

Imunitní systém a jeho studium pomocí průtokové cytometrie

Všechny mnohobuněčné organismy vyvinuly pro ochranu před patogeny jednodušší nebo složitější soubory specializovaných tkání, buněk a molekul – imunitní systémy. Základními složkami jsou molekuly (humorální imunita) a buňky (buněčná imunita). Stamiliony let evoluční zkušenosti s bojem proti patogenům vedly k vývoji strategií, které byly postupně optimalizovány, a to i tím, že rychle mutující mikroorganismy daným strategiím unikaly nebo vyvíjely protistrategie. Celá naše evoluční historie je provázána eskalací závodu ve zbrojení mezi hostitelem a patogeny a vítězné strategie jsou zaznamenány v genetické informaci. Miliardy předků v rodové linii člověka nashromáždily a zapsaly do své genové informace množství molekulárních triků, jak se s patogeny vypořádát, a tyto triky se dále sčítaly a kombinovaly. Naš imunitní systém je tak souhrnou evolučně prastarých obecných strategií, které sdílíme již s houbovci (fagocytóza), hmyzem (Toll-like receptory) a ostatními obratlovci (široké spektrum bílých krvinek a adaptivní imunita). Součástí evoluce byl postupný vznik buněčných specialistů pro konkrétní „bojové podmínky“ a konkrétní typy patogenů, kterých dnes u savců můžeme rozlišit jistě více než 100. Většina buněk imunitního systému není pevně vázána do 3D struktury tkání, je mobilní, lokalizovaná v krvi nebo z velké části do lymfatických orgánů. Proto je poměrně snadné je převést do buněčné suspenze, kterou lze po jednotlivých buňkách analyzovat pomocí průtokového cytometru (blíže o metodě na str. 21–24 této Živy). Typickým vzorkem pro průtokovou cytometrii jsou bílé krvinky, oddělené od červených krvinek centrifugací (nebo jsou červené krvinky lyzovány v hypotonickém prostředí). To je nezbytné proto, že červených krvinek je v krvi mnohem více než těch bílých, přibližně v poměru 500 : 1. Příklad využití průtokové cytometrie uvádíme v závěru článku.

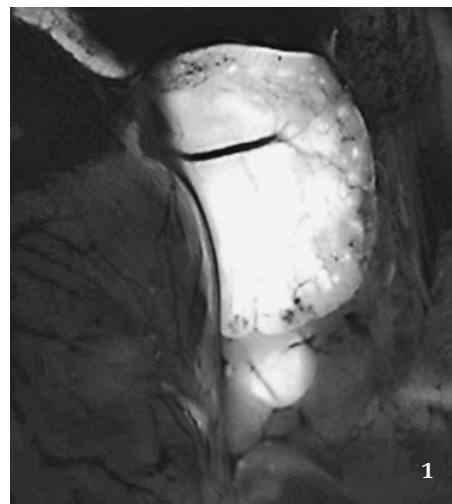
Z evolučního a zároveň funkčního hlediska rozdělujeme imunitní odpověď (reakci na přítomnost nebezpečného cizího i vlastního) na dva typy. Jde o imunitu vrozenou (přirozenou nebo nepřesně nespecifickou), kterou přímo dědí po rodičích. Dále je to imunita adaptivní (získaná, někdy označovaná jako specifická), která vzniká během života díky zkušenostem každého jedince s určitými patogeny a využívá náhodné vytváření genetické variability. Je jasné, že každá imunitní odpověď (vrozená i adaptivní), pokud má zlikvidovat konkrétní patogen a neohrozit přitom hostitelský organismus, musí být specifická. Musí umět cizorodý organismus jednoznačně rozpoznat, případně rozpoznat míru jeho nebezpečnosti. Vrozená a adaptivní imunita spolu úzce souvisejí, doplňují se a vytvářejí sofistikovaný systém komplexní ochrany.

Vrozená imunita

Evolučně první typ imunity (to platí i v ontogenezi), molekulární strategie vyvinuté během dlouhé evoluční zkušenosti s patogeny a zaznamenané v genetické informaci. Vrozené imunitní reakce nemusíme vyvíjet, stačí v pravý čas na pravém místě aktivovat příslušný soubor molekul nebo buněk.

Jak ale naše tělo pozná, že se v něm nalézá cizorodá struktura? Během stamilionů

let evoluce se přírodním výběrem vyvinuly mechanismy schopné vysoce specificky rozpoznávat molekuly typické pro určité skupiny potenciálních patogenů. Např. jedním ze zásadních rozdílů mezi živočišnými buňkami a buňkami prokaryotními (bakteriemi) je přítomnost buněčné stěny u prokaryot. Není tedy překvapivé, že podstatná část rozpoznání bakterií se na molekulární úrovni soustředí právě na její složky (např. lipopolysacharidy, lipoproteiny, lipopeptidy nebo peptidoglykan). Podobně je možné rozpoznat i patogenní houby. Další odlišností je, že bakterie jako první aminokyselinu při translaci (syntéze bílkovin) zabudovávají formylmetionin, a nikoli metionin jako my. Pokud se některá z výše zmíněných struktur (peptidy s formylmetioninem, dvouvláknová RNA – např. virová genetická informace, nemetylované CpG ostrovy – časté v bakteriální DNA, flagelin – součást bičíku, bakteriální ribozomální RNA) v těle objeví, znamená to přítomnost cizorodého molekulárního vzoru typického pro různé typy virů, bakterií, hub nebo prvoků. Během mnoha milionů let interakce mezi hostiteli a patogeny se postupně vyvinulo rozpoznávání všech výše vyjmenovaných molekul. Příslušné bílkovinné receptory rozpoznávají cizí molekulární vzory patogenů (PAMP – pathogen-associated molecular



1 Hrudní dutina MHC II-EGFP knock-in myši, u níž byl gen kódující jeden z řetězců MHC II vyměněn za variantu s připojeným genem pro zelený fluorescenční protein (GFP). V této myši po osvětlení modrým světlem zeleně fluoreskují makrofágy, dendritické buňky, B lymfocyty nebo epitelální buňky brzlíku. Zde pod fluorescenční binolupou – intenzivně fluoreskujícím útvarem je brzlík, kde dochází k pomyslné výchově T lymfocytů.

patterns) jsou přítomny na různých buňkách imunitního systému i ostatních typech tělních buněk. Mohou se nacházet v cytoplazmě (např. NOD receptory rozpoznávající některé viry), na povrchu buňky (celá řada Toll-like receptorů) nebo v endozomech (váčcích obsahujících pozřeny, endocytovaný materiál z vnějšího prostředí), kde mohou navázat molekuly uvolněné po částečném rozkladu parazitů v buňce.

