

TOLL LIKE ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

Ε.Ε. Γιαννάκη

Βιολόγος PhD, Τμήμα Κυτταρομετρίας, Αιματολογικό Εργαστήριο, Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Θεσ/νίκης «Θεαγένειο»

Εισαγωγή

Οι ανάλογοι των Toll υποδοχείς (Toll-like receptors, TLRs) είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έμφυτη ανοσία. Ανήκουν στους υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (pattern recognition receptors, PRRs) οι οποίοι αναγνωρίζουν μοριακές δομές που είναι ευρέως διαδεδομένες μεταξύ των μικροβίων και είναι γνωστές ως μοριακά πρότυπα συνδεόμενα με την παθογένεια (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs). Οι PAMPs δεν συσχετίζονται με μηχανισμούς διαφυγής από τον ξενιστή, έχουν κυρίως δομικό ρόλο και γι' αυτό το λόγο είναι εξελικτικά πολύ σταθερά μόρια (δεν υπόκεινται σε μεταλλάξεις ή οι τυχόν μεταλλάξεις είναι μη βιώσιμες). Τα μόρια αυτά είναι σαφώς διακριτά από τα μόρια του ξενιστή. Η αναγνώριση των PAMPs από τον ξενιστή τον θέτει σε συναγερμό ως προς την παρουσία ενός επικίνδυνου παθογόνου παράγοντα. Σε αυτά ανήκουν ποικίλα συστατικά όπως λιποπολυσακχαρίτες (LPS) Gram-αρνητικών βακτηρίων, ιικά RNAs μονής ή διπλής έλικας, διάφορα σάκχαρα, μη μεθυλιωμένα CpG ολιγονουκλεοτίδια κ.ά. Στην οικογένεια των TLRs των θηλαστικών ανήκουν 15 μέχρι τώρα γνωστά μέλη (TLR1 έως TLR15) και κάθε ένα αναγνωρίζει ένα διαφορετικό PAMP συνδέτη [1,2] (Πίνακας 1 [3,4,5]). Οι TLRs εκφράζονται σε λεμφικούς και μη ιστούς, κυριαρχούν ωστόσο στους πρώτους ακολουθώντας διαφορετικό πρότυπο έκφρασης σε κάθε ιστό. Εκφράζονται στη μεμβράνη κυρίως των κυττάρων της έμφυτης ανοσίας όπως μακροφάγα/μονοκύτταρα, κοκκιοκύτταρα, σιτευτικά, δενδριτικά, επιθηλιακά κύτταρα [6,7]. Ενεργοποιούνται εκτός από μικροβιακά συστατικά και από άλλους παράγοντες όπως σε τραυματισμούς που προκαλούνται από θερμότητα, χημικά, ιονίζουσα ακτινοβολία και άλλα ενδογενή ερεθίσματα όπως πρωτεΐνες θερμικού πλήγματος (Heat shock proteins, HSP) νεκρωτικούς ιστούς, ινωδογόνο, μετουσιωμένα θραύσματα ινικής κ.ά. που ονομάζονται: μοριακά πρότυπα συνδεόμενα με την καταστροφή (damage-associated molecular patterns, DAMPs) [8].

Δομή

Η μοριακή τους δομή αποτελείται από μια εξωμεμβρανική περιοχή πλούσια σε λευκίνη (Leukine rich repeats, LRR), μία υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή και μία ενδοκυττάρια (ή ενδοοργανιδιακή περιοχή για τους ενδοκυττάρια TLR3, 7, 8, 9) TIR (Toll/interleukin 1 receptor) που απαντάται επίσης στην οικογένεια των υποδοχέων της IL-1, καθώς και στους προσαρμογείς του μονοπατιού ενεργοποίησης από τους TLRs [7].

