

免疫學及其於生物醫學之應用報告
**INNATE IMMUNE SENSING AND ITS
ROOTS: the story of endotoxin**

學生:李嫩如

學號:9429510

學校:交通大學

系別:生化工程所碩一

(I agree my final report of the immunolgy course to post on the web of UBI/UBI Asia.)

ABSTRACT

宿主如何感測病原菌的存在?我們現在對於免疫學的觀念來自於科學家們長年的努力,不論是在微生物如何傷害宿主細胞、哪種物質能被宿主偵測和哪種受器被宿主用來偵測病原菌之類的問題,最後才慢慢發現感染性疾病的作用機制。而對於細菌毒素 lipopolysaccharide (LPS) 的化學、生物性和基因上的分析研究也最終導向了對宿主感測器-Toll-like receptors (TLRs) 的了解。

不同情況下不同的微生物感染會被不同的宿主受器所偵測而造成不同的疾病。先天性免疫系統受器會辨認微生物特殊的 motif。像有一種 receptor-ligand complex 的形式,發生在動物的 Toll-like receptor4 (TLR4)-MD2-CD14 complex 和細菌的 lipopolysaccharide (LPS) 間。最近有研究指出 TLR4 mediated responses 是非常多樣性的。除此之外,LPS 結構的多樣性和辨別這些細微差別 LPS 結構的 TLR4 跟非常多細菌性感染的疾病相關。這篇報告將回顧具有多樣性結構的 bacterial ligands (LPS) 和它的先天性免疫系統受器在形成感染性疾病過程中的相關性。也將探討 Toll-like receptor 的基本功能和在先天性免疫系統的生物性策略。

INTRODUCTION

在所有的文化和時代中，人類歷經了致死性疾病散佈所帶來的痛苦。這是我們現在所熟知的' infectious diseases'。複雜且多樣的大自然創造了瘟疫、霍亂和傷寒這些對人類有威脅性的疾病。所以不管是在醫藥還是科學，都在解決這些不因人的種族、性別、宗教甚至是階級地位的人類都會受到影響的疾病起源和成因。最重要的問題中心在於是哪種力量會造成死亡?除了疾病的成因是上帝的意志所造成的問題不論，只有確定疾病致死的成分才能夠發展預防或是治療的方法。而由於這些疾病所造成的症狀往往是發燒、嘔吐和腹瀉，早期的人便把這個現象歸類為'intoxication'。那麼造成疾病的毒素究竟為何?