Pouze rozpoznání cizího však pro aktivaci imunitního systému nestačí. Jinak bychom se neustále vyčerpávali bojem např. s komenzální (přirozenou, podílející se na fyziologickém trávení) mikrobiotou našich střev, případně složitým mikrobiálním společenstvem všech našich tělních povrchů. Imunitní systém našich předků se naučil rozlišovat mezi důležitým a nepodstatným. Pokud dojde nejednou k odhalení molekulárních vzorů PAMP (indikujících přítomnost patogenů) spolu s molekulárními vzory indikujícími poškození vlastních buněk (DAMP – damage-associated molecular patterns), je vysoká pravděpodobnost, že cizí vetřelec bude zároveň nebezpečný.

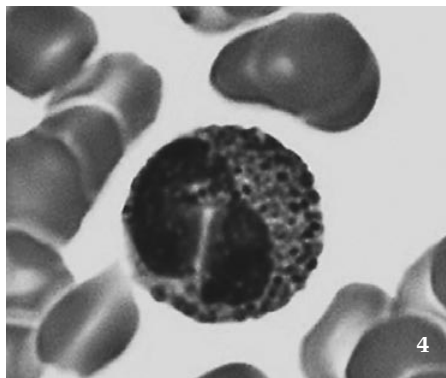
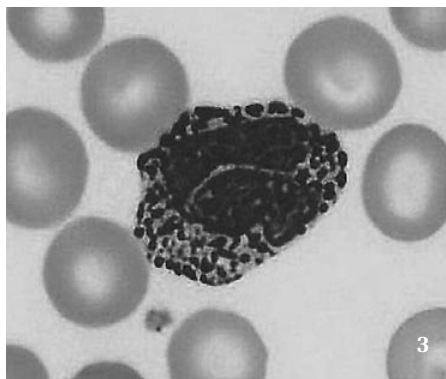
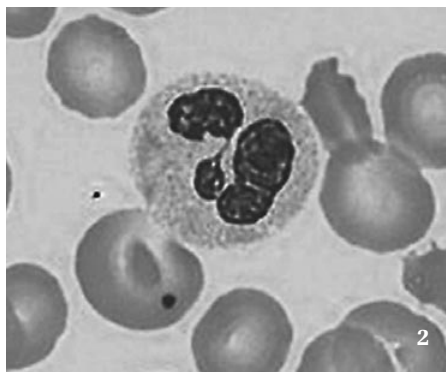
Za normálních okolností naše buňky umírají programovanou buněčnou smrtí (apoptózou), kdy je vnitřní obsah striktně oddělen od vnějšího prostředí. Apoptóza neaktivuje imunitní systém. Naopak nekroza – smrt buňky při některých virových, bakteriálních a parazitárních infekcích – vede k uvolnění různých molekul z cytoplazmy nebo jádra do okolí, což je jasným signálem poškození. Pro některé z těchto molekul existují specifické receptory. Jde např. o ATP, proteiny teplotního šoku (HSP – heat shock proteins) nebo HMGB1, molekulu vážící se za normálních podmínek na jaderný chromatin. DAMP receptory rozpoznávají molekuly uvolněné při nekroze se typicky nacházejí na povrchu buněk řídicích imunitní odpověď – zvláště na dendritických buňkách.

Jaké další způsoby okamžité imunitní reakce dědíme po rodičích? Jde mimo jiné o schopnost zvýšit teplotu a lépe prokrvit místo zánětu. Zvýšená teplota ovlivňuje životní cyklus mikrobů a aktivuje některé složky imunitní reakce. Lepší prokrvení pak umožní přivádět do místa zánětu více imunitních buněk a molekul. Dále dokážeme vytvářet molekuly, které mikroorganismy přímo likvidují. Objevitel penicilinu, Alexander Fleming, našel v slzách a později ve vaječném bílku lysozym, bílkovinu štěpící peptidoglykan buněčných stěn Gram-pozitivních bakterií. Dnes známe několik desítek podobných látek, včetně peptidů narušujících integritu bakteriální membrány.

Další důležitá skupina molekul přímo nezabíjí, ale na cizorodé struktury se váže, a tak je označí pro likvidaci specializovanými molekulami schopnými rozpoznat buňky zničit. Tuto kaskádu proteáz (enzymů štěpících jiné proteiny) nazýváme komplement. Enzymy se navzájem postupně aktivují, až vytvoří komplex, který perforuje cytoplazmatickou membránu buňky. Vznikne pór a buňka umírá. Komplement se aktivuje např. vazbou na protilátku, která rozpoznala příslušný epitop (místo, kam se specificky váže protilátka) patogenu. V obou případech jde za normální fyziologické situace o rozpoznání cizorodé struktury, kterou je potřeba odstranit.

Kromě zmíněných molekulárních „zbraní“ se na vrozené imunitě podílí některé specializované buňky – evolučně staré typy, které se postupně „naučily“ efektivně likvidovat patogeny, včetně souhry s ostatními buněčnými a molekulárními systémy. Jaké buněčné „vojáky“ náš vrozený imunitní systém využívá?

