

být atakována aminoskupinou aa-tRNA, ale chráněna před hydrolyzou.

Na tomto místě si neodpustím jednu reminiscenci. V r. 1973 byla J. Černou a I. Rychlíkem publikována práce, na níž jsem se také podílel. Poprvé a jasně prokazovala, že 23S rRNA, její integrita jsou nezbytné pro peptidyltransferázovou aktivitu a zvláště pro vazbu -CCA konce peptidyl-tRNA do P místa PT centra ribozomu. Výsledky jsme interpretovali podle dobového konsenzu, že když 23S rRNA vytváří kostru pro vazbu „katalytických bílkovin“ PT centra, tak potom už i malým narušením této kostry se jejich vazba změní, nebo se omezí přístup pro substrát, a ztratí se tím i PT aktivita. Možnost, že by jen sama RNA stačila na PT aktivitu, z našich výsledků přirozeně také vyplývala, ale nikdo si v té době nedovolil, a ani my, na něco takového jen pomyslet. Také žádné podobné výsledky o RNA jako možné enzymu nebyly v té době k dispozici a do objevu ribozymů zbývalo ještě 10 let.

Ale tak jednoduché to zřejmě také nebude. Jak bylo řečeno, zajištění celistvosti a přesné konformace úseků 23S rRNA v PT centru je nezbytné pro chod peptidyltransferázové reakce. 16S i 23S rRNA jsou nadány samosbalovací schopností, čímž se primárně určí např. celkový tvar 30S i 50S podjednotky (A. Spirin). Pro uvedení PT centra do aktivního stavu to však zřejmě nestačí, neboť samotná 23S rRNA nemá PT aktivitu. K jejímu obnovení je třeba ponechat nebo dodat některé ribozomální bílkoviny (např. L2, L3, L27). Na druhé straně ani žádná samotná r-bílkovina není schopna katalyzovat tvorbu peptidické vazby. Do-

hromady to naznačuje, že obě stavební složky 50S podjednotky jsou nakonec pro funkci PT centra nezbytné. Jak tedy uvést v soulad krystalografické modely PT centra a rekonstituční výsledky? Vysvětlení, které se dnes nabízí, může být asi následující: Přítomnost určitých ribozomálních bílkovin je zřejmě nezbytná k uvedení PT úseků 23S rRNA a/nebo substrátů do aktivní konformace pro katalýzu PT reakce. Neboli zdá se, že bílkoviny, i když ne přímo, by přece jen mohly mít na chodu PT reakce svůj (důležitý) podíl.

Měli jsme možnost trochu nahlédnout do molekulárních a atomových mechanismů proteosyntézy, zvláště pak probrat, jak se strukturální schopnosti RNA využívají k vytvoření aktivního ribozomu. Ukázalo se, že jak ribozom, tak jeho substráty jsou vybraně dynamické molekuly, jejichž konformační přeměny jsou nedílnou součástí těchto pochodů. Je zřejmé, že molekuly RNA hrají hlavní úlohu jak při dekodování mRNA, tak i při tvorbě peptidové vazby. Ribozom je tak strojem vybaveným ribozymovým mechanismem. Navíc jak jeho dekodovací centrum, tak PT centrum využívají mechanismus „induced-fit“ ke zvýšení substrátové specifity. To by mohlo i znamenat, že se tento mechanismus vyvinul už v RNA světě, a že i v tomto ohledu RNA předběhla proteiny. Stereochemické propojení mezi říší aminokyselin a říší nukleotidů přešlo do? /zůstalo v? rukou starodávných bílkovinných enzymů — aminoacyl-tRNA syntetáz.

Ačkoli obecná schémata proteosyntetického pochodu se běžně probírají v každé učebnici biochemie, při vysvětlování ně-

