnowotworowym izolowana z kory cisu) Hsp70, fragment domeny A fibronektyny, oligosacharydy kwasu hialuronowego fibrynogen, siarczan heparyny
TLR 5	flagellina
TLR 6	lipopeptydy diacylowe <i>Mycoplasma</i> , kwasy lipotejchojowe, zymosan
TLR 7	jednociowy RNA, syntetyczne związki przeciwwirusowe i przeciwnowotworowe: analogi nukleozydów
TLR 8	jednociowy RNA syntetyczne związki przeciwwirusowe
TLR 9	dwuniciowy DNA zawierający niemetylowane sekwencje CpG (bakteryjny i wirusowy)
TLR 10	nie określono
TLR 11	białka zbliżone do profiliny

i cytoplazmatyczną TIR przy zaangażowaniu wielu białek [1,46,52]. Pobudzenie TLR zlokalizowanych w endosomach, stymulowane jest przez swoiste dla tego receptora ligandy pochodzące ze sfagocytowanych drobnoustrojów [56].

Wykazano, iż zdolność receptorów TLR do tworzenia postaci homodimerycznych (para identycznych TLR) lub heterodimerycznych (dwie różne TLR) rozszerza rodzaj rozpoznawanych przez nie ligandów, np. TLR2 tworzy pary z TLR6 i w tej postaci dodatkowo rozpoznaje zymosan [14,54,56].

## 2. LIGANDY WIĄZANE PRZEZ RECEPTORY TLR

Receptory TLR rozpoznają bardzo różnorodną grupę ligandów. Należą do nich antygeny bakterii, wirusów i autoantygeny kręgowców [3]

Rodzaj ligandów wiązanych przez poszczególne TLR przedstawiono w tabeli nr 1.

## 3. PRZEKAZ SYGNAŁU ZA POŚREDNICTWEM RECEPTORÓW TLR

Transdukcja sygnału przez receptory TLR odbywa się z udziałem wielu białek, wśród których najważniejsze znaczenie odgrywa białko MyD88 (myeloid differentiation primary response). Jego obecność determinuje drogę sygnalizacji: zależną lub niezależną od MyD88.

### 3.1. Przekaz zależny od MyD88

Białko MyD88 zawiera w swej strukturze domenę TIR, która pośredniczy w wiązaniu się tego białka z domeną

TIR receptorów TLR. Ten element strukturalny umożliwia także przyłączanie się kolejnych białek zaangażowanych w procesie przekazywania sygnału [53].

Większość poznanych receptorów TLR (z wyjątkiem TLR3) w przekazie sygnału wykorzystuje białko MyD88. Szczególną pozycję zajmuje TLR4, który może przekazywać sygnał w sposób zależny, ale także niezależny od MyD88 [5,19,41,48].

W transdukcji pobudzenia komórki w szlaku zależnym od MyD88, biorą również udział białka z grupy Pellino, które wchodzi w interakcje z następującymi białkami: IRAK1 (interleukin-1 receptor-associated kinase 1), IRAK4 (interleukin-1 receptor-associated kinase 4), TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) i TAK1 (TGF – activated kinase 1) [13,18].

Związanie liganda przez receptory TLR powoduje łączenie się białka MyD88 z domeną TIR receptora TLR. Następuje to w sposób bezpośredni (TLR5, TLR7, TLR9) lub za pośrednictwem białka TIRAP (Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein) w przypadku TLR2 i TLR4 [48].

W kolejnym etapie do MyD88 przyłącza się białko IRAK1, które ulega fosforylacji pod wpływem innej kinazy z tej rodziny, tj. IRAK4 oraz za pośrednictwem automodyfikacji. Zaktywowana kinaza IRAK1 odłącza się od kompleksu białek związanych z receptorem TLR, a następnie modyfikuje białko TRAF6 w procesie fosforylacji. Jest to jednocześnie wstępny, niezbędny etap jego aktywacji. Białko IRAK1 i zaktywowany TRAF6 wiążą się z powstałym wcze-

Tabela 2. Składowe szlaku sygnałowego zależnego od MyD88

L.p.	Przebieg szlaku sygnałowego
1	Receptory TLR 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11
2	MyD88
3	Białka z rodziny Pellino
4	IRAK4
5	IRAK1
6	TAK1, TAB1, TAB2
7	TRAF6
8	IKK, MKK3, MKK6
9	IκB, JNK, P38
10	NF-κB, AP1

śniej kompleksem TAK1-TAB1 (TAK-1 binding protein)-TAB2 (TAK-1 binding protein 2), w którym TAB1 i 2 są białkami adaptorowymi TAK1. TRAF6 aktywuje kinazę TAK1, która następnie fosforyluje IKK (I kappa B kinase) i prowadzi do jej aktywacji [13].

Aktywna kinaza IKK odpowiada za fosforylację i degradację białka IκBα, które jest inhibitorem czynnika transkrypcyjnego NF-κB (nuclear factor kappa B). Powstały aktywny czynnik transkrypcyjny NF-κB wnika do jądra komórkowego i indukuje ekspresję odpowiednich genów dla cytokin, molekuł adhezyjnych i regulatorów wzrostu, niezbędnych do proliferacji i różnicowania wielu komórek układu immunologicznego [12,19,27,39,48].

Kinaza TAK1 uczestniczy także w procesie fosforylacji białek z rodziny kinaz MAP (mitogen – activated protein kinases), tj. MKK3 i MKK6, które aktywują JNK (Jun N – terminal kinase) i p38 (kinaza o m.c. 38 kDa z rodziny MAP). W wyniku tej reakcji powstają zmodyfikowane białka JNK i p38, które stymulują czynnik transkrypcyjny AP1 (activator protein 1). Uczestniczy on w regulacji ekspresji wielu genów.

