

Záhada aktivace $\gamma\delta$ T lymfocytů vyřešena

Mezi nejdůležitější buňky imunitního systému obratlovců nepochybně patří lymfocyty T. Jejich název je odvozen od toho, že nejdůležitější fáze jejich vývoje probíhají v brzlíku (thymu). Tyto buňky tvoří spolu s lymfocyty B adaptivní (antigenně specifickou) část imunitního systému. Každý z obrovského počtu individuálních klonů lymfocytů T je vybaven unikátními specifickými receptory, zvanými T-receptory (TCR), které se od TCR ostatních klonů liší detaily struktury vazebného místa. Tyto receptory vznikají (obdobně jako podobné „protilátkové“ receptory lymfocytů B) jako konečný výsledek náhodných procesů přeskupování úseků jejich genů (úseky se nazývají V, D, J). Vzniká tak giganticky velký repertoár desítek milionů různých klonálních variant, které jsou připraveny rozeznávat nejrůznější cizorodé chemické struktury (antigeny). Na povrchu každého lymfocytu T je kolem 50 000 identických kopií molekul TCR.

Povrch lymfocytů T

Existují dva základní typy T-receptorů. První se skládá ze dvou proteinových řetězců α a β (tzv. $\alpha\beta$ TCR), druhý z řetězců γ a δ ($\gamma\delta$ TCR). Proteinové řetězce α , β , γ a δ jsou si sice podobné, ale jsou kódovány odlišnými, rozdílně regulovanými geny. Naprostá většina $\alpha\beta$ TCR nerozeznává antigeny samotné (jako takové), ale jejich fragmenty navázané na speciální nosičové proteiny na povrchu jiných buněk. Těmito nosičovými proteiny jsou nejčastěji MHC proteiny, které vážou různé peptidové fragmenty proteinů. Existuje ale také malá skupina molekul zvaných CD1, podobných MHC proteinům, které vážou některé lipidy. Peptidové a lipidové antigenní fragmenty pocházejí většinou z mikroorganismů, které pronikají dovnitř buněk a žijí tam, nebo byly imunitními buňkami pohlceny a usmrceny. Prostřednictvím zdánlivě složitého mechanismu prezentování fragmentů na MHC nebo CD1 molekulách se dosahuje toho, aby imunitní systém získal přístup i k jinak špatně dostupným antigenům pocházejícím z intracelulárních parazitů, a aby tedy mohl odhalit takovéto infikované buňky.

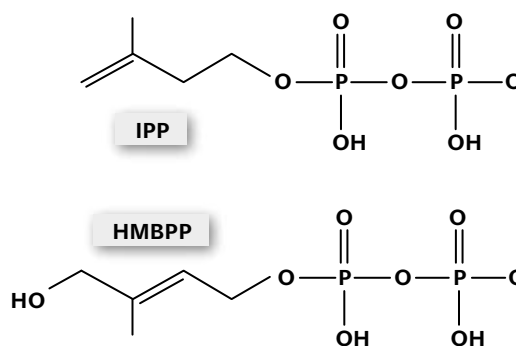
V lidském imunitním systému výrazně převažují lymfocyty T nesoucí $\alpha\beta$ TCR; u většiny jedinců tvoří $\gamma\delta$ T lymfocyty jen několik procent celkové populace lymfocytů T (u některých druhů savců je tomu právě naopak). Tento minoritní typ $\gamma\delta$ T lymfocytů se specializuje na rozpoznávání jiných typů antigenů

než $\alpha\beta$ T lymfocyty. Některé lidské $\gamma\delta$ TCR rozeznávají sice také komplexy CD1 molekul s bakteriálními lipidy, jiné ale rozeznávají proteiny vzdáleně příbuzné MHC proteinům, zvané MICA a ULBP.

