

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Úloha proteinkinázy LCK ve vývoji T-lymfocytů

Bakalářská práce

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2024/2025

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Lea Grossmannová**  
Osobní číslo: **C22192**  
Studijní program: **B0914P360019 Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**  
Téma práce: **Úloha proteinkinázy LCK ve vývoji T lymfocytů**  
Téma práce anglicky: **Role of LCK Protein Kinase in T-cell Development**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

1. Seznamte se s literaturou týkající se vývoje autoreaktivních T lymfocytů a jejich proteinkinázy LCK.
2. Vypracujte literární rešerši o proteinkináze LCK, její úloze a úloze CD8 a CD4 koreceptorů v signalizaci a vývoji T lymfocytů.
3. Informace zpracujte přehledně, použijte také obrázky, schémata, grafy a ze získaných literárních údajů vytvořte závěry, jak budou tyto nové informace o vývoji T lymfocytů využity při výzkumu autoreaktivních dějů.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2024**

Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2025**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.** v.r.  
děkan

L.S.

**prof. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.** v.r.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem Úloha proteinkinázy LCK ve vývoji T lymfocytů jsem vypracoval(a) samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil(a), jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl(a) jsem seznámen(a) s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 16. 6. 2025

Lea Grossmannová v. r.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce se zabývá vývojem autoreaktivních T-lymfocytů a jejich proteinkinázami LCK. Jsou zde uvedeny mechanismy imunologické tolerance, vývoj regulačních T-lymfocytů v thymu i mimo něj, úloha T-lymfocytů se zaměřením na regulační T-lymfocyty, vývoj a úskali vzniku autoreaktivních T-lymfocytů, a jak tyto procesy ovlivňuje proteinkináza LCK. Také je zde uvedeno, jak vazba koreceptorů CD8 a CD4 na proteinkinázu LCK ovlivňuje jejich autoreaktivitu, ať už v síle vazby nebo v počtu autoreaktivních receptorů, a nakonec rozdílný vliv proteinkinázy LCK na thymocyty a zralé T-lymfocyty.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

autoreaktivní T-lymfocyty, proteinkináza LCK, thymocyty, CD8, CD4, vývoj T-lymfocytů, imunitní tolerance

## **TITLE**

The role of protein kinase LCK in the development of T-lymphocytes

## **ANNOTATION**

This bachelor thesis deals with the development of autoreactive T-lymphocytes and their proteokinases LCK. In this thesis are the mechanisms of immunological tolerance, the development of regulatory T-lymphocytes in the thymus and outside the thymus, the role of T-lymphocytes with a focus on regulatory T-lymphocytes, the development and difficulties of autoreactive T-lymphocytes and how these processes are affected by proteokinases LCK are presented. Also discussed is the role of the LCK proteinkinase itself, its role in individual CD8 and CD4 coreceptors, how binding of CD8 and CD4 coreceptors to proteinkinase LCK affects their autoreactivity, either in the strength of binding or in number of autoreactive receptors, and finally the differential impact of the LCK proteinkinase on thymocytes and mature T-lymphocytes.

## **KEYWORDS**

autoreactive T-lymphocytes, proteinkinase LCK, thymocytes, CD8, CD4, development of T-lymphocytes, immune tolerance

# OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ.....	7
SEZNAM ZKRATEK.....	8
ÚVOD.....	9
1 Regulační T-lymfocyty .....	10
1.1 Mechanismy imunologické tolerance .....	10
1.2 Vývoj regulačních T-lymfocytů v thymu a mimo něj.....	12
1.2.1 Struktura receptoru TCR.....	15
1.2.2 Vývoj receptoru TCR.....	18
1.3 Úloha T-lymfocytů.....	21
1.3.1 Pomocné T-lymfocyty.....	22
1.3.2 Cytotoxické T-lymfocyty .....	24
1.3.3 Regulační T-lymfocyty .....	25
1.4 Autoreaktivní T-lymfocyty .....	28
1.4.1 Nebezpečné autoreaktivní T-lymfocyty .....	28
1.4.2 Bezpečné autoreaktivní T-lymfocyty .....	30
2 Proteinkináza LCK .....	32
2.1 Kinázy .....	32
2.2 Proteinkinázy .....	32
2.3 Proteinkináza LCK .....	34
2.4 Proteinkináza LCK u T-lymfocytů.....	37
ZÁVĚR .....	41
POUŽITÁ LITERATURA.....	42

## SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Vývoj T-lymfocytů .....	13
Obrázek 2: Struktura TCR .....	16
Obrázek 3: Prostorové vyobrazení TCR .....	17
Obrázek 4: Struktura TCR $\alpha\beta$ a TCR $\gamma\delta$ a struktura CD4 a CD8 .....	18
Obrázek 5: Vývoj TCR-CD3 komplexu .....	19
Obrázek 6: Recyklace TCR-CD3 komplexu.....	21
Obrázek 7: Homeostatická signalizace CD4 a CD8, povrchová exprese TCR na CD4 a CD8 lymfocytech, autoreaktivní signalizace TCR pro CD4, CD8 a CD8.4 lymfocyty.....	31
Obrázek 8: Struktura proteinkinázy LCK.....	35
Obrázek 9: Aktivace proteinkinázy LCK.....	36
Obrázek 10: Množství mRNA u CD8 $\alpha'$ pro thymocyty a Tc-lymfocyty a množství proteinu u CD8 $\alpha'$ pro thymocyty a Tc-lymfocyty .....	38
Obrázek 11: Síla vazby koreceptor-LCK pro jednotlivé koreceptory a porovnání síly signalizace TCR $\zeta$ , ZAP70 a tyrozinu u CD8 a CD8.4 .....	39
Obrázek 12: Porovnání velikostí CD4, CD8 a CD8.4 prostřednictvím hmotnosti sušiny, porovnání velikostí CD4, CD8 a CD8.4 prostřednictvím průtokové cytometrie (forward scatter), množství TCR $\beta$ u CD8 a CD8.4, množství exprimovaného ZAP70 u CD8 a CD8.4 .....	39

## SEZNAM ZKRATEK

- (APC) antigen prezentující buňky
- (ATP) adenosin trifosfát
- (C doména) konstantní doména T-lymfocytárního řetězce
- (CDK) cyklin-dependentní kináza
- (CDR) regiony určující komplementaritu – „Complementarity-determining regions“
- (CSK) C-terminální Src kináza
- (CTLA-4) cytotoxický T-lymfocytární antigen 4
- (FasL) Fas ligand
- (FOXP3) „Forkhead box P3“
- (HLA) lidské leukocytární antigeny
- (IL) interleukiny
- (INF- $\gamma$ ) interferon gama
- (LAT) spojovací článek pro aktivaci T-lymfocytů – „Linker for activation of T cells“
- (LCK) tyrozinkináza specifická pro lymfocyty – „lymphocyte-specific tyrosine kinase“
- (MHC) hlavní histokompatibilní komplex
- (PD1) protein programované buněčné smrti, tj. apoptózy 1
- (pMHC) komplex peptidu navázaném na MHC molekule
- (SH) Src homologová doména
- (T-bet) soubor genů obsahujících doménu T
- (Tc) cytotoxické T-lymfocyty
- (TCF-1) T-lymfocytární faktor 1
- (TCR) T-lymfocytový receptor
- (Tfh) folikulární pomocné T-lymfocyty
- (TGF- $\beta$ ) transformační růstový faktor beta
- (Th) pomocné T-lymfocyty
- (Treg) regulační T-lymfocyty
- (V doména) variabilní doména T-lymfocytárního řetězce
- (ZAP70) řetězec zeta spojený s proteinkinázou 70

## ÚVOD

Cílem této práce je seznámit s vývojem autoreaktivních T-lymfocytů a jejich specifické proteinkinázy LCK, seznámit podrobněji s proteinkinázou LCK, její úlohou a úlohou koreceptorů CD8 a CD4 v signalizaci a vývoji T-lymfocytů. Proteinkináza LCK je enzym, který fosforylací proteinů pomáhá k aktivaci signalizace T-lymfocytárního receptoru. Proteinkináza LCK je spojená s CD8 a CD4 koreceptory, které se podílejí na této signalizaci. Schopnost aktivovat signalizaci T-lymfocytárního receptoru se v průběhu vývoje lymfocytu liší, stejně tak i vazba na proteinkinázu LCK. Proteinkináza LCK se také podílí na autoreaktivitě T-lymfocytů, ať už jsou nebezpečné a působí vznik autoimunitních onemocnění, nebo jsou bezpečné a pomáhají k udržování periferní tolerance. Bezpečnost autoreaktivních T-lymfocytů záleží na autoreaktivní toleranci. Ta je určována množstvím receptorů reagujících s vlastními strukturami a silou jejich vazby. Mezi přirozeně bezpečné autoreaktivní T-lymfocyty patří regulační T-lymfocyty, které díky této autoreaktivitě mohou regulovat buňky imunitního systému. Regulační T-lymfocyty nejsou jediné T-lymfocyty, které jsou autoreaktivní. Protože všechny T-lymfocyty mají určitou míru bezpečné autoreaktivity. Tato míra bezpečné autoreaktivity je ovlivněna rozdíly v signalizaci, počtu receptorů a vazbě koreceptorů CD4 a CD8 na proteinkinázu LCK.

# 1 Regulační T-lymfocyty

T-lymfocyty jsou společně s B-lymfocyty zařazeny do skupiny lymfocytů, které patří mezi leukocyty a jsou součástí imunitního systému. Imunitní systém tvoří mechanismy, které udržují vícebuněčný organismus v bezpečí před patogenními agens. Imunitní systém spolupracuje s lymfatickým systémem, který se skládá z lymfatických orgánů, uzlin a cest. Lymfatický systém dále obsahuje nebo je tvořený ze specializovaných buněk (imunocytů) a jejich produktů (protilátky, cytokiny, komplementy), z přirozených bariér (kůže, sliznice) a fyziologických funkcí (kašel, deskvamace epitelu). Imunitní systém se rozděluje na přirozenou a adaptivní (specifickou) imunitu. Do přirozené imunity patří makrofágy a neutrofilové, kteří jsou první obrannou linií proti patogenům. Slouží k eliminaci známých mikroorganismů, jako jsou bakteriální infekce. O složitější patogeny, které nebyly rozpoznány přirozenou imunitou se postará adaptivní imunita, do které patří lymfocyty a jejich produkty a protilátky (Janeway a kol., 2001; Khan a kol., 2018; Nicholson, 2016; Trojan, 2003).

Lymfocyty lze nalézt v krvi, lymfě a v lymfatických tkáních, ale také i v ostatních tkáních, protože díky jejich dobré propustnosti skrz buněčnou membránu mohou cestovat po celém těle. Toto umožňuje lymfocytům setkat se s antigen prezentujícími buňkami (APC). APC jsou buňky obsahující antigeny cizích patogenů, vlastních buněk nebo oba tyto typy antigenů. A díky tomuto kontaktu s APC mohou lymfocyty ochraňovat organismus před patogeny a dohlížet na funkčnost buněk v organismu. V tomto textu se budeme zabývat regulačními T-lymfocyty (Treg) a jejich bezpečnou a nebezpečnou autoreaktivitou. Nebezpečně autoreaktivní T-lymfocyty jsou T-lymfocyty, které reagují na vlastní antigeny a pokud nejsou regulovány mohou způsobovat autoimunitní onemocnění. Bezpečně autoreaktivní T-lymfocyty jsou právě ty T-lymfocyty, které reagují na vlastní antigeny, ale jejich regulované množství nezpůsobí vznik autoimunitních onemocnění (Rosenblum a kol., 2015).

## 1.1 Mechanismy imunologické tolerance

Součástí imunitního systému organismu jsou také obranné mechanismy, které zabraňují vzniku autoimunity. Prvním z nich je imunologická tolerance. Ta je zprostředkována adaptivní imunitou, jejíž nejdůležitější částí jsou T-lymfocytární receptory (TCR) a B-lymfocytární receptory. Díky imunologické toleranci se eliminují nebo inaktivují lymfocyty, jejichž receptory rozpoznávají vlastní antigeny jako hrozbu a reagují tak na ně. Imunologická tolerance je zajišťována centrální tolerancí a periferní tolerancí. Centrální tolerance je zajištěna při vývoji T-lymfocytu v thymu. V thymu dochází ke kontaktu T-lymfocytů s makrofágy a dendritickými

buňkami, které nesou hlavní histokompatibilní komplex (MHC) I. nebo II. třídy. Pokud se T-lymfocyty budou vázat na vlastní antigen v komplexu s MHC, tak nebudou schopny rozeznávat vlastní buňky a budou určeny k apoptóze. Další diferenciací se T-lymfocyty setkávají s Treg a medulárními thymovými epiteliálními buňkami (mTEC), které také budou prezentovat vlastní antigeny. Treg produkují imunosupresivní cytokiny IL-10 a transformační růstový faktor beta (TGF- $\beta$ ) a potlačují tak ostatní T-lymfocyty. Dále tlumí aktivitu APC stimuluje T-lymfocyty, inhibují T-lymfocytární odpovědi pomocí cytotoxického T-lymfocytárního antigenu 4 (CTLA-4) nebo protein programované buněčné smrti, to je apoptózy 1 (PD1) a také produkují granzym B a perforin, které zabijí myeloidní buňky. Medulární thymové epiteliální buňky (mTEC) regulují nebezpečnou autoreaktivitu T-lymfocytů pomocí autoimunitního regulačního transkripčního faktoru (AIRE) (Khan a kol., 2018; Nüssing a kol., 2020; Waldmann, 2016).

Pokud nebezpečně autoreaktivní T-lymfocyty projdou mechanismem centrální tolerance, přechází do periferních oblastí. V perifériích se T-lymfocyty podrobují mechanismu periferní tolerance, která se skládá z následujících jevů (Khan a kol., 2018; Waldmann, 2016).

**Anergie** je jev, při kterém lymfocyty, které rozpoznávají vlastní antigeny, přestávají plnit svoji funkci. Anergie vzniká, pokud signál antigenního podnětu je přijímán po delší dobu, anebo pokud je přijímán signál z chybějícího TCR (Khan a kol., 2018; Nüssing a kol.).

Dalším jevem je **klonální ignorace**, při které nebezpečně autoreaktivní T-lymfocyty nereagují s vlastním antigenem, ale ignorují ho. Jedním z vysvětlení tohoto jevu je, že na povrchu APC je nedostačující množství antigenů k vyvolání aktivace T-lymfocytů, která by mohla vyvolat autoimunitu. Dalším důvodem může být neschopnost T-lymfocytů pronikat do tkání, mimo ty lymfocytární. Anebo při expresi molekul Fas a Fas ligandu (FasL), které jejich spojením vyvolají apoptózu (Khan a kol., 2018; Nüssing a kol.).

Paradoxem je, že T-lymfocyt exprimuje Fas i FasL a může tak dojít k jejich vzájemné interakci, což by vedlo k zániku T-lymfocytu. Tomuto jevu se říká **delece** (Khan a kol., 2018; Nüssing a kol.).

