

Received: 2013.04.17
Accepted: 2013.09.22
Published: 2013.10.30

Wieloletni proces dojrzewania receptora Toll-podobnego 9*

Multilevel maturation of Toll-like receptor 9

Joanna Zyzak¹, Janusz Matuszyk¹, Jakub Siednienko^{1,2}

¹ Laboratorium Białek Sygnalowych, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

² Wrocławskie Centrum Badań EIT+

Streszczenie

Receptory Toll-podobne są jednymi z ważniejszych elementów nieswoistej odpowiedzi odpornościowej. Wiążąc struktury stanowiące wzorce molekularne związane z patogenami, aktywują szlaki sygnałowe prowadzące do indukcji ekspresji, m.in. cytokin prozapalnych czy interferonów. Wśród TLR wyróżnić można dwie grupy receptorów: umiejscowione w błonie komórkowej lub w endosomach. Receptory TLR występujące w endosomach są odpowiedzialne za rozpoznawanie kwasów nukleinowych. Należy do nich m.in. TLR9 wiążący fragmenty DNA bogate w niemetylowane dinukleotydy cytozyno-guaninowe (CpG). Prawidłowe rozpoznanie liganda przez TLR9 zależy od zakotwiczenia receptora w odpowiednich strukturach subkomórkowych i powstania jego dojrzałej postaci. Transport TLR9 do endosomu jest determinowany przez transmembranowe białko opiekuńcze UNC93B1 oraz białka adaptorowe klatryny: AP-2 i AP-3. Receptor obecny w endosomie podlega obróbce proteolitycznej, w którą zaangażowane są endopeptydaza AEP i katepsyny. Tylko dojrzała postać TLR9, umiejscowiona w endosomie, jest zdolna do przekazania sygnału od CpG. Związanie liganda umożliwia rekrutację białka adaptorowego MyD88 i transdukcję sygnału na jednej z dwóch ścieżek: prowadzącej do aktywacji czynników transkrypcyjnych IRF7 lub NF-κB. Syntetyczne ligandy receptora TLR9 występują w dwóch podstawowych formach, uwarunkowanych sekwencją nukleotydową, w formie multimerycznej – CpG-A oraz monomerycznej – CpG-B. Związanie CpG-A przez receptor prowadzi do fosforylacji IRF7 i indukcji ekspresji interferonów typu I. CpG-B natomiast uruchamia zależne od NF-κB wytwarzanie cytokin prozapalnych, takich jak TNF-α czy IL-6.

Słowa kluczowe:

Receptory Toll-podobne • TLR9 • UNC93B1 • AEP, AP-2 • AP-3 • CpG • katepsyny • dojrzewanie TLR • transport TLR • endosomalne TLR • Interferon

Summary

Toll-like receptors (TLRs) are essential elements of the innate immune response. TLRs induce expression of inflammatory cytokines or interferons after recognition of microbial or viral structures called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Two different groups of TLRs can be distinguished: TLRs residing in the plasma membrane or in the endosomal compartment. TLRs localized in endosomes act as sensors for nucleic acids. TLR9, which recognizes unmethylated CpG, belongs to endosomal TLRs. The proper ligand detection by TLR9 depends on its specific subcellular localization and maturation. TLR9 delivery to the endosomes is mediated by two distinct proteins, UNC93B1 and AP-2, and post-early endosome distribution is determined by AP-3. TLR9 localized in the endosome is cleaved by at least two classes of proteases, AEP and cathepsins, which generate the mature form of receptor. Functional C-terminal form of TLR9 is capable of recognition of CpG and activation of signal pathways. Ligand binding to TLR9 causes conformational changes in the structure of this receptor which facilitates recruitment of MyD88 adaptor protein and activation

*Projekt Homing Plus/2010-2/15 realizowany w ramach programu Homing Plus Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, współfinansowany przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego

Keywords:	of two distinct cytokine-inducing pathways: IRF-7- and NF- κ B-dependent. The specific structure of the synthetic ligand (CpG-A or CpG-B) determines activation of certain transcription factors. Recognition of multimeric CpG-A results in IRF-7-dependent induction of type I interferon production. Monomeric CpG-B activates NF- κ B-dependent induction of proinflammatory cytokines, in particular TNF α and IL-6. Toll-like receptors • TLR9 • UNC93B1 • AEP, AP-2 • AP-3 • CpG • cathepsins • TLR maturation • TLR transport • endosomal TLR • interferon
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1074013
Word count:	4802
Tables:	–
Figures:	3
References:	68

Adres autorki: mgr inż. Joanna Zyzak, Laboratorium Białek Sygnałowych, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda, ul Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: joanna.nowak@iitd.pan.wroc.pl

Wykaz skrótów: **AEP** – endopeptydaza cysteinowa swoista względem wiązań asparaginowych, **AP-2/AP-3** – białka adaptorowe klatryny, **COPI** – kompleks peptydowy opłaszczający pęcherzyki zaangażowane w transport do wnętrza komórki (droga endocytozy), **COPII** – kompleks peptydowy opłaszczający pęcherzyki zaangażowane w transport na zewnątrz komórki (droga sekrecyjna), **CpG** – dinukleotydy cytozyno-guaninowy, **dsRNA** – dwuniciowe RNA, **ER** – retikulum endoplazmatyczne, **HSV** – wirus opryszczki, **IRAK1** – kinaza białkowa z rodziny kinaz związanych z receptorem interleukiny 1, **IRF-7** – czynnik transkrypcyjny regulujący ekspresję interferonu, **MyD88** – białko adaptorowe dla TLR, **NF- κ B** – czynnik transkrypcyjny κ B, **PAMP** – wzorce molekularne związane z patogenami, **PRR** – receptor rozpoznający wzorce, **ssRNA** – jednociowe RNA, **TGN** – sieć *trans* aparatu Golgiego, **TLR** – receptor Toll-podobny, **UNC93B1** – białko transportujące receptory TLR.

WSTĘP

Rozpoznanie zagrożenia jakie niesie ze sobą infekcja wirusowa lub zakażenie bakteryjne jest pierwszym i niezwykle ważnym elementem inicjującym pierwotną odpowiedź odpornościową, często warunkującym przeżycie nie tylko komórki, ale całego organizmu. Podstawową rolą pierwotnej odpowiedzi odpornościowej, poza jak najszybszą identyfikacją patogenu, jest możliwie skuteczne powstrzymanie jego dalszego rozprzestrzeniania się oraz indukcja wtórnej odpowiedzi odpornościowej, która precyzyjnie zwalczy zagrożenie, a dzięki pamięci immunologicznej będzie zapobiegać jego powtórnej inwazji.

Znaczącymi strukturami obecnymi w komórkach odpornościowych i umożliwiającymi walkę z patogenem są receptory rozpoznające wzorce (pattern recognition receptors – PRR). Dzięki konserwatywnej budowie mogą one odbierać sygnały zagrożenia związane z różnorodnymi patogenami. Struktury będące ligandami receptorów PRR zwane PAMP (wzorce molekularne związane z patogenami, pathogen associated molecular patterns) są przeważnie charakterystycznymi elementami budowy wirusów i mikroorganizmów (bakterii, drożdży czy grzybów pleśniowych) [30]. Niemal każda taka struktura rozpoznawana jest przez określony receptor należący do

PRR. Do rodziny PRR zalicza się receptory związane ze strukturami komórki, np. receptory Toll-podobne oraz receptory obecne w cytoplazmie, RLR (retinoic acid-inducible gene-I-like receptors) i NLR (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors).

Wśród PRR niezwykle istotne są receptory Toll-podobne – TLR (toll-like receptors) zidentyfikowane w 1997 roku [48]. Rodzina tych receptorów składa się z 13 członków: TLR1-13, przy czym u człowieka występuje ich 10 [32,65].

Receptory TLR występują w różnych typach komórek, np. w komórkach dendrytycznych, makrofagach, limfocytach T i B, a ich stymulacja może zainicjować bezpośrednie wytwarzanie cytokin prozapalnych lub też wywołać efekty pośrednie np. związane z różnicowaniem limfocytów pomocniczych typu Th1, aktywacją komórek NK i monocytów. Stymulacja receptorów Toll-podobnych swoistymi ligandami prowadzi do wzrostu ekspresji genów kodujących cytokiny (m.in. TNF- α , IL-1 i IL-6), a także cząsteczki kostymulujące CD40 i CD86. W odpowiedzi na infekcje wirusowe wytwarzane są interferony, które poza zdolnością do hamowania replikacji wirusów wpływają na migrację komórek dendrytycznych do węzłów chłonnych,

co jest potrzebne do zainicjowania nabytej odpowiedzi odpornościowej [2,54]. Ponadto wytwarzanie chemokin, takich jak MIP-1 (monocytes inflammatory protein 1) i IP-10 (IFN γ -inducible 10-kDa protein) wzmacnia migrację komórek T i NK [49]. Dodatkowo receptory TLR w sposób dwójaki przyczyniają się do wydzielania przez limfocyty B przeciwciał swoistych przeciwko peptydowym antygenom T-zależnym pochodzącym od patogenów. Receptory TLR indukują dojrzewanie komórek dendrytycznych oraz aktywację limfocytów Th, niezbędnych do dalszej aktywacji limfocytów B, głównie dzięki oddziaływaniom cząsteczek kostymulujących CD40-CD40L i sekrecji cytokin [31,54]. Receptory TLR występujące w komórkach B, biorą bezpośredni udział w aktywacji tych limfocytów i sekrecji przez nie przeciwciał, będących precyzyjnym narzędziem do walki z patogenem.