Σηματοδότηση

Η TLR σηματοδότηση ξεκινά με τη δημιουργία διμερών (ετεροδιμερή TLR 1 & 6 με τον TLR 2 ή ομοδιμερή TLR 4) με τη μεσολάβηση των συνδετών. Η σηματοδότηση μεταδίδεται μέσω των TIR περιοχών σε τέσσερις πρωτεΐνες προσαρμογείς: **(1)** την MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88), μεσολαβητής όλων των TLRs εκτός του TLR 3, **(2)** την TIRAP (TIR domain containing adapter protein) ή Mal, **(3)** την TRIF (TIR domain containing adapter protein inducing INF-β) και **(4)** την TRAM (TRIF related adapter molecule). Έχει βρεθεί ότι υπάρχουν δύο τουλάχιστον μονοπάτια σηματοδότησης από τους TLRs. Το πρώτο μονοπάτι εξαρτάται από την MyD88 και οδηγεί στην παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών. Το δεύτερο μονοπάτι ενεργοποιείται από τους TLR 3 & 4, δεν απαιτεί την MyD88 αλλά την TRIF και σχετίζεται με την παραγωγή IFN-β, την ωρίμανση των DCs και συμβάλλει χρονικά στην απώτερη φάση ενεργοποίησης των πυρηνικών παραγόντων μεταγραφής NFκB και AP-1 (Σχήμα 1) [7,8].

MyD88-εξαρτώμενο μονοπάτι

Αφορά όλους τους TLRs εκτός του TLR3. Οι MyD88 και TIRAP προσαρμογείς αλληλεπιδρούν μέσω των TIR που υπάρχουν σε αυτούς και στους TLRs (Σχήμα 1). Στρατολογείται και ενεργοποιείται η κινάση που σχετίζεται με τον υποδοχέα της IL-1 (IL-1 receptor associated kinase, IRAK) μέσω των περιοχών DD (Death Domain). Η IRAK 1 & 4 φωσφορυλιώνονται και συνδέονται με τον σχετιζόμενο με τον υποδοχέα του TNF παράγοντα 6 (Tumor necrosis factor receptor associated factor 6, TRAF6). Το σύμπλοκο IRAK-1/TRAF6 υφίσταται ουβικουϊτίνωση, συνδέεται με την κινάση που ενεργοποιείται από τον TGF-β (TGF-β activated kinase, TAK1) και τις πρωτεΐνες TAB1 και TAB2. Το σύμπλοκο αυτό ενεργοποιεί την TAK1 το οποίο ενεργοποιεί με τη σειρά του το σύμπλεγμα IKK κινασών (IKKα, IKKβ και NEMO) που ενεργοποιεί τις JNKs, τον IRF7, AP-1 και NF-κB μεταγραφικό παράγοντα που μεταναστεύει στον πυρήνα.

Ο καταρράκτης αυτών των αντιδράσεων έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών (TNFα, IL-1β, IL-6, IL-12) καθώς και την παραγωγή INFs τύπου 1 από τα pDCs και των επαγόμενων από αυτές γονιδίων.



Πίνακας 1. Οι TLRs ενεργοποιούνται από διαφορετικούς συνδέτες που βρίσκονται σε διαφορετικούς οργανισμούς ή δομές [3,4,5]. Έχουν διαφορετικούς προσαρμογείς (adapters) που μεταδίδουν την ενεργοποίησή τους από την κυτταρική επιφάνεια ή ενδοκυττάρια οργανίδια προς τον πυρήνα και εντοπίζονται σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων.

