



Ilja Trebichavský, Petr Šíma

Rozpoznávání – základ imunity II.

Kořenem všeho zla je nedostatek poznání.
Buddha

Minule jsme slíbili, že se pokusíme objasnit, proč bezobratlí, kteří se neumějí bránit obrannými molekulami z nadrodiny imunoglobulinů (protože nemají genetický aparát pro jejich tvorbu), přežívají na Zemi mnohonásobně déle než obratlovci vybavení adaptivní imunitou. A také, proč nespecifická, přirozená imunita reaguje na průnik patogenů okamžitě a nemusí spoléhat na komplikovaný generátor, který sice vyrábí specificky zaměřené protilátky, ale až za desítky hodin po setkání s cizorodými strukturami. Vše záleží na procesech rozpoznávání a rychlosti přenosu informace do buněčných center řídicích obranné reakce. Z obecného hlediska lze na rozpoznávání nahlížet jako na proces, který je sice zatížen mnoha chybami, ale pro živé organismy je *conditio sine qua non* jejich přežití. Je to dynamický proces, který neustále mění pravidla, a je nutné, aby získávané poznatky byly rychle roztrženy a předány. Např. náš mozek si pomáhá vytvářením šablon. Stejný princip se používá i při kategorizaci poznatků v počítači. Jde o rozpoznávání vzorů, pro které se ustálil anglický termín *pattern recognition*. V běžném životě se využívá pro ověřování podpisů, stylu řeči, daktyloskopickou detekci, či pro rozlišení osob podle obrazu jejich duhovky, ale také pro vyřídění spamů z elektronické pošty nebo odhalení plagiátů. Je na něm založena i počítačová diagnostika nemocí. Jednoduchý senzor předává informace do počítače, kde jsou příslušným programem vyhodnoceny, přiřazeny k určitým definovaným vzorům a rozpoznané rozdíly jsou pak zpracovány pro stanovení choroby. Rychlost přenosu rozpoznávaného signálu informujícího o přítomnosti cizího faktoru, potenciálně ohrožujícího život, je podmíněna přítomností rozpoznávacích senzorů a pohotovostí vyvolat příslušnou obranu. To vše je podstatou reakcí přirozené imunity.

Receptory přirozené imunity

V přírodě probíhá rozpoznávání na základě molekulárních interakcí. Každý mikroorganismus nese svůj charakteristický strukturální vzor. Může to být třeba jeho DNA, či stavební bílkovina jeho buňky nebo bičíku. Tyto struktury jsou typické jen pro mikroorganismy a za normálních okolností se u mnohobuněčných nevyskytují. Označují se obvykle jako vzory sdružené s patogeny – PAMP (z anglického Patho-

gen-Associated-Molecular-Patterns), ve skutečnosti se však vyskytují i na nepatogenních mikroorganismech a měly by se tedy označovat MAMP (Microbe-Associated-Molecular-Patterns). Mnohobuněčné organismy mají pro každý mikrobiální vzor odpovídající senzor, který je rozpoznává. Mikrobiální vzory, tedy PAMP, mohou zahrnovat rozmanité druhy molekul, avšak vždy mají něco společného, co lze rozpoznat. Např. každá bakteriální DNA je

odlišná od DNA mnohobuněčných živočichů, takže pro ni stačí jediný senzor. Ve skutečnosti však i senzorů DNA je více, protože se liší svou funkcí.

Mikrobiálních vzorů PAMP jsou desítky až stovky. Jejich senzory se nazývají receptory přirozené imunity a bývají označovány jako PRRs (Pattern Recognition Receptors). Nacházejí se jak na površích (zakotveny v cytoplazmatické membráně), tak uvnitř buněk nebo v membráně cytoplazmatických váčků – endozomů, ale i volně. Toto několikrát opakované rozmístění senzorů PAMP zaručuje komplexní ochranu před invadujícími patogeny.

Receptory/senzory přirozené imunity specificky vážou jen určité mikrobiální vzory. Jejich molekuly se skládají z rozpoznávací a signální části. Jakmile se k buňce nebo do ní dostane mikroorganismus, dojde k jeho navázání na rozpoznávací část příslušného receptoru. Tato vazba vyvolá aktivaci signální části molekuly. Signál o vazbě, tedy o rozpoznání cizorodé struktury je přenesen kaskádou dalších molekul až do buněčného jádra, kde vyvolá přepis genů řídicích produkci poplachových látek – cytokinů, které hrají při obranné odpovědi na patogenní mikroorganismus stěžejní úlohu.

