

Virus vakcinie – manipulace se smrtí

Během společného vývoje se svými hostiteli si viry vyvinuly mnoho strategií, jak manipulovat s obrannými mechanismy hostitele či jim zcela uniknout.

Virus vakcinie (VV) patří mezi poxviry, skupinu velkých dsDNA virů. Tyto viry se replikují v cytoplazmě hostitelské buňky a vzhledem k velikosti svého genomu (200 kbp) jsou schopny kódovat velké množství proteinů, které mění metabolismus i imunitní odpověď hostitele. Tyto proteiny specificky interferují s buněčnými drahami smrti či inhibují protivirové účinky interferonu a jiných cytokinů a chemokinů, komplement, aktivitu cytotoxických T lymfocytů i NK buněk (20). Virus vakcinie se v minulosti používal jako živá vakcína proti černým neštovicím (varirole). První pokusy o jakési očkování proti této chorobě sahají až do starého Egypta, kde se šňupaly zaschlé sekrety z puchýřů způsobených variolou. Začátkem 18. stol. se začalo s tzv. variolizací – sekrety z puchýřů se inokulovaly do kůže pomocí škrábanců. Koncem 18. stol. se anglický lékař Edward Jenner zasadil o rozšíření očkování pomocí viru kravských neštovic, a dal tím světu termín vakcinace (z latinského vacca – kráva). Tento virus je VV velmi příbuzný a v minulosti byly oba viry často považovány za jeden.

Původ a přirozený hostitel viru vakcinie není známý, byl identifikován až ve 20. století v průběhu procesu očkování a pravděpodobně se jedná o laboratorní kmen. Poté, co bylo zjištěno, že virus, kterým se v té době očkovalo, není (nebo už není) virem kravských neštovic, ale jiným, velmi příbuzným, byl název „vakcinie“ přisouzen novému viru, který se nadále používal pro očkování (7).

Očkování virem vakcinie navozuje velmi dobrou buněčnou i protilátkovou imunitu, nicméně bylo v minulosti spojeno s rizikem různých postvakcinačních komplikací. K nejzávažnějším komplikacím docházelo u jedinců s těžšími poruchami imunity. Patřily k nim progresivní vakcinie (vaccinia necrosum), postvakcinační encefalitida a eczema vaccinatum. U zdánlivě zdravých jedinců docházelo i ke generalizované vakcinii, tu se však obvykle dařilo překonat bez následků (3). Mezi komplikace nově popsané na základě současného očkování příslušníků americké armády patří myoperikarditida (4).

Virus vakcinie představuje unikát mezi vakcínami, protože tato vakcína byla jako jediná schopna celosvětově vymýtit původce onemocnění. Podílil se na tom i skutečnost, že jediným hostitelem varioly je člověk. Zároveň tato vakcína nikdy neprošla klinickým zkoušením a podle dnešních kritérií by nikdy nebyla schválena.

V roce 1980 byly černé neštovice prohlášeny za vymýcené (40), plošné očkování však bylo zastaveno už před rokem 1978. Zásoby viru varioly byly celosvětově zničeny a oficiálně jsou uchovávány jen v Rusku a v USA.

V poslední době však stoupá riziko zneužití černých neštovic pro bioteroristické účely. V některých zemích se proto vybrané skupiny obyvatelstva (armáda, zdravotnický personál, policie) znovu začínají očkovat původní vakcínou a intenzivně se vyvíjejí vakcíny nové (5). Opětovně tak nabývá na důležitosti nutnost lépe porozumět interakcím poxvirů s hostitelem i patogenезi postvakcinačních komplikací. Naše porozumění je však značně omezené tím, že očkování bylo zastaveno před rokem 1978 a nově očkováni jedinci jsou pečlivě vybíráni tak, aby riziko komplikací bylo minimalizováno. Z očkování jsou tak zcela vyřazeni nejen jedinci s vrozenými či získanými defekty imunity, ale i ti, kteří třeba v minulosti trpěli jen nějakou formou ekzému nebo mají někoho s ekzémem ve své rodině, kdo by mohl být nakažen.

