

**Masarykova univerzita**

**Přírodovědecká fakulta**

Ústav biochemie

**FUNKČNÍ A GENOMICKÉ VLASTNOSTI  
 $\gamma\delta$  KLONŮ T LYMFOCYTŮ**

Diplomová práce

**Bc. Magdaléna Dvořáková**

Školitel: RNDr. Irena Koutná, Ph.D.

Centrum analýzy biomedicínského obrazu

Masarykova univerzita, ILBIT 3A, Kamenice 3, Brno

**Brno 2009**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci „Funkční a genomické vlastnosti  $\gamma\delta$  klonů T lymfocytů“ vypracovala samostatně, pouze s pomocí uvedené literatury.

Bc. Magdaléna Dvořáková

Ráda bych poděkovala RNDr. Ireně Koutné, Ph. D. za to, že mi umožnila provedení této práce v Centru analýzy biomedicínského obrazu, za vedení a poskytnutí mnoha cenných rad. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Lence Tesařové za pomoc při práci v laboratoři a všem členům naší skupiny za vytvoření příjemné pracovní atmosféry. Velké poděkování za podporu při studiu patří celé mé rodině.

# Obsah

1	Teoretický úvod .....	9
1.1	Imunitní systém.....	9
1.1.1	Druhy imunitních mechanismů.....	9
1.1.1.1	Vrozená imunita .....	10
1.1.1.2	Adaptivní imunita .....	10
1.1.2	Funkce imunitního systému.....	11
1.2	Hematopoéza .....	11
1.3	Gama/delta T lymfocyty.....	13
1.3.1	Vznik a vývoj $\gamma\delta$ T lymfocytů.....	13
1.3.2	Struktura $\gamma\delta$ TCR.....	15
1.3.3	Rozdělení rodin.....	18
1.3.3.1	Gama rodina.....	18
1.3.3.2	Delta rodina.....	20
1.3.4	Výskyt.....	22
1.3.5	Vlastnosti.....	22
1.3.6	Klinický význam .....	25
1.3.6.1	Onemocnění.....	25
1.3.6.2	Transplantace kostní dřeně.....	27
1.4	Metody detekce a studia $\gamma\delta$ T lymfocytů z periferní krve.....	28
1.4.1	Southern a Northern Blot analýza hybridizace.....	28
1.4.1.1	Princip metody.....	28
1.4.1.2	Využití pro detekci a studium $\gamma\delta$ T lymfocyty .....	29
1.4.2	Průtoková cytometrie, FACS.....	30
1.4.2.1	Princip metody.....	30
1.4.2.2	Využití pro detekci a studium $\gamma\delta$ T lymfocyty .....	31
1.4.3	PCR.....	32
1.4.3.1	Princip metody.....	32
1.4.3.2	Využití pro detekci a studium $\gamma\delta$ T lymfocyty .....	32

2	Cíle práce.....	34
3	Materiál a metody .....	35
3.1	Získ periferní krve.....	35
3.2	Zpracování periferní krve .....	35
3.2.1	Získ mononukleárních buněk .....	35
3.2.2	Odstranění erytrocytů .....	36
3.2.3	Izolace $\gamma\delta$ T lymfocytů .....	36
3.2.3.1	Magnetické značení .....	36
3.2.3.2	Magnetická separace .....	36
3.2.4	Izolace total RNA .....	37
3.2.4.1	RNAqueous®-Micro Kit .....	37
3.2.4.2	RNeasy® Mini Kit .....	38
3.3	Amplifikace RNA .....	39
3.4	Zpětná transkripce, syntéza cDNA .....	39
3.5	PCR.....	39
3.6	Elektroforéza PCR produktů .....	41
3.6.1	Klasická elektroforéza .....	41
3.6.1.1	Příprava 2% gelu.....	41
3.6.1.2	Příprava vzorků a žebříčku.....	41
3.6.1.3	Vlastní elektroforéza .....	41
3.6.1.4	Vyhodnocení elektroforézy .....	41
3.6.2	Elektroforéza na čipu – Bioanalyzátor Agilent 2100 .....	41
3.6.2.1	Vkládání Gel-Dye Mix .....	42
3.6.2.2	Vkládání markerů.....	42
3.6.2.3	Vkládání žebříčku a vzorků.....	42
3.7	Statistická analýza .....	43
4	Výsledky.....	44
4.1	Optimalizace metody PCR pro profilování $\gamma\delta$ T lymfocytů.....	44
4.2	Kvantifikace získaných dat.....	65
5	Diskuze .....	68

