

## PREHLAD NIEKTORÝCH NAJNOVŠÍCH POZNATKOV O NEKLASICKÝCH MHC ANTIGÉNOCH A AKTIVAČNÝCH DRÁHACH T-LYMFOCYTOV

M. BUC

### REVIEW OF ACTUAL KNOWLEDGE ON NEOCLASSICAL MHC ANTIGENES AND ACTIVATION PATHWAYS OF T-LYMPHOCYTES

V dňoch 23.—29. júla 1995 sa konal 9. medzinárodný imunologický kongres v San Francisku (Kalifornia, USA). Bol som jedným z vyše 7000 účastníkov zo 42 krajín sveta. Kongres mal bohatý program. Denne sa konalo 5—7 sympózií doobeda a približne také isté množstvo pracovných akcií („workshopov“) poobede, kde sa diskutovalo o jednotlivých prezentovaných nástenkových správach. Už z uvedeného vyplýva, že sa nedalo zachytiť všetko. Každý si musel vybrať tému, ktorá ho najviac zaujímala.

Všetky akcie sa konali v hoteli Marriott a v blízkom kongresovom centre Manson, takže bol možný voľný pohyb medzi jednotlivými prednáškovými sálami. Každý mal možnosť oddýchnuť si a osviežiť sa v priľahlom parku alebo ísť k neďalekému pobrežiu Tichého oceánu. Ja som sa zamerlal na mne profesionálne najbližšiu oblasť, t.j. oblasť hlavného histokompatibilného komplexu a bunkovej imunity.

Hlavný histokompatibilný komplex (MHC) má ústredné postavenie v imunitných reakciách. Trvalo vyše 30 rokov od objavenia MHC u človeka (HLA, 1967) a vyše 60 rokov u myši (H-2, 1932), kým sa spoznala biologická funkcia hlavných génových produktov tohto systému (prezentácia antigénov, zabezpečenie kooperácie imunokompetentných buniek a indukcia tolerancie na vlastné antigény). Súčasné prúdke nasadenie metód molekulárnej biológie a počítačovej techniky spôsobuje, že každý rok pribúdajú ďalšie poznatky a nedávno nové dnes už považujeme za staré. Kým ešte na minulom kongrese roku 1992 v Budapešti našu pozornosť upútavala najmä terciárna štruktúra MHC-molekúl, prezentácia imunogénnych fragmentov pochádzajúcich z endogénnych alebo exogénnych antigénov a indukcia tolerancie, t.j. biologická funkcia „klasických“ MHC-antigénov, dnes sa síce uvedené poznatky doťahujú do detailov a ďalej rozpracúvajú, ale hlavnú pozornosť už prítahujú neklasické MHC-antigény a gény, ktoré ich determinujú.

Neklasické MHC-gény sa líšia od klasických niekoľkými črtami. 1. Medzi oboma skupinami génov je značná rozdielnosť v sek-

vencii nukleotidov. 2. Kým expresia klasických génov v rôznych tkanivách je pomerne uniformná, neklasické gény majú skôr nepravidelnú expresiu, t.j. na niektorých tkanivách alebo bunkách sa nachádzajú, kým na druhých nie. 3. Mnoho neklasických génov je vo forme pseudogénov. 4. Polymorfizmus neklasických génov je obyčajne menší ako pri klasických génoch. 5. Ak niektoré z neklasických génov sú vôbec funkčné, ich funkcia sa zväčša odlišuje od funkcie klasických génov.

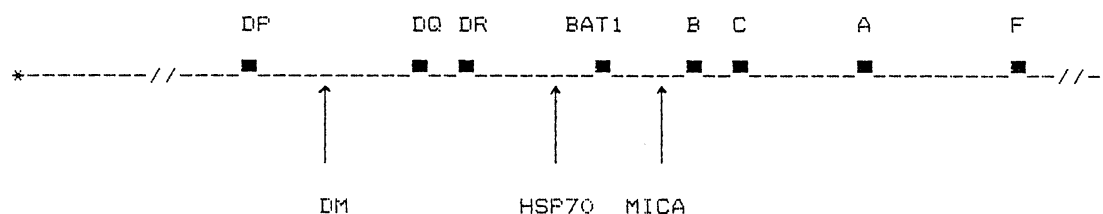
Neklasické MHC-gény a ich produkty pri myšiach sú známe už dávnejšie (H-2-Q, -T a -M). U človeka sa počet objavených neklasických HLA-génov a antigénov zvýšil práve v posledných rokoch. K neklasickým HLA-antigénom patria antigény príbuzné triede I HLA-antigénov, triede II alebo tie, ktoré stoja niekde v strede — majú podobnú biochemickú štruktúru ako MHC antigény, ale ich aminokyselinové zloženie sa zhoduje len v 30—40 % s jednou alebo druhou skupinou klasických HLA-antigénov.

K neklasickým HLA-antigénom triedy II patria HLA-DM-molekuly. Sú determinované génmi DMA ( $\alpha$ -retazec) a DMB ( $\beta$ -retazec), ktoré sa nachádzajú v HLA-D-oblasti, medzi podoblastami HLA-DQ a HLA-DP (obr. 1). Zvláštnosťou HLA-DM-molekúl je, že nedochádza k ich expresii, t.j. nenachádzajú sa v membránach buniek prezentujúcich antigén (APC), ako je to pri klasických HLA-II-antigénoch (t.j. HLA-DR, -DQ a -DP), ale sa nachádzajú iba v cytosóle bunky. Funkcia HLA-DM sa objasnila len nedávno. Ukázalo sa, že pri chýbaní HLA-DM-molekúl dochádza k poruche exogénnej cesty prezentácie antigénov. Na kongrese sa prezentovali práce, ktoré dokazujú, že hlavnou funkciou HLA-DM-molekúl je preberanie imunogénnych peptidov, ktoré sa nachádzajú v žliabku klasických HLA-II-molekúl. Za fyziologických podmienok je žliabok HLA-II-molekúl blokováný HLA-retazcom  $\gamma$  (synonymum Ii). Blokáda žliabku je potrebná, aby sa na HLA-II-molekuly počas svojej prítomnosti v endoplazmovom retikule nenadviazali peptidy, ktoré pochádzajú z endogénnej cesty prezentácie antigénu a sú predurčené na väzbu na HLA-molekuly triedy I. Keď sa však HLA-II-molekuly presunú do neskorého endozómu, kde na ne už čaká peptid pochádzajúci z cudzorodého antigénu, musia sa svojho „ochrancu“ zbaviť. Peptid, ktorý má pôvod v HLA  $\gamma$ -retazci a ktorý žliabok HLA-II-molekúl blokoval

Imunologický ústav Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave

**Address for correspondence:** M. Buc, MD, DSc., Imunologický ústav LFUK, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovakia.

