

## Buněčné složky získané imunity

### Slide 2

Charakteristickou vlastností buněčných složek získané imunity je to, že zajišťují antigenně specifickou obranu. K tomu využívají klonálně specifické receptory TcR na T-lymfocytech a BcR na B-lymfocytech. TcR receptory (TcR = T-cell receptor) se nacházejí na povrchích T-lymfocytů. Struktura obou receptorů tedy TcR i BcR je podobná a zejména struktura genů, které kódují hypervariabilní úseky zodpovědné za interakci s epitopem určitého antigenu, je rovněž podobná. Stejně tak při tvorbě funkčních genů během diferenciací lymfocytů se uplatňují podobné proteiny.

### Slide 3

Jak T tak B-lymfocyty jsou vysoce specifické pro epitop, na druhou stranu však nejsou schopny rozlišovat druh mikroorganismu nebo druh nebezpečí, se kterým se setkávají. K tomu je instruují buňky nespecifické imunity v interakci, která bude popsána později.

### Slide 4

Je důležité zmínit, že mimo primární lymfatické orgány, což je kostní dřeň a thymus, můžeme identifikovat tři různé subpopulace buněk specifické imunity, tedy jak T-, tak B-lymfocytů. Jednak jsou to naivní T a B-lymfocyty, což jsou plně funkční zralé buňky, které opustily primární lymfatické orgány, v případě B-lymfocytů tedy kostní dřeň, v případě T-lymfocytů thymus. Tyto buňky jsou schopny reagovat s antigenem, ale dosud se s ním v periférii neseťkaly. Kromě naivních, rozlišujeme dále paměťové a efektorové lymfocyty, které se již s antigenem setkaly v kontextu imunomodulačního pozadí buněk nespecifické imunity. V podstatě jedinou a hlavní roli zde hrají antigen prezentující buňky. Ty jsou již antigenně specifické a hlavně jsou schopny reagovat s antigenem, který rozliší přes svůj Tc nebo Bc receptor tak, že bezprostředně zahajují své efektorové funkce.

## Slide 5

Jak bylo zmíněno, T-lymfocyty, v podstatě ani B-lymfocyty, nemají schopnost rozhodovat o formě imunitní odpovědi. Jejich funkce je v podstatě v amplifikaci předem definovaného typu imunitní odpovědi a koordinaci této odpovědi. Tedy podání signálů jiným buňkám, anebo zprostředkování efektorové funkce, jako je například zabíjení nevhodných, nádorem pozměněných nebo virem infikovaných buněk, což je hlavní vlastnost cytotoxických lymfocytů, anebo stimulace například fagocytárního systému, anebo stimulace tvorby vhodného izotypu protilátek, tedy protilátek se stejnou specificitou, ale s různou strukturou těžkého řetězce, která je zodpovědná za odlišné biologické efektorové funkce imunoglobulinu.

## Slide 6

Na obrázku 6 jsou uvedeny základní vlastnosti B-lymfocytů. Jsou to buňky, které diferencují v plasmablasty, což jsou krátce žijící buňky, anebo v plasmatické buňky, což jsou dlouhodobě žijící buňky, vyskytující se v různých oblastech organismu. Nicméně, pro plasmatické buňky je dominantní kostní dřeň. Plazmasmatické buňky sekretují imunoglobuliny neboli protilátky. Důležitou vlastností B-lymfocytů je na rozdíl od T-lymfocytů to, že v periférii, zejména v zárodečných centrech periferních lymfatických uzlin, jsou schopny zvyšovat afinitu svých imunoglobulinů mechanismem takzvané somatické hypermutace. **Somatická hypermutace neprobíhá u T-lymfocytů.** B-lymfocyty se dále mohou uplatnit jako regulační buňky a mohou potlačovat funkci ostatních buněk. Produkci imunoglobulinů mohou rovněž přispět k řízení intenzity antigenně specifické imunitní odpovědi, zejména mechanismem takzvané antiidiotypové sítě. Zmíněná regulační funkce B-lymfocytů je například doložitelná pomocí prokázané schopnosti sekretovat imunosupresní cytokin interleukin 10 (IL-10).

## Slide 7

Kromě výše popsaných T- a B-lymfocytů, které se řadí do standardní, klasické formy T- a B-lymfocytů, rozlišujeme ještě zvláštní subpopulaci T-lymfocytů označovaných gama delta T-lymfocyty ( $\gamma\delta$ T-lymfocyty) a B-lymfocytů označovaných

B1 lymfocyty. Ty se svou funkcí liší od klasických T a B-lymfocytů a to zejména tím, že jsou schopny reagovat s antigeny bez podmínek, které jsou uvedeny pro standardní lymfocyty. V případě  $\gamma\delta$ T-lymfocytů to znamená, že rozlišují cílové buňky bez požadavku na MHC I či MHC II prezentaci antigenu, což je základní nezbytná podmínka rozlišení prostřednictvím klasických T-lymfocytů, někdy označovaných jako alfa, beta a to podle struktury jejich Tc receptoru.  $\gamma\delta$ T-lymfocyty se označují rovněž podle struktury Tc receptoru, který je tvořen jinými proteiny a to gama a delta ( $\gamma$  a  $\delta$ ), tedy dvěma jinými řetězci než u klasických  $\alpha\beta$ T-lymfocytů.  $\gamma\delta$ T-lymfocyty se během ontogeneze vyskytují jako první T-lymfocyty. Jejich charakteristickou vlastností je, že mají omezenou variabilitu i svého Tc receptoru, tedy ve smyslu antigenní specifity. Jejich další vlastností je, že pro svůj vývoj nevyžadují přítomnost thymu a bylo prokázáno, že některé subpopulace  $\gamma\delta$ T-lymfocytů jsou nadány schopností fagocytózy.

## Slide 8

Druhou populací je populace již zmíněných B1 lymfocytů, což jsou lymfocyty, které tvoří přirozené polyreaktivní protilátky zejména IgM izotypu. Tyto B-lymfocyty nevstupují do zárodečných center, a tudíž u nich neprobíhá somatická hypermutace, jak bylo prokázáno nesčítelným počtem experimentů, zejména například u nádorových pacientů, kde byly testovány periferní B-lymfocyty se specificitou vůči přirozeným antigenům, jako jsou autoantigeny, polysacharidové antigeny a podobně. Bylo ukázáno, že jejich hypervariabilní oblast, tedy oblast imunoglobulinu exprimovaného nebo sekretovaného těmito lymfocyty, je vytvořena pouze vlastní rekombinací úseků V, D a J, tak, jak je to popsáno v kapitole o specifické humorální imunitě ([vložit odkaz na příslušnou prezentaci](#)). Tyto protilátky, které produkují B1 lymfocyty, kromě toho, že jsou schopny reagovat s různými antigeny, jsou zejména homeostatické, to znamená, že přispívají udržení vhodné intenzity imunitní odpovědi.

## Slide 9

Nyní se budeme věnovat speciálně  $\alpha$  T-lymfocytům.

## Slide 10

Tyto T-lymfocyty, jak je uvedeno na tomto obrázku, můžeme rozdělit na dvě základní subpopulace. Jsou to CD4 T-lymfocyty a CD8 T-lymfocyty. Označení CD4 a CD8 se odvíjí od koreceptoru, tedy přidružené bílkoviny k Tc receptoru. Tato bílkovina, CD8 nebo CD4, je zodpovědná za selektivní vazbu Tc receptoru buď na hlavní histokompatibilní komplex I. třídy, tedy MHC I v případě CD8 T-lymfocytů, anebo za vazbu na hlavní histokompatibilní komplex II. třídy, tedy MHC II v případě CD4 T-lymfocytů. Tato specificita mezi MHC I a MHCII, neboli CD4 a CD8 T-lymfocyty, se vyvíjí během vyžívání prekurzorů T-lymfocytů v thymu.

## Slide 11

CD4 T-lymfocyty je možné dále rozdělit na dvě základní subpopulace. Jednak jsou to efektorové a paměťové buňky populací Th1, Th2, Th17 a Th9, přičemž Th1 a Th2 jsou základní dominantní subpopulace, lišící se zapojením do efektorových funkcí imunitního systému. Th17 je další subpopulací, která byla popsána v nedávné době a její charakteristickou vlastností je kooperace zejména s polymorfonukleárními neutrofily a další vlastností je sekrece interleukinu 17. Poslední zmíněná subpopulace CD4 T-lymfocytů, efektorové Th9 lymfocyty, je zapojena do obrany proti parazitům. Kromě těchto zmíněných populací rozlišujeme ještě takzvané regulační T-lymfocyty (Treg), které se rozlišují na takzvané přirozené (nTreg), a indukované (iTreg) lymfocyty a dále potom populace například Tfh a nebo Th3. Základní rozdělení na jednotlivé populace a cytokiny, které jsou zodpovědné za indukci vyžívání naivní CD4 T buňky směrem k jednotlivým uvedeným subpopulacím je zobrazeno na tomto obrázku.