Receptory Toll-podobne są zatem niezwykle ważnymi strukturami, które łączą odpowiedź pierwotną z odpowiedzią nabytą.

Ważne dla prawidłowej funkcji receptorów TLR jest odpowiednie umiejscowienie wewnątrzkomórkowe, związane z procesem rozpoznawania liganda. Ze względu na swoiste zakotwiczenie w kompartmentach komórkowych, receptory Toll-podobne można podzielić na dwie grupy: występujące w błonie komórkowej oraz w endosomach.

Można sobie wyobrazić, że receptory rozpoznające sygnały płynące ze środowiska zewnątrzkomórkowego, które związane są z elementami eksponowanymi na powierzchni mikroorganizmu, będą obecne na powierzchni błony komórkowej. Natomiast receptory wiążące wewnątrzkomórkowe struktury mikroorganizmów, których dostępność jest zależna od degradacji patogenu będą związane z kompartmentem endosomalnym. I rzeczywiście tak jest: otóż TLR umiejscowione w błonie komórkowej odpowiadają na komponenty obecne na powierzchni mikroorganizmów, podczas gdy endosomalne TLR rozpoznają kwasy nukleinowe pochodzące od patogenów: dwuniciowe RNA (dsRNA - double stranded RNA) rozpoznawane jest przez TLR3, jednoniciowe RNA (ssRNA - single stranded RNA) przez TLR7 i TLR8, natomiast ligandem dla TLR9 jest dwuniciowe DNA (dsDNA - double stranded DNA), a konkretnie motywy CpG [1,29,44]. Odpowiednie umiejscowienie umożliwia zetknięcie się receptora ze swoistym ligandem, dlatego też transport TLR do określonych kompartmentów decyduje o ich prawidłowym funkcjonowaniu i jest warunkiem rozpoznania zagrożenia, jakie dla komórki stanowią patogeny [5].

Receptor Toll-podobny 9 jest szczególnie ważny, gdyż zaangażowany jest w rozpoznawanie DNA bogatego w niemetylowane struktury CpG, obecne z różną częstością w materiale genetycznym zarówno organizmów wyższych, jak i mikroorganizmów czy wirusów [7,29,62]. Struktury te są powszechne u bakterii i wirusów, natomiast u kręgowców występują we fragmentach regulatorowych regionów promotorowych genów

i stanowią miejsca rekrutacji białek niezbędnych do zajścia transkrypcji [19]. Istotnym jest, że CpG obecne w genomie mikroorganizmów różnią się stopniem metylacji w porównaniu z CpG występującymi u organizmów wyższych, co pozwala na ustalenie czy komórka ma do czynienia z DNA patogenu, czy też z własnym materiałem genetycznym [34,47].

Mimo że TLR9 został odkryty jako receptor aktywowany bakteryjnym materiałem genetycznym, jego znaczącą rolę obserwuje się w rozpoznawaniu wirusów należących przede wszystkim do rodziny *Herpesviridae*, takich jak wirusy opryszczki (HSV-1 i HSV-2), wirus cytomegalii (CMV) lub wirus Epsteina-Barr (EBV) [20,24,43]. Udział receptora TLR9 zaobserwowano także w patogenezie chłoniaka Burkitta. Jest to nowotwór występujący najczęściej wśród ludności zamieszkującej Afrykę i rozwijający się w wyniku współdziałania dwóch patogenów, a mianowicie: zarodźca sierpowatego (*Plasmodium falciparum*) oraz wirusa EBV [68].

Rozpoznanie patogenu przez TLR9 jest procesem złożonym. Poza fagocytozę, umożliwiającą uwolnienie materiału genetycznego patogenu, konieczne jest odpowiednie umiejscowienie receptora, powstanie jego dojrzalej postaci oraz uczestnictwo białek transportujących receptor do konkretnych przedziałów komórkowych. W pracy skupiono się na roli, jaką w związaniu liganda przez TLR9 pełni jego transport do endosomu oraz zależne od proteaz dojrzewanie.

CHARAKTERYSTYKA RECEPTORA TOLL-PODOBNEGO 9

Warianty TLR9 wynikające z alternatywnego składowania mRNA

Gen ludzkiego TLR9 (*hTLR9*) składa się z dwóch eksonów i znajduje się na chromosomie 3 w pozycji 3p21.3. Istnieje pięć form alternatywnego składowania mRNA tego receptora: TLR9A-TLR9E. Izoformy A i B ludzkiego TLR9 zidentyfikowano w 2000 r. podczas klonowania genu TLR9 z komórek ludzkiej linii monocytarnej THP-1 [21]. Niemal jednocześnie inny zespół badawczy wyróżnił formy TLR9, TLR9.0, TLR9.1 oraz TLR9.2 obecne w łożysku, a ich nazwy zostały następnie zmienione na odpowiednio TLR9-A, TLR9-C, TLR9D i TLR9-E [16].

Produkt translacji wariantu A jest białkiem konwencjonalnym, kodowanym przez oba eksony i zbudowanym z 1032 reszt aminokwasowych. Krótsza o 57 aminokwasów, niefunkcjonalna forma B pozbawiona jest odcinka N-końcowego, w obrębie którego potencjalnie mieści się peptyd sygnałowy. Niefunkcjonalny wariant E jest również formą skróconą i ma 15 aminokwasów mniej niż forma podstawowa, natomiast warianty C i D są wydłużone o odpowiednio 23 i 24 reszty aminokwasowe. Region zbudowany z 975 aminokwasów jest wspólny dla wszystkich 5 wariantów [46,56]. Na ryc.1 przedstawiono porównanie sekwencji aminokwasowych odcinków N-końcowych pięciu izoform receptora TLR9 oraz ich numer w bazie UniProt.

Izoforma	Nr UniProt	Sekwencja
TLR9-A	Q9NR96-1	-----MGFCRSALHPLSLLVQAIMLAMTLALGTLPAFLP 34
TLR9-B	Q9NR96-2	-----
TLR9-C	Q9NR96-3	MPMKWSGWRWSWG---PATHTALPPPQGFRCRSALHPLSLLVQAIMLAMTLALGTLPAFLP 57
TLR9-D	Q9NR96-4	--MLYSSCKSRLLDSVEQDFHLEIAKKGFCRSALHPLSLLVQAIMLAMTLALGTLPAFLP 58
TLR9-E	Q9NR96-5	-----MAIMLAMTLALGTLPAFLP 19
TLR9-A	Q9NR96-1	CELQPHGLVNCNWLFLKSVPHFSMAAPRGNVTSL 68
TLR9-B	Q9NR96-2	-----MAAPRGNVTSL 11
TLR9-C	Q9NR96-3	CELQPHGLVNCNWLFLKSVPHFSMAAPRGNVTSL 91
TLR9-D	Q9NR96-4	CELQPHGLVNCNWLFLKSVPHFSMAAPRGNVTSL 92
TLR9-E	Q9NR96-5	CELQPHGLVNCNWLFLKSVPHFSMAAPRGNVTSL 53

Ryc. 1. Porównanie sekwencji aminokwasowej izoform TLR9 (wg [56])

W ludzkim układzie odpornościowym ekspresję *TLR9* wykazują: śledziona, węzły chłonne, szpik kostny, a także komórki krwi [16]. Zaobserwowano, że poziom ekspresji poszczególnych izoform różni się między komórkami układu odpornościowego. Mimo że wszystkie funkcjonalne izoformy (TLR9-A, TLR9-C i TLR9-D) są obecne w prawidłowych limfocytach B i T oraz w monocytach, forma A ulega najsilniejszej ekspresji w komórkach B, gdzie jej poziom jest 100-krotnie wyższy niż w monocytach lub limfocytach T, u których z kolei przeważa forma C. Na preferencje w ekspresji konkretnych izoform ma również wpływ etap dojrzewania i różnicowania, na którym znajduje się komórka. Wykazano, że naiwne limfocyty B charakteryzują się niskim poziomem TLR9-A/ wysokim TLR9-C, który w czasie dojrzewania komórki zmienia się na wysoki TLR9-A/niski TLR9-C [46].

Alternatywne składanie mRNA warunkuje różnice w budowie domeny *N*-końcowej między poszczególnymi izoformami receptora TLR9 i może wpływać na zmianę lub utratę funkcji receptora. Na podstawie modelowania komputerowego ustalono, że forma D może być zakotwiczona w retikulum endoplazmatycznym w odwrotnej orientacji w porównaniu do wariantu A, natomiast forma B, pozbawiona peptydu sygnałowego jest umiejscowiona w mitochondrium i prawdopodobnie może wiązać mitochondrialne DNA. Nieprawidłowe kotwiczenie wariantów receptora w strukturach

komórkowych w porównaniu do formy podstawowej TLR9-A, skutkuje zaburzeniem zdolności wiązania liganda [46].

Domenowa budowa TLR9

TLR9 jest białkiem błonowym I typu, które podobnie jak inne receptory Toll-podobne, ma trzy główne domeny: zewnątrzkomórkową, skierowaną do wnętrza endosomu domenę ECD (extracellular domain), jednokrotnie przebijającą błonę endosomu domenę TMD (transmembrane domain) oraz cytoplazmatyczną domenę ICD (intracellular domain) [62].

