

Mezibuněčná komunikace a interakce buněk imunitního systému

Základy buněčné signalizace

I. díl

Povrchové receptory

II. díl

Cytokiny

Lipidové mediátory zánětu

Lukáš Kubala

kubalal@ibp.cz

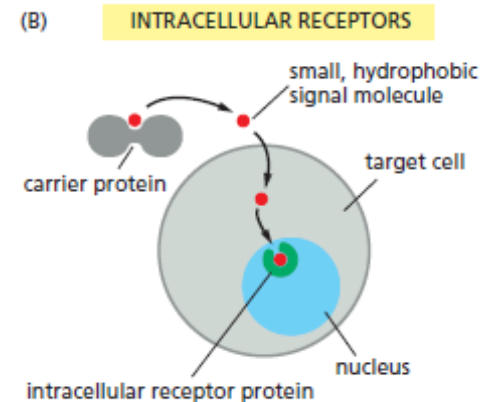
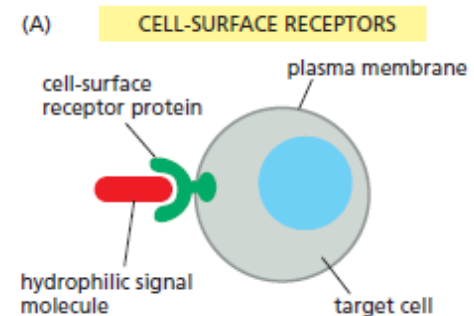
Mezibuněčná komunikace a interakce buněk – buněčná signalizace

Buňky komunikují s okolím prostřednictvím **receptorů** na membráně, které rozpoznávají extracelulárně přítomné molekuly – **ligandy**.

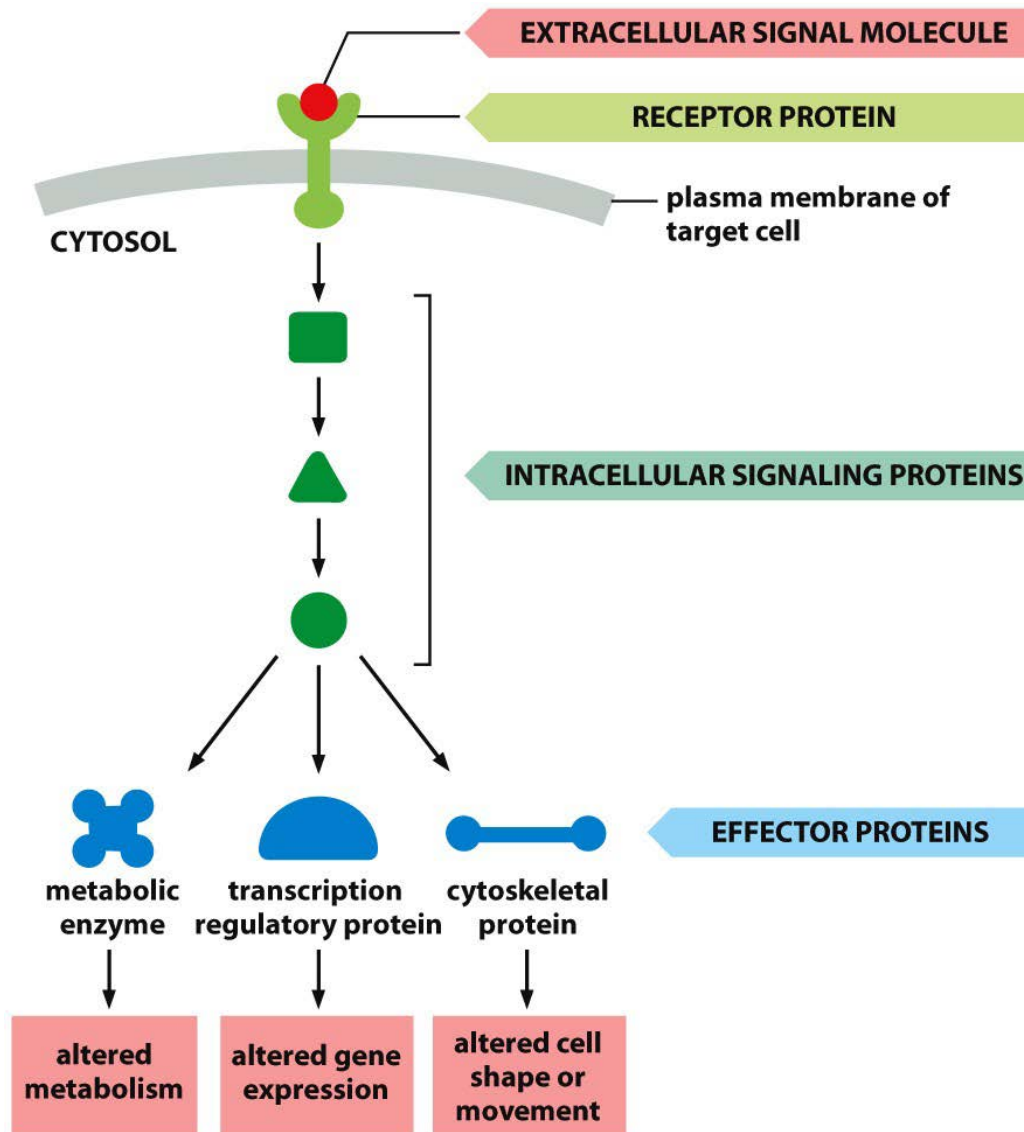
Ligandy mohou být:

- **rozpuštěné** (např. cytokiny)
- **nerozpuštěné** (např. struktury na površích jiných buněk nebo mezibuněčné hmoty)

Další způsoby – např. signální molekuly přecházející přes cytoplasmatickou membránu mají **receptory v cytosolu/jádře**.



Buněčná signalizace přes membránově vázaný receptor - obecně



+ **druzí poslové** - malé molekuly produkované enzymatickými reakcemi nebo uvolňovány iontovými kanály

Figure 15-1 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Základní mechanismy intracelulárního přenosu signálu u buněk imunitního systému

Typy reversibilních změn zajišťujících přenos signálu

1. Změna proteinové konformace
2. Fosforylace / defosforylace proteinů
3. Záměna GDP za GTP

Základní typy přenosu signálu u buněk imunitního systému

1. Receptory spřažené s enzymy nebo přímo s enzymovou funkcí
(Proteinové kinázy jako součást receptorů nebo jako asociované s receptory)
2. Receptory spřažené s G-proteiny
3. Receptory typu iontových kanálů

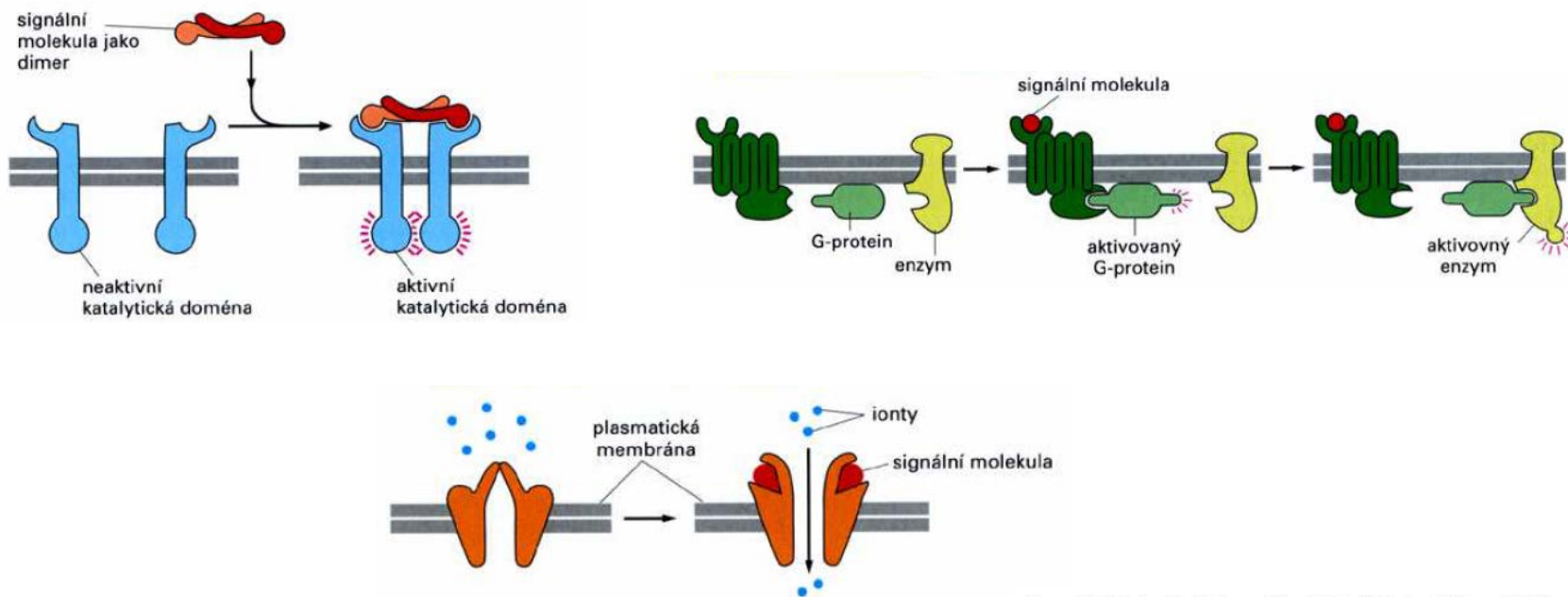


Figure 15-1 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Protein kinázy

Protein kinázy (PK) jsou aktivovány vazbou ligandu na receptor. Následně pak aktivují další intracelulární signální dráhy.

