

# Analiza raznolikosti delta lanca T staničnih receptora perifernih gamadelta T stanica oboljelih od vulgarne psorijaze primjenom TCRSeq metode

---

Marković, Marina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:741997>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO**  
**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Marina Marković**

**ANALIZA RAZNOLIKOSTI DELTA**  
**LANCA T STANIČNIH RECEPTORA**  
**GAMA DELTA T STANICA OBOLJELIH**  
**OD VULGARNE PSORIJAZE**  
**PRIMJENOM TCRSEQ METODE**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2024.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO**  
**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Marina Marković**

**ANALIZA RAZNOLIKOSTI DELTA**  
**LANCA T STANIČNIH RECEPTORA**  
**GAMA DELTA T STANICA OBOLJELIH**  
**OD VULGARNE PSORIJAZE**  
**PRIMJENOM TCRSEQ METODE**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2024.**

Rad je ostvaren u Laboratoriju za analizu DNA na Medicinskom fakultetu Osijek.

Mentor rada: Izv. prof. dr. sc. Stana Tokić, mag. mol. biol.

Neposredni voditelj: asistent/doktorand Maja Jirouš Drulak, mag. med. lab. diag.

Rad ima 55 listova, 7 tablica i 21 sliku.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Psorijaza .....	1
1.1.1. Epidemiologija .....	1
1.1.2. Klinička slika i komorbiditeti.....	1
1.1.3. Etiologija .....	2
1.1.4. Dijagnoza i liječenje .....	2
1.1.5. Imunopatogeneza.....	3
1.2. Gama delta T-stanice.....	4
1.2.1. T-receptor gama delta stanica.....	4
1.3. Uloga gama delta T-stanica u psorijazi .....	6
2. HIPOTEZA .....	8
3. CILJEVI.....	9
4. ISPITANICI I METODE.....	10
4.1. Ustroj studije.....	10
4.2. Ispitanici .....	10
4.3. Materijali .....	11
4.4. Metode.....	11
4.4.1. Analiza kvalitete i kvantifikacija RNK.....	11
4.4.2. Priprema NGS knjižnice .....	12
4.4.3. Gel-elektroforeza i kvantifikacija knjižnice .....	16
4.4.4. Bioinformatička analiza podataka .....	18
4.5. Statističke metode .....	19
5. REZULTATI.....	20
5.1. Obilježja ispitanika.....	20
5.2. Obilježja TRD repertoara kože .....	20
5.3. Raznolikost TRD repertoara kože.....	21

5.4. Izražaj <i>TRD</i> gena.....	27
5.5. Analiza dijeljenih <i>TRD</i> klonotipova u koži zdravih i oboljelih od vulgarne psorijaze .	32
5.6. Najčešće <i>TRD</i> klonotipske varijante u koži zdravih i oboljelih ispitanika .....	33
5.7. Analiza povezanosti <i>TRD</i> repertoara s obilježjima ispitanika .....	35
5.7.1. Povezanost <i>TRD</i> repertoara s demografskim i biokemijskim obilježjima ispitanika .....	35
5.7.2. Povezanost <i>TRD</i> repertoara s kliničkim obilježjima oboljelih od PV .....	37
6. RASPRAVA .....	40
7. ZAKLJUČAK .....	44
8. SAŽETAK .....	45
9. SUMMARY .....	46
10. LITERATURA .....	47
11. ŽIVOTOPIS .....	56

## POPIS KRATICA

AMP	antimikrobni peptid
anti-HBs	protutijelo protiv staničnog antigena virusa hepatitisa B
BCG	( <i>Bacillus Calmette–Guérin</i> ) cjepivo protiv tuberkuloze
BSA	(engl. <i>Body Surface Area</i> ) zahvaćena površina tijela
CD	(engl. <i>cluster of differentiation</i> ) biljeg grupe stanica
cDNK	(engl. <i>complementary</i> ) komplementarna DNK nastala prepisivanjem mRNK
CMV IgM	protutijela M razreda imunoglobulina protiv citomegalovirusa
CMV IgG	protutijela G razreda imunoglobulina protiv citomegalovirusa
DC	(engl. <i>dendritic cells</i> ) dendritične stanice
DLQI	(engl. <i>Dermatology Life Quality Index</i> ) dermatološka ocjena kvalitete života
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
EDTA	(engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> ) etilendiamintetraoctena kiselina
g	gravitacijsko ubrzanje
GSP	(engl. <i>gene-specific primers</i> ) početnice specifične za određene gene
HLA	(engl. <i>Human Leukocyte Antigen</i> ) antigen ljudskih leukocita
HRZZ	Hrvatska zaklada za znanost
hsCRP	(engl. <i>high-sensitivity C-reactive protein</i> ) C-reaktivni protein visoke osjetljivosti
IFN	interferon
IL	interleukin
ITM	indeks tjelesne mase
KBC	klinički bolnički centar

l	litra
MBC	(engl. <i>molecular barcode</i> ) molekularni barkod
mDC	mijeloidne dendritične stanice
MHC	(engl. <i>major histocompatibility complex</i> ) glavni sustav tkivne podudarnosti
mM	(engl. <i>millimolar</i> ) $10^{-3}$ mol/l
mRNK	(engl. <i>messenger</i> ) glasnička RNK
NaOH	natrijev hidroksid
ng	nanogram
NGS	(engl. <i>next generation sequencing</i> ) sekvenciranje sljedeće generacije
NK	(engl. <i>natural killer</i> ) prirodne ubojice
nM	(engl. <i>nanomolar</i> ) $10^{-9}$ mol/l
PASI	(engl. <i>Psoriasis Area And Severity Index</i> ) ocjena površine zahvaćenosti i težine psorijaze
pb	par/parovi baza
PBS	(engl. <i>phosphate buffered saline</i> ) fosfatni pufer
PCR	(engl. <i>polymerase chain reaction</i> ) lančana reakcija polimeraze
pDC	plazmocitoidne dendritične stanice
pH	(engl. <i>potential of hydrogen</i> ) kiselost
pM	(engl. <i>picomolar</i> ) $10^{-12}$ mol/l
PSORS	(engl. <i>psoriasis susceptibility</i> ) genski lokusi podložnosti psorijazi
PV	(lat. <i>psoriasis vulgaris</i> ) vulgarna psorijaza
rcf	(engl. <i>relative centrifugal force</i> ) relativna centrifugalna sila
RNK	ribonukleinska kiselina



rpm	(engl. <i>revolutions per minute</i> ) broj okretaja u minuti
TBE	puffer od Tris baze, borne kiseline i EDTA
TCR	(engl. <i>T-cell receptor</i> ) T-stanični receptor
TLR	(engl. <i>Toll-like receptor</i> ) receptori slični Tollu
TNF	(engl. <i>tumor necrosis factor</i> ) čimbenik nekroze tumora
TRA	(engl. <i>T-cell receptor alpha</i> ) alfa lanac T-staničnog receptora
TRD	(engl. <i>T-cell receptor delta</i> ) delta lanac T-staničnog receptora
TRG	(engl. <i>T-cell receptor gamma</i> ) gama lanac T-staničnog receptora
Tris-HCl	puffer od trisaminometana i klorovodične kiseline
UcTCRdb	(engl. <i>Unconventional T Cell Receptor database</i> ) baza podataka o receptoru nekonvencionalnih T-stanica
UV	(engl. <i>ultraviolet</i> ) ultraljubičasto
°C	Celzijev stupanj

## 1. UVOD

### 1.1. Psorijaza

Psorijaza je upalna bolest kože kroničnog, promjenjivog tijeka, praćena razvojem reumatoloških i kardiovaskularnih komorbiditeta te pojavom recidiva nakon prestanka terapije. Relativno je česta u populaciji (1) te predstavlja ozbiljan javnozdravstveni i socijalni problem (2).

#### 1.1.1. Epidemiologija

U svijetu je dijagnosticirano oko 30 milijuna slučajeva psorijaze među odraslima, a smatra se da je taj broj i dvaput veći zbog velikog broja neprepoznatih bolesnika te manjka podataka o epidemiologiji ove bolesti (3). Prevalencija koja obično iznosi 1 – 3 % (1) podjednaka je među spolovima (4 – 7) i nije se značajnije mijenjala u posljednjih dvadesetak godina (4), ali varira ovisno o zemljopisnom području (3) te dobi ispitanika (4, 5). Odrasli znatno češće obolijevaju nego djeca (3), a žene nešto ranije nego muškarci (5). Iako se psorijaza može javiti u bilo kojoj životnoj dobi, primijećen je bimodalni trend pojavnosti u skladu s klasifikacijom na rani i kasni tip (8). Rani tip, odnosno tip 1, javlja se prije 40. godine, češći je, oboljeli imaju gensku predispoziciju i težu kliničku sliku (1, 8, 9). Kasni tip ili tip 2 oboljenja pojavljuje se nakon 40. godine života, uz razvoj blažih simptoma, bez dokaza o prisutnosti rizične genetičke podloge (1, 8).

#### 1.1.2. Klinička slika i komorbiditeti

Vulgarna psorijaza (PV – lat. *psoriasis vulgaris*) najčešći je oblik ove bolesti. Karakterizirana je pojavom dobro ograničenih, eritematoznih plakova iznad površine kože koji su prekriveni srebrnobijelim ljuskama (1). Kod većine oboljelih nailazimo na simetričan raspored plakova (10), a uglavnom je zahvaćena koža lubanje, laktova, trupa i koljena (2, 6, 10). Ovakva žarišta mogu se pojaviti u različitim veličinama i na bilo kojem dijelu tijela, a glavni simptomi su ljuskanje, crvenilo i svrbež zahvaćenih dijelova kože (6). Osim što sama bolest negativno utječe na kvalitetu života (11), osobe sa psorijazom imaju i veliku učestalost kardiovaskularnih oboljenja (12), posebice srčanog udara (13), zatim metaboličkog sindroma (14), dijabetesa (6) te mentalnih poremećaja poput depresije (12) i anksioznosti (6). Također, kod otprilike jedne petine bolesnika javlja se psorijatični artritis (7, 9) koji je u većini slučajeva obilježen upalom interfalangealnih zglobova šaka i stopala, te povezan s lošijom prognozom (1).

### 1.1.3. Etiologija

Kao i većina bolesti suvremenog čovjeka (15), i psorijaza pripada složenim bolestima te slijedi obrazac multifaktorijskog nasljeđivanja. To znači da je u razvoj oboljenja uključeno više čimbenika, kako genetičkih, tako i okolišnih (16). Važnost genetičke predispozicije uočena je još 80-ih godina prošlog stoljeća u studijama blizanaca koje su pokazale da jednojajčani blizanci imaju značajno veću vjerojatnost obolijevanja u odnosu na dvojajčane blizance (17). Od tada je otkriven veliki broj genskih lokusa koji su uključeni u nasljeđivanje psorijaze (18), a većina njih ima ulogu u imunološkom sustavu (19). Najvažnijim se smatraju genske varijante *HLA-Cw6* lokusa smještenog unutar *PSORS1* (engl. *psoriasis susceptibility*) regije koja nosi najveći genetički rizik za razvoj ranog tipa bolesti (20). Za manifestaciju simptoma kod pojedinaca s genskom sklonošću potrebni su okidači iz okoliša, a oni mogu dovesti i do pogoršanja postojećeg stanja (1, 2). Najčešći provocirajući čimbenici su: ozljede kože (2, 21), stres (2, 22, 23), pušenje (24), infekcije (2, 23, 25) i različiti lijekovi (26, 27).

### 1.1.4. Dijagnoza i liječenje

Dijagnoza psorijaze obično se postavlja kliničkim pregledom kože uz određivanje izgleda i rasporeda lezija. Uz to, važno je poznavati informacije o povijesti bolesti u obitelji, potencijalnim okidačima i prisutnosti drugih simptoma. Ako simptomi nisu jasni, može se raditi i biopsija radi histološke potvrde dijagnoze i isključivanja drugih oboljenja (28). Za utvrđivanje težine bolesti i odabir terapije često se primjenjuju PASI (engl. *Psoriasis Area And Severity Index*) i DLQI (engl. *Dermatology Life Quality Index*) upitnici. Veličina PASI indeksa određuje se uz pomoć bodovnog sustava koji kvantificira opseg bolesti procjenom zahvaćene površine tijela i intenziteta promjena kao što su crvenilo, zadebljanje i stupanj ljuštenja (1). DLQI upitnik koristi se pak za evaluaciju učinka bolesti i liječenja na kvalitetu života pacijenta (29). Ranije je često u upotrebi bila i BSA (engl. *Body Surface Area*) metoda ili metoda dlana za određivanje postotka površine tijela zahvaćene promjenama gdje površina dlana odgovara jednom postotku površine ukupnog BSA (30). Na temelju rezultata prethodnih triju metoda PV se uobičajeno svrstava u dvije kategorije: blaga te srednja do teška psorijaza. Ova podjela važna je zbog izbora najboljeg načina liječenja i odluke o eventualnoj promjeni terapijskog režima. Blagi oblik bolesti prisutan je kada su vrijednosti BSA, PASI i DLQI manji ili jednaki 10 te se uglavnom može kontrolirati lokalnom terapijom. Srednja do teška PV definirana je brojem bodova većim od 10 na sve tri ljestvice i liječi se fototerapijom, fotokemoterapijom ili sustavnom terapijom (31). Najveći broj pacijenata liječi

se lokalnom terapijom (7, 12), prvenstveno lokalnim kortikosteroidima i analogima vitamina D (7). Fototerapija, tj. primjena UV (engl. *ultraviolet*) zračenja, također ima pozitivan učinak na povlačenje psorijatičnih lezija (32). Sustavna terapija sastoji se od tradicionalne i biološke terapije (1, 6, 7, 12, 28). Tradicionalni sustavni lijekovi unose se oralnim putem te uključuju metotreksat, ciklosporin, acitretin, fumarate i apremilast (7, 28). Biološka terapija uglavnom uključuje rekombinantna monoklonalna protutijela ili receptorske fuzijske proteine koji ciljaju specifične molekule važne u patogenezi psorijaze te se većina unosi injekcijama u potkožno tkivo (28). Najčešće se koriste antagonisti upalnih citokina TNF- $\alpha$ , IL-17 i IL-23 (7, 28). Biološku terapiju u liječenju PV koristi manje od 10 % oboljelih (6, 7, 12), stoga je razumijevanje imunopatogeneze ove bolesti ključno za razvoj lijekova, posebice biološke terapije.

#### 1.1.5. Imunopatogeneza

Najvažniju ulogu u razvoju psorijaze ima imunološki sustav, na čelu s T-limfocitima (33 – 35). Osim njih, u patogenezi sudjeluju i druge imunosne stanice poput dendritičnih stanica (DC – engl. *dendritic cells*), makrofaga i NK (engl. *natural killer*) stanica te druge stanice kao što su keratinociti i epitelne stanice. U PV dolazi do oštećenja stanica kože djelovanjem različitih okidača iz okoliša te one proizvode vlastite deoksiribonukleinske (DNK) i ribonukleinske kiseline (RNK) (33). Iz ozlijeđenih keratinocita oslobađa se LL-37 (36), C-terminalni dio katelicidina (37), antimikrobnog peptida (AMP), koji vezanjem za vlastitu DNK pravi DNK – LL-37 komplekse. Tako nastali kompleksi aktiviraju plazmocitoidne DC (pDC) preko TLR9 (engl. *Toll-like receptor 9*) i potiču ih na stvaranje IFN- $\alpha$  (36). RNK – LL-37 kompleksi također aktiviraju pDC, ali preko TLR7, a mijeloidne DC (mDC) preko TLR8. Osim toga, mDC se mogu aktivirati i djelovanjem interferona tipa 1 (38). Aktivirane DC stimuliraju proliferaciju T-limfocita (39) i stvaraju brojne medijatore poput IL-12 i IL-23 koji pomažu u diferencijaciji T-limfocita u pomoćničke (Th – engl. *T helper cells*) i citotoksične (Tc – engl. *T cytotoxic cells*) T-limfocite tipa 17. Th17 i Tc17 stanice izvor su IL-17A i IL-22 koji imaju ključnu ulogu u indukciji AMP i aktivaciji keratinocita (40). Aktivirani keratinociti izlučuju proupalne citokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) i kemokine te se tako stvara kronična upala zbog trajnog međudjelovanja hiperproliferativnih keratinocita i infiltrirajućih upalnih stanica (41).

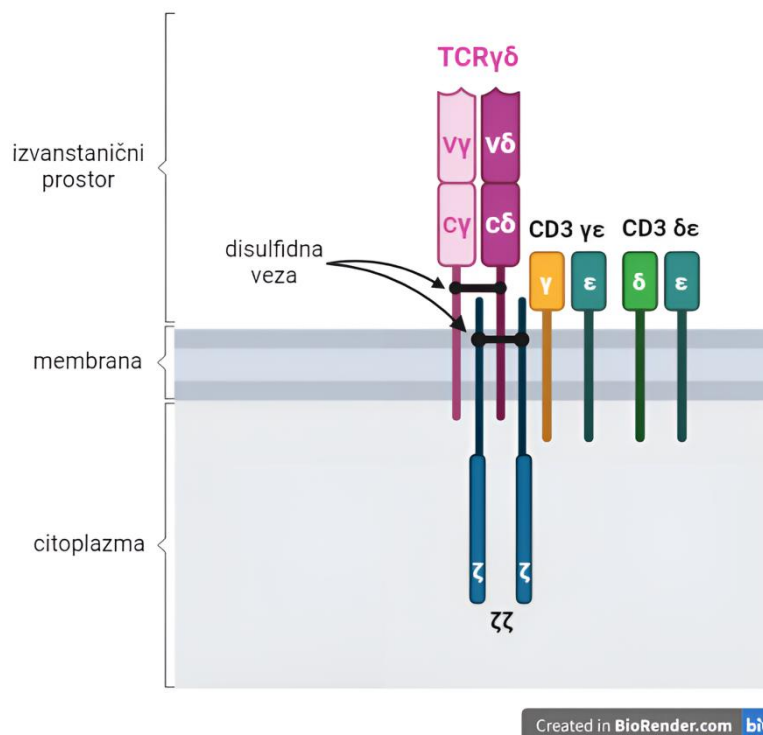
## 1.2. Gama delta T-stanice

U imunološkom sustavu čovjeka razlikujemo alfa beta ( $\alpha\beta$ ) i gama delta ( $\gamma\delta$ ) T-limfocite s obzirom na sastav peptidnih lanaca koji grade njihove T-stanične receptore (TCR – engl. *T-cell receptor*) (42). Osim u građi receptora,  $\alpha\beta$  i  $\gamma\delta$  T-limfociti razlikuju se u brojnosti, aktivaciji, načinu prepoznavanja antigena te uloga u organizmu (43). Gama delta T-stanice čine 1 – 10 % svih T-limfocita u perifernoj krvi, a njihovi udjeli mijenjaju se ovisno o spolu i dobi (44, 45). Aktivacija  $\gamma\delta$  T-limfocita često je potaknuta vezanjem citokina i drugih upalnih molekula koje se oslobađaju na mjestu oštećenja tkiva ili upale (37), ali je moguća i vezanjem različitih antigena neovisno o MHC (engl. *major histocompatibility complex*) sustavu, od malih fosforiliranih molekula (37, 46) i lipida, do peptidnih i nepeptidnih antigena (37, 43). Višestruki modaliteti aktivacije omogućavaju brz odgovor  $\gamma\delta$  T-stanica na različite patogene (43), osiguravajući obranu organizma za vrijeme aktivacije drugih specijaliziranih imunskih stanica. Gama delta T-limfociti izražavaju TCR repertoar ograničene raznolikosti, koji nastaje kao posljedica konzerviranog uparivanja  $\gamma$  i  $\delta$  lanaca rano u gestacijskom razvoju čovjeka (47). Ograničeni  $\gamma\delta$  TCR repertoar dodatno se fokusira tijekom života, posebice pri susretu s najčešćim mikrobnim antigenima, poput Epstein-Barr (48) i citomegalovirusa (49, 50). Osim mikrobnih antigena,  $\gamma\delta$  T-limfociti imaju sposobnost nadzora i eliminacije oštećenih, zaraženih (37) i tumorskih stanica (51). Također, sudjeluju u očuvanju homeostaze tkiva (52), ali i patogenezi nekih bolesti, posebice upalnih, kao što je psorijaza (53). Navedene funkcije ovih stanica upućuju na to da gama delta limfociti zbog svojih specifičnih osobina čine most između urođene i stečene imunosti (37).

