

Received: 2009.03.04
Accepted: 2009.06.25
Published: 2009.07.21

Receptory Toll-like w wirusowych zapaleniach wątroby

Toll-like receptors in viral hepatitis

Joanna Kozłowska, Joanna Jabłońska, Alicja Wiercińska-Drapała

Klinika Hepatologii i Nabytych Niedoborów Immunologicznych, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie

Receptory Toll-like pośredniczą w odpowiedzi immunologicznej wrodzonej – rozpoznają pewne struktury białkowe, lipidowe lub nukleinowe, powszechne w świecie mikroorganizmów, a niewystępujące u człowieka. Stymulacja TLR inicjuje aktywację sieci sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, co prowadzi do sekrecji cytokin prozapalnych, wśród których szczególne znaczenie mają: IFN typu I, TNF- α i IL-6.

Znaczenie w rozpoznawaniu zakażeń wirusowych mają: TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 i TLR9. Spośród nich cztery rozpoznają kwasy nukleinowe: TLR3 – dsRNA, TLR7 i TLR8 – ssRNA, TLR9 – DNA. Trwają badania mające na celu głębsze poznanie znaczenia TLR w patogenezie różnych zakażeń oraz innych procesów zapalnych, a także chorób nowotworowych i autoimmunologicznych.

Szczególne zainteresowanie budzi rola TLR w naturalnym przebiegu wzw typu B i typu C, a także w procesie leczenia tych chorób. Podejmowane są próby zastosowania agonistów TLR7 i TLR9 w leczeniu PZWC.

Głębsze zrozumienie roli TLR w całości zjawisk immunologicznych towarzyszących wirusowym zapaleniom wątroby otwiera nowe horyzonty możliwości terapeutycznych w tych chorobach.

Słowa kluczowe:

receptory Toll-like • odporność wrodzona • wirus zapalenia wątroby typu C • wirus zapalenia wątroby typu B

Summary

Toll-like receptors (TLRs) are part of the innate immune system. They recognize some protein, lipid, and nucleic structures that are common in microorganisms such as bacteria and viruses but not present in the human body. The stimulation of TLRs initiates the activation of an intracellular signaling network which results in the secretion of proinflammatory cytokines, mainly type I interferons, TNF- α , and IL-6. TLR2, TLR3, TLR4, TLR8, and TLR9 take part in the recognition of viral infections, four of them by discerning nucleic acids, with TLR3 recognizing dsRNA, TLR7 and TLR8-ssRNA, and TLR9-DNA. The role of TLRs in the development of infections and other inflammatory states, neoplasms, and autoimmune disorders is under investigation. The importance of TLRs in the natural course of hepatitis B and C and in the treatment of these diseases are the subject of particular interest. Attempts to apply TLR7 and TLR9 agonists in the treatment of chronic hepatitis type C are underway. A better understanding of the role of TLRs in the complex immunological phenomena accompanying viral hepatitis might put the therapeutic possibilities in these infections into a new perspective.

Key words:

Toll-like receptors • innate immunity • hepatitis C virus • hepatitis B virus

Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=891484
Word count:	1330
Tables:	–
Figures:	–
References:	32

Adres autorki: dr n. med. Joanna Kozłowska, Klinika Hepatologii i Nabytych Niedoborów Immunologicznych, ul. Wolska 37, 01-201 Warszawa; e-mail: joannakoz1@wp.pl

Do rodziny receptorów Toll-like (TLR – Toll-like receptors) należy 13 białek błonowych, wstępnie zidentyfikowanych u człowieka jako analogiczne z receptorem Toll odkrytym u *Drosophila*. Stanowią one główny element rozpoznania i sygnalizowania w ramach odpowiedzi immunologicznej wrodzonej [28].

Układ immunologicznej odpowiedzi wrodzonej (innate immune system), najbardziej pierwotna składowa odpowiedzi immunologicznej, uważany był do niedawna za odgrywającą pomniejszą rolę układ odpowiedzi nieswoistej, poprzedzającej aktywację „właściwej”, swoistej odpowiedzi nabytej. Obecnie stało się pewne, że odporność wrodzona pełni niezwykle istotną rolę w rozwoju obronności, rolę nie mniejszą niż odporność nabyta. Odpowiedź wrodzona zapewnia szybkie rozpoznanie patogenu, natychmiastową reakcję obronną oraz wpływ na rozwój swoistej odpowiedzi nabytej, która pojawia się z pewnym opóźnieniem. Odpowiedź swoista rozwija się pod warunkiem rozpoznania i „opracowania” patogenu przez układ odpowiedzi wrodzonej.