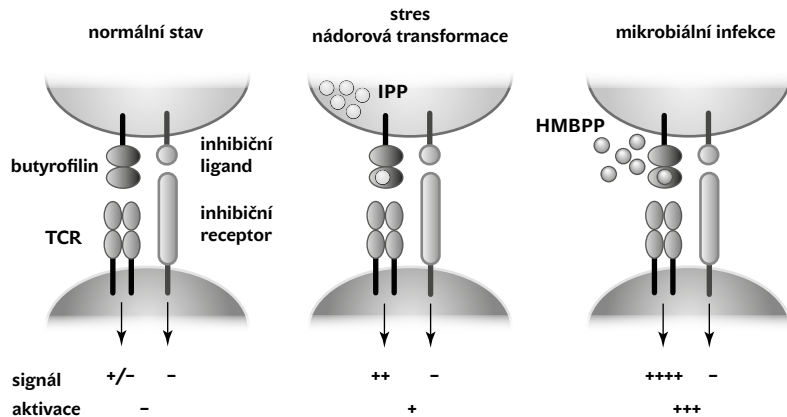
Co „probouzí“ jednu z rodin lymfocytů T

Většina $\gamma\delta$ T lymfocytů cirkulujících v lidské krvi jsou tzv. $V\gamma9V\delta2$ T lymfocyty (někteří autoři je označují jako $V\gamma2V\delta2$, což působí tak trochu zmatek). Většinou tvoří jen 5–10 % všech krevních lymfocytů T, ale u některých jedinců je jich mnohem více (souvisí to zřejmě s některými chronickými infekcemi, jejichž původci stimulují tyto buňky k proliferaci). Název těchto buněk je odvozen od toho, že jejich TCR se skládají z γ řetězců obsahujících N-koncové úseky kódované genovými úseky V z rodiny $\gamma9$ a úseky δ řetězců obsahujících N-koncové úseky kódované genovými úseky V z rodiny $\delta2$. O těchto buňkách je již dávno známo, že mohou být stimulovány malými organickými látkami obsahujícími pyrofosfátovou skupinu. Typickými příklady jsou isopentenylpyrofosfát (IPP) a hydroxymethylbut-2-enylpyrofosfát (HMBPP) (obr. 1).

Zatímco IPP je běžným metabolitem buněk obratlovců (jeden z meziproductů biosyntézy izoprenoidních sloučenin, patří mezi ně řada životně důležitých lipidů), HMBPP je metabolitem typickým pro bakterie a některé nižší eukaryoty, používající odlišnou biosyntetickou dráhu izoprenoidů. Důležité je, že HMBPP je více než tisíckrát účinnějším stimulem $V\gamma9V\delta2$ T lymfocytů než IPP, takže může pro náš imunitní systém sloužit jako jeden ze „signálů nebezpečí“ prozrazujících přítomnost potenciálně škodlivých mikroorganismů. Ale i IPP (a některé jeho deriváty) může prostřednictvím aktivace $V\gamma9V\delta2$ T lymfocytů signalizovat poškození vlastních buněk, ze kterých se do je-



1. Příklady pyrofosfátových antigenů stimulujících (za pomoci prezentujících buněk) $V\gamma9V\delta2$ T lymfocytů. IPP je účinný v koncentraci 1 μ M, HMBPP již v koncentraci 0,03 nM.



2. Interakce V γ 9V δ 2T lymfocytů s jinými buňkami. Vlevo: Pokud je kontaktovaná buňka normální, je lymfocyt T udržován v neaktivním stavu signály od několika inhibičních receptorů. Vazba TCR na butyrofilin bez pyrofosfátového ligandu je slabá a nestimuluje lymfocyt T. **Uprostřed:** Je-li kontaktovaná buňka abnormální, hromadí se v ní pyrofosfátové intermediáty (hlavně IPP) a vážou se na butyrofilin; komplex butyrofilinu s IPP se pevněji váže na TCR a stimuluje T lymfocyt. **Vpravo:** Pokud je kontaktovaná buňka infikovaná, produkuje infekční mikroorganismus HMBPP, který se váže na butyrofilin; komplex butyrofilinu s HMBPP se váže na TCR a silně stimuluje lymfocyt T. (Podle Willcox C. R. et al., *Nat. Immunol.* 14, 886–887, 2013/9.)

