

575:616-056

GENETICKÁ KONTROLA REZISTENCE/SUSCEPTIBILITY K ONEMOCNĚNÍ (Souhrnný referát)

Lenka HERNYCHOVÁ, Aleš MACELA, Hana KOVÁŘOVÁ

Ústav radiobiologie a imunologie Vojenské lékařské akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové

Souhrn

Tato práce shrnuje výsledky šestiletého studia genetické rezistence organismu proti infekcím získané na experimentálních modelech autorským kolektivem a uvádí je do širšího kontextu genetické kontroly vzniku a průběhu onemocnění obecně. Citlivost individua k onemocnění je kontrolována expresí genomu daného jedince. Genetická kontrola postihuje jak primární interakce zevních signálů s imunoregulačním systémem, tak procesy adaptivní imunologické odezvy. Změny v imunologické odpovědi na zevní signály mohou vést až k reakci vlastních obranných mechanismů na antigeny vlastních tkání, a vyvolat tak autoimunitní onemocnění. S postupným mapováním lidského genomu se stále více přibližujeme možnosti poznat jemné vazby regulace homeostatických mechanismů, které udržují nezbytnou integritu organismu. K dosažení tohoto cíle je však nezbytné hlubší porozumění vzniku chorobných procesů, zejména pak na molekulární úrovni, tedy v oblasti někdy nazývané molekulární patologií, v oblasti, kam směřuje své experimentování autorský kolektiv.

Klíčová slova: Autoimunitní onemocnění; Geny; Apoptóza; *Nramp1* gen; *Lps* gen.

Genetic Control of Resistance/susceptibility to Diseases (Report)

Summary

The authors summarize the results of six year's study on genetic resistance of organism to the infection that were obtained using a various experimental models. The findings are shown in broad context of genetic regulation of diseases including their rise and development. Individual susceptibility to the disease is controlled by expressed genes. The genetic control influences both the primary interactions of external signals with the cells or molecules of immune system and the mechanisms of adaptive immune response. The changes in immune responsiveness can lead to the reaction of host defence mechanisms with the self-antigens and cause the autoimmune disease. Present mapping of human genome allows better knowledge of the building elements of the homeostatic mechanisms that are necessary for keeping of integrity of the organism. To achieve this aim, we need deeper understanding of the mechanisms of the disease at the molecular level. This molecular pathology belongs to the permanent interests of the authors.

Key words: Autoimmune disease; Genes; Apoptosis; *Nramp1* gene; *Lps* gene.

Úvod

Odolnost nebo citlivost organismu k určitému typu onemocnění je považována za fenotypový znak (rezistence/susceptibilita). Tento znak, podobně jako ostatní fenotypové znaky, je u každého jedince kontrolován jeho genetickou výbavou. V převážné většině případů dochází po interakci s primárním, většinou zevním signálem, ke změně genové exprese, což má za následek funkční a často

také morfologické změny v tkáních a orgánech signálem atakovaných jedinců. Nejlépe lze tento fakt dokumentovat na infekčních onemocněních. Nezvládnutá interakce makroorganismu s mikroorganismy, přes dlouhou koexistenci či vlastně koevoluci těchto organismů, má za následek často vážné poškození integrity makroorganismu projevující se onemocněním. V případě infekčního onemocnění je pak rezistence či susceptibilita k němu výsledkem vzájemného protipůsobení genetické výbavy

hostitele a exprese faktorů virulence patogenu, která je rovněž geneticky kontrolována. Právě dlouhá koevoluce však umožnila oběma typům organismů vytvořit mezi sebou vzájemné vztahy, které jsou dány jejich schopností do jisté míry „tolerovat“ působení druhého typu organismu. Ze strany makroorganismu je rozhodnutí o míře „tolerance“ svěřeno jeho imunoregulačnímu systému.

Imunita každého jedince je dána přirozenou (nespecifickou) imunitou, která je následována získanou (specifickou) imunitou. Specifickou imunitu lze rozdělit na buněčnou a humorální. Tato práce je zaměřena na pochopení podstaty mechanismů přirozené imunity ve vztahu k rezistenci/susceptibilitě k infekci. Přirozená, nespecifická nebo také geneticky podmíněná imunitní odpověď se objevuje v časných fázích po vniknutí mikroorganismu do makroorganismu jako následek jeho primárních interakcí s buňkami imunoregulačního systému. V těchto časných fázích odpovědi organismu na infekci jsou aktivovány ty mechanismy imunologické obrany, které nejsou antigenně specifické a mohou se uplatňovat obecně v obraně proti infekčním zárodkům, cizorodým látkám nebo transformovaným buňkám. Na rozdíl od získané imunity působí mechanismy přirozené imunity spontánně, bez ohledu na to, zda se organismus s určitým antigenem dříve setrhl, či nikoli.

Imunitní systém je zodpovědný za rozpoznávání „vlastního od cizího“ na základě diskriminace těch proteinů a polysacharidových konformačních struktur, které nejsou zakódované v genomu vlastního, tedy rozpoznávajícího jedince. Rozpoznání cizího vede k protektivní imunitní odpovědi, naproti tomu proces nerozpoznání vlastního je označován jako autotolerance. Porušením tohoto principu dochází k reakci systému na vlastní antigenní struktury a vzniká reakce označovaná jako autoimunita. I ta však má v řadě případů původ v zevních signálech. Dochází tak ke vzniku autoimunitních chorob, které jsou důsledkem komplexu zevních vlivů a vnitřních patologických pochodů charakterizovaných následně abnormální reakcí na vnitřní antigeny (autoantigeny). Za vznik autoimunitních onemocnění zodpovídá více genů - mezi nejvýznamnější patří geny HLA systému, geny pro jednotlivé složky komplementu, geny pro T buněčný receptor, geny pro variabilní oblast protilátek, rodiny transportérů iontů (např. rodina Nramp proteinů) a další.

