

Imunita hmyzu a dalších bezobratlých živočichů 2.

V předchozí části článku (Živa 2018, 1: 32–34) jsme se dozvěděli, že přirozená imunita bezobratlých je založena na tělních bariérách a detailně jsme si popsali buněčné složky imunity. V následujícím dílu se seznámíme s humorální imunitou, kterou zajišťují efektorové molekuly v cirkulující tělní tekutině nebo produkované lokálně v tkáních. Vzájemnou spolupráci buněčných a humorálních složek nacházíme zejména v koagulační kaskádě. Někteří bezobratlí živočichové vyvinuli sociální imunitu nebo jsou schopni modulovat imunitní odpověď, což připomíná adaptivní imunitu obratlovců.

Tělní tekutiny bezobratlých obsahují velké množství transportních, zásobních, koagulačních, imunitních a dalších proteinů a peptidů syntetizovaných cirkulujícími buňkami nebo okolními tkáněmi, jako je např. tukové těleso u hmyzu. Celkově přispívají k udržení homeostáze organismu a některé z nich se přímo účastní imunitních reakcí – tvoří složky humorální imunity. Jejich zastoupení se výrazně mění především během vývoje jedince, a také při stresových situacích, ať už jde o setkání s cizorodým materiálem, patogenem nebo o poranění.

U bezobratlých představují humorální imunitu zejména dvě proteolytické kaskády (koagulační a fenoloxidázová), dále se na ní podílejí lysozym, lektiny, aglutininy a řada antigenem stimulovaných antibakteriálních a regulačních peptidů. Jednotlivé složky se nacházejí v oběhové coelomové tekutině nebo hemolymfě, mohou být také složkou sekretů (typicky slizu) nebo vylučovány na povrch kutikuly jako součást bariérních antimikrobiálních mechanismů. Část z nich je v organismu přítomna neustále – konstitutivně (enzym fenoloxidáza ve formě neaktivního prekurzoru nazývaného profenoloxidáza, lysozym, lektiny, hemolin, aglutininy), stresová situace ale mnohonásobně zvyšuje

jejich koncentraci, další část je exprimována pouze v případě infekce (typicky baktericidní peptidy).

Koagulační kaskáda

Po poranění dochází u téměř všech živočichů k aktivaci koagulační kaskády vedoucí ke srážení tělní tekutiny. U bezobratlých je koagulace zprostředkována různými typy hemocytů/coelomocytů, které se po stimulaci během poranění rozpadají, uvolňují faktory koagulační kaskády a aktivují ji. Jde tedy o propojení buněčné a humorální imunity. Společně s fenoloxidázovou kaskádou (viz dále) v místě poranění vytvoří „zátku“ – bílkovinnou síť ze srážecích proteinů – koagulogenů hemocytů/coelomocytů (koagulocytů) a z proteinů plazmy, které sekretují vnitřní orgány, např. tukové těleso u hmyzu. Tato bílkovinná síť se podílí na zastavení úniku hemolymfy/coelomové tekutiny a na zabránění infekci. Polymeraci proteinů katalyzuje transglutamináza závislá na iontech vápníku (Ca^{2+}).

U poměrně dobře probádaných členovců existují různé procesy koagulace a rozličné koagulační proteiny – obecně jde o soubor enzymaticky řízených dějů vedoucích od srážecích proteinů k nerozpustnému gelu (koagulinu). U koryšů známe dvě základní složky – transglutaminázu uvolňo-

