

Toll-lignende receptorer

Centrale komponenter i det medfødte immunforsvar og ved overvågning af vævsskade

Klaus Bendtzen, Lone Frier Bovin, Vagn Andersen, Klaus Rieneck og Morten Svenson

Det medfødte immunsystem er et afgørende tidligt bolværk mod invaderende mikroorganismer. Systemet består af celler: neutrofile granulocytter, monocytter/makrofager, dendritceller og NK-celler (naturlige drabsceller), samt opløselige elementer, fx cytokiner og komplementfaktorer.

Erkendelsen af mikroorganismene medieres af såkaldte *pattern recognition receptors* (PRR) på cellerne i det medfødte immunsystem. De vigtigste komponenter i PRR er Toll-lignende receptorer (TLR). TLR genkender strukturer som er fælles for mange patogener, såkaldte *pathogen associated molecular patterns* (PAMP). PAMP findes i endotoksiner, peptidoglykaner og i andre mikrobielle molekyler af klinisk relevans ved infektionssygdomme. Ud over at skelne mellem *self* (individets eget molekulære univers) og invaderende mikroorganismer spiller TLR også en rolle i erkendelsen af molekyler associeret til vævsbeskadigelse og vævsremodellering. Det er derfor sandsynligt at defekter i TLR-PRR-systemet kan være medvirkende årsag til mange sygdomme – også i mundhulen.

Det har længe været et ubesvaret spørgsmål hvorledes primitive organismer uden lymfocytbåren antigen-specifik immunitet diskriminerer mellem individets eget molekulære univers (*self*) og invaderende mikroorganismer. Dette har international forskning nu afdækket (1-3). Erkendelsen er betydningsfuld, fordi den rører ved immunologiens grundprincipper. Men den åbner også for en bedre forståelse af de molekulære baggrunde for infektionssygdomme og patogenetisk gådefulde immunsygdomme, og den bærer kimen til effektive nye forebyggelses- og behandlingsstrategier ved mange lidelser med infektion og vævsbeskadigelse som centrale faktorer.

Hvad bananfluen viste om infektionsforsvaret

Som hyppigt set er denne nye erkendelse opstået som følge af grundforskning, denne gang udført på bananfluen *Drosophila*, hvis *toll* gen blev fundet i begyndelsen af 1980'erne (4,5). Genet koder for en transmembranal receptor, som viste sig at være fundet i afgørende for den embryonale udvikling: En mutation i genet medførte at bananflueembryomet manglede mesodermen og hele nervesystemet. Dele af de intracellulære procesveje som udløstes ved aktivering af Toll proteinet, blev snart efter klarlagt, bl.a. vistes induktion af *nuclear factor-κB* (NF-κB)-lignende transskriptionsfaktorer af central betydning; se nedenfor.

I begyndelsen af 1990'erne viste andre at den signalgivende receptor for cytokinet interleukin 1 (IL-1) indeholdt et intracytoplasmatisk domæne, som var meget lig et tilsvarende domæne på Toll; det kaldtes »Toll/IL-1 receptor homology domain« (TIR) (6). I modsætning hertil er den ekstracellulære del af Toll helt forskellig fra IL-1 receptoren (Fig. 1). Da man vidste at IL-1, også via induktion af NF-κB, er af stor betydning for vertebraters immunforsvar, var det nærliggende at antage at Toll også kunne være involveret i bananfluens forsvaret mod infektioner. *Toll* var det eneste kendte bananfluengen som kunne aktivere NF-κB, og det viste sig hurtigt at generne for alle de antimikrobielle kationpeptider, som bananfluen producerer ved infektion, i deres promoterregioner indeholder bindingssteder for NF-κB. Interessen blev vakt for at undersøge om også pattedyr var udstyret med Toll-lignende receptorer (TLR).

1) Af tysk »*toll*« (fantastisk, forrykt), angiveligt fordi *Christiane Nüsslein-Volhard*, den gang ved European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, udbrod dette da hun af sin amerikanske medarbejder *Eric F. Wieschaus* konfronteredes med defekterne forårsaget af det muterede gen. Opdagelsen ledte sammen med fundet af 14 andre gener involveret i defekt embryonal segmentering til at begge forskere i 1995 delte Nobelprisen i fysiologi/medicin med amerikaneren *Edward B. Lewis*.