Geny účastníci se kontroly imunitní odpovědi

V současné době známe celou řadu genů, které ovlivňují určitým způsobem imunitní odpověď a tedy rezistenci/susceptibilitu k onemocněním. Celosvětový projekt „Genom“ by měl přispět ke komplexní identifikaci lidského genomu včetně genů podílejících se na genetické kontrole rezistence/susceptibility k onemocnění. Na základě dosavadních znalostí lze geny účastníky se kontroly rezistence k onemocnění rozdělit do tří skupin:

- geny velkého histokompatibilitního komplexu (MHC geny),
- geny pro jednotlivé složky obranných mechanismů,
- geny, jejichž funkce není dosud přesně vymezena, a proto jsou označovány jako geny přirozené rezistence (např. *Mx* gen pro kontrolu rezistence k infekcím vyvolaným mixoviry).

MHC geny

Genový komplex MHC je lokalizován na lidském 6. (označuje se HLA) a myším 17. chromozomu (označuje se H-2). Geny lokalizované v tomto komplexu kódují membránové glykoproteiny, které tvoří heterodimerní povrchové buněčné receptory. V rámci tohoto komplexu se však nachází i celá řada genů kódujících odlišné proteinové struktury, které mají rovněž úzký vztah k imunitnímu systému - např. některé složky komplementu, cytokiny TNF alfa a beta a další. Výrazným znakem MHC komplexu je polymorfie, která zaručuje antigenní jedinečnost daného individua. Důsledkem polymorfismu MHC je variabilita přirozené rezistence jednotlivých „haplotypů“. Předpokládá se, že právě rozrůzněnost kombinací produktů těchto genů, které představují klíčovou složku antigenního rozpoznávání a prezentace, má původ v interakcích mnohobuněčných organismů s mikroorganismy. Tlakem mikroorganismů, v průběhu evoluce mnohobuněčných organismů, byla poskytnuta selekční výhoda těm organismům, které byly schopny reagovat na širokou paletu mikroorganismů množstvím a rozrůzněním svého genetického potenciálu. Bylo tomu tak proto, že mikroorganismy měly proti mnohobuněčným organismům „fylogenetický náskok“ a měly již fixovanou svoji genetickou mnohotvárnost. V souvislosti s tím se selektovaly ty genové kombinace, které zvyšovaly možnost přežití dané

ho druhu. Dnes tedy existují určité alelické formy MHC genů, jejichž nositelé jsou výrazně odolnější proti některým onemocněním v porovnání s nositeli jiných alelických forem (např. jedinci s HLA-B53 mají vyšší rezistenci k malárii než nositelé ostatních forem HLA-B antigenů).

Mezi HLA-antigeny a nejčastějšími onemocněními existuje řada asociací. Dalším příkladem je asociace mezi antigenem HLA-B27 a Bechtěrevovou nemocí - *ankylózní spondylitidou* (1). U pacientů s tímto onemocněním se vyskytují protilátky s křížovou reaktivitou mezi antigenem HLA-B27 a některými enterobakteriemi. Ze stolice nemocných byly izolovány kmeny mikroorganismů druhu *Klebsiella pneumoniae* ve větším množství než u zdravých jedinců. Našla se identická sekvence aminokyselinových zbytků mezi HLA-B27 a *K. pneumoniae*. Antiklebsielové protilátky křížově reagují s epitopem nacházejícím se ve vnější části $\alpha 1$ domény HLA-B27. Předpokládá se, že proti invadujícím mikroorganismům *K. pneumoniae* vzniká imunitní odpověď a protilátky, které následně reagují s epitopem na HLA-B27. Výsledný komplex antigen-protilátka aktivuje komplement, a dává tak vznik zánětu. Tato sekvence molekulárních interakcí naznačuje, že ankylozní spondylitida je autoimunitní onemocnění způsobené molekulárními mimikry, které spočívají v identitě primární i terciární struktury části histokompatibilního antigenu a mikroorganismu. Tento pojem je uváděn ve vztahu „HLA a onemocnění“ a předpokládá existenci podobností mezi některými HLA antigeny a mikroorganismy. Molekulární mimikry mohou v organismu vyvolat dvě různé reakce:

1. Imunitní odpověď se nevyvine - exogenní antigen z mikroorganismu, resp. jeho epitop, je podobný vlastnímu tolerovanému antigenu. V tomto případě je dána mikroorganismu možnost působit v makroorganismu bez indukce obranné reakce a působit patologicky.
2. Imunitní odpověď se rozvine, je ale namířena jak proti mikroorganismu, tak proti vlastním antigenům (např. HLA-antigeny vlastní tkáň).

Výše uvedený příklad asociace mezi HLA-antigeny a pravděpodobně mikrobiální podstatou autoimunitního onemocnění se vztahuje na HLA-antigeny I. třídy, tj. antigeny, které se běžně vyskytují na buňkách nejčastějších tkání organismu. Podobné asociace však existují i mezi onemocněním a tří-

dou II MHC antigenů. V této souvislosti je v literatuře (2) uváděn myší model *systémového lupusu* (SLE - systemic lupus erythematosus). V roce 1993 to byl jeden z prvních popisů asociace mezi smíšeným haplotypem II. třídy MHC a autoimunitní chorobou. Myši NZB x NZW (F1 hybrid) exprimují onemocnění, které se podobá lidskému SLE. Objevení se IgG protilátek namířených proti dvouvláknové DNA u těchto myší má za následek klinickou manifestaci nefritidy. Podstata tohoto fenoménu spočívá ve vzniku nové smíšené haplotypové molekuly typu I-Ea^dEβ^z na základě identických sekvencí druhých exonů třídy II genů myší haplotypu H-2^d a H-2^u. Tato molekula hraje pravděpodobně klíčovou roli ve vzniku autoimunitního onemocnění (umožnění proliferace „zakázaného“ klonu?).

