

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

Srovnání funkce $\gamma\delta$ T lymfocytů u různých živočišných druhů

Bakalářská práce

Autorka:	Luisa Hrabcová
Studijní program:	B 1501 Biologie
Studijní obor:	Systematická biologie a ekologie
Vedoucí práce:	RNDr. Marek Šinkora, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala (pod vedením RNDr. Marka Šinkory, Ph.D.) samostatně a uvedla jsem všechny použité prameny a literaturu.

V Hradci Králové dne 24. dubna 2015

Luisa Hrabcová

Poděkování

Děkuji RNDr. Marku Šinkorovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a podporu při psaní této práce. Poděkování patří i kolektivu jeho laboratoře, zejména Lucii Poulové, Šárce Pfeiferové a Blance Dušánkové, za cenné rady a čas, který mi věnovaly, a dalším pracovníkům Mikrobiologického ústavu Akademie věd České Republiky laboratoře Gnotobiologie v Novém Hrádku. Velký dík za všestrannou podporu patří také mé rodině, přátelům a pedagogům Přírodovědecké fakulty Univerzity Hradec Králové. V neposlední řadě musí být zmíněna i finanční podpora, díky které mohla být tato bakalářská práce vytvořena na pracovišti Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky. Jedná se zejména o grantové projekty P502/12/0110 a 15-02274S Grantové agentury České republiky.

Anotace

HRABCOVÁ, L. *Srovnání funkce $\gamma\delta$ T lymfocytů u různých živočišných druhů*. Hradec Králové, 2015. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce Marek Šinkora. 31 s.

U všech čelistnatců, kteří byli dosud studováni, byly nalezeny pouze tři typy lymfocytů: B, $\alpha\beta$ -T a $\gamma\delta$ -T. Ačkoliv mechanismus přeskupování genů je stejný u všech tří typů lymfocytárních receptorů, jejich funkce, vývoj a specifčnost jsou různé. Na rozdíl od relativně dobře známých typů lymfocytů jsou $\gamma\delta$ T buňky, které reprezentují záhadnou skupinu s nejasnou funkcí. Tyto buňky mají velmi široké spektrum rozpoznávaných antigenů bez společného jmenovatele a také neobyčejně heterogenní zastoupení v lymfatických tkáních u různých zvířecích druhů. Fyziologické funkce $\gamma\delta$ T buněk jsou nedostatečně vysvětleny, ačkoliv tyto buňky byly podle všech dostupných informací zachovány po celé období evoluce čelistnatců, které trvalo přibližně 450 miliónů let. Cílem této bakalářské práce je vytřídit známé informace o vývoji a funkci $\gamma\delta$ T buněk u různých zvířecích druhů. V tomto ohledu je významná existence dvou skupin živočichů. Na jedné straně jsou $\gamma\delta$ -low druhy jako jsou lidé nebo hlodavci, zatímco na druhé straně jsou $\gamma\delta$ -high druhy zastoupené prasaty, přežvýkavci a ptáky u nichž mohou $\gamma\delta$ T buňky představovat i více než 70% všech T buněk v cirkulaci. Bakalářská práce bude také diskutovat nejnovější nález laboratoře, který odhalil jedinečnou populaci $\gamma\delta$ T buněk u $\gamma\delta$ -high druhů, která však chybí u $\gamma\delta$ -low druhů.

Klíčová slova: $\gamma\delta$ T lymfocyt, $\gamma\delta$ T buňka, $\gamma\delta$ -low druh, $\gamma\delta$ -high druh.

Annotation

HRABCOVÁ, L. *The comparison of $\gamma\delta$ T lymphocyte functions in different species*. Hradec Králové, 2015. Bachelor Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor Marek Šinkora. 31 p.

Three types of lymphocyte lineages have been identified in all higher vertebrates studied so far, consisting of B, $\alpha\beta$ -T and $\gamma\delta$ T lymphocytes. Although mechanism of gene rearrangement is similar for all type of lymphocyte receptors, their functions, receptor specificity and development is distinct for each lineage. Apart of relatively well understood lineages are $\gamma\delta$ T cells as an enigmatic group of cells with still unclear functions. These cells have very broad spectrum of recognized antigen with no uniform specificities and extremely different representation in lymphoid tissues in various species with often unique anatomical distribution. Physiological functions of $\gamma\delta$ T cells are not sufficiently explained although these cells have been conserved seemingly since the emergence of jawed vertebrates more than 450 million years ago. The aim of this bachelor thesis is to sort out information about $\gamma\delta$ T lymphocyte development and function in the different species. In this respect, it is significant that there are two groups of animals: $\gamma\delta$ -low species represented by humans or rodents and $\gamma\delta$ -high species that include swine, ruminants and chickens, in which $\gamma\delta$ T cells may account for >70% of peripheral T cells. Bachelor thesis will also discuss our recent finding that $\gamma\delta$ -low and $\gamma\delta$ -high species may differ in the presence of specific $\gamma\delta$ T cells population.

Keywords: $\gamma\delta$ T lymphocytes, $\gamma\delta$ T cell, $\gamma\delta$ -low species, $\gamma\delta$ -high species.

Obsah

Úvod	1
1 Charakteristiky $\gamma\delta$ T lymfocytů.....	2
1.1 Obecná charakteristika.....	2
1.2 Tkáňová distribuce	3
1.3 Povrchové znaky	3
1.3.1 TCR $\gamma\delta$	4
1.3.2 Pomocné molekuly $\gamma\delta$ T lymfocytů.....	6
1.4 Vývoj $\gamma\delta$ T lymfocytů.....	7
1.4.1 Stavba brzlíku.....	7
1.4.2 Začátek diferenciacie	8
1.4.3 Pozitivní a negativní selekce.....	8
1.5 Funkce $\gamma\delta$ T lymfocytů.....	9
1.5.1 $\gamma\delta$ T-lymfocyty a schopnost prezentovat antigen	10
1.5.2 $\gamma\delta$ T buňky v mikrobiálních infekcích.....	11
1.6 Rozdělení živočichů – $\gamma\delta$ -high a $\gamma\delta$ -low skupiny.....	12
2 $\gamma\delta$ -low druhy živočichů.....	14
2.1 $\gamma\delta$ T lymfocyty u myší	14
2.1.1 Vývoj $\gamma\delta$ T-lymfocytů u myší	14
2.1.2 Tkáňová distribuce $\gamma\delta$ T lymfocytů u myší.....	15
2.1.3 Funkce $\gamma\delta$ T-lymfocytů u myší.....	15
2.2 $\gamma\delta$ T lymfocyty u lidí	17
2.2.1 Vývoj $\gamma\delta$ T-lymfocytů u lidí	17
2.2.2 Tkáňová distribuce $\gamma\delta$ T-lymfocytů u lidí.....	17
2.2.3 Funkce $\gamma\delta$ T lymfocytů u lidí.....	18
3 $\gamma\delta$ -high druhy.....	21
3.1 $\gamma\delta$ T lymfocyty u prasat.....	21
3.1.1 Vývoj $\gamma\delta$ T lymfocytů u prasat.....	21
3.1.2 Tkáňová distribuce $\gamma\delta$ T lymfocytů u prasat.....	22
3.1.3 Funkce $\gamma\delta$ T lymfocytů u prasat	22
3.2 $\gamma\delta$ T lymfocyty u přežvýkavců	23
3.2.1 Vývoj $\gamma\delta$ T lymfocytů u přežvýkavců.....	23
3.2.2 Tkáňová distribuce $\gamma\delta$ T lymfocytů u přežvýkavců.....	24

3.2.3	Funkce $\gamma\delta$ T lymfocytů u přežvýkavců	24
3.3	$\gamma\delta$ T lymfocyty u ptáků	25
3.3.1	Vývoj $\gamma\delta$ T lymfocytů u ptáků.....	26
3.3.2	Tkáňová distribuce $\gamma\delta$ T lymfocytů u ptáků	26
3.3.3	Funkce $\gamma\delta$ T lymfocytů u ptáků.....	27
3.4	$\gamma\delta$ T buňky u dalších obratlovců.....	27
	Závěr.....	30
	Seznam použité literatury a dalších zdrojů.....	31

Seznam zkratek

ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (z angl. <i>Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity</i>)
APC	antigen-prezentující buňka (z angl. <i>Antigen-presenting Cell</i>)
BCR	B buněčný receptor (z angl. <i>B Cell Receptor</i>)
CCR	chemokinový C receptor (z angl. <i>Chemokine C Receptor</i>)
CD	diferenciační skupina (z angl. <i>Cluster of Differentiation</i>)
CDR	variabilní doména (z angl. <i>Complementarity Determining Region</i>)
DAMP	z angl. <i>Danger-associated Molecular Pattern</i>
DETC	dendritická epidermální T buňka (z angl. <i>Dendritic Epidermal T Cell</i>)
IEL	intraepiteliální lymfocyt (z angl. <i>Intraepithelial Lymphocyte</i>)
IFN- γ	interferon γ
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
IPP	isoprenyl pyrofosfát
KIR	z angl. <i>Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor</i>
LPS	lipopolysacharid
LRR	z angl. <i>Leucine-rich Repeat</i>
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (z angl. <i>major histocompatibility complex</i>)
NK	přirozený zabíječ (z angl. <i>Natural Killer</i>)
PAMP	z angl. <i>Pathogen-associated Molecular Pattern</i>
RAG	rekombinaci aktivující gen (z angl. <i>Recombination-activating Gene</i>)
SWC	z angl. <i>Swine Workshop Cluster</i>
TCR	T buněčný receptor (z angl. <i>T Cell Receptor</i>)
TdT	<i>Terminal deoxynucleotidyl Transferase</i>
Th	pomocná T buňky (z angl. <i>T-helper</i>)
TLR	z angl. <i>Toll-like Receptor</i>
TNF	tumor nekrotizující faktor (z angl. <i>Tumor Necrosis Factor</i>)
VLR	<i>Variable Lymphocyte Receptor</i>
WC	z angl. <i>Workshop Cluster</i>

Úvod

Doposud nepřilíš probádanou součást imunitních systémů obratlovců, počínaje prvními čelistnatci, tvoří $\gamma\delta$ T lymfocyty. Tyto buňky mají specifický receptor adaptivní imunity, ale disponují i mnoha funkcemi imunity vrozené. Stojí tedy na pomezí obou složek obranyschopnosti. V posledním desetiletí je výzkumu $\gamma\delta$ T lymfocytů věnována velká pozornost. Množství informací o $\gamma\delta$ T lymfocytech, které ještě v minulém století byly považovány za enigmatickou skupinu lymfocytů, neustále narůstá. Jedním z důvodů, proč byly $\gamma\delta$ T lymfocyty donedávna vnímané jako záhadná skupina lymfocytů, je skutečnost, že v nejlépe prostudovaných imunitních systémech – lidském a myším - se $\gamma\delta$ T lymfocyty vyskytují minimálně. Dalším důvodem je jejich nejednotná funkce. O jejich důležité úloze v imunitním systému však vypovídá skutečnost, že tato skupina buněk je u určitých zvířecích druhů nejpočetnějším typem lymfocytů, které byly zachovány ve fylogenezi u všech čelistnatců od jejich vzniku před více než 450 milióny let.

V této bakalářské práci shrnuji dosavadní dostupné informace o funkcích a odlišnostech ve vývoji $\gamma\delta$ T buněk u různých živočišných druhů. Jednotlivé kapitoly jsou věnovány obecné charakteristice $\gamma\delta$ T lymfocytů, $\gamma\delta$ -high a $\gamma\delta$ -low skupinám živočichů. Podkapitoly pojednávající o $\gamma\delta$ T lymfocytech myší, lidí, přežvýkavců i ptáků jsou dále členěné do odstavců zaměřených na zvláštnosti vývoje, tkáňové distribuce a rozmanité funkce těchto buněk. Závěr shrnuje poznatky o tématu vyplývající z dostupné literatury.

1 Charakteristiky $\gamma\delta$ T lymfocytů

1.1 Obecná charakteristika

Buňky účastnící se imunitních reakcí rozdělujeme na dvě základní skupiny podle toho, kterou složku imunity zajišťují: vrozenou nebo získanou (adaptivní). Vrozená imunita je založena na rozpoznání v přírodě již přítomných a známých motivů. Tato funkce je přičítána zejména fagocytujícím buňkám a tzv. přirozeným zabíječům. Svou úlohu zde plní také humorální složka imunitního systému (Panczak a kol., 2013). Adaptivní imunita je založená na rozpoznávání všech molekul, které nejsou tělu vlastní (Janeway a kol., 2001). Zajišťují ji výhradně specifické buňky, které nazýváme souhrnně lymfocyty. Lymfocyty se vyskytují u všech čelistnatců a dělí se podle funkce, místa vývoje a typu specifického receptoru, který nesou na svém povrchu, na B a T lymfocyty. Podle typu T buněčného receptoru (TCR, z angl. *T Cell Receptor*) se T lymfocyty dále rozdělují na $\alpha\beta$ a $\gamma\delta$ (Hořejší a kol., 2013). Společná pro všechny lymfocyty je tvorba specifického receptoru, který vzniká principiálně stejným způsobem. Stejný je i princip rozpoznávání antigenu, který se váže na silně variabilní oblasti, tzv. vazebné místo (Janeway a kol., 2001).

Ačkoliv je princip tvorby specifického receptoru pro všechny lymfocyty stejný, funkce a struktura jednotlivých typů lymfocytů je zcela odlišná (Kimball, 2001). B lymfocyty nesou na povrchu B buněčný receptor (BCR, z angl. *B Cell Receptor*), který rozpoznává antigeny přímo. Tento BCR může být vylučován z B buněk do organismu jako imunoglobulin neboli protilátka. BCR se skládá ze dvou identických těžkých a dvou identických lehkých řetězců. Každá molekula imunoglobulinu proto vlastní minimálně dvě vazebná místa pro antigen (Hořejší a kol., 2013). Pojmenování těžké a lehké řetězce vychází ze skutečnosti, že se oba řetězce značně liší molekulovou hmotností. Molekuly imunoglobulinů se navíc mohou svazovat do vyšších molekulárních celků, jako jsou dimery či pentamery a z tohoto důvodu se počet vazebných míst může násobit (Janeway a kol., 2001). T lymfocyty typu $\alpha\beta$ nesou na svém povrchu $TCR\alpha\beta$, který rozpoznává pouze fragmenty antigenů prezentovaných na molekulách histokompatibilního

komplexu (MHC, z angl. *Major Histocompatibility Complex*). Na rozdíl od BCR není TCR $\alpha\beta$ vylučován do prostředí a nevytváří násobné molekulární celky. TCR $\alpha\beta$ se skládá pouze ze dvou rozdílných řetězců typu α a β , které mají přibližně stejnou molekulovou hmotnost. Z tohoto důvodu má TCR $\alpha\beta$ pouze jedno vazebné místo (Hořejší a kol., 2013). T lymfocyty typu $\gamma\delta$ nesou na svém povrchu TCR $\gamma\delta$, který je svými vlastnostmi kombinací obou předchozích receptorů. TCR $\gamma\delta$ je strukturálně velmi podobný TCR $\alpha\beta$ (pouze dva rozdílné řetězce typu γ a δ mající přibližně stejnou molekulovou hmotnost) a také není vylučován do prostředí. Na druhou stranu však TCR $\gamma\delta$ rozpoznává antigeny přímo, i když pouze jedním vazebným místem (Janeway a kol., 2001).