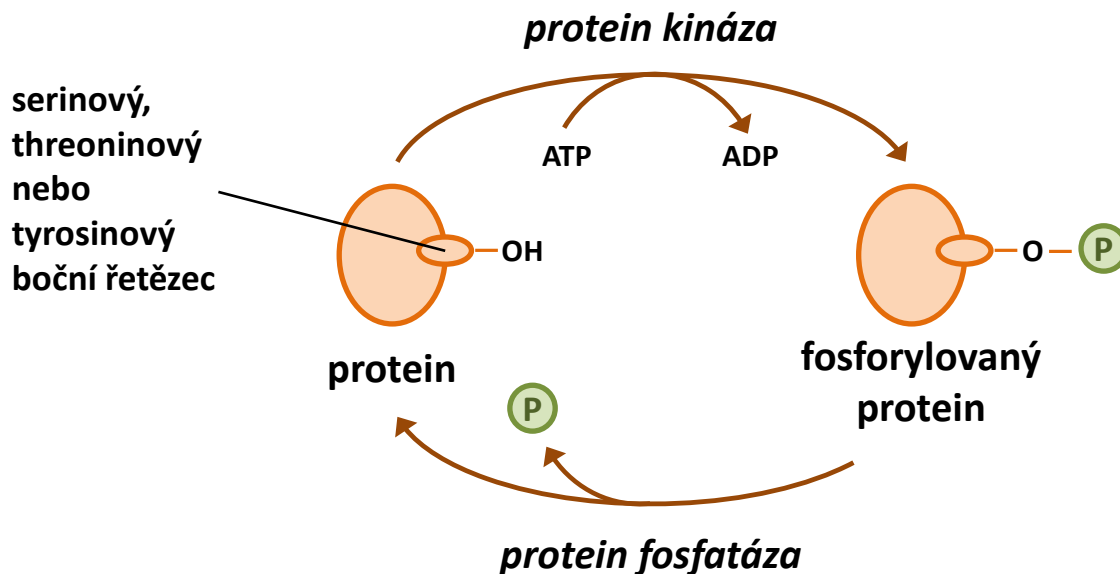
Vztah mezi receptory a PK:

- A) v cytoplasmatické části receptoru je přímo doména s PK aktivitou
- B) intracelulární domény receptoru jsou asociovány s cytoplasmatickými PK

PK a význam fosforylace v přenosu signálů

Fosforylace – navázání fosfátové skupiny díky aktivitě specifických PK; může být jak aktivační, tak inhibiční

Defosforylace – odštěpení fosfátové skupiny pomocí **specifických fosfatáz**; může být jak aktivační, tak inhibiční



G-proteiny

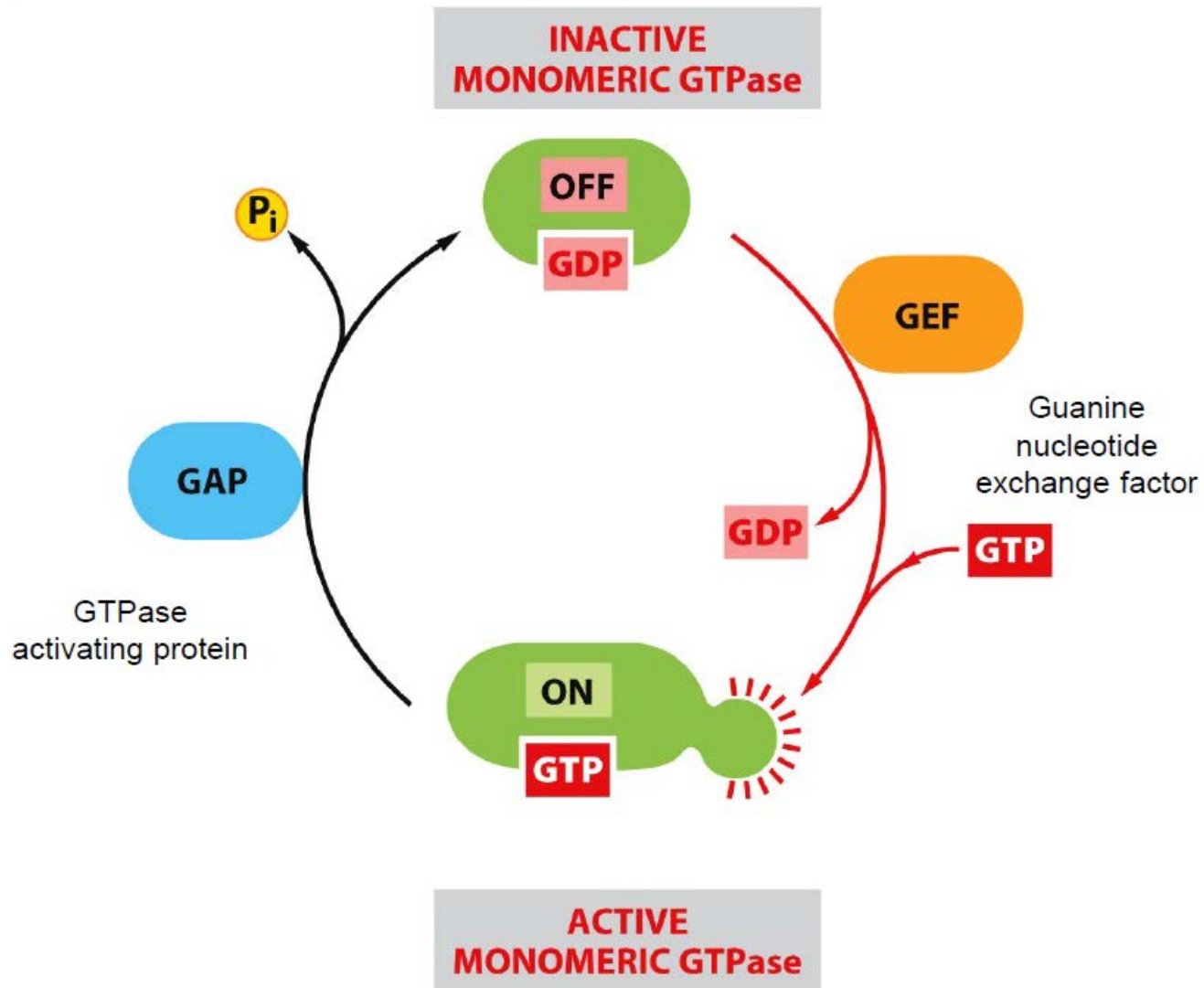


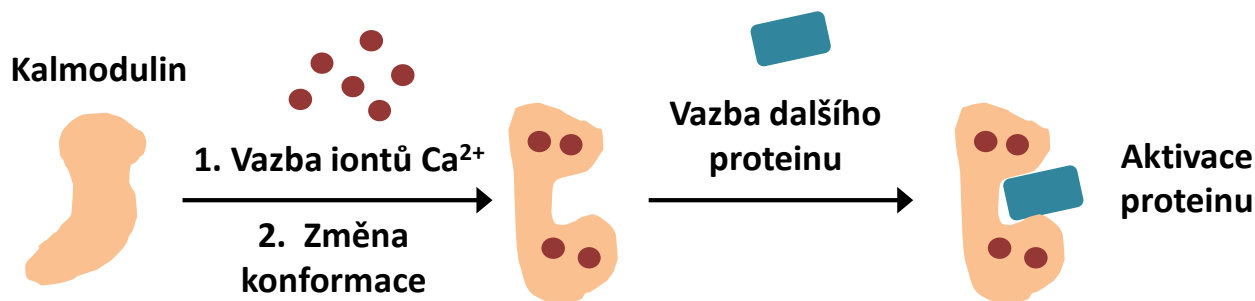
Figure 15-8 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Vápníkové ionty v signálních kaskádách

Důležitým principem v buněčném signálování je **změna intracelulární koncentrace Ca^{2+}** .