Další onemocnění, v literatuře často popisované (např. 3) a asociované s expresí určitých alel antigenů třídy II MHC, je *IDDM* (inzulín dependentní diabetes melitus I. typu). Je spojováno s expresí „znaků vnímavosti“ - HLA haplotypy DR3, DR4, DR9 a „znaků rezistence“ - HLA haplotypu DR2 (později se však ukázalo, že znak rezistence je striktně vázán na DQβ lokus). Z hlediska molekulární struktury bylo prokázáno, že striktní asociace rezistence je spojena s přítomností asparagové (Asp) kyseliny v pozici 57 v DQβ řetězci (zatímco u vnímavých jedinců je v této poloze přítomen serin, valin či alanin). Podobně byla také nalezena korelace rezistence u NOD (non-obese diabetic mice) transgenických myší - pokud byla přítomna Asp kyselina v pozici 57 myšího H-2I antigenu. U juvenilního diabetu mají téměř všichni postižení v alelické formě DQβ řetězce jinou aminokyselinu než kyselinu asparagovou.

U většiny onemocnění asociovaných s určitou konfigurací MHC genů je exprese dané alelické formy MHC genů nutnou, ale zdaleka ne postačující podmínkou pro vznik onemocnění. Přestože se jedná většinou o autoimunitní onemocnění, je pravděpodobně nutný zevní antigenní impuls. Názorným příkladem může být onemocnění nazvané *celiakie*, což je trvalá nesnášenlivost pšeničného glutenu a prolaminů ječmene, žita a ovsa. Toto onemocnění má všechny znaky autoimunitní poruchy a je asociované se specifickými genovými produkty - HLA-DQ2 molekula je prokazována u více než 90 % pacientů s celiakií (4). Je to snad dosud jediné autoimunitní onemocnění asociované s HLA, u kterého je znám zevní antigenní signál (právě gluten a prolamin).

Geny pro jednotlivé složky obranných mechanismů

Imunoglobulinové geny

Do skupiny onemocnění asociovaných s určitým genovým profilem kontrolujícím funkci jednotlivých imunologických mechanismů patří imunodeficity s převahou poruch tvorby protilátek (5, 6).

Snad nejznámější jsou onemocnění s označením **agamaglobulinémie** nebo **hypogamaglobulinémie** (pojem agamaglobulinémie se používá tehdy, pokud je celková hladina imunoglobulinů v séru nižší než 1 g/l), nemají však jednotnou molekulární podstatu. Nedostatečná produkce imunoglobulinů izotypu IgG vázaná na genový defekt je známá jako vrozená dětská hypogamaglobulinémie. Příčinou tohoto defektu je zablokování maturace B-lymfocytů v důsledku intragenové delece nebo bodových mutací genu kódujícího produkt známý pod označením Brutonova tyrozinová kináza (*btk*). Tento gen se nachází na X-chromozomu, čímž je určena jeho exprese i vazba onemocnění na pohlaví. Předpokládá se, že tato kináza je funkčně vázaná na imunoglobulinový receptor B-lymfocytů a přenáší signál do nitra buňky podobně, jako *lck* kináza asociovaná s CD4 a CD8 řetězci u T-lymfocytů. Postiženým chlapcům chybí periferní B-lymfocyty a mají extrémně nízké nebo nulové hladiny imunoglobulinů.

Jinou skupinu tvoří imunodeficity způsobené chyběním určitých genů pro imunoglobulinové řetězce, či imunodeficity způsobené bodovou mutací v těchto genech, která znemožňuje jejich expresi. První případ je případ delece v chromozomové oblasti 14q32, ve které se nacházejí geny pro těžké řetězce. Jedinci, kteří jsou pro takovéto delece homozygotní, postrádají příslušný izotyp protilátky i od něj odvozené podtřídy. Druhý případ je bodová mutace, která postihuje gen pro kapa-řetězec. Jedinci s touto mutací pak mají protilátky, které obsahují jen lehké lambda řetězce (6). Je pochopitelné, že jedinci s poškozenou imunoglobulinovou produkcí jsou pak více vnímaví pro řadu infekčních i neinfekčních onemocnění, v závislosti na tom, jaký typ protilátek je deficitní.

Geny pro TCR řetězec

Zatím není dobře prokázána žádná přímá asociace genů pro T-buněčný receptor (TCR) s určitým typem onemocnění. Jsou popsány různé poruchy, kdy např. defekt komplexu CD3-TCR je podmíněn chyběním řetězců γ , δ a ϵ antigenního komplexu

CD3. Chybění důkazů pro asociaci onemocnění s defekty TCR snad může být pochopitelné z hlediska klíčové pozice TCR v rozpoznání antigenních struktur, kdy nefunkčnost T-buněčného receptoru pro antigen nejspíše není slučitelná s existencí imunologické reaktivity, alespoň ve smyslu adaptivní imunitní odezvy.

Geny determinující složky komplementu

Složky komplementu jsou nezbytnou součástí mechanismů přirozené imunity. Vykonnávají řadu funkcí, které jsou nezbytné pro přirozenou obranu organismu proti infekcím. Z tohoto pohledu je pak dominujícím mechanismem chemotaxe a opsonizace. Dosavadní výzkumy dokazují, že kterákoliv složka komplementu účastní se klasické cesty aktivace komplementu může být postižena genovým defektem vedoucím až ke kompletní ztrátě této složky z komplementové kaskády. Je známo, že deficit složek C1, C4, C2 a C5 komplementu je asociovaný s autoimunitními chorobami, nejčastěji se SLE. Ztráta chemotaktické aktivity byla zjištěna u dysfunkce C5 složky. Zajímavá je geneze poznání efektu ztráty funkce C5 složky komplementu ve vztahu k infekčnímu agens. Původně byl gen, později dva geny, zodpovědný za přirozenou rezistenci proti mikrobu *Listeria monocytogenes* označen jako gen *Lr-1* (7), resp. *Lr-2*. Později však byl gen *Lr-1* ztožněn s genem kontrolujícím C5 složku komplementu. Z ní pak C5a fragment má chemotaktickou aktivitu pro neutrofilní a bazofilní leukocyty a monocyty a je jednou z dominantních složek indukce zánětu. Zánětlivé buňky jsou schopny eliminovat *Listeria monocytogenes* z buněk a tkání infikovaného organismu, a tak je možné zánět označit za hlavní efektorový mechanismus obrany proti tomuto mikroorganismu.

