

Receptory TLR w zarażeniach pierwotniakami

JOANNA ŚLIWA, PAULINA NIEDŹWIEDZKA,
BEATA TOKARZ-DEPTUŁA, WIESŁAW DEPTUŁA

Katedra Mikrobiologii i Immunologii Wydziału Nauk Przyrodniczych US, ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin

Śliwa J., Niedźwiedzka P., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.

Toll-like receptors in protozoan infection

Summary

Parasite diseases constitute a tremendous danger for human life all over the world, hence there is an urgent need for the recognition of the defense mechanisms of our body against these protozoan pathogens. The aim of this review has been to present the role of Toll-like receptors (TLRs) as constituents of innate immunity engaged in the fight against parasites, mainly protozoan, that are the cause of illness among people and animals. This review also shows the means by which the protozoan can control the immunological response to extend their survival inside the host.

Keywords: TLR, parasite

Zarażenia pasożytami stanowią poważny problem na całym świecie, gdyż są przyczyną uciążliwych i trudnych do wyleczenia chorób, zarówno ludzi, jak i zwierząt, często są także przyczyną śmierci. Nadal brak jest szczepionek przeciwko zarażeniom tymi pasożytami, a rozwijająca się ich lekooporność jest narastającym problemem. W walkę z pasożytami zaangażowany jest układ odpornościowy (UO) makroorganizmów, który już we wczesnych etapach inwazji pasożytów szybko wykrywa je i reaguje, m.in. dzięki niedawno odkrytym znacznikom odporności naturalnej, jakimi są receptory Toll-podobne (TLR) (13, 18, 26, 35, 36).

TLR to ważna grupa znaczników, dla których zidentyfikowano ligandy na pasożytach i zarazkach oraz opisano ścieżki sygnałne w komórkach UO zależne od tych receptorów (13, 18, 26, 35, 36). Są one klasycznym przykładem znaczników rozpoznających patogeny – PRR (patogen recognition receptors), dla których ligandami są struktury egzogenne, pochodzące z zarazków oraz endogenne, pochodzące od komórek gospodarza, a które są określane jako wzorce molekularne patogenów – PAMP (pathogen associated molecular patterns) (13, 18, 26, 36). TLR, łącząc się z różnymi ligandami, indukują syntezę wielu cytokin prozapalnych, wpływając na odporność wrodzoną, choć także na nabytą (13, 18, 26, 36). Dotychczas zostało opisanych 13 znaczników TLR, które poprzez ich zdolność do łączenia się z PAMP-ami silnie aktywizuje UO w makroorganizmie. Ze względu na powinowactwo do specyficznych ligand, dziesięć z nich zostało zgrupowanych w 5 podrodzinach, to jest: TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 i TLR9 (13). Analiza budowy receptorów TLR, wykazała ich wysokie podobieństwo wzglę-

dem siebie, aczkolwiek rola, jaką każdy z nich pełni w UO, jest różna (13, 26, 36). TLR-y to cząsteczki glikoproteinowe, należące do grupy receptorów transmembranowych występujących na błonach (głównie TLR 2, 4, 5) i w cytoplazmie (głównie TLR 3, 7, 8, 9) (13, 26, 36). Tworzy je część zewnątrzkomórkowa, którą warunkują domeny z powtórzeniami bogatymi w leucynę – LRR (Leucin Rich Repeats), rozpoznająca patogeny (pierwotniaki) oraz część pozabłonowa i odcinek wewnątrzcytoplazmatyczny z domeną TIR (13, 26, 36). Receptory TLR mogą działać jako pojedyncze cząsteczki, jak też mogą tworzyć postacie homodimeryczne (para identycznych cząsteczek TLR) lub heterodimeryczne (dwie różne cząsteczki TLR) i takie ich występowanie rozszerza zakres rozpoznawanych przez nie PAMP (13, 26, 36).

Receptory TLR w organizmach ssaków występują na powierzchni komórek UO, komórkach nabłonkowych przewodu pokarmowego i oddechowego, śródbłonku naczyń, w tym naczyń krwionośnych skóry, adipocytach, kardiomiocytach, fibroblastach oraz komórkach śledziony, nerek, grasicy, płuc i mikrogleju (13, 26, 36). Rozlokowane w ten sposób, mają dużą możliwość wychwytywania i łączenia się z PAMP patogenów, dostających się do makroorganizmu, co umożliwia powstawanie reakcji prowadzącej do mobilizacji i aktywacji systemu odpornościowego (13, 26, 36).

Rola receptorów TLR w zarażeniach pierwotniakami

Wykazano, że znaczniki TLR odgrywają ważną funkcję w reakcjach makroorganizmu na zarażenia pasożytami, w tym głównie w rozpoznawaniu ich po-

przez system odpornościowy i w wielu przypadkach biorą udział w patogenezie tych zarażeń (13, 18, 36). Pierwotniaki, podobnie jak cząsteczki wirusów lub bakterii, mają także specjalne struktury wzmacniające odpowiedź, czyli PAMP (18). W porównaniu z bakteryjnymi czy wirusowymi, PAMP-y pierwotniacze są obecnie jeszcze we wczesnej fazie badania (18).