Působením druhých poslů, hlavně **inositoltrifosfátu (IP_3)**, dochází k otevírání **iontových kanálů** a zvýšení koncentrace Ca^{2+} .

Ca^{2+} se váží na protein **kalmodulin**. Vazbou Ca^{2+} dochází ke změně konformace kalmodulinu a vytvoření aktivního místa (centra) pro vazbu substrátu. Celý komplex kalmodulin/ Ca^{2+} se váže na regulační proteiny (např. fosfatáza calcineurin) a mění jejich aktivitu.



Přenos signálu přes membránu zprostředkovaný vápníkovými ionty

Fosfolipáza C gamma (PLC- γ) štěpí
fosfatidylinositol bisfosfát (PIP₂)
na diacylglycerol (DAG) a IP₃.

IP₃ otevírá vápníkové kanály uvolňující Ca²⁺ z
endoplasmatického retikula a extracelulárního
prostoru. Ca²⁺ aktivuje kalmodulin.
DAG aktivuje PKC.

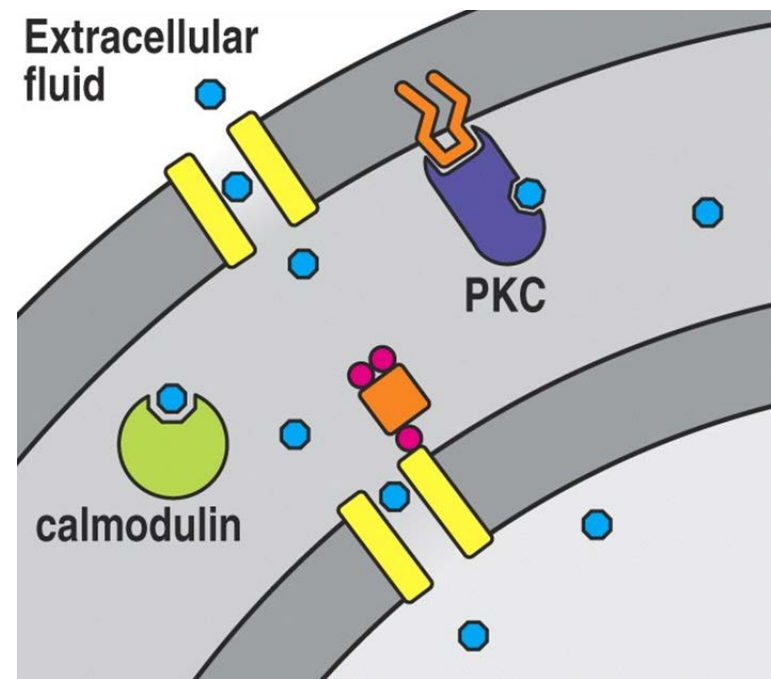
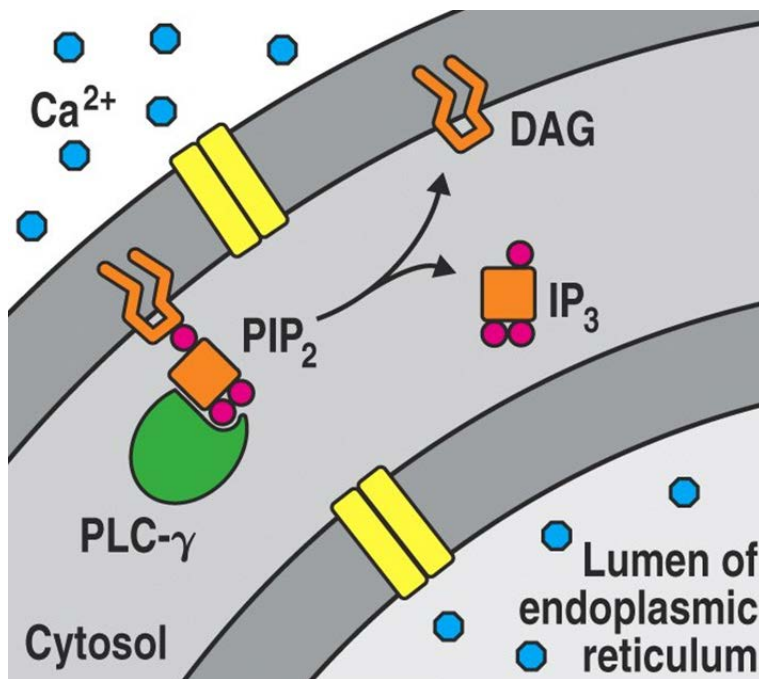


Figure 6-5 Immunobiology, 6/e. (© Garland science 2005)

Vybrané typy povrchových receptorů buněk imunitního systému podle funkce

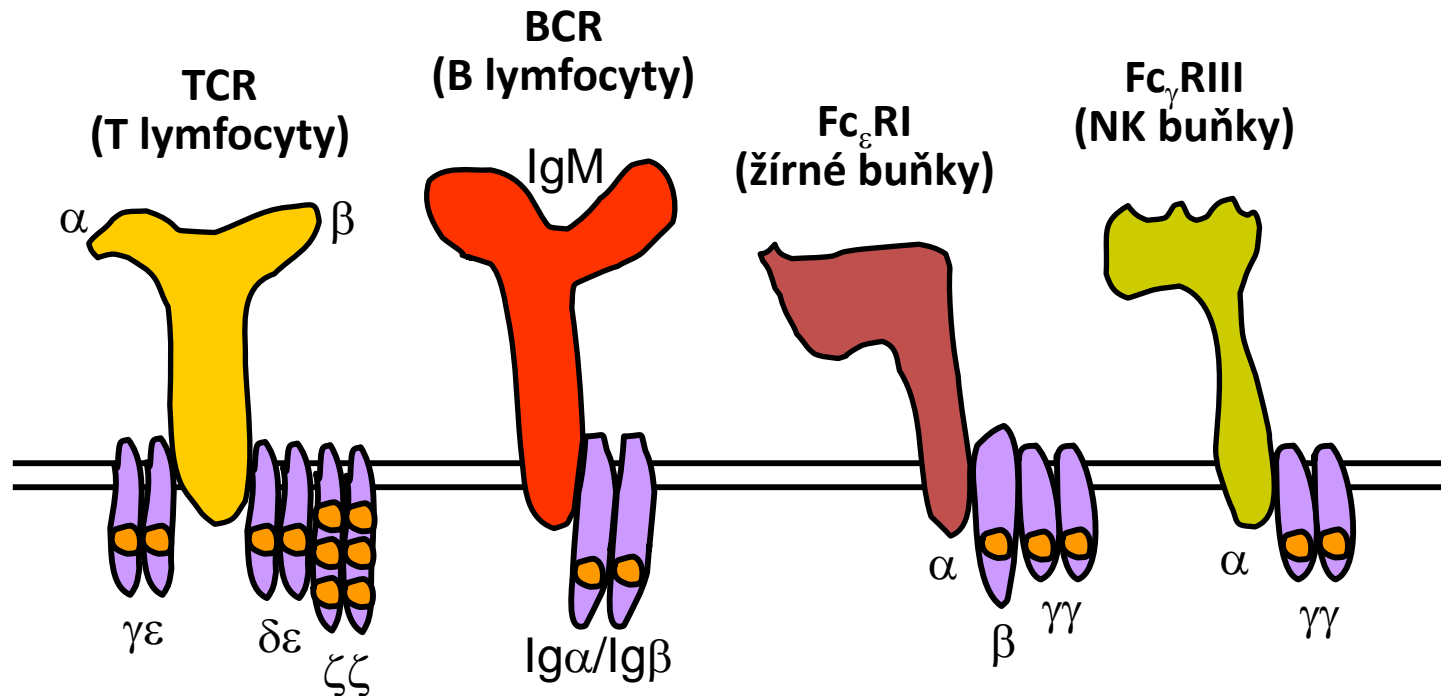
- 1. Immunoreceptory – receptory lymfocytů, NK buněk a žírných buněk**
- 2. Receptory prezentující antigen (MHC receptory)**
- 3. Fas receptory**
- 4. Receptory rozpoznávající struktury charakteristické pro patogeny a poškozené buňky (PRR, „Pattern Recognition Receptors“)**
- 5. Adheziny – adherence a migrace buněk**
 - Integriny
 - Selektiny
 - Adheziny patřící do velké rodiny imunoglobulinů
 - Cadheriny
 - Mucinové receptory