Geny pro cytokiny

Z hlediska regulační funkce cytokinů, jejich charakteru intercelulárních signálů a v krajním případě funkce růstových a diferenciacních faktorů je zcela přirozené, že defekty v genové struktuře, transkripci a funkci cytokinů jsou asociovány jak s různými autoimunitními onemocněními, tak s přirozenou rezistencí k infekcím. Při některých onemocněních se vytvářejí celé „zpětněvazebné smyčky“ cytokinů, které vedou ke změnám exprese efektorových mechanismů. Například při *SLE* a *sclerosis multiplex* je popsána zvýšená produkce IL-2 a zvýšená exprese receptorů pro IL-2 na T-lymfocytech. Vysoká hla-

dina IL-2 aktivuje T-lymfocyty se zvýšenou frekvencí IL-2 receptorů na buněčném povrchu, které v odpověď na tuto základní patologickou aktivaci produkují cytokiny nadměrně stimulující B-buňky. Ty pak v závěrečné fázi porušené regulační smyčky syntetizují autoprotilátky reagující s antigeny vlastních tkání.

Příkladem genu kontrolujícího rezistenci proti infekci je gen pro IL-3. Již bylo zmíněno, že rezistence proti intracelulárnímu patogenu *Listeria monocytogenes* byla původně popsána jako rezistence kontrolovaná dvěma geny *Lr-1* a *Lr-2*. Gen *Lr-1* byl později ztotožněn s genem pro C5 složku komplementu, gen *Lr-2* s genem pro IL-3. Tento cytokin je růstovým faktorem prekurzorových buněk kostní dřeně a je nutný k doplňování buněčného základu imunitních reakcí a k indukci zánětu. Tím je jeho funkce v protilisterické obraně zcela pochopitelná.

Další cytokin, který má nezastupitelné místo v indukci protiinfekční imunity, je interferon gama (IFN-gama). Tento Th1 cytokin hraje důležitou roli i v rezistenci k parazitární infekci *Leishmania major*. IFN-gama jako jeden ze dvou základních cytokinů aktivujících funkce makrofágů má rozhodující vliv na expresi inducibilní NO-syntázy a produkci NO infikovanými makrofágy. Produkce oxidů dusíku je jedním z účinných mechanismů, kterým jsou makrofágy schopny usmrtit infekční agens.

Ve vztahu ke genetické kontrole indukce tohoto efektorového mechanismu byl popsán případ myši C57Bl/10ScCr (Cr, *Lps^d*), u kterých byl zkoumán průběh infekce *Leishmania major*. Tyto myši na rozdíl od myši C57Bl/10ScSn (Sn, *Lpsⁿ*) nejsou schopny kontrolovat leishmaniovou infekci a dochází u nich k postupnému a prakticky neomezenému růstu počtu parazitů v kožních lézích. Slezinné buňky izolované od těchto myši nebyly schopny po sekundární aktivaci *in vitro* buď živými leishmaniemi, či UV inaktivovanými parazity produkovat IFN-gama. Samotný gen, který je zodpovědný za nedokonalou kooperaci antigen prezentujících buněk (makrofágy) s producenty IFN-gama (NK-buňky, T-lymfocyty), není znám. Jisté však je, že tímto genem není gen *Lps* (viz níže).

C3H/HeJ myši, které mají defekt v *Lps* genu podobný jako myši C57Bl/10ScCr (Cr, *Lps^d*), jsou schopny kožní leishmánízu kontrolovat a produkovat IFN-gama. Ani geny pro inducibilní NO-syntázu (*Scl1*) a IFN-gama inducibilní JAK tyrozin kinázu (*Scl2*), tedy geny, které mohou přímo kontrolovat

přenos signálu interferonem-gama (*Scl2*) i expresi samotných efektorových molekul (*Scl1*), nejsou odpovědné za defekt myši C57Bl/10ScCr (Cr, *Lps^d*) v protileishmaniové obraně (8).

Nově jsou popsány také další geny, které se na kontrole rezistence/susceptibility proti onemocnění účastní. V práci Krulové a Lipoldové (9) je uvedeno, že odpověď zvýšené produkce cytokinu IL-2 je kontrolována lokusem *Cindal* (Cytokine-induced activation 1) na myším chromozomu 11 blízko D11Mit4 znaku. Odpověď nízké produkce IL-2 testovaná na daných myších lymfocytech je kontrolována jiným lokusem *Cinda2* umístěným na chromozomu 12. *Cindal* i *Cinda2* jsou jedny z genů kontrolujících funkci T-buněk a podílejí se tedy i na genetické kontrole vnímavosti k infekcím a k autoimunitním onemocněním.

Geny pro apoptózu

Jako apoptóza je označován proces programované buněčné smrti. Tento proces, podobně jako proliferace a diferenciace, je geneticky kontrolován. Je spojen se syntézou, příp. aktivací určitých enzymů, která je regulována vnějšími i vnitřními faktory. V literatuře lze nalézt mnoho souborných prací zabývajících se problematikou programované smrti (viz např. 10-13). Proces apoptózy může být indukován prostřednictvím povrchových buněčných receptorů po ligaci vhodnou signální molekulou nebo kontrolován vnitřní (ne)rovnováhou exprese proapoptotických a protiapoptotických genů. Tím se striktně odlišuje od nekrózy, která je procesem spontánním, geneticky neřízeným a z hlediska buňky pasivním. V imunitním systému je apoptóza důležitým regulačním prvkem. Je nutná např. k udržení autotolerance - odstranění tzv. zakázaných klonů v thymu nebo k eliminaci infikovaných či transformovaných nebo z pohledu organismu jinak nevhodných buněk (v průběhu morfogeneze). Řada nemocí (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, AIDS) je spojena se zvýšenou frekvencí apoptotických buněk v tkáních. Naopak nádorová onemocnění, autoimunitní choroby a většina virových onemocnění jsou spojeny se selháním apoptózy (14, 15).