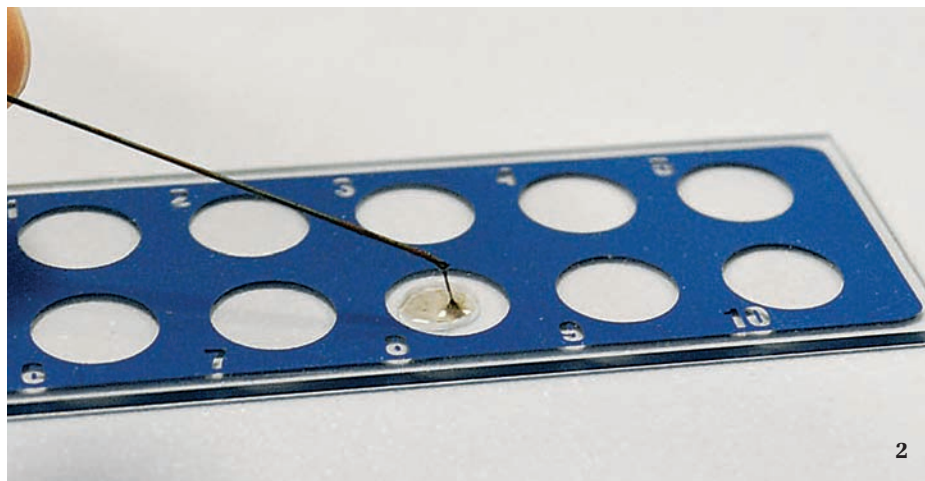
vanou z cirkulujících buněk po poranění a koagulační protein plazmy (homodimer o velikosti 210 kDa), které polymerují do velkých agregátů. U ostrorepů (Limulidae) existuje proteolytická kaskáda, jejíž komponenty jsou v granulích hemocytů a uvolňují se exocytózou v přítomnosti např. lipopolysacharidů. Koagulace u hmyzu vyžaduje transportní proteiny (lipoforiny – ekvivalenty savčích lipoproteinů LDL a HDL, Low/High Density Lipoproteins), hexameriny (také označované jako larvální sérové proteiny, tvoří součást zásobních proteinů), jejich receptor a další specializované srážecí faktory, jako např. hemo- lektin (homolog savčího faktoru von Willebrand). Většina těchto látek slouží hlavně jako substrát pro enzym transglutaminázu (její obdoba u obratlovců se označuje Faktor XIIIa), která vytváří vazby mezi glutaminem a lyzinem. Tím dojde k provázání koagulačních proteinů a vzniku sraženiny. V místě poranění většinou probíhá také aktivace fenoloxidázové kaskády a melanizace, poraněním může být regulována i syntéza antimikrobiálních peptidů.

Fenoloxidázová kaskáda

Tento sled reakcí byl doložen u měkkýšů, koryšů a hmyzu, u dalších skupin bezobratlých živočichů zcela chybí, nebo není znám. Zajímavá je její absence u některých klíšťat, i když blízké taxonomické skupiny ji mají. Fenoloxidázová kaskáda se podílí na tvorbě kutikulárních barviv, shlukování proniklých bakterií, opsonizaci (navázání na povrch antigenu, rozpoznání fagocytů), agregaci antigenu, enkapsulaci (tvorbě valů oddělujících cizorodý materiál, podrobněji v předchozím dílu článku) a tvorbě nodulů (útvárů vznikajících shlukováním hemocytů/coelomocytů). Kaskáda reakcí je na počátku aktivována složkami bakteriálních stěn, poraněním nebo při spuštění jiné imunitní reakce, což vede k přeměně

1 Měření antibakteriální aktivity hmyzí hemolymfy na misce s bakterií *Micrococcus luteus*. Antibakteriální složky brání v růstu bakterií a vznikají tím projasněné zóny, buď číré s naneseným kalibračním roztokem lysozymu, nebo tmavé s nanesenou hemolymfou, u níž došlo k tvorbě pigmentu – melanizaci.

2 Koagulace hemolymfy – krátce po odběru hemolymfy je možné z kapky vytáhnout vlákno, jehož délka a šířka je odlišná pro různé druhy hmyzu.



neaktivní profenoloxidázy pomocí proteolytických enzymů na aktivní fenoloxidázu. Výsledkem kaskády je přeměna zbytků aminokyseliny tyrozinu na polymer melanin (melanizace), imunitní reakci tedy doprovází tvorba tmavého pigmentu.

Lysozym

Základní humorální složku přirozené imunity tvoří enzym lysozym, jenž katalyzuje hydrolýzu polysacharidových řetězců N-acetylglukosaminových jednotek a zbytku N-acetylmuramové kyseliny v buněčných stěnách bakterií. Působí jako účinný lytický, baktericidní faktor (narušuje buněčnou stěnu bakterií) pouze na grampozitivní bakterie, protože mají odlišnou stavbu stěny než gramnegativní (na ty účinkuje pouze bakteriostaticky – brání jejich růstu/množení). Nachází se v tělních tekutinách a sekretech bezobratlých i obratlovců (slinách, slzách, krevní plazmě nebo mateřském mléce), po stimulaci jeho množstvím, a tím aktivita stoupá.