Phone: +421.7.535 7398 Fax: +421.7.535 7378 Internet: buc@fmed.uniba.sk



Obr. 1 Schéma rozmiestnenia lokusov HLA-komplexu s vyznačením lokalizácie novoobjavených neklasických HLA-génov.

(označuje sa ako CLIP - class II-associated li peptide), sa uvoľní a viaže sa na molekuly HLA-DM, ktoré takto fungujú ako „šape-rony“. V nasledujúcich krokoch sa imunogénny fragment cudzo-rodného antigénu nadviaže na HLA-molekuly a celý komplex sa presunie do membrány bunky, kde ho rozpoznajú T-lymfocyty.

Neklasické HLA-antigény triedy I (označujú sa ako HLA-Ib, kým klasické, t.j. HLA-A,-B,-C, sa označujú ako HLA-Ia) boli donedávna zastúpené funkčnými génmi HLA-E,-F,-G a nefunkčnými (pseudogénmi) HLA-H,-J,-K a -L. Na kongrese v San Francisku sa prezentovala existencia dvoch nových HLA-Ib-génov — MIC a MR1.



Obr. 2. Exónovo-intrónová štruktúra MICA-génu v porovnaní s exónovo-intrónovou štruktúrou klasických MHC-I-génov. L — exón pre signálny peptid,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  — exóny pre príslušné domény MICA a HLA-I-antigénov, TM — exón kódujúci transmebránovú časť príslušného refazca, CY — exóny kódujúce cytoplazmový úsek MICA, resp. MHC-I-antigénov, 3'UT — „stop“-kodón, kb — kilobáza.

MIC predstavuje rodinu 5 príbuzných génov, ktoré sa zatiaľ označujú ako MICA, MICB, MICC, MICD a MICE. Zatiaľ je dobre definovaný iba prvý z nich. Nachádza sa v oblasti medzi lokusmi BAT1 a HLA-B, blízko lokusu HLA-B (obr. 1). Štruktúra MICA-génu sa podobá štruktúre HLA-Ia-génov s tým rozdielom, že exóny pre signálny peptid a pre  $\alpha_1$ -doménu sú od seba oddelené dlhým intrónom a dva exóny, ktoré kódujú cytoplazmovú časť HLA-Ia-refazca a exón pre ukončenie transkripcie, sú pri MICA-géne spojené do jedného celku (obr. 2). Proteín, ktorý MICA-gén determinuje, má charakteristickú štruktúru HLA-Ia-molekúl (obr. 3). Porovnanie aminokyselinového zloženia refazcov HLA-Ia a MICA ukazuje, že tieto molekuly majú 15–21 % a 19–30 % homológnosť v  $\alpha_1$ -doménach, resp.  $\alpha_2$ -doménach a 33–36 % zhodu v  $\alpha_3$ -doménach. Tento stupeň vzájomnej príbuznosti je podstatne menší ako pri HLA-Ia-antigénoch, resp. MHC-Ia-refazcoch rôznych živočíšnych druhov. Naznačuje to, že ide o antigén determinovaný génom, ktorý je evolučne starší ako gény pre HLA-Ia-refazce. Predbežné výsledky ukazujú, že MICA-gén je polymorf- ný a exprimuje sa predovšetkým v epitelových bunkách a vo fib-

roblastoch. T-lymfocyty ani B-lymfocyty ho neexprimujú. O funkcii MICA-antigénov zatiaľ nič nevieme. Pretože má rovnakú štruktúru ako HLA-Ia-gény, predpokladá sa, že bude prezentovať imunogénne fragmenty, pravdepodobne však nie CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-lymfocytom, lebo oblasť, ktorá v HLA-Ia-antigénoch interaguje s CD8-molekulami, v MICA-refazcoch chýba.

Druhým novým neklasickým MHC-génom u človeka je MR1. Je zaujímavý tým, že je kódovaný génom, ktorý leží mimo HLA-genetickej oblasti — nachádza sa na dlhom ramene 1. chromozómu (1q25). Gén a aj proteín, ktorý determinuje, má charakteristickú štruktúru HLA-Ia-génov a antigénov. Aminokyselinová zhoda medzi MR1-antigénom a HLA-Ia refazcami je na rovnakej úrovni ako medzi antigénmi kódovanými génmi na jednotlivých klasických HLA-I lokusoch. MR1 možno teda považovať za typický HLA-antigén prvej triedy. Ne jeho ďalšiu charakteristiku, ako je polymorfnosť, schopnosť prezentácie antigénov, funkcii a biologický význam, budeme musieť ešte počkať.

K antigénom, ktoré sa podobajú triede I, ako aj triede II, patria diferenciačné antigény CD1. Je pravdepodobné, že sa v evolúcii vyvinuli z prvotnej molekuly schopnej prezentovať antigény, približne v tom istom čase, ako aj MHC, pričom však následný selekčný tlak pôsobil viac na MHC ako na CD1, a tak viedol k ich väčšej diverzifikácii. Nízka polymorfnosť CD1-antigénov naznačuje, že budú plniť skôr jednoduchšiu funkciu v imunitných reakciách, skôr na rozhraní špecifickej a nešpecifickej imunity, ako sa zúčastňovať na vysoko špecializovaných reakciách špecifickej imunity. Nasvedčuje tomu aj skutočnosť, že CD1-antigény sú konzervované molekuly, podobné nachádzame aj u iných cicavčích druhov.

CD1-antigény, podobne ako MHC-antigény, viažu  $\beta_2$ -mikroglobulín, ale na rozdiel od nich nie sú polymorfné. Existujú vo viacerých izotopových formách — u človeka rozoznávame 5 izotypov — CD1a, CD1b, CD1c, CD1d a CD1e. Sú kódované génmi nachádzajúcimi sa na 1. chromozóme (1q22-23) (toto umiestnenie zrejme nie je náhodné, lebo v tejto genetickej oblasti sa nachádzajú aj gény pre CD2, LFA-3, FcR $\gamma$ , FcR $\epsilon$  a poly-IgR, ktoré majú dôležitú úlohu v imunitných reakciách. Aj novoobjavený MHC-gén MR1 sa lokalizuje do tejto oblasti). Antigény CD1a, CD1b, CD1c a CD1e sa vyskytujú na profesionálnych bunkách prezentujúcich antigény (makrofágy, Langerhansove bunky, dendritové bunky), antigény CD1d majú naproti tomu preferenčné zastúpenie na bunkách črevného epitelu.

