



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

**Señalización mediada por receptores tipo Toll:
regulación y evasión.**

Autor: Víctor Fuentes Valverde

Tutora: Dra. María Molina Martín

Convocatoria: Junio 2017

RESUMEN.

Unos de los receptores implicados en la inmunidad innata son los TLRs que permiten detectar los microorganismos de una forma temprana a través de PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*). Tras el descubrimiento de los TLRs y su cascada de señalización se abrió un nuevo campo de estudio, la evasión de la respuesta innata a este nivel por parte de bacterias y virus. En este trabajo se analizan cuáles son las principales vías por las cuales los microorganismos son capaces de evadir la respuesta innata a través del sistema TLR.

Por otra parte, la hiperactivación, vinculada a la detección de ligandos endógenos DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*), del sistema TLR puede llevar a una situación patológica, de ahí la importancia de su regulación.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.

La inmunidad innata es la primera línea de defensa frente a la infección. No genera memoria y se activa con rapidez. Los receptores TLR participan en la inmunidad innata a través del reconocimiento de PAMPs y DAMPs. Los PAMPs son patrones moleculares de patógenos, con frecuencia compartidos por distintas clases de microorganismos y a menudo esenciales para ellos. Por tanto, dificultan que se puedan deshacer de las dianas moleculares, sin embargo, sí pueden generar estrategias para evadir la respuesta innata. Los DAMPs son moléculas endógenas que producen o liberan células dañadas en situaciones de trauma, hipoxia, célula infectada o muerte celular (Abbas, et al., 2015).

Se conocen 10 TLRs que tienen diferentes localizaciones celulares, bien en la superficie, en membrana plasmática (TLR 1, 2, 4, 5, 6, 10), o bien intracelulares en endosomas y retículo endoplásmico (TLR 3, 7, 8 y 9) (Beutler & Blasius, 2010; Brown, et al., 2011; Yesudhas & Gosu, 2014). Cada uno de estos receptores va a reconocer diferentes ligandos. Los situados en membrana plasmática reconocen PAMPs del ambiente extracelular. Por ejemplo, el LPS de bacterias Gram negativas es reconocido por TLR4, TLR2 en combinación con TLR1 o TLR6 es capaz de reconocer peptidoglicano de bacterias Gram positivas, TLR5 reconoce flagelina bacteriana, TLR3 reconoce ARN bicatenario producido por muchos virus durante su replicación, TLR7 y 8 reconocen ARNmc, TLR9 reconoce secuencias de ADN (figura 1) (Kawai & Akira, 2006). Los TLRs 3, 7, 8 y 9 distinguen entre ácidos nucleicos propios y exógenos por su compartimentalización en el espacio intracelular.

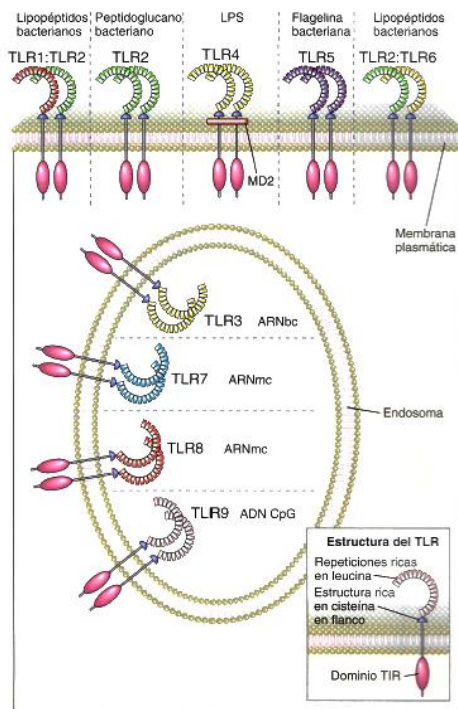


Figura 1. Localización de TLRs y ligandos reconocidos (Abbas, et al., 2015)

Hay material genético propio en el medio extracelular, pero en el medio intracelular este será de microorganismos fagocitados, evitándose así una respuesta inmune inapropiada. Además, reconocen cadenas de ácidos nucleicos poco comunes en mamíferos. Por ejemplo TLR9 reconoce secuencias CpG no metiladas (el nuestro está metilado) o TLR3 reconoce ARN de doble cadena (virus) (Akira & Kawai, 2010; Brubaker, et al., 2015). Las proteínas responsables de regular el tráfico celular determinan la compartimentalización, estas son; PRAT4A que dirige a TLR4, gp96 actúa sobre el resto de receptores de membrana plasmática y UNC93B1 es responsable de la localización de receptores intracelulares como TLR3, 7 y 9 (Akira & Kawai, 2010).

1. Estructura de los TLRs.

Los TLRs se componen de tres regiones. La región extracelular, compuesta por dominios ricos en aminoácido leucina, encargado de la especificidad de ligando, denominados LRR (*Leucine-rich repeats*) (Kawai & Akira, 2009; Abbas, et al., 2015; Ve, et al., 2015). Una región transmembrana α -hélice simple, responsable de la homo y heterodimerización de estos receptores, necesario para desencadenar la cascada de señalización (Reuven, et al., 2014). Una región intracelular con un dominio que es homólogo a IL-1R (*interleukin-1 receptor*) conocido como dominio Toll/IL-1R (TIR), necesario en la cascada de señalización cuya función es interactuar con TIRAP (*TIR-containing adaptor protein*) y TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*), que posteriormente reclutan a MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88*) y TRIF (*TIR domain-containing adaptor-inducing IFN- β*) respectivamente. Todas estas proteínas contienen un dominio TIR que interactúan con el dominio intracelular de los dímeros de TLR mediante interacciones TIR-TIR (Figura 2) (Kawai & Akira, 2009; Abbas, et al., 2015).