kterých pochodů na molekulární úrovni, a tedy i snaze o pochopení jejich mechanismu, se mnohde stále ještě dostáváme do úzkých. Zatímco v porozumění mechanismu přesnosti dekodování či peptidyltransferázového kroku translace byl učiněn dramatický pokrok, v jiných případech, např. posunu molekul tRNA v ribozomu z místa A do místa P, posunu mRNA, sprázení hydrolyzy GTP s těmito pochody atd., tak daleko nejsme. Triviální otázky, jako jak molekula tRNA přeruší a znovu vytvoří kontakt s ribozomem, když se posouvá téměř o 50 Å z jednoho do druhého místa, zůstávají nezodpovězeny. Jak nezávisle říkají V. Ramakrishnan a H. Noller, k úplnému objasnění molekulární dynamiky pochodů translace v atomovém rozlišení potřebujeme umět natočit souvislý film v tomto rozlišení, zatím však máme spíše jen jednotlivé obrázky. Nasazení všech moderních přístupů krystalografických a kryoelektronmikroskopických, kinetických analýz, zobrazovacích technik ke sledování jedné molekuly a dále počítačových simulací molekulární dynamiky na atomových strukturálních modelech bude vysoce žádoucí. (Ačkoli by se v současnosti zdálo, že pro simulace bude ribozom se svými 2 640 000 atomy zcela nespokojitelné sousto, taková simulace — vůbec největší ve světě — už překvapivě probíhá v Los Alamos Nat. Laboratories v USA.) Vzhledem k ústřední úloze, kterou má translace v biologii, by se to jistě mělo vyplatit. Především je to jedinečná příležitost, jak dobře rozjetou studii nějakého biochemického stroje dotáhnout jako první až blízko nebo do samotného konce.

Interakce klíště–hostitel

I. Sání krve a přenos patogenů

Tereza Matějovská

Ze známých infekčních nemocí patří k nejzávažnějším ty, které jsou přenášeny vektory z kmene členovců (*Arthropoda*). Na člověku parazitují a přenášejí na něj různá onemocnění zástupci dvou tříd členovců: hmyzu (*Insecta*, především komáři — *Culicidae*) a pavoukoců (*Arachnida*), nejvíce zástupci podřádu klíšťat (*Ixodida*). Ten se dále dělí na čeledi *Ixodidae* (klíšťata), *Argasidae* (klíšťáci) a *Nuttallidae* (blíže Živa 2002, 2: 73–76).

Příjem potravy (sání krve) ektoparazitů je ztížen faktem, že hostitel má účinné mechanismy, jak zabránit ztrátě krve a tedy i nasátí. Na druhé straně sliny ektoparazitů obsahují širokou škálu biologicky aktivních látek, které umožňují obranné mechanismy hostitele obejít. V dlouhodobé koevoluci parazit–hostitel se strategie obranných molekul jak na straně parazita, tak na straně hostitele neustále vyvíjejí a otázka zní: kdo bude úspěšnější, hladovějící parazit, nebo obratlovec, který se snaží ztrátě krve zabránit?

Všechny druhy klíšťat sají krev svých hostitelů, ale jen 10 % z celkového počtu (k dnešnímu dni asi 899 druhů) má schopnost přenášet patogenní organismy — viry, bakterie a prvoky — na člověka. Všechny patogeny se do klíštěte dostanou během sání na infikovaném hostiteli a při následujícím sání se přenášejí skrze slinné žlázy na dalšího hostitele. Z klíšťáků přenášejí nemoci na člověka jen rod *Ornithodoros*, hlavními vektory patogenů jsou především klíšťata.

K nejznámějším virovým infekcím přenášeným klíšťaty patří klíšťová encefalitida se třemi podtypy (evropská, východní a sibiřská) způsobená virem TBE (Tick Borne Encephalitis) z čel. *Flaviviridae*, do které patří i původci dalších onemocnění — pro větší přehlednost uvádíme podrobnosti v tabulce (tab. 1). Z dalších virových čeledí je třeba jmenovat *Reoviridae*, *Bunyaviridae* a *Asfarviridae*.

Nejznámějším zástupcem bakteriálních onemocnění přenášených klíšťaty (tab. 2)