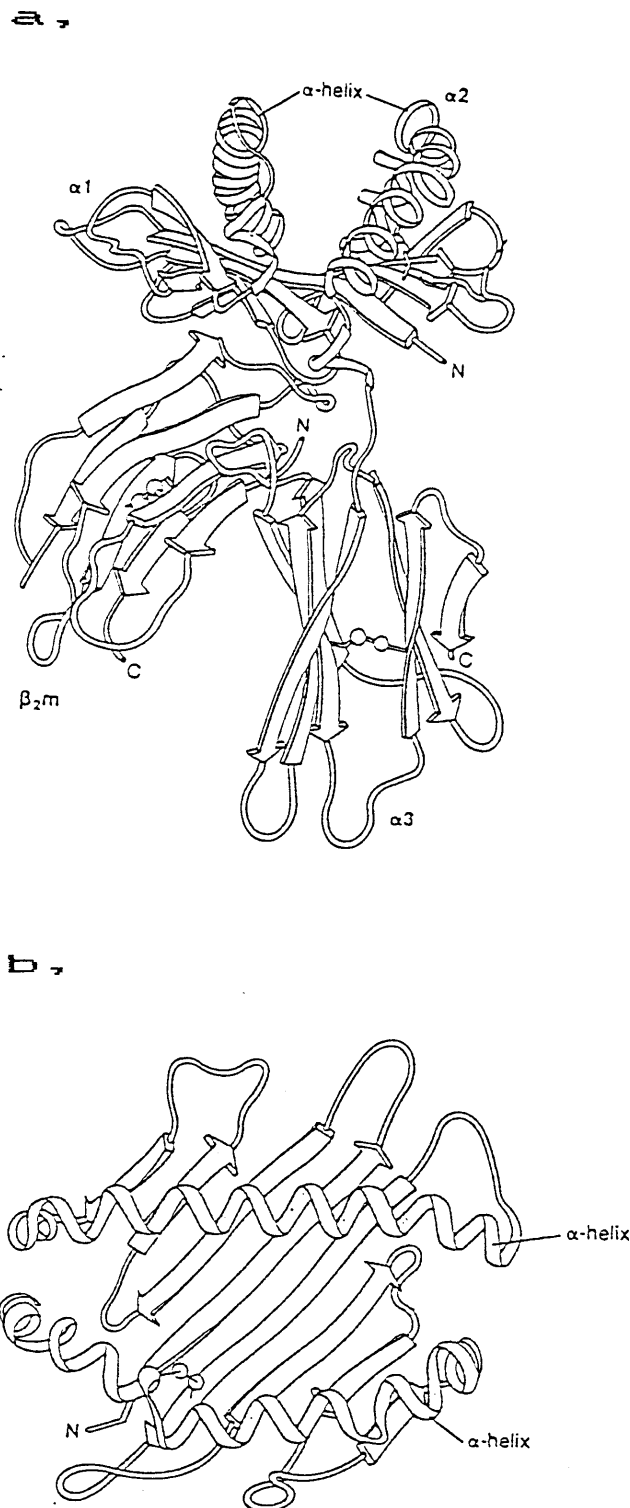
Funkcia CD1-molekúl dlho zostávala záhadná (objavené boli roku 1979), hoci ich príbuznosť s MHC-molekulami naznačovala, že bude podobná ako pri MHC-antigénoch. V skutočnosti ich schopnosť prezentovať antigény T-lymfocytom sa objavila až v tomto ro-

ku (1995). MHC-antigény sú známe tým, že prezentujú imunogénny fragment — peptid pochádzajúci z endogénneho alebo exogénneho antigénu proteínového charakteru. Na veľké prekvapenie sa ukázalo, že CD1-antigény prezentujú lipopolysacharidové antigény, konkrétne lipoarabitolmanan tvoriaci súčasť bunkovej steny mykobaktérií. Prezentácia tohto lipoglykánu si vyžadovala endozómovú cestu prezentačných procesov, na ktorej sa však nezúčastňujú ani antigény TAP ani HLA-DM. Tieto výsledky naznačujú, že okrem už známej (len 3 až 5 rokov známej!) cesty prezentácie proteínových antigénov, musí existovať ešte druhá cesta určená pre prezentáciu lipopolysacharidov. CD1b prezentovaný lipopolysacharid rozpoznávali lymfocyty CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, čo je opäť rozdiel oproti klasickej prezentačnej dráhe, kde v závislosti od charakteru antigénu sa aktivujú buď bunky CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, alebo CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>.

Keď sa už zdalo, že všetko je rozdelené, t.j. že MHC-molekuly sa špecializujú na prezentáciu proteínových a glykoproteínových antigénov a CD1-molekuly na prezentáciu lipopolysacharidových antigénov, prišla informácia, že aj CD1-molekuly, konkrétne CD1d, sú schopné prezentácie proteínových antigénov. Prezentácia peptidov CD1-molekulami spája v sebe charakteristické črty prezentácie peptidov MHC-molekulami triedy I aj II. Predovšetkým prezentovaný peptid je dlhší, a tak zodpovedá peptidom, ktoré sa viažu do žliabku MHC-II-molekúl. Na druhej strane CD1-žliabok využíva kotvové miesta, ktoré sú typické pre väzbu peptidov žliabkom MHC-I-molekúl, t.j. viaže aromatické aminokyselinové jednotky v pozíciách 1 a 7 a alifatické aminokyselinové jednotky v pozícii 4, pričom NH<sub>2</sub>-koniec prečnieva hranice žliabku.

Objavením antigénovo-prezentačnej schopnosti CD1-molekúl sa prirodzene vynára otázka, na čo v organizme slúži ďalší antigénovo prezentačný systém. Prezentácia lipopolysacharidových antigénov zrejme iba dopĺňa chýbajúce koliesko v reťazi molekul schopných prezentovať cudzorodý antigén. Význam prezentácie peptidov CD1-molekulami zatiaľ zostáva nejasný. Predbežné výsledky naznačujú, že aktivácia T-lymfocytov CD1-molekulami by mohla predchádzať aktivácii tých T-buniek, ktoré sa zúčastnia na MHC-regulovaných reakciách špecifickej imunity. Predstava je taká, že CD1-molekuly by prezentovali určité obmedzené množstvo konzervovaných peptidov (lebo sú nepolymorfne, a tým aj schopnosť väzby rôznych antigénov je limitovaná). T-lymfocyty rozpoznávajúce takto prezentovaný peptid by uvoľňovali príslušné lymfokíny a podľa ich charakteru a vzájomného pomeru by pripravovali pôdu na rozvinutie buď celulórneho, alebo protilátkového typu imunitnej odpovede. Na odpoveď, či je uvedená predstava správna, zrejme nebudeme musieť v súčasnosti dlho čakať a možno, že na ďalšom kongrese v New Dehli v Indii roku 1998 sa dozvieme odpoveď.