Do tej pory wykazano, że głównym ligandem receptorów TLR aktywujących UO po zarażeniu makroorganizmu pierwotniakami jest glikofosfatydyloinozitol (GPI), występujący licznie w błonach pasożytów (9, 18). Opisano, że GPI bądź jego fragmenty, pochodzące od *Leishmania major*, *Trypanosoma (T) brucei*, *T. cruzi*, *Plasmodium falciparum* czy *Toxoplasma gondii*, aktywują komórki UO zarówno pochodzenia limfoidalnego, jak i mieloidalnego (8, 11, 12, 25, 28, 33). Dla stadium trypomastigota *T. cruzi*, pochodzących z ssaczy komórek, prozapalna aktywność kotwic GPI zależy od ultrastruktury ich samych. Są one kowalencyjnie połączone z glikoproteinami mucynopodobnymi (GPI mucin) i występują na powierzchni pasożyta (8, 18). Wykazano, że nienasycony, tłuszczowy łańcuch acylowy i elementy wrażliwe na nadtlenek z kotwic GPI, pochodzące od *T. cruzi*, potrzebne są, między innymi, do wyzwolenia produkcji cytokin przez makrofagi (8, 18). Dowiedziono, że GPI oczyszczone z mucynopodobnych glikoprotein (tGPI-mucyna) uzyskane ze stadium trypomastigota *T. cruzi* (tGPI), odgrywają, poza syntezą cytokin, także istotną rolę w pobudzaniu innych funkcji makrofagów, choć wykazano też, że ich silna prozapalna aktywność jest zależna od ich ultrastruktury (9, 18). Stwierdzono, że komórki linii makrofagowej, zarażone trypomastigotami *T. cruzi*, produkują IL-12, która jest odpowiedzialna za inicjację syntezy IFN- γ przez komórki NK (17, 18). Dowiedziono też, że ten IFN- γ to najważniejsza cytokina w mechanizmach stymulujących działanie efektorowe UO, włączając w to syntezę RNI (reactive nitrogen intermediates) – elementu zasadniczego w kontrolowaniu replikacji tych pasożytów w czasie ostrej parazytozy (17). Zarejestrowano, że cząsteczki pasożyta *T. cruzi*, również dzięki indukcji syntezy TNF- α , dostarczają drugiego sygnału do optymalnej produkcji RNI przez makrofagi bogate także w IFN- α (17). Stwierdzono nadto, że ta początkowa indukcja prozapalnych cytokin skutkuje rozwojem i aktywacją komórek Th₁, które to elementy warunkują nabytą odpowiedź immunologiczną, w której pośredniczy IFN- γ , limfocyty T CD8⁺ oraz przeciwciała – podstawowy element warunkujący rozwój pasożytów w chronicznej fazie zarażenia (17). Dowiedziono, że GPI otrzymane z *T. cruzi* wywołują głównie poprzez TLR2 fosforylację kinazy MAPK (mitogen-activated protein kinase) oraz czynnika I κ B (inhibitor of nuclear factor- κ B), a także aktywują jądrowy czynnik transkrypcyjny NF- κ B (nuclear factor- κ B) (18). Zarejestrowano także, że TLR2 biorąc udział w zarażeniach *T. cruzi*, wywołuje hipertrofię kardiomiocytów i komórek ota-

czających zależną od IL-1 β , choć stan ten jest aktywowany również poprzez NF- κ B, który to czynnik wpływa na rozpoczęcie syntezy IL-1 β (30). Trzeba dodać również, że zależna od TLR2 kaskada sygnałowa może być zainicjowana w momencie, gdy ligandy *T. cruzi*, znajdujące się na powierzchni lub wydzielane przez infekcyjne trypomastigoty, wiążą się z heterodimerem TLR2-6 występujących na powierzchni kardiomiocytów (30). Takie zdarzenie wywołuje także aktywację NF- κ B, co prowadzi do indukcji syntezy prozapalnych cytokin, w tym IL-1 β , która to interleukina aktywuje program odpowiedzi hipertroficznej w komórkach zainfekowanych i komórkach otaczających (30). Udowodniono, że w rozpoznaniu GPI wymagana jest obecność CD14 – białka, które rozpoznaje bakteryjny LPS za pomocą TLR4. W badaniach prowadzonych nad zdolnością pasożytów *T. cruzi* do pobudzania TLR2 i TLR4 zarejestrowano, że różne kotwice GPI, a także, będące kolejnym ligandem glikoinozytofosfolipidy (GIPL), otrzymane ze stadiów trypomastigoty i epimastigoty tego pasożyta, wykazują różnorodny potencjał w aktywowaniu zależnej od NF- κ B ekspresji w komórkach CHO (Chinese Hamster Ovary cells) (9). Dowiedziono, że sam GIPL inicjuje rozpoznanie pasożytów *T. cruzi* przez wrodzone elementy układu odpornościowego gospodarza (9). Zarejestrowano, że podczas gdy kotwice GPI wywołują syntezę prozapalnych cytokin oraz syntezę NO przez makrofagi, GIPL i lipofosfoglikany (LPG) znajdujące się także na powierzchni błony pierwotniaków, mogą tłumić odpowiedź gospodarza na zarażenia, zwłaszcza wówczas, kiedy występuje ich wysoka koncentracja (9), tym bardziej, że pojawiające się GIPL na powierzchni błony pasożytów, zarówno jako GPI kotwice dla glikoprotein i polisacharydów lub jako wolne GIPL, zawierają identyczną strukturę rdzenia GPI (29). Badając różne sekwencje oligosacharydowe i struktury lipidowe większości GIPL, wyodrębnionych z różnych szczepów *T. cruzi*, stwierdzono jednocześnie ich heterogenność zarówno między różnymi szczepami pasożytów, jak i wewnątrz pojedynczego szczepu (29). W badaniach tych (29) potwierdzono prozapalne właściwości GIPL, który jest rozpoznawany dzięki TLR4. Na myszach udowodniono, że brak TLR4 czy MyD88 powoduje u tych zwierząt większą podatność na infekcję *T. cruzi* oraz zwiększoną ich śmiertelność (30). Stwierdzono również, że u myszy pozbawionych TLR2 dochodzi do zahamowania syntezy cytokin prozapalnych w makrofagach, jednak proces ten nie zmienia przebiegu tej parazytozy i nie wpływa na wskaźnik śmiertelności u zarażonych zwierząt (30).