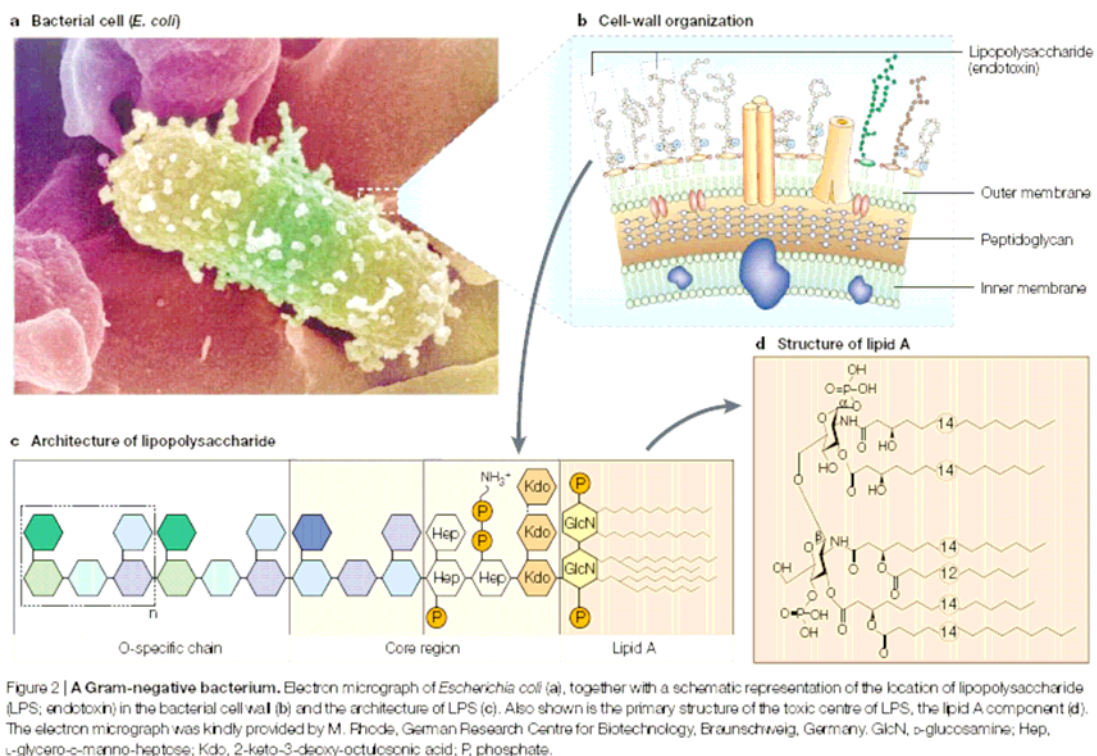
Metchnikoff是細胞免疫學的大師，一天，他觀察到水族箱中的水蚤病恹恹的，於是他用顯微鏡觀察這種體型微小又透明的節肢動物，發現水蚤原來是被一種類似酵母菌的真菌感染了，而在水蚤體內也發現一些吞噬細胞正在忙碌地吞食酵母菌的細胞和孢子。這些被吞食的酵母細胞，不久之後便逐漸被溶解而消化掉了。這不但是Metchnikoff研究生涯上最重要的一天，也是細胞免疫學史上的一個里程碑。因為這現象也可以說明人類的遊走細胞—白血球，為何會出現在發炎的傷口處，以及它們在宿主對抗微生物入侵上所擔任的工作。不久後吞噬細胞也被發現在哺乳類動物如人類當中存在，而吞噬細胞的重要性也廣泛的被認識。在當時Ehrlich於1889年也提出側鏈理論，發明了測定抗血清效力的方法。之後的許多年才了解到抗體是由淋巴球所產生而先天性免疫和適應性免疫系統有密切的合作關係。在此之後才了解適應性免疫系統是發生於先天性免疫之後。如果沒有巨噬細胞和組織樹狀細胞對病原菌發生antigen presenting function 則適應性免疫系統不會被啟動。但是在20世紀出，哪種receptor會被先天性免疫系統所使用來偵測微生物的入侵仍然不清楚。

近年先天性免疫細胞在如何偵測微生物感染上有長足的進步。這是由於對病原菌在化學、生物性、基因上和毒性上的分析研究。而對於細菌的lipopolysaccharide(LPS)的研究機制也最終導向了對Toll-like receptors(TLRs)的了解。

根據這些研究發現有些的宿主和微生物的關係是有益的，如腸道益生菌和人類的關係。但是大部分的病原菌則會穿過組織的屏障。先天性免疫不像適應性免疫系統要先有病原菌入侵過才能發動，而是藉由一些 evolutionarily conserved patterns 的辨認來認識特定族群的病源菌。

CHEMICAL DEFINITION OF ENDOTOXIN

由於 Mary Jane Osborn 和 Hikaido Nikaido 的努力，我們今日可以得知內毒素是 Gram-negative 細菌外細胞壁上的一種重要的構造成分。包含了 O-antigenic polysaccharide、核心的寡糖和 lipid A。下圖是 Gram-negative 細菌的構造示意圖。



其中構造中的 lipid A 受到最多的注意，到目前為止有許多的證據顯示指出它具有毒性和引起體內發熱的性質。由 Gram-negative 細菌來的 lipid A 雖然大部分有相同的結構但是少部份會有些許的不同。

STRUCTURAL VARIATIONS IN LIPID A

雖然 lipid A 是所有 Gram-negative 細菌膜上基本的組成份之一，但是它具有高度的變異性。如下圖：為幾個 Gram-negative 細菌中 lipid A 結構變異性的例子。

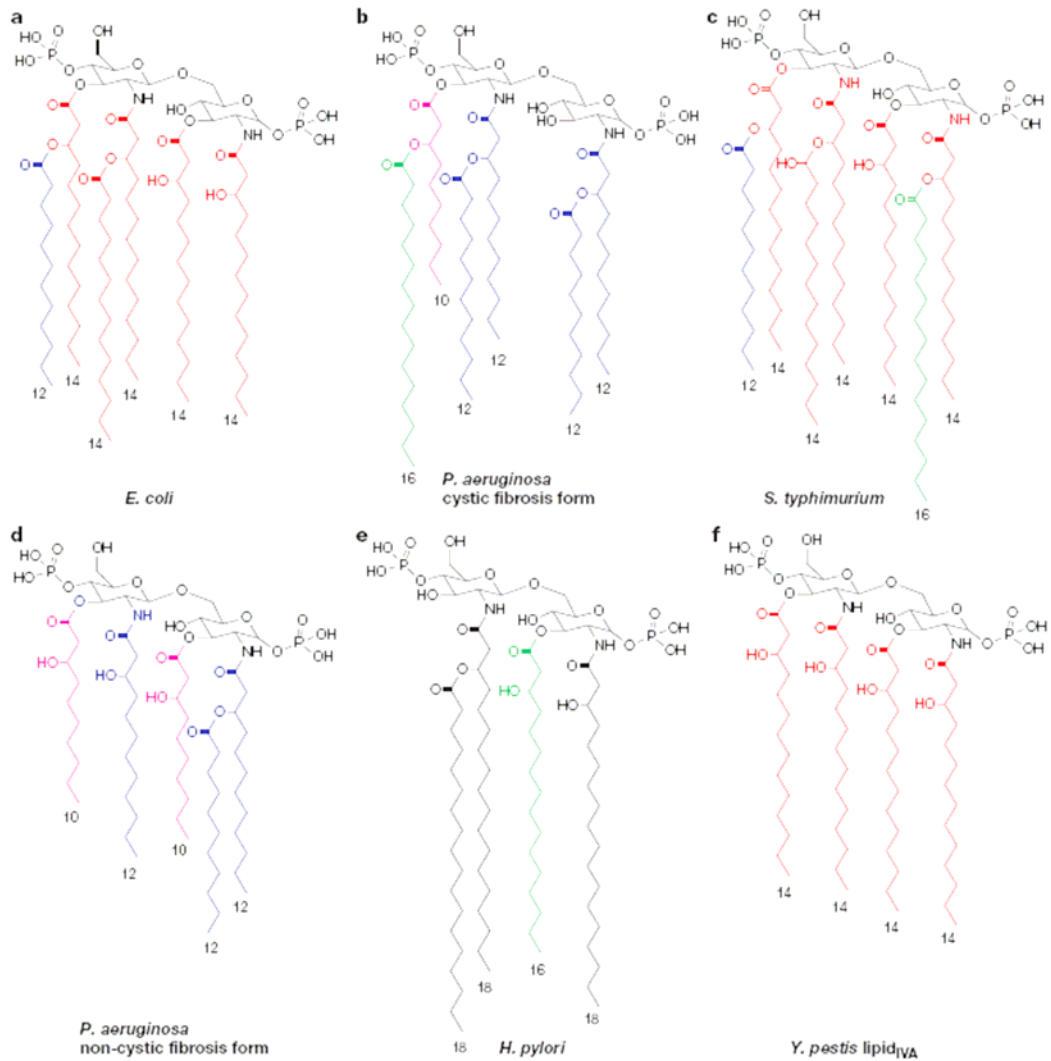


Figure 5 | The structural diversity of lipid A in Gram-negative microorganisms. Chemical structures of hexa-acylated *Escherichia coli* (a) and *Pseudomonas aeruginosa* (b), hepta-acylated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (c), penta-acylated *Pseudomonas aeruginosa* (d), tetra-acylated *Helicobacter pylori* (e) and lipid_{IVA}, a precursor of enteric lipid A or isolated from *Yersinia pestis* grown at 37°C (f). Colours indicate different fatty-acid carbon lengths.

Lipid A 多變異性通常多在 fatty-acid side chains 的數量和長度或是一些 terminal phosphate residues 的修飾。Lipid A 這樣的變異性跟疾病有非常大的關係如發生在人類身上，可以改變和其受體的辨認關係。尤其是在構造和功能的相關性研究顯示出 lipid A 中的 acyl side chains 的數量和長度和人類 TLR4 的訊息傳遞有決定性的影響。

REGULATING THE STRUCTURE OF LIPID A

Gram-negative 細菌不管在不同的環境或是在宿主的組織中都有機制去修飾 lipid A。如下圖：

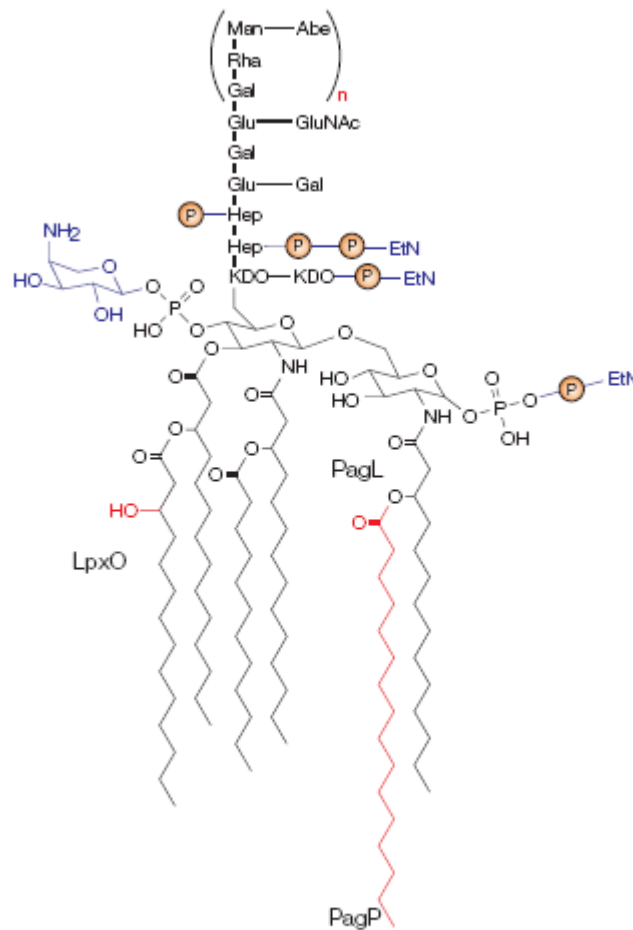


Figure 6 | The chemical structure of environmentally regulated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lipid A modifications. PhoP-mediated modifications are shown in red and PmrA/PmrB-mediated modifications in blue.

這樣的修飾可以對抗宿主分泌的 cationic antimicrobial peptides (CAMPs) 而且改變 TLR4 的辨認。Cationic antimicrobial peptides (CAMPs) 是先天性免疫的構成要素之一且具有 conserved amphipathic and cationic structural features。一般的 motif 包含了 α -helical peptides、modified acylated peptides 和 β -sheet 結構。Cationic antimicrobial peptides 普遍出現於所有生物體中，包括：植物、昆蟲、軟體動物、甲殼類、兩棲類、魚類、鳥類、哺乳類及人類，已經有超過五百種此類 peptide 被發現。而且對於 lipid A 而言也有來自 TLR4-MD2-CD14 辨認的選擇壓力而衍生的 lipid A 多樣性演化。

TLRs AND INNATE IMMUNE RECOGNITION

自從在 1980 年末期 Charles Janeway 發明了先天性免疫這個名詞後就預測了 pathogen-specific pattern recognition receptors 的存在。Pathogen-specific pattern recognition receptors 會辨識微生物特殊且具保留性的分子。如下圖是細菌和宿主之間的互動關係：

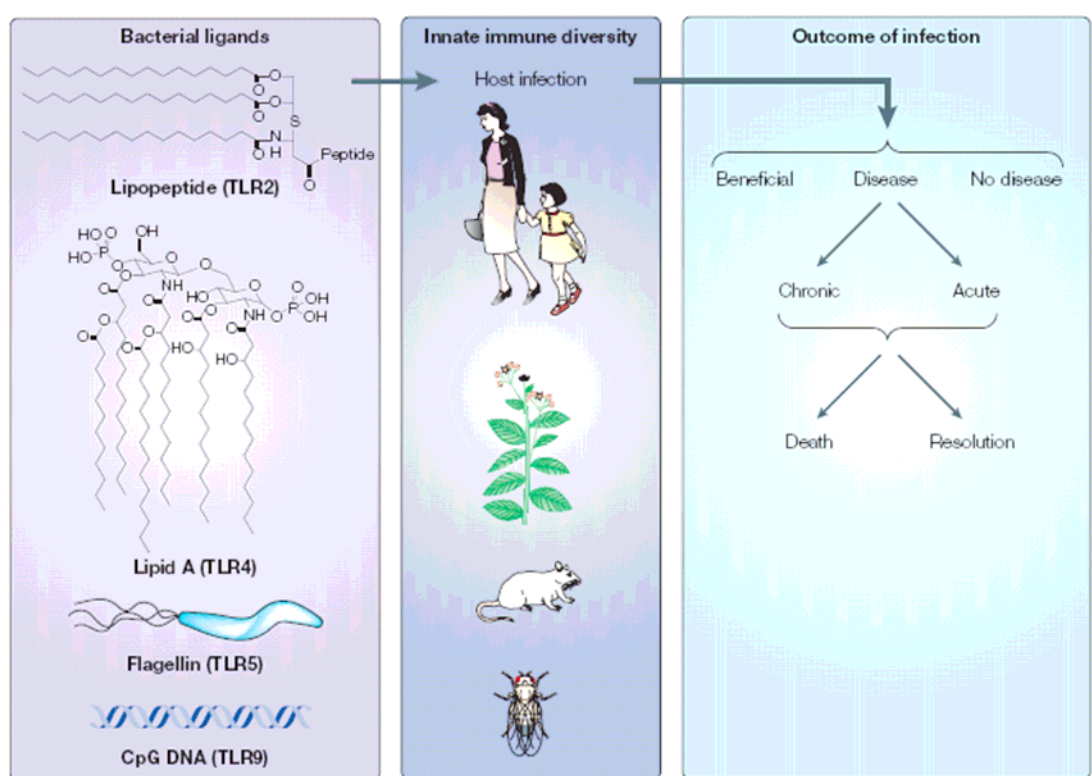


Figure 1 | The complexity of bacteria-host interactions. Pathogen-associated molecular patterns are recognized by the innate immune systems that are present in multicellular organisms. Innate immune responses to these bacterial ligands vary not only from species to species, but also within one particular species and might determine diverse infectious disease outcomes. TLR, Toll-like receptor.

TLRs 可以針對細菌、真菌和病毒對他們所擁有的結構成分做專一性的辨認，而去啟動訊息傳遞和發炎反應。如 TLR2 辨識 lipopeptide；TLR4 辨識 lipopolysaccharide；TLR5 辨識 flagellin；TLR7（人類 TLR8）和 TLR3 辨識細菌的產物如 ssRNA 和 dsRNA 而 TLR9 辨識 CpG DNA。辨識這些 ligands 依不同的 TLRs 在胞器座落的位置而可以在細胞表面和細胞內（如 late endosomes）發生。

THE CORE PATHWAY

LPS 是 Gram-negative 細菌細胞壁的成分，它可以引發相當有名的敗血性休克 (septic shock) 的全身反應。Gram-negative 細菌細胞壁的 LPS 可以和血漿蛋白 LBP (LPS-binding protein) 結合後再結合到 CD14 上。CD14 通過 GPI 錨定於細胞膜。TLRs 分子由胞外區、穿膜區及胞內區三部分組成。胞外區富含亮氨酸，可與 CD14 分子中的亮氨酸重複序列結合而介導蛋白質之間的相互作用。胞內區存在一段序列保守區，該序列與 IL-1 cytokine receptor 胞內區的保守序列有高度同源性，被稱之為 TIR。因此，TLRs 分子也屬於 IL-1 cytokine receptor 超家族的成員。LPS 以 LPS-LBP-CD14 三種複合物形式活化 TLRs 信號傳導。

Ligand 結合到 TLRs 的細胞膜外結構上會啟動複雜的訊息傳遞路徑最終導致 nuclear factor- κ B (NF- κ B) 這種轉錄因子的活化而且增加 pro-inflammatory cytokine 如 interleukin-6 (IL-6) 和 tumour-necrosis factor (TNF) 的轉錄。TLRs 的 cytosolic domain 稱為 TIR 因為他也出現在 IL-1 cytokine receptor 的 cytosolic domain。而其 cytosolic domain 是所有的 TLRs 的共同構造也是訊息傳遞的必需要件。Ligand 和 TLRs 的細胞膜外結構上結合會誘使結合在 TIR 區的 myeloid differentiation factor 88 (MyD88) 銜接蛋白活化。IL-1 cytokine receptor 和 ligand 結合後也是會活化 MyD88 銜接蛋白。MyD88 銜接蛋白有一端是 TIR 區會和 Toll 或 IL-1 上的 TIR 區發生反應，而在 MyD88 銜接蛋白的另一端則與另一個區域發生反應。LPS 與 TLRs 複合物結合後引發的下游事件主要包括以下幾個方面：① MyD88 通過 TIR 區與 TLRs 胞內區的 TIR 區結合，作為銜接蛋白招募 IRAK (interleukin-1 receptor-associated kinase)；② IRAK 結合 TRAF6 (TNF-receptor-receptor-associated factor 6) 從而活化 TAK1；③ 後者引發 NIK (NF- κ B 誘導激酶) 活化並與 IKK α / β (I- κ B 激酶) 形成複合物，作用於 I- κ B，使之降解而啟動 NF- κ B。

綜上所述，TLRs 除了扮演增加 pro-inflammatory cytokine 的角色外 TLR 也在作為連接天然免疫與特异性免疫的關鍵環節發揮著極為重要的作用。最近也有研究指出 TLRs 甚至因為對於其腸道共生細菌的辨認也參與了腸道的發展和保護。而 Irina Smirnova 等通過對不同種屬生物 TLR4 基因的序列分析，也揭示了 TLR4 分子存在多樣性且胞外區變化明顯高於胞內區；大約有 10% 的人類 TLR4 分子中含有共 12 種稀有氨基酸，顯示 TLR4 分子在進化過程發生了選擇，而進化選擇的結果對物種的疾病易感性的影響也是一個重要的問題。下圖是 TLRs 的訊息傳遞路徑：