I 1997 kunne *Charles A. Janeways* gruppe ved Yale-universitetet vise at mennesket har TLR – til dato er ti forskellige beskrevet – og at disse proteiner er ansvarlige for en infektionsresistens som er uafhængig af det specifikke lymfocytmedierede immunsystem (7). Lignende receptorer er nu fundet i alle undersøgte højerestående organismer, og da de som anført også er fundet i insekter og senest tillige i planter, formodes de at udgøre et evolutionært set gammelt forsvar mod infektioner.

Men hvorfor er det nu så betydningsfuldt?

Det medfødte og det erhvervede immunsystem

Menneskets og andre hvirveldyrers forsvar mod biosfærens mikroflora er komplekst (8). Man skelner mellem et uspecifikt, medfødt eller naturligt infektionsforsvar og et specifikt erhvervet forsvar, der beror på et adaptivt immunsystem. Det medfødte infektionsforsvar er fylogenetisk gammelt – over en mia. år – og beror på mekanismer der er i stand til hurtigt at hæmme eller dræbe mikroorganismer uafhængigt af om individet på et tidligere tidspunkt har været udsat for dem eller ej. Disse mekanismer virker omgående og på en række forskellige mikrober, og der er ikke tendens til at de reagerer bedre efter gentagne infektioner.

Den erhvervede immunitet er betydeligt yngre og rettet mod distinkte antigener i mikroorganismer eller i disses produkter, men potentielt også mod alle andre antigener i naturen, inklusive *self*. Den har hukommelse i den forstand at reaktiviteten mod det enkelte antigen øges markant efter gentagne påvirkninger med dette.

Erhvervet immunitet er baseret på antigenspecifikke T- og B-lymfocyt-receptorer (sidstnævnte også benævnt antistoffer). Disse opstår ved at relativt få gener under produktionen af lymfocytter tilsyneladende tilfældigt rekombineres til at danne et omfattende repertoire af antigen-genkendende receptorer. I livets løb dannes milliarder af lymfocytter med forskellige receptorspecificiteter, dog således at hver lymfocyt kun har receptorer med én specificitet. Kan en lymfocyt receptor genkende antigen fx på en mikrobe, indledes en klonal ekspansion af cellen med dannelse af millioner af lymfocytter, alle med ens receptorkonfiguration.

Fordelene er åbenbare, idet denne del af immunsystemet løbende kan tilpasse sig de aktuelle ydre og indre omgivelser og bidrage til opbygningen af længerevarende specifik immunitet efter infektioner – og vaccinationer. Ulemperne er at starten af dette immunrespons tager tid (adskillige dage), og at det adaptive system også udvikler receptorer der kan reagere med *self*; dette kræver særlige kontrolsystemer, som kan svigte, hvorved autoimmunsygdom kan opstå. Det er kun de tilgrundliggende receptorgener som nedarves i dette

system. Eventuelle gavnlige receptorkonfigurationer kan ikke overføres til afkommet da de ikke opstår ved mutationer, men ved tilfældigt opståede genrekombinationer. Hvert individ må »opfinde« sine egne T- og B-celle receptorer.

I modsætning hertil beror det medfødte infektionsforsvar på nedarvede og ikke-klonalt fordelte receptorer, dvs. der er flere forskellige receptorer på hver enkelt celle. Disse receptorer dannes ikke ved genetisk rekombination, som tilfældet er for T- og B-celle receptorerne, og antallet af forskellige receptorer er derfor begrænset.

Alligevel skelner systemet mellem *self* og tusinder af mikroorganismer, men hvordan? Problemet er løst på genial vis: Snarere end at disse receptorer genkender enkeltstrukturer (jf. antigener), aktiveres de af relativt få og velbevarede molekulære mønstre på mikroorganismene. Disse mønstre kaldes PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*), og de receptorer som erkender PAMP, benævnes PRR (*pattern recognition receptors*).

PAMP og PRR

PAMP er typisk uforanderlige strukturer som deles af klasser af mikrober, fx lipopolysakkarid (LPS) i gramnegative bakterier (Tabel 1). Det er karakteristisk at PAMP er af betydning for mikrobernes overlevelse og/eller patogenicitet, og at lignende molekulære strukturer sjældent udtrykkes i større omfang på eller frigives fra organismens egne celler (se dog nedenfor).

Adskillige PRR er identificeret hos mennesket. Bedst kendt er CD14 på makrofager, som binder flere lipidholdige molekyler (Fig. 1). Et af disse er LPS, en længe kendt aktivator af makrofager, hvor den inducerer produktion af IL-1 og andre cytokiner med afgørende indflydelse på både medfødt og erhvervet infektionsresistens (9). Men man har også længe vidst at CD14 ikke har en cytoplasmatisk signalgivende struktur, og mange har derfor i årevis søgt efter andre komponenter i det formodede LPS-receptorkompleks.