### 1.2.1. T-receptor gama delta stanica

Heterodimer T-staničnog receptora gama delta stanica sastavljen je od dva transmembranska polipeptidna lanca,  $\gamma$  i  $\delta$ , kovalentno vezana disulfidnom vezom. Svaki lanac sastavljen je od jedne N-terminalne varijabilne (V), jedne konstantne (C) domene, hidrofobne transmembranske regije i kratke citoplazmatske regije. Unutar varijabilne regije nalaze se 3 hipervarijabilne ili CDR (engl. *complementary-determining region*) regije. TCR  $\gamma\delta$  heterodimer je nekovalentno povezan s CD3 (engl. *cluster of differentiation*) gama, delta i epsilon ( $\epsilon$ ) proteinima te zeta ( $\zeta$ ) lancem. CD3  $\gamma$ ,  $\delta$  i  $\epsilon$  proteini su međusobno homologni, te kao i  $\zeta$  lanac, njihove transmembranske domene sadrže negativno nabijene ostatke asparaginske kiseline. Ona se veže na pozitivne ostatke lizina i arginina prisutne na  $\gamma$  i  $\delta$  lancima i tako nastaje TCR kompleks. Na Slici 1 prikazan je kompleks TCR  $\gamma\delta$  heterodimera

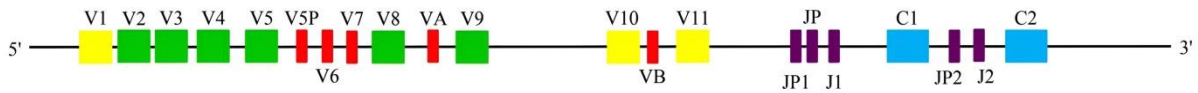
povezan s jednim CD3  $\gamma\epsilon$  heterodimerom, jednim CD3  $\delta\epsilon$  heterodimerom i jednim disulfidno povezanim  $\zeta\zeta$  homodimerom.



Slika 1. Građa TCR kompleksa. (Izvor: izradila autorica rada u BioRender programu)

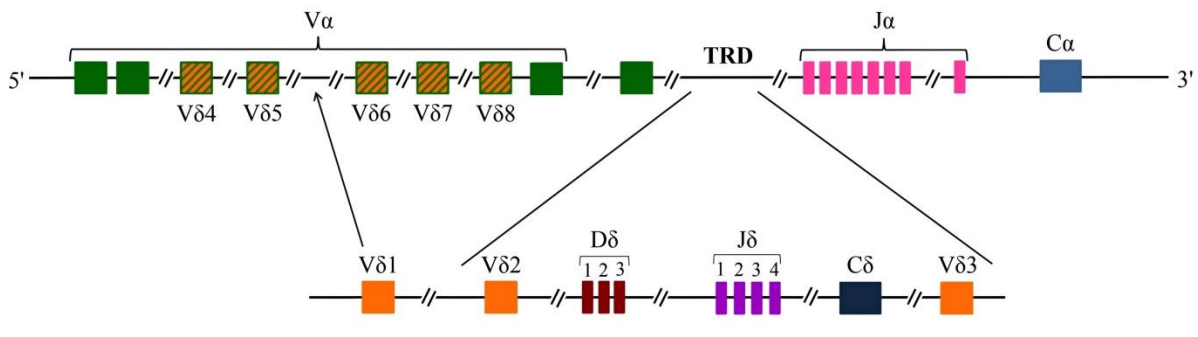
Raznolikost antigenskih receptora nastaje rekombinacijom genskih segmenata varijabilne (V) regije sa segmentima D (engl. *diversity*) i J (engl. *joining*) regije. Varijabilna (V) domena  $\gamma$  lanca kodirana je V i J segmentima, a V domena  $\delta$  lanca V, D i J genskim segmentima. CDR1 i CDR2 kodirane su germinativnim sljedovima unutar V segmenata, dok je CDR3 regija  $\gamma$  lanca kodirana negerminativnim povezujućim sljedovima između V i J regije i samim J segmentom, a CDR3 regija  $\delta$  lanca D i J segmentima i negerminativnim povezujućim sljedovima dodanima između V, D i J segmenata. Što se tiče konstantne domene, postoje dva gena za C domenu  $\gamma$  lanca i 1 gen za C domenu  $\delta$  lanca. Tijekom razvoja T-limfocita procesom V(D)J rekombinacije unutar *TCR* lokusa formira se V(D)J egzon koji će kodirati varijabilnu regiju proteina antigenskih receptora (37).

*TRG* (engl. *T-cell receptor gamma*) lokus smješten je na kratkom kraku kromosoma 7 (7p14) i sadrži 15 *TRGV* gena, od kojih je funkcionalno eksprimirano samo njih 6 (*V $\gamma$ 2 – 5*, *V $\gamma$ 8* i *V $\gamma$ 9*), i 5 *TRGJ* gena (*JP1*, *JP*, *J1*, *JP2*, *J2*) koji se spajaju s jednim od dva *TRGC* elementa (43, 54 – 57). Raspored gena *TRG* lokusa prikazan je na Slici 2. Unutar *TRG* lokusa preuređivanje se odvija spajanjem nasumično odabranog V i J genskog segmenta (37).



Slika 2. Geni *TRG* lokusa. (Izvor: izradila autorica rada)

*TRD* (engl. *T-cell receptor delta*) lokus nalazi se na dugom kraku 14. kromosoma (14q11.2) i sastoji se od 8 *TRDV* gena, od kojih se njih pet (*TRDV4* – 8) označava i *TRA* (engl. *T-cell receptor alpha*), jer se nalaze unutar *TRA* lokusa. Osim navedenih gena, unutar *TRD* lokusa nalaze se i tri *TRDD* (*TRDD1* – 3), četiri *TRDJ* gena (*TRDJ1* – 4) i 1 *TRDC* gen (43, 58 – 62). Slikom 3 predstavljeni su geni koji pripadaju *TRD* lokusu.



Slika 3. Geni *TRA/TRD* lokusa. (Izvor: izradila autorica rada)

U *TRD* lokusu prvo dolazi do spajanja nasumičnih D i J segmenata, a potom, također nasumično, do udruživanja V i DJ segmenata. Nakon transkripcije rekombinantnog VDJ segmenta dolazi do spajanja vodećeg dijela V(D)J prijepisa i prijepisa C regije te se stvara mRNK (engl. *messenger*) koja se prevodi u  $\delta$  lanac T-staničnog receptora. Ovakva rekombinacija nasumičnih V, D i J segmenata te dodavanje ili uklanjanje nukleotida na spojevima različitih segmenata doprinosi raznolikosti TCR repertoara, posebice raznolikosti CDR3 regije. Iako potencijalni broj različitih  $\gamma\delta$  TCR iznosi i do  $10^{18}$ , stvarna raznolikost antigenskih receptora  $\gamma\delta$  limfocita je znatno manja jer zrele stanice koriste samo neke od dostupnih V, D i J genskih segmenata (37). Dok je TRG repertoar prilično sličan među različitim pojedincima, tj. javan, TRD repertoar značajno se razlikuje od osobe do osobe (63), a posebno V $\delta$ 1 TCR sekvence koje su se pokazale jedinstvenim za pojedinca (64).

### 1.3. Uloga gama delta T-stanica u psorijazi

Povećane udjele  $\gamma\delta$  stanica nalazimo u mnogim patološkim stanjima, poput infekcija, hematoloških bolesti i različitih upala (65). U psorijazi, upalnoj bolesti kože, posredovanoj T-

limfocitima, one također imaju važnu ulogu (53). Gama delta stanice prisutne su u povećanom broju u zahvaćenoj koži oboljelih (66, 67), a opisana je i njihova infiltracija u dermisu (66). Značajno veće udjele  $\gamma\delta$  T-limfocita nalazimo i u zdravoj koži oboljelih od PV u odnosu na kožu zdravih pojedinaca, ali su te vrijednosti ipak manje od onih u lezijama. To upućuje na važnost ovih stanica u razvoju psorijatičnog plaka (68), najvjerojatnije kao posljedica lučenja interleukina 17A, 17F i 22 (69) koji pospješuju aktivaciju keratinocita (40). Povećanje broja  $\gamma\delta$  limfocita u koži PV oboljelih, povezano je s njihovim posljedičnim smanjenjem u perifernoj cirkulaciji. Štoviše, pokazano je da pad perifernih udjela  $\gamma\delta$  stanica korelira s povećanjem PASI indeksa u oboljelih (68). Značajne razlike u raznolikosti repertoara gama delta stanica u koži oboljelih i zdravih ispitanika do danas nisu zabilježene (70). Štoviše, klonalnost repertoara gama lanaca pokazala se vrlo sličnom u koži zdravih i oboljelih ispitanika, kao i u zahvaćenoj i nezahvaćenoj koži oboljelih. S druge strane, otkriven je veći broj dijeljenih, javnih TRG sekvenci u lezijama oboljelih nego u uzorcima zdrave kože, što govori o mogućem postojanju jedinstvenih populacija gama delta stanica u psorijazi (71). Također, dokazana je i povećana upotreba *TRGV5* genskog segmenta u ovoj bolesti (70).

Unatoč novim saznanjima o raznolikim funkcijskim i fenotipskim obilježjima perifernih gama delta T-limfocita u zdravlju i bolesti, uloga, brojnost, i TCR repertoar tkivnih populacija  $\gamma\delta$  T-stanica tek su djelomično poznati, a čine važnu komponentu u boljem razumijevanju i liječenju vulgarne psorijaze.



**2. HIPOTEZA**

Klonalni repertoar delta TCR lanaca CD3+ $\gamma\delta$ TCR+  $\gamma\delta$  T-limfocita razlikuje se u koži zdravih ispitanika i oboljelih od vulgarne psorijaze.

### 3. CILJEVI

Istraživanje je imalo sljedeće ciljeve:

1. Istražiti i usporediti repertoar delta TCR lanaca CD3+ $\gamma\delta$ TCR+  $\gamma\delta$  T-limfocita u koži zdravih i oboljelih ispitanika,
2. Ustanoviti povezanost otkrivenih delta TCR klonotipova s obilježjima i težinom bolesti.

### 4. ISPITANICI I METODE

#### 4.1. Ustroj studije

Studija je ustrojena kao istraživanje parova (engl. *case-control study*) (72).

#### 4.2. Ispitanici

Skupinu oboljelih u ovom istraživanju činile su osobe kojima je dijagnosticirana vulgarna psorijaza na osnovu kliničke slike i histološkog pregleda kože, a težina bolesti određena je na temelju PASI i DLQI bodovnih sustava. Oboljeli ispitanici izabrani su iz populacije bolesnika Zavoda za dermatologiju i venerologiju KBC-a Osijek nasumičnim redoslijedom pregleda u okviru standardne dijagnostičke obrade. Iz studije su isključeni bolesnici na fototerapiji, fotokemoterapiji, sustavnoj citostatskoj i biološkoj terapiji, oboljeli od malignih, infektivnih i autoimunih bolesti te oni sa zabilježenim alergijskim reakcijama u zadnjih šest tjedana.

Kontrolnu skupinu činile su zdrave, punoljetne, nesrodne osobe, po dobi i spolu usklađene s oboljelim ispitanicima. Zdravi ispitanici odabrani su tijekom redovnih pregleda iz populacije dermatoloških bolesnika koji imaju benigne, neinfektivne ili imunološki neutralne kožne promjene te nisu na sustavnoj ili fototerapiji i nemaju alergijske, maligne, infektivne niti autoimune bolesti.

Uzorci kože izuzeti su biopsijom od 19 ispitanika, 10 oboljelih od vulgarne psorijaze i 9 zdravih kontrola. Iz kože su sortirani leukociti iz kojih je zatim izolirana RNK. Uzroci su prikupljeni u periodu 2020. – 2023. Prilikom izuzimanja uzoraka zabilježeni su osnovni identifikacijski podatci ispitanika (ime i prezime, spol, dob) te im je izmjerena tjelesna masa i visina radi izračuna indeksa tjelesne mase (ITM).

Probir oboljelih i kontrolnih ispitanika, prikupljanje bioptata kože i periferne krvi te sortiranje i imunofenotipizacija tkivnih i krvnih  $\gamma\delta$  T-limfocita provedeni su u okviru HRZZ projekta UIP-2019-04-3494 i odobreni su odlukom Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek (Potvrda br. 2158-61-07-19-126) i Kliničkog bolničkog centra Osijek (Potvrda br. R2-12487/2019). Istraživanje provedeno u sklopu izrade diplomskog rada odobreno je odlukom Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek (Potvrda br. 2158-61-46-24-20).

### 4.3. Materijali

Za provedbu istraživanja korišteni su sljedeći reagensi i kemikalije:

- Qubit™ RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)
- Archer Immunoverse™-HS TCR kit za Illuminu
- Agencourt® AMPure® XP kuglice (Beckman Coulter)
- MBC adapteri za Illuminu (ArcherDX)
- Immunoverse™ GSP mix
- 100 %-tni etanol
- 1M Tris-HCL, pH 8
- koncentrirana otopina NaOH
- ultračista voda
- 1 × TBE pufer
- agaroz
- *Sybr Safe* boja
- *DNA Ladder*
- KAPA Universal Library Quantification Kit (KAPA Biosystems)

### 4.4. Metode

#### 4.4.1. Analiza kvalitete i kvantifikacija RNK

Iz tkivnih leukocita izolirana je ukupna RNK Direct-zol™ RNA Microprep metodom sukladno uputama proizvođača. Izolirana RNK je potom kvantificirana uz pomoć Qubit™ RNA HS Assay Kita. Prvo je pripremljena Qubit MMX radna otopina razrjeđenja 1:200 dodavanjem 1 µl Qubit® RNA HS reagensu u 199 µl Qubit® RNA HS pufera u 22 puta većoj količini (20 uzoraka i 2 standarda). Nakon toga pripremljena su dva standarda miješanjem 190 µl MMX radne otopine i 10 µl Qubit® RNA HS Standarda 1, odnosno Qubit® RNA HS Standarda 2. Uzorci su pripremljeni dodavanjem 5 µl izolirane RNK u 195 µl Qubit MMX radne otopine te su nakon kratkog vorteksiranja inkubirani 2 minute na sobnoj temperaturi. Zatim su očitane vrijednosti fluorescencije dva standarda kako bismo dobili standardnu krivulju na osnovu koje uređaj pruža informacije o koncentraciji RNK u našim uzorcima.

#### 4.4.2. Priprema NGS knjižnice

Priprema NGS (engl. *next generation sequencing*) knjižnice napravljena je korištenjem komercijalnog kompleta Archer Immunoverse™-HS TCR kit. Uz pomoć njega dobiva se veliki broj kopija cDNK (engl. *complementary DNA*) molekula specifičnih za T-stanični receptor čime je omogućeno ciljano sekvenciranje velike točnosti. Priprema knjižnice sastojala se od sljedećih koraka:

1. Dodavanje početnica specifičnih za TCR
2. Sinteza prvog lanca cDNK
3. Sinteza drugog lanca cDNK
4. Popravljanje krajeva
5. Prva ligacija
6. Dodavanje MBC (engl. *molecular barcode*) adaptera
7. Druga ligacija
8. Prva PCR (engl. *polymerase chain reaction*) reakcija
9. Druga PCR reakcija

Također, između nekih od koraka napravljeni su međukoraci ispiranja radi poboljšanja specifičnosti same analize.

##### 1. Dodavanje početnica specifičnih za TCR

Umnažanje fuzijskih prijepisa TRA/TRD lokusa ostvareno je korištenjem početnica komplementarnih konstantnim genskim segmentima. Reakcijske tubice s početnicama postavljene su na hladni stalak. U nove PCR tubice stavljena je odgovarajuća količina pročišćene RNK i ultračiste vode kako bi koncentracija RNK u svakoj tubici iznosila 50 ng/ml. U tubice s početnicama prebačeno je 20 µl razrijeđene RNK, promiješano, centrifugirano (15 – 20 sekundi, 2000 rpm/rcf, 25 °C) i vraćeno na led. Tubice su ubačene u prethodno zagrijan (poklopac zagrijan na  $\geq 100$  °C) PCR uređaj i inkubirane 5 minuta na 65 °C, te zatim ohlađene na 4 °C. Kad se temperatura spustila na 4 °C, tubice su kratko pohranjene u led.

##### 2. Sinteza prvog lanca cDNK

Prvi lanac komplementarne dvolančane DNK stvara se na osnovu RNK izolirane iz uzoraka reverznom transkripcijom. Reakcijske tubice za sintezu prvog lanca cDNK stavljene su na hladni stalak te je u njih prebačeno 20 µl sadržaja iz tubica s početnicama. Tubice za sintezu prvog lanca su promiješane, centrifugirane i vraćene na led, a potom prebačene u zagrijani

PCR uređaj radi sinteze cDNK prema sljedećem temperaturnom režimu: inkubacija 30 minuta na 50 °C, inkubacija 20 minuta na 80 °C i hlađenje na 4 °C. Nakon toga tubice su kratko centrifugirane i vraćene na hladno.

### 3. Sintaza drugog lanca cDNK

Drugi lanac cDNK sintetiziran je na temelju komplementarnosti s prvim lancem. Tako su dobivene dvolančane molekule koje su stabilnije i pogodnije za analizu od jednolančanih. Reakcijske tubice za sintezu drugog lanca cDNK stavljene su na hladni stalak. U svaku tubicu za sintezu prvog lanca dodano je 20 µl ultračiste vode, promiješano pipetom te je 40 µl ukupnog sadržaja prebačeno u tubice za sintezu drugog lanca. Poslije miješanja i centrifugiranja tubice su vraćene na led i ubačene u zagrijani PCR uređaj na inkubaciju prema sljedećem temperaturnom programu: inkubacija 60 minuta na 16 °C, inkubacija 20 minuta na 75 °C i hlađenje na 4 °C. Nakon što je program dosegao temperaturu od 4 °C, tubice su centrifugirane i vraćene na hladno.

### 4. Popravljanje krajeva

Radi što veće učinkovitosti sekvenciranja sintetizirana dvolančana cDNK je pocijepana na kraće lance restrikcijskim endonukleazama. Krajevi fragmenata su dodatno „uređeni“ enzimima u svrhu proizvodnje komplementarnih krajeva za vezanje adaptera. Reakcijske tubice za popravak krajeva stavljene su na led te je u njih prebačeno 40 µl sadržaja iz tubica za sintezu drugog lanca, promiješano, centrifugirano i vraćeno na hladni stalak. Tubice su inkubirane u PCR uređaju s nezagrijanim poklopcem 30 minuta na 20 °C. Nakon završetka programa, kratko su centrifugirane i vraćene na hladno.