Głównymi składowymi odpowiedzi wrodzonej są: neutrofile, monocyty, makrofagi, bazofile, mastocyty, eozynofile, komórki NK, białka komplementu oraz cytokiny prozapalne, takie jak IFN- α , - β i - γ , TNF- α i IL-12.

W przypadku wątroby najważniejszymi komórkami układu wrodzonej odpowiedzi immunologicznej są:

- Komórki NK (natural killer) – stanowiące jedną z głównych składowych układu odporności wrodzonej. Zapewniają odpowiedź wczesną na zakażenia bakteryjne i wirusowe, jak również na rozrost nowotworowy. Charakteryzują się zdolnością do spontanicznej lizy różnych linii komórkowych, w sposób niezależny od MHC (major histocompatibility complex) [4]. U ludzi komórki NK stanowią do 1/3 wszystkich limfocytów obecnych w wątrobie, podczas gdy we krwi obwodowej stanowią tylko 2% krążących limfocytów [20]. Komórki NK działają przez bezpośrednią cytotoxycyzość w stosunku do zakażonych komórek oraz przez wytwarzanie cytokin zapalnych: IFN- γ , TNF- α , IL-3, GCSF (granulocyte-colony stimulating factor), MCSF (monocyte-colony stimulating factor) [8].
- Komórki NKT – należą do limfocytów T, wykazując jednak ekspresję markerów komórek NK i stanowią do 1/3 wewnątrzwątrobowej populacji limfocytów T. Te komórki również mogą być indukowane do wytwarzania IFN- γ [29]. Rekrutacja komórek NK i NKT następuje poprzez mediatory wydzielane przez APC (antigen-presenting cells) [12].
- Komórki Kupffera (KC) – są makrofagami umiejscowionymi w wątrobie, stanowiącymi około 20% wszyst-

kich pozamajązszowych komórek wątroby. Ich rolą jest: fagocytoza, rozpoznanie i prezentacja antygeny, a także sekrecja mediatorów prozapalnych [13]. Syntetyzowane przez KC IL-12 i IL-18 stymulują komórki NK do wydzielania IFN- γ [14].

- Komórki dendrytyczne (DC) – są najsprawniejszymi komórkami prezentującymi antygen (APC). U ludzi dzieli się tę grupę komórek na dwie populacje: mDC (mieloidalne komórki dendrytyczne), specjalizujące się w rozpoznawaniu, przetwarzaniu i prezentacji antygeny oraz pDC (plazmocytoidalne komórki dendrytyczne), które wytwarzają duże ilości IFN typu I [10]. Uważane są za łączniki między odpowiedzią wrodzoną a nabytą i odgrywają rolę w rozwoju tolerancji immunologicznej [1].
- Komórki wyściółki zatok (LSEC – liver sinusoidal endothelial cells) – stanowią około 50% pozamajązszowych komórek wątroby. Tworzą pojedynczą, fenestrowaną warstwę oddzielającą hepatocyty od przepływającej krwi. Antygeny pobierają poprzez pinocytozę lub fagocytozę [13].

Odmienne niż w przypadku odpowiedzi nabytej, gdzie receptory na komórkach B i T są swoiste antygenowo, układ odpowiedzi wrodzonej używa konserwowanych receptorów zwanych PRR (pattern recognition receptors), które rozpoznają pewne struktury lipidowe, węglowodanowe, peptydowe i złożone z kwasów nukleinowych (tzw. pathogen-associated molecular patterns – PAMP), występujące powszechnie w świecie mikroorganizmów. TLR stanowią jedną z rodzin receptorów należących do PRR i różnią się w sposób istotny od receptorów antygenoswoistych [10]. Mogą one występować na wielu różnych komórkach efektorowych układu odpowiedzi wrodzonej, a ekspresja ich nie jest klonalna [17]. Reakcja komórki efektorowej na stymulację przez PRR jest natychmiastowa, nie musi być poprzedzona proliferacją. Dzięki temu reakcje układu odporności wrodzonej stanowią pierwszą linię obrony, jednocześnie indukując późniejszy rozwój odpowiedzi swoistej [26].

Rozpoznanie patogenu przez receptory typu PRR, w tym TLR, inicjuje aktywację złożonej sieci sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, prowadząc do sekrecji cytokin prozapalnych. Do wyżej wymienionej sieci przekaźników należą: białko adaptacyjne MyD88, kinazy białkowe (kinaza związana z receptorem IL-1 i kinaza związana z receptorem TNF) oraz czynnik transkrypcyjny NF- κ B [25].

