

5. kongres Strukovnog razreda za medicinsko-laboratorijsku
djelatnost Hrvatske komore zdravstvenih radnika

Analiza repertoara T-staničnih receptora primjenom metode sekvenciranja nove generacije (NGS)

RNA-Seq analiza repertoara TCR-a MAIT i $\gamma\delta$ T limfocita oboljelih od psorijaze vulgaris

Maja Jirouš Drulak¹, Kristina Glavaš², Vera Plužarić³, Barbara
Viljetić¹, Teuta Opačak-Bernardi¹, Marija Šola³, Maja Tolušić
Levak^{3,4}, Mario Štefanić⁵, Ljubica Glavaš-Obrovac¹, Stana Tokić⁶

¹ Katedra za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju, Medicinski fakultet Osijek

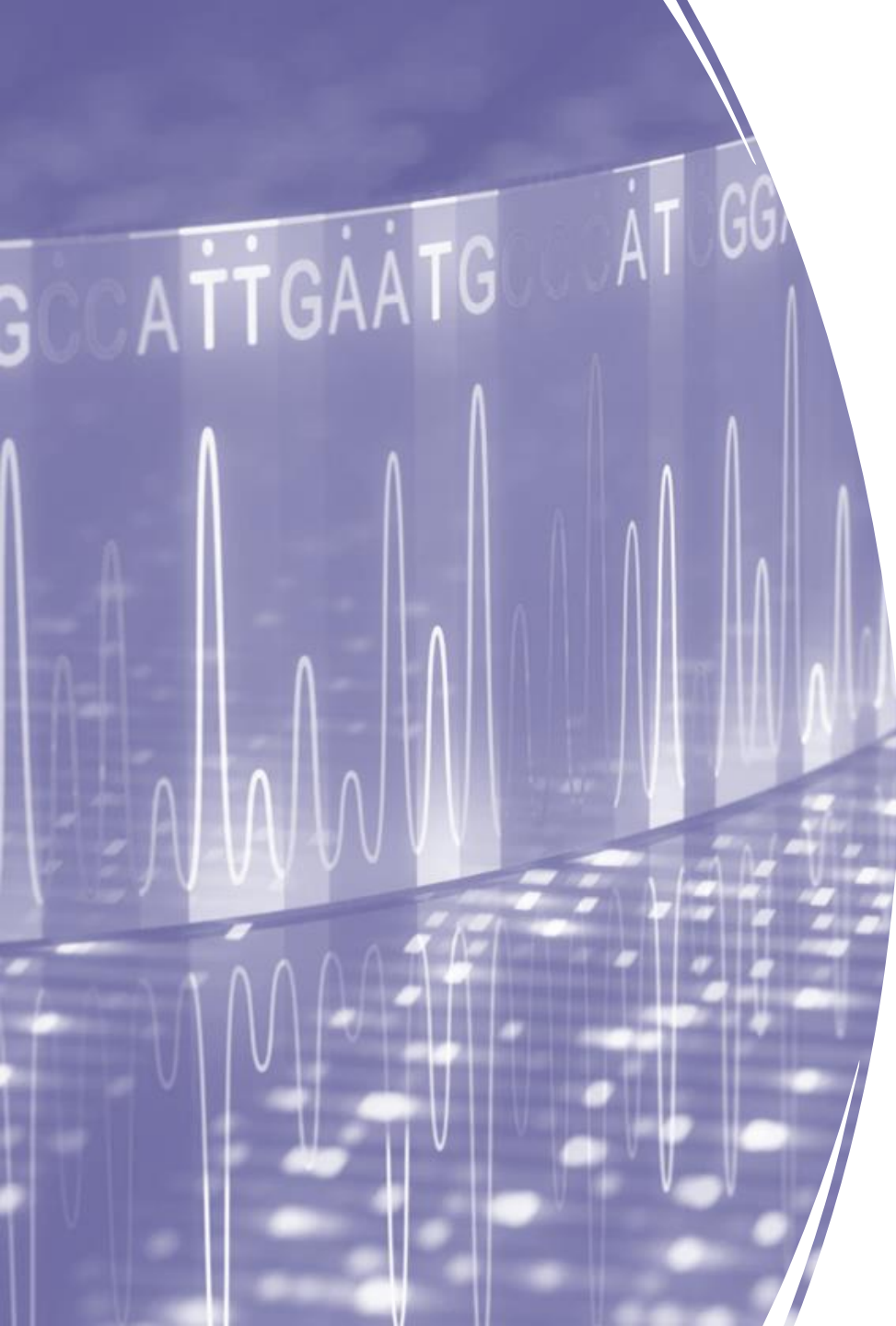
² Klinički zavod za transfuzijsku medicinu, KBC Osijek

³ Zavod za dermatologiju i venerologiju, KBC Osijek

⁴ Katedra za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet Osijek

⁵ Katedra za nuklearnu medicinu i onkologiju, Medicinski fakultet Osijek

⁶ Katedra za laboratorijsku medicinu i farmaciju, Medicinski fakultet Osijek



Što je NGS?