#### – Ispiranje uz pomoć AMPure XP magnetnih kuglica

Nakon sinteze cDNK i popravljanja njenih krajeva izvršen je međukorak ispiranja kako bi se uklonili svi nespecifični PCR produkti i zadržali samo fragmenti od interesa. Magnetne kuglice su resuspendirane vorteksiranjem. Tubice za popravak krajeva su uklonjene s leda i u svaku je dodano 100 µl kuglica. Sve je dobro vorteksirano radi homogenizacije i inkubirano 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon kratkog centrifugiranja, tubice su inkubirane 4 minute na magnetskom stalku pa je supernatant uklonjen pipetiranjem. Potom su kuglice isprane dva puta dodavanjem 200 µl 70 %-tnog etanola, inkubacijom 30 sekundi na sobnoj temperaturi i uklanjanjem etanola. Nakon ispiranja, pipetom su uklonjeni ostatci supernatanta i tubice su ostavljene da se suše 3 – 5 minuta na sobnoj temperaturi s otvorenim poklopcima. Poslije

sušenja kuglice su resuspendirane s 10 mM Tris-HCl otopinom pH vrijednosti 8 radi eluiranja cDNK te su tubice vraćene na magnet 2 minute.

##### 5. Prva ligacija

Prva ligacija prethodila je vezanju adaptera. Tubice za prvu ligaciju stavljene su na hladni stalak te je u njih prebačeno 20 µl pročišćene cDNK bez primjesa magnetnih kuglica. Sve je promiješano, centrifugirano i inkubirano u PCR uređaju sa zagrijanim poklopcem 15 minuta na 37 °C. Kad se temperatura spustila na 4 °C, tubice su kratko centrifugirane i vraćene na led. Zatim je dodano 20 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8, dobro promiješano i ponovno centrifugirano.

##### 6. Dodavanje adaptera

Adapteri su kratke oligonukleotidne sekvence koje se lijepu na krajeve fragmenata cDNK, u svrhu označavanja i pričvršćivanja cDNK fragmenata na NGS platformu. Tubice s MBC adapterima označene su trajnim markerom, a navedene oznake zapisane su radi praćenja koji adapter pripada kojem uzorku. Tubice s adapterima su stavljene na led i u njih je dodano 40 µl sadržaja iz tubica za ligaciju, promiješano i centrifugirano.

##### 7. Druga ligacija

U drugoj ligaciji dodani su indeksi, jedinstvene oligonukleotidne sekvence koje služe za identifikaciju porijekla pojedinih cDNK fragmenata koji se paralelno sekvenciraju, kako bi po završetku sekvenciranja znali koji rezultat pripada kojem ispitaniku. Cijela zapremnina tubica s adapterima prebačena je u tubice za drugi korak ligacije koje su bile na hladnom stalku. Sve je promiješano, centrifugirano i vraćeno na led pa zatim stavljeno u PCR uređaj bez prethodnog zagrijavanja poklopca radi inkubacije na 25 °C tijekom 15 minuta. Kad je program dosegnuo temperaturu od 4 °C, tubice su kratko centrifugirane i vraćene na led.

– Ispiranje uz pomoć *Ligation Cleanup* kuglica

*Ligation Cleanup* kuglice su resuspendirane vorteksiranjem. U nove PCR tubice od 200 µl dodano je 50 µl kuglica za ispiranje. Tubice su inkubirane na magnetskom stalku 1 minutu i nakon toga uklonjen je supernatant. Potom je dodano 50 µl *Ligation Cleanup* pufera u svaku tubicu radi resuspendiranja. Cijeli sadržaj tubica za drugi korak ligacije otpipetiran je u tubice s *Ligation Cleanup* kuglicama i puferom, vorteksiran, inkubiran 5 minuta na sobnoj temperaturi, te ponovno vorteksiran, inkubiran 5 minuta i kratko centrifugiran. Tubice su stavljene na magnet 1 minutu pa je uklonjeno 100 µl supernatanta ne dirajući kuglice. Kuglice su isprane dva puta dodavanjem 200 µl *Ligation Cleanup* pufera, vorteksiranjem, centrifugiranjem, držanjem na magnetu 1 minutu i odbacivanjem supernatanta. Nakon toga,

na isti način, kuglice su isprane s 200 µl ultračiste vode. Poslije uklanjanja cijelog supernatanta kuglice su resuspendirane u 36 µl 5 mM NaOH, a tubice prebačene u PCR uređaj s prethodno zagrijanim poklopcem na inkubaciju u trajanju od 10 minuta na 75 °C. Kad je uređaj dosegnuo temperaturu od 4 °C, tubice su kratko centrifugirane i stavljene na magnet.

#### 8. Prva PCR reakcija

Tijekom prve PCR reakcije umnažaju se fragmenti sintetizirane cDNK zajedno s vezanim adapterima. Tubice za prvu PCR reakciju stavljene su na hladni stalak i označene te je u njih dodano 4 µl smjese Immunoverse GSP (engl. *gene-specific primers*) početnica. Tubice su centrifugirane i vraćene na led pa je u njih dodano 36 µl supernatanta iz tubice iste identifikacijske oznake u prethodnom koraku. Sve je izmiješano, centrifugirano i vraćeno na hladno, a zatim prebačeno u zagrijani PCR uređaj programiran prema protokolu navedenom u Tablici 1. Kad je program dosegnuo 4 °C, tubice su kratko centrifugirane i stavljene na hladni stalak.

Tablica 1. Protokol prve PCR reakcije

Korak	Temperatura (°C)	Vrijeme	Broj ciklusa
1	95	3 min	1
2	95	30 s	24
3	65	3 min	
4	72	3 min	1
5	4	zadržati	1

#### – Ispiranje uz pomoć AMPure XP magnetnih kuglica

Kuglice su resuspendirane vorteksiranjem te je u svaku reakcijsku tubicu za prvi PCR dodano 48 µl kuglica. Kasnije su vorteksirane radi homogenizacije, inkubirane 5 minuta na sobnoj temperaturi, kratko centrifugirane i inkubirane na magnetskom stalku 4 minute. Uklonjen je supernatant te su kuglice isprane dva puta dodavanjem 200 µl 70 %-tnog etanola, inkubacijom od 30 sekundi i uklanjanjem etanola. Zatim su uklonjeni svi ostatci supernatanta i tubice su ostavljene da se suše 3 – 5 minuta s otvorenim poklopcima. Kuglice su resuspendirane dodavanjem 44 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8. Tubice su vraćene na magnetski stalak 2 minute pa je 42 µl DNA eluata prebačeno u nove PCR tubice zapremnine 200 µl.



## 9. Druga PCR reakcija

Nakon pročišćavanja, učinjena je druga amplifikacija PCR produkata iz prethodnog koraka. Tubice za drugu PCR reakciju stavljene su na hladni stalak te je u njih prebačeno 40 µl pročišćenog PCR eluata, sve je promiješano, centrifugirano i vraćeno na led. Potom su tubice ubačene u PCR uređaj s prethodno zagrijanim poklopcem i inkubirane prema temperaturnom programu opisanom u Tablici 2. Nakon što je program dosegnuo 4 °C, tubice su kratko centrifugirane i vraćene na hladni stalak.

Tablica 2. Protokol druge PCR reakcije

Korak	Temperatura (°C)	Vrijeme	Broj ciklusa
1	95	3 min	1
2	95	30 s	8
3	65	3 min	
4	72	3 min	1
5	4	zadržati	1

## – Ispiranje uz pomoć AMPure XP magnetnih kuglica

Kuglice su resuspendirane vorteksiranjem te je u svaku reakcijsku tubicu za drugi PCR dodano 48 µl kuglica. Sve je dobro vorteksirano radi homogenizacije, inkubirano 5 minuta na sobnoj temperaturi, kratko centrifugirano i inkubirano na magnetskom stalku 4 minute. Supernatant je uklonjen bez pipetiranja kuglica, a potom su kuglice isprane dva puta korištenjem 70 %-tnog etanola. Nakon ispiranja uklonjeni su ostatci supernatanta, a tubice su ostavljene da se suše 3 – 5 minuta na sobnoj temperaturi s otvorenim poklopcima. Kuglice su resuspendirane dodatkom 20 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8, u svrhu elucije DNK, nakon čega su tubice inkubirane na magnetskom stalku 2 minute. Zatim je 18 µl pročišćenog PCR eluata prebačeno u novu PCR tubicu od 200 µl nakon čega je učinjena agarozna gel-elektroforeza i kvantifikacija knjižnice.

4.4.3. Gel-elektroforeza i kvantifikacija knjižnice

Prije kvantifikacije napravljena je agarozna gel-elektroforeza kako bi se dobile informacije o veličini fragmenata knjižnice. Za pripremu 1,5 %-tnog agaroznog gela otopljeno je 0,75 grama agaroze u 50 ml 1 × TBE pufera zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici. Kada je gel otopljen, u njega je dodano 4 µl *Sybr Safe* boje te je izliven u kadicu za elektroforezu.

Postavljeni su češljici za oblikovanje jažica te je gel ostavljen 20 minuta da se ohladi i polimerizira. Na komadiću parafilma pomiješano je 1  $\mu\text{l}$  DNK boje i 4  $\mu\text{l}$  uzorka pa je tih 5  $\mu\text{l}$  uzorka, kao i 5  $\mu\text{l}$  *DNA Laddera* (standarda) naneseo u jažice na gelu. Elektroforeza je provedena pri naponu električne struje od 130 volti tijekom 20 min u mraku. Nakon toga, gel je vizualiziran pod UV lampom, a veličina fragmenata knjižnice određena je usporedbom s DNK standardom. Prosječna veličina fragmenata knjižnice iznosila je 550 parova baza.

Kvantifikacija dobivene NGS knjižnice napravljena je uz pomoć KAPA Library Quantification komercijalnog kompleta. DNK knjižnice razrijeđene su unutar koncentracijskog raspona KAPA standarda (0,0002 – 20 pM) kao dva serijska 1:100 razrjeđenja. Prvo su 2  $\mu\text{l}$  svake DNK knjižnice razrijeđena u 198  $\mu\text{l}$  10 mM Tris-HCl, a potom 2  $\mu\text{l}$  razrijeđene knjižnice u 198  $\mu\text{l}$  10 mM Tris-HCl. PCR MasterMix pripremljen je miješanjem 12  $\mu\text{l}$  KAPA Sybr Fast qPCR MasterMixa i 4  $\mu\text{l}$  PCR vode u 90 puta većoj količini (20 uzoraka u triplikatu + 6 komercijalnih standarda u triplikatu + negativna kontrola u triplikatu + 10 % za potencijalne gubitke). U svaku jažicu mikrotitarske pločice dodano je 16  $\mu\text{l}$  MasterMixa i 4  $\mu\text{l}$  standarda odgovarajuće koncentracije, odnosno PCR vode za negativnu kontrolu, odnosno 4  $\mu\text{l}$  uzorka koji sadrži cDNK. Zatvorena pločica postavljena je u PCR uređaj i inkubirana prema temperaturnom programu prikazanom u Tablici 3.

Tablica 3. PCR program za kvantifikaciju knjižnice

Korak	Temperatura (°C)	Vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	5 min	1
Denaturacija	95	30 s	35
Vežanje/produljivanje	60	45 s	
Hlađenje	4	po potrebi	1

Na osnovu srednjih koncentracija triplikata i prosječne veličine fragmenata knjižnice izračunata je molarnost prema navedenoj formuli, gdje 660 g/mol predstavlja prosječnu relativnu molekulsku masu jednog para baza DNK.

$$\text{Molarnost (nM)} = \frac{\text{srednja koncentracija triplikata } \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}\right) \times 10^6}{660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times \text{prosječna veličina fragmenata knjižnice (pb)}}$$

Nakon izračuna molarnosti za svaki uzorak, sve knjižnice su razrijeđene na koncentraciju od 2 nM. Iz svakog uzorka razrijeđene DNK knjižnice izuzeto je 10  $\mu\text{l}$  i združeno u jednu tubicu.

Združene knjižnice sekvencirane su primjenom NextSeq 500/550 Mid Output Kit (300 Cycles) na uređaju Illumina NextSeq.

### 4.4.4. Bioinformatička analiza podataka

Rezultati sekvenciranja analizirani su upotrebom nekoliko bioinformatičkih programa.

Uz pomoć Archer Analysis platforme ispravljene su greške nastale prilikom sekvenciranja, prepravljena su dvostruka očitavanja iste sekvence i napravljena su poravnanja sekvenci prema referentnom humanom genomu.

U MiXCR programu ispravljene su greške unutar sekvenci barkoda i uklonjeni nepostojeći barkodovi radi eliminiranja lažne raznolikosti. Također, rekonstruirane su CDR3 regije spajanjem sekvenci iz iste molekule, ali različitih čitanja, te produljene one regije kojima nedostaje mali dio. Na osnovu referentnih baza podataka V, D, J i C genskih segmenata napravljena su poravnanja koja su grupirana u predgrupe klonova uslijed istog barkoda, a potom u klonove prema sličnosti nukleotidnih sekvenci. Na kraju su izrađene klonotipske tablice s informacijama o svakom klonotipu poput nukleotidnih i aminokiselinskih sekvenci, prisutnih mutacija, broja čitanja i slično.

Radi analize klonotipskih tablica upotrijebljeni su VDJtools i Immunarch programski paketi. Njima su dobiveni podatci o broju jedinstvenih klonotipova, varijabilnosti dužine CDR3 regije te indeksima raznolikosti koji se prvenstveno koriste u ekologiji. Chao1 indeks procjenjuje stvarnu raznolikost uzoraka uzimajući u obzir ukupan broj otkrivenih klonotipova, broj klonotipova koji se pojavljuju samo jednom (engl. *singleton*) i broj klonotipova koji se pojavljuju dvaput (engl. *doubleton*). Zbog toga što u procjenu uzima i mogućnost da nisu detektirani svi postojeći klonotipovi, ovaj indeks dobar je pokazatelj rijetko zastupljenih klonotipova. Efron-Thisted procjena također je važna za rijetke klonotipove, ali ona u izračun uzima samo neprepoznate varijante (73). Shannon-Wiener indeks procjenjuje raznolikost uzorka računavajući broj otkrivenih klonotipova i njihovu relativnu zastupljenost (74). Inverzni Simpsonov indeks (engl. *inverse Simpson index* – iSimpson indeks) kvantificira prosječnu proporcionalnu zastupljenost klonotipova te je pravi odraz onih visoko zastupljenih (engl. *hyperexpanded*) (75). Indeks koji procjenjuje imunološku raznolikost, d50 indeks, govori o klonotipovima koji zauzimaju 50 % ukupnog repertoara (76). Osim toga, VDJtools i Immunarch dali su informacije o izražaju *TRD* gena i njihovim kombinacijama, preklapanju

repertoara, odnosno koeficijentu preklapanja i Jaccardovom indeksu, korelaciji upotrebe gena te razlikama, odnosno Jensen-Shannon divergenciji.

### 4.5. Statističke metode

Kategorijski podatci opisani su apsolutnim i relativnim frekvencijama, a numerički medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike kategorijskih varijabli testirane su Fisherovim egzaktnim testom, dok su razlike numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirane Mann-Whitneyevim U testom. Povezanost numeričkih varijabli ocijenjena je Spearmanovim koeficijentom korelacije  $\rho$  (rho). Sve p-vrijednosti su dvostrane, a značajnost razlika utvrđenih statističkim testiranjem iskazana je na razini  $p < 0,05$ . Obrada podataka načinjena je s pomoću R statističkog programa (inačica 4.1.0, R Core Team, Beč, Austrija).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Obilježja ispitanika

Istraživanjem su obuhvaćeni uzorci RNK izolirani iz leukocita kože 10 ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze (PV skupina) i 9 zdravih kontrola (CTRL skupina). Osnovna demografska (spol, dob), antropometrijska (ITM) i klinička (trajanje bolesti, PASI, DLQI) obilježja ispitanika, kao i izmjerene vrijednosti upalnih (hsCRP) i virusnih (CMV IgM i IgG, anti-HBs) biljega prikazani su u Tablici 4. Statistički značajne razlike u obilježjima dvije ispitivane skupine nisu zabilježene.

Tablica 4. Obilježja ispitanika

Obilježje	PV	CTRL	p-vrijednost
spol (M/Ž omjer)	7/3	7/2	1*
dob	49,5 (35,8 – 56,8)	34 (29 – 42)	0,2526 <sup>†</sup>
trajanje bolesti (godine)	6 (3 – 10)	-	
PASI	17,6 (10,3 – 30,1)	-	
DLQI	17,0 (8,3 – 25,0)	-	
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	31,0 (22,9 – 32,5)	27,2 (26,3 – 28,1)	0,414 <sup>†</sup>
hsCRP (mg/l)	3,2 (0,87 – 11,6)	2 (1,2 – 3,7)	0,7727 <sup>†</sup>
CMV IgG (U/ml)	96,5 (41,4 – 136,5)	110 (94 – 164)	0,3404 <sup>†</sup>
CMV IgM (U/ml)	5 (5 – 5)	7,5 (5 – 7,5)	0,068 <sup>†</sup>
anti-HBs (mIU/ml)	3 (3 – 3)	3 (2 – 452)	1 <sup>†</sup>

\* Fisherov egzaktni test; † Mann-Whitneyev U test

PASI – *Psoriasis Area And Severity Index*; DLQI – *Dermatology Life Quality Index*; ITM – indeks tjelesne mase; hsCRP – C-reaktivni protein visoke osjetljivosti; CMV IgG i IgM – protutijela G i M razreda protiv citomegalovirusa; anti-HBs – protutijelo protiv površinskog antigena virusa hepatitisa B

### 5.2. Obilježja TRD repertoara kože

Osnovna obilježja TRD repertoara iz stanica kože prikazana su u Tablici 5. U koži oboljelih od vulgarne psorijaze zabilježen je dvostruko veći broj TRD čitanja nego u kontrolnim uzorcima kože, bez statistički značajne razlike u frekvenciji jedinstvenih klonotipskih varijanti u ukupnom repertoaru, duljini CDR3 regije i broju umetnutih nukleotida.