TLR2-4 i TLR7-9 odgrywają szczególną rolę w rozpoznawaniu zakażeń wirusowych. Najważniejszym elementem tej odpowiedzi jest indukcja interferonów typu I (IFN- α i - β), co prowadzi do zwiększonej ekspresji i aktywności genów stymulowanych przez interferon (IFN-stimulated genes – ISG), co z kolei wyzwała odpowiedź przeciw-wirusową, antyproliferacyjną i immunoregulacyjną [2].

Farmakodynamicznym miernikiem tych reakcji może być wzrost m-RNA dla ISG [3].

Wykazano, że cztery spośród TLR rozpoznają kwasy nukleinowe: TLR3 – dsRNA, TLR7 i TLR8 – ssRNA, TLR9 – CpG DNA (zawierający swoiste dwunukleotydowe sekwencje cytozyna-fosfoguanozyna, częste w DNA bakteryjnym i wirusowym, nieobecne jednak u ludzi) [27]. TLR3 działa poprzez układ TRIF, a TLR7-9 poprzez MyD88 [25].

Receptory TLR3 i TLR7-9 są rozmieszczone głównie w obrębie retikulum endoplazmatycznego, w endosomach i lizosomach. Pozostałe TLR natomiast znajdują się w błonie komórkowej zewnętrznej i rozpoznają patogeny znajdujące się na zewnątrz komórki [18].

TLR7 i TLR9 wykazują ekspresję na limfocytach B oraz pDC. TLR8 występuje na monocytach i mDC, indukując inny zestaw cytokin [23]. Na KC znajdują się receptory TLR1-4 i TLR6-9. Stymulacja TLR3-4 prowadzi do wytwarzania IFN- β przez KC, a stymulacja TLR1-9 – do wytwarzania TNF- α i IL-6 [31]. LSEC wykazują ekspresję TLR1-4 i TLR6-8. Stymulacja poprzez TLR3 prowadzi do wydzielania IFN- β przez te komórki, a stymulacja poprzez TLR1-4 i TLR6 powoduje wzrost sekrecji TNF- α i IL-6 [31]. Wykazano pośrednie cechy aktywności TLR2-4 [26] oraz TLR7 [16] w hepatocytach.

Wielokierunkowe działanie wywołane stymulacją receptorów TLR wskazuje na prawdopodobieństwo udziału tych receptorów w przebiegu infekcji oraz innych procesów zapalnych, a także chorób nowotworowych i autoimmunologicznych. Spośród chorób o etiologii wirusowej szczególnie zainteresowanie budzą wirusowe zapalenia wątroby typu B i typu C. Poddawane są badaniom możliwości zastosowania terapeutycznego agonistów TLR [11].

Wirus HCV jest rozpoznawany przez mechanizmy odpowiedzi immunologicznej wrodzonej już w czasie pierwszych 2 tygodni od zakażenia. Dzięki tym mechanizmom dochodzi do gwałtownego wzrostu wytwarzania interferonu (IFN), co powoduje wzmożoną ekspresję ISG [7]. Podejmowano badania nad zastosowaniem agonistów TLR7 [9,21] i TLR9 [15] w przewlekłym wirusowym zapaleniu wątroby typu C (PZWC). Oba te receptory charakteryzują się wysoką ekspresją w komórkach pDC. Co prawda nie wykazano bezpośredniego udziału TLR7 w naturalnym przebiegu PZWC, jednak dowody pośrednie wskazują na rolę tego receptora – dożylne podanie isatoribiny [9], a także doustne resiquimodu [21], agonistów tego receptora, spowodowało spadek poziomu wirusa HCV w surowicy. Wykazano, że stymulacja TLR7 hamuje replikację HCV nie tylko przez indukcję interferonu, ale także w mechanizmie niezależnym od interferonu [16]. Istotną rolę TLR7 w przebiegu

PZWC potwierdza również badanie polimorfizmu TLR7, gdzie jeden z wariantów (c.1-120T>G) był związany z istotnie łżejszym przebiegiem choroby [24].

W badaniach nad PZWC stwierdzono wzrost ekspresji TLR2 i TLR4 w PBMC [22] i w komórkach wątroby [19]. Ekspresja TLR2 na monocytach korelowała ze wzrostem TNF- α i aktywnością martwiczo-zapalną w wątrobie u chorych z PZWC [22]. Stwierdzono również, że to białko rdzeniowe HCV oraz białko NS3 aktywują PBMC poprzez TLR2 (ale nie TLR4) do wytwarzania TNF- α i IL-6 [6]. Dla PZWB obserwowano z kolei przeciwną zależność – spadek ekspresji TLR2 na hepatocytach, KC i PBMC, który był związany z obecnością antygeny HBe [30].