Z uvedeného vidíme, že počet génov patriacich HLA-systému sa rozrastá, a to dokonca aj o gény, ktoré sa nachádzajú mimo oblasti, na ktorú sme už zvyknutí, t.j. na krátke rameno 6. chromozómu. Prečo existuje taký veľký počet rôznych HLA (alebo vo všeobecnosti MHC) génov, možno zodpovedať iba keď sa na MHC pozrieme z evolučného hľadiska. Dnes je už jasné, že MHC sa vyvíja pod evolučným tlakom mikroorganizmov, a to expanziou (duplikáciou) a kontrakciou (deléciou) svojich génov. K expanzii MHC dochádzalo vždy vtedy, keď sa rozširovalo pôsobenie príslušného živočíšneho druhu, aby sa lepšie prispôsobil na nové životné prostredie, v ktorom sa ocitol. Expanzia génov však nemôže byť bezhraničná, je obmedzená najmä tým, že každý nový MHC-



Obr. 3. Terciálna štruktúra HLA-antigénov triedy I (modifikované podľa Stitesa D.P. a spol.: Basic and clinical immunology. 8. vydanie. East Norwalk, CT, Appleton and Lange 1994). a) pohľad bočný, b) pohľad zhora. Priestorové usporiadanie jednotlivých domén HLA-antigénov triedy I je odlišné. Domény  $\alpha 1$  a  $\alpha 2$  majú helixovú štruktúru ( $\alpha$ -štruktúra),  $\alpha 3$ -domény a  $\beta 2$ -mikroglobulín naproti tomu štruktúru sklada-ného listu ( $\beta$ -štruktúra). Takéto priestorové usporiadanie vytvára akýsi žliabok, ktorý má schopnosť viazať cudzorodý peptid.

Tab. 1. Cytokínový profil pomocných T-lymfocytov.

Vlastnosť	T <sub>H</sub> 1	T <sub>H</sub> 2
IFN- <i>gama</i>	++	-
IL-2	++	-
IL-12	++	-
Lymfotoxín (TNF- $\beta$ )	++	-
GM-CSF	++	+
TNF- $\alpha$	++	+
IL-3	++	++
IL-4	-	++
IL-5	-	++
IL-6	-	++
IL-10	-	++

GM-CSF — faktor stimulujúci kolónie, špecificky pôsobiaci na granulocyty a monocyty, IFN — interferón, IL — interleukín, T<sub>H</sub> — pomocný T-lymfocyt, TNF — faktor nekrotizujúci nádory.

gén spôsobí deléciu *self*-reaktívnych T-lymfocytov. Príliš vysoký počet MHC-génov by preto spôsobil zánik početných klonov T-lymfocytov a takýto organizmus by namiesto lepšej obrany (kvôli zlepšenej prezentácii antigénov viacerými MHC-molekulami) bol skôr bezbranný, lebo by ho vlastne nemal kto brániť (väčšina T-lymfocytov by pri indukcii tolerancie na vlastné antigény zahynula). Príroda to preto vyriešila tak, že ponechala funkčnými iba malé množstvo génov (2–3) a diverzifikovala ich mechanizmom polymorfizmu. Ostatné MHC-gény sa pretransformovali na pseudogény, alebo sa im ponechala limitovaná, presne špecifikovaná funkcia. Takto má živočíšny druh ako taký schopnosť obrany na ktorýkoľvek pre neho potencionálne patogénny mikroorganizmus, kým príslušník tohto druhu sám takúto „vymoženosť“ nemá. Mikroorganizmus, ktorý u dotyčného jedinca nenájde „svoje“ MHC-molekuly, môže potom relatívne nerušene rozvíjať svoje patologické pôsobenie. Takto aj u človeka máme klasické, funkčné MHC-gény, ktoré zodpovedajú za špecifickú obranyschopnosť druhu *homo sapiens sapiens*, a množstvo neklasických génov, ktoré hádam v evolúcii už zohrali svoju úlohu a možno, že „čakajú na svoju novú príležitosť“. Napr. ekvivalent HLA-G-génu u opíc Nového sveta je ich najdôležitejším MHC-génom, kým u človeka je jeho funkcia obmedzená len na ochranu plodu pred imunitným systémom matky. Môžeme preto aj v budúcnosti očakávať, že sa ešte objavia ďalšie gény, ktoré budú spadať do uvedenej predstavy vývoja MHC. Oprávňuje nás k tomu aj skutočnosť, že gény pre početné atavizmy pretrvávajú v našom genóme potencionálne funkčné mnoho miliónov rokov po tom, ako sa stali nadbytočnými.

Výkonnými bunkami špecifickej (získanej) imunity sú lymfocyty T a B. T-lymfocyty nie sú homogénnou populáciou buniek, ale delia sa na subpopulácie. Pôvodne sa rozlišovali tri základné supopulácie T-lymfocytov: pomocné, cytotoxické a supresorové. Postupnou charakterizáciou jednotlivých typov buniek sa narazilo na problém jednoznačnej identifikácie supresorových T-lymfocytov. Pomocné a cytotoxické T-lymfocyty možno od seba rozlíšiť na základe membránových (tzv. diferenciálnych) antigénov (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> versus CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) a rozdielných funkčných vlastností (pomoc B-lymfocytom, zabezpečovanie mechanizmov oneskorenej precitlivosti na lýzu vírusom infikovaných a ná-

dorových buniek). Fenomén útlmu imunitných reakcií sa takisto jednoznačne dokázal a odvtedy, ako Gershon ako prvý postuloval existenciu samostatnej skupiny buniek zodpovedných za tento jav, sa až donedávno predpokladalo, že je to naozaj tak. V poslednom čase sa však začali objavovať pochybnosti o existencii samostatnej populácie supresorových T-lymfocytov. Predovšetkým sa ukázalo, že imunosupresiu nemožno jednoznačne pripočítavať iba bunkám CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, imunitnú odpoveď potláčali aj bunky CD8<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> a dokonca aj bunky CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Ďalej sa nepodarilo určiť žiadny diferenciálny antigén, ktorý by bol charakteristický iba pre túto populáciu T-lymfocytov. Pôvodne uvádzaný histokompatibilný antigén H-2I-J (pri myšiach) sa našiel na pomocných aj supresorových bunkách a nepredstavuje reštrikčnú molekulu ako typické H-2-molekuly (t.j. H-2-K,-D,-L, resp. H-2A,-E). Navyše sa doteraz nedodarilo získať klony supresorových T-lymfocytov a ani sa nepodarilo identifikovať gény pre supresorové faktory, prostredníctvom ktorých supresorové T-lymfocyty potláčajú imunitnú odpoveď.