● **Neutrofilní granulocyty** – kamikaze lidského imunitního systému, extrémně krátce žijící (hodiny až asi tři dny) pohyblivý buněčný typ, nejčastější bílá krvinka – leukocyt (60–70 %). Neutrofilny migrují z krve do tkání, a to i na dlouhé vzdálenosti. Do místa zánětu jsou „přilákány“ speciálními molekulami (chemoatraktanty), které jsou pro tento účel produkovány napadenými buňkami v místě zánětu, přítomnými imunitními buňkami, které rozpoznaly nebezpečí vyvolané patogenem, nebo jsou uvolňovány přímo patogeny. Pokud je v těle infekce, přemísťují se neutrofilny do zasažených tkání, kde fagocytují bakterie. Pohlčení bakterií není nutně spojeno s jejich likvidací, některé jsou totiž schopny uvnitř buňky dlouhodobě přežívat. Řada z nich i proto, že vyvinuly množství způsobů, jak ovlivnit nepříznivé prostředí fagozomu, váčku, v němž se po pohlčení nacházejí. Jde např. o neutralizaci původně kyselého pH nebo inhibici degračních enzymů hydroláz, v jiných případech dokážou přesměrovat váčkový transport buňky. Proto je třeba efektivní zničení bakterií zajistit těmi nejdrastičtějšími prostředky. Jednou z možností je oxidační vzplanutí, kdy je molekula kyslíku využita pro vznik radikálů, které mají silné baktericidní účinky (spolu s reaktivními sloučeninami dusíku a chloru). Není překvapivé, že tak poškozující chemii ve svých organelách neutrofilní granulocyty dlouho nepřežijí. Po pohlčení bakterií je spuštěn samodestrukční program, který při velkém nahromaděním neutrofilů v místě infekce vede ke vzniku hnisu. Kromě fagocytózy jsou neutrofilny



schopny unikátní aktivity (opět sebevražděné) – vyvrhnutí obsahu svého jádra neboli netózy. Vyvržený chromatin vytvoří okolo neutrofilu lepkavou síť (navíc s řadou baktericidních látek), do níž jsou zachyceny bakterie, a je tak zabráněno jejich šíření po těle.

● **Eozinofilní granulocyty** – zabíjící mnohobuněčných parazitů, poměrně vzácný typ bílé krvinky (v krvi tvoří 1–3 % leukocytů), jehož cytoplazmatická granula se barví eozinem. Právě tato granula souvisí s hlavní aktivitou eozinofilu – schopností degranulace. Při ní cytoplazmatické váčky (granula naplněná obsahem a odštěpená z Golgiho aparátu) splynou s plazmatickou membránou. Jejich obsah je tak vypuštěn do mimobuněčného (extracelulárního) prostředí, jde tedy o jeden z typů exocytózy, vylučování materiálu vně buňky. Vzhledem k tomu, že k degranulaci dochází zpravidla po rozpoznání mnohobuněčného parazita, je logické, že granula obsahují antiparazitické látky. Na rozdíl od neutrofilů se eozinofily vyskytují hlavně v tkáních (v brzlíku, tlustém střevě, vaječniku, děloze, slezině nebo mizních uzlinách), kde po opuštění krevního řečiště přežívají okolo 10 dní. Kromě degranulace produkují řadu dalších toxických a regulačních substancí. Funkce eozinofilů proto dalece přesahuje protiparazitické působení. Jak snadno poznáte přítomnost parazita (třeba škrkavky) v těle? Např. zvýšeným

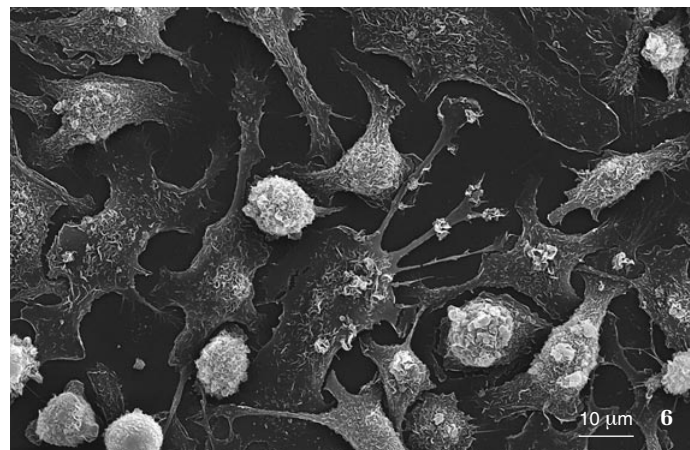
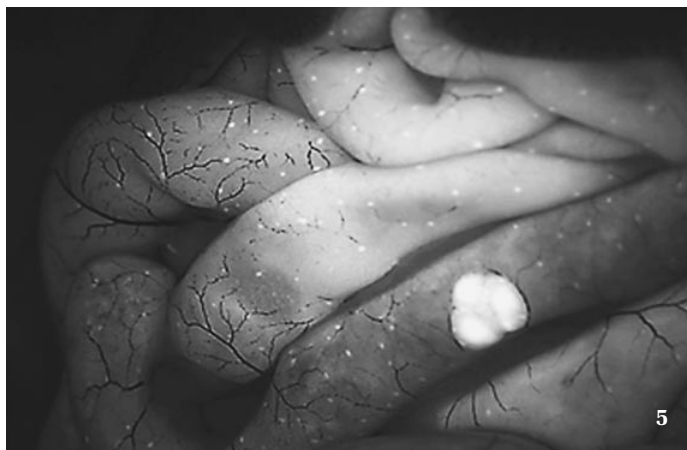
množstvím eozinofilů v krvi – eozinofilii. Ta se ale objevuje i při některých autoimunitních a alergických onemocněních.

● **Bazofilní granulocyty** – postrach alergií, nejvzácnější a největší leukocyty v krvi (0,5 až 1 %). Bazofily jsou důležité buňky regulující zánět, také jsou zodpovědné za podstatnou část symptomů alergických reakcí. To je způsobeno mimo jiné tím, že po exocytóze jejich granul (v tomto případě intenzivně barvitelných zásaditých barviv, odtud jméno bazofily – např. hematoxylinem) uvolňují histamin a serotonin ovlivňující stah cév. Kromě toho produkují např. heparin, který brání předčasnému srážení krve. Podobně jako eozinofily se uplatňují v boji proti parazitům, jejich působení je ale mnohem širší, obecně ho můžeme pojmenovat jako prozánětlivé. Mezi jinými receptory je na jejich povrchu významný vysokoafinní receptor pro imunoglobulin E (IgE), jeden z typů protilátek, úzce související jak s bojem proti parazitům, tak s alergickými reakcemi.