## Slide 12

Na obrázku 12 si můžeme hrubě přiblížit základní funkce T-lymfocytů na několika příkladech. Jsou zde uvedeny dominantní patogeny, vůči nimž je dominantně zajištěna obrana určitými populacemi lymfocytů, i když tyto lymfocyty nemusí samy o sobě být zodpovědné za eliminaci konkrétních mikroorganismů, ale jsou kritické pro efektorovou imunitní odpověď vedoucí k úspěšné eliminaci. Pro příklad virové infekce, jako je například chřipka, vzteklna, ale i listeriové infekce,

kdy hlavní vlastností těchto mikroorganismů je jejich lokalizace v cytoplasmě, jsou kontrolovány efektorovými cytotoxickými T-lymfocyty, které buňky napadené těmito uvedenými mikroorganismy rozlišují prostřednictvím interakce Tc receptoru s peptidem odvozeným z určitých mikroorganismů prezentovaných na hlavním histokompatibilním komplexu I. Třídy (HLA I) cílových, tedy infikovaných buněk. Efektorová funkce CD8 T-lymfocytů je terminální. Jsou to buňky, které samy o sobě jsou schopny zabít takto rozpoznané buňky prostřednictvím mechanismů, které budou uvedeny později. U další skupiny patogenů, jako je *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Leishmania donovani* nebo *Pneumocystis carinii*, je imunita proti nim zajištěna prostřednictvím populace Th1 lymfocytů, které jsou zodpovědné za aktivaci makrofágů tak, aby byly schopny tyto, můžeme říct intracelulární parazity, zabít. Vyskytují se jako mikroorganismy většinou v různých vezikulách makrofágů a zmíněná aktivace je klíčová k tomu, aby makrofág byl schopen tyto mikroorganismy zabít. Funkce Th1 lymfocytů je tedy dominantní v tom, že prostřednictvím sekretovaných cytokinů aktivují fagocyty k zabíjení intracelulárně vezikulárně lokalizovaných mikroorganismů. Rozlišení takovýchto infikovaných buněk se děje prostřednictvím peptidů prezentovaných na cílových buňkách MHC druhé třídy, samozřejmě proto, že se jedná o CD4 T-lymfocyty. Poslední populace lymfocytů, která se účastní protekce a obrany proti infekci je populace Th2, ale v některých případech i Th1 CD4 T-lymfocytů, která je zodpovědná za obranu proti extracelulárním mikroorganismům, příkladem je *Clostridium tetani*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, polyoviry, *Pneumocystis carinii* a podobně. Tyto mikroorganismy se vyskytují v extracelulárních tekutinách a obrana proti nim je zprostředkována zejména tvorbou protilátek z B-lymfocytů, které jsou aktivovány prostřednictvím Th2 nebo Th1 pomocných T-lymfocytů. Specifická interakce je zajištěna tím, že B-lymfocyty prezentují fragmenty antigenů, které rozlišují svými imunoglobuliny na povrchu T-lymfocytů a to prostřednictvím peptidů vystavených opět, jak už bylo zmíněno v předchozím případě, na MHC molekulách druhé třídy.

### Slide 13

Další obrázek schematicky zobrazuje základní cytokiny a v podstatě graficky vyjadřuje předchozí situaci. Tedy CD8 T-lymfocyty jako cytotoxické buňky schopné rozlišit cílovou buňku pomocí peptidu prezentovaného na MHC I a jsou zde

vyjádřeny jejich efektorové funkce. Je to jednak sekrece cytotoxických peptidů jako je perforin a granzym nebo indukce apoptózy cílových buněk přímo receptorovou interakcí Fas ligandu s Fas receptorem. Základní podmínkou toho, aby cytotoxický T-lymfocyt mohl zabít cílovou buňku je, že ji rozliší právě přes svůj Tc receptor, tedy v případě některých virových infekcí, které jsou schopny potlačit expresi MHC I molekul, je cytotoxický T-lymfocyt neefektivní, protože takovou buňku není schopen rozlišit a musí se uplatnit jiné efektorové funkce, kde dominují zejména NK buňky (přirození zabíječi). Kromě sekrece cytotoxických substancí, jak bylo zmíněno, CD8 T-lymfocyty uvolňují také některé cytosiny, jako je interferon gamma (INF- $\gamma$ ), anebo tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- $\alpha$ ) a tumor nekrotizující faktor beta (TNF- $\beta$ ). Co se týče pomocných T-lymfocytů, tedy CD4 T-lymfocytů, tyto rozlišují cílovou buňku prostřednictvím peptidů prezentovaných MHC I. Cílovou buňku nezabíjejí, ale aktivují ji ke zvýšení intracelulárního cytotoxického prostředí a to zejména sekrecí cytokinů, jako je interferon gamma (INF- $\gamma$ ), kolonie granulocytů stimulující faktor (GM-CSF), tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- $\alpha$ ), CD40 ligand a rovněž Fas ligand. Poslední zmíněný cytosin indikuje, že i Th1 lymfocyt může do jisté míry přispět k indukci apoptózy cílové buňky. Ukážeme si to i na příkladě další populace, což jsou regulační T-lymfocyty, u nichž jedna z regulačních efektorových funkcí je právě indukce apoptózy v cílové buňce. Mimo to některé Th1 lymfocyty mohou produkovat obecně proliferační faktor interleukin 3 (IL-3) případně tumor nekrotizující faktor beta (TNF- $\beta$ ). Uvedená produkce interleukinu 2 (IL-2) je v podstatě produkcí autokrinní, která je klíčová pro autostimulaci pomocných T-lymfocytů. Další populací pomocných T-lymfocytů je Th2 subpopulace, která se uplatňuje zejména při aktivaci B-lymfocytů pro produkci specifických protilátek a rovněž k indukci izotypového přesmyku. Při indukci izotypového přesmyku hraje významnou roli nejen sekrece cytosinů, jako je interleukin 4 (IL-4), interleukin 5 (IL-5), ale rovněž receptorová interakce mezi CD40 ligandem na povrchu Th2 lymfocytu a CD40 molekulou na povrchu cílové B buňky. Výsledkem je sekrece protilátek, které se vyznačují zejména svou neutralizační schopností, tedy schopností neutralizovat různé toxiny produkované bakteriemi, ale také schopností neutralizovat viry. Kromě toho, některé Th2 lymfocyty produkují interleukin 3 (IL-3), opět GM-CSF, interleukin 10 (IL-10) transformující růstový faktor beta (TGF- $\beta$ ), což je společně s IL-10 silný imunosupresivní cytosin, a eotaxin.

Na dalších obrázcích se budeme věnovat diferenciaci konvenčních T-lymfocytů, tedy těch T-lymfocytů, pro které je charakteristický Tc receptor, tvořený podjednotkami alfa a beta.

## Slide 15

Na obrázku 15 je uvedeno základní schéma diferenciaci T-lymfocytů. Prekurzory T-lymfocytů vznikají v primárním lymfatickém orgánu a to v kostní dřeni, kterou opouštějí a odtud migrují do thymu, kde dochází k jejich další diferenciaci vedoucí k tvorbě již zmíněných naivních T-lymfocytů. Vyžívání v thymu je spojeno s jedním základním mechanismem a to je přeskupování genu pro Tc receptor, konkrétně tedy přeskupování segmentů, které se účastní tvorby části genu kódující hypervariabilní úsek Tc receptoru. Jakmile dojde k přeskupování těchto segmentů genu pro alfa a beta řetězec Tc receptoru, buňky začnou exprimovat CD4 nebo CD8 molekulu, což předurčí jejich další osud směrem k cytotoxickým CD8 T-lymfocytům nebo budoucím pomocným T-lymfocytům. V této fázi však buňky nejsou efektorové, jsou to buňky naivní, schopné reagovat s antigenem na MHC molekule, ale nikoliv schopné efektorových funkcí. K tomu musí tyto buňky být nejdříve stimulovány, aby se změnil v efektorové funkce.

Rozlišení cílových buněk přes MHC je kritické. Bez MHC prezentace nejsou Tc lymfocyty, nebo obecně  $\alpha\beta$  T-lymfocyty, schopny interagovat s cílovou buňkou a to, že vlastně MHC určuje schopnost T-lymfocytů interagovat s cílovou buňkou, se označuje takzvanou MHC restrikcí.