Přenos informace o průniku mikroba do vnitřního prostředí a navazující reakce vedoucí ke vzniku imunitní odpovědi zajišťují velmi složité mechanismy. Celý proces vyžaduje opakovaná potvrzení. Má však také mnoho brzd, které jej v případě potřeby umožňují zpomalit nebo i zastavit. Setkání s mikroorganismy tedy nemusí v každém případě vést k přemrštěné imunitní odpovědi, což by bylo jen neúčelným plýtváním energie organismu, ale pouze uvádí buňky do stavu pohotovosti.

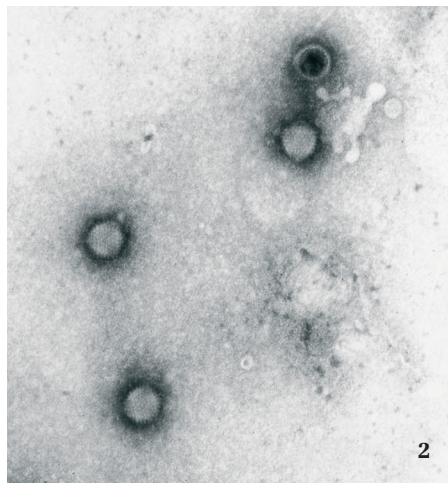
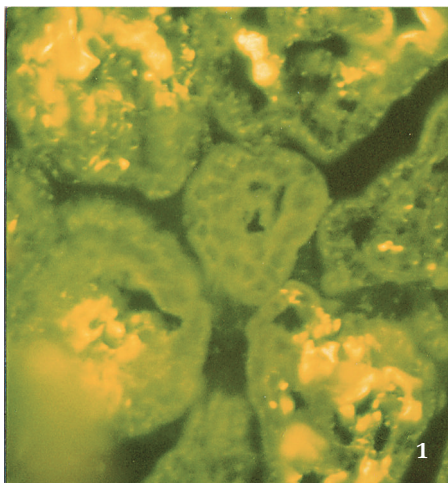
Inside story

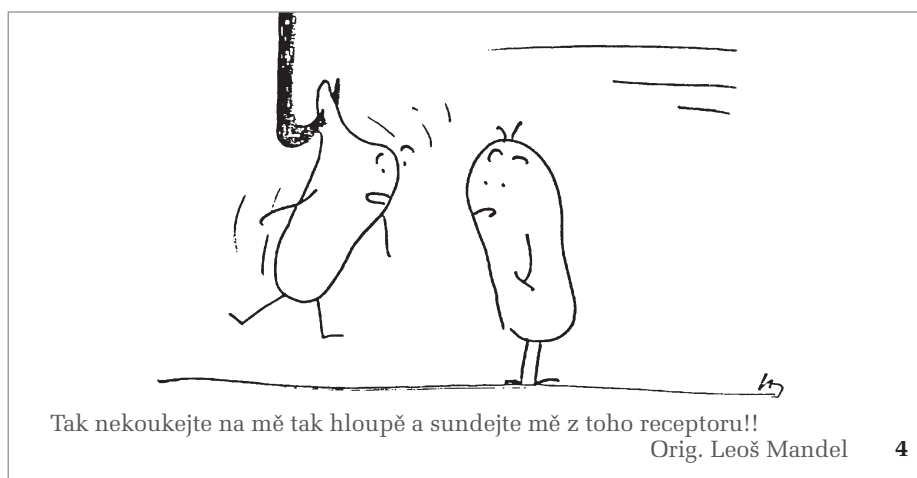
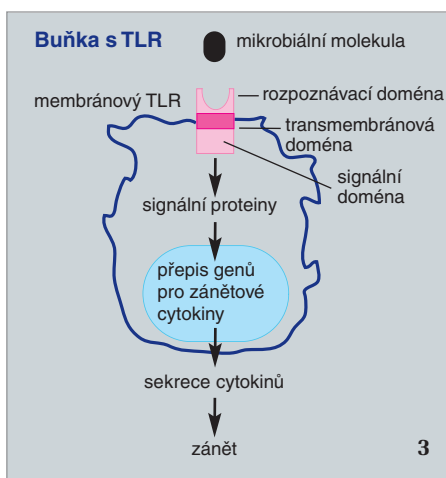
Tento název je parafrází slavného muzikálu *Westside story*. Jde o příběh mikroorganismů, které žijí v našich tělech. Lidské tělo se skládá z neuvěřitelného množství téměř 10 bilionů buněk. Ale jen v trávicím systému se nachází desetkrát více bakterií, dohromady o hmotnosti asi 1 kg. Co do pestrosti je to asi tisíc bakteriálních druhů a desetinásobek jejich odlišných kmenů, což dohromady vytváří na 10 tisíc různých bakteriálních genů. Udržet toto ohromné množství stále se množících mikrobů pod kontrolou vyžaduje vysoce efektivní regulační i imunitní mechanismy.

