

Nobelova nagrada za fiziologijo in medicino za leto 2011 podeljena za dosežke na področju imunologije

Alojz Ihan in Sanja Stopinšek



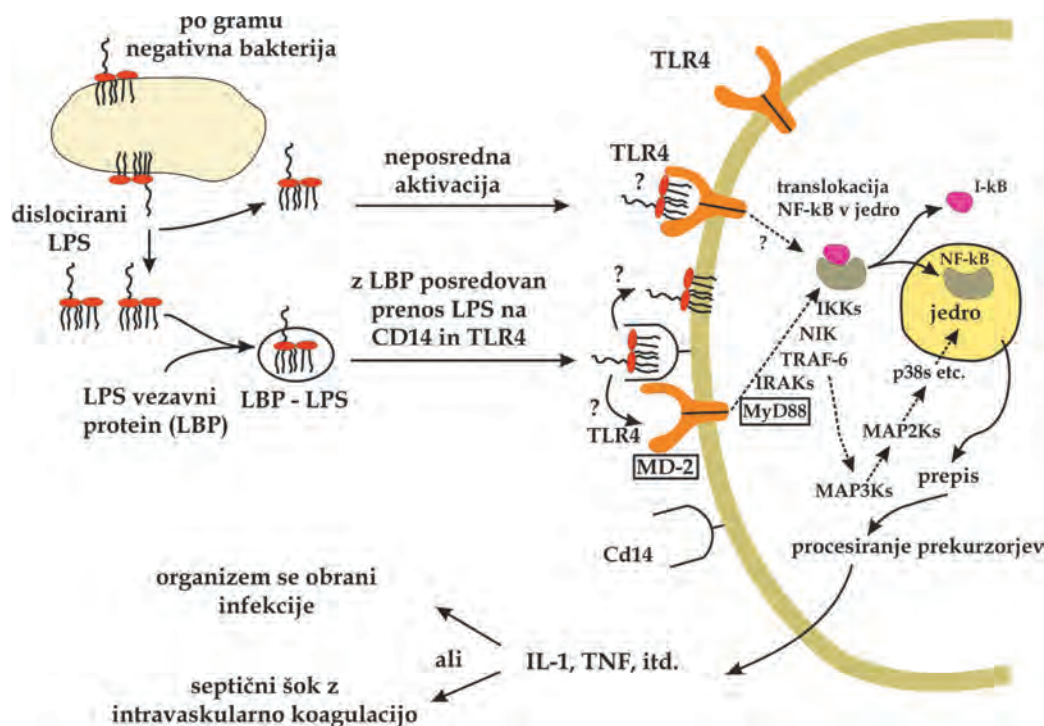
Nobelovi nagrajenci za fiziologijo in medicino za leto 2011: Bruce Beutler, Jules Hoffmann in Ralph Steinman.

Trije letošnji Nobelovi nagrajenci za medicino – Američan Bruce Beutler, Luksemburčan Jules Hoffmann in Kanadčan Ralph Steinman – so s svojimi dosežki na področju imunologije lepo sklenili krog z odkritji, ki so omogočila boljše razumevanje ter nove obrambne strategije proti okužbam in uspešno obvladovanje avtoimunskega odziva organizma z novimi biološkimi zdravili.

Bruce Beutler, ki je vodja oddelka genetike na Scrippsovem raziskovalnem inštitutu La Jolla v Kaliforniji, in Jules Hoffmann, ki je raziskovalni direktor in član upravnega odbora Nacionalnega centra za znanstvena raziskovanja v Strasbourgu, sta prva izolirala dejavnik tumorske nekroze (TNF), to je osrednjo signalno molekulo, ki po bakterijski okužbi alarmira imunski sistem. Poleg tega sta odkrila tudi receptor (senzor) za lipopolisaharid (LPS), ki ga imajo imunske celice, da prepoznajo bakterijsko okužbo. Oboje je del verižnega procesa, ki