- eng. next generation sequencing ili sekvenciranje nove generacije
- određivanje redoslijeda nukleotida u genomu ili ciljanim regijama DNA/RNA
- brzo i istovremeno sekvenciranje velike količine genetskog materijala → masovno paralelno sekvenciranja milijuna kratkih fragmenata DNA
- velika preciznost i pouzdanost
- revolucionirao područje istraživanja i dijagnostike

Prednosti i primjena NGS-a u dijagnostici

NGS omogućava

- analizu velikog broja ciljanih gena,
- detekciju novih mutacija,
- veću osjetljivost = kvantifikacija rijetkih varijanti i transkripata

... na velikom broju uzoraka te na rezoluciji jedne baze!

Primjena:

- maligna oboljenja, rijetke nasljedne bolesti
- farmakogenomika
- HLA tipizacija
- molekularna mikrobiologija
- prenatalno testiranje (cfDNA)
- nove mutacije, personalizirano liječenje...
- **Usmjerenost imunološkog odgovora – analiza imunološkog repertoara**



Što je imunološki repertoar?

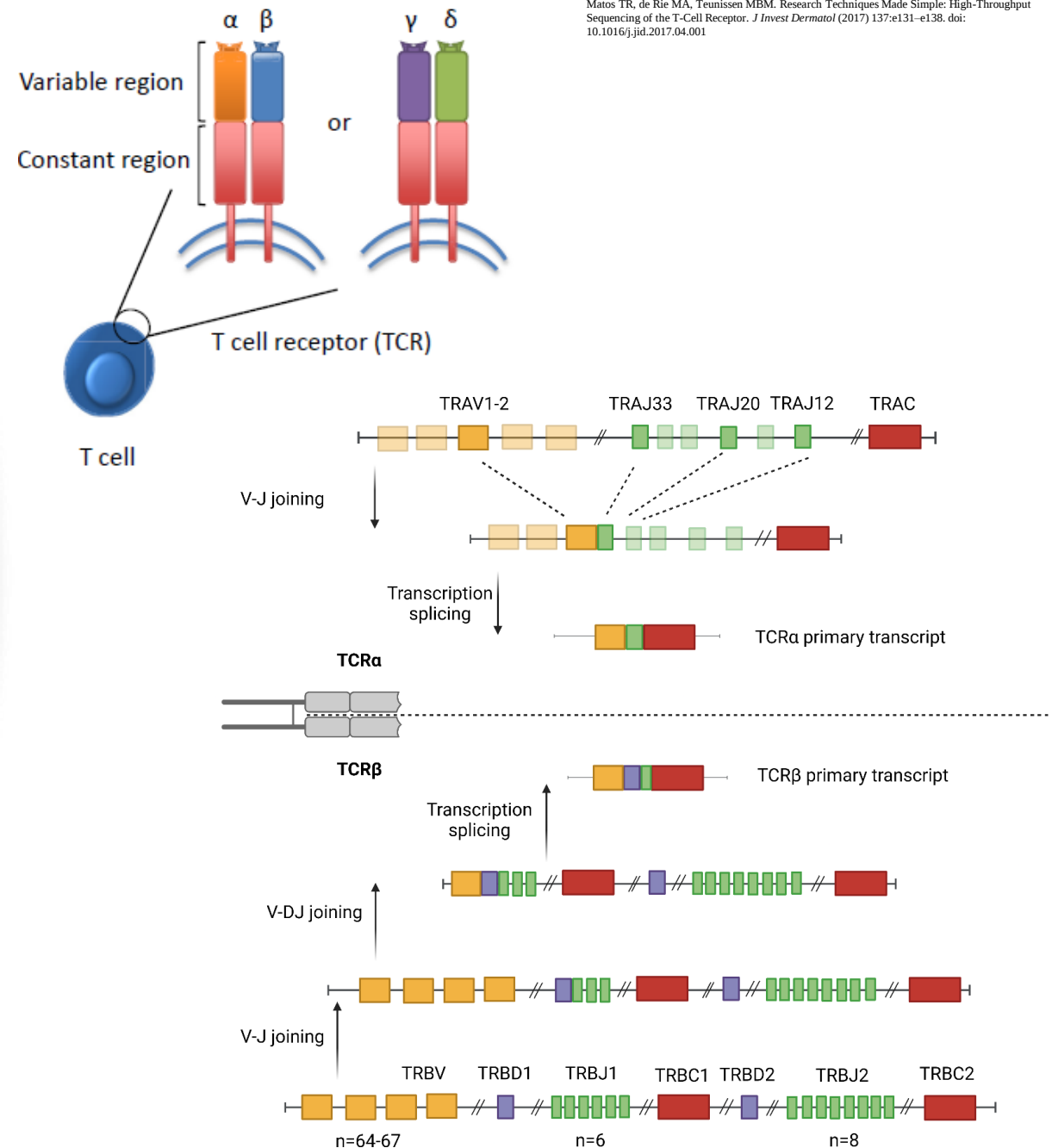
Skup svih receptora T i B limfocita (TCR/BCR)