N-końcowa domena ECD składa się z 25 powtórzeń bogatych w leucynę (leucine-rich repeats – LRR) i jest silnie glikozylowana [11]. Każde LRR tworzy pętlę, w której konserwatywne, hydrofobowe reszty aminokwasowe skierowane są do jej wnętrza, następnie kilka takich pętli układa się w kształt podkowy. Regiony LRR otoczone są na *N*- i *C*-końcu strukturami osłaniającymi bogatymi w cysteinę. Dziesięć pierwszych reszt aminokwasowych każdego LRR przyjmuje konformację β -kardki i tworzy wewnętrzną powierzchnię „podkowy”. Pozostałe części LRR są zmienne i budują wypukłą stronę domeny [8]. Cechą charakterystyczną receptorów Toll-podobnych, zwłaszcza TLR7, TLR8 i TLR9 jest obecność nietypowych LRR, zawierających do-

datkowe reszty aminokwasowe, wystające ponad wypukłą powierzchnię „podkowy” ECD. W przypadku TLR9 insercja w obrębie LRR 2, 5 i 8 są istotne dla jego funkcjonowania, gdyż ich usunięcie hamowało wiązanie liganda CpG [55]. Rola insercji nie została do końca wyjaśniona, jednak są one najprawdopodobniej wymagane do prawidłowego przebiegu dojrzewania receptora w endosomie.

Receptor zakotwiczony jest w błonie endosomu dzięki krótkiej domenie transmembranowej TMD, która ma postać pojedynczej α -helisy [61,62]. Wyniki badań dotyczących roli domeny TMD w procesie transportu receptora TLR9 są dość kontrowersyjne. O ile Leifer i wsp. uważają, iż TMD nie bierze udziału w kierowaniu TLR9 do odpowiednich kompartmentów, o tyle inni wykazali, iż zmiany sekwencji aminokwasowej w obrębie tej domeny mogą wpływać na umiejscowienie receptora w błonie komórkowej [40,50]. Ponadto nieprawidłowa budowa domeny TMD skutkuje zaburzeniem procesu dojrzewania TLR9, co wraz z usytuowaniem receptora na powierzchni komórki umożliwia jego błędną aktywację przez własne DNA organizmu [6,50].

C-kończącą część cytoplazmatycznej domeny ICD stanowi region TIR (Toll/IL-1R homologous region) [61]. W jego obrębie znajduje się 32-aminokwasowy fragment tworzący strukturę zbudowaną z pięciu α -helis. Odcinek ten jest niezbędny do przekazania sygnału od receptora TLR9, gdyż komórki transfekowane konstruktem z delecją tego fragmentu nie były wrażliwe na stymulację ligandem [62]. Wykazano, że po aktywacji receptora następują zmiany konformacyjne w budowie domeny TIR umożliwiające aktywację kaskady sygnałowej [28,38]. TLR9 w odróżnieniu od innych receptorów Toll-podobnych funkcjonuje od początku jako dimer. Po związaniu liganda podjednostki tego receptora zacieśniają się tworząc miejsce oddziaływania z białkiem adaptorowym MyD88 [38]. Tak zbudowany receptor Toll-podobny 9 jest niedojrzały, niezdolny do przekazania sygnału. Wymaga wielu modyfikacji potranslacyjnych, które rozpoczynają się już w aparacie Golgiego, gdzie receptor podlega glikozylacji [15]. Jednak ostateczną, dojrzałą postać TLR9 przybiera dopiero w endosomie, do którego transportowany jest przez białko UNC93B1 [33].

Ligand receptora Toll-podobnego 9

Komórki ssaków charakteryzują się niewielką, w porównaniu do bakterii, częstością występowania niemetylowanych sekwencji DNA. Z tego względu takie sekwencje pochodzenia bakteryjnego czy też wirusowego mogą wywoływać odpowiedź odpornościową objawiającą się wytwarzaniem cytokin i różnicowaniem komórek układu odpornościowego. Immunostymulująca aktywność bakteryjnego DNA została zaobserwowana po raz pierwszy w 1984 r., kiedy okazało się, że frakcja DNA ze szczepionki przeciw gruźlicy – BCG (Bacille Calmette-Guérin), otrzymanej z *Mycobacterium*, indukuje wytwarzanie interferonu typu I [64]. Po kilku latach Kreig i wsp. wykazali, że efekt ten wywołała obecność niemetylowanych dinukleotydów cytozyno-guaninowych (CpG). Co ważne, właściwość ta była charakterystyczna dla genomu DNA bakterii, ale nie ssaków [34].

Niemetylowane reszty cytozyny występujące w genomach ssaków ulegają spontanicznej deaminacji tworząc reszty tyminy. Deaminacja metyloowanych cytozyn jest łatwa do wykrycia przez mechanizmy naprawcze DNA, gdyż skutkuje powstaniem uracylu, natomiast przekształcenie się niemetylowanej cytozyny w tyminę jest nieodwracalne i może zwiększać liczbę mutacji. Dlatego też częstość występowania niemetylowanych motywów CpG w komórkach ssaków jest znacznie niższa niż szacowana [36].

Genom ludzki zawiera skupiska niemetylowanych dinukleotydów CpG, zwane wyspami CpG, obecne w regionie 5' regulatorowym około 70% promotorów genów i stanowiące odcinki DNA o długości około 1 kb. Sekwencje te, ze względu na swoją strukturę, pełnią ważną rolę w regulacji transkrypcji genów [19,36]. Odpowiadają one m.in. za destabilizację nukleosomów i wiązanie białek odpowiedzialnych za powstawanie dostępnej transkrypcyjnie postaci chromatyny [19].

Mimo że motywy CpG obecne są we wszystkich genomach, w pewnych warunkach mogą inicjować odpowiedź odpornościową. Aby do tego doszło wymagana jest określona sekwencja motywów CpG oraz swoisty „wzorzec” ich metylacji. Aktywacja limfocytów B wymaga konsensusowego motywu jednoniciowego DNA, w którym niemetylowana sekwencja CpG jest otoczona przez dwie puryny na końcu 5' oraz dwie pirymidyny na końcu 3' [34].

Odróżnienie obcych sekwencji CpG od własnego materiału genetycznego komórki jest możliwe dzięki: różnym poziomom metylacji DNA komórek prokariotycznych i organizmów wyższych, występowaniu w DNA kręgowców immunosupresorowych sekwencji oskrzydlających CpG oraz odpowiedniemu umiejscowieniu receptora TLR9 rozpoznającego CpG [18].

TLR9 został zidentyfikowany jako receptor dla niemetylowanych sekwencji CpG w 2000 roku [29]. Wcześniej wykazano, że bakteryjne DNA indukuje odpowiedź odpornościową, jednak mechanizm aktywacji komórek układu odpornościowego przez DNA bogate w niemetylowane motywy CpG pozostawał niewyjaśniony [34]. Wykazanie roli TLR9 w tym procesie stało się możliwe dzięki wykorzystaniu myszy z delecją tego receptora. W wyniku stymulacji DNA z sekwencjami CpG, komórki pochodzące od myszy *TLR9^{-/-}* nie wykazywały cech odpowiedzi zapalnej, co objawiało się brakiem różnicowania komórek dendrytycznych, proliferacji komórek śledziony oraz zahamowaniem wytwarzania cytokin przez makrofagi. Ponadto myszy te były odporne na letalne dawki CpG [29].

Aby doszło do aktywacji TLR9, DNA bogate w sekwencje CpG musi zostać przetransportowane do wnętrza endosomu, gdzie umiejscowiony jest receptor. Prawdopodobnie oddzielenie TLR9 od miejsc występowania własnego materiału genetycznego i usytuowanie go w endosomie jest wytworzonym ewolucyjnie mechanizmem zapobiegającym aktywacji TLR9 przez własne DNA.

ROLA BIAŁEK UNC93B1 I AP-2 W TRANSPORCIE TLR9 DO ENDOSOMU

Do niedawna sądzono, że nieaktywny TLR9 utrzymywany jest w ER aż do stymulacji komórek ligandem – CpG. Wnioski te zostały wyciągnięte głównie na podstawie badań na komórkach transdukowanych TLR9 w systemie retro- lub lentiwirusowym. W warunkach nadekspresji TLR9, w komórkach spoczynkowych, receptor odnajdowany był jedynie w kompartmentach związanych z ER, natomiast nie występował w obrębie błony komórkowej [37,41].

Najnowsze doniesienia wskazują, że zarówno w makrofagach, jak i limfocytach B uzyskanych z transgenicznych myszy wykazujących stabilną ekspresję TLR9-GFP większość komórek spoczynkowych, stanowiąca około 70% populacji wykazywała obecność TLR9-GFP w endosomach. Po szczegółowych badaniach dotyczących dystrybucji TLR9 w obrębie poszczególnych przedziałów komórkowych okazało się, że 10% jest obecne w endosomach, a 90% w ER, natomiast po stymulacji komórek DNA z sekwencjami CpG, odsetek TLR9-GFP znajdującego się w endosomach wzrósł nieznacznie, bo jedynie do 15%. Zespół kierowany przez Ploegha i Brinkmann jako pierwszy poddał w wątpliwość, że do translokacji TLR9 z retikulum endoplazmatycznego do endosomu niezbędna jest obecność DNA bogatego w dinukleotydy CpG, dlatego też w celu wyjaśnienia roli liganda w tym procesie niezbędne są dalsze badania [3].