Další jev se nazývá **inhibice**, která je způsobena inhibitory TCR. Tyto inhibitory jsou CTLA-4 a PD1. CTLA-4 má stejnou strukturu jako CD28. B7 je protein lidského leukocytárního antigenu (HLA), který se na CTLA-4 váže s větší afinitou než na CD28. CD28 je důležitý při aktivaci T-lymfocytů. CTLA-4 je inhibován po aktivaci T-lymfocytu. Jakmile se na CTLA-4 naváže B7, dojde k odstranění a pohlcení komplexu. Tímto způsobem se sníží

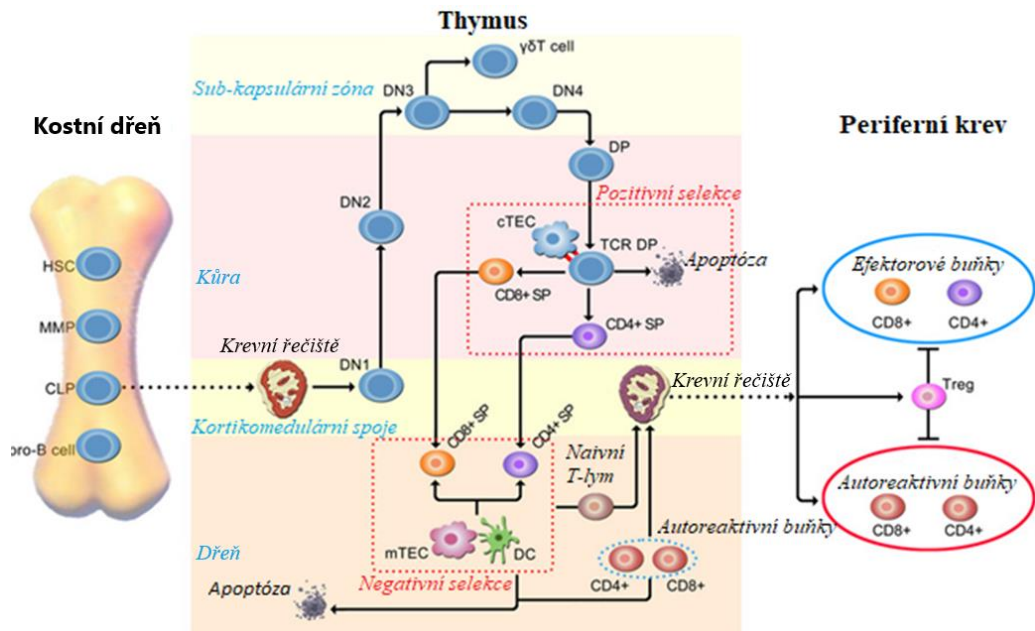
hladina B7 a tím zabrání interakci B7 s CD28. PD1 je další inhibiční receptor TCR. Po navázání ligandu na PD1 dojde k fosforylaci s tyrozinovými imunoreceptorovými inhibitory (ITIM) a s tyrozinovými imunoreceptorovými přepínači (ITSM). To má za následek fosforylaci a snížení signalizace TCR prostřednictvím defosforylace signálních meziproduktů. Dalším inhibičním receptorem je tlumič B- a T-lymfocytárního signálu (BTLA). Pokud se tlumič B- a T-lymfocytárního signálu zkříží s antigenním receptorem, povede to k jeho tyrozinové fosforylaci. Tyrozinová fosforylace vede k navázání tyrozinofosfatáz obsahujících Src homologovou doménu 2 (SH2), což způsobí útlum v produkci IL-2. Variabilní doména supresoru aktivujícího T-lymfocyty (VISTA) je další inhibiční receptor T-lymfocytů. Jeho nadměrná exprese vede k potlačení aktivace, proliferace a produkce cytokinů v T-lymfocytu. Lymfocyty aktivující gen 3 (LAG3) je inhibiční molekula přítomná na aktivovaných T-lymfocytech, NK-buňkách a dendritických buňkách. Interakce mezi lymfocyty aktivujícím genem 3 a ligandem MHC II. třídy tlumí cytotoxické T-lymfocyty. Doména obsahující T-lymfocytární imunoglobulin a mucin 3 (TIM-3) je poslední ze zástupců periferní tolerance. Podílí se na potlačení signalizace pomocných a cytotoxických T-lymfocytů. Pokud dojde ke kolokalizaci této domény pomocí receptorových fosfatáz CD45 a CD148, dochází k inhibici signalizace TCR (Khan a kol., 2018; Nüssing a kol.).

## **1.2 Vývoj regulačních T-lymfocytů v thymu a mimo něj**

Hematopoéza neboli krvetvorba je proces, při kterém vznikají nové krevní elementy. Hematopoéza probíhá v kostní dřeni, která obsahuje kmenové buňky. Kmenové buňky mají schopnost sebeobnovy a udržují tak stálý přísun krevních elementů do krve. Z nediferencovaných kmenových buněk se diferencují hematopoetické kmenové buňky, ze kterých následně vznikají multipotentní progenitorové buňky. Z multipotentních progenitorových buněk se diferencují oligopotentní progenitory, které se dále mohou diferencovat na linie myeloidní a lymfoidní. Z linie myeloidní vznikají trombocyty, granulocyty a monocyty. Z linie lymfoidní vznikají lymfocyty a přirození zabíječi (NK-buňky) (Riether a kol., 2014).

Vývoj T-lymfocytů je od ostatních je unikátní, protože zahrnuje vývoj nejen v kostní dřeni, ale i v thymu. Tento vývoj je popsán na obrázku 1. Vývoj zahrnuje významné změny, které vedou k vývoji specifického receptoru pro antigen TCR. Začátek hematopoezy je stejný jako u ostatních krevních elementů. Rozdíl nastává v lymfoidních oligopotentních progenitorech. Ty se diferencují na lymfocytární thymocytové progenitory, které exprimují povrchové markery CD27 a CD135. Lymfocytární thymocytové progenitory jsou následně

přeneseny krví až do thymu, kam vstupují přes kortikomedulární spoje. Kortikomedulární spoje se nachází na hranici kůry a dřene thymu. Lymfocytární thymocytové progenitory se ve dřeni dále diferencují na thymocyty (Anaya a kol., 2013; Horkova a kol., 2020; Sala a kol., 2023).



Obrázek 1: Vývoj T-lymfocytů (Wang a kol., 2015; upraveno)

Thymocyty putují z dřene až do kůry díky chemokinovému gradientu a po cestě procházejí třemi stádii dvojité negativity. V průběhu jednotlivých stádií dvojité negativity se sledují CD znaky na membráně thymocytu. Sleduje se CD4 a CD8. První stádium dvojité negativity nastává, když se na membráně thymocytu neobjeví CD4 a CD8. Thymocyty jsou tedy  $CD4^-$  a  $CD8^-$ . To aktivuje expresy transkripčního faktoru a začne druhé stádium dvojité negativity. Ve druhém stádiu dvojité negativity probíhá somatické přeskupení genů pro TCR, které vede k začátku třetího stádia dvojité negativity, kde probíhá selekce genů vhodných pro TCR. Po projití všemi třemi stádii dvojité negativity vzniká  $CD4^+$  a  $CD8^+$ , což se označuje za dvojitou pozitivitu. Po vstupu do dvojité pozitivitu prochází thymocyty prvním kontrolním bodem nazývaným pozitivní selekce (Anaya a kol., 2013; Horkova a kol., 2020; Sala a kol., 2023).

Pozitivní selekcí projdou jen ty thymocyty, které se neaktivují po kontaktu s vlastními antigeny na antigenních komplexech MHC I. nebo II. třídy, ale které jsou prezentovány na dendritických buňkách nebo makrofázích. Některé T-lymfocyty, i přestože reagují na vlastní antigeny, projdou pozitivní selekcí. Tato reakce na vlastní antigeny není dostatečně silná jako u nebezpečných autoreaktivních T-lymfocytů, které by způsobily autoimunní onemocnění. Takovéto T-lymfocyty se označují jako bezpečné autoreaktivní T-lymfocyty. Thymocyty, které

neprošly prvním kontrolním bodem, jsou určeny k apoptóze. K vývoji dvojité pozitivních thymocytů dochází v kůře thymu. Poté následuje druhý kontrolní bod ve dřeni thymu, při které se vyberou jen ty thymocyty, které mají kompletní molekulu TCR. Představí se jim různé antigeny od vlastních buněk, jako jsou mTEC a dendritické buňky. Tento proces se označuje jako negativní selekce, díky ní se z prošlých thymocytů stanou naivní T-lymfocyty. Celým tímto procesem až k naivním T-lymfocytům pojde asi je 10 % thymocytů. Zbýlých 90 % neprojde negativní selekcí a je zničeno při kontaktu s antigenním komplexem MHC (Anaya a kol., 2013; Horkova a kol., 2020; Sala a kol., 2023).

Aby mohly z thymocytů vznikat Treg, musí být již v thymu vystaveny určitým podmínkám. Jedna z podmínek je neúplná signalizace TCR, která podporuje vznik receptoru IL-2 (CD25). To vede k zahájení signalizace pomocí IL-2 nebo IL-15, která podporuje expresi transkripčního faktoru FOXP3. FOXP3 vytváří epigenetické a transkripční prostředí nezbytné pro získání Treg. Pokud by bylo po stimulaci TCR exprimováno malé množství FOXP3, aktivovala by se alternativní cytokinová signalizace, která by zajistila dokončení diferenciaci Treg. Další vývoj Treg závisí na jejich aviditě a afinitě molekulárních interakcí s TCR, který vyžaduje vyšší afinitu k vlastním antigenům. Tomuto jevu pomáhá kostimulace CD28, která podporuje tvorbu FOXP3. FOXP3 je nezbytný pro vývoj genů spojených s vývojem Treg a také je nezbytný pro zvýšení množství povrchových molekul jako je CTLA-4. Po dokončení diferenciaci Treg thymocytů se z nich stávají naivní Treg, které opustí thymus. Při vstupu do periferií začnou exprimovat receptor (CCR7), který je navede k sekundárním lymfatickým orgánům nebo do specifických tkání. Tato exprese je zprostředkována stimulací TCR antigeny, se kterými se naivní Treg dostane do kontaktu v periferiích a vede k transkripčním změnám. Transkripční změny mohou za expresi daných receptorů a za přesun naivního Treg (Delacher a kol., 2020; Malko a kol., 2022).

V sekundárních lymfatických orgánech se Treg diferencují do třech podskupin na základě exprese ligandu CD62 (CD62L) a T-lymfocytárního faktoru 1 (TCF-1), který podporuje dlouhověkost a sebeobnovu naivních a paměťových T-lymfocytů. Treg, které jsou TCF-1<sup>+</sup> a CD62L<sup>+</sup>, mají největší zastoupení (45-60 %) a označují se tak naivní Treg. Treg, které exprimují TCF-1<sup>-</sup> a CD62L<sup>-</sup> jsou zastoupeny až z 20 % a jejich nejčastější výskyt je v zásobárnách (pool) v lymfatických tkáních. TCF-1<sup>-</sup> a CD62L<sup>-</sup> označují efektorové Treg. Třetí podskupina může mít TCF-1 nebo CD62L pozitivní nebo negativní a je tak mezikrokem mezi úplnou pozitivitou nebo negativitou TCF-1 a CD62L (Delacher a kol., 2020; Malko a kol., 2022).

Cílem vývoje Treg v sekundárních lymfatických tkáních je vznik efektorových Treg z naivních Treg. Přeměna naivních pomocných T-lymfocytů na Treg probíhá díky stimulaci antigenem v přítomnosti cytokinů, jako je TGF- $\beta$  a IL-2. Cytokin TGF- $\beta$  podporuje tvorbu FOXP3 prostřednictvím kyseliny retinové, která indukuje expresi FOXP3 a její stabilizaci. Stabilizace je možná, díky demetylaci zesílených elementů v lokusu FOXP3. Cytokin IL-2 pomáhá ulehčit tuto diferenciaci zprostředkovanou TGF- $\beta$ . IL-2 přímo podporuje přežití a expanzi Treg a také podporuje inhibici vzniku Th17. Th17 jsou více popsány v kapitole Úloha T-lymfocytů (Delacher a kol., 2020; Malko a kol., 2022).

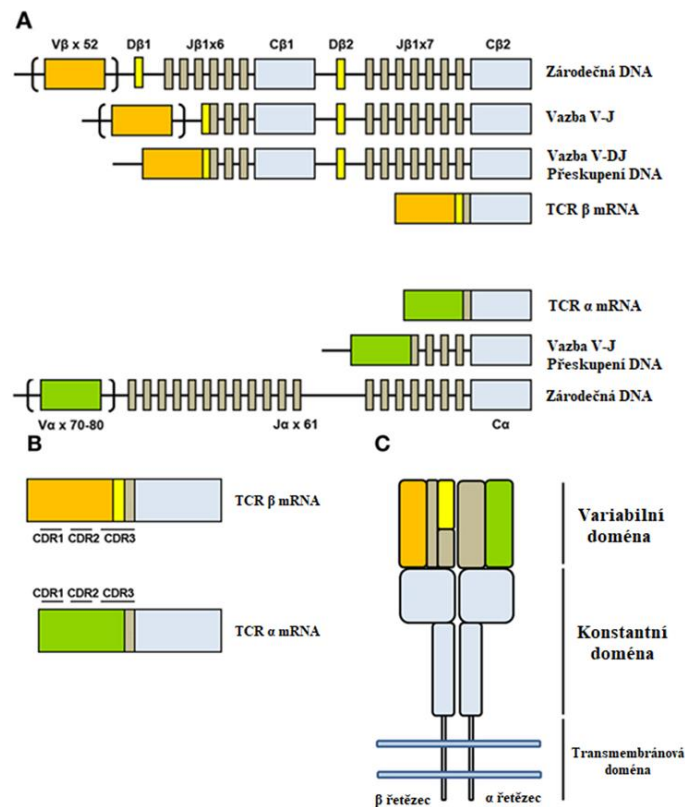
Diferenciace Treg musí probíhat v prostředí bez přítomnosti prozánětlivých cytokinů, jako je IL-6. V přítomnosti prozánětlivých cytokinů dochází k inhibici diferenciaci Treg a podporuje se diferenciaci Th17. V posledních letech přibývá důkazů o řízení diferenciaci Treg prostřednictvím hierarchie transkripčních faktorů. Tato hierarchie transkripčních faktorů se kromě FOXP3 skládá z proteinu indukujícím maturaci lymfocytů 1 (PRDM1 nebo BLIMP-1) a z interferonového regulačního faktoru 4 (IRF4). Při expresi obou transkripčních faktorů dochází ke zvýšené expresi různých povrchových markerů a dochází také k expresi IL-10. Pokud se naivní Treg přesunou z thymu rovnou do specifických tkání, vznikají v nich zásobárny Treg, které vytvářejí tkáňově specifické Treg. Mezi nejčastější tkáně, ve kterých se Treg usazují, jsou viscerální tuková tkáň, svaly, centrální nervová soustava, játra, ledviny, orgány reprodukčního systému a plíce (Delacher a kol., 2020; Malko a kol., 2022).

Treg mají vysokou míru proliferace a zlepšené supresorové funkce, které se projevují zvýšenou expresí povrchových markerů, jako je receptor pro zabíjácké buňky G1 (KLRG1) a CTLA-4. Efektorové Treg exprimují IL-10 a mohou se volně pohybovat po periferních tkáních, kde lokálně řídí imunitní a tkáňovou homeostázu (Delacher a kol., 2020; Malko a kol., 2022).

### **1.2.1 Struktura receptoru TCR**

Receptor TCR, který je na obrázku 2, se skládá z  $\alpha$  a  $\beta$  řetězce. Jeden řetězec TCR se skládá z extracelulární oblasti, transmembránové oblasti a krátkého cytoplazmatického konce. Extracelulární oblast se skládá z domén strukturou podobou imunoglobulinu (Ig). Menšími strukturami v TCR jsou domény, a to variabilní (V), kontrastní (C), diverzní (D) a spojovací (J) doména. Domény jsou spojeny peptidy. Oba řetězce TCR obsahují V a C doménu, J a D doménu navíc obsahuje TCR $\alpha$ . Geny aktivující rekombinaci 1 a 2 (RAG1 a RAG2) usnadňují vznik V domény ze segmentů genů, které sloužili k rozpoznání antigenu. C doména slouží k propojení

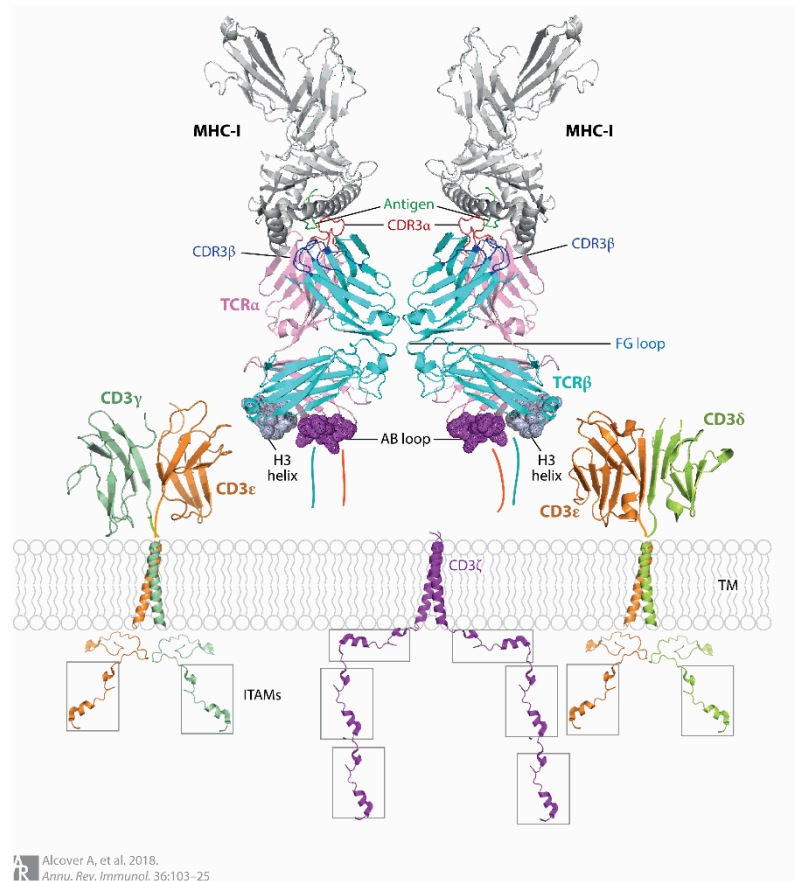
s CD3 řetězcem. TCR rozpoznávají antigeny, které jsou exprimovány na povrchu APC na MHC. MHC I. třídy jsou rozpoznány cytotoxickými T-lymfocyty a MHC II. třídy jsou rozpoznány pomocnými T-lymfocyty. Sekvence V(D)J domény je kódována regiony určující komplementaritu 3 (CDR3). Tato sekvence je velmi důležitá v obou řetězcích TCR a určuje schopnost T-lymfocytu rozpoznávat antigeny navázané na komplexu peptidu navázaném na MHC molekule (pMHC), která je na APC (Alcover a kol., 2018; Attaf a kol., 2015; De Simone a kol., 2018; Shah a kol., 2021).