Obraz aktywacji UO opisany w przypadku *T. cruzi*, jest także obserwowany w zarażeniach *Leishmania spp.*, który to pasożyt również posiada cząsteczki związane z GPI, wywołujące aktywację TLR. W tym przypadku stwierdzono na powierzchni stadium infekcyjnego promastigoty, obecność lipofosfoglikanów (LPG) (4). Wykazano (4, 11), że wyodrębnione LPG z *Leish-*

mania major stymulują mysie makrofagi i ludzkie komórki NK dzięki receptorom TLR2, jak też dowiedziono, że w tej odpowiedzi immunologicznej oraz kontrolowaniu rozwoju tego pasożyta bierze także udział receptor TLR4 (23). Podobnie w przypadku *Leishmania donovani*, wykazano, że pasożyt ten aktywuje makrofagi poprzez receptory TLR2. Udowodniono (23), że myszy mające mutacje w genie *tlr4* (TLR^{0/0}) nie były w stanie zapobiec schorzeniom skórnyemu występującym w przebiegu leiszmaniozy ani ograniczyć rozwoju tego pasożyta. Zauważono, że rozprzestrzenienie się tych pasożytów i ich zwiększona przeżywalność w komórkach gospodarza korelują ze zwiększoną aktywnością arginazy – enzymu, który przyspiesza ich rozwój (23). Korelacja pomiędzy wewnątrzkomórkowym rozwojem tych pasożytów a indukcją arginazy została także zaobserwowana, kiedy porównywano *in vitro* alternatywnie infekowane makrofagi ze szczepów myszy wyzdrowiałych i chorych (23). W doświadczeniu tym zaobserwowano, że rozwój pasożytów oraz poziom arginazy były znacząco wyższe w makrofagach pozyskanych od myszy wrażliwych (BALB/c) niż w makrofagach pozyskanych od myszy opornych (C57BL/6) (23), stąd przyjęto, że sygnalizacja TLR4 pomaga makrofagom bardziej efektywnie zabijać *L. major* i wydajniej kontrolować aktywność arginazy, a efekt ten można przypisać stanowi równowagi pomiędzy odpowiedzią komórek Th₁ i Th₂, ponieważ, dzięki receptorom TLR, indukcja odpowiedzi komórek Th₁ jest związana z sygnalizacją TLR, zaś odpowiedź limfocytów Th₂ – z brakiem takiej sygnalizacji (23). Nadmienić trzeba, że receptor TLR4 nie tylko oddziałuje wzajemnie z PAMP tych pasożytów, ale także rozpoznaje endogenne ligandy, takie jak ich białka szoku termicznego (HSP) oraz składniki zewnątrzkomórkowego matrix (23). Dlatego trudno obecnie określić, czy aktywacja TLR4 po zarażeniu *L. major* następuje wskutek rozpoznania PAMP pasożyta czy wskutek wzajemnego oddziaływania endogennych ligandów (23).

Rolę receptorów TLR2 i TLR4 wykazano także w zarażeniach pierwotniakami z grupy Apicomplexa, które aktywują UO poprzez GPI (28, 22). Opisano że, merozoity *Plasmodium falciparum*, poprzez cząsteczki GPI silnie indukują syntezę TNF dzięki ich interakcjom z kompleksem TLR1-TLR2 oraz w mniejszym stopniu TLR4 (28). Stwierdzono również, że zarażenie *Toxoplasma gondii* powoduje, za pomocą kotwic GPI tego pasożyta, stymulację UO poprzez TLR2 i TLR4, co manifestuje się pobudzeniem aktywności NF- κ B i zwiększoną syntezą TNF w makrofagach (18).