Oceniano również zdolność hamowania replikacji HCV przez komórki nieparenchymalne wątroby (KC i LSEC) i stwierdzono, że stymulacja TLR3 i TLR4 istotnie hamuje replikację HCV przez wytwarzanie IFN- β [5].

W odróżnieniu od PZWC, w PZWB we wczesnej fazie zakażenia nie stwierdza się istotnych zmian w ekspresji wewnątrzwątrobowych genów związanych z odpowiedzią wrodzoną. Jednak większa część wirusowego DNA jest eliminowana zanim dojdzie do klinicznych objawów choroby. Całkowita eliminacja wirusa jest uzależniona głównie od wtórnej odpowiedzi ze strony limfocytów CD4 i CD8. Uważa się, że najistotniejszym elementem w eliminacji wirusa jest niszczenie zakażonych hepatocytów przez swoiste limfocyty cytotoksyczne (CTL). W badaniach na myszach wykazano, że stymulacja TLR3-4 na komórkach nieparenchymalnych wątroby (KC i LSEC) prowadzi do zahamowania replikacji HBV [31].

Badania receptorów typu PRR wykazują, że służą one nie tylko rozpoznaniu zewnętrznych patogenów, lecz mogą również rozpoznawać własne epitopy gospodarza, pochodzące z komórek uszkodzonych lub podlegających apoptozie. W tym kontekście PRR odgrywają rolę w naprawie tkankowej i usuwaniu resztek komórkowych, lecz również w inicjacji i rozwoju procesów autoimmunologicznych. Dotychczas udowodniono taką aktywność receptorów TLR7 i TLR9, obecnych w komórkach B i pDC, prowadzącą do wytwarzania autoprzeciwciał. Stwierdzono, że zwiększona ekspresja tych receptorów koreluje z obecnością czynnika reumatoidalnego i krioglobulin u pacjentów z PZWC [32]. Również IFN typu I odgrywa istotną rolę w etiologii chorób autoimmunologicznych.

Lepsze zrozumienie procesów immunologicznych związanych z odpowiedzią wrodzoną i nabytą, zachodzących w wątrobie w przebiegu ostrych i przewlekłych zakażeń wirusami HBV i HCV, zwiększa szanse nowych możliwości terapeutycznych w tych chorobach.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Banchereau J., Steinman R.M.: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998; 392: 245–252
- [2] Barton G.M.: Viral recognition by Toll-like receptors. *Semin. Immunol.*, 2007; 19: 33–40
- [3] Bigger C.B., Brasky K.M., Lanford R.E.: DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J. Virol.*, 2001; 75: 7059–7066
- [4] Biron C.A., Nguyen K.B., Pien G.C., Cousens L.P., Salazar-Mather T.P.: Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu. Rev. Immunol.*, 1999; 17: 189–220
- [5] Broering R., Wu J., Meng Z., Hilgard P., Lu M., Trippier M., Szczeponek A., Gerken G., Schlaak J.F.: Toll-like receptor – stimulated non-parenchymal liver cells can regulate hepatitis C virus replication. *J. Hepatol.*, 2008; 48: 914–922