Prof. RNDr. Václav Hořejší, CSc., (*1949) vystudoval Přírodovědeckou fakultu UK v Praze. V Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v. v. i., který od roku 2005 řídí a kde je vedoucím oddělení molekulární imunologie, se zabývá povrchovými a signalizačními molekulami buněk imunitního systému. Přednáší imunologii na Přírodovědecké fakultě UK v Praze.

jich okolí uvolňují látky, které jsou ve zdravé buňce skryty uvnitř. V γ 9V δ 2T lymfocyty stimulované pyrofosfátovými sloučeninami začnou vylučovat látky (cytokiny) podporující vznik zánětlivé reakce, a tím zahajují komplexní obrannou imunitní reakci, která by měla infekci lokalizovat a postupně eliminovat. Aktivované V γ 9V δ 2T lymfocyty jsou ale také schopny účinně zabít nádorové nebo poškozené (stresované) buňky po přímém kontaktu (jsou totiž vybaveny receptorovými molekulami rozeznávajícími některé charakteristické povrchové proteiny nádorových a jiných abnormálních buněk). Protinádorové účinky V γ 9V δ 2T lymfocytů stimulovaných pyrofosfátovými sloučeninami se opakovaně testovaly (se slibnými výsledky) v klinických studiích s onkologickými pacienty.

Jak funguje „budíček“ lymfocytů V γ 9V δ 2T

Až donedávna ovšem zůstávalo záhadou, jak V γ 9V δ 2T lymfocyty rozeznávají pyrofosfátové sloučeniny. Nejprve se téměř samozřejmě předpokládalo, že se tyto látky vážou přímo na TCR těchto buněk, podobně jako je mohou rozeznávat antigenně specifické receptory (BCR) některých lymfocytů B. To se ale nepotvrdilo a v experimentech testujících přímé vazebné interakce mezi pyrofosfátovými sloučeninami (např. IPP a HMBPP) nebyla pozorována naprosto žádná vazba. Rozumnou hypotézou se tedy jevílo, že by vše mohlo fungovat podobně jako u α β T lymfocytů, které *de facto* také rozeznávají relativně malé molekuly (peptidové fragmenty antigenních proteinů), avšak nikoli jako takové, ale pouze v komplexu s „nosičovými“ MHC proteiny na buněčném povrchu. Tomu silně nasvědčovalo i to, že pro účinnou stimulaci V γ 9V δ 2T lymfocytů pyrofosfátovými sloučeninami je nutná současná přítomnost jiných buněk. Jako takové „pomocné“, prezentační buňky fungovala většina různých typů lidských buněk, ale nikoli např. buněk myších. To svědčilo o tom, že hypotetické nosičové molekuly jsou druhově specifické, ale málo specifické co do buněčného typu (jsou, jak se říká, „široce exprimovány“). Problém se tedy redukoval na to, jak technicky identifikovat gen, resp. geny kódující hypotetický prezentační protein.

Mezinárodní tým, kterému se to nedávno podařilo, vedl Gennaro De Libero z Univerzity v Basileji (Vavassori S. et al., *Nat. Im-*


munol. 14(9), 908–916, 2013). Použil přístup zvaný poziční klonování. Badatelé vyšli ze souboru buněčných hybridních linií, u kterých pocházela dobře definovaná část genomu z myši a druhá část z člověka. Pokud tedy některé z těchto linií nepodporovaly stimulaci V γ 9V δ 2T lymfocytů pyrofosfátovými sloučeninami, zřejmě jim chyběla ta část lidského genomu, ve které byl i onen hledaný gen. S trochou štěstí se tímto postupem skutečně podařilo zúžit hledanou část lidského genomu na celkem malý úsek 6. chromozomu. Vzhledem k tomu, že celý lidský genom je již podrobně zmapován, bylo možno určit, že tento úsek obsahuje 81 genů, které jsou poměrně široce exprimovány (jak bylo ověřeno pomocí několika typově velmi odlišných buněčných linií). Šestnáct z těchto genů vypadalo velmi nadějně, protože kódovaly typické transmembránové proteiny. Mezi nimi byla nejnadějnější skupina pěti genů kódujících příbuzné proteiny imunoglobulinové genové rodiny zvané butyrofiliny. U dvou z nich byla již v minulosti prokázána souvislost s vývojem γ δ T lymfocytů.