Apoptóza hraje jistou úlohu i v rozvoji bakteriálních infekcí, kdy baktériemi vylučované toxiny vyvolávají smrt cílových buněk napadeného organismu (16). Defekt v kterémkoli genu kontrolujícím proces apoptózy může mít fatální následky pro organismus. Dosud je popsáno několik genů, které proces apoptózy kontrolují. Jejich stručná charakte-

ristika je následující:

- **bcl2** - onkogen - produkt tohoto genu blokuje apoptózu (17).
- **p53** - antionkogen - produkt tohoto genu má pravděpodobně funkci senzoru poškození DNA a navozuje sled reakcí končících smrtí buňky (18).
- **bax** - jeho produkt reguluje aktivitu proteinu Bcl2, s kterým vytváří funkční dimer Bcl2-Bax. Jestliže je však v buňce hladina proteinů Bax podstatně vyšší než Bcl2, vzniká homodimer Bax-Bax, který směřuje buněčné pochody k apoptóze (19), plní také funkci iontového transportéru.
- **c-myc** - protoonkogen - má ambivalentní funkci, podle přítomnosti různých regulačních faktorů může produkt genu *c-myc* stimulovat jak buněčnou proliferaci, tak i apoptózu (20).

Jedním z dobře popsáných znaků spouštějících apoptózu je **Fas (APO-1)**, povrchový buněčný receptor, který rozeznává Fas ligandu (Fas-L). Fas-L se může vyskytovat na povrchu interagující buňky nebo v rozpustné formě (21). Apoptóza vyvolaná vznikem komplexu Fas a Fas ligandy přispívá ke kontrole spektra lymfocytových klonů a jejich aktivity, a to třemi různými způsoby:

- a) První způsob indukce apoptózy se týká cytotoxických lymfocytů, které po adhezi na cílovou buňku ji usmrtí v důsledku interakce své Fas-L s jejím Fas antigenem - receptorem (22).
- b) Druhým možným procesem je vzájemná eliminace lymfocytů, kdy dochází buď k interakci Fas-L jednoho lymfocytu s Fas antigenem druhého, v němž je indukována apoptóza, nebo se zahubí oba lymfocyty, jestliže interakce Fas-L s Fas receptorem byla vzájemná. Může nastat také případ, kdy sám lymfocyt spáchá sebevraždu, pokud na jeho povrchu interaguje vlastní Fas-L s Fas receptorem (23).
- c) Poslední typ vzniku apoptotického procesu indukovaného prostřednictvím vazby Fas-L a Fas je reprezentován v tkáních, které mají určitá privilegia týkající se tkáňové slučitelnosti. Mezi ně patří např. oči, ale i centrální nervový systém nebo varlata. Buňky těchto tkání se chrání před napadením lymfocytu tím, že interakci svých povrchových Fas-L s povrchovým Fas antigenem lymfocytů v nich indukují apoptózu.

Jedinci, u nichž došlo k mutaci genu vedoucímu ke vzniku nefunkčního proteinu Fas, trpí autoimunitními onemocněními způsobenými přítomností vel-

kého množství autoreaktivních B-lymfocytů (24). K pochopení vztahu Fas receptoru či Fas ligandy a apoptózy na straně jedné a apoptózy a autoimunitních onemocnění na straně druhé pomohl myši model uváděný jako *lpr/gld* defekt. Myši homozygotní v tzv. *lpr* genu (lymphoproliferation response) i myši homozygotní v genu *gld* (generalized lymphoproliferative disease) fenotypicky exprimují onemocnění velmi podobné systémovému lupusu. Později bylo prokázáno, že produkt *lpr* genu je vlastně Fas receptor. U genu *gld* nebylo zatím přímo prokázáno, že by kontroloval expresi Fas ligandy, nepřímá experimentální data tomu však nasvědčují (viz např. 25).

Kombinované imunodeficity

Kombinované imunodeficitní stavy se mohou projevit jak na úrovni T-lymfocytů, tak i B-lymfocytů (6). Defekt může být kompletní nebo částečný a tomu odpovídají také adekvátní klinické příznaky. Většinou se onemocnění objeví poměrně brzy, ještě v dětství. Děti jsou pak vnímavé k celému spektru různých mikroorganismů, jejich léčba je těžká a často bez výsledku.

Jedním z popsáných onemocnění je těžká kombinovaná imunodeficience (**SCID**), která označuje heterogenní skupinu chorob (26). V tomto případě nemocnému chybí T-lymfocyty i B-lymfocyty (defekt je na úrovni vývoje kmenových buněk). Při SCID vázané na pohlaví dochází k mutaci genu pro γ řetězec receptoru pro IL-2 (nachází se na X-chromozomu) a tím i k poruše výstavby vysokoafinitního receptoru pro IL-2. K SCID patří vážné poruchy buněčné i protilátkové imunity s extrémní vnímavostí na mikroorganismy.

Geny přirozené rezistence

Tato skupina genů, která byla v minulosti velmi početná, se postupně rozpadá. Původně byla tvořena geny kontrolujícími rezistenci proti jednotlivým infekcím a podle nich rovněž nazvanými. Tak např. gen pro rezistenci k mixovirům byl označen jako *Mx* gen, gen pro rezistenci k *Mycobacterium bovis* kmen BCG byl označen jako *Bcg* gen, o genech *Lr-1* a *Lr-2* jsme se již zmínili. Podobně byly popsány geny pro kontrolu rezistence proti *Rickettsia tsutsugamushi* (*Ric* gen) či *Schistosoma mansoni* (*Rsm* gen/y). Postupně se ukázalo, že tyto geny se buď vyznačují pleiotropním efektem (*Bcg* gen byl zto-

tožněn s geny *Ity* a *Lsh* kontrolující rezistenci proti *Salmonella typhimurium*, resp. *Leishmania donovani*), nebo že kontrolují některé z jednotek skládajících imunoregulační systém (*Lr-1* a *Lr-2*). Z toho, co bylo právě řečeno, vyplývá, že snad žádný z genů není určen výhradně ke kontrole rezistence proti určité infekci, nýbrž se jedná o geny kódující určité buněčné struktury či sekreční produkty, které mají svoji nezastupitelnou úlohu v expresi komplexního fenoménu rezistence. V každém případě však geny označované jako geny přirozené rezistence fungují v časných fázích infekcí a obecně se dá říci, že jejich efekt je možné spatřovat:

- a) ve snížené možnosti vzniku infekce,
- b) v menší proliferaci infekčního agens v orgánech a konečně
- c) ve vyšším ochranném efektu imunizace.