Tablica 5. Obilježja TRD repertoara

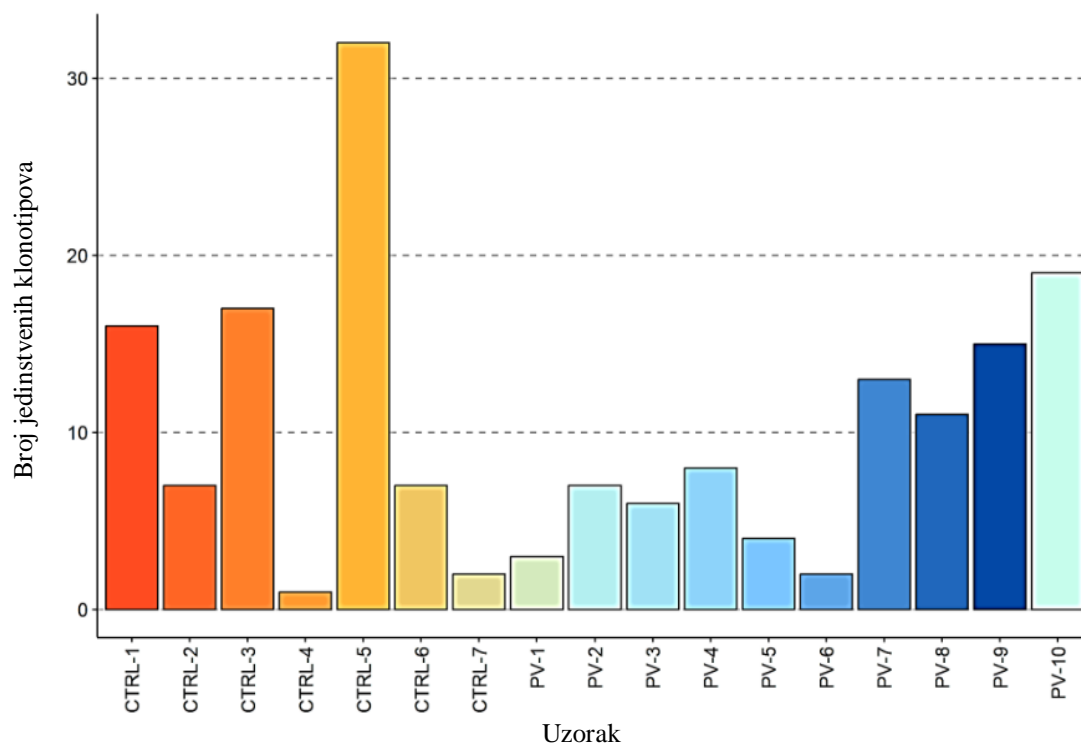
Obilježje	PV	CTRL	p-vrijednost
broj čitanja	4284,5 (3045,0 – 7651,8)	1965 (1074 – 5533)	0,09417*
prosječna frekvencija klonotipova	0,13 (0,08 – 0,23)	0,14 (0,06 – 0,63)	0,9291*
prosječna duljina CDR3 nukleotidne sekvence	49,2 (48,4 – 53,4)	49,9 (45,6 – 51,7)	0,5052*
prosječan broj nasumično umetnutih nukleotida unutar CDR3 regije	7,3 (6,1 – 9,9)	7,0 (2,5 – 8,3)	0,7558*
prosječan broj nukleotida između V i J segmenata unutar CDR3 regije	17,4 (15,0 – 20,3)	17,9 (15,2 – 19,4)	1*

\* Mann-Whitneyev U test

### 5.3. Raznolikost TRD repertoara kože

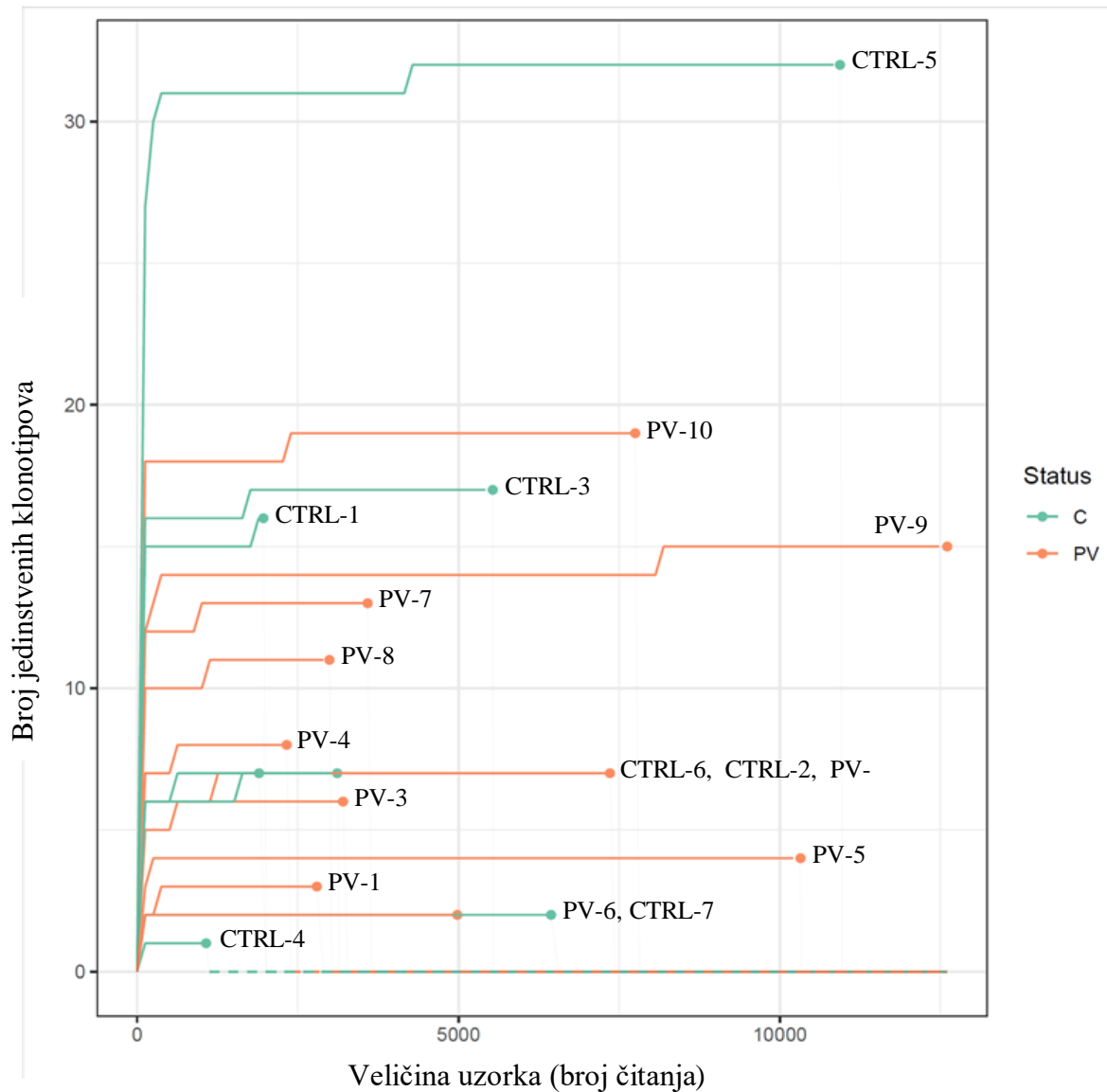
Radi izostanka ili malog broja čitanja TRD sekvenci (< 300), 2 uzorka iz skupine zdravih kontrola izuzeta su iz daljnje analize.

Ukupan broj jedinstvenih klonotipova u ukupnoj kolekciji uzoraka bio je 166, od čega su 164 klonalne varijante zabilježene jednom, a samo dva klonotipa primijećena su dva puta. Najveći broj jedinstvenih klonotipova, njih 32, pronađen je u uzorku CTRL-5, a najmanji, samo 1, u uzorku CTRL-4 (Slika 4).



Slika 4. Broj jedinstvenih klonotipova. Na apscisi je redni broj uzorka, a na ordinati broj jedinstvenih klonotipova u pojedinom uzorku.

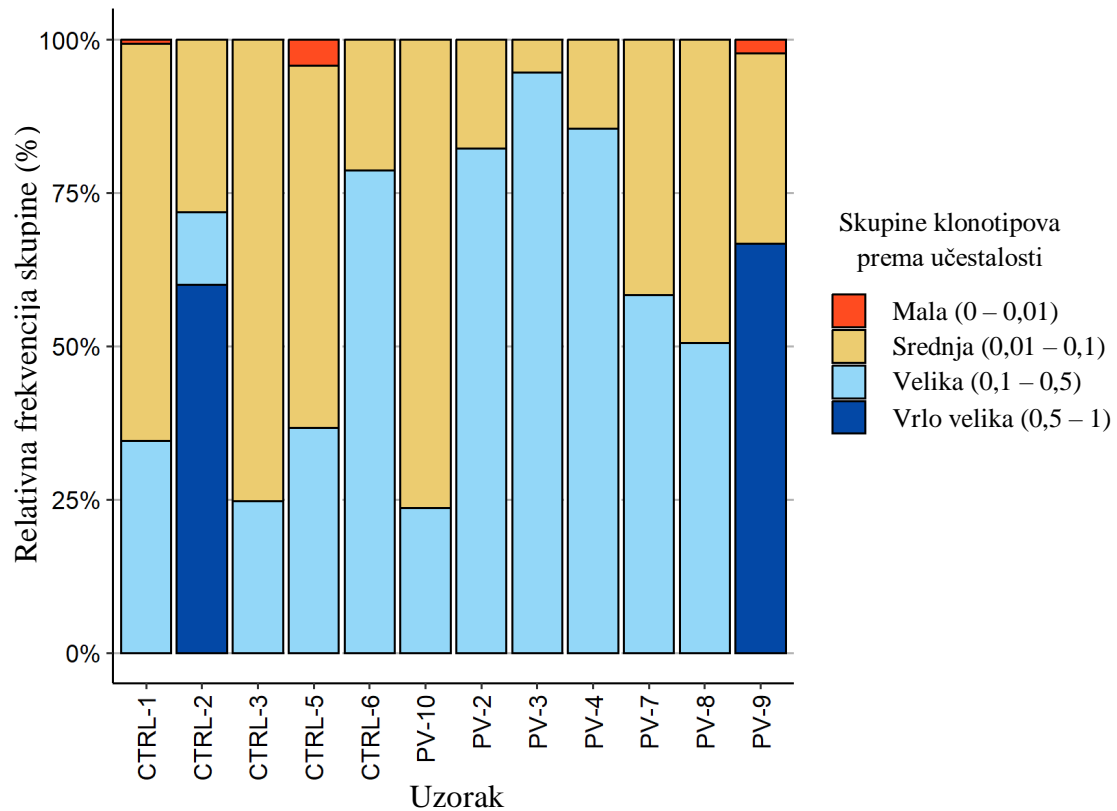
Raznolikost uzoraka s obzirom na broj čitanja, prikazana je na Slici 5. Mali broj jedinstvenih klonotipova zabilježen je u obje skupine ispitanika (najveći broj = 32), a većina klonotipova ima mali broj čitanja. Najveća klonotipska raznolikost primijećena je u uzorku CTRL-5, a najmanja u CTRL-4.



Slika 5. Raznolikost uzorka s obzirom na broj čitanja. Na apscisi je veličina uzorka, odnosno broj čitanja, a na ordinati broj jedinstvenih klonotipova.

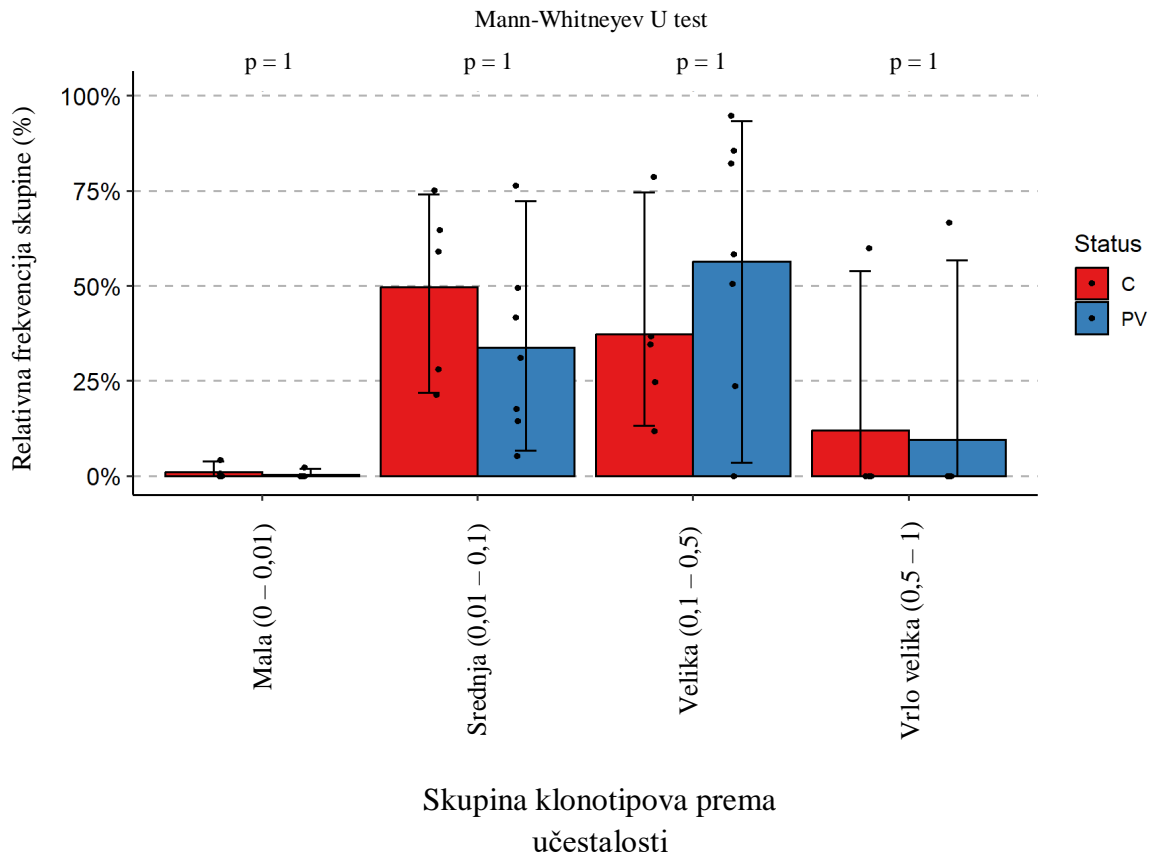
U sljedećem koraku, učinjena je analiza zastupljenosti klonotipova male (0 – 1 %), srednje (1 – 10 %), velike (10 – 50 %) i vrlo velike (50 – 100 %) učestalosti u ukupnom TRD repertoaru. Iz analize su isključeni uzorci s manje od 5 jedinstvenih klonotipova (CTRL-4, CTRL-7, PV-1, PV-5, PV-10). Klonotipovi male učestalosti bili su najmanje zastupljeni, dok su klonotipovi srednje do velike učestalosti dominirali TRD repertoarom (Slika 6).





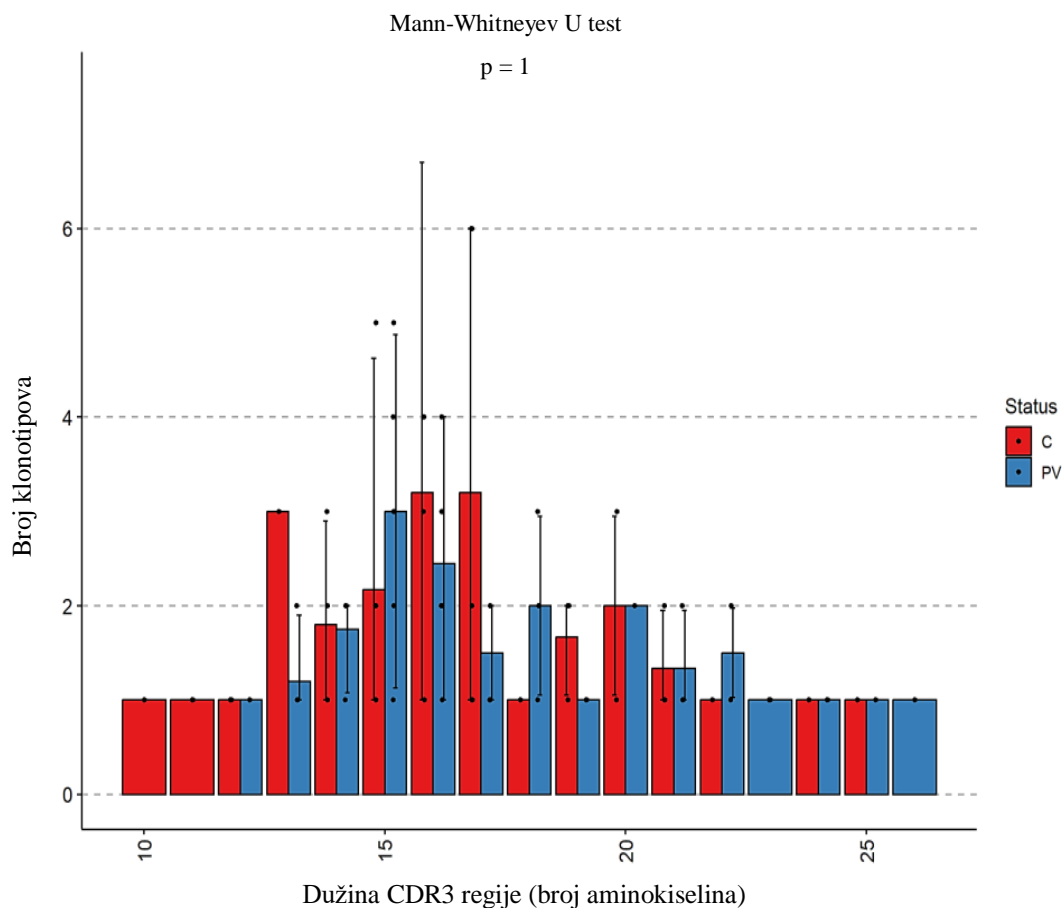
Slika 6. Frekvencije klonotipova male, srednje, velike i vrlo velike učestalosti u svakom uzorku. Na apscisi je redni broj uzorka, a na ordinati relativna frekvencija skupine klonotipova.

U skupini PV oboljelih uočen je trend većeg udjela klonotipova velike učestalosti, ali statistički značajne razlike u odnosu na TRD repertoar zdravih ispitanika u toj ili drugim kategorijama učestalosti nisu zabilježene (Slika 7).



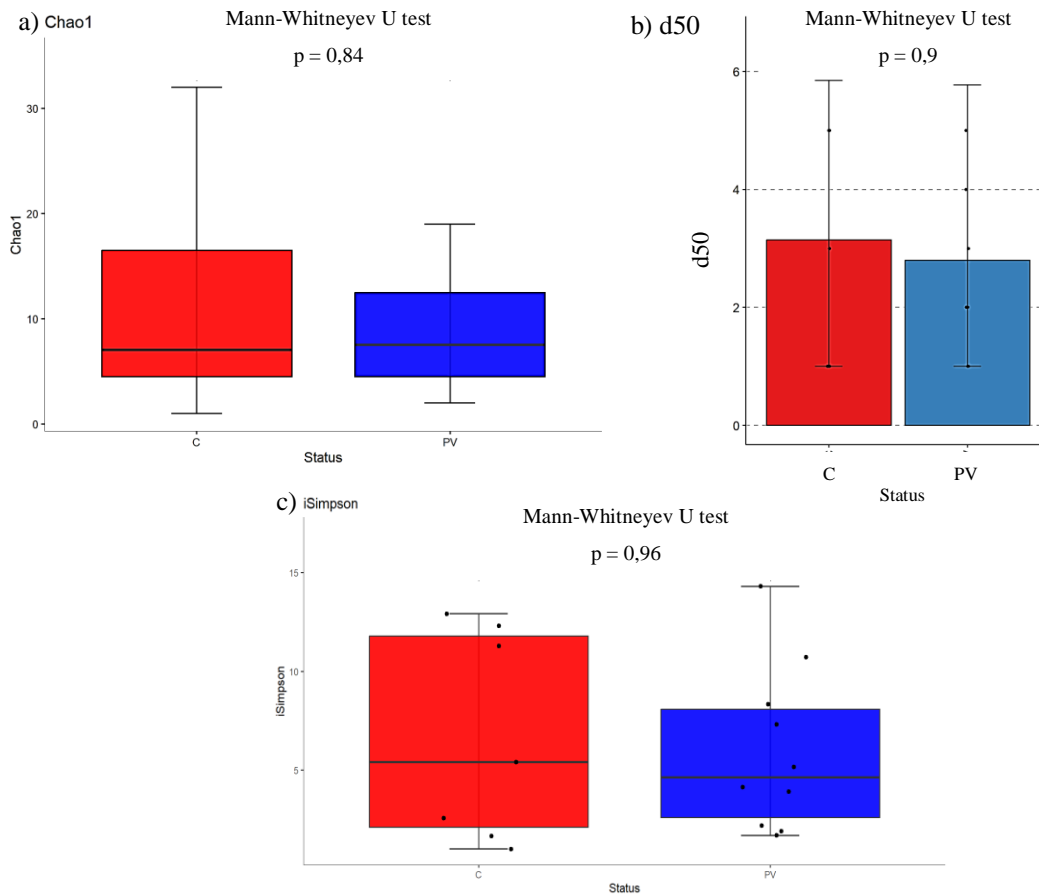
Slika 7. Razlike u udjelima klonotipova male, srednje, velike i vrlo velike učestalosti između zdravih kontrola (crveno) i oboljelih ispitanika (plavo). Na apscisi su skupine klonotipova razvrstane u odnosu na učestalost, a na ordinati relativna frekvencija skupine klonotipova. Razlike su testirane Mann-Whitneyevim U testom.