se začne z vstopom človeku nevarne bakterije v organizem. Ta povzroči vzdraženje omenjenega receptorja za LPS, posledično pa nastane TNF. Pri manjših okužbah je to običajni način aktiviranja imunske obrambe organizma. V primeru obsežnejše okužbe in zastrupitve krvi z bakterijami pa taisti TNF uniči žile, zato nastanejo obsežne otekline in človek lahko dobesedno izkrvavi navznoter in umre zaradi padca krvnega tlaka in zastoja srca. To stanje imenujemo septični šok in je med pogostejšimi vzroki smrti.

Tretji prejemnik, 30. septembra leta 2011 umrlí Ralph Steinman, profesor na univerzi Rockefeller v New Yorku, pa je prvi odkril dendritične celice, ki imajo na sebi že omenjene senzorje (receptorje TLR) za različne molekule, ki pripadajo bakterijam, virusom, glivam ali parazitom. S temi senzorji celice prepoznajo, za katero okužbo gre (virusno,



Slika 1: Interakcija po vdoru po Gramu negativnih bakterij v telo: Ob razpadu bakterij se sprostijo bakterijski lipopolisaharidi (LPS); njegov lipidni del (lipid A) se poveže s plazemskim proteinom LBP, nato se kompleks obeh veže na receptor TLR4 makrofagnih ali dendritičnih celic. Sledi aktivacija genov za vnetne citokine. Po predlogi narisala: Janja Benedik.

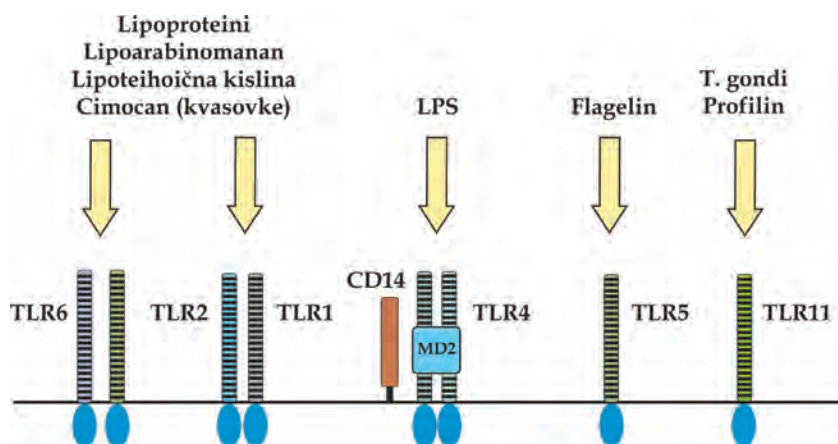
bakterijsko, glivično ali parazitsko), da lahko vključijo pravi način imunskega odziva. Omenjeni mikroorganizmi so med seboj namreč tako različni, da so proti vsakemu od njih potrebna različna »orožja«, podobno kot ni mogoče na enak način loviti miši ali slona ali tune. Tu pa imajo odločilno vlogo dendritične celice kot senzorske celice; med njihovimi senzorji (receptorji TLR) je danes praktično najpomembnejši že omenjeni in receptor za lipopolisaharid (TLR4), ki je tudi ena od glavnih tarč pri razvoju novih bioloških zdravil.

Zaradi opisanega razumevanja vnetnih mehanizmov pri zastupitvi krvi so raziskovalci na podlagi teh odkritij izdelali številna sodobna biološka zdravila, ki preprečujejo neprijetno ali celo smrtno verigo vnetja, ki

se začne z bakterijsko okužbo in konča s septičnim šokom; med prvimi tovrstnimi zdravili je bilo protitelo proti TNF (infliximab), ki neredko skoraj čudežno ustavi hude oblike Cronove bolezni, revmatoidnega artritisa in drugih avtoimunih bolezni.