Antimikrobiální peptidy

Invadující mikroorganismy jsou u bezobratlých po průniku mechanickými bariérami (kde mohou být zachyceny transglutaminázou během koagulace, viz výše) okamžitě odstraněny buněčnými složkami imunity. Uvádí se, že řádově v sekundách je 99,5 % mikroorganismů pohlceno fagocyty a teprve proti zbývajícím jsou zapojeny složky humorální imunity. Kromě lysozymu, nacházejícího se u většiny živočichů, jde zpravidla o inducibilní antimikrobiální peptidy (AMP), kterých existuje obrovské množství a jejich zastoupení se liší podle jednotlivých taxonů, vývojových stádií a zdroje nákazy. U většiny bezobratlých se předpokládá, že je současně přítomno několik AMP s odlišným působením, identifikovány a popsány byly ale zatím pouze u malého počtu druhů. Výzkum AMP má velký potenciál i pro člověka ve farmacii a medicíně, protože mnoho přírodních látek z této skupiny může sloužit jako antibiotikum (viz seriál Léčivé látky z živočišné říše v Živě 2001, 1–6) a řada z nich vykazuje i protinádorové vlastnosti. Nejpodrobněji je prozkoumán aktivační systém syntézy AMP u hmyzu, zahrnující dvě hlavní signální dráhy Toll a IMD (Immune Deficiency), které kontrolují syntézu malých kladně nabitých AMP aktivních proti bakteriím, houbám, ale i virům. V případě peptidů působících na bakterie rozhoduje také složení bakteriální buněčné stěny. Některé z AMP působí specificky pouze proti gramnegativním, nebo pouze proti grampozitivním kmenům a na ostatní mají jen bakteriostatický vliv. AMP lze dělit podle chemické stavby a struktury, případně se označují podle taxonu, z něhož byly izolovány (diptericyny z dvoukřídlých – Diptera, cecropiny z martináče *Hyalophora cecropia*, drosomycin z octomilky *Drosophila melanogaster* atd.). Syntéza AMP je rovněž tkáňově specifická.

Aglutinin

Aglutinin kolující v tělní tekutině představují neprobádanou skupinu proteinů, u nichž byla zjištěna aglutinační a opsonizační aktivita s rozdílnou intenzitou proti různým patogenům. Některé patří



zároveň mezi lektiny (viz dále). Nacházejí se kromě tělní tekutiny i v hlenu na povrchu těla vodních, případně suchozemských bezobratlých.

Lektiny a další receptory (PRRs)

Lektiny tvoří skupinu proteinů, které hydrofobně vážou specifické glycidy a jsou schopny rozeznávat patogeny nebo parazity (PRRs – Pattern Recognition Receptors). Syntetizují se v tukovém tělese po zranění, bakteriální infekci nebo během metamorfózy, což naznačuje, že se dokážou podílet na likvidaci patogenů nebo poškozených a rozpadávajících se tkání. Významný je např. limulin z ostrorepa – specificky rozpoznává strukturní složky bakteriálních stěn; využívá se i v lékařské praxi jako součást testů zdravotnického materiálu na bakteriální kontaminace.

Inhibitory proteáz

U hmyzu bylo popsáno několik inhibitorů serinových proteáz, jež se podílejí především na regulaci proteázových kaskád včetně fenoloxidázového systému, a také je dobře znám jejich inhibiční vliv na proteázy houbových patogenů. Zatím poměrně málo prozkoumanou složkou vrozené imunity hmyzu jsou pak inhibitory metalloproteáz. Enzymy ze skupiny metalloproteáz jsou produkovány infekčními organismy včetně entomopatogenů, kterým napomáhají během invaze.

Molekuly Ig-like, complement-like

U některých bezobratlých byly také popsány molekuly po funkční stránce podobné působení protilátek (specifické antibody-like) a komplementového systému (complement-like). Jsou důležité zejména pro studium evoluce imunitního systému (např. Thioester-containing Proteins – TEP – jako předchůdci komplementu obratlovců) jako přechodu k adaptivní imunitě.

Sociální imunita

Kromě popsaných mechanismů přirozené imunity bezobratlých se u některých setkáváme ještě s dalšími možnostmi, jak zvýšit úspěšnost při kontaktu s patogeny v okolí. Tento typ imunitního systému vznikl u sociálně žijících druhů, jako jsou mravenci, včely, čmeláci a termíti. Sociální imunita byla popsána jako série projevů chování ve skupině, které umožňují potlačit pravděpodobnou infekci a přenos chorob v populaci (Cremer a kol. 2007).