W ostatnich latach wykazano, że oprócz ligandów GPI i LPG opisanych u pierwotniaków, które w większości skupiają uwagę badaczy, odkryto także inne cząsteczki, które zaliczono do grupy PAMP. Przykładem może być białko Tc52, otrzymane z *T. cruzi*, którego poziom wzrasta przy intensywnej parazytemii tym pasożytem, a które aktywuje TLR2, z włączeniem syn-

tezy przez makrofagi prozapalnych cytokin, takich jak: IL-8 i MIP-1 α , przy jednoczesnym braku sekrecji TNF- α (32). Zarejestrowano także, że taka immunizacja makrofagów białkiem Tc52 znosi immunosupresję obserwowaną w czasie ostrej fazy zarażenia tym pasożytem i w ten sposób dochodzi do stymulacji komórek B i T (32). Dowiedziono także, że białko Tc52 nie tylko aktywuje makrofagi, ale także aktywuje dojrzewanie ludzkich i mysich komórek dendrytycznych (DC), a przez to chroni myszy przed letalną infekcją *T. cruzi* (32). Udowodniono, że indukcja dojrzewania komórek DC oraz ich aktywacja następują poprzez dwie domeny białka Tc52, z których jedna wiąże się z TLR2, natomiast druga wchodzi w interakcje ze strukturami na powierzchni komórek dendrytycznych (32).

Inne badania (35) wskazują także na rolę genomowego DNA niektórych pierwotniaków jako liganda dla TLR9. Stwierdzono, że u *T. cruzi*, *T. brucei* i *Babesii bovis* ich DNA rozpoznawane jest przez TLR9 i w ten sposób dochodzi do aktywacji zarówno makrofagów, jak i komórek dendrytycznych, dzięki obecności niemetylowanych motywów CpG (35). U myszy doświadczalnie stwierdzono, że do kontroli rozwoju parazytemii wywołanej *T. brucei* konieczne są znaczniki TLR9 (14). Wykazano, że zwierzęta te, bez tegoż receptora zarażone *T. brucei*, miały zwiększoną liczbę pasożytów w organizmie, a makrofagi słabo reagowały na PAMP *T. brucei*, jakim jest genomowe DNA (14).

Dalszym ligandem dla znaczników TLR, poza wymienionymi, jest także hemozyna (HZ), która mobilizuje, zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*, naturalną odporność, czego efektem jest produkcja wielu cytokin, chemokin, a także regulacja cząsteczek koostymulujących (10). Hemozyna, jako pigment w wakuolach *Plasmodium (P) sp.* jest także produktem degradacji cząsteczek hemu erytrocytów (10). Wewnątrzkomórkowa hemozyna *Plasmodium sp.* jest uwalniana do krążenia w momencie rozpadu schizontów, a następnie fagocytowana przez makrofagi czy komórki DC, co skutkuje nagromadzeniem się jej w fagosomach, a w rezultacie prowadzi do rekrutowania z retikulum endoplazmatycznego receptorów TLR9, które ją rozpoznają (10). Wykazano także, że TLR9 rozpoznaje również hemozynę otrzymaną z erytrocytów, wewnątrz których stwierdza się obecność merozoitów *P. falciparum* (18, 20). Dowiedziono, że hemozyna wyodrębniona z *P. falciparum* aktywuje także makrofagi do produkcji prozapalnych cytokin, chemokin i wpływa na dojrzewanie komórek DC (10). Substancja ta, zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* aktywuje również makrofagi u myszy, poprzez receptor TLR9 i poprzez drogę zależną od Myd88 (10), co można zahamować chlorochiną – powszechnym lekiem przeciwmalarycznym (10).

Kolejnym ligandem aktywującym TLR-y, opisanym u pierwotniaka, jakim jest *T. gondii*, jest białko profilinopodobne (PFTG – profilin-like protein), które jest