U nastavku je analizirana dužina CDR3 regije TRD sekvenci. Zabilježena je velika varijabilnost u broju aminokiselinskih ostataka (10 – 26), pri čemu su najkraće CDR3 regije uočene u koži zdravih, a najduže u koži oboljelih ispitanika. Dužina CDR3 regije većine klonotipova varirala je između 14 i 17 aminokiselina, bez značajnih razlika u međugrupnim usporedbama (Slika 8).



Slika 8. Varijabilnost distribucije dužina CDR3 regije između kontrola (crveno) i oboljelih (plavo). Na apscisi je dužina CDR3 regije s obzirom na broj aminokiselina, a na ordinati broj klonotipova s tom dužinom. Razlike između skupina testirane su Mann-Whitneyevim U testom.

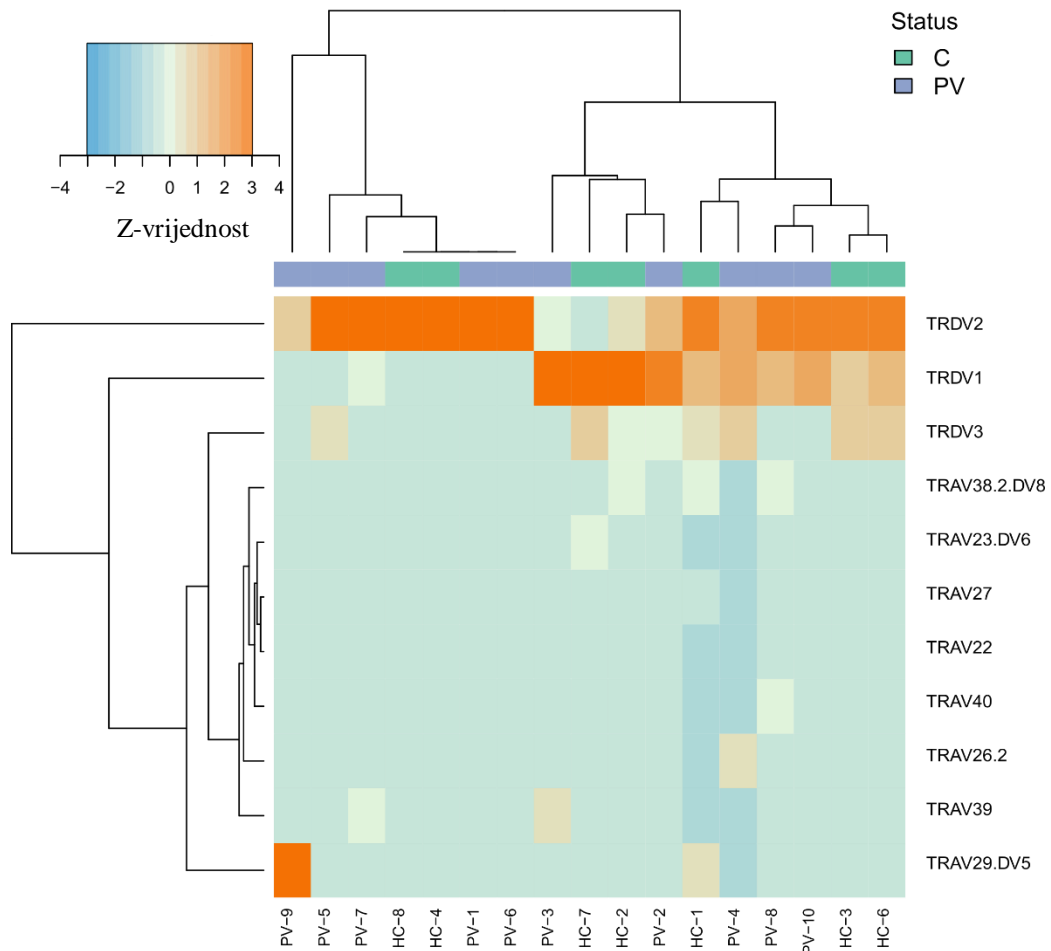
U svrhu procjene i usporedbe raznolikosti TRD repertoara u koži zdravih i oboljelih ispitanika učinjena je analiza indeksa raznolikosti, preciznije Chao1, D50 i iSimpson indeksa. Slijedom navedenog, Chao1 indeks (Slika 9a), odraz rijetkih klonotipova, te d50 indeks koji opisuje broj najučestalijih klonotipova koji zauzimaju polovicu repertoara (Slika 9b), kao i iSimpson indeks (Slika 9c), pokazatelj klonotipova velike učestalosti, nisu se statistički značajno razlikovali između zdravih i oboljelih ispitanika. Štoviše, klonotipovi vrlo visoke učestalosti, definirani indeksom d50, kao vrste koje zauzimaju najmanje 50 % svih čitanja, činili su uglavnom od dvije do tri varijante po repertoaru, odnosno trećinu zabilježenih klonotipova u većini uzoraka.



Slika 9. Indeksi raznolikosti: a) Chao1, b) d50 i c) iSimpson. Na apscisi je status ispitanika (crveno kontrole, plavo oboljeli), a na ordinati vrijednost indeksa. Vrijednosti indeksa raznolikosti prikazani su kutijastim dijagramom i okomitim crtama s graničnikom, gdje vodoravna linija unutar pravokutnika predstavlja medijan, gornja i donja granica pravokutnika interkvartilni raspon, a graničnici najmanju i najveću dobivenu vrijednost. Razlike između ispitivanih skupina testirane su Mann-Whitneyevim U testom.

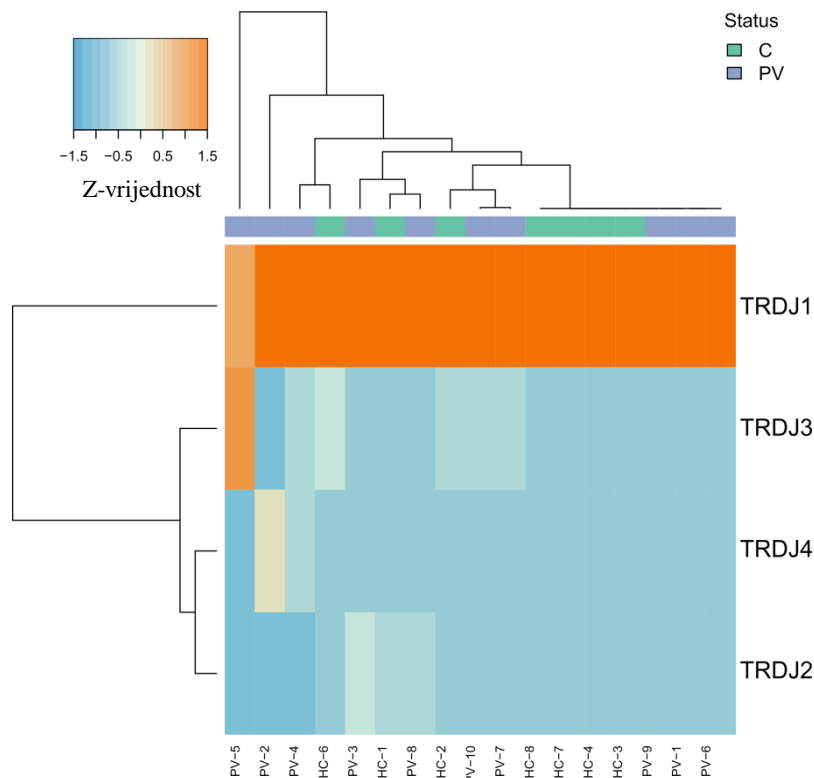
#### 5.4. Izražaj *TRD* gena

Vrsta i frekvencija *TRDV* gena koji sudjeluju u izgradnji TRD klonotipova prikazani su na Slici 10. Zabilježena su sva 3 poznata gena *TRD* lokusa, 3 od 5 gena koja pripadaju *TRD* i *TRA* lokusu, te 5 gena *TRA* lokusa. Najčešće su korišteni *TRDV2* i *TRDV1* geni, a izuzetak je uzorak PV-9 jer u velikoj mjeri izražava *TRAV29/TRDV5* transkript.



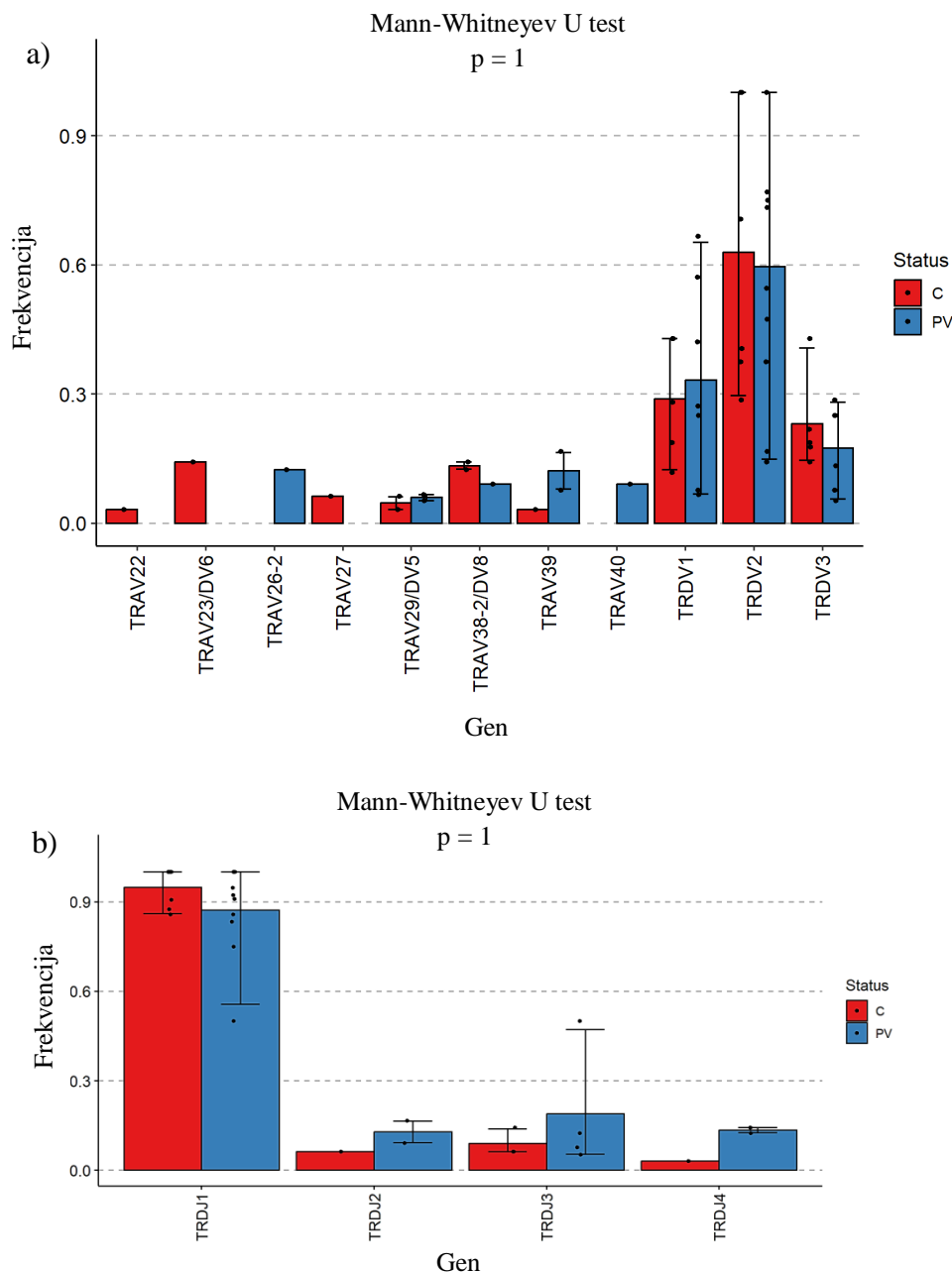
Slika 10. Izražaj *TRAV/TRDV* gena. Na toplinskoj karti prikazana je učestalost upotrebe gena s obzirom na z-vrijednost, gdje je veća z-vrijednost označena toplijom (narančastom) bojom i ukazuje na veću frekvenciju upotrebe tog gena.

Zabilježena su sva 4 do sada poznata *TRDJ* gena, a najčešće je korišten *TRDJ1* gen (Slika 11).



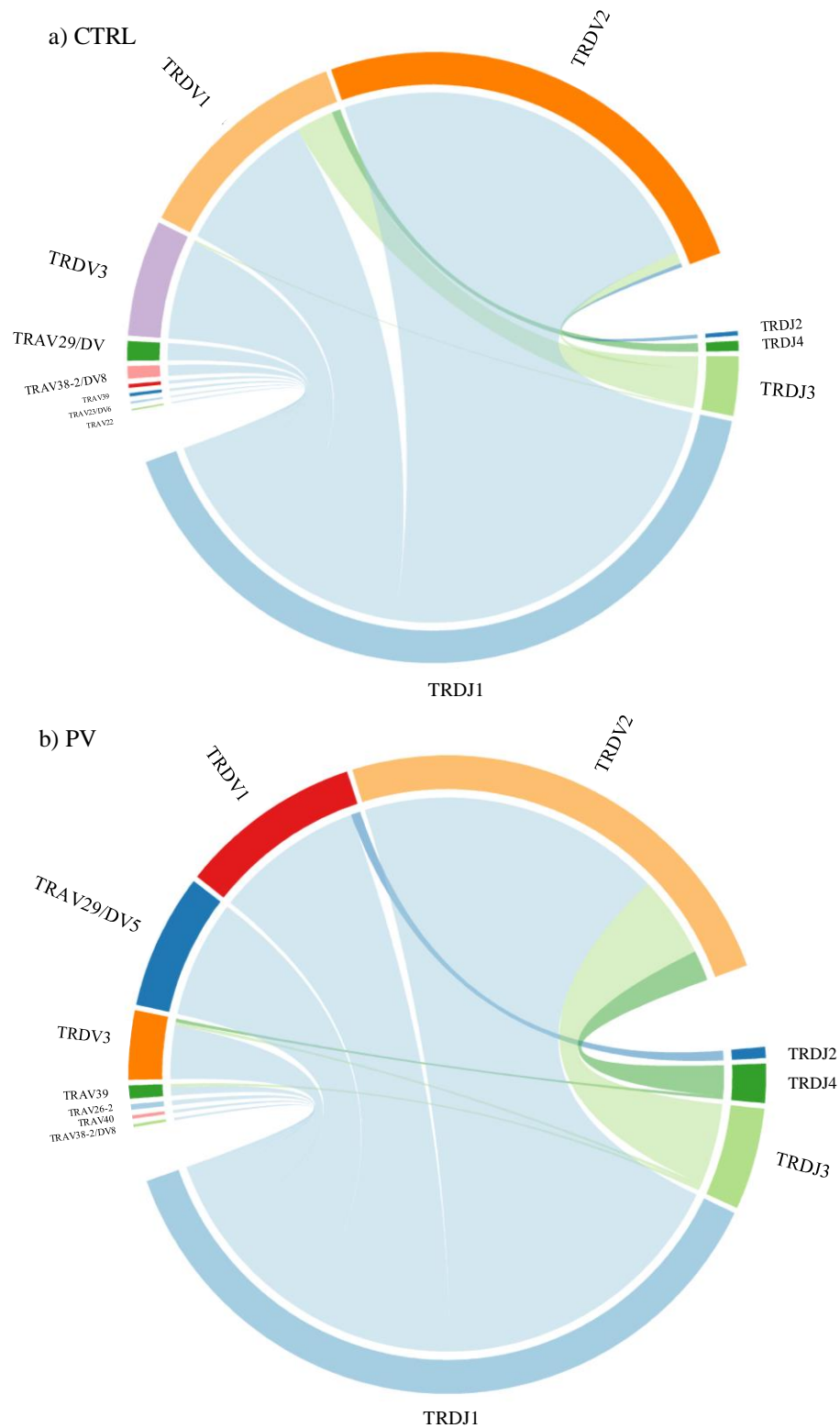
Slika 11. Upotreba *TRDJ* gena. Na toplinskoj karti prikazana je učestalost upotrebe gena s obzirom na z-vrijednost, gdje je veća z-vrijednost označena toplijom (narančastom) bojom i ukazuje na veću frekvenciju upotrebe tog gena.

Izražaj gena *TRDV2* ( $\approx 60\%$ ) i *TRDJ1* ( $\approx 90\%$ ) dominirao je TRD repertoarom kože obje skupine ispitanika, pri čemu je neznatno manja učestalost *TRDV3*, kao i nešto veći izražaj *TRDJ3* i *TRDJ4* gena primijećen u repertoaru kože oboljelih, ali bez statistički značajnih razlika u usporedbi s TRD repertoarom zdravih kontrola. Rijetke genske varijante poput *TRAV29/DV5* i *TRAV38/DV8* primijećene su u repertoaru zdravih i oboljelih ispitanika, dok je ekspresija *TRAV23/DV6* zabilježena samo u zdravoj koži (Slika 12).



Slika 12. Razlika u upotrebi a) *TRAV/TRDV* i b) *TRDJ* gena između zdravih (crveno) i oboljelih (plavo). Na apscisi su *TRD* geni, a na ordinati frekvencija ispitanika s izražajem određenog gena. Razlike su testirane Mann-Whitneyevim U testom.

Učestalost *TRDV-TRDJ* kombinacija u skupini kontrolnih i oboljelih ispitanika prikazana je na Slici 13, a najčešće korištena kombinacija u obje skupine bila je *TRDV2-TRDJ1*. U TRD repertoaru oboljelih primijećen je veći stupanj udruživanja *TRDJ3* i *TRDJ4* segmenata sa *TRDV2* genom, za razliku od repertoara zdrave kože gdje su se *TRDJ3* i *TRDJ4* većinom sparivali s *TRDV1*.

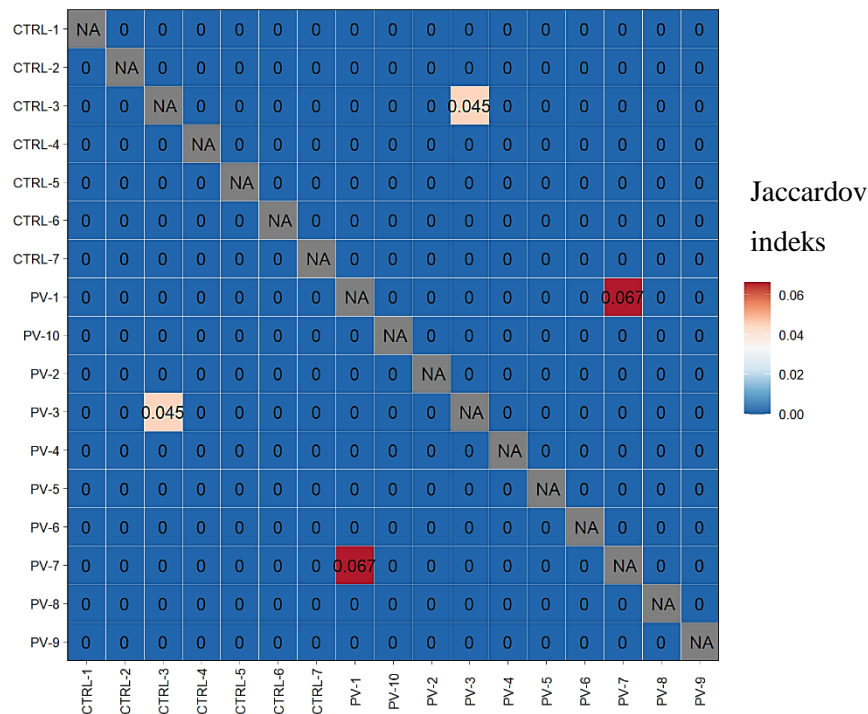


Slika 13. Učestalost kombinacija *TRDV-TRDJ* gena u a) kontrolnoj i b) oboljeloj skupini. Na lukovima kružnog grafa su *TRAV/TRDV* i *TRDJ* geni, a vrpce označavaju uparene genske segmente, gdje deblja vrpca znači veću učestalost kombinacije.