Obrázek 2: Struktura TCR (A) Genetické uspořádání a somatická rekombinace  $\alpha$  a  $\beta$  řetězce, zapojení V, C, D a J domény do jednotlivých řetězců (B) Funkční uspořádání  $\alpha$  a  $\beta$  řetězce (C) Kompletní uspořádání TCR (De Simone a kol., 2018; upraveno)

Na povrchu všech T-lymfocytů se exprimuje CD3 a s TCR vytváří komplex. TCR-CD3 komplex se skládá ze dvou TCR řetězců a ze šesti CD3 řetězců. TCR řetězce mohou být  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  a  $\delta$ . Nejčastěji vznikají řetězce  $\alpha$  a  $\beta$ . Stejně jako TCR i CD3 má proteinové řetězce, a to  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  a  $\zeta$ , které tvoří dimery. Dimery CD3 vytvářejí podjednotky  $CD3\epsilon\gamma$ ,  $CD3\epsilon\delta$  a  $CD3\zeta\zeta$ . Řetězce CD3 se spojují s TCR pomocí nekovalentních hydrofobních vazeb a jejich tvorba je regulována pozicí TCR na povrchu buňky. Aby mohl takto vzniklý TCR-CD3 komplex rozpoznávat antigeny musí mít pMHC ligand, který se spojuje s TCR prostřednictvím šesti smyček CDR. Tři smyčky vycházejí z V domény na řetězci  $\alpha$  a další tři smyčky vycházejí z V domény na

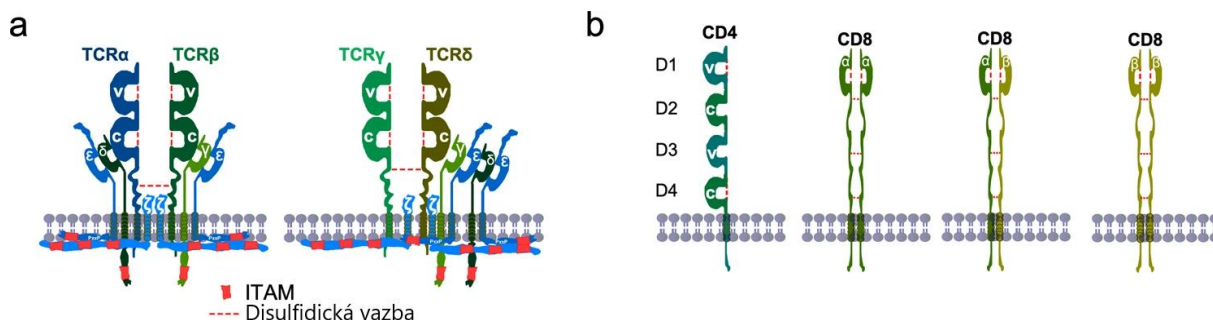
řetězci  $\beta$ . CDR1 a CDR2 jsou kódovány ve V doméně TCR a CDR3 vzniká rekombinací genů DNA V domény a spojovací domény z  $\alpha$  řetězce s V doménou, diverzní a spojovací doménou z  $\beta$  řetězce. Což tedy vede k navázání pMHC na TCR-CD3 komplex. Prostorové vyobrazení TCR je na obrázku 3 a jeho názorná sktruktura na obrázku 4a (Alcover a kol., 2018; Attaf a kol., 2015; Mariuzza a kol., 2020; Shah a kol., 2021).



Obrázek 3: Prostorové vyobrazení TCR (Alcover a kol., 2018)

Pokud by se na T-lymfocyту exprimovaly  $\gamma$  a  $\delta$  řetězce místo řetězců  $\alpha$  a  $\beta$ , vznikal by  $\gamma\delta$  T-lymfocyt. TCR  $\gamma\delta$  T-lymfocyту je vyobrazen na obrázku 4a.  $\gamma\delta$  T-lymfocyty jsou s  $\alpha\beta$  T-lymfocyty částečně podobné. Antigen  $\gamma\delta$  T-lymfocytů je CD3 a postrádá CD4 a CD8. TCR $\gamma\delta$  se váže na peptidový nebo nepeptidový struktury antigenu, aniž by k tomu potřeboval MHC. Této vazby se využívá u rekombinantního CDR3 pro řetězec  $\delta$ . TCR $\gamma\delta$  rozpoznává vlastní peptidy, které jsou ektopicky exprimované na buněčné membráně. Tyto vlastní peptidy pochází z intracelulárních složek buňky, které byly vystaveny buněčnému stresu. Tyto buňky mohou vznikat při nádorovém bujení, proto  $\gamma\delta$  T-lymfocyty by bylo možné využít při protinádorové terapii s chimerickým antigenním receptorem. Zatímco nepeptidové antigeny mohou být lipidy, metabolity vitamínu B nebo fosfátové antigeny. Dalším rozdílem od  $\alpha\beta$  T-lymfocytů je počet receptorů na povrchu buňky.  $\gamma\delta$  T-lymfocytů mají více receptorů a to okolo  $10^{20}$ , zatímco

$\alpha\beta$  T-lymfocyty mají okolo  $10^{15}$  receptorů. Oproti  $\alpha\beta$  T-lymfocytům, které se vyskytují v krvi a lymfatických tkáních, se  $\gamma\delta$  T-lymfocyty vyskytují také v malé míře v krvi (0,5-5 %), epitelích, lymfatických tkáních a ve velké míře ve střevním epitelu (25-60 %). Funkcí  $\gamma\delta$  T-lymfocytů je imunoregulace a imunitní dozor, za přítomnosti Tc-lymfocytů a jejich cytokinů (Anaya a kol., 2013; Pellicci a kol., 2020; Sweeney a kol., 2024; You a kol., 2025).



Obrázek 4: (a) Struktura TCR $\alpha\beta$  a TCR $\gamma\delta$  (b) Struktura CD4 a CD8 (Shah a kol., 2021; upraveno)

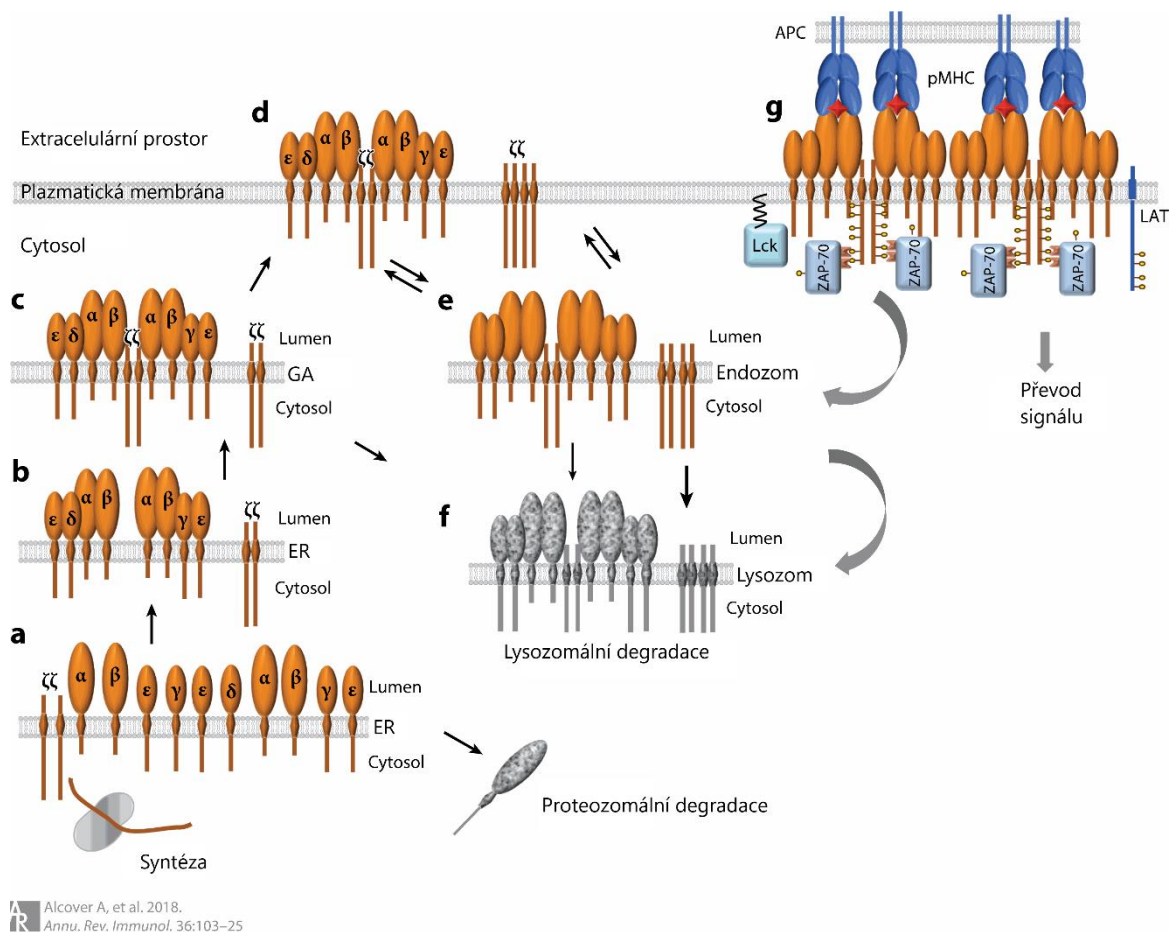
Ve vývoji TCR-CD3 komplexu hrají důležitou roli CD4 a CD8, protože se chovají vzhledem k TCR jako jeho koreceptory. Stejně jako TCR oba tyto znaky obsahují extracelulární doménu, transmembránovou doménu a krátký intracelulární konec. Také mají stejné funkce a jejich struktura je si podobná. Extracelulární doména u CD4 obsahuje dvě V domény (D1, D3) a dvě C domény (D2, D3), jejichž umístění lze vidět na obrázku 4b. CD4 je na povrchu buňky chová jako monomer vzhledem k TCR. Využívá D1 doménu k rozpoznání MHC a cytoplazmatický konec k interakci s nereceptorovou LCK. U CD8 je extracelulární domény tvořena jen jednou V doménou. Proto jsou exprimovány dvě izoformy CD8, a to CD8 $\alpha$  a CD8 $\beta$ , které můžou tvořit homodimery nebo heterodimery. Většina CD8 lymfocytů tvoří heterodimery, ale například ve střevech jsou intraepiteliální lymfocyty ( $\gamma\delta$  T-lymfocyty), které tvoří homodimery  $\alpha\alpha$ , anebo tyto homodimery tvoří i paměťové prekurzory (Shah a kol., 2021).

### 1.2.2 Vývoj receptoru TCR

Vývoj TCR začíná v thymu ve druhém stádiu dvojité negativity, kde probíhá přestavba genů aktivujících rekombinací 1 a 2 (RAG1 a RAG2). To vede ke vhodné selekci genů pro TCR  $\beta$  řetězec. Poté nastává třetí stádium dvojité negativity, kde dochází ke vzniku  $\alpha$  řetězce. Následně se začnou produkovat proteiny nezbytné pro sestavení a signalizaci TCR. Tyto proteiny jsou řetězce CD3, kinázy (tyrozinokináza specifická pro lymfocyty (LCK)), fosfatázy, řetězec zeta spojený s proteinkinázou 70 (ZAP70), tyrozinový aktivační imunoreceptor (ITAM) a spojovací článek pro aktivaci T-lymfocytů (LAT). Buňka má k diferenciaci na výběr ze dvou možností. Může exprimovat  $\alpha$  a  $\beta$  řetězec TCR a pokračovat v diferenciaci až po vznik

Tc-lymfocytů a Th-lymfocytů nebo může exprimovat  $\gamma$  a  $\delta$  řetězec TCR a bude tak vznikat subpopulace  $\gamma\delta$  T-lymfocytů (Anaya a kol., 2013).

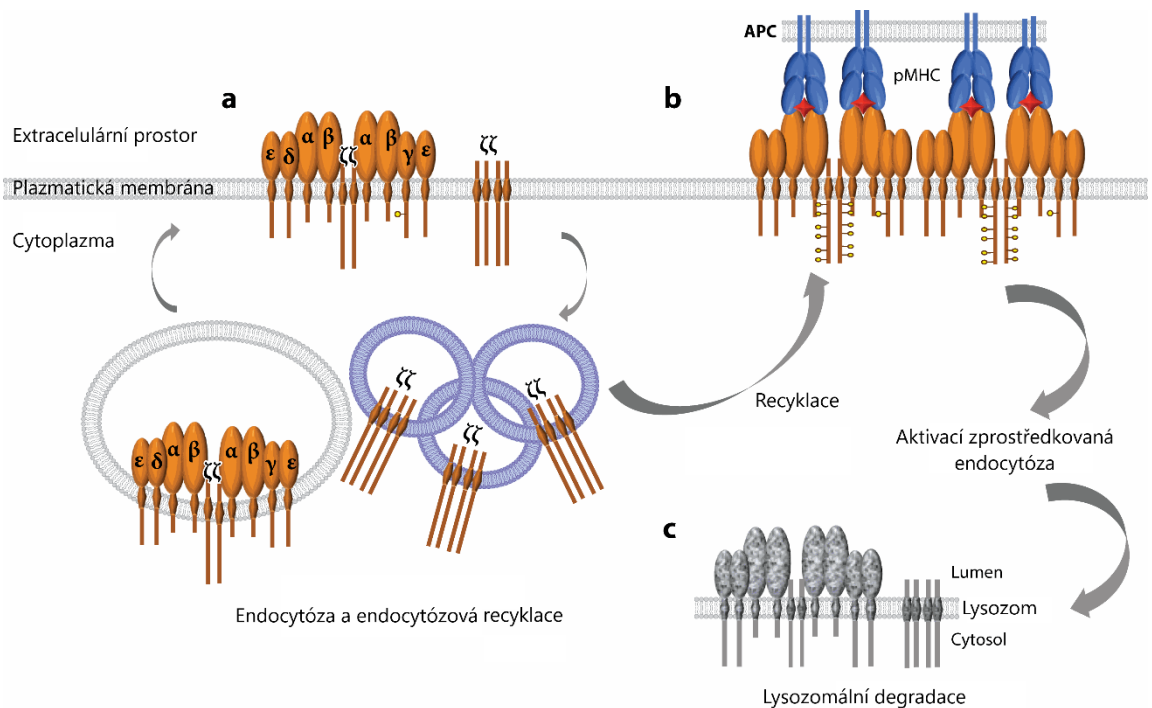
Vývoj samotného TCR bez ohledu na vývojové fáze T-lymfocytu probíhá v endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu, odkud se transportuje na povrchu T-lymfocytů a je zobrazen na obrázku 5. Řetězce TCR-CD3 komplexu, kromě CD3 $\zeta\zeta$ , jsou syntetizovány v nadbytku a jsou transportovány do endoplazmatického retikula. V endoplazmatickém retikulu jsou zadrženy prostřednictvím aminokyselin a hromadí se do té doby, než se nashromáždí všechny řetězce z TCR-CD3 komplexu. Pokud se v endoplazmatickém retikulu objeví jednotlivé řetězce TCR-CD3 komplexu, tedy TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  a CD3 $\epsilon$ , tak jsou pohlceny proteozomy a dochází tak k jejich degradaci. Degradace CD3 probíhá v lysozomech. Tato degradace nastává díky retenčnímu signálu z endoplazmatického retikula, který bude přítomen, dokud nebudou všechny dimery TCR-CD3 komplexu degradovány (Alcover a kol., 2018; De Simone a kol., 2018; Shah a kol., 2021).