● **Žírné buňky** – „sestřenky“ bazofilů, také vážou IgE. Tato vazba aktivuje degranulaci váček s biologicky aktivními substancemi, což je významné pro etiologii některých alergických onemocnění. Žírné buňky jsou strážci vnější hranice organismu a spolu s dalšími buněčnými typy zahajují komplexní odpověď proti pronikajícím patogenům, která se nazývá zánět. Tato evolučně prastará vrozená odpověď je řízena tisíci genů a účastní se jí stovky informačních a regulačních molekul, např. cytokinů. Ochranný zánět je nezbytný pro potlačení infekce a případné další noxy poškozující organismus, ale jeho delší trvání je nebezpečné, a proto musí být regulován.

● **Makrofágy** – „bumbřlícíci“ našeho těla, buňky s vysokou fagocytickou aktivitou, které žijí mnohem déle než neutrofilny (dny až týdny, v některých tkáních i měsíce). Jednou z jejich mnoha rolí je být úklidovou četou odstraňující buněčný a molekulární nepořádek. Fagocytují a následně hydrolytickými enzymy štěpí např. apoptotická tělíčka, tedy pozůstatky buněk, které ukončily svůj život apoptózou. Obecně makrofágy pohltnou vše, co dokážou rozpoznat prostřednictvím receptorů na svém povrchu. Zdravé buňky našeho těla se fagocytóze brání pomocí signálů „don't eat me“, např. přítomností molekuly CD47 na povrchu. Makrofágy se nacházejí v mnoha tkáních, kde bývají označovány speciálními názvy (Kupfferovy buňky v játrech nebo mikroglie v mozku). Předkládají (prezentují) některé části pohlčeného materiálu pomocným T lymfocytům, díky čemuž hrají důležitou roli při aktivaci imunitní odpovědi. Kromě toho produkují regulační bílkoviny, jejichž prostřednictvím spolu komunikují buňky imunitního systému – cytokiny, ale i cytotoxické molekuly – např. oxid dusnatý. Během zánětu makrofágy nastupují v druhé vlně po neutrofilních granulocytech, odstraní zbytky neutrofilů, poškozené tkáně apod. Po likvidaci infekce produkují řadu molekul usnadňujících tkáňové hojení.

● **Dendritické buňky** – dispečeri imunitního systému tvořící funkční propojení mezi vrozenou a adaptivní imunitou. Zřejmě nejdůležitější buňky celého systému, stojící v centru regulace imunitních reakcí. Bez jejich přítomnosti by další klíčové buňky,



2 až 4 Krevní roztěr – neutrofilní (obr. 2), bazofilní (3) a eozinofilní (4) granulocyty. Barveno Giemsou.

Podrobněji v textu. Upraveno podle zdrojů z Wikimedia Commons

5 Tenké střevo MHC II-EGFP knock-in myši pod fluorescenční binolupou – je vidět Peyerův plát, množství tečkovitých útvarů (cryptopatches) a různě intenzivní signál stěvy stěva podle množství antigen-prezentujících buněk v lamina propria (tenké vrstvě pojivové tkáně pod povrchem stěvy stěva).

6 Makrofágy a kulovité dendritické buňky kultivované z myši kostní dřevě ve skenovacím elektronovém mikroskopu

pomocné T lymfocyty, neměly dostatek informací, zda se mají aktivovat, či nikoli.

Hlavní funkcí dendritických buněk je prezentace antigenů – kousky pohlcených a rozštěpených proteinů vystaví na povrch a ukážou je tak T lymfocytům. Dendritické buňky navíc označujeme jako profesionální antigen-prezentující buňky, neboť jako v podstatě jediné v těle dokážou vyhodnotit informaci z mnoha receptorů pro PAMP a DAMP. Díky těmto buněčným „smyslům“ jsou detailně obeznámeny s kontextem pohlceného materiálu – např. zda se v okolí vyskytovaly buňky umírající nekrotickou nebo molekulární vzory typické pro patogeny. Dendritické buňky jsou přítomny ve všech tkáních, které komunikují s vnějším prostředím, a plní zde roli jakýchsi buněčných pohraničnicků. Po aktivaci (pohlcení cizorodého materiálu v kontextu nebezpečí) se dendritická buňka přemístí do komunikačních center imunitního systému, lymfatických orgánů – lymfou do mízních uzlin nebo krví do sleziny. Zde na svém povrchu vystaví části bílkovin (peptidy), které pohltila na periférii těla. Ty pak mohou aktivovat nejen paměťové T lymfocyty (v minulosti se již zúčastnily imunitní reakce a čekají na další příležitost), ale i naivní T lymfocyty, které se zatím do žádné reakce nezapojily. Na svém povrchu mají kostimulační molekuly (CD80, CD86 a CD40), jež se za splnění všech uvedených podmínek mohou propojit s partnerskými molekulami na T lymfocytech, a tím potvrdit aktivizační signál. Dendritické buňky žijí středně dlouho (okolo 14 dnů) a jsou průběžně obměňovány hlavně diferenciací z monocytů, prekursorů vznikajících v kostní dřevě (které jsou např. i buněčnými prekursorů makrofágů a osteoklastů).

Adaptivní imunita

Adaptivní (specifická, získaná) imunita dokáže velmi přesně zacílit na konkrétní detail molekuly (antigenu) unikátního patogenního organismu, nikoli pouze na obecný molekulární vzor. Potenciálními cíli pro specifické rozpoznání imunitním systémem mohou být obrovská množství chemických struktur, většinou peptidů, řádově přesahující počet genů, které máme v genomu. Pokud má mít imunitní systém schopnost rozpoznat miliony různých antigenů, musí existovat možnost vytvářet nové geny. Ač to zní bláznivě, přesně k tomu ve specializovaných buňkách (T a B lymfocytech) skutečně dochází. Navíc je třeba zajistit, aby jednotlivé buňky imunitního systému dokázaly odlišit cizí od vlastního a mimo jiné zkontrolovat, zda se uvnitř buněk nevyskytují patogeny. K tomu slouží prezentace antigenů na povrchu buněk.