### 5.5. Analiza dijeljenih TRD klonotipova u koži zdravih i oboljelih od vulgarne psorijaze

TRD repertoar pokazao se vrlo individualnim i privatnim jer su u ukupnoj kolekciji klonotipova zabilježene samo dvije dijeljene, javne klonotipske varijante. Jedna javna varijanta primijećena je usporedbom TRD repertoara uzoraka oboljele kože (PV-1 i PV-7) za koje Jaccardov indeks sličnosti iznosi 0,067, a drugi je klonotip bio dijeljen između uzorka oboljele (PV-3) i zdrave kože (CTRL-3) sa Jaccardovim indeksom sličnosti 0,045 (Slika 14).



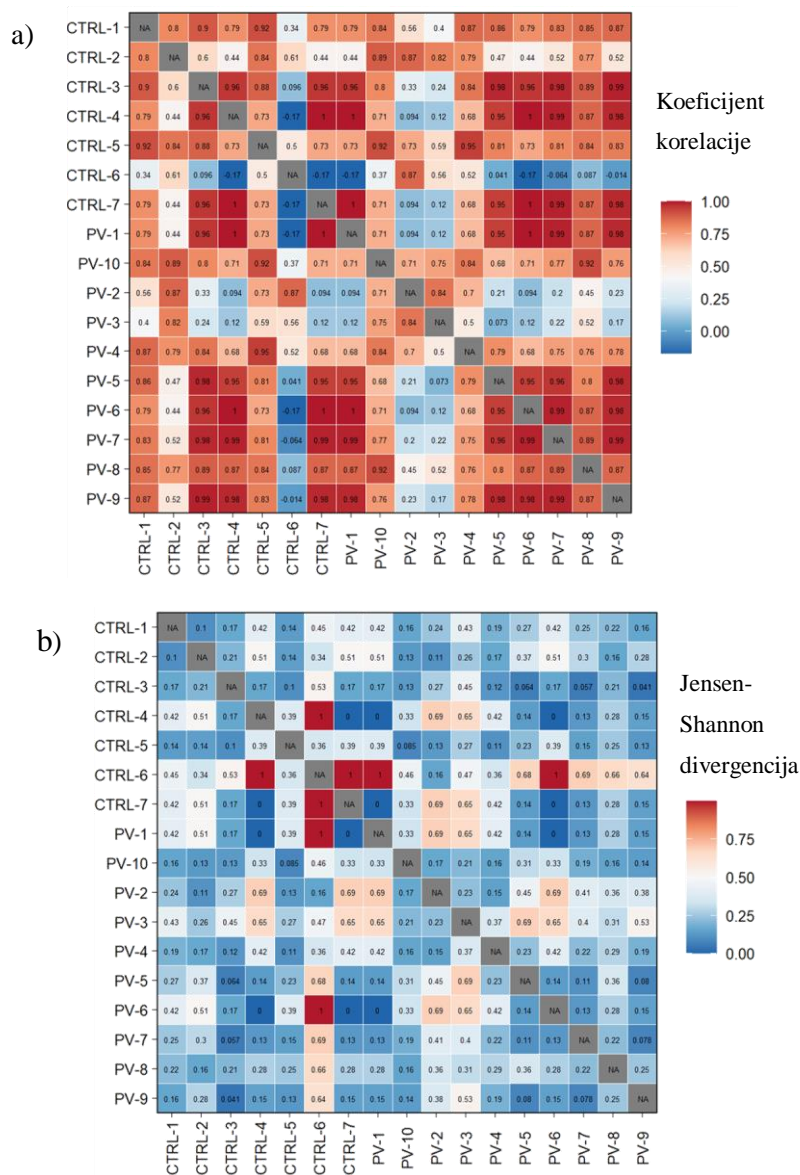
Slika 14. Preklapanje TRD repertoara izraženo Jaccardovim indeksom sličnosti. Toplija (crvena) boja predstavlja veći Jaccardov indeks, odnosno veću sličnost repertoara.

Obilježja dijeljenih klonotipova prikazana su u Tablici 6. Klonotip koji je zabilježen u dva uzorka oboljele kože ima veći broj čitanja i veću učestalost u odnosu na klonotip dijeljen između zdrave i oboljele kože. Obje javne varijante imaju CDR3 regiju dužine 16 aminokiselina te koriste iste V i J segmente, *TRDV2* i *TRDJ1*.

Tablica 6. Dijeljeni klonotipovi

Uzorci koji dijele klonotip	Broj čitanja	Učestalost	Aminokiselinska sekvenca CDR3 regije	V segment	J segment
PV-1 i PV-7	2361	0,040761714	CACDTGLSPYTDKLIF	TRDV2	TRDJ1
PV-3 i CTRL-3	406	0,007009426	CACDTVGTLETNKLIF	TRDV2	TRDJ1

Unatoč malom broju dijeljenih klonotipova, TRD repertoar kože oboljelih i zdravih ispitanika obilježava visoki stupanj genske korelacije ukazujući na mali broj istih genskih varijanti koje sudjeluju u izgradnji TRD repertoara male raznolikosti (Slika 15).



Slika 15. a) Korelacija i b) Jensen-Shannon raznolikost upotrebe gena. Veće vrijednosti prikazane su toplijom (crvenom) bojom.

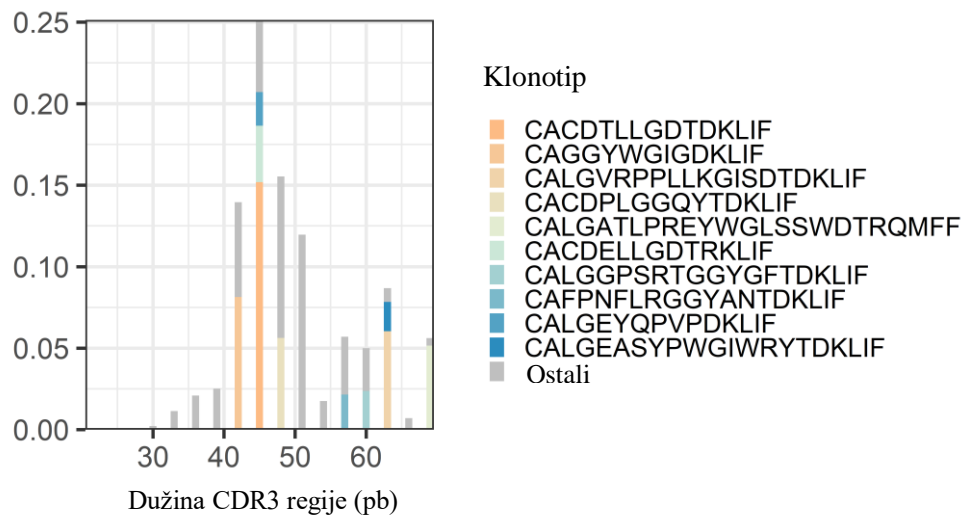
### 5.6. Najčešće TRD klonotipske varijante u koži zdravih i oboljelih ispitanika

Učestalost i sekvence najčešćih klonotipova u ukupnom repertoaru prikazani su u Tablici 7. Većina njih ima CDR3 sekvencu dugu 16 aminokiselina te koristi *TRDV2* i *TRDJ1* gen.

Tablica 7. Najčešći klonotipovi u ukupnom repertoaru

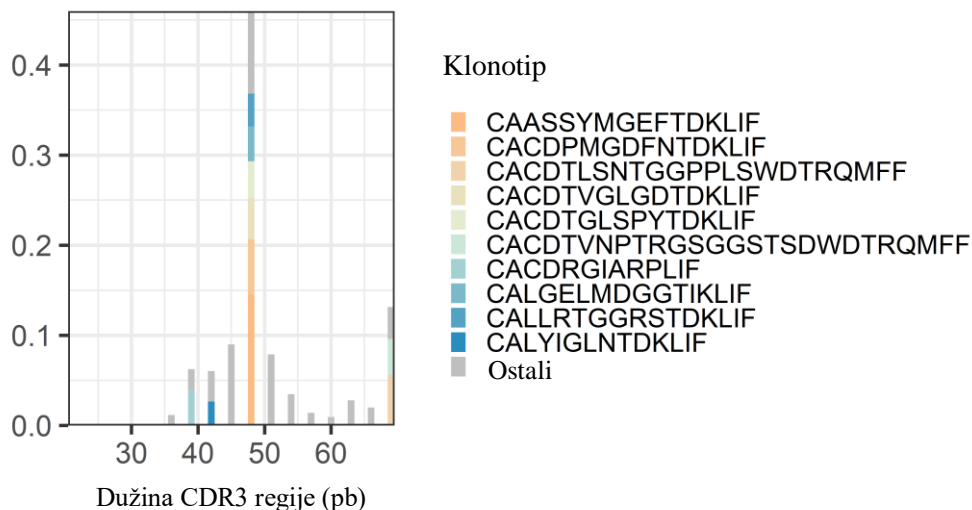
Broj čitanja	Učestalost	CDR3 aminokiselinska sekvenca	V segment	J segment
8404	0,094551264	CAASSYMGEFTDKLIF	TRAV29/DV5	TRDJ1
4700	0,052878503	CACDTLLGDTDKLIF	TRDV2	TRDJ1
3570	0,040165161	CACDPMGDFNTDKLIF	TRDV2	TRDJ1
3260	0,03667743	CACDTLSNTGGPPLSWDTRQMFF	TRDV2	TRDJ3
2648	0,029791974	CACDTVGLGDTDKLIF	TRDV2	TRDJ1
2518	0,028329377	CAGGYWGIGDKLIF	TRDV2	TRDJ1
2361	0,02656301	CACDTGLSPYTDKLIF	TRDV2	TRDJ1
2300	0,025876714	CACDTVNPTRGSGGSTSDWDTRQMFF	TRDV2	TRDJ3
2284	0,025696702	CACDRGIARPLIF	TRDV2	TRDJ4
2229	0,025077911	CALGELMDGGTIKLIF	TRDV1	TRDJ1

Klonotipovi vrlo velike učestalosti unutar kontrolne skupine uglavnom imaju CDR3 regiju dužine između 40 i 50 pb (Slika 16).



Slika 16. Raspodjela najčešćih klonotipova u kontrolnoj skupini prema dužini CDR3 regije. Na apscisi je dužina CDR3 regije u parovima baza, a na ordinati učestalost klonotipa s navedenom dužinom.

Klonotipovi vrlo velike učestalosti kod oboljelih od PV su u prosjeku nešto duži od onih u kontrolnoj skupini s obzirom na to da najveći broj njih ima CDR3 regiju dugu 48 pb (Slika 17).



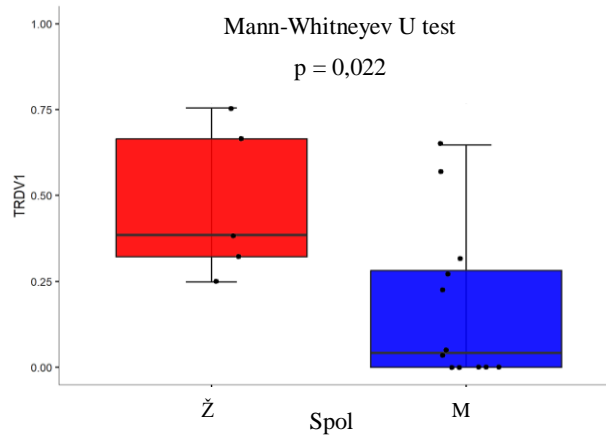
Slika 17. Raspodjela najčešćih klonotipova u skupini oboljelih od PV prema dužini CDR3 regije. Na apscisi je dužina CDR3 regije u parovima baza, a na ordinati učestalost klonotipa s navedenom dužinom.

### 5.7. Analiza povezanosti TRD repertoara s obilježjima ispitanika

U sljedećem koraku, uslijedila je analiza povezanosti parametara TRD repertoara s demografskim, kliničkim i biokemijskim obilježjima ispitanika.

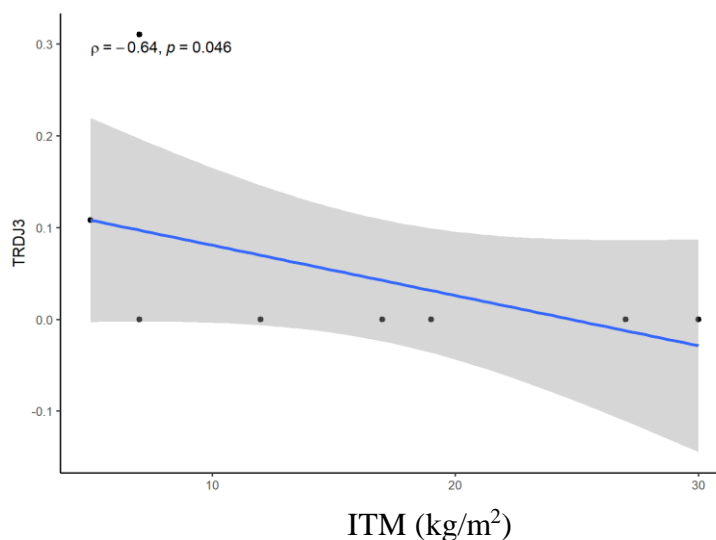
#### 5.7.1. Povezanost TRD repertoara s demografskim i biokemijskim obilježjima ispitanika

Usporedbom izražaja *TRDV* i *TRDJ* genskih varijanti između ispitanika razvrstanih u odnosu na spol, primijećena je značajno veća učestalost ekspresije *TRDVI* gena u osoba ženskog spola (Slika 18). Značajne razlike u izražaju preostalih *TRDV/TRDJ* genskih varijanti pri usporedbi muških i ženskih ispitanika nisu zabilježene, kao ni prilikom usporedbe *TRDV/TRDJ* izražaja oboljelih i zdravih ispitanika muškog spola.



Slika 18. Razlika u upotrebi *TRDVI* gena između spolova. Na apscisi su skupine prema spolu (crveno ženski, plavo muški), a na ordinati upotreba *TRDVI* gena. Upotreba gena prikazana je kutijastim dijagramom i okomitom crtom s graničnikom, gdje vodoravna linija unutar pravokutnika predstavlja medijan, gornja i donja granica pravokutnika interkvartilni raspon, a graničnici najmanju i najveću dobivenu vrijednost. Razlike između ispitivanih skupina testirane su Mann-Whitneyevim U testom.

Ekspresija *TRDJ3* gena negativno je korelirala s rastućim vrijednostima indeksa tjelesne mase, neovisno o statusu ispitanika (Slika 19).

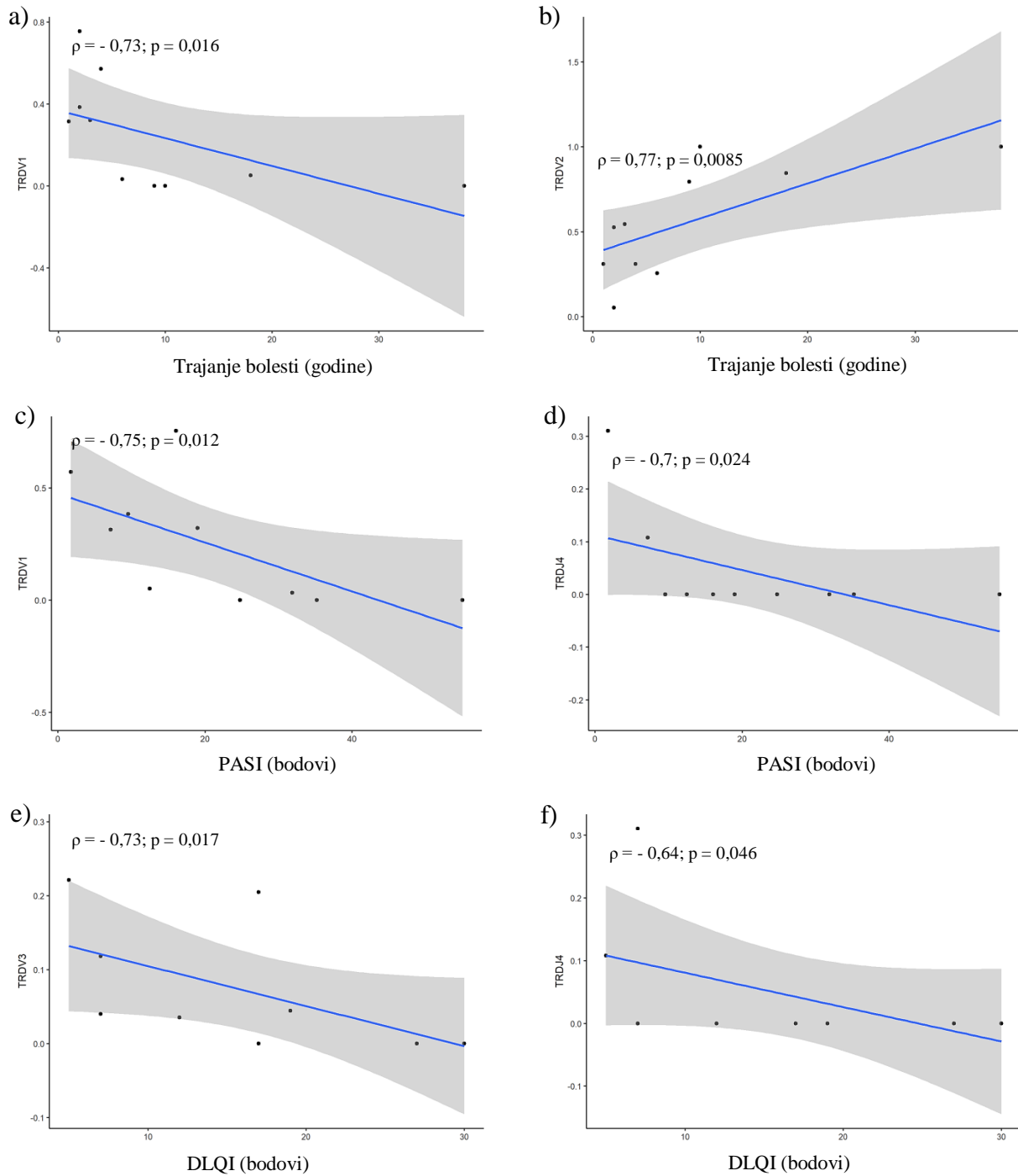


Slika 19. Povezanost izražaja *TRDJ3* gena s indeksom tjelesne mase (ITM). Na apscisi je ITM vrijednost, a na ordinati upotreba *TRDJ3* gena. Povezanost je ocijenjena Spearmanovim koeficijentom korelacije ( $\rho$ ). Plava linija je linija linearne regresije, dok su osjenčani dijelovi 95 %-tni interval pouzdanosti.

Povezanost dobi i serumskih vrijednosti upalnih (hsCRP) i virusnih (CMV IgM i IgG, anti-HBs) biljega s izražajem *TRDV* i *TRDJ* gena, brojem *TRDV/J* čitanja te indeksima raznolikosti TRD repertoara, međutim, nije zabilježena.