Obrázek 5: Vývoj TCR-CD3 komplexu (a-c) Syntéza TCR-CD3 komplexu v endoplazmatickém retikulu (ER) a v Golgiho aparátu (d) transport TCR-CD3 komplexu na plazmatickou membránu (e) Endozomální recyklace (f) Lyzosomální degradace (g) Přenos signálu TCR (Alcover a kol., 2018; upraveno)

Na plazmatické membráně probíhá spojení všech šesti částí TCR-CD3 komplexu. Dimery TCR $\alpha\beta$  a CD3 $\zeta\zeta$  jsou spojeny kovalentními vazbami prostřednictvím disulfidových vazeb. Zatímco dimery CD3 $\epsilon\delta$  a CD3 $\epsilon\gamma$  jsou spojeny nekovalentními vazbami. Toto spojení vede k vysoké citlivosti vůči neionogenním detergentům. Jedna z nejpravděpodobnějších teorií o tom, jak se dimery TCR-CD3 komplexu navazují, se nazývá monovalentní stechiometrie. Ta říká, že na dimer TCR $\alpha\beta$  je navázán jeden CD3 $\epsilon\delta$  dimer, jeden CD3 $\epsilon\gamma$  dimer a jeden CD3 $\zeta\zeta$  dimer. Další z teorií se nazývá bivalentní stechiometrie, která vznikla na základě experimentu, který ukázal, že na plazmatické membráně T-lymfocyty jsou minimálně dva dimery TCR $\alpha\beta$  v těsné blízkosti s TCR-CD3 komplexem. Toto tvrzení, ale nepodpořil fakt, že na plazmatické membráně T-lymfocyty, který je v klidu, je přítomno až 20 oligomerů TCR-CD3 komplexů. Tyto oligomerní komplexy se označují jako nanoklastry, jejichž existence byla potvrzena elektroforézou za přirozených podmínek, konfokální mikroskopií s vysokým rozlišením a elektronovou mikroskopií (Alcover a kol., 2018; De Simone a kol., 2018; Shah a kol., 2021).

Na povrchu plazmatické membrány je TCR-CD3 komplex vystavován neustálé kontrole jeho funkce. Tuto kontrolu zprostředkovávají jednotlivé endocytózní cykly, které případně poškozené nebo již staré TCR-CD3 komplexy degradují a jednotlivé řetězce jsou recyklovány, jak lze vidět na obrázku 6. Pokud při endocytóze je TCR-CD3 komplex neporušený, vrátí se zpět na plazmatickou membránu. Tyto cykly jsou zprostředkovány fosforylací serinového zbytku, které se nachází v těsné blízkosti s dileucinovými endocytózními strukturami, které jsou složkou intercelulární oblasti řetězce CD3 $\gamma$ . I v dalších řetězcích CD3 jsou tyto endocytózní struktury, které se také podílí na endocytóze. Při porušení komplexu TCR-CD3 tedy probíhá endocytóza následovaná degradací komplexu v lysozomech. (Alcover a kol., 2018).



Alcover A, et al., 2018.  
*Annu. Rev. Immunol.* 36:103–25

Obrázek 6: Recyklace TCR-CD3 komplexu (a) Endocytóza a endocytózová recyklace komplexu TCR-CD3 (b) Recyklace jednotlivých složek TCR-CD3 komplexu (c) Lysozomální degradace (Alcover a kol., 2018; upraveno)

Přeživší TCR-CD3 komplexy následně mohou reagovat s pMHC na APC. V důsledku čehož se začnou vytvářet shluky, zvané imunologické synapse, které budou podléhat fosforylaci proteinkinázou LCK. To zahájí přenos signálu prostřednictvím fosforylace tyrozinového aktivačního imunoreceptoru (ITAM), která zahájí interakci ZAP70 s CD3ζ. ZAP70 zahájí fosforylaci signální adaptivní molekuly LAT, díky které se přenesení signál až k druhým poslům (diacylglycerol,  $Ca^{2+}$ ), kteří předají signál T-lymfocytům (Alcover a kol., 2018; Kumari a kol., 2014).

### 1.3 Úloha T-lymfocytů

T-lymfocyty se rozdělují pomocí povrchové struktury CD4 a CD8. Díky těmto CD znakům lze T-lymfocyty rozdělit na pomocné ( $CD4^{+}$ ) a cytotoxické ( $CD8^{+}$ ). I přes to že se dále dělí, jejich mechanismus imunitní odpovědi je podobný. Na TCR se naváže antigen, T-lymfocyty rozpoznají jaký je to antigen a podle typu T-lymfocytu, se kterým přišel do kontaktu, vznikne adekvátní imunitní odpověď. Laboratorně se jednotlivé skupiny T-lymfocytů mohou stanovovat pomocí průtokové cytometrie nebo imunohistochemickými metodami (Anaya a kol., 2013; Jílek, 2019; Penka a Slavičková, 2011).

Pomocí průtokové cytometrie se sledují jednotlivé buňky v suspenzi a určuje se jejich počet, velikost, tvar, povrchové znaky a mnohé další parametry. Imunohistochemické metody se obecně využívají k určení specifických protilátek, díky kterým můžeme určit specifický antigen. Pro určení T-lymfocytů se využívá specifické protilátky proti specifickým povrchovým znakům na povrchu T-lymfocytu, tyto povrchové znaky jsou CD3, CD4 a CD8 (Penka a Slavičková, 2011).

### 1.3.1 Pomocné T-lymfocyty

T-lymfocyty, na jejichž povrchu dochází k expresi CD4 a jsou tedy CD4<sup>+</sup>, se označují jako „helping“ neboli pomocné T-lymfocyty (Th). Jejich funkcí je produkce cytokinů, které stimulují B-lymfocyty k produkci protilátek anebo regulují cytotoxickou imunitní odpověď. K jejich aktivaci dochází při setkání s antigenem peptidového charakteru nebo s MHC II. třídou. Po aktivaci se mohou dále diferencovat nebo se z nich mohou stát paměťové T-lymfocyty. Pokud se budou Th-lymfocyty dále diferencovat budou vznikat specializovanější buňky. Díky prostředí, ve kterém se vyskytují při diferenciaci, se z nich stávají Th-lymfocyty se specifickou funkcí a vlastnostmi. Rozdělují se do více skupin, podle toho, které z cytokinů produkují (Anaya a kol., 2013; Cosmi a kol., 2013; Ivanova a kol., 2015; Jílek, 2019).

Jednou z prvních objevených skupin Th-lymfocytů jsou lymfocyty **Th1**, které vznikají při diferenciaci v přítomnosti INF- $\gamma$  a IL-12. Hlavním transkripčním faktorem Th1 je soubor genů obsahujících doménu T (T-bet). Funkcí Th1 je aktivace makrofágů, monocytů, ale i cytotoxických lymfocytů, které jsou zaměřené proti intracelulárním patogenům, jako jsou viry nebo mykobakterie (Anvar a kol., 2024; Ivanova a kol., 2015; Meng a kol., 2025).

Dalšími Th-lymfocyty, které byly objeveny mezi prvními, jsou lymfocyty **Th2**. Ty vznikají v přítomnosti IL-4 a jejich hlavním transkripčním faktorem je GATA-3. Th2 umožňují přepínat mezi typy produkovaných imunoglobulinů (Ig). Díky IL-4 dojde k přepnutí tvorby Ig na IgE. IgE slouží k aktivaci buněk vrozené imunity, jako jsou bazofily a mastocyty. Jejich aktivací se spouští jejich degradace a následné uvolnění obsahu jejich granul do okolí. V granulech jsou obsaženy histamin, heparin, proteázy, serotonin, cytokiny a chemokiny. Tyto látky napomáhají při apoptóze, vyvolávají stahy hladké svaloviny, zvyšují propustnost cév a mobilizují další zánětlivé buňky (Anvar a kol., 2024; Ivanova a kol., 2015; Meng a kol., 2025).

Transkripční faktory GATA-3 a T-bet jsou antagonisté. Jestli bude vznikat Th1 nebo Th2 záleží čistě jen na vnitřním prostředí. Díky jejich antagonismu může vznikat dočasná nestabilita

v jejich produkci, která se ustálí po převaze jedné ze složek pro diferenciaci Th1 nebo Th2 (Anvar a kol., 2024; Ivanova a kol., 2015; Meng a kol., 2025).

Jednou z později nalezených Th-lymfocytárních skupin jsou lymfocyty **Th17**, jejichž diferenciaci musí probíhat v přítomnosti IL-6, IL-1 $\beta$  nebo IL-21 a TGF- $\beta$ . Primární funkcí Th17 je chránit hostitele před extracelulárními patogeny na povrchu sliznic. Th17 může být součástí několika autoimunitních onemocnění, a to roztroušené sklerózy, revmatoidní artritidy, psoriázy a zánětlivých střevních onemocnění (Anvar a kol., 2024; Ivanova a kol., 2015; Meng a kol., 2025).

Další novější skupinou Th-lymfocytů jsou lymfocyty **Th9**, které jsou typické produkcí IL-9. Vznikají stimulací Th2 za přítomnosti TGF- $\beta$  nebo stimulací jiných T-lymfocytů pomocí TGF- $\beta$  a IL-4. Th9 jsou přítomny při autoimunitních onemocněních a alergiích. Funkcí Th9 je podpora přežití a proliferace T-lymfocytů a mastocytů, stimulace produkce několika cytokinů, úprava odpovědi B-lymfocytů a také hrají roli u parazitických infekcích (Anvar a kol., 2024; Ivanova a kol., 2015; Meng a kol., 2025).

**Th22** jsou další skupinou Th-lymfocytů. Produkují IL-22, který patří do rodiny cytokinů IL-10. Hlavní funkcí IL-22 je obrana proti invazivním patogenům. Při jejich diferenciaci musí být přítomny tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-6 a je IL-1 $\beta$  (Anvar a kol., 2024; Ivanova a kol., 2015; Meng a kol., 2025).

Další skupinou Th-lymfocytů jsou **folikulární Th-lymfocyty (Tfh)**. Tfh na rozdíl od ostatních Th-lymfocytů zůstávají ve folikulech lymfatických uzlinách a slezině, protože jejich účelem je pomáhat B-lymfocytům s produkcí protilátek a pomoc při vzniku paměťových a plazmatických buněk. Diferenciaci Tfh usnadňují a zrychlují B-lymfocyty, expresí IL-6. Přítomnost paměťových B-lymfocytů ve folikulech lymfatických uzlin může vést ke vzniku paměťové Tfh. Pokud by paměťové Tfh vycestovaly z lymfatických uzlin, daly by se označit za paměťové T-lymfocyty. Paměťové T-lymfocyty mohou tvořit i ostatní skupiny Th-lymfocytů. Tfh jsou závislé na B-lymfocytech a plazmatické buňky jsou závislé na Tfh. Tento vztah mezi Tfh, B-lymfocyty a plazmatickými buňkami vytváří zpětnou vazbu, díky které dochází k správné regulaci humorální imunity. B-lymfocyty pomáhají Tfh s rozpoznáváním antigenů a Tfh pomáhá vzniku plazmatických buněk z B-lymfocytů. Tfh se uplatňují při infekčních onemocněních, jako lymfocytární choriomeningitida (LCMV) a chronická malárie (Anvar a kol., 2024; Ivanova a kol., 2015; Meng a kol., 2025).

### 1.3.2 Cytotoxické T-lymfocyty

T-lymfocyty, které exprimují CD8 se nazývají cytotoxické T-lymfocyty (Tc). Tyto T-lymfocyty jsou unikátní v tom, že dokážou útočit a zničit cizorodé agens, především viry. Aby mohly účinně vykonávat svoji funkci, musí se aktivovat, poté zaměřit správnou buňku pomocí jejího antigenu a následně dochází k jejímu zničení (Anaya a kol., 2013; Raskov a kol., 2021).

Aktivace Tc-lymfocytu je děj, který se skládá z aktivace TCR a aktivace koreceptoru CD28. TCR i CD28 musí být schopné vytvářet a předávat signál. Při aktivaci TCR se Tc-lymfocyt naváže na antigen v komplexu s MHC I. třídy na povrchu APC a zaměří se na tuto buňku. MHC obsahují peptidové fragmenty, které vznikly degradací cytoplazmatických proteinů při kontaktu TCR s antigenem. Navázáním TCR na MHC I. třídy vzniká MHC-antigen-peptidový komplex, díky kterému začne Tc-lymfocyt prozkoumávat plazivým pohybem povrch APC a určovat tak jeho patogenitu. Po aktivaci TCR se TCR a CD8 spojí prezentujícími peptidy s podjednotkami MHC $\alpha$  a dojde tak k aktivaci TCR. Dalším krokem je aktivace koreceptoru CD28 (Anaya a kol., 2013; Raskov a kol., 2021).

Signál z koreceptoru CD28 vzniká po interakci receptoru CD28 s CD8<sup>+</sup> Tc-lymfocytu a CD80/B7 nebo CD86/B7. CD80/B7 a CD86/B7 jsou vysoce exprimovány na APC, makrofázích a aktivovaných B-lymfocytech. Hrají důležitou roli při určování citlivosti Tc-lymfocytů tím, že snižují stimulační práh naivních Tc-lymfocytů, zvyšují jejich proliferaci a produkci cytokinů (IL-2). Po stimulaci receptoru CD28 dochází k fosforylaci intracelulárních tyrozinových zbytků, které aktivují fosfatidylinositol-3-kinázu (PI3K). Aktivovaná fosfatidylinositol-3-kináza (PI3K) podporuje aktivaci proteinkinázy B (PKB/Akt) a nukleárního faktoru- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Díky tomu může probíhat exprese Bcl-xL, která podporuje přežití T-lymfocytů a také nyní je Tc-lymfocyt schopen apoptózy. Pokud Tc-lymfocyt obdrží signály z TCR a z koreceptoru CD28, buňka není patogenní a není určena k likvidaci apoptózou. Pokud Tc-lymfocyt neobdrží signál z jednoho z koreceptorů, buňka se stane anergickou a je vedena k apoptóze (Anaya a kol., 2013; Raskov a kol., 2021).

Po aktivaci se Tc-lymfocyt pohybuje plazivým pohybem po patogenní APC, což pomáhá k vytváření pórů. Tc-lymfocyt následně vyloučí granula obsahující granzymy, perforin, katepsin C a granulyzin. Tyto granula iniciují apoptózu. Jeden ze způsobů, jak se granula dostanou do patogenní APC je, že splynou s cytoplazmatickou membránou patogenní APC. Dalším způsob je, že granula jsou do patogenní APC přesunuta pomocí endocytózy plasmatické

membrány Tc-lymfocyty. Při endocytóze granulosinu a perforinu tvoří póry v endozomální membráně a uvolňují tak několik granzymů do cytoplazmy. Tc-lymfocyty uplatňují při apoptóze také FasL. FasL je exprimován na povrchu Tc-lymfocyty a je označen CD95. Při ligaci Fas receptoru na patogenní APC dochází k aktivaci Fas asociovaného proteinu s doménou smrti (FADD), což vede k aktivaci kaspáz a endonukleáz, a to vede k fragmentaci DNA patogenní APC. Tc-lymfocyt uvolňuje  $\text{INF-}\gamma$  a tumor nekrotizující faktor alfa ( $\text{TNF-}\alpha$ ), které jsou důležité při obraně proti virovým infekcím a při kontrole proliferace nádorových buněk (Anaya a kol., 2013; Raskov a kol., 2021).

Apoptóza je jedním z mechanismů buněčné smrti. Druhý mechanismus buněčné smrti je nekróza. Apoptóza a nekróza se od sebe liší hlavně tím, že apoptóza probíhá již předem určenými postupy. Usmrčená buňka se díky ní zmenšuje a aby mohla probíhat je zapotřebí energie. Na druhou stranu nekróza je spíše spontánní proces. Usmrčené buňky se zvětšují (bobtnají) až prasknou a při nekróze není zapotřebí energie. Apoptóza neslouží jen k usmrcení buněk, rovněž spolupracuje s makrofágy. Apoptotické buňky produkují signál „find me“ neboli signál „najdi mě“, sloužící k přivolání makrofágů a dále produkují signál „eat me“ neboli signál „sněz mě“, díky kterému dochází k pohlcení apoptotické buňky makrofágy (Nagata, 2018).