Υποδοχέας	Συνδέτης	Προέλευση συνδέτη	Προσαρμογέας	Τοποθεσία	Κυτταρικός τύπος
TLR1+2	Πεπτιδολιπίδιο Tlraacyl	Βακτήρια	MyD88/MAL	Κυτταρική επιφάνεια	<ul style="list-style-type: none"> Μονοπύρνα / Μακροφάγα Πλασματοκυτ. δενδριτικά κύτταρα Β λεμφοκύτταρα
TLR2	Γλυκολιπίδια	Βακτήρια	MyD88/MAL	Κυτταρική επιφάνεια	<ul style="list-style-type: none"> Μονοπύρνα / Μακροφάγα Μυελ. δενδριτικά κύτταρα Σιτευτικά κύτταρα
	Πεπτιδολιπίδια	Βακτήρια			
	Λιποπρωτεΐνες	Βακτήρια			
	Λιποτοιχοϊκό οξύ	Βακτήρια			
	HSP 70	Κύτταρα ξενιστή			
	Ζυμοζάνη (β-γλυκάνη) Κ.α.	Μύκητες			
TLR3	Διπλής έλικας RNA polyI:C	Ιοί	TRIF	Κυτταροπλασματικά οργανίδια	<ul style="list-style-type: none"> Δενδριτικά κύτταρα Β λεμφοκύτταρα
TLR4	Λιποπολυσακχαρίτης	Gram αρνητικά βακτήρια	MyD88/MAL TRIF TRAM	Κυτταρική επιφάνεια	<ul style="list-style-type: none"> Μονοπύρνα / Μακροφάγα Μυελ. δενδριτικά κύτταρα Σιτευτικά κύτταρα Εντερικό επιθήλιο
	HSP	Βακτήρια & κύτταρα ξενιστή			
	Ινωδογόνο	Κύτταρα ξενιστή			
	Θραύσματαθειικής ηπαράνης	Κύτταρα ξενιστή			
	Θραύσματα υαλουρονικού οξέος	Κύτταρα ξενιστή			
	Κ.α.				
TLR5	Φλατζελίνη	Βακτήρια	MyD88/MAL	Κυτταρική επιφάνεια	<ul style="list-style-type: none"> Μονοπύρνα / Μακροφάγα Πλασματοκυτ. δενδριτικά κύτταρα Εντερικό επιθήλιο
TLR6+2	Διάκυλο-πεπτιδολιπίδια	Μυκόπλασμα	MyD88/MAL	Κυτταρική επιφάνεια	<ul style="list-style-type: none"> Μονοπύρνα / Μακροφάγα Σιτευτικά κύτταρα Β κύτταρα
TLR7	Ιμιδαζοκινολόνη	Ιοί	MyD88/MAL	Κυτταροπλασματικά οργανίδια	<ul style="list-style-type: none"> Μονοπύρνα / Μακροφάγα Πλασματοκυτ. δενδριτικά κύτταρα Β κύτταρα
	Loxoribine (ανάλογο της γουανοσίνης)				
	Βροπριμίνη ssRNA				
TLR8	Μικρά συνθετικά συστατικά ssRNA	Ιοί	MyD88/MAL	Κυτταροπλασματικά οργανίδια	<ul style="list-style-type: none"> Μονοπύρνα / Μακροφάγα Υποομάδα δενδριτικών κυττάρων Σιτευτικά κύτταρα
TLR9	Μη μεθυλωμένα CpG Ολιγοδιεόξυ-νουκλεοτίδια DNA	Βακτήρια & ιοί	MyD88/MAL	Κυτταροπλασματικά οργανίδια	<ul style="list-style-type: none"> Μονοπύρνα / Μακροφάγα Πλασματοκυτ. δενδριτικά κύτταρα Β κύτταρα
TLR10	Άγνωστος	Άγνωστος	Άγνωστος	Κυτταρική επιφάνεια	<ul style="list-style-type: none"> Μονοπύρνα / Μακροφάγα Β κύτταρα
TLR11	Προφιλίνη	Τοξόπλασμα gondii	MyD88/MAL	Κυτταρική επιφάνεια	<ul style="list-style-type: none"> Μονοπύρνα / Μακροφάγα Ηπατικά κύτταρα Νεφρά Χοληφόρο επιθήλιο
TLR12	Άγνωστος		Άγνωστος	;	<ul style="list-style-type: none"> Νευρώνες
TLR13	Άγνωστος		Άγνωστος	;	<ul style="list-style-type: none"> Νευρώνες Επενδυματικά κύτταρα Αστροκύτταρα Ενδοθηλιακά κύτταρα
TLR15	Άγνωστος	Salmonella enterica ορότυπος Typhimurium	Άγνωστος	;	