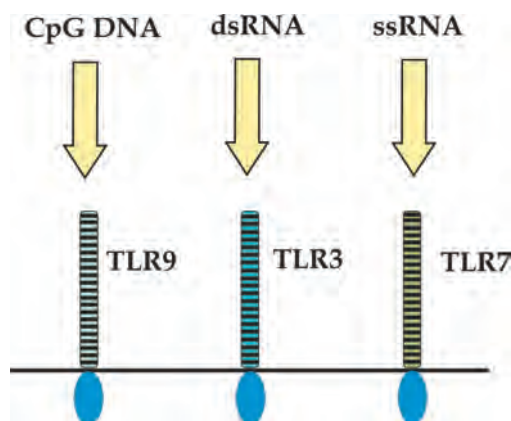
Začne se vedno z vdorom mikrobov v organizem – okužbo

Okužba je proces, pri katerem mikrobi (na primer bakterije) vdrejo v telo, kjer se razmnožujejo. Posledica je moteno in nato tudi okvarjeno delovanje tkiv in organov in razvoj bolezenskih znakov. Zato vsi večcelični organizmi preprečujejo vdiranje mikrobov v notranjost tkiv in organov. Odpornost proti mikrobom v organizmu najprej omogočajo različne fizikalne in kemične pregrade – koža, sluznice in njihovi



Slika 2: Receptorji TLR, ki so senzorji za bakterijske molekule.

Po predlogi narisala: Janja Benedik.



Slika 3: Receptorji TLR, ki so senzorji za virusne molekule.

Po predlogi narisala: Janja Benedik.

protimikrobni mehanizmi (na primer kislina v želodcu, zaklopke v mehurju, peristaltika v črevesju, sluz in ciliarni transport v dihalih). Vendar so nekatere (patogene) vrste mikrobov razvile načine (tvorba toksinov, encimov), da kljub pregradam vdirajo v organizem. Zato imajo vsi kompleksni organizmi razvit imunski sistem. Imunski sistem sestavljajo celice, tkiva in organi, ki omogočajo uničevanje in odstranjevanje mikrobov, kadar preko pregrad (koža, sluznice) vdrejo v notranjost organizma. Čeprav je delovanje imunskega sistema zapleteno, je njegova osnovna logika preprosta: prepoznati tujek, mobilizirati obrambne celice in izoblikovati ustrezno vrsto imunskega odziva, ki bo uspešno odstranil tujek. Pri

tem morajo biti imunski odzivi ustrezno izoblikovani glede na naravo tujka (bakterija, virus, parazit, gliva), pa tudi primerni glede na mesto okužbe (koža, sluznica, notranji organi) in obsežnost okužbe (lokalna ali sistemska okužba). Posebej pomembno je, da so imunski odzivi in posledično vnetje uravnavani tako, da organizmu ne povzroči pretirane škode - namen teh odzivov je preživetje organizma, ne pa uničenje tujka za vsako ceno.

Med evolucijo so se razvile različne vrste imunskih celic in imunskih odzivov, ki se med seboj razlikujejo predvsem glede prepoznavanja nevarnosti in posledično mehanizmov, s katerimi povzročijo odstranitev tujkov. Način uničevanja bakterij je namreč drugačen kot način odstranjevanja virusov ali parazitov. Zato poznamo različne vrste imunskih odzivov, ki jih klinično opazimo kot različne vrste vnetnih (oziroma preobčutljivostnih, kadar gre za patologijo) reakcij. V vsakem primeru pa mora biti ob okužbi imunski odziv po eni strani dovolj učinkovit za ustavljanje okužbe, po drugi

strani pa dovolj natančno uravnavan, da vnetje povzroči čim manjšo škodo in čim manj časa moti normalno delovanje organizma.