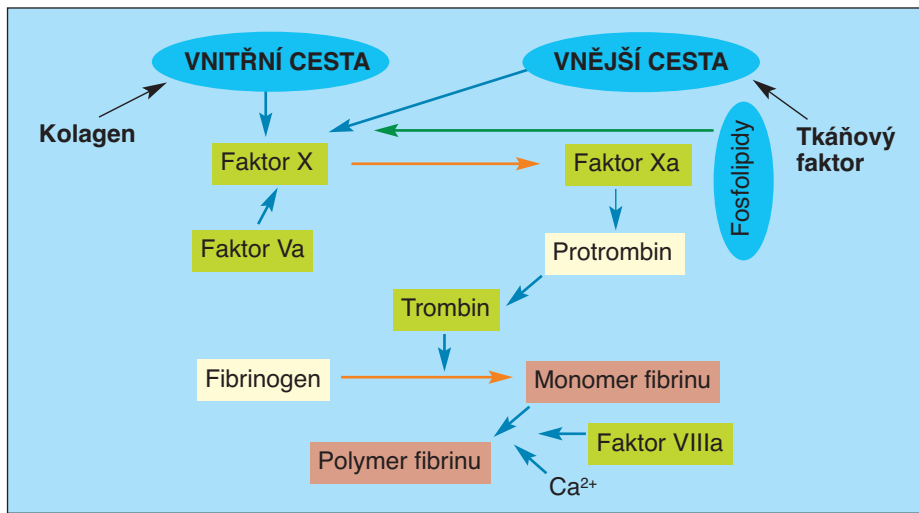
je lymfická borelióza způsobená spirochetami komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (prokazatelně typy *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii* a *B. valaisiana*). Klíšťata dále přenášejí např. bakterie způsobující tularémii (*Francisella tularensis*), intracelulární bakterie z čel. *Rickettsiaceae* a další choroby, které opět přibližuje podrobněji tabulka.

V neposlední řadě je třeba uvést parazitární onemocnění z kmene *Apicomplexa* (nejznámějším zástupcem je původce malárie — rod *Plasmodium*). Z těchto nemocí je známá babesióza a teilerióza. Babesióza je závažné a smrtelné onemocnění jak člověka (*Babesia microti*), tak i skotu (*B. divergens* a *B. bovis*) a přenášejí ho klíšťata rodů *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Hyalomma* (viz obr.) a *Amblyomma*. Teilerióza (*Theileria parva*) se vyskytuje především u ovcí a dobytka v celé Africe, vektory jsou klíšťata rodu *Rhipicephalus*.

V České republice patří k nejzávažnějším onemocněním přenášeným klíšťaty klíšťová encefalitida (Živa 2001, 4: 150–152) a lymfická borelióza, jejichž vektorem je klíště obecné *Ixodes ricinus* (viz obr.).

Sání krve klíšťaty

Úspěšný příjem potravy je životně důležitý pro dokončení vývojového cyklu klíštěte, přežití a nakladiení vajíček samicíčkou. Na druhé straně, tělo hostitele je během sání vystaveno poškození kůže, zánětlivé reakci a možnému přenosu patogenů. Pomocí chelicer klíštěte dochází k průniku sacího orgánu — hypostomu do kůže hostitele, což má za následek poškození epidermálních a dermálních buněk včetně místních



Nejvýznamnější kroky koagulační kaskády (KK) obratlovců. Během tvorby krevní zátky jsou v krvi volně přítomné bílkoviny KK enzymaticky štěpeny na aktivní molekuly, které následně štěpí další faktory této kaskády. Vše nakonec vyústí v přeměnu protrombinu (neaktivní molekula, koagulační faktor č. II) na trombin (proteolytický enzym), který mění fibrinogen (bílkovina krevní plazmy důležitá pro srážení krve — koagulační faktor č. I) na fibrin. Jeho polymerací vzniká vláknitý fibrin. Celá kaskáda má 12 koagulačních faktorů. Obr. z archivu autorky

torů uvolňovaných z aktivovaných destiček (serotonin, tromboxan A — produkt přeměny kyseliny arachidonové) nebo vznikajících během aktivace koagulační kaskády.

Krevní destičky — trombocyty dokáží zformovat krevní zátku během několika sekund. K jejich aktivaci dochází při styku s kolagenem během poranění cévy klíštěcím hypostomem. Po této primární aktivaci se rychle mění tvar trombocytů a dochází k degranulaci jejich granul — malých váčků v buňkách obsahujících farmakoaktivní molekuly (adenosindifosfát — ADP, tromboxan A a trombin), při níž se váčky spojí s cytoplazmatickou membránou a jejich obsah se vylije ven z buňky.