Hvad C3H/HeJ mus viste om LPS-receptoren

Løsningen kom i 1998 efter en række undersøgelser udført af *Bruce Beutler* og medarbejdere ved Texas Southwestern-universitetet (10). Man vidste allerede at musestammen C3H/HeJ er usædvanlig følsom over for infektioner med gramnegative bakterier, og at musene lider af en selektiv defekt i LPS-signalgivningen: Selv om dyrene producerer IL-1 og andre cytokiner efter injektion af andre bakterielle produkter, kan de ikke producere disse cytokiner efter injektion af LPS. I C3H/HeJ musen identificeredes en selektiv og homozygot mutation i en Toll-lignende receptor, benævnt TLR4, og transfektionsforsøg og forsøg med TLR »knock-

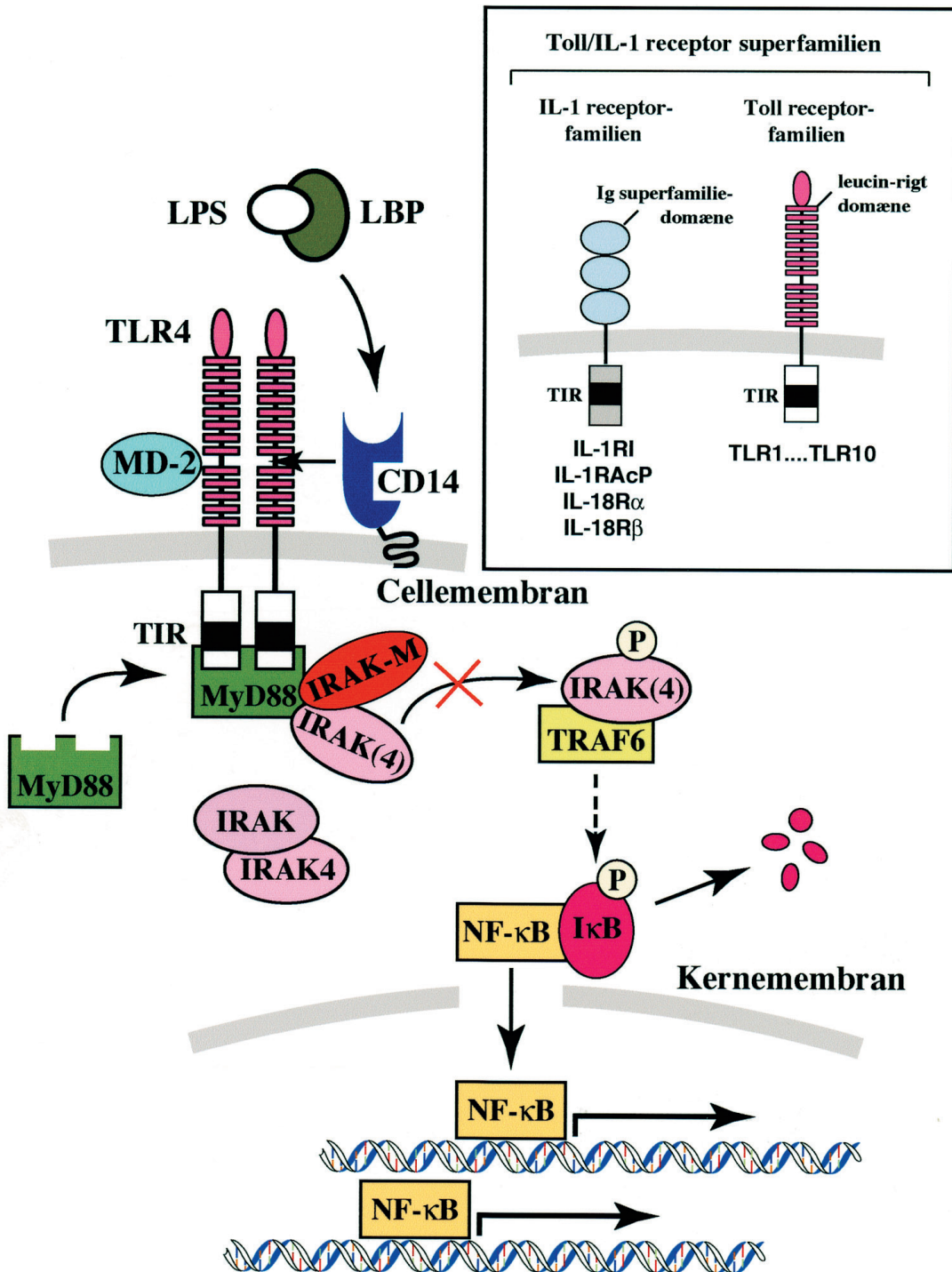


Fig. 1. Lipopolysakkarid (LPS) receptorkomplekset og Toll/IL-1 receptor superfamilien. Toll-lignende receptor (TLR) 4 aktiveres af LPS efter dets binding til LPS-bindende protein (LBP) og CD14. Den opløselige faktor MD-2 er sammen med andre faktorer (ikke vist) nødvendig for TLR4 signalgivning. Efter aktivering signalerer TLR4 homodimerer til adaptorproteinet MyD88 gennem Toll/IL-1 receptor *homology domain* (TIR). Dette rekrutterer IL-1 receptor-associerede kinaser (IRAK og IRAK4), som autofosforylerer og aktiverer TNF receptor-associeret faktor 6 (TRAF6). Gennem intermediære kinaser fosforyleres NF- κ B inhibitor (I κ B), som derpå degraderes. Frit NF- κ B kan nu translokere til kernen, hvor det aktiverer flere forskellige gener. Signalvejen reguleres negativt af den inaktive kinase IRAK-M som kan binde til TIR i stedet for IRAK/IRAK4.

Indsat: IL-1 receptorfamilien og Toll receptorfamilien har homologe intracellulære komponenter; begge indeholder således TIR. I modsætning hertil er de ekstracellulære komponenter forskellige og binder til forskellige ligander. De 10 kendte TLR afviger primært fra hinanden ved variable mængder af ekstracellulære leucinrige domæner.

Forkortelser i øvrigt: Ig: immunoglobulin; IL-1R: interleukin 1 receptor; IL-1RAcP: IL-1R accessorisk protein; NF- κ B: nuclear factor κ chain transcription in B cells.