5.1	Referenční skupina.....	68
5.2	Porovnání průměrných expresních profilů $\gamma\delta$ T lymfocytů pacientů s onkologickým onemocněním a zdravých jedinců .....	69
6	Souhrn.....	72
7	Summary .....	73
8	Literatura.....	74

## Seznam zkratk

APC	buňka nabízející antigen (antigen-presenting cell)
APM	molekula nabízející antigen (antigen-presenting molecules)
BAL	bronchoalveolární laváž (bronchoalveolar lavage)
BCR	B buněčný (lymfocytový) receptor (B cell receptor)
bp	pár bazí (base pair)
C doména	konstantní doména
C oblast	konstantní oblast
CCR	CC chemokinový receptor (chemokine (C-C motif) receptor)
CD	diferenční skupina (cluster of differentiation)
CD45RO	izoforma CD45
cDNA	komplementární DNA (complementary DNA)
CDR	oblast určující komplementaritu (complementarity determining region)
CXCR	CXC chemokinový receptor (chemokine (C-X-C motif) receptor)
D oblast	diverzifikační oblast
DN	dvojitě negativní (double negative)
dNTP	deoxynukleosidtrifosfát
DP	dvojitě pozitivní (double positive)
dsDNA	dvouvláknová DNA (double-stranded DNA)
DTT	dithiotreitol

EtBr	ethidium bromid
Fab fragment	oblast protilátky vázající antigen (fragment antigen binding)
FACS	třídění fluorescenčně aktivovaných buněk (fluorescence-activated cell sorter)
g	gravitační konstanta
GvHD	reakce štěpu proti hostiteli (graft versus host disease)
GvL	reakce štěpu proti leukémii (graft versus leukemia)
H řetězec	těžký řetězec imunoglobulinu
HLA	hlavní histokompatibilní komplex u člověka (human leucocyte antigens)
hsp	protein indukovaný teplem (heat shock protein)
IEL	intraepiteliální lymfocyty (intraepithelial lymphocytes)
IFN	interferon
IL	interleukin
J oblast	spojovací oblast
KIR molekula	killer inhibitory receptor molekula
L řetězec	lehký řetězec imunoglobulinu
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
MICA/MICB	proteiny blízké MHC I (MHC class I polypeptide-related sequence A/ MHC class I polypeptide-related sequence B)
MNC	mononukleární buňky (mononuclear cells)
mRNA	mediátorová RNA (messenger RNA)
NK buňka	natural killer buňka
NK/LAK buňka	natural killer/lymphokine-activated killer buňka
NKT buňka	Natural killer T buňka
PCR	polymerasova řetězová reakce (polymerase chain reaction)
rpm	otáčky za minutu (revolutions per minute)
RSS	rekombinační signální sekvence
RT	laboratorní teplota (room temperature)
RTasa	zpětná transkriptasa
RT-PCR	zpětná PCR (reverse transcription PCR)
SD	směrodatná odchylka (standard deviation)
SP	jednoduše pozitivní (single positive)

$t_a$	teplota pro připojení primeru (annealing temperature)
TCR	T buněčný (lymfocytový) receptor (T cell receptor)
TCRAV	variabilní oblast $\alpha$ řetězce TCR
TCRBV	variabilní oblast $\beta$ řetězce TCR
TCRDV	variabilní oblast $\delta$ řetězce TCR
TCRGV	variabilní oblast $\gamma$ řetězce TCR
TGF	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
TIL	T lymfocyty infiltrující do nádorů (tumor-infiltrating lymphocytes)
$t_m$	teplota tání (melting temperature)
TNF	nádorový nekrotický faktor (tumor necrosis factor)
V doména	variabilní doména
V oblast	variabilní oblast



# 1 Teoretický úvod

V současné době je hlavním problémem alogenních transplantací kostní dřeně odmítnutí štěpu (reakce) a reakce štěpu proti hostiteli (GvHD). Čím jsou tyto reakce způsobeny, není dosud zcela známo, ale mají imunitní charakter a souvisí především s T lymfocyty. V této práci jsem se zaměřila na podskupinu  $\gamma\delta$  T lymfocyty a zavedli jsme profilování  $\gamma\delta$  T lymfocytů, které by mělo objasnit jejich roli při těchto reakcích. Tato práce má sloužit jako pilotní studie v oblasti profilování  $\gamma\delta$  T lymfocytů.

