

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2014**

**Barbora Lukášová**

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra zoologie**



**T lymfocyty – funkční populace a jejich  
význam v imunitním systému člověka.**

**Bakalářská práce**

**Barbora Lukášová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2014**

**Vedoucí práce: RNDr. Ivana Fellnerová, Ph.D.**

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením RNDr. Ivany Fellnerové, Ph.D. a pouze s použitím citované literatury.

V Olomouci dne 16. 4. 2014

.....

podpis

## **Abstrakt**

Práce se formou literární rešerše zabývá problematikou T-lymfocytů, které hrají klíčovou roli v řadě fyziologických a patologických procesů.

V úvodní části jsou v přehledu představeny základní složky a funkce imunitního systému se zaměřením na buňky specifické imunity. Intenzivní výzkum v souvislosti s narůstajícím počtem autoimunitních a nádorových onemocnění a také s rozvojem transplantační medicíny odhaluje stále nové populace T lymfocytů, jež hrají v daných procesech významnou roli.

Cílem literární rešerše je podat aktuální přehled všech dosud popsaných populací T lymfocytů vč. jejich základní charakteristiky a funkce, pokud je známa. V závěru jsou představeny vybrané patologické jevy, které bezprostředně souvisí s disfunkcí nebo naopak hyperfunkcí některé z populací T lymfocytů.

## **Abstract**

Using literary review this work deals with T-lymphocytes, which are essential for many physiological and pathological processes.

Basic principles and functions of immune system with focus on specific immune cells are presented in an introduction. Intense research of constantly increasing number of autoimmune and tumour illnesses as much as development of transplant medicine uncovers new populations of T-lymphocytes, which carry important roles in these processes.

The main purpose of this work is to describe currently known populations of T-lymphocytes including their basic characteristics and functions if known. Conclusion deals with pathological occurrences related to dysfunction or hyper function in some of T-lymphocytes populations.

**Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí práce RNDr. Ivaně Fellnerové, Ph.D. za odborné vedení, připomínky, podněty, cenné rady a poskytnuté materiály.

## Obsah:

1	Úvod.....	8
2	Cíle práce .....	9
3	Imunitní systém v přehledu.....	10
3.1	Hematopoéza.....	10
3.2	MHC glykoproteiny .....	12
3.3	CD nomenklatura .....	12
3.4	Nespecifická imunitní odpověď .....	12
3.5	Specifická imunitní odpověď .....	14
4	T- lymfocyty .....	16
4.1	Funkční morfologie T-lymfocytů.....	16
4.2	Vznik a vývoj .....	17
4.3	Prezentace antigenu a aktivace T-lymfocytů .....	18
5	Přehled efektorových subpopulací T-lymfocytů.....	21
5.1	Cytotoxické T-lymfocyty .....	21
5.2	Pomocné Th lymfocyty .....	22
5.2.1	Prekurzorové Th0 lymfocyty .....	23
5.2.2	Pomocné Th1 lymfocyty.....	23
5.2.3	Pomocné Th2 lymfocyty.....	26
5.2.4	Interakce mezi Th1 a Th2 .....	28
5.2.5	Pomocné Th17 lymfocyty.....	29
5.2.6	Pomocné Th9 lymfocyty.....	30
5.2.7	Pomocné Th22 lymfocyty.....	31
5.2.8	Folikulární Tfh lymfocyty .....	31
5.3	Regulační T-lymfocyty (Treg) .....	32
5.3.1	Rozdělení regulačních T-lymfocytů .....	34

5.3.1.1	Přirozené regulační T-lymfocyty (nTreg) .....	34
5.3.1.2	Indukované regulační T-lymfocyty (iTreg) .....	35
5.3.1.2.1	<i>Regulační T-lymfocyty typu 1 (Tr1)</i> .....	35
5.3.1.2.2	<i>Antigen-specifické pomocné T-lymfocyty typu 3 (Th3)</i> .....	36
5.3.1.3	CD8+ Treg (Supresorové T-lymfocyty; Ts) .....	36
5.3.1.4	NKT lymfocyty .....	36
5.3.2	Mechanismy fungování regulačních T-lymfocytů.....	37
5.4	$\gamma\delta$ T-lymfocyty.....	39
6	Patologie v souvislosti s T-lymfocyty .....	42
6.1	Těhotenství a Treg .....	42
6.2	Autoimunitní onemocnění .....	43
6.2.1	Revmatoidní artritida .....	44
6.2.2	Sarkoidóza .....	45
6.3	Alergie .....	45
6.3.1	Atopie.....	47
6.4	HIV a AIDS .....	47
6.5	Nádor a T-lymfocyty .....	48
7	Závěr .....	50
8	Seznam zkratk .....	52
9	Seznam použité literatury .....	53

# 1 Úvod

Imunitní systém patří mezi základní homeostatické mechanismy organismů. Za normálních okolností chrání organismus před cizorodými a infekčními částicemi, rozpoznává a toleruje vlastní tkáň a zároveň dohlíží na odstranění starých, poškozených nebo pozměněných buněk. Schopnost imunitního systému rozpoznat všechny tyto struktury a následně na ně odpovídajícím způsobem reagovat, je dána existencí vysoce polymorfních imunitních buněk resp. receptorů a imunoglobulinů.

Základní buněčnou složku imunitního systému představují leukocyty, vyskytující se v krvi, lymfě, lymfatických orgánech popř. dalších tkáních. Ze všech leukocytů vykazují nejvyšší polymorfismus lymfocyty T a B. Tyto vysoce specifické buňky mají u člověka vyvinutý složitý rozpoznávací mechanismus představované nejen specifickými receptory ale také řadou koreceptorů. Složitý rozpoznávací mechanismus pak umožňuje s mimořádnou přesností zasáhnout proti potencionálně škodlivým částicím označovaným jako antigeny. Tato na jedné straně velmi propracovaná a výkonná síť ochranných imunitních reakcí však může, na druhé straně, selhávat v řadě dílčích kroků. S takovou situací se setkáváme často právě v případě T lymfocytů, kterým se předkládaná práce věnuje.

Selhání některé z četných funkcí T lymfocytů nebo naopak jejich nadměrná aktivita, může vést k rozvoji autoimunitního onemocnění, nádorového bujení a také k různým druhům hypersenzitivity. Ukazuje se, že základem všech těchto onemocnění je primárně narušení rovnováhy mezi různými populacemi T lymfocytů a tím následně změna aktivity některých jejich efektorových populací. V souvislosti s uvedeným výčtem onemocnění, ale také v souvislosti s problematikou transplantační imunologie jsou definovány stále nové subpopulace T-lymfocytů, které hrají v těchto procesech klíčovou roli. Tato bakalářská práce se zabývá definicí jednotlivých subpopulací T-lymfocytů a jejich úlohou v imunitním systému člověka.



## 2 Cíle práce

Cílem této práce bylo vypracovat formou literární rešerše přehled jednotlivých populací T-lymfocytů a jejich fyziologickou i patologickou funkcí v imunitním systému.

Úvodní část práce je věnována především imunitnímu systému jako celku, jeho základním rozdělením na nespecifickou a specifickou imunitní odpověď a obecnému popisu T-lymfocytů, které se řadí ke specifické odpovědi, jejich morfologií, vývojem a také jejich aktivací.

Hlavní část se zaměřuje na obecný přehled jednotlivých subpopulací T-lymfocytů. Cílem této části je zaměřit se na strukturní i funkční rozdíly mezi jednotlivými subpopulacemi, dále budou zmapovány faktory ovlivňující diferenciaci, vývoj, efektorové projevy a vzájemné vztahy mezi jednotlivými subpopulacemi.

V závěrečné části práce je přehled některých patologických projevů vyvolaných disfunkcí nebo naopak příliš silnou reakcí T-lymfocytů. Bude zde charakterizován vznik autoimunitních onemocnění, nádorového bujení a dalších patologií jako jsou alergie nebo úlohy lymfocytů během těhotenství.

### 3 Imunitní systém v přehledu

Imunitní systém se ve spolupráci s nervovým a hormonálním systémem podílí na udržení homeostázy v organismu. Rozpoznává vlastní tkáň organismu a udržuje toleranci vůči nim. Imunitní systém rozpoznává a reaguje také na antigeny. Nejčastěji se jedná o cizorodé látky z vnějšího prostředí (tzv. exoantigeny), některé antigeny však mohou pocházet z organismu samotného (tzv. autoantigeny), tedy průběžně odstraňuje staré, poškozené a některé změněné (zmutované) buňky. Aby na ně imunitní systém mohl reagovat, musí být rozeznány ve formě makromolekul. Nejvýznamnějšími antigeny jsou proteiny a různé komplexní sacharidy, ale také lipidy a lipoproteiny. Imunitními receptory je rozeznána jen malá část antigenu zvaná epitop (Hořejší et al., 2009).

Organismus má na obranu proti vniknutí cizích vysokomolekulárních substancí (cizorodé bílkoviny, bakterie, viry) dva imunitní mechanismy: nespecifickou buněčnou a látkovou obranu a specifickou buněčnou a látkovou obranu. Buněčnou imunitu zajišťují lymfocyty, látkovou imunitu zprostředkovávají protilátky. Buňky imunitního systému spolu s pojivovými buňkami a dalšími strukturami tvoří lymfatickou tkáň a lymfatické orgány. V primárních lymfatických orgánech dochází ke vzniku, diferenciaci a zrání imunokompetentních buněk a patří mezi ně kostní dřev, thymus (u ptáků Fabricova burza). Sekundární lymfatické orgány a tkáň jsou místem, kde probíhají hlavní fáze antigenně specifických imunitních reakcí a patří mezi ně slezina, lymfatické uzliny, tonsily, appendix a Peyerovy pláty ve střevě (Hořejší et al., 2009).

Mechanismy obrany organismu se liší především způsobem rozpoznání antigenů, rychlostí aktivace a efektivitou zásahu.

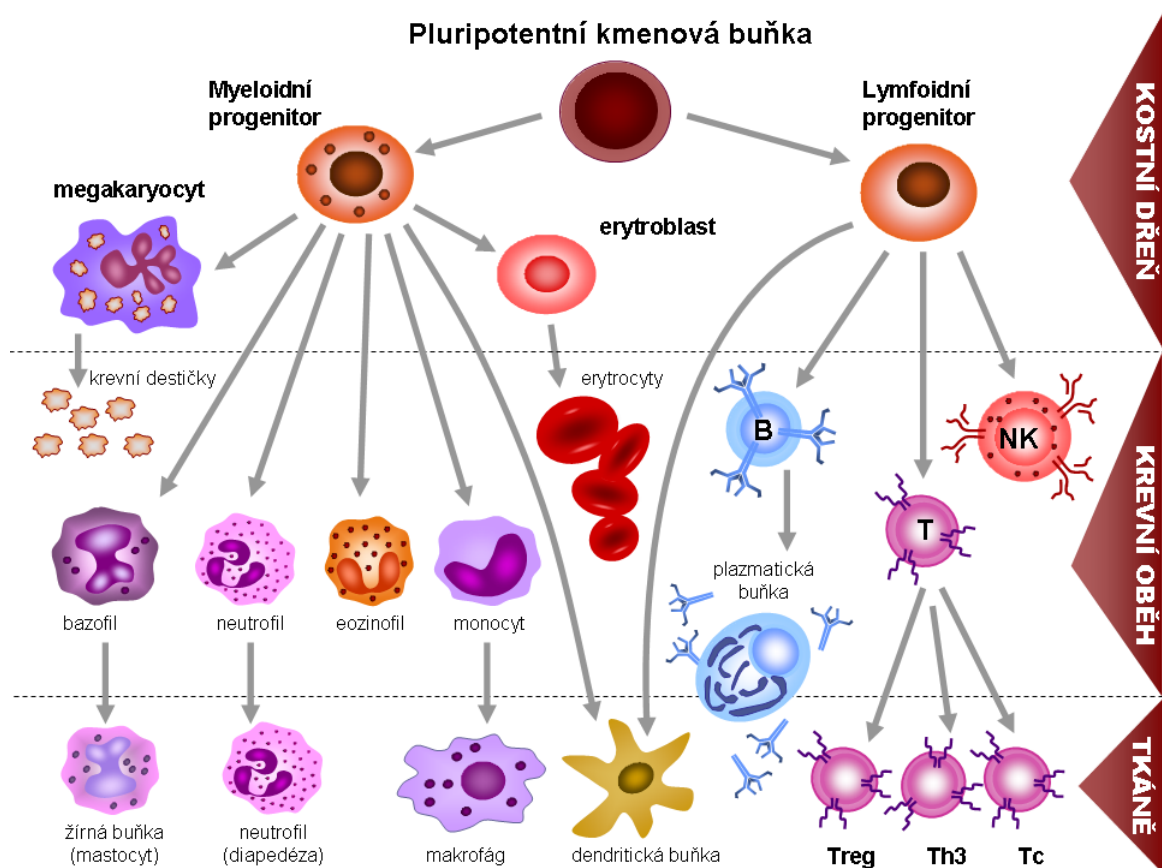
#### 3.1 Hematopoéza

Všechny druhy leukocytů vznikají z pluripotentních kmenových buněk v červené kostní dřev. Tyto kmenové buňky se v kostní dřev udržují v malém množství po celý život a pod vlivem různých faktorů se jich část diferencuje na různé typy leukocytů. Úbytek kmenových buněk je kompenzován dělením (Hořejší et al., 2009).

Z kmenové buňky vznikají dvě základní linie prekursorů a to myeloidní a lymfoidní. Buňky tvořené z myeloidní větve jsou základem nespecifické imunity. Myeloidní linie dává vzniknout třem druhům granulocytů z mladého vývojového stadia zvaného myeloblast. Mezi tyto granulocyty patří neutrofil, basofil a eosinofil. Tkáňovou formu

basofilů představují žírné buňky. Z myeloidní linie vznikají také monocyty, které cirkulují krví a v tkáních se diferencují na makrofágy a vznikají také dendritické buňky. Součástí této vývojové linie jsou také trombocyty a také červená vývojová větev, ze které vznikají erytrocyty.

Z lymfoidní linie se diferencují B-lymfocyty, T-lymfocyty a NK buňky (natur killer). B-lymfocyty se vyvíjejí v kostní dřeni a svůj vývoj dokončují po setkání s antigenem v sekundárních lymfatických orgánech. Dozrávání T-lymfocytů probíhá v brzlíku (thymus). Některé subpopulace se však mohou vyvíjet i mimo thymus. NK buňky jsou vývojově blíž T-lymfocytům (Hořejší et al., 2009).



**Obrázek 1. Vývoj lymfocytů z kmenové buňky kostní dřene.**

Z pluripotentních kmenových buněk vznikají dvě základní linie: myeloidní a lymfoidní. Vedle erytrocytů vznikají z myeloidní linie monocyty a granulocyty (neutrofil, eozinofil a basofil), ale také erytrocyty a trombocyty. Do této vývojové linie patří také dendritické buňky. Z lymfoidní linie vznikají lymfocyt B a T a také NK buňky (Vrána et al., 2011).

### 3.2 MHC glykoproteiny

Produkty genů MHC (major histocompatibility complex; u lidí HLA – hlavní histokompatibilní komplex) jsou glykoproteiny (gp). Tyto glykoproteiny jsou exprimované na povrchu všech jaderných buněk a jsou označovány jako MHC gp I. třídy, nebo jsou exprimovány na buňkách prezentující antigen jako MHC gp II. třídy. Jejich hlavní úlohou je prezentovat antigenní peptidy T-lymfocytům. MHC gp I. třídy váží krátké proteiny a prezentují je cytotoxickým T-lymfocytům. MHC gp II. třídy jsou schopny vázat delší peptidy, které předkládají pomocným T-lymfocytům. Glykoproteiny MHC nejsou jediné molekuly schopné předkládat lymfocytům antigenní fragmenty. Existují také molekuly s podobnou funkcí, ale kódované mimo komplex MHC. Mezi tyto molekuly patří molekuly CD1, které váží glykolipidové antigeny a ty poté předkládají  $\gamma\delta$  T-lymfocytům (Hořejší et al., 2009).

### 3.3 CD nomenklatura

Buňky imunitního systému jsou často rozpoznávány na základě svých povrchových molekul. Většina těch to molekul nese označení CD (cluster of differentiation). Tyto molekuly byly definovány na základě skupin (clusters) monoklonálních protilátek, které s nimi reagují a vzájemně je od sebe diferencují. Nově popsané molekuly dostávají pořadová čísla, což však nic neříká o jejich struktuře, podobnosti nebo funkci. Mnohé z nich však mají také alternativní název. Systém CD nomenklatury tedy odstraňuje chaos, který vznikl libovolným pojmenováním nově objevených molekul (Hořejší et al., 2009)

### 3.4 Nespecifická imunitní odpověď

Jedná se o prvotní reakci organismu na přítomnost patogena nebo jiné nežádoucí částice. Označuje se často jako vrozená nebo neadaptivní, protože její kvalita a účinnost se během života nemění. Tato imunitní reakce představuje v první řadě fyzickou bariéru proti vstupu infekce kůží a sliznicemi a také poskytuje tělu okamžitou reakci namířenou proti široké škále patogenů (Delves *et al.*, 2011).

Nespecifické mechanismy jsou tvořeny složkami buněčnými i humorálními. Buněčné systémy představují fagocytující buňky, jako jsou granulocyty, monocyty, makrofágy a dendritické buňky a přirozeně cytotoxické buňky (tzv. NK buňky). Humorální složky

tvoří komplementový systém, interferony, lektiny a jiné sérové proteiny (Hořejší et al., 2009).

Mezi granulocyty patří **neutrofilní, eozinofilní a basofilní granulocyty**. Tyto buňky jsou klíčové k zahájení imunitní odpovědi, protože jako první migrují do místa zánětu (Krejsek et al., 2004). Hrají důležitou roli v obraně proti extracelulárním bakteriím a na svém povrchu neexprimují MHC molekuly II. třídy.

**Monocyty** slouží jako prekurzory makrofágů a některých dendritických buněk (Hořejší et al., 2009), které se z nich diferencují v zasažené tkáni.