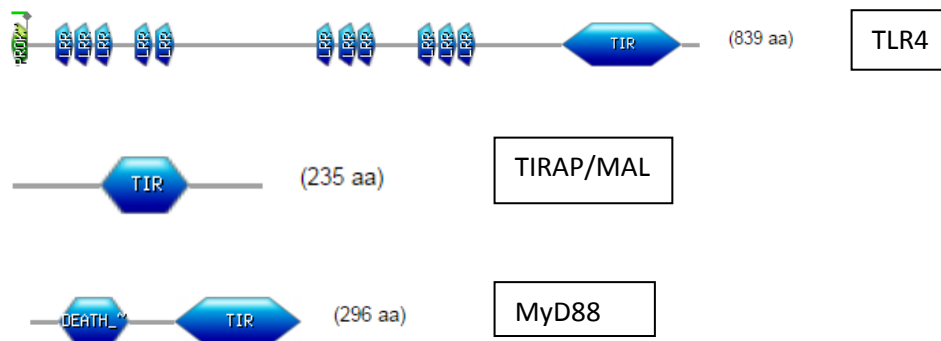


Figura 2. Proteínas con dominios TIR

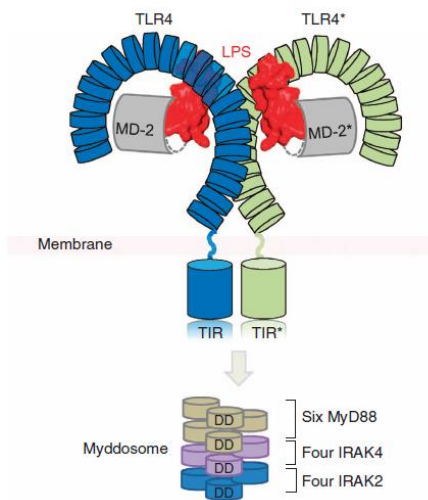


Figura 3. Esquema reconocimiento de LPS (Park & Lee, 2013).

2. Reconocimiento de ligandos por los TLRs.

Este se produce por interacción entre el exodominio del receptor (dominios LRR) y el ligando, mediante interacciones iónicas o hidrófilicas (TRL3-ARN) o por interacción hidróficas (TLR1-lipopeptido). Esto lleva a la homodimerización o heterodimerización a través del dominio transmembrana, lo que permite reclutar a los adaptadores y desencadenar la cascada de señalización (Reuven, et al., 2014).

En el reconocimiento de LPS por TLR4, la proteína sanguínea LBP se une al LPS formando un complejo que es reconocido por CD14 y transferido al complejo TLR4-MD2 (Figura 3) (Park & Lee, 2013).

TLR2, para reconocer los PAMPS heterodimeriza con TLR1 o TLR6, utiliza los correceptores CD36 o CD14, respectivamente. Esto permite reconocer una amplia variedad de PAMPs procedentes de hongos, parásitos, bacterias o virus.

TLR5, localizado en membrana basolateral de células epiteliales, reconoce flagelina, una proteína estructural que conforma los flagelos. Su función es detectar bacterias flageladas del intestino que hayan sido capaces de atravesar el epitelio intestinal (Kawai & Akira, 2009). Si la localización fuese en membrana apical se produciría inflamación en una situación fisiológica.

El reconocimiento de moléculas endógenas, DAMPs, también denominadas alarminas, por parte de los TLR esta mediado por TLR2 y TLR4. Estos DAMPs pueden ser

extracelulares como LDL (*Low Density Lipoprotein*), ácido hialurónico, o pueden ser intracelulares como chaperonas y HMGB-1 que durante un proceso de inflamación o daño tisular salen al medio extracelular y pueden ser detectadas (Kawai & Akira, 2009; Saïd-Sadier & Ojcius, 2012).

3. Señalización dependiente de TLR.

Tras la activación del TLR dos vías pueden ser activadas, dependiente de MyD88 o dependiente de TRIF. Según el tipo de receptor se activa una vía u otra: TLR 1, 2, 6, 7, 8 y 9 activan exclusivamente la vía dependiente de MyD88, mientras que TLR3 sólo activa la cascada de señalización dependiente de TRIF. Hasta ahora, sólo TLR4 es capaz de activar ambas cascadas (Ruyschaert & Lonez, 2015) (Figura 4).

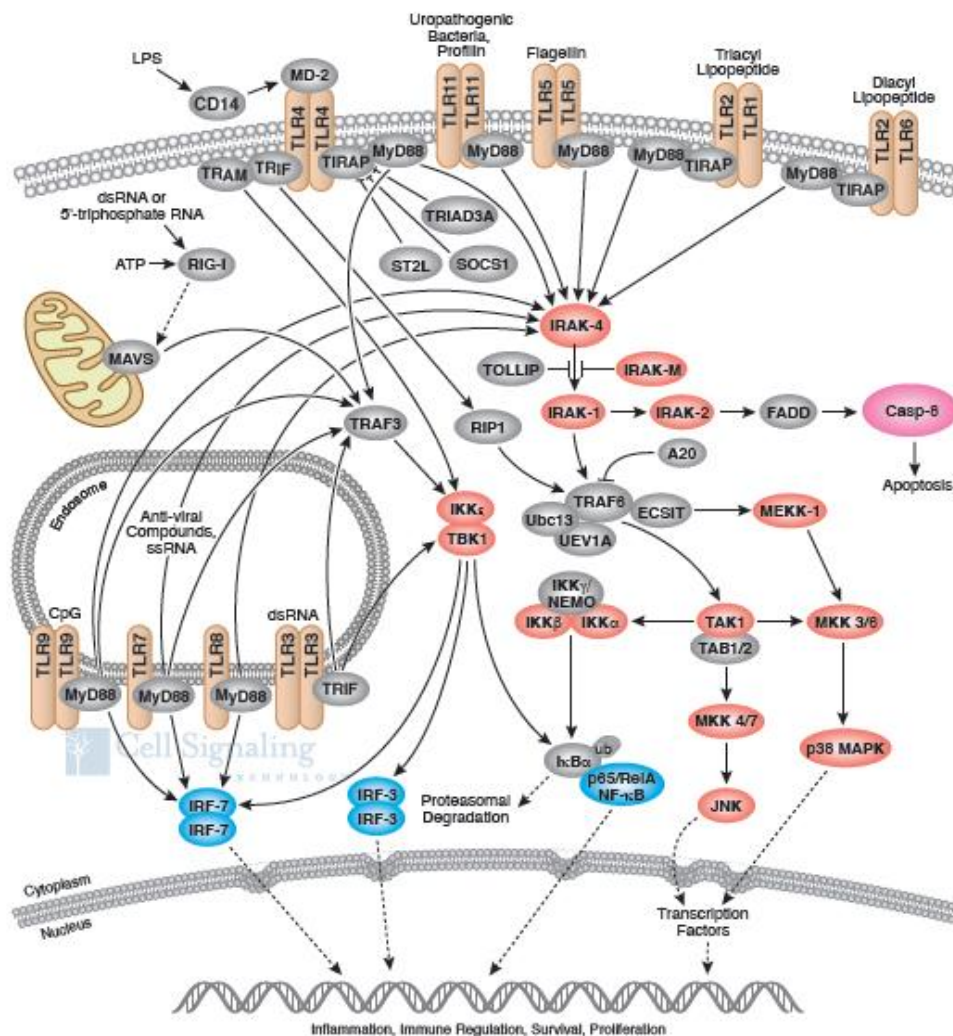


Figura 4. Esquema general de señalización TLR (Mandrekar, 2014).

3.1.- Señalización dependiente de MyD88.

Todos los receptores TLRs, a excepción de TLR3, utilizan MyD88 como adaptador en la señalización intracelular. Tras la unión del ligando al receptor TLR4, este recluta a TIRAP, que está en membrana por poseer dominios de unión a fosfatidilinositoles (Ve, et al., 2015), el adaptador TIRAP reclutará a MyD88 por interacciones TIR-TIR. A partir de aquí se forma el denominado mydosoma, MyD88 interacciona con su dominio *death* con otras moléculas de MyD88 y con IRAK4 (*IL-1 receptor-associated kinase*) serin/treonin quinasa, estos dominios también son responsables de la agregación de IRAK1 o IRAK2 (Park & Lee, 2013). Cuando este se ha formado, primero se autofosforilan las IRAK4s y a continuación fosforilan a IRAK1s. Como MyD88 sólo se une a IRAK1 no fosforilado, una vez esta es fosforilada es liberada y permite la activación de la ubiquitina ligasa TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*), que se autoubiquitina añadiendo K63-ubiquitina (TRAF6-K63-ubiquitina) (O'Neill, 2008), a diferencia de la poliubiquitinación en K48 no dirige a la degradación por el proteasoma (Pickart & Eddins, 2004; Park & Lee, 2013). Esta ubiquitina es reconocida por los dominios dedos de Zinc del complejo formado por TAK1, TAB2 y TAB3 (O'Neill 2008), lo que desencadena la señalización hacia NF- κ B y MAPKs. El complejo TAK/TAB se encarga de activar, por fosforilación, al complejo IKK compuesto por IKK α , IKK β (subunidades con actividad quinasa) e IKK γ (NEMO) (subunidad con función reguladora) que media la fosforilación de la proteína I κ B, permitiendo que sea K-48 poliubiquitinada para posteriormente sea degradada por el proteasoma (Li & Qin, 2005), liberando así al factor de transcripción NF- κ B. Se expresarán citoquinas (TNF, IL-1 e IL-6), quimioquinas (CCL2, CXCL8), moléculas de adhesión endotelial (selectina E) que permiten la unión al endotelio y posterior infiltración hasta llegar al órgano diana y moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86). Como resultado aparece inflamación, crecimiento celular y estimulación de la inmunidad adaptativa (Pickart & Eddins, 2004; Johnson, 2015). Por otra parte, el complejo TAK1 también controla la activación de las MAPKs p38 y JNK, que activarán factores de transcripción como AP-1 que activa la expresión de IFN de tipo 1 confiriendo un estado antivírico. En células dentríticas hay una expresión constitutiva del factor de transcripción de interferones de tipo I IRF7, fosforilado y activado por TAK1 (Kawai & Akira, 2006; Akira & Kawai, 2010; Brown, et al., 2011; Abbas, et al., 2015).

3.2.- Señalización dependiente de TRIF.

El resultado de esta vía es la activación de los factores de transcripción NF-KB e IRF3, que lleva la expresión de citoquinas proinflamatorias e interferones de tipo I, respectivamente.

TRIF es responsable de reclutar tanto a TRAF6, que se comporta de la misma forma que en la señalización dependiente de MyD88, como a TRADD. Este a su vez recluta a Pellino-1, E3-ubiquitina ligasa, responsable de la K-63 poliubiquitinación de RIP-1. Esta poliubiquitinación permite la activación del complejo TAK1 por la interacción con los dedos de Zinc (Akira & Kawai, 2010). Por otra parte, TRIF es capaz de reclutar a TRAF3, que se poliautoubiquitina en K63 (Takeuchi & Akira, 2010). Esta poliubiquitinación es reconocida por el complejo TBK1-IKKi cuyo sustrato de fosforilación es el factor de transcripción IRF3 tras esto, IFN- α e IFN- β son expresados (Li & Qin, 2005; Flannery & Bowie, 2010).

OBJETIVOS.

Dada la importancia de la señalización mediada por receptores TLR para el desarrollo de una respuesta inmune eficaz frente a patógenos y teniendo en cuenta la compleja cascada de señalización, se pretende profundizar en:

- 1) La regulación de esta vía.
- 2) Relación entre un defecto de la regulación de esta vía y la etiopatogénesis.
- 3) Las estrategias moleculares que hayan podido desarrollar bacterias y virus con el fin de evadir la respuesta innata mediada por estos receptores.

METODOLOGÍA.

Para la elaboración del trabajo se ha realizado una búsqueda bibliográfica en Pubmed con los siguientes criterios: “TLR”, “Toll-like receptors”, “TLR and negative regulation”, “evasión TLR”, “TLR autoinmunity”, “TLR cáncer”. Además, se han usado libros disponibles en la biblioteca de la facultad. También se ha realizado búsquedas de secuencias aminoacídicas en *protein* del NCBI para posteriormente usar la aplicación Prosite con el fin de encontrar dominios funcionales en algunas de las proteínas de interés.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. Regulación negativa de los TLR.

Como resultado de una sobreestimulación del sistema TLR pueden aparecer enfermedades autoinmunes, inflamación crónica o neoplasia. Por ello, se han desarrollado

multitud de mecanismos fisiológicos con el fin de mantener el balance proinflamatorio-antiinflamatorio (Figura 5) (Anwar, et al., 2013). Algunos estudios muestran que una exposición continuada a LPS produce como respuesta una disminución en los niveles de citoquinas. Este fenómeno es conocido como tolerancia a endotoxinas (Brown, et al., 2011).

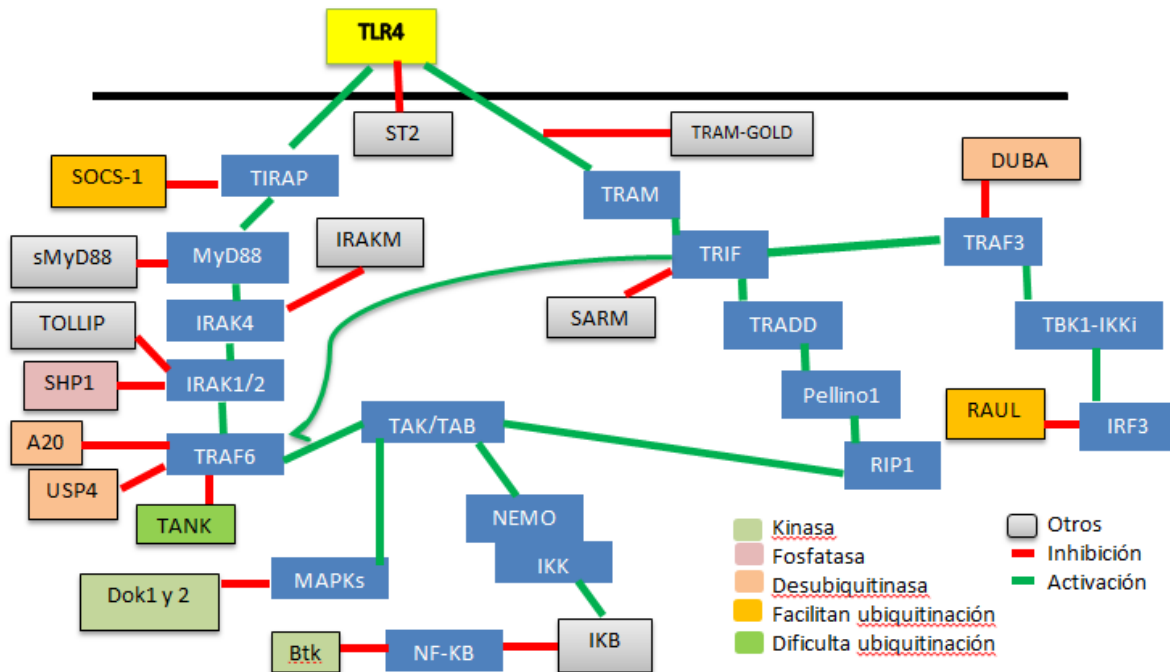


Figura 5 . Regulación negativa de la vía MyD88 dependiente y TRIF dependiente.

1.1.- Regulación por fosforilación.

La fosforilación es un proceso por el cual se incorpora un grupo fosfato a una biomolécula, induciendo un cambio de conformación en ella. La modificación del estado de fosforilación la pueden llevar a cabo kinasas o fosfatasas. Entre las kinasas encontramos a Dok1, Dok2 y Btk, todas ellas activadas por TLR4 activado. Dok1 y Dok2 fosforilan proteínas de la vía ERK-MAPKs inhibiendo esta vía, pero no JNK, ni NF-κB. Btk fosforila a NF-κB inhibiéndolo (Brown, et al., 2011). Entre las fosfatasas están SHP-1 y SHP-2. La primera responsable de la inhibición de la vía dependiente de MyD88 por actuar sobre IRAK e IRAK2, mientras que SHP-2 cuya diana es desconocida, interrumpe la vía dependiente de TRIF (Anwar, et al., 2013).

1.2.- Regulación de la ubiquitinación.

La ubiquitina es una proteína estructuralmente conservada que se une covalentemente a otras y produce cambios en la estabilidad o actividad de estas proteínas que posteriormente serán degradadas por el complejo del proteasoma. A continuación, se describen tres posibles

mecanismos para la regulación relacionados con la ubiquitina, a saber: dificultando ubiquitinación, promoviendo la ubiquitinación y eliminando cadenas de ubiquitina.

Las proteínas A20 y USP4 (peptidasa ubiquitina específica 4) eliminan las cadenas de K63-poliubiquitina de TRAF6, impidiendo su reconocimiento por el complejo TAK/TAB. Estas desubiquitininas actúan en la vía dependiente de MyD88. Por el contrario, DUBA es una desubiquitinasa de cadenas de K-63 poliubiquitina de TRAF3, intermedio en la cascada de señalización independiente de MyD88 (Takeuchi & Akira, 2010). Entre las proteínas que median la ubiquitinación encontramos a RAUL y SCOS-1. RAUL es responsable de la ubiquitinación de IRF3 e IRF7. Mientras que, SCOS-1 (*Suppressor of cytokine signaling 1*) ubiquitina TIRAP. Por último, TANK es una proteína que dificulta la ubiquitinación de TRAF6 (O'Neill, 2008; Anwar, et al., 2013).

1.3.- Factores solubles.

Estos pueden estar en el medio extracelular compitiendo por la unión con el ligando, o bien a nivel intracelular dificultando que se recluten las proteínas adaptadoras. Los monocitos sanguíneos son capaces de liberar al medio TLR2, TLR4 y CD-14 solubles que se unen a los mismos ligandos que sus homólogos de membrana, pero sin activar la respuesta inmune (Anwar, et al., 2013; Jiménez-Dalmaroni, et al., 2016).

Algunos reguladores negativos llevan a cabo su función gracias a la presencia de dominios TIR. La proteína ST2 actúa a dos niveles; inhibiendo la sobreexpresión de TLR1 y TLR4 y previniendo la sobreactivación, gracias a su dominio TIR, que dificulta que TLR2, TLR4 y TLR9 recluten a las proteínas adaptadoras. TRAM con dominio GOLD, encargado de internalización y degradación de TLR4 (Anwar, et al., 2013), la variante *splicing* de MyD88 (MyD88s) que carece de dominio *death* motivo, por lo cual, no puede reclutar a IRAK4 (Janssens, et al., 2003; Li & Qin, 2005) y SARM, se une a TLR3 y TLR4, inhibiendo selectivamente la vía dependiente de TRIF (O'Neill, 2008). TOLLIP (*Toll-interacting protein*) regula el tráfico de proteínas de membrana a través de interacción con proteínas y fosfoinosítoles. Presenta un dominio de unión a TIR, otro de unión a IRAK1 e IRAK2 y por último un dominio de unión a fosfoinosítoles por el cual se une a membrana. De esta manera estabiliza el *mydosoma* e impide la disociación de IRAK1 o IRAK2 (Capelluto, 2012). SIGIRR, cuya sobreexpresión inhibe la síntesis de citoquinas y su déficit las exagera, es otro regulador negativo con dominio TIR cuyo mecanismo de acción es desconocido (Li & Qin, 2005; Molgora, et al., 2016).

IRAK-M, también denominada IRAK3, carece de actividad kinasa y se cree que impide la activación de TRAF6 por su unión al complejo MyD88/IRAK4/IRAK1. Esta interacción puede ser debida al dominio *death* compitiendo con el resto de IRAKs con capacidad para fosforilar (Du, et al., 2014).

1.4.- Regulación postranscripcional.

Han sido descritas dos proteínas con un dominio de dedos de Zinc que se une al ARN mensajero, posteriormente degradado por el dominio con actividad ARNasa. La primera es Zc3h112a cuya diana es ARN mensajero de IL-6 e IL-12. La deficiencia en esta ha sido relacionada con un incremento del título de autoanticuerpos. La segunda proteína, es tristeraprolina (Xfp36), relacionada con artritis reumatoide, su diana es ARN mensajero de TNF (Akira & Kawai, 2010).

2. Asociación entre TLR y enfermedad.

Como consecuencia de una sobreestimulación del sistema pueden aparecer situaciones patológicas. Así, en artritis inflamatoria hay un incremento de fibronectina, chaperonas y ácido hialurónico de bajo peso molecular responsables de la activación de osteoclastos, a través de TLR4, con la consiguiente degradación de tejido óseo. A este tipo de fenómeno se le denomina inflamación estéril (Hosseini, et al., 2015; Jiménez-Dalmaroni, et al., 2016). En lupus eritematoso sistémico la proteína nuclear HMGB-1 facilita la internalización de ARN propio para que pueda ser reconocido por TLR7 desencadenando la respuesta inflamatoria. La catelicina (LL37) es una proteína sobreexpresada en tejido psoriásico que favorece la internalización de ARN y ADN propio que será reconocido por TLR7 y TLR9, respectivamente (Akira & Kawai, 2010). En aterosclerosis las LDL oxidadas (*Low Density Lipoprotein*) son reconocidas por TLR4 y TLR2, permitiendo su fagocitosis por macrófagos formándose las células espumosas. El sistema TLR en cáncer juega un doble papel. Por una parte, actúa como procancerígeno a través de la activación de NF- κ B. Este factor de transcripción regula la inflamación, la evasión de la apoptosis, la proliferación y los efectos antioxidantes (Pradere, et al., 2014). Además, en algunos tipos de cáncer se ha observado una disminución de micro ARNs, encargados de regular la expresión de NF- κ B (Tong, et al., 2015). En cáncer colorrectal aparece una sobreexpresión de TLR4 responsable de la expresión de TNF α y NF- κ B, cuando es tratado con eritonan, antagonista de TLR4 disminuye la capacidad migrativa de este tipo de tumores (Yesudhas & Gosu, 2014). Por otra parte, actúa como antitumorígeno gracias a los interferones de tipo 1, por su actividad anticancerígena y

antiproliferativa (Gajewski & Corrales, 2015). Esto explicaría porque imiquimod, agonista del TLR7, tiene indicación frente a cáncer basocelular superficial y como poli I:C, agonista sintético de TLR3 reduce el crecimiento de melanoma y hepatocarcinoma en ratones TLR3 deficientes (Pradere, et al., 2014) (Tabla 1).

Modificaciones sobre la regulación negativa realizadas en ratones, muestran la importancia de esta en la prevención de la enfermedad. Así, aquellos con deficiencia en A20 o IRAK-M presentan una inflamación exacerbada que, en el caso de A20, resulta letal (Anwar, et al., 2013; Flannery & Bowie, 2010). Una deficiencia en TANK conlleva la aparición de glomerulonefritis suprimida con antibióticos o deficiencias en MyD88 o IL-6. (Akira & Kawai, 2010).

Modificaciones en este sistema no solo están relacionadas con enfermedades autoinmunes, sino también, con una mayor susceptibilidad a infecciones. Ejemplo de esto, un déficit en esta proteína UNC93B1 está relacionado con la propensión a padecer ciertas infecciones víricas, como el virus del herpes simple (Abbas, et al., 2015). Además, se ha visto que un déficit en TLR3 se asocia con propensión a la infección de HVS-1 (Akira & Kawai, 2010).

Tabla1. Relación TLRs y procesos patológicos.

Patología	DAMP	TLR o mediador implicado	Estrategias terapéuticas
Artritis inflamatoria	Fibronectina, ác. Hialurónico de bajo peso molecular	TLR4	
Lupus eritematoso	ARN facilitado por HMGB1	TLR7	IRS-954 y DV-1179 (antagonistas TLR7 y TLR9). Sifalimumab y adalimumab
Psoriasis	ARN ADN Facilitado por Catelicina (LL37)	TLR7 TLR9	
Aterosclerosis	LDL oxidadas	TLR2 y TLR4	
Cáncer		TLR4, TLR7, TLR3 y ↑NF-κB	Eritonan, imiquimod, poli I:C

3. Estrategias de evasión del sistema TLR por parte de microorganismos.

Los microorganismos con el fin de asegurar su supervivencia han desarrollado a lo largo del tiempo mecanismos que modifiquen la señalización vía TLR. Sin embargo, no siempre van a regular negativamente este sistema, en algunas ocasiones les beneficia activarlo. Por ejemplo, *Legionella pneumophila* secreta una kinasa, LegK1, cuyo sustrato es IKB liberando así a NF-KB que inhibe la apoptosis, con el fin último de permitirle a *L.pneumophila* multiplicarse intracelularmente. La activación de NF-KB, al igual que en condiciones fisiológicas, se produce por la fosforilación de IKB (McGuire & C. Arthur, 2015).

Tabla 2. Principales mecanismos de evasión desarrollados por bacterias y virus. (En rosa Gram positivas, en morado Gram negativas y en negro virus).

Mecanismo	Proteína bacteriana	Mediador	Microorganismo
Modificación de PAMP (LPS)		TLR4	<i>Yersinia pestis, Francisella tularensis, Helicobacter pylori, Porphyromonas gingivalis, Shigella flexneri</i>
Dominio extracelular de TLR	SSL3 y SSL4	TLR2	<i>S.aureus</i>
	Gingipainas	CD14	
Interacción TIR-TIR	TlpA	Desconocido	<i>Salmonella enterica</i> Enteritidis
	TirS	Desconocido	<i>Staphylococcus aureus</i>
	TcpC	Desconocido	<i>E.coli</i> uropatógena
	BtpA y BtpB	TIRAP y MyD88, respectivamente	<i>Brucella melitensis</i>
	ypTIR	MyD88	<i>Y.pestis</i>
Proteasa	LF	MKKs	<i>Bacillus anthracis</i>
	NleD NleC	JNK p65 NF-KB	<i>E.coli</i> enteropatógena (EPEC) y enterohemorrágica (EHEC)
	CT441 y CPAF	NF-KB	<i>Chlamydia</i>
	NS3/4A	TRIF	Virus de la hepatitis C
	3C	TRIF	Coxsackievirus
Metilación	NleE	TAB2/3	<i>E.coli</i> enteropatógena (EPEC)
Acetilación	VopA	MKK6	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
	AvrA	MKK4 y MKK7	<i>Salmonella Typhimurium</i>
	YopJ	TAK1	<i>Y.pestis</i>
Fosfotreonina liasa	OspF	ERK, JNK y p38	<i>Shigella flexneri</i>
	SpvC	ERK, JNK y p38	<i>S. Typhimurium</i>
Ubiquitinación	IpaH9.8	NEMO	<i>Shigella flexneri</i>

	IpaH4.5 IpaH0722	p65 NF-KB TRAF2	
	ICP0	TIRAP y MyD88	VHS-1
Desubiquitinación	AvrA y SseL	IKB	<i>Salmonella Typhimurium</i> <i>Chlamydia trachomatis</i>
	ChlsDub1	IKB	
	BPLF-1	TRAF6	Virus de Epsteins-Barr
Inhibición desubiquitinación	OspI	TRAF6	<i>Shigella flexneri</i>
	OspG	IKB	<i>Shigella flexneri</i>
	A49	IKB	Virus Vaccinia
Secuestro	NleB y NleE	NF-KB	<i>E.coli (EPEC)</i>
	OspZ	NF-KB	<i>S.flexneri</i>
	Icp0	IRF-3	HSV-1
	A46R	TIRAP, MyD88, TRAM y TRIF	Virus Vaccinia
	A52R	IRAK2	Virus Vaccinia
Fosforilación	ORF47	IRF-3	Virus Varicela-Zoster
	U _s 3	IRF-3 NF-KB	HSV-1
Fosfatasa	PtpA	JNK y p38	<i>M.tuberculosis</i>
Inhibición del tráfico de vesículas	NleA, NleF		<i>E.coli (EHEC y EPEC)</i>
	EspG		<i>Citrobacter</i>
Reclutar reguladores	Tir	SHP-1	<i>Shigella y E.coli EPEC</i>

3.1.- Modificación de PAMPs.

Cuando el lípido A del LPS disminuye el grado de acilación, también lo hace la respuesta de TLR4. Por ejemplo, *Yersinia pestis* a 37°C no expresa las dos aciltransferasas encargadas de las dos últimas acilaciones que sí expresa a 27°C. De esta forma, a 37°C presenta una forma tetra-acilada, mientras que a 27°C está hexa-acilada (Matsuura, 2013; Reddick & Alto, 2014). Más ejemplos se pueden encontrar en la tabla 2.

3.2.- Efectos sobre el dominio extracelular del receptor TLR.

Es un mecanismo hasta la fecha poco común para evadir el sistema TLR. Los superantígenos SSL3 y SSL4 expresados por *S.aureus* son capaces de unirse a TLR2 y antagonizarlo (Rosadini & Kagan, 2015). Al igual que algunas bacterias como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria* spp secretan proteasas frente a IgA,

Porphyromonas gingivales, bacteria Gram negativa, es capaz de secretar una proteasa que degrada preferentemente CD14, correceptor de TLR4 (Rosadini & Kagan, 2015).

3.3.- Bloqueo de la señalización por interacciones TIR-TIR.

Algunas bacterias son capaces de expresar proteínas con dominios TIR denominadas, TcP (*TIR-containing protein*). Actúan por competición con otros dominios TIR endógenos, presentes en proteínas como MyD88 o TIRAP, pero no son capaces de desencadenar la cascada de señalización. Por ejemplo, BtpA, también denominada TcPB, de *Brucella* es capaz de unirse a TIRAP por su dominio TIR y también a la membrana por un dominio de unión a PIP₂, igual que TIRAP. Tras la unión TIRAP-BtpA, no sólo previene la cascada de señalización, sino que además, favorece su degradación por el proteasoma al favorecer su ubiquitinación, un mecanismo similar al usado por SOCS-1 (McGuire & C. Arthur, 2015; Rosadini & Kagan, 2015). BtpB por el contrario bloquea la señalización por su interacción con MyD88 (Salcedo, et al., 2013). En la tabla 2 aparecen otras proteínas cuya diana exacta es desconocida.

3.4.- Proteasas.

Estas enzimas median la degradación de intermedios de la cascada de señalización. El factor letal (LF) de *Bacillus anthracis* induce proteólisis del dominio D, implicado en el reconocimiento de sustrato de las quinasas MKKs y como consecuencia, no aparece activación en las vías MAPKs, JNK y p38. *E.coli* enteropatogénica (EPEC) y enterohemorrágica (EHEC) presentan proteasas que introducen a través de un sistema de secreción de tipo III. Estas son: NleD, metaloproteasa que actúa sobre la región de activación de JNK, y NleC, actúa sobre la subunidad p65 de NF- κ B. Las proteasas CT441 y CPAF de *Chlamydia* proteoliza a NF- κ B (McGuire & C. Arthur, 2015; Rosadini & Kagan, 2015).

Entre los virus encontramos que el virus de la hepatitis C ha desarrollado dos mecanismos; sintetizar una proteasa (NS3/4A) cuya diana es TRIF e inhibir a MyD88, por unión al dominio DD, mediante la proteína NS5A. VHC es un virus de RNA de cadena simple de polaridad positiva. Este ARN monocatenario es reconocido por TLR8 (que usa como adaptador MyD88), pero cuando se produce la replicación se forma ARN de doble cadena, ligando exógeno de TLR3 (usa TRIF como adaptador) (Carty & Bowie, 2010). Por último, Coxsakievirus produce una proteasa (3C) encargada de degradar TRIF (Rosadini & Kagan, 2015).

3.5.- Acetiltransferasas y metiltransferasas.

Se ha encontrado que estos mecanismos pueden modificar e inhibir MKKs y el complejo TAK. Así, VopA de *Vibrio parahaemolyticus*, una acetiltransferasa de MKK6, que acetila residuos del dominio regulador y catalítico de esta MAPKK, comportándose como un inhibidor de la vía de las MAPKs (McGuire & C. Arthur, 2015). Por otra parte, la proteína NleE de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) es un metiltransferasa cuyo sustrato son cisteínas de los dominios de dedos de Zn en TAB2/3. De esta forma, el complejo pierde la capacidad de reconocer las cadenas de poliubiquitina y se bloquea la activación de TAK1. Sobre este mismo complejo actúa YopJ de *Y.pestis*, expresada a 37°C y no a 27°C, acetila residuos de serina y treonina del dominio de activación de TAK1, impidiendo su activación, así como de varias MKKs (Matsuura, 2013; Reddick & Alto, 2014; Rosadini & Kagan, 2015).

3.6.-Fosfotreonina liasa.

OspF de *Shigella* y SpvC de *S. Typhimurium*, son fosfotreonina liasas que eliminan el fosfato de la treonina del dominio de activación de las MAPKs mediante un mecanismo de β -eliminación, formándose un aminoácido insaturado que no podrá ser fosforilado; por consiguiente, la inactivación es irreversible. Tienen actividad frente a ERK, JNK y p38, por lo que, inhiben las vías de señalización de estas MAPKs (McGuire & C. Arthur, 2015).

3.7.- Ubiquitinación.

Como se ha comentado en la introducción, la ubiquitinación es un mecanismo de regulación negativa de la cascada de señalización. Por esto es utilizado por proteínas bacterianas o víricas para conseguir una evasión del sistema inmune innato. Algunas bacterias, utilizan E3 ubiquitina-ligasas. Un ejemplo es *Shigella flexneri*, que expresa varias proteínas con este objetivo. IpaH9.8, encargada de la poliubiquitinación 27-K de NEMO, cuyo resultado es un descenso en la activación de NF-KB. IpaH4.5 ubiquitina la subunidad p65 de NF-KB, bloqueando la transcripción (Reddick & Alto, 2014; McGuire & C. Arthur, 2015). Entre los virus, ICP0 de VHS-1 (virus herpes simplex 1) promueve la degradación de TIRAP y MyD88 por un mecanismo dependiente del proteasoma (Rosadini & Kagan, 2015).

3.8.- Desubiquitinadas o inhibición de ubiquitinación.

Durante este trabajo hemos visto dos tipos de ubiquitinaciones: K63 responsable de reclutar mediadores de señalización y K-48 deriva la proteína hacia la degradación por el proteasoma. AvrA y SseL de *Salmonella Typhimurium* y ChlsDub1 de *Chlamydia*

trachomatis poseen actividad desubiquitinasa de las poliubiquitinaciones K48 de I κ B. De esta forma, inhiben su degradación y, por tanto, la activación de NF- κ B (McGuire & C. Arthur, 2015). BPLF-1 del virus de Epstein-Barr actúa como desubiquitinasa de TRAF6, en posición 63K (Rosadini & Kagan, 2015).

En cuanto a la inhibición de ubiquitinación, *Shigella flexneri* posee dos proteínas. OspI inhibe la poliubiquitinación de TRAF6, por desaminar la glutamina de la E2-ubiquitin transferasa, necesaria para que TRAF6 (E3-ubiquitin ligasa) se autopoliubiquitine en posición K63, mientras que, OspG evita la degradación de I κ B por interferir en su ubiquitinación. De forma similar actúa la proteína A49 de VACV (Virus Vaccinia) por inhibir a una E3-ligasa responsable de la ubiquitinación de I κ B. Otros virus que también actúan a este nivel, inhibiendo la ubiquitinación de I κ B, como HSV-1 o rotavirus (Rosadini & Kagan, 2015).

3.9.- Fosforilación y defosforilación.

En el apartado 1.1 hemos visto como se regula este sistema mediante fosforilación, los patógenos han desarrollado estrategias similares que median la evasión. Así pues, pueden fosforilar a IRF3 en residuos distintos a las kinasas que lo activan, produciendo un cambio en la conformación de este factor de transcripción, que no puede ser reconocido por las kinasas y, por tanto, ser activado. Ejemplos de proteínas de virus que emplean este mecanismo son ORF47 de varicela-zoster y U₃ de HSV-1. U₃ además, es capaz de hiperfosforilar NF- κ B (Rosadini & Kagan, 2015). PtpA de *M.tuberculosis* es una tirosin-fosfatasa que tiene como sustrato a JNK y p38 (McGuire & C. Arthur, 2015).

3.10.- Otras formas de actuar.

Además de los mecanismos previamente estudiados, existen otros que comprenden el secuestro de proteínas, reclutamiento de reguladores propios o inhibición del tráfico de vesículas. Por ejemplo, NleB y NleE de *E.coli* (EPEC) y OspZ de *S.flexneri* inhiben la translocación de NF- κ B al núcleo, mientras que Icp0 de HSV-1 secuestra a IRF-3 (Rosadini & Kagan, 2015). También los hay que secuestran proteínas implicadas en la cascada de señalización por TLRs. Por ejemplo, A46R de Virus Vaccina (VACV) es capaz de unirse y secuestrar a los cuatro adaptadores (TIRAP, MyD88, TRAM y TRIF). Mientras que A52R se une y secuestra a IRAK2 (Carty & Bowie, 2010).

Algunas bacterias como *Shigella* o *E.coli* EPEC son capaces, a través del sistema de secreción de tipo III, de introducir proteínas efectoras como Tir (*translocated intimin*

receptor) responsable de reclutar el regulador negativo SHP-1, una fosfatasa que desfosforila a las proteínas IRAKs (Reddick & Alto, 2014).

Otro mecanismo especialmente común entre los denominados patógenos A/E: *E.coli* (EHEC y EPEC) y *Citrobacter* es introducir, en la célula, efectores encargados de inhibir el tráfico de vesículas desde retículo endoplásmico a aparato de Golgi, con el fin de inhibir la liberación de citoquinas. Estos efectores son: NleA, NleF y EspG (Reddick & Alto, 2014).

CONCLUSIONES.

En concordancia con el material revisado durante la elaboración del trabajo sobre el sistema TLR y su regulación y evasión, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- 1) Se trata de un sistema altamente regulado, tanto en la vía dependiente de MyD88 como la dependiente de TRIF. Sin embargo, será la primera donde en apariencia mayor regulación aparece. Quizá, porque el número de receptores que actúan a través de esta vía es mayor. Entre los puntos de regulación parece ser clave TRAF6, proteína donde convergen ambas vía de señalización.
- 2) En contra de la idea inicial sobre la mayor importancia de posibles defectos en la regulación negativa y subsiguiente aparición de procesos patológicos, parece que es predominante una mayor expresión de determinados receptores o un aumento de los ligandos que los activan.
- 3) Los virus se centran en la inhibición de la vía TRIF, con el objeto de evitar muerte celular mediada por la expresión de interferones.
- 4) Las bacterias Gram negativas, en particular aquellas que corresponden a la familia *Enterobacteriaceae*, parecen actuar más sobre este sistema de evasión que las Gram positivas. Cuando una bacteria trata de evadir este sistema lo hará no sólo a un nivel sino a varios, para poder asegurarse la supervivencia. Se podrían utilizar como diana estas proteínas con el fin de obtener antibióticos selectivos.
- 5) Tanto virus como bacterias son capaces actuar sobre los distintos estadios de la cascada de señalización.