obecne w nadmiarze w rozpuszczalnych preparatach antygenowych, uzyskanych z jego kultur (24, 41). Białko to, występując tylko w komórkach eukariotycznych, należy do rodziny protein wiążących aktyne i pełni rolę regulacyjną w jej polimeryzacji (24, 41). Badania pokazały, że profilina *T. gondii* jest homologiczna tylko z genem profilinowym pasożytów *P. falciparum* wywołujących malarię (24) i stąd też spekuluje się, że TLR11 może również być zaangażowany w rozpoznanie tych pasożytów (24). Białko to, oddziaływujące aktywnie na TLR11, wykryto także w komórkach myszy oraz u większości Apicomplexa – jako stosunkowo konserwatywną strukturę (18, 41). Wprawdzie przyjmuje się, że jego rola w komórkach u pierwotniaków do końca nie jest poznana, ale zakłada się, że może ono służyć jako PAMP pierwotniaczy, gdzie, będąc rozpoznawanym przez TLR11, indukuje syntezę IL-12 w komórkach DC (18). Trzeba dodać, że cytokina ta, produkowana w tych komórkach i wymagająca obecności MyD88, jest podstawową cząsteczką tworzącą odporność w trakcie zarażenia *T. gondii* (41). Wykazano, że u myszy pozbawionych TLR11 zarejestrowano zwiększoną podatność na zakażenia *T. gondii*, wywołaną wskutek spadku syntezy IL-12 (41). Warto również dodać, że ochrona makroorganizmu przeciwko *T. gondii* warunkowana jest ilością i aktywnością IFN- γ , TNF- α , a także aktywnością makrofagów (27). Nadto zarejestrowano, że w rozpoznawaniu PAMP *T. gondii* biorą udział również TLR2 oraz TLR4, którego aktywność jest związana z dawką pasożytów, jako że u myszy pozbawionych TLR2 zarejestrowano liczne zejścia śmiertelne (27). Wykazano, że myszy z deficytem TLR2 padły w przeciągu 8 dni po infekcji 300 cystami pasożyta, natomiast po podaniu myszom pozbawionym receptorów TLR2 odpowiednio 100 i 50 cyst odnotowano 80% i 100% przeżywalności w czasie trwania doświadczenia (27). Natomiast w przypadku TLR4 wykazano, że jego brak przy zarażeniu myszy *T. gondii* powoduje szybką ekspresję na powierzchni neutrofilii TNF- α , choć zarejestrowano również, że pasożyt ten działa supresyjnie na tę cytokinę (5). W przypadku ludzi zarażonych tym pasożytem wykazano, że PFTG nie w pełni aktywuje komórki DC do produkcji IL-12, ponieważ ludzki gen kodujący znacznik TLR11 ma przedwczesny kodon stop, stąd zakłada się, że koduje on нефunkcjonalną formę TLR11 (24). Jednocześnie przypuszcza się, że u ludzi TLR11 po części jest zaangażowany w obronę organizmu w czasie infekcji *T. gondii* w sposób pośredni, jako że przyjmuje się, że ochronna rola receptora TLR11 przekazywana jest razem z chorobą kotom, a następnie koty mogą przekazywać ją ludziom (24).

Dalszymi cząsteczkami, które mobilizują UO do obrony przeciwko pasożytom są białka szoku termicznego (HSP) wytwarzane i opisane u tachyzoitów *T. gondii* oraz inne, częściowo oczyszczone preparaty z tego stadium, które wykazały aktywujący wpływ, kolejno, na TLR4 i TLR2 (3, 18). Trzeba dodać, że po

aktywacji sygnału przez PAMP tego pasożyta dochodzi do interakcji z takimi białkami adapterowymi, jak MyD88, który transdukuje sygnał dla każdego TLR (oprócz TLR3), TIRAP, aktywujący TLR2 i TLR4 lub TRIF „używany” przez TLR3 i TLR4 bądź też TRAM, który wykazano, że współdziała tylko z TLR4 (13, 16, 19, 31, 39, 40). Dowiedziano także, że myszy pozbawione MyD88 są wysoce podatne na zakażenia wywołane przez *T. gondii*, jako że ginęły w ciągu 10 dni od zarażenia (18). Wzrost wrażliwości tych zwierząt na tę parazytozę był związany z zaburzoną produkcją cytokin oraz zwiększoną syntezą przez komórki Th₁ – IFN γ i IL-12 (18). Podobnie było w przypadku myszy z deficytem MyD88 zarażonych *T. cruzi* i *T. brucei* (18). Odmienne zmiany zaobserwowano u myszy z brakiem MyD88 zakażonych *Plasmodium berghei* (główny czynnik wywołujący malarię gryzoni), u których stwierdzono wprawdzie zaburzenia w produkcji cytokin, lecz choroba charakteryzowała się lżejszym przebiegiem i mniejszą śmiertelnością (1). W przypadku tym pierwotniak dodatkowo nie powodował uszkodzenia wątroby – co jest charakterystyczne dla tego zarażenia tym pasożytem myszy (1). Stwierdzić zatem należy, że pomimo wykazania istotnej sygnalizacji TLR w odporności na zarażenia pierwotniakami *T. cruzi*, *T. brucei*, *T. gondii*, *L. major*, *P. berghei*, jaką zaobserwowano u myszy z Myd88^{-/-}, pozbawiając myszy któregoś ze znaczników TLR, nie dochodzi, w większości przypadków, do wyraźnego wzrostu wrażliwości na zarażenia tymi patogenami i większej śmiertelności. Dowodem tego może być brak TLR2 rozpoznającego GPI-kotwice, przy którym to stanie nie rejestrowano większej podatności myszy na zakażenia *T. cruzi*, natomiast u myszy z brakiem TLR9 zauważono, po zarażeniach *T. cruzi*, *T. brucei* i *Toxoplasma gondii*, cięższy przebieg parazytozy, jak również przypadki śmiertelne, choć nie były one tak intensywne, jak w przypadku myszy Myd88^{-/-}.