Zato so se med evolucijo razvile različne vrste imunskih celic, ki se med seboj razlikujejo predvsem glede mehanizmov, s katerimi razlikujejo tujke od lastnih telesnih celic, pa tudi glede mehanizmov, s katerimi povzročijo odstranitev tujkov. Osnovne naloge imunskega pa so:

- Receptorsko prepoznavanje telesu tujih molekul (to je kompleksnih molekul, ki niso proizvod lastnega genoma) in s tem tudi prepoznavanje mikroorganizmov.
- Izbira in razvoj imunskega odziva in vnetja, ki ustreza vrsti okužbe (virusi, paraziti, znotraj- in zunajcelične bakterije, glive) in tkivu, kjer poteka okužba (sluznica, koža, kri, jetra, možgani, oko ...). Ena od pomembnih vrst imunskega odziva proti tujkom je tudi tolerančni odziv.
- Napad na tujek in njegovo odstranjevanje – spremljajoče vnetje ob tem okvarja normalno dejavnost tkiv in organov.
- Imunski spomin kot posledica razmnoženih in diferenciranih imunskih celic, ki ob kasnejšem srečanju z enakim tujkom obnovijo enako vrsto imunskega odziva, kot se je izoblikovala ob prvotni okužbi.

Glavne senzorske celice za razlikovanje različnih vrst tujkov so makrofagne celice in iz njih nastale dendritične celice, ki se nahajajo po vseh tkivih in prepoznavajo tujke s površinskimi receptori za prepoznavanje vzorcev (PRR, ang. pattern recognition receptors). Med PRR sodijo Tollu podobni receptorji (TLR), lektini tipa C in znotrajcelični NOD-u podobni receptorji (NLR).

PRR se vežejo s takimi mikrobnimi molekulami, ki se v evoluciji niso bistveno spreminjale in so skupne večjim skupinam patogenih mikrobov – imenujemo jih molekule PAMP (PAMP, ang. pathogen associated molecular patterns). Molekule PAMP (na primer lipopolisaharid, peptidoglikan, dvojnovijačna RNA) so običajno nahajajo v notranjosti mikrobov in se sprostijo v okolico šele ob njihovem razpadu. Navzočnost molekul PAMP je pogoj, da se dogodi prvi val imunskega odziva, to je aktivacija fagocitnih celic, čemur sledi vnetje in aktivacija drugega, specifičnega vala imunskega odziva, katerega nosilci so limfociti. Pri naravni okužbi so vir molekul PAMP razpadli mikrobi, pri cepljenju pa funkcijo molekul PAMP opravljajo adjuvansi. Brez delovanja molekul PAMP na receptorje PRR namreč ne pride do aktivacije fagocitnih celic, pospešene fagocitoze, makrofagnega predstavljanja antigenov limfocitom T in migracije makrofagov v področne bezgavke. V cepivih so kot adjuvansi lahko uporabljene kar naravne mikrobnne molekule PAMP (na primer Freundov adjuvans, ki vsebuje mrtve mikobakterije), sintetski analogi naravnih molekul PAMP (na primer AS04, ki je analog polisaharida šigel) ali pa snovi, ki aktivirajo makrofage na druge načine (kovinski oksidi) in ne z vezavo na receptorje PRR. Receptorska prepoznavna značilnih mikrobnih molekul PAMP je torej signal, da fagocitne celice (nevtrofilci, monociti, makrofagi) začnejo požirati delce in hkrati izločati prve vnetne mediatorje, na primer TNF in interleukin 1 (IL-1) in TNF.

Zgradba TLR

Receptorji TLR so membranski glikoproteini tipa 1. Glede na podobnost citoplazemske domene (C-terminalni del proteina) jih uvrščamo v naddružino, v katero uvrščamo tudi receptorje za interleukin 1. Domena je znana kot domena Toll-interleukinskega receptorja oziroma domena TIR (angl. Toll-interleukin receptor). Receptorji so se-

stavljeni še iz transmembranske regije, ki prehaja bodisi skozi citoplazemsko membrano ali pa skozi membrano endosomov. N-terminalna domena receptorjev je se-

stavljena iz 19 do 25 ponovitev z levcinom bogatih sekvenc (ang. leucine-rich repeat, LRR). Pri receptorjih, ki ležijo na celični površini, ta domena veže molekule zunaj

Razpredelnica 1: Do zdaj znani receptorji TLR pri človeku in njihove značilnosti.