V teoretickém úvodu své diplomové práce uvádím základní charakteristiky imunitního systému s ohledem na  $\gamma\delta$  T lymfocyty. Následuje charakteristika těchto buněk z molekulární úrovně a klinického významu. Kapitola je zakončena stručným přehledem metodik, které se používají při studiu těchto buněk.

## 1.1 Imunitní systém

Imunitní systém je soubor molekul, buněk, tkání a orgánů, které spolu působí tak, aby zajistili imunitu a obranu organismu proti cizím organismům [1]. Má některé jedinečné vlastnosti, které ho odlišují od ostatních homeostatických systémů. Mezi tyto vlastnosti patří vysoká přesnost a rozlišování při rozpoznávání antigenů potenciálně patogenních mikroorganismů a látek z prostředí, paměť umožňující rychlejší odpověď při opětovném setkání organismu s antigenem, a reakce na antigen mnoha drahami, kdy zneškodnění antigenu může probíhat několika mechanismy. S tím souvisí přesný regulační systém buněk a jejich produktů, které udržují homeostázu a tlumí reakce organismu při jejím porušení. Hlavní funkci při těchto procesech mají lymfocyty. Jejich vznik a vývoj je součástí vzniku a vývoje krvinek, tedy procesu nazývaném hematopoéza [2].

### 1.1.1 Druhy imunitních mechanismů

Rozlišujeme dva druhy imunitních mechanismů – vrozené (nespecifické) a adaptivní (antigenně specifické).

### 1.1.1.1 Vrozená imunita

Vrozená imunita je evolučně starší a tedy přítomná u všech mnohobuněčných organismů. Vytváří se na základě genetického kódu daného organismu. Je zprostředkována buňkami, které exprimují neselektivní receptory. Reakce na patogeny je rychlá a velmi silná, ale působí krátce. Při opakované infekci reaguje v podstatě stejně, z čehož plyne, že nevytváří paměťové buňky. Nezajišťuje dlouhodobou obrannou imunitu ani autoimunitní reakce [3].

Její činnost je zajištěna:

- epitelovými bariérami: pokožka a sliznice, které tvoří fyzickou bariéru mezi organismem a prostředím; produkují defensiny, což jsou peptidy s antibiotickou funkcí, které zabíjejí mikroby, a obsahují intraepiteliální T a B-1 B lymfocyty, které rovněž zabíjejí mikroby.
- efektorovými buňkami: fagocytující neutrofilové buňky a makrofágy, které navíc produkují cytokiny; a NK buňky, které lyzují napadené buňky a aktivují makrofágy.
- efektorovými proteiny: komplementové proteiny, které zabíjejí mikroby nebo je opsonizují a aktivují leukocyty; collectiny, které opsonizují mikroby a aktivují komplementové proteiny (lektinová dráha); a pentraxiny, které mají obdobné vlastnosti jako collectiny.
- cytokiny: TNF, IL-1, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, chemokiny, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  a TGF- $\beta$  [1; 3; 4].

### 1.1.1.2 Adaptivní imunita

Adaptivní imunita je evolučně mladší (objevuje se až u obratlovců) a vyvíjí se během života jako odpověď na vystavení organismu antigenům a infekcím. Je zprostředkována buňkami, které exprimují selektivní receptory antigenů. Odpověď směřuje k přesné obranné reakci, k jejímu úplnému rozvoji je zapotřebí několika dní až týdnů. Charakteristickým rysem je imunologická paměť, kdy po setkání s antigenem vznikají paměťové buňky, které při opětovném setkání zajišťují rychlejší imunitní odpověď. Zprostředkovává také autoimunitní reakce [3].

Je zajišťována B lymfocyty a  $\alpha\beta$  T lymfocyty [1; 3].

Další skupiny lymfocytů, B-1 B lymfocyty, NKT buňky a  $\gamma\delta$  T lymfocyty, které rovněž exprimují selektivní receptory nezprostředkovávají adaptivní imunitní reakce [1; 3].