Systém vzájemné spolupráce se soustřeďuje na čištění hnízda, ale i na vzájemné čištění jedinců, jež zabraňuje šíření nákazy a v některých případech slouží k sociální imunizaci. Nezasahuje tedy pouze při onemocnění, ale vytváří účinnou prevenci. Dalším příkladem mohou být antimikrobiální látky, které si sociální hmyz sám vytváří nebo je sbírá v okolí.

Mezi studované sociální druhy patří včely, protože jsou v současnosti zatíženy řadou onemocnění, působením pesticidů a dalšími negativními vnějšími faktory. Genom včel obsahuje pouze třetinu imunitních genů v porovnání s octomilkou nebo komárem rodu *Anopheles*; ztráta těchto genů musela být v průběhu evoluce nahrazena systémem sociální imunity nebo nějakým jiným faktorem.

Adaptivní imunita bezobratlých?

Adaptivní imunita založená na přítomnosti paměťových buněk, produkci protilátek a variabilitě hlavního histokompatibilního systému (MHC), jakou známe u obratlovců, u bezobratlých neexistuje. Komplikované imunitní reakce adaptivní imunity bezobratlých nahrazují jednak specifickými adaptacemi (pro patogeny nepropustnou vnější chitinovou kostrou, rychlým rozmnožováním – krátkým životním cyklem, velkým počtem potomků, krátkou dobou života aj.) a dobře fungujícím imunitním systémem, jenž se funkčně v některých případech adaptivní reakcí přibližuje. Experimenty prokázaly imunologickou specifitu a přinejmenším krátkodobou paměť u houbovců (Porifera), dále u žahavců (Cnidaria), kroužkovců (Annelida), hmyzu (Insecta) a ostnokožců (Echinodermata), ale nikoli u hlístic (Nematoda) nebo měkkýšů (Mollusca). Adaptivní projevy přirozené imunity (alternativní adaptivní imunity) jsou v současnosti intenzivně studovány. Genetická variabilita bezobratlých může být analogicky obratlovcům protilátkám, např. různý způsob sestřihu mediátorové ribonukleové kyseliny (mRNA) pro gen *Dscam* (Down syndrome cell adhesion molecule) v tukových buňkách a hemocytech u octomilky (Kurtz a Armitage 2006). Přítomnost nových forem (období) adaptivní imunity u bezobratlých není až tak překvapivá, protože již byla popsána i u bakterií a archeí, kde je založená na CRISPR-Cas systému proti virům a plazmidům (Horvath a Barrangou 2010, viz také Živa 2017, 2: 70–72 a XLVII–XLIX a na str. 58–62 tohoto čísla).

Základní schéma u bezobratlých, rozpoznání – signál do buňky – reakce, může být ovlivněno několika procesy. Ochranná imunizace se vyskytuje u řady druhů proti širokému spektru parazitů, přestože postrádají T a B lymfocyty. Imunizace bez-



3 Larva zlatohlávka rodu *Eudicella* s melanizovaným cizorodým objektem pod kutikulou (pravděpodobně částice substrátu vniklá při poranění)

4 Mrtvá housenka zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) – černá barva znamená, že v celém těle proběhla melanizace.

5 Housenka modelového druhu martináče čínského (*Antheraea pernyi*)

6 Včelí plod po laboratorní nákaze bakteriemi obsahujícími zelený fluorescenční protein (GFP). Po nasvícení ultrafialovým světlem jsou vidět včelí larvy, u nichž úspěšně proběhla nákaza.

7 Experimenty s indukcí antibakteriální odpovědi u včel – po injekci včely suspenzí bakterií dojde během 24 hodin k syntéze antibakteriálních peptidů.