Možnosti léčby komplikací po očkování nebo po případném úmyslném zavlečení poxvirové infekce mezi obyvatelstvo jsou relativně omezené. V minulosti i současnosti se aplikují imunoglobulin (VIG – Vaccinia immune globulin), podávají se a nově se zkoušejí různé analogy nukleosidů. USA se zásobují cidofovirem, což je jediná v současnosti schválená látka k léčbě poxvirové infekce. Tuto látku objevil prof. Holý z Ústavu organické chemie a biochemie v Praze a původně byla schválena pro léčbu cytomegalovirové retinitidy; má však řadu nežádoucích účinků a původní preparát se musí aplikovat nitrožilně, což je relativně nevhodné pro akutní léčbu větších skupin obyvatelstva. Intenzivně se proto hledají další látky, zejména takové, které inhibují uvolňování viru z buňky a jeho šíření v organismu.

Nejnovější látky účinné proti poxvirové infekci jsou inhibitory různých kináz, které byly vyvinuty k terapii malignit (např. Gleevec, léčba chronické myeloidní leukemie). Další nové látky byly nalezeny pomocí počítačového modelování a testování in silico, některé už jsou v různých fázích klinického výzkumu (např. ST-246) (34).

Účinnost VIG, cidofoviru a ST-246 byla prověřena při loňském případě eczema vaccinatum, kdy se dvouletý chlapec, atopik, nakazil kontaktem se svým nedávno očkovaným otcem (léze po očkování pravděpodobně nebyla ještě zhojena). Aplikace VIG a cidofoviru se zdály neúčinné (chlapec měl puchýře na 80 % povrchu těla, ascites, selhávaly mu ledviny, byl pod silnými sedativy a uměle ventilován), proto byla narychlo povolena aplikace experimentální látky ST-246. Druhý den se začal jeho stav zlepšovat a dnes je chlapec relativně v pořádku. Z případu se však nedá uzavřít, která látka byla skutečně účinná (17).

Věnuje se zvýšená pozornost výzkumu interakce

Z výše uvedeného je nasnadě, proč je výzkum poxvirů, jejich interakcí s imunitním systémem hostitele i možností jejich farmakologické inhibice nadále velmi důležitý. K rozšíření poznání v této oblasti se snaží přispět i výzkum v naší laboratoři.

Interference viru vakcinie s účinky cytokinů

Virus vakcinie i jiné poxviry vyvolávají u zdravých jedinců velmi dobrou buněčnou i protilátkovou imunitu, a to přesto, že kódují množství proteinů, které různým způsobem modifikují či inhibují imunitní odpověď hostitele.

Klasické protivirové cytokiny jsou interferony (IFN) typu I a II (α/β a γ), jejichž produkce je stimulována virovou infekcí. Virus vakcinie inhibuje už samotnou indukci syntézy IFN α/β . Brání totiž aktivaci transkripčních faktorů zodpovědných za expresi IFN α/β – inhibuje fosforylaci interferon regulujících faktorů 3 a 7 (IR-F-3, 7) a jejich translokaci do jádra, dále inhibuje signalizaci přes Toll-like receptory a aktivaci NF- κ B transkripčního faktoru (VV-kódované proteiny N1L, A46R a A52R (10)). Některé kmeny VV také kódují analog buněčných receptorů pro IFN α/β , který pak s nimi kompetuje o vazbu IFN α/β (B18R protein) (1).