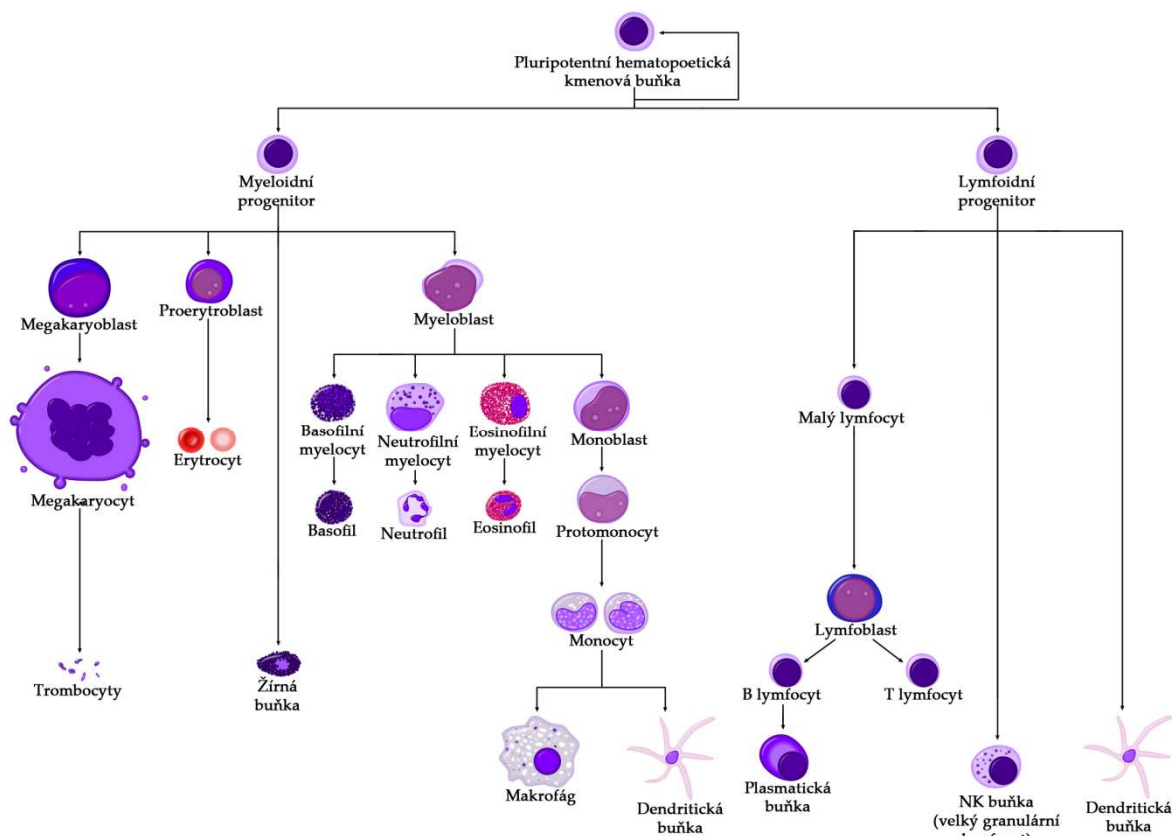
### **1.1.2 Funkce imunitního systému**

Funkcí imunitního systému je udržování integrity organismu tím, že rozpoznává škodlivé od neškodného a chrání tak organismus proti škodlivinám zevního i vnitřního původu. Tato funkce se projevuje takto:

- obranyschopnost – tedy rozpoznávání vnějších škodlivin a ochrana organismu před patogenními mikroorganismy a jejich toxickými látkami.
- autotolerance – rozpoznávání vlastní tkáně organismu a udržuje toleranci vůči nim.
- imunitní dohled – rozpoznávání vnitřních škodlivin, tedy odstraňuje staré, poškozené a některé zmutované buňky [5].

## **1.2 Hematopoéza**

Hematopoéza je proces, při kterém v kostní dřeni vznikají všechny buňky přítomné v krvi a lymfě. Začíná u pluripotentních hematopoetických kmenových buněk, které se nachází právě v kostní dřeni. Úbytek těchto buněk v rámci dozrávání je kompenzován jejich dělením přímo v kostní dřeni a jejich množství se tedy během života výrazně nemění [2].