Fig. 1. The lipopolysaccharide (LPS) receptor complex and Toll/IL-1 receptor superfamily. Toll-like receptor (TLR) 4 is activated by LPS following binding to LPS-binding protein (LBP) and CD14. The soluble molecule MD-2 is essential for TLR4 signalling along with other factors not shown. After activation, the TLR4 homodimer signals the adaptor protein MyD88 through Toll/IL-1 receptor homology domain (TIR). This recruits the IL-1 receptor-associated kinases (IRAK and IRAK4) which autophosphorylate and activate TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6). Through intermediate kinases, the NF- κ B inhibitor, I κ B, is phosphorylated and degraded. NF- κ B now becomes free to translocate to the nucleus to activate several different target genes. The pathway is negatively regulated by the inactive kinase IRAK-M, which can bind to TIR instead of IRAK/IRAK4.

Insert: While the intracellular components are similar and contain TIR, the extracellular parts have no homology and bind to distinct ligands. The ten known TLR differ primarily by the variable lengths of their extracellular, leucine-rich components.

Further abbreviations: Ig: immunoglobulin; IL-1R: interleukin 1 receptor; IL-1RAcP: IL-1R accessory protein; NF- κ B: nuclear factor κ chain transcription in B cells.

out« mus viste entydigt at TLR4 er den signalgivende del af LPS-receptorkomplekset (2) (Fig. 1). Andre forsøg har vist at en anden TLR, TLR2, er led i signalsystemet for peptidoglykan fra grampositive bakterier, visse lipo- og glykopeptider fra mykobakterier og mannanner fra gær.

At TLR4 næppe er ene om at mediere effekten af LPS viser helt nye undersøgelser. NOD-2, en intracellulær mediator af

LPS respons i monocytter, har en vis homologi med TLR og synes at ændre LPS-induceret NF- κ B aktivitet. Mutation i NOD-2 er for nylig vist at være relateret til Mb. Crohn, men ikke til ulcerøs colitis.

Den immunologiske betydning

Der er hidtil påvist ti forskellige TLR hos mennesket, alle med en betydelig grad af homologi (Fig. 1). Sandsynligheden for at der findes mange flere TLR er begrænset, og selvom andre PRR har lignende funktioner, synes Tollsyste­met at være det væsentligste i genkendelsen af PAMP (1,2). Men det medfødte infektionsforsvar må kunne kende et stort antal PAMP i naturen, det må straks kunne skelne *self* fra PAMP, og det må kunne diskriminere mellem forskellige patogener for hurtigt at kunne igangsætte hensigtsmæssige svar på infektioner.

