

Analiza raznolikosti beta lanca T staničnih receptora u TCRV alfa 7.2 + MR1+ MAIT stanicama oboljelih od vulgarne psorijaze primjenom RNASeq metode

Grgić, Zvonimir

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:152:127163>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

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



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

Zvonimir Grgić

**ANALIZA RAZNOLIKOSTI BETA
LANCA T STANIČNIH RECEPTORA U
TCRV ALFA 7.2+ MR1+ MAIT
STANICAMA OBOLJELIH OD
VULGARNE PSORIJAZE PRIMJENOM
RNASEQ METODE**

Diplomski rad

Osijek, 2022.

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

Zvonimir Grgić

**ANALIZA RAZNOLIKOSTI BETA
LANCA T STANIČNIH RECEPTORA U
TCRV ALFA 7.2+ MR1+ MAIT
STANICAMA OBOLJELIH OD
VULGARNE PSORIJAZE PRIMJENOM
RNASEQ METODE**

Diplomski rad

Osijek, 2022.

Rad je ostvaren u okviru HRZZ projekta UIP-2019-04-3494 i projekta IP15-2020-MEFOS naslova „NGS analiza transkriptoma MAIT i $\gamma\delta$ T limfocita: fenotip, funkcija i raznolikost TCR klonova u podlozi razvoja vulgarne psorijaze“. Svi eksperimenti učinjeni su u Laboratoriju za analizu DNA pri Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i laboratorijsku medicinu Medicinskog fakulteta u Osijeku.

Mentor rada: doc. dr. sc. Stana Tokić.

Neposredni voditelj: Maja Jirouš, mag. med. lab. diag.

Rad ima 44 lista, 10 tablica i 6 slika.

Veliku zahvalnost dugujem mentorici doc. dr. sc. Stani Tokić na prihvaćanju mentorstva te što je svojim velikim znanjem, uložnim vremenom i nesebičnom pomoći pridonijela izradi diplomskog rada.

Zahvaljujem Maji Jirouš, mag. med. lab. diag. na ogromnoj pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela kao i kod pisanja diplomskog rada.

Zahvaljujem svojim prijateljima koji su bili uz mene, što su mi uljepšali studentske dane te na podršci tijekom cjelokupnog studiranja.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji koji su vjerovali u mene od početka, što su bili potpora na svakom koraku te bez kojih ništa ne bi bilo moguće.

Sadržaj:

| | |
|---|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Vulgarna psorijaza | 1 |
| 1.2. Etiologija | 2 |
| 1.2.1. Genetski čimbenici | 2 |
| 1.2.2. Okolišni čimbenici..... | 3 |
| 1.3. Patogeneza | 4 |
| 1.3.1. Konvencionalni limfociti T | 5 |
| 1.3.2. Nekonvencionalni limfociti T | 5 |
| 1.3.3. Struktura i sinteza T staničnih receptora..... | 7 |
| 1.3.4. Karakteristike T staničnog receptora MAIT stanica..... | 9 |
| 2. HIPOTEZA | 11 |
| 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA..... | 12 |
| 4. MATERIJALI I METODE | 13 |
| 4.1. Ustroj studije..... | 13 |
| 4.2. Materijali | 13 |
| 4.2.1. Ispitanici..... | 13 |
| 4.2.2. Upotrijebljene kemikalije..... | 14 |
| 4.3. Metode..... | 14 |
| 4.3.1. Kvantifikacija i dilucija RNA iz perifernih MAIT stanica | 14 |
| 4.3.2. Priprema NGS knjižnice | 15 |
| 5. REZULTATI..... | 25 |
| 5.1. Deskriptivna analiza demografskih i kliničkih obilježja ispitanika | 25 |
| 5.2. Pregled kvantitativnih parametara kontrole kvalitete sekvenciranih i mapiranih klonskih varijanti | 26 |
| 5.3. Kvantitativna analiza raznolikosti TCR β repertoara TCRV α 7.2+ MR1+ stanica | 26 |
| 5.4. Distribucija TRBV i TRBJ gena u β -TCR repertoaru TCRV α 7.2+ MR1+ stanica zdravih i oboljelih ispitanika..... | 27 |
| 5.5. Diferencijalna uporaba TRBV gena u sastavu TCR β klonova MAIT stanica PV ispitanika | 30 |
| 5.6. Brojnost i aminokiselinski sastav javnih β -TCR klonotipova MR1+TCRV α 7.2+MAIT stanica zdravih i oboljelih ispitanika..... | 32 |

| | |
|----------------------|----|
| 6. RASPRAVA | 34 |
| 7. ZAKLJUČAK | 37 |
| 8. SAŽETAK | 38 |
| 9. SUMMARY | 39 |
| 10. LITERATURA | 40 |
| 11. ŽIVOTOPIS | 44 |

POPIS KRATICA

- AMP (engl. *Antimicrobial peptide*) - antimikrobni peptid
- APC (engl. *Antigen presenting cell*) - antigen prezentirajuća stanica
- BMI (engl. *Body mass index*) - indeks tjelesne mase
- BSA (engl. *Body surface area*) - skala zahvaćenosti površine tijela psorijazom
- CARD14 (engl. *Caspase recruitment domain family, member 14*) - kaspaza-regrutirajuća domena
- CCL (engl. *C-C motif chemokine ligand*) - kemokinski ligand
- CD (engl. *Cluster of differentiation*) - klaster diferencijacije
- CDR (engl. *Complementary determining region*) - regija koja određuje komplementarnost
- CMV (engl. *Cytomegalovirus*) - citomegalovirus
- CRP (engl. *C-reactive protein*) - C-reaktivni protein
- CXCL (engl. *C-X-C motif chemokine ligand*) - kemokinski CXC ligand
- DC (engl. *Dendritic cell*) - dendritička stanica
- DLQI (engl. *Dermatology life quality index*) - indeks kvalitete života
- DNA (engl. *Deoxyribonucleic acid*) - deoksiribonukleinska kiselina
- EDC (engl. *Epidermal differentiation complex*) - epidermalni diferencijacijski kompleks
- HBsAg (engl. *Hepatitis B surface antigen*) - hepatitis B površinski antigen
- HDL (engl. *High density lipoprotein*) - lipoprotein visoke gustoće
- HIV (engl. *Human immunodeficiency virus*) - virus humane imunodeficijencije
- HLA (engl. *Human leukocyte antigen*) - humani leukocitni antigen
- IFN (engl. *Interferon*) - interferon
- IgG (engl. *Immunoglobulin G*) - imunoglobulin G
- IL (engl. *Interleukin*) - interleukin
- iNKT (engl. *Invariant natural killer T cells*) - invarijantne prirodene stanice ubojice
- LCE (engl. *Late cornified envelope*) - kasni rožnati omotač
- LDL (engl. *Low density lipoprotein*) - lipoprotein niske gustoće
- MAIT (engl. *Mucosal associated invariant T*) - sluznicama pridružene invarijantne T stanice
- MHC (engl. *Major histocompatibility complex*) - molekula glavnog sustava tkivne snošljivosti
- MR1 (engl. *MHC-related protein 1*) - protein srodan MHC klasi
- NF-κB (engl. *Nuclear factor kappa B*) - nuklearni faktor κB
- PASI (engl. *Psoriasis area and severity index*) - indeks proširenosti i težine psorijaze

PSORS (engl. *Psoriasis susceptibility*) - genski lokus osjetljiv na psorijazu

PV (engl. *Vulgar psoriasis*) - vulgarna psorijaza

RNA (engl. *Ribonucleic acid*) - ribonukleinska kiselina

STAT4 (engl. *Signal transducer and activator of transcription 4*) - aktivator transkripcije i prijenosa signala

Tc (engl. *T cytotoxic cell*) - citotoksična stanica

TCR (engl. *T cell receptor*) - T-stanični receptor

TGF- β (engl. *Transforming growth factor beta*) - transformirajući čimbenik rasta beta

Th (engl. *T helper cell*) - pomagačka stanica

TLR (engl. *Toll-like receptors*) - receptori slični Tollu

TNF- α (engl. *Tumor necrosis factor alpha*) - tumor nekrotizirajući faktor alfa

1. UVOD

1.1. Vulgarna psorijaza

Psorijaza je kronična, autoimuna bolest kože s jakom genskom podlogom, koja pogađa preko 125 milijuna odraslih i djece diljem svijeta. Prepoznata je kao bolest koja znatno utječe na kvalitetu života i emocionalno stanje bolesnika. Bez kvalitetne terapije, remisija bolesti je vrlo rijetka, a s progresijom bolesti razvijaju se štetni komorbiditeti poput reumatoidnog artritisa, pretilosti, dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti, različitih metaboličkih sindroma i depresije, zbog čega se psorijaza smatra kompleksnom multisistemskom bolesti (1, 2).

Najčešći tip, vulgarnu psorijazu, karakteriziraju eritematozni plakovi jasnih granica sa srebrnastim ljuskama. Na zahvaćenom području javlja se neugodan osjećaj svrbeža čijim grebanjem dolazi do krvarenja, prepoznato kao Auspitzov znak. Lezije se pojavljuju na vlasištu, koljenima, laktovima te na lumbosakralnom području, i na tim mjestima mogu perzistirati mjesecima ili godinama (3). Pojava lezija na nekim područjima se može izazvati traumom što se karakterizira kao Koebnerov fenomen.

S obzirom na vidljive kliničke znakove, dijagnoza ove bolesti inicijalno se utvrđuje kliničkim pregledom, a potvrđuje histopatološkom analizom bioptata zahvaćene kože (4). Težina bolesti određuje se pomoću indeksa proširenosti i težine psorijaze (od engl. *Psoriasis Area and Severity Index – PASI*), skale zahvaćenosti površine tijela psorijazom (od engl. *Body Surface Area – BSA*) te indeksa kvalitete života (od engl. *Dermatological Quality of Life Indeks – DLQI*). Prije odabira i primjene topičke ili sustavne terapije potrebno je odrediti težinu bolesti, koja se tijekom liječenja prati radi kontrole uspješnosti terapije. Cilj liječenja je poboljšanje kliničke slike i poboljšanje kvalitete života (3). Psorijatične lezije u većini slučajeva nestaju primjenom adekvatne terapije, međutim često se vraćaju na istim područjima prekidom terapije (5).

Psorijatične lezije histološki pokazuju proširenje epidermisa (akantozu) zbog značajnog povećanja broja nediferenciranih keratinocita. Zadržavanje jezgri keratinocita u vanjskom sloju kože dovodi do fenomena parakeratoze. Povećan je broj dermalnih endotelnih stanica odgovornih za crvenilo, a u dermisu i epidermisu prisutan je upalni infiltrat koji čine neutrofilni, dendritičke stanice (DC), T stanice i ostale stanice imunosnog sustava. Udomljavanje i proliferaciju imunskih stanica u koži potiču aktivirani keratinociti lučenjem proupalnih citokina. Međusobnom interakcijom imunskih stanica i keratinocita dolazi do nekontroliranog razvoja upale (2, 6).

1.2. Etiologija

Razlog nastanka psorijaze kao i čimbenici koji doprinose pogoršanju simptoma i ukupnog stanja oboljelih još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Pretpostavka je da međudjelovanje rizičnih genetskih i okolišnih čimbenika vodi ka upali koja posreduje razvoj bolesti (3).

Veliku ulogu genske podloge potvrđuju obiteljske studije i studije blizanaca. Prema istraživanju obiteljskih studija, potomci dvaju bolesnih roditelja imaju 50 % šanse za razvoj psorijaze, dok se taj rizik smanjuje na 16 % ukoliko je zahvaćen samo jedan roditelj. Smatra se da 1/3 pacijenata ima krvno srodstvo s osobom oboljelom od psorijaze. Studije blizanaca potvrđuju veću učestalost oboljenja u monozigotnih blizanaca (70 %), dok je u dizigotnih potomaka pojava oboljenja znatno rjeđa (20 %). Na važnost rizičnih genetskih čimbenika ukazuju sličnosti u težini simptoma, području zahvaćenosti te pojavnosti i tijeku oboljenja u monozigotnih blizanaca (7).

1.2.1. Genetski čimbenici

Danas je prepoznata povezanost psorijaze s nekolicinom ključnih genskih lokusa, koji su radi svojeg značaja u razvoju oboljenja objedinjeni pod kraticom PSORS (od engl. *psoriasis susceptibility*), i označeni brojevima 1-9. Među njima, najistaknutiju ulogu u razvoju psorijaze čine genske sastavnice PSORS1 lokusa, smještenog na kratkom kraku kromosoma 6 (6p21.3) (8). U toj kromosomskoj regiji nalazi se glavni kompleks gena tkivne podudarnosti (MHC, od engl. *Major Histocompatibility Complex*), među kojima antigenska varijanta HLA-Cw6 čini glavnu gensku determinantu psorijaze (2). Genske inačice HLA-C lokusa kodiraju različite varijante MHC receptora klase I (MHC-I), ključne u obrani domaćina od unutarstaničnih patogena. Ove receptorske molekule izražavaju sve stanice s jezgrom, uključujući i različite vrste adaptivnih i prirođenih limfocita T, koji posreduju brojne upalne reakcije u psorijatičnoj koži (9). Nositelji jedne alelne varijante HLA-Cw*0602 gena imaju 10 puta veći rizik za razvoj psorijaze, a rizik se udvostručuje u homozigotnih nositelja (10).

Genski lokus PSORS2 na kromosomu 17 (17q25.3) nosi gen *CARD14* (od engl. *Caspase recruitment domain family member 14*) koji sudjeluje u signalnom putu nuklearnog faktora κB

(NF- κ B, od engl. *Nuclear factor kappa B*). Mutacijom tog gena dolazi do povećane aktivnosti NF- κ B i posljedično povećane ekspresije ključnih upalnih molekula koje doprinose upalnim procesima u psorijazi. Povećanju rizika razvoja psorijaze doprinosi i delecija u *EDC* (od engl. *Epidermal Differentiation Cluster*) genu na lokusu PSORS4 smještenom na kromosomu 1 (1q21). Pripadnici EDC genske obitelji kodiraju LCE (od engl. *Late cornified envelope*) proteine rožnatog sloja kože, koji sudjeluju u terminalnoj epidermalnoj diferencijaciji, a u mutiranom obliku potencijalno doprinose smanjenoj funkciji kožne barijere (9, 11, 12).

Osim navedenih genskih lokusa, razvoju psorijaze pridonose i mutirane varijante gena *IL36RN*. Ovaj gen kodira antagonista receptora interleukina 36 (IL-36RA), čiji agonisti sudjeluju u aktivaciji transkripcijskog čimbenika NF- κ B. Mutacija pospješuje trajnu aktivaciju signalnog puta koji doprinosi aktivaciji i akumulaciji neutrofila u bolesnikovu kožu (2).

Ostali rizični genski lokusi koji pripadaju PSORS-u skupini povezani su s patogenezom psorijaze, no njihova točna uloga još uvijek je nedovoljno razjašnjena (2, 9).

1.2.2. Okolišni čimbenici

Uz genetsku predispoziciju, specifični okolišni okidači i životne navike povezuju se s razvojem psorijaze. Najčešće opisivani okolišni čimbenici su različiti mikroorganizmi, infekcije, fizičke traume, pretilost, lijekovi, stres, pušenje i alkohol (13).

Brojni patogeni organizmi prepoznati su u ulozi okidača upale koja obilježava početak razvoja psorijaze. Jedan od njih je *Streptococcus pyogenes* koji često uzrokuje pogoršanje simptoma u oboljelih. Osim što se često pojavljuje uz streptokoknu upalu grla, psorijaza se javlja i u pratnji vulvovaginitisa te perianalne streptokokne infekcije. Mogući uzrok povezanosti psorijaze sa streptokoknom infekcijom leži u križnoj reaktivnosti streptokoknog M površinskog proteina i keratinocita čime potencijalno započinje abnormalni imunosni odgovor (14).