● Prezentace antigenů

Způsob, jakým je na plazmatické membráně buněk umožněno ukazovat části molekul (antigeny – struktury rozpoznatelné imunitním systémem), které se normálně nacházejí uvnitř. Důvodem je, že buňky schopné rozlišit vlastní od cizího (T lymfocyty) neumějí vstoupit dovnitř prověřované buňky. Molekuly specifické pro patogeny tedy musejí být nějakým způsobem přístupné na jejich povrchu. Takovou „výstavu“ dokážou vytvořit v podstatě všechny buňky našeho těla, s několika málo výjimkami (např. červené krvinky). Ve všech buňkách se může skrývat virus, bakterie nebo parazit, proto by měly mít možnost své části ukázat ke kontrole. Jak je toho dosaženo? Pomocí dvou typů buněčných „nástěnek“ – molekul hlavního histokompatibilního komplexu MHC (major histocompatibility complex) glykoproteinů. U lidí se tyto molekuly označují zkratkou HLA (human leukocyte antigen).

● **MHC I** je molekula zakotvená v cytoplazmatické membráně v podstatě všech buněčných typů našeho těla (s výjimkou červenýchrvinek) s mimořádným strukturálním designem. Kombinace β -skládaných listů a α -helixů (tvořících sekundární strukturu proteinů) vytváří vazebný žlábek, do kterého dokonale zapadá stavební složka bílkoviny – peptid. Ten vzniká při fyziologickém odbourávání proteinů proteazomem, komplexem proteáz, kdy výsledkem štěpení jsou peptidy dlouhé okolo 10 aminokyselin. Velká většina těchto peptidů je dále v cytoplazmě štěpena na volné aminokyseliny, část z nich je ale TAP transportéry

přenášena dovnitř endoplazmatického retikula. Zde čeká prázdná molekula MHC I, která je za pomoci dalších molekul s tímto peptidem spojena. Následuje průchod Golgiho aparátém a odštěpený váček obsahující MHC I s navázaným peptidem splyne s plazmatickou membránou (exocytóza). Na povrchu buňky se tak objeví část molekuly, jež se původně nacházela v cytoplazmě. Buňky kontrolující, zda jsou peptidy prezentované na MHC I vlastní, nebo cizí, jsou cytotoxické T lymfocyty (Tc). Pokud rozpoznají cizorodý peptid na povrchu vlastní tělní buňky v komplexu s vlastním MHC I (nebo jiný MHC I glykoprotein jako takový), reagují nekompromisně – spustí v této buňce programovanou buněčnou smrt.

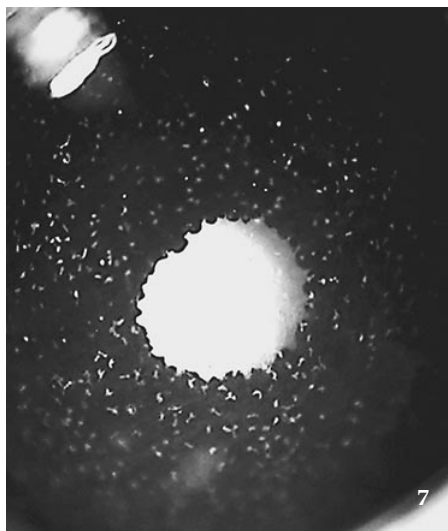
● **MHC II** se nachází pouze na povrchu antigen-prezentujících buněk (B lymfocytů, makrofágů, monocytů a dendritických buněk). Podobně jako v případě MHC I jde o transmembránovou molekulu s vazebným žlábkem schopným vázat antigenní peptidy. Fragmenty bílkovin však v tomto případě nepocházejí z buňky, ale byly původně pohlceny z vnějšího prostředí endocytózou. Na povrchu antigen-prezentující buňky se tak objevuje MHC II s navázaným peptidem extracelulárního původu. V sekundárních lymfoidních orgánech (mízních uzlinách nebo slezině) pak dojde ke zkontrolování vystaveného peptidu pomocným (helper) T lymfocytům (Th), který dokáže rozlišit vlastní od cizího. Na rozdíl od rozpoznání cizorodého peptidu cytotoxickým T lymfocytům na MHC I není buňka prezentující antigen pomocnému T lymfocytu odstraněna (to by organismus ničil buňky svého imunitního systému). Naopak, výsledkem rozpoznání cizorodého peptidu na MHC II je aktivace pomocného T lymfocytu, který může spustit imunitní odpověď. Přítomnost cizorodého peptidu na molekule MHC II totiž znamená infekci kdekoli v těle.

Peptidy navázané na MHC molekulách jsou rozpoznávány T receptory (receptory T lymfocytů složených ze dvou řetězců). Všechny buňky našeho těla by měly mít stejnou genetickou informaci. Pro lymfocyty to však neplatí. Je jim dovoleno kombinovat konkrétní úseky DNA (označené jako V, D a J) do jedinečných kombinací. Unikátní mechanismus tvorby nových genů, typická vlastnost a vlastně i předpoklad adaptivní imunity, se nazývá VDJ rekombinace.

Jak je možné, že T lymfocyt je tak „chytřý“, že pozná, co je konkrétnímu tělu vlastní a co je v něm cizí? Funkcí T receptoru je vazba na komplex peptid/MHC glykoprotein.