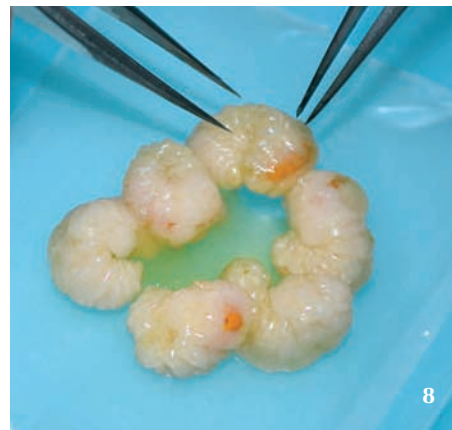
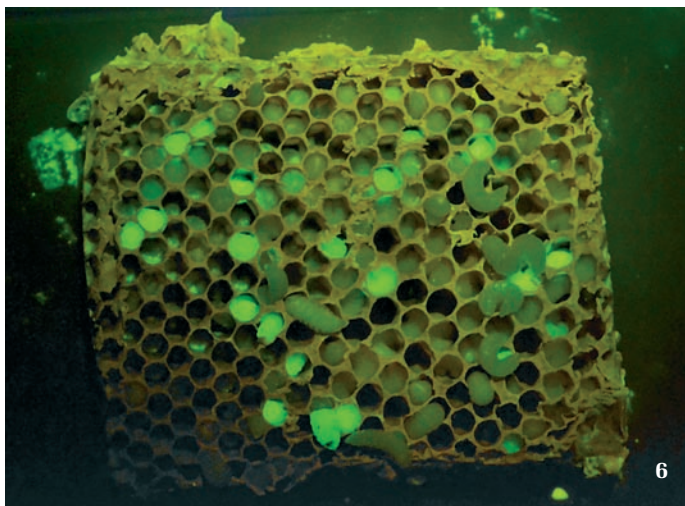
8 Odběr hemolymfy včelího plodu. Snímky P. Hyršla, není-li uvedeno jinak

9 Ostrorep americký (*Limulus polyphemus*). Z ostrorepa byl izolován protein limulin ze skupiny lektinů, který je schopen rozpoznat strukturní složky bakteriálních membrán a využívá se proto v lékařské diagnostice. Foto V. Motyčka

obratlých zahrnuje příklady obecné nespecifické imunitní ochrany, ale také specifickou imunitní paměť označovanou jako imunitní priming.

U imunizace hovoříme o snížené citlivosti k nákaze (parazitovi) při opakovaném setkání. K aktivní imunizaci dochází, když jedinec přijde do kontaktu s patogenem a jeho tělo je díky tomu lépe připraveno na sekundární setkání, u sociálně žijících druhů může proběhnout také pasivní imunizace výměnou antimikrobiálních látek mezi zdravým a nakaženým jedincem.

Profylaktický efekt zvaný imunitní priming je soubor činností a opatření, který znamená určitou ochranu před chorobami. Jde např. o odlišnou reakci na bakteriální infekci u naivních jedinců (dosud se s nákazou nesetkali) a těch, kterým byly předtím podány inaktivní bakterie. Konkrétních studií popisujících priming existuje již mnoho desítek, což dokládá, že bezobratlí si vytvořili různé varianty této obrany. Zajímavým případem je trofolaxe sociálního hmyzu – oboustranné nebo jednostranné předání obsahu zažívacího traktu. Může probíhat ústy (stomodeální), nebo konečníkem (proktodeální trofolaxe). Např.



u mravenců představuje trofolaxe jeden z důležitých faktorů, který jim pomáhá přežít a zvětšovat kolonie. Priming prokazuje, že i u bezobratlých nalézáme imunologickou specifitu a paměť. Termín specifita zde určuje konkrétní vztah hostitele a parazita, není tedy ve významu získané (specifické) imunity obratlovců založené na produkci protilátek. Mnoho studií ukazuje, že díky vystavení patogenu může být hostitel při opětovném setkání lépe chráněn.

Kromě toho víme, že tuto imunitu může matka předat potomkům. Rodiče své potomky zásobují lepší obranyschopností díky tomu, že sami již do kontaktu s patogenem přišli, jak prokázala studie u čmeláků (Moret a Schmid-Hempel 2001). Priming nalézáme tedy jak u obratlovců, tak

u bezobratlých. U obratlovců rozumíme tomuto mechanismu po funkční i mechanické stránce, u bezobratlých víme pouze o konkrétních příkladech, ale neznáme ještě mechanismus tohoto procesu.

Vzhledem k obrovskému počtu bezobratlých živočichů lze očekávat, že pokračující výzkum přinese ještě mnoho dalších překvapivých informací.

Výzkum imunity hmyzu byl podpořen projektem Grantové agentury České republiky č. 17-03253S.

Seznam použité a doporučené literatury je uveden na webové stránce Živy.