Povećana prevalencija psorijaze je osim u uvjetima streptokokne upale, zabilježena i kod pacijenata pozitivnih na humani imunodeficijenti virus (HIV). Učinci HIV infekcije koji pospješuju simptome u oboljelih od psorijaze vezani su uz gubitak regulatorne loze CD4+ pomoćničkih limfocita T, što potencijalno pospješuje ekspanziju CD8+ memorijskih T-stanica, i pogoršanje simptoma psorijaze (15). Ostali mikroorganizmi vezani uz inicijaciju psorijaze uključuju *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori* te *Candidu* i retroviruse, između ostalih (14).

Osim mikrobnih okidača, mehanička trauma kože često se opisuje u etiopatogenezi psorijatičnih lezija. Najčešća mehanička oštećenja u pozadini psorijaze uključuju tetovaže, opekotine, ugrize insekata, akupunkturu iglom ili svrbež (2).

Pretilost je sljedeći značajan rizični čimbenik za razvoj psorijaze. Adipozno tkivo služi kao skladište energije, ali ono ima i ulogu u izlučivanju leptina i rezistina, pronađenih u visokim koncentracijama kod bolesnika s psorijazom (2). Kod pretilih pacijenata s psorijazom, pojačano lučenje leptina, rezistina i citokina iz adipoznog tkiva potiče razvoj upalnog stanja (16). Zbog toga se u liječenju psorijaze ističe važnost adekvatne nutritivne skrbi, s naglaskom na gubitak težine i smanjenje rizika oboljenja od kardiovaskularnih komorbiditeta koji često pogađaju pretilu psorijatične bolesnike (17).

Zbog čestog izlaganja lijekovima za liječenje hipertenzije ili kardiovaskularnih oboljenja, u oboljelih od psorijaze moguće su višestruke nuspojave i pogoršanje simptoma koji se ublažavaju prestankom terapije. Pojedini lijekovi mogu potaknuti i stvaranje novih lezija kod pacijenata s psorijazom (18). Lijekovi koji potvrđeno djeluju kontraproduktivno su litij, antimalarici, tetraciklini, beta-blokatori i različiti imunomodulatori (2).

Stres je česta pojava kod bolesnika koji zbog straha od stigmatizacije ili recidiva nakon prestanka terapije, razvijaju težu kliničku sliku psorijaze (13). Istraživanja su pokazala da u 26-88 % slučajeva oboljeli pacijenti pate od stresa uzrokovanog psorijazom. Također, stresni događaji utječu na nastup simptoma.

Pušenje i konzumacija alkohola također su ubrajaju u skupinu rizičnih čimbenika za pojavu i pogoršanje psorijaze. Povećanjem oksidativnog stresa i smanjenjem antioksidativnog kapaciteta dolazi do endotelne disfunkcije. Nikotin povećava lučenje citokina sa značajnom ulogom u patogenezi psorijaze, poput IL-12, IL-2 i tumor nekrotizirajućeg faktora (TNF)- α (13). Pretpostavlja se da alkohol povećanom proizvodnjom transformirajućeg čimbenika rasta beta (TGF- β), IL-6 i interferona alfa (IFN- α) aktivira limfocite T i inducira hiperproliferaciju keratinocita (2).

1.3. Patogeneza

Patogenetski mehanizam psorijaze još uvijek nije do kraja razjašnjen, ali brojna istraživanja ukazuju na poremećenu homeostazu brojnih stanica unutar kože (keratinociti, endotelne stanice), stanica urođenog i stečenog imunskog odgovora, što dovodi do pojave trajne upale i bolesti.

Proces počinje kod osoba s genetskom predispozicijom pri susretu s jednim od mnogih potencijalnih okolišnih okidača koji će potaknuti keratinocite na lučenje antimikrobnih peptida (AMP, od engl. *Antimicrobial peptides*) LL-37, defenzina i S100 protein. LL-37 u kompleksu s DNA preko Tollu-sličnih receptora (TLR) aktiviraju mijeloidne i plazmacitoidne DC koji posljedično otpuštaju TNF- α , IL-23, IL-12 te IFN- α . Aktivirane DC cirkuliraju u limfne čvorove gdje prezentiraju antigene u kompleksu s MHC receptorom naivnim limfocitima T. U ovisnosti o vrsti citokinskog podražaja i transkripcijskih faktora potiču diferencijaciju različitih subpopulacija limfocita (8). IFN- α je u psorijatičnim lezijama prisutan u povišenim koncentracijama (19). Keratinociti lučenjem kemokina CCL20 i CXCL8 privlače neutrofile te regrutiraju periferne limfocitne linije koji će sudjelovati u stvaranju upalnog stanja u koži. Kada subpopulacije limfocita T počnu lučiti citokine poput TNF- α , IL-17 i IL-23 pozitivnom povratnom spregom ponovno aktiviraju keratinocite stvarajući začarani krug (20). U stvaranju upalnog infiltrata osim konvencionalnih limfocita (CD4+, CD8+ limfociti T) djeluju i nekonvencionalne urođene stanične linije (gama-delta($\gamma\delta$) T, invarijantne prirodene stanice ubojice (iNKT) i sluznicama pridružene invarijantne T stanice (MAIT)) (21).

1.3.1. Konvencionalni limfociti T

Konvencionalni limfociti djeluju u sklopu stečenog imunskog odgovora te izražavaju T-stanične receptore (TCR) s heterodimernim $\alpha\beta$ lancima, pomoću kojih prepoznaju i vežu antigen-MHC kompleks na površini APC. Uz $\alpha\beta$ TCR kompleks, koreceptorske molekule služe za klasifikaciju CD4+ pomoćničkih (Th, od engl. *T helper*), i CD8+ citotoksičnih (Tc, od engl. *T cytotoxic*) limfocita T (21).

1.3.2. Nekonvencionalni limfociti T

U novije vrijeme veći broj istraživanja ukazuje na ulogu nekonvencionalnih limfocita T u psorijazi. Nekonvencionalne T stanice imaju karakteristike prirodnog i stečenog imunskog sustava. Odlike stanica prirodnog imunskog sustava podrazumijevaju brz, TCR neovisan i lokaliziran odgovor na brojne, često nepeptidne antigene, dok je stečeni imunski odgovor uvjetovan interakcijom između T staničnog receptora i peptidnih antigena. U skupinu prirodnih limfocitnih vrsta ubrajamo urođene limfoidne stanice, gama-delta($\gamma\delta$) T limfocite, iNKT i MAIT stanice (21).

1.3.2.1. Sluznicama pridružene invarijantne T stanice (MAIT stanice)

MAIT stanice čine 1-10 % populacije cirkulirajućih T-stanica, a najzastupljenije su u sluznici crijeva i jetri. U jetri one čine čak 45 % limfocita T (22). Kao i ostali nekonvencionalni limfociti T, MAIT stanice dijele karakteristike urođenog i stečenog imunskog odgovora. U usporedbi s $\gamma\delta$ i iNKT stanicama, frekvencija MAIT stanica u perifernoj krvi manja je od frekvencije $\gamma\delta$ T stanica, ali značajno veća u odnosu na brojnost iNKT (23). MAIT stanice izražavaju semi-invarijantni TCRV α 7.2V β receptor, koji prepoznaje nepeptidne produkte bakterijskog metabolizma riboflavina u kompleksu s MR1 (od engl. *MHC-related protein 1*) prezentirajućim molekulama. Dodatni aktivacijski signal osigurava vezanje IL-12 ili CD28 koreceptora s pripadajućim agonistima (24). Aktivacija MAIT stanica moguća je i na TCR-neovisan način, u prisutnosti citokina IL-12 i IL-18 (25). Novija istraživanja također potvrđuju reaktivnost MAIT stanica sa superantigenima bakterijskih vrsta *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus pyogenes* (26). Aktivirane MAIT stanice luče proupalne citokine IL-17, IFN- γ , TNF- α , te proteolitičke enzime granzim B i perforin čime pokazuju svoja citotoksična svojstva (27). Osim navedenih citotoksičnih biljega, MAIT stanice pokazuju i obilježja svojstvena drugim prirođenim limfocitnim linijama, poput ekspresije C-tip lektina CD161 i receptora IL-18R α (22), pri čemu većinom izražavaju CD8+ α ili dvostruko negativni CD4-CD8- koreceptorski profil (28).

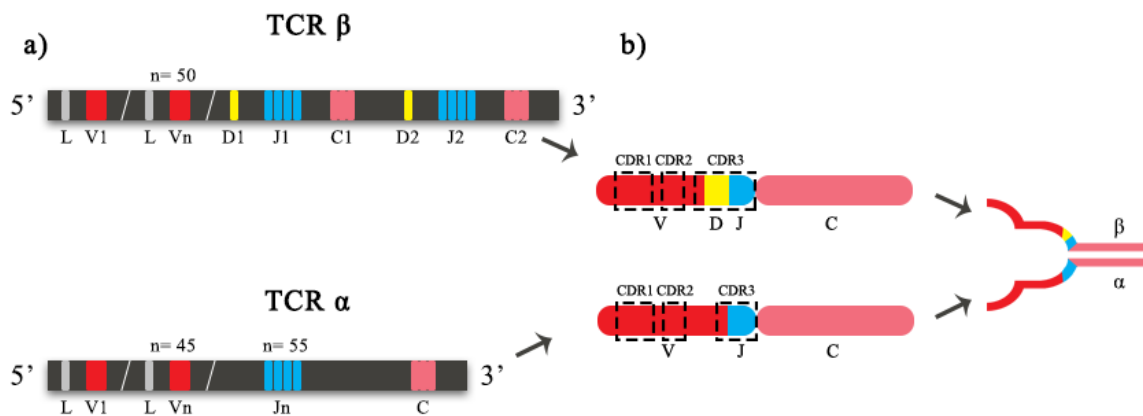
Dosadašnja istraživanja MAIT stanica u psorijazi, govore u prilog potencijalno važne uloge CD8+CD161^{hi}TCRV α 7.2+IL-18R α +IL-17+ staničnih vrsta, koje dijelom obuhvaćaju izvorni odjeljak MR1tet+TCRV α 7.2+ MAIT limfocita. MR1 tetramer se smatra specifičnim markerom MAIT stanica, za razliku od dosadašnjih surogat markera poput CD161. U sklopu tetramera se nalazi antigen kojeg prepoznaju MAIT stanice (29). Štoviše, nedavno je u perifernoj krvi oboljelih od psorijaze uočeno značajno smanjenje kanoničkih CD4+CD8+MR1-tet+TCRV α 7.2+ i CD4+MR1-tet+TCRV α 7.2+ MAIT populacija, potencijalno kao posljedica njihove redistribucije u pogođene dijelove kože (30). Zanimljivo, aktivirane CD8+CD161+TCRV α 7.2+ stanice, zabilježene u dermisu i epidermisu psorijatičnih lezija, dominiraju unutar razreda humanih, krvnih CD8+IL-17+ stanica (22), te čine glavninu MR1tet+MAIT populacija, čija se uloga u nastanku psorijatičnih lezija, međutim još uvijek istražuje (31).

1.3.3. Struktura i sinteza T staničnih receptora

Stanični receptor limfocita T (TCR) služi za prepoznavanje antigena u kompleksu s MHC prezentirajućim molekulama. Uz MHC-antigen kompleks, u aktivaciji limfocita T sudjeluje molekula CD3 kompleksa, ζ molekula te CD4 ili CD8 koreceptorske molekule. Osim prvog aktivacijskog signala koji nastaje interakcijom T staničnog receptora s antigen-MHC kompleksom, za aktivaciju limfocita potreban je i kostimulacijski signal koji nastaje vezanjem CD28 i CD40L kostimulacijskih molekula s pripadajućim ligandima (B7 i CD40) na površini antigen prezentirajuće stanice (APC). Treći signal, koji ujedno usmjerava diferencijaciju aktivirane limfocitne jedinice, pružaju upalni citokini vezanjem za pripadajuće citokinske receptore (32).

T stanični receptor sastoji se od $\alpha\beta$ ili $\gamma\delta$ heterodimernih glikoproteinskih lanaca čije su varijabilne i konstantne polipeptidne domene kodirane nekolicinom konstantnih (C) i velikim brojem varijabilnih (V), raznolikih (D) i spojnih (J) genskih segmenata, smještenih unutar lokusa TRA (14q11.2), TRB (7q34), TRG (7p14) i TRD (14q11.2) (**Slika 1.a**). Sintaza varijabilne polipeptidne domene T staničnog receptora podrazumijeva nasumično spajanje (somatsku rekombinaciju) VDJ genskih segmenata, pri čemu alfa i gama lanac nastaju rekombinacijom gena V (49 TRAV+5 TRAV/TRDV za α -lanac, 12-15 za γ -lanac) i J (61 za α -lanac, 5 za γ -lanac), dok se beta i delta lanci generiraju preslagivanjem gena V (66 za β -lanac, 3 TRDV+5 TRAV/TRDV za δ -lanac), D (2 za β -lanac, 3 za δ -lanac) i J (14 za β lanac, 4 za δ -lanac) (33). Konstantne polipeptidne regije alfa i delta lanaca kodirane su jednim (TRAC ili TRDC), a beta i gama lanaca s jednim od dva C gena prisutna unutar TRB i TRG lokusa.

U okviru varijabilnih domena α -, β -, γ - i δ -polipeptidnih lanaca nalaze se komplementarne CDR regije (od engl. *Complementary Determining Region*) odgovorne za prepoznavanje antigena. CDR1 i CDR2 domene kodirane su germinativnim varijantama V gena, smještenim iza liderske sekvence na 5' kraju polipeptidnih lanaca, dok se najvažnije promjene događaju unutar CDR3 regije koja obuhvaća V(D)J spojnicu (**Slika 1.b**). Učestala stopa rekombinacije V(D)J gena doprinosi nastanku raznolikog repertoara CDR3 sekvenci (potencijalno $\approx 10^{16} - 10^{18}$ varijanti) koji služi za prepoznavanje jednako velikog broja različitih antigena (43).



Slika 1. **a)** Genski lokusi za TCR α i β sadrže kodirajuće segmente (egzone), međusobno odvojene segmentima koji se ne ekspimiraju (introni). V- varijabilni segmenti; C-konstantni segmenti; D-segmenti raznolikosti; J- spojni segmenti; L- vodeća sekvenca. **b)** Varijabilna (V) i konstantna (C)-domena svakog polipeptidnog lanca kodirane su različitim genskim segmentima čijom rekombinacijom nastaju CDR3 regije. Slika (autorski rad) je napravljena računalnim programom Adobe Photoshop (Adobe Photoshop CC 2015, San Jose, Kalifornija, SAD)

Tijekom procesa razvoja limfocita T somatskom rekombinacijom genskih segmenata varijabilne domene nastaju različiti antigenski receptori.

Somatska rekombinacija genskih segmenata koji kodiraju TCR lance započinje nasumičnim spajanjem jednog D i J gena, a fuzionirani DJ produkt spaja se s jednim V genskim segmentom. Tijekom fuzije VDJ gena uvode se dvolančani prekidi na krajevima genskih segmenata, nukleotide se dodaju ili uklanjaju na slomljenim krajevima, i konačno se obrađeni krajevi povezuju kako bi se proizvele različite kombinacije V(D)J egzona. Regije C gena leže nizvodno od preuređenog V(D)J egzona i prepisuju se u primarni RNA transkript, koji se u nastavku preuređuje izrezivanjem nekodirajućih regija (od engl. *RNA splicing*) pri čemu nastaje zreli transkript sastavljen od vodeće egzonske sekvence, V(D)J i C egzona. Translacijom dobivene mRNA stvara se odgovarajući TCR lanac. Upotreba različitih kombinacija V, D i J genskih segmenta te dodavanje i uklanjanje nukleotida na spojevima doprinose ogromnoj raznolikosti antigenskih receptora (35). Uklanjanje ili dodavanje nukleotida djelovanjem egzonukleaza ili enzima deoksiribonukleotidil transferaze (TdT) uvelike povećava raznolikost CDR3 repertoara. Kao rezultat ovih djelovanja ukupan broj potencijalnih TCR varijanti prelazi 10^{16} (35).