Další
přednáška

Imunoreceptory

Struktura a funkce:

- multiproteinové komplexy klonálně variabilních řetězců vážících antigen (TCR a BCR) nebo protilátku (FcR) a invariantních přídatných řetězců zajišťujících signální funkce



- **ITAM** („Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif“) – funkčně důležité tyrosiny

Průběh signalizace u imunoreceptorů s PK asociovanými s receptory

vazba ligandu na imunoreceptor (TCR, BCR, FcR)



migrace receptorů do lipidových raftů a jejich agregace



zvýšení aktivity asociovaných PK
(u antigenních receptorů se jedná o rodinu tyrosinových kináz Src)



fosforylace ITAM a následná aktivace dalších signálních drah v buňce



změna transkripce genů, stavby cytoskeletu, sekrece látek atd.



defosforylace signální molekuly protein fosfatázami => návrat do původního stavu

Membránové lipidové rafty

Lipidové rafty jsou nezbytné pro signálování TCR, BCR a FcR. Jde o specializované regiony buněčných membrán bohaté na nasycené lipidy a cholesterol. Hojně se zde vyskytují proteiny vázající glykosylfosfatidylinositol (GPI) a PK (např. Src-rodiny).

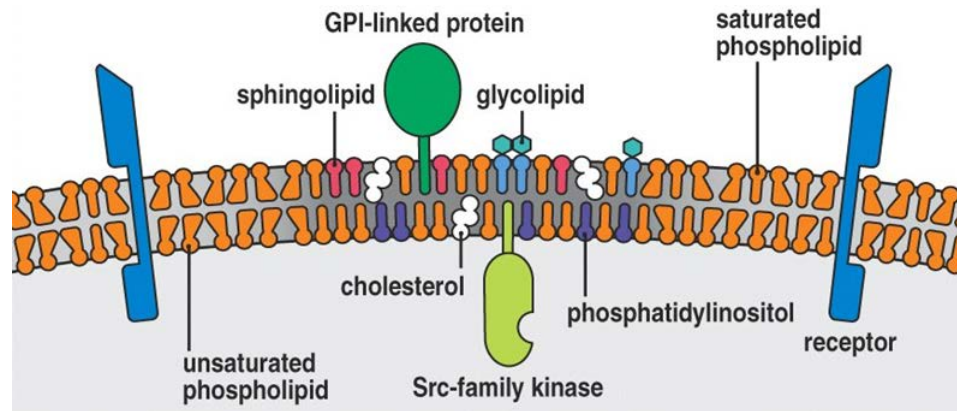


Figure 6-3 Immunobiology, 6/e.
(© Garland science 2005)

Lipidové rafty velmi dynamicky mění strukturu a obsah proteinů. Některé typy receptorů po navázání ligandu migrují do těchto lipidových raftů a agregují zde.

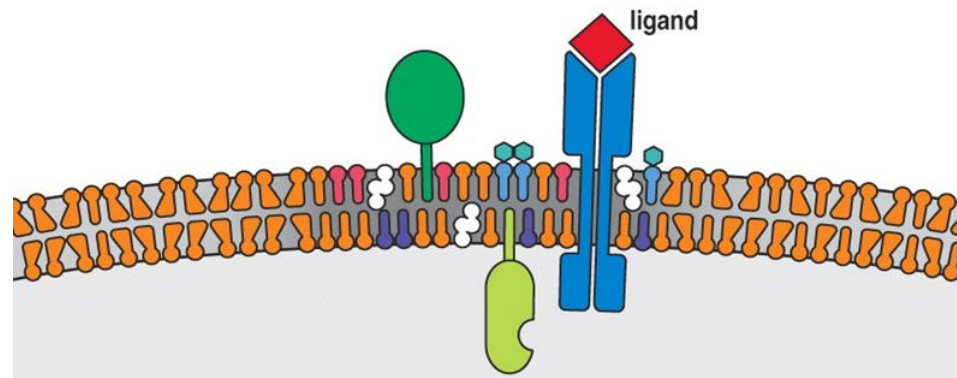


Figure 6-3 Immunobiology, 6/e.
(© Garland science 2005)

TCR receptor

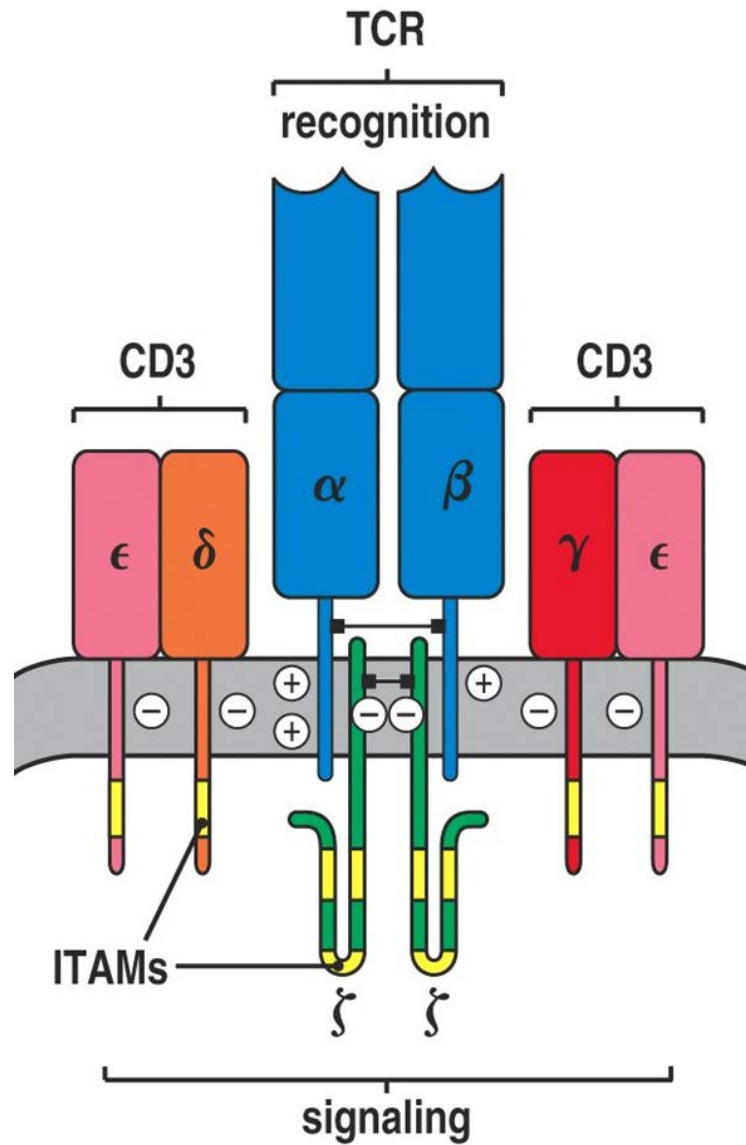


Figure 6-9 Immunobiology, 6/e.
(© Garland science 2005)

Přenos signálu přes TCR receptor

Lck a Fyn jsou tyrosin kinázy ze Src rodiny. ZAP-70 je tyrosin kináza ze Syk rodiny.

Navázání recept. na antigen prezentovaný MHC vede k vazbě koreceptoru (molekula CD4) na MHC a indukcii fosforylace ITAM kinázami Lck a Fyn.

Kináza ZAP-70 se váže na fosforylovaný ITAM a je následně sama fosforylována a aktivována.