Niedojrzały TLR9 wiąże się w retikulum endoplazmatycznym z białkiem opiekuńczym UNC93B1, homologiem B1 białka Unc-93 występującego u *Caenorhabditis elegans* [12]. Jest to 598-aminokwasowe białko obecne w ER, 12-krotnie przebijające błonę i oddziałujące ze wszystkimi endosomalnymi receptorami TLR rozpoznającymi kwasy nukleinowe (TLR3, TLR7, TLR9, TLR 11 i TLR13) [12,39,60]. UNC93B1 jest istotne dla funkcjonowania tychże receptorów, gdyż odpowiada za ich transport do kompartmentu endosomalnego [33]. Wykazano, że mutacje w obrębie genu kodującego to białko powodują zaburzenie przekazania sygnału od TLR9, a w skrajnych przypadkach mogą prowadzić do rozwoju chorób wynikających z autoagresji.

Myszy „3d” (triple D) nazwane tak ze względu na upośledzenie odpowiedzi od trzech receptorów TLR: TLR3, TLR7 i TLR9 charakteryzowały się mutacją zmiany sensu (missense mutation) w genie kodującym białko UNC93B1. Mutacja ta prowadzi do substytucji histydyny argininą w pozycji 412 (H412R) łańcucha aminokwasowego, w dziewiątej domenie transmembranowej UNC93B1. Następstwem mutacji jest zwiększona podatność na infekcje wirusowe i zakażenia bakteryjne [60]. U ludzi mutacja w genie kodującym białko UNC93B1, prowadząca do powstania skróconej jego formy, wpływa na zaburzenie odpowiedzi odpornościowej indukowanej przez receptor TLR9, sugerując tym samym, że białko UNC93B1 jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania receptorów Toll-podobnych występujących w endosomie [14]. Wykazano, że białko UNC93B1, umożliwia transport receptora TLR9, jak i innych wewnątrzkomórkowych receptorów Toll-podobnych, do pęcherzyków endosomal-

nych poprzez fizyczne oddziaływanie z tymi receptorami. Za wiązanie białka UNC93B1 odpowiedzialna jest domena transmembranowa receptorów TLR. Chimeryczne endosomalne receptory TLR mające domeny TMD receptora TLR4, którego prawidłowa postać umiejscowiona jest w błonie komórkowej, nie były zdolne do wiązania UNC93B1. Natomiast receptor TLR4 zawierający domenę TMD pochodzącą od TLR3 lub TLR9 mógł z powodzeniem oddziaływać z białkiem UNC93B1 [12]. Indukowana swoistymi ligandami translokacja receptorów TLR3, TLR7 i TLR9 wraz z białkiem UNC93B1 do endosomów była zahamowana w komórkach BMDM pochodzących od myszy „3d” [33].

Mimo że białko UNC93B1 jest czynnikiem determinującym transport wszystkich receptorów Toll-podobnych rozpoznających kwasy nukleinowe, zauważono, że receptor TLR9 jest preferencyjnie, w porównaniu do TLR7, wiązany przez to białko [26]. Mutacja warunkująca substytucję kwasu asparaginowego alaniną w pozycji 34 (D34A) łańcucha aminokwasowego białka UNC93B1 zaburza tę przewagę powodując wzmożony transport TLR7 do endosomu, co z kolei umożliwia niepożądaną aktywację receptora. Myszy ze zmienionym białkiem UNC93B1 umierały przedwcześnie z powodu rozwinięcia niekontrolowanego stanu zapalnego. Prawdopodobnie substytucja D34A jest związana z rozwojem chorób o podłożu autoimmunologicznym, takich jak układowy toczeń rumieniowaty, reumatoidalne zapalenie stawów lub łuszczyca [25,26].

Ponadto wykazano, że nie tylko występowanie prawidłowego UNC93B1, ale również określona ilość tego białka, jest niezbędna do powstania funkcjonalnego receptora TLR9. Zauważono bowiem, iż w niektórych komórkach poziom ekspresji UNC93B1 był niewystarczający do powstania aktywnej C-końcowej postaci receptora w endosomie [1].

Mechanizm translokacji TLR9 z ER do endosomu do niedawna był przyczyną sporów. O ile pewne grupy badaczy postulowały, że TLR9 omija aparat Golgiego i jest transportowany bezpośrednio do endosomów [33,38], o tyle inne zespoły badawcze udowodniały powstawanie glikozylowanych postaci receptora [15]. Najnowsze badania Lee i wsp. wydają się w sposób pełny, aczkolwiek zaskakujący, opisywać proces dostarczania TLR9 do endosomu. Wykazano, że białko UNC93B1 po związaniu się w retikulum endoplazmatycznym z receptorem TLR9 pokonuje z nim wszystkie etapy drogi do endosomu, gdyż każda postać TLR9: niedojrzała TLR9-ER o masie 150 kDa, większa od niej glikozylowana postać prekursorowa, jak i dojrzała (80 kDa) fizycznie oddziaływały z białkiem UNC93B1 [39]. Transport TLR9 do miejsca jego aktywacji, rozpoczyna się od dostarczenia TLR9 do pęcherzyków opłaszczonych kompleksem COPII (coat protein II). Pęcherzyki te pośredniczą w przenoszeniu białek między ER a aparatem Golgiego [67]. Następnie w aparacie Golgiego zarówno TLR9, jak i białko UNC93B1 ulegają glikozylacji. Transport przez TGN (sieć *trans*, trans-Golgi network) jest uwarunkowany oddziaływaniem UNC93B1 z innymi białkami. Wykazano, że C-końcowa domena białka UNC93B1 skierowana jest do cytoplazmy i rekrutuje białko AP-2 [39]. Białko AP-2 należy do rodziny białek adaptorowych klatryny

(adaptor protein – AP), które odpowiadają za prawidłowy przebieg endocytozy i segregację ładunku pobieranego z powierzchni komórki [51]. Co ciekawe, transport TLR9 z ER do endosomu nie zachodzi w sposób bezpośredni. Receptor Toll-podobny 9 najpierw przenoszony jest do błony komórkowej, a następnie z udziałem białka AP-2 pobierany jest do endosomu w wyniku endocytozy [39] (ryc. 2).

W endosomie zachodzą kolejne, zależne od proteaz etapy dojrzewania receptora TLR9, które prowadzą do powstania formy receptora zdolnej do wiązania liganda.

ZALEŻNE OD PROTEAZ DOJRZEWANIE TLR9

Umieszczenie w endosomie jest głównym czynnikiem umożliwiającym receptorowi TLR9 odróżnienie własnego materiału genetycznego od obcego DNA [6]. Jednak endosom jest nie tylko miejscem zetknięcia receptora z ligandem, ale stanowi również bardzo istotne miejsce w procesie dojrzewania receptora TLR9.

Początkowo sądzono, że za powstanie aktywnego receptora TLR9 odpowiada niskie pH panujące we wnętrzu pęcherzyków endosomalnych [57]. Okazało się jednak, że o ile odczyn środowiska nie pozostaje bez wpływu na zdolność wiązania DNA bogatego w sekwencje CpG przez receptor TLR9, o tyle czynnikiem warunkującym powstanie dojrzałej postaci receptora jest aktywność proteaz obecnych w endosomach. Istnieje kilka opinii na temat enzymów proteolitycznych niezbędnych do powstania dojrzałego receptora TLR9. Pierwszymi wskazanymi przez badaczy enzymami zaangażowanymi w ten proces były katepsyny [45,52]. Wkrótce potem okazało się, że również inna proteaza, a mianowicie AEP (asparagine endopeptidase) jest zaangażowana w dojrzewanie TLR9 w plazmacytoidalnych komórkach dendrytycznych (plasmacytoid dendritic cells – pDC) [59]. AEP (ludzki homolog legumina – LGMN) jest endopeptydazą cysteinową swoistą względem wiązań asparaginowych.

Różnice co do roli poszczególnych klas proteaz w procesie dojrzewania TLR9 zostały ostatecznie wyjaśnione dzięki badaniom Ewalda i wsp., którzy twierdzą, że proteoliza jest procesem dwustopniowym, w którym biorą udział zarówno endopeptydaza AEP, jak i katepsyny [22]. Wykazano, że w pierwszym etapie endopeptydaza AEP usuwa większą część ektodomenu receptora TLR9. Drugi etap polega na dodatkowym „docięciu” powstałej C-końcowej formy TLR9 i przeprowadzany jest przez katepsyny. Brak endopeptydazy AEP nie hamuje obróbki proteolitycznej, gdyż jej rolę przejmują wtedy katepsyny, które mogą z powodzeniem przeprowadzić cały proces dojrzewania receptora TLR9. W sytuacji gdy zahamowana zostaje aktywność katepsyn, proteolityczne cięcia zapoczątkowane przez endopeptydazę AEP nie jest kontynuowane, co skutkuje powstaniem dłuższej formy receptora i upośledzeniem sygnału [22,23]. Nie do końca wiadomo, które konkretnie katepsyny są zaangażowane w proteolizę TLR9. Początkowe dane wskazywały na rolę katepsyn K i B w tym procesie, jednak dalsze badania wykazały, że obróbka receptora może być przeprowadzona także przez

inne enzymy z tej grupy [23,45,52]. Nie zostało wyjaśnione, dlaczego proces ten charakteryzuje się taką redundancją. Jedną z hipotez zakłada, że region, w obrębie którego dochodzi do cięcia proteolitycznego jest łatwo dostępny dla proteaz. Receptor TLR9 ma niekonserwatywną pętlę w obrębie domeny N-końcowej, między LRR14 a LRR15, która jest podatna na działanie katepsyn i ma potencjalne miejsca cięcia dla endopeptydazy AEP [52,59]. Możliwe jest zatem, że miejsce inicjacji cięcia proteolitycznego nie jest istotne dla funkcjonalności receptora, a jedynie umożliwia dalsze etapy „docinania” białka, prowadzące do powstania formy o odpowiedniej długości [22] (ryc. 2).