## Slide 16

Na obrázku 16 jsou shrnuty základní vlastnosti T buněčného receptoru TcR. Je to antigenně specifický receptor, který rozlišuje peptidy prezentované na MHC molekulách. Jedná se o heterodimer, tedy protein složený ze dvou podjednotek alfa a beta. Každá podjednotka je kódována jiným genem. Část genu kódující variabilní doménu Tc receptoru je multisegmentová a tyto segmenty se ve svém uspořádání liší mezi alfa a beta podjednotkou.

## Slide 17

Co se týče srovnání mezi strukturou Tc receptoru a strukturou imunoglobulinu, je možno říct, že jsou to molekuly velmi podobné, ovšem Tc receptor je strukturně poměrně jednodušší, tak jak je zobrazeno na tomto obrázku. Obsahuje jenom jednu variabilní a jednu konstantní doménu pro řetězec alfa i pro řetězec beta. Je důležité zmínit to, že obě domény mají na svém C konci transmembránovou doménu a krátký cytoplasmatický úsek, který je spojen s pomocnými molekulami přidruženými s Tc receptorem, což jsou molekuly CD3, prostřednictvím nichž je přenášen signál z povrchu buňky do nitra T-lymfocyty. Touto signalizací jsou zahájeny odpovědi efektorové funkce T-lymfocytů.

## Slide 18

Struktura genu, který kóduje jednotlivé podjednotky, tedy alfa a beta řetězce Tc receptoru, je uvedena na obrázku 18. Je vidět, že pro oba řetězce je typické, že gen obsahuje variabilní úsek v počtu 70 segmentů pro beta řetězec a v počtu 52 segmentů pro alfa řetězec, které jsou následovány spojovacím řetězcem. Na rozdíl od imunoglobulinu a genů kódujících těžký řetězec imunoglobulinů nejsou přítomny ve velkém počtu diverzní segmenty. Pouze u beta řetězce je vždy jeden diverzní segment před několika spojovacími řetězci za následujícími úseky genu pro konstantní doménu beta řetězce Tc receptoru a tato struktura se opakuje dvakrát.

## Slide 19

V thymu probíhá rekombinace těchto úseků V, D a J a vzniká jedinečná struktura genu, který se liší v tomto rekombinovaném úseku mezi jednotlivými T-lymfocyty. Na obrázku 19 je schematicky ukázáno co se děje na genové úrovni, jak se liší gen zárodečné buňky od genu buňky, která prošla somatickou rekombinací a jak potom dochází k vytvoření funkčního alfa a beta řetězce. Podobně jako v případě B-lymfocytů, vede vyžívání prekurzorů T-lymfocytů v thymu k nevratné ztrátě úseků nebo segmentů V a J, jak alfa, tak beta řetězce Tc receptoru. Z toho plyne, že zralá naivní T buňka a všechny její následné dceřiné buňky, již není schopna dát vzniknout široké populaci T-lymfocytů ve smyslu variability Tc receptoru. Z toho dále vyplývá, že z periferního T-lymfocyty, pokud je naivní nebo již diferencován



směrem k efektorové buňce, nemůžeme vzniknout populaci silně variabilních buněk. K tomu je třeba použít kmenovou buňku, u níž ještě nedošlo k rekombinaci, a proto se také k transplantaci periferních buněk, v případě T buněčných imunodeficitů, musí používat kmenové buňky. Dalším faktem, který podporuje nutnost použití kmenových buněk k transplantaci je to, že vyztřálé T-lymfocyty mají již do jisté míry omezený počet replikací, i když tento aspekt v některých situacích není platný, zejména pokud se naivní T-lymfocyty dostávají do periferní mízní uzliny, kde jsou stimulovány v kontextu s antigen prezentující buňkou. Zde potom dochází ke značné proliferaci určitého klonu s cílem zajistit dostatečný počet buněk schopných realizovat antigenně specifické efektorové funkce.

## Slide 20

Na obrázku 20 je zobrazen mechanismus rekombinace segmentů genu pro alfa a beta řetězec Tc receptou. Tento mechanismus je společný s rekombinací na úrovni genů kódujících imunoglobulin a využívá rovněž stejné proteiny. Důležité je zdůraznit, že i zde vznikají takzvané nepalindromatické a palindromatické nukleotidy. Palindromatické nukleotidy vznikají, jak je zobrazeno v levé části obrázku, tak, že dojde k rozštěpení DNA a následně uvolnění některých nukleotidů z hybridu s druhým vláknem DNA, které jsou potom připojeny do jednořetězce. Tyto nukleotidy jsou symetrické podle místa, podle kterého byly překlopeny, a tomu se říká palindrom. Tyto nukleotidy jsou kódovány genomem a nedávají vzniknout vysoké míře variability. Naopak nepalindromatické nukleotidy, které jsou v dalším kroku, tak jak je zobrazeno v obrázku vpravo nahoře, připojeny aktivitou terminální deoxyribonukleotidyltransferázy (TdT), nemají templát, jsou připojeny náhodně a umožňují zařazení nových aminokyselin, které se lokalizují na přechodu mezi D a J segmentem nebo V a D segmentem.

## Slide 21

Tyto aminokyseliny jsou zdrojem obrovské variability Tc receptoru, protože zejména ty oblasti přechodu mezi jednotlivými segmenty, které jsou vzájemně rekombinovány, kódují úseky molekuly Tc receptoru, které jsou zodpovědné za interakci s antigenem. Klíčovou roli tedy při rekombinaci genomické DNA při vyztřávání prekurzoru T-lymfocytu a v podstatě i B-lymfocytu hrají geny RAG, což

jsou rekombinací aktivující geny a terminální deoxyribonukleotidyltransferáza. Mutace v RAG genech jsou spojeny s těžkými kombinovanými T a B buněčnými deficity často ohrožujícími pacienty na životě a někdy se těmto onemocněním spojenými s mutacemi RAG genu říká Omenův syndrom.

## Slide 22

Na obrázku 22 jsou shrnuty informace o rekombinaci TCR genů. Rekombinací TCR genů myslíme tedy, jak bylo zmíněno, rekombinací segmentů genů a zejména spojování konců DNA jako významný zdroj variability antigenní specifity Tc receptoru. Všechno se odehrává, jak vidíte, na úrovni genomické DNA, což je důležité pro to, že následná klonální expanze po kontaktu naivního T-lymfocyту, případně později i kontaktu paměťového T-lymfocyту, umožní vznik velkého množství široké populace dceřiných buněk s identickou specifitou TCR. To je základ klonální imunity a mechanismus klonální expanze se objevuje i v názvu specifické buněčné imunity jako klonální. Totéž platí i pro B-lymfocyty a produkci protilátek.

## Slide 23

Na tomto obrázku jsou sumarizovány zdroje variability TCR genů mezi jednotlivými klony. Jedním zdrojem variability je počet variabilních segmentů V pro alfa a beta řetězec, který se pohybuje, jak vidíte, u alfa kolem 70, u beta kolem 52. Pouze v genu kódujícím beta řetězec TCR jsou přítomny 2 diversitní (D) segmenty. Dalším zdrojem variability je čtení ve třech čtecích rámcích, přičemž čtení D segmentu ve všech třech čtecích rámcích je charakteristické právě pro gen kódující beta řetězec. To samozřejmě zase zvyšuje variabilitu, protože každý čtecí rámec představuje zcela jinou sekvenci aminokyselin. Dále je to přítomnost J segmentu, počet genů pro alfa řetězec je zhruba 61, počet segmentů pro beta řetězec je 13. Počet spojení prostřednictvím N a P nukleotidů v případě alfa genu nebo genu pro alfa řetězec je 1, protože zde chybí D segment. V případě beta řetězce, kde je variabilní, diversitní a spojovací segment, tedy dva spoje, tak je to samozřejmě počet 2. Celkový počet variabilních úseků vytvořených po rekombinaci je  $5,8 \times 10^6$ . Vzhledem k tomu, při tvorbě nepalindromatických, tedy N nukleotidů uplatňuje adice, je variabilita toho spojení v důsledku aktivity terminální deoxyribonukleotidyltransferázy až  $10^{11}$  různých klonů. Celkově se tedy dostáváme

na počet zhruba kolem  $10^{18}$  různých klonů T-lymfocytů lišících se alespoň jednou aminokyselinou v antigen vážící oblasti Tc receptoru, což samo o sobě stačí k rozlišení jiného peptidu na povrchu MHC molekuly ať již první nebo druhé třídy.