TLRs και εντερικές δυσλειτουργίες

Η έκφραση των TLRs στο εντερικό επιθήλιο των υγιών ατόμων είναι χαμηλή, ενώ αυξάνεται σημαντικά σε καταστάσεις φλεγμονής. Έχει διαπιστωθεί ότι ο TLR4 έχει υψηλή έκφραση στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα (Intestinal epithelial cells, IECs) ασθενών με νόσο του Crohn, όχι όμως στην ελκώδη κολίτιδα. Ποντίκια με έλλειψη στον TLR5 αναπτύσσουν αυτόματα κολίτιδα. Επιπρόσθετα, στη φυσιολογική κατάσταση οι TLRs φαίνεται να υφίστανται αρνητική ρύθμιση. Τα IECs ασθενών με φλεγμονώδη νόσο του εντέρου απέτυχαν να διεγείρουν την έκφραση της πρωτεΐνης TOLLIP. Η μη έκφραση της SIGIRR, που είναι αναστολέας των TLR4 και TLR9, σε πειραματόζωα, τα έκανε περισσότερο δεκτικά στην εντερική φλεγμονή. Τέλος, η έκφραση του συνυποδοχέα MD2 του TLR4 στα IECs είναι χαμηλή γεγονός που περιορίζει σημαντικά την υπερευαισθησία στους λιποπολυσακχαρίτες (LPS) των βακτηρίων που βρίσκονται στον εντερικό αυλό. Οι επιθηλιακοί TLRs «αναγνωρίζουν» τον τραυματισμό του εντέρου, μειώνοντας την έκτασή του μέσω παρεμπόδισης της απόπτωσης και των προφλεγμονωδών μονοπατιών, προκαλώντας αύξηση του πολλαπλασιασμού των επιθηλιακών κυττάρων. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να έχει εφαρμογή στον τραυματισμό και την αιμορραγία του εντέρου που είναι παρενέργεια κατά τη θεραπεία καρκινοπαθών με ακτινοβολία [12].

TLRs και καρκινογένεση

Οι TLRs είναι υποψήφιοι μεσολαβητές μεταξύ φλεγμονής, έμφυτης ανοσίας και καρκινογένεσης. Ο καρκίνος άλλωστε έχει χαρακτηριστεί ως «μια πληγή που δεν κλείνει» [8]. Οι TLRs έχουν σταθερή παρουσία σε καρκινικά κύτταρα. Η αιτιολογία αυτής της παρουσίας δεν είναι διευκρινισμένη, ωστόσο φαίνεται να σχετίζεται με την αύξηση του όγκου και τη βιωσιμότητά του. Μεταλλάξεις στον TLR4 σχετίζονται με αυξημένη συχνότητα μετάστασης στον καρκίνο του μαστού μετά από χημειοθεραπεία. Οι MyD88 + καρκίνοι μαστού σχετίζονται με αντοχή στα φάρμακα και έκφραση αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών [13]. Επίσης, η παρουσία παθογόνων στο καρκινικό μικροπεριβάλλον ενισχύει την εξάπλωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων [13]. Αντίθετα, οι Salaun et al. [14] έδειξαν ότι η καταστολή του TLR3 με το συνθετικό dsRNA-TLR3 αγωνιστή, επάγει την απόπτωση σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού. Επιπρόσθετα, καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν TLR3 μπορούν να οδηγηθούν σε απόπτωση όταν διεγερθούν με τύπου Ι ιντερφερόνη. Διοσιδής φαίνεται να είναι η δράση των TLRs στον καρκίνο, αφού η διέγερσή τους μπορεί να επιδεινώσει ή να έχει αντικαρκινική δράση. Υψηλές δόσεις TLR αγωνιστών φαίνεται να έχουν αντικαρκινική δράση, ενώ χαμηλές δόσεις προάγουν τον καρκίνο. Σημαντική αντικαρκινική δράση παρουσιάζει ο imiquimod (αγωνιστής του TLR7), που χρησιμοποιείται στη θεραπεία του πλακώδους επιθηλιακού καρκίνου, του μελανώματος, της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (B-ΧΛΛ) και του καρκίνου του παγκρέατος.

TLRs και αυτοανοσία

Πολλά είναι τα πειραματικά δεδομένα που αποδίδουν ευθύνη για την εκδήλωση αυτοανοσία στους TLRs. Έχει διατυπωθεί η Toll υπόθεση [9] που υποστηρίζει ότι τα νουκλεϊνικά οξέα των RNPs λειτουργούν ως ανοσοενισχυτικά και οι πρωτεΐνες τους «παρουσιάζονται» από τα ενεργοποιημένα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα στα T κύτταρα. Πειράματα έδειξαν ότι η απουσία της MyD88 και του TLR9 μείωνε τα επίπεδα των αυτοαντισωμάτων στον ορό πειραματόζωων με ΣΕΛ. Ενώ ο σχηματισμός ανοσοσυμπλεγμάτων που περιέχουν χρωματίνη οδηγεί στην ενεργοποίηση των B κυττάρων που εκκρίνουν τον ρευματοειδή παράγοντα.