1.2 Tkáňová distribuce

Nejvíce $\gamma\delta$ T lymfocytů nalezneme v brzlíku, kde se vyvíjejí. Další tkáňová distribuce $\gamma\delta$ T buněk se však značně liší. U nejvíce studovaných druhů (lidé a myši) se $\gamma\delta$ T lymfocyty hojně vyskytují na místech vstupu do těla – ve sliznicích a kůži (Zheng a kol., 2013). U těchto živočichů je výskyt $\gamma\delta$ T lymfocytů v krvi a lymfatických orgánech nízký. Protipólem jsou určité zvířecí druhy, u kterých se $\gamma\delta$ T lymfocytů v krvi a lymfatických orgánech vyskytují ve vysoké míře (Garfias, 2011). Důvod rozdílů v mezidruhové tkáňové distribuci je neznámý. Více o této problematice bude rozvedeno dále v textu.

V závislosti na exprimovaném TCR je možné $\gamma\delta$ T lymfocyty rozdělit na dvě skupiny. Jednu představují rezidentní $\gamma\delta$ T lymfocyty. Tyto $\gamma\delta$ T buňky mají omezenou rozmanitost TCR $\gamma\delta$ a vyskytují se v epitelech a sliznicích. Druhou skupinou jsou cirkulující lymfocyty, jejichž TCR $\gamma\delta$ je vysoce variabilní. Ty se nacházejí v krvi a lymfatických tkáních (Chen, 2002).

1.3 Povrchové znaky

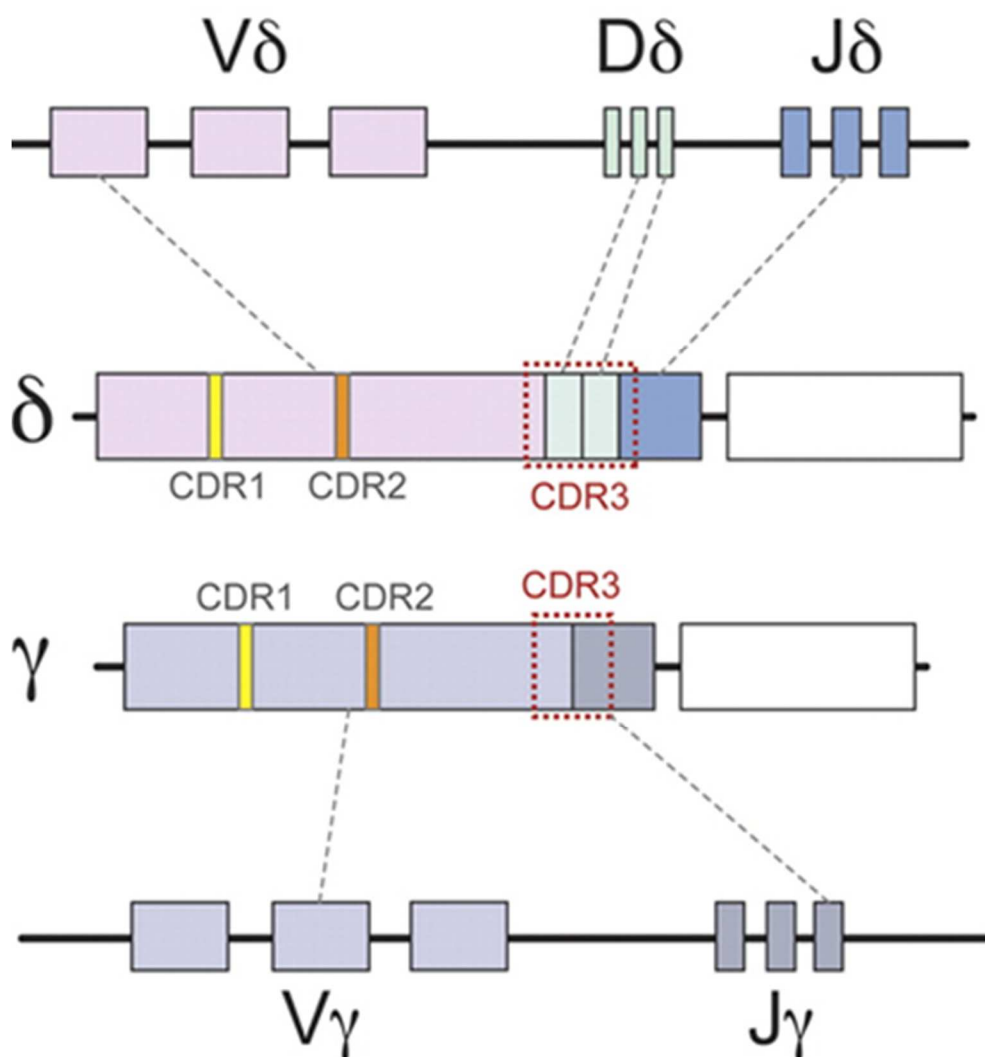
Na povrchu $\gamma\delta$ T lymfocytů najdeme specifický T buněčný receptor (TCR $\gamma\delta$) a také mnoho dalších pomocných molekul nutných pro výkonnostní funkce. Většina pomocných molekul je klasifikována do tzv. „*Cluster of Differentiation*“ a označována zkráceně CD (Janeway a kol., 2001).

1.3.1 TCR $\gamma\delta$

TCR $\gamma\delta$ je glykoproteinový dimer, který se strukturálně zařazuje do imunoglobulinové rodiny proteinů. Na povrchu buněk je exprimován ve spojení se shlukem proteinů označovaných jako CD3 (Ciccarese a kol., 1997). Pomocný CD3 komplex se skládá z řetězců pěti molekul (γ , δ , ϵ , ζ a η), které tvoří heterodimery a pomáhají ukotvit TCR $\gamma\delta$ do plazmatické membrány. Další funkcí CD3 komplexu je přenos aktivačních signálů dovnitř lymfocytů v závislosti na interakcích mezi TCR $\gamma\delta$ řetězcem a jejich ligandy (Ciccarese a kol., 1997).

Vlastní TCR $\gamma\delta$ se vytváří během vývoje principiálně stejným mechanismem jako je tomu u jiných specifických receptorů lymfocytů (Panczak a kol., 2013). Řetězec TCR δ je adekvátní řetězcem TCR β nebo těžkému řetězci protilátek a tvoří se přeskupením variabilních (V δ , z angl. *Variable*), různorodých (D δ , z angl. *diversity*) a spojovacích (J δ , z angl. *Junctional*) genomových segmentů ke konstantní oblasti (C, z angl. *Constant*). Tento proces genové rekombinace nazýváme VDJ přeskupením (Janeway a kol., 2001). Řetězec TCR γ je naopak adekvátní řetězci TCR α nebo lehkému řetězci protilátek a tvoří se pouze VJ přeskupením, tedy spojením V γ a J γ genomových segmentů k C γ oblasti (Hodges a kol., 2002). Výsledkem přeskupení a následného přepisu a překladu obou typů řetězců jsou proteiny obsahující variabilní a konstantní domény o délce asi 110 aminokyselinových zbytků (Abbas a Lichtman, 2011). V genech pro variabilní oblast jsou lokalizovány tři hypervariabilní úseky CDR1, CDR2, CDR3 (z angl. *Complementary-determining Regions*) zodpovědné za vytvoření vazebného místa pro antigen (Toman a kol., 2009). Zatímco CDR1 a CDR2 úseky jsou kódovány V geny, CDR3 úsek je kódován rozhraním V(D)J genů (obr. č. 1). Organizace lokusů TCR γ a TCR δ se podobá organizaci TCR α a TCR β , ačkoli se zde vyskytuje důležitý rozdíl. Skupina genomových segmentů kódující TCR δ řetězec se totiž nachází přímo v lokusu TCR α , mezi genovými segmenty V α a J α (Janeway a kol., 2001). Když se tedy genové segmenty TCR V α a J α přeskupují při vzniku $\alpha\beta$ T lymfocytů, TCR δ geny jsou nenávratně vystřiženy z genomové DNA. Tímto mechanismem je zajištěno, že $\alpha\beta$ T lymfocyty nemohou revertovat do $\gamma\delta$ T lymfocytů (Hayday a Gibbons, 2001).

Variabilita TCR $\gamma\delta$ je oproti dalším lymfocytárním receptorům omezená (Stuart a kol., 2009). V lokusech TCR γ a TCR δ se totiž vyskytuje podstatně méně V genových segmentů než u TCR $\alpha\beta$ nebo protilátek. Toto omezení je však kompenzováno soustředěním téměř veškeré variability TCR $\gamma\delta$ do spojovací oblasti CDR3 (Janeway a kol., 2001). Další zajímavostí je skutečnost, že V regiony TCR $\gamma\delta$ se podobají spíše V oblastem protilátek než V genovým segmentům TCR $\alpha\beta$ (Janeway a kol., 2001). Tyto nálezy zřejmě vysvětlují přímé rozpoznávání antigenů pomocí TCR $\gamma\delta$ a protilátek, zatímco TCR $\alpha\beta$ rozpoznávají pouze krátké peptidy vázané na MHC molekuly.



Obr. č. 1: Zjednodušené schéma VDJ přeskupení pro řetězec TCR δ (horní část) a VJ přeskupení pro řetězec TCR γ (dolní část), ve kterém jsou jednotlivé genové segmenty V(D)J rekombinovány do funkčních genů (Kazen a Adams, 2011, upraveno).

1.3.2 Pomocné molekuly $\gamma\delta$ T lymfocytů

Kromě TCR exprimují $\gamma\delta$ T lymfocyty další molekuly, které jim umožňují vykonávat specifické funkce. Podobně jako $\alpha\beta$ T lymfocyty mohou i $\gamma\delta$ T buňky exprimovat povrchové molekuly transmembránových glykoproteinů CD4 a CD8, které slouží u $\alpha\beta$ T lymfocytů k vazbě na MHC I a MHC II. $\gamma\delta$ T lymfocyty je však často postrádají a jsou schopné rozpoznávat antigeny přímo (Plattner a Hostetter, 2011), lze se tak domnívat, že CD4 ani CD8 neplní kostimulační funkce. Některé nálezy spojují expresi CD4 s produkcí cytokinů (Qi a kol., 2009). Glykoproteinový heterodimer CD8 se obvykle vyskytuje na cytolytických $\alpha\beta$ T lymfocytech ve formě CD8 $\alpha\beta$. U $\gamma\delta$ T lymfocytů se však vyskytuje převážně CD8 $\alpha(\alpha)$ forma, která je exprimována i na jiných buněčných typech jako důsledek aktivace. Heterodimer CD8 $\alpha\beta$ byl nalezen například v populacích ptačích (Pieper a kol., 2008), prasečích (Šinkora a kol., 2007) či myších (Sato a kol., 1993) $\gamma\delta$ T buněk.

Dalšími běžnými molekulami na povrchu $\gamma\delta$ T lymfocytů jsou CD2, které definují většinu T lymfocytů (Dvořáková, 2009). Molekuly CD2 mají mimo kostimulační funkce i funkci adhezní a váží se na jiné adhezní molekuly na dalších buněčných typech, jako je CD58 na lidských leukocytech a endoteliálních buňkách nebo CD48 na leukocytech (Hořejší a kol., 2013) u myší (Kato a kol., 1992). Důležité je zjištění, že určité populace $\gamma\delta$ T lymfocytů postrádají CD2, a proto ji nepotřebují ke své funkci.

Na povrchu $\gamma\delta$ T lymfocytů mohou být nalezeny molekuly CD16, které mají klíčové funkce u přirozených zabíječů, neboli NK (z angl. *Natural Killer*) buněk, Fc γ receptory, nebo *toll-like* receptory (TLR), které lze převážně najít u makrofágů a dendritických buněk (Dvořáková, 2009). Další molekuly, vyskytující se na $\gamma\delta$ T lymfocytech, mohou souviset s jejich specializovanými úlohami. V případě lidských V δ 2 buněk se například vyskytuje paměťový znak CD45R0 (Dvořáková, 2009). Mezi pomocné molekuly V γ 9 δ 2 buněk patří KIR (z angl. *Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor*) molekuly, které se společně s CD94 účastní aktivace T lymfocytů a kontrolují reaktivitu $\gamma\delta$ T buněk. Chemokinové receptory CCR1 a CCR5 (z angl. *Chemokine C Receptor*) představují receptory pro cytokiny (Dvořáková, 2009). Výčet všech pomocných molekul

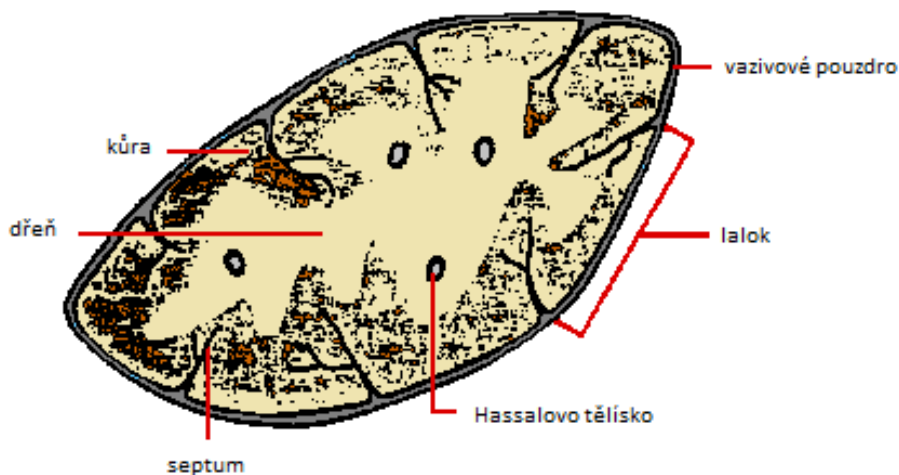
vyskytujících se na $\gamma\delta$ T lymfocytech přesahuje rozsah této bakalářské práce. Výše uvedený výčet slouží především k demonstraci rozmanitosti pomocných molekul, které mohou být na $\gamma\delta$ T lymfocytech exprimovány.

1.4 Vývoj $\gamma\delta$ T lymfocytů

U všech známých druhů se $\gamma\delta$ T lymfocyty vyvíjejí v brzlíku a jsou nejdříve detekovatelnou podskupinou T buněk (Šinkora a kol., 2005). Poté, co se vyvinou, osídlují periferii.

1.4.1 Stavba brzlíku

Brzlík (*thymus*) je plochý primární lymfatický orgán uložený za horní částí hrudní kosti (*sternum*) (Toman a kol., 2009). Je pokryt tenkým vazivovým pouzdrém, které tvoří septa rozdělující thymus do menších lalůčků (*lobulů*). Každý lalůček se skládá z kůry (*kortex*) a dřene (*medula*), jejichž strukturu tvoří síť epitelových buněk vyplněná thymocyty (obr. č. 2; Földi M. a Földi E., 2014).



Obr. č. 2: Obrázek stručně zachycuje stavbu brzlíku (Cann, 2007, upraveno).

V kůře probíhá časný vývoj T buněk. Některé epitelové buňky zde thymocyty zcela obklopují a nazývají se „pečovatelské buňky“ (Ritter a kol., 1981). Vývoj T lymfocytů se dokončuje v dřeni. V dřeni lze nalézt i Hassalova tělíška složená z jedné nebo více centrálních granulárních buněk obklopených zhuštěnými epitelovými buňkami. Funkce Hassalových tělísek není zcela objasněna (Toman

a kol., 2009), mohou však ovlivňovat na zrání $\gamma\delta$ T lymfocytů (Mackay a kol., 1989). Mají původ v thymických epiteliálních buňkách (Hassan a Rasool, 2014). Další buňky dřeně jsou dendritické buňky a lymfocyty (Földi M. a Földi E., 2014). Během dospívání organismu dochází k tzv. věkové involuci brzlíku, kdy je tkáň thymu postupně nahrazována tkání tukovou (Földi M. a Földi E., 2014).

1.4.2 Začátek diference

Všechny T lymfocyty vznikají ze společných prekurzorů. Ty pocházejí z kostní dřeně plodu, popřípadě u druhů s dlouhou gestací z embryonálních lymfopoetických orgánů, odkud migrují do korového epitelu embryonálního brzlíku (Butler a kol., 2006). V kůře brzlíku se prekurzory množí a dávají vznik progenitorům T-buněk (pro-T buňky), které na svém povrchu nenesou ani TCR, ani kostimulační molekuly CD4 či CD8. Tyto TCR⁻CD4⁻CD8⁻ prekurzory jsou označovány jako "trojitě negativní" stádium a v prvním kroku u nich dochází k přeskupení genů pro TCR. S přeskupováním genů souvisí i výskyt faktorů nutných pro zahájení přeskupování jako je enzym deoxynukleotidyltransferáza (TdT) a produkty genů RAG1 a RAG2 (rekombinaci aktivující geny) (Toman a kol., 2009).

Skutečnost, zda z progenitorové buňky nakonec vznikne $\alpha\beta$ či $\gamma\delta$ T lymfocyt, je dána mnoha faktory včetně různé intenzity signalizujících molekul (Turchinovich a Pennington, 2011).

1.4.3 Pozitivní a negativní selekce

Zatímco zahájení přeskupování genů pro TCR je společné pro $\alpha\beta$ i $\gamma\delta$ T lymfocyty, další vývoj obou linií se značně liší (Efenberk, 2010). V případě, že se pro-T buňky vyvíjí do $\alpha\beta$ T lymfocytů, následuje po úspěšném přeskupení TCR β řetězce přepis genů pro molekuly CD4 a CD8 a vzniká "dvojitě pozitivní" stádium vývoje (Janeway, a kol., 2001). V tomto TCR⁻CD4⁺CD8⁺ stádiu se přeskupují TCR α geny a buňka prochází pozitivní selekcí, která umožní další vývoj jen těm buňkám rozpoznávajícím MHC proteiny (Hořejší a kol., 2013). Úspěšné buňky se rozdělí podle toho, zda lépe rozpoznávají MHC I nebo MHC II

na ty, které nakonec budou CD8⁺ nebo CD4⁺ a exprese druhé z kostimulačních molekul je zrušena. Tímto způsobem vzniknou "jednoduše pozitivní" CD4⁺ nebo CD8⁺ αβ T lymfocyty (Dvořáková, 2009), které se přesunou do dřeně brzlíku, v níž probíhá negativní selekce (Toman a kol., 2000). Negativní selekce eliminuje ty buňky, které rozpoznávají příliš silně vlastní molekuly MHC nebo vlastní antigen v komplexu s MHC. Obě selekce úspěšně projde, a tedy přežije jen cca 1% αβ T buněk, které jsou exportovány mimo brzlík (Dvořáková, 2009).

Pokud se progenitor vyvíjí do γδ T lymfocytu, následuje po úspěšném přeskupení TCRγ a TCRδ řetězců jejich spárování se schopností vázat antigen. Tento krok je ve své podstatě pozitivní selekcí γδ T lymfocytů (Toman a kol., 2000), přičemž nedochází k přechodné expresi molekul CD4 a CD8 (Dvořáková, 2009). Takto vzniklý γδ T lymfocyt se přesouvá do dřeně brzlíku a následně je exportován do krevního řečiště. Případná negativní selekce probíhá v thymu a pravděpodobně také v periférii (Lin a kol., 1999), podobně jako je tomu u B lymfocytů. Je zřejmé, že vývoj γδ T lymfocytů v brzlíku trvá kratší dobu, než je tomu u αβ T lymfocytů (Haas a kol., 2012), což by mohlo také vysvětlovat, proč jsou γδ T lymfocyty nejdříve detekovatelnou podskupinou T buněk v ontogenezi (Born a kol., 2010).

1.5 Funkce γδ T lymfocytů

Z historického hlediska jsou γδ T lymfocyty popisovány jako „neklasické“ (Guzman a kol., 2014) nebo také „nekonvenční“ (Kaufmann, 1996), protože mohou vázat antigen a být aktivovány nezávisle na komplexech MHC/peptid (Guzman a kol., 2014). Antigenem pro γδ T lymfocyty mohou být specifické proteinové, ale i nepeptidové ligandy (Kaufmann, 1996), mikroorganismy i poškozené buňky (Toman a kol., 2009). Kromě vlastní vazby antigenů s TCRγδ mohou γδ T lymfocyty poskytovat regulační, pomocné (Kaufmann, 1996) a antigen-přezentační funkce (Brandes a kol., 2005).

Jednou z důležitých vlastností γδ T lymfocytů je exprese širokého spektra TLR (Zheng a kol., 2013), které rozpoznávají „signály nebezpečí“ PAMP (z angl. *Pathogen-associated Molecular Pattern*). Jedná se zejména o lipopolysacharidy (LPS) gramnegativních bakterií, lipoproteiny a prokaryotické či virové nukleové

kyseliny (Hořejší a kol., 2013). K aktivaci $\gamma\delta$ T lymfocytů může dojít také navázáním endogenních ligandů TLR. Těmi jsou proteiny teplotního šoku (Boere a kol., 2011) nebo DAMP (z angl. *Damage-associated Molecular Pattern*), zastoupené molekulami, které exprimují vlastní aktivované nebo poškozené buňky vystavené buněčnému stresu (Foell a kol., 2007). Se stresovými molekulami reagují převážně $CD8^+$ $\gamma\delta$ T buňky (Guzman a kol., 2012). Kromě těchto funkcí tvoří $\gamma\delta$ T lymfocyty významnou složku v místech styku organismu s vnějším prostředím. Proto se většinou vyskytují v epiteliálních tkáních, což svědčí o jejich významné roli v regulačních aktivitách a rychlé mobilizaci v odpovědi na infekci (Kaufmann, 1996). Jako příklad lze uvést regulaci vyzrávání střevního epitelu (Toman a kol., 2009).

Úloha $\gamma\delta$ T lymfocytů coby pomocných buněk spočívá v kompenzaci funkcí $\alpha\beta$ T lymfocytů. Mnohdy jsou schopné také regulovat mnohem větší populace $\alpha\beta$ T buněk, než je jejich vlastní populace (Kaufmann, 1996). Stimulované $\gamma\delta$ T buňky mohou také vykazovat cytolytické aktivity, ve kterých většinou produkují Th1 (z angl. *T helper*) cytokiny (Kaufmann, 1996), tj. interleukin 2 (IL-2), a interferon γ (IFN- γ) (Hořejší a kol., 2013).

1.5.1 $\gamma\delta$ T-lymfocyty a schopnost prezentovat antigen

Profesionální antigen-prezentující buňky (APC, z angl. *Antigen-presenting Cell*) disponují schopnostmi příjmu antigenů pomocí fagocytózy a následného prezentování zpracovaných antigenů v kontextu s MHC II molekulami. Pokud je antigen rozpoznán, vede tato aktivita k indukci imunitní odpovědi antigen-specifických $\alpha\beta$ T buněk a případné aktivaci B lymfocytů. Prototypem profesionálních antigen-prezentujících buněk jsou dendritické buňky, které přijímají antigeny v místech infekce, zranění nebo rakoviny. V takovém případě dendritické buňky vyzrávají, zvyšují expresi kostimulačních molekul a migrují do přilehlých lymfatických uzlin (Himoudi a kol., 2012).

Schopnost APC však nemají pouze dendritické buňky. Prezentace antigenu podobným způsobem byla popsána i u $\gamma\delta$ T lymfocytů a to poprvé u turů (Collins a kol., 1998). V tomto konkrétním případě začaly $WC1^+$ $\gamma\delta$ T lymfocyty po přijetí antigenu exprimovat povrchové proteiny charakteristické pro APC a indukovaly

proliferaci CD4⁺ αβ T buněk (Guzman a kol., 2012). U myši byly nalezeny γδ T lymfocyty, které jsou krátce po aktivaci schopné exprimovat MHC II a prezentovat antigen αβ T buňkám (Cheng a kol., 2008). Dalším příkladem je pozorovaná prezentace antigenu αβ T lymfocytům populací lidských Vγ2Vδ2⁺ buněk (Brandes a kol., 2005). U prasat byla schopnost γδ T lymfocytů prezentovat antigen a stimulovat paměťové pomocné αβ T lymfocyty přímo dokázána po modelové imunizaci ovalbuminem (Takamatsu a kol., 2002).

1.5.2 γδ T buňky v mikrobiálních infekcích

Důkazů pro důležitou roli γδ T buněk v antimikrobiální imunitě přibývá. Jsou významné při udržování integrity a stability vnitřního prostředí hostitele. Během infekce se rychle shromáždí okolo patogenu a ve spolupráci s okolními imunitními buňkami zahajují lokální imunitní odpověď (Zheng a kol., 2013). Jejich úloha mimo jiné spočívá v regulaci aktivity makrofágů a kontrole rychlé aktivace NK buněk v odpovědi na mikrobiální infekci (Kaufmann, 1996). Byla také zaznamenána vzájemná interakce γδ T lymfocytů s dendritickými buňkami, a to konkrétně u lidí (Shrestha a kol., 2005), myši (Plattner a Hostetter, 2011), ale i u přežvýkavců infikovaných mykobakteriemi. Produkce IFN-γ v tomto případě stimulovala dozrávání dendritických buněk a jejich produkci IL-12, a přítomnost dendritických buněk zvyšovala produkci IFN-γ γδ T lymfocyty (Price a Hope, 2009).

U lidí trpících bakteriálními nebo protozoálními infekcemi, ale i v myších experimentálních infekčních modelech, byla pozorována akumulace γδ T buněk v určitých oblastech mikrobiální replikace, stejně jako selektivní expanze γδ T buněk v periferní krvi nebo lymfatických orgánech (Kaufmann 1996).

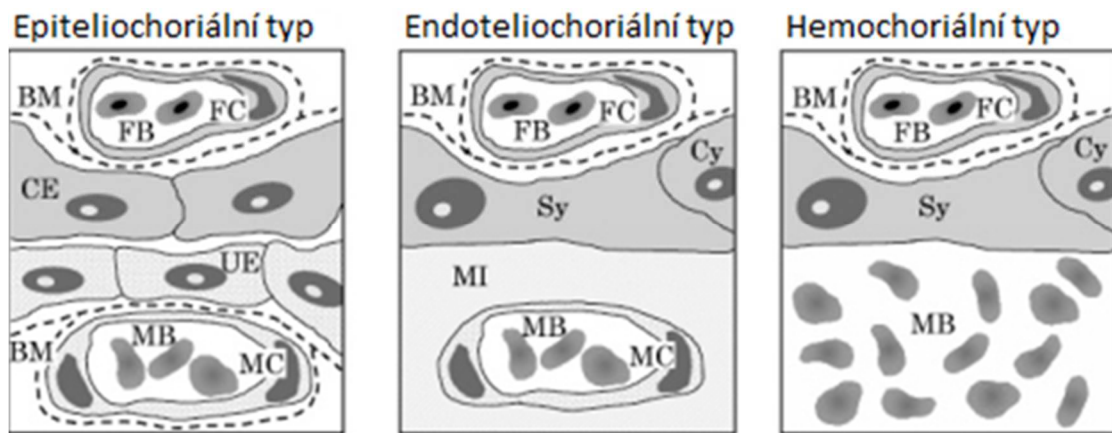
1.6 Rozdělení živočichů – $\gamma\delta$ -high a $\gamma\delta$ -low skupiny

Na základě zastoupení $\gamma\delta$ T lymfocytů v krvi a různých tkáních lze rozdělit živočichy do dvou základních skupin. Prasata, přežvýkavci a kuřata mají vyšší podíl $\gamma\delta$ T buněk v periferní krvi a lymfatických orgánech. U těchto druhů mohou $\gamma\delta$ T lymfocyty představovat i více než polovinu periferních T buněk (Cicarese a kol., 1997; Šinkora a kol., 2005). Z tohoto důvodu jsou tyto druhy označovány jako " $\gamma\delta$ -high ". Je důležité podotknout, že ne všechny $\gamma\delta$ -high druhy mají stejné procentuální zastoupení $\gamma\delta$ T buněk v periferní krvi. Například u kuřete je to 15% všech lymfocytů, u prasete 24%, u turů 20-40% v případě dospělců a 70% u novorozených jedinců (Garfias, 2011).

U lidí, myši a krysa je TCR $\alpha\beta$ exprimován na víc než 95% všech T buněk v brzlíku i periferních lymfoidních oblastech, zatímco TCR $\gamma\delta^+$ buňky představují menšinovou populaci (Šinkora a kol., 2005). Takové druhy jsou proto označovány jako „ $\gamma\delta$ -low “. U $\gamma\delta$ -low druhů tvoří $\gamma\delta$ T buňky jen 1-5% cirkulujících lymfocytů, ale až 50% T buněk epitelů kůže a střeva (Chen, 2002).

Zajímavým pojítkem u $\gamma\delta$ -low a $\gamma\delta$ -high skupin je rozdílný způsob placentace. (obr. 3). U přežvýkavců se vyskytuje endoteliochoriální placenta, která je daleko méně propustná než lidská či myší hemochoriální placenta (Štaud a Fendrich, 1996) a přes placentární bariéru tvořenou pěti vrstvami prochází γ globulin, ale ne protilátky (Dixon a Humphrey, 1967). Prase má epiteliochoriální placentu, u které je krev plodu oddělena od krve matky dokonce šesti vrstvami tkáně. V tomto uspořádání neprochází ani γ globulin a nedochází tedy k žádné imunizaci plodu ani přechodu maternálních proteinů (Dixon, a Humphrey, 1967). Novorozenci $\gamma\delta$ -high druhů proto postrádají pasivní imunitu získanou díky protilátkám matky. U hemochoriální placenty je krev matky v přímém kontaktu s trofoblastem a plod získává již v prenatalním stadiu protilátky stejného složení a koncentrace jako má matka (Štaud a Fendrich, 1996). Jedinou známou výjimkou naivního imunitního systému novorozenců u $\gamma\delta$ -high druhů jsou ptáci. Z krevního řečiště slepice protilátky pronikají do žloutkového vaku, což je vysoce vaskularizovaná membrána obklopující žloutek během embryonálního vývoje. Z něj zárodek společně s výživou získává i maternální imunoglobuliny Y (IgY), které jej chrání i v prvních několika dnech po vylíhnutí (Ulmer-Franco a kol.,

2011). Na druhou stranu u ptáků po vylíhnutí nedochází k přenosu mateřských protilátek tak, jako tomu je u savců díky mléku.



Obr. č. 3: Obrázek znázorňuje způsoby placentace lišící se vztahem mezi chorionem a stěnou dělohy. Části náležící plodu představují trofoblast, bazální membránu a fetální kapiláry. BM – bazální membrána, CE – epitel chorionu (trofoblast), Cy – cytotrofoblast, FB (z angl. fetal blood) – krev plodu, FC (z angl. fetal capillary) – kapiláry plodu, MB (z angl. maternal blood) – maternální krev, MC (z angl. maternal capillary) – maternální kapiláry, MI – maternální interstitium, Sy – cyncytioblast, UE (z angl. uterine epithelium) – epitel dělohy (Furukawa a kol., 2011, upraveno).

2 $\gamma\delta$ -low druhy živočichů

2.1 $\gamma\delta$ T lymfocyty u myši

Studium imunitního systému myši přineslo možnost nahlédnout do pochodu lidského imunitního systému (Mestas a Hughes, 2004). Myší model poskytuje možnost studovat $\gamma\delta$ T lymfocyty způsobem, který není v případě člověka dosažitelný (Born a kol., 2010). Jejich imunitní systém je v mnoha ohledech podobný lidskému. Existují zde však rozdíly vzhledem k odlišné evoluční historii. Podle některých studií je tedy myš nevhodným modelovým systémem pro biologii člověka (Mestas a Hughes, 2004).

2.1.1 Vývoj $\gamma\delta$ T-lymfocytů u myši

Kromě základního schématu vývoje $\gamma\delta$ T lymfocytů uvedeného výše bylo u myši pozorováno oddělení $\alpha\beta$ - a $\gamma\delta$ - vývojových linií již v kostní dřeni (Dejbakhsh-Jones a kol., 2001). Taktéž se uvažuje o odlišné diferenciaci v závislosti na síle signálu, spíše než dle různých druhů TCR (Pang a kol., 2012). Silné TCR signály, které determinují dvojité negativní buňky do $\gamma\delta$ linie, jsou považovány za důsledek vazby agonista / ligand. Že tato vazba vzniká, bylo prokázáno u periferních $\gamma\delta$ T lymfocytů, jako například u dendritických epidermálních či u $\gamma\delta$ T buněk podobných NK buňkám nesoucích převážně V γ 1V δ 6.3/6.4 receptor (Pang a kol., 2012). U myši bylo také pozorováno vyzrávání $\gamma\delta$ T lymfocytů v periférii (Ishikawa a kol., 1999). Ačkoli $\gamma\delta$ T lymfocyty opouštějí brzlík s definovaným a limitovaným funkčním potenciálem, jejich konečné funkce a TCR $\gamma\delta$ repertoár je dále ovlivňován podněty z okolního prostředí a způsobem TCR $\gamma\delta$ signalizace (Joachims a kol., 2006). Negativní selekce, která má za úkol eliminovat thymocyty s autospecifickým TCR $\gamma\delta$, je u myši po narození velmi oslabená. Zvláštností je, že v důsledku tohoto zmírnění selekce nemusí $\gamma\delta$ thymocyty rozpoznávající vlastní MHC podlehnout apoptóze, ale unikají do střevního epitelu, kde jich byly nalezeny vysoké počty (Lin a kol., 1999).

2.1.2 Tkáňová distribuce $\gamma\delta$ T lymfocytů u myší

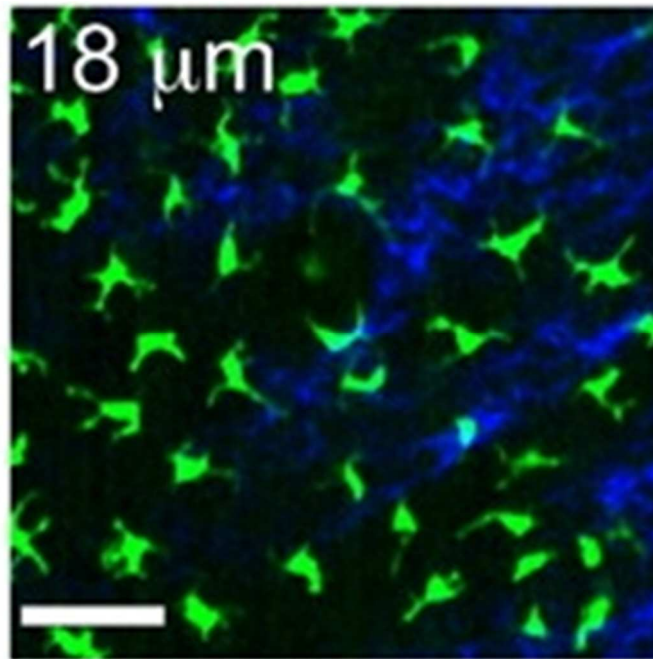
Experimenty s periferními $\gamma\delta$ T buňkami u myší naznačují, že většina z nich se dočasně nebo trvale usazuje v lymfatických tkáních (Born a kol., 2010). Je pozoruhodné, že distribuce většinou závisí na typu TCR γ anebo TCR δ řetězce. V myší slezině lze nejčastěji nalézt V γ 1⁺ a V γ 4⁺ lymfocyty, přičemž V γ 1⁺ převažují (Born a kol., 2010). V kůži převládají $\gamma\delta$ T buňky, které se lokalizují trvale (Kaufmann, 1996) a mají velmi omezenou rozmanitost TCR $\gamma\delta$ (Chen, 2002). Nejlépe prostudovanými jsou myší dendritické epidermální T buňky (DETC, z angl. *Dendritic Epidermal T Cell*) (Pang a kol., 2012), vyskytující se výhradně v epidermis (Vantourout a Hayday, 2013). Druhou skupinou trvale lokalizovaných $\gamma\delta$ T buněk s neměnným TCR $\gamma\delta$ jsou V γ 6⁺V δ 1⁺ buňky v plicích nebo ve sliznici samičího rozmnožovacího traktu (Born a kol., 2010). Důležitá podtřída $\gamma\delta$ T buněk sídlí v epiteliálních vrstvách gastrointestinálního traktu (Pang a kol., 2012). Tyto $\gamma\delta$ intraepiteliální lymfocyty ($\gamma\delta$ IEL) se mohou vyvíjet nejen v brzlíku, ale i přímo ve střevní sliznici (Ishikawa a kol., 1999).

2.1.3 Funkce $\gamma\delta$ T-lymfocytů u myší

Funkční charakteristiky myších $\gamma\delta$ T buněk jsou těsně svázány s lokalizací těchto buněk a typem exprimovaného TCR $\gamma\delta$. Například $\gamma\delta$ T lymfocyty v játrech a slezině nesoucí V γ 1V δ 6.4 (Gerber a kol., 1999), popřípadě V γ 1V δ 6.3 (O'Brien a Born, 2010), jsou schopné produkovat IL-4. S produkcí Th2 cytokinů, mezi které IL-4 patří, je u myších $\gamma\delta$ T lymfocytů spojována také exprese CD4 (Qi a kol., 2009). Přítomnost IL-4 je důležitá pro diferenciaci B-buněk a následnou produkci IgE (Qi a kol., 2009), která proto může být zvýšena prostřednictvím V γ 1⁺V δ 6.4⁺ či V γ 1⁺V δ 6.3⁺ buněk. IgE je významný při napadení mnohobuněčnými parazity, ale také v alergických reakcích (Hořejší a kol., 2013). Jinou populací ve slezině jsou V γ 1⁺V δ 5⁺ lymfocyty u kterých byla prokázána inhibice vývoje CD4⁺CD25⁺ regulačních $\alpha\beta$ T lymfocytů (O'Brien a Born, 2010).

V kůži se vyskytující V γ 5⁺V δ 1⁺ DETC charakteristického tvaru (obr. č. 2) naopak odpovídají rychle na místní poranění tkáně. Tyto DETC rozpoznávají stresované keratinocyty a po aktivaci produkují jejich specifický růstový faktor

(Jameson a kol., 2004). Oprava pokožky je zajištěna produkcí hyaluronanu, který přitahuje makrofágy podílející se na hojení ran (Born a kol., 2010).



Obr. č. 4: Demonstrativní obrázek představuje $\gamma\delta$ DETC (zeleně) v epidermis myši (Sumaria a kol., 2011, upraveno).

Slizniční $V\gamma 6^+\delta 1^+$ $\gamma\delta$ T buňky mají funkci při chronických bakteriálních infekcích. Po $TCR\gamma\delta$ nezávislé stimulaci, například cytokinovými receptory nebo PAMP, mohou produkovat IL-17 (O'Brien a Born, 2010). Tento interleukin hraje roli v tzv. první linii obrany při bakteriálních infekcích (*Stafylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium sp.*), ale také při napadení kvasinkami (*Candida albicans*) (Jin a Dong, 2013). Důležitá je i funkce $\gamma\delta$ IEL, které stimulují epiteliální buňky k produkci specifických adhesivních molekul podílejících se na zadržování $\gamma\delta$ IEL v jejich blízkosti (Kaufmann, 1996). Takto lokalizované $\gamma\delta$ IEL zajišťují imunitní ochranu střeva a to především produkcí IFN- γ (Pang a kol., 2012), jehož úlohou je kromě aktivace makrofágů také obrana proti virům (Hořejší a kol., 2013). Tomu, že mají $\gamma\delta$ IEL také stimulační schopnosti, nasvědčuje, že u myši bez funkčních $\gamma\delta$ IEL bylo prokázáno zásadně větší poškození střeva po infekci *Eimeria vermiformis* než u kontrolních jedinců z důvodu nedostatečné odpovědi $\alpha\beta$ T buněk (Pang a kol., 2012).

2.2 $\gamma\delta$ T lymfocyty u lidí

Hlavním experimentálním zdrojem lidských $\gamma\delta$ T buněk zůstává periferní krev, která obsahuje omezené spektrum těchto buněk. Převážně z tohoto důvodu je rozsah poznatků o jejich funkcích a vlastnostech také limitován (Born a kol., 2010).

2.2.1 Vývoj $\gamma\delta$ T-lymfocytů u lidí

Experimenty s lidskými prekurzory $\gamma\delta$ T lymfocytů naznačují, že k oddělení $\alpha\beta$ a $\gamma\delta$ T linií dochází u lidí již v kostní dřeni, kde se částečně diferencuje multipotentní prekurzorová buňka (Klein a kol., 2003). Brzké prekurzory jsou charakteristické expresí CD34 a CD38, přičemž nejčasnější progenitory mají fenotyp CD34⁺CD38⁻CD1a⁻. Tyto se následně diferencují do CD34⁺CD38⁺CD1a⁻ a CD34⁺CD38⁺CD1a⁺ buněk (Dvořáková, 2009). Jiné nálezy uvádějí, že k podstatné části TCR $\gamma\delta$ přeskupení dochází až v pozdějším stupni vývoje. Proto je pravděpodobné, že se $\gamma\delta$ T buňky diverzifikují u lidí v pozdějším stádiu než u myši (Joachims a kol., 2006).

V závislosti na expresi TCR $\gamma\delta$ mohou být lidské $\gamma\delta$ T lymfocyty rozděleny do dvou hlavních populací $\gamma\delta$ T lymfocytů: V δ 1⁺ a V δ 2⁺ (Krangel a kol., 1990). Většina těchto buněk na svém povrchu nemá CD4 nebo CD8 receptory. Experimentální data naznačují, že skupina V δ 2⁺ nad V δ 1⁺ převažuje (Krangel a kol., 1990). U lidí je pozoruhodné, že k plnému vývoji V γ 9V δ 2 $\gamma\delta$ T lymfocytů zřejmě dochází až po narození (Dvořáková, 2009). Po vyžrání v brzlíku je pro přesun $\gamma\delta$ T lymfocytů důležitý dočasný CCR7 receptor, který je směřuje do lymfatických uzlin. U lidí bylo též pozorováno, že variabilita $\gamma\delta$ T lymfocytů narůstá do 6 – 10 let věku vlivem působení antigenů z prostředí (Dvořáková, 2009).

2.2.2 Tkáňová distribuce $\gamma\delta$ T-lymfocytů u lidí

V lidské krvi představují $\gamma\delta$ T lymfocyty cca 1-5% všech T lymfocytů (Chen, 2002). Většinu z nich tvoří V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T buňky a to zejména V γ 9⁺ (Pang a kol., 2012).

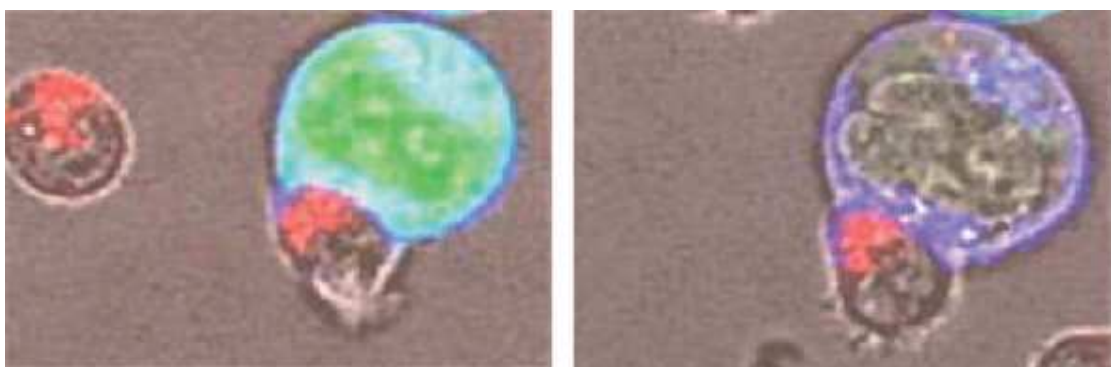
Buňky nesoucí genový segment V δ 1 jsou sice v případě periferní krve člověka menšinovou populací, ale převažují v kůži, epitelu střeva, děloze a zanícených tkáních (Ziegler a kol., 2014). Tyto lymfocyty mohou exprimovat CD4 receptor a kromě tohoto znaku disponují také znaky kmenových a progenitorových buněk. U těchto $\gamma\delta$ T lymfocytů byla prokázána schopnost přeměnit se do $\alpha\beta$ T buněk, což je možné vzhledem k zachovaným TCR α genovým lokusům. K této přeměně dochází převážně v zanícené tkáni, kdy je exprese TCR γ blokována a následně dochází k expresi V δ 1/V β , která nahrazuje pre-TCR (Ziegler a kol., 2014).

Je nutno podotknout, že ačkoliv V δ 1 převažují v mukozálních orgánech (Zheng a Yang, 2014), celkově tvoří $\gamma\delta$ T lymfocyty v kůži pouze malý podíl buněk (Vroom a kol., 1991). Nejčastěji je lze nalézt v bazální vrstvě epidermis, nebo případně v papilární dermis. Ve střevě se $\gamma\delta$ T buňky jednoznačně lokalizují do epitelu a i zde tvoří menší část T buněk, ačkoli aktuální přítomnost v jednotlivých částech střeva se velmi liší (Vroom a kol., 1991). Počet T lymfocytů typu $\gamma\delta$ u lidí nepřesahuje 5% ani v brzlíku, lymfatických uzlinách, tonsilách, kostní dřeni, játrech nebo Peyerových placích, ani v nelymfatických orgánech jako je dýchací či pohlavní trakt nebo jazyk (Vroom a kol., 1991). Zajímavý je nálezn až 17% $\gamma\delta$ T lymfocytů v červené dřeni sleziny (Bordessoule a kol., 1990).

2.2.3 Funkce $\gamma\delta$ T lymfocytů u lidí

U lidí bylo nalezeno několik odlišných ligandů pro aktivaci $\gamma\delta$ T lymfocytů. Z nepeptidových antigenů byly charakterizovány především různé typy fosfoantigenů (Himoudi a kol., 2012). Jedním z nich je isoprenyl pyrofosfát (IPP), který rozpoznávají pouze V γ 9V δ 2⁺ T lymfocyty. Kromě toho, že je IPP metabolitem patogenů (Morita a kol., 2000), bývá také spojovaný s rakovinou (Himoudi a kol., 2012) a nežádoucími nitrobuněčnými mikroorganismy, jako například *Mycobacterium tuberculosis* (Zheng a kol., 2013). Tímto antigenem stimulované $\gamma\delta$ T-lymfocyty vykazují schopnost produkce prozánětlivých cytokinů jako je IFN- γ a TNF α (Himoudi a kol., 2012). Pomocí TLR4 a TLR5 rozpoznávají lidské $\gamma\delta$ T buňky bakterie grampozitivní (*Staphylococcus aureus*) i gramnegativní (*Escherichia coli*). Cytolytickou aktivitu a produkci Th1 cytokinů $\gamma\delta$ T lymfocyty zvyšují při virových nálezích TLR3 a TLR9, rozeznávající virovou

DNA či RNA (Zheng a kol., 2013). Klíčová úloha $\gamma\delta$ T buněk je popisována při obraně proti chřipkovému viru, lidskému cytomegaloviru, lidskému viru hepatitidy C, ale také při infekci HIV (Zheng a kol., 2013). Jiné aktivované $\gamma\delta$ T lymfocyty produkují i protizánětlivé cytokiny, jako je například IL-10, které pomáhají ukončit imunitní reakci (O'Brien a Born, 2010). Aktivované lidské $\gamma\delta$ T buňky mohou vykazovat i vlastnosti typické pro vrozenou imunitu. Příkladem může být cytotoxicita zprostředkovaná NK receptory, buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (ADCC, z angl. *Antigen-dependent Cellular Cytotoxicity*) nebo fagocytóza (Himoudi a kol., 2012). Ukázka cytotoxické schopnosti $\gamma\delta$ T lymfocytů je demonstrována na obrázku 3. V určitých pracích byly subpopulace lidských $\gamma\delta$ T buněk přímo charakterizovány jako profesionální fagocyty (Born a kol., 2010). Takové $\gamma\delta$ T lymfocyty exprimují MHC II, další kostimulační molekuly a chemokinové homing receptory pro lymfatické uzliny (Himoudi a kol., 2012). V této konkrétní práci bylo prokázáno, že lidské krevní $\gamma\delta$ T buňky mohou přijímat velké fragmenty z neporušených buněk při procesech fagocytózy a trogocytózy. Struktury větší než 1 μm byly zpracovány a peptidové zbytky navázány na MHC II, což umožnilo prezentovat antigen jiným T buňkám. Podobným způsobem byly odhaleny $\gamma\delta$ T lymfocyty schopné prezentovat rakovinné antigeny $\alpha\beta$ T buňkám po stimulaci tumor-reaktivními myšími protilátkami (Himoudi a kol., 2012).



Obr. č. 5: Lidský $\gamma\delta$ T lymfocyt zabíjí uvolněním perforinu (červeně) cílovou buňku lymfomu (modrá membrána). Ztráta zeleného fluorochromu na této fotografii indikuje buněčnou smrt (Gertner a kol., 2007, upraveno).

Důležitým znakem $\gamma\delta$ T lymfocytů při aktivaci je i změna fenotypu. Lidské $\gamma\delta$ T lymfocyty lze rozdělit do čtyř populací na základě exprese CD27 (Ribot a kol., 2009), a CD45RA: Naivní ($\text{CD27}^+\text{CD45RA}^+$), efektorové paměťové buňky (CD27^-

CD45RA⁻), centrální paměťové buňky (CD27⁺CD45RA⁻) a definitivně diferencované buňky (CD27⁻CD45RA⁺) (Zheng a kol., 2013). Exprese CD27 je spojována u $\gamma\delta$ T lymfocytů s produkcí IFN- γ . Naopak, CD27⁻ $\gamma\delta$ T lymfocyty většinou uvolňují IL-17 (Ribot a kol., 2009). Na CD27⁻CD45RA⁻ $\gamma\delta$ T buňkách byla v roce 2012 poprvé demonstrována paměťová schopnost při studiu makaků nakažených tuberkulózou. Fenotyp CD27⁻CD45RA⁻ nesou u lidí a primátů V δ 2⁺ buňky v krevním oběhu a ve tkáních (Plattner a Hostetter 2011).

3 $\gamma\delta$ -high druhy

3.1 $\gamma\delta$ T lymfocyty u prasat

Vepř je užitečný model pro studium různorodosti savčího imunitního systému (Yang a Parkhouse, 1996). Jeho imunitní systém vykazuje několik odlišností oproti obecné charakteristice imunitního systému obratlovců. Některými z nich jsou převrácená struktura mízních uzlin či chybějící IgD⁺ stádium vývoje B buněk (Toman a kol., 2000). Na druhou stranu jsou prasata fyziologicky velmi podobná člověku a z tohoto důvodu jsou hojně využívána v biomedicíně.

3.1.1 Vývoj $\gamma\delta$ T lymfocytů u prasat

Časný vývoj $\gamma\delta$ T lymfocytů u prasat je podobný obecnému schématu vývoje thymocytů (Šinkora a kol., 2005). Prekurzory migrují z embryonální kostní dřeně do brzlíku, kde se po fázi pro-T buněk a přeskupení TCR γ , TCR δ a TCR β odděluje vývoj $\alpha\beta$ a $\gamma\delta$ linie. Zajímavé zjištění představuje výskyt malé populace CD4⁺ $\gamma\delta$ thymocytů, která neopouští prasečí z brzlík a exprimuje heterodimer CD8 $\alpha\beta$ (Šinkora a kol., 2007). Tato specifická populace může zvrátit svůj vývoj a dávat vzniku $\alpha\beta$ T lymfocytům (Šinkora a kol., 2005 a 2007). Experimentální práce naznačují, že exprese CD4 je právě důsledkem odklonu vývoje od $\gamma\delta$ do $\alpha\beta$ T lymfocytů (Šinkora a kol., 2007). Většinová populace CD4⁻ $\gamma\delta$ thymocytů se v brzlíku nadále vyvíjí do $\gamma\delta$ linie ztrátou exprese CD1 a zvýšenou expresí CD45RC a postupným ztrácením a získáváním CD2 a CD8 molekul (Šinkora a kol., 2005 a 2007). Výsledkem tohoto vývoje je vznik CD2⁺CD8⁺, CD2⁺CD8⁻ a CD2⁻CD8⁻ $\gamma\delta$ T lymfocytů, které jsou exportovány do periférie (Štěpánová a Šinkora, 2013).

Při studiu vývoje T lymfocytů u prasete byly také přímo zdokumentovány jednotlivé vlny osídlování brzlíku T buněčnými prekurzory (Šinkora a kol., 2000). Toto pozorování bylo umožněno díky dlouhé graviditě prasat, kdy se vývoj multipotentních buněk v jednotlivých hematopoetických centrech embryí nepřekrývá tak, jako je tomu u myši (Šinkora a kol., 2000). První vlna pocházející

ze žloutkového vaku a embryonálních jater byla následována druhou vlnou pocházející z kostní dřeně. Ze získaných výsledků je zřejmé, že migrace prekurzorů T buněk z hematopoetických center musí být kontinuální, a pokud je přerušena, vývoj T buněk v brzlíku se zastavuje (Šinkora a kol., 2000).

3.1.2 Tkáňová distribuce $\gamma\delta$ T lymfocytů u prasat

U prasat nebyla pozorována specifická lokalizace $\gamma\delta$ T lymfocytů podle druhu exprimovaného TCR $\gamma\delta$, ale na základě v brzlíku vzniklých CD2/CD8 subpopulací. Lokalizační studie prokázaly, že zatímco CD2⁻CD8⁻ $\gamma\delta$ T buňky se převážně zdržují v krvi, CD2⁺CD8⁺ a CD2⁺CD8⁻ preferenčně osidlují sekundární lymfatické orgány (Štěpánová a Šinkora, 2013). U prasete je zajímavá tendence snižování počtu $\gamma\delta$ T lymfocytů s věkem (Brown a kol., 2006). Zatímco v prvním týdnu života představují $\gamma\delta$ T lymfocyty cca 75% všech T buněk, později tento počet klesá i pod 50%. Možným vysvětlením je funkční význam $\gamma\delta$ T lymfocytů záhy po narození, kdy je imunitní systém ještě nevyzrálý (Brown a kol., 2006). Z tohoto pohledu je významný epiteliochoriální typ placentace, neboť uzavřený typ placenty neumožňuje přechod mateřských protilátek do těla potomka a proto je imunitní systém novorozenců zcela naivní (Butler a kol., 2006).

3.1.3 Funkce $\gamma\delta$ T lymfocytů u prasat

Kromě standardních CD znaků byly na povrchu prasečích $\gamma\delta$ T lymfocytů popsány molekuly, které nemají analogy s lidskými nebo myšími znaky a jsou označovány SWC (z angl. *Swine Workshop Cluster*; Toman a kol., 2000). Specifický znak buněčných linií představuje SWC1, zatímco SWC7 je považována za molekulu aktivační (Štěpánová a Šinkora, 2012). Z funkčního hlediska byly u prasete studovány zejména CD2/CD8 subpopulace T buněk. Cytotoxické testy prokázaly, že CD2⁺CD8⁺ $\gamma\delta$ T lymfocyty mají schopnost napadat a lyzovat jiné cílové buňky (de Bruin a kol., 1997). Z funkčních studií také vyplývá, že CD2⁺CD8⁺ $\gamma\delta$ T lymfocyty mohou vznikat z jejich CD2⁺CD8⁻ protějšků, zatímco CD2⁻CD8⁻ $\gamma\delta$ T lymfocyty nejsou schopny změnit svůj fenotyp (Štěpánová a Šinkora, 2013). Detailní analýza CD25, CD11b, SWC1, SWC7, MHC II a CD45

povrchových znaků potvrdila tyto závěry a ukázala, že CD2⁻CD8⁻ subpopulace zahrnují převážně naivní $\gamma\delta$ T buňky, zatímco CD2⁺CD8⁻ a CD2⁺CD8⁺ subpopulace představují výkonnostní a paměťová stádia. Z tohoto hlediska mají CD2⁺CD8⁺ $\gamma\delta$ T lymfocyty znaky koncově diferenciovaných buněk s nejvyšší expresí MHC II, SWC1, CD11b a CD25 (Štěpánová a Šinkora, 2012). Tyto výsledky v souhrnu naznačují, že existují dvě linie periferních $\gamma\delta$ T buněk: CD2⁺ a CD2⁻. Při porovnání s fenotypem $\gamma\delta$ T lymfocytů u lidí a myší, které téměř nemají CD2⁻ $\gamma\delta$ T buňky, se nabízí zajímavá myšlenka, že CD2⁻ $\gamma\delta$ T lymfocyty jsou specifickou linií buněk, která se vyskytuje pouze u $\gamma\delta$ -high druhů. Této teorii nahrává skutečnost, že CD2⁻ $\gamma\delta$ T lymfocyty se preferenčně lokalizují v krvi a $\gamma\delta$ T lymfocyty u lidí a myší v krvi prakticky chybí.

3.2 $\gamma\delta$ T lymfocyty u přežvýkavců

Imunitní systém skotu není příliš odlišný od imunitního systému ostatních obratlovců. Za odlišnost by se dal považovat Peyeroův plak v kyčelníku (*ileum*) (Toman a kol., 2000). Tuto lymfatickou tkáň, která je plně vyvinuta již v prenatálním období a časně po narození zaniká, lze nalézt i u dalších kopytnatců (Butler a Šinkora, 2013). Brzlík, který je u turů na rozdíl od jiných obratlovců dvojlaločný (*bilobární*), má buněčnou populaci z 97% tvořenou T lymfocyty, zbylá 3% představují dendritické buňky (Toman a kol., 2000).

3.2.1 Vývoj $\gamma\delta$ T lymfocytů u přežvýkavců

Detailní analýza vývoje $\gamma\delta$ T lymfocytů u přežvýkavců nebyla provedena. Z dostupných informací je však zřejmé, že se jejich základní vývoj neliší od studií provedených u ostatních zvířecích druhů. Prekurzory T lymfocytů pocházejí z kostní dřeně a diferencují se v brzlíku (Garfias, 2011). Po jejich dozrání odcházejí $\gamma\delta$ T lymfocyty do krevního oběhu a osidlují sekundární lymfatické orgány (Garfias, 2011).

3.2.2 Tkáňová distribuce $\gamma\delta$ T lymfocytů u přežvýkavců

Podobně jako u prasat představují $\gamma\delta$ T buňky u přežvýkavců 15-60% cirkulujících lymfocytů (Toman a kol., 2000). Většina těchto $\gamma\delta$ T buněk v krvi mladých přežvýkavců nese na svém povrchu specifickou molekulu WC1 (Rogers a kol., 2005) a vykazuje fenotyp WC1⁺CD2⁻CD4⁻CD8⁻ (Guzman a kol., 2012). V sekundárních lymfatických tkáních, jako je slezina nebo střevní sliznice, je většina $\gamma\delta$ T buněk WC1⁻ (Rogers a kol., 2005) a exprimuje CD2 a CD8 (Machugh a kol., 1997). Tato tkáňová distribuce je velmi podobná CD2/CD8 tkáňové distribuci $\gamma\delta$ T buněk u prasat.

Molekula WC1 vděčí za své označení zkratce z prvního pracovního setkání veterinárních imunologů (z angl. *Workshop Cluster 1*). Detailní analýza (Rogers a kol., 2005) později prokázala, že tento antigen, známý také jako T19, je molekula transmembránového glykoproteinu náležící do rodiny scavenger receptorů bohatých na cystein (z angl. *Scavenger Receptor Cystein-Rich*), které zahrnují také molekuly CD5, CD6 nebo CD163 (Ahn a kol., 2002). Ačkoli je funkce tohoto receptoru doposud neznámá, předpokládá se, že se jedná o kostimulační nebo homingovou molekulu (Ahn a kol., 2002). WC1 je unikátně exprimován na $\gamma\delta$ T buňkách (Rogers a kol., 2005). Poznatek je však komplikován nálezem, že WC1⁺ $\gamma\delta$ T buňky nejsou homogenní; byly nalezeny isoformy WC1.1, WC1.2 a WC1.3, kde se navíc WC1.3⁺ subpopulace ukázala být podtřídou WC1.1⁺ $\gamma\delta$ T buněk (Guzman a kol., 2012). Je překvapivé, že WC1-podobné sekvence byly nalezeny i u jiných druhů včetně lidí, ale exprese nebyla nikdy detailně analyzována (Ahn a kol., 2002). Z tohoto hlediska je porovnání exprese WC1 na $\gamma\delta$ T buňkách u různých druhů velmi problematická.

3.2.3 Funkce $\gamma\delta$ T lymfocytů u přežvýkavců

U přežvýkavců byla poprvé popsána cytolytická schopnost $\gamma\delta$ T buněk zprostředkovaná receptorem přirozených zabíječů CD335. Po ligaci těchto receptorů byl produkován perforin. Tento nález byl učiněn při studiích nákazy kulhalkou a slintavkou, kdy WC1⁺ buňky exprimovaly CD335 (Toka a kol., 2011). Zajímavé je zjištění, že u mladých jedinců nebyla k vyvolání exprese perforinu

stimulace antigenem zapotřebí (Guzman a kol., 2012). Exprese CD335 u $\gamma\delta$ T lymfocytů časem mizí, stejně jako exprese perforinu. Guzman tento mechanismus přirovnává k redukci funkcí NK buněk (Guzman a kol., 2012).

Po stimulaci bakteriálními a protozoálními (Guzman a kol., 2012), ale i virovými (Toka a kol., 2011) antigeny produkují $\gamma\delta$ T buňky zánětlivý cytokin IFN- γ (Plattner a Hostetter, 2011). Důležité je zjištění, že v produkci IFN- γ a požadavcích na stimulaci se jednotlivé podtřídy WC1⁺ buněk liší (Guzman a kol., 2012).

Na druhou stranu však $\gamma\delta$ T lymfocyty u přežvýkavců vykazují i regulační aktivity. Buňky produkující IL-10 se vyskytují v podtřídách WC1⁺, ale i WC1⁻ (Guzman a kol., 2014). Kromě tlumení imunitní reakce vykazují regulační $\gamma\delta$ T lymfocyty i schopnost prezentovat antigen. V tom případě $\gamma\delta$ T lymfocyty exprimují znak paměťových buněk CD45R0. Tento znak se vyskytuje na 80% WC1⁺ $\gamma\delta$ T buněk zdravých jedinců, v případě infekce kulhavkou a slintavkou se exprese tohoto znaku výrazně snižuje (Toka a kol., 2011).

3.3 $\gamma\delta$ T lymfocyty u ptáků

Nejlépe prostudovaným druhem mezi ptáky je kur, který v mnoha případech slouží jako laboratorní model pro řád hrabavých ptáků. O historickém významu tohoto zvířecího druhu pro imunologii svědčí skutečnost, že vůbec první oslabená vakcína vyvinutá L. Pasteurem byla použita k ochraně proti kuřecímu patogenu – drůbeží choleře (Davison, 2003). Studium imunitních systémů kuřat a kuřecích embryí se také poprvé podařilo prokázat klíčovou roli lymfocytů v adaptivní imunitě (Davison, 2003). Imunitní systém kura se částečně odlišuje od imunitních systémů jiných obratlovců. U některých druhů ptáků zcela chybí lymfatické uzliny, avšak téměř ve všech orgánech se objevují ohniska lymfatické tkáně (Toman a kol., 2000). Nejaktivnějším lymfatickým orgánem je brzlík, který v embryu dozrává jako první a je lymfopoeticky nejaktivnější (Janković a kol., 1975). Jeho vývoj je následován specifickým ptačím orgánem zadního střeva, tzv. Fabriciovu bursou, která slouží k produkci B lymfocytů (Toman a kol., 2009). Zajímavostí je, že tato část ptačího těla přispěla k objevení dvou hlavních linií

lymfocytů – T a B (Davison, 2003). Dalšími důležitými orgány z hlediska imunity jsou slezina a lymfatické uzliny ve slepém střevě (Khan a kol., 1998).

3.3.1 Vývoj $\gamma\delta$ T lymfocytů u ptáků

Vývoj ptačích B lymfocytů se od jiných zvířecích druhů značně liší, avšak vývoj T lymfocytů probíhá podobně, v brzlíku. U ptáků bylo poprvé jasně prokázáno, že i $\gamma\delta$ IEL se, na rozdíl od myších $\gamma\delta$ IEL, vyvíjejí v thymu (Dunon a kol., 1993).

V minulosti byly u ptáků rozlišovány tři druhy TCR receptorů (TCR1, TCR2 a TCR3) namísto klasických $TCR\alpha\beta$ a $TCR\gamma\delta$ (Chen a kol., 1989). Postupně bylo odhaleno, že TCR1 je adekvátní k $TCR\gamma\delta$, zatímco oba druhy TCR2 i TCR3 jsou adekvátní k $TCR\alpha\beta$ (Chen a kol., 1989 a 1994). Lymfocyty nesoucí $TCR\gamma\delta$ vznikají z prekursorů, které ve třech vlnách osídlují brzlík (Chen a kol., 1994). Progenitory první vlny pocházejí z tzv. para-aortálních shluků (Säynäjäkangas a kol., 2009) a další dvě mají původ v kostní dřeni. Buňky nesoucí $TCR\gamma\delta$ ukončují vývoj v brzlíku vždy o tři dny dříve, než $\alpha\beta$ T lymfocyty (Dunon a kol. 1998). První dvě vlny $\gamma\delta$ T buněk před vylíhnutím osídlují střevo a slezinu. Třetí generace $\gamma\delta$ T lymfocytů migruje do periférie v prvním týdnu života kuřete (Dunon a kol., 1993).

3.3.2 Tkáňová distribuce $\gamma\delta$ T lymfocytů u ptáků

U kura představují $\gamma\delta$ T buňky 25-50% T lymfocytů. (Toman a kol., 2000). Na horní hranici se jejich počet může zvýšit především u kuřat ve stáří 6 měsíců (Chen a kol., 1994). Podobně jako u prasat a přežvýkavců má většina $\gamma\delta$ T lymfocytů v cirkulaci fenotyp $CD4^-CD8^-$ (Sowder a kol., 1988), zatímco $CD8^+$ $\gamma\delta$ T lymfocyty se lokalizují převážně do sekundárních lymfatických orgánů (Pieper a kol., 2008). Rozdíly v distribuci $CD8^-$ a $CD8^+$ $\gamma\delta$ T lymfocyty mezi cirkulací a periférií však nejsou tak zřetelné. Významným zjištěním je, že ptačí $\gamma\delta$ T lymfocyty mohou exprimovat CD8 jak v homodimeru $CD8\alpha\alpha$, tak heterodimeru $CD8\alpha\beta$, a $CD8\alpha\beta^+$ $\gamma\delta$ T lymfocyty se vyskytují ve všech studovaných orgánech v jasné početní převaze (Pieper a kol., 2008). Ve střevě $\gamma\delta$ T lymfocyty osídlují zejména sliznici jako $\gamma\delta$ IEL (Toman a kol., 2000) a jejich

nejvyšší počty byly zaznamenány ve slepém střevě (Pieper a kol., 2008). Ve Fabriciově burse a kostní dřeni se $\gamma\delta$ T lymfocyty téměř nevyskytují. Jejich počty v těchto orgánech jsou méně než 1% a mají převážně CD4⁻CD8⁻ fenotyp (Sowder a kol., 1988).

3.3.3 Funkce $\gamma\delta$ T lymfocytů u ptáků

Populace CD8⁺ $\gamma\delta$ T lymfocytů představuje nositele výkonnostních funkcí, které zahrnují produkci IFN- γ . Ty z nich, které jsou CD8 α ⁺, jsou také schopné exprimovat TLR4 (Pieper a kol., 2008), nutný pro přímou identifikaci bakteriálních LPS a dalších látek (Hořejší a kol., 2013), a v menší míře také i IL-2 (Pieper a kol., 2008). Stěžejní roli v obraně proti bakteriím, jako jsou *Salmonella enterica* a *S. typhimurium*, hrají CD8 α ⁺ $\gamma\delta$ T lymfocyty (Pieper a kol., 2011).

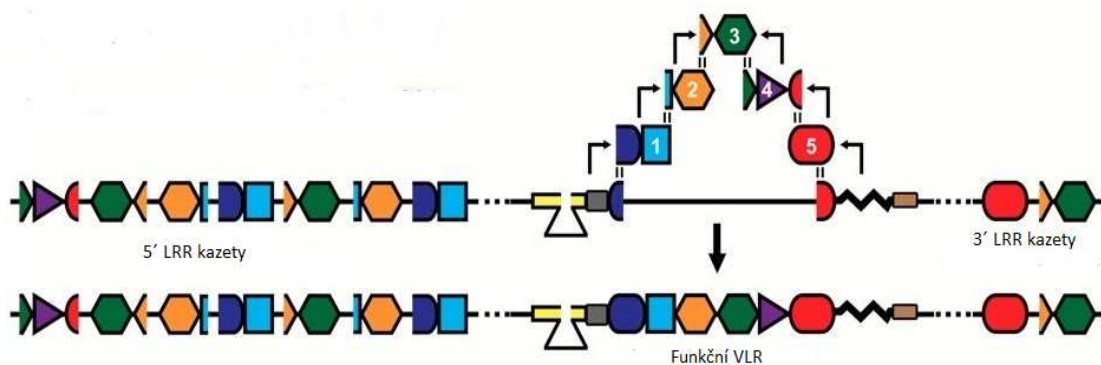
Ptačí CD8⁺ $\gamma\delta$ T lymfocyty ve slezině také exprimují molekulu CD6, která je charakteristická pro embryonální NK a $\alpha\beta$ T buňky (Göbel a kol., 1996). Jedná se o typ scavenger („uklízecího“) receptoru, který se obvykle vyskytuje na povrchu fagocytů a rozpoznává struktury na membránách některých mikroorganismů, ale také apoptických buněk (Hořejší a kol., 2013). Bylo zjištěno, že CD8⁺ $\gamma\delta$ T buňky ve slezině mohou mít také supresorové funkce, kterými tlumí produkci protilátek (Quere a kol., 1990). V periferní krvi jsou CD8⁺ $\gamma\delta$ T buňky charakteristické expresí pomocné molekuly CD28. Ačkoli většina ptačích $\gamma\delta$ T buněk je CD28 negativních, v periferní krvi tvoří CD8⁺CD28⁺ až 12% (Koskela a kol., 1998). Kostimulační molekula CD28 je zásadní při interakci s APC, jejímž výsledkem je aktivace, buněčná proliferace, produkce cytokinů a aktivace efektorových funkcí (Bočko a kol., 2002).

3.4 $\gamma\delta$ T buňky u dalších obratlovců

Prvky adaptivního imunitního systému, ve kterém jsou specifické receptory tvořeny VDJ přeskupením, se vyskytují u všech čelistnatců. Prvními živočichy, u nichž se vyskytuje TCR, jsou paryby (*Chondrichthyes*) (Criscitello a kol., 2010). Žralok vouskatý (*Ginglymostoma cirratum*) je zajímavý extrémně vysokou diverzitou TCR δ . Není jisté, zda jej lze považovat za $\gamma\delta$ -high nebo $\gamma\delta$ -low

živočicha, neboť jsou u něj $\alpha\beta$ i $\gamma\delta$ T lymfocyty zastoupené na obdobné úrovni (Criscitiello a kol., 2010). U kostnatých ryb byly popsány převážně cytotoxické $\gamma\delta$ T lymfocyty, které exprimují CD8 α a jsou velmi podobné NK buňkám. U mořčáka (*Dicentrarchus sp.*) byly nalezeny zejména ve střevě (Scapigliati, 2013). V těle čtverzubce (*Takifugu rubripes*) se $\gamma\delta$ T lymfocyty nachází v lymfatických orgánech včetně thymu a sleziny a dále ve sliznicích žaber, střeva a také v kůži (Araki a kol., 2005). Z funkčního hlediska se zdá, že u kostnatých ryb $\gamma\delta$ T lymfocyty tvoří především imunitní ochranu sliznic (Criscitiello a kol., 2010), kde mají funkce podobné výše zmíněným $\gamma\delta$ IEL (Rombout a kol., 2005). Buňky podobných vlastností jako myší $\gamma\delta$ IEL se vyskytují také ve střevě axolotla mexického (*Ambistoma mexicanum*), který představuje modelového zástupce pro studium imunitního systému obojživelníků (*Amphibia*). Tento živočich by se svými 20-60% $\gamma\delta$ T lymfocytů z celkového množství T buněk v krvi mohl řadit do skupiny $\gamma\delta$ -high živočichů (André a kol., 2007).

Bezčelistní obratlovci (*Agnatha*), sliznatky a mihule, nemají klasickou adaptivní imunitu. Vyvinuli si však alternativní adaptivní systém založený na receptorech VLR (z angl. *Variable Lymphocyte Receptor*) (Herrin a Cooper, 2010). Receptory VLR nevznikají VDJ přeskupením, ale pomocí mechanismu somatického složení genů (angl. *Somatic Gene Assembly*). Tento mechanismus je založen na proteinových oblastech bohatých na leucin (LRR z angl. *Leucine-Rich Repeat*), které jsou velmi krátké a jsou mnohonásobně duplikovány do cílové VLR kazety (obr. 4). Výsledkem je tedy VLR receptor, který na rozdíl od klasické VDJ rekombinace nevzniká přemístěním genomových segmentů, ale jejich kopírováním do nastřiženého templátu (Kishishita a Nagawa, 2013).



Obr. č. 6: Schéma somatického složení genů a vzniku VLR (VLR) (Herrin a Cooper, 2010, upraveno).

VLR nepatří do imunoglobulinové super-rodiny proteinů. Zajímavým zjištěním je skutečnost, že se VLR vyskytují ve třech formách: VLRA (odpovídající protilátkám B lymfocytů), VLRB (odpovídající TCR $\alpha\beta$ T lymfocytů) a VLRC, který je ekvivalentní savčím $\gamma\delta$ T lymfocytům. Vývoj VLR je také podobný vývoji klasických adaptivních receptorů (Herrin a Cooper, 2010). VLRA a VLRC se diverzifikují v thymoidní oblasti žaber a jsou exprimovány jako povrchové proteiny. VLRB vzniká v buňkách hematopoetických oblastí střevní řasy (*typhlosolis*) a vnitřní stěny střeva a může být sekretován ven z buněk. U mihulí převažují VLRC⁺ lymfocyty nad ostatními typy VLR⁺ buněk v krvi, ledvinách, *typhlosolis* a žábrech. U dospělců jsou VLRC⁺ buňky distribuované podobně jako VLRA⁺ ve střevní řase, ledvinách a žábrech. Lymfocyty exprimující VLRC se v jednotlivých částech těla mihule liší tvarem. Ve střevním epitelu a kůži, kde se vyskytují početné populace VLRC⁺ buněk, mají tyto lymfocyty dendritický tvar a jsou přirovnávány k DETC (Kishishita a Nagawa, 2013), které se jinak vyskytují pouze u hlodavců a přežvýkavců (Vantourout a Hayday, 2013).

Z hlediska existence VLR je zajímavé, že ačkoliv jde o jiný a nezávisle vyvinutý systém adaptivního rozpoznávání, byly v tomto systému použity stejné tři základní linie lymfocytů. Tyto nálezy naznačují, že u společného předchůdce všech obratlovců před více jak 500 milióny let byly přítomny tři linie lymfocytů, ačkoli jen u některých živočichů se následně vyvinula adaptivní imunita. Tyto poznatky mohou také znamenat, že vývoj adaptivního rozpoznávání vždy potřebuje tři linie buněk se specifickými funkcemi, bez ohledu na to, jaký typ adaptivního rozpoznávání se uplatní.

Závěr

U všech porovnávaných druhů se $\gamma\delta$ T lymfocyty vyvíjejí podle obecného schématu, který je principiálně stejný. V porovnání s $\alpha\beta$ T lymfocyty je vývoj $\gamma\delta$ T lymfocytů rychlejší, nepodléhají striktní pozitivní a negativní selekci a nepotřebují pre-TCR. Výraznější odlišnosti se objevují pouze u určitých skupin $\gamma\delta$ T buněk, a to zejména ve vývoji $\gamma\delta$ IEL u myší a ptáků. Za zvláštnost by se dalo považovat oddělení linií $\alpha\beta$ a $\gamma\delta$ T lymfocytů v kostní dřeni u myší i u lidí. Z obecné představy o $\gamma\delta$ T buňkách se vymyká také existence populací CD4⁺ buněk u lidí a prasat, které mohou zvrátit svůj vývoj a stát se $\alpha\beta$ T lymfocyty. Studie imunitních systémů různých zvířecích druhů se doplňují s ohledem na pozorovanou kolonizaci sekundárních lymfatických orgánů $\gamma\delta$ T lymfocyty, k níž dochází ve dvou vlnách. Rozdílná je však míra prostudování mechanismů kolonizace, kdy u některých druhů zcela chybí dokumentace podrobného průběhu.

Repertoár TCR γ a TCR δ není u $\gamma\delta$ -high druhů tak omezený jako u $\gamma\delta$ -low druhů a proto analýzy provedené u $\gamma\delta$ -low nelze zobecnit pro $\gamma\delta$ -high druhy. Obecně mohou $\gamma\delta$ T lymfocyty u různých druhů exprimovat různé pomocné, kostimulační, homingové a adhesivní molekuly. Je jisté, že ke svým funkcím nepotřebují TCR kostimulační molekuly CD4 a CD8.

Mezi zvířecími druhy, které jsou zmíněné v této práci, se vyskytují výrazné rozdíly v expresi CD2 molekul na $\gamma\delta$ T lymfocytech. Zatímco u $\gamma\delta$ -low druhů exprimují prakticky všechny $\gamma\delta$ T lymfocyty molekulu CD2, u $\gamma\delta$ -high druhů jsou CD2⁻ $\gamma\delta$ T lymfocyty běžné a jsou převážně lokalizované v krvi. Takové nálezy mohou znamenat, že CD2⁻ $\gamma\delta$ T lymfocyty jsou zvláštní skupinou buněk, která se vyskytuje převážně u $\gamma\delta$ -high druhů a je možná důvodem, proč $\gamma\delta$ -high druhy mají vysoké počty $\gamma\delta$ T lymfocytů v periférii. Je pozoruhodné, že tyto dvě skupiny se neliší pouze v počtu u $\gamma\delta$ T lymfocytů, ale i ve způsobu placentace a imunitního vývoje plodu. Zda tato skutečnost může vysvětlit rozdíl mezi zvířecími druhy v počtu $\gamma\delta$ T lymfocytů, nebo se jedná pouze o spekulaci, může objasnit jen další studium na poli adaptivní imunity.

Seznam použité literatury a dalších zdrojů

1. **ABBAS a LICHTMAN, 2011:** *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. 3. vyd. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2011. ISBN 978-1-4160-5569-3.
2. **AHN a kol., 2002:** Scavenger receptor cysteine-rich domains 9 and 11 of WC1 are receptors for the WC1 counter receptor. *J Leukoc Biol.* **72**(2), 382-390. ISSN 1938-3673.
3. **ANDRÉ a kol., 2007:** Highly restricted diversity of TCR delta chains of the amphibian Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*) in peripheral tissue. *Eur J Immunol.* **37**(6), 1621-1633. ISSN 0022-1767.
4. **ARAKI a kol., 2005:** Characterization and expression analysis of CD3varepsilon and CD3gamma/delta in fugu, *Takifugu rubripes*. *Immunogenetics.* **57**(1-2), 158-163. ISSN 0093-7711.
5. **BOČKO a kol., 2002:** CD28 costimulatory molecule-expression, structure and function. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* **50**(3), 169-177. ISSN 0004-069X.
6. **BOERE, van der ZEE a van EDEN, 2011:** Heat shock proteins are no DAMPs, rather 'DAMPERS'. *Nat Rev Immunol.* **11**(8), 565. ISSN 1474-1733.
7. **BORDESSOULE, GAULARD a MASON, 1990:** Preferential localisation of human lymphocytes bearing gamma delta T cell receptors to the red pulp of the spleen. *J Clin Pathol.* **43**(6), 461-464. ISSN 0021-9746.
8. **BORN a kol., 2010:** Analysis of $\gamma\delta$ T Cell Functions in the Mouse. *J Immunol.* **184**(8), 4055-4061. ISSN 0022-1767.
9. **BRANDES, WILLIMAN a MOSER, 2005:** Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science.* **309**(5732), 264-268. ISSN 0036-8075.
10. **BROWN a kol., 2006:** Ontogeny of T lymphocytes and intestinal morphological characteristics in neonatal pigs at different ages in the postnatal period. *J ANIM SCI.* **84**(3), 567-578. ISSN 0021-8812.
11. **BUTLER a kol., 2006:** Development of the neonatal B and T cell repertoire in swine: implications for comparative and veterinary immunology. *Vet. Res.* **37**(3), 417-441. ISSN 0928-4249.
12. **BUTLER a ŠINKORA, 2013:** The enigma of the lower gut-associated lymphoid tissue (GALT). *J Leukoc Biol.* **94**(2), 259-270. ISSN 1938-3673.
13. **CHEN a kol., 1989:** TCR3: a third T-cell receptor in the chicken. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**(7), 2351-2355. ISSN 1091-6490.
14. **CHEN a kol., 1994:** T cell development in chicken. Symposium: Current Advances in Avian Immunology. *Poult Sci.* **73**(7), 1012-1018. ISSN 0032-5791.
15. **CHEN, 2002:** Comparative biology of gamma delta T cells. *Science progress.* **85**(4), 347-358. ISSN: 0036-8504.
16. **CHENG a kol., 2008:** Mouse $\gamma\delta$ T cells are capable of expressing MHC class II molecules, and of functioning as antigen-presenting cells. *J Neuroimmunol.* **203**(1), 3-11. ISSN: 0165-5728.
17. **CICCARESE, LANAVE a SACCONI, 1997:** Evolution of T-Cell Receptor Gamma and Delta Constant Region and Other T-Cell-Related Proteins in the Human-Rodent-Artiodactyl Triplet. *Genetics.* **145**(2), 409-419. ISSN 0016-6731.
18. **COLLINS a kol., 1998:** Gammadelta T cells present antigen to CD4⁺ alphabeta T cells. *J Leukoc Biol.* **63**(6), 707-714. ISSN 1938-3673.
19. **CRISCITIELLO a kol., 2010:** Evolutionarily conserved TCR binding sites, identification of T cells in primary lymphoid tissues, and surprising trans-rearrangements in nurse shark. *J Immunol.* **184**(12), 6950-6960. ISSN 0022-1767.

20. **DAVISON, 2003:** The immunologists' debt to the chicken. *Br Poult Sci.* **44**(1),6-21. ISSN 1466-1799.
21. **DE BRUIN a kol., 1997:** Establishment and characterization of porcine cytolytic cell lines and clones. *Vet Immunol Immunopathol.* **59**(3-4), 337-347. ISSN 0165-2427.
22. **DEJBAKSH-JONES a kol., 2001:** Clonable progenitors committed to the T lymphocyte lineage in the mouse bone marrow; use of an extrathymic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**(13), 7455-7460. ISSN 1091-6490.
23. **DIXON a HUMPHREY, 1967:** *ADVANCES IN IMMUNOLOGY.* New York: Academic Press, 1967. sv. 6. ISBN 9780080577821.
24. **DUDLEY a kol., 1995:** $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells can share a late common precursor. *Cur Biol.* **5**(6), 659-669. ISSN 0960-9822.
25. **DUNON, COOPER a IMHOF, 1993:** Migration patterns of thymus-derived gamma delta T cells during chicken development. *Eur. J. Immunol.* **23**(10), 2545-2550. ISSN 0014-2980.
26. **DUNON a kol., 1998:** Renewal of thymocyte progenitors and emigration of thymocytes during avian development. *Dev Comp Immunol.* **22**(3), 279-87. ISSN 0145-305X.
27. **DVOŘÁKOVÁ, 2009:** *Funkční a genomické vlastnosti $\gamma\delta$ klonů T lymfocytů.* Brno, 2009. Diplomová práce. Masarykova univerzita. Fakulta přírodovědecká.
28. **EFENBERK, 2010:** *Analýza molekulárních markerů lymfoproliferativních onemocnění.* Olomouc, 2010. Diplomová práce. Palackého univerzita. Fakulta přírodovědecká.
29. **FOELL a kol., 2007:** S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol.* **81**(1), 28-37. ISSN 1938-3673.
30. **FÖLDI M. a FÖLDI E., 2014:** *Lymfologie: Překlad 7. vydání.* Přeložil Sarlon. 1. české vyd. Praha: Grada Publishing, a. s., 2014. ISBN 978-3-437-45323-6.
31. **GARFIAS, 2011:** Importance of gamma delta T lymphocytes in the bovine immune response. *Vet. Méx.* **42**(1), 65-75. ISSN 0301-5092.
32. **GERBER a kol., 1999:** IL-4-producing gamma delta T cells that express a very restricted TCR repertoire are preferentially localized in liver and spleen. *J Immunol.* **163**(6), 3076-3082. ISSN 0022-1767.
33. **GÖBEL, CHEN a COOPER, 1996:** Expression of an avian CD6 candidate is restricted to alpha beta T cells, splenic CD8⁺ gamma delta T cells and embryonic natural killer cells. *Eur J Immunol.* **26**(8), 1743-1747. ISSN 0022-1767.
34. **GUZMAN a kol., 2012:** Bovine $\gamma\delta$ T cells: Cells with multiple functions and important roles in immunity. *Vet Immunol Immunopathol.* **148**(1-2), 161-167. ISSN 0165-2427.
35. **GUZMAN a kol., 2014:** Bovine $\gamma\delta$ T cells are a major regulatory T cell subset. *J Immunol.* **193**(1), 208-222. ISSN: 0022-1767.
36. **HAAS a kol., 2012:** Development of Interleukin-17-Producing $\gamma\delta$ T Cells Is Restricted to a Functional Embryonic Wave. *Immunity.* **37**(1), 48-59. ISSN 1074-7613.
37. **HASSAN a RASOOL, 2014:** The Hassal of Thymus: Hassals Corpuscle Histological and Histopathological Perspective. *Sch. J. App. Med. Sci.* **2**(1B),147-148. ISSN 2347-954X.
38. **HAYDAY a GIBBONS, 2001:** Regulated T-cell development: a victim of multiple conspiracies. *Immunology.* **104**(1), 8-10. ISSN 1365-2567.
39. **HERRIN a COOPER, 2010:** Alternative adaptive immunity in jawless vertebrates. *J Immunol.* **185**(3), 1367-1374. ISSN 0022-1767.
40. **HIMOUDI a kol., 2012:** Human $\gamma\delta$ T Lymphocytes Are Licensed for Professional Antigen Presentation by Interaction with Opsonized Cells. *J Immunol.* **188**(4), 1708-1716. ISSN 0022-1767.

41. **HODGES a kol., 2002:** Diagnostic role of tests for T cell receptor (TCR) genes. *J Clin Pathol.* **56**, 1-11. ISSN 0021-9746.
42. **HOŘEJŠÍ a kol., 2013:** *Základy imunologie.* 5. vyd. Praha: TRITON, 2013. ISBN: 978-80-7387-713-2.
43. **ISHIKAWA a kol., 1999:** New gut associated lymphoid tissue "cryptopatches" breed murine intestinal intraepithelial T cell precursors. *Immunol Res.* **20**(3), 243-250. ISSN 0257-277X.
44. **JAMESON a kol., 2004:** A Keratinocyte-Responsive $\gamma\delta$ TCR Is Necessary for Dendritic Epidermal T Cell Activation by Damaged Keratinocytes and Maintenance in the Epidermis. *J Immunol.* **172**(6), 3573-3579. ISSN 0022-1767.
45. **JANEWAY a kol., 2001:** *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.* 5. vyd. New York: Garland Publishing, 2001. ISBN-10: 0-8153-3642-X.
46. **JANKOVIĆ a kol., 1975:** Immunological capacity of the chicken embryo. I. Relationship between the maturation of lymphoid tissues and the occurrence of cell-mediated immunity in the developing chicken embryo. *Immunology.* **29**(3), 497-508. ISSN 1365-2567.
47. **JIN a DONG, 2013:** IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerg Microbes Infect.* Online first. ISSN 2222-1751.
48. **JOACHIMS a kol., 2006:** Human $\alpha\beta$ a $\gamma\delta$ Thymocyte Development: TCR Gene rearrangements, Intracellular TCR β Expression, and $\gamma\delta$ Developmental Potential – Differences between Men and Mice. *J Immunol.* **176**(3), 1543-1552. ISSN 0022-1767.
49. **KATO a kol., 1992:** CD48 is a counter-receptor for mouse CD2 and is involved in T cell activation. *JEM.* **176**(5), 1241-1249. ISSN 0022-1007.
50. **KAUFMANN, 1996:** Gamma/delta and other unconventional T lymphocytes: What do they see and what do they do? *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**(6), 2272-2279. ISSN 1091-6490.
51. **KHAN, HASHIMOTO a ASADUZZMAN, 1998:** Development of T-cell sub-populations in postnatal chicken lymphoid organs. *VET ARHIV.* **68**(5), 183-189. ISSN 0372-5480.
52. **KISHISHITA a NAGAWA, 2013:** Evolution of adaptive immunity: Implications of a third lymphocytes lineage in lampreys. *BioEssays.* **36**(3), 244-250. ISSN 1521-1878.
53. **KLEIN a kol., 2003:** T lymphoid differentiation in human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**(11), 6747-6752. ISSN 1091-6490.
54. **KOSKELA, ARSTILA a LASSILA, 1998:** Costimulatory function of CD28 in avian gammadelta T cells is evolutionarily conserved. *Scand J Immunol.* **48**(6), 635-641. ISSN 0022-1767.
55. **KRANGEL a kol., 1990:** A distinct wave of human T cell receptor gamma/delta lymphocytes in the early fetal thymus: evidence for controlled gene rearrangement and cytokine production. *JEM.* **172**(3), 847-859. ISSN 0022-1007.
56. **LIN a kol., 1999:** Autospecific $\gamma\delta$ thymocytes that escape negative selection find sanctuary in the intestine. *J Clin Invest.* **104**(9), 1297-1305. ISSN 0021-9738.
57. **MACHUGH a kol., 1997:** Identification of two distinct subsets of bovine gamma delta T cells with unique cell surface phenotype and tissue distribution. *Immunology.* **92**(3), 340-345. ISSN 1365-2567.
58. **MACKAY, BEYA a MATZINGER, 1989:** Gamma/delta T cells express a unique surface molecule appearing late during thymic development. *Eur J Immunol.* **19**(8), 1477-1483. ISSN 0022-1767.
59. **MESTAS a HUGHES, 2004:** Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human. *J Immunol.* **172**(5), 2731-2738. ISSN 0022-1767.

60. **MORITA, MARIUZZA a BRENNER, 2000:** Antigen recognition by human gamma delta T cells: pattern recognition by the adaptive immune system. *Springer Semin Immunopathol.* **22**(3), 191-217. ISSN 0344-4325.
61. **O'BRIEN a BORN, 2010:** $\gamma\delta$ T Cell Subsets: A Link Between TCR and Function? *Semin Immunol.* **22**(4), 193-198. ISSN 1044-5323.
62. **PANCZAK a kol., 2013:** *Lékařská biologie a genetika (III. díl)*. Praha: Karolinum, 2013, ISBN 978-80-246-2415-0.
63. **PANG a kol., 2012:** Understanding the complexity of $\gamma\delta$ T-cell subsets in mouse and human. *Immunology.* **136**(3), 283-290. ISSN 1365-2567.
64. **PIEPER, METHNER a BERNDT, 2008:** Heterogeneity of avian gammadelta T cells. *Vet Immunol Immunopathol.* **124**(3-4), 241-252. ISSN 0165-2427.
65. **PIEPER, METHNER a BERNDT, 2011:** Characterization of Avian $\gamma\delta$ T-Cell Subsets after Salmonella enterica Serovar Typhimurium Infection of Chicks. *Infect. Immun.* **79**(2), 822-829. ISSN 0019-9567.
66. **PLATTNER a HOSTETTER, 2011:** Comparative gamma delta T cell immunology: a focus on mycobacterial disease in cattle. *Vet Med Int.* Online first. ISSN 2042-0048.
67. **PRICE a HOPE, 2009:** Enhanced secretion of interferon- γ by bovine $\gamma\delta$ T cells induced by coculture with Mycobacterium bovis-infected dendritic cells: evidence for reciprocal activating signals. *Immunology.* **126**(2), 201-208. ISSN 1365-2567.
68. **QI a kol., 2009:** Enhanced development of CD4⁺ gammadelta T cells in the absence of Itk results in elevated IgE production. *Blood.* **114**(3), 564-571. ISSN 0006-4971.
69. **QUERE, COOPER a THORBECKE, 1990:** Characterization of suppressor T cells for antibody production by chicken spleen cells. I. Antigen-induced suppressor cells are CT8⁺, TcR1⁺ (gamma delta) T cells. *Immunology.* **71**(4), 517-522. ISSN 1365-2567.
70. **RIBOT a kol., 2009:** CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon- γ and interleukin 17-producing $\gamma\delta$ T cell subsets. *Nature Immunol.* **10**(4), 427-436. ISSN 1529-2908.
71. **RITTER a kol., 1981:** The human thymus microenvironment: in vivo identification of thymic nurse cells and other antigenically-distinct subpopulations of epithelial cells. *Immunology.* **44**(3), 439-446. ISSN 1365-2567.
72. **ROGERS a kol., 2005:** $\gamma\delta$ T Cell Function Varies with the Expressed WC1 Coreceptor. *J Immunol.* **174**(1), 3386-3393. ISSN 0022-1767.
73. **ROMBOUT a kol., 2005:** Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.* **19**(5), 441-455. ISSN 1050-4648.
74. **SATO a kol., 1993:** Detailed characterization of gamma delta T cells within the organs in mice: classification into three groups. *Immunology.* **80**(3), 380-387. ISSN 1365-2567.
75. **SÄYNÄJÄKANGAS, UCHIDA a VAINIO, 2009:** Differential Gene Expression in CD45⁺ Cells at Para-aortic Foci Stage of Chicken Haematopoiesis. *Scand J Immunol.* **70**(3), 288-294. ISSN 0300-9475.
76. **SCAPIGLIATI, 2013:** Functional aspects of fish lymphocytes. *Dev Comp Immunol.* **41**(2), 200-208. ISSN 0145-305X.
77. **SHRESTHA a kol., 2005:** Regulation of acquired immunity by gamma delta T-cell/dendritic-cell interactions. *Ann N Y Acad Sci.* **1062**, 79-94. ISSN 0077-8923.
78. **SOWDER a kol., 1988:** A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T γ/δ receptor. *JEM.* **167**(2), 315-322. ISSN 0022-1007.

79. **STUART a kol., 2009:** *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood*. 7. vyd. Philadelphia: Saunders Elsevier. sv. 1. ISBN: 978-1-4160-3430-8.
80. **ŠINKORA a kol., 2000:** Early ontogeny of thymocytes in pigs: sequential colonization of the thymus by T cell progenitors. *J Immunol.* **165**(4), 1832-1839. ISSN 0022-1767.
81. **ŠINKORA a kol., 2005:** Development of $\gamma\delta$ thymocyte subsets during prenatal and postnatal ontogeny. *Immunology.* **155**(4), 544-555. ISSN 1365-2567.
82. **ŠINKORA a kol., 2007:** Two Groups of Porcine TCR $\gamma\delta^+$ Thymocytes Behave and Diverge Differently. *J Immunol.* **178**(2), 711-719. ISSN: 0022-1767.
83. **ŠTAUD a FENDRICH, 1996:** MORFOLOGIE A FYZIOLOGIE PLACENTY, Morphology and physiology of the placenta. *GYNEKOLOG: časopis ženských lékařů.* **12**(4), 127. ISSN 1210-1133.
84. **ŠTĚPÁNOVÁ a ŠINKORA, 2012:** The expression of CD25, CD11b, SWC1, SWC7, MHC-II, and family of CD45 molecules can be used to characterize different stages of $\gamma\delta$ T lymphocytes in pigs. *Dev Comp Immunol.* **36**(4), 728-740. ISSN 0145-305X.
85. **ŠTĚPÁNOVÁ a ŠINKORA, 2013:** Porcine $\gamma\delta$ T lymphocytes can be categorized into two functionally and developmentally distinct subsets according to expression of CD2 and level of TCR. *J Immunol.* **190**(5), 2111-2020. ISSN 0022-1767.
86. **TAKAMATSU, DENYER a WILEMAN, 2002:** A sub-population of circulating porcine gammadelta T cells can act as professional antigen presenting cells. *Vet Immunol Immunopathol.* **87**(3-4), 223-224. ISSN 0165-2427.
87. **TOKA, KENNEY a GOLDE, 2011:** Rapid and Transient Activation of $\gamma\delta$ T Cells to IFN- γ Production, NK Cell-Like Killing, and Antigen Processing during Acute Virus Infection. *J Immunol.* **186**(8), 4853-4861. ISSN 0022-1767.
88. **TOMAN a kol., 2000:** *Veterinární imunologie*. Praha: Grada Publishing, spol. s. r. o. 2000, ISBN 80-7169-727-3.
89. **TOMAN a kol., 2009:** *Veterinární imunologie*. 2. vydání. Praha: Grada Publishing, a. s., 2009. ISBN 978-80-247-6762-8.
90. **TURCHINOVICH a PENNINGTON, 2011:** T cell receptor signalling in $\gamma\delta$ cell development: strength isn't everything. *Trends Immunol.* **32**(12), 1-7. ISSN 1471-4906.
91. **ULMER-FRANCO a kol., 2012:** Hatching egg and newly hatched chick yolk sac total IgY content at 3 broiler breeder flock ages. *Poul Sci.* **91**(3), 758-764. ISSN 0032-5791.
92. **VANTOUROUT a HAYDAY, 2013:** Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat Rev Immunol.* **13**(2), 88-100. ISSN 1474-1733.
93. **VROOM a kol., 1991:** Tissue distribution of human $\gamma\delta$ T cells: No evidence for general epithelial tropism. *J Clin Pathol.* **44**(12), 1012-1017. ISSN 0021-9746.
94. **YANG a PARKHOUSE, 1996:** Phenotypic classification of porcine lymphocytes subpopulations in blood and lymphoid tissues. *Immunology.* **89**(1), 76-83. ISSN 1365-2567.
95. **ZHENG a kol., 2013:** $\gamma\delta$ -T cells: an unpolished sword in human anti-infection immunity. *Cell Mol Immunol.* **10**(1), 50-57. ISSN 1672-7681.
96. **ZHENG a YANG, 2014:** The Role of the $\gamma\delta$ T Cell in Allergic Diseases. *JEM*. Online first. ISSN 0022-1007.
97. **ZIEGLER a kol., 2014:** Human peripheral CD4 $^+$ V δ 1 $^+$ $\gamma\delta$ T cells can develop into $\alpha\beta$ T cells. *Front Immunol.* **17**(5), 645. ISSN 1664-3224.

Webové stránky

KIMBALL, 2001: B and T cells. In: *Kimball 's Immunology Pages* [online, cit. 10. 2. 2015]. Dostupné z: www.dls.ym.edu.tw/ol_biology2/ultranet/Welcome.html.

Zdroje obrázků

1. **CANN, 2010:** Thymus. In: *The Anatomy of the Immune System* [online]. Poslední aktualizace: květen, 2007 [cit. 8. 3. 2015]. Dostupné z: www.microbiologybytes.com/iandi/2b.html.
2. **FURUKAWA a kol., 2011:** Toxicological Pathology in the Rat Placenta. *Toxicol Pathol.* [online]. Publikováno online: červen, 2011 [cit. 8. 3. 2015]. ISSN 1881915X. Dostupné z: doi: 10.1293/tox.24.95.
3. **GERTNER a kol., 2007:** Lymphocytes: Gamma Delta. In: *eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.* [online]. Publikováno online: červen, 2007 [cit. 9. 3. 2015]. Dostupné z: doi: 10.1002/9780470015902.a0001195.pub2.
4. **HERRIN a COOPER, 2010:** Alternative adaptive immunity in jawless vertebrates. *J Immunol.* **185**(3), 1367-1374. ISSN 1550-6606.
5. **KAZEN a ADAMS, 2011:** Evolution of the V, D, and J gene segments used in the primate gammadelta T-cell receptor reveals a dichotomy of conservation and diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**(29), 332-340. ISSN 1091-6490.
6. **SUMARIA a kol., 2011:** Cutaneous immunosurveillance by self-renewing dermal $\gamma\delta$ T cells. *JEM.* **208**(3), 505-518. ISSN 0022-1007.