Situácia sa začala vyjasňovať po tom, čo práce Mossmana a spol. z roku 1989 dokázali, že populácia pomocných T-lymfocytov nie je jednotná a možno ju na podklade rôznej produkcie cytokínov rozdeliť na dve, resp. tri subpopulácie — T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, príp. T<sub>H</sub>0. T<sub>H</sub>1-bunky produkujú najmä IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\beta$  a zodpovedajú predovšetkým za celulárnu imunitu, T<sub>H</sub>2-lymfocyty syntetizujú zase IL-4, IL-5, IL-10 a zodpovedajú za pomoc B-lymfocytom pri zabezpečovaní protilátkami sprostredkovaných obranných reakcií (tab. 1). T<sub>H</sub>0-lymfocyty sa nedajú zaradiť ani k jednému typu buniek, produkujú lymfokíny oboch skupín. Nedávno sa dokázalo, že uvedený cytokínový profil neplatí len pre T<sub>H</sub>-lymfocyty, ale aj pre cytotoxické T-lymfocyty (CTL). Ďalej sa zistilo, že rozdielny charakter produkcie cytokínov platí aj pre lymfocyty s antigénovým receptorom TCR $\alpha\beta$  aj TCR $\gamma\delta$ . Podstatné však je, že pôsobenie týchto cytokínov, najmä ich protagonistov IFN- $\gamma$  a IL-4, je antagonistické. IFN- $\gamma$  potláča aktivitu T<sub>H</sub>2-lymfocytov a naopak, IL-4 potláča aktivitu T<sub>H</sub>1-buniek. Konečný výsledok imunitnej reakcie závisí potom od výsledného vzájomného pomeru uvedených cytokínov. Dôkaz rozdielného cytokínového profilu ako všeobecne platného javu pre reguláciu imunitných reakcií vylúčil takto existenciu T-supresorových lymfocytov ako samostatnej subpopulácie buniek. To, čo sa predtým pripisovalo úlohe supresorových T-lymfocytov, sa ukázalo, že je odrazom aktivácie, či inhibície príslušnej subpopulácie pomocných a cytotoxických buniek prostredníctvom cytokínov v závislosti od charakteru antigénu, ktorý indukoval procesy imunitnej odpovede.

Príčinu antagonistického pôsobenia IFN- $\gamma$  a IL-4 na T-lymfocyty sa podarilo takisto už objasniť, a to vďaka poznatkom, ktoré sa v posledných troch rokoch získali pri štúdiu prenosu signálu.

Organizmus, či už jednobunkový alebo mnohobunkový, na zabezpečenie svojho prežitia musí získavať rôzne signály z prostredia, v ktorom sa nachádza, spracovať ich a reagovať na ne. Bunky prijímajú signál prostredníctvom receptorov. Receptor je molekula, vo väčšine prípadov glykoproteínového charakteru, ktorá špecificky rozpozná signál a pretransformuje ho do reakcií, ktoré sú charakteristické pre tú-ktorú bunku. Membránové receptory zabezpečujú teda bunke dve základné funkcie — rozpoznanie extracelulárneho signálu a jeho prevod do vnútra bunky.

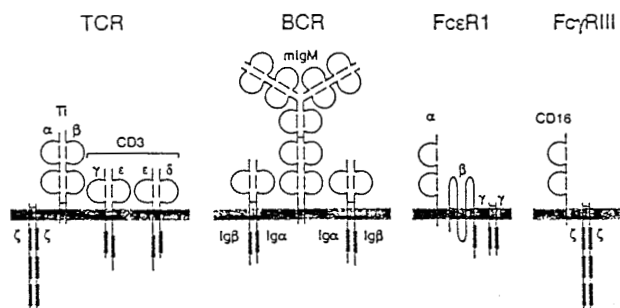
T-lymfocyty rozoznávajú antigén v podobe imunogénneho fragmentu nadviazaného na vlastné MHC-antigény. Antigénový

receptor T-lymfocytov (TCR) síce antigén rozpozná, ale sám nie je schopný preniesť získaný signál do vnútra bunky — cytoplazmový úsek jeho reťazcov je príliš krátky na splnenie tejto funkcie — skladá sa len z 5 aminokyselinových jednotiek. Prenos signálu zabezpečuje druhá štruktúra, ktorá je s TCR nekovalentne viazaná, a to diferenciačný antigén CD3. Antigén CD3 sa skladá z viacerých reťazcov — CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  a z CD3 $\xi$ -diméra (tento môže byť vo forme homodiméru alebo heterodiméru s reťazcom CD3 $\eta$  alebo Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ ). Cytoplazmový úsek týchto molekúl je v porovnaní s cytoplazmovým úsekom TCR-reťazcov omnoho väčší — od 20 do 113 aminokyselinových jednotiek (obr. 4).

Interakcia TCR s prezentovaným peptidom spôsobí fosforyláciu CD3 $\xi$  tyrozínkinázou lck<sup>56</sup>. Tyrozínkináza lck<sup>56</sup> je viazaná na diferenciačný antigén CD4 (alebo CD8 pri cytotoxických T-lymfocytoch — CTL) a aktivuje sa pri interakcii CD4 (CD8) s HLA-molekulami triedy II (alebo triedy I pri CTL). Molekuly CD4 (CD8) majú pri rozpoznávaní antigénu funkciu koreceptorov (tzv. fenomén imunologickej reštrikcie).

Aktivovaný CD3z sa následne viaže a aktivuje proteínkinázu ZAP-70 (gén pre ZAP-70 sa nachádza na 16. chromozóme (p13); pri jeho chýbaní sa u novonarodených detí vyvíja ťažká kombinovaná imunodeficientna choroba — SCID, ktorá je nezlučiteľná so životom). ZAP-70 sa v neaktivovanom stave nachádza v cytoplazme, po fosforylácii CD3 $\xi$  sa na tento reťazec nadväzuje a aktivuje, pravdepodobne tak isto lck<sup>56</sup>-kinázou. V ďalšom aktivačnom slede udalostí sa aktivuje fosfolipáza PLc1 (asi prostredníctvom ZAP-70) a tá zase aktivuje proteínkinázu C (PKC). PKC aktivuje fosfoinozitolkinázu (obr. 5). Jej pôsobením na fosfatidyl-inozitoldifosfát vzniká inozitoltrifosfát (IP3) uvoľňujúci z endoplazmového retikula Ca<sup>2+</sup>, ktoré je jeho hlavnou zásobárňou. Druhý dôležitý metabolit fosfatidylinozitolovej hydrolýzy je diacylglycerol (DG). Jeho hlavnou funkciou je ďalšia aktivácia proteínkinázy C.