Tyto látky se vážou na povrch krevních destiček, které jsou následně pospojovány a utvoří krevní zátku.

cévek. Sání klíšťat je dlouhodobý proces, během kterého se vyvíjí silná odpověď hostitele, zahrnující jak složku hemostatickou (zastavující krvácení), tak zánětlivou. Klíště se těmto mechanismům brání pomocí sekrece biologicky aktivních látek ze slinných žláz (Živa 2002, 2: 73–76). Slinné žlázy patří v těle klíštěte mezi největší a jsou nezbytné pro úspěšný příjem krve. Zároveň jsou cestou přenosu mnoha patogenů do těla hostitele. U klíšťáků může navíc do-

jít k přenosu infekce na hostitele i cestou přes koxální (kyčelní) žlázy, které u této čeledi slouží k vyměšování přebytečných tekutin při sání.

Obrana hostitele: zástava krvácení — hemostáza

Ihned po poranění cévy klíštětem dochází ke stažení cévy — vazokonstrikci. Ta je výsledkem nejen reflexivní činnosti svalové vrstvy cévy, ale i odpovědí na mnoho fak-

Tab. 1. Výskyt a zařazení jednotlivých virových onemocnění a jejich nejčastější přenašeči (podtrženě nejčastější vektor)

Čeľad	Patogen	Onemocnění	Přenašeč	Rozšíření
Flaviviridae	TBE virus (RSSE, CEE)	klíšťová encefalitida	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i> , <i>I. trianguliceps</i> , <i>I. hexagonus</i> , <i>Dermacentor marginatus</i> , <i>Haemaphysalis inermis</i> , <i>H. punctata</i>	Evropa, Rusko
	KFD virus	nemoc kyanurského lesa	<i>Haemaphysalis spinigera</i>	Indie
	OHF virus	omská hemoragická horečka	<i>Dermacentor reticulatus</i> , <i>I. apronophorus</i>	Sibiř
	PE virus	powassanská encefalitida	<i>I. cookei</i> , <i>I. marxi</i> , <i>D. andersoni</i> , <i>I. spinipalpis</i> , výjim. <i>I. pacificus</i>	Severní Amerika
	LI virus	louping ill — skotská encefalitida	<i>I. ricinus</i> , <i>Rhipicephalus appendiculatus</i> , <i>Hyalomma anatolicum</i>	Velká Británie, Irsko
	CTF virus	koloradská klíšťová horečka	<i>D. andersoni</i> , <i>D. albipictus</i> , <i>D. parumapterus</i> , <i>Haemaphysalis leporispalustris</i>	Severní Amerika
Bunyaviridae	CCHF virus	krymsko-konžská hemoragická horečka	29 druhů: např.: <i>Ornithodoros laborensis</i> , <i>D. marginatus</i> , <i>Hyalomma marginatum</i> , <i>R. rossicus</i> , <i>Amblyomma variegatum</i>	Afrika, Rusko, Evropa, Asie
	NSD virus	nairobská nemoc ovcí	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	východní Afrika (Keňa)
Asfarviridae	ASF virus	africká horečka prasat	<i>Ornithodoros moubata</i>	Afrika–Sáhara, j. Evropa

Tab. 2. Přehled bakteriálních onemocnění přenášených klíšťaty (podtrženě nejvýznamnější vektor)

Zařazení	Druh	Onemocnění	Přenašeč	Rozšíření
Spirochaetaceae (čeled)	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	lymská borelióza	<i>I. ricinus</i> , <i>I. ovatus</i> , <i>I. scapularis</i> , <i>I. turdus</i> , <i>I. pacificus</i> , <i>I. dentatus</i> , <i>I. persulcatus</i> ad.	Evropa, Asie, Severní Amerika
	<i>B. recurrentis</i> , <i>B. bermsii</i> , <i>B. duttoni</i>	návratná horečka	<i>O. moubata</i> , <i>O. ruidis</i> , <i>O. bermsi</i> , <i>O. erraticus</i>	Afrika, Asie, Amerika
Gramnegativní aerobní tyčky	<i>Francisella tularensis</i>	tularemie	<i>D. variabilis</i> , <i>Amblyomma</i> sp., <i>D. andersoni</i>	Severní Amerika, Rusko
Rickettsiaceae (čeled)	<i>Rickettsia rickettsii</i>	horečka skalistých hor	<i>D. variabilis</i> , <i>D. andersoni</i>	Skalisté hory (USA)
	<i>R. conorii</i>	středomořská a astracháňská horečka	<i>R. pumilio</i> , <i>R. sanguineus</i>	Středomoří, severní Afrika
	<i>R. australis</i>	queenslandský klíštěcí tyfus	<i>I. holocyclus</i>	Austrálie, Nový Zéland
	<i>R. sibirica</i>	severoasijský klíštěcí tyfus	<i>D. nuttalli</i> , <i>Haem. japonicum</i> , <i>D. marginatus</i>	Střední Asie, Slovensko
	<i>R. slovaca</i>	klíšťová lymfadenopatie	<i>D. marginatus</i> , <i>D. reticulatus</i>	jižní, záp. a stř. Evropa
	<i>Coxiella burnetii</i>	Q horečka	<i>Ixodidae</i> , <i>Argasidae</i>	celosvětově
	<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	monocytická ehrlichioza	<i>A. americanum</i> , <i>D. variabilis</i>	Severní Amerika
	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	granulocytická ehrlichioza	<i>I. ricinus</i> , <i>R. sanguineus</i> , <i>D. variabilis</i>	Evropa, Severní Amerika
	<i>E. ruminantium</i>	kovdrióza přežvýkavců	<i>A. bebreum</i> , <i>A. variegatum</i>	Afrika



Vlevo nahoře nenasátá samička klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) ♦ Vpravo nahoře nenasátý sameček téhož druhu. Snímky T. Matějovské a F. Weydy, pokud není uvedeno jinak ♦ Vlevo dole samičky klíštěte obecného kladoucí vajíčka. Samička, na rozdíl od samečka, saje po velmi dlouhou dobu (až 10 dní), po nasátí dochází ke kopulaci. Sameček umírá, samička za dva týdny vyklade až několik tisíc vajíček a také umírá. Foto J. Erhart ♦ Dole uprostřed samička *Hyalomma* sp. Klíštěta tohoto rodu mají jako jedni z mála klíšťat oči a vyznačují se velkým sacím ústrojím. Foto J. Erhart

Shlukování (agregace) krevních destiček je v těsném vztahu s dalším mechanismem zabráňujícím úniku krve — koagulační kaskádou. Jde o soubor enzymatických dějů, jejichž výsledkem je přeměna rozpustného fibrinogenu v nerozpustný fibrin (tj. přeměna tekuté krve v gel). Ten spolu s krevními destičkami tvoří mechanicky odolnou definitivní krevní zátku. Hemokoagulace se účastní látky označované jako koagulační faktor I–XII, které tvoří vnitřní, vnější a společný koagulační systém. Aktivují se pouze v místě poranění, např. při styku s kolagenem, bazální membránou, membránovými fosfolipidy či tkáňovým faktorem (TF) — látkami, které se uvolňují z poškozených buněk a aktivovaných trombocytů.

Obrana proti obraně: inhibice hemostáze

Klíšťata čel. *Ixodidae* patří mezi pomalu krevsající (hematofágní) členovce, a proto se u nich vyvinuly mechanismy, jak zabránit srážení krve hostitele během příjmu potravy. V reakci na koagulační kaskádu, která je schopna ve spolupráci s agregací destiček během několika málo minut zastavit únik krve, došlo u klíšťat k vývoji velkého množství specifických inhibitorů hemostáze, které jsou obsaženy v jejich slinách. Řada z těchto látek byla v posledních 10–15 letech identifikována. Zároveň se prokázalo, že látky fungující na podobných principech se nacházejí i u ostatních krevsajících členovců, jako jsou komáři, blechy, štěnice, klíšťáci atd.

Proces agregace krevních destiček může být zastaven složkami klíštěčích slin v několika fázích označených jako preaktivace (dříve než jsou na receptory krevních destiček navázány aktivátory agregace), postaktivace (v této fázi se klíštěcí molekuly váží na již pozměněné aktivované trombocyty a brání jejich agregaci) a postagregaci (trombocyty jsou již pospojované, ale odebráním fibrinogenu může dojít k uvolnění jednotlivých krevních destiček).