Iako se smatra da se VDJ geni rekombiniraju nasumično, neki se klonotipovi stvaraju češće od drugih čineći populaciju javnih klonotipova – jednaki klonotipovi dijeljeni među populacijom (36).

1.3.4. Karakteristike T staničnog receptora MAIT stanica

Ključna značajka MAIT stanica jest polu-invarijantni TCRV α 7.2 receptor koji prepoznaje antigene u sklopu MR1 molekule. Struktura invarijantnog α -lanca najčešće je kodirana kombinacijom gena TRAV1-2 i TRAJ33, TRAJ20 ili TRAJ12 (37). Invarijantni α -lanac udružen je s β -lancem, koji najčešće kodiraju varijante gena TRBV20 i TRBV6, i pridruženi članovi obitelji gena TRBJ1 ili TRBJ2. Osim navedenih TRBV gena, u sastavu β TCR repertoara MAIT stanica, često se pojavljuje i TRBV4 (28). Obzirom na invarijantnu prirodu α -lanca TCRV α 7.2 receptora, raznolikost pridruženih beta lanaca MAIT stanica uvelike oblikuje njihov kapacitet prepoznavanja i vezanja različitih antigena (38), čineći β TCR repertoar atraktivnom metom u istraživanju čimbenika koji upravljaju razvojem MAIT stanica.

Sekvenciranje RNA (RNASeq) je metoda izbora za analizu raznolikosti TCR repertoara koja omogućava uvid u trenutni transkriptomski profil sortiranih limfocitnih vrsta (39). Prikupljeni podaci pružaju mogućnost analize duljine, raznolikosti i aminokiselinskog sastava CDR3 regija, stvarajući uvjete za usporedbu i identifikaciju razlika u TCR repertoaru zdravih i oboljelih ispitanika (40).

Dosadašnje studije TCR β repertoara u MAIT stanicama zdravih ljudi zabilježile su velik broj jedinstvenih klonotipova ograničene duljine CDR3 regije. Među njima, 5 % klonotipova čini čak 80 % ukupnog MAIT TCR β repertoara ukazujući na važan utjecaj krvnih mikrobnih antigena na mehanizme u kontroli rekombinacije TRB gena u zdravih osoba. Osim u perifernoj krvi, oligoklonalnost MAIT TCR β repertoara uočena je i u zdravoj jetri (38). Suprotno, u psorijatičnoj koži, uočen je povećani broj jedinstvenih varijanti beta TCR lanaca u odnosu na zdravu i nelezijsku kožu (41). Najučestalije TCR β klonalne varijante u lezijama bile su prisutne i u nepogođenim dijelovima kože oboljelih, sugerirajući generalnu ekspanziju MAIT TCR β repertoara u psorijazi (41).

Međutim, analiza ukupnih T limfocitnih populacija u psorijatičnim lezijama, otkrila je oligoklonalne populacije $\alpha\beta$ TCR β stanica koje proizvode IL-17. U patogenim IL-17+ klonovima, otkrivena je preferencijalna upotreba specifičnih TRBV (TRBV3-1, TRBV5-1) i

TRAV (TRAV20, TRAV30, TRAV41) genskih segmenata, a identificirano je i 15 TCR β , te 4 TCR α sekvence, dijeljene unutar ukupnog TCR repertoara oboljelih, ali ne i zdravih ispitanika (5).

Za razliku od opisanih specifičnosti TCR β repertoara u psorijatičnim lezijama (5, 41) i perifernim mononuklearnim stanicama oboljelih (42), raznolikost β -lanaca sortiranih linija TCRV α 7.2+MR1+ MAIT stanica u perifernoj krvi oboljelih još uvijek je nerazjašnjena. Povezanost TCR β varijanti MAIT stanica s težinom i obilježjima vulgarne psorijaze također je nepoznanica. U okviru ovog istraživanja primjenom RNASeq metode planirano je istražiti oboje.

2. HIPOTEZA

Klonalni repertoar TCR β lanaca TCRV α 7.2+MR1+MAIT limfocita različit je u zdravih ispitanika i oboljelih od vulgarne psorijaze te su promjene u klonalnom repertoaru povezane s obilježjima i težinom oboljenja.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Istražiti i usporediti repertoar β -TCR klonotipova perifernih TCRV α 7.2+MR1+ MAIT stanica zdravih i oboljelih ispitanika
2. Identificirati oligoklonalne varijante β -TCR receptora TCRV α 7.2+ MR1+ MAIT stanica i utvrditi njihovu povezanost s težinom i obilježjima bolesti.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

Istraživanje je provedeno kao case-control studija (istraživanje parova) (43).

4.2. Materijali

4.2.1. Ispitanici

U svrhu istraživanja prikupljeno je 20 uzoraka periferne krvi, od kojih 10 zdravih (CTRL) i 10 oboljelih (PV) punoljetnih osoba. Probir oboljelih i kontrolnih ispitanika te prikupljanje, sortiranje i imunofenotipizacija MAIT limfocita u njihovim uzorcima odobreni su odlukom Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek (Potvrda br. 2158-61-07-19-126, 11.10.2019.) i Kliničkog bolničkog centra Osijek (Potvrda br. R2-12487/2019, 12.09.2019.). Prikupljanje i obrada uzoraka provedeni su u okviru HRZZ projekta UIP-2019-04-3494.

Probir zdravih kontrola i oboljelih ispitanika izvršen je nasumičnim redosljedom pregleda u okviru standardne dijagnostičke obrade na Zavodu za dermatologiju i venerologiju KBC Osijek. Oboljeli ispitanici izabrani su na temelju klinički i histološki potvrđene dijagnoze vulgarne psorijaze, a težina bolesti određena je pomoću skale PASI i DLQI. Pacijenti koji su unutar 6 tjedana prije dijagnostičke obrade bili na sustavnoj biološkoj, citostatskoj, fotokemoterapiji (psoralen, UVA zračenje) ili fototerapiji (uskospektralno UVB zračenje) su isključeni iz istraživanja. Također, isključeni su bolesnici s pridruženim autoimunim, malignim i infektivnim oboljenjima ili dokumentiranom epizodom alergijske reakcije u navedenom periodu.

Kontrolna skupina sastavljena je od zdravih odraslih osoba, po dobi i spolu prilagođenih skupini oboljelih. Odabrani su tijekom redovite dermatološke skrbi benignih, neinfektivnih ili imunosno neutralnih promjena na koži, bez sustavne medikamentozne ili fototerapije, povijesti alergijskih, malignih ili autoimunih oboljenja.

Prilikom izuzimanja uzoraka krvi od svih ispitanika zabilježeni su osnovni identifikacijski i demografski podaci (ime, prezime i dob) i učinjena antropometrijska mjerenja (visina i težina ispitanika) s ciljem određivanja indeksa tjelesne mase (BMI, od engl. *body mass index*).

4.2.2. Upotrijebljene kemikalije

- Qubit™ RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
- AmpliSeq™ for Illumina® cDNA Synthesis Kit (Illumina, San Diego, Kalifornija, SAD)
- AmpliSeq™ for Illumina® Library PLUS Kit (96 reactions) (Illumina, San Diego, Kalifornija, SAD)
- AmpliSeq™ for Illumina® Immune Repertoire Plus, TCR beta panel (Illumina, San Diego, Kalifornija, SAD)
- AmpliSeq™ for Illumina® CD Indexes for Illumina Kit (Illumina, San Diego, Kalifornija, SAD)
- AmpliSeq™ for Illumina® cDNA Synthesis Kit (Illumina, San Diego, Kalifornija, SAD)
- Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, Pasadena, Kalifornija, SAD)
- Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)
- KAPA Library Quantification Kits for Illumina® platforms (Kapa Biosystems, Wilmington, Massachusetts, SAD)
- MiniSeq High Output Reagent Kit (Illumina, San Diego, Kalifornija, SAD)
- PhiX Control v3 (kontrola knjižnica, unutarnja kontrola sekvenciranja) (Illumina, San Diego, Kalifornija, SAD)
- Tris-HCl, pH 8.5
- Na-OH, molecular biology grade (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)

4.3. Metode

4.3.1. Kvantifikacija i dilucija RNA iz perifernih MAIT stanica

TCRV α 7.2+MR1+MAIT limfociti sortirani su iz uzoraka perifernih mononuklearnih stanica, nakon čega je iz tako sortiranih stanica slijedila izolacija ukupne RNA (30).

Analiza kvalitete i kvantifikacija RNA iz sortiranih linija perifernih TCRV α 7.2+MR1+ MAIT stanica oboljelih od psorijaze i zdravih ispitanika učinjena je upotrebom komercijalnog kita „Qubit™ RNA HS Assay Kit“ prema uputama proizvođača.

Postupak: 20 uzoraka i 2 standarda pripremljena su u Qubit™ Assay tubicama. Prvo je pripremljena radna otopina razrjeđenja 1:200 od Qubit™ RNA HS reagensa i Qubit™ RNA HS pufera. U svaku od 20 tubica dodano je 199 μ l radne otopine i 1 μ l RNA uzorka nakon čega je slijedilo kratko vorteksiranje te inkubacija na sobnoj temperaturi. Za pripremu standarda 1 i 2 pomiješano je 190 μ l radne otopine s 10 μ l otopine Qubit™ RNA HS Standarda 1, odnosno 10 μ l otopine Qubit™ RNA HS Standarda 2. Na Qubitu su prvo izmjerene vrijednosti fluorescencije oba standarda radi dobivanja standardne krivulje kalibracije, a nakon toga su određene i vrijednosti koncentracije RNA u uzorcima. Rezultati su izraženi u ng/ μ l. Za reakciju reverzne transkripcije uzeta je jednaka početna koncentracija svih uzoraka (10 ng RNA).

4.3.2. Priprema NGS knjižnice

4.3.2.1. Sinteza cDNA

Za pretvorbu ukupne RNA u cDNA reverznom transkripcijom korišten je komercijalni kit „AmpliSeq™ for Illumina® cDNA Synthesis Kit“ koji sadrži 2 tubice s reakcijskom smjesom (5X AmpliSeq cDNA Reaction Mix) i smjesom enzima (10X AmpliSeq RT Enzyme Mix).

Postupak: 5X AmpliSeq cDNA Reaction Mix i 10X AmpliSeq RT Enzyme Mix izvađeni su iz zamrzivača te odmrznuti na sobnoj temperaturi (Reaction Mix) i na ledu (Enzyme Mix). Na PCR ploču s 32 jažice dodavani su 1 μ l 5X AmpliSeq cDNA Reaction Mix, 0,5 μ l 10X AmpliSeq RT Enzyme Mix, 1 μ l ukupne RNA te 2,5 μ l Nuclease-free vode. Finalni reakcijski volumen u jednoj jažici bio je 5 μ l. Ploča je sigurnosno zatvorena koristeći MicroAmp Clear Adhesive Film folijom nakon čega je ploča vorteksirana te kratko centrifugirana. Ploča je postavljena u PCR uređaj i pokrenut je RT program za sintezu cDNA. RT program je postavljen na slijedeći način:

- Volumen: 5 μ l
- Zagrijavanje poklopca pred reakciju na 105 °C
- 42 °C na 30 minuta
- 85 °C na 5 minuta

4.3.2.2. Amplifikacija ciljnih regija

Korištenjem 5X AmpliSeq HiFi Mix iz komercijalnog kita „AmpliSeq™ for Illumina® Library PLUS Kit“ i 5X AmpliSeq Immune Repertoire panel iz kita „AmpliSeq™ for Illumina® Immune Repertoire Plus, TCR beta panel“ amplificirane su ciljne regije cDNA uzoraka.

Postupak: Prije početka postupka 5X AmpliSeq HiFi Mix je odmrznut na ledu, dok se 5X AmpliSeq Immune Repertoire panel odmrznuo na sobnoj temperaturi. Ploča iz prethodnog koraka je kratko centrifugirana i skinuta je folija. U svaku od jažica s 5 µl cDNA dodano je 4 µl 5X AmpliSeq HiFi Mix, 4 µl 5X AmpliSeq Immune Repertoire Panel reagensa te 7 µl Nuclease-free vode. Reakcijska smjesa je promiješana pipetiranjem, ponovno zatvorena folijom te kratko centrifugirana. Ploča je postavljena u PCR uređaj te je pokrenut AMP program za amplifikaciju ciljnih regija.

AMP program je postavljen na:

- Volumen: 20 µl
- Zagrijavanje poklopca pred reakciju na 105 °C
- 99 °C na 2 minute
- 20 ciklusa:
 - 99 °C na 15 sekundi
 - 60 °C na 4 minute

4.3.2.3. Digestija amplikona

U sljedećem koraku dodatkom FuPa reagensa razgrađeni su ostaci početnica, a dijelom i amplikoni.

Postupak: FuPa reagens je odmrznut i čuvan na ledu tijekom cijelog postupka. U svaku jažicu dodano je 2 µl FuPa reagensa nakon čega je ploča prekrivena folijom, kratko vorteksirana i centrifugirana. Ploča je postavljena u PCR uređaj te pokrenut FUPA program.

FUPA program je postavljen na:

- Volumen: 22 µl
- Zagrijavanje poklopca pred reakciju na 105 °C
- 50 °C na 10 minuta

- 55 °C na 10 minuta
- 62 °C na 20 minuta

4.3.2.4. Vežanje indeksa

Na svaki uzorak se vežu Index 1 (i7) i Indeks 2 (i5) adapteri radi stvaranja jedinstveno označene knjižnice. Korišteni su indeksi iz „AmpliSeq™ for Illumina® CD Indexes for Illumina Kit“ kompletu, i reagensi Switch Solution i DNA Ligase iz „AmpliSeq™ for Illumina® Library PLUS Kit“. Označavanjem uzoraka jedinstvenim indeksima omogućeno je miješanje svih uzoraka te njihovo sekvenciranje u isto vrijeme.

Postupak: Switch Solution je odmrznut na sobnoj temperaturi, dok je DNA Ligase odmrznuta na ledu gdje je čuvana tijekom postupka. Ploča s ampliconima je kratko centrifugirana i uklonjena je folija. Indeksi su odmrznuti, kratko vorteksirani i centrifugirani. U svaku jažicu s uzorkom dodani su redosljedom sljedeći reagensi: 4 µl Switch Solution; 2 µl AmpliSeq CD indeksa; 2 µl DNA Ligase. Folijom je zatvorena ploča, kratko vorteksirana i centrifugirana nakon čega je postavljena u PCR uređaj s LIGATE programom.