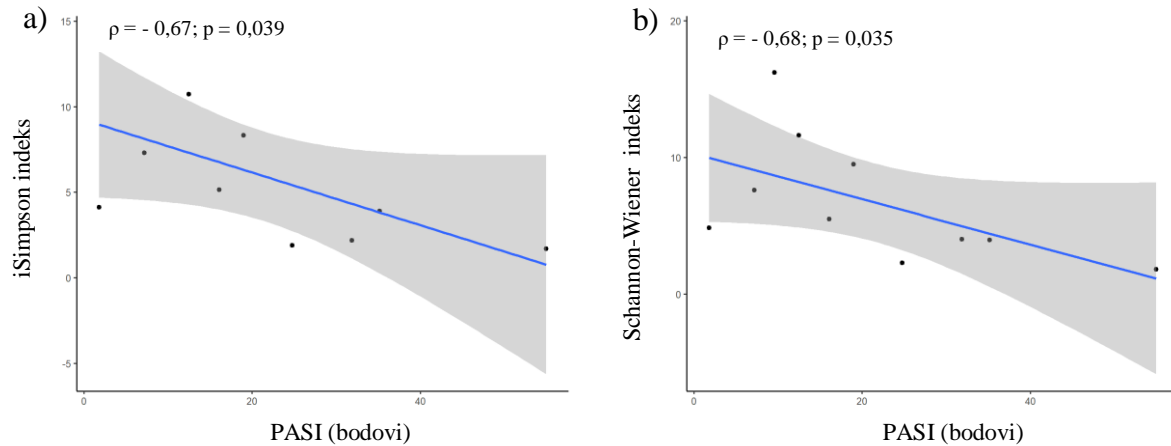
#### 5.7.2. Povezanost TRD repertoara s kliničkim obilježjima oboljelih od PV

Analiza povezanosti TRD repertoara lezijske kože i kliničkih obilježja oboljelih ispitanika zabilježila je više zanimljivih korelacija. Izražaj gena *TRDVI* u koži oboljelih je opadao (Slika 20a), a gena *TRDV2* (Slika 20b) rastao s duljinom trajanja psorijaze. Štoviše, izražaj gena *TRDVI* i *TRDJ4* smanjivao se s povećanjem PASI indeksa (Slika 20c i 20d), a porast DLQI indeksa, kao mjera smanjenja kvalitete života, korelirao je sa smanjenjem izražaja gena *TRDV3* (Slika 20e) i *TRDJ4* (Slika 20f) .



Slika 20. Povezanost a) *TRDV1* i b) *TRDV2* gena s dužinom trajanja PV. Povezanost c) *TRDV1* i d) *TRDJ4* gena s PASI brojem bodova. Povezanost e) *TRDV3* i f) *TRDJ4* gena s DLQI brojem bodova. Na apscisi je dužina trajanja psorijaze u godinama, odnosno broj bodova ostvaren na PASI i DLQI upitniku, a na ordinati upotreba *TRD* gena. Povezanost je ocijenjena Spearmanovim koeficijentom korelacije ( $\rho$ ). Plava linija je linija linearne regresije, dok su osjenčani dijelovi 95 %-tni interval pouzdanosti.

Sudeći po porastu vrijednosti PASI indeksa, progresija oboljenja vezana je uz smanjenje raznolikosti repertoara, odnosno nižim vrijednostima iSimpson i Shannon-Wiener indeksa (Slika 21).



Slika 21. Povezanost a) iSimpson i b) Shannon-Wiener indeksa s PASI brojem bodova. Na apscisi je broj bodova ostvaren na PASI ljestvici, a na ordinati vrijednost indeksa raznolikosti. Povezanost je ocijenjena Spearmanovim koeficijentom korelacije ( $\rho$ ). Plava linija je linija linearne regresije, dok su osjenčani dijelovi 95 %-tni interval pouzdanosti.

Statistički značajna povezanost između drugih parametara TRD repertoara i kliničkih obilježja oboljelih ispitanika nije zabilježena.



## 6. RASPRAVA

Iz uzoraka kože 19 ispitanika, 10 oboljelih od vulgarne psorijaze i 9 zdravih kontrola, izolirana je RNK i učinjena TCRSeq analiza TRD repertoara. Analizom dobivenih čitanja zabilježen je mali broj jedinstvenih klonotipskih varijanti u koži obje skupine ispitanika, ukupno 166, od čega najmanje 1, a najviše 32 klonotipa po uzorku, što ukazuje na prisustvo malog broja  $\gamma\delta$  stanica u koži. U oboljelih od vulgarne psorijaze zabilježen je dvostruko, ali ne i značajno, veći broj TRD čitanja (Tablica 5), većinom *TRDV2* genskog razreda, sukladno nalazima prethodnih studija (70), i u prilog ranijim rezultatima koji opisuju migraciju i udomljavanje krvnih  $\gamma\delta$  populacija u psorijatičnim lezijama (66 – 68).

Većina zabilježenih TRD klonova pripadala je skupini srednje do velike učestalosti (čine 1 – 50 % ukupnog repertoara), bez dokaza o prisutnosti rijetkih klonotipskih varijanti zastupljenih s jednim ili dva čitanja, ukazujući na vrlo malu raznolikost TRD repertoara, i potpuni izostanak potencijalno naivnih  $\gamma\delta$  T-limfocitnih vrsta u koži. Niske vrijednosti Chao1 indeksa, koji ukazuje na rijetke klonotipove, odgovaraju malom broju pronađenih nisko frekventnih varijanti (< 1 % repertoara), svega njih tri. Hiperekspandirane klonalne varijante, koje čine više od 50 % repertoara, pronađene su u dva uzorka i bile su podjednako prisutne u zdravoj i oboljeloj koži ukazujući na značajan utjecaj individualnih čimbenika u oblikovanju TRD repertoara u koži. Najveći broj TRD čitanja zabilježen je pak u uzorku lezijske kože (PV-9), gdje je, zanimljivo, jedan klonotip činio više od dvije trećine repertoara. Pojava ove klonotipske varijante nije, međutim, primijećena u ostalim uzorcima lezijske niti zdrave kože, pa će značaj ovog nalaza u kontekstu pojave i razvoja psorijaze biti potrebno testirati u proširenom skupu uzoraka.

Dužina CDR3 regije većine TRD klonotipova bila je duga od 14 do 17 aminokiselina, odnosno 42 – 51 pb, i nije značajno varirala u odnosu na status ispitanika. Razlike u dužini CDR3 regije između zdravih i oboljelih nisu primijetili ni Chen i sur. (77). Sličan raspon dužina CDR3  $\delta$  lanaca ranije je opisan u krvi (78) i probavnom traktu (79) zdravih osoba. Zanimljivo, Davey i sur. primijetili su da se dužina CDR3 sekvenci mijenja ovisno o vrsti  $\delta$  lanca, pri čemu V $\delta$ 1 stanice izražavaju CDR3 sekvence većeg (25 – 70 pb), a V $\delta$ 2 stanice manjeg raspona dužina (35 – 55 pb) (64). Sukladno navedenom, dužina CDR3 regije deset najčešćih klonotipova u zdravoj koži ispitanika ove studije varirala je između 40 i 50 pb, potencijalno odražavajući većinski razred *TRDV2* klonotipskih varijanti. U zdravoj koži zabilježena je i najkraća CDR3 regija dužine 10 aminokiselinskih ostataka. U usporedbi s

dužinom CDR3 regija u zdravoj koži, CDR3 sekvence PV repertoara bile su većinom ujednačene dužine od 48 pb, nalik dužinama CDR3 delta lanaca u crijevnim resicama oboljelih od celijakije (79). U lezijskoj koži zabilježena je i pojava najduže CDR3 regije od 78 pb.

U sljedećem dijelu istraživana je učestalost izražaja *TRDV* i *TRDJ* genskih varijanti. Značajna razlika u izražaju *TRDV* i *TRDJ* genskih varijanti između zdravih i oboljelih nije zabilježena, sukladno nalazima Chena i sur. koji također opisuju podjednaki izražaj *TRDV* i *TRDJ* genskih segmenata u zdravih ispitanika i oboljelih od PV (77). U TRD repertoaru naših ispitanika, najčešće izraženi V segmenti bili su *TRDV2*, a zatim *TRDV1* i *TRDV3*. Za razliku od dominantne ekspresije *TRDV2* u ukupnoj kolekciji uzoraka, u TRD repertoaru jednog oboljelog ispitanika zabilježen je većinski izražaj gena *TRAV29/TRDV5*, ponajviše kao odraz gotovo dvostruko većeg broja čitanja ove najučestalije klonotipske varijante u odnosu na sljedeću varijantu po učestalosti. Gen *TRDJ1* bio je najčešće izražen kod svih ispitanika, a oboljeli od psorijaze imali su i nešto veću, ali ne i statistički značajnu, upotrebu ostalih J segmenata, *TRDJ2*, *TRDJ3* i *TRDJ4*.

S obzirom na dominantni izražaj gena *TRDV2* i *TRDJ1*, njihova kombinacija bila je najučestalija u obje skupine. U uzorcima zdrave kože,  $\gamma\delta$  stanice su međutim, gotovo isključivo koristile *TRDV2-TRDJ1* varijante, dok su  $\gamma\delta$  T-limfociti PV ispitanika *TRDV2* kombinirali i s *TRDJ3* i *TRDJ4* genima. Suprotno navedenom, Chen i sur. opisali su značajno veću učestalost *TRDV1-TRDJ1* u bolesnika sa psorijazom (77).

Izražaj *TRDV1* gena ranije je opisan i u zdravoj koži (80), ali i u koži zahvaćenoj psorijazom (77) i tumorski izmijenjenim Merkelovim stanicama (81). Za razliku od navedenih studija koje opisuju dominantni izražaj *TRDV1* klonotipskih varijanti, TRD repertoar naših ispitanika uglavnom obilježava izražaj gena *TRDV2*, potencijalno kao posljedica različitih metodoloških pristupa u obradi tkivnih bioptata i izolaciji tkivnih leukocita. U našem istraživanju koristili smo naime RNK materijal iz ukupnih leukocita, izoliranih nakon relativno kratke enzimske i mehaničke homogenizacije svježih uzoraka kože pri čemu smo pored trajno naseljenih populacija, moguće izolirali i značajan udio perifernih  $\gamma\delta$  T populacija, a koje uglavnom izražavaju V $\delta$ 2 fenotip (82). Za precizniju procjenu TRD repertoara u koži, bit će potrebno dodatno procesiranje uzoraka u vidu sortiranja i imunofenotipizacije kožnih populacija  $\gamma\delta$  T-stanica.

Zabilježene klonalne varijante bile su uglavnom jedinstvene, i suštinski privatne. Pronađene su samo dvije dijeljene, javne aminokiselinske sekvence CDR3 regije, od kojih je jedna primijećena u dva uzorka lezijske kože, a druga u uzorku zdrave i oboljele osobe. Sekvence dijeljenih klonotipova nisu pronađene u postojećim bazama podataka (83, 84). Oba dijeljena klonotipa izražavaju *TRDV2* gen, sukladno nalazima Daveya i sur. koji su pokazali značajno veći udio javnih CDR3 sekvenci u repertoaru V $\delta$ 2 stanica u odnosu na TRD repertoar V $\delta$ 1 limfocita (64). Mali udio dijeljenih, javnih TRD sekvenci među pojedincima opisuju i drugi istraživači kako u krvi (63, 64, 85), tako i u koži (70), tankom crijevu (79) i plućima (86). CDR3 sekvence  $\delta$  lanaca rijetko dijele više od dvije osobe (70, 85), što ukazuje na izrazito individualan delta TCR repertoar. Iako su zajednički klonotipovi među našim ispitanicima bili rijetki, oni su uglavnom izražavali iste gene, a razlike u sastavu i broju nasumično umetnutih nukleotida vjerojatno najviše doprinose individualnosti TRD repertoara (37).

Od deset najčešćih klonotipova zabilježenih u okviru ove studije, u literaturi se spominju dvije varijante. Najčešću sekvencu u zdravoj koži naših ispitanika te drugu po učestalosti u ukupnom repertoaru, CACDTLLGDTDKLIF, opisali su Vyborova i sur. (78) te Xia i sur. (85) u krvi odraslih, zdravih osoba. Xia i sur. također su primijetili povećanje CACDTLLGDTDKLIF sekvence nakon administracije BCG (*Bacillus Calmette–Guérin*) cjepiva (85). U UcTCRdb (engl. *Unconventional T Cell Receptor database*) bazi (83) evidentirana je i CACDTVGLGDTDKLIF sekvenca, otkrivena u psorijatičnoj koži naših ispitanika, ali ju zasad nismo uspjeli pronaći u radovima drugih istraživača.

Analiza povezanosti TRD repertoara i demografskih, antropometrijskih i kliničkih obilježja ispitanika dala je zanimljive rezultate. Dužina trajanja psorijaze negativno je korelirala s izražajem gena *TRDV1*, dok je izražaj gena *TRDV2* rastao s dužim trajanjem bolesti. Štoviše, ekspresija gena *TRDV1* i *TRDJ4* opadala je s progresijom bolesti i porastom vrijednosti PASI indeksa, a kvaliteta života oboljelih ispitanika, procijenjena sukladno DLQI upitniku, opadala je sa smanjenjem ekspresije gena *TRDV3* i *TRDJ4*. Zabilježena je i negativna korelacija između vrijednosti iSimpson i Shannon-Wiener indeksa te PASI skale, ukazujući na smanjenje udjela rijetkih klonotipskih varijanti s progresijom bolesti. Prethodne studije opisuju značajniji pad krvnih V $\delta$ 1 udjela u sredovječnim muškaraca nego u žena iste dobi, kao i veće smanjenje broja V $\delta$ 2 stanica nakon 40. godine života kod osoba ženskog spola u odnosu na muški (82). Smanjenje broja V $\delta$ 2 stanica u žena i V $\delta$ 1 limfocita u muškaraca moguće doprinosi značajno većem izražaju *TRDV1* gena koje je zabilježeno u ispitanica ženskog spola u odnosu na muške ispitanike.

Ukupno, rezultati ove studije daju preliminarni uvid u obilježja TRD repertoara u koži zdravih kontrola i oboljelih od vulgarne psorijaze, pružajući uvid u jedinstvene genske i klonotipske varijante zasad nepoznatog kliničkog i terapijskog značaja. Međutim, ograničenja studije nalažu oprez u tumačenju priloženih rezultata, posebice u kontekstu malog broja uzoraka i malog broja zabilježenih TRD prijepisa, te metodoloških ograničenja poput izostanka analize fenotipskih obilježja i TCR repertoara sortiranih gama delta stanica iz kože, te zahtijevaju daljnje analize u vidu naprednih tehnologija poput sekvenciranja jednostanične RNK sortiranih  $\gamma\delta$  T-limfocita iz kože.

## 7. ZAKLJUČAK

Na osnovu prikupljenih rezultata ovog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. TRD repertoar kožnih leukocita čini mali broj jedinstvenih klonotipova, izrazito privatnog i individualnog karaktera.
2. Raznolikost TRD repertoara u koži je mala, a prevladavaju varijante srednje do velike učestalosti koje dominantno izražavaju *TRDV2*, *TRDV1* i *TRDV3* varijante gena u kombinaciji s *TRDJ1*, *TRDJ3* i *TRDJ4*, neovisno o statusu slučaj-kontrola.
3. Dužina trajanja psorijaze raste s porastom izražaja gena *TRDV2*, a veličina PASI i DLQI indeksa negativno korelira s izražajem gena *TRDV1*, *TRDV3* i *TRDJ4*.
4. Raznolikost TRD repertoara u koži oboljelih smanjuje se s povećanjem PASI indeksa.

## 8. SAŽETAK

**Ciljevi istraživanja:** Istraživanjem se istražio i usporedio repertoar delta TCR lanaca CD3+ $\gamma\delta$ TCR+  $\gamma\delta$  T-limfocita u koži zdravih pojedinaca i osoba oboljelih od vulgarne psorijaze te ustanovila povezanost otkrivenih delta TCR klonotipova s obilježjima i težinom ove bolesti.

**Nacrt studije:** Studija je ustrojena kao istraživanje parova.

**Ispitanici i metode:** Iz tkivnih leukocita dobivenih uzorkovanjem kože zdravih ispitanika i bolesnika s vulgarnom psorijazom izolirana je RNK te je njenim sekvenciranjem analizirana raznolikost delta lanaca T-staničnog receptora gama delta T-limfocita.

**Rezultati:** Pronađeno je 166 jedinstvenih klonotipova, od kojih 164 privatne i 2 dijeljene varijante. Klonotipovi srednje do velike učestalosti bili su najzastupljeniji s prosječnom dužinom CDR3 regije 14 – 17 aminokiselina. Najučestalije genske varijante *TRDV2*, *TRDVI* i *TRDV3* najčešće su udruživane s genima *TRDJI*, *TRDJ3* i *TRDJ4*. Dužina trajanja psorijaze rasla je s porastom izražaja gena *TRDV2*, a veličina PASI i DLQI indeksa negativno je korelirala s izražajem gena *TRDVI*, *TRDV3* i *TRDJ4*. Shannon-Wiener i iSimpson indeks negativno su korelirali s PASI.

**Zaključak:** TRD repertoar kožnih leukocita čini mali broj jedinstvenih klonotipova, izrazito privatnog i individualnog karaktera srednje do velike učestalosti. Indeksi raznolikosti repertoara i izražaj gena *TRDVI*, *TRDV3*, *TRDJ4* negativno koreliraju s kraćim i blažim oblikom bolesti, dok *TRDV2* pozitivno korelira s dužim trajanjem psorijaze.

**Ključne riječi:** delta lanac T-staničnog receptora; intraepitelni limfociti; psorijaza; sekvenciranje RNK

## 9. SUMMARY

### ANALYSIS OF T-CELL RECEPTOR DELTA CHAIN DIVERSITY IN GAMMA DELTA T-CELLS OF PSORIASIS VULGARIS PATIENTS USING TCRSEQ METHODOLOGY

**Objectives:** The study investigated and compared the repertoire of delta TCR chains of CD3+ $\gamma\delta$ TCR+  $\gamma\delta$  T-lymphocytes in the skin of healthy individuals and people suffering from psoriasis vulgaris and established the association of detected delta TCR clonotypes with the characteristics and severity of this disease.

**Study design:** The study was conducted as a case-control study.

**Participants and methods:** RNA was isolated from tissue leukocytes obtained by sampling the skin of healthy subjects and patients with psoriasis vulgaris, and the delta chain diversity of the gamma delta T-lymphocyte T-cell receptor was analyzed by sequencing.

**Results:** 166 unique clonotypes were found, of which 164 were private and 2 shared variants. Medium to high frequency clonotypes were the most abundant, with an average length of the CDR3 region of 14 – 17 amino acids. The most frequent gene variants *TRDV2*, *TRDV1* and *TRDV3* were most often combined with the genes *TRDJ1*, *TRDV3* and *TRDJ4*. The duration of psoriasis increased with the higher expression of *TRDV2*, and the size of PASI and DLQI indices negatively correlated with the expression of *TRDV1*, *TRDJ3* and *TRDJ4*. Shannon-Wiener and iSimpson indices negatively correlated with PASI.

**Conclusion:** The TRD repertoire of skin leukocytes consists of a small number of unique clonotypes, with an extremely private and individual character, in medium to high frequency. The repertoire diversity indices and the expression of the genes *TRDV1*, *TRDV3* and *TRDJ4* negatively correlate with a shorter and milder form of the disease, while *TRDV2* positively correlates with a longer duration of psoriasis.