BIBLIOGRAFÍA.

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S., 2015. *Inmunología celular y molecular*. 8ª ed. Madrid: Elsevier.

Akira, S. & Kawai, T., 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *nature immunology*, pp. 373-384.

Anwar, M. A., Basith, S. & Choi, S., 2013. Negative regulatory approaches to the attenuation of Toll-like receptor signaling. *Experimental & Molecular Medicine*, 2(45).

Beutler, B. & Blasius, A. L., 2010. Intracellular Toll-like Receptors. *Immunity*, pp. 305-315.

Brown, J., Wang, H., Hajishengallis, G. & Martin, M., 2011. TLR-signaling Networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk.. *Journal of dental research*, 4(90), pp. 417-427.

Brubaker, S., Bonham, K. S., Zanoni, I. & Kagan, J. C., 2015. Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. *Annual Review of Immunology*.

Capelluto, D. G., 2012. Tollip: a multitasking protein in innate immunity and protein trafficking.. *Microbes and Infection*, 2(14), pp. 140–147.

Carty, M. & Bowie, A., 2010. Recent insights into the role of Toll-like receptors in viral infection. *Clinical and Experimental Immunology*, p. 161: 397–406.

Du, J. y otros, 2014. The structure function of the death domain of human IRAK-M. *Cell Communication and Signaling*, 12(77).

Flannery, S. & Bowie, A. G., 2010. The interleukin-1 receptor-associated kinases: Critical regulators of innate immune signalling. *Biochemical Pharmacology*, 12(80), pp. 1981–1991.

Gajewski, T. F. & Corrales, L., 2015. New perspectives on type I IFNs in cancer. *Cytokine Growth Factor Review*, 2(26), pp. 175–178.

Hosseini, A. M., Majidi, J., Baradaran, B. & Yousefi, M., 2015. Toll-Like Receptors in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 1(5), pp. 605-614.

Janssens, S. y otros, 2003. MyD88s, a splice variant of MyD88, differentially modulates NF- κ B and AP-1 dependent gene expression. *FEBS letter*, Issue 549, pp. 103-107.

Jiménez-Dalmaroni, M. J., Gerswhin, M. E. & Adamopoulos, I. E., 2016. The critical role of toll-like receptors - From microbial recognition to autoimmunity: A comprehensive review. *Autoimmunology review*, 1(15), pp. 1-18.

Johnson, D. E., 2015. The ubiquitin-proteasome system: opportunities for therapeutic intervention in solid tumors. *Endocrine-Related Cancer*, 1(22), pp. 1-17.

Kawai, T. & Akira, S., 2006. TLR signaling. *Cell Death and Differentiation*, Issue 13, pp. 816-825.

Kawai, T. & Akira, S., 2009. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition.. *International immunology*, pp. 317–337.

Li, X. & Qin, J., 2005. Modulation of Toll–interleukin 1 receptor mediated signaling. *Journal of Molecular Medicine*, 83(4), pp. 258–266.

Mandrekar, P., 2014. *Cellsignal*. [En línea] Disponible en: <https://www.cellsignal.com> [Último acceso: 20/ 5/ 2017].

Matsuura, M., 2013. Structural modifications of bacterial lipopolysaccharide that facilitate Gram-negative bacteria evasion of host. *Frontiers in immunology*.

McGuire, V. A. & C. Arthur, J. S., 2015. Subverting Toll-Like Receptor Signaling by Bacterial Pathogens. *Frontiers in Immunology*, 6:607.

Molgora, M., Barajon, I., Mantovani, A. & Garlanda, . C., 2016. Regulatory Role of IL-1R8 in immunity and Disease. *Frontiers in immunology*. *Frontiers in immunology*, 149(7).

O'Neill, L. A., 2008. When signaling pathways collide: positive and negative regulation of toll-like receptor signal transduction.. *Immunity*, 1(29), pp. 12-20.

Park, B. S. & Lee, J.-O., 2013. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental & Molecular Medicine*.

Pickart, C. M. & Eddins, M. J., 2004. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1(1695), pp. 55–72.

Pradere, J.-P., Dapito, D. H. & Schwabe, R. F., 2014. The Yin and Yang of Toll-like Receptors in Cancer. *Oncogene*, 27(33), pp. 3485-3495.

Reddick, L. E. & Alto, N. M., 2014. Bacteria Fighting Back: How Pathogens Target and Subvert the Host Innate Immune System. *Molecular Cell*, pp. 321-328.

Reuven, E. M., Fink, A. & Shai, Y., 2014. Regulation of innate immune responses by transmembrane interactions: Lessons from the TLR family. *Biochimica et Biophysica Acta*, pp. 1586–1593.

Rosadini, C. V. & Kagan, J. C., 2015. Microbial strategies for antagonizing Toll-like-receptor signal transduction. *Current Opinion in Immunology*, pp. 61–70.

Ruysschaert, J.-M. & Loney, C., 2015. Role of lipid microdomains in TLR-mediated signalling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848(9), pp. 1727-1954.

Säid-Sadier, N. & Ojcius, D. M., 2012. Alarmins, Inflammasomes and Immunity.. *Biomedical journal*, 6(35), pp. 437-449.

Salcedo, S. P. y otros, 2013. BtpB, a novel Brucella TIR-containing effector protein with immune modulatory functions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, p. 3:28.

Takeuchi, O. & Akira, S., 2010. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, pp. 805-820.

Tong, L., Yuan, . Y. & Wu, . S., 2015. Therapeutic microRNAs targeting the NF-kappa B signaling circuits of cancers. *Advanced drug delivery reviews*, Volumen 0, pp. 1-15.

Ve, T., Williams, S. J. & Kobe, B., 2015. Structure and function of Toll/interleukin-1 receptor/resistance protein (TIR) domains. *Apoptosis*, Issue 20, pp. 250–261.

Yesudhas, D. & Gosu, . V., 2014. Multiple roles of toll-like receptor 4 in colorectal cancer.. *Frontiers in immunology*, 5(334), pp. 1-10.