### 3.2. Przekaz sygnału niezależny od MyD88

Transdukcja sygnału jedynie w szlaku niezależnym od MyD88 odbywa się poprzez TLR3. TLR4 indukuje natomiast dwie drogi sygnalizacji: zależną i niezależną od MyD88. Indukcja szlaku niezależnego od MyD88 w obrębie receptorów TLR3 i 4 prowadzi do aktywacji kilku dróg sygnałowych. W proces ten zaangażowane są różne białka adaptorowe. TLR4 wykorzystuje w tym szlaku białko TRIF (TIR – domain containing adapter inducing interferon-β) oraz TRAM (TRIF – related adapter molecule). Natomiast TLR 3 tylko TRIF [19,48].

Po związaniu swoistych ligandów w szlaku niezależnym od MyD88 z udziałem TRIF dochodzi do aktywacji NF-κB, ale także czynnika transkrypcyjnego z rodziny IRF (interferon regulatory factor), określanego jako IRF3. Kontroluje on ekspresję genu interferonu beta (IRF-β) [19,50,57].

Tabela 3. Składowe szlaku sygnałowego niezależnego od MyD88

L.p.	Przebieg szlaku sygnałowego
1	Receptor TLR 3, TLR 4
2	TRIF, TRAM
3	TRAF6/ IKKi/TBK1
4	RIP1, RIP3
5	NF-κB, IRF3

Wykazano, że w procesie prowadzącym do aktywacji NF-κB uczestniczą także kinazy RIP1 i RIP3 (receptor interacting protein 1 i 3) [9,37].

### 4. ROLA RECEPTORÓW TLR W PROCESACH AUTOIMMUNOLOGICZNYCH

Udział receptorów TLR w rozwoju procesów autoimmunologicznych jest wiązany z jednej strony z molekularnym podobieństwem antygenów własnych komórek do antygenów obcych, z drugiej natomiast z nadmierną aktywacją układu immunologicznego i brakiem kontroli nad procesami autoimmunizacyjnymi [2,48].

Nie jest pewne w jaki sposób odpowiedź na antygeny obce przekształca się w proces autoimmunizacyjny. Uważa się, że przejście od prawidłowej odpowiedzi immunologicznej, przebiegającej z niewielkimi uszkodzeniami lub bez uszkodzeń tkanek gospodarza do reakcji patologicznej, która powoduje znaczące uszkodzenia tkanek, może być związana z nieprawidłową ekspresją, defektem struktury czy funkcji receptorów TLR w błonie komórkowej lub błonie endosomu [32,38].

Zaburzenia funkcji receptorów TLR mogą być również spowodowane mutacjami genów TLR, które prowadzą do ich aktywacji przez ligandy o niskim powinowactwie lub też przez autoantygeny gospodarza [45,48].

Scheibner i wsp. w swej pracy opublikowanej w roku 2006 podkreślają rolę receptorów TLR w odpowiedzi na antygeny obce i na składniki komórek gospodarza. W swych badaniach autorzy stwierdzili, że receptory TLR2 i 4 uczestniczą w zapoczątkowaniu reakcji zapalnej w odpowiedzi na składniki degradacji macierzy pozakomórkowej przez kwas hialuronowy (Ha) gospodarza. Do odpowiedzi tej niezbędna jest obecność białek MyD88. U myszy transgenicznej pozbawionej genu dla MyD88, nie rozwija się odpowiedź zapalna na Ha za pośrednictwem TLR2 i 4 [51].

W patogenezie chorób o podłożu autoimmunizacyjnym, w tym także w układowym toczeniu rumieniowatym (SLE – systemic lupus erythematosus) zwraca się uwagę na dużą, endogenną podaż ligandów TLR. Może być ona spowodowana zaburzeniami procesu apoptozy lub też defektem eliminacji komórek apoptotycznych [41].

Ważną rolę w tym procesie odgrywa promieniowanie ultrafioletowe. Przyczynia się ono nie tylko do wywołania objawów SLE, ale także prowokuje kolejne zaostrzenia choroby. Wykazano, że światło UV stymuluje wydziela-

nie prozapalnych cytokin i nasila apoptozę keratynocytów [30]. Do czynników biorących udział w ujawnieniu się lub też zaostreniu SLE należą także inhibitory metylacji DNA. Wyodrębnią się wśród nich niektóre leki, takie jak hydralazyna i prokainamid. W warunkach *in vitro* stwierdzono, że inhibitory metylacji DNA zmieniają ekspresję genów i powodują rozwój autoreaktywności limfocytów CD4+. Przyjmuje się, że odcinki DNA o sztucznie obniżonej zawartości grup metylowych wiążą się z receptorem TLR9 w sposób bardziej swoisty i powodują silniejszą aktywację zależnego od TLR9 szlaku sygnałowego [55,58]. Ponadto obniżona metylacja DNA zwiększa ekspozycję receptorów TLR na antygeny endogenne [11]. Badania doświadczalne wskazują, że antygeny pochodzenia endogennego mają zdolność stymulacji odpowiedzi autoimmunologicznej tylko wtedy, gdy ulegną swoistym modyfikacjom. Może to być spowodowane nie tylko zaburzeniami metylacji DNA ale także zmianą poziomu fosforylacji histonów czy też oksydacyjnym uszkodzeniem DNA. Stąd też wymienione czynniki mogą się przyczyniać do aktywacji TLR i stymulować odpowiedź autoimmunizacyjną [15].