Προκαταρκτικά αποτελέσματα εμπλέκουν την έκφραση και λειτουργικότητα των TLRs με τη σηψαιμία [15], την αλλεργία [11], τον τραυματισμό, την ισχαιμία, το αιμορραγικό σοκ [16], ενώ έχουν εξακριβωθεί γενετικές ανοσοανεπάρκειες που οφείλονται σε μεταλλάξεις των γονιδίων των TLRs.

Μελέτη των TLRs με κυτταρομετρία ροής (ΚΡ)

Τα μέχρι τώρα δεδομένα έχουν καταστήσει σαφή το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν οι TLRs στον οργανισμό, όπως επίσης τον πιθανό ρόλο τους σε παθολογικές καταστάσεις. Πολλές μελέτες πρέπει να γίνουν ώστε να διερευνηθεί και να αποσαφηνιστεί πλήρως ο φυσιολογικός ρόλος τους καθώς και η εμπλοκή τους στην παθολογία όπως και η αλληλεπίδραση με τους αγωνιστές τους. Η κυτταρομετρία ροής μπορεί να συμβάλει σημαντικά στη διερεύνηση αυτή.

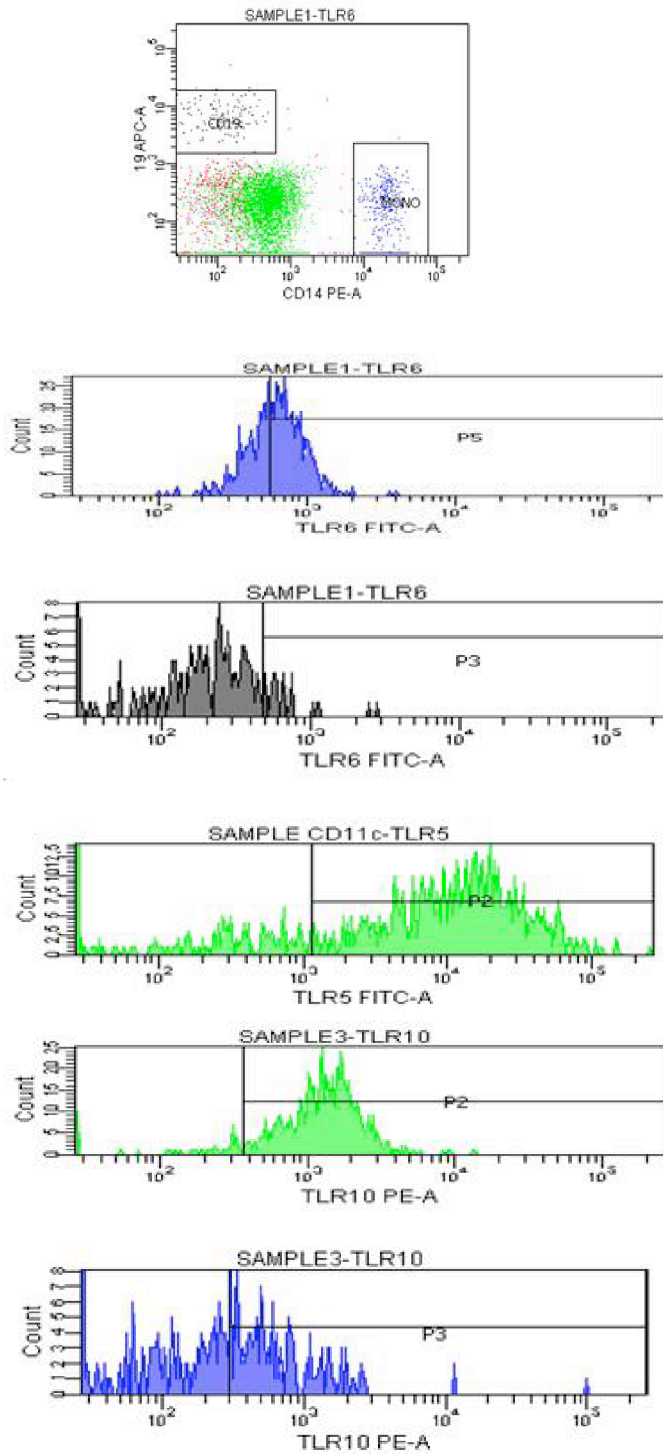
Η έκφραση των περισσότερων TLRs, με έμφαση τους TLR1 και TLR4, είναι χαμηλή στα μονοκύτταρα και σε άλλους κυτταρικούς τύπους όπως ουδετερόφιλα και ανώριμα δενδριτικά κύτταρα (immature dendritic cells, iDC). Επιπρόσθετα, μεγάλη διακύμανση στην επιφανειακή έκφραση των TLRs έχει διαπιστωθεί μεταξύ φυσιολογικών αιμοδοτών [17]. Τα προκαταρκτικά πειράματα τιτλοδότησης για κάθε μονοκλωνικό αντίσωμα της TLR οικογένειας έχουν πραγματοποιηθεί και έχουν βρεθεί οι κατάλληλες συνθήκες-συγκεντρώσεις για τον προσδιορισμό αυτών των αντιγόνων κυτταρομετρικά. Λόγω της χαμηλής επιφανειακής έκφρασής τους συστήνεται να χρησιμοποιούνται συνδεδεμένα με το PE φθοριόχρωμα. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί διαφορετική έκφραση των TLRs σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους. Η έκφραση του TLR4 ποντικών μειώνεται μετά από διέγερση με LPS [18], ενώ αυξάνεται στα μονοκύτταρα του ανθρώπου [19]. Ο TLR2 αυξάνεται στα περιφερικά μονοκύτταρα μετά από επίδραση με LPS, GM-CSF, IL-1 και IL-10 και μειώνεται από τους IL-4, INF-γ και TNF-α [20]. Η χαμηλή έκφραση του TLR2 στα ουδετερόφιλα μειώνεται περισσότερο από τους LPS, GM-CSF και TNF-α, ενώ αυξάνεται ελαφρά με IL-10 [20]. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα του ανθρώπου εκφράζουν κυρίως TLR4 αλλά και χαμηλά επίπεδα TLR2. Ο TLR2 αυξάνεται μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα του ανθρώπου και στα HUVEC όταν διεγερθούν με LPS, TNF-α ή INF-γ [21]. Στο Σχήμα 2 παρουσιάζεται ενδεικτικά η έκφραση των TLRs σε κύτταρα περιφερικού αίματος φυσιολογικών αιμοδοτών.