Zvýšenie hladiny intracytoplazmového Ca<sup>2+</sup> je nevyhnutné pre influx tohto iónu z extracelulárneho prostredia. Kanál, ktorým Ca<sup>2+</sup> prechádza cez membránu, vytvárajú molekuly diferenciačného antigénu CD3. V cytoplazme bunky sa Ca<sup>2+</sup> viaže na špecifický proteín — kalmódulín, ktorý má pre tento ión až 4 väzbové miesta. Fyziologická koncentrácia Ca<sup>2+</sup> v cytoplazme bunky je 10<sup>-8</sup>—10<sup>-7</sup> mol.l<sup>-1</sup>, po stimulácii sa zvyšuje na 10<sup>-6</sup> mol.l<sup>-1</sup> a viac. Zvýšená koncentrácia intracelulárneho Ca<sup>2+</sup> je potrebná na aktiváciu ďalších enzýmov a proteínov — takých, ako sú napr. *kacineurin* (serínová fosfatáza), *Soc*, *Vav*, *GAP* a iných. Významnou je predovšetkým fosforylácia transkripčných faktorov a proteínov jadra, ktoré sa vo fosforylovanej forme ľahšie uvoľňujú z DNA. Takto uvoľnený priestor využijú transkripčné faktory, ktoré po väzbe na promótorovú oblasť príslušného génu začnú jeho transkripciu. Pre aktiváciu T-lymfocytov je najdôležitejšia transkripcia génu pre IL-2. Na začatie transkripcie IL-2-génu sa musia na IL-2-promótor nadviazať viaceré transkripčné faktory, vrátane NF-kB, NF-AT a NF-IL-2. Kým AP-1 a NF-kB sú aktivované extracelulárnymi signálmi pri väčšine buniek, tak tvorba transkripčných faktorov NF-AT a NF-IL-2, je špecifická len pre T-lymfocyty. Najdôležitejší z uvedených faktorov je AP-1, lebo jednak sám sa viaže na IL-2 promótor a jednak je súčasťou faktorov NF-AT a NF-IL-2. AP-1 sa skladá z dvoch podjednotiek, prvá je produktom protoonkogénu *c-fos* a druhá produktom *c-jun*. AP-1 môže plniť svoju funkciu iba po svojej fosforylácii. Fosforyláciu AP-1 zabezpečujú proteínkinázy



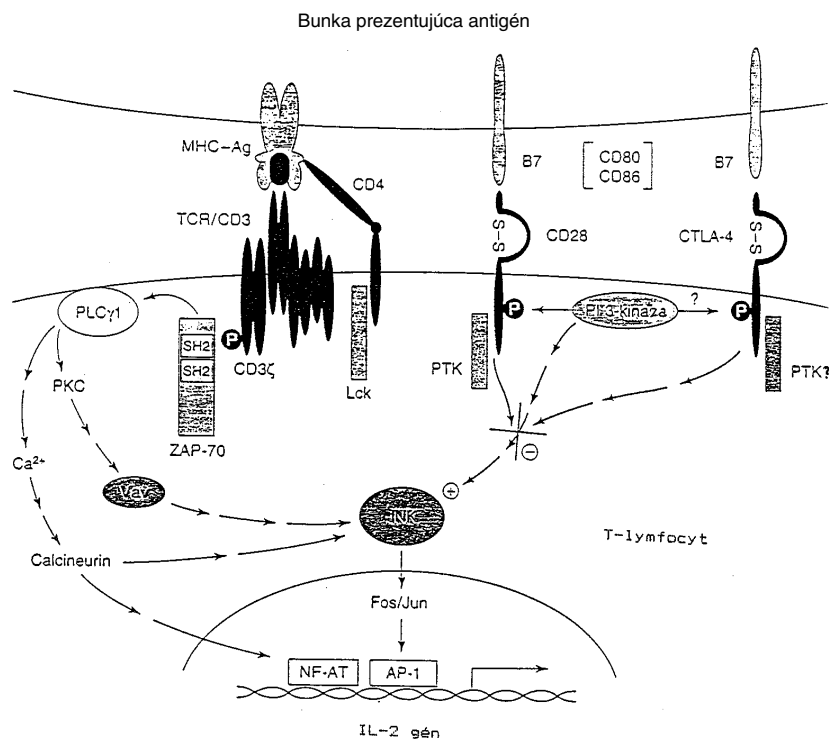
Obr. 4. Schéma štruktúry antigénového receptora T-lymfocytov (TCR), antigénového receptora B-lymfocytov (BCR), Fc-receptora pre IgE (Fc $\epsilon$ R1) a Fc-receptora pre IgG (Fc $\gamma$ RIII) s vyznačením motívu, ktorý fosforylujú tyrozínkinázy (podľa Weissa A., Littmana D.R.: Cell, 76, 1994, s. 26—274).

JNK, na ktorých aktiváciu je však potrebná nielen vyššie opísaná signalizačná dráha idúca cez T-bunkový receptor, ale navyše, a to je novinka tohto roku (1995), na ich aktiváciu je potrebná aj súčasná signalizácia cez kostimulačný receptor.

Už dávnejšie je známe, že rozpoznanie antigénu T-lymfocytom pomocou TCR nie je ešte postačujúci signál na jeho aktiváciu, na to potrebuje ešte druhý, kostimulačný stimul, ktorý zabezpečuje interakcia medzi kostimulačnými molekulami oboch kooperujúcich buniek, t.j. bunky prezentujúcej antigén (APC) a T-lymfocytu. Konkrétne ide o interakciu medzi antigénom CD80 (B7-1) na strane APC a antigénom CD28 na strane T-lymfocytu a interakciu medzi CD86 (B7-2) a CTLA4 (obr. 5). Uvedené interakcie spôsobujú aktiváciu fosfoinozitolkinázy a aktiváciu bližšie nešpecifikovanej proteínovej tyrozínkinázy (PTK), pravdepodobne Itk. Uvedený signalizačný proces napokon vedie k potranslačnej fosforylácii AP-1.