SLE występuje dziewięć razy częściej u kobiet niż u mężczyzn i ujawnia się zwykle w okresie rozrodczym. Obserwacje te wskazują na istotną rolę estrogenów w patogenezie choroby. To również tłumaczy to, że stosowanie estrogenowych środków antykoncepcyjnych indukuje zaostrenie choroby i zwiększa ryzyko cięższego jej przebiegu. Ujawnienie się SLE po 60 roku życia, w okresie menopauzy natomiast rokuje łagodniejszy przebieg [22,34,49].

Wyniki badań eksperymentalnych prowadzonych na komórkach uzyskanych od chorego w doświadczeniach *in vitro* wskazują na zwiększone wytwarzanie interferonu alfa (IFN- $\alpha$ ) u kobiet w wyniku aktywacji TLR7. Jednoczesna stymulacja TLR7 i 9 za pomocą takich ligandów jak resiquimod (R848), imiquimod (R837) i CpG DNA (dinukleotyd cytydylowo-guaniny – kwas deoksyrybonukleinowy) wykazała znacząco wyższe stężenie IFN- $\alpha$  w hodowlach komórkowych *in vitro* uzyskanych od kobiet niż od mężczyzn. W analogicznych warunkach doświadczalnych nie zaobserwowano takiego efektu po stymulacji wyłącznie za pomocą wymienionych wyżej ligandów TLR9. Omówione obserwacje wskazują, że wzrost stężenia IFN- $\alpha$  u chorych na SLE kobiet jest spowodowany aktywacją TLR7. Stąd też wzrost stymulacji TLR7 może odgrywać istotną rolę w patogenezie tej choroby [4].

Znaczenie TLR podkreślane jest również w rozwoju reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS). Wykazano, że stymulacja komórek zawierających receptory TLR2 i 4 wyizolowanych z błony maziowej stawów zajętych procesem chorobowym w warunkach *in vitro* wpływa na wzrost ekspresji prozapalnych cytokin: TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-8. Ponadto stwierdzono zwiększone stężenie metaloproteinaz – MMP 1, 2, 3 i 13 (matrix metalloproteinases). Te enzymy proteolityczne uczestniczą w degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej i wpływają na wzrost aktywacji receptorów TLR2 i 4 [48]. Również polimery kwasu hialuronowego, powstałe w procesie degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej, stanowią ligandy receptora TLR4 (tab. 2).

W badaniach na hodowlach komórkowych w warunkach *in vitro* wykazano stymulujący wpływ płynu tkankowego pochodzącego z zajętych procesem chorobowym stawów cho-

rych na RZS na ekspresję TLR2 i TLR4. Podobne działanie obserwuje się w wyniku stymulacji tych receptorów ligandami syntetycznymi lub endogennymi. Należy do nich białko szoku cieplnego B8, oznaczane też jako HSP22 (heat shock protein 22), występujące w osoczu i płynie maziowym chorych na RZS. Aktywuje ono komórki dendrytyczne w sposób zależny od TLR4. Powyższe obserwacje potwierdzają udział receptorów TLR2 i 4 w rozwoju RZS [47,48].

W procesie pobudzenia receptorów TLR zaangażowane są białka MyD88 oraz TIRAP. Wyniki badań eksperymentalnych wskazują, że zmutowane, nieaktywne postaci tych białek działają hamująco na szlak sygnałowy zależny od TLR2 i TLR4. Blokują także ekspresję cytokin prozapalnych oraz MMP. Podobne mechanizmy aktywacji receptorów TLR obserwowane są również w przebiegu SLE [48].

Badania doświadczalne na modelu zwierzęcym dla SLE potwierdzają istotną rolę receptora TLR9 w rozwoju tej choroby. Wykorzystując linie myszy podatnych na rozwój tocznia (MRL<sup>lpr/lpr</sup>) oraz szczep myszy niepodatnych (MRL), zwierzętom podawano parenteralnie substancje zawierające ligandy receptorów TLR3, 7 i 9 [44]. Były to odpowiednio pI: C RNA – ligand TLR3, imiquimod – ligand TLR7 i CpG DNA – ligand TLR9. Wykazano, że tylko w przypadku zastosowania liganda TLR9 u myszy MRL<sup>lpr/lpr</sup> rozwinęło się zapalenie nerek, którego nie obserwowano u MRL. W moczu myszy MRL<sup>lpr/lpr</sup> obecne było białko, a w obrazie histopatologicznym stwierdzono rozlane, proliferacyjne zapalenie kłębuszków nerkowych z odkładaniem złogów IgG i składnika C3 dopełniacza. Powyższe objawy ustępowały po podaniu preparatów zawierających sekwencje DNA, swoiście blokujące receptor TLR9. W grupie myszy z zapaleniem nerek stwierdzono ponadto zwiększone wytwarzanie IL-12, IFN- $\alpha$  przez PDC (plasmacytoid dendritic cell), wzmożoną proliferację limfocytów B i wzrost miana przeciwciał przeciw dwuniciowemu DNA (dsDNA). Wprawdzie pI: RNA oraz imiquimod zwiększały odpowiednio stężenia IL-12 i IL-6, jednak w przeciwieństwie do CpG DNA nie powodowały wzrostu stężenia IFN- $\alpha$  i nie indukowały powstawania złogów IgG<sub>1</sub> i IgG<sub>2a</sub> w kłębuszkach nerkowych. Uzyskane wyniki potwierdzają rolę TLR9 w rozwoju SLE, zwłaszcza z zajęciem nerek (lupus nephritis) [44].