Aby si VV skutečně dobře pojistil, že interferonem indukované protivirové účinky proti němu nebudou zasahovat, kóduje i inhibitory, které potlačují aktivaci a funkci protivirových enzymů PKR a systému oligoadenylát syntetáza/RNáza L. Jejich inhibice ve svém důsledku brání interferonem indukované degradaci RNA a inhibici proteosyntézy, čímž umožňuje normální expresi virových proteinů i delší přežití buňky. Těmito inhibitory jsou VV-kódované proteiny E3L (váže dsRNA, a tak brání aktivaci systému oligoadenylát syntetáza/RNáza L i PKR, a dokonce i RNA editaci) a K3L (působí jako pseudosubstrát pro PKR, a tak brání inhibici proteosyntézy) (9, 22, 24). To, že VV skutečně účinně inhibuje působení IFN α/β , dokazuje jeho nezměněný růst in vitro v přítomnosti tohoto IFN. Avšak in vivo aplikace IFN α/β myši růst VV inhibuje, což naznačuje, že tento IFN indukuje v jiných buněčných typech další protivirové aktivity (31). Rozhodující roli tak v inhibici růstu VV v organismu hraje IFN γ a buněčná imunita, což nejlépe dokazují různé studie na myších s deletovaným receptorem pro IFN γ nebo na jinak mutovaných zvířatech (27). I proti IFN γ se však VV snaží bránit, a to expresí homologu receptoru pro IFN γ , který však je druhově specifický (B8R) (36).

Proti poxvirům zasahují i různé jiné cytokiny. Důležitost jejich působení opět dokládá, že s jejich účinky VV různým způsobem interferuje, a to hlavně pomocí homologů jejich přirozených buněčných receptorů. VV však produkuje i vlastní cytokin, tj. virokin, VGF – vaccinia virus growth factor (homolog buněčného EGF a TGF α). Dále ovlivňuje maturaci prekurzorů některých cytokinů (pomocí serpinů), funkci komplementu, syntézu steroidů, prezentaci virových antigenů pomocí MHC I i II či funkci některých typů buněk.

Buněčná smrt způsobená virem vakcinie

VV se množí v mnoha typech buněk a ve většině způsobuje lýzu hostitelské buňky, jen v několika typech imunitních buněk (makrofágy, dendritické buňky, B buňky) dochází k apoptóze (14, 6, 12). Na nekrozu se obvykle nahlíží jako na nehodu či náhodnou smrt, kdy základní homeostatické mechanismy selžou a nedokážou udržet vnitřní integritu buňky. Nekróza tak je většinou způsobena nějakou noxou či jiným vnějším inzultem a vede k zánětlivé reakci okolí.

Naproti tomu programovaná buněčná smrt (PCD) je aktivní, energii vyžadující proces, který má ochránit makroorganismus za cenu obětování jedné či několika buněk. Nejvíce studovaným typem PCD je apoptóza, nověji byla definována autofagie a mnoho přechodů mezi apoptózou, autofagií a nekrozou. Zatímco apoptóza je obvykle ireverzibilní a končí fagocytózou apoptotických buněk či tělísek, autofagie může být i reverzibilní a s její pomocí se buňka může zbavit špatně složených proteinů, části cytoplazmy nebo i celých organel. Apoptóza a autofagie se tak od sebe liší nejen co do výsledku, ale také aktivací různých metabolických procesů.

Biochemicky je hlavním znakem apoptózy aktivace kaspáz a jejich kaskádovitě štěpení obdobně procesům hemostázy, které vede ke specifické degradaci některých buněčných proteinů, tzv. substrátů smrti, i buněčné DNA (21). Také dochází k zásadním změnám ve funkci mitochondrií.

Autofagie naproti tomu probíhá bez účasti kaspáz, uplatňují se při ní především lyzozomální proteázy a jiné lyzozomální enzymy, které degradují autofagické váčky i s jejich obsahem (25).

Viry ke své propagaci potřebují buňku alespoň natolik funkční, aby jim zajistila vhodné podmínky pro jejich replikaci, expresi a morfogenezi – zejména proteosyntetický aparát a ATP. Zřejmě nezáleží tolik na tom, zda buňka následně zahyne nekrozou, apoptózou, či zda přežije, např. s využitím autofagie. Důležité pro viry je jen to, aby se pomnožily a dostaly se do dalších buněk, případně hostitele. Proto se viry, aby získaly čas, snaží všechny tyto procesy ovlivnit a pozdržet ve svůj prospěch.