Nie jest również wyjaśnione w jaki sposób proteoliza umożliwia aktywację receptora TLR9. Zaobserwowano bowiem, że zarówno forma skrócona, jak i ta o pełnej długości, jest zdolna do związania DNA z sekwencjami CpG, jednakże sygnał może zostać przekazany jedynie przez formę w pełni dojrzałą [23]. Prawdopodobnie proteoliza umożliwia zbliżenie się do siebie podjednostek domeny TIR, co jak wiadomo jest warunkiem oddziaływania receptora TLR9 z białkiem adaptorowym MyD88 i aktywacji szlaku sygnałowego zależnego od receptora [22,37].

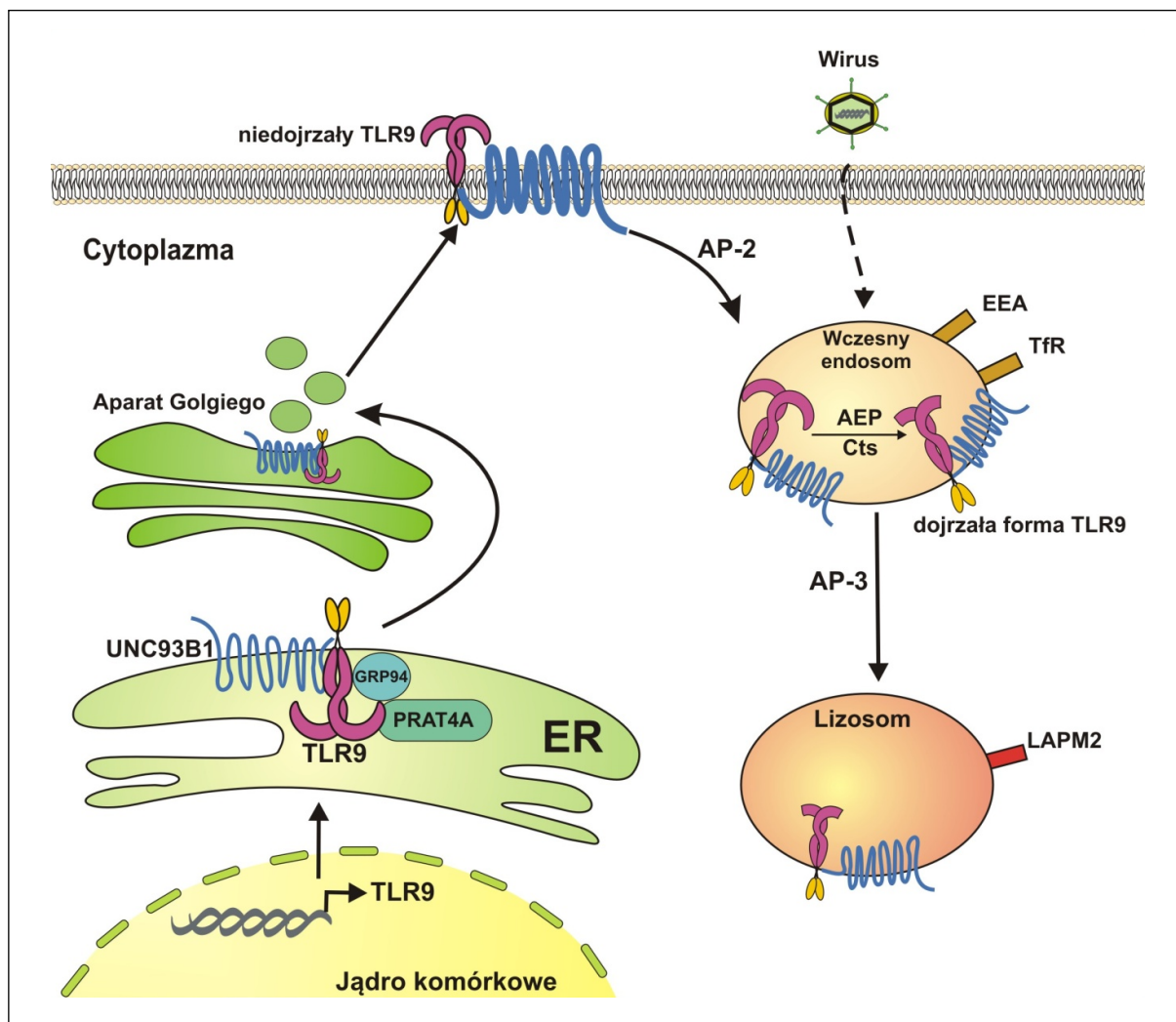
AKTYWACJA RECEPTORA TLR9 W KOMPARTMENCIE ENDOSOMALNYM

Skomplikowany transport receptora TLR9 do endosomu i dalsza obróbka proteolityczna skutkują powstaniem jego C-końcowego odcinka, w pełni gotowego do związania liganda.

Oddziaływanie drobnoustroju z powierzchniowymi receptorami komórki warunkuje zajście fagocytozy, czy też w przypadku wirusów endocytozy. Procesy te umożliwiają degradację patogenu wewnątrz fagosomu/endosomu, uwolnienie jego materiału genetycznego i w następstwie aktywację TLR9.

Syntetyczne oligonukleotydy CpG (CpG-ODN) częściowo transportowane są przez granulinę. Jest to glikozylowane białko bogate w cysteinę, wydzielane przez komórki w postaci prekursora progranuliny i obecne w surowicy [53]. Granulina wiąże CpG-ODN w sposób niezależny od sekwencji, gdyż wykazano, że może oddziaływać również z „inhibitorowymi” CpG-ODN, które mimo wiązania się do receptora TLR9 nie wywołują odpowiedzi zapalnej. Wykazano, że myszy z delecją genu kodującego granulinę miały upośledzoną odpowiedź odpornościową objawiającą się zahamowaniem wytwarzania TNF- α indukowanego przez syntetyczny CpG-ODN. Dodatkowo obserwowano częściowe zahamowanie wiązania CpG-ODN do aktywnego receptora TLR9, co wskazuje na udział granuliny w transporcie CpG-ODN do endosomu [53]. Rola granuliny jako kofaktora receptora TLR9 jest znana od stosunkowo niedawna, dlatego mechanizm w jakim białko to pośredniczy w aktywacji receptora nie jest w pełni poznany.

Typ sekwencji CpG prezentowany przez konkretne patogeny determinuje rodzaj i siłę odpowiedzi odpornościowej wywołanej u różnych organizmów. Ponadto obserwuje się



Ryc. 2. Transport TLR9 do endosomu i zależne od proteaz powstawanie aktywnej postaci receptora. Nowo syntetyzowane białko TLR9 zlokalizowane jest w ER, gdzie wiąże białka chaperonowe GRP94 i PRAT4A [13, 42] i białko transporterowe UNC93B1 [12, 39]. Z ER receptor trafia do aparatu Golgiego, gdzie dochodzi do glikozylacji domeny N-końcowej. Następnie receptor TLR9 przenoszony jest w pęcherzykach COPII do błony komórkowej, ponownie internalizowany w wyniku transportu zależnego od klatryny i umiejscowiony we wczesnym endosomie z udziałem białka AP-2. W endosomach TLR9 podlega obróbce proteolitycznej zależnej od endopeptydazy AEP i katepsyn (Cts). W dystrybucję dojrzałej postaci receptora TLR9 z endosomu do lizosomu zaangażowane jest białko AP-3 (wg [12, 13, 39, 42], zmodyfikowano)

swoistość gatunkową względem różnych motywów CpG. Sekwencje CpG działające stymulująco na komórki mysie, wykazują niewielką aktywność w stosunku do komórek ludzkich i odwrotnie. Komórki mysie są wrażliwe na CpG, którego rdzeń stanowi sekwencja GACGTT, natomiast preferowana sekwencja wywołująca odpowiedź odpornościową w komórkach ludzkich powinna zawierać więcej niż jedną parę CG oraz rdzeń GTCGTT [7]. Różnice w sekwencji CpG wywołującej odpowiedź odpornościową u gryzoni i naczelników mogą sugerować występowanie dywergencji w ewolucji receptora TLR9 [61].

Syntetyczne CpG-ODN różnią się znacznie od DNA mikroorganizmów, ze względu na obecność wiązań tiofosforanowych, warunkujących oporność na działanie nukleaz [17]. Ponadto niektóre oligonukleotydy mają powtórzenia guaniny na 5'-i/lub 3'-końcu, umożliwiające bardziej wydajne

wnikanie CpG-ODN do wnętrza komórki oraz warunkujące powstawanie form multimerycznych [66].

Syntetyczne CpG-ODN mogą występować pod dwiema głównymi postaciami: jako multimeryczne CpG-A oraz monomeryczne CpG-B. Taka właściwość sprawia, że oligonukleotydy te wykazują odmienne czasy wędrówki przez pęcherzyki endosomalne i tym samym indukują ekspresję różnego repertuaru cytokin.