Znaczenie receptora TLR9 w patogenezie SLE potwierdzają również badania na mysim modelu MRL/Mp, z genetycznie uwarunkowaną mutacją Fas<sup>lpr/lpr</sup> predysponującą do rozwoju tej choroby. Z linii tych myszy wyprowadzono szczep, który charakteryzował się brakiem receptora TLR9 lub TLR3 [7]. U zwierząt Fas<sup>lpr/lpr</sup>, pozbawionych TLR9 zaobserwowano zahamowanie wytwarzania przeciwciał skierowanych przeciw chromatynie i dsDNA, nie stwierdzono natomiast tego w przypadku tworzenia autoprzeciwciał przeciw rybonukleoproteinie (antygen Sm). Jest to zgodne ze swoistością ligandów wiązanych przez TLR9. Jednak mimo braku tego receptora u myszy dochodziło do pogłębiania się objawów choroby, co związane było z obecnością mutacji genu Fas i predyspozycją zwierząt do rozwoju SLE.

Wydaje się, że receptor TLR3 odgrywa mniej istotną rolę w rozwoju tocznia rumieniowatego układowego w tym układzie doświadczalnym. U zwierząt, u których nie stwierdzono obecności genu TLR3, nie obserwowano hamowania wytwarzania autoprzeciwciał skierowanych wobec złożo-

nych kompleksów DNA i białek (chromatyna) oraz RNA i białek (antygen Sm). Jednak obecność mutacji Fas powodowała, że u myszy tych rozwijały się stopniowo kliniczne objawy SLE [7].

Receptor TLR3 może odgrywać rolę w indukcji stanów autoimmunizacyjnych w odpowiedzi na infekcję wirusową. Wykazano, że ulega ekspresji w komórkach mezangium kłębuszków nerkowych oraz w komórkach dendrytycznych [42].

Podawanie syntetycznych fragmentów RNA np. pI: C RNA zwierzętom predysponowanym do rozwoju SLE, nasila objawy kłębuszkowego zapalenia nerek, jednak nie wpływa na wielkość miana przeciwciał anty-dsDNA. Powyższa obserwacja wskazuje na różnice mechanizmów stymulujących odpowiedź autoimmunizacyjną z udziałem RNA. W przeciwieństwie do predyspozycji rozwoju SLE w wyniku aktywacji receptorów TLR9, w której uczestniczy DNA, w szlaku zależnym od RNA, nie dochodzi do aktywacji komórek B gospodarza. Za rozwój zmian typu *lupus nephritis* w obrębie komórek *mezangium* bezpośrednio odpowiadają cytokiny i chemokiny uwalniane w miejscu toczącego się procesu chorobowego [42].

Wyniki badań doświadczalnych wskazują, że w patogenezie SLE istotne znaczenie odgrywa rodzaj ligandów rozpoznawanych przez TLR9. Typowymi aktywatorami są odcinki dwuniciowego DNA, zawierające nukleotydy cytydylowy i guanylowy "CpG" w postaci niemetylowanej. Stwierdzono, że u gryzoni najsilniej stymulujący wpływ wywiera sekwencja GACCTT (oligonukleotyd: guanylowo-adenylowo-cytydylowo-cytydylowo-tymidylowo-tymidylowy) natomiast u małp naczelnych GTCGTT (oligonukleotyd: guanylowo-tymidylowo-cytydylowo-guanylowo-tymidylowo-tymidylowy). Dalsze badania potwierdziły silne działanie pobudzające bakteryjnych sekwencji CpG-DNA, które można odtworzyć w warunkach *in vitro* i *in vivo* za pośrednictwem syntetycznych fragmentów DNA [2,4,10,25,55]. Istnieje kilka typów takich sekwencji do których zaliczamy:

**Typ A(D)** zawiera części skrajne wzbogacone w G (nukleotyd guanylowy) i centralną część zawierającą palindromową sekwencję CpG (dinukleotyd cytydylowo-guanylowy). Tworzą one łatwo struktury dwurzędowe lub większe agregaty wskutek oddziaływania fragmentów palindromowych.

**Typ B(K)** zawiera liniową, niepalindromową sekwencję CpG, zbudowany jest na ogół z nukleazoopornego szkieletu fosfotioestrowego.

Powyższe oba typy są bardzo dobrymi stymulatorami ludzkich i mysich komórek B.

**Typ C** zawiera w końcu 5' sekwencję TCG (trinukleotyd tymidylowo-cytydylowo-guanylowy) i palindrom CpG, który formuje struktury wyższego rzędu.

Niezmodyfikowany DNA ssaków jest słabym stymulatorem receptorów TLR. Wynika to z niewielkiej liczby motywów CpG DNA oraz z tego, że większość z nich u ssaków jest metylowana. Sprawia to, że nie są one specyficznie związane z TLR. Ponadto właściwą stymulację receptora TLR za pośrednictwem niezmodyfikowanego DNA gospodarza utrudnia obecność w DNA genomu, sekwencji hamujących interakcje z receptorem TLR, jak np. telomerowy DNA wzbogacony w pary AT (TTAGGGn) (powtórzenia oligonukleotydu: tymidylowo-tymidylowo-adenylowo-guanylowo-guanylowo-guanylowego). Istnieje jednak pro-

blem wydajnego wychwytu wysokocząsteczkowych kompleksów chromatyny i IgG gospodarza przez odpowiednie receptory. Kompleksy te mogą być wychwytywane przez receptory Fc gamma komórek dendrytycznych i limfocytów B. Jednak dla pełnej aktywacji obu typów komórek jest konieczny udział TLR9. Wykazano, że stymulacja TLR9 przez kompleksy chromatyna-IgG, powoduje zmiany składu cytokin uwalnianych przez DC (dendritic cell) w stosunku do odpowiedzi na standardowe, opisane wcześniej ligandy TLR9. W wyniku aktywacji kompleksami chromatyna-IgG nie obserwowano wzrostu wydzielania IL-12, stwierdzano natomiast obecność czynnika BAFF (B cell activating factor), który wydłuża przeżywanie komórek B [6,23].