Některé způsobují spíše apoptózu a apoptotická tělíška jim zřejmě poskytují ochranu (HIV), jiné se vylíjí do okolí i s obsahem nekrotické buňky (poxviry). Ještě další se dokážou pomnožit i dostat se ven z buňky, aniž by ji zahubily (viry hepatitidy). Nicméně způsob zániku infikované buňky může ovlivnit imunitní odpověď – nekróza indukuje zánětlivou odpověď, zatímco apoptóza nikoli; aktivace dendritických buněk je také rozdílná podle toho, zda je antigen původu apoptotického nebo nekrotického (32).

O poxvirech je známo, že inhibují apoptózu specificky i nespecificky a že ve většině buněk způsobují lýzu. Mezi nespecifické mechanismy lze zařadit jejich zasahování do působení

poxvirů s imunitním systémem hostitele...

interferonů (aktivace RNázy L i PKR kromě již popsaných efektů vede k apoptóze) (19), ostatních cytokinů a jiných mechanismů imunitní odpovědi. Rovněž by sem patřila stimulace buněk pomocí VGF (vaccinia virus growth factor), vakcíní kódovaného analogu EGF a TGF α . Kromě toho poxviry inhibují některé specifické kroky v apoptóze.

VV inhibuje jak vnější, tak vnitřní dráhu aktivace apoptózy. Vnější dráha aktivace apoptózy začíná vazbou příslušného ligandu na receptor smrti (Fas, TNF α a jejich homology). Následně je za účasti kaspázy-1 aktivována kaspáza-8 a spouští se kaskáda štěpení a aktivací dalších prokaspáz na kaspázy. VV inhibuje tuto dráhu pomocí serpinu-2 (serin protease inhibitor 2, SPI-2). SPI-2 je produkt genu B13R a je sekvenčním homologem CrmA, proteinu kódovaného jiným poxvirem – Myxoma virem. CrmA znamená Cytokine response modifier A a tento protein je schopen inhibovat jak cysteinové proteázy (kaspáza 1, 8, 10) (28), tak i serinovou proteázu (granzym B) (26). Vakcíniový protein SPI-2 se pravděpodobně jako CrmA váže do reakčního centra kaspázy-1 (původně nazývané IL-1 β -converting enzyme, ICE) a vytváří s ní ireverzibilní komplex, čímž blokuje počátek apoptózy (18). Kromě funkce v apoptóze kaspáza-1 také štěpí prekurzory prozánětlivých cytokinů IL-1 α , β a IL-18, čímž je ak-

tivuje. Inhibicí aktivity kaspázy-1 tedy SPI-2 funguje i jako regulátor zánětlivé odpovědi (18, 11). Různé formy intracelulárního stresu aktivují vnitřní dráhu aktivace apoptózy, která je spojena s mitochondriemi, ev. endoplazmatickým retikulem. Základním dějem je tzv. „permeability transition“ mitochondrií, spočívající ve vytvoření speciálních kanálů ve vnitřní mitochondriální membráně a ve vylití cytochromu c a dalších proteinů do cytoplazmy, po kterém opět následuje apoptotická kaskáda štěpení a aktivace prokaspáz na kaspázy. Tuto dráhu VV inhibuje pomocí proteinu F1L, který se lokalizuje do mitochondrií, kde brání „permeability transition“ a vylití cytochromu c (39).

V důsledku rizika zneužití viru černých neštovic pro bioteroristické účely se v posledních letech u vybraných skupin obyvatelstva znovu začíná s očkováním původní vakcínou proti černým neštovicím a intenzivně se vyvíjejí vakcíny nové, bezpečnější.

Kvůli riziku postvakcinačních komplikací a potřebě účinné terapie poxviróvé infekce znovu vzrůstá význam lepšího porozumění patogenезi poxviróvé infekce a věnuje se zvýšená pozornost výzkumu interakcí poxvirů s imunitním systémem hostitele i vývoji nových látek účinných proti poxvirům. ■

Literatura: www.sanquis.cz