### 1.3.3 Regulační T-lymfocyty

Poslední skupinou T-lymfocytů, která zde bude zmíněna je skupina regulačních Th-lymfocytů neboli Treg. Treg se řadí jak mezi Th-lymfocyty tak i k Tc-lymfocytům. Treg se dále dělí na přirozené Treg nebo indukované Treg. Vznik těchto dvou variant závisí na přítomnosti  $\text{TGF-}\beta$  a antigenů při jejich diferenciaci. I přestože Treg dělíme, funkce obou variant jsou stejné a jejich rozdělení záleží na jejich epigenetickém charakteru (Cosmi a kol., 2013; Fisher a Sennikov, 2025; Ivanova a kol., 2015; Khan a kol., 2018).

Přirozené Treg exprimují  $\text{CD4}^+$   $\text{CD25}^+$   $\text{FOXP3}^+$  a vznikají v thymu, ale i v malém množství v perifériích z naivních Th-lymfocytů. Přirozené Treg exprimují IL-2 a CD25. CD25 společně s FOXP3 jsou konstantně exprimovány u naivních přirozených Treg a částečně exprimovány u efektorových Treg. Treg potlačují produkci CD127 (receptor IL-7), což vede ke snížení jeho exprese (Fisher a Sennikov, 2025; Hassan a kol., 2025).

Indukované Treg vznikají v periférii z naivních T-lymfocytů. Indukované Treg se dále dělí do dalších čtyř skupin. První skupina se jmenuje Tr1 a exprimují IL-10<sup>-</sup> a  $\text{CD4}^+$ . Druhou skupinu se jmenuje Th3 a exprimuje  $\text{TGF-}\beta$ . Třetí skupinou jsou Treg  $\text{CD8}^+$ , což značí že

vznikají z Tc-lymfocytů. A poslední čtvrtou skupina se jmenuje iTr35, která exprimuje CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP<sup>-</sup> IL-35<sup>+</sup> (Fisher a Sennikov, 2025; Hassan a kol., 2025).

Zvláštní skupinou Treg jsou Treg podpořené B-lymfocyty ze sleziny a Peyerských plátů. U lidí i u myši B-lymfocyty pomáhají k aktivaci a množení Treg. Naivní B-lymfocyty ve slezině a v Peyeroých plátech (sliznice střeva) se chovají jako APC a prostřednictvím přímých interakcí mezi buňkami mohou transformovat CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-lymfocyty na CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>-</sup> Treg. Tyto Treg produkované B-lymfocyty exprimují lymfocyty aktivující gen 3 (LAG3), receptor tumor nekrotického faktoru obsahující glukokortikoidy (GITR), CTLA-4, kostimulátor indukovaných T-lymfocytů (ICOS), OX40, PD1 a IL-10. Při pokusech na myších se povedlo úspěšně zabránit rozvoji kolagenem indukované artritidy, Th1/Th17 zprostředkované idiopatické záněty střev a Th2 zprostředkované alergické astma (Hassan a kol., 2025).

Hlavní funkcí Treg je udržování periferní tolerance, což znamená, že zabraňují vzniku autoimunitního onemocnění, regulací APC mimo lymfatické cesty. Treg mohou potlačovat funkci ostatních efektorových T-lymfocytů a APC, na základě buněčných interakcí a uvolňování cytokinů (TGF- $\beta$  a IL-10) určených k jejich potlačení. Dále jsou popsány mechanismy udržení periferní tolerance pomocí Treg (Cosmi a kol., 2013; Fisher a Sennikov, 2025; Hassan a kol., 2025; Ivanova a kol., 2015; Khan a kol., 2018).

Treg ovlivňují jak přirozenou imunitu, tak adaptivní, aby dosáhly udržení imunitní tolerance. Neutrofilů a makrofágů jsou součástí přirozené imunity a zodpovídají za zánětlivé a regenerační procesy. Treg vyvolávají apoptózu neutrofilů a blokují tak produkci IL-6 neutrofilů. Treg také způsobují tvorbu sekundárních imunopresivních neutrofilů, které produkují IL-10, TGF- $\beta$ 1, indoleamin-2,3-dioxygenázu (IDO) a hemoxygenázu (HO-1). Dále mohou indukovat apoptózu neutrofilů. Na druhou stranu Treg mohou prostřednictvím makrofágů stimulovat fagocytózu neutrofilů a mohou podporovat polarizaci makrofágů na fenotyp M2 tvorbou protizánětlivých cytokinů (IL-4, IL-10, IL-13) (Fisher a Sennikov, 2025; Hassan a kol., 2025).

Aktivované Treg reagují s dendritickými buňkami a efektorovými T- a B-lymfocyty. Na dendritických buňkách Treg váží lymfocyty aktivující gen 3 (LAG3) na MHC II. třídy a CTLA-4 na CD80/86. Tím narušují maturaci dendritických buněk, jejich prezentaci antigenu a podporují tvorbu fenotypu dendritických buněk, který bude imunitní systém tolerovat. Produkci indoleamin-2,3-dioxygenázy (IDO) Treg narušuje vazby CD80/86, které jsou na

dendritické buňce a vazby na CD28, které jsou na efektorovém T-lymfocyту. Takto blokuje jejich aktivaci (Fisher a Sennikov, 2025; Hassan a kol., 2025).

Treg produkující IL-10 přímo inhibuje expresi T-lymfocytů a potlačuje prezentaci antigenů a aktivaci dendritických buněk. Dalším cytokinem, který Treg produkují je TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  inhibuje IL-2 prostřednictvím signální dráhy SMAD3 a blokuje tak proliferaci T-lymfocytů a inhibuje cykliny D2, E, cyklin-dependentní kinázu 4 (CDK-4) a gen c-myc. TGF- $\beta$  dále inhibuje diferenciaci Th1 a Th2 prostřednictvím blokace signálních cest T-bet/STAT4 a GATA-3/NFAT. Treg produkcí granzymu A, granzymu B a perforinu vyvolávají apoptózu efektorových buněk. Aktivované Treg mohou spustit metabolické procesy adenosinu z ATP, který je dále metabolizován dráhou CD39/CD73. Tento proces zahrnuje potlačení T-lymfocytů negativní signalizací APC a efektorových T-lymfocytů. Díky vysoké povrchové expresi CD25 a schopnosti vycytávat IL-2 mohou Treg snižovat prozánětlivou cytokinovou signalizaci (Fisher a Sennikov, 2025; Hassan a kol., 2025).

Treg potlačují nebezpečné autoimunitní buňky ve snaze zabránit vzniku autoimunitního onemocnění. Treg potlačují nebezpečné autoimunitní B-lymfocyty expresí velkého množství PD1 na autoimunním B-lymfocyту a aktivací ligandu PD1 (PDL-1) a ligandu PD2 (PDL-2), které se váže na PD1. Tato vazba umožní Treg kontrolovat aktivitu nebezpečného autoimunního B-lymfocyту. Jako podporu v boji s nebezpečným autoimunním B-lymfocytem může Treg také použít granzym B a perforin k potlačení aktivity efektorových B-lymfocytů. Granzym B a perforin snižují produkci protilátek, což snižuje aktivitu nebezpečného autoimunitního B-lymfocyту (Fisher a Sennikov, 2025; Hassan a kol., 2025).

Antigen specifické Treg se aktivují po rozpoznání specifických antigenů na APC. Tato aktivace jim dovoluje potlačit efektorové T-lymfocyty, které reagují na stejný specifický antigen. Čímž dokážou efektivně zabránit nežádoucí imunitní odpovědi na vlastní tkáň. Antigen specifické Treg mohou migrovat do tkání obsahující nebezpečné autoimunní antigeny a díky tomuto mechanismu mohou snižovat riziko nespecifické imunosuprese, což z nich dělá potenciální metodu léčby autoimunních onemocnění (Fisher a Sennikov, 2025).

Kromě antigen specifických Treg mohou být i antigen specifické mechanismy působení Treg. Tyto mechanismy mohou účinně potlačovat nebezpečné autoreaktivní T-lymfocyty a pomáhají tak udržovat imunitní homeostázu. Také mají potenciál pro léčbu autoimunních onemocnění (Fisher a Sennikov, 2025).

## 1.4 Autoreaktivní T-lymfocyty

Autoreaktivní T-lymfocyty jsou T-lymfocyty, které mají vysokou afinitu na vlastní antigeny. Autoreaktivní T-lymfocyty se mohou uplatňovat jak u fyziologických, tak u patologických funkcí imunitního systému. Velikost a síla vazby na vlastní antigeny závisí na signalizaci TCR, množství autoreaktivních receptorů a povrchu T-lymfocytu (Horkova a kol., 2020; Mørch a kol., 2020).

Jedna z hlavních rolí TCR je zapojit LCK do TCR signalizačního komplexu, což vede k fosforylaci řetězců navázaných na TCR, a to vede ke snižování schopnosti signalizace. Interakce mezi koreceptorem CD4 nebo koreceptorem CD8 s LCK reguluje citlivost na antigen. Bylo zjištěno, že klony Th-lymfocytů, které reagují na vlastní antigeny lépe reagují na inhibici než Th-lymfocyty, které reagují na cizorodé antigeny. Další studie ukázaly, že priming T-lymfocytů vlastními antigeny zvyšuje jejich bezpečnou autoreaktivitu, což zvyšuje jejich následnou odpověď na cizí antigeny. Díky těmto studiím lze říct, že autoreaktivní T-lymfocyty jsou prospěšné pro imunitu, ale také představují riziko pro vznik autoimunity. Proto lze usuzovat, že v těle existuje optimální množství autoreaktivních T-lymfocytů, která je určována pozitivní a negativní selekcí v thymu nebo vzniká změnou citlivosti na signalizace TCR během zrání T-lymfocytů. Pro jednotlivé podskupiny T-lymfocytů se může optimální hranice bezpečných autoreaktivních T-lymfocytů lišit. A proto lze autoreaktivní T-lymfocyty dělit na nebezpečné a bezpečné autoreaktivní T-lymfocyty (Horkova a kol., 2020; Mørch a kol., 2020).

### 1.4.1 Nebezpečné autoreaktivní T-lymfocyty

Nebezpečné autoreaktivních T-lymfocyty mají tak vysokou afinitu, že způsobují onemocnění vyvolaná autoimunitní reakcí. Autoimunitní reakce je reakce imunitního systému namířená proti vlastním antigenům. Autoimunitní onemocnění jsou typická ztrátou imunitní tolerance vůči vlastním antigenům. Na ztrátě imunitní tolerance se podílí genetické faktory, vnější a vnitřní prostředí pacienta s autoimunitním onemocněním. U genetických faktorů za poškození mohou geny, ať už jeden nebo více (častěji mutují dva geny). Autoimunitní onemocnění způsobené vnějším prostředím jsou většinou způsobené dlouhodobou infekcí (virus Epstein-Barr) nebo nadměrným vystavením UV záření a jinými fyzikální faktory. Autoimunitní onemocnění mohou postihovat jednotlivé orgány nebo celé orgánové systémy. Proto se rozdělují na orgánově specifické autoimunitní onemocnění a na systémová autoimunitní onemocnění. Imunitní systém má složitou strukturu složenou z různých molekulárních kontrol a rovnováh složených tak, aby byla zajištěna přesná a přiměřená reakce

na cizorodý organismus. U autoimunitních onemocnění tyto regulační mechanismy jsou dysfunkční. Tuto dysfunkci může způsobit řada faktorů, a to genetická predispozice, podněty z prostředí a faktory hostitele (Khan a kol., 2018; Rosenblum a kol., 2015).

Nebezpečné autoreaktivní nebo také autoimunitní T-lymfocyty vznikají poruchou jakéhokoli mechanismu imunologické tolerance. To tedy znamená, že při vývoji nebezpečný autoimunitní T-lymfocyt projde mechanismem centrální tolerance a periferní tolerance, aniž by byl zničen. Jednou z nejčastějších metod vzniku autoimunitního onemocnění je produkce autoreaktivních protilátek, které označují vlastní buňky a jsou apoptózou zničeny (Wang a kol., 2015).

Dalším způsobem vzniku autoimunitního onemocnění je vznik nebezpečných autoreaktivních T-lymfocytů. Nebezpečné autoreaktivní T-lymfocyty útočí přímo na cílovou tkáň a v periferní krvi jsou zastoupeny jen ve velmi malém množství. V cílových tkáních jsou zastoupeny až stokrát víc. Nebezpečné autoreaktivní Tc-lymfocyty rozpoznají cílovou buňku pomocí vazby TCR na MHC I. typu s peptidy odvozenými od autoantigenů. Cílová buňka může umřít buď tím, že nebezpečné autoreaktivní Tc-lymfocyty produkují cytotoxická granula (perforin, granzym B) nebo reakcí Fas-FasL. Přičemž oba tyto způsoby vedou k apoptóze. Anebo nebezpečné autoreaktivní Tc-lymfocyty mohou produkovat cytokiny (tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- $\alpha$ ), INF- $\gamma$ ) a to by vedlo k poškození tkáně (Wang a kol., 2015).

Nebezpečné autoreaktivní Th-lymfocyty mají podobný reakční mechanismus. Také rozpoznají cílovou buňku díky přítomnosti peptidů odvozených od autoantigenů na MHC II. typu. Poté jednotlivé podskupiny se budou k cílové buňce chovat jako k patogenu a budou pomáhat zničit cílovou buňku i přesto, že je vlastní. Způsobů, jak vznikají nebezpečné autoreaktivní T-lymfocyty je mnoho, dále jsou některé uvedeny (Wang a kol., 2015).

Jako první způsob vzniku nebezpečných autoreaktivních T-lymfocytů je porucha signalizace TCR. Jakmile se T-lymfocyty naváží pomocí TCR na MHC na APC, dochází ke genové expresi, produkci cytokinů a podpoře efektorových funkcí. Díky autoreaktivnímu vývoji nebezpečné autoreaktivní T-lymfocyty obsahují neobvyklé spojovací proteiny na pMHC ligandu. Tento mechanismus vzniku nebezpečných autoreaktivních T-lymfocytů byl popsán u systémového lupusu erythematoides. Autoreaktivní T-lymfocyty u systémového lupusu erythematoides fosforylují signální protein. To vede k snížení produkce řetězce CD3 $\zeta$ , přičemž dochází k poruše signalizace TCR. Porucha signalizace TCR vede ke zvýšení vápenatých iontů. Úbytek CD3 $\zeta$  řetězce lze zvrátit produkcí IL-2 (Khan a kol., 2018; Rosenblum a kol., 2015).

Dalším způsobem, jak vznikají nebezpečné autoreaktivní T-lymfocyty, je pomocí exprese genů. Kódujícím genem pro signalizaci T-lymfocytů je gen PTPN11. Tento gen zvyšuje expresi HLA-B27, který je markerem některých autoimunitních onemocnění (Bechtěrevova nemoc). HLA II. třídy jsou spojovány s autoimunitními nemocemi, hlavně HLA-CD a HLA-DQ. A to z důvodu přítomnosti při selekci a aktivaci Th-lymfocytů, které reagují s antigeny humorální a buněčné imunity. Dalším genem, jehož postižení může vyvolávat autoimunitní onemocnění je gen kódující FasL, který způsobuje apoptózu po reakci s Fas receptorem, gen kódující členy rodiny Bcl-2 Bim a sirotčí steroidní receptor 77, díky kterým zaniká nebezpečný autoreaktivní T-lymfocyt (Khan a kol., 2018; Rosenblum a kol., 2015).

Další defekty u nebezpečných autoreaktivních T-lymfocytů, mohou způsobit geny regulující jejich funkci. Tyto geny jsou CTLA-4 a FcγRIIB, a podílí se na funkci Treg a inhibici T-lymfocytů. Byly prokázány u systémového lupusu erythematoides, revmatoidní artritidy a diabetes mellitus I. typu (Khan a kol., 2018; Rosenblum a kol., 2015).

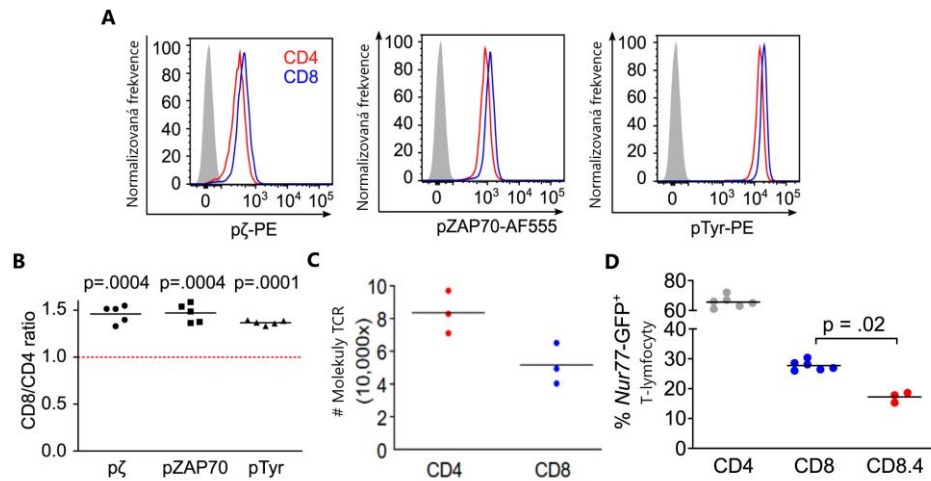
Nebezpečné autoreaktivní T-lymfocyty dále vznikají díky produkci jednotlivých variant genu PTPN22. PTPN22 je gen kódující lymfaticky specifickou fosfatázu (Lyp). Lymfaticky specifická fosfatáza je vázaná na SH3 doménu C-terminální Src kinázy (CSK) prostřednictvím vazeb bohatých na prolin. CSK zvyšuje aktivaci T-lymfocytů. Poškození tohoto genu způsobí narušení spojení mezi lymfatickou specifickou fosfatázu a CSK, a to vede k hyperaktivitě T-lymfocytů, které mají větší šanci na vznik nebezpečné autoreaktivity (Khan a kol., 2018; Rosenblum a kol., 2015).

Posledním uvedeným způsobem vzniku nebezpečných autoreaktivních T-lymfocytů je polymorfismus receptorů u řady interleukinů, jako jsou IL-2, IL-23R, IL7Rα a IL-12B. Na příklad IL-23 zvyšuje prozánětlivou kapacitu Th17. Díky polymorfismu jeho receptoru Th17 poškozují tkáň. Tento defekt byl pozorován u systémového lupusu erythematoides, revmatoidní artritidy a psoriázy (Khan a kol., 2018; Rosenblum a kol., 2015).

#### **1.4.2 Bezpečné autoreaktivní T-lymfocyty**

Bezpečné autoreaktivní T-lymfocyty nemají tak vysokou afinitu k vlastním antigenům jako nebezpečné autoreaktivní T-lymfocyty. V organismu je více bezpečných autoreaktivních Tc-lymfocytů než bezpečných autoreaktivních Th-lymfocytů. Do tohoto tvrzení se nepočítají Treg. Tento rozdíl v bezpečné autoreaktivitě může být zapříčiněn reakcí s různými třídami MHC, které mají rozdílnou autoreaktivní toleranci. Což naznačuje, že jde o jistou formu evoluce (Horkova a kol., 2020; Mørch a kol., 2020).

Při testování monoklonálních T-lymfocytů *in vivo* a *ex vivo* byly zjištěny výsledky s podobnými závěry. Při testech na myších bylo dosaženo výsledků se závěrem, že bezpečné autoreaktivní T-lymfocyty určují sílu homeostatických TCR signálů. Vyšší míra fosforylace TCR $\zeta$ , ZAP70 a tyrozinu je vyšší u Tc-lymfocytů než u Th-lymfocytů. Což naznačuje, že Tc-lymfocyty dostávají silnější homeostatické signály od vlastních antigenů než Th-lymfocyty. To je doložené na obrázku 7A a obrázku 7B. Tc-lymfocyty také mají nižší povrchovou expresi TCR než Th-lymfocyty, to jde vidět na obrázku 7C. Proto lze říct, že autoreaktivní Tc-lymfocyty jsou více bezpečné než Th-lymfocyty. Tc-lymfocyty mohou být také náchylnější k hyperproliferaci, pokud by selhala tolerance zprostředkovaná Treg. Do tohoto pozorování nejsou zahrnuty Treg, protože FOXP3<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty mají podobné výsledky jako Tc-lymfocyty, jak lze vidět na obrázku 7A (Horkova a kol., 2020; Mørch a kol., 2020; Wyss a kol., 2016).



Obrázek 7: (A, B) Homeostatická signalizace CD4 a CD8 (C) Povrchová exprese TCR na CD4 a CD8 lymfocytech (D) Autoreaktivní signalizace TCR pro CD4, CD8 a CD8.4 lymfocyty (Horkova a kol., 2020; upraveno)

Pro sledování signalizace bezpečných autoreaktivních TCR je vhodné sledovat citlivost Nur77. Signalizace Nur77 byla silnější u Th-lymfocytů, což lze vidět na obrázku 7D, proto by měla být TCR signalizace u bezpečně autoreaktivních Th-lymfocytů silnější než u bezpečně autoreaktivních Tc-lymfocytů. Společně s expresí Nur77 u Th-lymfocytů a Tc-lymfocytů byla pozorována exprese Nur77 i u chimérického koreceptoru CD8.4, který měl intracelulární doménu CD8 $\alpha$  nahrazenou intracelulární doménou koreceptoru CD4. Exprese Nur77 u CD8.4 byla výrazně nižší než u CD8 nebo CD4. Z čehož vyplývá, že dynamika vazby CD4-LCK nebo CD8-LCK udává míru bezpečné autoreaktivity u T-lymfocytů. Tyto rozdíly v bezpečné

autoreaktivitě jsou pravděpodobně způsobeny odlišnou regulací genů spíše než rozdílnou signalizací TCR (Horkova a kol., 2020; Mørch a kol., 2020).

## **2 Proteinkináza LCK**

### **2.1 Kinázy**

Proteinkinázy patří mezi skupinu enzymů zvaných kinázy. Kinázy tvoří skupinu enzymů, která katalyzuje přesun (transfer) fosfátové skupiny, pomocí fosforylace. Fosforylace je energeticky náročná operace, proto kinázy musí obsahovat vazebné místo pro navázání adenosintrifosfátu (ATP). Kinázy se dělí podle svých substrátů na lipidové kinázy, nukleotidové kinázy, karbohydrátové kinázy a proteinkinázy. Proteinkinázy jsou ještě dále rozděleny podle aminoskupiny, kterou fosforylují na tyrozinové kinázy, serin/treoninové kinázy, aspartát/glutamylové kinázy a histidinové kinázy (Cheek a kol., 2005; Schwartz a Murray, 2011; Wu a kol., 2024).

### **2.2 Proteinkinázy**

Proteinkinázy ovlivňují metabolismus, transkripci, buněčné dělení, pohyb a buněčnou smrt. Také se podílí na imunitní odpovědi a funkci nervového systému. Jejich nejdůležitější schopností je fosforylace proteinů. Fosforylace proteinů je reverzibilní rovnovážná reakce proteinkináz a fosforilovaných proteinů. Při poškození proteinkinázových drah dochází ke vzniku řady onemocnění. Nejčastěji se tato porucha prokazuje u rakoviny a zánětlivých onemocněních. Proteinkinázy mohou změnit funkci proteinů. Fosforylace proteinu může zvýšit nebo snížit enzymovou aktivitu, a to i u dalších biologických aktivit jako je transkripce nebo translace. To může způsobit stimulaci nebo inhibici daných proteinů. Fosforylace také může stabilizovat nebo destabilizovat proteiny nebo může způsobit přesun proteinů z jedné buňky do druhé. Jedním způsobem, jak takového přesunu docílit, je fosforylace proteinu po navázání SH2 domény proteinkinázy na fosfotyrosin proteinu (Cabral a kol., 2024; Chiwoneso a kol., 2025; Roskoski, 2015).

Některé substráty proteinkináz zvyšují nebo snižují jejich biologickou aktivitu a po jejich fosforylaci jsou tak schopny přenášet signál. Před aktivací proteinkináz jsou všechny proteiny v neaktivním stavu. Aktivace proteinkináz je provedena různými stimulačními podněty. K aktivaci tyrozinových proteinkináz dochází po dimerizaci způsobené ligandy a po zahájení fosforylace segmentů. Tyto tyrozinové proteinkinázy představují receptory epidermálního růstového faktoru (EGFR), které se na aktivaci nepodílí. Jednotlivé proteinkinázy mohou mít

vlastní mechanismy aktivace. Aktivace rodiny Src kináz začíná defosforylací inhibitorů fosfotyrozinu a pokračuje aktivací fosforylace segmentů tyrozinu nebo treoninu. Rodina CDK je aktivována cykliny a  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin-dependentní proteinkinázy (CAMK) jsou aktivovány vápenatými a kalmodulinovými komplexy (Cabral a kol., 2024; Chiwoneso a kol., 2025; Roskoski, 2015).

Volné proteinkinázy se skládají z primární, sekundární a terciální struktury. Primární struktura se skládá z aminokyselinových sekvencí, které byly rozřazeny do 11 domén, značených římskými číslicemi I-XI. Jednotlivé domény obsahují 250-300 aminokyselin. Sekundární struktura skládá jednotlivé domény do prostorových útvarů a vytváří tak dva konce. Malý aminoterminální konec (N-konec) se skládá z  $\beta$ -skládaného listu s pěti vazebnými místy a velký karboxyterminální konec (C-konec) se skládá z  $\alpha$ -helixu a aminokyselinových smyček. Mezi C-konec a N-konec se vytváří štěrbina pro navázání ATP. ATP je umístěno přímo pod smyčkou I. domény, která je bohatá na glycin. V terciální struktuře dochází k provázání ATP pomocí vodíkových a solných můstků s C-koncem a s N-koncem. C-konec obsahuje  $\text{Mg}^{2+}$  ionty, který se také navazuje na ATP. Ve zpevnování struktury hrají velkou roli hydrofobní interakce mezi jednotlivými strukturami. Po vzniku všech tří struktur vzniká neaktivovaná proteinkináza. Všechny aktivované proteinkinázy musí obsahovat signalizační motivy. Tyto motivy se označují Lys/Glu/Asp/Asp (lysin/glutamin/kyselina asparagová/ kyselina asparagová). Díky přítomnosti signalizačních motivů se vazba ATP s  $\text{Mg}^{2+}$  iontem stabilizuje, což poukazuje na vznik funkční proteinkinázy. První proteinkinázy, na které byla tato struktura popsána byla proteinkináza A (McClendon a kol., 2014; Roskoski, 2015).

Fosforylace proteinů probíhá podle této rovnice:



Proteinkinázy katalyzují vazbu fosfátové skupiny ( $\text{PO}_3^{2-}$ ) z ATP na proteinový substrát. Fosfátová skupina se přenáší z  $\text{MgATP}^{-1}$  substrátu, který obsahuje divalentní kationt  $\text{Mg}^{2+}$ . Proteinový substrát pro serin obsahuje treonin-alkoholovou skupinu a pro tyrozin obsahuje fenolovou skupinu. Alkoholová i fenolová skupina má na proteinu hydroxylovou skupinu (-OH), na kterou se váže fosfátová skupina z ATP (Roskoski, 2015).

Mezi nejznámější fosforylované proteiny patří kasein (z mléka) a fosfitin (z vaječného žloutku). Oba tyto proteiny přirozeně obsahují jednu fosfátovou skupinu a na každé dva aminokyselinové zbytky, což je dělá nejsilněji fosforylovanými proteiny. Další důležité rozdíly

ve vlastnostech proteinů byly objevené po fosforylaci tyrosinu, serinu, threoninu, lysinu anebo histidinu u středního a velkého T antigenu polyomavirů (Roskoski, 2015).

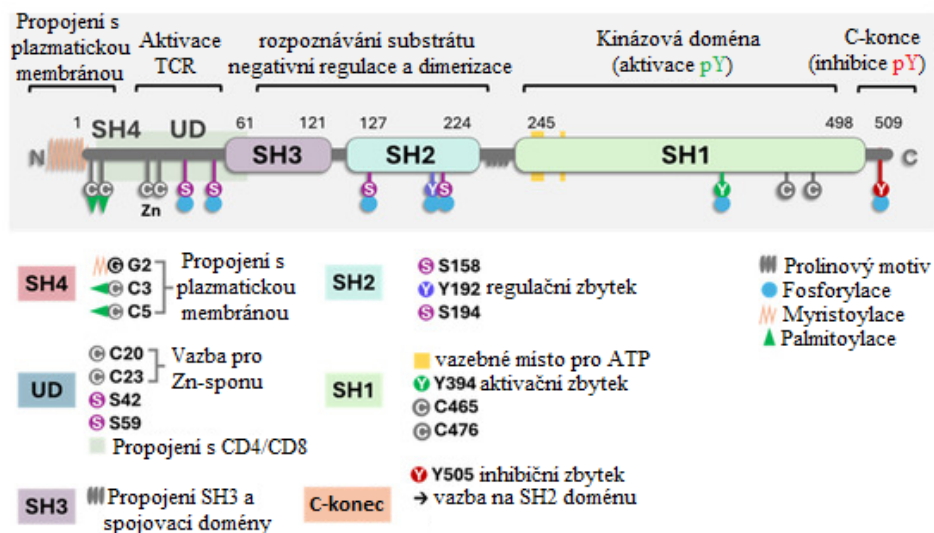
Proteinkinázy se dělí do devíti skupin, které se nazývají AGC, CAMK, CK1, CMGC, STE, TK, TKL, RCG, OTHER. AGC skupina dostala název podle jejich prvních tří členů, a to proteinkinázy A, proteinkinázy G a proteinkinázy C. CAMK skupina obsahuje proteinkinázy závislé na vápníku nebo kalmodulinu. Název CK1 skupiny je zkratkou pro kaseinové kinázy 1, což je také název jedné z podskupin. Jméno čtvrté skupiny s názvem CMGC vzniklo, stejně jako název první skupiny, a to z názvů jednotlivých podskupin (CDK, mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK), kináza glykogensyntázy (GSK), kináza podobná CDK (CDKL)). Další skupina má název STE, ve které jsou kinázy příbuzné sterilním genům kvasinek. Skupina TK je zkratkou pro tyrozinkinázu a skupina TKL je zkratkou pro struktury podobné tyrozinkináze. Skupina receptor guanyln cykláz (RCG) je podobná doménám sekvenovaných tyrozinovou proteinkinázou. A do poslední skupiny ostatních kináz, patří všechny ostatní proteinkinázy, které nezapadají do žádné jiné skupiny (Roskoski, 2015).

### 2.3 Proteinkináza LCK

Označení LCK pochází k anglického názvu „lymphocyte cell-specific protein-tyrosine kinase“ a volně přeloženo jsou to tyrozinové proteinkinázy specifické pro lymfocyty. Mohou se také označovat jako lymfocytární C-terminální Src kinázy (LSK) nebo se dříve označovaly jako p56lck. LCK patří do rodiny Src kináz. Rodiny Src kináz (SFK) patří mezi nereceptorové tyrozinové proteinkinázy. Rodina Src kináz iniciuje a reguluje intracelulární signalizační dráhy prostřednictvím tyrozinové fosforylace. Díky tyrozinové fosforylaci dochází ke změně konformace proteinů, což vede ke vzniku vazebného místa pro SH2 doménu a proteinovou tyrozin vázající se doménu. Vznikem této vazby dochází k regulaci proteinové aktivity a může také docházet k interakci proteinu s proteinem. Tento mechanismus umožňuje rodině Src kináz přenos pozitivních a negativních signálů prostřednictvím kaskádové regulace (Bommhardt a kol., 2019; De Sanctis a kol., 2024).

Enzymatická struktura vázané proteinkinázy LCK je stejná jako u ostatních Src kináz a je vyobrazena na obrázku 8. Skládá se tedy z SH4 domény na N-konci, unikátní domény, SH3 a SH2 domény, katalytické tyrozinkinázové SH1 domény a krátkého C-konce. SH4 doména se pomocí řetězce kyseliny myristoylové propojuje s glycinem a s dvěma zbytky cysteinu, přičemž vzniká ireverzibilní spojení (myristoylace). Toto spojení může být i reverzibilní, pokud se místo kyseliny myristoylové tvoří řetězce z kyseliny palmitové (palmitoylace). Myristoylace

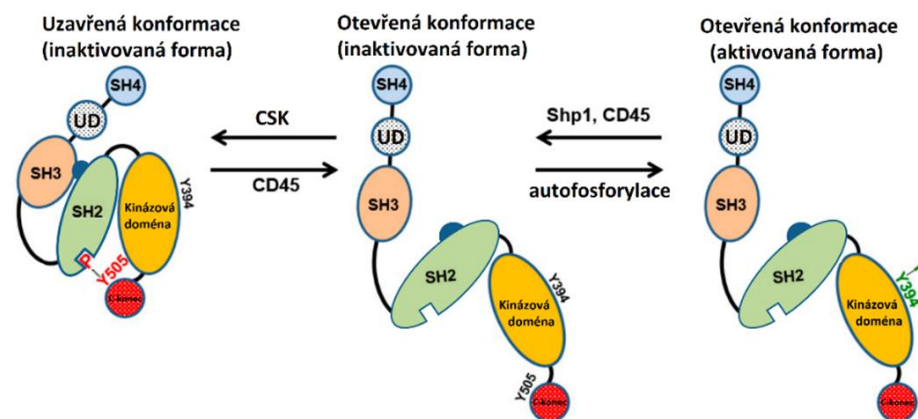
a palmitoylace jsou nezbytné pro vazbu LCK na plazmatickou membránu. SH4 doména je ukotvená v plazmatické membráně. Součástí SH4 domény jsou dva cysteiny, které slouží k vazbě  $Zn^{2+}$  iontu na SH4 doménu. Spojením cysteinů a  $Zn^{2+}$  iontu vzniká komplex zvaný zinková spona. Za SH4 doménou se nachází unikátní doména, do které zasahuje zinková spona. A společně s SH4 je unikátní doména v kontaktu s CD4 nebo s CD8. Dalšími složkami LCK jsou SH3 a SH2 domény, které regulují konformační změny na katalytické doméně SH1 při aktivaci a deaktivaci LCK, prostřednictvím motivů bohatých na prolin a motivů obsahujících fosfotyrosin. SH1 katalytická doména obsahuje dva cysteinové a jeden glycinový (Y) zbytek a také volná vazebná místa pro navázání ATP. Poslední částí LCK je krátký C-terminální konec, na kterém je navázán glycinový zbytek Y505. Y505 je inhibitor a uplatňuje se při zavření konformace LCK. Struktura LCK je složená z aminokyselin, které se řadí od N-konce k C-konci. N-konec obsahuje SH4 doménu (Bommhardt a kol., 2019; Bozso a kol., 2020; De Sanctis a kol., 2024).



Obrázek 8: Struktura proteinkinázy LCK (De Sanctis a kol., 2024; upraveno)

Aktivace LCK je popsána na obrázku 9 a probíhá následovně. LCK začíná v uzavřené konformaci, které se docílí fosforylací Y505 na C-konec. Tato fosforylace je zprostředkována CSK a vede k intramolekulární interakci Y505 s SH2 doménou, která následně uzavře LCK. Uzavřená konformace je stabilizována interakcí SH3 domény s prolinovou oblastí na spojovací SH2 doméně. Defosforylací Y505, která je zprostředkována protein tyrosin fosfatázou CD45, se LCK znovu otevře. CD45 je transmembránový protein, který exprimují všechny hematopoetické buňky. Aby mohlo vůbec k defosforylaci dojít, tak se nejdříve musí inhibovat produkce CSK. CSK je zodpovědná za regulaci konformace LCK. Pokud dochází k fosforylaci LCK, tak je CSK exprimována. Pokud dochází k defosforylaci LCK, tak CSK musí být

inhibována. Po otevření LCK dochází k fosforylaci Y394, který se nachází v aktivační smyčce v katalytické doméně, a to vede k aktivaci LCK. Aktivace LCK je dále regulována fosforylací dalších aminokyselinových zbytků. Pokud by došlo k fosforylaci Y192, který je umístěn na SH2 doméně, došlo by k interakci mezi LCK a CD45, což by vedlo k hyperfosforylaci Y505 a k inaktivaci LCK. Fosforylace Y192 se neobejde bez přítomnosti ZAP70. Y192 je společně se zbytkem serinu 59 (S59) součástí unikátní domény. Y192 je také součástí smyčky zodpovědné za zpětnou vazbu, díky které se Y192 podílí na regulaci aktivace LCK a také se společně s S59 podílí na regulaci signalizace TCR. S59 je fosforylována extracelulárními signálově regulačními kinázami jako jsou extracelulární signál regulační kinázy 1/2 (Erk1/2). To vede k defosforylaci samotné S59 prostřednictvím kalcineurinu a to způsobuje pozitivní nebo negativní regulaci aktivity LCK. Při blokaci extracelulárních signalizačních regulačních kináz 1/2 (Erk1/2) k těmto dějům nedochází a vedou k ukončení proximální signalizace TCR (Bommhardt a kol., 2019; Bozso a kol., 2020; De Sanctis a kol., 2024).



Obrázek 9: Aktivace proteinkinázy LCK (Bommhardt a kol., 2019; upraveno)

LCK lze v nejvyšším zastoupení nalézt v thymu a v apendixu. V nižších koncentracích je LCK i v tonzilách, lymfatických uzlinách, slezině. LCK také mohou exprimovat tkáně jako jsou slinné žlázy, plíce, tenké střevo, tlusté střevo, žlučník, jícen, neurony, močový měchýř, prostata a děložní čípek. Protože LCK jsou produkovány v tolika tkáních a také se podílejí na vícero buněčných procesech, jsou často zmiňovány v souvislosti s nádorovými nemocemi. LCK se podílí na patogenezi kolorektálního karcinomu, chronické lymfocytární leukemii a thymomu. U kolorektálního karcinomu je LCK produkována některými nádorovými buňkami tlustého střeva a v nenádorových buňkách tlustého střeva je exprese LCK nízká. Díky takto nerovnoměrné expresi LCK buňkami tlustého střeva dochází k navýšení nenádorových buněk, což vede k tumorigenezi. K léčbě kolorektálního karcinomu s takovýmito nálezy je nejslibnější léčba pomocí LCK inhibitorů. U chronické lymfocytární leukemie LCK podporuje signalizaci

B-lymfocytárních receptorů a napomáhá tak k přežití buňky. Také podporuje rezistenci B-lymfocytů vůči glukokortikoidům a inhibici apoptózy LCK u buněk chronické lymfocytární leukemie. Stejně jako u léčby kolorektálního karcinomu se u chronické lymfocytární leukemie léčba zaměřuje na LCK. U thymomu dochází ke zvýšené expresi LCK, což vede ke zvýšené proliferaci nezralých thymocytů s následně k tumorigenezi. Proto by byly k léčbě vhodné inhibitory LCK, které regulují její množství tak, aby nedošlo ke zvýšené expresi. Kromě těchto tří onkologických onemocnění se LCK uplatňuje u imunitních odpovědí a u signalizace nádorových buněk. Proto má stanovení LCK potenciál i u jiných nádorových onemocnění jako třeba u karcinomu prsu, plic, žlučových cest, gliomu, melanomu a endokrinních nádorů slinivky břišní (De Sanctis a kol., 2024).

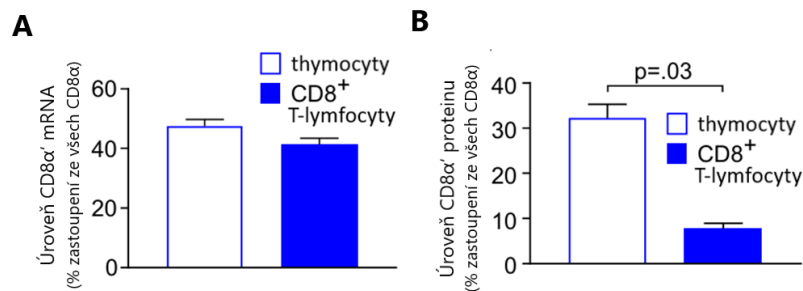
## 2.4 Proteinkináza LCK u T-lymfocytů

Ve spojení s T-lymfocyty se LCK podílí na jejich aktivaci. LCK je totiž zakotvená v plazmatické membráně a na rozdíl od TCR může být aktivována i za nepřítomnosti prezentujícího antigenu. Proto lze LCK lehce vychýlit z rovnováhy a porušit tak signalizaci T-lymfocytu. Na povrchu plazmatické membrány jsou ukotveny CD4 nebo CD8 právě na struktuře LCK. LCK je první kinázou, která je zapojena do aktivace T-lymfocytů a také je základní složkou odpovědi T-lymfocytů. Mimo povrchovou membránu T-lymfocytů je LCK exprimována na povrchu mitochondriální membrány obohacené o glykolipidy. Plazmatická mitochondriální membrána obohacená o glykolipidy je také obohacena o vysoce fosforylovaný TCR-CD3 komplex, ZAP70, SH2 doménu spojenou s leukocytárním proteinem o velikosti 76 kDa (SLP-76) a fosfolipázy C $\gamma$ 1 (De Sanctis a kol., 2024).

Schopnost vazby koreceptor-LCK využívá odlišné mechanismy u thymocytů a u zralých T-lymfocytů. Rozdíl by mohl být v molekulární hmotnosti řetězce CD8 $\alpha$ . Molekulová hmotnost řetězce CD8 $\alpha$  u thymocytů je nižší než u zralých T-lymfocytů v periferní krvi. Tento rozdíl vede ke zvýšené modifikaci proteinů, při které dochází k navázání kyseliny sialové na konec oligosacharidového řetězce glykoproteinu (sialyzace). K sialyzaci dochází více u Tc-lymfocytů v periferní krvi než u thymocytů. Pokud by byla kyselina sialová odebrána z řetězce, prostřednictvím neuraminidázy, molekulární hmotnost CD8 $\alpha$  by se vrátila do normálu, ale neovlivnilo by to detekci protilátek (Horkova a kol., 2020).

Další rozdíl je, že thymocyty mají nižší vazebnost k LCK. Toto je způsobeno tím, že LCK je navázána na izoformu CD8 $\alpha$ , která je značená jako CD8 $\alpha'$ . CD8 $\alpha'$  neobsahuje vazebné místo pro LCK. U zralých T-lymfocytů je vazba CD8-LCK silnější než vazba CD4-LCK.

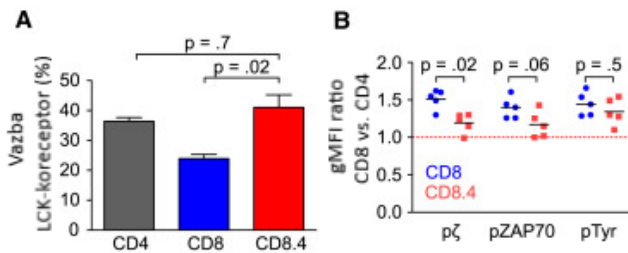
Zvýšená vazebná síla CD8-LCK může být způsobena dvěma faktory. Prvním faktorem je, že thymocyty obsahují CD8 $\alpha$ ' , zatím co periferní T-lymfocyty CD8 $\alpha$ ' neobsahují. Ale jak lze vidět na obrázku 10A, je úroveň CD8 $\alpha$ ' mRNA u thymocytů a Tc-lymfocytů podobná. Exprese CD8 $\alpha$ ' by měla být regulována posttranskripčně, ale jak jde vidět na obrázku 10B, úroveň CD8 $\alpha$ ' proteinu u Tc-lymfocytů je znatelně nižší. Druhým faktorem je, že CD8 $\alpha$ ' je málo exprimován (asi 30 %) z celkového počtu CD8 $\alpha$  na thymocytech, jak je uvedeno na obrázku 10B (Horkova a kol., 2020).



Obrázek 10: (A) Množství mRNA u CD8 $\alpha$ ' pro thymocyty a Tc-lymfocyty (B) Množství proteinu u CD8 $\alpha$ ' pro thymocyty a Tc-lymfocyty (Horkova a kol., 2020; upraveno)

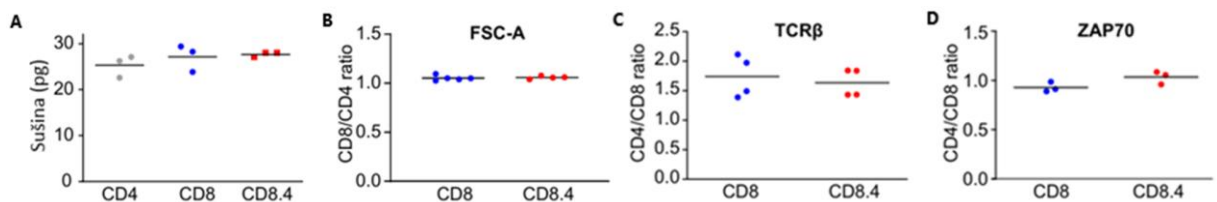
Většina molekul LCK v thymocytech je spojená s CD4 nebo CD8. Bylo pozorováno, že v *in vitro* testech má CD4 vyšší afinitu k LCK než CD8. CD4 sekvenuje LCK při vývoji z CD8 ve stádiu dvojité pozitivity, což se u zralých Tc-lymfocytů neděje. Ze zkoušek s modulárními modely také vyplývá, že monoklonální Tc-lymfocyty v periferní krvi jsou omezeny na MHC I. třídy a mohou tak být aktivovány pozitivní selekcí nebo částečně negativní selekcí vlastními antigeny (Horkova a kol., 2020; Mørch a kol., 2020).

Pokusem s chimérickými koreceptory CD8.4 byly pozorovány odlišné signalizace TCR u T-lymfocytů, jak je vidět na obrázku 11A. Z testu s CD8.4 bylo zjištěno, že síla vazby koreceptoru s LCK se v průběhu vývoje T-lymfocytu mění a s tím se mění i signalizace TCR u jednotlivých T-lymfocytů. Tato změna v signalizaci TCR je způsobená fosforylací ZAP70, TCR $\zeta$  a tyrozinu, která byla naměřena u Tc-lymfocytů vyšší než u Th-lymfocytů, jak je vidět na obrázku 11B. Což ukazuje na změny ve vazbě koreceptor-LCK v průběhu vývoje jsou způsobeny rozdíly v TCR signalizaci (Horkova a kol., 2020; Mørch a kol., 2020).



Obrázek 11: (A) Síla vazby koreceptor-LCK pro jednotlivé koreceptory (B) Porovnání síly signalizace TCR $\zeta$ , ZAP70 a tyrozinu u CD8 a CD8.4 (Horkova a kol., 2020; upraveno)

Rozdíly v signalizaci TCR mohou být také způsobené expresí TCR, která je nejvyšší u Th-lymfocytů a exprese ZAP70, která je stejná pro Th-lymfocyty i Tc-lymfocyty. Tyto hodnoty jsou vyobrazeny na obrázku 12. Tohle dokazuje, že velikostní rozdíly buněk a TCR nebo ZAP70 a jejich exprese jsou také důležité při signalizaci TCR (Horkova a kol., 2020).



Obrázek 12: (A) Porovnání velikostí CD4, CD8 a CD8.4 prostřednictvím hmotnosti sušiny (B) Porovnání velikostí CD4, CD8 a CD8.4 prostřednictvím průtokové cytometrie (forward scatter) (C) Množství TCR $\beta$  u CD8 a CD8.4 (D) Množství exprimovaného ZAP70 u CD8 a CD8.4 (Horkova a kol., 2020; upraveno)

I přes tyto rozdíly v signalizaci TCR, jsou u jednotlivých skupin T-lymfocytů mechanismy převodu signálu a aktivace LCK stejné. Aktivovaná LCK je podmínkou pro fosforylaci tyrosinových zbytků na ITAM, které jsou umístěny na  $\zeta\zeta$  řetězci TCR-CD3 komplexu. LCK se na T-lymfocytu vyskytuje buď asociovaná s CD4, CD8 nebo se vyskytuje volně. Při vývoji je vazba LCK na plazmatické membráně velmi důležitá, protože všechny LCK na thymocytech jsou asociovány s CD4 nebo s CD8. Tímto zjištěním byla vyvrácena teorie o jejich negativním účinku na TCR při vazbě na CD4 nebo na CD8. Také bylo potvrzeno, že volné LCK na TCR inhibují fosforylaci komplexu TCR-CD3 (Bommhardt a kol., 2019).

Inhibice TCR-CD3 komplexu je dosaženo iontovými interakcemi CD3 $\zeta$  zbytků s aminokyselinami na unikátní doméně, které jsou obohaceny o kyselinové zbytky. Fosforylace ITAM je následována propojením ZAP70 s TCR prostřednictvím SH2 domény. ZAP70 je plně aktivován až do ukončení fosforylace zprostředkované LCK. Aktivací ZAP70 dochází k fosforylaci transmembránového proteinu LAT. LAT slouží k propojení TCR s intracelulární signalizační dráhou, která může za transkripční aktivaci a proliferaci T-lymfocytů. Při fosforylaci LAT slouží LCK jako molekulární most. Spojení ZAP70 a SH2 domény vede ke

spojení LAT a SH3 domény, prostřednictvím prolinových motivů a negativně nabitých aminokyselin, které se vyskytují na LAT. Předpokládá se, že vazba LCK na LAT prostřednictvím tohoto motivu negativně ovlivňuje kinázovou aktivitu LCK. Díky ovlivnění LAT pomocí LCK dochází k ovlivnění proximální TCR signalizace (Bommhardt a kol., 2019).

LCK se podílí na přenosu signálu z koreceptoru CD28, což vede k aktivaci T-lymfocyty. LCK fosforyluje tyrozinové zbytky nacházející se ve dvou signalizačních motivech umístěných v cytosolové doméně CD28, YMNM a PYAP. Fosforylace YMNM motivu umožňuje nábor adaptorů proteinu 2 vázaném na receptoru růstového faktoru (Grb2), GADS a fosfatidylinositol-3-kinázu (PI3K) podjednotky p85, což umožňuje CD28 aktivovat signalizační dráhy. Předpokládá se, že se PYAP motiv přímo váže na LCK, bez použití fosforylace na SH3 doménu (Bommhardt a kol., 2019).

Vazba CD28 s LCK může způsobit fosforylaci fosfoinosid-dependentní kinázy 1 (PDK1), což je nezbytné pro aktivaci proteinkinázy C theta (PKC $\theta$ ), která přispívá k aktivaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B. LCK se váže na PYAP motiv prostřednictvím SH2 domény. A to umožňuje SH3 doméně interagovat s PKC $\theta$ , která je bohatá na prolin (Bommhardt a kol., 2019).

Tento popsaný mechanismus dokazuje, že by LCK mohla hrát roli při vazbě PKC $\theta$  na CD28 v blízkosti fosfoinosid-dependentní kinázy 1 (PDK1). Signalizace vzniklá prostřednictvím CD28 je inhibována prostřednictvím defosforylace motivu YMNM pomocí SH domény obsahující fosfatázu-1 nebo -2 (SHP1 nebo SHP2), které jsou aktivovány po ligaci PD1. LCK způsobuje snižování funkčnosti ostatních receptorů včetně Fas,  $\beta$ 1-integrinů a draslíkových kanálů Kv1.3, které se podílí na tvorbě imunologické synapse po TCR stimulaci (Bommhardt a kol., 2019).

## ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývala úlohou proteinkináz LCK a jejího působení u T-lymfocytů. Proteinkináza LCK je enzym, který se nejčastěji vyskytuje navázaný na plazmatickou membránu T-lymfocytů. Na plazmatické membráně se na proteinkinázu LCK navazují koreceptory CD4 nebo CD8. Díky tomuto spojení a spojení s vnějším prostředím skrz plazmatickou membránu může LCK ovlivňovat signalizaci T-lymfocytů, což může mít vliv na vznik autoreaktivních T-lymfocytů. Spojením s koreceptory může LCK ovlivňovat různým způsobem signalizaci Tc-lymfocytů a Th-lymfocytů.

Autoreaktivní T-lymfocyty reagují na vlastní antigeny. Při nepřiměřeném množství takových T-lymfocytů vznikají autoreaktivní onemocnění. Ale pokud je udržována určitá hranice v počtu autoreaktivních T-lymfocytů, mohou být naopak velmi prospěšné. Typickým příkladem bezpečných autoreaktivních T-lymfocytů jsou Treg, které svojí autoreaktivitou regulují imunitní odpověď.

Rozdíly způsobené vazbou s LCK jsou také u Tc a Th-lymfocytů. Tyto rozdíly jsou způsobené vazbou CD4 nebo CD8 na LCK. Tc-lymfocyty jsou více bezpečné autoreaktivní lymfocyty než Th-lymfocyty. Ale autoreaktivní signalizace TCR je silnější u Th-lymfocytů, v důsledku vyšší afinity LCK k CD4 než k CD8.

V průběhu vývoje T-lymfocytů, který začíná v kostní dřeni s mezikrokem v thymu a končí v periferní krvi, se spojení LCK s T-lymfocyty liší. Thymocyty, především ve stádiu dvojité positivity ( $CD4^+$  a  $CD8^+$ ), mají slabší vazbu k LCK než zralé T-lymfocyty. Thymocyty mají také lehčí TCR řetězce, tedy s menší molekulovou hmotností, než zralé T-lymfocyty.

Treg buňky se řadí mezi Th-lymfocyty, ale v souvislosti s LCK mají podobné vlastnosti jako Tc-lymfocyty. Treg a Tc-lymfocyty rozpoznávají APC a podle jejich specifických mechanismů na ně reagují, buď potlačí jejich funkce nebo je zahubí. Na rozdíl od Tc-lymfocytů, které rozpoznávají převážně cizorodé antigeny z patogenů prezentované na APC, Treg buňky reagují především na vlastní APC a efektorové T-lymfocyty. Tyto podobnosti s Tc-lymfocyty naznačují, že Treg jsou více bezpečně autoreaktivní a mají slabší autoreaktivní signalizaci TCR než zbytek Th-lymfocytů, stejně jako Tc-lymfocyty. Přítomnost Treg buněk je zásadní pro udržení imunologické rovnováhy, neboť porucha jejich vývoje může vést ke vzniku autoimunitních onemocnění.

## POUŽITÁ LITERATURA

- ALCOVER, A, ALARCÓN, B a V D BARTOLO. Cell Biology of T Cell Receptor Expression and Regulation. *Annual Review of Immunology*. 2018, **36**, 103-125. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053429>.
- ANAYA, JM, Y SHOENFELD, A ROJAS-VILLARREGA a et al., editors. Introduction to T and B lymphocytes. Autoimmunity: From Bench to Bedside. 2013. *Bogota: El Rosario University Press*, 2013. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459471/>.
- ANVAR, M.T., K. RASHIDAN, N. ARSAM a et al. Th17 cell function in cancers: immunosuppressive agents or anti-tumor allies?. *Cancer Cell International*. 2024, **24**. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12935-024-03525-9>.
- ATTAF, M., HUSEBY, E. a SEWELL, A. K.  $\alpha\beta$  T cell receptors as predictors of health and disease. *Cellular and Molecular Immunology*. 2015, **26**, 391-399. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.134>.
- BOMMHARDT, U., B. SCHRAVEN a L. SIMEONI. Beyond TCR Signaling: Emerging Functions of Lck in Cancer and Immunotherapy. *MDPI*. 2019, **20** (14). Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms20143500>.
- BOZSO, S. J., J. J. H. KANG a J. NAGENDRAN. The role of competing mechanisms on Lck regulation. *Immunologic Research*. 2020, **68**, 289-295. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12026-020-09148-2>.
- CABRAL, G., W. J. MOSS a K. M. BROWN. Proteomic approaches for protein kinase substrate identification in Apicomplexa. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2024, **259**. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2024.111633>.
- COSMI, Lorenzo, Laura MAGGI, Veronica SANTARLASCIO, Francesco LIOTTA a Francesco ANNUNZIATO. T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry Part A*. 2013, **85**, 36-42. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22348>.
- DE SANCTIS, J. B., J. V. GARMENDIA, H. DUCHOVÁ, V. VALENTINI, A. PUSKASU, A. KUBÍČKOVÁ a M. HAJDÚCH. Lck Function and Modulation: Immune Cytotoxic Response and Tumor Treatment More Than a Simple Event. *MDPI*. 2024, **16** (15). Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cancers16152630>.
- DELACHER, M., Ch. D. IMBUSCH, A. HOTZ-WAGENBLATT, JP. MALLM, K. BAUER, M. SIMON, D. RIEGEL, A. F. RENDEIRO. S. BITTNER, L. SANDERINK, A. PANT, L. SCHMIDLEITHNER, K. L. BRABAND, B. ECHTENACHTER, A. FISCHER, V. GIUNCHIGLIA, P. HOFFMANN, M. EDINGER, Ch. BOCK, M. REHLI, B. BRORS, Ch. SCHMIDL a M. FEUERER. Precursors for Nonlymphoid-Tissue Treg Cells Reside in Secondary Lymphoid Organs and Are Programmed by the Transcription Factor BATF. *Immunity*. 2020, **52**, 259-312. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.12.002>.
- DE SIMONE, M., G. ROSSETTI a M. PAGANI. Single Cell T Cell Receptor Sequencing: Techniques and Future Challenges. *Frontiers Immunology*. 2018, **9**. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01638>.
- FISHER, M. S., S. V. SENNIKOV. T-regulatory cells for the treatment of autoimmune diseases. *Frontiers in Immunology*. 2025, **16**. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1511671>.

- HASSAN, M., M. ELZALLAT, D. M. MOHAMMED, M. BALATA a W. H. EL-MAADAWY. Exploiting regulatory T cells (Tregs): Cutting-edge therapy for autoimmune diseases. *International Immunopharmacology*. 2025, **155**. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2025.114624>
- HORKOVA, V., A. DROBEK, D. MUELLER, C. GUBSER, V. NIEDERLOVA, L. WYSS, C. G. KING, D. ZEHN, O. STEPANEK. Dynamics of the Coreceptor-LCK Interactions during T Cell Development Shape the Self-Reactivity of Peripheral CD4 and CD8 T Cells. *Cell Reports*. 2020, **30**, 1504-1514. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.008>.
- CHEEK, S., K. GINALSKI, H. ZHANG a N. V. GRISHIN. A comprehensive update of the sequence and structure classification of kinases. *BMC Structural Biology*. 2005, **5**. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1472-6807-5-6>.
- CHIWONESO, T. C., Y. LUO, Y. XU, X. CHEN, L. CHEN a J. SUN. Kinases and their derived inhibitors from natural products. *Bioorganic Chemistry*. 2015, **156**. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2025.108196>.
- IVANOVA, Ekatarina A. a Alexander N. OREKHOV. T Helper Lymphocyte Subsets and Plasticity in Autoimmunity and Cancer: An Overview. *BioMed Research International*. 2015. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2015/327470>.
- JANEWAY, CA Jr, P. TRAVERS, M. WALPORT, et al. Principles of innate and adaptive immunity. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 2001, **5**. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27090/>.
- JÍLEK, Petr. *Imunologie: stručně, jasně, přehledně*. Online. 2., doplněné vydání. Praha: Grada Publishing. 2019, 59-64. ISBN 978-80-271-0595-3. Dostupné z: <https://www.bookport.cz/kniha/imunologie-5316/>.
- KHAN, Uqba a Hareem GHAZANFAR. T Lymphocytes and Autoimmunity. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2018, **341**, 125-168. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.05.008>.
- KUMARI, S, S. CURADO, V. MAYYA, M. L. DUSTIN. T cell antigen receptor activation and actin cytoskeleton remodeling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2014, 546-556. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.05.004>.
- MALKO, D., T. ELMZZAHI a M. BEYER. Implications of regulatory T cells in non-lymphoid tissue physiology and pathophysiology. *Frontiers in Immunology*. 2022, **13**. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.954798>.
- MARIUZZA, R A, PRAGATI, A a ORBAN, J. The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation: An enduring enigma. *Journal of Biological Chemistry*. 2020, **295**, 914-925. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)49904-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)49904-2).
- MCCLENDON, C. L., A. P. KORNEV, M. K. GILSON a S. S. TAYLOR. Dynamic architecture of a protein kinase. *PNAS*. 2014, (43). Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.1418402111>.
- MENG, Tingting, Lili NIE a Ying WANG. Role of CD4+ T cell-derived cytokines in the pathogenesis of uveitis. *Clinical and Experimental Medicine*. 2025, **25**. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10238-025-01565-7>.
- MØRCH, A. M., Š. BÁLINT, A. M. SANTOS, S. J. DAVIS a M. L. DUSTIN. Coreceptors and TCR Signaling – the Strong and the Weak of It. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020, **8**. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.597627>.

- NAGATA, S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annual Review of Immunology*. 2018, **36**, 489-517. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053010>.
- NICHOLSON, L. B. The immune systém. *Essays in Biochem.* 2016, **60**, 245-301. Dostupné z: <https://doi.org/10.1042/EBC20160017>.
- NÜSSING S., J. A. TRAPANI a I. A. PARISH. Revisiting T Cell Tolerance as a Checkpoint Target for Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*. 2020, **11**. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.589641>
- PELLICCI, D. G., HF KOAY a S. P. BERZINS. Thymic development of unconventional T cells: how NKT cells, MAIT cells and  $\gamma\delta$  T cells emerge. *Nature Reviews Immunology*. 2020, **20**, 756-770. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0345-y>.
- PENKA, Miroslav a SLAVÍČKOVÁ, Eva. *Hematologie a transfuzní lékařství*, I, Hematologie. Praha: Grada, 2011, 215-222. ISBN 978-80-247-3459-0. Dostupné z: <https://www.bookport.cz/kniha/hematologie-a-transfuzni-lekarstvi-i-540/>.
- RASKOV, H., A. ORHAN, J. P. CHRISTENSEN a I. GÖGENUR. Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *British Journal of Cancer*. 2021, **124**, 359-367. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01048-4>.
- RIETHER, C., C. M. SCHÜRCH a A. F. OCHSENBEIN. Regulation of hematopoietic and leukemic stem cells by the immune systém. *Cell Death and Differentiation*. 2015, **22**, 187-198. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.89>.
- ROSENBLUM, M. D., K. A. REMEDIOS a A. K. ABBAS. Mechanisms of human autoimmunity. *The Journal of Clinical Investigation*. 2015, **125**, 2228-2233. Dostupné z: <https://doi.org/10.1172/JCI78088>.
- ROSKOSKI, R. Jr. A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacological Research*. 2015, **100**, 1-23. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.07.010>.
- SALA, C, M STADERINI, T LOTTIONI, C DURANTI, G ANGELINI, G CONSTANTIN a A ARCANGELI. Expression of the ether-a-gò-gò-related gene 1 channel during B and T lymphocyte development: role in BCR and TCR signaling. *Frontiers in Immunology*. 2023, **14**. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1111471>.
- SHAH, K., A. AL-HAIDARI, J. SUN a et al. T cell receptor (TCR) signaling in health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021, **6**. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00823-w>.
- SCHWARTZ, P. A. a B. W. MURRAY. Protein kinase biochemistry and drug Discovery. *Bioorganic Chemistry*. 2011, 39, 192-210. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2011.07.004>.
- SWEENEY, J., S. MARWAHA a H. ARNOUK, Gamma Delta T Cell: A Unique Member of the T Cell Family with a Significant Role in Cancer Immunotherapy. *Biology of T Cells in Health and Disease*. 2025. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/chapters/1207643>.
- TROJAN, Stanislav. *Lékařská fyziologie*. Vyd. 4., přeprac. a dopl. Praha: Grada, 2003, 157-159. ISBN 80-247-0512-5.
- WALDMANN H. Mechanisms of immunological tolerance. *Clinical Biochemistry*. 2016, **49**, 324-328. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.05.019>

- WANG L., FS. WANG, M. E. GERSHWIN. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *Journal of Internal Medicine*. 2015, **278**, 369-395 Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/joim.12395>.
- WU, Y., Y. ZOU, C. SONG, K. CAO, K. CAI, S. CHEN, Z. ZHANG, D. GENG, N. ZHANG, H. FENG, M. TANG, Z. LI, G. SUN, Y. ZHANG, Y. SUN, Y. ZHANG. The role of serine/threonine protein kinases in cardiovascular disease and potential therapeutic methods. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2024, **177**. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117093>
- WYSS, L., B. D. STADINSKI, C. G. KING, S. SCHALLENBERG, N. I. MCCARTHY, J. Y. LEE, K. KRETSCHMER, L. M. TERRACCIANO, G. ANDERSON, C. D. SURH, E. S. HUSEBY a E. PALMER. Affinity for self antigen selects Treg cells with distinct functional properties. *Nature immunology*. 2016, **17**, 1093-1101. Dostupné z: <https://www.proquest.com/docview/1812643475/fulltext/8A5DFE59FAA74E1CPQ/1?accountid=17239&sourcetype=Scholarly%20Journals>
- YOU, H, X ZHANG, H CHEN, Ch LIU, D TENG, J HAN, M CHEN, Y PANG, J ZHANG, M CAI, Y ZHAO, Q DONG, S WANG, Y XU, Y HU, P DONG a W HE,  $\gamma\delta$  T-cell autoresponses to ectopic membrane proteins: a new type of pattern recognition. *Cellular and Molecular Immunology*. 2025. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41423-025-01258-x>.