- [6] Dolganiuc A., Oak S., Kodys K., Golenbock D.T., Finberg R.W., Kurt-Jones E., Szabo G.: Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger Toll-like receptor 2-mediated pathways and inflammatory activation. *Gastroenterology*, 2004; 127: 1513–1524
- [7] Dustin L.B., Rice C.M.: Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annu. Rev. Immunol.*, 2007; 25: 71–99
- [8] Guidotti L.G., Chisari F.V.: Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu. Rev. Immunol.*, 2001; 19: 65–91
- [9] Horsmans Y., Berg T., Desager J.P., Mueller T., Schott E., Fletcher S.P., Steffy K.R., Bauman L.A., Kerr B.M., Averett D.R.: Isatoribine, an agonist of TLR7, reduces plasma virus concentration in chronic hepatitis C infection. *Hepatology*, 2005; 42: 724–731
- [10] Ito T., Kanzler H., Duramad O., Cao W., Liu Y.J.: Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood*, 2006; 107: 2423–2431
- [11] Kanzler H., Barrat F.J., Hessel E.M., Coffman R.L.: Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat. Med.*, 2007; 13: 552–559
- [12] Kimura K., Kakimi K., Wieland S., Guidotti L.G., Chisari F.V.: Interleukin-18 inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. *J. Virol.*, 2002; 76: 10702–10707
- [13] Knolle P.A., Gerken G.: Local control of the immune response in the liver. *Immunol. Rev.*, 2000; 174: 21–34
- [14] Kopydlowski K.M., Salkowski C.A., Cody M.J., van Rooijen N., Major J., Hamilton T.A., Vogel S.N.: Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.*, 1999; 163: 1537–1544
- [15] Krieg A.M.: Antiinfective applications of toll-like receptor 9 agonists. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 2007; 4: 289–294
- [16] Lee J., Wu C.C., Lee K.J., Chuang T.H., Katakura K., Liu Y.T., Chan M., Tawatao R., Chung M., Shen C., Cottam H.B., Lai M.M., Raz E., Carson D.A.: Activation of anti-hepatitis C virus responses via Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 1828–1833
- [17] Medzhitov R., Janeway C. Jr.: Innate immunity. *N. Engl. J. Med.*, 2000; 343: 338–344
- [18] Migglin S.M., O'Neill L.A.: New insights into the regulation of TLR signaling. *J. Leukoc. Biol.*, 2006; 80: 220–226
- [19] Mozer-Lisewska I., Sluzewski W., Kaczmarek M., Jenek R., Szczepanski M., Figlerowicz M., Kowala-Piaskowska A., Zeromski J.: Tissue localisation of Toll-like receptors in biopsy specimens of liver from children infected with hepatitis C virus. *Scand. J. Immunol.*, 2005; 62: 407–412
- [20] Norris S., Collins C., Doherty D.G., Smith F., McEntee G., Traynor O., Nolan N., Hegarty J., O'Farrelly C.: Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. *J. Hepatol.*, 1998; 28: 84–90
- [21] Pockros P.J., Guyader D., Patton H., Tong M.J., Wright T., McHutchison J., Meng T.C.: Oral resiquimod in chronic HCV infection: safety and efficacy in 2 placebo-controlled, double-blind phase IIa studies. *J. Hepatol.*, 2007; 47: 174–182
- [22] Riordan S.M., Skinner N.A., Kurtovic J., Locarnini S., McIver C.J., Williams R., Visvanathan K.: Toll-like receptor expression in chronic hepatitis C: correlation with pro-inflammatory cytokine levels and liver injury. *Inflamm. Res.*, 2006; 55: 279–285
- [23] Sallusto F., Lanzavecchia A.: The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Res.*, 2002; 4(Suppl.3): S127–S132
- [24] Schott E., Witt H., Neumann K., Taube S., Oh D.Y., Schreiber E., Vierich S., Puhl G., Bergk A., Halangk J., Weich V., Wiedenmann B., Berg T.: A Toll-like receptor 7 single nucleotide polymorphism protects from advanced inflammation and fibrosis in male patients with chronic HCV-infection. *J. Hepatol.*, 2007; 47: 203–211
- [25] Schwabe R.F., Seki E., Brenner D.A.: Toll-like receptor signaling in the liver. *Gastroenterology*, 2006; 130: 1886–1900
- [26] Szabo G., Dolganiuc A., Mandrekar P.: Pattern recognition receptors: a contemporary view on liver diseases. *Hepatology*, 2006; 44: 287–298
- [27] Thompson J.M., Iwasaki A.: Toll-like receptors regulation of viral infection and disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008; 60: 786–794
- [28] Trinchieri G., Sher A.: Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. Immunol.*, 2007; 7: 179–190
- [29] Trobonjaca Z., Leithäuser F., Möller P., Schirmbeck R., Reimann J.: Activating immunity in the liver. I. Liver dendritic cells (but not hepatocytes) are potent activators of IFN- γ release by liver NKT cells. *J. Immunol.*, 2001; 167: 1413–1422
- [30] Visvanathan K., Skinner N.A., Thompson A.J., Riordan S.M., Sozzi V., Edwards R., Rodgers S., Kurtovic J., Chang J., Lewin S., Desmond P., Locarnini S.: Regulation of Toll-like receptor-2 expression in chronic hepatitis B by the precore protein. *Hepatology*, 2007; 45: 102–110
- [31] Wu J., Bröring R., Schlaak J.F.: The role of the innate immune system of the liver in the control of HBV and HCV. *Virologica Sinica*, 2008; 23: 116–123
- [32] Zuckerman E., Pavlotzky E., Toubi E.: Enhanced expression of Toll-like receptor 7 and 9 in peripheral B cells in chronic hepatitis C infection: implications for HCV-related autoimmunity. *J. Hepatol.*, 2008; 48(Suppl.2): S238 (639)

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.