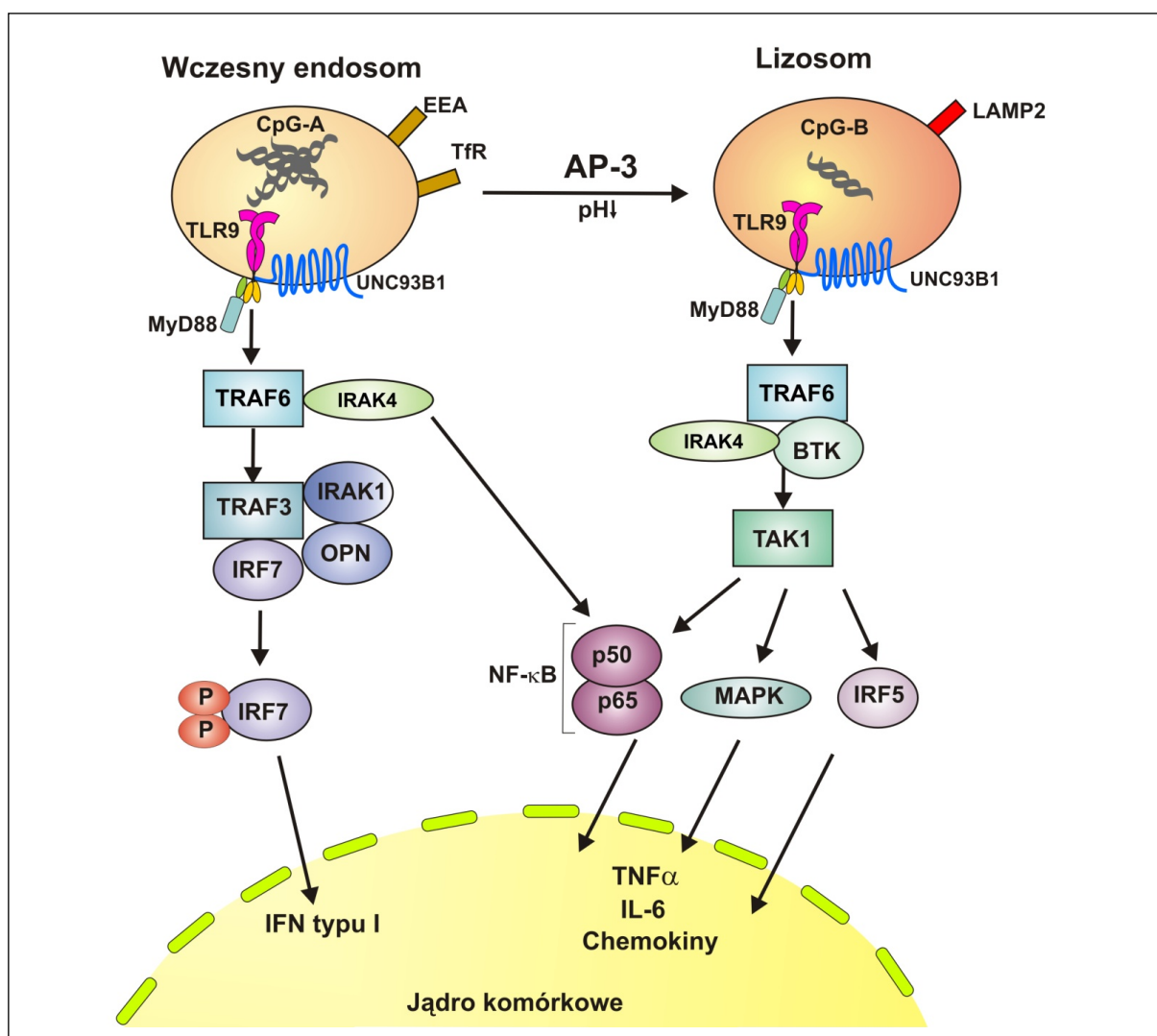
Oligonukleotydy CpG-A, mające ogony poliG, tworzą agregaty i ze względu na bardziej skomplikowaną budowę przez dłuższy czas przebywają we wczesnym endosomie. Aktywacja receptora TLR9 przez CpG-A prowadzi do rekrutacji białka adaptorowego MyD88 i zależnego od czynnika transkrypcyjnego IRF-7 wytwarzania interferonów typu I. Monomeryczna budowa CpG-B sprawia, że szybciej trafia ono

do późnego endosomu, gdzie po związaniu się z receptorem TLR9 aktywuje ścieżkę sygnałową MyD88/TRAF6/IRAK4/NF- κ B, która wzmacnia wytwarzanie cytokin, takich jak IL-6 i TNF- α [4,27] (ryc. 3).

Rozdział sygnału ze względu na postać CpG ma dodatkowo związek z obecnością białka AP-3, które jest odpowiedzialne za transport receptora TLR9 w obrębie kompartmentu endosomalnego [58].

Białko AP-3, podobnie jak wspomniane wcześniej białko AP-2, należy do grupy białek adaptorowych odpowiedzialnych za sortowanie białek opuszczających aparat Golgiego. Białko AP-3 kieruje ładunek do endosomu i dalej do pęcherzyków lizosomalnych. Zaobserwowa-

no, że komórki BMDM z delecją podjednostki β 3A białka AP-3 (*Ap3b1*^{-/-}) wykazują upośledzone wytwarzanie IFN- α w odpowiedzi na ligand CpG-A. Podobnie komórki pDC izolowane z myszy z mutacją *Ap3b1*^{-/-} charakteryzują się zaburzonym wytwarzaniem cytokin (m.in. IFN- β , TNF- α i IL-12) w odpowiedzi na ligand CpG-A, mysji wirus cytomegalii czy wirus grypy [10]. Wykazano, że AP-3 warunkuje transport receptora TLR9 z wczesnego endosomu do lizosomu (LAMP2⁺), gdyż po stymulacji ligandem CpG-A komórek niemających tego białka, receptor TLR9 nie był odnajdowany w lizosomach. Upośledzenie sygnału wynika również z zahamowania zależnej od białka AP-3 rekrutacji czynnika transkrypcyjnego IRF-7 do lizosomów zawierających CpG-A [58].



Ryc. 3. Zależna od struktury liganda aktywacja receptora TLR9. TLR9, w odpowiedzi na syntetyczne ligandy - CpG-A i CpG-B, aktywuje różne szlaki sygnałowe. Ligandy lokalizują się we wczesnych endosomach mających markery EEA oraz TfR lub w lizosomach charakteryzujących się występowaniem białka LAMP2. CpG-A, wiąże się z receptorem we wczesnym endosomie i indukuje ekspresję interferonów typu I zależnie od aktywacji czynnika transkrypcyjnego IRF-7. CpG-B, jest transportowany do lizosomów, gdzie w następstwie aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, indukuje wytwarzanie prozapalnych cytokin np. IL-6 (wg [27], zmodyfikowano); EEA – marker wczesnych endosomów, TfR – receptor transferyny, LAMP2 – białko błonowe 2 związane z lizosomami, BTK - kinaza tyrozynowa Brutona, IRAK1 - kinaza białkowa z rodziny kinaz związanych z receptorem IL-1, OPN – osteopontyna, TAK1 – kinaza aktywowana TGF- β , TRAF – czynnik związany z receptorem TNF

PODSUMOWANIE

Niedługa, bo niespełna 20-letnia historia receptorów TLR obfituje w wiele przełomowych odkryć. Początkowe badania nad receptorami Toll-podobnymi, związane z identyfikacją receptora TLR4 i jego liganda LPS zawocowały Nagrodą Nobla, którą w 2011 roku otrzymali Bruce A. Beutler i Jules A. Hoffmann. Dzięki wzrastającemu zainteresowaniu wielu grup badawczych receptorami należącymi do rodziny receptorów rozpoznających wzorce lepiej poznano mechanizmy wrodzonej odpowiedzi odpornościowej. Obecnie nie jest już ona rozpatrywana jako nieskomplikowany etap walki z patogenem, umożliwiającą jedynie zainicjowanie odpowiedzi nabytej. Wrodzona odpowiedź odpornościowa okazała się niezwykle złożonym procesem, angażującym wiele szlaków sygnałowych, którego zadaniem jest zatrzymanie rozprzestrzeniania się patogenu, mobilizacja komórek odpornościowych (m.in. makrofagów i komórek dendrytycznych) do usuwania patogenów i wreszcie aktywacja komórek odpowiedzialnych za rozwój nabytej odpowiedzi odpornościowej, takich jak limfocyty T i B.

Ligandami receptorów rozpoznających wzorce są swoiste struktury mikroorganizmów, w większości nie spotykane u organizmów wyższych. Ligandy te noszą wspólną nazwę molekularnych wzorców związanych z patogenami. Nazwa PAMP nie jest ścisła, gdyż struktury te są obecne zarówno u mikroorganizmów patogennych, jak również komensalnych. Dlatego też rozpoznawanie patogenów związane jest nie tylko z występowaniem w ich budowie struktur stanowiących ligandy receptorów PRR, ale również z ich pojawianiem się w miejscach organizmu gospodarza, w których mogą być zagrożeniem.