Regulacja aktywacji receptorów TLR w zarażeniach pierwotniakami

Reakcje prozapalne, zależne od TLR, które są wywołane przez zarażenia pierwotniakami, muszą być kontrolowane, by nie doszło do patologicznych stanów i śmierci organizmu. Dla pasożyta nadmierna odpowiedź ze strony UO nie jest dobra, ponieważ żywiciel musi być żywy wystarczająco długo, by pasożyt mógł czerpać z niego korzyści i w ostateczności przenieść się do żywiciela następnego. W związku z tym przy każdym zarażeniu pierwotniakami następuje indukcja endogennych antyzapalnych czynników. Indukcja tych czynników nie tylko jest reakcją na nadmierną odpowiedź UO, ale również, przynajmniej w niektórych przypadkach, może bezpośrednio ułatwić bytowanie pasożyta. Do endogennych czynników antyzapalnych należy IL-10, która jest indukowana w czasie trwania parazytoz pierwotniaczych i która znana jest ze swych możliwości obniżania produkcji

takich czynników prozapalnych, jak IL-12, TNF i RNI, które z kolei są aktywowane dzięki ścieżkom sygnałnym poprzez receptory TLR (18, 31). Wykazano (18), że IL-10 nie tylko kontroluje odpowiedź prozapalną oraz mechanizmy efektorowe komórek UO, ale także pozwala pierwotniakom na długotrwałe pasożytowanie wewnątrz żywiciela. Odkryto również, że niektóre pasożyty, m.in. *Plasmodium chaubadi*, *Leishmanii chagasi*, *T. cruzi* i *Toxoplasma gondii*, indukują produkcję TGF- β (transforming growth factor- β) – cytokinę, także mającą właściwości antyzapalne i sprzyjającą przeżyciu tych pierwotniaków w żywicielu. Dowiedziono (2, 18), że indukcja lipoksyny A₄ (lipoxin A₄) i eikozanoidów w zarażeniach pasożytami, prowadzi do obniżenia regulacyjnego działania IL-12, co w konsekwencji hamuje patogenne ich działanie. Udowodniono, że pierwotniaki wykształciły w sobie także umiejętności pozwalające na regulowanie aktywacji TLR (18). Oprócz tego, że wykorzystują czynniki prozapalne syntetyzowane przez elementy UO, także same w sposób swoisty ingerują w ścieżki sygnałne TLR, co ma umożliwić dłuższe ich przeżycie w żywicielu. Przykładem może być *Toxoplasma gondii*, który bezpośrednio aktywuje STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), przez co obniża produkcję IL-12 i TNF oraz możliwość stymulowania komórek T. Wykazano (5), że *T. gondii* także częściowo blokuje indukowaną LPS-em sekrecję TNF- α przez neutrofile, a infekując komórki DC, sprawia, że nie są one w stanie osiągnąć dojrzałości. Stwierdzono (6), że w makrofagach pozbawionych STAT3 zdolność *T. gondii* do blokady produkcji cytokin, indukowanej LPS, jest wysoce obniżona. Zarejestrowano (21) również, że *Toxoplasma gondii* reguluje zależną od LPS aktywację MAPK (mitogen-activated protein kinase), a w szczególności aktywację białka p38 MAPK, które są potrzebne do produkcji IL-12. Dowiedziono również, że celem tego pierwotniaka staje się także aktywacja NF- κ B (7, 34). Stwierdzono (7, 34), że pomimo indukcji – w czasie zarażenia, szybkiej fosforylacji i degradacji I κ B, czynnik NF- κ B zostaje unieruchomiony i nie może przemieszczać się do jądra. Zaburzenia działania czynnika I κ B oraz NF- κ B stwierdzono także w przypadku zarażenia *Leishmania mexicana* (38). Wykazano, że stadium rozwojowe – amastigota tego pasożyta – tłumi produkcję IL-12 poprzez proteazę cysteinową. Przykładem regulacji przez tego pierwotniaka aktywności TLR może być też aktywacja ścieżki ERK1/ERK2 MAPK, dzięki której, np. *Leishmania major* ma możliwość obniżenia produkcji przez makrofagi IL-12 (15). Jako kolejny przykład regulacji TLR można podać deaktywację komórek dendrytycznych, które stają się niewrażliwe na działanie poprzez receptory TLR, wskutek oddziaływań PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1), elementów znajdujących się na powierzchni erytrocytów zarażonych *Plasmodium falciparum*, a które wchodzi w interak-

cje z białkiem CD36 występujących na komórkach żywiciela (37).

Podsumowanie

Receptory TLR odgrywają istotną rolę nie tylko w regulacji odpowiedzi immunologicznej na zakażenia bakteryjne, grzybicze i wirusowe (13, 26, 36), ale są również ważnym elementem w zarażeniach pasożytniczych, w tym pierwotniaków, jako że poprzez swoje działanie prowadzą do wzmożonej syntezy czynników przeciwpasożytniczych, w tym prozapalnych cytokin. Poznanie roli i dróg oddziaływania tych receptorów w mechanizmach reakcji z PAMP pasożytów, w tym pierwotniaków, to nowy krok do odnalezienia innowacyjnych rozwiązań w walce z nimi. Natomiast poznanie mechanizmów leżących u podstaw rozpoznawania pierwotniaków przez receptory i komórki UO, w tym elementy odporności wrodzonej, pozwoli, być może, na stworzenie nowych strategii efektywnej profilaktyki i terapii u zarażonych tymi pasożytami.