**Obrázek 1.1: Hematopoeza**, převzato z [http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Hematopoiesis\\_\(human\)\\_diagram.png](http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Hematopoiesis_(human)_diagram.png) a upraveno

Hematopoeza se tedy podílí na vzniku buněk, které mají důležitou funkci v imunitním systému a to buď v úvodní, nebo v efektorové fázi imunitní odpovědi. Úvodní fáze je spojena s dendritickými buňkami a jejich prekursory. Část těchto buněk putuje do brzlíku, kde slouží jako APC a část zůstává v oběhu, kterým jsou rozdělovány mezi tkáňe a orgány kde uplatňují svou APC funkci. V pokožce jsou to Langerhansovy buňky a v lymfatickém systému makrofágy. Při efektorové fázi vznikají buňky myeloidní části hematopoezy, například granulocyty, které spolupracují s protilátkami [2].

Jedna vlastnost je společná jak pro myeloidní tak pro lymfoidní progenitory a to, že aktivně proliferují, a proto jsou citlivé na ozařování, chemoterapii i léčbu imunosupresivy. Ztráta myeloidních nebo lymfoidních progenitorů vede k akutní hematologické toxicitě (leukopenii, trombocytopenii či anémii) jako běžný vedlejší účinek léčby cílené na imunitní systém [2].

### 1.3 Gama/delta T lymfocyty

$\gamma\delta$  T lymfocyty jsou buňky imunitního systému, které mají vlastnosti jak vrozené tak adaptivní imunity. Imunitní odpovědi, které zprostředkovávají tyto buňky, mají charakter vrozené imunity, ale zároveň na svém povrchu exprimují selektivní receptory antigenů a některé buňky jsou podle fenotypu považovány za paměťové, což jsou naopak charakteristické znaky adaptivní imunity [6].

#### 1.3.1 Vznik a vývoj $\gamma\delta$ T lymfocytů

T lymfocyty stejně jako B lymfocyty vznikají v kostní dřeni, ale na rozdíl od nich zde nedozrávají [1; 4]. Místem jejich zrání je *thymus*, tedy brzlík, od něhož je také odvozeno jejich označení [7]. Ovšem ne všechny T lymfocyty se vyvíjí pouze v brzlíku.  $\gamma\delta$  T lymfocyty vytváří celý systém lymfocytů, který se vyvíjí v brzlíku, ve střevním epitelu, v pokožce, ve slezině a ve fetálních játrech [8; 9] působením dalších skupin leukocytů [10]. Naproti tomu  $\alpha\beta$  T lymfocyty se vyvíjí pouze v brzlíku [8; 11].

Progenitory T lymfocytů začínají odcházet do brzlíku v průběhu 8 až 9 týdnů těhotenství [4; 8]. T lymfocyty vyvíjející se v brzlíku jsou označovány jako tymocyty, ty proliferují a diferencují podle vývojové dráhy, která vytváří funkčně odlišné subpopulace zralých T lymfocytů [1; 2; 4], a to na  $\alpha\beta$  a  $\gamma\delta$  T lymfocyty [12]. Z celkové populace diferencujících se tymocytů dosahuje pouze zhruba 1 % stádia zralých T lymfocytů. 99 % tymocytů umírá apoptózou [13].

Jednotlivé stupně vývoje tymocytů jsou rozděleny na DN, DP a SP buňky podle exprese CD4 a CD8 koreceptorů ( $CD4^-CD8^-$ ,  $CD4^+CD8^+$ ,  $CD4^+CD8^-$  /  $CD4^-CD8^+$ ) [12]. DN subpopulace jsou charakteristické rozdílnou expresí CD34, CD38 a CD1a, rané progenitory mají fenotyp  $CD34^+CD38^-CD1a^-$ , následují  $CD34^+CD38^+CD1a^-$  a  $CD34^+CD38^+CD1a^+$  buňky [12]. Proces vývoje a zrání  $\gamma\delta$  T lymfocytů z DN tymocytů není zatím objasněn, nicméně vývoj DN tymocytů na diferenciované  $\gamma\delta$  nebo  $\alpha\beta$  T lymfocyty není ovlivněn přeskupením TCR genů, protože většina těchto přeskupení je neproduktivních – pouze asi 33 % dává vznik funkčním produktům [7].  $\gamma\delta$  T lymfocyty jsou fenotypově nezralé ( $CD4^-CD8^-$ ) [6;

14], ale malé množství  $\gamma\delta$  tymocytů a později také zralých lymfocytů exprimuje CD8 a ještě menší množství CD4 molekuly. Vývoj  $\gamma\delta$  T lymfocytů však nezahrnuje  $CD4^+CD8^+$  přechodový stav [15].