## Slide 24

Kde se vlastně vznik této obrovské variability prekurzoru T-lymfocytů odehrává, kde dochází k rekombinacím jednotlivých genových segmentů, to je ukázáno na tomto obrázku. Odehrává se to tedy v primárním lymfatickém orgánu a to v thymu, kde přicházejí prekurzory T-lymfocytu, které zde prochází pozitivní a negativní selekcí na základě schopností vytvořených Tc receptorů vázat antigen na povrchu antigen prezentujících buněk. Ovšem nikoli ve smyslu antigen prezentujících buněk, které by aktivovaly lymfocyty v efektorové buňky, ale ve smyslu tom, že tyto buňky jsou schopny prezentovat antigeny jak na MHC první třídy, tak na MHC druhé třídy. Tuto roli hrají převážně kortikální, epiteliální buňky, dále epiteliální buňky meduly a do jisté míry se zde uplatňují i dendritické buňky zejména při navození tolerance tak, jak bylo například popsáno pro tolerantní mechanismy přední komory oční. Důležité je, že podobně jako u B-lymfocytu, je kritériem funkční přestavby T-lymfocytů schopnost genu po rekombinaci kódovat funkční alfa nebo beta řetězec Tc receptoru. Dochází tedy k rekombinaci genu a následně k expresi proteinu. Pokud je protein exprimován a je funkční, je schopen se vystavit na povrchu buňky, je schopen vázat antigen na MHC molekuly první nebo druhé třídy a je schopen inicializovat přenos signálu, což je finálním kritériem jeho funkčnosti.

Během těchto mechanismů se uplatňují dva selekční mechanismy. První mechanismus je v podstatě ten, který byl právě zmíněn. Tedy, že pouze buňky, které přeskupí genové segmenty Tc receptor za vzniku produktivního genu schopného kódovat funkční protein, jsou pozitivně selektovány díky zmíněné interakci mezi Tc receptorem a MHC peptidem. Tyto buňky podstupují další, takzvanou negativní selekci, která probíhá v kortikomedulárním přechodu a v medule, kde jsou naopak selektovány negativně ty buňky, které mají silnou interakci mezi Tc receptorem a peptidem na MHC molekule epiteliálních buněk, případně dendritických buněk. Pokud je tato interakce silná, buňky jsou eliminovány jako potenciálně autoreaktivní. Ne všechny buňky jsou však tímto mechanismem eliminovány, protože, jak bude ukázáno, silná pozitivní interakce může být naopak

stimulem pro pozitivní selekci buněk (takzvaná sekundární pozitivní selekci) směrem k fenotypu regulačních T-lymfocytů, které přispívají k udržení homeostázy. Důležitým závěrem vyžívání T-lymfocytu v thymu je, že přicházejí prekursori T-lymfocytů nefunkční nezralé buňky, které ještě nemají přeskupený gen pro Tc receptor a odcházejí naivní T-lymfocyty, což jsou zralé buňky, schopné interakce s antigenem, schopné být aktivovány, pokud je antigen prezentován ve vhodném kostimulačním prostředí, což se děje běžně na povrchu antigen prezentujících buněk, i když se tyto buňky doposud s žádným antigenem v periférii neseťkaly. To je tedy hlavní znak naivních buněk, které opouštějí thymus. Bylo několikrát zmíněno, že se rozlišujeme CD4 a CD8 T-lymfocyty.

## Slide 25

Na obrázku 25 je ukázána struktura jak CD4 molekuly, což je vlastně jednořetězcový polypeptid, tak CD8 molekuly, která sestává z dvou řetězců alfa a beta spojených disulfidickým můstkem. Tyto molekuly jsou zodpovědné za specifickou vazbu Tc receptoru buď na MHC I, za což jsou zodpovědné CD8 molekuly, nebo na MHC II, za což jsou odpovědné CD4 molekuly. Během vyžívání thymu dochází nejdříve k expresi CD4 a CD8 molekul a vznikají tedy dvojité pozitivní T-lymfocyty. Teprve na základě síly interakce s MHC I nebo MHC II molekulami vystavujícími peptidy je nasměrována selekce směrem k CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> nebo naopak CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>. Tato selekce je opět založena na kritériu funkční schopnosti T-lymfocytu interagovat s daným receptorem. V tomto případě je receptorem MHC molekula s prezentovaným peptidem. Tím dostáváme obraz funkčního Tc receptoru, který je tvořen alfa a beta řetězcem plus CD4 molekula a nebo CD8 dimer sestavený z alfa beta podjednotek. Takto zmíněný Tc receptor je však ještě nefunkční, neboť k tomu, aby byl schopen plnit svou funkci, to jest přenášet signál po rozlišení specifické molekuly, musí k němu být připojeny obvykle ještě čtyři CD3 molekuly, které jsou molekulami přenášejícími signál.

## Slide 26

Pro shrnutí, zralé naivní T-lymfocyty opouštějí thymus, aby osídlily sekundární lymfatické orgány a slizniční tkáň a zde tyto naivní T-lymfocyty v průběhu času přijdou do kontaktu s antigenem na MHC molekulách antigen

prezentujících buněk (APC) a tak dojde k jejich aktivaci směrem k efektorovým nebo paměťovým T-lymfocytům.

## Slide 27

Na obrázku 27 je odpověď na otázku, jak jsou v periférii naivní T-lymfocyty udržovány. V periférii jsou zralé naivní T-lymfocyty převážně v T zóně lymfatických uzlin, kde jsou v neustálém kontaktu s lymfoidními dendritickými buňkami (DC), které prezentují autoantigeny na MHC molekulách ovšem bez kostimulačních molekul. Vzniká tak unikátní mechanismus navozující anergii a delecii, ale současně udržující nezralé T-lymfocyty ve stádiu, kdy jsou do budoucna stále ještě permissivní k možným stimulačním signálům.

## Slide 28

Na obrázku 28 je zobrazen řez lymfatickou uzlinou, kde modrou barvou je zvýrazněna T zóna, kde se nacházejí již zmíněné T-lymfocyty. T-lymfocyty do lymfatické uzliny přicházejí aferentní žílou a prostupují přes venuly s vysokým epitelem a zde dlouhodobě přežívají. V případě aktivace jsou v kontextu s antigen prezentující buňkou stimulovány v efektorové nebo paměťové buňky a opouštějí lymfatickou uzlinu eferentní lymfatickou cévou, nikoli tedy krevní ale lymfatickou cestou, aby se později dostaly do krevního oběhu a osidlovaly další lokality v závislosti na jejich fenotypu. Ten může být v souladu s většinou publikací definován jako takzvané periferní a centrální, respektive efektorové nebo paměťové T-lymfocyty. Přičemž periferní efektorové T-lymfocyty osidlují různé tkáně, kde se dá předpokládat, že se díky k nim přicházejícím chemokinovým a proinflammatorním podnětům uplatní jejich efektorová funkce při obraně proti infekci, proti nádorům a podobně. Centrální efektorové T-lymfocyty se naopak dostávají, zejména ve funkci paměťových buněk, do lymfatických uzlin, kde mohou být rovněž kontaktovány antigenem, ovšem nikoli antigenem, který by se zde uvolňoval nebo byl prezentován na infikovaných buňkách, ale zejména antigenem, který sem přináší z periferie antigen prezentující buňky aferentními lymfatickými cévami.

## Slide 29

Na obrázku 29 je sumarizována cesta antigenu od periferie do lymfatické uzliny. Hlavním nositelem antigenu jsou dendritické buňky. Následně dochází k jeho vystavení a kontakt s T-lymfocyty a indukci specifické T buněčné odpovědi. Na obrázku jsou dobře vidět jednotlivá stádia obrany proti infekci. Na obrázku vlevo je vidět zejména zapojení buněk nespecifické imunity, včetně zapojení  $\gamma\delta$  T-lymfocytů. Na druhém obrázku zleva je potom vidět zapojení dendritických buněk, které jsou buňkami na rozhraní mezi nespecifickou a specifickou imunitou, které běžně migrují s antigenem do lymfatické uzliny. Antigen může migrovat do lymfatické uzliny, zejména v případě některých infekcí, také sám a může infikovat buňky, které jsou lokalizovány v lymfatické uzlině. Jednoznačně zde však dochází k indukci specifické imunitní odpovědi. S tím ovšem souvisí také možnost, že přes lymfatické uzliny dochází k šíření infekce do celého organismu. Během nebo po indukci specifické imunitní odpovědi dochází k imigraci efektorových buněk jak specifické, tak nespecifické imunity, například aktivovaných makrofágů aktivovaných prostřednictvím Th1 lymfocytů, a k eliminaci infekce.

### Slide 30

Jak bylo zmíněno T-lymfocyty je možno rozdělit do několika populací. První takovou významnou populací, kterou zmíníme, jsou CD4 T-lymfocyty.