Nyní byla již cesta k cíli celkem snadná – badatelé vyklonovali všechny tyto nadějně geny (ve formě komplementární DNA, cDNA), vpravili je standardním postupem (transfekcí) do vhodných buněčných linií a sledovali, které z takovýchto „transfektantů“ budou podporovat aktivaci V γ 9V δ 2T lymfocytů. Paralelně zkusili potlačit expresi jednotlivých kandidátních genů v lidských buněčných liniích pomocí techniky siRNA. Oba tyto přístupy vedly k jednoznačné identifikaci genu *BTN3A1* jako toho kýženého pravého. S tím se ovšem výzkumný tým nespokojil – výsledky ještě potvrdil tím, že připravil rekombinantní rozpustný genový produkt butyrofilin 3A1 (známý též pod názvem CD277), resp. jeho N-terminální doménu obsahující vazebné místo pro pyrofosfátové antigeny, a podrobně studoval biochemické vlastnosti komplexů tohoto purifikovaného rekombinantního proteinu s pyrofosfátovými antigeny IPP a HMBPP. Mimo jiné byly připraveny i krystaly těchto komplexů a byla vyřešena jejich prostorová struktura, která jasně ukázala detaily vazebného místa pro pyrofosfátové antigeny. Nakonec byl ještě také připraven rekombinantní rozpustný γ δ TCR a exaktními fyzikálními metodami byla prokázána jeho specifická vazba na komplexy rekombinantního butyrofilinu 3A1 a pyrofosfátových antigenů. Zajímavé bylo, že jedna z těchto citlivých metod ukázala, že γ δ TCR slabě váže i samotný butyrofilin 3A1 bez navázaných pyrofosfátových ligandů.

Tato velmi důkladná práce tedy definitivně objasnila záhadu, která řadu let trápila badatele v oboru biologie lymfocytů T – jaký je mechanismus stimulace fyziologicky důležitých V γ 9V δ 2T lymfocytů pyrofosfátovými antigeny. Ukázalo se, že butyrofilin 3A1 hraje vlastně velmi podobnou roli jako MHC proteiny – slouží jako nezbytná prezentační molekula zprostředkující stimulaci důležitě

skupiny lymfocytů T skupinou malých organických molekul produkovaných buď buňkami organismu vlastními, nebo různými patogenními mikroorganismy.

Zajímavé je, že butyrofilin 3A1 (CD277) byl již o rok dříve identifikován jinou skupinou také jako molekula kritická pro rozpoznávání pyrofosfátových antigenů V γ 9V δ 2T lymfocyty (Harly C. et al., Blood. 120, 2269–2279, 2013/11). Tito badatelé ale došli k závěru, že pyrofosfátové antigeny se vážou na intracelulární (cytoplazmatickou) část molekuly CD277, způsobují tak agregaci tohoto proteinu a tyto agregáty jsou pak rozeznávány T-receptory V γ 9V δ 2T lymfocytů. Zdá se však, že nynější výsledky De Liberova týmu velmi přesvědčivě ukazují něco jiného.

Poznamenejme ještě, že V γ 9V δ 2T lymfocyty mohou být stimulovány i jinými typy malých molekul, např. některými jednoduchými alkylaminy. V tomto případě je ale mechanismus zřejmě jiný, nepřímý. Tyto sloučeniny totiž částečně inhibují některé kritické kroky biosyntézy izoprenoidů. To vede k hromadění biosyntetických meziproduktů (např. IPP) schopných aktivovat V γ 9V δ 2T lymfocyty. Něco podobného se zřejmě děje také v abnormálních buňkách (poškozených, stresovaných, nádorových). I v takových situacích mohou být proto stimulovány obranné mechanismy založené na V γ 9V δ 2T lymfocytech. To, jak fungují v různých fyziologicky relevantních situacích V γ 9V δ 2T lymfocyty, znázorňuje obr. 2. 

Zoufání nad počasím

Matka příroda opět přivedla červen do rozumné podoby, kdy se člověk těší z přívětivého podletí. Jestliže však jednoho jitra stlačí teploměr až takřka k nule, pak je to žertování až povážlivé. Patrně se povyřáží pohledem, jak lidé vytahují honem z šatníků pronaftalinované svetry. Za pár dní se člověk probudí, peřina je skopaná na podlahu, teploměr ukazuje pětadvacet, během dne se vysouká ke třiceti a ještě kus nad, a to už je stav, kdy o žertování, ani trapném, už nemůže být řeči. Svět se potácí, sluneční exploze ochromuje všechno živé. Ženy strhávají ze sebe poslední, co ještě šetří cudnost. Tím se vystavují potřízím dermatologickým, ne-li i sexuálním. Ačkoli těm snad ne. Muži se potí, to je to jediné, čím vyčerpávají svou zbývající aktivitu. Lidé otvírají okna v rozpálených bytech a zas je zavírají, protože se zvenku žene dovnitř ještě horší výheň. Druhého dne se však už nežene nic, ani dovnitř, ani ven. Město jako by bylo přiklopeno skleněnou kopulí, pod níž se už nehne list na stromě ani myšlenka v hlavě či vlas na spařeném pleši. Je-li co k dýchání, pak slizký neviditelný opar.

Tehdy jsem se octl kdesi v městě beze stopy po stínu. Parno ze mne postupně vysávalo všechno, co bych mohl mít za své já. Zbylo tělo, seděla na něm hlava, která se opile motala, nohy, jestliže šly, tedy samy od sebe, útroby cosi chtěly, ale nebylo jasné co. Oči ještě viděly, ale ne prostor, ten se splaskával do plochy, která ztrácela barvy, až splýnula v jakousi vybledlou rozmazaninu. A tu se mi vynořilo v paměti cosi, co jsem snad kdysi četl, slovo o pěti slabikách, každá jako rána do bubnu, DE-HY-DRA-TA-CE. Hrozivě se blížilo a zřetelnělo a tu jsem si vybavoval další slova, „V pokročilém věku...“, „nebez-

pečí...“, „až smrtelné...“. „Pít,“ zaslechl jsem v sobě, ač jsem žízeň necítil, necítil jsem vlastně nic, dovlekl jsem se do jakéhosi stánku, vypil sklenici, ale hrdlo v mžiku vysálo tekutinu jako rozžhavený písek na poušti. Žádná změna. Bůhví, jak jsem se dopotácel domů, spal a spal, kdoví jak dlouho, až mě probudila bouře, blesky práskaly do pražských věží, palba krup bubnovala do okna. A rádio hlásalo, řeky trhají hráze, zaplavují vsi, zoufalí lidé, jen co spravili domky rozvrácené předchozí povodní, už zase zachraňují plovoucí zvířata a podpírají bortící se zdi...


Co se to děje s matkou přírodou? Co ji pohání k pomatným skokům od mrazu k výhni, od pouštní vyprahlosti k potopám? Matička je nemocná. Kdo ji uzdraví, není-li tu nikdo moudřejší než ona? Jak doufat, že jí pomůžeme my, její děti, když jsme to byli možná právě my, kdo jí nemoc přivodil?

Snad bychom mohli aspoň trochu přispět, aby neubývalo sil, které jí ještě zůstávají.

Brouku, který marně tápal po okenním skle, jsem pomohl na svobodu.

Zhasil jsem v předsíni lampu, kterou jsem včera zapomněl vypnout.

Měl jsem cosi sepsat, i zvolil jsem papír na jedné straně už popsany. Vždyť každý papírek znamená konec jedné větvičky v lese.

Nic dalšího už mi nenapadlo. 

ILJA HURNÍK

Prof. Ilja Hurník, DrSc., (1922–2013) absolvoval AMU. Působil na bratislavské Vysoké škole umění a na pražské konzervatoři. Je autorem osmidesátého cyklu Umění poslouchat hudbu. R. 1992 mu Ostravská univerzita udělila titul Doctor Scientiarum honoris causa.

Z literárního díla např.: Trubači z Jericha (1965), Kapitolské husy (1969), Cesta s motýlkem (1970), Muzikální Sherlock (1971), Dětství ve Slezsku (1979), Múza v terénu (1980) aj. Na knihu Dětství ve Slezsku navazuje kniha vzpomínek Závěrečná zpráva (Karolinum, Praha 2000); obě knihy vzpomínek doplňuje kniha Pondělníci (Karolinum, Praha 2002).