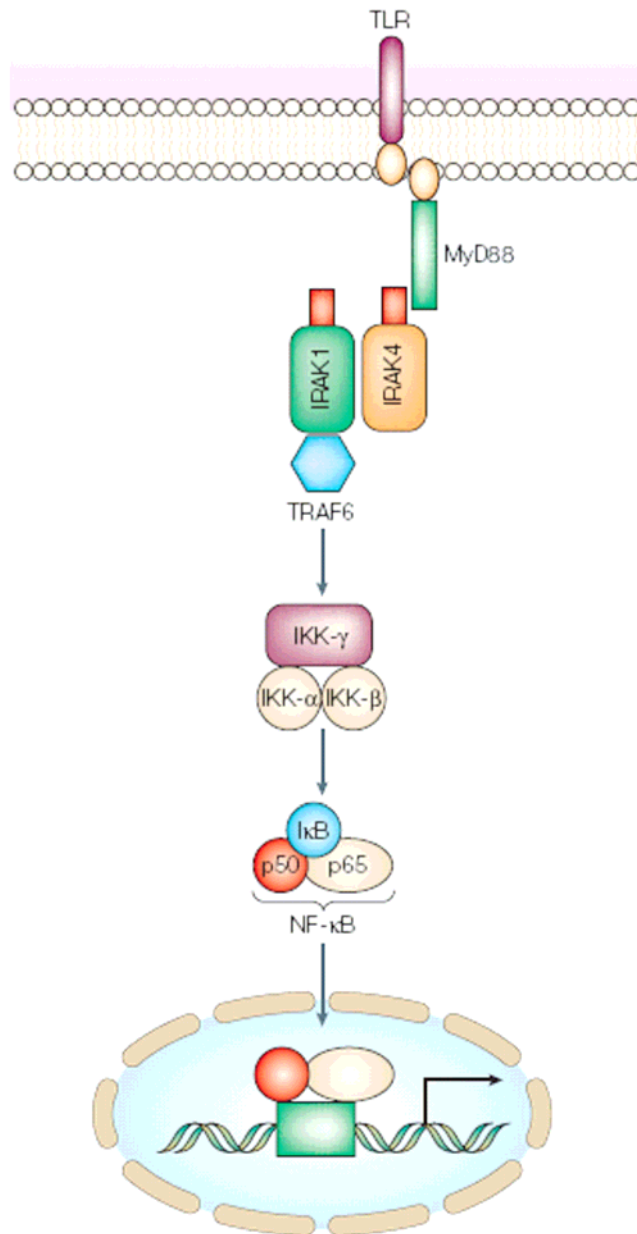


Figure 2 | **Intracellular signalling by Toll-like receptors (TLRs).** Stimulation of the extracellular domain of a TLR triggers the intracellular association of myeloid differentiation factor 88 (MyD88) with its cytosolic domain. Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4), IRAK1 and tumour-necrosis factor (TNF)-receptor-associated factor 6 (TRAF6) are subsequently also recruited to the receptor complex. Through a series of other intermediate compounds (not shown), the IκB kinase (IKK) complex is phosphorylated, and in turn phosphorylates IκB, which allows nuclear factor (NF)-κB to translocate to the nucleus.

HUMAN TLR4 AND LIPID A

最近的研究指出人類和老鼠對不同的 lipid A 結構有不同的鑑識機制，這最後終將導致不同疾病的發生。不同種之間的比較發現 TLR4 的細胞外區域變異性高於細胞內區域的變異性。下圖代表了 TLR4 的細胞外區域變異性反應出在演化上選擇地壓力而決定了 lipid A 結構。這也印證了長期以來就知道老鼠的 TLR4 complex 比人類的 TLR4 在辨認 lipid A 結構更‘promiscuous’。例如鼠疫桿菌的 lipid A 可以誘發老鼠的 TLR4 反應而人類的 TLR4 無法辨識鼠疫桿菌的 lipid A，即使是在非常高濃度的 lipid A 下。

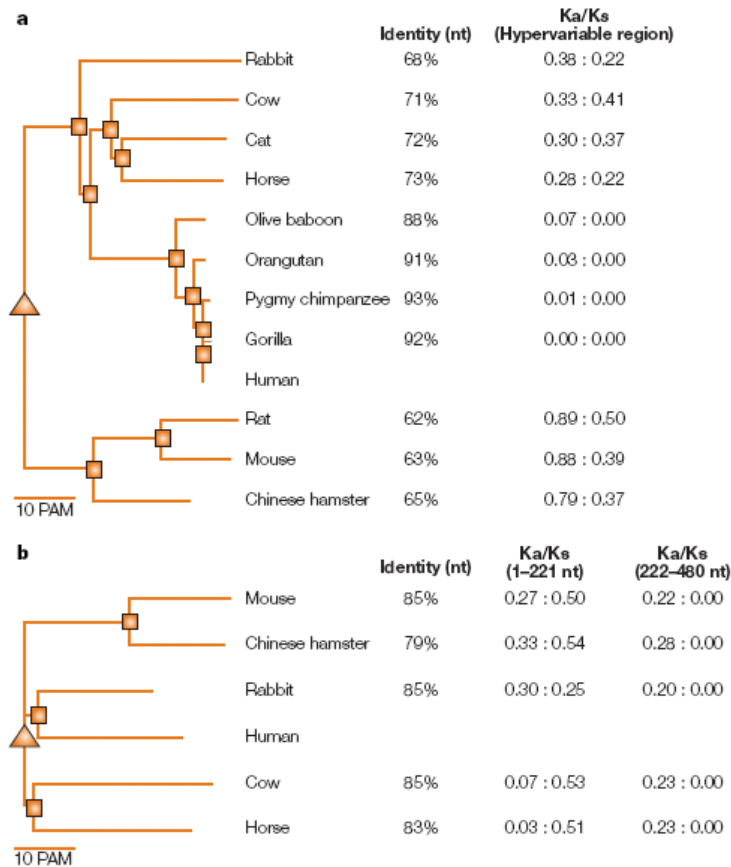
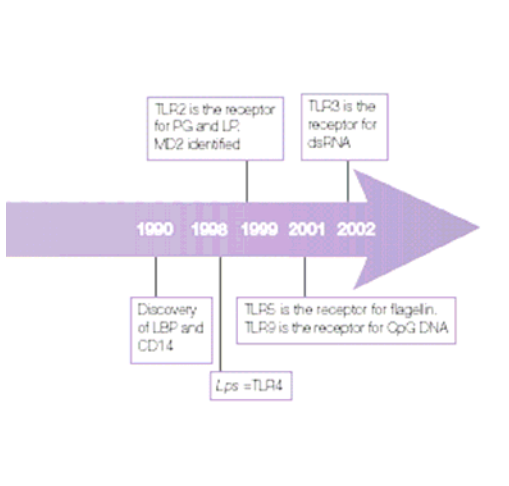
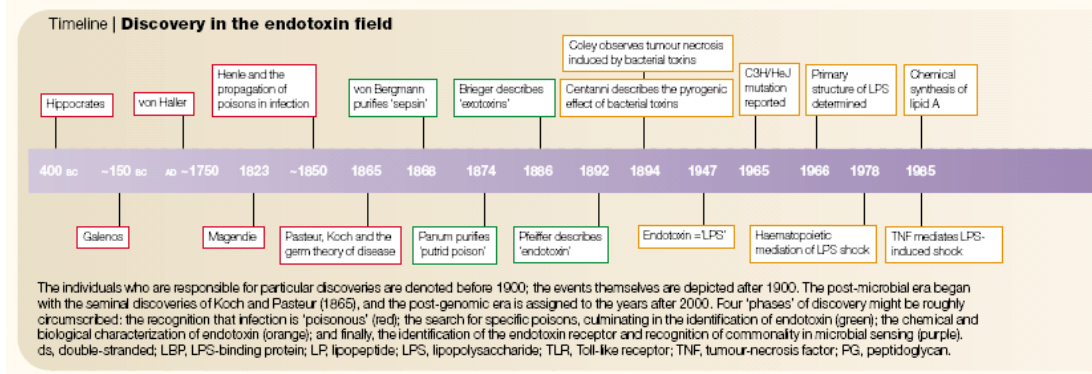