Receptor	Ligand	Kje se nahaja?	Celica
TLR1	bakterije – peptidoglikan, lipoproteini	celična površina	monociti/makrofagi, dendritične celice, limfociti B
TLR2	bakterije, glive – cimosan, živalske celice	celična površina	monociti/makrofagi, mieloidne dendritične celice, celice mast
TLR3	virusi – dvojnovijačna RNK, po Gramu negativne bakterije – LPS, živalske celice	v citoplazmi	dendritične celice, limfociti B
TLR4	živalske celice	celična površina	monociti/makrofagi, mieloidne dendritične celice, celice mast, intestinalni epitelij
TLR5	bakterije – flagelin	celična površina	monociti/makrofagi, dendritične celice, inestinalni epitelij
TLR6	mikoplazme – lipopeptidi	celična površina	monociti/makrofagi, limfociti B, celice mast
TLR7	enovijačna RNK	v citoplazmi	monociti/makrofagi, dendritične celice, limfociti B
TLR8	enovijačna RNK	v citoplazmi	monociti/makrofagi, dendritične celice, celice mast
TLR9	bakterije	v citoplazmi	monociti/makrofagi, dendritične celice, limfociti B
TLR10	ni znano	celična površina	monociti/makrofagi, limfociti B
TLR11	<i>Toxoplasma gondii</i>	celična površina	monociti/makrofagi, jetrne, ledvične in celice mehurja

celice (zunajcelična domena). Pri receptorjih TLR3, 7, 8 in 9 pa je N-terminalni del v notranjosti oziroma v lumnu endosomov, zato ji pravimo tudi luminodomena ali luminalna domena.

TLR in njihovi ligandi

Prvi je bil odkrit receptor TLR4, ki prepozna lipopolisaharid (LPS), sestavino v zunanem sloju membrane po Gramu negativnih bakterij. TLR2 prepozna v kombinaciji s TLR1 ali TLR6 različne bakterijske sestavine, kot so peptidoglikan, lipopeptidi in lipoproteini po Gramu pozitivnih in negativnih bakterij, lipoteihoično kislino po Gramu pozitivnih bakterij, lipopeptid mikoplazem, glikolipide *Treponema maltophilum*, atipični LPS pri neenterobakterijah, sidro GPI pri protozojih ter protein ovojnice pri virusih. Prav tako se na TLR2 veže cimosan, pripravek iz celične stene kvasovk. Receptor TLR1 veže triacil lipopeptide pri bakterijah. Receptor TLR5 prepozna flageлин, ki je proteinska sestavina v bakterijskih bičkih. Vsi naštetih receptorji ter TLR10 so vsidrani v citoplazemsko membrano. Receptorji TLR3, 7, 8 in 9 pa se nahajajo v membrani endosomov in prepoznavajo nukleinske kisline. TLR3 prepozna virusno dvoverižno RNA ali dsRNA, medtem ko TLR7 in 8 prepoznata enovijačno RNA ali ssRNA. TLR9 posreduje pri prepoznavanju bakterijskih, virusnih in protozojskih nemetiliranih 2'-deoksiribo citidin-fosfatgvanozin (CpG) motivov DNK. Receptor TLR11 pa prepozna sestavine uropatogenih bakterij ter profilinu podobne molekule pri protozojih.