V každé buňce, i když není infikována, vznikají desetitisíce různých tělu vlastních peptidů, které tvoří komplexy s MHC I. třídy. Po infekci jsou v buňce přítomny i cizí proteiny, pro účely prezentace naštěpené na peptidy, vždy ale platí, že cizorodých peptidů navázaných na MHC I je mnohem méně než těch vlastních. Molekula MHC nedokáže sama o sobě vybrat a navázat jen cizorodé peptidy, jejich odhalení je tedy hledáním „jehly v kupce sena“. Nalezení je podmíněno přítomností T lymfocytů, které je jednoznačně rozpoznají pomocí specifických T receptorů. Po vazbě T receptoru na komplex MHC I a cizorodého peptidu následuje spuštění apoptózy prověřované buňky – proto je zásadní, aby se v těle nevyskytovaly autoreaktivní T lymfocyty, jež by rozpoznaly tělu vlastní peptid vystavený na MHC I. Takové T lymfocyty by mohly způsobit autoimunitní (vlastní tělo poškozující) reakci. VDJ rekombinace je náhodná, autoreaktivní T lymfocyty tedy nutně vznikají a je potřeba je eliminovat. Selektce T lymfocytů probíhá v brzlíku, který můžeme označit jako „školu“ imunitního systému. Jednotlivé T lymfocyty poskládají svou unikátní variantu genů pro T receptor a v oblasti brzlíku označované jako kortex nejprve testují, zda vůbec dokážou rozpoznat některý z vlastních MHC glykoproteinů. Pokud ne, neprojdou pozitivní selekcí a nepostoupí „na druhý stupeň“ – do oblasti brzlíku zvané medula, kde probíhá negativní selektce. Zde hynou T lymfocyty rozpoznávající vlastní peptidy, avšak část z nich je ponechána jako regulační T lymfocyty. Dovedou potlačit efektorové mechanismy případně uniklých T lymfocytů, které by mohly začít napadat vlastní buňky. Výchova v brzlíku má velmi vysokou úmrtnost – „projde“ jen 1–3 % adeptů na buněčné záchranáře – cytotoxické a pomocné T lymfocyty. V brzlíku se též rozhoduje o specializaci konkrétního T lymfocytu. Pokud v kroku pozitivní selektce rozpozná testovaný T lymfocyt MHC I. třídy, stane se cytotoxickým T lymfocyt (a ponese koreceptor CD8, specializovaný pro MHC I). Pokud rozpozná MHC II. třídy, stane se pomocným T lymfocyt (s koreceptorem CD4 pro MHC II). Na začátku diferenciace jsou T lymfocyty negativní pro CD4 i CD8, pak nesou obě tyto molekuly, nakonec mají na povrchu jen jednu z nich. Výsledkem je vznik následujících typů buněčných specialistů s T receptorem.

● **Pomocné T lymfocyty (Th)** – buňky rozpoznávající svým T receptorem peptidy navázané na MHC II. třídy, s koreceptorem pro MHC II a molekulou CD4. Pomáhají dalším buňkám imunitního systému optimálně plnit jejich funkci. Pokud Th rozpoznají cizorodý peptid, produkují specifické aktivační cytokiny. Mohou také podpořit vývoj B lymfocytů schopných rozeznávat stejný antigen a podpořit tak jeho afinitní maturaci (blíže v kapitole o protilátkách). Dalším případem je aktivace makrofágů – jejich proměna v buňky schopné efektivně likvidovat pohlčené patogeny. Pomocný T lymfocyt pomáhá přímo jen těm buňkám, které mají na povrchu MHC II, nepřímou však produkcí cytokinů ovlivňuje fungování imunitního systému jako celku. Jeho důležitost se projevuje např. u pacientů infikovaných HIV, který napadá zejména Th



7 Oko MHC II-EGFP knock-in myši pod fluorescenční binoklupou. Ve středu je duhovka – okolo ní jednotlivé Langerhansovy buňky a makrofágy lokalizované v rohovce. Langerhansovy buňky „patrolují“ a hlídají, zda do těla nepronikají patogenní organismy. Pokud zaznamenají nebezpečí, přesunou se do lymfatických orgánů a zde komunikují s T lymfocyt, které mohou aktivovat. Snímky J. Černého a N. Malinské, není-li uvedeno jinak

(po vazbě na receptor CD4). Po delší době infekce Th buňky z těla téměř vymizí, u pacientů se rozvine AIDS a funkce jejich imunitního systému se významně zhorší.

● **Regulační T lymfocyty (Treg)** – buňky podobné Th tím, že na povrchu nesou molekulu CD4 a rozpoznávají MHC II. třídy. Na rozdíl od nich však potlačují imunitní odpověď. Překonaly negativní selekci v brzlíku, přestože v medule rozpoznaly tělu vlastní peptidy se střední afinitou. Rozpoznávají tedy vlastní struktury, po interakci s nimi však brání imunitní odpovědi, která by mohla být zaměřena proti tělu samotnému. Treg tak brání rozvoji autoimunity a napomáhají mimo jiné ukončit imunitní reakci po likvidaci patogenu. Z klinického hlediska je podstatné, že některé nádory jsou schopny si tyto buňky „uchochít“ a směřovat jejich inhibiční aktivitu proti klasickým T buňkám, a tím se chránit.

● **Cytotoxické T lymfocyty (Tc)** – T receptorem (spolu s koreceptorem CD8) rozpoznávají MHC I. třídy a na něm prezentované navázané cizorodé peptidy. Pokud je Tc na tělní buňce odhalí, zabijí ji, aby zabránily šíření infekce. Mají k tomu dva hlavní mechanismy. Prvním je exocytóza molekul perforinů, které v cílové buňce vytvoří dočasný pór pro vstup granzymů (serinových proteáz – štěpících proteiny v okolí aminokyseliny serinu) do cytoplazmy. Ty aktivují další proteázy – kaspázy, podílející se na apoptóze. Vzniklá apoptotická tělíska jsou poté pohlčena. Podobný výsledek má druhý způsob, někdy poeticky označovaný jako „polibek smrti“. Jde o těsný mezibuněčný kontakt – na „receptor smrti“ na zabíjené buňce se naváže „ligand smrti“ na povrchu Tc. V reálné situaci je receptorem např. molekula Fas a ligandem FasL (Fas ligand).