Εκτός από την απευθείας *in vivo* ανάλυση του περιφερικού αίματος, κύτταρα από διάφορες πηγές (κυτταρικές σειρές, διάφοροι ιστοί πειραματόζων, ανθρώπων φυσιολογικών ή ασθενών με νόσημα όπως καρκίνος, σηψαιμία, αυτοανοσία κ.ά.) έχουν απομονωθεί και καλλιεργηθεί παρουσία διαφόρων παραγόντων, όπως TLR συνδεδετών (LPS, zymozan, flagellin), αγωνιστών (PolyI:C, R848, Ixobione, imiquimod), κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων σε *in vitro* πειράματα. Στα καλλιεργημένα αυτά κύτταρα μελετήθηκε τόσο η απευθείας έκφραση των TLRs όσο και συνδιεγερτικών μορίων προκειμένου να αποδειχθεί η επαγωγή ή καταστολή τους μετά από την επίδραση αυτών των παραγόντων. Ενδεικτικά αναφέρονται το CD80, CD86, MHC class II στα μονοκύτταρα ή στα δενδριτικά κύτταρα ή η ενδοκυττάρια έκφραση κυτταροκινών [22]. Παράλληλα, στο υπερκείμενο αυτών των καλλιεργείων γίνεται προσδιορισμός διαλυτών κυτταροκινών, ιντερφερονών κ.ά. με σφαιριδομετρική κυτταρομετρική ανάλυση δεδομένου ότι τα υπερκείμενα κυρίως από απομονωμένα κύτταρα ασθενών, δεν είναι ποσοτικά επαρκή για να προσδιοριστούν με την τεχνική της ELISA.