Piśmiennictwo

1. Adachi K., Tsutsui H., Kashiwamura S.-I., Seki E., Nakano H., Takeuchi O., Takeda K., Okumura H., Akira S., Nakanishi K.: Plasmodium berghei infection in mice induces liver injury by an IL-12 and Toll-like receptor/MyD88-dependent mechanism. *J. Immunol.* 2001, 167, 5928-5934.
2. Aliberti J., Serhan C., Sher A.: Parasite-induced lipoxin A₄ is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection. *J. Exp. Med.* 2002, 196, 1253-1262.
3. Aosai F., Chen M., Kang H. K., Norose K., Piao L. X., Kobayashi M., Takeuchi O., Akira S., Yano A.: *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein HSP70 functions as a B cell mitogen. *Cell Stress Chaperones.* 2002, 7, 357-364.
4. Becker I., Salaiza N., Aquirre M., Delgado J., Carillo-Carrasco N., Kober L. G., Ruiz A., Cerrantes R., Torres A. P., Cabrera N., Gonzales A., Maldonado C., Isibasi A.: *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through Toll-like receptor 2. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2003, 130, 65-74.
5. Bennouna S., Sukhumavasi W., Denkers E. Y.: *Toxoplasma gondii* inhibits Toll-Like receptor 4 ligand-induced mobilization of intracellular tumor necrosis factor alpha to the surface of mouse peritoneal neutrophils. *Infect. Immun.* 2006, 74, 4274-4281.
6. Butcher B. A., Kim L., Panopoulos A. D., Watowich S. S., Murray P. J., Denkers E. Y.: IL-10-independent STAT3 activation by *Toxoplasma gondii* mediates suppression of IL-12 and TNF- α in host macrophages. *J. Immunol.* 2005, 174, 3148-3152.
7. Butcher B. A., Kim L., Johnson P. F., Denkers E. Y.: *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation factor NF- κ B. *J. Immunol.* 2001, 167, 2193-2201.
8. Camargo M. M., Almeida I. C., Pereira M. E., Ferguson M. A., Traversons I. R., Gazzinelli R. T.: Glycophosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *J. Immunol.* 1997, 158, 5890-5901.
9. Campos M. A. S., Almeida I. C., Takeuchi O., Akira S., Valente E. P., Procópio D. O., Travasso L. R., Smith J. A., Golenbock D. T., Gazzinelli R. T.: Activation of Toll-Like-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J. Immunol.* 2001, 167, 417-423.
10. Coban C., Ishii K. J., Kawai T., Hemmi H., Sato S., Uematsu S., Yamamoto M., Takeuchi O., Itagaki S., Kumar N., Horii T., Akira S.: Toll-like receptor 9 mediates innate activation by the malaria pigment hemozoin. *J. Exp. Med.* 2005, 201, 19-25.
11. de Veer M. J., Curtis J. M., Baldwin T. M., DiDonato J. A., Sexton A., McConville M. J., Handman E., Schofield L.: MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur. J. Immunol.* 2003, 33, 2822-2831.
12. DeBierre-Grochkego F., Azzouz N., Schmidt J., Dubremetz J. F., Geyer R., Weingart, Schmidt R. R., Schwarz R. T.: Roles of glycophosphatidylinositols