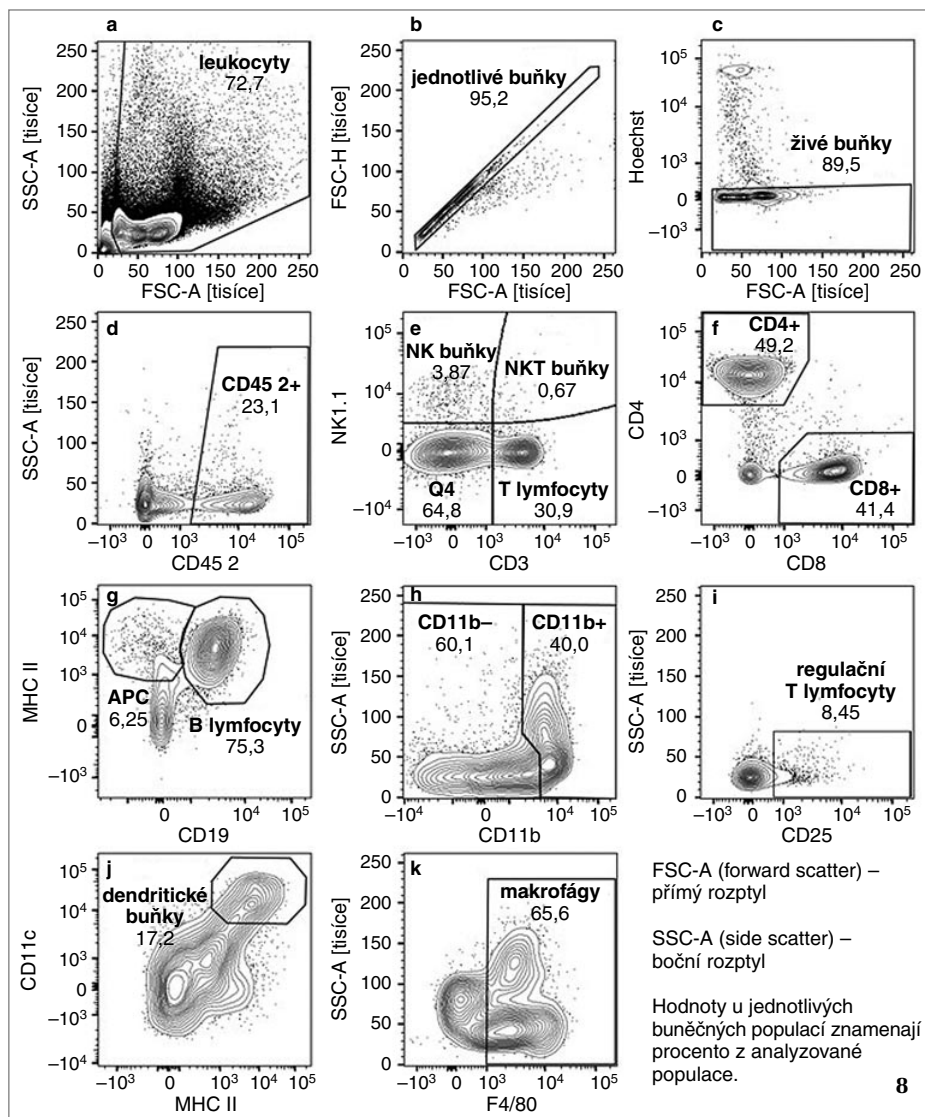
● Mezi lymfocyty patří také **NK buňky** – natural killers („přirození zabijáci“). Patogen může snadno mnoha způsoby uniknout

adaptivnímu imunitnímu systému tak, že zabránil prezentaci svých antigenů – např. zablokováním proteazomu, TAP transportéru, přeměrováním váček s MHC I, zabráněním syntézy MHC I, zacílením MHC I k degradaci. Výsledkem je v podstatě nemožnost odhalit intracelulární parazity. Tato oblíbená strategie řady patogenů by vedla k nekontrolovaným infekcím – ale nevede! Naštěstí máme NK buňky, specializované lymfocyty pro likvidaci buněk, které na povrchu nemají MHC I. třídy. Obrazně řečeno, buňka, která se nedokáže prokázat „buněčnou občankou/nástěnkou“, něco skrývá a nemá mezi ostatními co pohledávat! Každá NK buňka „váží“ na pomyslné misce vah výsledek zapnutí inhibičních i aktivačních signálů a na základě této rozvahy koná (zabíjí), nebo nekoná.

● **Protilátky (imunoglobuliny)**

Podobným způsobem jako T receptory vznikají protilátky (imunoglobuliny) produkované B lymfocyty. Jsou také složeny ze dvou částí, z lehkého a těžkého řetězce, přičemž oba se podílejí na vzniku vazebného místa pro rozpoznávaný antigen. U B lymfocytů se k rekombinační VDJ kombinatorice přidává ještě jeden molekulární mechanismus zvyšující různorodost vazebného místa – dodatečné mutace právě v místech vazby antigenu, umožňující ještě dále optimalizovat specifitu a sílu vazby – afinitní maturace. Protilátky jsou bílkoviny, které se vážou na antigeny bez nutnosti jejich prezentace – typicky cizorodou molekulu na povrchu patogenního organismu. Antigenů a jejich epitopů může být obrovské množství. Každá bakterie je složena z několika tisíců různých proteinů (a nejen proteinů) a na každém z nich mohou být desítky epitopů. Patogenních bakterií mohou být stovky druhů. Kromě bakterií musí náš imunitní systém umět rozpoznat prvky, hlísty, kvasinky a také viry, které navíc rychle mutují a mění své povrchové antigeny, např. v případě chřipky každý rok vytvářejí unikové varianty (dokonce kombinací lidské, prasečí a ptačí chřipky). Vzhledem k funkci protilátek je jejich struktura evolučně optimalizována. Tvar základního stavebního prvku protilátky připomíná písmeno Y a tvoří jej dva těžké a dva lehké řetězce spojené disulfidickými můstky. Základní modul může fungovat v tomto uspořádání, nebo dále vytvářet dvojice, případně i pětice a šestice (pentamery a hexamery připomínající sněhovou vločku). Je zřejmé, že pentamerní struktura obsahuje 10 vazebných míst, což zvyšuje sílu vazby celé protilátky na antigen s více epitopy (např. na povrch virionu nebo bakterie). Těto mnohonásobné vazbě říkáme avidita, na rozdíl od síly vazby jednoho vazebného místa, kterou označujeme pojmem afinita. Typ (izotyp) protilátky tvořící pentamer se označuje IgM, protilátky izotypů IgG, IgD a IgE (ten byl již zmíněn v souvislosti s bazofily a žírnými buňkami) tvoří monomer (váže dva antigeny), IgA (varianta protilátek sekretovaná na povrch sliznic) má dimerní uspořádání.