Dette brede repertoire af PRR tilvejebringes bl.a. ved at genkendelsen af visse PAMP kun sker gennem kombinationer af TLR molekyler og evt. andre receptorer. Det er fx vist at TLR2 genkender andre PAMP end heterodimeren TLR2/TLR6 (11) (Tabel 1). Samme gruppe har også sandsynliggjort at de cytoplasmatiske dele af TLR ikke er funktionelt ligestillede; nogle fungerer i homomer form, andre kun som heteromere komplekser. Hvor det erhvervede immunsystem kombinerer relativt få gener til produktion af millioner af T- og B-celle receptorer, synes det medfødte infektionsforsvar således at kombinere nogle få TLR til at danne hundreder af PRR-komplekser, som både er funktionelt forskellige, og som hver især kender en eller få af biosfærens mange PAMP.

Tilstedeværelsen af TLR og andre PRR på mange forskellige celletyper, og fund af disse receptorer i primitive dyr uden leukocytter – endog i planter – gør det sandsynligt, at TLR-systemets primære funktion har været at forhindre mikrober i at invadere flercellede organismer, i de højerestående dyr allerede med virkning i celler i hud og slimhinder. Men TLR har under evolutionen opnået andre vigtige egenskaber.

TLR er rigt repræsenteret på makrofager og dendritceller, og de har betydning for dannelsen af både peptid-MHC-komplekser og T-celleaktiverende molekyler på disse de vigtigste antigenpræsenterende celler. Hvor T- og B-celler erkender alle antigener, inklusive *self*, genkender PRR som anført overvejende *non-self* strukturer fra patogene mikroorganismer. Det medfødte immunsystem skelner med andre ord infektiøs *non-self* fra *self*, og det er sandsynligt, omend ikke endeligt fastslået, at det er det primitive system som i vid udstrækning styrer det adaptive immunsystems bidrag til infektionsresistens. Tabel 2 viser en oversigt over det naturlige og det adaptive immunsystem.

Tabel 1. Eksempler på stimulatorer af Toll-lignende receptorer (modificeret fra (14)).

Receptorer	Karakteristiske stimulatorer	Kilder
TLR1/TLR2	Opløselige faktorer fra levende bakterier	<i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2/TLRX	Lipoproteiner Lipoteikonsyre Lipoarabinomannan Fosfatidylinositol derivater LPS	Adskillige bakteriearter Spirokæter, <i>Staphylococcus aureus</i> Mykobakterier <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Leptospira interrogans</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i>
TLR2/TLR6	Peptidoglykaner Opløselig fenolmodulin Zymosan Makrofag-aktiverende lipopeptid-2	Grampositive bakterier <i>Staphylococcus aureus</i> Gærsvampe <i>Mycoplasma fermentans</i>
TLR3	Dobbeltstrenget RNA	Virus
TLR4	LPS Taxol	Gramnegative bakterier Planter
TLR5	Flagellin	Flagellate bakterier
TLR7	Imidazoquinolin antivirale medikamenter	Kemiske stoffer
TLR9	CpG DNA	Bakterier

TLR: Toll-lignende receptorer; TLRX: endnu ukarakteriseret TLR; LPS: lipopolysakkarid.

Tabel 2. Oversigt over det medfødte og det erhvervede immunsystem.

Immunsystem	Medfødt, naturligt	Erhvervet, adaptivt
Fylogenetisk alder	flere mia. år	ca. 500 mio. år
Respons		
- primært	omgående	langsomt
- efterfølgende	omgående	hurtigt
Specificitet		
- antigener (epitoper)	÷	+
- PAMP	÷	(÷)
- Self		potentielt
Hukommelse	÷	+
Molekylær baggrund	PRR	T- og B-lymfocytreceptorer

PAMP: pathogen-associated molecular patterns; PRR: pattern recognition receptors.

Overvågningsfunktion ved vævsskader?

Som vist i Tabel 3 er der i de seneste år påvist PRR-reaktivitet mod strukturer der forekommer normalt også hos mennesker, fx *heat shock* proteiner (HSP) og den umetylerede nukleotidsekvens CpG, som dog hyppigst forekommer i

Tabel 3. Eksempler på endogene stimulatorer af Toll-lignende receptor 4 (modificeret fra (13)).