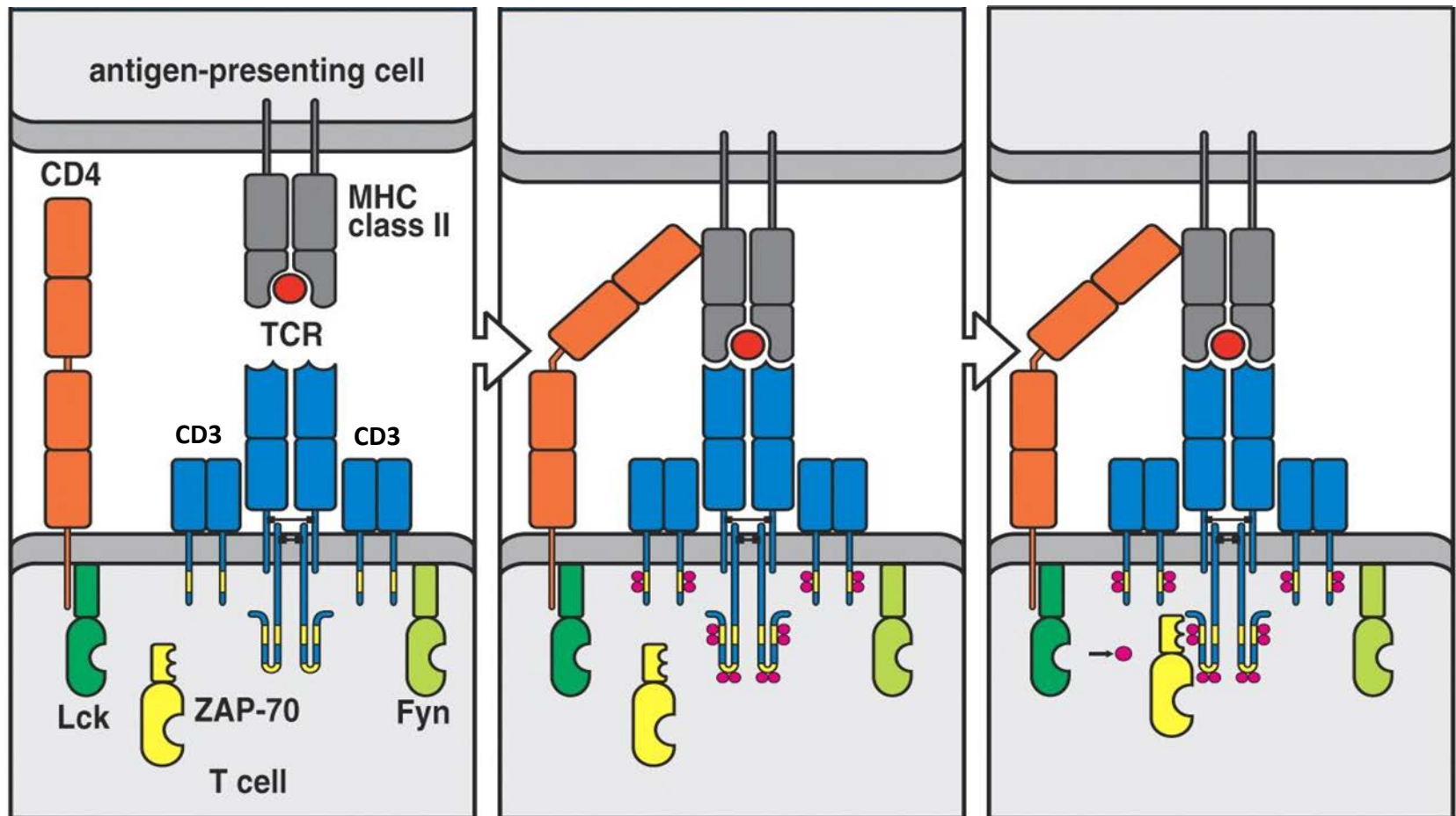


Figure 6-12 Immunobiology, 6/e. (© Garland science 2005)

Komplexní přehled přenosu signálu z TCR

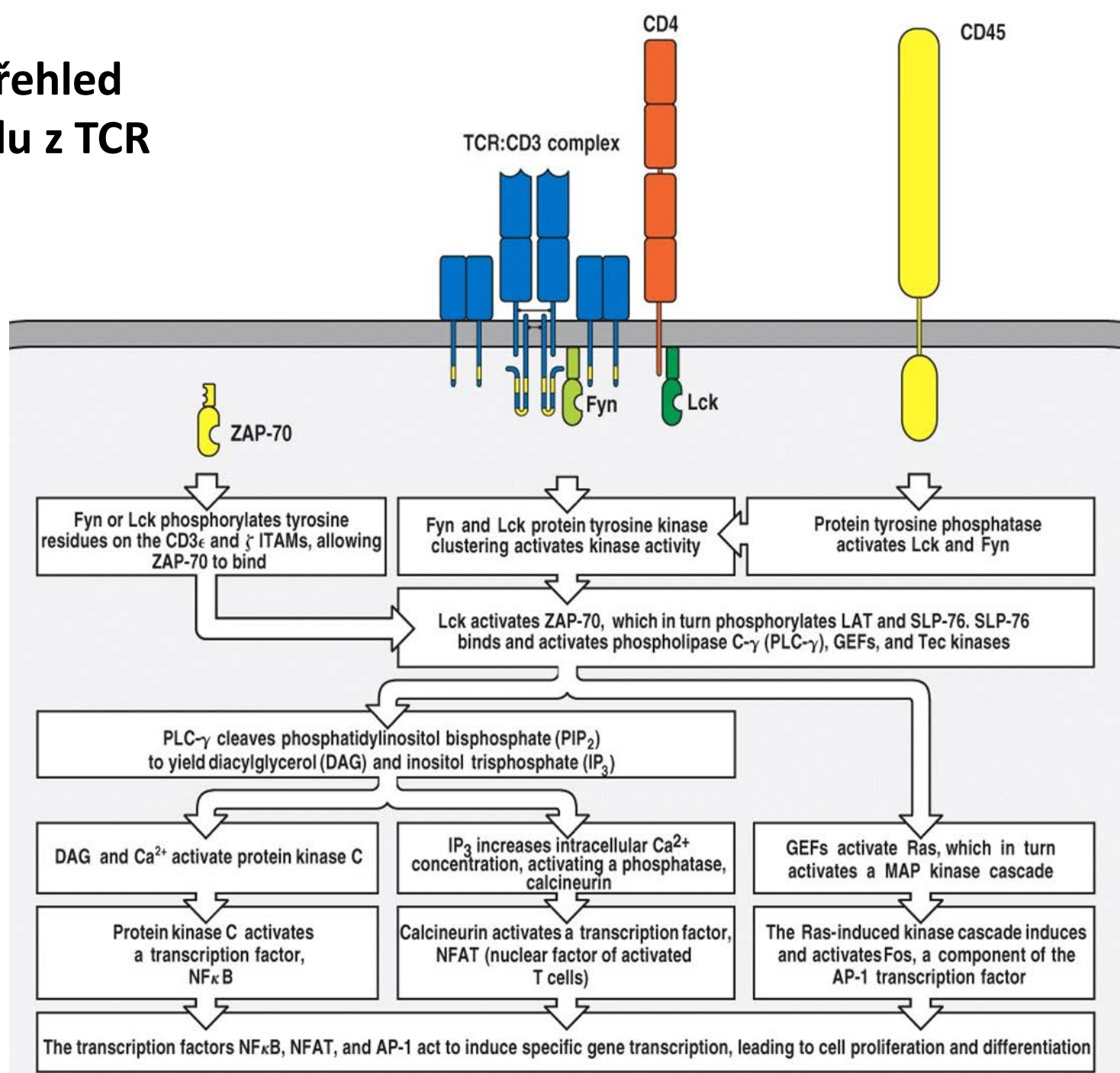


Figure 6-16 Immunobiology, 6/e.
(© Garland science 2005)

Přenos signálu přes BCR receptor

Membránově vázaná IgM (mIg)

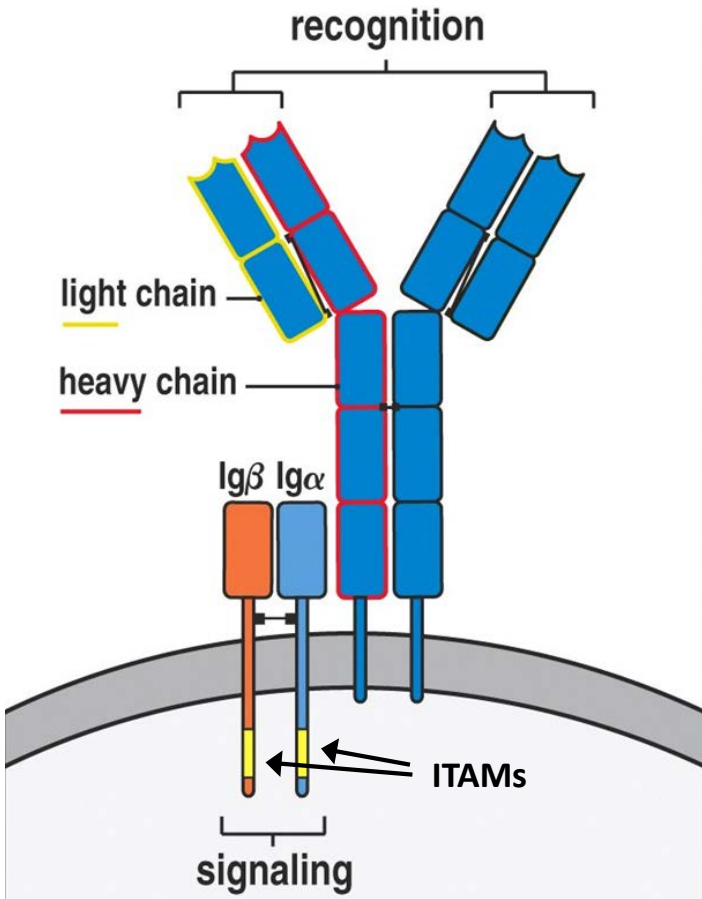


Figure 6-8 Immunobiology, 6/e.
(© Garland science 2005)

Antigenem indukované shlukování IgM receptorů umožňuje kinázám asociovaným s těmito receptory (Src kinázy) fosforylovat ITAM.