### Slide 31

CD4 T-lymfocyty jsou, jak je uvedeno na obrázku 31, někdy označovány jako pomocné T-lymfocyty neboli Th lymfocyty. Vznikají z naivních CD4 T-lymfocytů, které opouštějí thymus, a to v kontaktu s aktivovanými antigen prezentujícími buňkami, které kromě prezentace antigenu na MHC musí poskytnout dostatečný kostimulační podnět. Ten spočívá jednak v expresi některých kostimulačních molekul, ale současně také v sekreci některých významných cytokinů, které rozhodují o dalším osudu vyvíjejících se prekurzorů Th lymfocytů.

### Slide 32

Jak je vidět na obrázku 32, je možno osud prekurzorů T-lymfocyty rozdělit do několika větví. Jednak může dojít k aktivaci prekurzorů směrem k Th1. Při této aktivaci hraje významnou roli zejména interleukin 12 (IL-12) a transformující růstový faktor gama (TGF- $\gamma$ ). IL-12, který je zde klíčový, je uvolňován zejména makrofágy. Při aktivaci prekurzorů T-lymfocytů směrem k Th2, se významnou měrou uplatňuje interleukin 4 (IL-4). Th2 lymfocyty, jak už jsme si říkali, jsou buňky, které produkují zejména IL-4, IL-5 a IL-13. Th1 lymfocyty jsou buňky produkující zejména interferon gamma (INF- $\gamma$ ) a tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- $\alpha$ ). Šipky, které vedou od cytokinů na pravé straně směrem k T-lymfocytům, ukazují, že produkty Th1 populace jsou současně supresorickými molekulami pro tu populaci druhou - tedy produkty Th1 lymfocytů jsou supresivní pro Th2 lymfocyty a naopak produkty Th2 lymfocytů, zejména IL-4, jsou supresivní pro populaci Th1 lymfocytů. To znamená, že INF- $\gamma$  a IL-4 jako produkty Th1 a Th2 populace jsou současně supresory té opačné populace. V přítomnosti TGF- $\beta$  dochází k diferenciaci CD4 prekurzorů směrem k regulačním T-lymfocytům (Treg), které jsou charakteristické tlumením imunitní odpovědi zejména specifických buněk, jako jsou ostatní T-lymfocyty, kde se uplatňuje několik mechanismů. Co se týče solubilních molekul, tak významnou roli hraje zejména IL-10, TGF- $\beta$  a cyklický adenosin monofosfát (cAMP).

Další populací, která může vzniknout v rámci diferenciaci a aktivace prekurzorů T-lymfocytů je populace Th17. Je nazvána podle cytokinu, který tyto buňky produkují, pokud jsou aktivovány a efektorově vyžívají. Jde o interleukin 17 (IL-17) a interleukin 22 (IL-22), IL-17 je významný v tom, že podporuje aktivitu a protibakteriální obrannou funkci polymorfonukleárů. Předpokládá se, že uvedené buněčné populace jsou fenotypově poměrně hodně stabilní. Pro typizaci těchto populací, například při analýze na průtokovém cytometru, se využívají nejčastěji monoklonální protilátky proti transkripčním faktorům, které jsou jedinečně exprimovány u těchto populacích. Jiná možnost je použít monoklonální protilátky proti některým povrchovým znakům. Pro Th1 lymfocyty je to znak T-bet, pro Th2 je to znak GATA-3. Pro některé populace regulačních T-lymfocytů je to transkripční faktor FoxP3. , Některé populace regulačních T-lymfocytů však nejsou pozitivní pro tento faktor, ale můžeme je typizovat i jiným způsobem. Jedním z takových povrchových typických znaků regulačních T-lymfocytů je vysoká míra exprese receptoru pro alfa řetězce IL-2, což je znak CD25.

### Slide 33

Na obrázku 33 je zobrazeno zejména to, že diferenciace naivních T-lymfocytů je určena cytokiny, které jsou produkty převážně dendritických buněk, v některých situacích i makrofágů. Ty jsou významné zejména při stimulaci CD8 lymfocytů. Dendritické buňky ve fázi, kdy stimulují naivní T-lymfocyty směrem k Th1, Th2, Th17 anebo Treg lymfocytů, jsou již předem instruovány k tomu, jakým směrem mají naivní T-lymfocyty stimulovat. Co rozhoduje tedy o tom, zda imunitní odpověď bude Th1 či Th2 typu? Rozhodují o tom signály, které působí na dendritické buňky. Tyto signály jsou v podstatě asociovány s mikrobiálními patogeny, které jsou primárním cílem specifické imunitní odpovědi. Většina těchto signálů je představována molekulami, které se označují jako ancestrální receptory neboli PAMP molekuly, což jsou molekulární motivy asociované s patogenem. Jsou to molekuly, které jsou charakteristické pro určité široké skupiny mikroorganismů, bez nichž by mikroorganismy nemohly realizovat svou patogenitu, a imunitní systém si během evoluce ověřil, že rozlišování těchto molekul a následná indukce určitého typu imunitní odpovědi, včetně indukce určitého subtypu T-lymfocytů, je to optimální, jak reagovat proti takovýmto mikrobiálním patogenům.

### Slide 34

Na obrázku tedy 34 jsou shrnuty faktory, které jsou významné pro diferenciaci naivních T-lymfocytů směrem k Th1 a Th2. Tato dráha je zobrazena tak, aby zahrnovala i primární podněty. Je to tedy zobrazeno zprava doleva oproti běžnému čtení s tím, aby bylo zobrazeno, co všechno se odehrávalo historicky před tím, než byl naivní T-lymfocyt finálně stimulován určitým směrem. V případě Th1 je primárním cytokinem zodpovědným za vlastní diferenciaci směrem k Th1 interleukin 12. Ten je produkován antigen prezentujícími buňkami, zejména pokud jsou stimulovány faktory, jako jsou některé molekulární motivy asociované s patogenem. Dále se zde uplatňuje stimulace chemokiny CCL4, CCL5, CXCL10, dále stimulace přes INF- $\gamma$  a prostaglandin 2, které jsou produkovány NK buňkami a některými CD8 T-lymfocyty a to na podnět některých virových a bakteriálních infekcí. Diferenciace směrem k Th2 je stále ještě otevřenou otázkou. Některé práce stále tvrdí, že v podstatě Th2 směr diferenciace je pouze projev nedostatečné stimulace směrem k Th1. Ukazují se však i některé významné faktory, které jsou schopny zajistit stimulaci Th2 přímo. Takovým typickým faktorem, který je zapojen do stimulace



Th2, je interakce antigen prezentující buňky s naivním Th lymfocytem prostřednictvím OX40 ligandu (OX40-L) a OX40 molekuly. Než však k této interakci dojde, musí být antigen prezentující buňka vhodně stimulovaná, aby byla schopna Th naivní buňky indukovat směrem k Th2. Mezi významné stimulační faktory zde patří některé chemokiny, jako je CCL2, CCL3, dále IL-7, TSLP jako thymický stromální lymfopoietin a rovněž prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>). Zdrojem látek, které stimulují antigen prezentující buňky, mohou být interakce s některými molekulárními motivy asociovanými s patogeny. Předpokládá se, že hlavním zdrojem těchto látek, cytokinů a jiných solubilních mediátorů, je zejména mastocyt, některé populace NK buněk (takzvané NKT buňky), což jsou buňky, které mají na svém povrchu i znaky T-lymfocytů. Mohou to být také enterocyty a epidermální buňky, tedy buňky zapojené do významné rozhodovací role, jakým směrem bude imunitní odpověď iniciována. No a co je tím primárním stimulem? Opět mikroorganismy a jejich schopnost penetrace, jejich vlastnosti co se týče exprese PAMP motivů a podobně.

### Slide 35

Na dalších třech obrázcích, tedy 35, 36 a 37, jsou ukázány některé dráhy stimulace naivních T-lymfocytů směrem k Th1, kde je dominující IL-12. Dendritické buňky přitom vznikají diferenciací z monocytů za stimulace granulocytárně monocytárního koloie stimulujícího faktoru (GM-CSF) a IL-4. To co je určující kromě těchto dvou solubilních faktorů, jsou kontakty s bakteriálními patogenními motivy, tak jak je ukázáno úplně v levé části (například lipopolysacharid, který je rozlišován Tool-like receptory 4, některé prostaglandiny a jiné bakteriální motivy). Na druhou stranu, přítomnost produktu jako je prostaglandin E2 z mastocytů, vede k diferenciaci prekurzorů dendritických buněk směrem k buňkám, které jsou schopny aktivovat CD4 T-lymfocyty směrem k Th2, tedy k buňkám produkujícím, jak už bylo zmíněno, IL-4, IL-5 a IL-13.