1 Molekuly HSP70 (proteiny tepelného šoku – Heat Shock Proteins), které vznikly při salmonelové infekci, jsou v histologickém řezu střevních klků obarveny fluorescencí. Tyto stresové proteiny jsou rozpoznávány pomocí buněčných receptorů TLR 2 a TLR 4 (zvětšeno 200×). Blíže v textu.

Foto I. Trebichavský

2 Skupina adenovirů, původců onemocnění dýchacích cest a tzv. střevní chřipky, negativně obarvených pro elektronovou mikroskopii. DNA adenovirů je rozpoznávána uvnitř buněk pomocí buněčného receptoru TLR 9 (zvětšeno 100 000×). Foto M. Koukal





Přímému přilnutí mikrobů na buňky kryjící vnitřní povrch střeva a jejich případnému průniku do organismu zabráňuje navíc i viskózní sliz, který rovněž obsahuje účinné antimikrobiální látky (viz Živa 2001, 1–6). Spolu s bakteriemi a odlučujícími se buňkami střevních klků se dostává do stolice, která obsahuje v jednom gramu až miliardu bakterií. Tak je u zdravého člověka zaručena regulace počtu mikrobů v trávicím ústrojí. Průniku bakterií do vnitřního prostředí organismu brání i morfologické utváření střevní stěny. Buňky střevní výstelky na sebe nasedají tak těsně, že ani ty bakterie, které se přes vrstvu slizu ojedinele dostanou, neproniknou do střevní sliznice a dále do těla. Některé patogenní mikroby však dokážou překonat i tuto bariéru. Jejich rozpoznání mezi neškodnými nebo jen příležitostně škodlivými bakteriemi, jejichž počet je mnohonásobně převyšuje, by se dalo přirovnat k příslovečnému nalezení jehly v kupě sena. Jak je tohoto rozpoznání dosaženo, objasnil až objev prvních receptorů přirozené imunity.

Tab. 1 Buněčné receptory TLR člověka a jejich cílové vazebné struktury

Receptor	Ligand
TLR 1	triacyllipoproteiny bakterií, modulín
TLR 2	lipoproteiny gramnegativních bakterií lipoteichoová kyselina grampozitivních bakterií lipoarabidomanany mykobakterií, zymosan hub, HSP70 – stresový protein
TLR 3	dvouvláknová virová RNA
TLR 4	lipopolysacharid gramnegativních bakterií, HSP70, některé proteiny mezibuněčné hmoty aj.
TLR 5	bakteriální flagelin
TLR 6	lipopeptidy bakterií, kys. lipoteichoová, zymosan
TLR 7	imidazochinolin (imiquimod), jednovláknová RNA
TLR 8	jednovláknová RNA
TLR 9	demetylovaná CpG (cytosin-poly-guaninová sekvence) mikrobiální DNA
TLR 10	neznámý