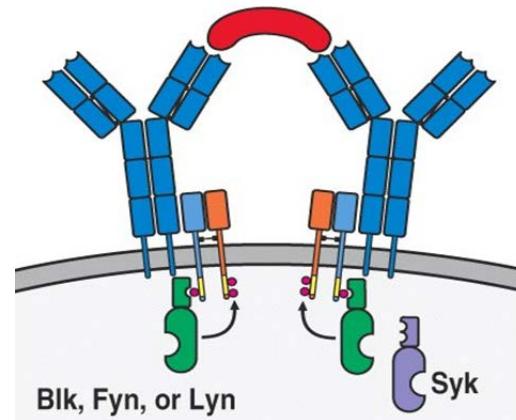


Figure 6-14 Immunobiology, 6/e.
(© Garland science 2005)

Syk kináza se váže na fosforylovaný ITAM a je tím aktivována.

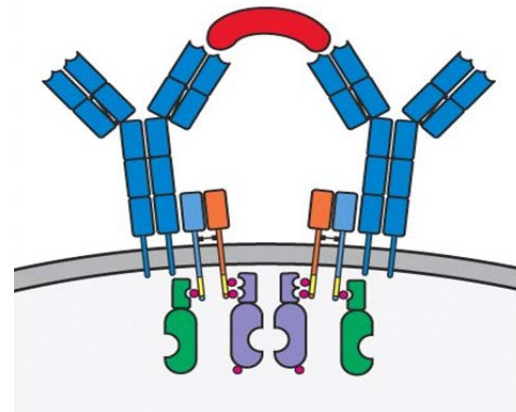


Figure 6-14 Immunobiology, 6/e.
(© Garland science 2005)

Komplexní přehled přenosu signálu z BCR

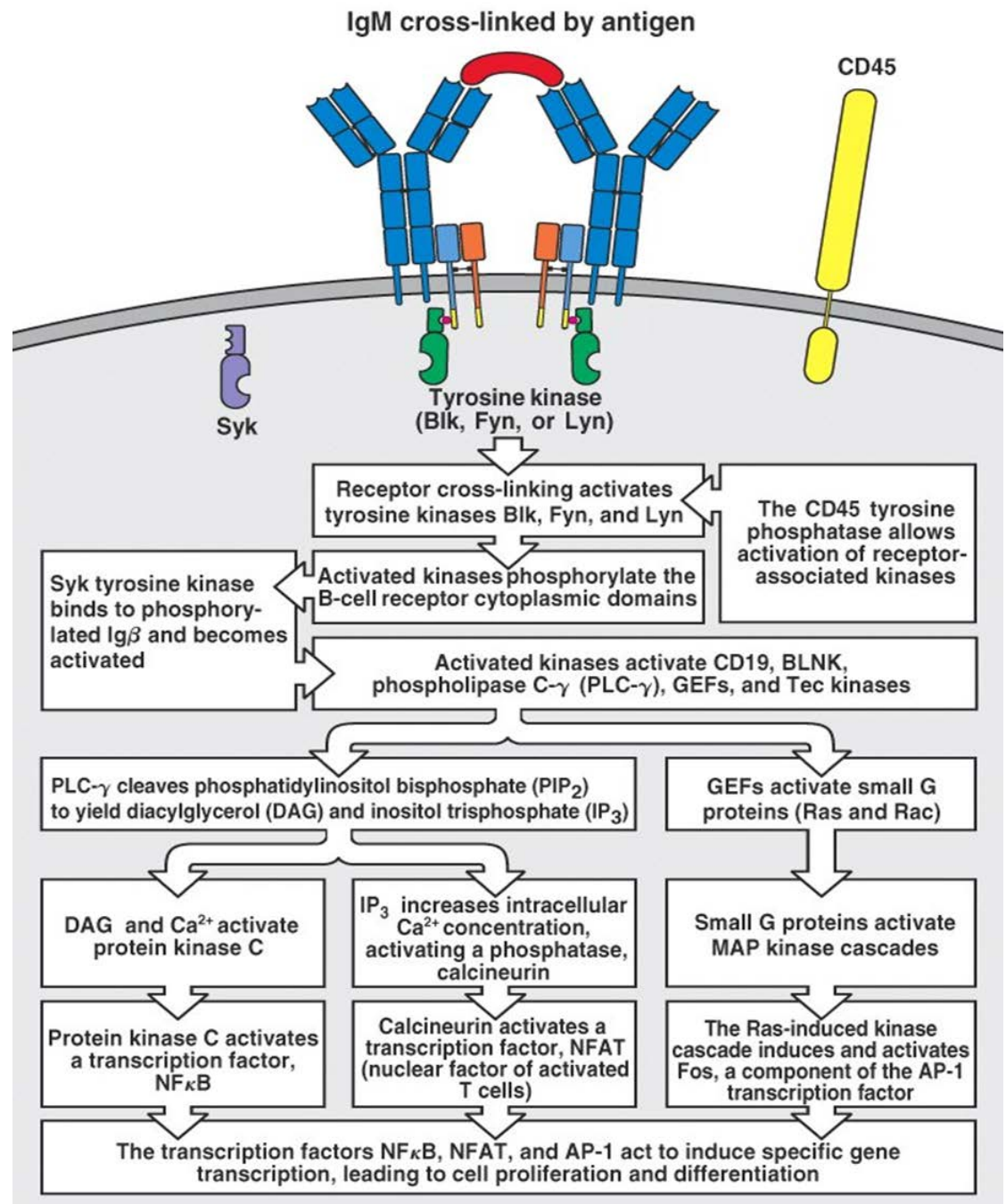


Figure 6-15 Immunobiology, 6/e.
(© Garland science 2005)

Fas receptor

Nepotřebné lymfocyty jsou odstraňovány apoptózou, která je indukována navázáním Fas ligandu (člen rodiny TNF cytokinů) na receptor Fas (rodina TNF receptorů) na povrchu lymfocytů.

Fas ligand (FasL) se váže na Fas.

Dochází ke konformační změně Fas, který následně váže domény adaptorových proteinů.

Adaptorové proteiny aktivují kaspázu 8, která následně aktivuje kaspázu 3.

Kaspáza 3 štěpí další regulační proteiny, což vede k indukci apoptózy.