Występowanie u chorych na SLE kwasu DNA zawierającego nukleotydy C i G oraz fragmentów CpG był podstawą do zaprojektowania i zsyntetyzowania kilku sekwencji DNA. [36]. Badania prowadzono na hodowanych *in vitro* komórkach śródbłonna pępowiny. W eksperymencie wybrano taki właśnie substrat, ponieważ zapalenie naczyń obserwowane jest we wczesnej fazie rozwoju SLE. W badaniach zastosowano następujące syntetyczne sekwencje DNA, zawierające wiązania fosfotioestrowe: CpG-ODN; 5'-TTTTCAATTCCGAAGATGAAT-3' oraz kontrolną sekwencję GpC DNA; 5'-TTTTCAATTGCAAGATGAAT-3'. Po transfekcji sekwencji CpG DNA do komórek śródbłonna naczyń, metodą cytometrii przepływową wykazano zwiększoną ekspresję białka adhezyjnego ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1). Ponadto obserwowano wzrost ekspresji mRNA wielu cytokin o działaniu prozapalnym: IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor alfa), IFN- $\alpha$  oraz ICAM-1 ocenianego metodą RT-PCR (reverse transcriptase – polymerase chain reaction). Sekwencja kontrolna GpC DNA nie wpływała tak na śródbłonek naczyń [36].

Na istotne znaczenie receptorów TLR w rozwoju chorób autoimmunizacyjnych w tym także SLE, wskazują wyniki badań dotyczące udziału interferonów typu I w rozwoju odpowiedzi autoimmunologicznej [8,24,31,50]. Stwierdzono w nich, że ekspresja niektórych genów interferonu klasy I aktywuje receptory TLR. Ponadto w badaniach eksperymentalnych na zwierzęcym modelu dla SLE wykazano, że interferony typu I powodują zmianę izotypu przeciwciał (IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> i IgG<sub>1</sub> u myszy) odpowiadających za aktywację dopełniacza. Obserwacja ta wskazuje na udział tych izotypów w procesie aktywacji układu dopełniacza w zwierzęcych modelach rozwoju SLE. U chorych na SLE zwłaszcza w aktywnej fazie choroby stwierdza się obniżony poziom składowych komplementu, gdyż są one wykorzystywane do tworzenia kompleksów immunologicznych [2,8,24].

Wyniki badań eksperymentalnych wskazują, że w wyniku stymulacji receptorów TLR7 i 9 obecnych na DC, dochodzi do wzrostu wytwarzania IFN- $\alpha$  przez te komórki oraz do zwiększenia stężenia tej cytokiny w surowicy krwi [25,26,35].

## 5. MODYFIKACJA AKTYWNOŚCI RECEPTORÓW TLR

Receptory TLR mogą być hamowane nie tylko przez określone sekwencje DNA, ale także przez specyficzne leki [10,12,16,28,57].

W doświadczeniach prowadzonych na mysich liniach komórkowych stwierdzono, że leki stosowane w leczeniu ma-

larii, takie jak quinakryna i chloroquina hamują indukcję odpowiedzi immunologicznej przez fragmenty CpG DNA. Zawierają one łańcuch cukrowo-fosforanowy DNA, połączony niewystępującymi naturalnie wiązaniami tioestrowymi, które go stabilizują *in vivo* [28]. Mechanizm działania tych związków jednak nie jest znany. Wykluczono ich wpływ na zakwaszenie endosomów oraz na bezpośrednie działanie typu interkalacji (wbudowanie do cząsteczki DNA).

Leki antymalaryczne są od wielu lat wykorzystywane w terapii RZS i SLE jako preparaty indukujące i podtrzymujące remisje kliniczne [28].

Inną metodą, związaną z modyfikowaniem aktywności receptorów TLR, która może być wykorzystana w leczeniu SLE, jest stosowanie odpowiednich sekwencji DNA, które wiążąc się z TLR hamują ich aktywność. Takie syntetyczne oligonukleotydy, jak np. 5'-TCCTGGAGGGGAAGT3'; 5'-TCCTGGCGGGGAAGT3'; 5'-TCCTGGATGGGAA GT3'; 5'-CCTGGATGGGAAGT3' są rozpatrywane jako potencjalne leki u chorych na SLE [17,25,26].

Badania eksperymentalne na zwierzęcym modelu rozwoju SLE, myszach nowozelandzkich białych i czarnych (NZW-NZB), wykazały korzystny, hamujący wpływ syntetycznych sekwencji TTAGGG na rozwój kłębuszkowego zapalenia nerek. Preparaty te przyczyniały się istotnie do przedłużenia życia zwierząt. Poprawa stanu klinicznego była związana ze zmniejszeniem wytwarzania przeciwciał typu dsDNA oraz zmniejszonym wytwarzaniem IFN- $\alpha$  i IL-12. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość terapeutycznego wykorzystania inhibitorów TLR w leczeniu SLE [12].

W porównawczych badaniach molekularnych nad strukturą sekwencji DNA o właściwościach hamujących receptory TLR, zidentyfikowano następujące charakterystyczne jej cechy:

1. Długość około 10-15 nukleotydów,
2. Sekwencja CCT od końca 5', następnie łącznik niezawierający nukleotydy cytydylowe oraz część 3' końcowa GGG(G) [25,26,43].

Uzyskane wyniki badań na modelu zwierzęcym wykazały, że powyższe sekwencje zawierają szkielet fosfotioestrowy, który w przeciwieństwie do szkieletu naturalnie występującego w DNA (wiązanie fosfoestrowe) nie jest wrażliwy na działanie nukleaz [43].