Obsahem těchto časných fází infekcí jsou primární interakce buněk imunoregulačního systému s mikroorganismy, které ovlivňují indukci, regulaci a expresi adaptivní (protektivní) imunity. Ze všech dostupných údajů se jeví být pravděpodobné, že pro ustavení protektivní imunity jsou důležité jak kvalitativní, tak kvantitativní parametry imunogenního signálu a významnou úlohu může hrát i faktor času, tj. jak rychle jsou jednotlivé mechanismy imunoregulačního systému uváděny do aktivovaného stavu. Pro bližší pochopení funkce genů přirozené rezistence jsou zde uvedeny příklady, jejichž „story“ byla a je velice zajímavá právě z hlediska rezistence proti infekčním agens.

***Nramp1* gen**

Jedním z nejlépe prostudovaných genů přirozené rezistence je *Nramp1* gen (natural resistance-associated macrophage protein), který leží v 30 cM lokusu lokalizovaném na 1. myším chromozomu (27). Klonováním a následnou analýzou *Nramp1* genu identifikovali tento gen jako vážného kandidáta pro *Bcg/Ity/Lsh* lokus. Totožnost *Nramp1* genu s *Bcg/Ity/Lsh* genem byla potvrzena *in vivo* vytvořením nulové alely *Nramp1* genu rekombinací (28) a transgenezí (29). *Nramp1* gen je jedním z nejdůležitějších genů, který zprostředkovává rezistenci makrofágů k mnoha různým intracelulárním patogenům včetně *M. bovis* kmen BCG, *M. leprae*, *M. intracellulare* i k jiným, taxonomicky a antigenně nesouvisejícím mikroorganismům, jako je *Salmonella typhimurium* a *Leishmania donovani*. Nedávno byly popsány další dva proteiny vyka-

zující vysoký stupeň homologie s proteinem kódovaným *Nramp1* genem, jedná se o myši *Nramp2* (30) a krysí DCT1, který je pravděpodobně krysím homologem *Nramp2* (31). Tyto proteiny se (pravděpodobně - výzkum pokračuje) podílejí na transportu dvojmocných kationtů, především železa a Zn^{2+} , Mn^{2+} (32) přes membránu buněk v oblasti střev.

Dále byla prokázána homologie mezi *Nramp1* a mikrobiálními transportními proteiny (28) a začíná se hovořit o celé rodině *Nramp* proteinů. Jenefer Blackwell (33) se zmiňuje o 55-58% homologii *Nramp* genu s kvasinkovými geny *SMF1* a *SMF2*, které fungují rovněž jako iontové transportéry. Myši gen *Nramp1* má dvě formy, jedna exprimuje kyselinu asparagovou v pozici 169 (D169, Bcg^s) a druhá v této pozici exprimuje glycin (G169, Bcg^l). Tato substituce má za následek sterické změny, které způsobují nefunkčnost proteinu a tím i spojitost s vnímavostí k infekci (34).

Nramp1 je transmembránový protein s 10 až 12 transmembránovými doménami. Jeho exprese je známa výhradně v profesionálních fagocytech a může být regulována lipopolysachridem (LPS) nebo interferonem- γ (IFN- γ) (35). Stále diskutovanou otázkou je jak funkce *Nramp1* proteinu, tak vztah mezi jeho endosomální/lysosomální lokalizací a řízením transportu železa. Jedni upřednostňují transport do fagosomu, druzí z fagosomu (viz např. 36). V mnoha studiích byla popsána řada pleiotropních efektů tohoto genu majících vliv na aktivaci makrofágů: snížení regulace 5' nukleotidázy, zvýšení exprese MHC třídy II, zvýšení produkce TNF-alfa, exprese IL-1beta, oxidativní vzplanutí, zvýšení tumoricidní aktivity a další (33). Specialitou výzkumu exprese a funkce *Nramp* genu je, že dlouhou dobu nebylo možné připravit protilátku proti *Nramp* proteinu vzhledem k jeho vysoké evoluční homologii (98% homologie u savců a 70% homologie savčích *Nramp* genů a *Nramp* genu slepic).

Řada nových studií se zabývá vztahem lidského NRAMP1 a citlivosti k autoimunitním (37) a infekčním (38) onemocněním. Získané údaje podporují hypotézu o alelických asociacích NRAMPu s citlivostí na infekční (lepra, tuberkulóza) a autoimunitní (revmatoidní artritida, diabetes) onemocnění, přičemž se zdá, že alela 3 přináší citlivost na onemocnění, zatímco alela 2 je signifikantně protektivní (viz 36).

***Lps* gen**

Další gen patří do skupiny genů přirozené rezistence je *Lps* gen. Leží na 4. myším chromozomu

a exprimuje se na makrofázích ve dvou formách. Produkt *Lps* genu začíná být objasňován, ale jeho funkce není dosud zcela jasná. Dosavadní experimenty byly provedeny převážně v *in vitro* uspořádání.

Lipopolysacharid (LPS), strukturální komponenta vnější membrány gramnegativních bakterií, má schopnost působit zánětlivě a modulačně na humorální i buněčnou složku imunitního systému (39). LPS byl označen jako hlavní mediátor septického šoku u lidí. U myši vyvolává LPS podobné patofyziologické změny jako u lidí, a proto lze myši využít jako ideální zvířecí model pro studium efektů LPS na imunitní systém. Citlivost k LPS je u myši geneticky kontrolována jediným genem, právě genem *Lps*. V letech 1960-1965 došlo v myším kmenu C3H/HeJ ke spontánní mutaci *Lps* genu, která vedla k tomu, že tento kmen je vysoce odolný k efektům LPS. Od objevení tohoto defektu velká část důkazů naznačuje, že neodpovídatost na LPS je odvozena od chybné interakce receptoru pro LPS s lipidem A. Nedávno (40) byl identifikován 80 kDa LPS vázající protein na myších lymfocytových a makrofágových buněčných membránách, který se zdá být specifický pro oblast lipidu A molekuly LPS. Tento receptor byl však detekován na obou subpopulacích peritoneálních makrofágů odvozených z normálních (*Lps*⁺) i LPS defektních (*Lps*^d) myši. Je tedy pravděpodobné, že defekt způsobující neodpovídatost na LPS je defektem uvnitř receptoru, který způsobí selhání přenosu signálu z buněčného povrchu do nitra buňky (39).