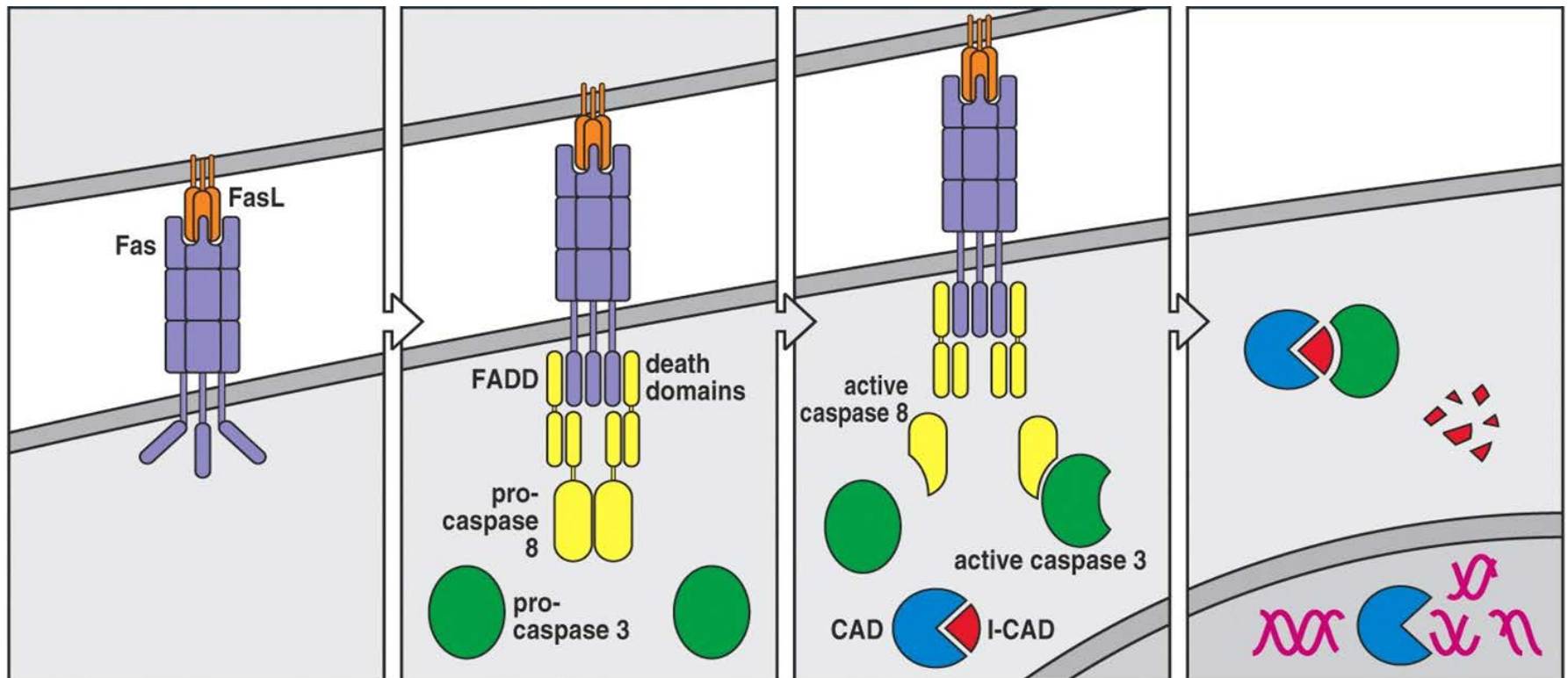


Figure 6-24 Immunobiology, 6/e. (© Garland science 2005)

PRR („Pattern Recognition Receptors“)

= receptory rozpoznávající struktury charakteristické pro patogeny a poškozené buňky

Struktury které rozpoznávají:

1. Konzervované molekulární vzory asociované s patogeny (PAMPs „Pathogen-associated molecular patterns“)
2. Konzervované molekulární vzory asociované s s poškozenými hostitelskými (vlastními) buňkami (DAMPs „Damage-associated molecular patterns“)

Struktury, které rozpoznávají receptory rozpoznávající struktury charakteristické pro patogeny a poškozené buňky (PRR)

1. Konzervované molekulární vzory asociované s patogeny (PAMPs „Pathogen-associated molecular patterns“)

- Typické molekuly:
 - > **bakteriální sacharidy** – lipopolysacharidy (LPS), lipoteichoová kyselina, manóza
 - > **bakteriální proteiny a peptidy** – flagelin, N-formylmethionine
 - > **glukany hub, chitin**
 - > **nukleové kyseliny** – bakteriální DNA (nemethylované CpG dinukleotidy), virová dvouvláknová RNA (dsRNA)

2. Konzervované molekulární vzory asociované s s poškozenými hostitelskými (vlastními) buňkami (DAMPs „Damage-associated molecular patterns“)

- Typické molekuly:
 - > **intracelulární proteiny** – proteiny tepelného šoku („Heat Shock Proteins“, HSP)
 - > **komponenty extracelulární matrix** – fragmenty hyaluronanu
 - > **kyselina močová, ATP, DNA**

Charakteristika PRR

Dělení PRR

- A. Podle umístění → membránově vázané a cytoplazmatické
- B. Podle specifity ligandu

PRR membránově vázané (jak na povrchu buňky, tak v endosomech)

- > Toll-like receptory (TLR)
- > C-lektinové receptory (CLR)

PRR cytoplazmatické

- > NOD-like receptory (NLR)
- > RIG-I-like receptory (RLR)

Toll-like receptor (TLR)

- Poprvé **objeveny u drosofil** (produkty genu *Toll* regulují ontogenetický vývoj a obranu).
- Podobné struktury identifikovány u vyšších rostlin, u bezobratlých a u obratlovců včetně člověka – u člověka popsáno **10 funkčních členů TLR rodiny**.
- Typická struktura složená z **domén bohatých na leucin => specifický tvar podkovy**.
- **Aktivace TLR:** převážně tvorba dimerů - spouští specifické signální dráhy

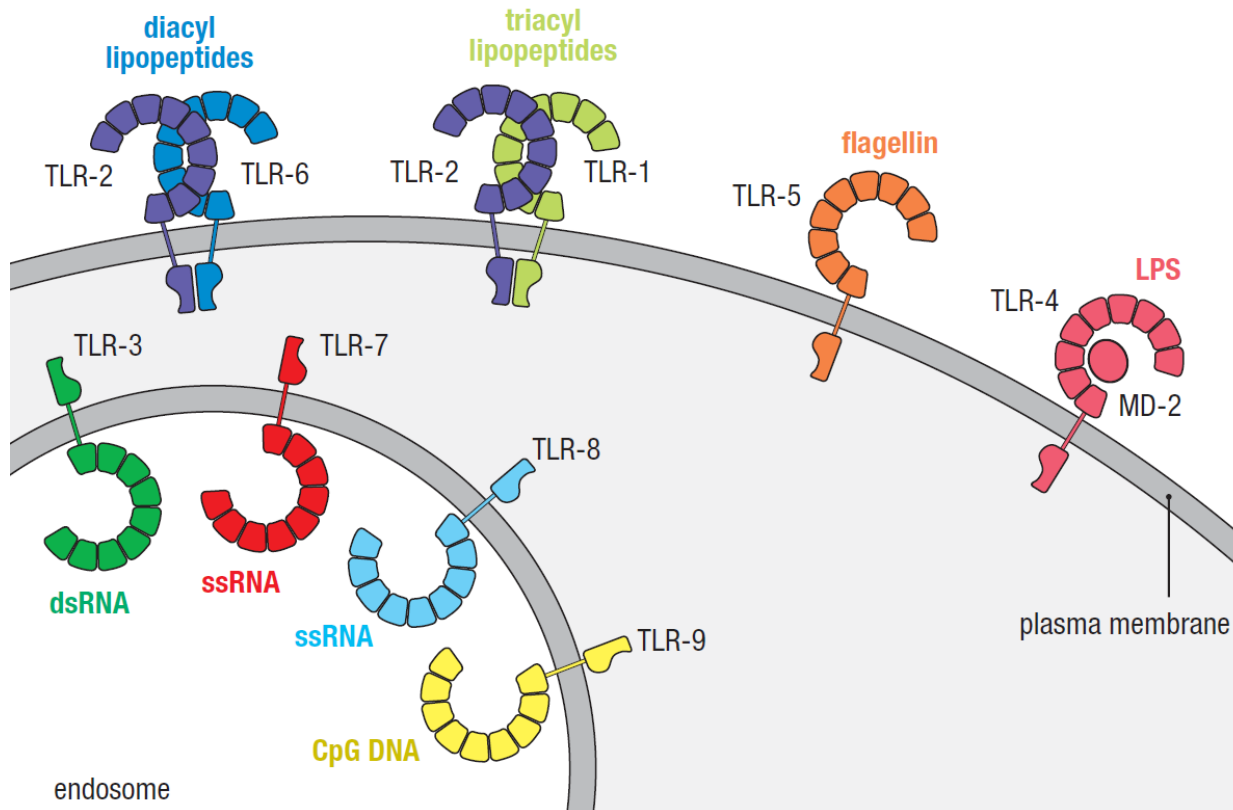


Fig. 3.11 Immunobiology, 9/e.
(© Garland science 2017)