Badane sekwencje to: 5'-TCCTGGAGGGGAAGT-3', 5'-TCCTGGCGGGGAAGT-3', 5'-TCCTGGATGGGAA GT-3', 5'-CCTGGATGGGAAGT-3' [43].

Opisano również kolejne trzy klasy sekwencji DNA o działaniu immunomodulującym (immunoregulatory DNA sequences – IRS), takie jak:

1. IRS 661 (5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3') – specyficznie hamująca TLR7.

2. IRS 869 (5'-TCCTGGAGGGGTTGT-3') – specyficznie hamująca TLR9.
3. IRS 954 (5'-TGCTCCTGGAGGGGTTGT-3') – hamująca TLR7 i TLR9.

Wykazano, że wymienione sekwencje, które wcześniej stymulowano swoistymi, syntetycznymi ligandami w komórkach myszy i człowieka hamują aktywację receptorów TLR7 i 9. Nie stwierdzono natomiast takiego działania na receptory TLR2, 3, 4, 5 [2].

Aktywność hamująca powyższych klas IRS była badana w warunkach *in vivo* w komórkach śledziony (splenocyty) myszy BALB/c poprzez pomiar stężenia IL-6 wydzielanej do płynu pożywki za pomocą techniki ELISA.

Stwierdzono, że w splenocytach myszy sekwencja 5'-CTCCTGGAGGGGTTGT-3', będąca podstawowym składnikiem preparatu IRS 987 w stężeniu 1,4  $\mu$ M hamuje w 99% wytwarzanie IL-6 po stymulacji TLR9. Sekwencja IRS 954 o tym samym stężeniu hamuje aktywność tego receptora w 96%. Do zahamowania TLR7 w 77% stężenie IRS 954 musi być równe 5,6  $\mu$ M.

Stwierdzono również, że dootrzewnowe podanie myszom preparatu IRS 954, a następnie po 2 h tą samą drogą agonisty TLR7, hamuje jego aktywność. Miarą tego działania była ocena stężenia IL-12 w osoczu myszy [2].

Podobne działania wykazywały wymienione sekwencje IRS na komórki B człowieka w warunkach *in vitro*, co określano przez pomiar stężenia IL-6 w płynie pożywki za pomocą techniki ELISA.

Wykazano, że syntetyczne sekwencje DNA hamują aktywację receptorów TLR7 i 9 oraz zwiększone wytwarzanie IFN- $\alpha$  przez komórki PDC człowieka w odpowiedzi na stymulację wirusami DNA, takimi jak np. wirus opryszczki i inaktywowany promieniowaniem UV.

## 6. PODSUMOWANIE

Wyniki zaprezentowanych prac wskazują na istotną rolę receptorów TLR w rozwoju chorób autoimmunologicznych. Postęp w dziedzinie biologii molekularnej i inżynierii genetycznej umożliwia dokładniejsze poznanie funkcji tych receptorów zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i w warunkach patologicznych.

Poznanie funkcji receptorów TLR oraz metod modyfikacji ich aktywności jest podstawą podejmowania prób syntezy wielu związków, regulujących aktywność receptorów TLR. Mogą być one wykorzystane do projektowania nowych leków, które w przyszłości będą wykorzystane w leczeniu różnych chorób w tym także SLE.

## PIŚMIENNICTWO

[1] Ayyar S., Pistillo D., Calleja M., Brookfield A., Gittins K., Goldstone C., Simpson P.: NF- $\kappa$ B/Rel-mediated regulation of the neural fate in *Drosophila*. *PLoS One*, 2007; 2: e1178

[2] Barrat F.J., Meeker T., Gregorio J., Chan J.H., Uematsu S., Akira S., Chang B., Duramad O., Coffman R.L.: Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.*, 2005; 202: 1131-1139