„Story“ genů přirozené rezistence přináší stále nová překvapení a ukazuje se, že celá oblast výzkumu genetické rezistence proti onemocněním je zajímavá. Ukázalo se totiž, že produkt *Lps* genu je velmi podobný jednomu z genů mušky *Drosophila*, který kontroluje rezistenci proti plísňovým onemocněním dospělých mušek (41). Produkt tohoto genu mušky se označuje Toll a patří pravděpodobně mezi archaické členy IL-1 receptorové rodiny (42). Nedlouho po objevení Toll receptoru byly nalezeny homology těchto molekul u lidí a označeny jako Toll-like receptors (TLR). Experimentální práce prokazují, že TLR se účastní aktivace mechanismů přirozené i adaptivní imunity obratlovců všeobecně (např. 43). Navíc se ukázalo, že TLR2 je signální receptor aktivovaný LPS (44). Již výše zmíněná práce (41) pak dokazuje, že produkt myšího *Lps* genu je pravděpodobně totožný s TLR4. Muška *Drosophila*, která v minulosti velmi dobře po-

sloužila genetikům posunout poznání dědičnosti, tak znovu posloužila k lepšímu chápání základních principů genetické kontroly rezistence proti onemocněním, alespoň v případě jednoho genu, tedy genu *Lps*.

Jednou ze známých funkcí *Lps* genu je zprostředkování přenosu signálu od receptoru do jádra, kde se nachází gen pro TNF. Bakteriální LPS stimuluje buňky monocyt/makrofágové linie, které mají na svém povrchu CD14 receptor. Ten zprostředkovává aktivaci kináz a následně i aktivaci a translokaci transkripčního faktoru NF- κ B do jádra buňky, kde spouští transkripci různých prozánětlivých genů, včetně genů pro cytokiny TNF-alfa, IL-1 a IL-6 (jsou odpovědné za vznik gramnegativní sepse) a genu pro inducibilní NO-syntázu. Důsledky přepisu těchto informací pro rezistenci proti mikroorganismům již byly popsány u genů jiných a jsou prakticky stejné.

Závěr

Při studiu infekčních i autoimunitních onemocnění bylo jednoznačně prokázáno, že citlivost individua k onemocnění je kontrolována expresí genomu daného jedince. V některých případech je genetická kontrola realizována jedním genem (*M. bovis* kmen BCG), v jiných případech jde o polygenovou kontrolu (z infekčních onemocnění např. tularémie, z autoimunitních prakticky všechny). Genetická kontrola postihuje jak primární interakce zevních signálů s imunoregulačním systémem, tak procesy adaptivní imunologické odezvy. Změny v imunologické odpovědi na zevní signál mohou vést až k reakci vlastních obranných mechanismů na antigeny vlastních tkání, a vyvolat tak autoimunitní onemocnění.

Kontroly přirozené rezistence se účastní nejrůznější geny a charakter genových alterací určuje expresi fenotypu rezistence. Je nutné mít na zřeteli, že různé genové alterace mohou vést ke stejným fenotypickým projevům znaku rezistence k onemocnění.

Literatura

1. BAUM, H. - DAVIES, H. - PEAKMAN, M.: Molecular mimicry in the MHC: Hidden clues to autoimmunity. *Immunol. Today*, 1996, vol. 17, no. 2, p. 64-70.
2. NYGARD, NR., et al.: Mixed haplotypes and autoimmunity. *Immunol. Today*, 1993, vol. 14, no. 2, p. 53-56.