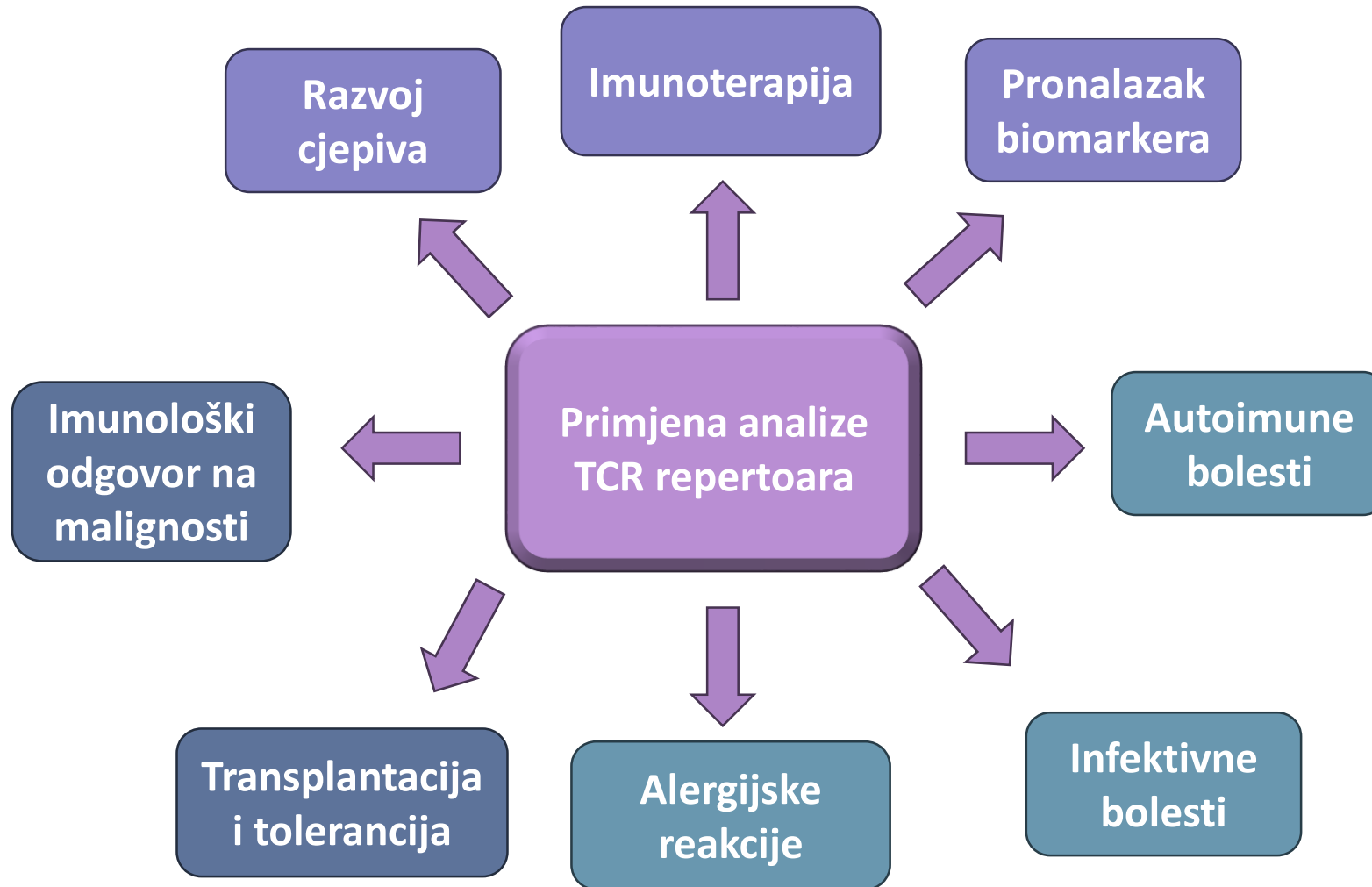
Količina raznolikosti u imunološkom repertoaru odražava sposobnost imunološkog sustava da odgovori na bolest

Profil imunološkog repertoara mijenja se u bolesti

T-stanični receptori (TCR)

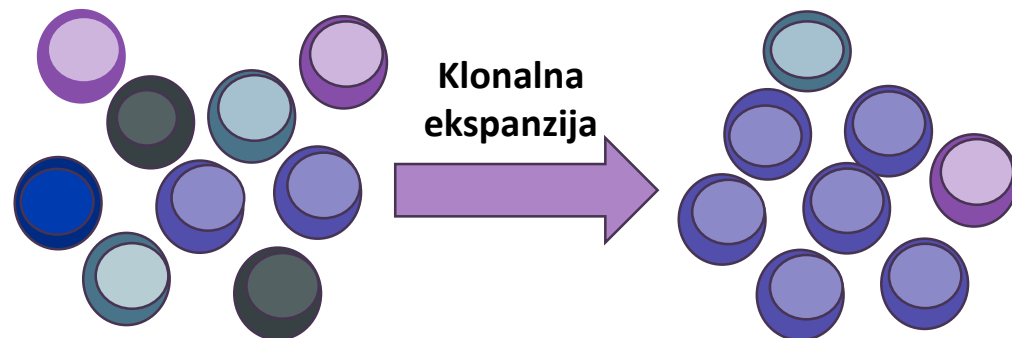
- Molekule izražene na površini T limfocita
- Omogućuju specifično prepoznavanje antigena (epitopa)
- Jedinstveni svakom T limfocitu (klonu)
- Građeni od kombinacije α i β ($\alpha\beta$ TCR) lanca ili γ i δ lanca ($\gamma\delta$ TCR)
- **V(D)J rekombinacija** omogućava izrazitu raznolikost kombinacija TCR $\rightarrow 10^{20}$!
- **CDR3** regija - izravna interakcija s antigenom, visoka varijabilnost
- **Klonotip** $\rightarrow$ jedinstvena nukleotidna sekvenca koja nastaje tijekom procesa V(D)J rekombinacije





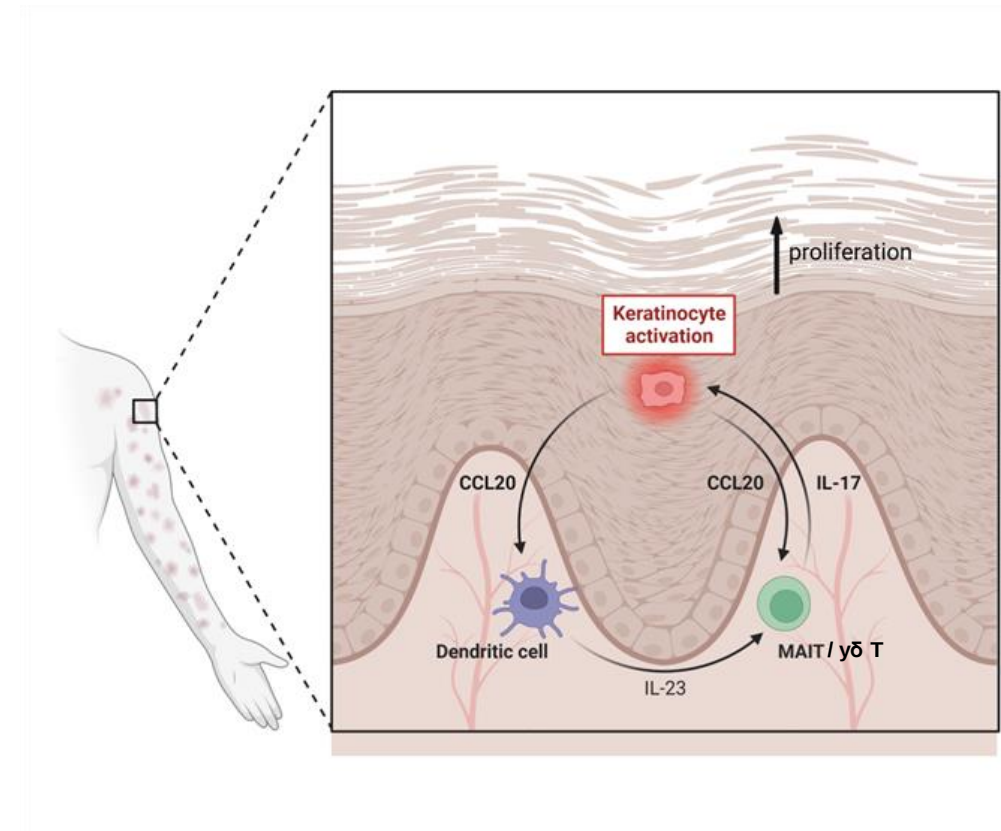
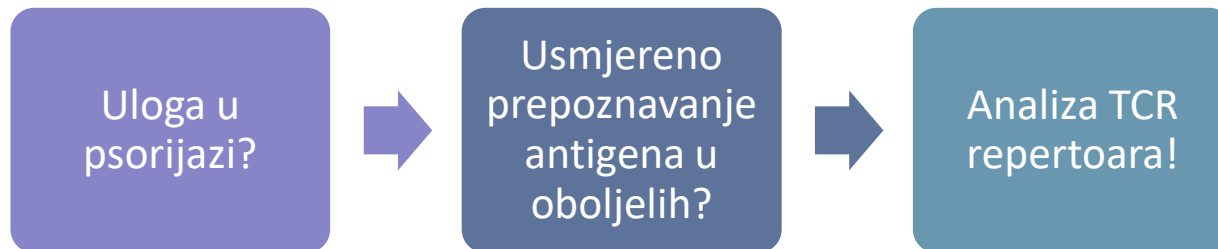
Primjena analize repertoara TCR-a u dijagnostici autoimunih bolesti

- Immunološki profili oboljelih pokazuju specifične obrasce:
 - smanjena raznolikost
 - promijenjeni obrasci ekspresije *TCR-V/J* gena
 - specifični klonotipovi



RNASeq analiza repertoara TCR-a MAIT i $\gamma\delta$ T limfocita oboljelih od psorijaze vulgaris

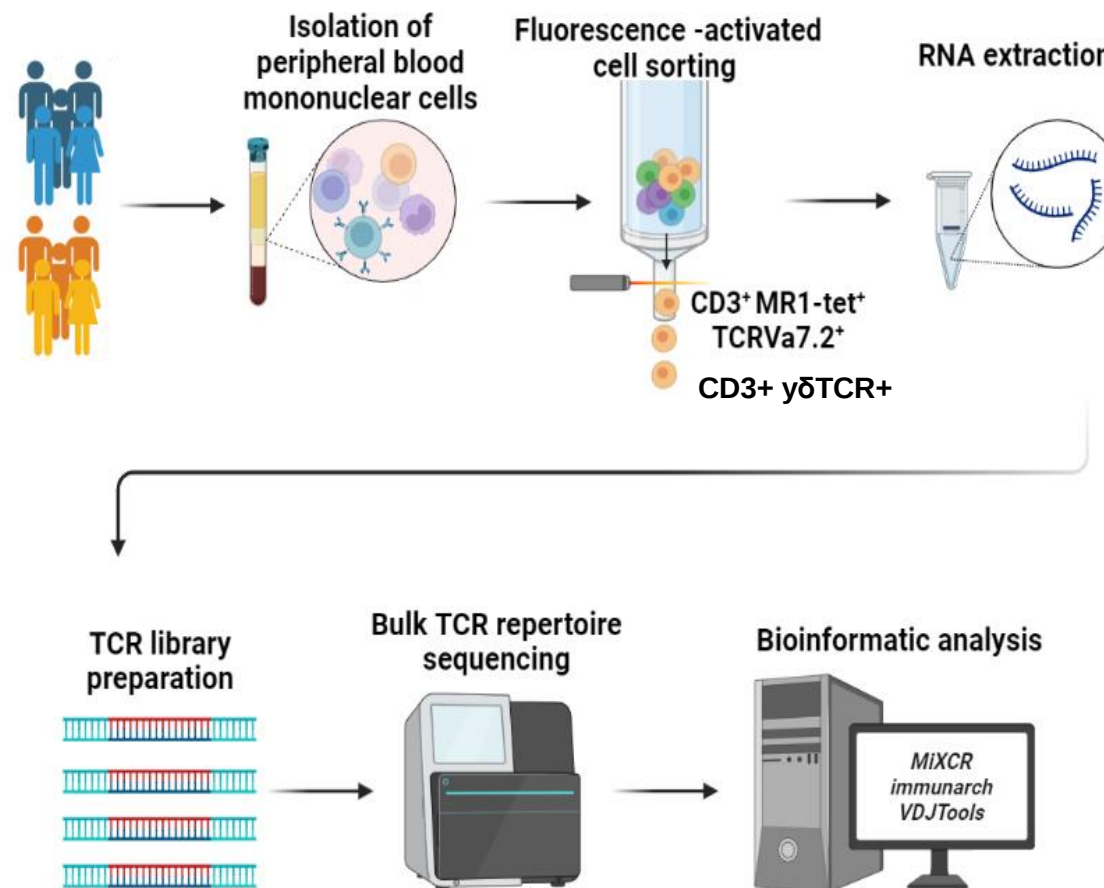
- Psorijaza → kronična autoupalna bolest kože posredovana T limfocitima
- **MAIT i $\gamma\delta$ T limfociti** - „nekonvencionalni” T limfociti
 - Prepoznaju nepeptidne antigene
 - Najzastupljeniji u epitelnim barijerama (probavni, dišni trakt, sluznice, jetra, koža)



Izazov – 1-10 % ukupnih
perifernih T limfocita; <5%
u koži

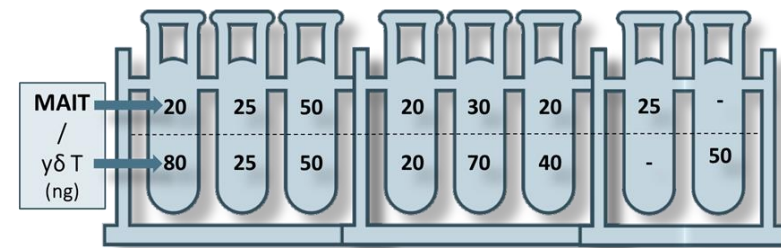


Pristup – sortiranje
(fluorescencijom-aktivirano
protočno sortiranje)

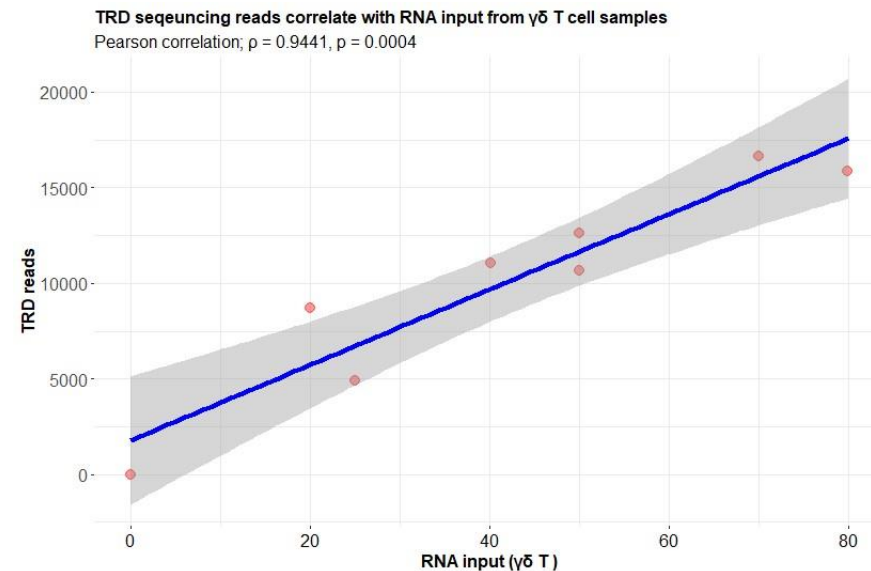
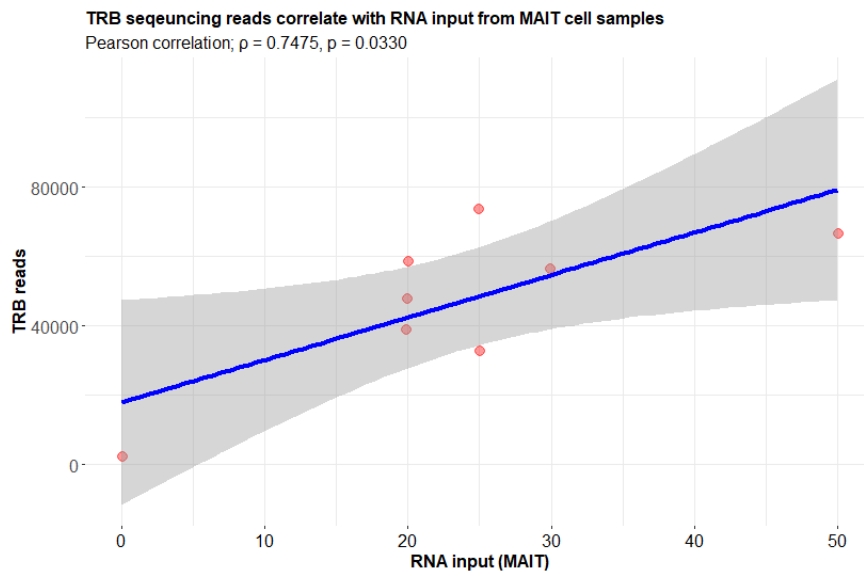
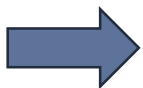


Istovremeno sekvenciranje TCR- $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ lanaca – utjecaj različitih početnih koncentracija RNA te *pooliranja* MAIT i $\gamma\delta$ T RNA uzoraka

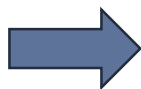
- 8 uzoraka RNA protočno-sortiranih perifernih MAIT i $\gamma\delta$ T stanica različitih početnih koncentracija i omjera (MAIT/ $\gamma\delta$ T)
- Archer® Immunoverse™ TCR Kit – priprema knjižnica
- Illumina Miniseq sequencer
- Archer Analysis Software + VDJTools – bioinformatička analiza



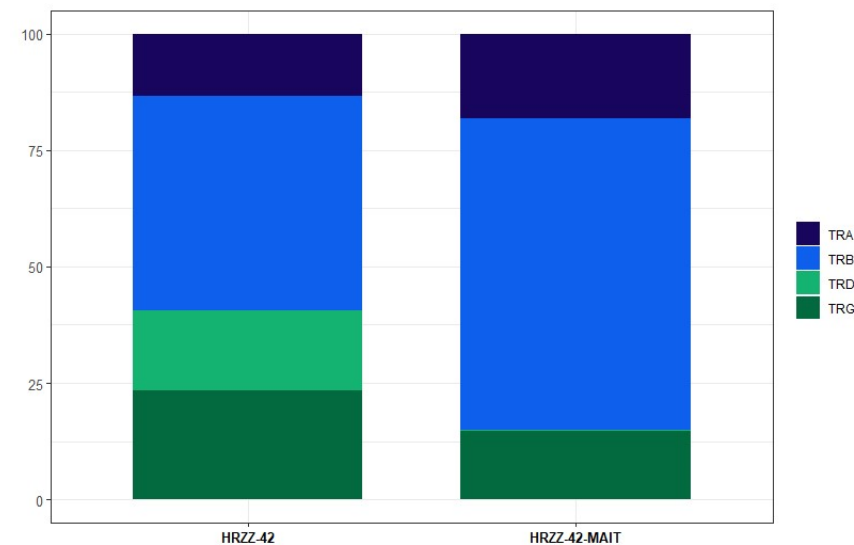
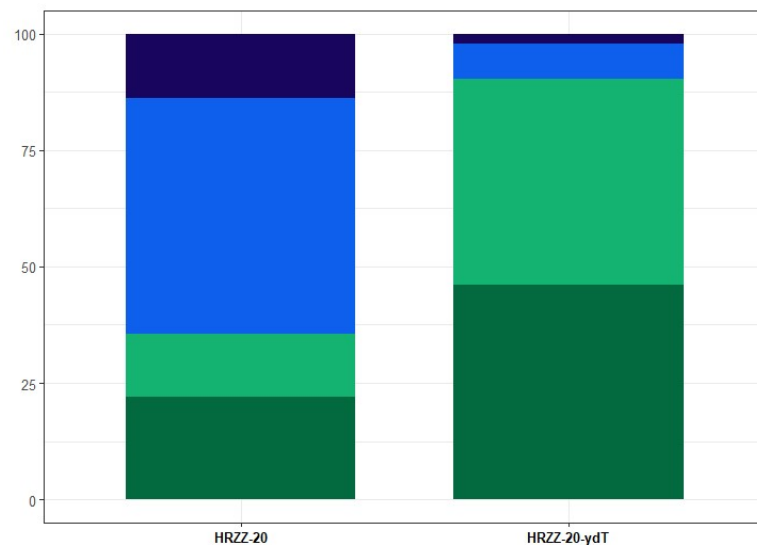
RNA input korelirao je s brojem TRB/TRG/TRD transkripata



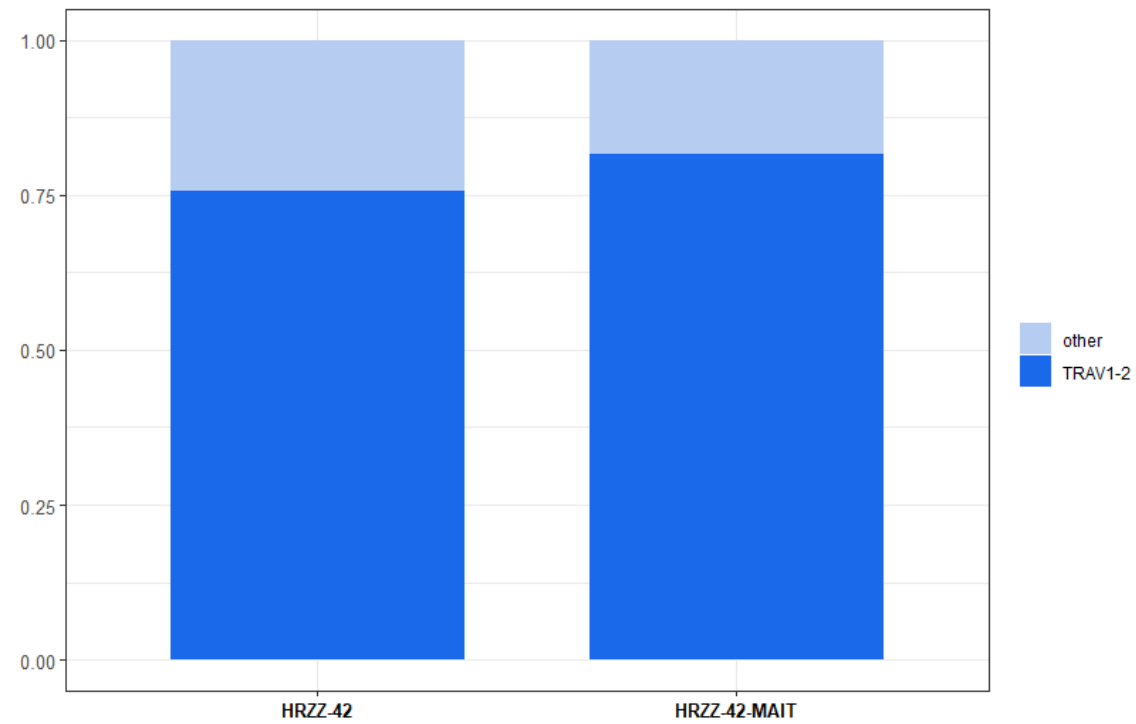
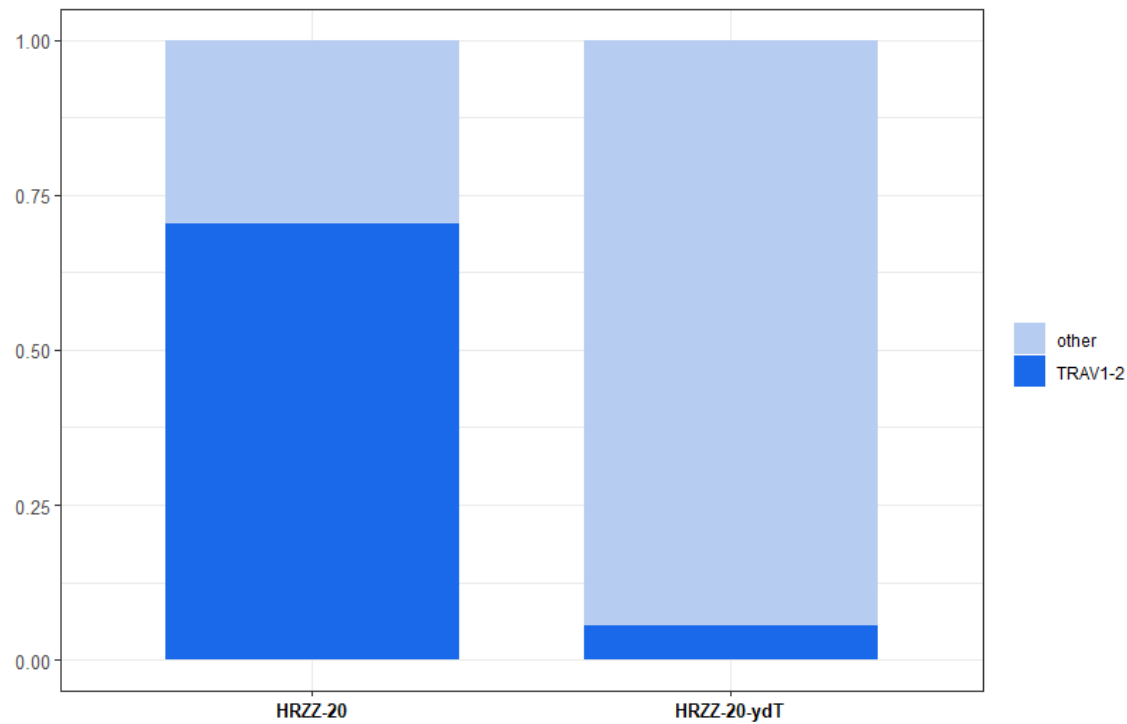
TRA i TRB transkripti činili ~ 9% $\gamma\delta$ TCR knjižnice



20 % readova u MAIT uzorku čine TRG i TRD varijante



„kontaminirajući” transkripti – non-TRAV1-2 varijante →
transkripti konvencionalnih $\alpha\beta$ T limfocita



Zaključno

Sortiranje rijetko zastupljenih limfocitnih populacija zahtijeva metodu koja osigurava visoku osjetljivost i specifičnost



Za pouzdanu *bulk* RNA-Seq analizu nužna je zasebna analiza TCR- α , - β , - γ , - δ repertoara u sortiranim MAIT i $\gamma\delta$ T stanicama, uz korištenje ograničenih količina RNA



Single-cell RNA-Seq predstavlja napredniji pristup u analizi TCR-a rijetko zastupljenih limfocitnih vrsta

ZAHVALA

- Projektni tim „NGS analiza transkriptoma MAIT i $\gamma\delta$ T limfocita: fenotip, funkcija i raznolikost TCR klonova u podlozi razvoja vulgarne psorijaze”
 - Voditeljica: izv. prof. dr. sc. Stana Tokić
 - Doc. dr. sc. Barbara Viljetić
 - Doc. dr. sc. Teuta Opačak-Bernardi
 - Dr.sc. Vera Plužarić
 - Dr.sc. Maja Tolušić Levak
 - Marija Šola, dr.med.
- Medicinski fakultet u Pečuhu, Katedra za imunologiju i biotehnologiju / Szentágothai Research Center
 - Prof. dr.sc. Peter Balogh
 - Dr.sc Erzsébet Emilia Gajdócsi
 - Dr.sc. David Ernszt
 - Noémi Balázs
- Katedra za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta u Osijeku
 - Predsjednica: prof. dr.sc. Ljubica Glavaš-Obrovac



Projekt je financiran od strane Hrvatske zaklade za znanost (UIP-2019-04-3494)