- [1] Ayyar S., Pistillo D., Calleja M., Brookfield A., Gittins K., Goldstone C., Simpson P.: NF- $\kappa$ B/Rel-mediated regulation of the neural fate in *Drosophila*. *PLoS One*, 2007; 2: e1178
- [2] Barrat F.J., Meeker T., Gregorio J., Chan J.H., Uematsu S., Akira S., Chang B., Duramad O., Coffman R.L.: Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.*, 2005; 202: 1131–1139
- [3] Bell J.K., Mullen G.E., Leifer C.A., Mazzoni A., Davies D.R., Segal D.M.: Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol.*, 2003; 24: 528–533
- [4] Berghöfer B., Frommer T., Haley G., Fink L., Bein G., Hackstein H.: TLR7 ligands induce higher IFN- $\alpha$  production in females. *J. Immunol.*, 2006; 177: 2088–2096
- [5] Bin L.H., Xu L.G., Shu H.B.: TIRP, a Novel Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein involved in TIR signaling. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 24526–24532
- [6] Boule M.W., Broughton C., Mackay F., Akira S., Marshak-Rothstein A., Rifkin I.R.: Toll-like receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes. *J. Exp. Med.*, 2004; 199: 1631–1640
- [7] Christensen S.R., Kashgarian M., Alexopoulou L., Flavell R.A., Akira S., Shlomchik M.J.: Toll-like receptor 9 controls anti-DNA autoantibody production in murine lupus. *J. Exp. Med.*, 2005; 202: 321–331
- [8] Colonna M.: Toll-like receptors and IFN- $\alpha$ : partners in autoimmunity. *J. Clin. Invest.*, 2006; 116: 2319–2322
- [9] Cusson-Hermance N., Khurana S., Lee T.H., Fitzgerald K.A., Kelliher M.A.: Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF- $\kappa$ B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 36560–36566
- [10] Dalpke A.H., Lehner M.D., Hartung T., Heeg K.: Differential effects of CpG-DNA in Toll-like receptor-2/-4/-9 tolerance and cross-tolerance. *Immunology*, 2005; 116: 203–212
- [11] Deng C., Lu Q., Zhang Z., Rao T., Attwood J., Yung R., Richardson B.: Hydralazine may induce autoimmunity by inhibiting extracellular signal-regulated kinase pathway signaling. *Arthritis Rheum.*, 2003; 48: 746–756
- [12] Dong L., Ito S., Ishii K.J., Klinman D.M.: Suppressive oligodeoxynucleotides delay the onset of glomerulonephritis and prolong survival in lupus-prone NZB x NZW mice. *Arthritis Rheum.*, 2005; 52: 651–658
- [13] Dong W., Liu Y., Peng J., Chen L., Zou T., Xiao H., Liu Z., Li W., Bu Y., Qi Y.: The IRAK-1-BCL10-MALT1-TRAF6-TAK1 cascade mediates signaling to NF- $\kappa$ B from Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 26029–26040
- [14] Farhat K., Riekenberg S., Heine H., Debarry J., Lang R., Mages J., Bwitt-Beckmann U., Röschmann K., Jung G., Wiesmüller K.H., Ulmer A.J.: Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. *J. Leukoc. Biol.*, 2008; 83: 692–701
- [15] Frostegard J., Svenungsson E., Wu R., Gunnarsson I., Lundberg I.E., Klareskog L., Hörkö S., Witztum J.L.: Lipid peroxidation is enhanced in patients with systemic lupus erythematosus and is associated with arterial and renal disease manifestations. *Arthritis Rheum.*, 2005; 52: 192–200
- [16] Gorden K.K., Qiu X., Battiste J.J., Wightman P.P., Vasilakos J.P., Alkan S.S.: Oligodeoxynucleotides differentially modulate activation of TLR7 and TLR8 by imidazoquinolines. *J. Immunol.*, 2006; 177: 8164–8170
- [17] Hoshi N., Watanabe H., Kobayashi H., Sekine H., Hoshi N., Sugino T., Suzuki T., Sato Y., Ohira H.: Inhibitory oligodeoxynucleotide improves glomerulonephritis and prolongs survival in MRL-lpr/lpr mice. *Fukushima J. Med. Sci.*, 2007; 53: 70–84
- [18] Jiang Z., Johnson H.J., Nie H., Qin J., Bird T.A., Li X.: Pellino 1 is required for interleukin-1 (IL-1)-mediated signaling through its interaction with the IL-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4)-IRAK-tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) complex. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 10952–10956
- [19] Kawai T., Akira S.: Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Res. Ther.*, 2005; 7: 12–19
- [20] Keith F.J., Gay N.J.: The *Drosophila* membrane receptor Toll can function to promote cellular adhesion. *EMBO J.*, 1990; 9: 4299–4306
- [21] Kobe B., Kajava A.V.: The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2001; 11: 725–732
- [22] Lahita R.G.: The role of sex hormones in systemic lupus erythematosus. *Curr. Opin. Rheumatol.* 1999; 11: 352–356
- [23] Leadbetter E.A., Rifkin I.R., Hohlbaum A.M., Beaudette B.C., Shlomchik M.J., Marshak-Rothstein A.: Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature*, 2002; 416: 603–607
- [24] Le Bon A., Thompson C., Kamphuis E., Durand V., Rossmann C., Kalinke U., Tough D.F.: Enhancement of antibody responses through direct stimulation of B and T cells by type I IFN. *J. Immunol.*, 2006; 176: 2074–2078
- [25] Lenert P.: Inhibitory oligodeoxynucleotides – therapeutic promise for systemic autoimmune diseases? *Clin. Exp. Immunol.*, 2005; 140: 1–10
- [26] Lenert P.S.: Targeting Toll-like receptor signaling in plasmacytoid dendritic cells and autoreactive B cells as a therapy for lupus. *Arthritis Res. Ther.*, 2006; 8: 203
- [27] Li S., Strelow A., Fontana E.J., Wesche H.: IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 5567–5572
- [28] Macfarlane D.E., Manzel L.: Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J. Immunol.*, 1998; 160: 1122–1131
- [29] Majewska M., Szczepanik M.: Rola receptorów Toll podobnych (TLR) w odporności wrodzonej i odczynu nadwrażliwości w regulacji odpowiedzi immunologicznej. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2006; 60: 52–63
- [30] Manson J.J., Isenberg D.A.: The pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Neth. J. Med.*, 2003; 61: 343–346
- [31] Mathian A., Weinberg A., Gallegos M., Banchereau J., Koutouzov S.: IFN- $\alpha$  induces early lethal lupus in preautoimmune (New Zealand Black x New Zealand White) F1 but not in BALB/c mice. *J. Immunol.*, 2005; 174: 2499–2506
- [32] Matsumoto M., Funami K., Tanabe M., Oshiumi H., Shingai M., Seto Y., Yamamoto A., Seya T.: Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J. Immunol.*, 2003; 171: 3154–3162
- [33] Matsushima N., Tanaka T., Enkhbayar P., Mikami T., Taga M., Yamada K., Kuroki Y.: Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics*, 2007; 8: 124
- [34] McAlindon T.E., Gulin J., Chen T., Klug T., Lahita R., Nuite M.: Indole-3-carbinol in women with SLE: effect on estrogen metabolism and disease activity. *Lupus*, 2001; 10: 779–783
- [35] Means T.K., Latz E., Hayashi F., Murali M.R., Golenbock D.T., Luster A.D.: Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J. Clin. Invest.*, 2005; 115: 407–417
- [36] Miyata M., Ito O., Kobayashi H., Sasajima T., Ohira H., Suzuki S., Kasukawa R.: CpG-DNA derived from sera in systemic lupus erythematosus enhances ICAM-1 expression on endothelial cells. *Ann. Rheum. Dis.*, 2001; 60: 685–689
- [37] Newton K., Sun X., Dixit V.M.: Kinase RIP3 is dispensable for normal NF- $\kappa$ Bs, signaling by the B-cell and T-cell receptors, tumor necrosis factor receptor 1, and Toll-like receptors 2 and 4. *Mol. Cell. Biol.*, 2004; 24: 1464–1469
- [38] Nishiyama T., Kajita E., Miwa S., Defranco A.L.: TLR3 and TLR7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 37107–37117
- [39] Oda K., Kitano H.: A comprehensive map of the toll-like receptor signaling network. *Molecular Systems Biology*, 2006; 2: 15
- [40] Oshiumi H., Sasai M., Shida K., Fujita T., Matsumoto M., Seya T.: TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to Toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon- $\beta$ . *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 49751–49762
- [41] Papadimitrakaki E.D., Choulaki C., Koutala E., Bertsis G., Tsatsanis C., Gergianaki I., Raptopoulou A., Kritikos H.D., Mamalaki C., Sidropoulos P., Boumpas D.T.: Expansion of toll-like receptor 9-expressing B cells in active systemic lupus erythematosus: implications for the induction and maintenance of the autoimmune process. *Arthritis Rheum.*, 2006; 54: 3601–3611
- [42] Patole P.S., Gröne H.J., Segerer S., Ciubar R., Belemzova E., Henger A., Kretzler M., Schlöndorff D., Anders H.J.: Viral double-stranded RNA aggravates lupus nephritis through Toll-like receptor 3 on glomerular mesangial cells and antigen-presenting cells. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2005; 16: 1326–1338
- [43] Patole P.S., Zecher D., Pawar R.D., Gröne H.J., Schlöndorff D., Anders H.J.: G-rich DNA suppresses systemic lupus. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2005; 16: 3273–3280
- [44] Pawar R.D., Patole P.S., Ellwart A., Lech M., Segerer S., Schlöndorff D., Anders H.J.: Ligands to nucleic acid-specific Toll-like receptors and the onset of lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2006; 17: 3365–3373