**Tabulka I**  
 **$\gamma\delta$  T lymfocyty v periferní krvi**

vlastnost		$\gamma\delta$ T lymfocyty
CD3 <sup>+</sup> buňky		1 – 10 %
CD4/CD8 fenotyp	CD4 <sup>+</sup>	< 1 %
	CD8 <sup>+</sup>	~30%
	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	< 1 %
	CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>	~ 60 %

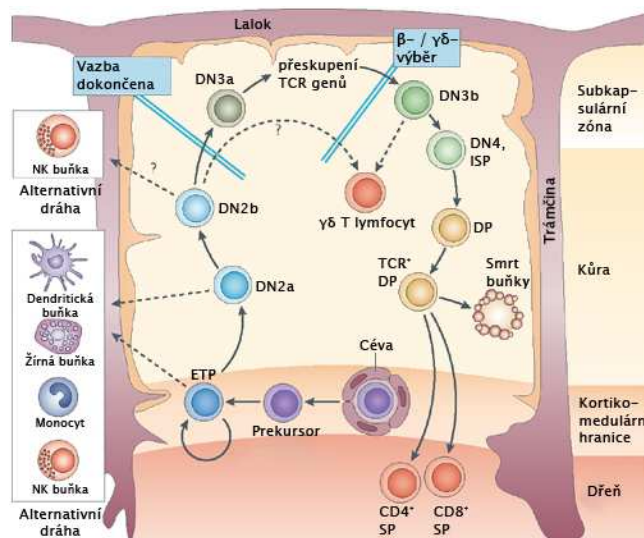
převzato z [16] a upraveno

U vývoje podskupin  $\gamma\delta$  T lymfocytů existují dvě hypotézy ohledně regulačních mechanismů těchto dějů a to: a) ligandy specifické pro daný stupeň vyberou příslušnou  $\gamma\delta$  podskupinu; b) přeskupování V $\gamma$  a V $\delta$  genových segmentů je naprogramováno buď mikroprostředím brzlíku nebo progenitorovou buňkou [15]. Rané stádium vývoje je charakterizováno postupujícími vlnami různých  $\gamma\delta$  podskupin, které se překrývají [7; 15] a jsou charakteristické expresí určitých V $\gamma$  a V $\delta$  genových segmentů [7]. V prvních dvou vlnách jsou  $\gamma\delta$  T lymfocyty s V $\gamma$ 3 a V $\gamma$ 4, u nichž má  $\delta$  řetězec složení V $\delta$ 1/D $\delta$ 2/J $\delta$ 2 genových segmentů. Později se již tyto T lymfocyty neobjevují a jsou nahrazeny V $\gamma$ 1 a V $\gamma$ 2  $\gamma\delta$  T lymfocyty s různými V $\delta$  [15].

V průběhu zárodečného vývoje jsou na membránách exprimovány jedinečné antigen-vázající molekuly nazývané TCR [1; 2; 4; 17], které jsou nekovalentně vázány s proteinovými  $\gamma$ -,  $\delta$ - a  $\epsilon$  podjednotkami CD3 molekul a tvoří tak funkční  $\gamma\delta$  receptory [14]. CD3 $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ - podjednotky se spojují s cytoplazmatickými proteiny pro T buněčnou signalizaci [18] a jejich extracelulární části obsahují jednoduché domény podobné doménám imunoglobulinovým a mohou tedy interagovat s konstantními doménami TCR [18], při kterých vzniká signální komplex [19]. TCR se uplatňují v posledním stupni diferenciaci T lymfocytů v brzlíku při interakcích s ligandy. Tyto interakce jsou potřebné při přeměně tymocytů ve zralé

fenotypy, které jsou zcela funkční a schopné opouštět brzlík [20]. Množství exprimovaných receptorů je asi  $10^{20}$  [21].