Podobným mechanizmom určite dochádza k derepresii génov aj pre iné lymfokíny. Od vzájomného pomeru syntetizovaných cytokínov tak T-bunkami, ako aj inými bunkami imunitného systému, ktoré sa v danom mikroprostredí nachádzajú, bude závisieť, ktorý typ buniek, T<sub>H</sub>1 alebo T<sub>H</sub>2, nadobudne prevahu a aký typ imunitnej odpovede sa rozvinie. Prevaha IFN- $\gamma$  podporí T<sub>H</sub>1-typ, kým jeho relatívny nedostatok zase T<sub>H</sub>2-typ. Inhibícia T<sub>H</sub>2-klonov buniek IFN- $\gamma$  bola síce známou skutočnosťou, ale mechanizmus, akým IFN- $\gamma$  potláča ich aktivitu, sa podarilo objasniť len celkom nedávno.

Väzba IFN- $\gamma$  na svoj receptor v membráne T-lymfocytov aktivuje tyrozínkinázy Jak-1 a Jak-2, ktoré následne fosforylujú cytoplazmový faktor Sta-1 (p91) (je to proteín patriaci k rodine prenášačov a aktivátorov transkripcie, tzv. STAT, t.j. signal transducers and activators of transcription). Fosforylovaný Stat-proteín homodimerizuje a vytvára komplex označovaný STF-INF $\gamma$ , ktorý sa presúva do jadra a viaže sa na promótorovú oblasť pre IFN- $\gamma$ . Pri štúdiu aktivačných procesov po pridaní IFN- $\gamma$  ku kultúre klonov lymfocytov T<sub>H</sub>1 alebo T<sub>H</sub>2 sa zistilo, že IFN- $\gamma$  indukoval STF-INF $\gamma$  iba pri T<sub>H</sub>2-klonoch, pri T<sub>H</sub>1 nie. Ďalším skúmaním sa zistilo, že príčina rozdielnej tvorby transkripčného faktora STF-INF $\gamma$  je v odlišnej štruktúre receptora pre IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ R) na oboch typoch buniek. IFN- $\gamma$ R sa skladá z dvoch reťazcov - IFN- $\gamma$ R $\alpha$  a IFN- $\gamma$ R $\beta$  (AF-1). IFN- $\gamma$ R $\alpha$  má síce vysokú afinitu pre IFN- $\gamma$ , ale pre



Obr. 5. Schéma prenosu signálu od receptora do jadra bunky pri T-lymfocytoch (podľa Robeyho E., Allisona J.P.: *Immunology Today*, 16, 1995, s. 306–310) (vysvetlenie v texte).

prenos signálu a vznik STF-IFN $\gamma$  je nevyhnutná prítomnosť aj druhého retazca. A práve tu je rozdiel medzi lymfocytmi T<sub>H</sub>1 a T<sub>H</sub>2 — T<sub>H</sub>1 nemajú AF-1, kým T<sub>H</sub>2 áno. IFN- $\gamma$  nemôže uplatniť svoj antiproliferačný účinok na T<sub>H</sub>1-bunky, lebo im chýba signalizačný systém. Naopak antiproliferačný, a teda inhibičný účinok sa úplne prejaví pri T<sub>H</sub>2-bunkách, lebo celý signalizačný systém počnúc od dvojretazcového receptora pre IFN- $\gamma$  až po promótorovú oblasť IFN- $\gamma$  je v činnosti. Funkčne sa tieto rozdiely na molekulovej úrovni prejavujú prevahou bunkovej imunity a potlačením protilátkovej imunity.

Súčasný výskum sa vyznačuje tým, že sa získané výsledky okamžite zavádzajú do medicínskej praxe. Príkladom je zavedenie imunosupresív cyklosporínu A (CsA) a súčasne, postupné zavádzanie FK506 do zvládnutia potransplantačných odvrhovacích reakcií a pri liečbe niektorých autoimunitných chorôb. CsA a FK506 inhibujú syntézu IL-2 práve blokovaním aktivačnej cesty prenosu signálu na úrovni calcineurínu. Podobne si svoje miesto v potlačaní imunitných reakcií dobývajú monoklonové protilátky proti diferenciačným antigénom, ako sú anti-CD3, anti-CD4, anti-LFA-1 a iné.

Určite neuplynú veľa času od využitia, možno povedať jedného z najvýznamnejších objavov roku 1995, o štruktúre receptora pre IFN- $\gamma$  a jeho významu pre selektívnu aktiváciu subpopulácií T-lymfocytov. S veľkou pravdepodobnosťou monoklonové protilátky proti AF-1 nájdu svoje uplatnenie pri liečbe niektorých autoimunitných chorôb, kde prevláda zvýšená aktivita T<sub>H</sub>2-buniek a selektívne potlačenie ich aktivity by mohlo priniesť zlepšenie kli-

nického stavu pacienta. Prvé experimenty na myšiach naznačujú schodnosť uvedenej cesty.

Z hľadiska noviniek, ktoré ešte priniesol kongres v San Francisku v oblasti bunkovej imunity, sa treba ešte zmieniť o ďalších dvoch novinkách, ktoré tiež menia naše doterajšie nazeranie na určité schémy, akými sa rozvíja imunitná odpoveď, na ktoré sme si už zvykli a považovali sme ich za dogmatické. Práve tu vidíme ohromnú rozmanitosť prístupu prírody na zabezpečenie určitého biologicky významného javu. Najprv by som sa zmienil o molekulách prezentujúcich antigén. Dnes je už jednoznačne dokázané, že ide o produkty génov hlavného histokompatibilného komplexu, buď triedy I, alebo II. V úvode tohto článku uvádzam, že túto funkciu môžu vykonávať aj neklasické MHC-molekuly. Podľa najnovších experimentálnych výsledkov však treba k molekulám prezentujúcich antigén pripočítať ešte aj proteíny teplotného šoku patriace do rodiny HSP70. Tento objav nie je až natoľko prekvapivý, akoby sa na prvý pohľad zdalo. Najprv gény pre HSP70 sa nachádzajú v HLA-genetickej oblasti, medzi lokusmi HLA-DRA a HLA-B (obr. 1) a už sama lokalizácia v tejto oblasti naznačuje, že HSP70-molekuly sa budú nejakým spôsobom zúčastňovať na regulácii imunitnej odpovede. Doteraz sa im však pripisovala iba úloha „šaperonov“ pri prenose niektorých peptidov pri ich prezentácii HLA-antigénmi triedy I. Po druhé, je známe, že MHC-antigény vznikli v evolúcii fúziou dvoch funkčne odlišných proteínov — „šaperonov“ a imunoglobulínov. MHC-antigény prevzali z imunoglobulínov ich doménové usporiadanie, kým zo „šaperonov“ prevzali oblasť zliabku schopného do seba zabudovať peptid (z tohto

evolučného prístupu vychádzal aj návrh prof. W. Bodmera premenovať MHC-antigény na histoglobíny, ale sa neujal). Po tretie sa dokázalo, že „šaperony“ sa nachádzajú nielen v cytoplazme, ale aj v membráne APC. Vychádzajúc z uvedeného nie je preto prekvapujúce, že aj „šaperony“ môžu v niektorých prípadoch prezentovať antigény, pravdepodobne také, ktoré sú evolučne konzervované a človek s nimi prichádzal počas svojej existencie neustále do kontaktu, ako sú napr. antigény mykobaktérii. Bolo už predtým známe, že antigény pochádzajúce z mykobaktérii rozpoznávajú T-lymfocyty majúce antigénový receptor TCR $\gamma\delta$ , takže teraz, keď sa dokázalo, že „šaperony“ prezentujú antigény TCR $\gamma\delta$ -lymfocytom, a nie TCR $\alpha\beta$ -lymfocytom, sa ukazuje, že „jedno koliesko zapadlo do druhého“.

Druhá novinka v oblasti bunkovej imunity sa týka T-lymfocytov s antigénovým receptorom TCR $\gamma\delta$ . U človeka predstavujú 5–10 % celej populácie T-lymfocytov a ich prítomnosť u rôznych druhov stavovcov poukazuje na významnosť tohto typu buniek pre imunitné reakcie. Inými slovami, TCR $\gamma\delta$ -lymfocyty nebudú iba komplementárnou súčasťou imunitných reakcií zabezpečovaných TCR $\alpha\beta$ -lymfocytmi, ale budú plniť pre ne charakteristické úlohy. Rozpoznávanie antigénu TCR $\gamma\delta$ -lymfocytmi sa v niektorých aspektoch odlišuje od spôsobu rozpoznávania antigénu TCR $\alpha\beta$ -bunkami. Predovšetkým pre TCR $\gamma\delta$ -lymfocyty neplatí fenomén imunologickej reštrikcie a cudzorodé antigény rozpoznávajú častejšie na neklasických MHC-molekulách ako na klasických. Z prezentovaných antigénov, ktoré rozpoznávajú TCR $\gamma\delta$ -bunky, sa najčastejšie uvádzajú antigény mykobaktérii, antigény teplotného šoku N-formylované proteíny (N-formylmetionínová sekvencia sa nachádza najmä v signálnych peptidoch proteínov baktérii. V bunkách tkanív cicavcov sa nachádza len málo N-formylovaných proteínov, zväčša sú mitochondriového pôvodu), teda antigény, ktoré sú fylogeneticky konzervované a nachádzajú sa viac v mikróbnom svete ako u človeka. Ako novinka sa na kongrese prezentovalo, že TCR $\gamma\delta$ -lymfocyty rozpoznávajú antigény, ktoré si nevyžadujú opracovanie cez známe prezentačné dráhy, rozpoznávajú natívny antigén. Ďalej sa zistilo, že CDR3-oblasť TCR $\gamma$ -reťazca (CDR3 je tretí hypervariabilný úsek variabilnej domény imunoglobulínov a TCR. Je rozhodujúci pre interakciu s antigénom.) je dlhá a variabilná a podobá sa CDR3-oblasti ťažkých reťazcov imunoglobulínov. CDR3-oblasť TCR $\delta$ -reťazca je naproti tomu omno-

ho kratšia a menej variabilná a podobá sa CDR3-oblasti ľahkých reťazcov imunoglobulínov. Naproti tomu CDR3-oblasti reťazcov TCR $\alpha$  a TCR $\beta$  sú dlhé takmer identicky a obe sú variabilné. Tieto výsledky naznačujú, že TCR $\gamma\delta$ -lymfocyty predstavujú skupinu buniek, ktoré rozpoznávajú antigén podobne ako protilátky, t.j. bez nevyhnutnosti opracovania v APC a prezentácie klasickými alebo neklasickými MHC-antigénmi.

TCR $\gamma\delta$ -lymfocyty majú typické vlastnosti T-lymfocytov, sú schopné sekrécie lymfokínov a cytotoxickej aktivity. Ich schopnosť rozpoznávať natívne antigény zabezpečí, že mikroorganizmy, nádorové bunky, poškodené alebo cudzorodé tkanivá budú indukovať imunitnú odpoveď skorej ako pri imunitnej odpovedi TCR $\alpha\beta$ -typu, čím sa zvyšuje flexibilita imunitného systému.

V poslednom čase som sa zúčastnil na všetkých troch najvýznamnejších podujatiach v oblasti imunológie — medzinárodného kongresu v Budapešti roku 1992, európskeho kongresu roku 1994 v Barcelone a medzinárodného kongresu v San Francisku. Môžem konštatovať, že imunológia skutočne ide míľovými krokmi vpred, pričom tento trend sa zväčšuje najmä v posledných 10 rokoch. Nové poznatky pribúdajú, staré sa prehodnocujú a je skutočne veľmi ťažké udržať sa aspoň v oblasti teoretických poznatkov na úrovni doby vo všetkých oblastiach imunológie. Život vyžaduje špecializáciu. Horšie to má pedagóg, ktorý musí sledovať každú oblasť aspoň na úrovni sumárneho zhrnutia principiálnych výsledkov danej oblasti, aby ich vedel pretransformovať do vyučovacieho procesu a odovzdať ich nastupujúcej generácii lekárov a iných špecialistov. Imunológia totiž už dávno nie je iba akademickou záležitosťou, ale vybojovala si svoje miesto v praxi. Lekár bez imunologického vzdelania si pri riešení diagnostických a terapeutických možností nepomôže napr. pri alergiách, autoimunitných chorobách, bez imunologických poznatkov by sa nemohli uskutočňovať transplantácie, zvládnúť AIDS a podobne. Čo z uvedeného možno aplikovať aj u nás? Je jasné, že na vrcholový výskum v oblasti základnej imunológie nemáme dostatok prostriedkov. Neznamená to však, že sa treba vzdať, naopak treba vybrať tie kolektívy, ktoré sa k požadovanej úrovni aspoň približujú, a podporovať ich. V opačnom prípade hrozí, že sa z nás stanú iba štatisti a interpreti interpretácie výsledkov, ktoré dosiahli iní, príp. iba „innocent bystanders“, t.j. nevinne sa prizerajúci, ktorí nevedia, čo sa okolo nich deje.