- [45] Qureshi S.T., Lariviere L., Leveque G., Clermont S., Moore K.J., Gros P., Malo D.: Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J. Exp. Med.*, 1999; 189: 615–625
- [46] Rock F.L., Hardiman G., Timans J.C., Kastelein R.A., Bazan J.F.: A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 588–593
- [47] Roelofs M.F., Boelens W.C., Joosten L.A., Abdollahi-Roodsaz S., Geurts J., Wunderink L.U., Schreurs B.W., van den Berg W.B., Radstake T.R.: Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J. Immunol.*, 2006; 176: 7021–7027
- [48] Sacre S.M., Andreakos E., Kiriakidis S., Amjadi P., Lundberg A., Giddins G., Feldmann M., Brennan F., Foxwell B.M.: The Toll-like receptor adaptor proteins MyD88 and Mal/TIRAP contribute to the inflammatory and destructive processes in a human model of rheumatoid arthritis. *Am. J. Pathol.*, 2007; 170: 518–525
- [49] Sánchez-Guerrero J., Liang M.H., Karlson E.W., Hunter D.J., Colditz G.A.: Postmenopausal estrogen therapy and the risk for developing systemic lupus erythematosus. *Ann. Intern. Med.*, 1995; 122: 430–433
- [50] Sato S., Sugiyama M., Yamamoto M., Watanabe Y., Kawai T., Takeda K., Akira S.: Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$  (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF- $\kappa$ B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol.*, 2003; 171: 4304–4310
- [51] Scheibner K.A., Lutz M.A., Boodoo S., Fenton M.J., Powell J.D., Horton M.R.: Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J. Immunol.*, 2006; 177: 1272–1281
- [52] Tauszig S., Jouanguy E., Hoffmann J.A., Imler J.L.: Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 10520–10525
- [53] Tohno M., Shimazu T., Aso H., Kawai Y., Saito T., Kitazawa H.: Molecular cloning and functional characterization of porcine MyD88 essential for TLR signaling. *Cell. Mol. Immunol.*, 2007; 4: 369–376
- [54] Triantafilou M., Gamper F.G., Haston R.M., Mouratis M.A., Morath S., Hartung T., Triantafilou K.: Membrane sorting of Toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 31002–31011
- [55] Vollmer J., Weeratna R.D., Jurk M., Samulowicz U., McCluskie M.J., Payette P., Davis H.L., Schetter C., Krieg A.M.: Oligodeoxynucleotides lacking CpG dinucleotides mediate Toll-like receptor 9 dependent T helper type 2 biased immune stimulation. *Immunology*, 2004; 113: 212–223
- [56] Wańkiewicz-Kalińska A.: Zjawiska autoimmunizacyjne. W: *Immunologia*, red.: J. Gołab, M. Jakóbsiak, W. Lasek, T. Stokłosa. PWN, Warszawa 2007, 376–397
- [57] Youn H.S., Lee J.Y., Fitzgerald K.A., Young H.A., Akira S., Hwang D.H.: Specific inhibition of MyD88-independent signaling pathways of TLR3 and TLR4 by resveratrol: molecular targets are TBK1 and RIP1 in TRIF complex. *J. Immunol.*, 2005; 175: 3339–3346
- [58] Yung R.L., Johnson K.J., Richardson B.C.: New concepts in the pathogenesis of drug-induced lupus. *Lab. Invest.*, 1995; 73: 746–759

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.