### Slide 36

Kromě výše uvedené stimulace, která vede k diferenciaci prekurzorů dendritických buněk v buňky schopné indukovat imunitní odpověď, dochází také k diferenciaci prekurzorů v populaci myeloidních dendritických buněk, která typicky

přispívá k imunitní odpovědi. Zde se uplatňují významnou měrou opět některé bakteriální a virové motivy, jako je na obrázku uvedená dvouvláknová DNA, jednovláknová RNA, thymický stromální lymfopoinetin, který, na rozdíl od virových nukleových kyselin směřujících odpověď směrem k Th1, směřuje odpověď Th2 směrem. Při interakci směrem k Th2 byla již zmíněna významná role kostimulační molekuly OX40 na T-lymfocyty a OX40 ligandu na prekurzoru myeloidní dendritické buňky.

### Slide 37

Na posledním obrázku je uvedeno zapojení plasmatické, plasmacytoidní dendritické buňky, která diferencuje s plasmocytoidního dendritického prekurzoru za stimulace některých motivů, jako je například CPG motiv, který stimuluje Toll-like receptor 9 (TLR9), nebo jednovláknová RNA, která stimuluje zejména Toll-like receptor 7 (TLR7). To vede zejména ke stimulaci plasmacytoidních dendritických buněk, které neindukují efektorovou Th1 odpověď tak, jak to bylo v případě myeloidních dendritických buněk, ale indukují zejména CD4 T-lymfocyty k diferenciaci směrem k regulačním T-lymfocytům. Zde se významně uplatňuje INF- $\alpha$  a interakce dalších molekul z rodiny tumor nekrotizujícího faktoru, jako je ICOS ligand a ICOS molekula. Pro regulační T-lymfocyty je typická produkce některých imunopresivních látek, jak je uvedeno na tomto obrázku. V přítomnosti IL-3 mohou plasmacytoidní dendritické buňky diferencovat v buňky, které jsou schopny indukovat diferenciaci naivních T-lymfocytů směrem k Th2 tak, jak je ukázáno v dolní části obrázku. Zde vidíme, že se uplatňuje podobná interakce jako v horní části ICOS ligand/ICOS molekula a současně s tím interakce OX40 ligandu s OX40 molekulou, která byla na předchozím obrázku uvedena jako významný stimulátor specifické diferenciaci CD4 T-lymfocytů směrem k Th2 lymfocytům.

### Slide 38

Na obrázku 38 je pak ulzána významnost kostimulačních molekul při aktivaci naivní T buňky v interakci s antigen prezentující buňkou. Je zde jednak uveden vlastní TC receptor, včetně signálních molekul CD3, a CD4 molekuly, které jsou rozhodující pro schopnost vazby TC receptoru na MHC druhé třídy a peptid. Dále kostimulační molekula CD28, která je typicky přítomna na T-lymfocytech a která

musí být simulována vazbou přes molekulu B71 nebo B72, CD80, CD86 na povrchu aktivované antigen prezentující buňky. Pokud tato kostimulační interakce nenastane, tak většinou dochází k indukci anergie anebo apoptózy naivních T-lymfocytů, ale nikoli k indukci specifické aktivace a následně tedy tvorbě efektorových a paměťových T-lymfocytů. Je to v podstatě mechanismus periferní tolerance prezentace antigenu v nepřítomnosti kostimulačních molekul.

### Slide 39

Na obrázku 39 jsou shrnuty základní a hlavní funkce Th1 lymfocytů. Th1 lymfocyty jsou známy svou schopností stimulovat makrofágy k zabíjení zejména intracelulárních bakterií, podporovat intracelulární oxidační vzplanutí a mechanismy rezistence na obranné funkce intracelulárních parazitů, které spočívají v tom, že eliminují tvorbu toxického prostředí ve fagolyzozomu, případně unikají z fagolyzozomu nebo brání funkci nebo fúzi fagosomu s lyzozomem. V každém případě eliminují okolní toxické prostředí, které by na ně působilo ať už tím, že unikají z fagozomu nebo inhibují jeho aktivaci. Kromě toho Th1 lymfocyty jsou významné při aktivaci naivních CD8 T-lymfocytů. U některých Th1 lymfocytů byla popsána přímá cytotoxická funkce a konečně Th1 lymfocyty pomáhají při antigenně specifické aktivaci B-lymfocytů, zejména indukci izotopového přesmyku k tvorbě opsonizačních a komplement fixačních protilátek. Je to vlastně indukce, která je daná tím, že izotyp určité protilátky má biologické funkce určené konstantní doménou, což je vlastně to, co určuje izotyp. Obecně se udává dominance Th2 lymfocytu při stimulaci B-buněk k produkci protilátek, ovšem Th2 lymfocyty vedou k indukci jiných protilátek, co se týče funkce, i když neovlivňují specifickou nebo specifickou těchto protilátek, neovlivní tedy strukturu antigen vážící domény.

### Slide 40

Přehled hlavních funkcí druhé populace T-lymfocytů, tedy Th2, je uveden na obrázku 40. Th2 lymfocyty jsou významné při indukci izotypového přesmyku protilátek produkovaných B-lymfocyty během jejich vyžívání směrem k IgE, k tvorbě neutralizačních imunoglobulinů a tvorbě IgA. Jsou obecně významné pro aktivaci antigen specifické obrany proti extracelulárním parazitům, ale rovněž k aktivaci antigen nespecifické obrany přispívají k atrakci a aktivaci eozinofilů

Přispívají rovněž k proliferaci mastocytů a jsou významné pro terminální diferenciaci B-lymfocytů v plasmatické buňky na slizničních površích nebo v podslizniční tkáni, kde je významným faktorem této terminální diferenciace IL-6. To se odehrává především v lamina propria mucosae. Kromě toho, svými cytokiny rovněž přispívají k inhibici funkcí spojených s Th1 lymfocyty a v tomto případě tedy přispívají k inhibici aktivace makrofágů.

#### Slide 41

Další populací Th lymfocytů jsou Th17 lymfocyty, které jsou významné zejména pro aktivaci nespecifické neutrofilní obrany, tedy obrany proti bakteriím, zejména extracelulárním.

#### Slide 42

Pro Th17 lymfocyty je významné že jsou to buňky, které vznikají z regulačních prekurzorů, takzvaných rTh17, které se diferencují v přítomnosti vhodných podnětů, konkrétně TGF- $\beta$  a IL-6. Tyto regulační Th17 jsou fenotypově nestabilní a v přítomnosti IL-23 diferencují terminálně v efektorové Th17 lymfocyty. Rozdíl mezi regulačními Th17 a efektorovými je v tom, že regulační Th17 lymfocyty jsou silně protizánětlivé buňky, kdežto efektorové Th17 jsou buňky přispívající k zánětu a k aktivaci neutrofilů.

Poslední populací pomocných T-lymfocytů jsou regulační T-lymfocyty (Treg). Těch je několik rodin – přirozené regulační T-lymfocyty (nTreg), dále indukované regulační T-lymfocyty (iTreg), T-lymfocyty takzvané TA, TR lymfocyty, které jsou významné zejména produkcí TGF- $\beta$  a Th3 lymfocyty, které jsou indukovány zejména na serózách a diferencují zejména v přítomnosti TGF- $\beta$ , IL-4 a IL-10. Je zde důležité zmínit, že přirozené regulační T-lymfocyty vznikají převážně z thymu a to v kontextu vysoké afinity vazby TC receptoru na peptid na MHC molekulách dendritických buněk stimulovaných thymálním stromálním lymfopoetinem. Jsou to tedy přirozené regulační buňky, které pocházejí z thymu. Indukované regulační T-lymfocyty se diferencují v periférii, včetně slizničních tkání, a významné faktory, které jsou zapojeny do stimulace jejich diferenciace jsou kyselina retinová, IL-2, IL-10 a TGF- $\beta$ .

### Slide 43

Th17 lymfocyty diferencují terminálně z nějakých regulačních rTh17 prekurzorů, které vznikají na podnět cytokinů, TGF- $\beta$  a IL-6. V přítomnosti IL-23 však dochází k terminální diferenciaci. Vidíte, že TGF- $\beta$ , jak je zobrazeno na tomto obrázku, je významný pro diferenciaci jak regulačních T-lymfocytů, tak prekurzorů Th17 lymfocytů, tedy buněk rTh17. IL-6 tedy přispívá ke změně fenotypu od regulačních obecných T-lymfocytů se znakem FoxP3 k těm rTh17 se znakem ROR $\gamma$ T.