Přehled TLR a jejich ligandů

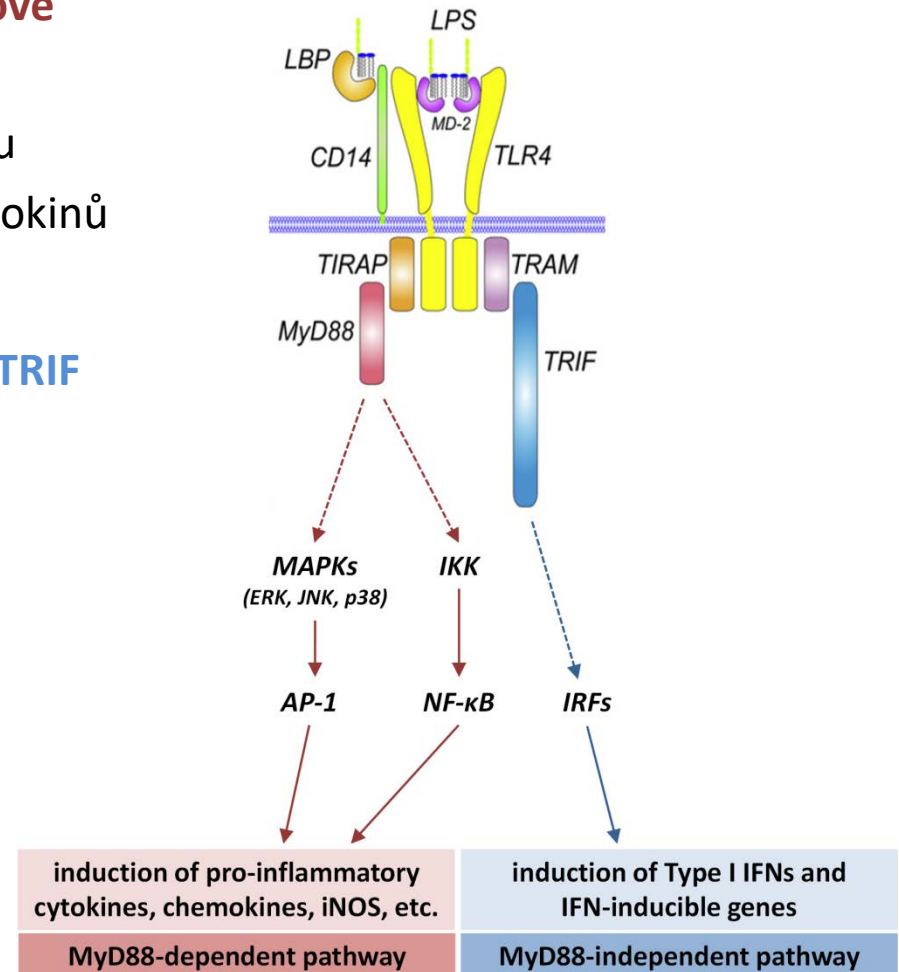
Innate immune recognition by mammalian Toll-like receptors		
Toll-like receptor	Ligand	Hematopoietic cellular distribution
TLR-1:TLR-2 heterodimer	Lipomannans (mycobacteria) Lipoproteins (diacyl lipopeptides; triacyl lipopeptides) Lipoteichoic acids (Gram-positive bacteria) Cell-wall β -glucans (bacteria and fungi) Zymosan (fungi)	Monocytes, dendritic cells, mast cells, eosinophils, basophils
TLR-2:TLR-6 heterodimer		
TLR-3	Double-stranded RNA (viruses), poly I:C	Macrophages, dendritic cells, intestinal epithelium
TLR-4 (plus MD-2 and CD14)	LPS (Gram-negative bacteria) Lipoteichoic acids (Gram-positive bacteria)	Macrophages, dendritic cells, mast cells, eosinophils
TLR-5	Flagellin (bacteria)	Intestinal epithelium, macrophages, dendritic cells
TLR-7	Single-stranded RNA (viruses)	Plasmacytoid dendritic cells, macrophages, eosinophils, B cells
TLR-8	Single-stranded RNA (viruses)	Macrophages, neutrophils
TLR-9	DNA with unmethylated CpG (bacteria and herpesviruses)	Plasmacytoid dendritic cells, eosinophils, B cells, basophils
TLR-10 (human only)	Unknown	Plasmacytoid dendritic cells, eosinophils, B cells, basophils
TLR-11 (mouse only)	Profilin and profilin-like proteins (<i>Toxoplasma gondii</i> , uropathogenic bacteria)	Macrophages, dendritic cells (also liver, kidney, and bladder)
TLR-12 (mouse only)	Profilin (<i>Toxoplasma gondii</i>)	Macrophages, dendritic cells (also liver, kidney, bladder)
TLR-13 (mouse only)	Single-stranded RNA (bacterial ribosomal RNA)	Macrophages, dendritic cells

Fig. 3.10 Immunobiology, 9/e. (© Garland science 2017)

TLR signalizace

Příklad: Stimulace buněk pomocí LPS/TLR4 signální dráhy

- Rozpoznání LPS vyžaduje interakci i dalších proteinů – LBP, CD14 aj.
- Aktivace TLR4 vede k asociaci intracelulárních domén s různými adaptorovými molekulami
- Intracelulární signalizace závislá na **adaptorové molekule MyD88** vede především k aktivaci MAP-kinázové dráhy a transkripčního faktoru NF- κ B => indukce sekrece prozánětlivých cytokinů a kostimulačních molekul.
- Signalizace závislá na **adaptorové molekule TRIF** vede zejména k indukci interferonu α a β .



C-lektinové receptory (CLR)

Velká skupina receptorů s jednou a více **C-lektinovými doménami**

Jak **membránově vázané, tak solubilní.**

Rozpoznávají:

- > různé cizorodé struktury – např. manózu, fukózu a glukany
- > nově přítomné „nevlastní“ povrchové antigeny poškozených či pozměněných buněk – např. onkofetální antigen

Velké množství skupin CLR, např:

- > **manózový receptor (MR)** – na povrchu makrofágů nebo dendritických buněk; rozpoznání a navázání opakujících se manózových jednotek na povrchu mikrobů
- > **MBL („Mannose Binding Lectin“)** – solubilní; klíčový v aktivaci komplementu
- > **dectin 1 a dectin 2** – na povrchu dendritických buněk; rozpoznání beta glukanů kvasinek a plísní
- > **galaktózový receptor** – rozpoznání galaktózových zbytků na senescentních erytrocytech

NOD-like receptory (NLR)

(„Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors“)

- Intracelulární sensory bakteriální infekce a poškození buněk.
- lokalizovány v cytosolu

Rozpoznávají fragmenty peptidoglykanů z buněčné stěny bakterií:

- > **NOD1** rozpoznává γ -glutamyl diaminopimelovou kyselinu – produkt rozpadu peptidoglykanů G^- bakterií (*Salmonella*) nebo G^+ bakterií (*Listeria*).
- > **NOD2** rozpoznává muramyl dipeptid – součást peptidoglykanů většiny bakterií.

Signálování:

- V neaktivním stavu se NOD proteiny vyskytují v cytosolu v podobě monomerů.
- Po rozpoznání ligandu dochází k jejich konformační změně a oligomerizaci.
- Typická je **aktivace dráhy NF- κ B** => indukce zánětlivé odpovědi

RIG-I-like receptory (RLR)

RLR jsou **RNA helikázy** rozpoznávající **cytoplasmatickou virovou RNA**, jednovláknovou (ssRNA) i dvouvláknovou (dsRNA).

Zástupce:

- **RIG-I** – exprimován v mnoha různých tkáních a buněčných typech, kde rozpoznává intracelulární RNA viry – rozlišuje virovou a hostitelskou RNA na základě odlišností 5' konců RNA transkriptů

Signálování RIG-I:

- V neaktivní (auto-inhibiční) konformaci se RIG-I vyskytuje v cytoplasmě.
- Po vazbě virové RNA dochází ke konformační změně, **aktivaci dráhy NF-κB a spuštění antivirového programu buňky** => produkce pro-zánětlivých cytokinů a interferonů typu I.

RLR často interagují s TLR při regulaci adaptivní imunitní odpovědi.

Dašší PRR

FMLP receptor 1 („N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine receptor 1“)

- Exprimován pŕedevším na fagocytech.
- Rozpoznává fMLP uvolňovaný z invadujících mikroorganismů a poraněných tkání.
- Stimuluje leukocyty k destrukci patogenu nebo odstranění zbytků zničených tkání.

Scavengerové receptory

- Pŕítomny na membránách makrofágů.
- Rozeznávají zejména modifikované lipoproteiny.
- Role v iniciaci procesu fagocytózy nejen patogenů, ale také apoptotických buněk.

Různé plazmatické proteiny

- Zahrnují skupinu pentraxinů (do ní patŕí napŕ. C-reaktivní protein) nebo také receptory bohaté na leucin (napŕ. CD14 váží LPS).