Zapoczątkowanie przez patogen reakcji odpornościowej wiąże się z aktywacją określonego receptora i uruchomieniem kaskady sygnałowej prowadzącej do indukcji ekspresji cytokin prozapalnych, chemokin, czy też cząsteczek kostymulujących na powierzchni limfocytów B i T. Cytokiny i chemokiny aktywują komórki odpornościowe, co objawia się ich różnicowaniem i wzmożoną migracją komórek prezentujących antygen do węzłów chłonnych, gdzie biorą udział w aktywacji limfocytów T-pomocniczych. Aktywowane limfocyty T-pomocnicze rozpoznają następnie antygen peptydowy, prezentowany na powierzchni limfocytów B i z udziałem cząsteczek kostymulujących oraz wydzielanych cytokin indukują proliferację i w dalszej kolejności różnicowanie się limfocytów B do komórek plazmatycznych, wydzielających przeciwciała swoiste względem antygenów peptydowych. Taka kolejność zdarzeń sprawia, że receptory PRR można uznać za element warunkujący rozwój pełnej odpowiedzi odpornościowej, której składowymi są odpowiedź wrodzona i nabyta.

Najlepiej poznanymi receptorami rozpoznającymi wzorce są receptory Toll-podobne. Biorą one udział w inicjowaniu reakcji odpornościowej skierowanej prze-

ciwko różnorodnym patogenom obejmującym wirusy, bakterie, grzyby, a także pierwotniaki.

Rozróżnia się dwie grupy receptorów TLR: ekspozowane na powierzchni komórki lub występujące w endosomach i wiążące kwasy nukleinowe uwolnione po degradacji patogenu.

Wśród endosomalnych receptorów Toll-podobnych na szczególną uwagę zasługuje receptor TLR9, rozpoznający DNA bogate w niemetylowane sekwencje CpG [6,7]. Aktywacja TLR9 wymaga wielu etapów dojrzewania tego receptora oraz jego umiejscowienia w endosomie. Aby do tego doszło niezbędne jest związanie TLR9 przez białko transportujące UNC931, które przebywa wraz z receptorem drogę z ER do endosomu. W kolejnych etapach dystrybucji TLR9 biorą udział białka AP-2 i AP-3.

Obecność TLR9 w endosomie nie tylko umożliwia zetknięcie się receptora z jego ligandem, ale także pozwala na przeprowadzenie modyfikacji potranslacyjnych, które zależne są od enzymów proteolitycznych obecnych w tym przedziale komórkowym, takich jak endopeptydaza AEP i katepsyny [39]. Ponadto ograniczenie miejsca rozpoznania liganda do endosomu minimalizuje zagrożenie aktywacji receptora własnym DNA komórki. Dzięki możliwości przekazywania sygnału z endosomów na różnym etapie ich dojrzewania, TLR9 indukuje ekspresję genów kodujących interferony typu I i cytokiny prozapalne.

Limfocyty B i komórki dendrytyczne, stymulowane ligandem receptora TLR9, wykazują wzmożoną prezentację cząsteczek kostymulujących, zwiększoną ekspresję genu kodującego receptor CCR7 chemokin, sekrecję chemokin MIP1 i IP-10 oraz ekspresję innych genów aktywowanych przez interferon. Ponieważ niemetylowane CpG jest antygenem grasiczniezależnym, jednoczesna aktywacja naiwnych limfocytów B przez TLR9 oraz BCR (B-cell receptor) jest wystarczająca do ich różnicowania w kierunku komórek plazmatycznych i nie wymaga udziału limfocytu T. W przypadku komórek pamięci samo pobudzenie receptora TLR9 jest wystarczające, aby doszło do ich przekształcenia w komórki plazmatyczne. Właściwość pobudzania limfocytów B przez aktywowane receptory TLR9 jest wykorzystywana do opracowania adiuwantów szczepionkowych opartych o syntetyczne oligonukleotydy zawierające sekwencje CpG [9,31].

Mimo oddzielenia miejsca występowania TLR9 od przestrzeni międzykomórkowych, czy też obszarów komórki, w których receptor ten mógłby zetknąć się z endogennym DNA, istnieje mechanizm umożliwiający przedostawanie się materiału genetycznego komórki do endosomu i błędną aktywację TLR9, co może prowadzić do rozwoju chorób wynikających z autoagresji. Mechanizm ten obejmuje tworzenie kompleksów DNA z antybakteryjnym peptydem LL37 wydzielanym przez neutrofile lub uszkodzone komórki nabłonka naczyń. Peptyd LL37 wiąże własne DNA organizmu, tworząc

agregaty, które rozpoznawane są przez białko HMGB-1 (high-mobility group box 1) [35,63]. Kompleksy takie aktywują receptor TLR9, co w tym wypadku prowadzi do ciągłej aktywacji genów kodujących interferony typu I.

Receptor TLR9 pełni funkcję nie tylko w procesie wrodzonej odpowiedzi odpornościowej *sensu stricto*, ale także bierze udział w rozwoju chorób autoimmunologicznych, czy też nowotworzeniu.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Alexopoulou L., Holt A.C., Medzhitov R., Flavell R.A.: Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature*, 2001; 413: 732-738
- [2] Asselin-Paturel C., Brizard G., Chemin K., Boonstra A., O'Garra A., Vicari A., Trinchieri G.: Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *J. Exp. Med.*, 2005; 201: 1157-1167
- [3] Avalos A.M., Kirak O., Oelkers J.M., Pils M.C., Kim Y.-M., Ottinger M., Jaenisch R., Ploegh H.L., Brinkmann M.M.: Cell-specific TLR9 trafficking in primary APCs of transgenic TLR9-GFP mice. *J. Immunol.*, 2013; 190: 695-702
- [4] Avalos A.M., Latz E., Mousseau B., Christensen S.R., Shlomchik M.J., Lund F., Marshak-Rothstein A.: Differential cytokine production and bystander activation of autoreactive B cells in response to CpG-A and CpG-B oligonucleotides. *J. Immunol.*, 2009; 183: 6262-6268
- [5] Barton G.M., Kagan J.C.: A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat. Rev. Immunol.*, 2009; 9: 535-542
- [6] Barton G.M., Kagan J.C., Medzhitov R.: Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat. Immunol.*, 2006; 7: 49-56
- [7] Bauer S., Kirschning C.J., Häcker H., Redecke V., Hausmann S., Akira S., Wagner H., Lipford G.B.: Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 9237-9242
- [8] 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
- [9] Bernasconi N.L., Onai N., Lanzavecchia A.: A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood*, 2003; 101: 4500-4504
- [10] Blasius A.L., Arnold C.N., Georgel P., Rutschmann S., Xia Y., Lin P., Ross C., Li X., Smart N.G., Beutler B.: Slc15a4, AP-3, and Hermansky-Pudlak syndrome proteins are required for Toll-like receptor signaling in plasmacytoid dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 19973-19978
- [11] Botos I., Segal D.M., Davies D.R.: The structural biology of Toll-like receptors. *Structure*, 2011; 19: 447-459
- [12] Brinkmann M.M., Spooner E., Hoebe K., Beutler B., Ploegh H.L., Kim Y.M.: The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J. Cell Biol.*, 2007; 177: 265-275
- [13] Brooks J.C., Sun W., Chiosio G., Leifer C.A.: Heat shock protein gp96 regulates Toll-like receptor 9 proteolytic processing and conformational stability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012; 421: 780-784
- [14] Casrouge A., Zhang S.Y., Eidenschek C., Jouanguy E., Puel A., Yang K., Alcais A., Picard C., Mahfoufi N., Nicolas N., Lorenzo L., Plancoulaine S., Sénéchal B., Geissmann F., Tabeta K. i wsp.: Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science*, 2006; 314: 308-312
- [15] Chockalingam A., Brooks J.C., Cameron J.L., Blum L.K., Leifer C.A.: TLR9 traffics through the Golgi complex to localize to endolysosomes and respond to CpG DNA. *Immunol. Cell Biol.*, 2009; 87: 209-217
- [16] Chuang T.H., Ulevitch R.J.: Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur. Cytokine Netw.*, 2000; 11: 372-378
- [17] Dalpke A.H., Zimmermann S., Albrecht I., Heeg K.: Phosphodiester CpG oligonucleotides as adjuvants: polyguanosine runs enhance cellular uptake and improve immunostimulative activity of phosphodiester CpG oligonucleotides in vitro and in vivo. *Immunology*, 2002; 106: 102-112
- [18] de Jong S.D., Basha G., Wilson K.D., Kazem M., Cullis P., Jefferies W., Tam Y.: The immunostimulatory activity of unmethylated and methylated CpG oligodeoxynucleotide is dependent on their ability to colocalize with TLR9 in late endosomes. *J. Immunol.*, 2010; 184: 6092-6102
- [19] Deaton A.M., Bird A.: CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.*, 2011; 25: 1010-1022
- [20] Delale T., Paquin A., Asselin-Paturel C., Dalod M., Brizard G., Bates E.E., Kastner P., Chan S., Akira S., Vicari A., Biron C.A., Trinchieri G., Briere F.: MyD88-dependent and -independent murine cytomegalovirus sensing for IFN- α release and initiation of immune responses in vivo. *J. Immunol.*, 2005; 175: 6723-6732
- [21] Du X., Poltorak A., Wei Y., Beutler B.: Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur. Cytokine Netw.*, 2000; 11: 362-371
- [22] Ewald S.E., Engel A., Lee J., Wang M., Bogyo M., Barton G.M.: Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase. *J. Exp. Med.*, 2011; 208: 643-651
- [23] Ewald S.E., Lee B.L., Lau L., Wickliffe K.E., Shi G.P., Chapman H.A., Barton G.M.: The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature*, 2008; 456: 658-662
- [24] Fiola S., Gosselin D., Takada K., Gosselin J.: TLR9 contributes to the recognition of EBV by primary monocytes and plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.*, 2010; 185: 3620-3631
- [25] Fukui R., Saitoh S., Kanno A., Onji M., Shibata T., Ito A., Onji M., Matsumoto M., Akira S., Yoshida N., Miyake K.: UNC93B1 restricts systemic lethal inflammation by orchestrating Toll-like receptor 7 and 9 trafficking. *Immunity*, 2011; 35: 69-81
- [26] Fukui R., Saitoh S., Matsumoto F., Kozuka-Hata H., Oyama M., Tabeta K., Beutler B., Miyake K.: UNC93B1 biases Toll-like receptor responses to nucleic acid in dendritic cells toward DNA- but against RNA-sensing. *J. Exp. Med.*, 2009; 206: 1339-1350
- [27] Guiducci C., Ott G., Chan J.H., Damon E., Calacsan C., Matray T., Lee K.D., Coffman R.L., Barrat F.J.: Properties regulating the nature