Toll

Za objevem receptorů přirozené imunity kupodivu stály genetické a embryologické výzkumy octomilky (*Drosophila melanogaster*). Roku 1985 byl identifikován zvláštní gen kontrolující ustavení dorzo-ventrální osy v průběhu jejího embryonálního vývoje. Později se ukázalo, že stejný gen hraje zároveň úlohu i v její obraně proti infekci. Objev genu byl o 10 let později oceněn Nobelovou cenou za fyziologii a medicínu. Obdrželi ji Ch. Nüsslein-Volhardová z Ústavu pro vývojovou biologii Max-Planckova institutu v Tübingenu (starém německém univerzitním městě v Bádensku-Württembersku) spolu s E. B. Lewisem z Kalifornské techniky a E. F. Wieschausem z Princetonské univerzity (ve státě New Jersey v USA). Traduje se, že při identifikaci tohoto dvojfunkčního genu zvolala Ch. Nüsslein-Volhardová překvapeně „Das ist toll!“, což v hovorové němčině znamená něco jako naše „To je super!“. Genu už toto pojmenování zůstalo a postupně byly odhaleny další geny kódující embryonální vývoj octomilky. Co však na tom bylo velmi zvláštní, některé z nich byly homologní s geny, které řídí imunitní odpověď u obratlovců, evolučně velmi vzdálených od bezobratlých živočichů.

Gen *Toll* se u octomilky zapojuje do rozpoznání infekčního agens tak, že kóduje tvorbu transmembránového buněčného receptoru, který vnější rozpoznávací částí identifikuje mikrobiální vzory a vnitřní signální částí zanořenou do cytoplazmy zprostředkuje signalizaci a následnou aktivaci imunitních pochodů. Další výzkum ukázal, že signální doména receptoru Toll octomilky je částečně homologní s cytoplazmatickou částí lidského receptoru pro interleukin-1, jenž mimo jiné slouží jako tzv. vnitřní pyrogen, tj. vyvolavatel horečky. Interleukin-1 (IL-1) se krevním oběhem přenáší do centra regulace tělesné teploty v podvěsku mozkovém (hypotalamu) a výsledkem je stav, běžně označovaný jako horečka, který je významným obranným mechanismem organismu. Některé mikroby jednak přímo poškozují a také zvyšují aktivitu bílých krvinek, které je pohlcují. Horečka vede k produkci ochranných proteinů tepelného šoku HSP (Heat Shock Proteins). Ty zabráňují tepelné denaturaci jiných proteinů a navíc aktivují receptory přirozené imunity, a tak zesilují obranné reakce (obr. 1). K horečce a jejím průvod-

3 Rozpoznání mikrobů pomocí membránového receptoru TLR. Molekula TLR vyčnívá z buňky rozpoznávací částí a do buňky je zanořena signální částí (některé TLR nejsou na vnější cytoplazmatické membráně, ale na membráně cytoplazmatických váčků – endozomů). Různé receptory rozpoznávají různé vzory mikrobiálních molekul. Signál rozpoznání je předán soustavou signálních proteinů v cytoplasmě do buněčného jádra, kde dojde k přepisu genů pro zánětové cytokiny. V cytoplasmě jsou tyto molekuly buněčné komunikace syntetizovány a po sekreci z buňky vyvolají místní zánětovou reakci. Orig. I. Trebichavský

ním jevům se ještě vrátíme v příštím pokračování článku.

TLR

Zakrátko po odhalení úlohy receptoru Toll v imunitě octomilky byly v r. 1997 R. Medzhitovem a Ch. Janewayem z Yaleovy univerzity v New Haven (Connecticut, USA) objeveny podobné geny i v genomu savců včetně člověka. Jejich produkty – buněčné receptory – byly nazvány TLR (Toll-Like Receptors, receptory podobné Toll). U lidí zatím známe 10 receptorů TLR, které rozpoznávají rozličné ligandy – strukturální mikrobiální a jiné vzory (PAMP, tab. 1).

Všechny TLR hrají nezastupitelnou roli v přirozené imunitě. V buňkách jsou umístěny v povrchové buněčné membráně nebo v membráně cytoplazmatických endozomů. TLR lokalizované v endozomech (TLR 3, 7, 8 a 9) rozpoznávají nukleové kyseliny, takže jsou významnými detektory buněčné infekce virem a jinými nitrobuněčnými parazity (obr. 2). Molekula TLR je tvořena vnější rozpoznávací částí LRR (Leucine Rich Repeats, protože obsahuje převážně aminokyselinu leucin) a signální částí zanořenou v cytoplasmě, která aktivuje tvorbu poplachových cytokinů (obr. 3).

Je paradoxní, že receptor TLR 7, který byl již před 10 lety prakticky využit v medicíně, je nejméně prostudovaný. Jeho cílová struktura se pod názvem imiquimod stala součástí přípravků pro léčbu genitálních a análních bradavic. Toto obtížné virové onemocnění postihuje na celém světě více než 600 milionů lidí (viz také Živa 2004, 4: 146–149). Stimulace receptoru TLR 7 imiquimodem má za následek tvorbu interferonu, který hraje významnou úlohu v antivirové imunitě.





Cytoplazmatické receptory

Řekli jsme, že receptory TLR rozpoznávají mikrobiální vzory se nacházejí na povrchu buňky nebo na membránách cytoplazmatických endozomů. Buňky jsou však také schopny rozpoznávat mikroby přímo cytoplazmatickými receptory, které se označují NLR (NOD Like Receptors; jako NOD byly nazvány receptory této skupiny, které byly objeveny jako první). Většina NLR se skládá z rozpoznávací části LRR, dále ze střední domény, která umožňuje vytvářet proteinové komplexy, a z části, která zajišťuje signalizaci pro indukci zánětu. NLR rozpoznávají i jiné mikrobiální struktury, např. peptidoglykany stěvních bakterií, které vyvolávají náklady trávicího ústrojí. O významu těchto receptorů svědčí to, že genová mutace znemožňující funkci jednoho z nich vede k těžkým zánětům střeva.

U člověka je zatím známo 23 receptorů NLR. Jejich homology jsou nalézány i u rostlin a bezobratlých živočichů. Některé receptory NLR jsou složkou inflama-zomů – komplexů proteinů, které aktivují okamžitou zánětovou odpověď.

Jako senzory nukleových kyselin mikro-organismů, které pronikly až do buněčné

cytoplazmy, slouží receptory RLR (RIG Like Receptors; RIG se nazývá jeden z těchto receptorů). Tyto senzory byly objeveny při studiu genových změn při virových onemocněních. Bylo zjištěno, že při infekci virem hemoragické horečky dengue (viz Živa 2009, 6: 242–246) se zvyšuje produkce enzymů, RNA helikáz, které rozplétají dvouvláknovou RNA. Později se prokázalo, že zvýšené koncentrace těchto enzymů provázejí i infekce vyvolané některými dalšími RNA viry (mimo jiné i virem chřipky). Rozpoznávací proces vede v infikovaných buňkách k tvorbě velmi účinných antivirových interferonů α a β .

Pro DNA rovněž existují cytoplazmatické receptory/senzory, z nichž jeden indukuje tvorbu interferonu (DAI), zatímco druhý je součástí jednoho druhu inflama-zomu (AIM2). Inflamazomy jsou natolik významné pro vznik zánětové odpovědi, že jim bude věnována samostatná kapitola v příštím pokračování.

Závěry

Přirozená imunita a její receptory umožnily bezobratlým přežít velmi úspěšně i bez schopnosti tvořit protilátky. Zůstala však zachována i u obratlovců a propojila

se s evolučně novou adaptivní imunitou. Receptory přirozené imunity se vyskytují u většiny buněk těla. Každý buněčný typ má jinou sestavu těchto sensorů i jiný způsob aktivace obranné odpovědi. Např. keratinocyty, epitelové buňky chránící povrch kůže, jsou vybaveny receptory TLR rozpoznávajícími téměř všechny druhy mikrobů (včetně velmi nebezpečných virů chřipky), které se na kůži dostanou. Po přenosu signálu o jejich přítomnosti dojde k tvorbě obranných faktorů od cytokinů počínaje, až po antimikrobiální peptidy (blíže seriál Léčivé látky z živočišné říše, Živa 2001, 1–6). Jiné buňky, zejména ty, co vykonávají v organismu vysoce specializované funkce, už samy nejsou schopny ubránit se infekci. Chrání je však profesionální imunokompetentní buňky, tedy buňky imunitního systému, které se mobilizují pomocí poplachových molekul (cytokinů) okamžitě poté, co rozpoznaly cizí mikrobiální vzory PAMP svými receptory přirozené imunity. Jsou-li cytokiny řečí buněk, jsou receptory jejich očima.

Studie byla podpořena institucionálním záměrem AV0Z 5020051.

Jiří Šantrůček

Atmosféra–list–fotosyntéza–člověk. Jak měníme fotosyntézu listu a jak ona mění nás II.