Signalna pot

Vezava liganda na receptor povzroči dimerizacijo receptorjev TLR, ki je lahko homodimerizacija (povezava dveh enakih TLR) ali heterodimerizacija (povezava dveh različnih TLR). Zunanja domena prepozna ligand, citoplazemska domena TIR pa posreduje začetek signalizacijske poti, ki pri-

vede do prehoda transkripcijskih dejavnikov v jedro in izražanja vnetnih citokinov ali interferonov tipa 1. Prenos signala zagotavljajo adapterski proteini. Poleg sinteze vnetnih citokinov sproži signaliziranje preko receptorjev TLR tudi dozorevanje dendritičnih celic (DC), ki so skupina antigen predstavljajočih celic. Dozorevanje dendritičnih celic je nujno za sprožitev pridobljenega imunskega odziva. Receptorji TLR torej povezujejo prirojeno in pridobljeno imunost.

V grobem ločimo dve različni signalizacijski poti, ki se ločita po adapterskem proteinu, ki prenese signal takoj po dimerizaciji receptorja. Najbolj pogosta pot je pot, ki je odvisna od diferenciacijskega mieloidnega proteina 88 ali MyD88 (angl. myeloid differentiation primary-response protein 88). Pri poti, ki ni odvisna od MyD88, pa sodeluje adapterski protein TRIF (angl. TIR-domain-containing adaptor protein inducing INF- β), znan tudi kot TICAM-1 (angl. TIR-domain-containing molecule 1), zato ji pravimo tudi od TRIF odvisna pot.

Od MyD88 odvisna pot

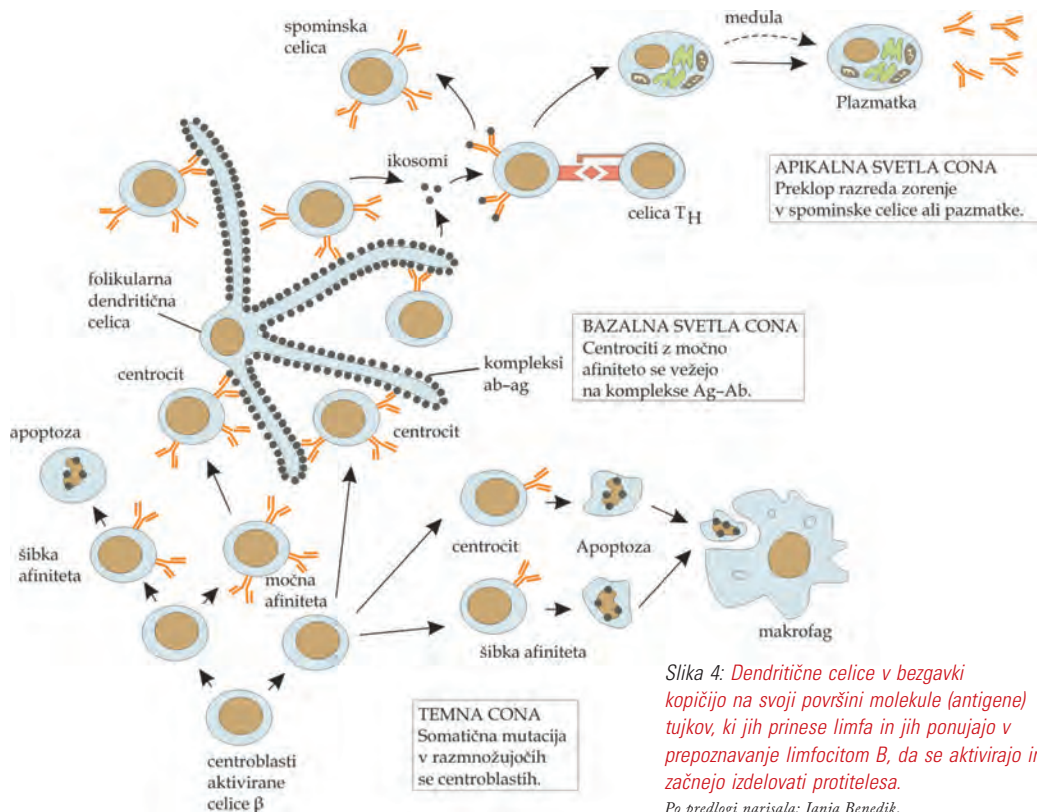
MyD88 je osrednji adapterski protein, ki sodeluje pri prenosu signala preko vseh receptorjev TLR, razen preko TLR3. Na C-terminalnem delu ima domeno TIR, na N-terminalnem delu pa domeno smrti (DD, angl. death domain). Loči ju kratko povezovalno zaporedje. MyD88 sodeluje pri prenosu signala preko receptorjev TLR1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 in 10. Pri receptorjih TLR1, 2, 6 in 4 se MyD88 veže le ob prisotnosti adapterskega proteina Ma1/TIRAP (angl. MyD88 – adaptor-like/TIR-domain-containing adaptor molecule). Na domeno TIR adapterja Ma1/TIRAP se nato s svojo domeno TIR veže protein MyD88. Domena smrti proteina MyD88 se poveže z domeno smrti kinaze IRAK4 (kinaza, povezana z receptorjem IL-1, angl. IL-1R-associated kinase 4). Ta povezava nato omogoči vezavo IRAK1. Kinaze IRAK imajo domeno