LIGATE program je postavljen na:

- Volumen: 22 µl
- Zagrijavanje poklopca pred reakciju na 105 °C
- 22 °C na 30 minuta
- 68 °C na 5 minuta
- 72 °C na 5 minuta

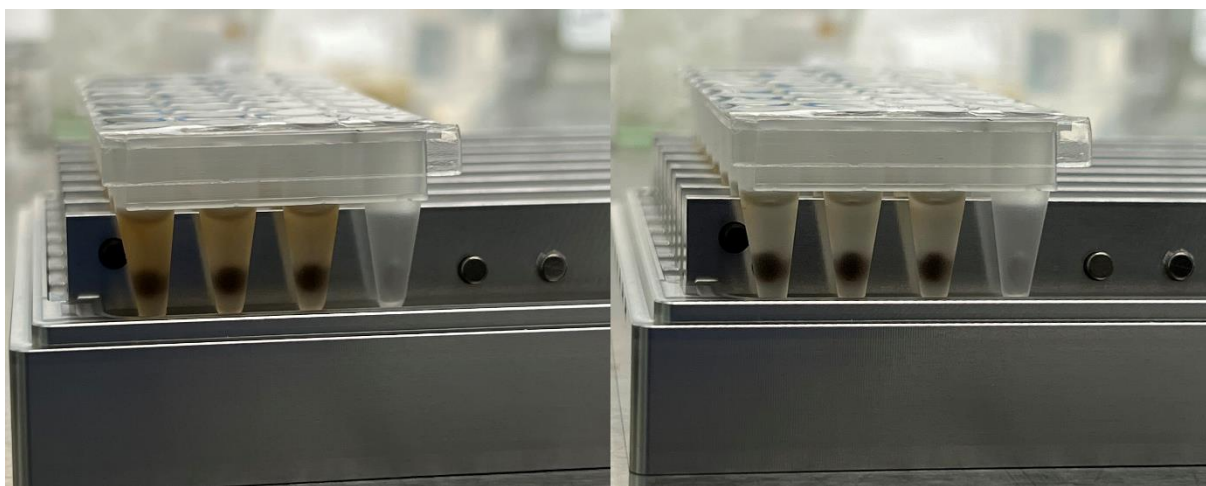
Tablica 1. Prikaz položaja indeksa u PCR ploči s 32 jažice.

| | | | |
|----|----|----|--|
| 1D | 2G | 1E | |
| 1F | 2H | 2A | |
| 1G | 3C | 2F | |
| 1H | 3E | 3A | |
| 2B | 3G | | |
| 2C | 1A | | |
| 2D | 1B | | |
| 2E | 1C | | |

4.3.2.5. Prvo čišćenje knjižnice

Čišćenjem knjižnice postiže se uklanjanje malih, nespecifičnih fragmenata DNA radi postizanja što efikasnijeg rezultata sekvenciranja. Čišćenje djeluje na principu vezanja većih DNA fragmenata za paramagnetske kuglice iz Agencourt AMPure XP Beads reagensa. Kuglice s knjižnicom se zadržavaju djelovanjem magnetskog polja, dok se višak uklanja jednostavnim ispiranjem.

Postupak: Agencourt AMPure XP beads zagrijane su na sobnu temperaturu i prije korištenja dobro vorteksirane. Prije postupka čišćenja pripremljeno je 10 ml 70 % etanola. Ploča je kratko centrifugirana i uklonjena je folija. U svaku knjižnicu dodano je 30 μ l AMPure XP kuglica nakon čega je ploča centrifugirana i inkubirana na sobnoj temperaturi 5 minuta. Nakon inkubacije ploča je postavljena na magnetni stalak 2 minute da kuglice privuče magnetsko polje (**Slika 2**). Dok je bila ploča na stalku, skinuta je folija i uklonjen cjelokupni supernatant iz svake jažice. U svaku jažicu zatim je dodano 150 μ l 70 % etanola, te je ploča inkubirana na sobnoj temperaturi dok se otopina nije razbistrila. Supernatant je ponovno uklonjen, a korak ispiranja ponavljen još jednom. Ploča je zatim zatvorena i centrifugirana te vraćena na magnetni stalak. Uklonjen je ostatak prisutnog etanola i ploča je ostavljena da se osuši na zraku u sljedećih 10 minuta. Ostatak etanola uklonjen je pipetom kako bi u svakoj jažici ostala samo knjižnica vezana za kuglice.



Slika 2. Privlačenje magnetskih kuglica s knjižnicom prema magnetu a) nakon što je ploča stavljena i b) nakon 2 minute. Fotografirao autor rada.

4.3.2.6. Amplifikacija knjižnice

Druga amplifikacija u pripremi knjižnice služi za umnažanje dodatne količine knjižnice prije sekvenciranja koristeći se 1X Lib Amp Mix i 10X Library Amp Primers iz komercijalnog kita „AmpliSeq™ for Illumina® Library PLUS Kit“.

Postupak: 1X Lib Amp Mix odmrznut je na ledu, a 10X Library Amp Primers na sobnoj temperaturi. Ploča je maknuta s magnetnog stalka te je u svaku jažicu dodano 45 µl 1X Lib Amp Mix i 5 µl 10X Library Amp Primers reagensa, nakon čega je ploča zatvorena, kratko vorteksirana i centrifugirana. Ploča je postavljena na PCR uređaj i pokrenut je AMP_7 program. LIGATE program je postavljen na:

- Volumen: 50 µl
- Zagrijavanje poklopca pred reakciju na 105 °C
- 98 °C na 2 minute
- 7 ciklusa:
 - 98 °C na 15 sekundi
 - 64 °C na 1 minutu

4.3.2.7. Drugo čišćenje knjižnice

Drugo čišćenje knjižnice učinjeno je korištenjem Agencourt AMPure XP kuglica u dva koraka. U prvom koraku pročišćavanja, nespecifični fragmenti DNA vežu se na kuglice, a knjižnica i početnice ostaju supernatantu koji se zatim prebacuje na novu ploču. U drugom koraku čišćenja knjižnica ostaje vezana za kuglice, a supernatant se uklanja.

Postupak: Prije samog postupka, Agencourt AMPure XP kuglice i Low TE pufer iz „AmpliSeq™ for Illumina® Library PLUS kompleta zagrijani su na sobnu temperaturu. Istovremeno pripremljeno je 10 ml 70 % etanola.

PCR ploča s amplificiranim knjižnicama kratko je centrifugirana i folija skinuta. U svaku jažicu dodano je 25 µl AMPure XP beads. Ploča je kratko vorteksirana i centrifugirana nakon čega je uslijedila inkubacija na sobnoj temperaturi 5 minuta. Ploča je zatim smještena na magnetni stalak na 5 minuta dok se knjižnica nije razbistrila. Cjelokupan supernatant (~75 µl) s knjižnicom prebačen je u jažice nove ploče i dodano je 60 µl XP kuglica te je ponovljeno vorteksiranje, centrifugiranje i inkubacija od 5 minuta. Nakon toga ploča je ponovno inkubirana na magnetu dok se uzorci knjižnice nisu izbistrili, a sav preostali supernatant je uklonjen.

Pročišćene knjižnice isprane su u 150 μ l 70 % etanola i inkubirane 30 s na magnetskom stalku nakon čega je uklonjen sav supernatant. Postupak ispiranja ponovljen je još jednom, a preostali etanol unutar jažica osušen je na zraku 5 minuta. Ploča je maknuta s magnetnog stalka te je u svaku jažicu dodano 30 μ l Low TE pufera. Ploča je zatvorena folijom te kratko vorteksirana, centrifugirana i inkubirana na magnetu dok se tekućina u jažicama nije izbistrila. Nakon toga, 27 μ l supernatanta s knjižnicom prebačeno je na novu PCR ploču.

4.3.2.8. Kvantifikacija knjižnice

4.3.2.8.1. Kvantifikacija knjižnice fluorometrijskom metodom

Kvantifikacija knjižnice učinjena je fluorometrijskom metodom uz korištenje kita „Qubit™ dsDNA HS Assay Kit“.

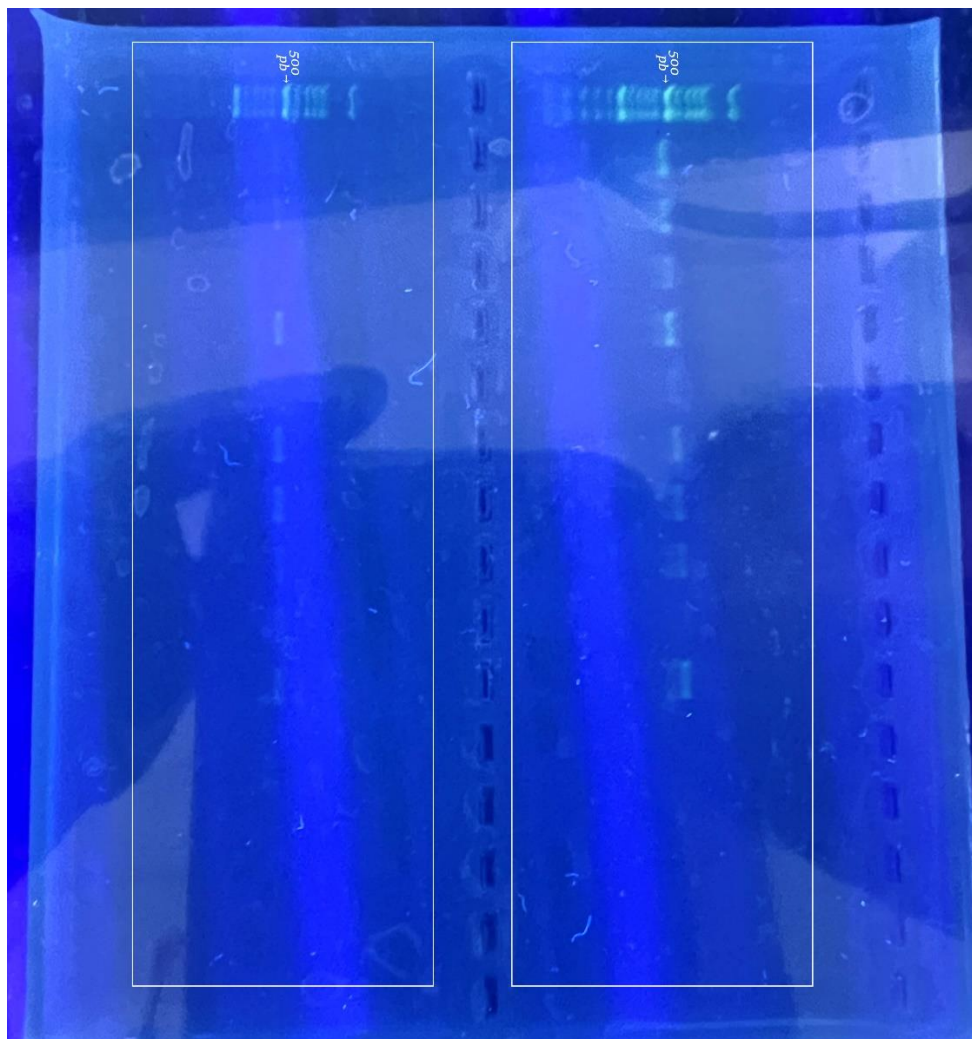
Postupak: 20 uzoraka i 2 standarda pripremljena su u Qubit™ Assay tubicama. Pripremljena je radna otopina razrjeđenja 1:200 od Qubit™ dsDNA HS reagensa i Qubit™ dsDNA HS pufera. U svaku tubicu dodano je 198 μ l radne otopine i 2 μ l DNA dobivene knjižnice. Tubica je kratko vorteksirana te inkubirana na sobnoj temperaturi. Za pripremu standarda 1 i 2 pomiješano je 190 μ l radne otopine s 10 μ l otopine Qubit™ dsDNA HS Standarda 1, odnosno 10 μ l otopine Qubit™ dsDNA HS Standarda 2. Radi dobivanja standardne krivulje prvo su izmjerene vrijednosti Standarda 1 i 2 a nakon toga su određene i vrijednosti koncentracije DNA u uzorcima. Rezultati koncentracije DNA izraženi su u ng/ μ l.

4.3.2.8.2. Agarozna gel elektroforeza

Veličina fragmenata knjižnice provjerena je pripremom 1,5 % agarozna gel elektroforeze.

Postupak: 1,5 % agarozni gel pripremljen je mješanjem 0,75 g agaroze i 50 ml 1X TBE pufera u Erlenmeyerovoj tikvici. Gel je otopljen zagrijavanjem, te je nakon hlađenja izliven u kadicu za elektroforezu s češljčićima kako bi se polimerizirale jažice za nanošenje uzoraka.

Na komadiću parafilma pomiješano je 4 μ l uzorka i 1 μ l DNA boje. U jažice je pipetirano 5 μ l DNA markera te 5 μ l svake knjižnice. Ciljni fragmenti DNA, veličine 500 parova baza, razdvojeni su tijekom 25 min gel elektroforeze u električnom polju jakosti 150 V. Gel je vizualiziran pod UV-lampom (**Slika 3**).



Slika 3. **Vizualizacija DNA fragmenata nakon elektroforeze pod UV lampom.** Fragmenti knjižnice pokazuju veličinu od 500 pb. Fotografirao autor rada.

4.3.2.8.3. qPCR kvantifikacija

Real Time PCR (qPCR) kvantifikacija učinjena je uz korištenje „KAPA Library Quantification Kits for Illumina® platforms“ kompleta.

Postupak: Komponente kompleta KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix i DNA standardi 1-6 otopljeni su na ledu. Pripremljen je 10 mM Tris-HCl, pH 8,0-8,5. 2 µl svake knjižnice razrijeđena su u 2 serijska (1:100) razrjeđenja s 10mM Tris-HCl tako da njihove finalne koncentracije budu usklađene s koncentracijskim rasponom KAPA standarda (0,0002-20 pM). Ukupan volumen za qPCR reakciju bio je 20 µl, uključujući 12 µl KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix reagensa, 4 µl PCR vode te 4 µl razrijeđene knjižnice. Kvantifikacija je provedena u real-time PCR uređaju QuantStudio 5 u sljedećim temperaturnim uvjetima:

- Volumen: 20 μl
- 95 °C na 2 minute
- 35 ciklusa:
 - 95 °C na 30 sekundi
 - 60 °C na 45 sekundi

Na temelju dobivenih srednjih vrijednosti koncentracije izmjerenih u duplikatu, izračunata je molarnost svake knjižnice primjenom slijedeće formule:

$$\text{Molarnost (nM)} = \frac{c \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right) * 10^6}{\frac{660\text{g}}{\text{mol}} * \text{prosječna veličina knjižnice (500 bp)}}$$

Na temelju dobivenih rezultata qPCR kvantifikacije, sve knjižnice su razrijeđene na koncentraciju 2 nM.

4.3.3. Denaturacija i razrijeđenje knjižnice prije sekvenciranja

Prije sekvenciranja na Illumina® MiniSeq™ sustavu, knjižnice su denaturirane i razrijeđene na preporučenu koncentraciju 1,1-1,9 pM u konačnom volumenu od 500 μl . Tijekom procesa pripreme uzoraka za sekvenciranje korišteni su reagensi „MiniSeq High Output Reagent“, „AmpliSeq™ for Illumina® Library PLUS“ te „PhiX Control“ kompleta.

Postupak: Reagensi HT1, low TE te PhiX otopljeni su na sobnoj temperaturi. Pripremljen je 1 ml 0,2 M NaOH. PhiX kontrola je razrijeđena s 10 mM Tris-HCl na 4 nM koncentraciju. 10 μl knjižnice svakog uzorka združeno je u 1,5 ml tubicu, te je tubica kratko vorteksirana i centrifugirana. Združena knjižnica i PhiX kontrola potom su denaturirane dodatkom 10 μl , odnosno 5 μl NaOH, u 10 μl združene knjižnice, odnosno 5 μl PhiX kontrole. Obje tubice su vorteksirane, centrifugirane i inkubirane 5 minuta na sobnoj temperaturi. U tubicu s knjižnicom konačno je dodano je 10 μl , a u PhiX kontrolu 5 μl vode te su obje tubice nanovo vorteksirane i centrifugirane.

Razrijeđenje združene, denaturirane knjižnice, i PhiX kontrole na 20 pM koncentraciju učinjeno je dodatkom 970 μl , odnosno 985 μl hladnog HT1 reagensa. Tubice su vorteksirane i centrifugirane. Finalno razrijeđenje knjižnice ostvareno je miješanjem 28 μl denaturirane

knjižnice s 472 μ l hladnog HT1 reagensa. Za finalno razrjeđenje PhiX kontrole, pomiješano je 35 μ l 20 pM PhiX-a s 465 μ l HT1.

Flow Cell i Reagent Cartridge iz „MiniSeq High Output Reagent“ kompleta otopljeni su i pripremljeni za korištenje. U Reagent Cartridge pipetirano je 495 μ l knjižnice i 5 μ l PhiX kontrole.