Οι Hirschfeld και συν. [23] προκειμένου να ελέγξουν τη λειτουργικότητα των TLRs στα πειράματά τους, ανέπτυξαν μια τεχνική κατά την οποία απομόνωσαν κύτταρα περιφερικού αίματος και τα καλλιέργησαν παρουσία TLR συνδεδετών. Μετά την πάροδο 24h μέτρησαν με σφαιριδομετρική κυτταρομετρική ανάλυση, κυτταροκίνες της Th1/Th2 απόκρισης. Η τεχνική αυτή του έδωσε πληροφορίες για την ακεραιότητα ολοκλήρου του TLR σηματοδοτούμενου μονοπατιού, στερώντας ωστόσο τη δυνατότητα να διευκρινίσουν σε πιο σημείο του μονοπατιού μπορεί να οφείλεται η παρέκκλιση από το φυσιολογικό. Παράγοντες όπως οι συνθήκες ξεπλύματος των PBMCs, το αντιπηκτικό που χρησιμοποιείται κατά την αιμοληψία, ο χρόνος και οι συνθήκες διατήρησης των δειγμάτων καθώς και ο τύπος ορού που χρησιμοποιείται στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας μπορούν να επηρεάσουν την TLR απόκριση.

Ο Dasu και συν. [24,25] ανέπτυξαν δύο κυτταρομετρικές τεχνικές για την ανίχνευση ανωμαλιών στο TLR μονοπάτι. Η πρώτη στηρίζεται στην ενδοκυττάρια ανίχνευση TNF-α πρωτεΐνης σε μονοκύτταρα περιφερικού αίματος που ενεργοποιούνται μετά από 24 ώρες καλλιέργειάς τους από TLR συνδέτες (TLR 1-9). Η δεύτερη μέθοδος στηρίζεται στη διαπίστωση ότι τα ουδετερόφιλα αντιδρούν έπειτα από διέγερση με TLR, με πρωτεόλυση της επιφανειακής L-σελεκτίνης (CD62L) προκειμένου να ευοδωθεί η προσκόλλησή τους στο ενδοθήλιο των αιμοφόρων αγγείων. Μεταλλάξεις των γονιδίων IRAK4 και UNC93B1 οδηγούν σε αναποτελεσματική CD62L αποδέσμευση μετά από TLR ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων. Η κυτταρομετρική τεχνική που ανέπτυξαν στηρίζεται στην ανίχνευση του CD62L στην επιφάνεια των ουδετερόφιλων μετά από διέγερσή τους από TLR συνδέτες. Πρόκειται για μεθόδους σχετικά φθηνές και γρήγορες κατά τις οποίες ανιχνεύονται TLR γενετικές ανωμαλίες, που πρέπει όμως να επιβεβαιωθούν περαιτέρω με γονιδιακή ανάλυση.

Πέρασαν 12 χρόνια από την κλωνοποίηση του πρώτου γονιδίου TLR του ανθρώπου, Έκτοτε οι TLRs έχουν αναδειχθεί ως ρυθμιστές κλειδιά των φλεγμονωδών αντιδράσεων με έναν ευρύτερο ρόλο στην οξεία και χρόνια φλεγμονώδη αντίδραση από ό,τι αρχικά έγινε αντιληπτό. Εκτός του σημαντικού ρόλου τους στην έμφυτη ανοσία, οι TLRs εμπλέκονται στη ρύθμιση της ιστικής βλάβης και πολλών παθολογικών καταστάσεων. Ο τρόπος όμως που εμπλέκονται σε αυτές τις καταστάσεις χρειάζεται αποσαφήνιση. Μελέτες επίσης πρέπει να γίνουν προκειμένου να εξακριβωθεί ο ρόλος διαφόρων TLR συνδεδετών καθώς και των μορίων του TLR μονοπατιού ως πιθανών θεραπευτικών παραγόντων. Σίγουρα ένα μεγάλο κομμάτι στην αποκάλυψη των ανωτέρων ανήκει στην κυτταρομετρία ροής.