3. GILL, RG. - HASKINS, K.: Molecular mechanisms underlying diabetes and other autoimmune diseases. *Immunol. Today*, 1993, vol. 14, no. 2, p. 49-51.
4. KOUPILOVÁ, K.: Celiakie - tvorba a význam autoprotilátek. Disertační práce, Praha, 1997.
5. THEOFILOPOULOS, AN.: The basic of autoimmunity: Part II. Genetic predisposition. *Immunol. Today*, 1995, vol. 16, no. 3, p. 150-157.
6. BUC, M. - FERENČÍK, M.: *Imunogenetika*. Alfa plus, 1994, s. 383-394.
7. CHEERS, CH., et al.: Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: Course to Listeriosis in resistant or susceptible mice. *Infect. Immunity*, 1978, vol. 19, p. 763.
8. MULLER, I., et al.: Leishmania major infection in C57BL/10 mice differing at the *Lps* locus: a new non-healing phenotype. *Med. Microbiol. Immunol.*, 1997, vol. 186, p. 75-81.
9. KRULOVÁ, M., et al.: IL-2-Induced proliferative response is controlled by loci *Cinda1* and *Cinda2* on mouse chromosomes 11 and 12: A distinct control of the response induced by different IL-2 concentrations. *Genomics*, 1997, vol. 42, p. 11-15.
10. ELLIS, RE. - YUAN, JY. - HORVITZ, HR.: Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1991, vol. 7, p. 663-698.
11. SCHWARTZMAN, RA. - CIDLOWSKI, JA.: Mechanism of tissue-specific induction of internucleosomal deoxyribonucleic acid cleavage activity and apoptosis by glucocorticoids. *Endocrinology*, 1993, vol. 133, p. 591-599.
12. HALE, AJ., et al.: Apoptosis: Molecular regulation of cell death. *Eur. J. Biochem.*, 1996, vol. 237, p. 884.
13. KVASNÍČKA, J. - PETRÁŠEK, J.: Apoptosis-programmed cell death. *Čas. Lék. čes.*, 1995, vol. 134, p. 259-264.
14. RAFF, MC., et al.: Programmed cell death and the control of cell survival: Lesson from the nervous system. *Science*, 1993, vol. 262, p. 695-700.
15. THOMSON, CB.: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 1995, vol. 267, p. 1456-1462.
16. CHANG, MP., et al.: Internucleosomal DNA cleavage precedes diphtheria toxin-induced cytolysis. Evidence that cell lysis is not a simple consequence of translation inhibition. *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, p. 15 261-15 267.
17. COLLINS, MK. - LOPEZ RIVAS, A.: The control of apoptosis in mammalian cells. *Trends Biochem. Sci.*, 1993, vol. 18, p. 307-309.
18. ENOCH, T. - NORBURY, C.: Cellular response to DNA damage: Cell-cycle checkpoints, apoptosis and roles of p53 and ATM. *Trends Biochem. Sci.*, 1995, vol. 20, p. 426-430.
19. KORSMEYER, SJ.: Regulators of cell death. *Trends Genet.*, 1995, vol. 11, p. 101-105.
20. WILLIAMS, GT. - SMITH, CA.: Molecular regulation of apoptosis: Genetic controls on cell death. *Cell*, 1993, vol. 74, p. 777-779.
21. CHALOUPKA, J.: Programovaná smrt buňky. *Biologické listy*. 1996, roč. 61, č. 3-4, s. 249-271.
22. BERKE, G.: The CTL's kiss of death. *Cell*, 1995, vol. 81, p. 9-12.
23. NAGATA, S. - GOLDSTEIN, P.: The Fas death factor. *Science*, 1995, vol. 267, p. 1449-1456.
24. HOŘEJŠÍ, V.: *Molekulární imunologie I*. 1. vydání. Praha, Reprodukční a knihářské pracoviště PFF UK Praha, 1993. 173 S.
25. COHEN, PL. - EISENBERG, RA.: The *lpr* and *gld* genes in systemic autoimmunity: life and death in the *Fas* lane. *Immunology Today*, 1992, vol. 13, no. 11, p. 427-428.
26. NOGUCHI, MYI, H. - ROSENBLATT, HM.: Interleukin-2 receptor γ -chain mutation result in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell*, 1993, vol. 73, p. 147-157.
27. VIDAL, S., et al.: Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of candidate for *Bcg*. *Cell*, 1993, vol. 73, p. 469-485.
28. VIDAL, S., et al.: The *Ity/Lsh/Bcg* locus: Natural resistance to infection with intracellular parasites abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. *J. Exp. Med.*, 1995, vol. 182, p. 655-666.
29. GOVONI, G., et al.: The *Bcg/Ity/Lsh* locus: Genetic transfer of resistance to infections in C57BL/6J mice transgenic for the *Nramp1*^{Gly 169} allele. *Infect. Immunol.*, 1996, vol. 64, p. 2923-2929.
30. GOVONI, G., et al.: Genomic structure, promoter sequence, and induction of expression of mouse *Nramp1* gene in macrophages. *Genomics*, 1995, vol. 27, p. 9-19.
31. GUNSHIN, H., et al.: Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 1997, vol. 388, p. 482-488.
32. SUPEK, F., et al.: A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, vol. 93, 5105 S.
33. BLACKWELL, JM., et al.: Genetic regulation of leishmanial and mycobacterial infections: The *Lsh/Ity/Bcg* gene story continues. *Immunol. Lett.*, 1994, vol. 43, p. 99-107.
34. AGRANOFF, D. - KRISHNA, S.: Metal ion homeostasis and intracellular parasitism. *Mol. Microbiol.*, 1998, vol. 28, p. 403-412.
35. GOVONI, G., et al.: Cell-specific and inducible *Nramp1* gene expression in mouse macrophages in vitro and in vivo. *J. Leukoc. Biol.*, 1997, vol. 62, 277 S.
36. BLACKWELL, JM. - SEARLE, S.: Genetic regulation of macrophage activation: Understanding the function of *Nramp1* (= *Ity/Lsh/Bcg*). *Immunol. Lett.*, 1999, vol. 65, p. 73-80.
37. ESPOSITO, L., et al.: Genetic analysis of chromosome 2 in type 1 diabetes: analysis of putative loci IDDM7, IDDM12, and IDDM13 and candidate genes NRAMP1 and IA-2 and the interleukin-1 gene cluster. *IMDIAB Group Diabetes*, 1998, vol. 47, p. 1797-1799.
38. SHAW, MA., et al.: Evidence that genetic susceptibility to Mycobacterium tuberculosis in a Brazilian population is under oligogenic control: linkage study of the candidate genes *NRAMP1* and *TNFA*. *Tuber. Lung Dis.*, 1997, vol. 78, p. 35-45.
39. PERERA, PY., et al.: Detection and analysis of the 80-kD lipopolysaccharide receptor in macrophages derived from *Lps*^r and *Lps*^d mice. *J. Leukoc. Biol.*, 1992, vol. 51, p. 501-506.
40. LEI, MG. - MORRISON, DC.: Specific endotoxin Lipopolysaccharide binding proteins on murine splenocytes. *J. Immunol.*, 1988, vol. 141, p. 996-1005.
41. HOSHINO, K., et al.: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the *Lps* gene product. *J. Immunol.*, 1999,

- vol. 162, p. 3749-3752.
42. GAY, NJ. - KEITH, FJ.: *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature*, 1991, vol. 351, p. 355-356.
43. MEDZHITOV, R. - PRESTON-HULBURT, P. - JANE-WAY, CA.: A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 1997, vol. 388, p. 394-397.
44. KIRSCHNING, CJ., et al.: Human Toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.*, 1998, vol. 188, p. 2091-2097.

Korespondence: Ing. Lenka Hernychová

Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně

Třebešská 1575

500 01 Hradec Králové

e-mail: hernychova@pmfhk.cz

Do redakce došlo 16. 9. 1999