4.3.4. Analiza podataka primjenom MiXCR, Immunarch i VDJTools alata

Nakon sekvenciranja, rezultati su dobiveni u obliku .fastq formata. Unutar FASTQ datoteke nalaze se sirovi podatci koji su obrađeni primjenom MiXCR programa do kvantificiranih klonotipova u sklopu BaseSpace Sequence Hub platforme na Illumini. Alat MiXCR (<https://github.com/milaboratory/mixcr/>) poravnava sekvence prema humanom genomu s velikom preciznosti. On prepoznaje sve CDR regije gena slagajući ih u klonotipove. Rješavanjem nastalih pogrešaka tijekom koraka PCR-a i sekvenciranja (mismatch, delecije) spašava podatke i također ih grupira u klonotipove.

MiXCR se služi ugrađenom knjižnicom referentnih V, D i J sekvenci gena iz NIH GenBank baze podataka (44). U zadnjoj fazi, za svaki uzorak, formiraju se .txt datoteke s podacima o zabilježenim klonotipovima, uključujući broj čitanja svake klonske varijante, nazive i kombinacije pripadajućih V, D i J segmenata, i udjele pojedinih klonova u ukupnom repertoaru. Pomoću bioinformatičkih alata Immunarch (<http://github.com/immunomind/immunarch/>) i VDJTools (<http://github.com/mikessh/vdjtools>) analizirane su dobivene datoteke. Za dobivanje udjela korištenja pojedine varijante TRBV ili TRBJ gena u ukupnim klonotipovima svakog uzorka korištena je funkcija CalcSegmentUsage iz VDJTools alata. Funkcija heatmap.2 iz R paketa ggplot2 (<https://github.com/tidyverse/ggplot2>) korištena je za grafički prikaz toplinske karte.

4.3.5. Statistička obrada rezultata

Kategoričke varijable prikazane su apsolutnim frekvencijama i proporcijama, a omjerne varijable medijanom s interkvartilnim rasponom (IQR). Proveden je izračun klonalnosti (udio repertoara koji zauzima skupine staničnih klonova), preklapanje repertoara (određivanje “javnih” klonotipova), utvrđivanje distribucije V i J gena te procjena raznolikosti repertoara

(Broj jedinstvenih klonova, ChaoE (45), Efron-Thisted (46), Chao1 (47) i D50 indeks (48)). Statistička značajnost razlike među neovisnim skupinama testirana je neparametrijskim testom (Mann-Whitney, omjerne varijable). Povezanost kontinuiranih varijabli procijenjena je Spearmanovim koeficijentom korelacije (ρ). Tablice kontingencije analizirane su Fisher exact testom. Dvostrani $P < 0,05$ predstavlja prag značajnosti, bez korekcije za broj testova. Statistička analiza provedena je pomoću statističkog programa R v4.1.0 (<https://www.r-project.org/>).

5. REZULTATI

5.1. Deskriptivna analiza demografskih i kliničkih obilježja ispitanika

Za istraživanje je korišteno 20 uzoraka RNA izoliranih iz sortiranih MR1+TCRVa7.2+ MAIT stanica prikupljenih iz periferne krvi 10 ispitanika oboljelih od vulgarne psorijaze i 10 zdravih kontrola, po dobi i spolu prilagođenih skupini oboljelih. Deskriptivna analiza demografskih, kliničkih i biokemijskih obilježja prikazana je u Tablici 2. Skupina oboljelih i kontrolnih skupina nisu se značajno razlikovale po spolu, dobi ili BMI. Značajne razlike u koncentraciji CRP upalnog biljega, broju eritrocita, trombocita, koncentraciji ukupnog kolesterola, te LDL i HDL serumskim razinama, nisu zabilježene. Broj leukocita u krvi oboljelih [median; $M_e=6,7 (5,9-7,9) \times 10^9/l$; $P=0,031$] bio je značajno povišen u odnosu na vrijednosti zabilježene u zdravih ispitanika [$M_e=5,7 (4,7-6,7) \times 10^9/l$]. Vrijednosti homocisteina, folne kiseline i vitamina B12 nisu se značajno razlikovale između skupina. Statistički značajna razlika u CMV IgG seropozitivnosti, kao i u serumskim razinama CMV IgG i anti-HBs IgG protutijela nije zabilježena.

Tablica 2. Demografska, klinička i biokemijska obilježja ispitanika.

| Skupina | PV (N=10) | CTRL (N=10) | P-vrijednost |
|----------------------------|-------------------|--------------------|---------------|
| N (M/Ž omjer) | 10 (8/2) | 10 (8/2) | 1** |
| Dob (godine) | 34 (29,5-39) | 33 (28,5-37) | 0,591* |
| BMI (kg/m ²) | 28,1 (27,4-29,6) | 27,5 (26,5-29,2) | 0,711* |
| PASI | 20,1 (5,35-23) | - | - |
| DLQI | 10 (4,25-11) | - | - |
| CRP (mg/l) | 0,7 (0,4-0,9) | 1,4 (0,7-3) | 0,222* |
| Lkc (x10 ⁹ /l) | 6,7 (5,9-7,9) | 5,7 (4,7-6,7) | 0,031* |
| Erc (x10 ¹² /l) | 5,1 (4,6-5,3) | 5,1 (5-5,2) | 0,703* |
| Tr (x10 ⁹ /l) | 250 (218,6-281,3) | 245 (222-282) | 0,968* |
| Kol (mmol/l) | 5,5 (5-6) | 4,9 (4,8-5,4) | 0,849* |
| HDL-kol (mmol/l) | 1,2 (1,1-1,6) | 1,3 (1,2-1,5) | 0,435* |
| LDL-kol (mmol/l) | 3,9 (3,7-4,1) | 4,3 (2,9-3,5) | 0,222* |
| Homocistein (μmol/l) | 9 (9-10) | 8,5 (8-9,8) | 0,197* |
| Folna kiselina (nmol/l) | 9,3 (8,8-14) | 15 (12,7-18,6) | 0,111* |
| Vitamin B12 (pmol/l) | 309 (288-346) | 354 (292-395) | 0,659* |
| Anti CMV IgG (poz/neg) | 7/2 | 10/0 | 0,210** |
| Anti CMV IgG (AU/ml) | 84,9 (35,6-101) | 100,8 (83,9-119,2) | 0,141* |
| Anti HBs (mIU/ml) | 3 (2-296,5) | 281 (22-781) | 0,215* |

* Mann-Whitney U-test. ** Fisher exact test. Rezultati mjerenja prikazani su medijanom i interkvartilnim rasponom (IQR). N – broj ispitanika; **BMI** – indeks tjelesna mase; **PASI** – *Psoriasis Area and Severity Index*; **DLQI** - *Dermatological Life Quality Index*; **CRP** – C-stanični protein; **Lkc** – leukociti; **Erc** – eritrociti; **Tr** – trombociti; **Kol** – kolesterol; **CMV** – citomegalovirus; **HBs** – hepatitis B, površinski antigen; **IgG** – imunoglobulin G

5.2. Pregled kvantitativnih parametara kontrole kvalitete sekvenciranih i mapiranih klonskih varijanti

Kvantitativni parametri kontrole kvalitete ostvarenih čitanja prikazani su u Tablici 3. U usporedbi s kontrolnom skupinom, u PV uzorcima ostvaren je nešto veći broj čitanja [PV vs. CTRL; 326343 (201105-528040) vs. 214410 (132550-348893); $P=0,307$]. Najmanji broj klonalnih varijanti u PV skupini bio je 121 204, dok je kod kontrolne skupine on bio 2236. Ostvaren je i veći broj jedinstvenih klonalnih varijanti, čija je frekvencija posljedično bila nešto veća u PV nego u CTRL skupini [PV vs. CTRL; 4566,5 (3364,2-6297,5) vs. 2967,5 (2445,5-5030,75); $P=0,186$], ali statistički značajna razlika u navedenim kategorijama nije zabilježena. Udio čitanja mapiranih u TCR transkriptomu bio je podjednak u obje skupine, kao i broj čitanja po klonotipu, te duljina nukleotidnih sljedova CDR3 transkripata.

Tablica 3. Deskriptivna analiza parametara kontrole kvalitete.

| Skupina | PV (N=10) | CTRL (N=10) | P-vrijednost |
|---|--------------------------|--------------------------|--------------|
| Broj čitanja po uzorku | 326343 (201105-528040) | 214410 (132550-348893) | 0,307* |
| Udio mapiranih čitanja (%) | 87,19 (86,18-88,62) | 86,84 (86,35-87,45) | 0,939* |
| Udio čitanja mapiran u TCR transkriptomu (%) | 63,5 (59,25-64,75) | 62 (58,25-63,75) | 0,341* |
| Broj jedinstvenih klonova | 4566,5 (3364,2-6297,5) | 2967,5 (2445,5-5030,75) | 0,186* |
| Prosječan broj čitanja po klonotipu | 62,02 (55,01-79,15) | 64,96 (43,19-82,23) | 0,909* |
| Srednja vrijednost frekvencije klonotipa | 0,00022 (0,00016-0,0003) | 0,000337 (0,0002-0,0004) | 0,186* |
| Srednja vrijednost nukleotidne sekvence CDR3 regije | 43,91 (43,56-44-23) | 43,81 (43,43-44,35) | 0,909* |

* Mann-Whitney U-test. Rezultati mjerenja prikazani su medijanom i interkvartilnim rasponom.

5.3. Kvantitativna analiza raznolikosti TCR β repertoara TCRV α 7.2+ MR1+ stanica

Raznolikost TCR β repertoara procijenjena je primjenom kvantitativnih mjera raznolikosti koje se često primjenjuju u ekologiji, poput ChaoE, Chao1 i Efron-Thisted

procjenitelja te D50 indeksa (44, 45, 46, 47). Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 4. U usporedbi s β -TCR repertoarom MAIT stanica zdravih kontrola, u PV ispitanika uočen je nominalno veći, ali ne i statistički značajno različit broj jedinstvenih CDR3 β klonalnih varijanti MR1+TCRV α 7.2+ stanica. Kako bi procijenili potencijalnu raznolikost nezabilježenih ili nedostajućih klonotipova učinjena je ekstrapolacija zabilježenog broja klonova primjenom ChaoE, Chao1 i Efron-Thisted parametara, međutim značajna razlika među ispitivanim skupinama nije zabilježena. Za daljnju analizu prisutnosti klonotipskih ekspanzija, izračunat je indeks raznolikosti 50 (D50), koji odgovara postotku jedinstvenih CDR3 sekvenci koje čine 50 % ukupnog broja ostvarenih čitanja. Više od 98 % jedinstvenih klonotipova činilo je 50 % ukupnog broja CDR3 β sekvenci u oboljelih od PV, što ukazuje na veliku raznolikost TCR β MAIT repertoara i izostanak ekspanzije klonalnih varijanti u PV. Podjednaka veličina D50 indeksa i raznolikosti β TCR repertoara zabilježena je i u kontrolnoj skupini.

Tablica 4. Procjena raznolikosti β -TCR repertoara sortiranih MR1+TCRV α 7.2+ stanica.

| Raznolikost | PV | CTRL | P-vrijednost |
|---------------------------|--------|--------|--------------|
| Broj jedinstvenih klonova | 4566,5 | 2967,5 | 0,185* |
| ChaoE | 5033 | 3309,5 | 0,140* |
| Efron-Thisted | 5616,5 | 3950,5 | 0,121* |
| Chao1 | 5033,5 | 3317,5 | 0,161* |
| D50 Index | 0,9815 | 0,977 | 0,384* |

* Mann-Whitney U-test. Rezultati mjerenja prikazani su medijanom. **ChaoE** – ekstrapolacija broja detektiranih različitih klonotipova (45); **Efron-Thisted Estimate** – procjenjivanje broja nepoznatih klonotipova (46); **Chao1** – procjena ukupnog broja klonotipova (47); **D50 Index** - postotak jedinstvenih CDR3 sekvenci odgovornih za 50 % ukupnog broja sekvenci (48).

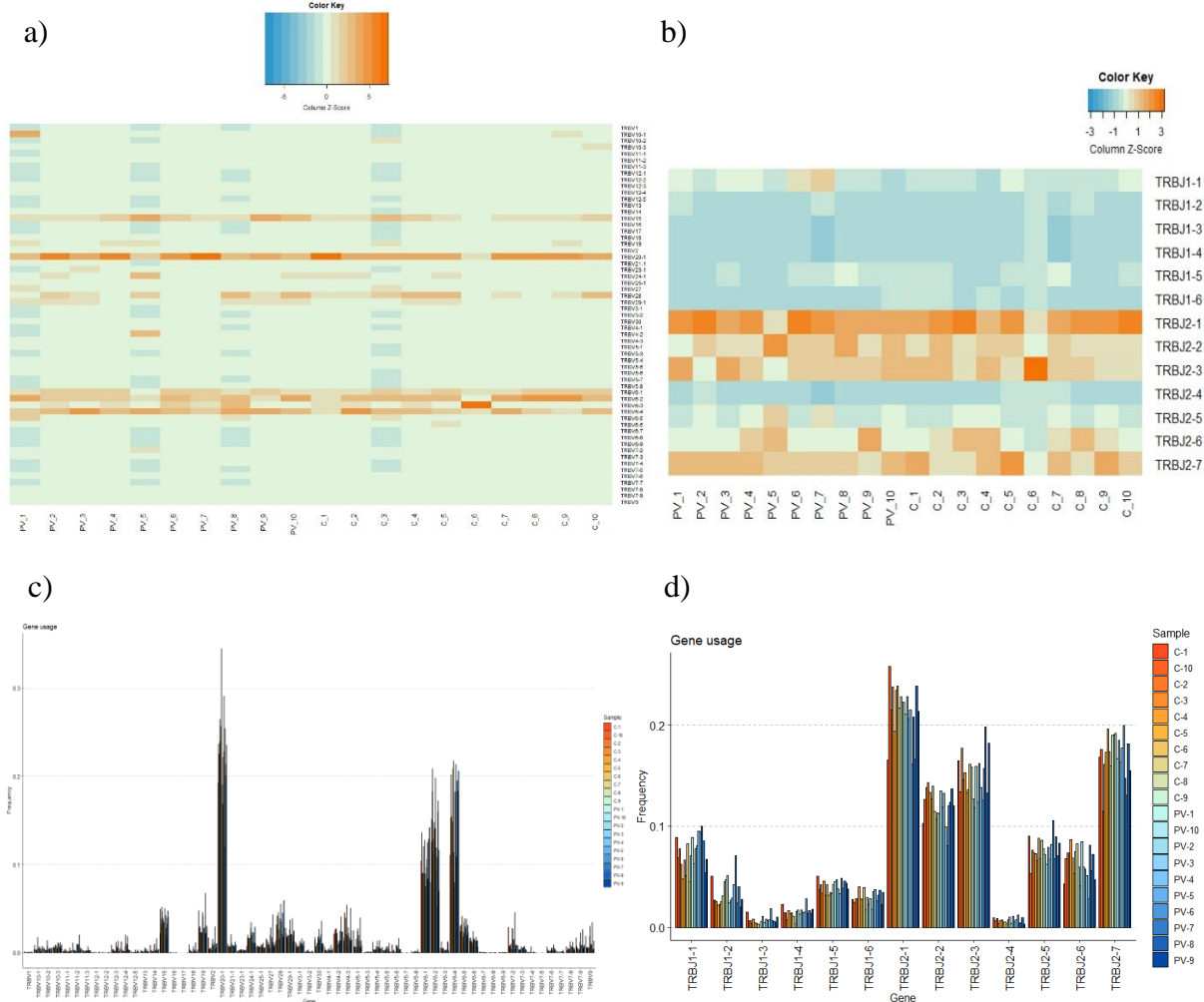
5.4. Distribucija TRBV i TRBJ gena u β -TCR repertoaru

TCRV α 7.2+ MR1+ stanica zdravih i oboljelih ispitanika

Kako bi odredili distribuciju pojedinačnih gena V i J u TCR β repertoaru MR1+TCRV α 7.2+ MAIT stanica, napravljene su toplinske karte (**Slika 4.a i 4.b**) i stupčasti dijagrami (**Slika 4.c i 4.d**) uspoređujući upotrebu 59 TRBV i 13 TRBJ gena u jedinstvenim β -CDR3 sekvencama zdravih kontrolnih i oboljelih ispitanika.