Stimulatorer	Kilder
Heparansulfat	Celleoverflader, ekstracellulær matriks
Hyaluronan	Ekstracellulær matriks, synovial matriks
HSP60	Mitochondrier
HSP70	Cytoplasma
Gp96	Endoplasmatisk reticulum
CpG	DNA
Fibronectin extra domæne A	Ekstracellulær matriks, serum
Fibrinogen	Plasma
Surfactant protein-A	Lungeendotelceller

bakterier (Tabel 1). Denne reaktivitet kan tænkes at være af betydning for aktivering af fagocytter, fx ved apoptose, og det er muligt at hele TLR-PRR-systemet udgør en avanceret overvågningsfunktion som aktiveres, ikke blot af eksogene molekyler fra mikroorganismer, men også af endogene molekyler som frigives i forbindelse med vævsskade og vævsremodellering (12,13).

Perspektiver

De skitserede forskningsresultater har givet svar på essentielle og indtil for få år siden ubesvarede spørgsmål inden for immunologien. Som altid, når fundamentale biologiske processer belyses, kan det få stor praktisk klinisk betydning – også for tandlæger. TLR-systemets centrale placering ved infektionsresistens og dets rolle ved vævsbeskadigelser og vævsremodellering lader formode at flere af mundhulens immun- og betændelsesygdomme samt følgesygdomme til ortodontiske indgreb kan have fejl eller mangler i TLR som grundlag. Udvikling af TLR-agonister kan få klinisk betydning, fx som bidrag til behandling af infektions- og cancer-sygdomme og som effektive adjuvantia ved vaccinationer. Omvendt kan TLR-antagonister bidrage til udvikling af nye, målrettede og potente immunsuppressive og antiinflammatoriske behandlingsstrategier.

Artiklen er opdateret fra artikel bragt i *Ugeskr Læger* den 20. august, 2001. Gruppens arbejde har opnået økonomisk støtte fra Gigtföreningen.

English summary

Toll-like receptors. Central components in the innate immune system and as surveillance of tissue damage

The innate immune system is the first line of defence against invading microorganisms. The system consists of cells: neutrophils, monocytes/macrophages, dendritic cells and natural killer cells, and of soluble elements such as cytokines and components of the complement system.

Detection of these microorganisms is mediated by pattern recognition receptors (PRR) expressed on the cells of the innate immune system. The most important components of PRR are Toll-like receptors (TLR). TLR recognise structures common to many pathogens, the so-called pathogen associated molecular patterns (PAMP). PAMP are part of endotoxins, peptidoglycans and other microbial molecules of clinical relevance in infectious diseases.

Apart from distinguishing *self* from invading microorganisms, TLR also play a role in the recognition of molecules associated with tissue damage and remodelling. It is therefore likely that defects in the TLR-PRR system underlie many diseases, including diseases in the oral cavity.

Litteratur

1. Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000; 343: 338-44.
2. Kimbrell DA, Beutler B. The evolution and genetics of innate immunity. *Nature Rev Genet* 2001; 2: 256-67.
3. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216.
4. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 1980; 287: 795-801.
5. Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988; 52: 269-79.
6. Gay N, Keith F. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* 1991; 351: 355-6.
7. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394-7.
8. Koch C. Immunsystemets betydning. I. Bendtzen K, Marker O, Svehag S-E, Svejgaard A, Kilian M, red. *Basal og klinisk immunologi*. 3. udg. København: FADL's Forlag; 2000. p. 17-22.
9. Bendtzen K. Makrofaghormonerne interleukin 1 (IL-1) og tumornekrotiserende faktor (TNF). *Ugeskr Laeger* 1987; 149: 2191-6.
10. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Huffel CV, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282: 2085-8.
11. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13766-71.
12. Beg AA. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends Immunol* 2002; 23: 509-12.
13. Johnson GB, Brunn GJ, Tang AH, Platt JL. Evolutionary clues to the functions of the Toll-like family as surveillance receptors. *Trends Immunol* 2003; 24: 19-24.
14. Bochud PY, Calandra T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *BMJ* 2003; 326: 262-6.

Forfattere

Klaus Bendtzen, professor, overlæge, dr.med., Lone Frier Bovin, civilingeniør, cand.polyt., Vagn Andersen, overlæge, Klaus Rieneck, afdelingslæge, og Morten Svenson, laboratorieforsker, cand. scient.

Institut for Inflammationsforskning (IIR), Rigshospitalet, København