### Slide 44

Na dalším obrázku jsou sumarizovány efektorové funkce Th17 lymfocytů. Jednak je uvedeno spektrum cytokinů uvolňovaných Th17 lymfocyty, kde významnou roli hraje, jak již bylo zmíněno, IL-17, IL-22, ale i řada dalších cytokinů, které jsou zapojeny do aktivace endoteliálních buněk, fibroblastů, epiteliálních buněk a makrofágů, které produkují široké spektrum růstových faktorů, chemokinů a cytosiny, které vedou jednak k aktivaci granulocytů, k jejich kumulaci a obraně proti bakteriální infekci, jak bylo zmíněno, zejména extracelulární. Stejné mechanismy však mohou vést k rozvoji nebo alespoň k prohloubení některých autoimunitních onemocnění a k prohloubení chronických zánětů.

### Slide 45

Jako shrnutí funkcí Th17 lymfocytů je uveden obrázek 45. Th17 lymfocyty produkují některé cytokiny, zejména tedy IL-17 a IL-22 stimulují obranu proti infekci extracelulárních bakterií, stimulují fibroblasty, epiteliální buňky, dále stimulují neutrofilní granulocyty a přispívají k rozvoji autoimunitních onemocnění.

### Slide 46

Naopak funkce regulačních T-lymfocytů je funkcí, která je velmi heterogenní, neboť Treg jsou velmi heterogenní a využívají celou škálu mechanismů,

prostřednictvím kterých tlumí imunitní odpověď. Tyto mechanismy jsou jednak zprostředkovány produkcí některých cytokinů, ale mohou být rovněž realizovány přímým cytotoxickým působením proti antigenně specifickým aktivovaným T-lymfocytům k určení potlačení jejich funkce a dále může docházet k takzvanému okolnímu efektu suprese přiléhajících buněk (bystander efekt), kde významnou roli hrají imunosupresní cytokiny nebo některé další imunosupresi nebo apoptózu indukující substance. Detailní zmínky o těchto regulačních lymfocytech budou uvedeny ještě v dalším textu.

#### **Slide 47**

Další významnou populací jsou CD8 T-lymfocyty, což jsou buňky, které se charakterizují zejména schopností zabít cílové buňky přímým kontaktem nebo uvolněním cytotoxických substancí. Je důležité zmínit, že cytotoxické lymfocyty zabíjejí antigenně specifické buňky, to znamená, že musí docházet k antigenně specifickému porušení cílových buněk, kde se opět uplatňuje interakce TC receptoru a peptidu, který je nějakým způsobem asociován s patologií té buňky prezentovanému na MHC první třídy.

#### **Slide 48**

CD8 T-lymfocyty vznikají z naivních CD8 T-lymfocytů nebo z jejich prekurzorů, po kontaktu s aktivovanými antigen prezentujícími buňkami, kde je nutné zdůraznit, že na rozdíl od CD4 T-lymfocytů je pro aktivaci naivních T-lymfocytů vyžadováno mnohem intenzivnější kostimulační pozadí, což je jeden z mechanismů, který je zodpovědný za prevenci náhodné aktivace cytotoxických autoimunitních buněk.

#### **Slide 49**

Vlastní aktivace probíhá podobně jako u CD4 T-lymfocytů v sekundárních lymfatických orgánech. Pro aktivaci jsou významné antigen prezentující buňky, které většinou aktivují ty CD8 T-lymfocyty společně s pomocnými antigenně specifickými CD4 T-lymfocyty. Ovšem mohou se zde uplatnit i antigen prezentující buňky, které

jsou předem stimulovány tak, že jsou schopny indukovat aktivaci CD8 T-lymfocytů bez konkrétní přítomnosti CD4 T-lymfocytů. Takovým buňkám se říká licencované antigen prezentující buňky. Aktivace CD8 T-lymfocytů je poměrně časově velmi dlouhá, trvá několik desítek hodin a v případě aktivace T-lymfocytů v cytotoxické lymfocyty musí interakce probíhat dokonce až téměř 50 hodin.

## Slide 50

Na obrázku 50 je sumarizováno několik mechanismů, které jsou nezbytné a zapojené do aktivace naivních CD8 T-lymfocytů směrem k efektorovým a paměťovým buňkám. Zelenou šipkou je uvedeno to klíčové a to je kostimulace nebo současná prezentace peptidu na MHC první třídy. Ke tvorbě kostimulačních molekul je dendritická buňka většinou stimulována přítomností pomocného CD4 T-lymfocytu vázaného přes MHC druhé třídy na peptidu, samozřejmě na něm přítomném, a pomocí jiných kostimulačních interakcí. Typická je interakce CD40/CD40 ligand. Vlastní stimulace CD8 T-lymfocytu probíhá potom prostřednictvím antigen specifické reakce, zde je uvedena jako MHC I antigen, TC receptor interakce, dále kostimulační molekuly typicky B7, CD28, kde B7 je na povrchu antigen prezentující buňky, CD28 je na povrchu naivní CD8 T buňky a dále přítomnost cytokinů interferon alfa, beta a IL-12.

Další možnost je, že dendritická buňka je předem stimulována k tomu, aby produkovala kostimulační molekuly tak, jak byly uvedeny, a stimulační cytokiny, aniž by ve chvíli kontaktu s CD8 T-lymfocytem musela nutně být kontaktována CD4 T-lymfocytem. Kontakt s CD4 T-lymfocytem je obecně významný, pouze se odehrává v časoprostorově jiném bodě než kontakt s CD8 T-lymfocytem. Jinak je vlastní mechanismus aktivace CD8 T-lymfocytu velmi podobný, jak vidíte na prostřední části toho obrázku.

Vpravo je pak uvedena situace, kdy dendritická buňka není dostatečně aktivován. Důsledkem toho je sice prezentace antigenu na MHC první třídy, ale následně odpověď naivních T-lymfocytů není v tom, že by byly aktivovány, ale dochází k anergii, případně delecii a apoptóze prekurzorů naivních T-lymfocytů.

## Slide 51

Na obrázku 51 jsou zobrazeny molekuly, které jsou klíčové k tomu, aby došlo jednak k aktivaci CD4 T-lymfocytů pomocí antigen prezentujících buněk a následně rovněž k aktivaci CD8 T-lymfocytů pomocí antigen prezentující buňky, která je současně koaktivována již aktivovaným CD4 T-lymfocytem. Tyto mechanismy byly v podstatě zmíněny. Je důležité zmínit zejména kostimulační molekuly. Pro přehled jsou to tedy interakce B7, CD28 v případě antigen prezentující buňky a CD4 T-lymfocytu. Tatáž interakce se uplatňuje při aktivaci CD8 T-lymfocytu. Významnou roli při aktivaci CD8 T-lymfocytů dále hraje autokrinní stimulace prostřednictvím IL-2 a důležitá je také antiapoptotická stimulační dráha přes 4-1BB ligand na antigen prezentujících buňkách se 4-1BB molekulou na CD8 T-lymfocytech.

## Slide 52

Na dalším obrázku je v detailu sumarizován model aktivace CD8 T-lymfocytu, kde na jednu stranu je ukázána významná funkce interakce OX40/OX40 ligand při stimulaci CD4 T-lymfocytu a současně významná role antiapoptotické dráhy 4-1BB/4-1BB ligand. Obě tyto interakce a obě tyto molekuly jsou vlastně členy rodiny tumor nekrotizujícího faktoru a proto jsou zapojeny významně do indukce nebo suprese apoptotické odpovědi cílové buňky.

## Slide 53

Na obrázku 53 je ukázán efekt slabé aktivace CD8 T-lymfocytu, která ústí v CD8T toleranci. Vlevo máme zobrazenou CD8 buňku, která je v kontextu MHC na antigen TC receptor a B7, CD28 stimulována buďto v přítomnosti cytokinů, IL-12 a interferon alfa nebo beta, nebo v nepřítomnosti. V nepřítomnosti je důsledkem tolerance, tak jak ukazuje šipka nahoru. V přítomnosti cytokinů je naopak aktivace CD8 významná, CD8 se tedy diferencuje v aktivovanou CD8 T buňku a tato může diferencovat několik významných subpopulací. Jednak jsou to paměťové CD8 T-lymfocyty a efektorové CD8 T-lymfocyty. Jestliže je antigenní stimulace dlouhodobá, dochází k vyčerpání efektorové buňky a k navození tolerance, což je mechanismus, který je významný zejména k udržení homeostázy imunitní odpovědi a k prevenci autoimunity, neboť může dojít k tomu, že cizorodý peptid je podobný autonomnímu a potom je zodpovědný za dlouhodobou stimulaci.



## Slide 54

Na dalším obrázku jsou uvedeny hlavní solubilní substance, kterými cytotoxický T-lymfocyt zprostředkovává svou cytotoxickou funkci. Jedná se o dvě substance a to perforin a granzym. Perforin je látka, která polymeruje v membráně z několika podjednotek za vzniku kanálu.

## Slide 55

Granzymy jsou pak látky, které tím vzniklým kanálem, tak jak je ukázáno na tomto obrázku, migrují do nitra buňky, kde indukují apoptózu, což je významný mechanismus cytotoxického působení CD8 TC lymfocytů.

## Slide 56

Detailně je to zobrazeno na tomto obrázku, Je zobrazeno, že dvě podtřídy granzymů, tedy granzym A a granzym B, mohou v cílových buňkách navodit v podstatě velmi odlišnou formu reakce. Typickým cytotoxickým mediátorem je granzym B, který po vstupu do buňky navozuje apoptózu, přispívá k aktivaci kaspázy 3 a kaspázy 7 a následně tedy apoptotické buněčné smrti. Rovněž přispívá k uvolnění cytochromu C a k tvorbě některých významných intracelulárních mediátorů. Na rozdíl od toho, granzym A přispívá zejména k rozvoji zánětlivé reakce, ne zcela jasným mechanismem přispívá k aktivaci a produkci IL-1 $\beta$ . Zde uvedená kaspáza 1 je známým mechanismem aktivace preformovaných nefunkčních prekurzorů IL-1 $\beta$ , kde kaspáza 1 je významná k tomu, aby prekuzor k IL-1 $\beta$ , případně iL-18 byl štěpen a mohly se z buňky uvolňovat už efektorové prozánětlivé formy IL-1 nebo IL-18.

## Slide 57

V takovém hrubém schématu je to zobrazeno na obrázku 57. Je zde ukázáno, že efektorové funkce cytotoxických lymfocytů a NK buněk spojené s uvolněním granzymu a perforinu jsou spojené jednak s navozením cytotoxické aktivity a s

indukcí buněčné smrti, ale rovněž mohou stimulovat zánětlivou reakci při stimulaci makrofágu.

### Slide 58

Cytotoxické látky, jsou jako granzym A, granzym B a perforin, jsou uloženy v granulích cytotoxických lymfocytů a uvolňují se z nich velmi rychle. Některé sekretované cytotoxické substance, jako jsou TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , INF- $\gamma$  a povrchová exprese Fas ligandu, jsou následkem stimulace syntetizovány *de-novo*. To znamená, že tato odpověď je časově oddálenější.

### Slide 59

Tady na tomto obrázku je naznačen mechanismus indukce apoptózy přes interakci Fas ligand/Fas, anebo TNF, který spadá do podobné rodiny, jako Fas ligand. Obecně dochází přes Fas asociované, takzvané **det** domény, k aktivaci prokaspázy 8 v kaspázu 8 a následně tedy k aktivaci efektorových kaspáz – kaspázy 3, 6 a 7, které přispívají jednak k degradaci DNA, ale štěpí také proteiny asociované s buněčnou smrtí. Dochází tedy k tvorbě nebo uvolňování signálních proteinů, kináz, které tlumí DNA opravné proteiny, strukturní proteiny a kaspáza 8 rovněž přispívá k aktivaci mitochondrií, která vede k uvolnění cytochromu C. Druhou dráhou, která není realizována přímo přes aktivaci kaspáz, ale přes některé kinázy, dochází k tlumení antiapoptotických molekul, jako je Bcl-2, Bcl-X a tyto molekuly nejsou schopny tlumit uvolnění cytochromu C a dochází k jeho bouřlivému uvolnění a buňka přechází do apoptotické smrti.

### Slide 60

CD8 T-lymfocyty zabíjí virem infikované a nádorové buňky. Granzymem indukují apoptózu za chorobných stavů, na rozdíl do kaspáz, které indukují apoptózu fyziologicky, případně v odpovědi na interakci Fas ligand/Fas. Důležité je, že granzymem zprostředkovaná aktivace nebo indukce apoptózy může vést k zánětlivé reakci. Některé subpopulace CD8 T-lymfocytů jsou nadány schopností regulovat imunitní odpověď a působí protizánětlivě. Jednak tím, že potlačují expresi

kostimulačních molekul na antigen prezentujících buňkách, jednak tím, že podobně jako přirozené regulační T-lymfocyty mohou interferovat s aktivitou IL-2, zde zejména prostřednictvím CD122 receptoru pro IL-2. I když u regulačních T-lymfocytů je tato interference založena zejména na CD25 molekule, která je alfa řetězcem v receptoru pro IL-2, která je významná pro takzvané metabolické strádání cílových buněk a potlačování jejich imunitní odpovědi, jak je v detailu zmíněno v další kapitole.

### **Slide 61**

Na obrázku 61 jsou uvedeny faktory, které vypovídají o rychlosti nástupu sekundární imunitní odpovědi, která je spojena s populacemi paměťových CD4 a CD8 T-lymfocytů. Tyto paměťové buňky migrují do periferní tkáně, kde se uplatňují jako cytotoxické lymfocyty nebo migrují do lymfatických uzlin, kde dlouhodobě přetrvávají. Faktory, které jsou typické povrchové znaky, podle nichž můžeme určit, zda se jedná o efektorové lymfocyty, anebo o ty lymfocyty, které jsou předurčeny k migraci do lymfatické uzliny. Je to tedy jednak exprese CD62 ligandu, prostřednictvím kterého se T-lymfocyty mohou dostat do lymfatické uzliny, dále exprese receptoru pro IL-7, který je významný zejména pro dlouhodobě přežívající lymfocyty a dále exprese receptoru CD45RA, který u je efektorových buněk už exprimován velmi málo až téměř vůbec.

### **Slide 62**

Ještě vzniká otázka, jak jsou v periférii paměťové lymfocyty udržovány. Na rozdíl od naivních T-lymfocytů, které, jak jsme říkali, vyžadují trvalý kontakt přes TCR a peptid prezentovaný na MHC molekule na lymfoidních dendritických buňkách, udržování populace paměťových T-lymfocytů v periférii již není závislé na interakci TC receptoru s nějakým peptidem na MHC molekulách, ale pouze na trvalé cytokinové stimulaci.

### **Slide 63**

Další populací T-lymfocytů, která byla zmíněna v úvodu lekce a která se významně liší od předchozí populace T-lymfocytu, je takzvaná populace  $\gamma\delta$ -lymfocytů.

#### Slide 64

Jsou to lymfocyty, které jsou charakteristické tím, jak už sám název říká, že na jejich povrchu je Tc receptor tvořen podjednotkami  $\gamma$  a  $\delta$ . Tyto podjednotky mají podstatně menší diverzitu ve srovnání s podjednotkami  $\alpha$  a  $\beta$ . Je to dáno především omezeným počtem segmentů ve V oblasti. Je zde také relativně nízká frekvence nepalindromatických N nukleotidů, které jsou připojeny terminální deoxyribonukleotidyltransferázou a diverzita je určena pozitivně vazbou na omezené spektrum autoantigenů. Tyto autoantigeny jsou rozlišovány v kontextu zejména CD1 molekul a takzvaných MICA molekul, což jsou MHC I molekulám podobné molekuly, ovšem nejsou to vysoce variabilní, klasické MHC I molekuly. Důležité je, že mnoho klonů  $\gamma\delta$  T-lymfocytů má stejnou specifitu Tc receptoru.

#### Slide 65

T lymfocyty, které na svém povrchu exprimují TcR $\gamma\delta$ , jsou obvykle CD4- a CD8-. Část těchto buněk však může CD8 exprimovat, obvykle jde o heterodimer  $\alpha\alpha$ .  $\gamma\delta$ -lymfocyty jsou schopny rozpoznávat nepeptidové antigenní podněty, zejména tzv. fosfoantigeny, které jsou též označovány jako prenylované pyrofosfátové antigeny. Tyto antigeny jsou  $\gamma\delta$ -lymfocyty prezentovány jinými molekulami než HC. Jde zejména o molekuly CD1c, CD1d, MICA a MICB, které se svou strukturou podobají molekulám MHC I. třídy. Významná je zejména prezentace antigenních fragmentů na molekulách MICA a MICB, které se nacházejí téměř výhradně na epitelových buňkách střevní sliznice, které je exprimují tehdy, je-li střevní sliznice vystavena stresu (infekce, tepelný šok). Molekuly MICA a MICB nacházíme také na nádorových buňkách.

#### Slide 66

$\gamma\delta$ -lymfocyty se u člověka vyskytují převážně v lymfatické tkáni kůže a sliznic a dále ve slezině, kde sehrávají významnou úlohu v obraně proti některým, zejména intracelulárně kolalizovaným, virovým a bakteriálním infekcím, jako jsou

Libérie, mykobakterie, salmonely, ehrlichie, mykoplazmy a borélie. Produkci některých cytokinů (IL-2, IL-3, IL-6, IFN- $\gamma$  a RNF- $\alpha$ ) se podílejí na regulaci a polarizaci Th1 a Th2 lymfocytů.

**Slide 67**