Većina CDR3 sekvenci TCR β lanaca koristila je gen TRBV20-1 (22 826/100 869 klonova) i inačice TRBV6 obitelji gena (TRBV6-1 (9 471/100 869 klonova), TRBV6-2 (13 435/100 869 klonova), TRBV6-4 (15 322/100 869 klonova)), a geni TRBV28, TRBV15 i

TRBV29-1 zabilježeni su u više od 2 % svih β -TCR klonotipova (**Slika 4.a i c**). Pridružene genske varijante J segmenata najčešće su kodirane genskim inačicama TRBJ2 obitelji gena, od kojih ponajviše genima TRBJ2-1 (21 838/100 869 klonova) i TRBJ2-7 (15 836/100 869 klonova) (**Slika 4.b i d**).



Slika 4. Distribucija TRBV i TRBJ gena u uzorcima PV i CTRL skupine. Rezultati su prikazani toplinskim kartama za **a)** TRBV i **b)** TRBJ gene. Za dobivanje udjela korištenja pojedine varijante TRBV ili TRBJ gena u ukupnim klonotipovima svakog uzorka korištena je funkcija CalcSegmentUsage iz VDJTools alata. Funkcija heatmap.2 iz R paketa ggplot2 korištena je za grafički prikaz toplinske karte. Z-score je izračunat unutar funkcije heatmap.2 te predstavlja rezultat dobiven oduzimanjem ukupne prosječne zastupljenosti gena od sirove ekspresije za svaki gen te dijeljenjem tog rezultata sa standardnom devijacijom (SD) broja klonova u svim uzorcima. Narančasti dio spektra predstavlja najzastupljenije varijante V i J gena. Stupčastim dijagramima prikazana je distribucija **c)** TRBV i **d)** TRBJ gena u svim uzorcima.

Frekvencije 10 najzastupljenijih TRBV i TRBJ gena u sastavu TCR β repertoara perifernih MAIT stanica kontrolnih i oboljelih ispitanika prikazane su u Tablici 5. i Tablici 6. Najzastupljeniji TRBV geni u skupini oboljelih od PV, u istom sastavu i redosljedom pojavljuju se među 10 najučestalijih gena u združenoj populaciji svih ispitanika. Isti popis TRBV varijanti nalazi se i na listi 10 najzastupljenijih gena u kontrolnih ispitanika, ali se njihov rang djelomice razlikuje u usporedbi s redosljedom gena koji je zabilježen u PV skupini. Najznačajnija je bila razlika u učestalosti TRBV29-1 gena, čija je frekvencija bila značajno veća u TCR β klonovima oboljelih [PV vs. CTRL: 3,82 % vs. 2,22 %].

Tablica 5. **Distribucija TRBV gena u ukupnom repertoaru.**

| Najzastupljeniji TRBV geni (PV+CTRL) | %* (PV+CTRL) | Najzastupljeniji TRBV geni (PV) | %* (PV) | Najzastupljeniji TRBV geni (CTRL) | %* (CTRL) |
|--------------------------------------|--------------|---------------------------------|---------|-----------------------------------|-----------|
| TRBV20-1 | 22,63 | TRBV20-1 | 17,99 | TRBV20-1 | 17,59 |
| TRBV6-4 | 15,19 | TRBV6-4 | 13,22 | TRBV6-2 | 13,18 |
| TRBV6-2 | 13,32 | TRBV6-2 | 10,37 | TRBV6-4 | 10,80 |
| TRBV6-1 | 9,39 | TRBV6-1 | 8,57 | TRBV6-1 | 7,55 |
| TRBV15 | 3,79 | TRBV15 | 7,67 | TRBV15 | 7,18 |
| TRBV28 | 2,87 | TRBV28 | 5,78 | TRBV28 | 6,64 |
| TRBV29-1 | 2,74 | TRBV29-1 | 3,82 | TRBV24-1 | 2,73 |
| TRBV6-3 | 2,59 | TRBV6-3 | 3,55 | TRBV6-3 | 2,47 |
| TRBV24-1 | 1,99 | TRBV24-1 | 2,54 | TRBV19 | 2,23 |
| TRBV19 | 1,92 | TRBV19 | 2,22 | TRBV29-1 | 2,22 |

*Za izračun frekvencijskih udjela TRBV gena korištena je funkcija CalcSegmentUsage iz VDJTools programa.

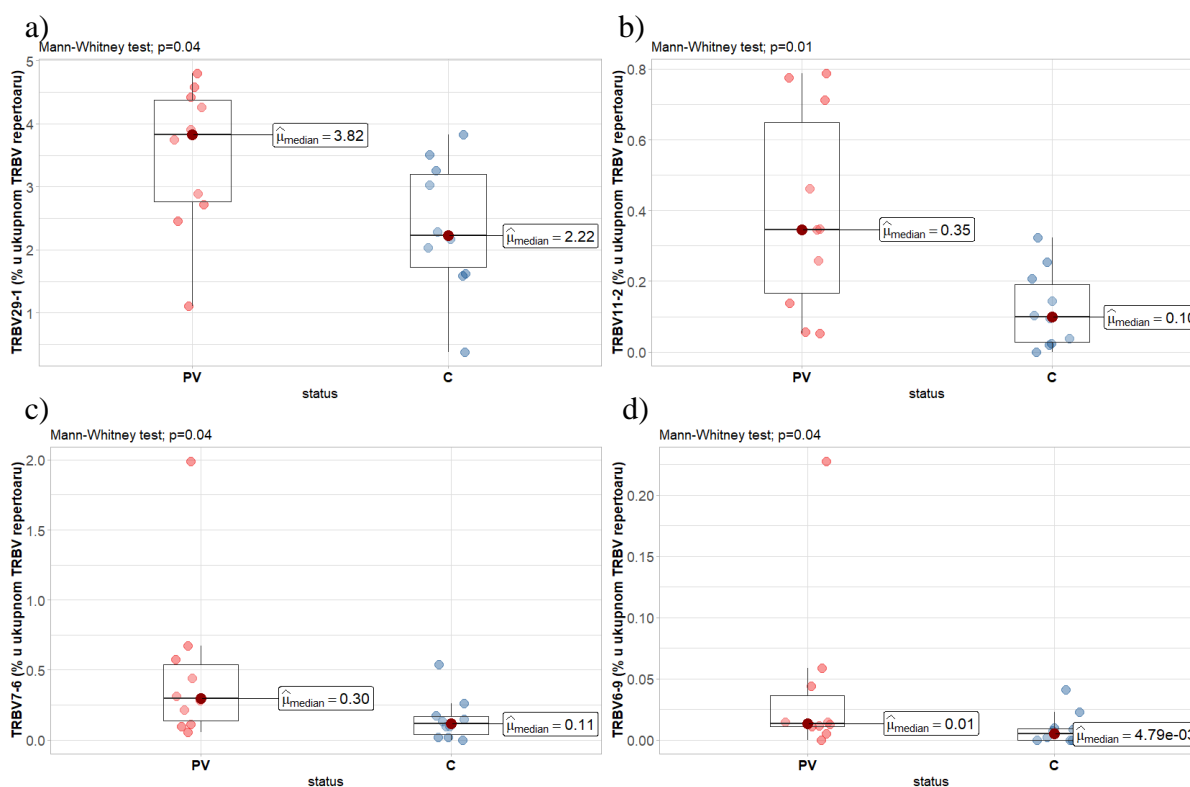
Tablica 6. **Distribucija TRBJ gena u ukupnom repertoaru.**

| Najzastupljeniji TRBJ geni (PV+CTRL) | %* (PV+CTRL) | Najzastupljeniji TRBJ geni (PV) | %* (PV) | Najzastupljeniji TRBJ geni (CTRL) | %* (CTRL) |
|--------------------------------------|--------------|---------------------------------|---------|-----------------------------------|-----------|
| TRBJ2-1 | 21,65 | TRBJ2-1 | 20,70 | TRBJ2-1 | 22,82 |
| TRBJ2-7 | 15,70 | TRBJ2-7 | 15,79 | TRBJ2-7 | 15,68 |
| TRBJ2-3 | 13,99 | TRBJ2-3 | 13,91 | TRBJ2-3 | 14,91 |
| TRBJ2-2 | 12,66 | TRBJ2-2 | 13,07 | TRBJ2-2 | 12,18 |
| TRBJ2-6 | 8,76 | TRBJ2-6 | 8,06 | TRBJ2-6 | 10,41 |
| TRBJ2-5 | 5,75 | TRBJ2-5 | 6,40 | TRBJ2-5 | 5,60 |
| TRBJ1-1 | 4,95 | TRBJ1-1 | 5,95 | TRBJ1-1 | 4,48 |
| TRBJ1-5 | 2,69 | TRBJ1-5 | 2,71 | TRBJ1-5 | 2,50 |
| TRBJ1-6 | 1,91 | TRBJ1-6 | 1,80 | TRBJ1-6 | 1,91 |
| TRBJ1-2 | 1,48 | TRBJ1-2 | 1,49 | TRBJ1-2 | 1,30 |

* Za izračun frekvencijskih udjela TRBJ gena korištena je funkcija CalcSegmentUsage iz VDJTools programa

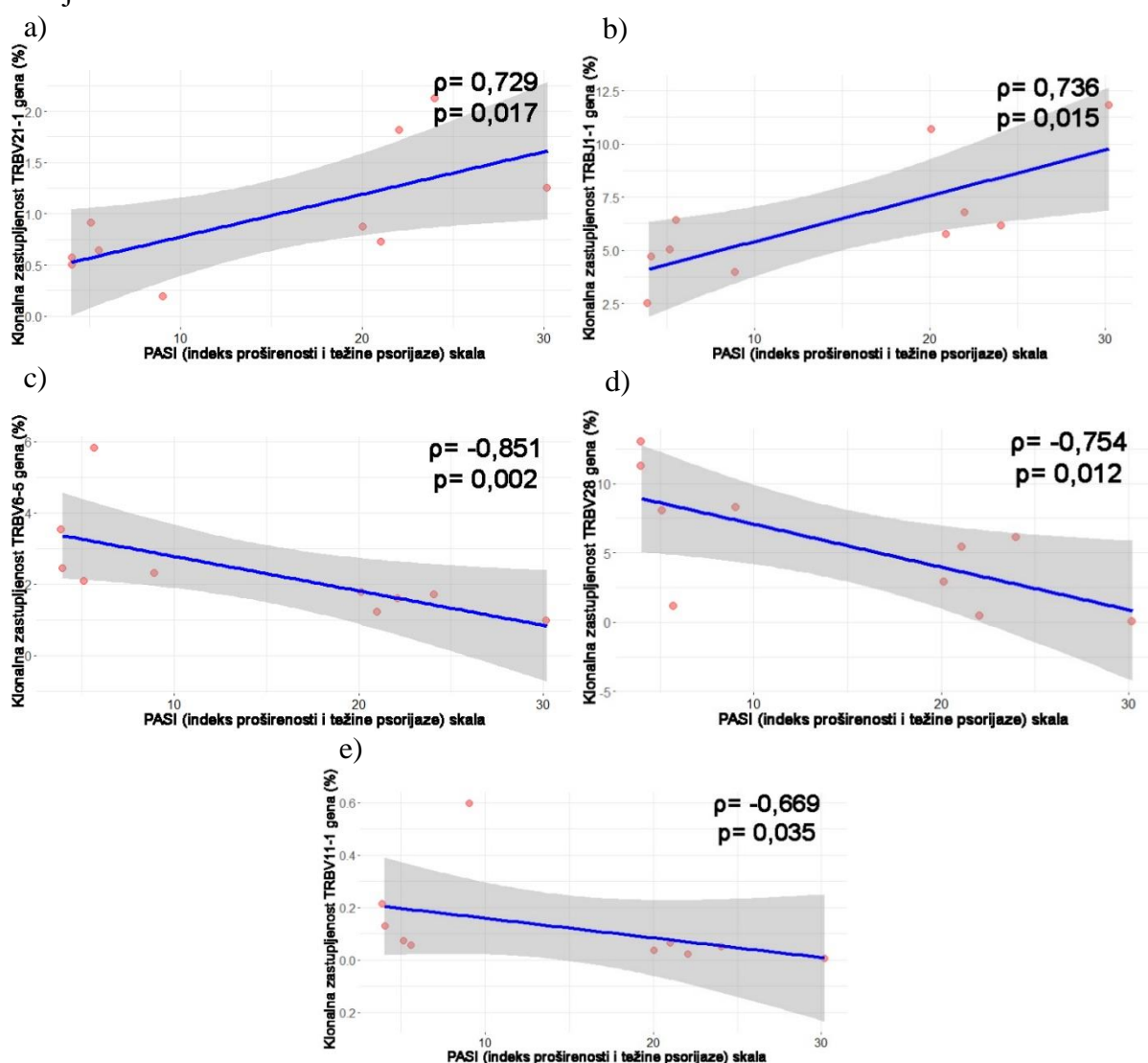
5.5. Diferencijalna uporaba TRBV gena u sastavu TCR β klonova MAIT stanica PV ispitanika

Analiza frekvencijskih udjela TRBV i TRBJ gena u TCR β repertoaru MR1+TCRV α 7.2+MAIT stanica, otkrila je nekolicinu genskih varijanti različito zastupljenih u CDR3 sekvencama PV i zdravih ispitanika. Među njima, upotreba TRBV29-1, jednog od najučestalijih gena u jedinstvenim CDR3 β sekvencama oboljelih, bila je značajno veća od one opažene u zdravih kontrola [PV vs. CTRL, $M_e=3,82$ (2,75-4,38) vs. $M_e=2,22$ (1,72-3,19); Mann-Whitney $P=0,04$; **Slika 5.a**]. Frekvencija nekolicine rjeđih TRBV varijanti, preciznije gena TRBV11-2 [$M_e=0,35$ (0,17-0,65) vs. $M_e=0,10$ (0,03-0,19) ; $P=0,01$, **Slika 5.b**], TRBV7-6 [$M_e=0,3$ (0,13-0,54) vs $M_e=0,11$ (0,04-0,17); $P=0,04$, **Slika 5.c**] i TRBV6-9 [$M_e=0,01$ (0,01-0,04) vs. $M_e=0,00479$ (0-0,01); $P=0,04$, **Slika 5.d**], također je bila značajno veća u PV nego u kontrolnih ispitanika. Značajne razlike u frekvenciji drugih TRBV i TRBJ gena između ispitivanih skupina, međutim, nisu zabilježene.



Slika 5. Učestalost upotrebe a) TRBV29-1 b) TRBV11-2 c) TRBV7-6 i d) TRBV6-9 gena u MAIT TRB-CDR3 sekvencama oboljelih i zdravih ispitanika prikazana pravokutnim ili box-plot dijagramom. Unutar svakog pravokutnika nalazi se horizontalna linija s prikazanom vrijednosti medijana (μ). Gornja i donja linija box-plota omeđuje interkvartilni raspon (IQR). Vertikalne linije predstavljaju 1,5xIQR. Razlike između PV i CTRL skupina određene su Mann-Whitney U-testom. Prag značajnosti definiran je kao dvostrani $P<0,05$.