- of *Toxoplasma gondii*. Induction of tumor necrosis factor- α production in macrophages. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 32987-32993.
13. *Deptula W., Tokarz-Deptula B., Niedźwiedzka P.*: Rola i znaczenie receptorów Toll-podobnych w odporności. *Post. Mikrobiol.* 2006, 45, 221-231.
 14. *Drennan M. B., Stijlemans B., Abbeele J., Qesniaux W. J., Barkhuizen M., Brombacher, Baetselier P., Ryffel B., Mages S.*: The induction of a type 1 immune response following a *Trypanosoma brucei* infection is MyD88 dependent. *J. Immunol.* 2005, 175, 2501-2509.
 15. *Feng G.-J., Goodridge H. S., Harnett M. M., Wei X.-O., Hiclaer A. V., Higson A. P., Liew F.-Y.*: Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: *Leishmania phosphoglycans* subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. *J. Immunol.* 1999, 163, 6403-6412.
 16. *Fitzgerald K. A., Palsson-McDermott E. M., Bowie A. G., Jefferies C. A., Mansell A. S., Print E., Dunne A., Gray P., Harte M. T., McMurray D., Smith D. E., Sims J. E., Bird T. A., O'Neil L. A. J.*: Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor 4 signal transduction. *Nature* 2001, 413, 78-83.
 17. *Gazinelli R. T., Ropert C., Campos M. A.*: Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunol. Rev.* 2004, 201, 9-25.
 18. *Gazzinelli R. T., Denkers E. Y.*: Protozoan encounters with Toll-like receptors signaling pathways. *Nat. Rev. Immunol.* 2006, 6, 895-906.
 19. *Hornig T., Barton G. M., Flavell R. A., Medzhitov R.*: The adaptor molecule TIRAP provides signaling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 2002, 420, 329-333.
 20. *Jaramillo M., Plante J., Qellet N., Vandal K., Tessier P. A., Olivier M.*: Hemozoin-inducible proinflammatory events in vivo: potential role in malaria infection. *J. Immunol.* 2004, 172, 3101-3110.
 21. *Kim L., Butcher B. A., Denkers E. Y.*: *Toxoplasma gondii* interferes with lipopolysaccharide-induced mitogen-activated protein kinase activation by mechanism distinct from endotoxin tolerance. *J. Immunol.* 2004, 172, 3003-3010.
 22. *Krishnegowda G., Hajjar A. M., Zhu J., Douglass E. J., Uematsu S., Akira S., Woods A. S., Gowda A. C.*: Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycoposphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycoposphatidylinositol (GPI) structural requirement and regulation of GPI activity. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 8606-8616.
 23. *Kropf P., Freudenberg M. A., Modolell M., Price H. P., Herath S., Antoniazzi S., Galanos C., Smith D. F., Muller I.*: Toll-Like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect. Immun.* 2004, 72, 1920-1928.
 24. *Lauw F. N., Caffrey D. R., Golenbock D. T.*: Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. *Trends Immunol.* 2005, 26, 509-511.
 25. *Mages S., Sajlemans B., Radwanska M., Pays E., Ferguson M. A. J., De Baetselier P.*: The glycosyl-inositol-phosphate and dimyristoylglycerol moieties of the glycoposphatidylinositol anchor of the trypanosome variant-specific surface glycoprotein are distinct macrophage-activating factors. *J. Immunol.* 1998, 160, 1949-1956.
 26. *Majewska M., Szczepanik M.*: Rola receptorów toll-podobnych (TLR) w odporności wrodzonej i nabytej oraz ich funkcja w regulacji odpowiedzi immunologicznej. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2006, 60, 52-63.
 27. *Mun H. S., Aosal F., Norose K., Chen M., Piao L. X., Takeuchi O., Akira S., Ishikura H., Yano A.*: TLR2 as an essential molecule for protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *Int. Immunol.* 2003, 15, 1081-1087.
 28. *Naik R. S., Branch O. H., Woods A. S., Vijaykumar M., Perkins D. J., Nahlen B. L., Lal A. A., Cotter R. J., Costello C. E., Ockenhouse L. F., Davidson E. A., Gowda D. C.*: Glycoposphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis. *J. Exp. Med.* 2000, 192, 1563-1576.
 29. *Oliveira A. C., Peixoto J. R., Arruda L. B., Campos M. A., Gazzinelli R. T., Golenbock D. T., Akira S., Previato J. O., Mendonca-Previato L., Norberga A., Bellio M.*: Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J. Immunol.* 2004, 173, 5688-5696.
 30. *Petersen C. A., Krumholz K. A., Burleigh B.*: Toll-Like receptor 2 regulates interleukin-1 β -dependent cardiomyocyte hypertrophy triggered by *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 2005, 73, 6974-6980.
 31. *Pestka S., Krause C. D., Sarkar D., Walter M. R., Shi Y., Fisher P. B. L.*: Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 2004, 22, 929-979.
 32. *Qaissi A., Guilvard E., Delneste Y., Caron G., Magistrelli G., Herbault N., Thielblemont N., Jeannin P.*: The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-Like receptor 2, and confers protection against lethal infection. *J. Immunol.* 2002, 168, 6366-6374.
 33. *Schofield L., Hackett F.*: Signal transduction in host cells by glycoposphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J. Exp. Med.* 1993, 177, 145-153.
 34. *Shapira S., Speirs K., Gerstein A., Caamano J., Hunter Ca.*: Suppression of NF- κ B activation by infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci.* 2005, 118, 3501-3508.
 35. *Shoda L. K., Kegerries K. A., Suarez C. E., Roditi J., Corral R. S., Bertot G. M., Norimine J., Brown W. C.*: DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor- α and nitric oxide. *Infect. Immun.* 2001, 69, 2162-2171.
 36. *Tokarz-Deptula B., Niedźwiedzka P., Deptula W.*: Nowe receptory w immunologii. *Centaur Lubuski* 2004, 63, 12-15.
 37. *Urban B. C., Willcox N., Roberts D. J.*: A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2001, 98, 8750-8755.
 38. *Weinheber N., Wolfram M., Harbecke D., Aebischer T.*: Phagocytosis of *Leishmania mexicana* amastigotes by macrophages leads to a sustained suppression of IL-12 production. *Eur. J. Immunol.* 1998, 28, 2467-2477.
 39. *Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Sanjo H., Uematsu S., Kaisho T., Hoshino K., Takeuchi O., Kobayashi M., Fujita T., Takeda K., Akira S.*: Essential role for TIRAP in activation of the signaling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 2002, 420, 324-329.
 40. *Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Hoshino K., Kaisho T., Sanjo H., Takeuchi O., Sugiyama M., Okabe M., Takeda K., Akira S.*: Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003, 301, 640-643.
 41. *Yarovinsky F., Zhang D., Andersen J. F., Bannenberg G. L., Serhan C. N., Hayden M. S., Hieny S., Sutterwala F. S., Flavell R. A., Ghosh S., Sher A.*: TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profiling-like protein. *Science* 2005, 308, 1626-1629.

Adres autora: prof. dr hab. Wiesław Deptuła, ul. Felczaka 3a, 71-412 Szczecin; e-mail: kurp13@univ.szczecin.pl