První část tohoto článku pojednávala o vztazích mezi listem rostlin a atmosférou, která ho obklopuje, o tom, jak mění se koncentrace oxidu uhličitého (CO₂) v atmosféře Země ovlivnila vývoj listu, jeho tvar, morfologii a hlavně četnost „bran“, kterými list komunikuje s atmosférou, hustotu průduchů. Zpětnou vazbu, od vegetace do atmosféry, představuje fotosyntéza, dýchání i transpirace, ale také antropogenní aktivity člověka, kterými ovlivňujeme atmosférickou koncentraci CO₂, a tedy opět list a jeho fotosyntetickou aktivitu. To poslední děláme nevědomky, bezděčně, nezáměrně. Tento díl se zabývá spíše snahou člověka měnit fotosyntézu záměrně, s nadějí, že tím zkvalitní svůj život. Jednostrannost je nepřirozená. V závěru se tedy role v jistém smyslu obrátí.

Je relativně snadné měnit vlastnosti rostlin, které jsou kódovány jedním genem nebo úzkou skupinou poměrně snadno manipulovatelných genů. Máme tak celou barevnou škálu květů u mnoha druhů okrasných rostlin. Těžké, až zatím nemožné, je cíleně specifickou manipulací měnit takové vlastnosti, jako je velikost těla nebo hmotnost biomasy určitého orgánu (výnos). Šlechtění na tyto vlastnosti se dělo po staletí a často k němu stále empiricky dochází: náhodné navození variability, výběr na výnos a stále dokola. Např.

je známo, že rychlost fotosyntézy není přímým a jediným selekčním kritériem pro cílené změny výnosu (Nátr, Lawlor 2005). Proto odrůdy s vyšší rychlostí asimilace oxidu uhličitého nemusí mít vyšší výnos. Přesto se v minulosti podařilo vyšlechtit výnosné odrůdy, aniž by probíhal výběr cíleně na nějakou fyziologickou vlastnost rostliny spojenou s výnosem. Zpětně s odstupem desetiletí nebo staletí však může být užitečné prověřit, zda se „nespecifickým“ výběrem např. na výnos nezměnily systematicky některé fyziologické, morfo-

logické nebo jiné vlastnosti rostliny. Možná, že naši předkové po desetiletí nevědomky selekcí ovlivňovali určitý děj, který ještě neuměli změřit, který výnos podstatně spoluurčuje a který svým kódováním nezasahuje celý genom. O podobném případě, který má souvislost s průduchy a fotosyntézou, bych se nyní chtěl krátce zmínit.

Jak měníme list záměrně

Otevřenost je skvělá vlastnost, ale ne vždy a všude, ne za každou cenu. Platí to (duševně) pro člověka i (látkově) pro rostliny. Šlechtění na vyšší otevřenost průduchů, a tedy zvýšený přístup CO₂ do chloroplastů, je logická a teoreticky podložená snaha v podmínkách, kdy můžeme rostlinám zajistit dostatek půdní vody. Díky průkopnickým pracím G. Haberlandta, P. Gastry a dalších rostlinných fyziologů první a počátku druhé poloviny minulého stol. dnes víme, že fotosyntetická fixace CO₂ je fotochemický a biochemický proces, jehož rychlost je často omezena difúzním tokem CO₂ z atmosféry přes průduchy do chloroplastů. Průduchy představují jakési hrdlo lahve pro protisměrné toky CO₂ do rostliny a vodní páry ven z listu; přesněji rostlinou plynule regulovatelný ventil. Ventil, který se otevře, pokud je v chloroplastech nedostatek CO₂ a současně má rostlina dostatek vody, nebo se uzavře v opačném extrémním případě. Mezi oběma extrémy je ale samozřejmě celá škála stavů otevřenosti (difúzní vodivosti) průduchů daných rychlostí fotosyntézy a vodním stavem rostliny. Proč tedy neselektovat rostliny na zvýšenou vodivost průduchů? Přestože se záhy vyvinula technika spolehlivého měření průduchové vodivosti (tzv. porometry), ve šlechtění se prakticky neuplatnila. Důvodem byla mimo jiné velká časová i prostorová variabilita vodivosti průduchů, často větší než ta meziodrůdová nebo