Protilátky jsou produkovány B lymfocyty. Již jsme si popsali sofistikovanost VDJ rekombinace a afinitní maturace. Mezi našimi buňkami jsou výjimečné tím, že je jim dovoleno mutovat – naštěstí jen v přísně omezené oblasti genetické informace. Dále patří mezi nemnoho buněčných typů, které



8 Analýza dat z průtokové cytometrie spočívá v tzv. gatování pozitivních nebo negativních signálů různých kombinací markerů. Nejprve si oddělíme populaci buněk od signálu menších událostí (obr. a) a vybereme si pouze buňky, které byly v proudu kapaliny samy – singlety (b). Nebudeme tak analyzovat kombinaci markerů dvou nebo více buněk jako jednu událost. Dále pomocí jaderného barvení vybereme pouze živou část buněk (c). Zde byl použit Hoechst, který se váže do žlábků DNA, ale neprostupuje membránou, do živých buněk se nedostane. Jako první si poté „zogatujeme“ populaci všech imunitních buněk – těch, které exprimují marker CD45 (d). Z nich můžeme rozlišit T lymfocyty, NK buňky, NKT buňky (kombinují vlastnosti T lymfocytů a NK buněk, plní unikátní roli propojující vrozenou a adaptivní imunitu) a zbylou negativní populaci, a to pouze dvěma markery – CD3 (pro T lymfocyty) a NK1.1 (značí NK buňky; e). Z populace T lymfocytů jsme schopni rozeznat CD8+ cytotoxické T lymfocyty a CD4+ pomocné T lymfocyty (f). Z pomocných T lymfocytů můžeme dále identifikovat CD25+ T lymfocyty, které by měly být z velké části regulačními T lymfocyty (i). Z populace negativní na markery CD3 a NK1.1 dokážeme s využitím CD19 a MHC II určit populaci B lymfocytů (exprimují oba markery) a populaci ostatních antigen-prezentujících buněk

(APC, exprimují pouze MHC II; g). Marker CD11b nám pak pomáhá rozpoznat další populace buněk (h). Z CD11b negativních buněk pomocí CD11c a MHC II určíme dendritické buňky (j), naopak z CD11b pozitivních pomocí F4/80 velkou část makrofágů (k). Použitím 11 protilátek s různými fluorofory a fluorescenčního jaderného barvení jsme tedy byli schopni určit až 9 buněčných populací vyskytujících se ve slezině. Z archivu katedry buněčné biologie PŘF UK

exprimují MHC II. třídy, a dostávají tedy pomoc od Th lymfocytů. B lymfocyty vznikají v kostní dřeni a významnou část života tráví v sekundárních lymfoidních orgánech, např. mízních uzlinách, slezině nebo lymfatické tkáni sliznic a střeva. Specializované B lymfocyty, plazmatické buňky produkující protilátky, jsou pak hlavně v kostní dřeni. Paměťové buňky čekají i několik let na další setkání s patogenem, pro jehož odstranění byly původně vyvinuty. Protilátky produkované B lymfocyty mohou být např. neutralizační, které se naváží na důležitou molekulu patogenu a zablokují její funkci (např. navázání viru na hostitelskou buňku), nebo opsonizační – vazbou označí cizorodou částici pro navázání a aktivaci komplementu nebo pro fagocytózu neutrofilním granulocytům či makrofágem.

Pro adaptivní imunitní odpověď je důležitá paměť, a tedy i vznik a dlouhodobé pře-

žívání paměťových buněk (T i B lymfocytů). Při primární infekci patogenem, kdy se organismus setkává s konkrétním patogenem vůbec poprvé, jsou aktivovány specifické klony naivních lymfocytů. Dojde k masivnímu namnožení těchto buněk a po odstranění patogenu jich většina zemře. Malá část se však stane paměťovými buňkami. Pokud se organismus setká se stejným patogenem opakovaně, dojde k jejich aktivaci a výraznému urychlení adaptivní imunitní odpovědi. Paměťové buňky jsou naprogramované k rychlé aktivaci a dělení. Pokud tedy onemocníte a nemoc trvá jen několik dní, s největší pravděpodobností jde o patogen, se kterým jste se již v minulosti setkali – ve vašem těle už existují specifické paměťové buňky. U primární infekce trvá rozvoj adaptivní imunitní odpovědi okolo 7–10 dní. Vznik paměťových buněk je velmi důležitý a tento proces je základem očkování. Očkováním napodobujeme primární infekci, která ale nemá klinické projevy nemoci, přesto dojde ke vzniku paměťových buněk, a organismus je tak chráněn před skutečným patogenem při reálné infekci.

Průtoková cytometrie

Všechny výše zmíněné typy buněk můžeme v organismu detekovat různými metodami, neefektivnější z nich je ale průtoková cytometrie, vzhledem k možnosti analýzy velkého množství vzorku i velkého množství buněčných typů zároveň, jak popisuje citovaný článek na str. 21–24 této Živy.

Můžeme tak sledovat výskyt jednotlivých buněčných typů v krvi (i ostatních tkáních) a odhalit např. přítomnost parazita skrze zvýšenou přítomnost eozinofilních granulocytů – eozinofilii. Pomocí průtokové cytometrie na vzorku krve může být zjištěna nákaza HIV, který napadá pomocné T lymfocyty a vede k jejich postupnému úbytku. Pokud tedy vzorek krve analyzujeme na přítomnost CD4+ a CD8+ T lymfocytů a jejich poměr se zásadně blíží k CD8+ cytotoxickým T lymfocytům, může to svědčit o úbytku CD4+ pomocných T lymfocytů a možné nákaze HIV. Velké využití má metoda i ve výzkumu. Můžeme zkoumat např. specifické odpovědi vůči patogenům, kdy sledujeme frekvence jednotlivých buněčných populací imunitních buněk po nákaze, nebo třeba vývoj T lymfocytů v brzlíku, které postupně procházejí negativním stadiem pro CD4 a CD8 koreceptory přes double pozitivní stadium s expresí obou koreceptorů (podrobněji dříve v textu) až po single pozitivní stadium, kdy si na základě schopnosti rozpoznání MHC I. nebo II. třídy T lymfocyt zvolí finální expresi jednoho z koreceptorů.

Imunitní systém je fascinující součástí lidského těla, která díky stovky milionů let probíhajícímu boji s patogeny vyvinula sofistikovaný systém navzájem koordinovaných buněčných a molekulárních zbraní. Imunologie je mimořádná vědní disciplína, která dnes využívá metodické přístupy umožňující studovat imunitní mechanismy v podstatě bez omezení a kompromisů. Důležitou roli zde určitě hraje průtoková cytometrie.

Text vychází z přípravné brožury pro 54. ročník Biologické olympiády (Balázová a kol. 2019).