smrti na N-terminalnem delu. Osrednja regija ima kinazno aktivnost, C-terminalni del pa je bogat z aminokislinama treonin in serin, zato jih uvrščamo v skupino serin/treonin kinaz. IRAK4 povzroči fosforilacijo in s tem aktivacijo IRAK1, ki se avtofosforilira. Nanj se nato veže TRAF6 (faktor oziroma dejavnik, povezan z receptorjem za TNF, ang. TNF receptor-associated factor 6). Kompleks proteinov IRAK1-TRAF6 se sprosti z receptorja in reagira s kompleksom TAK1 (s transformirajočim rastnim dejavnikom β aktivirana kinaza 1, angl. transforming growth factor- β -activated kinase 1), TAB1 (protein, ki veže TAK1, ang. TAK1-binding protein), TAB2 in TAB3 na citoplazemski membrani. TAK1, TAB2 in TAB3 se fosforilirajo, IRAK1 se razgradi. Ostali kompleks se v citosolu poveže z ubikvitin-ligazama UBC13 (angl. ubiquitin conjugating enzyme 13) in

UEV1A (ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1). To vodi do ubikvitiniranja TRAF6 in posledično aktivacije TAK1. Aktivirana TAK1-kinaza fosforilira kompleks IKK (inhibitorni kapa B (I κ B) kinazni kompleks, angl. inhibitor of nuclear factor- κ B (I κ B)-kinase complex). Sestavlja ga podenoti IKK α , IKK β ter regulatorna podenota IKK γ oziroma NEMO (angl. NF- κ B essential modulator). IKK kompleks nato fosforilira I κ B in ga označi za poliubikvitiniranje. I κ B se razgradi, kar privede do sprostitve transkripcijskega dejavnika NF- κ B iz inhibitornega kompleksa in njegov prenos v jedro, kjer sproži prepisovanje od NF- κ B-odvisnih genov.

Od MyD88 neodvisna pot oziroma od TRIF odvisna pot

Po aktivaciji receptorja TLR3 pride do sprožitve od MyD88 neodvisne oziroma od



Slika 4: Dendritične celice v bezgavki kopičijo na svoji površini molekule (antigene) tujkov, ki jih prinese limfa in jih ponujajo v prepoznavanje limfocitom B, da se aktivirajo in začnejo izdelovati protitelesa.

Po predlogi narisala: Janja Benedik.