U nastavku je ispitivana potencijalna povezanost frekvencijskog udjela TRBV i TRBJ gena u TCR β repertoaru MAIT stanica s težinom psorijaze. U tu svrhu, učinjena je Spearmanova analiza povezanosti klonalnog udjela TRBV i TRBJ gena s veličinom PASI indeksa oboljelih. Otkrivena je povezanost nekolicine TRBV i TRBJ gena i PASI skale, pri čemu je klonalna zastupljenost TRBV21-1 i TRBJ1-1 gena u MAIT TCR β repertoaru rasla (Slika 6.a i 6.b), a gena TRBV6-5, TRBV28 i TRBV11-1 opadala s porastom PASI indeksa (Slika 6.c, 6.d i 6.e). Klonalna zastupljenost gena koji su u većem broju uočeni u sastavu CDR3 β sekvenci PV ispitanika (TRBV6-9, TRBV7-6, TRBV11-2 i TRBV29-1) nije se mijenjala s PASI indeksom. Povezanost klonalnih udjela drugih TRBV gena s ostalim kliničkim obilježjima nije zabilježena.



Slika 6. Povezanost udjela a) TRBV11-1, b) TRBJ1-1, c) TRBV6-5, d) TRBV28 i e) TRBV11-1 gena i indeksa proširenosti i težine psorijaze (PASI). ρ - Spearmanov koeficijent korelacije. Prag značajnosti definiran je kao $P < 0,05$. Plava linija predstavlja liniju linearne regresije, dok sjenčana polja predstavljaju 95 %-tni interval pouzdanosti.

5.6. Brojnost i aminokiselinski sastav javnih β -TCR klonotipova MR1+TCRV α 7.2+MAIT stanica zdravih i oboljelih ispitanika

U združenom uzorku zdravih i oboljelih ispitanika zabilježeno je 4384 javnih klonotipova, a 10 najučestalijih varijanti, zabilježenih u više od 75 % ispitanika prikazano je u Tablici 7. Klonotipovi CASSELAGGPDTQYF i CSARLAGGQETQYF najviše su proširene sekvence zabilježene u 17 od 20 ispitanika. U skupini 10 najproširenijih sekvenci PV skupine, prvih 6 klonotipova čini dio najzastupljenijih varijanti ukupne populacije, a sekvence rangirane od 7. do 10. mjesta pojavljuju se u 3-5 od 10 zdravih kontrola (**Tablica 8.**). U skupini 10 najproširenijih sekvenci CTRL skupine, prvih 5 klonotipova čini dio najzastupljenijih varijanti ukupne populacije te se svaka od sekvenci pojavljuje u više od pola oboljelih (**Tablica 9.**). Uz ove klonotipske varijante, pronađeno je nekoliko javnih klonotipova koji se pojavljuju u više od polovice PV ispitanika, ali ni u jednom od kontrolnih uzoraka (**Tablica 10.**). Među njima, rijetka klonotipska varijanta CSARTGDYGYTF (frekv. $6,2251e-05$), kodirana TRBV20-1 i TRBJ1-2 genima, pojavljuje se u 7 od 10 PV ispitanika, ali je u potpunosti izostavljena u MAIT TCR β repertoaru zdravih osoba. Suprotno, varijanta CSARGLAGDSYEQYF, kodirana kombinacijom TRBV20-1 s TRBJ2-7, zabilježena je u 5 od 10 zdravih kontrola, ali ni u jednom PV uzorku.

Tablica 7. Prikaz preklapanja CDR3 β repertoara među PV i CTRL skupinama.

| Najčešći klonotipovi dijeljeni između PV i CTRL ispitanika | TRBV gen | TRBJ gen | Broj PV ispitanika s klonotipom | Broj CTRL ispitanika s klonotipom |
|--|-------------|----------|---------------------------------|-----------------------------------|
| CASSELAGGPDTQYF | TRBV6-4 | TRBJ2-3 | 9 | 8 |
| CSARLAGGQETQYF | TRBV20-1 | TRBJ2-5 | 9 | 8 |
| CASSDRDTGELFF | TRBV6-4 | TRBJ2-2 | 9 | 7 |
| CASSDSSGANVLTF | TRBV6-4 | TRBJ2-6 | 9 | 7 |
| CSARQGDTEAFF | TRBV20-1 | TRBJ1-1 | 8 | 8 |
| CASSYRDTGELFF | TRBV6-2,6-3 | TRBJ2-2 | 7 | 9 |
| CASSDSSGSTDQYF | TRBV6-4 | TRBJ2-3 | 9 | 6 |
| CASSETSGSTDQYF | TRBV6-4 | TRBJ2-3 | 9 | 6 |
| CASSDSNTGELFF | TRBV6-4 | TRBJ2-2 | 8 | 7 |
| CASSSDTGELFF | TRBV6-4 | TRBJ2-2 | 7 | 8 |

Tablica 8. Prikaz najčešćih klonotipova PV skupine.

| Najčešći klonotipovi dijeljeni između PV ispitanika | TRBV gen | TRBJ gen | Broj PV ispitanika s klonotipom | Broj CTRL ispitanika s klonotipom |
|---|-------------|----------|---------------------------------|-----------------------------------|
| CASSELAGGPDTQYF | TRBV6-4 | TRBJ2-3 | 9 | 8 |
| CSARLAGGQETQYF | TRBV20-1 | TRBJ2-5 | 9 | 8 |
| CASSDRDTGELFF | TRBV6-4 | TRBJ2-2 | 9 | 7 |
| CASSDSSGANVLTF | TRBV6-4 | TRBJ2-6 | 9 | 7 |
| CASSDSSGSTDQYF | TRBV6-4 | TRBJ2-3 | 9 | 6 |
| CASSETSGSTDQYF | TRBV6-4 | TRBJ2-3 | 9 | 6 |
| CASSYGTSGYEQYF | TRBV6-3,6-2 | TRBJ2-7 | 9 | 5 |
| CASSDSSGSYNEQFF | TRBV6-4 | TRBJ2-1 | 9 | 4 |
| CASSELAGGQETQYF | TRBV6-1 | TRBJ2-5 | 9 | 4 |
| CASSEAGGTDQYF | TRBV6-4 | TRBJ2-3 | 9 | 3 |

Tablica 9. Prikaz najčešćih klonotipova CTRL skupine.

| Najčešći klonotipovi dijeljeni između CTRL ispitanika | TRBV gen | TRBJ gen | Broj CTRL ispitanika s klonotipom | Broj PV ispitanika s klonotipom |
|---|-------------|----------|-----------------------------------|---------------------------------|
| CASSYRDTGELFF | TRBV6-2,6-3 | TRBJ2-2 | 9 | 7 |
| CASSELAGGPDTQYF | TRBV6-1 | TRBJ2-3 | 8 | 9 |
| CSARLAGGQETQYF | TRBV20-1 | TRBJ2-5 | 8 | 9 |
| CSARQGDTEAFF | TRBV20-1 | TRBJ1-1 | 8 | 8 |
| CASSSDTGTGELFF | TRBV6-4 | TRBJ2-2 | 8 | 7 |
| CASSYSDTGTGELFF | TRBV6-2,6-3 | TRBJ2-2 | 8 | 7 |
| CASSELAGGTDQYF | TRBV6-4 | TRBJ2-3 | 8 | 5 |
| CASSELAGGYNEQFF | TRBV6-1 | TRBJ2-1 | 8 | 5 |
| CASSYNSGANVLTF | TRBV6-2,6-3 | TRBJ2-6 | 8 | 5 |
| CATSRDSSGANVLTF | TRBV15 | TRBJ2-6 | 8 | 5 |

Tablica 10. Prikaz klonotipova jedinstvenih za PV skupinu.

| Klonotipovi | TRBV gen | TRBJ gen | Broj PV ispitanika s klonotipom | Broj CTRL ispitanika s klonotipom |
|-----------------|--------------|----------|---------------------------------|-----------------------------------|
| CSARTGDYGYTF | TRBV20-1 | TRBJ1-2 | 7 | 0 |
| CASSESGGSYNEQFF | TRBV6-4 | TRBJ2-1 | 5 | 0 |
| CASSTGTGDTGELFF | TRBV6-2, 6-3 | TRBJ2-2 | 5 | 0 |
| CSADRLNTEAFF | TRBV20-1 | TRBJ1-1 | 5 | 0 |
| CSARGTADYEQYF | TRBV20-1 | TRBJ2-7 | 5 | 0 |

6. RASPRAVA

MAIT limfociti dijele obilježja stanica urođenog i stečenog imunskog odgovora i potencijalno imaju važnu, ali još nedovoljno istraženu ulogu u patogenezi psorijaze. S obzirom na invarijantnu prirodu MAIT TCR α lanca, repertoar TCR β klonova nosi veći potencijal za identifikaciju autolognih ili komenzalnih oligoklonalnih TCR varijanti koje moguće pridonose pojavi i/ili recidivu psorijatičnih lezija. Stoga je primjenom RNASeq metode u ovom istraživanju ispitivana raznolikost TCR β repertoara sortiranih TCRV α 7.2+MR1+ MAIT stanica, te povezanost zabilježenih klonalnih varijanti s kliničkim obilježjima zdravih i oboljelih ispitanika.

Po završetku eksperimentalnog dijela rada, analizirani su osnovni parametri ostvarenih čitanja. Repertoar TCR β lanaca perifernih MAIT stanica oboljelih i zdravih ispitanika bio je izrazito poliklonalnog karaktera, bez značajne razlike u broju jedinstvenih klonalnih sekvenci, odnosno bez dokaza o ekspanziji oligoklonalnih MAIT CDR3 β varijanti. Broj jedinstvenih MAIT CDR3 β klonova u krvi oboljelih bio je štoviše, neznatno veći nego u zdravih ispitanika, najvjerojatnije kao posljedica posrednih, sistemskih učinaka upale na aktivaciju perifernih leukocitnih vrsta, uključujući i MAIT stanice, čemu u prilog svjedoči i povećan broj leukocita zabilježen u krvi oboljelih od psorijaze. Kvantitativni procjenitelji raznolikosti, također su potvrdili poliklonalnost MAIT TCR β repertoara, koja se nije razlikovala u odnosu na klinički status ispitanika. Štoviše, D50 indeks, koji predstavlja broj jedinstvenih kategorija peptida CDR3 u polovici ukupnih čitanja, a čije visoke vrijednosti ukazuju na izrazitu raznolikost analiziranih TRB-CDR3 varijanti, u obje je skupine ispitanika bio veći od 95 %.

Prethodno su u perifernoj krvi oboljelih od psorijaze opisane oligoklonalne TRB-CDR3 varijante koje su činile manje od 6 % ukupnog repertoara, a pokrivale su više od 50 % svih čitanja, ukazujući na prisutnost ekspanziranih klonotipova usmjerenih protiv određenih antigena u krvi ispitanika s psorijazom (42). Ta je studija, za razliku od ove, provedena u uzorku ukupnih perifernih mononuklearnih stanica i sugerira postojanje drugih, non-MAIT mononuklearnih stanica s fokusiranim TRB-CDR3 repertoarom u psorijazi. Zanimljivo, nekolicina jedinstvenih, oligoklonalnih TRB-CDR3 varijanti je, osim u krvi, prethodno zabilježena i u klinički izliječenim psorijatičnim lezijama (5), dok je TRB-CDR3 repertoar u aktivnim psorijatičnim lezijama bio više poliklonalne prirode, najvjerojatnije kao posljedica masivne infiltracije različitih vrsta T limfocita stanju upale. Ove nominalno „patogene“ T koje se zadržavaju u pogođenim lezijama i nakon UVB fototerapije, izlučuju IL-17, a njihov $\alpha\beta$ TCR

repertoar obogaćen je specifičnim TRBV (TRBV3-1, TRBV5-1) i TRAV (TRAV20, TRAV30, TRAV41) genskim sekvencama.

U okviru naših rezultata, također su otkrivena specifična imunosna obilježja MAIT TRB-CDR3 repertoara, uključujući očekivano preferencijalnu upotrebu gena TRBV20-1, TRBV6-1, -6-2 i -6-4, zabilježenih u čak 63 % jedinstvenih TCR β klonova ukupne populacije ispitanika. Štoviše, u sastavu TRB-CDR3 sekvenci oboljelih i kontrolnih ispitanika, sudjelovale su iste vrste TRBV gena, ali s malom razlikom u kumulativnim učestalostima. U tom kontekstu, učestalost upotrebe gena TRBV29-1, TRBV11-2, TRBV7-6 i TRBV6-9 bila je značajno veća u TRB-CDR3 repertoaru pacijenata s psorijazom, u odnosu na repertoar zdravih ispitanika. Prilikom analize upotrebe TRBJ genskih varijanti, u ukupnom MAIT CDR3 β repertoaru uočena je sklonost ka korištenju gena TRBJ2-1 i TRBJ2-7, ali je značajna razlika u kumulativnoj učestalosti upotrebe TRBJ gena među skupinama, izostala. Zanimljivo, geni TRBV6-1, TRBV28, TRBV29-1, TRBJ2-1 i TRBJ2-7, iz skupine najzastupljenijih gena MAIT TCR β repertoara, također su u većoj učestalosti ranije primijećeni u TRBV-CDR3 repertoaru ukupnih perifernih mononuklearnih stanica oboljelih od psorijaze (42), ukazujući na konzervativnu ulogu ovih genskih varijanti u izgradnji perifernih antigenskih receptora u psorijazi. Sudeći po povezanosti s veličinom PASI indeksa, osim navedenih, potencijalnu ulogu u razvoju psorijaze imaju i geni TRBJ1-1, TRBV6-5, TRBV11-1 i TRBV21-1. Osim analize pristranosti upotrebe TRBV i TRBJ gena u MAIT repertoaru, analizirana je i duljina CDR3 β domene, koja je u odnosu na ranije analizirane CDR3 β sekvence TCRV α 7.2⁺CD161^{high} stanica (38), bila nešto dulja, i umjesto 11 do 14 aminokiselina, u svom aminokiselinskom sastavu varirala između 12 i 15 ostataka. Značajna razlika u duljini CDR3 β domene između zdravih i oboljelih ispitanika nije primijećena, što ukazuje na mogućnost da je zabilježeni raspon duljine CDR3 β sekvenci specifična značajka MR1+TCRV α 7.2⁺ MAIT limfocita.

U potrazi za TCR β varijantama koje se javljaju unutar MAIT repertoara oboljelih, ali ne i zdravih ispitanika, učinjena je analiza javnih klonotipova, dijeljenih između najmanje dvije osobe. U ukupnoj populaciji MAIT TRB-CDR3 klonova zabilježeno je 4384 javnih klonotipskih varijanti, među kojima su varijante CASSELAGGPDTQYF i CSARLAGGQETQYF, bile zastupljene u MAIT repertoaru gotovo svih ispitanika. Ovako visoki broj dijeljenih CDR3 β sekvenci MAIT stanica reflektira generalno konzervirani spektar MR1+MAIT TCR β sekvenci s preferencijalnom upotrebom gena TRBV20-1, TRBV6-4, i pridruženim inačicama gena TRBJ2. S druge strane, među najučestalijim klonotipovima pacijenata s psorijazom, zabilježena su 3 CDR3 β klona, učestalo dijeljena između PV (9/10), ali ne i zdravih (3/10) ispitanika. Štoviše, identificirano je 5 CDR3 β peptidnih sekvenci koje se

pojavljuju isključivo u PV, ali ne i u CTRL skupini, od kojih se varijanta CSARTGDYGYTF javlja u čak 7 PV, i niti jednom kontrolnom MAIT TCR β repertoaru. Uloga i klinički značaj ovog nalaza ostaje međutim, nepoznat, i zahtijeva dodatna istraživanja strukture i funkcije MR1+MAIT T staničnih receptora, primjenom *in vitro* i *in silico* metoda za analizu konformacije i afiniteta vezanja T staničnih receptora. Dodatno ograničenje ove studije uključuje relativno mali broj ispitanika u obje skupine, kao i nedostatak analize MR1+MAIT CDR β repertoara u parnim uzorcima pogođenih i nepogođenih dijelova oboljele kože.

Sveukupno, ovo istraživanje donosi prve rezultate sekvenciranja TCR β repertoara MR1⁺TCRV α 7.2⁺ MAIT stanica u perifernoj krvi oboljelih od psorijaze. Dobiveni rezultati pokazuju poliklonalni spektar TRB-CDR3 sekvenci s preferencijalnom upotrebom gena TRBV29-1, TRBV11-2, TRBV7-6 i TRBV6-9 u TRB-CDR3 repertoaru oboljelih. Štoviše, otkrivena je nekolicina CDR3 peptidnih varijanti koje se pojavljuju isključivo u krvi pacijenata s psorijazom. Potvrda ostvarenih nalaza traži međutim, dodatna istraživanja većeg opsega u pogledu broja ispitanika i vrste uzoraka.

7. ZAKLJUČAK

- Klonalni repertoar TCR β lanaca TCRV α 7.2+MR1+MAIT stanica oboljelih i zdravih ispitanika je poliklonalnog karaktera s većinskom upotrebom TRBV20-1, TRBV6-4 i TRBV6-2 te TRBJ2-1, TRBJ2-7 i TRBJ2-3 gena.
- Oboljeli od psorijaze imaju značajno veću učestalost upotrebe gena TRBV29-1, TRBV11-2, TRBV7-6 i TRBV6-9 u TCR β repertoaru MR1+TCRV α 7.2+ MAIT stanica.
- Klonalna zastupljenost TRBV21-1, TRBJ1-1, TRBV11-1, TRBV28 i TRBV6-5 gena u TCR β repertoaru MAIT stanica povezana je veličinom PASI indeksa.
- U klonalnom repertoaru TCR β lanaca TCRV α 7.2+MR1+MAIT stanica oboljelih od psorijaze otkrivene su specifične CDR3 peptidne varijante.

8. SAŽETAK

Uvod: Psorijaza je kronična, autoimuna bolest kože s jakom genskom podlogom. MAIT stanice su nekonvencionalni limfociti T uključeni u imunski odgovor u psorijazi. One izražavaju semi-invarijantni TCRV α 7.2 β receptor, koji prepoznaje nepeptidne antigene u kompleksu s MR1 receptorom. Aktivirane MAIT stanice luče citokine IL-17, IFN- γ i TNF- α pokazujući citotoksična svojstva.

Ciljevi istraživanja: Istražiti i usporediti repertoar, identificirati oligoklonalne varijante β -TCR klonotipova perifernih TCRV α 7.2+MR1+ MAIT stanica te ustanoviti njihovu povezanost s težinom i obilježjima bolesti.

Materijali i metode: Istraživanjem su prikupljeni uzorci periferne krvi 10 oboljelih (PV) i 10 zdravih (CTRL) ispitanika. Sortirane linije perifernih TCRV α 7.2+MR1+ MAIT stanica su kvantificirane („Qubit™ RNA HS Assay Kit“), razrijeđene te je sekvenciranje (Illumina® MiniSeq™) provedeno nakon pripreme NGS knjižnice. Podatci su obrađeni i analizirani primjenom MIXCR, Immunarch i VDJTools alata.

Rezultati: U usporedbi sa zdravim ispitanicima, oboljeli od psorijaze imaju značajno veću učestalost upotrebe gena TRBV29-1, TRBV11-2, TRBV7-6 i TRBV6-9 u repertoaru TCR β lanaca MAIT stanica. Zabilježena je povezanost veličine PASI indeksa i klonalne zastupljenosti TRBV21-1, TRBJ1-1, TRBV11-1, TRBV28 i TRBV6-5 gena.

Zaključak: Oboljeli od psorijaze pokazuju veću učestalost upotrebe gena TRBV29-1, TRBV11-2, TRBV7-6 i TRBV6-9 u klonalnom repertoaru TCR β lanaca MAIT stanica. Klonalna zastupljenost TRBV21-1, TRBJ1-1, TRBV11-1, TRBV28 i TRBV6-5 gena u psorijazi povezana je s težinom oboljenja.

Ključne riječi: psorijaza; RNA-Seq; sluznicama pridružene invarijantne T stanice; T-stanični receptor

9. SUMMARY

ANALYSIS OF T CELL RECEPTOR BETA CHAIN DIVERSITY IN TCRVALPHA7.2+ MR1+ MAIT CELLS OF PSORIASIS VULGARIS PATIENTS USING RNASEQ METHODOLOGY

Introduction: Psoriasis is chronic, autoimmune skin disease with strong genetic background. MAIT cells are unconventional T lymphocytes involved in immune response in psoriasis. They express semi-invariant TCRV α 7.2 β receptor which recognizes non-peptid antigens presented by MR1. Upon activation, they secrete cytokines IL-17, IFN- γ and TNF- α suggesting cytotoxic effector function.

Objectives: To explore and compare β -TCR clonotype of peripheral TCRV α 7.2+MR1+ MAIT cell repertoire, identify oligoclonal variants and determine their association with clinical features and severity of psoriasis.

Materials and methods: Peripheral blood was collected from 10 PV patients and 10 healthy controls. TCRV α 7.2+MR1+ MAIT sorted cells were quantified with Qubit™ RNA HS Assay Kit, diluted and sequenced on Illumina® MiniSeq™ after preparing NGS library. MiXCR, Immunarch and VDJTools were used for data analysis.

Results: Compared to the control subjects, PV patients have had significantly increased TRBV29-1, TRBV11-2, TRBV7-6 and TRBV6-9 gene usage in MAIT cell TCR β repertoire. Significant correlation has been observed between PASI and TRBV21-1, TRBJ1-1, TRBV11-1, TRBV28 and TRBV6-5 genes clonal distribution.

Conclusion: PV patients have shown increased TRBV29-1, TRBV11-2, TRBV7-6 and TRBV6-9 gene usage in MAIT cell TCR β repertoire. Clonal distribution of TRBV21-1, TRBJ1-1, TRBV11-1, TRBV28 and TRBV6-5 genes in psoriasis was associated with disease severity.

Key words: mucosal-associated invariant T cells; psoriasis; RNA-Seq; T-cell receptor

10. LITERATURA

1. Griffiths CEM, Armstrong AW, Gudjonsson JE, Barker JNWN. Psoriasis. *The Lancet*. 2021;397:1301-1315
2. McCormick T, Ayala-Fontanez N, Soler D. Current knowledge on psoriasis and autoimmune diseases. *Psoriasis: Targets and Therapy*. 2016;6:7-32
3. Kaštelan M. Psorijaza. *Reumatizam*. 2017;64:31-36
4. Kimmel GW, Lebwohl M. Psoriasis: Overview and Diagnosis. U: Bhutani T, Liao W, Nakamura M, urednici. *Evidence-based Psoriasis*. Cham: Springer; 2018. str. 1–16.
5. Matos TR, O'Malley JT, Lowry EL, Hamm D, Kirsch IR, Robins HS i sur. Clinically resolved psoriatic lesions contain psoriasis-specific IL-17-producing $\alpha\beta$ T cell clones. *J. Clin. Investig.* 2017;127(11):4031–41
6. Benhadou F, Mintoff Di, del Marmol V. Psoriasis: Keratinocytes or Immune Cells - Which Is the Trigger? *Dermatology*. 2019;235:91–100
7. Gupta R, Debbaneh MG, Liao W. Genetic Epidemiology of Psoriasis. *Curr. Dermatol. Rep.* 2014; 3:61–78
8. Schön MP. Adaptive and Innate Immunity in Psoriasis and Other Inflammatory Disorders. *Front. Immunol.* 2019;10-1764
9. Capon F. The genetic basis of psoriasis. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18:2526
10. Gudjonsson JE, Karason A, Runarsdottir EH, Antonsdottir AA, Hauksson VB, Jónsson HH i sur. Distinct clinical differences between HLA-Cw*0602 positive and negative psoriasis patients - An analysis of 1019 HLA-C- and HLA-B-typed patients. *J. Invest. Dermatol.* 2006;126(4):740–5
11. Dand N, Mahil SK, Capon F, Smith CH, Simpson MA, Barker JN. Psoriasis and genetics. *Acta Derm Venereol.* 2020; 100:54–64
12. Niehues H, van Vlijmen-Willems IMJJ, Bergboer JGM, Kersten FFJ, Narita M, Hendriks WJAJ i sur. Late cornified envelope (LCE) proteins: Distinct expression patterns of LCE2 and LCE3 members suggest nonredundant roles in human epidermis and other epithelia. *Br. J. Dermatol.* 2016; 174:795–802
13. Roszkiewicz M, Dopytalska K, Szymańska E, Jakimiuk A, Walecka I. Environmental risk factors and epigenetic alternations in psoriasis. *Ann Agric Environ Med.* 2020; 27: 335–42
14. Lee E, Wu K, Lee M, Bhutani T, Wu J. Psoriasis risk factors and triggers. *Cutis.* 2018;102:18-20

15. Alpalhão M, Borges-Costa J, Filipe P. Psoriasis in HIV infection: an update. *Int. J. STD AIDS*. 2019;30:596–604.
16. Jensen P, Skov L. Psoriasis and Obesity. *Dermatology*. 2017;232:633–9
17. Kanda N, Hoashi T, Saeki H. Nutrition and psoriasis. *Int. J. Mol. Sci*. 2020;21:1–19
18. Balak D, Hajdarbegovic E. Drug-induced psoriasis: clinical perspectives. *Psoriasis*. 2017;7:87–94
19. Kurtovic NO, Halilovic EK. Serum Concentrations of Interferon Gamma (IFN- γ) in Patients with Psoriasis: Correlation with Clinical Type and Severity of the Disease. *Med Arch*. 2018;72(6):410–3
20. Prinz JC. The role of T cells in psoriasis. *JEADV*. 2003;17:257–270
21. Roberts S, Girardi M. Conventional and unconventional T cells. U: Gaspari AA, urednik. *Clinical and Basic Immunodermatology*. Springer; 2004. str. 85-104
22. Dusseaux M, Martin E, Serriari N, Pé Guillet I, Premel V, Louis D i sur. Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17 secreting T cells. *Blood*. 2011;117(4):1250–9
23. Gherardin NA, Souter MNT, Koay HF, Mangas KM, Seemann T, Stinear TP i sur. Human blood MAIT cell subsets defined using MR1 tetramers. *Immunol Cell Biol*. 2018;96(5):507–25
24. Ussher JE, Klenerman P, Willberg CB. Mucosal-associated invariant T-cells: New players in anti-bacterial immunity. *Front. Immunol*. 2014;5:450
25. Corbett AJ, Awad W, Wang H, Chen Z. Antigen Recognition by MR1-Reactive T Cells; MAIT Cells, Metabolites, and Remaining Mysteries. *Front. Immunol*. 2020;11:1961
26. Ussher JE, Bilton M, Attwod E, Shadwell J, Richardson R, de Lara C i sur. CD161⁺⁺CD8⁺ T cells, including the MAIT cell subset, are specifically activated by IL-12+IL-18 in a TCR-independent manner. *Eur J Immunol*. 2014;44:195–203
27. Tastan C, Karhan E, Zhou W, Fleming E, Voigt AY, Yao X i sur. Tuning of human MAIT cell activation by commensal bacteria species and MR1-dependent T-cell presentation. *Mucosal Immunol*. 2018;11(6):1591–605
28. Held K, Beltrán E, Moser M, Hohlfield R, Dornmair K. T-cell receptor repertoire of human peripheral CD161hiTRAV1-2⁺ MAIT cells revealed by next generation sequencing and single cell analysis. *Hum Immunol*. 2015;76(9):607–14
29. Souter MNT, Loh L, Li S, Meehan BS, Gherardin NA, Godfrey DI i sur. Characterization of Human Mucosal-associated Invariant T (MAIT) Cells. *Curr Protoc Immunol*. 2019;1:127(1)

30. Plužarić V, Štefanić M, Mihalj M, Tolušić Levak M, Muršić I, Glavaš-Obrovac L i sur. Differential Skewing of Circulating MR1-Restricted and $\gamma\delta$ T Cells in Human Psoriasis Vulgaris. *Front Immunol.* 2020;11:572924
31. Teunissen MBM, Yeremenko NG, Baeten DLP, Chielie S, Spuls PI, de Rie MA i sur. The IL-17A-producing CD8 + T-cell population in psoriatic lesional skin comprises mucosa-associated invariant t cells and conventional t cells. *J. Invest. Dermatol.* 2014;134:2898–907
32. Andres I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M i sur. *Imunologija*. 7.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010
33. The international ImMunoGeneTics information system. Locus and genes. Dostupno na adresi: <https://www.imgt.org/IMGTrepertoire/LocusGenes/#B>. Datum pristupa: 04.09.2022.
34. 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):120682
35. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Osnove imunologije*. 5.izd. Split: Medicinski fakultet; 2017
36. Laydon DJ, Bangham CRM, Asquith B. Estimating T-cell repertoire diversity: Limitations of classical estimators and a new approach. *Biol.* 2015;370(1675)
37. Reantragoon R, Corbett AJ, Sakala IG, Gherardin NA, Furness JB, Chen Z i sur. Antigen-loaded MR1 tetramers define T cell receptor heterogeneity in mucosal-associated invariant T cells. *J. Exp. Med.* 2013;210(11):2305–20
38. Lepore M, Kalinichenko A, Colone A, Paleja B, Singhal A, Tschumi A i sur. Parallel T-cell clonality and deep sequencing of human MAIT cells reveal stable oligoclonal TCR β 2 repertoire. *Nat Commun.* 2014;5
39. Valkiers S, de Vrij N, Gielis S, Verbandt S, Ogunjimi B, Laukens K i sur. Recent advances in T-cell receptor repertoire analysis: Bridging the gap with multimodal single-cell RNA sequencing. *ImmunoInformatics.* 2022;5:100009
40. Hou XL, Wang L, Ding YL, Xie Q, Diao HY. Current status and recent advances of next generation sequencing techniques in immunological repertoire. *Genes Immun.* 2016; 17(3):153–64
41. 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

42. Cao X, Wa Q, Wang Q, Li L, Liu X, An L i sur. High throughput sequencing reveals the diversity of TRB-CDR3 repertoire in patients with psoriasis vulgaris. *Int Immunopharmacol.* 2016;40:487–91
43. Marušić M i sur. Uvod u znanstveni rad u medicini. 5.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2013
44. Wolf S, Supatto W, Debrégeas G, Mahou P, Kruglik SG, Sintès JM i sur. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nat. Methods*; 2015;12:379–80
45. Chao A, Gotelli NJ, Hsieh TC, Sander EL, Ma KH, Colwell RK i sur. Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecol. Monogr.* 2014;84:45-67
46. Efron B, Thisted R. Estimating the Number of Unseen Species: How many words did Shakespeare know. *Biometrika.* 1976;63:435-447
47. Chao A. Non-parametric estimation of the classes in a population. *Scand. J. Stat.* 1984;11:265-270
48. Han J. Immunodiversity assessment method and its use. US20120183969 USA. 2012

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Zvonimir Grgić

Datum i mjesto rođenja: 23. srpnja 1997., Osijek, Hrvatska

Adresa: Branka Radičevića 83, 31207 Tenja, Hrvatska

Mobitel: +385 995708117

E-mail adresa: zvonimir.grgic7@gmail.com

OBRAZOVANJE

2020. – 2022. Medicinski fakultet Osijek, Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

2016. – 2020. Medicinski fakultet Osijek, Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

2012. – 2016. Prva gimnazija Osijek

2004. – 2012. Osnovna škola Tenja

OSTALO

Jezici: Engleski, njemački (B1 razina – DSD)

2019. – 2021. Član studentskog zbora i fakultetskog vijeća MEFOS

Voditelj radionice na međunarodnom kongresu translacijske medicine studenata biomedicinskih znanosti i mladih liječnika „OSCON 2020” (Osijek, Hrvatska)

2019. Aktivni sudionik na „5th International Cholnoky Symposium“ (Pečuh, Mađarska) – poster