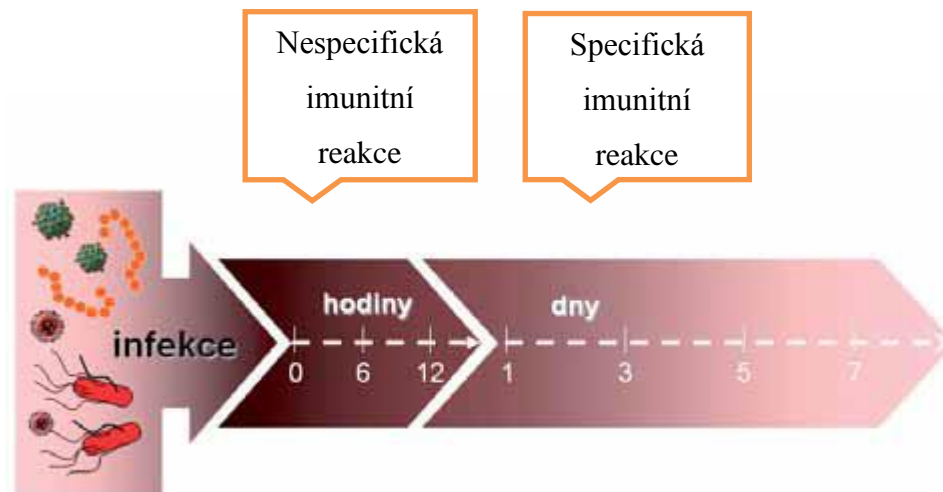
**Makrofágy** mají významnou úlohu při pohlcování extracelulárních patogenů, odstraňování mrtvých buněk a regeneraci poškozených tkání (Krejsek et al., 2004).

**Dendritické buňky** jsou nejúčinnější antigen prezentující buňky. V organismu se vyskytují ve zralé i nezralé formě a dynamicky cestují mezi krví a lymfou. Pokud nezralé DC rozpoznají podnět pro organismus nebezpečný, aktivují se a stávají se z nich zralé DC, které se přesunují z tkání do lymfatických uzlin a sekundárních lymfatických orgánů, což je ovlivněno chemokiny CCL-19 a CCL-21, pro něž mají receptor CCR7 a stávají se účinnými APC (Hořejší et al., 2009).

**NK buňky** z vývojového hlediska patří do lymfocytární linie, ale jsou řazeny mezi buňky nespecifické imunity. Jsou aktivovány interferony a cytokiny, které produkují makrofágy v místě zánětu (Hilary et al., 1996). Na rozdíl od T-lymfocytů

a B-lymfocytů nemají antigenně specifické receptory. Na svém povrchu však mají dva typy receptorů: stimulační a inhibiční. Mezi stimulační receptory patří například Fc receptor CD16. Tyto receptory rozeznávají struktury přítomné na povrchu nejrůznějších typů buněk. Signály poskytnuté těmito receptory aktivují buňku k použití jejich cytotoxických mechanismů. Inhibiční receptory rozeznávají MHC molekuly I. třídy. Signály přijímané těmito receptory inhibují cytotoxické mechanismy. Výsledná reakce NK buněk tedy závisí na tom, převáží-li stimulační nebo inhibiční signály (Hořejší et al., 2009). Po aktivaci NK buňky produkují IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-1 $\beta$  (Hilary et al., 1996).

Složky nespecifické imunity aktivují mechanismy specifické imunity, které plynule navazují.



**Obrázek 2:** Časová posloupnost nespecifické a specifické imunity (Vrána et al., 2011).

### 3.5 Specifická imunitní odpověď

Specifická neboli získaná imunita je, na rozdíl od nespecifické imunitní reakce, zacílena proti konkrétnímu agens, či cizorodé částici při vypuknutí infekce. Během života se vyvíjí průběžným kontaktem s různými antigeny (Delves et al., 2011).

Je zajišťována specializovanými druhy bílých krvinek – B-lymfocyty a T-lymfocyty, které jsou aktivovány specifickou vazbou svých membránových receptorů s antigenem. Tyto receptory vznikly rekombinací genů a poskytují tak organismu možnost reagovat prakticky na jakýkoliv antigen. Lymfocyty můžeme rozdělit podle místa jejich dozrávání na B-lymfocyty, které dozrávají především v kostní dřeni a na T-lymfocyty, které svůj vývoj dokončují v thymu (brzlíku) a v dospělosti v sekundárních lymfatických orgánech (Danilova, 2012).

K úplnému rozvoji specifické imunitní reakce je za potřebí několik dnů až týdnů. Charakteristickým rysem těchto reakcí je imunologická paměť. Po setkání zralého lymfocytu s antigenem dochází k jeho aktivaci a vzniku efektorových buněk, se kterými zároveň vznikají buňky paměťové. Tyto buňky jsou při dalším setkání s již známým antigenem schopné produkovat efektorové buňky a protilátky mnohem rychleji a efektivněji (Hořejší et al., 2009).

Úloha **B-lymfocytů** spočívá především v produkci specifických protilátek vůči antigenu. Prekurzory B-lymfocytů vznikají především v kostní dřeni. Zralé naivní lymfocyty poté migrují do sekundárních lymfatických orgánů, kde po kontaktu s antigenem začnou produkovat protilátky (Delves et al., 2011). Na svém povrchu nesou BCR (B cell receptor),

který se skládá ze dvou těžkých a dvou lehkých řetězců. Oba řetězce jsou spojeny disulfidickými můstky. B-lymfocyty také vystupují jako APC při prezentaci antigenu T-lymfocytům. Jsou schopny samy pohlcovat antigen a poté jej prezentovat na svém povrchu v komplexu s MHC gp. II molekulami (Hořejší et al., 2009). Při této signalizaci hrají důležitou roli kostimulační molekuly a to CD80 a CD86 na povrchu B-lymfocytů a CD28 na povrchu T-lymfocytů, dále pak CD40 u B-lymfocytů a CD40L T-lymfocytů (Delves et al., 2011).

**T- lymfocyty** spolu s B-lymfocyty tvoří základní buňky specifické imunitní odpovědi a představují buněčnou složku. T-lymfocyty jsou charakteristické přítomností T-buněčného receptoru (TCR) v cytoplazmatické membráně (Delves et al., 2011). Na receptoru TCR můžeme rozeznat část vázající antigen a asociovaný komplex několika proteinů (tzv. CD3 komplex), který je podstatný pro přenos signálu. Část rozeznávající antigen je strukturně podobná imunoglobulinům a skládá se ze dvou transmembránových řetězců označovaných  $\alpha$  a  $\beta$  (případně  $\gamma$  a  $\delta$ ), jejich N-terminální části tvoří vazebné místo pro antigen. T-lymfocyty (nesoucí TCR typu  $\alpha\beta$ ) rozeznávají antigen, který je na povrchu buněk prezentujících antigen (APC). (Hořejší et al., 2009).

## 4 T-lymfocyty

### 4.1 Funkční morfologie T-lymfocytů

Všechny T-lymfocyty na svém povrchu nesou molekulu CD3 a TCR. Molekuly CD3 komplexu se účastní přenosu aktivačního signálu po interakci s antigenem (Janeway et al., 2005). Podle typu TCR lze T-lymfocyty rozdělit na buňky nesoucí TCR typu  $\alpha\beta$  nebo typu  $\gamma\delta$ . Buňky nesoucí  $\alpha\beta$  TCR jsou u většiny savců dominantním typem. Vyvíjejí se zásadně v thymu a rozeznávají peptidy navázané v komplexu s MHC molekulami. T-lymfocyty nesoucí TCR typu  $\alpha\beta$ , lze rozdělit na lymfocyty nesoucí molekuly CD8 (koreceptor pro MHC gp I), které jsou prekurzory cytotoxických lymfocytů a také některých regulačních T-lymfocytů, a na lymfocyty nesoucí CD4 (koreceptor pro MHC gp II), které se stávají prekurzory pomocných a regulačních

T-lymfocytů. MHC molekuly pomáhají zprostředkovat tzv. první signál vedoucí k aktivaci T-lymfocytů. Dalším důležitým receptorem je molekul CD28, která zprostředkovává tzv. druhý kostimulační signál při aktivaci T-lymfocytů (Hořejší et al., 2009). Molekula CD28 se váže na kostimulační molekuly CD80 (B7-1) a CD86 (B7-2) exprimované na povrchu aktivovaných APC. Aktivované T-lymfocyty také na svém povrchu exprimují molekulu CD40L, která reaguje s molekulou CD40 na povrchu APC a zajišťují signály, které zvyšují expresi kostimulačních molekul B7 buňkami APC. Další kostimulační molekulou produkovanou T-lymfocyty je molekula ICOS (inductible costimulator, CD278). Jeho ligand, nazývaný ICOS-L (CD275), se vyskytuje na povrchu B-lymfocytů nebo dendritických buněk. *ICOS hraje důležitou roli při reakcích zprostředkovaných protilátkami závislých na T-lymfocytech?*

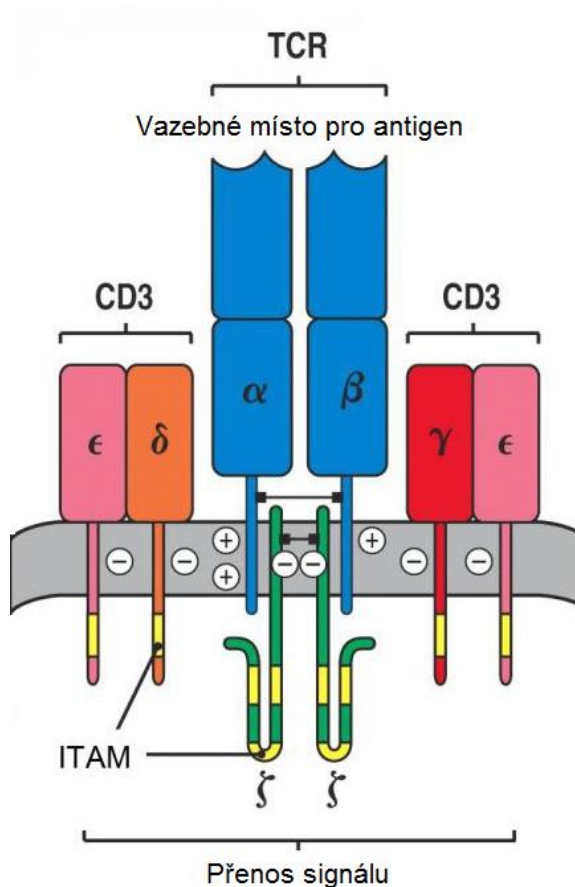
Na povrchu T-lymfocytů se vyskytují také inhibiční receptory. Mezi tyto receptory patří CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) a PD-1 (programmed death). Oba receptory jsou součástí receptorové rodiny CD28. Tyto receptory jsou důležité při toleranci a abnormality v jejich expresi nebo funkci vedou ke vzniku autoimunitních onemocnění (Abbas et al., 2012).

Mezi povrchové molekuly T-lymfocytů patří také CD25 (IL-2R; receptor pro IL2). Který umožňuje aktivovaným T-lymfocytům reagovat na IL-2, který podporuje růst.

Existuje spousta dalších povrchových molekul, jako například molekula CD2 nebo integriny, které zprostředkovávají kostimulační signály in vitro, ale jejich fyziologická



funkce při aktivaci T-lymfocytů je méně objasněná než v případě molekul CD28 (Abbas et al., 2012).



**Obrázek 3.** TCR složený z řetězců  $\alpha$  a  $\beta$ , komplexu molekul CD3 ( $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  a  $\delta$ ) (upraveno podle Janeway et al., 2005).

## 4.2 Vznik a vývoj

Vývoj T-lymfocytů probíhá v primárních orgánech imunitního systému.

Na začátku vývoje stojí pluripotentní kmenová buňka, která dává vznik dvěma různým kmenovým liniím – myeloidní a lymfoidní. Z lymfoidní linie vznikají prekurzory T-lymfocytů, které ještě nenesou TCR. Tyto prekurzory následně migrují pomocí krve a usídlují se v thymu. Zároveň se z lymfoidní linie diferencují i B-lymfocyty a NK buňky. Některé subpopulace se však mohou vyvíjet i mimo thymus (Janeway et al., 2005).

Nejdříve tyto prekurzory exprimují molekuly CD7, CD2 a později i CD5. Molekuly CD8 a CD4 zatím nenesou a proto jsou v tomto stádiu označovány jako dvojitě negativní CD4-/CD8-. Na konci jejich vývoje se postupně zesiluje exprese molekul CD4 a CD8 a stávají se dvojitě pozitivními CD4+/CD8+. Celý diferenciační proces je regulován pomocí transkripčních faktorů, cytokinů a nitrobuňčných signálních molekul (Krejsek et al., 2011). Poté se začnou přeskupovat geny pro vznik  $\beta$  řetězce TCR (TCR $\beta$ ). Organizace genů kódujících TCR se skládá z genových segmentů V, (D), J a C. Proběhne-

li toto přeskupení úspěšně, objeví se na povrchu thymocyty pre-TCR složený z  $\beta$  řetězce a CD3 komplexu. Poté následuje přeskupení genů pro TCR $\alpha$  a vznik kompletního TCR složeného z řetězců  $\alpha$  a  $\beta$ . V té době se v cytoplazmě thymocytů nachází také komplex CD3, který je exprimován na povrch T-lymfocytů, jakmile je ukončeno přeskupení genů pro řetězec  $\alpha$  (Hořejší et al., 2009). Jedna prekurzorová buňka dává vzniknout velkému množství nezralých T-lymfocytů.

V thymu dále probíhá testování specificity a afinity jejich povrchových receptorů – TCR. Během testování dochází k interakci s molekulami MHC na povrchu thymu nebo dendritických buněk. Je-li afinita tohoto receptoru vůči vlastnímu neškodnému antigenu slabá, obdrží tato buňka signál, která mu umožňuje přežít, zatímco thymocyty bez afinity k vlastním molekulám MHC jsou eliminovány apoptózou. Tomuto procesu říkáme pozitivní selekce. V jiném případě, váže-li TCR lymfocytu vlastní antigen vysokou afinitou, dostává tento lymfocyt signál k jeho apoptóze – tzv. negativní selekce. Tímto způsobem se odstraní ty nezralé lymfocyty, které by z důvodu velké reaktivity vedly ke vzniku autoimunitních reakcí (Janeway et al., 2005).

Thymocyty, které reagují s molekulami MHC I. třídy postupně ztrácí expresi CD4 a ponechávají si pouze molekulu CD8 (stávají se CD8<sup>+</sup> cytotoxickými T-lymfocyty). Naopak thymocyty, které reagují s molekulami MHC II. třídy se stávají CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty (Krejsek et al., 2011).

T-lymfocyty, které tvoří dospělou populaci buněk, se dále rozvíjí v periferních (sekundárních) lymfatických orgánech, mezi které řadíme například slezinu, lymfatické uzliny a jejich organizované shluky. Právě zde se naivní lymfocyty setkávají s antigenem, který je vystavený na povrch speciálních, antigen prezentujících buněk (APC). Tato reakce vede k aktivaci T-lymfocytů. Následuje jejich pomnožení a následná diferenciaci na efektorové buňky (Janeway et al., 2005).

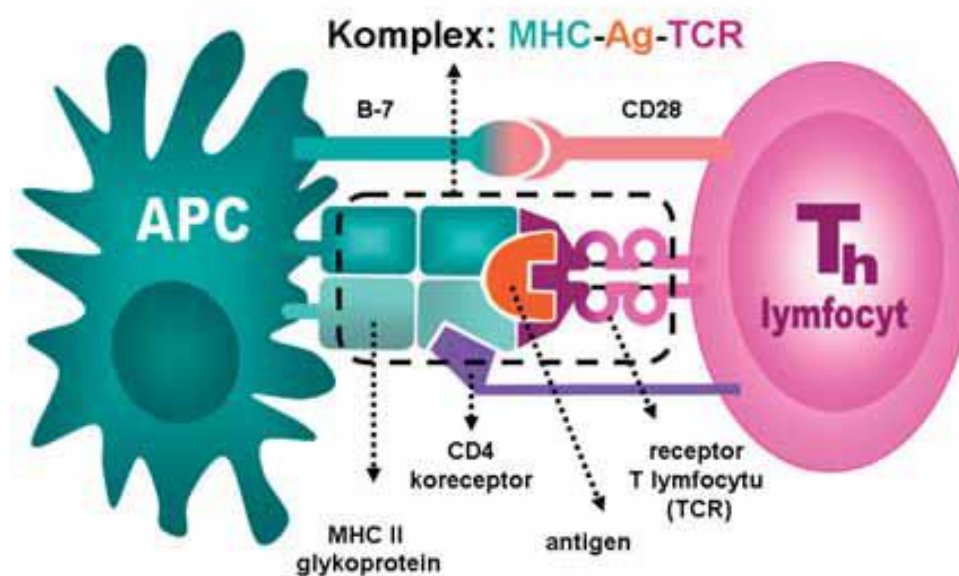
Všechny T-lymfocyty však nejsou přeměněné na efektorové buňky. Z části buněk se stávají buňky paměťové, které při dalším setkání se známým antigenem zprostředkují rychlejší a efektivnější reakci (Hořejší et al., 2009).

### **4.3 Prezentace antigenu a aktivace T-lymfocytů**

Dospělý T-lymfocyt, který se doposud neseťkal s antigenem, se označuje jako naivní lymfocyt. T-lymfocyty jsou schopny rozpoznat antigen pouze v případě, že je vázán na MHC molekulu, která se v organismu vyskytuje buď jako MHC gp I. třídy nebo jako MHC

gp II. třídy. MHC gp I. třídy je přítomen u všech jaderných buněk a MHC gp II. třídy se nachází pouze na povrchu APC, jako jsou makrofágy, DC nebo B-lymfocyty. Hlavní funkcí MHC molekul je vazba peptidových fragmentů, které buňka pohltila a jejich prezentace T-lymfocytům.

Na rozpoznání antigenu se spolu s TCR podílí i koreceptorové molekuly CD4 a CD8. Koreceptor CD4 pomáhá vázat komplexy peptidu s MHC gp II. třídy a CD8 váže MHC gp I. třídy (Hořejší et al., 2009). Molekula CD3, která je vždy přítomná v komplexu s TCR, pomáhá svými řetězci při transportu signálu do buňky (Hořejší et al., 2009). Pouhá vazba s antigenem však k úplné aktivaci nestačí. Potřebná je také spolupráce dalšího receptoru CD28, který se váže na kostimulační molekuly APC – CD80 a CD86 (nazývané i B7). Tato stimulace je charakteristická především pro pomocné Th lymfocyty. V případě cytotoxických Tc lymfocytů je kostimulační signál většinou zprostředkován cytokiny, které jsou exprimovány Th lymfocyty (Murphy et al., 2008). Vazba s CD28 zprostředkovává druhý signál vedoucí k buněčnému dělení a konečné diferenciaci. Absence tohoto signálu způsobí funkční útlum a apoptózu, čímž znemožní aktivaci T-lymfocytů. Tento kontrolní mechanismus zabraňuje autoimunitním reakcím proti vlastním tkáním (Hořejší et al., 2009). Jakmile buňka dostane plnohodnotný signál, vstupuje do G1 fáze buněčného cyklu a začíná také produkovat IL-2, což je základní cytokin ovlivňující diferenciaci a proliferaci T-lymfocytů. Byly však zjištěny i receptory, které inhibují aktivaci T-lymfocytů (CTLA-4, PD-1). Tyto receptory se podílejí především na udržení tolerance. Výsledek aktivace lymfocytů je tedy ovlivněn rovnováhou mezi zapojením aktivačních nebo inhibičních receptorů (Abbas et al., 2012).



#### **Obrázek 4. Stimulace T-lymfocyту komplexem Antigen-MHC.**

*Na TCR je vazebné místo pro antigen a zároveň i vazebné místo pro MHC glykoprotein. Důležitá je také spolupráce koreceptových molekul CD4 a CD8, které pomáhají vázat MHC gp. I. a II. třídy (na obrázku znázorněná vazba molekuly CD4 s MHC gp. II. třídy). K plné aktivaci signálu je potřeba také spolupráce receptoru CD28, který rozeznává kostimulační molekuly B7 (CD80 a CD86) na povrchu APC (Vrána et al., 2011).*

Lymfocyty se mohou diferencovat buď na buňky efektorové, nebo na buňky paměťové. CD4+ T-lymfocyty se mohou na základě dosavadních znalostí diferencovat do šesti druhů efektorových buněk (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 a Treg). V jaký druh se bude buňka diferencovat, záleží na cytokinech, které buňky produkuje a uvolňuje do okolí. V případě CD8+ lymfocytů se buňka po aktivaci diferencuje na cytotoxický T-lymfocyt (Tc), který se dále nedělí na další podskupiny (Murphy et al., 2008).

Další typ buněk, které mohou vznikat z naivních T-lymfocytů, jsou buňky paměťové. Na rozdíl od efektorových buněk jsou inaktivní a dlouhodobě v organismu přežívají (Murphy et al., 2008). Paměťová buňka, která se opět setká se svým antigenem, jej okamžitě rozpozná a následná imunitní reakce je pak mnohem rychlejší než při prvním setkání (Hořejší et al., 2009). Podle přítomnosti chemokinového receptoru CCR7 můžeme rozlišit dva typy paměťových buněk. Tento chemokinový receptor umožňuje buňkám vstup do sekundárních lymfatických tkání. Prvním typem jsou tzv. efektorové paměťové buňky (neexprimují CCR7), které se po své restimulaci dokáží rychle transformovat v efektorový T-lymfocyt, produkující velké množství cytokinů. Druhým typem jsou centrální paměťové buňky (exprimují CCR7), které se usazují v lymfatických tkáních. V případě opětovného setkání s antigenem nejsou schopny tak rychlé diferenciaci a zároveň neprodukuje tolik cytokinů (Murphy et al., 2008).

## 5 Přehled efektorových subpopulací T-lymfocytů

### 5.1 Cytotoxické T-lymfocyty

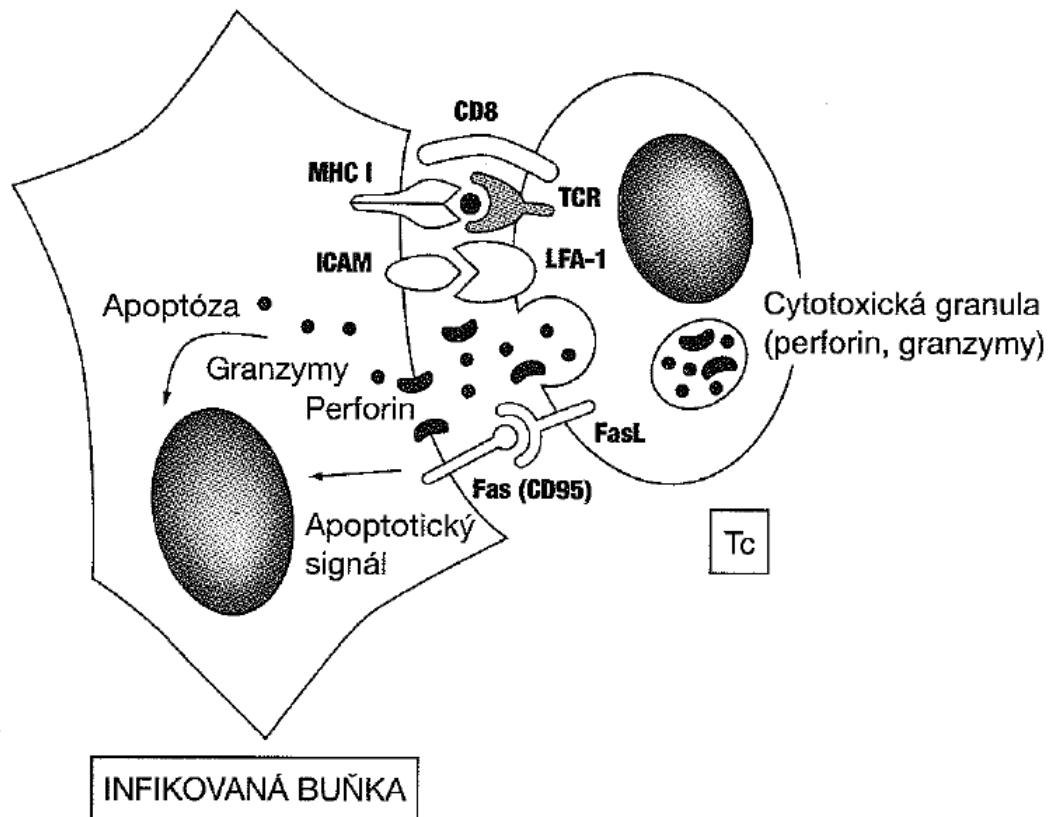
Vykazují se především schopností likvidovat jiné buňky různými mechanismy. Na svém povrchu nesou molekulu CD8 a také membránově vázaný cytokin FasL. Cytotoxické lymfocyty sekretují TNF- $\beta$ , který využívají k eliminaci buněk a INF- $\gamma$ , který aktivuje makrofágy a NK buňky.

Cytotoxické T-lymfocyty (Tc) exprimují na svém povrchu marker CD8 a k jejich stimulaci je potřeba, aby byl antigen navázaný na molekulu MHC I. třídy. Cytotoxické T-lymfocyty se vyznačují schopností likvidovat jiné buňky (Delves et al., 2011). Dokáží rozpoznat vlastní buňky, které jsou poškozené stresem, infikované viry, parazity, nebo pozměněné v důsledku rakovinného bujení (Janeway et al., 2005).

Efektorové Tc vznikají vazbou prekurzorových Tc s APC, které na svém povrchu vystavují komplexy antigenních peptidů s MHC gp I. třídy a také potřebné kostimulační a adhezivní molekuly (CD80, CD86; ligandy receptoru CD28). Tyto antigen prezentující buňky, především DC a makrofágy, pohlcují antigeny pocházející z odumřelých infikovaných, nádorových či stresových buněk nebo jsou virem přímo infikovány. Po první interakci dojde k proliferaci a diferenciaci cytotoxických prekurzorových buněk na zralé efektorové cytotoxické T-lymfocyty (Hořejší et al., 2009). Tomuto procesu napomáhají i Th-lymfocyty a to především Th1, které prostřednictvím INF- $\gamma$  stimulují APC a produkují IL-2 (Krejsek et al., 2004).

Zralé cytotoxické T-lymfocyty mají ve své cytoplazmě velké množství granul obsahující různé proteiny. Mezi nejvýznamnější patří perforin, který vytváří v cílových buňkách póry sloužící k průniku proteáz zvaných granzymy (Janeway et al., 2005). Proteázy aktivují kaspázy, které působením na další proteiny vedou k apoptóze buňky. K uvolnění obsahu cytotoxických granul je však nutný přímý kontakt cílové buňky s Tc pomocí jeho TCR a adhezivních molekul. Cytotoxické T-lymfocyty nesou na svém povrchu membránově vázaný cytokin FasL, který se váže na apoptický receptor Fas (CD95) přítomný u mnoha různých buněk. Vazba tohoto cytokinu na receptor spouští kaskádu reakcí, které opět končí buněčnou smrtí. Receptor Fas je přítomný dokonce i na povrchu samotných Tc-lymfocytů. Apoptóza vlastních Tc-lymfocytů je důležitým regulačním mechanismem (Hořejší et al., 2009). Cytotoxické lymfocyty využívají k přímé eliminaci i sekretované produkty, a to především TNF- $\beta$ . Při tomto mechanismu eliminace však může snadno dojít k vážnému poškození okolních zdravých buněk. Kromě TNF- $\beta$  produkují Tc i INF- $\gamma$ , který je schopen aktivovat makrofágy a NK buňky (Delves et al., 2011). Po ukončení obraných reakcí se

část cytotoxických lymfocytů stává buňkami paměťovými, což při dalším setkání s virovým agens vede ke zrychlení imunitní reakce (Krejsek et al., 2004).



**Obrázek 5. Cytotoxické mechanismy Tc lymfocytů;**

Tc lymfocyt rozpozná špatnou buňku a jeho cytotoxická granula, obsažená v cytoplazmě, putují k plazmatické membráně. V místě kontaktu obou buněk se jejich obsah uvolní do štěrbin a následují reakce vedoucí k apoptické smrti poškozené buňky. Dále se na povrchu Tc nachází protein FasL, který se váže na apoptický receptor Fas. Signály které se přes tento receptor přenášejí vedou k také k apoptické smrti poškozené buňky (Hořejší et al., 2009).

## 5.2 Pomocné Th lymfocyty

Jedná se o lymfocyty nesoucí na svém povrchu kostimulační molekuly CD4+. Stimulovány jsou prostřednictvím antigenu, který je prezentován na MHC gp II. třídy. Pomocné Th lymfocyty se dělí na další podskupiny podle spektra produkováných cytokinů.

Většina CD4+ T buněk jsou prekurzory pomocných T-lymfocytů (Th; hellper T cell) a také regulačních T-lymfocytů (Treg). Pro tyto CD4+ T buňky je typický koreceptor MHC gp II. třídy. Th-lymfocyty se dále dělí podle hlavních cytokinů, které produkují na Th1 a Th2. Další postupně definované minoritní subpopulace jsou označovány jako Th17, Th9 a Th22 (Hořejší et al., 2009).

Transkripční faktory jsou klíčové molekuly pro vývoj a správnou funkci T-lymfocytů a jsou také nezbytné pro jejich diferenciaci. Jedná se o proteiny, které se spolupodílejí na iniciaci transkripce. Pro pomocné T-lymfocyty jsou charakteristické především Stat proteiny. Stat proteiny se v klidovém stádiu nacházejí v cytoplazmě. Ke své aktivaci potřebují fosforylaci, která je zprostředkována JAK kinázami po navázání některých cytokinů nebo růstových faktorů na buněčné receptory. Po fosforylaci putují do jádra, kde modulují expresi příslušných genů, kde mohou regulovat jejich aktivitu nebo vypnutí. Na základě těchto funkcí jsou řazeny mezi transkripční faktory (Harrison, 2012). Všechny Stat proteiny mají podobnou strukturu, ale liší se funkcemi a odlišnými reakcemi na vnější podněty. Stat proteiny ovlivňují diferenciaci, proliferaci a apoptózu buněk (Mai et al., 2011).

### **5.2.1 Prekurzorové Th0 lymfocyty**

**Jedná se o populaci naivních buněk, jež se doposud nesetkaly s antigenem. Th0 lymfocyty se po aktivaci diferencují v různé podskupiny pomocných T-lymfocytů.**

Th0 klony produkují různé kombinace cytokinů typu Th1 a Th2 (Hořejší et al., 2009). Na základě genetické informace a podnětů z okolního prostředí se Th0 lymfocyty diferencují na fenotypické populace v rámci CD4<sup>+</sup> pomocných lymfocytů (Kopřiva et al., 2009).

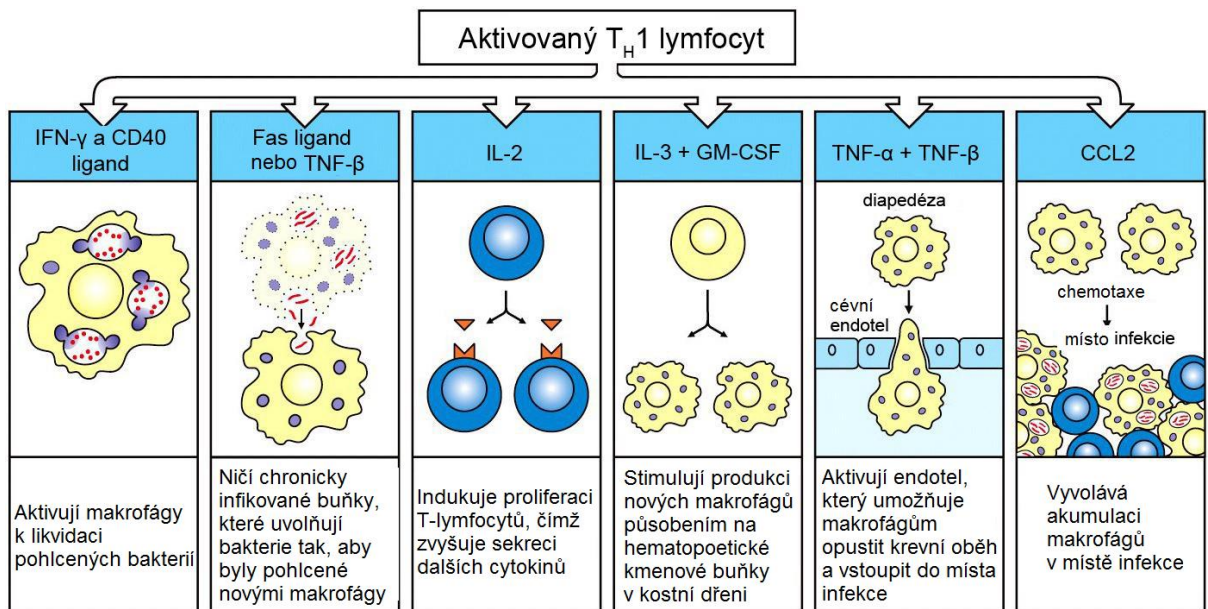
Charakter antigenu, způsob a doba jeho prezentace určuje vývoj prekurzorových Th0 buněk k Th1, Th2, Th17, Th9 nebo Th22 lymfocytům (Krejsek et al., 2004). Dále o tom také rozhoduje produkce cytokinů. Pokud bude v počátečním stádiu aktivace prekurzorových Th0 produkovaný IL-4, dojde ke vzniku Th2. Bude-li však produkovaný IL-12, budou vznikat Th1 lymfocyty. IL-12 produkují makrofágy a DC, zatímco IL-4 produkují hlavně mastocyty a bazofily. (Hořejší et al., 2009). Bude-li však produkovaný IL-4 a zároveň TGF- $\beta$ , budou vznikat lymfocyty Th9 (Pan et al., 2013). V prostředí bohatém na TGF- $\beta$  a IL-6 (nebo IL-21) se z Th0 lymfocytů vyvíjejí lymfocyty Th17 (Mai et al., 2011). Při produkci různých kombinací cytokinů IL-6, IL-1 $\beta$  nebo TNF- $\alpha$  se Th0 buňky diferencují na podskupinu lymfocytů Th22 (Tong et al., 2013).

### **5.2.2 Pomocné Th1 lymfocyty**

**Jsou aktivovány především pomocí IL-12, který produkují makrofágy. Díky své schopnosti exprese INF- $\gamma$ , IL-2 a TNF- $\beta$  se podílejí na rozvoji zánětu.**

Infikovaný makrofág zpracovává proteiny intercelulárních bakterií do peptidových fragmentů a následně některé vystavuje na svém povrchu pomocí MHC gp II. třídy. Na povrchu makrofágů se nacházejí i adhezivní molekuly (např. protein ICAM-1) a ligandy kostimulačních receptorů (především CD86, který se váže na receptor CD28 na povrchu T-lymfocyty) (Hořejší et al., 2009).

Makrofágy produkují interleukin 12 (IL-12), důležitý diferenciační faktor pro Th1 lymfocyty. Po obdržení těchto stimulů dojde k proliferaci a konečné diferenciaci prekurzoru pomocných T buněk na efektorové Th1 buňky. Bylo prokázáno, že myši defektní v syntéze IL-12, nebo ty, které nemají receptory pro tento interleukin, netvoří subpopulaci Th1 (Nelms et al, 1999).



**Obrázek 6:** Cytokiny Th1 subpopulace (upraveno podle Janeway et al, 2005)

Specifickým transkripčním faktorem pro Th1 lymfocyty je Stat4, jehož absence představuje snížení jejich diferenciace. Stat4 je exprimován i u Th2 subpopulace, ale aktivován může být pomocí IL-2 pouze v Th1. Dokonce bylo prokázáno, že Stat4 je produkován v CD4+ i v CD8+ lymfocytech, ale pouze CD4+ lymfocyty potřebují pro syntézu INF- $\gamma$  Stat4 (Lauerová et al., 2000).

Dalším specifickým transkripčním faktorem pro diferenciaci Th1 lymfocytů je T-bet (T-box expressed in T-cells), který patří do skupiny transkripčních faktorů kódovaných geny označovaných jako T-box. T-bet indukuje syntézu INF- $\gamma$  v CD4+ lymfocytech a zároveň potlačuje produkci IL-4, čímž nasměruje jejich diferenciaci v Th1 a potlačuje Th2

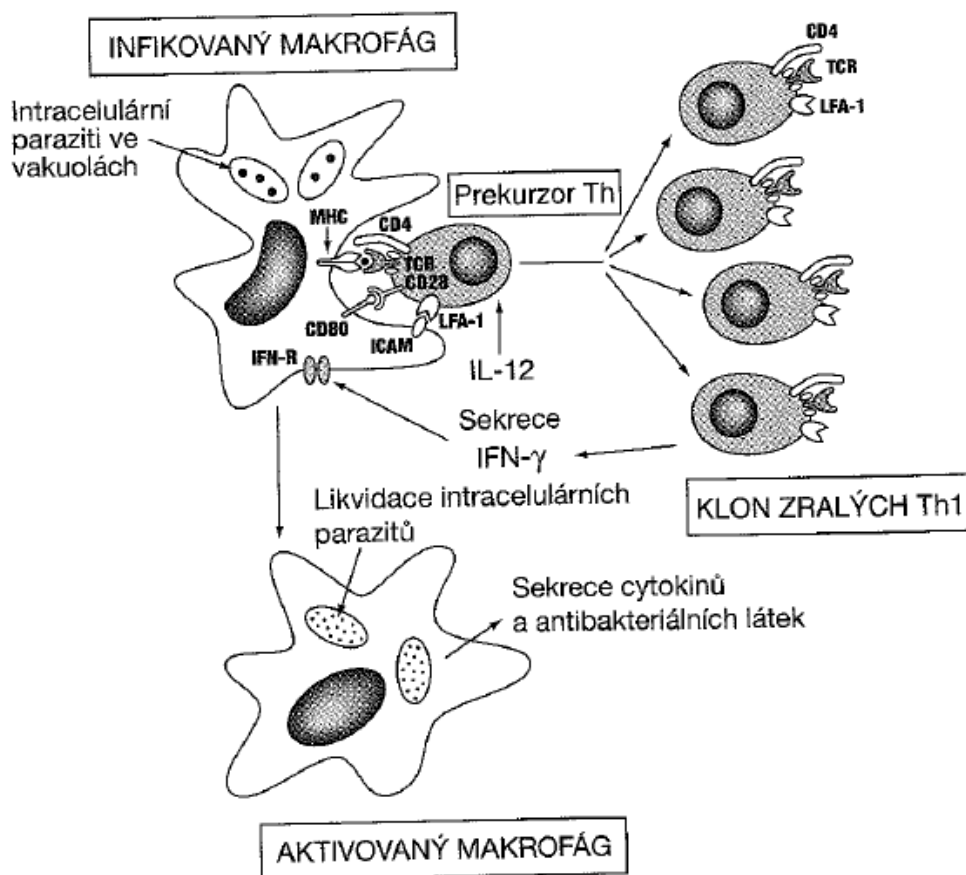


imunitní odpověď (Papaioannou, 1997). Spolu s IL-27 inhibuje také lymfocyty Th17 (Tato et al., 2006).

Th1 lymfocyty jsou důležité především pro aktivaci CD8+ buněk, makrofágů a NK buněk. Charakteristické jsou produkcí interferonu  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), který aktivuje makrofágy. Dále pak produkují především interleukin 3 (IL-3) a interleukin 2 (IL-2), které aktivují cytotoxické buněčné mechanismy. Podílejí se zejména na rozvoji zánětu. (Janeway et al, 2005).

Bakterie fagocytované makrofágy bývají většinou zničeny v lysozomech obsahující různé enzymy a antimikrobiální látky. Intracelulární bakterie okupující vezikuly makrofágů se však fúzí s lysozomy vyhýbají, díky čemuž jsou schopné přežít i po pohlcení. V tomto případě je potřeba spolupráce s efektorovými Th1 lymfocyty, které pomocí produkujících cytokinů mobilizují a aktivují makrofágy k odstranění těchto bakterií (Janeway et al., 2005).

Efektorové Th1 lymfocyty kontaktují makrofág infikovaný intracelulárními bakteriemi prostřednictvím TCR a adhezivních molekul, čímž se spustí tvorba různých druhů cytokinů (Tato et al., 2006).



Obrázek 7: *Diferenciace Th1 lymfocytů a vznik aktivovaných makrofágů;*

*Prekurzor Th musí přijít do styku s infikovaným makrofágem, který produkuje IL-12, což je výrazný diferenciací faktor pro Th1 lymfocyty. Signály přijaté prekurzorem Th od infikovaného makrofága vedou k pomnožení klonu a konečné diferenciaci na zralé efektorové Th1 lymfocyty. Ty sekretují INF- $\gamma$ , který stimuluje makrofágy k přeměně v aktivovanou formu (Hořejší et al., 2009).*

### **5.2.3 Pomocné Th2 lymfocyty**

**Jsou aktivovány pomocí IL-4. Hrají důležitou roli v patogenezi atopií a astmatu a prostřednictvím exprese svých cytokinů (IL-4, IL-5 a IL-13) indukují proliferaci a diferenciaci B-lymfocytů.**

Pro vznik efektorových Th2 lymfocytů je potřebná vazba prekurzorových Th s antigenem navázaným na povrchu APC a také je nezbytná přítomnost interleukinu

IL-4. Optimálními APC jsou DC s velkým množstvím povrchových MHC gp II. třídy, s potřebnými adhezivními molekulami a hlavně s kostimulačními proteiny CD80 a CD86. Signály předané do T-lymfocytů přes TCR, CD28 a receptor pro IL-4 iniciují proliferaci a diferenciaci prekurzorových Th buněk na zralé Th2 efektorové lymfocyty. Tyto zralé efektorové Th2 lymfocyty dodávají B-lymfocytům potřebné signály pomocí svých cytokinů. Jako APC mohou posloužit i B-lymfocyty aktivované už existujícími efektorovými Th2 lymfocyty (Hořejší et al., 2009).

Důležitou roli při diferenciaci Th2 lymfocytů hraje IL-4. Tato diferenciace si vyžaduje aktivaci Stat6. Je známo několik transkripčních faktorů, které jsou klíčové pro vývoj Th2 lymfocytů, jako je například GATA-3 a c-Maf. U myši, které nemají c-Maf bylo zjištěno výrazné snížení syntézy IL-4 (Lauerová et al., 2000). IL-4 společně s IL-13 indukuje v B-lymfocytech přesmyk k tvorbě IgE protilátek a zároveň potlačuje aktivitu IL-2. Receptor pro IL-4 má dva řetězce: řetězec  $\alpha$  je specifický, zatímco řetězec  $\gamma$  je společný všem lymfocytárním receptorům. IL-4 také indikuje expresi adhezivních molekul (VCAM-1) na povrchu endoteliálních buněk (Romagnani, 1997) a aktivuje Stat6. Stat6 rozpoznává fosforylovaný tyrosin pouze na cytoplazmatické části  $\alpha$  řetězce receptoru pro IL-4 (Lauerová et al., 2000).

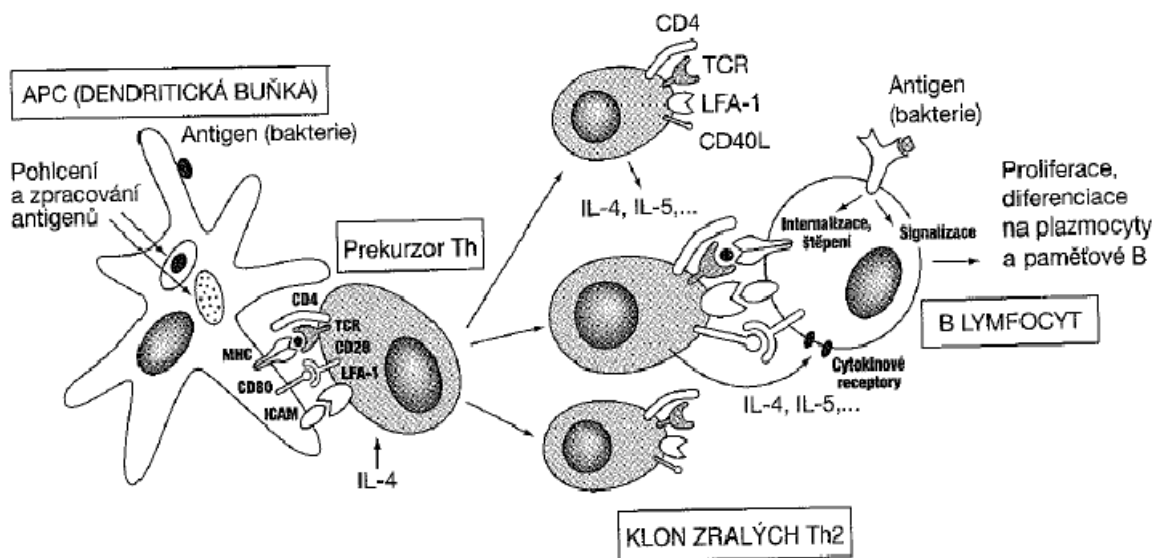
Th2 lymfocyty produkují typicky interleukiny IL-4, IL-5 a IL-6, IL-10, IL-13, které indukují protilátkovou reakci. Uplatňují se v antiparazitární imunitě, zatímco v patologii je tato reakce typická pro alergické reakce (atopii) (Krejsek et al., 2004).

IL-5 vyvolává diferenciaci eozinofilů a jejich přestup z kostní dřeně do periferní krve. Zvýšená produkce IL-5 je častá u pacientů s alergickými chorobami nebo u pacientů s parazitárním onemocněním (Romagnani, 1997).

Antigenní receptor B-lymfocytů (BCR) slouží nejen pro přenos signálu vyvolaného specifickou vazbou antigenu, ale na rozdíl od receptoru pro T-lymfocyty (TCR) přenáší do nitra buňky i samotný antigen. Ten je v tomto intracelulárním prostoru degradován a poté obvykle znovu vystaven na buněčném povrchu jako peptid tvořící komplex s MHC gp II. třídy, který rozpoznává efektorové Th2 lymfocyty (Janeway et al, 2005).

Th lymfocyty mohou tedy poskytovat pomoc dvěma typům B-lymfocytů. Prvním typem jsou ty B-lymfocyty, jejichž receptory pohltily ten samý antigen jako DC, které po vystavení antigenu vyvolaly tvorbu efektorových Th2 lymfocytů. Ke stimulaci sekrece cytokinů stačí Th2 lymfocytům pouze kontakt s B-lymfocylem pomocí TCR a adhezivních molekul, zatímco signál přes kostimulační receptor CD28 už není nutný. Tato pomoc B-lymfocytům se označuje jako přímá pomoc.

Druhým typem jsou B-lymfocyty, které byly stimulované rozpoznáním úplně jiného antigenu a v danou chvíli na svém povrchu nevystavují komplexy MHC gp II. třídy s peptidy. I v takovém případě může dojít ke kontaktu efektorových Th2 lymfocytů pomocí adhezivních molekul, sekreci cytokinů, vazbě CD40L na kostimulační receptor CD40 a plné stimulaci B-lymfocytu. Taková pomoc se označuje jako nepřímá (Hořejší et al., 2009).



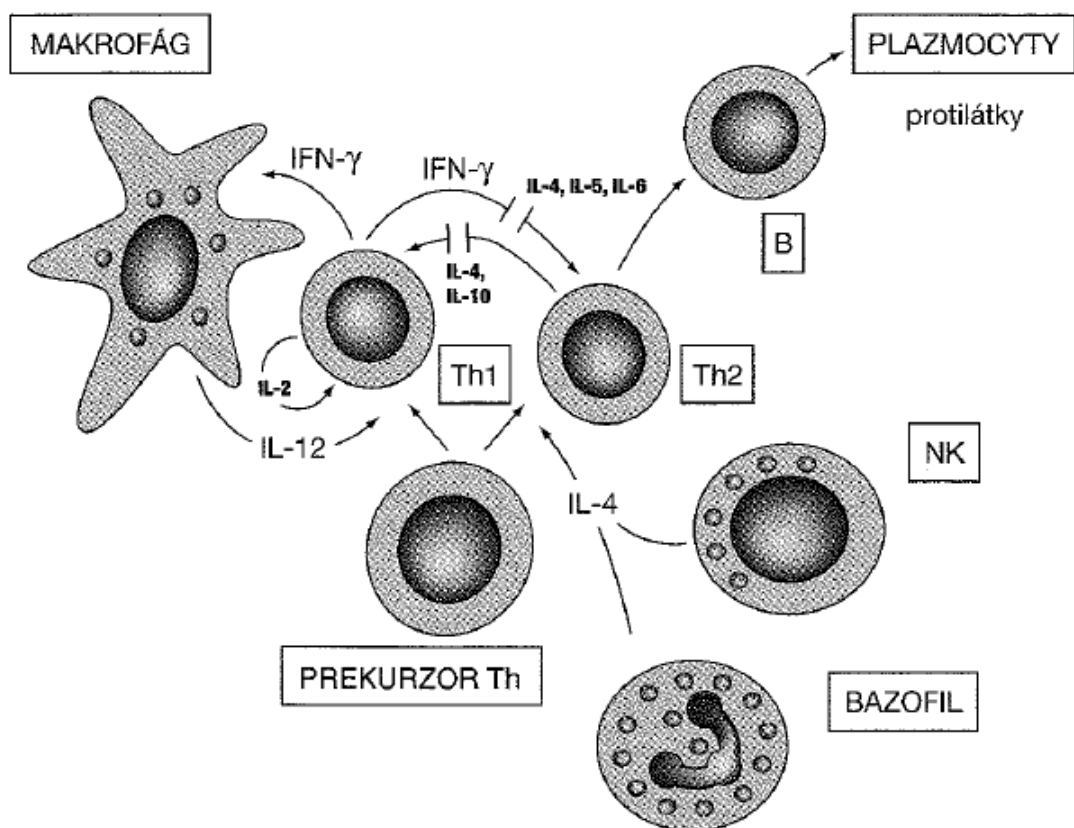
**Obrázek 8: Diferenciace Th2 a stimulace B lymfocytů;**

Prekurzor Th se setká s antigenem na povrchu APC za přítomnosti IL-4, což vede ke vzniku klonu zralých efektorových Th2 lymfocytů a jeho opakovanému buněčnému dělení. Zralé Th2 lymfocyty pak dodávají B-lymfocytům potřebné pomocné signály prostřednictvím cytokinů (Hořejší et al., 2009).

#### 5.2.4 Interakce mezi Th1 a Th2

Th1 a Th2 působí antagonisticky. Th1 lymfocyty snižují aktivaci a proliferaci Th2 lymfocytů zvláště působením  $\text{INF-}\gamma$  a podporují tak vznik Th1. Th2 lymfocyty tlumí aktivaci a proliferaci Th1 pomocí produkce IL-4 a podporují tak vznik Th2 (Janeway et al, 2005). Také IL-10 produkovaný Th2 inhibuje uvolňování IL-2 APC a tím také nepřímo inhibuje diferenciaci v Th1 lymfocyty. Lze tedy říci, že cytokiny uvolňované Th subpopulacemi uplatňují navzájem pozitivní i negativní účinek a tím řídí vývoj a polarizaci pomocných Th lymfocytů.

Porucha v rovnováze Th diferenciačních procesů vede k některým imunopatiím. Převaha Th1 imunitní odpovědi se uplatňuje u některých autoimunitních onemocnění (např. diabetes mellitus). Naopak, převaha Th2 se podílí na alergických stavech, jako je atopická dermatitis a bronchiální astma (Lauerová et al., 2000) nebo při onemocnění AIDS.



**Obrázek 9: Vzájemná regulace Th1 vs. Th2;**

*Hlavní cytokiny produkované Th2 (IL-4 a IL10) inhibují vývoj Th1 a hlavní cytokin produkovaný Th1 ( $\text{INF-}\gamma$ ) inhibuje vývoj Th2 (Hořejší et al., 2009).*

### 5.2.5 Pomocné Th17 lymfocyty

**Pro jejich diferenciaci je důležitý TGF- $\beta$  spolu s IL-6 nebo IL-21. Stejně jako Th1 mají i Th17 lymfocyty důležitou roli při udržování zánětlivé reakce, díky produkci IL-17, který má výrazné prozánětlivé účinky.**

Tato nedávno objevená subpopulace T-lymfocytů nese své označení díky sekreci IL-17 (IL-17A), který má výrazné prozánětlivé vlastnosti, zvyšuje aktivitu neutrofilů a působí i na jiné subpopulace T-lymfocytů (Hořejší et al., 2009).

Na povrchu Th17 lymfocytů jsou exprimovány receptory pro TGF- $\beta$ , IL-6, IL-23, IL-21 a chemokinové receptory CCR4 a CCR6 (Basso et al., 2009).

Lymfocyty Th17 jsou diferencovány z naivních T-buněk pomocí TGF- $\beta$ , který ale sám k jejich diferenciaci nestačí. Nejčastěji se spolu s ním diferenciaci účastní IL-6, ale Th17 se mohou vyvíjet i za přítomnosti TGF- $\beta$  a IL-21. Th17 lymfocyty jsou dále množeny a stabilizovány pomocí IL-23, který produkují buňky nespecifické imunity (Tong et al., 2013). IL-23 je také důležitý především pro expanzi již diferencované linie Th17 lymfocytů a k indukci produkce IL-17 (Mai et al., 2011).

Expanzi Th17 lymfocytů mohou také nepřímo ovlivnit i dendritické buňky, které v odpovědi na IL-17 zvyšují svou produkci IL-23, který zpětně indukuje produkci IL-17 a také expanzi populace Th17 (Basso et al., 2009). Bylo zjištěno, že za určitých podmínek může dojít i ke zvrácení vývoji u relativně diferencované populace. Již diferencované lidské Treg jsou za přítomnosti allogeních APC v kombinaci s IL-2

a IL-15 schopny změnit se na populaci produkující IL-17 a exprimující ROR $\gamma$ T, tedy v typ připomínající Th17 (Koenen et al., 2008).

Pro vývoj Th17 lymfocytů jsou také nezbytné transkripční faktory ROR $\gamma$ T (Retinoid-related orphan $\gamma$ T<sup>receptor</sup>) a Stat3 (Basso et al., 2009). Stat3 je lokalizován na chromozomu 17 (Mai et al., 2011).

Th17 lymfocyty kromě IL-17 produkují také IL-21, který aktivuje NK buňky (Hořejší et al., 2009) a IL-25.

IL-17 je homodimerní protein patřící k rodině cytokinů IL-17, do které patří i IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (nazývaný také IL-25) a IL-17F (Auriemma et al., 2013). IL-17, respektive IL-17A má výrazné prozánětlivé účinky, zvyšuje aktivitu neutrofilů a působí i na jiné subpopulace T-lymfocytů (Hořejší et al., 2009). Je také klíčovým cytokinem v patogenezi autoimunitních onemocnění. V keratinocytech se IL-17 popisuje jako hlavní regulátor antimikrobiálních peptidů (Auriemma et al., 2013). Je také často spojován s alergickými reakcemi a indukuje tvorbu spousty dalších cytokinů a chemikonů

(např. IL-6, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8 a další). IL-17 není však produkován pouze lymfocyty Th17, ale významným zdrojem tohoto cytokinu jsou také lymfocyty s TCR typu  $\gamma\delta$ , které produkují jak IL-17A, tak IL-17F a IL-22 (Roark et al., 2008). Receptor pro IL-17 byl nalezen na všech typech buněk a tkání, u kterých byla jeho přítomnost zkoumána. Žádná jiná rodina cytokinových receptorů nemá podobnou strukturu (Tato et al., 2006). Také bylo zjištěno, že IL-17A se váže na jiné formy receptoru než další členové této cytokinové rodiny (Witowski et al., 2004).

IL-21 je nedávno popsáným cytokinem rodiny IL-2 a je produkován převážně Th17 lymfocyty. IL-21 podporuje diferenciaci Th17 a také inhibuje produkci IgE. Na zvířecích modelech bylo potvrzeno, že snížení hladiny IL-21 přispívá k rozvoji alergických a autoimunitních onemocnění (Auriemma et al., 2013).

IL-25, který je také známý jako IL-17F, je důležitý modulátor při onemocněních způsobených Th2 lymfocyty. Jeho hlavní produkce závisí na Th17 lymfocytech, je však produkován i DC, eozinofily nebo basofily. Bylo také prokázáno, že IL-25 produkuje tvorbu cytokinů Th2 populace v kultivovaných keratinocytech (Auriemma et al., 2013).

### **5.2.6 Pomocné Th9 lymfocyty**

**Jsou stimulovány především IL-4 a TGF- $\beta$ . Jedná se o prozánětlivé lymfocyty, které jsou charakteristické produkcí IL-9 a IL-10.**

Pomocné lymfocyty Th9 jsou nedávno objevenou podskupinou lymfocytů charakteristické produkcí IL-9 a IL-10. Bylo prokázáno, že Th2 lymfocyty se v prostředí bohatém na TNF- $\beta$  sklánějí k Th9 (Auriemma et al., 2013).

Diferenciace Th9 lymfocytů probíhá za přítomnosti IL-4 a TGF- $\beta$ , kde každý cytokin vede k produkci transkripčních faktorů, které regulují produkci IL-9. Pro vývoj Th9 lymfocytů jsou nezbytné dva transkripční faktory a to PU.1 a IRF4 (interferon-regulační faktor 4). Nedostatek některého z těchto faktorů snižuje produkci Th9 lymfocytů a společná exprese obou těchto faktorů podporuje produkci IL-9 lymfocyty Th9. TGF- $\beta$  vyvolává expresi PU.1, stejně jako FoxP3 u Treg. PU.1 také negativně reguluje vývoj Th2 lymfocytů. Důležitý je také IL-4 aktivovaný transkripčním faktorem Stat6. IL-4 a Stat6 indukují expresi několika transkripčních faktorů společných pro Th9 a Th2 lymfocyty, jako je například IRF4 a GATA3 (Pan et al., 2013).

Přestože produkují IL-10 jedná se o prozánětlivé lymfocyty a jejich hlavním úkolem je nábor žírných buněk pomocí produkce IL-9 (Auriemma et al., 2013).

IL-9 působí jako regulátor krvetvorných buněk. Jeho hlavní produkce spočívá v Th9 lymfocytech, je ale také produkován lymfocyty Th2, přestože dříve byla přisuzována Th17 lymfocytům (Auriemma et al., 2013). IL-9 vykazuje svoji biologickou aktivitu pomocí interakce s heterodimerním receptorovým komplexem složeným s IL-9R $\alpha$  a řetězce  $\gamma$ . Ukázalo se, že kombinace IL-4 a TGF- $\beta$  jsou základními faktory pro růst a diferenciaci a podporují rozvoj Th9 lymfocytů (Pan et al., 2013).

### **5.2.7 Pomocné Th22 lymfocyty**

**Jejich vznik výrazně ovlivňují IL-1 $\beta$ , IL-6 a TNF- $\gamma$ . Lymfocyty Th22 jsou nedávno objevenou populací lymfocytů a jsou předmětem mnoha studií. Mnohé z nich naznačují, že Th22 lymfocyty jsou zapojeny do patogeneze zánětlivých onemocnění.**

Byly objeveny před několika lety a jsou charakteristické produkcí IL-22. Rozvoj Th22 buněk vyžaduje receptor AHR (aryl uhlovodíkový receptor). Bylo také zjištěno, že IL-1 $\beta$ , IL-6 nebo TNF- $\alpha$  mohou významně podporovat vznik Th22 lymfocytů z naivních CD4+ buněk a že kombinace IL-1 $\beta$  + IL-6, IL-1 $\beta$  + TNF- $\alpha$ , IL-6 + TNF- $\alpha$  nebo IL-1 $\beta$  + IL-6 + TNF- $\alpha$  podporují diferenciaci Th22 v ještě větší míře. Kromě toho INF- $\gamma$  nemá vliv na množství Th22 lymfocytů a naopak může snížit procenta Th22 lymfocytů stimulovaných IL-6 nebo/a TNF- $\alpha$  (Tong et al., 2013).

Th22 neexprimují IL-17 (charakteristický pro Th17), IL-4 (marker Th2 lymfocytů) ani INF- $\gamma$  (marker Th1), čímž se liší od ostatních subpopulací pomocných T-lymfocytů (Tong et al., 2013). Od ostatních subpopulací pomocných Th-lymfocytů se liší především vysokou expresí CCR10 (C-C chemokinový protein typu 10) (Auriemma et al., 2013).

Exprese CCR10 naznačuje, že tyto buňky mohou být pravděpodobně zaneseny do kůže, kde mohou přispět k obraně hostitele proti mikrobiálním patogenům a podporovat opravu nebo remodelaci tkáně (Hao, 2014). Mnohé studie ukazují, že Th22 lymfocyty mohou být také zapojeny do patogeneze zánětlivých kožních onemocnění jako je lupénka, atopický ekzém a alergické kontaktní dermatitidy (Tong et al., 2013).

### **5.2.8 Folikulární Tfh lymfocyty**

**Hlavním regulátorem Tfh diferenciace je transkripční faktor Bcl-6. Na jejich vývoji se však podílí i IL-6 a IL-21. Jsou důležité pro tvorbu zárodečných center a diferenciaci B-lymfocytů.**

Tato malá populace pomocných T-lymfocytů se vytváří nezávisle na ostatních Th-lymfocytech. Tfh lymfocyty se vyskytují především ve folikulech B buněk

a lymfatických uzlinách. Tfh lymfocyty na svém povrchu kromě CD4, CD28 nebo CD40L (pro interakci s B-lymfocyty nebo DC) exprimují také molekulu ICOS, SLAM (signaling lymphocyte activation molecule) nebo chemokinový receptor CXCR5.

Tfh lymfocyty mají jedinečný požadavek na vysokou expresi transkripčního faktoru B buněk Bcl-6 (B cell leukemia/lymfoma 6), což je odlišuje od ostatních populací pomocných Th-lymfocytů. Na jejich diferenciaci se podílí také transkripční faktor Stat3 (Rolf et al., 2010).

Soustředují se na pomoc B-lymfocytům. Produkuje IL-21, který výrazně stimuluje diferenciaci B-lymfocytů a jejich následnou produkci protilátek a také umožňuje dlouhodobé přežití Tfh lymfocytů. Změna počtu těchto buněk je může podílet na patogenezi některých autoimunitních onemocnění (Nutt et al., 2011). Kromě toho jsou Tfh lymfocyty velice univerzální, co se týče produkce cytokinů. Bylo dokázáno, že produkují IL-4, INF- $\gamma$ , IL-17 (Rolf et al., 2010).

Subpopulace	Povrchové molekuly	Vylučované efektorové molekuly	Transkripční faktory
Th1	CD3, CD4, IL-12R, IFN- $\gamma$ R	INF- $\gamma$ , IL-2, IL-3, TNF- $\beta$	T-bet, Stat4
Th2	CD3, CD4, IL-4R,	IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13,	GATA3, Stat6, c-Maf
Th17	CD3, CD4, IL-23R, TNF- $\beta$ R, CCR6, CCR4	IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-23	ROR $\gamma$ t, Stat3
Th9	CD3, CD4	IL-9, IL-10	PU.1, IRF4
Th22	CD3, CD4, CCR10, CCR6, CCR4	IL-22	AHR
Tfh	CD3, CD4, CXCR5, SLAM, IL-21R, CD40L, ICOS	IL-21, IL-4, INF- $\gamma$ , IL-17	Bcl-6, Stat3

**Tabulka 1.** Přehled subpopulací pomocných T-lymfocytů, jejich povrchových molekul, vylučovaných efektorových molekul a transkripčních faktorů. Sekrece IL charakteristických pro danou populaci T lymfocytů je tabulce zvýrazněna tučně.

### 5.3 Regulační T-lymfocyty (Treg)

Většina regulačních T-lymfocytů nese na svém povrchu molekulu CD4. Přesto však existují i výjimky, které nesou molekulu CD8. Vyznačují se především schopností potlačovat aktivitu jiných T-lymfocytů.



Jako regulační se označují lymfocyty, které jsou schopny potlačovat aktivity jiných efektorových T-lymfocytů (Hořejší et al., 2009). Většina populace se vyvíjí z naivních Th-lymfocytů. Regulační buňky patří do skupiny CD4<sup>+</sup> lymfocytů, existují však i výjimky patřící do skupiny CD8<sup>+</sup> lymfocytů. Bylo prokázáno, že regulační buňky chrání před vznikem autoimunitních onemocnění tím, že eliminují autoreaktivní T-lymfocyty, které unikly negativní selekci. Jsou také zodpovědné za kontrolu průběhu alergických reakcí (Hořejší et al., 2009).

Na svém povrchu exprimují CD3, CD4 nebo CD8 a CD45 (Sakaguchi et al., 1995).

Pro správný vývoj a funkci je také nezbytný FoxP3 transkripční faktor (forkhead/wingedhelix transkripční represor P3; u myši je označován jako Scurfin; Schubert 2001). Pro expresi FoxP3 je důležitý TGF- $\beta$ , IL-2 a kyselina retinová.

FoxP3 gen je kódován na chromozomu X v oblasti Xp11.23-Xq13.3. Jedinci s mutacemi v tomto genu trpí autoimunitními onemocněními, protože T-lymfocyty nejsou schopné aktivace apoptózy nebo se nekontrolovatelně dělí. FoxP3 má také aktivační účinek na geny CTLA-4 a CD25 (Hori et al., 2003; Hill et al., 2007).

Dalším důležitým rozpoznávacím znakem pro regulační T-lymfocyty je přítomnost molekuly CD127, což je povrchový řetězec IL-7 a jeho nízká exprese koleruje s vysokou expresí znaku FoxP3 (Hill et al., 2007).

Zřejmě existuje několik druhů Treg, avšak nejlépe prozkoumané jsou zatím tzv. přirozené Treg, které mají fenotyp podobný aktivovaným T-lymfocytům (povrchová exprese podjednotky IL-2 receptoru CD25 a inhibičního CTLA-4) (Hořejší et al., 2009).

Treg rozlišujeme podle jejich původu na buňky, které se přirozeně vyskytují v thymu (označovány jako nTreg) a na buňky, které se mohou vyvinout z pomocných T-lymfocytů během zánětu (tzv. indukované – iTreg) (Jonuleit et al., 2003).

Mezi indukované Treg patří Tr1 a Th3. Tyto dva typy také mohou mít fenotyp CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, ale nevylučují FoxP3. Další specifickou populací regulačních T-lymfocytů jsou NKT lymfocyty, které jsou charakteristické expresí znaků společných jak pro T-lymfocyty, tak pro NK buňky a taky supresorové Ts buňky, které na svém povrchu nesou molekulu CD8 (Godfrey et al., 2000).

### 5.3.1 Rozdělení regulačních T-lymfocytů

Typ buňky	Povrchový fenotyp	Vylučované efektorové molekuly
nTreg	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	IL-10, TGFβ, IL-35, IL-2, IL-4, INFγ
iTreg	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	IL-10, TGFβ
Tr1	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+/-</sup> FoxP3 <sup>+</sup> IL-10 <sup>high</sup>	IL-10, IL-2,
Th3	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+/-</sup> FoxP3 <sup>-</sup> TGF-β <sup>high</sup>	TGFβ, IL-4, IL-10
NKT	CD8 <sup>+/-</sup> , CD4 <sup>+/-</sup> , CD28 <sup>-</sup>	IL-4, IFNγ, IL-17A
CD8 <sup>+</sup> Treg	CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	IL-10

**Tabulka 2:** Typy regulačních buněk, jejich povrchový fenotyp a vylučované efektorové molekuly.

#### 5.3.1.1 Přirozené regulační T-lymfocyty (nTreg)

Jejich aktivace je závislá na IL-2. Důležitá je jejich produkce tlumivých cytokinů (IL-10 a TGF-β) a jejich působení na jiné buňky přímým kontaktem. nTreg zaujímají asi 10-15% ze všech CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů.

Přirozené regulační T-lymfocyty vznikají v thymu. Po opuštění thymu nesou povrchové znaky CD4, CD25 (Mitášová *et al.*, 2012).

Při tvorbě z naivních nTreg buněk se podílejí epiteliální buňky kůry a dřeně thymu a DC přítomné v thymu. Pro jejich diferenciaci je potřeba kostimulační signál prostřednictvím CD28, CD80, CD86 a CD40. Důležitá je taky přítomnost TGF-β a také IL-2, IL-7 (CD127), IL-15 a IL-21, které jsou považovány za hlavní regulátory homeostázy (Overwijk *et al.*, 2009). nTreg buňky nejsou schopny samy produkovat IL-2 a jeho produkce je závislá na ostatních T-lymfocytech. Přirozené nTreg jsou typické expresí receptoru CD25, což je podjednotka IL-2 receptoru, a inhibičního CTLA-4. Produkují IL-10, IL-4, INF-γ a TGF-β (Veselá *et al.*, 2004). Po opuštění brzlíku přechází nTreg do periferie, kde se setkává s antigenem (Mitášová, 2012). Tyto buňky, na rozdíl od jiných T-lymfocytů, vlastní buňky nenapadají, ale možné autoimunitní reakce potlačují (Veselá *et al.*, 2004).

### 5.3.1.2 Indukované regulační T-lymfocyty (iTreg)

Vznikají na periférii a k jejich vzniku je potřeba TGF- $\beta$ , IL-2 a kostimulační molekuly CD80 a CD86. Pomáhají tlumit imunitní reakce, čímž redukuje škodlivé imunopatologické dopady.

Indukované regulační T-lymfocyty (iTreg) vznikají na periférii při většině antigen-specifických reakcí (Th1 a Th2). Jsou zprvu CD25 negativní a začínají znak exprimovat až po stimulaci antigenem v periferních lymfoidních orgánech. K tomu je zapotřebí zajištění dostatku IL-2 a také TGF- $\beta$  (Mitášová, 2012).

Indukované regulační T-lymfocyty vznikají v periferních tkáních při většině antigenně specifických imunitních reakcí a působí hlavně pomocí sekretovaných tlumivých cytokinů (Hořejší et al., 2009). Oba typy Treg buněk se vyznačují významnou produkcí TGF- $\beta$  a IL-35 (Collinson et al., 2007).

Bylo prokázáno, že úbytek CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulačních T-lymfocytů vede k rozvoji systémových autoimunitních onemocnění u myši. Navíc pomocí přenosu CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-lymfocytů lze zabránit rozvoji experimentálně vyvolaných autoimunitních chorob u zvířecích modelů např. kolitida, gastritida, thyreoiditida. Tyto pokusy dokazují, že CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> zastávají klíčovou roli při kontrole autoreaktivních buněk a v indukci periferní tolerance. (Sakaguchi et al., 1995). Mezi indukované Treg patří Tr1 a Th3. Tyto dva typy také mohou mít fenotyp CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, ale nevylučují FoxP3.

(Godfrey et al., 2000).

#### 5.3.1.2.1 Regulační T-lymfocyty typu 1 (Tr1)

Tyto buňky jsou periferně indukovány stimulací komplexem MHC/peptid za současné přítomnosti IL-10. Tr1 se diferencují s prekurzorů naivních CD4<sup>+</sup> lymfocytů (Wang, 2008). Tr1 jsou indukovány antigenní stimulací za přítomnosti IL-10. Neexprimují FoxP3, ale exprimují CD4 a CD25 (Vieira et al., 2004). Jsou specifické především produkcí cytokinů, jako jsou IL-10 a TGF- $\beta$ , díky kterým mohou potlačovat reaktivitu Th1 a Th2. Významně se podílí při modulaci imunitní odpovědi u autoimunitních chorob, imunodeficienci, transplantaci a onkologických onemocnění a jsou důležité při zánětu (Belkaid et al., 2005).

#### 5.3.1.2 *Antigen-specifické pomocné T-lymfocyty typu 3 (Th3)*

Tato subpopulace lymfocytů je některými autory zařazována mezi pomocné Th-lymfocyty. Jsou indukovány v periferních lymfatických orgánech pomocí stimulace TCR a TGF- $\beta$  a mají fenotyp CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. TGF- $\beta$  následně využívají k supresi efektorových T-lymfocytů a také může být u některých Th3 lymfocytů zaznamenána exprese FoxP3 právě díky stimulaci TGF- $\beta$  (Vieira *et al.*, 2004).

Th3 produkují protizánětlivé cytokiny TGF- $\beta$ , IL-4 a IL-10 podporují produkci IgA a mají potlačující účinky na Th1 a Th2 (Weiner, 2001). Th3 buňky také spolupracují s B-lymfocyty ve slizniční lymfatické tkáni (Hořejší *et al.*, 2009).

#### 5.3.1.3 *CD8+ Treg (Supresorové T-lymfocyty; Ts)*

**Jejich stimulace probíhá v periférii a důležitý je komplex peptid-MHC gp I. třídy. Mají důležitou roli v patogenezi autoimunitních onemocnění. Jejich cílovými buňkami jsou především APC, na které působí přímým kontaktem.**

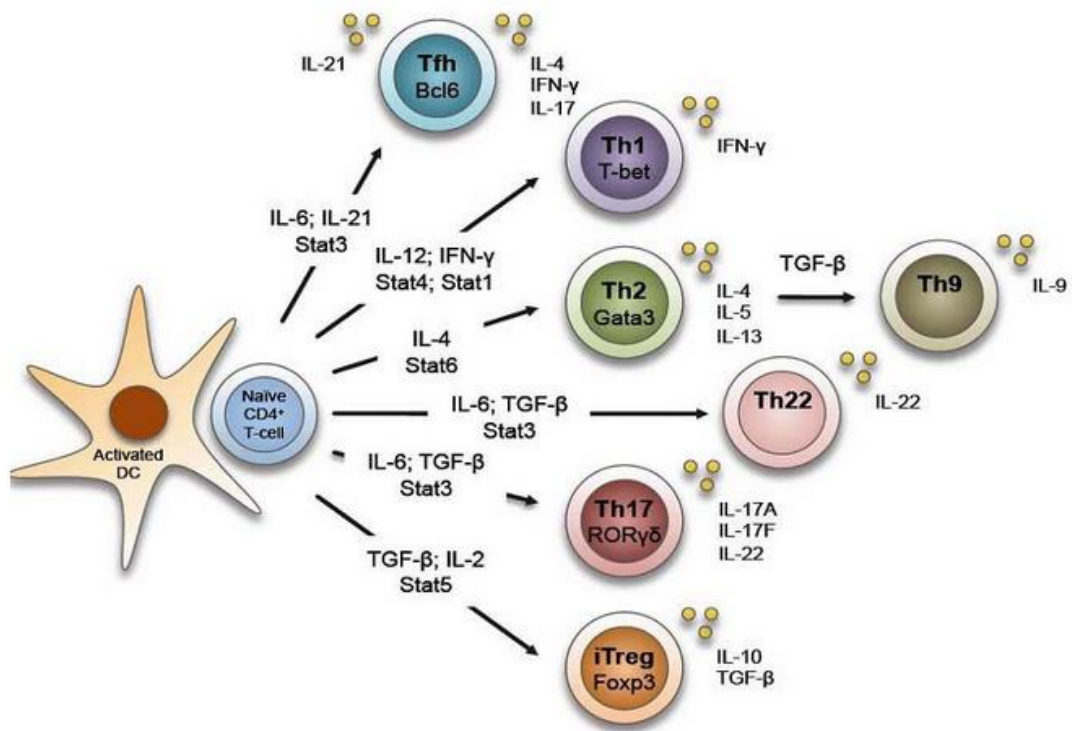
CD8<sup>+</sup> Treg jsou v některých publikacích označovány jako supresorové Ts lymfocyty. Tento název byl však dříve používán pro celou subpopulaci regulačních T-lymfocytů. Tato skupina lymfocytů patří mezi CD8 buňky, neexprimují molekulu CD28, ale exprimují FoxP3. Jejich fenotyp je tedy CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>. Jsou indukované na periférii stimulací antigeny MHC I. třídy. Cílovými buňkami jsou APC, především buňky dendritické. Ts lymfocyty kontrolují aktivaci Th lymfocytů tak, že potlačují stimulační funkci APC zablokováním interakce CD28-B7 molekul (CD80 a CD86). Imunitní reakci zprostředkovávají pomocí přímého buněčného kontaktu (Wang, 2008). Bylo však zjištěno, že suprese pomocí Ts lymfocytů je u pacientů s mnoha zánětlivými onemocněními, roztroušené skleróze, diabetu I. typu ve srovnání se zdravými jedinci defektní. Zvýšený počet CD8<sup>+</sup> T regulačních lymfocytů je spojován se stárnutím (Joosten *et al.*, 2008)

#### 5.3.1.4 *NKT lymfocyty*

**Jedná se o buňky nesoucí TCR typu  $\alpha\beta$  a zároveň vykazují celou řadu receptorů typických pro NK buňky. Některé mají koreceptor CD4, některé CD8 a některé nemají CD4 ani CD8. Důležitá je produkce cytokinů IL-4 a INF- $\gamma$ , které ovlivňují diferenciaci buď Th1 lymfocytů nebo Th2 lymfocytů.**

NKT lymfocyty jsou charakteristické produkcí IL-4 a INF- $\gamma$ . Exprimují znaky společné jak pro T-lymfocyty, tak pro NK buňky (Godfrey *et al.*, 2000). Jejich TCR receptory se vážou především s molekulou CD1d (příbuzná MHC I), která je exprimována buňkou APC. NKT

uplatní své efektorové a imunoregulační funkce až po stimulaci pomocí kostimulačních molekul mezi APC a NKT a proliferaci NKT. Cytokiny produkované NKT buňkami diferencují Th0 do dráhy Th1 a Th2, ale také ovlivňují funkci B-lymfocytů a NK buněk. Imunoregulační vlastnosti mohou také přispívat k indukci potransplantační toleranci a prevenci proti dalším autoimunitním chorobám (Cardell, 2006).



**Obrázek 10.** Shrnutí vývoje jednotlivých subpopulací pomocných Th-lymfocytů včetně regulačních T-lymfocytů, které se také diferencují z naivní CD4<sup>+</sup> buňky. Přehled cytokinů a transkripčních faktorů ovlivňujících jejich diferenciaci a přehled vylučovaných efektorových molekul jednotlivých subpopulací (The T helper 17 subset in pulmonary diseases, 2014).

### 5.3.2 Mechanismy fungování regulačních T-lymfocytů

Dnes jsou známy čtyři základní mechanismy suprese regulačními T-lymfocyty.

#### Modulace prostřednictvím cytolyzy

Při tomto způsobu modulace imunitní odpovědi dochází k likvidaci autologních buněk imunitní odpovědi. Suprese imunitní odpovědi pomocí cytolyzy byla dříve spojována především s NK buňkami a cytotoxickými T-lymfocyty. Regulační T-lymfocyty přednostně využívají k cytolyze granzym A a perforin (Jonuleit et al., 2003).

### **Modulace prostřednictvím cytokinů**

V tomto mechanismu se uplatňují především IL-10, TGF- $\beta$  a IL-35. IL-10 je významný protizánětlivý faktor, který se uplatňuje především v orgánech, které přicházejí do styku s vnějším prostředím. Tento cytokin však nemusí být produkován přímo regulačními T-lymfocyty (Murray *et al.*, 2009).

TGF- $\beta$  v těle reguluje např. proliferaci a vývoj buněk. Při imunitní odpovědi odpovídá především za inhibici aktivace lymfocytů. Je nezbytný pro vývoj indukovaných regulačních T-lymfocytů, nepřímo zprostředkovává omezení protinádorové imunity indukcí regulačních T-lymfocytů a také inhibuje efektorové T-lymfocyty a NK buňky (Fahlén *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007).

Regulační T-lymfocyty produkují také cytokin IL-35, jehož nepřítomnost podstatně negativně ovlivňuje regulační schopnosti T-lymfocytů. Přesný mechanismus jeho fungování je zatím ve stádiu výzkumu (Collison *et al.*, 2007).

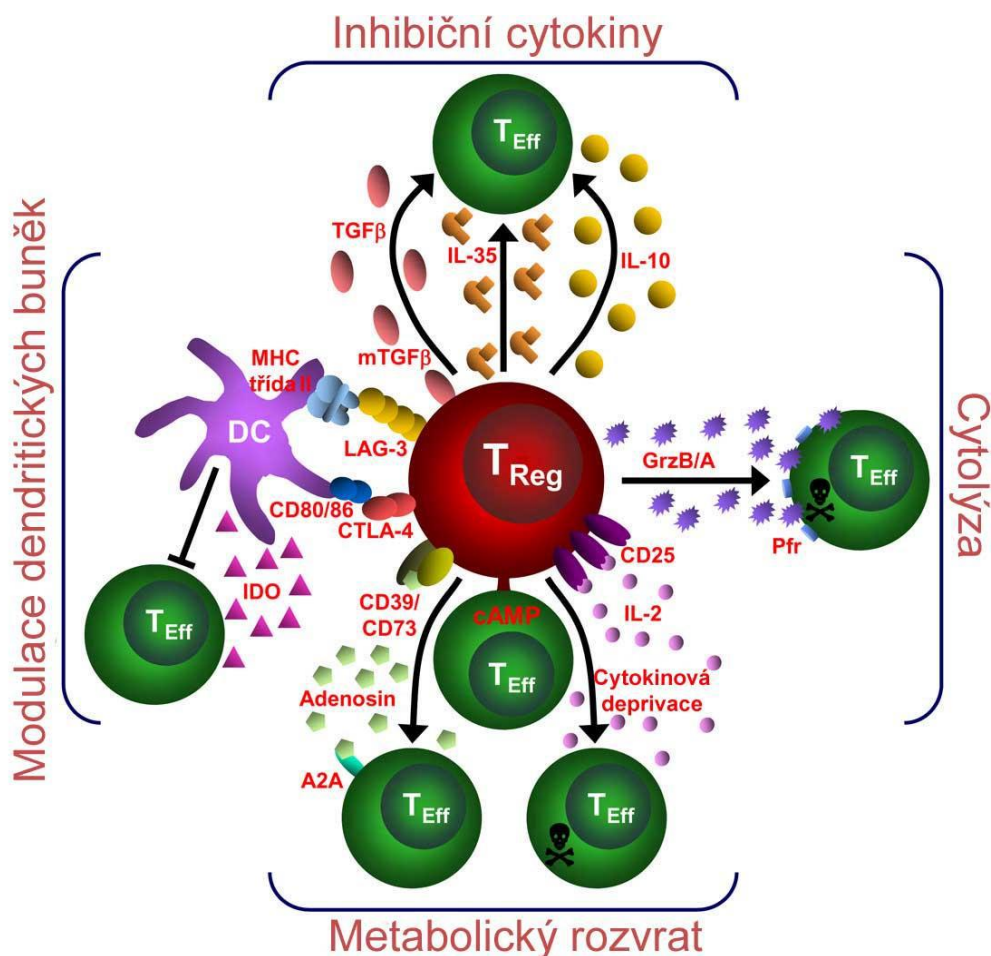
### **Modulace funkce DC**

DC jsou zodpovědné za aktivaci T-lymfocytů a prezentaci antigenů. Ke kontrole DC využívají regulační T-lymfocyty CTLA-4 (také CD152), který na povrchu DC komunikuje s molekulami CD80 a CD86 a tím dochází k produkciIDO (indolamin-2,3-dioxygenázy) (Fallarino *et al.*, 2003).IDO metabolizuje aminokyselinu tryptofan, která je důležitá pro proliferaci a diferenciaci efektorových T-lymfocytů. Je-li nedostatek tryptofanu, dochází ke vzniku tlumivých T-lymfocytů a ty po kontaktu s dalšími DC v nich indukují produkciIDO, a tak z nich dělají další tolerogenní DC (Hořejší *et al.*, 2009).

### **Suprese metabolickým rozvratem**

Tento mechanismu vede vždy k potlačení funkce efektorových T-lymfocytů. Jedním z mechanismů založeným na metabolickém rozvratu efektorových T-lymfocytů je boj o IL-2, který je nezbytným faktorem pro jejich přežití. Regulační T-lymfocyty mají na svém povrchu molekuly CD25, která je součástí receptoru pro IL-2. Vysoká koncentrace této molekuly umožňuje účinné vychytávání IL-2 z okolí (Pandiyan *et al.*, 2007).

Regulační T-lymfocyty také obsahují vysoké koncentrace cAMP (cyklický adenosinmonofosfát), který se vyznačuje útlumem proliferace T-lymfocytů a jejich syntézy IL-2. cAMP je mezi buňkami přenášen pouze přímým kontaktem (Bopp *et al.*, 2007).



**Obrázek 11.** Čtyři mechanismy suprese regulačními T-lymfocyty. T<sub>Eff</sub> – efektorový T-lymfocyt, T<sub>Reg</sub>- regulační T-lymfocyt, DC- dendritická buňka (Vignali et al., 2008)

#### 5.4 $\gamma\delta$ T-lymfocyty

Tato subpopulace T-lymfocytů pravděpodobně hraje důležitou roli v imunitním dozoru během infekce a nádorových transformací. Přesné funkce  $\gamma\delta$  lymfocytů nejsou zatím známy.

Buňky nesoucí typ  $\gamma\delta$  jsou méně časté (1-10%). Mohou se vyvíjet mimo thymus a rozeznávají antigeny jiného typu než komplexy MHC proteinů s peptidy (Hořejší et al., 2009), ale místo toho interagují s lipidovými a glykolipidovými antigeny vázanými na CD1 molekulách.  $\gamma\delta$  T-lymfocyty jsou dvojitě negativní CD4-CD8- a neexprimují ani CD25. Mají vlastnosti jak vrozené tak adaptivní imunity (Danilova, 2012). Vyskytují se v periferní krvi a v epiteliálních vrstvách vnějších a vnitřních tkání.  $\gamma\delta$  lymfocyty můžeme charakterizovat jako regulační most mezi vrozenými a adaptivními imunitními odpověďmi. Některé jejich vlastnosti jsou shodné s NK buňkami a T-lymfocyty nesoucí TCR typu  $\alpha\beta$ .

S  $\alpha\beta$  T-lymfocyty mají společnou cytotoxickou aktivitu a produkci cytokinů INF- $\gamma$ , IL-2, IL-4 a TNF- $\alpha$  a jsou také významným zdrojem IL-17 (Xiong et al., 2007).  $\gamma\delta$  T-lymfocyty produkují jak IL-17A, tak IL-17F i IL-22 (Roak et al., 2008). Podobně jako NK buňky produkují peptid granulysin, který se vyznačuje lytickou aktivitou. T-lymfocyty typu  $\gamma\delta$  také regulují zrání DC a funkce B-lymfocytů,  $\alpha\beta$  T-lymfocytů, NK a NKT buněk a také makrofágů (Xiong et al., 2007).



Subpopulace	podskupina	TCR receptor	povrchové molekuly	efektorové molekuly	transkripční faktory
Cytotoxické (Tc)	-	$\alpha\beta$	CD3, CD8	Perforiny, granzymy, INF- $\gamma$ , TNF- $\beta$	
Pomocné (Th)	Th1	$\alpha\beta$	CD3, CD4, IL-12R, IFN- $\gamma$ R	INF- $\gamma$ , IL-2, IL-3, TNF- $\beta$	T-bet, Stat4
	Th2	$\alpha\beta$	CD3, CD4, IL-4R	IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13,	GATA3, Stat6, c-Maf
	Th17	$\alpha\beta$	CD3, CD4, IL-23R, TNF- $\beta$ R, CCR6,	IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-23	ROR $\gamma$ t, Stat3
	Th9	$\alpha\beta$	CD3, CD4	IL-9, IL-10	PU.1, IRF4
	Th22	$\alpha\beta$	CD3, CD4, CCR10	IL-22	AHR
	Tfh	$\alpha\beta$	CD3, CD4, CXCR5, SLAMF1, IL-21R, CD40L	IL-21, IL-4, INF- $\gamma$ , IL-17	Bcl-6, Stat3
Regulační	nTreg	$\alpha\beta$	CD3, CD4, CD25	IL-10, TGF $\beta$ , IL-35, IL-2, IL-4, INF- $\gamma$	FoxP3, Stat5
	iTreg	Tr1	CD3, CD4, CD25	IL-10, IL-2,	není znám
		Th3	CD3, CD4, CD25	TGF $\beta$ , IL-4, IL-10	někdy Fox
	NKT	$\alpha\beta$	CD3, (CD8, CD4)	IL-4, IFN $\gamma$ , IL-17A	
	CD8+ (Ts)	$\alpha\beta$	CD3, CD8	IL-10	
vš	-	$\gamma\delta$	CD3	INF- $\gamma$ , IL-2, IL-4 a TNF- $\alpha$ , IL-17A, tak IL-17F i IL-22	

**Tabulka 3.** Přehled efektorových subpopulací T-lymfocytů, jejich povrchových molekul, produkováných efektorových molekul, transkripčních faktorů a hlavních funkcí v imunitním systému člověka.

## 6 Patologie v souvislosti s T-lymfocyty

### 6.1 Těhotenství a Treg

Imunologické rozpoznání těhotenství a ustanovení tolerance matky vůči zárodku jsou velmi důležité pro jeho vznik a zdárný vývoj. Antigeny, exprimované plodem, mohou být mateřským imunitním systémem rozeznávány jako cizí a může proti nim být zahájena imunitní odpověď. Tato reakce by mohla být pro plod fatální a mohlo by vést až ke smrti plodu. Proto jsou potřebné regulační mechanismy, které zajišťují maximální ochranu plodu proti útoku mateřského imunitního systému a zároveň tento fyziologický útlum imunity nesmí způsobit naprostý útlum imunity matky vůči ostatním podnětům (Heikkinen *et al.*, 2004).

K navýšení Treg lymfocytů dochází již před početím, kdy nejvyšší hladiny FoxP3<sup>+</sup> buněk byly zaznamenány v pozdní folikulární fázi.

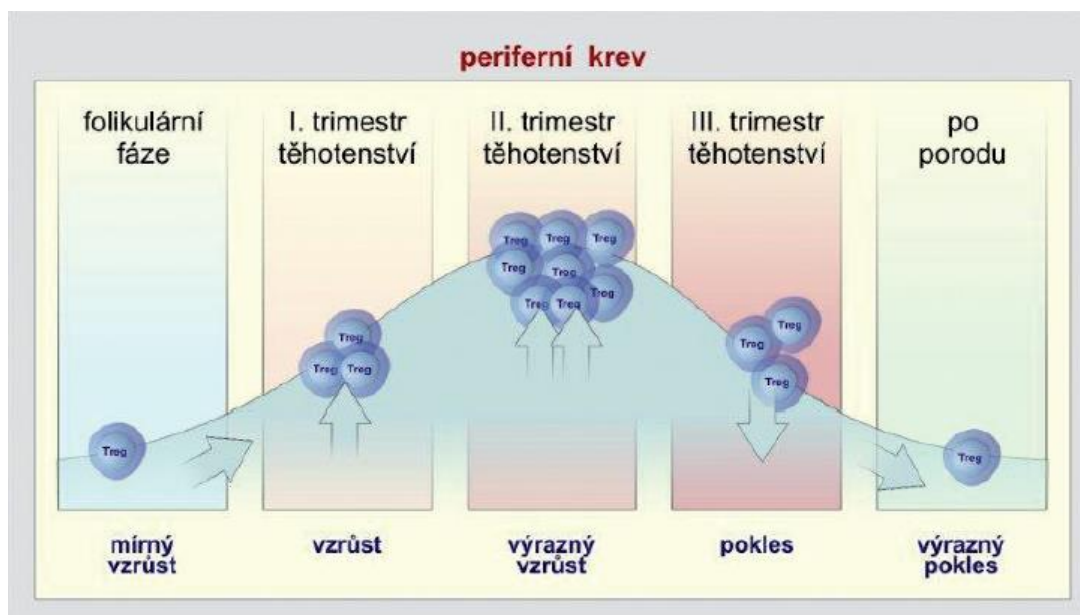
U zvířecího modelu vědci zjistili, že seminální tekutina způsobuje nárůst CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> buněk v lymfatických uzlinách kolem dělohy již třetí den po páření. Jako důležitá součást seminální tekutiny se ukázala být seminální plazma, která indukuje produkci chemokinu CCL19 (Macrophage inflammatory protein - 3β) v epiteliálních buňkách reprodukčního traktu samic. Tento chemokin působí na Treg a reguluje jejich nábor a zadržení v periferních tkáních (Mitášová *et al.*, 2012).

Výrazný nárůst Treg lymfocytů nastává na počátku gravidity v transformované děložní sliznici zvané decidua, které je imunologicky aktivní a zajišťuje rozhraní mezi plodem a matkou (Trudley *et al.*, 2004).

Treg lymfocyty jsou zřejmě stimulovány v lymfatických uzlinách kolem dělohy, do které následně migrují a jako Treg lymfocyty specifické pro otcovské antigeny indukují toleranci v raném stádiu těhotenství. Silným atraktantem pro Treg lymfocyty se jeví také choriový gonadotropin (hCG), který je produkován trofoblastem. Samotné buňky trofoblastu mají silné imunomodulační účinky.

Největší počet cirkulujících regulačních T-lymfocytů v krvi matky byl zaznamenán ve druhém trimestru těhotenství, zatímco následně ve třetím trimestru jejich hladina postupně klesala. Dnes se uvažuje o tom, že snížení hladiny CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg a zároveň zvýšení počtu CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Treg v periferní krvi je jednou z příčin počátku vypuzování plodu z dělohy.

Komplikace během těhotenství, jakými jsou nevysvětlitelná neplodnost, opakující se spontánní potraty nebo pre-eklampsie, jsou spojovány s poruchami v počtu či aktivitě Treg lymfocytů (Mitášová *et al.*, 2012).



**Obrázek 12.** Znárodnění dynamiky Treg lymfocytů v periferní krvi (Mitášová *et al.*, 2012)

## 6.2 Autoimunitní onemocnění

Fyziologické „autoimunitní reakce“ v organismu zajišťují především eliminaci vlastních, přestárných či jinak pozměněných buněk. Pokud však tyto reakce vedou k ničení vlastní zdravé tkáně, pak se jedná o patologickou reakci a mluvíme o autoimunitním onemocnění. Podstatou tohoto patologického procesu je zánět zprostředkovaný Th1 lymfocyty, jejich cytokiny a aktivovanými makrofágy a vyvolaný reakcí na neinfekční podnět. Často se používá termín IMID (immune mediated inflammatory disorders) (Vernerová, 2012).

Pro vznik autoimunitních onemocnění je zásadní prolomení periferní tolerance, která je, za fyziologických podmínek udržována:

- Klonální delecí – autoreaktivní lymfocyty po aktivaci hynou apoptózou
- Klonální anergií – T-lymfocyt rozpozná autoantigen, ale chybí kostimulační signál nutný k plné aktivaci buňky, důsledkem čehož dochází k útlumu
- Klonální ignorancí – především u autoantigenů, které jsou exprimovány na vlastních tkáních v podprahovém množství a neposkytují dostatečný signál
- Supresí – dochází k potlačení autoreaktivních lymfocytů jinými buňkami a jejich produkty (např. Treg, B-lymfocyty, NK buňky, DC atd.)

Autoimunitní onemocnění může vyvolat například nadbytek určitého cytokinu, což ovlivňuje regulaci hladiny Th1 a Th2 lymfocytů (Hořejší et al., 2009). Některá autoimunitní onemocnění (především u žen) mohou být způsobena i hormonálními faktory. U žen při infekci, vakcinaci a poranění dochází k převládající Th2 imunitní odpovědi, zatímco u mužů převládá Th1 imunitní odpověď. Ženský pohlavní hormon estrogen zvyšuje produkci cytokinů IL-10 a IL-4 (Fairweather et al., 2008). Z vnějších faktorů je za vznik autoimunitních onemocnění nejčastěji zodpovědná infekce, kterou mohou způsobovat viry, bakterie nebo parazité. Infekce může způsobit aktivaci T-lymfocytů, včetně aktivace autoreaktivních klonů prostřednictvím antigenů, které jsou označovány jako superantigeny, což jsou aktivní látky mikrobiálního, virového či bakteriálního původu (Krejsek et al., 2004).

Autoimunitní onemocnění jsou buď systémová, při kterých je postiženo více orgánů, autoimunitní reakce je namířena proti orgánově nespecifickým antigenům a uplatňují se především imunokomplexy, nebo orgánově specifická, která vedou k postižení jednoho orgánu a jsou navíc provázeny i řadou systémových příznaků. Hranice mezi těmito chorobami však není ostrá (Hořejší et al., 2009).

### **6.2.1 Revmatoidní artritida**

Jedná se o zánětlivé onemocnění, které postihuje synoviální výstelku kloubů a šlach a řadí se k systémovým autoimunitním onemocněním (Hořejší et al., 2009).

V počátečním stádiu hrají největší roli T-lymfocyty. V synoviální membráně kloubu se hromadí makrofágy, které působí jako APC a exprimují antigeny s MHC molekulami avšak jaký antigen spouští onemocnění není známo. Z T-lymfocytů jsou zastoupeny především Th1 lymfocyty. Buňky zánětlivé reakce napadnou výstelku kloubního pouzdra, kde dochází k jejich proliferaci a rozvoji nemoci. K trvalému zánětu přispívá také nedostatek protizánětlivých cytokinů Th2 a zvýšení produkce prozánětlivých cytokinů Th1 (IL-1, IL-6 a TNF- $\alpha$ ) (Pavelka et al., 2003). Důležitou roli hraje i IL-17 produkovaný Th17 lymfocyty, který stimuluje tvorbu prozánětlivých cytokinů a také ovlivňuje makrofágy a buňky synovie (Basso et al., 2009). I samotné makrofágy jsou schopny produkovat prozánětlivé cytokiny.

V chronické fázi zánětu se synoviální výstelka mění v tzv. pannus, který je tvořen řadou buněk (lymfocyty, makrofágy, DC atd.) a postupně prorůstá do kosti a narušuje chrupavčitou tkáň. Mezi chrupavkou a pannem uvolňují aktivované makrofágy

proteolytické enzymy jako odpověď na produkci IL-1 a TNF- $\alpha$ . Tyto cytokiny neovlivňují pouze poškození kloubu, ale jsou zodpovědné i za systémovou odpověď organismu jako je například horečka, nechutenství nebo celková vyčerpanost (Pavelka et al., 2003).

### **6.2.2 Sarkoidóza**

Řadí se mezi systémové zánětlivé granulomatózní onemocnění vyvolané doposud neznámým antigenem. Nejčastěji jsou postiženy plíce, ale může napadnout i jiné tkáně (Hořejší et al., 2009). Onemocnění má dvě formy – akutní a chronickou. Akutní forma má příznaky infekčního onemocnění, kdy pacienti trpí horečkou, bolestmi kloubů, únavou či malátností, zatímco chronická forma má pomalý nástup a postupně se objevují respirační a jiné orgánové příznaky (Kolek, 2007).

Vyvolávající antigen je prezentován APC ve spojení s MHC II. třídy Th1 lymfocytům. Aktivované T-lymfocyty produkují IL-2 a chemotaktické faktory, které přitahují do místa zánětu monocyty a makrofágy. INF- $\gamma$  je nutný pro aktivaci makrofágů a jejich transformaci na buňky, které jsou základem granulomu. Výsledkem těchto procesů je chronický zánět a tvorba granulomů (Vicherek, 2008).

Granulomy v organismu vznikají běžně při zánětlivých onemocnění, ale při sarkoidóze jsou tvořeny na zatím neznámý podnět. V centru granulomu se nacházejí Th-lymfocyty a aktivované makrofágy, zatímco periferní oblast je tvořena Tc-lymfocyty a B-lymfocyty (Kolek, 2007).

Pro diagnózu sarkoidózy je přínosné stanovení subpopulací T-lymfocytů. Zvýšený podíl pomocných CD4<sup>+</sup> lymfocytů nad tlumivými CD8<sup>+</sup> podporuje diagnózu tohoto onemocnění. Dosahuje-li index CD4/CD8 více než 3,5 je tato diagnóza pravděpodobná, při hodnotě 10 je téměř jistá.

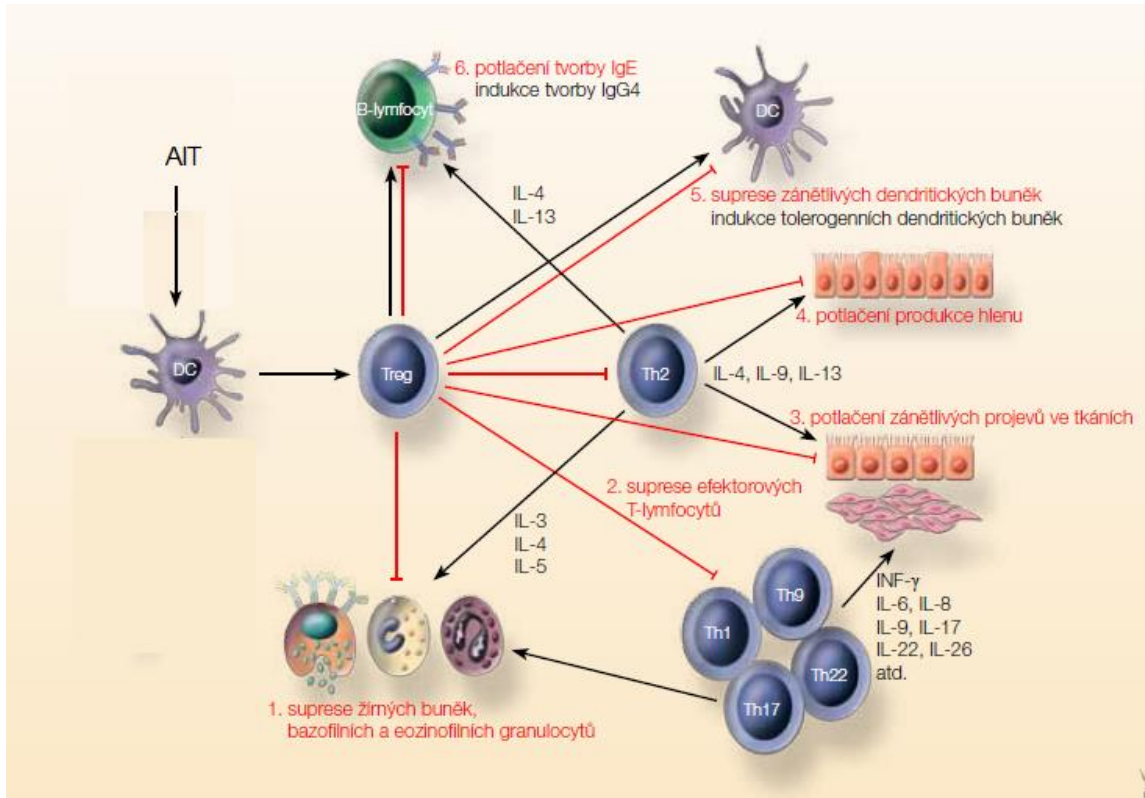
U plicních projevů bývá přítomen suchý kašel, může se objevit dušnost a bolest na hrudníku. Kromě plic mohou být zasaženy i oči, kůže nebo srdce (Vicherek, 2008).

### **6.3 Alergie**

Alergické choroby jsou spojené s aktivací Th2 lymfocytů a jsou provázeny nadprodukcí IgE a vyvolány jsou vnějším antigenem – alergenem, zatímco autoimunitní choroby jsou reakcí na vlastní antigen. V poslední době se však zjistilo, že ani toto rozlišení alergií od autoimunitních onemocnění není jednoznačné. Alergie mohou být vyvolány vnitřními

faktory a naopak. Platné je pouze to, že u obou skupin chorob se jedná o poruchu regulace imunitního systému (Hořejší et al., 2009).

Normální jedinci jsou před alergickými chorobami chráněni pomocí Treg, které regulují poměr Th1 a Th2. Cílem Alergenové imunoterapie (AIT), která je nejcharakterističtější léčebným postupem, je vyvolat toleranci periferních T-lymfocytů, která je charakterizována právě produkcí alergen-specifických regulačních T-lymfocytů tvořící IL-10 a TGF- $\beta$ . Úkolem AIT je také modulovat aktivitu žírných buněk a bazofilů a tlumit zvýšenou produkci histaminu, která je zprostředkována IgE protilátkami. Cílem Treg není jen snížení Th2 imunitní reakce, ale i jiných buněk, jako jsou DC, žírné buňky, bazofily a eozinofily. Klíčovou roli v navození alergenové tolerance hrají především Tr1. Protilátky IgG4 jsou izotypy protilátek zabraňující alergické reakci. Oproti IgE se mohou přímo vázat na různé epitopy alergenů, dokáží zabránit vazbě alergenu na IgE a výsledkem jejich vazby je blokující efekt. Nastartování tvorby IgG4 je umožněno kostimulací IL-4 a IL-10, kdy IL-10 tlumí přesmyk na tvorbu IgE indukovaný IL-4, ale zvyšuje produkci IgG4 indukovanou IL-4. IL-10 tedy nejen vytváří toleranci u T-lymfocytů, ale také reguluje tvorbu alergen-specifických protilátkových izotopů (Bystroň, 2012).



**Obrázek 13.** Mechanismy působení alergenové imunoterapie (Bystroň, 2012).

### **6.3.1 Atopie**

Jako atopii označujeme geneticky podmíněnou predispozici reagovat na běžné alergeny zvýšenou tvorbou protilátek třídy IgE. Jedinci, kteří reagují na neškodné antigeny produkcí IgE se nazývají atopici. K reakci dochází velmi rychle po kontaktu s antigenem.

Při prvním setkání s antigenem proběhne diferenciaci Th2 lymfocytů a následně B-lymfocytů, které pod vlivem cytokinů Th2 (IL-4 a IL-5) sekretují především protilátky třídy IgE (Hořejší et al., 2009).

U atopiků tedy byla prokázána zvýšená tvorba IL-4 a IL-5 při odpovědi na antigeny bakterií, které u neatopiků navozují Th1 odpověď. Infekce prodělané v prvních letech života (tuberkulóza, černý kašel nebo spalničky) významným způsobem ovlivňovaly vývoj imunitního systému jedince a vyvolávaly diferenciaci Th1 lymfocytů, jejichž cytokiny potlačovaly aktivitu Th2 lymfocytů. Snížení frekvence těchto onemocnění může vést k převaze mechanismů Th2 imunitní odpovědi a tím i k rozvoji atopických onemocnění (Kopřiva et al., 1999).

## **6.4 HIV a AIDS**

AIDS (syndrom získané imunodeficiency) je nejzávažnějším druhem získané poruchy imunity a je způsobený infekcí virem HIV. Tento virus infikuje buňky CD4<sup>+</sup>, makrofágy a buňky CNS, kde se váže na receptor CD4<sup>+</sup>. Po vstupu viru do buňky se virová RNA pomocí enzymu reverzní transkriptázy přepisuje do DNA buňky. Nastává akutní fáze, která může být příznaky podobné chřipce nebo může být asymptomatická (Hořejší et al., 2009). V krvi nastává přechodný pokles CD4<sup>+</sup> lymfocytů a objevuje se antigen p24. Asi po 1 až 3 týdnech se počet lymfocytů vrací zpět do normálu a antigen p24 vymizí. Infekce nadále zůstává v asymptomatickém stádiu a trvá až několik let. V tomto období dochází k úbytku CD4<sup>+</sup> lymfocytů. Jakmile počet CD4<sup>+</sup> lymfocytů klesne pod 500 buněk/μl začnou se projevovat první symptomy (Černý et al., 2007). Poté nastává symptomatická fáze, během níž propukají různá infekční onemocnění. Začíná vzrůstat množství viru v krvi a klesat počet CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů. Tato infekce virem HIV postupně vede k selhání většiny složek imunity a to se všemi důsledky jako je snížená rezistence k infekcím, zvýšení výskytu některých nádorových chorob a různé projevy autoimunity a alergie (Hořejší et al., 2009). Poslední a nejzávažnější fázi představuje AIDS. V tomto stádiu nastává pokles CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů pod 200 buněk/μl a jsou přítomny tzv. oportunitní infekce (způsobené

patogenními mikroorganismy). Postižení na tyto infekce většinou umírají (Černý et al., 2007).

## 6.5 Nádor a T-lymfocyty

Podstatou nádorového onemocnění jsou zhoubné buňky, které získaly schopnost nekontrolovaně se dělit a pronikat z místa svého vzniku do okolních tkání, kde tvoří nádory (Krejsek et al., 2004). Transformace buněk může být vyvolána různými způsoby v důsledku selhání mechanismů buněčného dělení a regulace sociálního chování buněk, což je vyvolané mutacemi na tzv. onkogenech (Hořejší et al., 2009). Transformační podněty však mohou být vyvolané i chemickými, fyzikálními nebo biologickými karcinogeny. Taková transformace způsobuje antigenní odlišnost transformované buňky od buňky zdravé (Krejsek et al., 2004). Tato odlišnost může být imunitním systémem ignorována, pokud je příliš malá. Nádorové buňky však mohou používat i různé mechanismy, jak se vyhnout imunitnímu dozoru (Hořejší et al., 2009). Další mechanismy protinádorové imunity jsou založeny především na reakcích NK buněk, makrofágů a také T-lymfocytů.

Důležitou roli hraje buněčná imunitní odpověď, kdy je buňka lýzována např. cytotoxickými T-lymfocyty nebo NK buňkami. Tc-lymfocyty pomocí proteinu perforinu a proteázy granzymu penetrují nádorovou buňku a aktivují kaspázy, což vyvolá sled reakcí vedoucích k apoptické smrti buňky (Krejsek et al., 2004). T-lymfocyty nezodpovídají pouze za přímé usmrcení buněk, ale také za aktivaci dalších složek imunitního systému. Protože většina nádorových buněk obsahuje pouze molekuly MHC I. třídy, nemohou je Th-lymfocyty rozlišit a jsou závislé pouze na APC nesoucí MHC II. třídy. Aktivované Th-lymfocyty pak mohou aktivovat Tc-lymfocyty, NK buňky a B-lymfocyty (Stites et al., 1991). Th1 lymfocyty spolupracují s makrofágy a aktivují je k účinnější fagocytóze, zatímco Th2 lymfocyty spolupracují s B-lymfocyty a podporují jejich dělení a diferenciaci. Protilátky produkované B-lymfocyty pak mohou působit proti nádorovým buňkám (Hořejší et al., 2009).

Nádorové buňky však disponují schopnostmi, díky kterým dokáží uniknout imunitnímu dozoru a to především T-lymfocytům. Právě tato schopnost nádorových buněk vede k invazi nádorového onemocnění. Možnou příčinou nerozpoznání nádorových buněk imunitním systémem je, že nádorové antigeny jsou na buněčném povrchu vystaveny jen ve velmi malém množství a tak jsou imunitním systémem ignorovány (Janeway et al., 2005).



Nádorové buňky na svém povrchu neobsahují kostimulační molekuly (CD80 a CD86) a nemohou tak plnit funkci APC, čímž tlumí prekurzory Th a Tc. Některé nádorové buňky na svém povrchu mohou vystavovat molekulu FasL, která pak může u protinádorových T-lymfocytů vyvolat apoptózu. Nádory mohou být před imunitním systémem chráněny i pomocí regulačních T-lymfocytů, které nádory chrání jako normální tkáň. Odstraněním těchto buněk však může dojít ke vzniku autoimunitních onemocnění (Hořejší et al., 2009). Aktivaci buněčných imunitních mechanismů můžeme vyvolat například vakcinací pomocí adoptivní imunoterapie (terapie buňkami). Do této imunoterapie řadíme stimulaci LAK (lymphocyte activated killers) a TIL (tumor infiltrating lymphocytes). Při LAK stimulaci se z periferní krve pacienta získají T-lymfocyty a kultivují se in vitro pomocí cytokinů (IL-2, IL-4, IL-7). Metoda pomocí TIL buněk vychází ze stejného principu, ale zde jsou T-lymfocyty izolované přímo z nádoru a ty se poté také aktivují cytokiny (např. IL-12). Tyto buňky se pak vrací zpět do organismu. Zatím je prokázáno, že LAK buňky jsou méně účinné než buňky TIL (Hořejší et al., 2009; Janeway et al., 2005).

## 7 Závěr

Z provedené literární rešerše je zřejmé, že kromě tradičního rozdělení lymfocytů na dvě základní funkční populace (cytotoxické a pomocné) existuje, především mezi pomocnými T lymfocyty značná diverzita. Kromě toho existuje řada přechodných forem T lymfocytů, které vykazují znaky dvou nebo více samostatných skupin. Jednotlivé subpopulace T lymfocytů se od sebe morfologicky neliší a detekovat je můžeme pouze imunohistochemicky na základě přítomnosti konkrétních povrchových molekul (CD), popř. analýzou spektra dekretujících cytokinů.

Lymfocyty nesoucí na svém povrchu molekulu CD8 se převážně označují jako cytotoxické T-lymfocyty. Na svém povrchu nesou membránově vázaný cytokin FasL, který vazbou na svůj receptor přítomný u cílové buňky aktivuje řadu reakcí vedoucí ke smrti buňky. Tyto buňky se vyznačují schopností likvidovat jiné buňky infikované virem (nebo jiným intracelulárním parazitem) nebo buňky poškozené. Tyto lymfocyty produkují cytokiny TNF- $\beta$  a INF- $\gamma$ .

Lymfocyty, které na svém povrchu nesou molekulu CD4, jsou označovány jako pomocné lymfocyty, které se dále dělí podle spektra produkovaných cytokinů. Dlouhou dobu byly známy pouze pomocné lymfocyty označované jako Th1, které se podílí na tvorbě zánětu, a Th2, jež indukují proliferaci a diferenciaci B-lymfocytů. S rozvojem výzkumu autoimunitních chorob jsou definovány stále nové skupiny pomocných T-lymfocytů. Jedny z nich jsou označovány jako Th17. Své označení získaly díky produkci IL-17, který se také výrazně podílí na zánětu. Další nedávno objevenou skupinou jsou lymfocyty označované jako Th9, produkující IL-9. I tato skupina lymfocytů patří mezi prozánětlivé. Teprve před pár lety byla objevena další skupina lymfocytů, která nese označení Th22. Tyto lymfocyty jsou stále předmětem mnoha výzkumů, které zatím naznačují, že i tyto lymfocyty jsou zapojeny do patogeneze zánětlivých onemocnění. Zatím poslední známou skupinou T-lymfocytů jsou folikulární T-lymfocyty. Tato skupina se vyvíjí nezávisle na ostatních pomocných lymfocytech a významně modifikuje činnost B lymfocytů. Jednotlivé skupiny pomocných lymfocytů se od sebe liší nejen funkcí a rozdílnou produkcí cytokinů, ale nesou i specifické povrchové molekuly a rozdílné jsou i jejich transkripční faktory.

Další známou subpopulací T-lymfocytů jsou regulační T-lymfocyty, charakteristické svou schopností potlačovat aktivitu jiných buněk. Tyto buňky na svém povrchu exprimují molekuly CD4, byly však objeveny i skupiny nesoucí molekulu CD8. Tato subpopulace se dělí na přirozené a indukované. Přirozené regulační lymfocyty regulují aktivitu jiných

buněk produkcí cytokinů a přímým kontaktem. Mezi indukované Treg, které pomáhají tlumit imunitní reakce, patří regulační lymfocyty typu 1 (Tr1) a antigen specifické pomocné lymfocyty typu 3 (Th3). Tr1 potlačují především aktivitu Th1 a Th2 stejně jako Th3, které navíc spolupracují s B-lymfocyty. Regulační lymfocyty, které na svém povrchu exprimují molekulu CD8 se označují jako CD8+ Treg a v některých publikacích jsou označovány jako supresorové. Tato skupina potlačuje stimulační funkci APC, čímž regulují aktivaci Th-lymfocytů. Mezi regulační jsou řazeny i NKT buňky. Tyto buňky nesou znaky společné pro T-lymfocyty i pro NK buňky a produkcí svých cytokinů ovlivňují diferenciaci buď Th1 nebo Th2.

Zvláštní skupinou T-lymfocytů jsou  $\gamma\delta$  T-lymfocyty. Své označení nesou podle svého TCR, který se skládá z řetězců  $\gamma$  a  $\delta$ . Jejich přesná funkce není doposud známa, ale pravděpodobně hrají důležitou roli během infekce a nádorových onemocnění.

Z předkládané rešerše je zřejmé, že T lymfocyty mají zásadní vztah k řadě závažných onemocnění (autoimunita, alergie, atopie, nádory) ale také lékařských úkonů (transplantace, imunizace). Dalším významným poznatkem je, že naše znalosti v oblasti imunobiologie T lymfocytů nejsou zdaleka úplně a vzhledem k biomedicinskému významu těchto buněk má výzkum této problematiky velký význam.

## 8 Seznam zkratek

- AHR – aryl uhlovodíkový receptor  
AIT – alergenová imunoterapie  
APC – buňka předkládající antigen (Antigen Presentig Cell)  
Bcl-6 – B cell Leukemia/lymfoma 6  
BCR – receptor B-lymfocytů (B-Cell Receptor)  
CD – diferenční antigen (Cluster of Differentiation)  
CNS – Centrální Nervový Systém  
CTLA-4 – cytotoxic-T-lymphocyte antigen (CD152)  
DC – dendritická buňka (Dendritic Cell)  
FoxP3 - Forkhead/wingedhelix transkripční represor P3  
Gp - glykoprotein  
HLA – hlavní lidský antigen (Human Leukocyte Antigen)  
ICAM- mezibuněčná adhezivní molekula (InterCelular Adhesive Molecule)  
INF – interferon  
Ig – imunoglobulin  
IL – interleukin  
IRF4 – Interferon-Regulační Faktor 4  
IS – Imunitní Systém  
LAK – buňky-zabíječi aktivované lymfokinem (Lymphokine-Activated Killers)  
MALT – slizniční imunitní systém (Mucosa Associated Lymphoid Tissue)  
MHC – hlavní histokompatibilní komplex (Major Histocompatibility Complex)  
NK – přirozený zabíječ (Natural Killer)  
ROR $\gamma$ T - Retinoid-related Orphan $\gamma$ T<sup>c</sup> Receptor  
Stat – transkripční faktor (Signal Transducer and Activators of Transcription)  
Tc – cytotoxický T lymfocyt (Cytotoxic T cell)  
TCR – receptor T-lymfocytů pro antigen (T-Cell Receptor)  
TGF – transformující růstový faktor (Transforming Growth Factor)  
Th – pomocný T lymfocyt (Helper T cell)  
TIL- lymfocyty infiltrující nádory (Tumor Infiltrating Lymphocytes)  
TNF – faktor nekrotizující nádory (Tumor Necrosis Factor)  
Treg – regulační T lymfocyt (Regulatory T cell)  
VCAM – cévní adhezivní molekula (Vascular Cell Adhesion Molecule)

## 9 Seznam použité literatury

1. ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., PILLAI S. *Cellular and molecular immunology*. 7.vyd. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012, 545s. ISBN 978-4377-1528-6.
2. AURIEMMA, M., VIANALE, G., AMERIO, P., REALE, M. Cytokines and T cells in atopic dermatitis. *Eur. Cytokine Netw.*, 2013, roč. 24, č. 1, s. 37-44.
3. BASSO, A. S., CHEROUTRE, H., MUCIDA, D. More stories on Th17 cells. *Cell Res*, 2009, roč. 19, č. 4, s. 399-411.
4. BELKAID, Y., ROUSE, B. T. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol*, 2005, č. 6, s. 353–360.
5. BOPP, T., BECKER, CH., KLEIN, M., KLEIN-HEIBLING, S., PALMETSCHOFER, A., SERFLING, E., HEIB, V., BECKER, M., KUBACH, J., SCHMITT, S., STOLL, S., SCHILD, H., STAEGE, M. S., STASSEN, M., JONULEIT, H., SCHMITT, E. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *JEM*, 2007, roč. 204, č. 6, s. 1303-1310.
6. BYSTROŇ, J. *Alergenová imunoterapie*. [on line]. Kostelec nad Černými Lesy: Remedia online [cit. 2014-03-17]. Dostupné na: <<http://www.remedia.cz/Okruhy-temat/Imunologie/Alergenova-imunoterapie/8-17-1kq.magarticle.aspx>>.
7. CARDELL, S. L. The natural killer T lymphocyte: a player in the complex regulation of autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Clin Exp Immunol*, 2006, roč. 143, s. 194– 202.
8. COLLISON, L. W., WORKMAN, C. J., KUO, T. T., BOYD, K., WANG, Y., VIGNALI, K. M., CROSS, R., SEHY, D., BLUMBERG, R. S., VIGNALI, D. A. A. The inhibitory cytokine IL-35 to regulatory T cell function. *Nature*. 2007, roč. 450, č. 22, s. 566-569.
9. ČERNÝ, R., MACHALA, L. *Neurologické komplikace HIV/AIDS*. 1.vyd. Praha: Univerzita Karlova, 2007, 300 s. ISBN 978-80-246-1222-5.
10. DANILOVA, N.. The evolution of adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol.*, 2012, č. 738, s. 218 – 235.
11. DELVES, P. J., MARTIN, S. J., BURTON, D. R., ROITT, I. M. *Roitt's essential immunology*. 12.vyd. Chichester: Wiley-Blackwell, 2011. 546 s. ISBN 978-1-4051-9683-3.
12. FAHLÉN, L., READ, S., GORELIK, L., HURST, S. D., COFFMAN, R. L., FLAVELL, R. A., POWRIE, F. 2005. T cells that cannot respond to TGF- $\beta$

- escape control by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *JEM*, 2007, roč. 201, č. 5, s. 737-746.
13. FALLARINO, F., GROHMANN, U., HWANG, K. W., ORABONA, C., VACCA, C., BIANCHI, R., BELLADONNA, M. L., FIORETTI, M. C., ALEGRE, M-L., PUCETTI, P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003, roč. 4, č. 12, s. 1206-1212.
  14. GODFREY, D. I., HAMMOND, K. J. L., POULTON, L. D., SMYTH, M. J., BAXTER, A. G. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today*, 2000, roč. 21, č. 11, s. 573-583.
  15. HAO, J. Q. Targeting Interleukin-22 in Psoriasis. *Inflammation*, 2014, roč. 37, č. 1, s. 94-99.
  16. HARRISON, D. A. The Jak/STAT pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2012, roč. 4, č. 3, s. 1-3.
  17. HEIKKINEN, J., MÖTTÖNEN, M., ALANEN, A., LASSILA, O. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clin Exp Immunol*, 2004, č. 136, s. 373-378.
  18. HILARY, S., WARREN. NK cell proliferation and inflammation. *Immunology and Cell Biology.* 1996, č. 74, s. 473 – 480.
  19. HILL, J. A., FEUERER, M., TASH, K., HAXHINASTO, S., PEREZ, J., MELAMED, R., MATHIS, D., BENOIST, CH. Foxp3 transcription-factor-dependent and-independent regulation of theregulatory T cell transcriptional signature. *Immunity.* 2007, č. 27, s. 786-800.
  20. HORI, S., NOMURA, T., SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 2003, č. 299, s. 1057-1061.
  21. HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J. *Základy imunologie.* 4.vyd. Praha: Triton, 2009, 316 s. ISBN 978-80-7387-280-3.
  22. JANEWAY, CH., TRAVERS, P., WALPORT, M. *Immunobiology: the immune system in health and disease.* 6.vyd. New York: Garland Science, 2005, 823 s. ISBN 0-8153-4101-6.
  23. JONULEIT, H., SCHMITT, E. The Regulatory T Cell Family: Distinct Subsets and their Interrelations. *J Immunol*, 2003, č. 171, s. 6323-7.
  24. JOOSTEN, S. A., OTTENHOFF, T. H. Human CD4 and CD8 regulatory T cells in infectious diseases and vaccination. *Hum Immunol*, 2008, roč. 69, č. 11, s. 760-770.
  25. KOENEN, H. J. P. M., SMEETS R. L., VINK, P. M., VAN RIJSSSEN, E., BOOTS, A.

- M. H., JOOSTEN, I. Human CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>pos</sup> regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood*. 2008, roč. 112, č. 6, s. 2340-2352. ISSN 0006-4971.
26. KOLEK, V. Sarkoidóza - dosud nepoznána (1). *Interní Med.* 2007, roč. 9, č. 6, s. 276-279. ISSN 1803-5256.
27. KOPŘIVA, F., ZÁPALKÁ, M. Lymfocyty Th1 a Th2 v patogenezi onemocnění. *Alergie*, 1999, č. 4, s. 199-203.
28. KREJSEK, J., KOPECKÝ, O. *Klinická imunologie*. 1. vyd. Hradec Králové: Nucleus, 2004. 941s, ISBN 80-86225-50-X.
29. LAUEROVÁ, L., KOCÁK, I. Regulace protinádorové imunity pomocnými CD4<sup>+</sup> Th1/Th2 lymfocyty. *Klinická imunologie*, 2000, roč. 14, č. 5, s. 154-156.
30. LIU, V. C., WONG, L. Y., JANG, T., SHAH, A. H., PARK, I., YANG, X., ZHANG, Q., LONNING, S., TEICHER, B. A., LEE, CH. Tumor evasion of the immune system by converting CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells into CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells: role of tumor-derived TGF- $\beta$ . *J Immunol.* 2007, č. 178, s. 2883-2892.
31. MAI, J., WANG, H., YANG, X. T Helper 17 Cells Interplay with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs in Regulation of Inflammations and Autoimmune Diseases. *Front Biosci*, č. 15, s. 986–1006.
32. MITÁŠOVÁ, E., KREJSEK, J., KACEROVSKÝ, M., ANDRÝS, C. Těhotenství a regulační T-lymfocyty. *Alergie*, 2012, č. 3, s. 196-202.
33. MURAI, M., TUROVSKAVA, O., KIM, G., MADAN, R., KARP, CH. L., CHEROUTRE, H., KRONENBERG, M. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol*, 2009, roč. 10, č. 11, s. 1178-1185.
34. MURPHY, K., TRAVERS, P., WALPORT, M. *Janeway's Immunobiology*. 7. vyd. New York: Garland Science, Taylor & Francis group, LCC, 2008, 887 s. ISBN 0-8153-4123-7.
35. NELMS, K., KEEGAN, A. D., ZAMORANO, J., RYAN, J. J., PAUL, W. E. IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu. Rev. Immunol*, 1999, č. 17, s. 701-738.
36. NUTT, S. L., TARLINTON, D. M. Germinal center B and follicular helper T cells: siblings, cousins or just good friends?. *Nat Immunol*, 2011, roč. 12, č. 6, s. 472-477.
37. OVERWIJK, W. W., SCHULNS K. S. Functions of  $\gamma$ C cytokines in immune homeostasis: Current and potential clinical applications. *Clinical Immunology*, 2009, č. 132, s. 153-165.

38. PAN, H., LENG, R., LI, X., ZHENG, S. G., YE, D. Targeting T-helper 9 cells and interleukin-9 in autoimmune diseases. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2013, č. 24, s. 515–522.
39. PANDIYAN, P., ZHENG, L., ISHIHARA, S., REED, J., LENARDO, M. J. CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*, 2007, roč. 8, č. 12, s. 1353-1362.
40. PAPAIOANNOU, V. E. T-box family reunion. *Trends in Genetics*. 1997, roč. 13, č. 6, s. 212-213.
41. PAVELKA, K., ROVENSKÝ, J. *Klinická revmatologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2003, 952 s., ISBN 80-7262-174-2.
42. ROARK, CH. L., SIMONIAN, P. L., FONTENOT, A. P., BORN, W. K., O BRIEN, R. L.  $\gamma\delta$  T cells: an important source of IL-17. *Current Opinion in Immunology*. 2008, roč. 20, č. 3, s. 353-357. ISSN 09527915.
43. ROLF, J., FAIRFAX, K., TURNER, M. Signaling Pathways in T Follicular Helper Cells. *J Immunol*, 2010, roč. 184, č. 12, s. 6563-6568.
44. ROMAGNANI, S. The Th1/Th2 paradigm. *ImmunolToday*, 1997, roč. 18, č. 6, s. 263-266.
45. SAKAGUCHI, S., SAKAGUCHI, N., ASANO, M., ITOH, M., TODA, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a 114 single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 1995, č. 155, s. 1151–1164.
46. SCHUBERT, L. A., JEFFERY, E., ZHANG, Y., RAMSDELL, F., ZIEGLER, S.F. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem*, 2001, č. 276, s. 37672-9.
47. STITES, D. P., TERR, A. I. *Základní a klinická imunologie*. Praha: Victoria Publishing, 1994, 744 s., ISBN 8085605376.
48. TATO, C. M., LAURENCE, A., O`SHEA, J. J. Helper T cell differentiation enters a new era: Le Roi est mort; vive le Roi!. *The Journal of experimental medicine*, 2006, č. 4, s. 809-812.
49. The T helper 17 subset in pulmonary diseases. [on line] Rotterdam: Erasmus MC, 2014, 1 s. [cit. 2014-4-4]. Dostupné na: <http://www.erasmusmc.nl/content/3025942/3030149/thelper17subsetinpulmdiseases?lang=en>.



50. TONG, Z. H., SHI, H. Z. Subpopulations of helper T lymphocytes in tuberculous pleurisy. *Tuberculosis*, 2013, č. 93, s. 279-284.
51. TRUNDLEY, A., MOFFETT, A. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens*, 2004, č. 63, s. 1-12.
52. VERNEROVÁ, E. Specifická alergenová imunoterapie a autoimunitní onemocnění. *Alergie*, 2004, č. 1, s. 73-76.
53. VESELÁ, I., STRÍŽ, I. T regulační buňky a jejich úloha v imunitních reakcích. *Alergie*, 2004, č. 1, s. 43-52.
54. VICHEREK, P. Sarkoidóza. *Revmatologie*, 2010, roč. 50, č. 1, s. 3-16. ISSN 1214-5076.
55. VIEIRA, P. L., CHRISTENSEN, J. R., MINAEE, S., O'NEILL, E. J., BARRAT, F. J., BOONSTRA, A., BARTHLOTT, T., STOCKINGER, B., WRAITH, D. C., O'GARRA, A. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol*, 2004, č. 172, s. 5986-5993.
56. VIGNALI, D. A. A., COLLISON, L. W., WORKMAN, C. J. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*, 2008, roč. 8, č. 7, s. 523-532.
57. VRÁNA, A., FELLNEROVÁ, I., VRÁNOVÁ J.. *Imunologie a imunomodulační terapie*. 1.vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011, 72s., ISBN 978-80-244-2748-5.
58. WANG, R. F. CD8<sup>+</sup> regulatory T cells, their suppressive mechanisms, and regulation in cancer. *Hum Immunol*, 2008, roč. 69, č. 11, s. 811-814.
59. WEINER, H. L. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-β-secreting regulatory cells. *Microbes Infect*, 2001, č. 3, s. 947-954.
60. WITOWSKI, J., KSIAZEK, K., JARRES, A. Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 2004, roč. 61, č. 5, s. 567-579.
61. XIONG, N., RAULET, D. H. Development and selection of γδ T cells. *Immunological Reviews*. 2007, č. 215, s. 15-20.