Mezi farmakoaktivní látky vyskytující se v preaktivaci fázi agregace destiček můžeme zařadit apyrázu (ATP-difosfhydroláza) — enzym, který byl identifikován u většiny krevsajících členovců včetně klíšťat *I. scapularis* a *Ornithodoros moubata*. Nebyl však nalezen u klíštěte *Amblyomma americanum*. Tento enzym má hydrolytickou aktivitu, díky níž přeměňuje ATP a ADP na AMP (adenosinmonofosfát) a tím zabráňuje aktivaci destiček. Dalšími látkami atakujícími ADP jsou nebiilkovinné složky slin — prostaglandiny PGI₂ a PGD₂, které zabráňují sekreci ADP během aktivace destiček. Inhibitory trombinu (např. boofilin z klíštěte *Boophilus microplus*) mají za úkol bránit aktivaci krevních destiček trombinem a zároveň zpomalují koagulační kaskádu, jejíž je trombin také součástí. Destičky, jak už bylo zmíněno, mohou být aktivované i kolagenem, čemuž zabráňuje specifický inhibitor kolagenu, nalezený u klíštěte *O. moubata*, a protein TAI (Tick Adhesion Inhibitor), který brání adhezii destiček na kolagenovou matriku.

Mezi inhibitory, které klíštěte vylučuje v postaktivaci fázi agregace krevních destiček, patří proteiny variabilin (*Dermacentor variabilis*), savignygrin (*O. savignyi*) a disagregin (*O. moubata*). Všechny inhibují vazbu fibrinogenu na integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (na povrchu destiček) a tím zabráňují shlukování aktivovaných destiček.

Pokud se nezdařilo zabránit agregaci destiček předchozími látkami, mohou být destičky uvolněny pomocí tzv. IIb3 antagonistů, kteří soutěží o daný receptor s fibrinogenem. Další možností je proteolýza navázaného fibrinogenu nebo dříve zmíněná apyráza, která dokáže uvolnit i již agregované destičky pomocí odstranění ADP.

Koagulační kaskáda hostitele může být klíštěcími proteiny inhibována buď ve vnitřní cestě aktivace, nebo ve vnější cestě (viz obr.). Mezi inhibitory komplexu VIIa/TF (vnější cesta), který aktivuje faktor X, patří proteiny ixolaris a penthalaris, které byly

identifikovány v nedávné době. Mají schopnost vázat se na komplex VIIa/TF a zároveň na aktivovaný nebo neaktivovaný faktor X(a), a tím inhibovat koagulační kaskádu. Z dalších proteinů inhibujících funkci faktoru X(a) byly identifikovány proteiny ze slin Salp14 a Salp9 (Salivary Protein s molekulovou hmotností 14 a 9 kDa) u klíštěte *I. scapularis*. Ty patří do rodiny antikoagulačních proteáz a prodlužují tzv. aktivovaný parciální tromboplastinový čas (APTT) — tento test používaný v laboratorních vyšetřeních simuluje vnitřní cestu aktivace koagulační kaskády). Umlčení transkripce genů (interference dsRNA) pro tyto proteiny v sajcích klíšťatech *I. scapularis* ovlivnilo příjem potravy a snížilo celkovou hmotnost nasátých klíšťat až o 70 %. Extrakty slinných žláz (SGE) z klíšťat *Haemaphysalis inermis*, *Rhipicephalus appendiculatus* a *Dermacentor reticulatus* inhibovaly více vnější než vnitřní cestu aktivace koagulace. Koagulační kaskáda hostitele může být inhibována i v posledních krocích, kdy inhibitory trombinu zabráňují vazbě fibrinogenu na trombin. Metaloproteázy, objevené v slinách klíštěte *I. scapularis*, vykazují antifibrinogenní (ničí fibrinogen) a antifibrinové (ničí fibrin) aktivity a mají sekvenční podobnost k hemoragickým proteázám vyskytujícím se v hadích jedech. Je předmětem diskuse, zda tyto proteázy mají vztah i k přenosu *Borrelia burgdorferi* z klíštěte na hostitele.

Prostaglandiny (PGI₂, PGE₂ a PGD₂) působí jako účinná vazodilatační (uvolňují stažené cévy) v místě sání, ale nezvyšují propustnost cévy pro makromolekuly (mikrovaskulární permeabilitu). Uvolněním hladkého svalstva cév v místě sání dochází k regulovatelnému zvýšení průtoku krve, a tudíž k lepší dostupnosti potravy.

Klíšťata ovšem nemají problém jen s hostitelovou snahou zabránit úniku krve. Jsou také velmi rychle rozeznávána imunitními mechanismy jako cizorodý organismus, což vede k cílené imunitní reakci — ale o tom se dozvíte více příště.