Figure 4 | **A hypervariable region of the TLR4 extracellular domain and the C-terminus of the accessory protein MD2 evolved across species.** Results are shown from pair-wise alignments of human TLR4 (a) or MD2 (b) with those from other species. Alignments and construction of phylogenetic trees were performed using Multalin and DisplayFam, respectively (see the Online links box for further information). Mutation rates were calculated using DnaSP 3.51 (see the Online links box). Ka is the number of non-synonymous substitutions per non-synonymous site and Ks is the number of synonymous substitutions per synonymous site. GenBank accession numbers for TLR4 sequences analysed: cat, AB060687; Chinese hamster, AF153676; cow, AB056444; gorilla, AH011592; horse, AY005808; human, U88880; mouse, AF110133; Olive baboon, AH008378; orangutan, AH011591; pygmy chimpanzee, AH008351; rabbit, AY101394; rat, NM019178. GenBank accession numbers for MD2 sequences analysed: Chinese hamster, AF325501; cow, AF368418; horse, AY398685; human, AB018549; mouse, AB018550. nt, nucleotides.

THE FUTURE

我們現在對於先天性免疫的了解是由於早期科學家對於微生物病原菌和因為 Gram-negative 細菌 LPS 的發現而來。下圖是說明內毒素發現的時間表：



內毒素結構的發現在了解微生物是如何治病機制上的了解是極大的里程碑。而 LPS receptor 的發現更使人了解許多微生物的毒性物質共享相同的傳遞機制。感測微生物的受器一面傷害我們的身體也一面保護我們不受病菌的侵襲。但是現在仍有一個問題仍未解決，這個問題也是內毒素研究的熱門焦點。不論在細胞或是所有的動物中都會發現細胞或體內經過小劑量 LPS 的刺激之後，對於 LPS 的刺激呈現低反應或無反應的狀態稱為 endotoxin tolerance。儘管這一現象早就被發現了但是卻一直無被解答。TLRs 的發現或許能為這個問題來新的契機。而對於具有多樣性結構的 bacterial ligands (LPS) 和它的先天性免疫系統受器在決定感染性疾病的相關性上的闡明，也可以利用到發展更安全和更低價位的疫苗上。使 LPS 當成是 adjuvant 時使用更為安全。

REFERENCE

1. Nat Rev Microbiol. 2005 Jan;3(1):36-46
2. Nat Rev Immunol. 2003 Feb;3(2):169-76
3. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2003;43:609-28. Epub 2002 Jan 10