RIF (angl. TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- β) odvisne poti. TRIF je znan tudi kot TICAM1 (angl. TIR-domain-containing molecule 1). Do aktivacije te poti pride tudi pri receptorju TLR4. To so ugotovili s študijami na makrofagih, ki niso izražali MyD88. Od TRIF odvisna pot aktivacije povzroči zakasneni NF- κ B-odgovor in aktivacijo transkripcijskega dejavnika IRF3 (interferonski odzivni dejavnik 3). IRF3 sproži nastanek IFN (interferona) α in β ter izražanje IFN-inducibilnih genov. Poleg adapterskega proteina TRIF pri odzivu s TLR4 sodeluje še protein TRAM (angl. TRIF-related adaptor molecule), znan tudi kot TICAM2 (angl. TIR-domain-containing molecule 2), ki se veže na TIR domeno TLR4. Preko domene TIR se na TRAM veže še TRIF. N-terminalna domena TRAM se lahko veže s TRAF6 in povzroči aktivacijo transkripcijskega dejavnika NF- κ B. Za aktiva-

cijo od IFN tipa 1 odvisnih genov mora priti do sinteze IRF3. N-terminalna domena proteina TRIF se poveže z netipičnima IKK-kinazama – TBK1 (angl. TRAF-family-member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase 1) in IKK- ϵ . Kinazi fosforilirata IRF3 (angl. IFN-regulatory factor 3), kar privede do dimerizacije. Dimer IRF3 potuje v jedro in sproži prepis genov.

Odkritje TLR in njihovih ligandov je odprlo možnosti za razvoj novih pristopov k zdravljenju različnih bolezni, kot so infekcijske, rakaste, avtoimunske in alergijske bolezni. Ligande TLR uporabljajo pri izboljševanju virusnih in bakterijskih cepiv, imunoterapiji raka in pri alergijskih boleznih, medtem ko bi lahko bili antagonisti TLR ali zaviralci (inhibitorji) TLR odzivov učinkoviti pri zdravljenju endotoksinskega šoka, kot tudi vnetnih in avtoimunskih bolezni.

Seznam in legenda kratic:

AS04. Adjuvanski sistem 04.

CpG. Citozin-fostat-gvanin.

DC. Dendritične celice.

DD. Domena smrti.

DNA. Deoksiribonukleinska kislina.

dsRNA. Dvoverižna RNA.

GPI. Glikozilfosfatidilinozitolne vezi.

IFN. Interferon.

IKK. Inhibitorna kinaza kapa B.

IL. Interlevkin.

IL-1R. Receptor za IL-1.

IRAK. Kinaza, povezana z receptorjem za IL-1.

IRF3. Interferonski odzivni faktor 3.

I κ B. IKK.

LBP. Protein, ki veže LPS.

LPS. Lipopolisaharid.

LRP. Ponovitev, ki je bogata z levcinom.

Ma1/TIRAP. Adapterski protein Ma1/TIRAP.

MD2. Diferencijski mieloidni protein 2.

MyD88. Diferencijski mieloidni protein 88.

NEMO. Regulatorna podenota kompleksa IKK.

NF- κ B. Transkripcijski faktor kapa B.

NLR. Receptorji, podobni NOD.

NOD. Nukleotidna oligomerizacijska domena.

PAMP. Molekulski vzorci patogenih mikroorganizmov.

PRR. Receptorji, ki prepoznajo vzorce patogenih mikroorganizmov.

RNA. Ribonukleinska kislina.

ssRNA. Enoverižna RNA.

TAB. Protein, ki veže TAK1.

TAK. Kinaza, ki jo aktivira TGF- β .

TICAM. Adapterska molekula TLR.

TIR. Domena Toll-interlevkinskega receptorja.

TLR. Receptorji, podobni Tollu.

TNF. Dejavnik tumorske nekroze.

TRAF. Dejavnik, povezan z receptorjem za TNF.

TRAM. Adapterska molekula, povezana s TRIF.

TRIF. Adapterski protein (angl. TIR-domain-containing adapter-inducing IFN- β).

UBC13. Encim 13, konjugiran z ubikvitinom.

UEV1A. Encim E2 varianta 1, konjugiran z ubikvitinom.