- of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. *J. Exp. Med.*, 2006; 203: 1999-2008
- [28] Häcker H., Vabulas R.M., Takeuchi O., Hoshino K., Akira S., Wagner H.: Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (Traf) 6. *J. Exp. Med.*, 2000; 192: 595-600
- [29] Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S.: A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 2000; 408: 740-745
- [30] Janeway C.A. Jr., Medzhitov R.: Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, 2002; 20: 197-216
- [31] Jung J., Yi A.K., Zhang X., Choe J., Li L., Choi Y.S.: Distinct response of human B cell subpopulations in recognition of an innate immune signal, CpG DNA. *J. Immunol.*, 2002; 169: 2368-2373
- [32] Kawai T., Akira S.: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.*, 2010; 11: 373-384
- [33] Kim Y.M., Brinkmann M.M., Paquet M.E., Ploegh H.L.: UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature*, 2008; 452: 234-238
- [34] Krieg A.M., Yi A.K., Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., Koretzky G.A., Klinman D.M.: CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 1995; 374: 546-549
- [35] Lande R., Gregorio J., Facchinetti V., Chatterjee B., Wang Y.H., Homey B., Cao W., Wang Y.H., Su B., Nestle F.O., Zal T., Mellman I., Schröder J.M., Liu Y.J., Gilliet M.: Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*, 2007; 449: 564-569
- [36] Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W., Funke R., Gage D., Harris K., Heaford A., Howland J. i wsp.: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001; 409: 860-921
- [37] Latz E., Schoenemeyer A., Visintin A., Fitzgerald K.A., Monks B.G., Knetter C.F., Lien E., Nilsen N.J., Espevik T., Golenbock D.T.: TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat. Immunol.*, 2004; 5: 190-198
- [38] Latz E., Verma A., Visintin A., Gong M., Sirois C.M., Klein D.C., Monks B.G., McKnight C.J., Lamphier M.S., Duprex W.P., Espevik T., Golenbock D.T.: Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nat. Immunol.*, 2007; 8: 772-779
- [39] Lee B.L., Moon J.E., Shu J.H., Yuan L., Newman Z.R., Schekman R., Barton G.M.: UNC93B1 mediates differential trafficking of endosomal TLRs. *Elife*, 2013; 2: e00291
- [40] Leifer C.A., Brooks J.C., Hoelzer K., Lopez J., Kennedy M.N., Mazzoni A., Segal D.M.: Cytoplasmic targeting motifs control localization of toll-like receptor 9. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 35585-35592
- [41] Leifer C.A., Kennedy M.N., Mazzoni A., Lee C., Kruhlak M.J., Segal D.M.: TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation. *J. Immunol.*, 2004; 173: 1179-1183
- [42] Liu B., Yang Y., Qiu Z., Staron M., Hong F., Li Y., Wu S., Li Y., Hao B., Bona R., Han D., Li Z.: Folding of Toll-like receptors by the HSP90 paralogue gp96 requires a substrate-specific cochaperone. *Nat. Commun.*, 2010; 1: 79
- [43] Lund J., Sato A., Akira S., Medzhitov R., Iwasaki A.: Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 2003; 198: 513-520
- [44] Lund J.M., Alexopoulou L., Sato A., Karow M., Adams N.C., Gale N.W., Iwasaki A., Flavell R.A.: Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 5598-5603
- [45] Matsumoto F., Saitoh S., Fukui R., Kobayashi T., Tanimura N., Konno K., Kusumoto Y., Akashi-Takamura S., Miyake K.: Cathepsins are required for Toll-like receptor 9 responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008; 367: 693-699
- [46] McKelvey K.J., Highton J., Hessian P.A.: Cell-specific expression of TLR9 isoforms in inflammation. *J. Autoimmun.*, 2011; 36: 76-86
- [47] Medzhitov R.: CpG DNA: security code for host defense. *Nat. Immunol.*, 2001; 2: 15-16
- [48] Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A. Jr.: A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 1997; 388: 394-397
- [49] Megjugorac N.J., Young H.A., Amrute S.B., Olshalsky S.L., Fitzgerald-Bocarsly P.: Virally stimulated plasmacytoid dendritic cells produce chemokines and induce migration of T and NK cells. *J. Leukoc. Biol.*, 2004; 75: 504-514
- [50] Mouchess M.L., Arpaia N., Souza G., Barbalat R., Ewald S.E., Lau L., Barton G.M.: Transmembrane mutations in Toll-like receptor 9 bypass the requirement for ectodomain proteolysis and induce fatal inflammation. *Immunity*, 2011; 35: 721-732
- [51] Ohno H.: Clathrin-associated adaptor protein complexes. *J. Cell Sci.*, 2006; 119: 3719-3721
- [52] Park B., Brinkmann M.M., Spooner E., Lee C.C., Kim Y.M., Ploegh H.L.: Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat. Immunol.*, 2008; 9: 1407-1414
- [53] Park B., Buti L., Lee S., Matsuwaki T., Spooner E., Brinkmann M.M., Nishihara M., Ploegh H.L.: Granulin is a soluble cofactor for toll-like receptor 9 signaling. *Immunity*, 2011; 34: 505-513
- [54] Pasare C., Medzhitov R.: Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature*, 2005, 438: 364-368
- [55] Peter M.E., Kubarenko A.V., Weber A.N., Dalpke A.H.: Identification of an N-terminal recognition site in TLR9 that contributes to CpG-DNA-mediated receptor activation. *J. Immunol.*, 2009; 182: 7690-7697
- [56] Q9NR96. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9NR96> (29.05.2013)
- [57] Rutz M., Metzger J., Gellert T., Luppa P., Lipford G.B., Wagner H., Bauer S.: Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur. J. Immunol.*, 2004; 34: 2541-2550
- [58] Sasai M., Linehan M.M., Iwasaki A.: Bifurcation of Toll-like receptor 9 signaling by adaptor protein 3. *Science*, 2010; 329: 1530-1534
- [59] Sepulveda F.E., Maschalidi S., Colisson R., Heslop L., Ghirelli C., Sakka E., Lennon-Duménil A.M., Amigorena S., Cabanie L., Manoury B.: Critical role for asparagine endopeptidase in endocytic Toll-like receptor signaling in dendritic cells. *Immunity*, 2009; 31: 737-748
- [60] Tabet K., Hoebe K., Janssen E.M., Du X., Georgel P., Crozat K., Mudd S., Mann N., Sovath S., Goode J., Shamel L., Herskovits A.A., Portnoy D.A., Cooke M., Tarantino L.M. i wsp.: The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat. Immunol.*, 2006; 7: 156-164
- [61] Takeshita F., Gursel I., Ishii K.J., Suzuki K., Gursel M., Klinman D.M.: Signal transduction pathways mediated by the interaction of CpG DNA with Toll-like receptor 9. *Semin. Immunol.*, 2004; 16: 17-22
- [62] Takeshita F., Leifer C.A., Gursel I., Ishii K.J., Takeshita S., Gursel M., Klinman D.M.: Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J. Immunol.*, 2001; 167: 3555-3558
- [63] Tian J., Avalos A.M., Mao S.Y., Chen B., Senthil K., Wu H., Parroche P., Drabic S., Golenbock D., Sirois C., Hua J., An L.L., Audoly L., La Rosa G., Bierhaus A. i wsp.: Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat. Immunol.*, 2007; 8: 487-496

[64] Tokunaga T., Yamamoto H., Shimada S., Abe H., Fukuda T., Fujisawa Y., Furutani Y., Yano O., Kataoka T., Sudo T., Makiguchi N., Suganuma T.: Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1984; 72: 955-962

[65] West A.P., Koblansky A.A., Ghosh S.: Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2006; 22: 409-437

[66] Wu C.C., Lee J., Raz E., Corr M., Carson D.A.: Necessity of oligonucleotide aggregation for toll-like receptor 9 activation. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 33071-33078

[67] Zanetti G., Pahuja K.B., Studer S., Shim S., Schekman R.: COPII and the regulation of protein sorting in mammals. *Nat. Cell Biol.*, 2011; 14: 20-28

[68] Zauner L., Nadal D.: Understanding TLR9 action in Epstein-Barr virus infection. *Front. Biosci.*, 2012; 17: 1219-1231

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.