TLR6 μονοκύτταρα

TLR6 Β-κύτταρα

TLR5 μονοκύτταρα

TLR10 μονοκύτταρα

TLR10 Β-κύτταρα

Σχήμα 2: Έκφραση TLR 5, 6, 10 στα μονοκύτταρα και Β-κύτταρα περιφερικού αίματος.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μηνά Γιάγκου, Αν. Καθηγητή Ανοσολογίας, Τμήματος Βιολογίας για τις εποικοδομητικές διορθώσεις επί του κειμένου και τον κ. Δημήτρη Μπουγιουκλή για τα κυτταρομετρικά διαγράμματα που μου διέθεσε.

Βιβλιογραφία

1. Rakoff-Nhoun S, R, Medzhitov. (2009) Toll-like receptors and cancer. *Nature reviews cancer*. 9; 57-63.
2. De Franco A. et al. (2007). The Toll-Like Receptor Family of Immune Receptors. Chapter 3; *Innate Immunity*; New Science Press Ltd.
3. Waltenbaugh C, Doan T, Melvold R, Viselli S (2008). *Immunology*. Lippincott's Illustrated reviews. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. pp. 17. ISBN 0-7817-9543-5.
4. Sallusto F, Lanzavecchia A (2002). "The instructive role of dendritic cells on T-cell responses" (<http://arthritis-research.com/content/4/Suppl3/5127>). *Arthritis Res.* 4 Suppl 3: S127-32. doi: 10.1186/ar567
5. Mishra BB, Gundra UM, Teale JM (2008). „Expression and distribution of Toll-like receptors 11-13 in the brain during murine neurocysticercosis“. *Journal of Neuroinflammation* (<http://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-5-53>). PMID 19077284 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19077284>)
6. Medzhitov R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature reviews Immunology*. 1; 135-144.
7. Takeba K, S. Akira. (2004). TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology* 16; 3-9.
8. Kluwe J, A. Mencin & R.F. Schwabe. (2009). Toll-like receptors, wound healing and carcinogenesis. *J Mol Med.* 87(2); 125-138.
9. Martin D, K.B. Elkon. (2005). Autoantibodies make a U-turn: the toll hypothesis for autoantibody specificity. *JEM*; 202; 11; 1465-1469.
10. Zeromski J et al. (2008). Significance of Toll-like Receptors Expression in Tumor Growth and Spreading: A short Review. *Cancer Microenvironment*. 1; 37-42.
11. Wills-Karp M. et al. (2010) New insights into innate immune mechanisms underlying allergenicity. *Review. Nature Immunology*. 3; 2; 104-110.
12. Abreu M. (2010). Toll-like receptors signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nature Reviews. Immunology*. 10; 131-143.
13. Kelly MG, et al (2006). TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res.* 66: 3859-3868.
14. Salaum B. et al (2006) TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J Immunol* 176: 4894-4901.
15. Armstrong L, et al (2004). Differential expression of Toll-like receptor 2 and TLR-4 on monocytes in human sepsis. *Clin Exp Immunol*; 136: 312-319.
16. Gill R, A. Tsung, T. Billiar. (2010) Linking oxidative stress to inflammation: Toll like receptors. *Free Radic. Biol. Med.* Doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.006.
17. Visintin A, et al (2001) Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J. Immunol.* 166(1): 249-55.
18. Nomura F, et al (2000). Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J. Immunol.* 164(7): 3476-9.
19. Jiang Q, et al. (2000) Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *J. Immunol.* 165(7): 3541-4.
20. Flo TH, et al. (2001) Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. *J. Leukoc. Biol.* 69(3): 474-81.
21. Faure E, et al. (2000) Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappa B through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 275(15): 11058-63.
22. Lancaster G. et al (2005). The physiological regulation of Toll-like receptors expression and function in humans. *J Physiol* 563.3; 945-955.
23. Hirschfeld A.F. et al. (2007). Prevalence of Toll-like receptor signalling defects in apparently healthy children who developed invasive pneumococcal infection. *Clin Immunol.* 122; 271-278.
24. Dasu T. et al. (2009). A functional flow cytometry-based screening assay to detect TLR signaling defects in pediatric patients. *Clin Immunol*; 131, S.2, S133.
25. Dasu T. et al. (2009). Laboratory diagnosis of TLR signaling defects in children by flow cytometry. *Clin Immunol*; 131, F.74, S67.