**Keywords:** intraepithelial lymphocytes; psoriasis; RNA-Seq; T-cell receptors delta-chain

**10. LITERATURA**

1. Basta-Juzbašić A i sur. *Dermatovenerologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2014.
2. Barišić-Druško V, Ručević I. Psoriasis vulgaris u istočnoj Hrvatskoj – epidemiologija i “trigger” čimbenici. *Med Vjesn*. 1999;31(1-4):131-7.
3. Parisi R, Iskandar IYK, Kontopantelis E, Augustin M, Griffiths CEM, Ashcroft DM. National, regional, and worldwide epidemiology of psoriasis: systematic analysis and modelling study. *BMJ*. 2020;369:m1590.
4. Armstrong AW, Mehta MD, Schupp CW, Gondo GC, Bell SJ, Griffiths CEM. Psoriasis Prevalence in Adults in the United States. *JAMA Dermatol*. 2021;157(8):940-6.
5. Iskandar IYK, Parisi R, Griffiths CEM, Ashcroft DM; Global Psoriasis Atlas. Systematic review examining changes over time and variation in the incidence and prevalence of psoriasis by age and gender. *Br J Dermatol*. 2021;184(2):243-58.
6. Torres T, Filipe P, Menezes Brandão F, Figueiredo A, Pinto Soares A, Sousa Basto A, i sur. Epidemiology of Psoriasis in Portugal: A Population-Based Study. *Acta Med Port*. 2023;36(9):541-9.
7. Vesikansa A, Mehtälä J, Pesu M, Aaltonen J, Kontinen R, Tasanen K, i sur. Comorbidities and Medication Use in Finnish Patients with Psoriasis: A Population-Based Registry Study. *Acta Derm Venereol*. 2023;103:adv00886.
8. Henseler T, Christophers E. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol*. 1985;13(3):450-6.
9. Ohata C, Anezaki H, Kaneko S, Okazaki F, Ito K, Matsuzaka Y, i sur. Clinical characteristics of patients with psoriasis with family history: A multicenter observational study. *J Dermatol*. 2023;50(6):746-52.
10. Farber EM, Nall ML. The natural history of psoriasis in 5,600 patients. *Dermatologica*. 1974;148(1):1-18.
11. Stern RS, Nijsten T, Feldman SR, Margolis DJ, Rolstad T. Psoriasis is common, carries a substantial burden even when not extensive, and is associated with widespread treatment dissatisfaction. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2004;9(2):136-9.



12. Solberg SM. Psoriasis in Norway: a prescription-based registry study of psoriasis-associated comorbidities. *Eur J Dermatol.* 2023;33(6):657-63.
13. Gelfand JM, Neimann AL, Shin DB, Wang X, Margolis DJ, Troxel AB. Risk of myocardial infarction in patients with psoriasis. *JAMA.* 2006;296(14):1735-41.
14. Love TJ, Qureshi AA, Karlson EW, Gelfand JM, Choi HK. Prevalence of the metabolic syndrome in psoriasis: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2003-2006. *Arch Dermatol.* 2011;147(4):419-24.
15. Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanić M, i sur. *Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi. 2. dopunjeno i izmijenjeno izdanje.* Zagreb: Medicinska naklada; 2018.
16. Turnpenny PD, Ellard S, Cleaver R. *Emery's Elements of Medical Genetics and Genomics.* 16. izdanje. Philadelphia: Elsevier; 2022.
17. Brandrup F, Hauge M, Henningsen K, Eriksen B. Psoriasis in an unselected series of twins. *Arch Dermatol.* 1978;114(6):874-8.
18. Tsoi LC, Stuart PE, Tian C, Gudjonsson JE, Das S, Zawistowski M, i sur. Large scale meta-analysis characterizes genetic architecture for common psoriasis associated variants. *Nat Commun.* 2017;8:15382.
19. Nair RP, Duffin KC, Helms C, Ding J, Stuart PE, Goldgar D, i sur. Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways. *Nat Genet.* 2009;41(2):199-204.
20. Nair RP, Stuart PE, Nistor I, Hiremagalore R, Chia NVC, Jenisch S, i sur. Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *Am J Hum Genet.* 2006;78(5):827-51.
21. Kalayciyan A, Aydemir EH, Kotogyan A. Experimental Koebner phenomenon in patients with psoriasis. *Dermatology.* 2007;215(2):114-7.
22. Malhotra SK, Mehta V. Role of stressful life events in induction or exacerbation of psoriasis and chronic urticaria. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2008;74(6):594-9.

23. Naldi L, Peli L, Parazzini F, Carrel CF; Psoriasis Study Group of the Italian Group for Epidemiological Research in Dermatology. Family history of psoriasis, stressful life events, and recent infectious disease are risk factors for a first episode of acute guttate psoriasis: results of a case-control study. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44(3):433-8.
24. Temiz SA, Özer İ, Ataseven A, Dursun R, Uyar M. The effect of smoking on the psoriasis: Is it related to nail involvement? *Dermatol Ther.* 2020;33(6):e13960.
25. Thorleifsdottir RH, Eysteinsdóttir JH, Olafsson JH, Sigurdsson MI, Johnston A, Valdimarsson H, i sur. Throat Infections are Associated with Exacerbation in a Substantial Proportion of Patients with Chronic Plaque Psoriasis. *Acta Derm Venereol.* 2016;96(6):788-91.
26. Balak DM, Hajdarbegovic E. Drug-induced psoriasis: clinical perspectives. *Psoriasis (Auckl).* 2017;7:87-94.
27. Kim GK, Del Rosso JQ. Drug-provoked psoriasis: is it drug induced or drug aggravated?: understanding pathophysiology and clinical relevance. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2010;3(1):32-8.
28. Griffiths CEM, Armstrong AW, Gudjonsson JE, Barker JNWN. Psoriasis. *Lancet.* 2021;397(10281):1301-15.
29. Finlay AY, Khan GK. Dermatology Life Quality Index (DLQI) – a simple practical measure for routine clinical use. *Clin Exp Dermatol.* 1994;19(3):210-6.
30. Christensen TE, Callis KP, Papenfuss J, Hoffman MS, Hansen CB, Wong B, i sur. Observations of psoriasis in the absence of therapeutic intervention identifies two unappreciated morphologic variants, thin-plaque and thick-plaque psoriasis, and their associated phenotypes. *J Invest Dermatol.* 2006;126(11):2397-403.
31. Mrowietz U, Kragballe K, Reich K, Spuls P, Griffiths CE, Nast A, i sur. Definition of treatment goals for moderate to severe psoriasis: a European consensus. *Arch Dermatol Res.* 2011;303(1):1-10.
32. Noronha-Neta MI, Picciani BLS, Niemeyer-Corbellini JP, Ramos-E-Silva M, Soares FA, Carneiro S. Quantification of histopathological changes in patients with psoriasis before and after phototherapy. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2019;35(5):354-9.

33. Georgescu SR, Tampa M, Caruntu C, Sarbu MI, Mitran CI, Mitran MI, i sur. Advances in Understanding the Immunological Pathways in Psoriasis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3):739.
34. Reynolds G, Vegh P, Fletcher J, Poyner EFM, Stephenson E, Goh I, i sur. Developmental cell programs are co-opted in inflammatory skin disease. *Science.* 2021;371(6527):eaba6500.
35. Bos JD, Hulsebosch HJ, Krieg SR, Bakker PM, Cormane RH. Immunocompetent cells in psoriasis. In situ immunophenotyping by monoclonal antibodies. *Arch Dermatol Res.* 1983;275(3):181-9.
36. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, i sur. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature.* 2007;449(7162):564-9.
37. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology.* 10. izdanje. Philadelphia: Elsevier; 2022.
38. Lowes MA, Suárez-Fariñas M, Krueger JG. Immunology of psoriasis. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:227-55.
39. Nestle FO, Turka LA, Nickoloff BJ. Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis. Autostimulation of T lymphocytes and induction of Th1 type cytokines. *J Clin Invest.* 1994;94(1):202-9.
40. Boonpethkaew S, Meephansan J, Jumlongpim O, Tangtanatakul P, Soonthornchai W, Wongpiyabovorn J, i sur. Transcriptomic Profiling of Peripheral Edge of Lesions to Elucidate the Pathogenesis of Psoriasis Vulgaris. *Int J Mol Sci.* 2022;23(9):4983.
41. Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2009;129(6):1339-50.
42. Morath A, Schamel WW.  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cell receptors: Similar but different. *J Leukoc Biol.* 2020;107(6):1045-55.
43. Hu Y, Hu Q, Li Y, Lu L, Xiang Z, Yin Z, i sur.  $\gamma\delta$  T cells: origin and fate, subsets, diseases and immunotherapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8(1):434.

44. Fonseca S, Pereira V, Lau C, Teixeira MDA, Bini-Antunes M, Lima M. Human Peripheral Blood Gamma Delta T Cells: Report on a Series of Healthy Caucasian Portuguese Adults and Comprehensive Review of the Literature. *Cells*. 2020;9(3):729.
45. Andreu-Ballester JC, García-Ballesteros C, Benet-Campos C, Amigó V, Almela-Quilis A, Mayans J, i sur. Values for  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T-lymphocytes and CD4+, CD8+, and CD56+ subsets in healthy adult subjects: assessment by age and gender. *Cytometry B Clin Cytom*. 2012;82(4):238-44.
46. Zhou J, Zhang J, Tao L, Peng K, Zhang Q, Yan K, i sur. Up-regulation of BTN3A1 on CD14+ cells promotes V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell activation in psoriasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022;119(44):e2117523119.
47. Dimova T, Brouwer M, Gosselin F, Tassignon J, Leo O, Donner C, i sur. Effector V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells dominate the human fetal  $\gamma\delta$  T-cell repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(6):E556-65.
48. Farnault L, Gertner-Dardenne J, Gondois-Rey F, Michel G, Chambost H, Hirsch I, i sur. Clinical evidence implicating gamma-delta T cells in EBV control following cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48(11):1478-9.
49. Couzi L, Pitard V, Netzer S, Garrigue I, Lafon ME, Moreau JF, i sur. Common features of gammadelta T cells and CD8(+) alphabeta T cells responding to human cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients. *J Infect Dis*. 2009;200(9):1415-24.
50. Pitard V, Roumanes D, Lafarge X, Couzi L, Garrigue I, Lafon ME, i sur. Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Blood*. 2008;112(4):1317-24.
51. Halary F, Pitard V, Dlubek D, Krzysiek R, de la Salle H, Merville P, i sur. Shared reactivity of V{delta}2(neg) {gamma}{delta} T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *J Exp Med*. 2005;201(10):1567-78.
52. Ribot JC, Lopes N, Silva-Santos B.  $\gamma\delta$  T cells in tissue physiology and surveillance. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(4):221-32.

53. Swindell WR, Johnston A, Voorhees JJ, Elder JT, Gudjonsson JE. Dissecting the psoriasis transcriptome: inflammatory- and cytokine-driven gene expression in lesions from 163 patients. *BMC Genomics*. 2013;14:527.

54. The International ImunoGeneTics Information System. IMGT Repertoire (IG and TR); Locus representation: Human (Homo sapiens) TRG. Dostupno na adresi: <https://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=locus&species=human&group=TRG>. Datum pristupa: 5.5.2024.

55. The International ImunoGeneTics Information System. IMGT Repertoire (IG and TR); Gene table: human (Homo sapiens) TRGV. Dostupno na adresi: <https://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=genetable&species=human&group=TRGV>. Datum pristupa: 5.5.2024.

56. The International ImunoGeneTics Information System. IMGT Repertoire (IG and TR); Gene table: human (Homo sapiens) TRGJ. Dostupno na adresi: <https://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=genetable&species=human&group=TRGJ>. Datum pristupa: 5.5.2024.

57. The International ImunoGeneTics Information System. IMGT Repertoire (IG and TR); Gene table: human (Homo sapiens) TRGC. Dostupno na adresi: <https://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=genetable&species=human&group=TRGC>. Datum pristupa: 5.5.2024.

58. The International ImunoGeneTics Information System. IMGT Repertoire (IG and TR); Locus representation: human (Homo sapiens) TRA/TRD. Dostupno na adresi: <https://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=locus&species=human&group=TRA>. Datum pristupa: 5.5.2024.

59. The International ImunoGeneTics Information System. IMGT Repertoire (IG and TR); Gene table: human (Homo sapiens) TRDV. Dostupno na adresi: <https://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=genetable&species=human&group=TRDV>. Datum pristupa: 5.5.2024.

60. The International ImunoGeneTics Information System. IMGT Repertoire (IG and TR); Gene table: human (Homo sapiens) TRDD. Dostupno na adresi:

<https://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=genetable&species=human&group=TRDD>. Datum pristupa: 5.5.2024.

61. The International ImunoGeneTics Information System. IMGT Repertoire (IG and TR); Gene table: human (Homo sapiens) TRDJ. Dostupno na adresi: <https://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=genetable&species=human&group=TRDJ>. Datum pristupa: 5.5.2024.

62. The International ImunoGeneTics Information System. IMGT Repertoire (IG and TR); Gene table: human (Homo sapiens) TRDC. Dostupno na adresi: <https://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=genetable&species=human&group=TRDC>. Datum pristupa: 5.5.2024.

63. Ravens S, Schultze-Florey C, Raha S, Sandrock I, Drenker M, Oberdörfer L, i sur. Human  $\gamma\delta$  T cells are quickly reconstituted after stem-cell transplantation and show adaptive clonal expansion in response to viral infection. *Nat Immunol.* 2017;18(4):393-401.

64. Davey MS, Willcox CR, Joyce SP, Ladell K, Kasatskaya SA, McLaren JE, i sur. Clonal selection in the human V $\delta$ 1 T cell repertoire indicates  $\gamma\delta$  TCR-dependent adaptive immune surveillance. *Nat Commun.* 2017;8:14760.

65. Roden AC, Morice WG, Hanson CA. Immunophenotypic attributes of benign peripheral blood gammadelta T cells and conditions associated with their increase. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132(11):1774-80.

66. Cai Y, Shen X, Ding C, Qi C, Li K, Li X, i sur. Pivotal role of dermal IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells in skin inflammation. *Immunity.* 2011;35(4):596-610.

67. Seung NR, Park EJ, Kim CW, Kim KH, Kim KJ, Cho HJ, i sur. Comparison of expression of heat-shock protein 60, Toll-like receptors 2 and 4, and T-cell receptor gammadelta in plaque and guttate psoriasis. *J Cutan Pathol.* 2007;34(12):903-11.

68. Laggner U, Di Meglio P, Perera GK, Hundhausen C, Lacy KE, Ali N, i sur. Identification of a novel proinflammatory human skin-homing V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell subset with a potential role in psoriasis. *J Immunol.* 2011;187(5):2783-93.

69. Pantelyushin S, Haak S, Ingold B, Kulig P, Heppner FL, Navarini AA, i sur. Ror $\gamma$ t+ innate lymphocytes and  $\gamma\delta$  T cells initiate psoriasiform plaque formation in mice. *J Clin Invest.* 2012;122(6):2252-6.
70. Merleev AA, Marusina AI, Ma C, Elder JT, Tsoi LC, Raychaudhuri SP, i sur. Meta-analysis of RNA sequencing datasets reveals an association between TRAJ23, psoriasis, and IL-17A. *JCI Insight.* 2018;3(13):e120682.
71. Harden JL, Hamm D, Gulati N, Lowes MA, Krueger JG. Deep Sequencing of the T-cell Receptor Repertoire Demonstrates Polyclonal T-cell Infiltrates in Psoriasis. *F1000Res.* 2015;4:460.
72. Marušić M i sur. Uvod u znanstveni rad u medicini. 5. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.
73. Read the Docs. Diversity estimation. Dostupno na adresi: <https://vdjtools-doc.readthedocs.io/en/master/diversity.html>. Datum pristupa: 19.7.2024.
74. Omni Calculator. Shannon Diversity Index Calculator. Dostupno na adresi: <https://www.omnicalculator.com/ecology/shannon-index>. Datum pristupa: 19.7.2024.
75. ImmunoMind. Diversity estimation. Dostupno na adresi: [https://immunarch.com/articles/web\\_only/v6\\_diversity.html](https://immunarch.com/articles/web_only/v6_diversity.html). Datum pristupa: 19.7.2024.
76. Hou D, Ying T, Wang L, Chen C, Lu S, Wang Q, i sur. Immune Repertoire Diversity Correlated with Mortality in Avian Influenza A (H7N9) Virus Infected Patients. *Sci Rep.* 2016;6:33843.
77. Chen Y, Fu Q, Ma Y, Wang N, Yang J, Liang Q, i sur. Identification of the immune repertoire of  $\gamma\delta$  T-cell receptors in psoriasis. *Immunol Cell Biol.* 2024;102(7):570-7.
78. Vyborova A, Janssen A, Gatti L, Karaiskaki F, Yonika A, van Dooremalen S, i sur.  $\gamma\delta$ 2 T-Cell Expansion and Phenotypic Profile Are Reflected in the CDR3 $\delta$  Repertoire of Healthy Adults. *Front Immunol.* 2022;13:915366.
79. Eggesbø LM, Risnes LF, Neumann RS, Lundin KEA, Christophersen A, Sollid LM. Single-cell TCR sequencing of gut intraepithelial  $\gamma\delta$  T cells reveals a vast and diverse repertoire in celiac disease. *Mucosal Immunol.* 2020;13(2):313-21.

80. Ebert LM, Meuter S, Moser B. Homing and function of human skin gammadelta T cells and NK cells: relevance for tumor surveillance. *J Immunol.* 2006;176(7):4331-6.
81. Gherardin NA, Waldeck K, Caneborg A, Martelotto LG, Balachander S, Zethoven M, i sur.  $\gamma\delta$  T Cells in Merkel Cell Carcinomas Have a Proinflammatory Profile Prognostic of Patient Survival. *Cancer Immunol Res.* 2021;9(6):612-23.
82. Sanz M, Mann BT, Ryan PL, Bosque A, Pennington DJ, Hackstein H, i sur. Deep characterization of human  $\gamma\delta$  T cell subsets defines shared and lineage-specific traits. *Front Immunol.* 2023;14:1148988.
83. Zhang Lab, Tianjin University, China. Unconventional T Cell Receptor database. Dostupno na adresi: <http://uctcrdb.cn/#/search>. Datum pristupa: 19.7.2024.
84. Pierce Laboratory at the Institute for Bioscience and Biotechnology Research of the University of Maryland. TCR3d. Dostupno na adresi: <https://tcr3d.ibbr.umd.edu/tcrsearch>. Datum pristupa: 19.7.2024.
85. Xia M, Blazevic A, Fiore-Gartland A, Hoft DF. Impact of BCG vaccination on the repertoire of human  $\gamma\delta$  T cell receptors. *Front Immunol.* 2023;14:1100490.
86. Ogongo P, Steyn AJ, Karim F, Dullabh KJ, Awala I, Madansein R, i sur. Differential skewing of donor-unrestricted and  $\gamma\delta$  T cell repertoires in tuberculosis-infected human lungs. *J Clin Invest.* 2020;130(1):214-30.



## 11. ŽIVOTOPIS

### OPĆI PODATCI

Marina Marković, studentica 2. godine diplomskog sveučilišnog studija medicinsko laboratorijska dijagnostika

Datum i mjesto rođenja: 25. studenoga 2000., Maoča, Bosna i Hercegovina

Adresa: Tina Ujevića 13, 76100 Brčko, Bosna i Hercegovina

Mobitel: +385 955137149

E-pošta: marina.markovic0280@gmail.com

### OBRAZOVANJE

2006. – 2011. Osnovna škola „Špionica“, Tuzlanska županija, BiH

2011. – 2015. Deseta osnovna škola Bijela, Brčko distrikt, BiH

2015. – 2019. Poljoprivredna i medicinska škola Brčko distrikta BiH, smjer medicinski tehničar

2019. – 2022. Medicinski fakultet Osijek, Sveučilišni prijediplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

2022. – 2024. Medicinski fakultet Osijek, Sveučilišni diplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika