

## Abstrakt

T-lymfocyty jsou bezpochyby nejvíce studovanými buňkami imunitního systému. Jsou klíčovými hráči specifické imunity zodpovědnými za cílenou odpověď proti patogenům a jiným signálům nebezpečí. Díky jejich centrálnímu významu vede často jakákoliv porucha regulace jejich aktivity k imunopatologiím. Znalost jejich bio destruktivní efektorové funkce je tedy velice zásadní. Dodnes panují rozpory, jakým molekulárním mechanismem probíhá zahájení T-buněčné aktivace. Po rozeznání specifického antigenu prostřednictvím antigen-prezentující buňky a T-buněčného receptoru je aktivační signál přenesen přes plasmatickou membránu, kde následuje fosforylace cytoplasmatických částí T-receptorového komplexu. Tato událost je obecně považována za první biochemický znak aktivace T-lymfocytů v procesu zvaném „TCR triggering“. Jak se však aktivační signál dostane do buňky a jaké mechanismy regulují samotné zahájení signalizace, jsou dvě základní, avšak dosud nezodpovězené, otázky. V této práci jsme se zaměřili především na mechanismy regulace T-buněčné aktivace a tři související problémy. V prvním jsme se zabývali časoprostorovou organizací důležitých signálních molekul před a po aktivaci T-lymfocytů v kontextu tzv. lipidových mikrodomén, u kterých předpokládáme, že hrají důležitou úlohu v organizaci membrány během jejich aktivace. Zkoumali jsme především kinázu Lck, která je považována za hlavní generátor signálu zahajujícího T-buněčnou signalizaci. Pomocí biochemických metod jsme studovali distribuci aktivní formy kinázy Lck (pY394<sup>Lck</sup>) v membráně. Nejenže jsme ukázali, že v naivních T-lymfocytech je pY394<sup>Lck</sup> v omezeném množství přítomna téměř výlučně ve vysokomolekulárních komplexech, ale také jsme zjistili, že po aktivaci T-lymfocytů dojde ke značnému nárůstu množství této aktivované formy Lck a zároveň jejímu přesunu do lipidových mikrodomén. Podstatné rozdíly v kvantifikaci pY394<sup>Lck</sup> v naší a v předchozích studiích, které naopak poukazují na velké množství již aktivní Lck v nestimulovaných T-buňkách jež se po aktivaci nemění, vedou k odlišným závěrům ohledně úlohy pY394<sup>Lck</sup>. Vzhledem k tomu, že právě pY394<sup>Lck</sup> iniciuje samotné zahájení signalizace, je otázka bazální Lck aktivity velice důležitá. Dále jsme se proto zabývali tím, co způsobuje takovéto rozpory. Prokázali jsme, že většina těchto nesrovnalostí pramení z nekonsistence postupů při přípravě vzorků a vysoká úroveň detekované pY394<sup>Lck</sup> je tedy důsledek nekontrolované spontánní aktivace kinázy Lck během buněčné lýze. Již dříve jsme ukázali, že aktivací T-lymfocytů způsobený přesun kinázy Lck v rámci plasmatické membrány je důležitý pro její samotnou funkci, avšak mechanismus tohoto procesu není znám. V další části našeho výzkumu jsme se proto zaměřili na objasnění tohoto redistribučního procesu kinázy Lck a poprvé jsme identifikovali formování dočasného Lck-RACK1-cytoskeleton komplexu. Účast cytoskeletu v organizaci signálních molekul v rámci T-buněčné aktivace tak přináší další úroveň komplexity regulace T-receptorové signalizace. Závěrem, tato práce přináší řadu nových poznatků týkajících se příspěvku membránové organizace k časoprostorové regulaci aktivity kinázy Lck, stejně jako k dalším signálním komponentám účastnících se zahájení T-buněčné signalizace.