Naivní (zralé) T lymfocyty se dělí do funkčně odlišných skupin, které mají svá vlastní pravidla (většinou neznámá) a nespočet přímých a nepřímých vlivů na zdravé a napadené tkáně, imunitní buňky a patogeny [10]. Odcházejí do sekundárních lymfatických orgánů, sleziny a lymfatických uzlin, kde tvoří oblasti bohaté na T lymfocyty, periarteriální pochva sleziny a parakortex lymfatických uzlin. Ve slezině zůstávají pouze několik hodin a v lymfatických uzlinách asi den, předtím než odejdou slezinnými žilami a lymfatickými odvodnými cévami. Putující naivní T lymfocyty obohacují krevní řečiště a vstupují do nových lymfatických orgánů. Tento cyklus se opakuje, dokud nejsou aktivovány peptidy antigenů [22]. Aktivované T lymfocyty exprimují dočasný CCR7 receptor, který jim umožňuje přesunout se do lymfatických uzlin [10; 23].



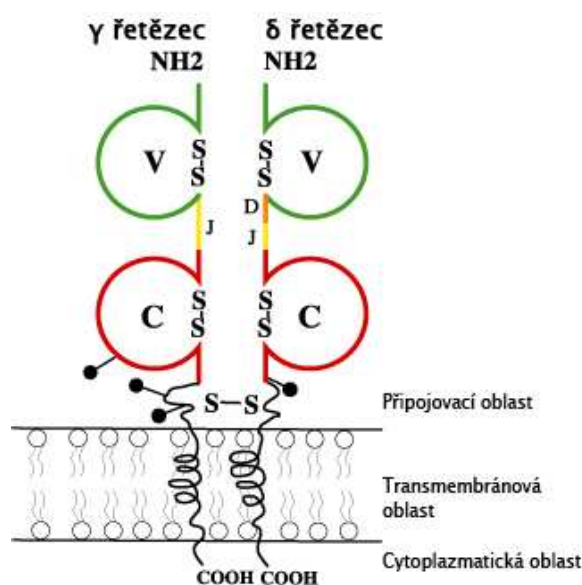
Obrázek 1.2: Vývoj T lymfocytů v brzlíku, převzato z [24] a upraveno

### 1.3.2 Struktura $\gamma\delta$ TCR

Určit strukturu  $\gamma\delta$  TCR, stejně tak  $\alpha\beta$  TCR, bylo zpočátku obtížné, protože stejně jako transmembránové bílkoviny jsou nerozpustné. Problém byl vyřešen expresí modifikovaných forem proteinů *in vitro*. Tyto proteiny byly navrženy tak, aby obsahovaly předčasné stop-kodony, které brání translaci sekvence, která váže TCR na membránu a která způsobuje, že molekula je nerozpustná [3].

TCR pro antigeny se skládají z  $\gamma$  a  $\delta$  polypeptidových řetězců [18], jedná se tedy o heterodimery, které jsou velmi podobné struktuře imunoglobulinů a proto jsou zařazovány do superrodiny imunoglobulinů [25].

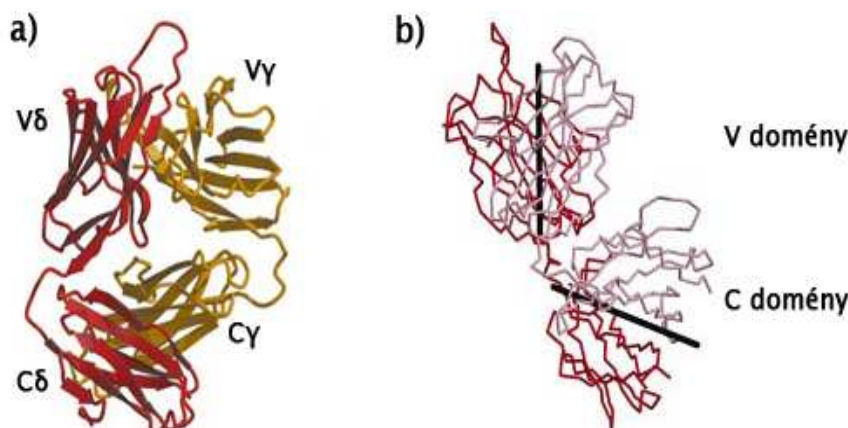
Každý řetězec v TCR ( $\gamma$  i  $\delta$ ) má dvě domény o délce 60 až 75 aminokyselin, které obsahují vnitřní disulfidický můstek. Domény, jedna variabilní (V) a jedna konstantní (C), jsou strukturně homologní k V a C doménám imunoglobulinů a celá TCR molekula se podobá Fab fragmentu, který je napojen místo na konstantní oblast imunoglobulinu na buněčnou membránu. NH<sub>2</sub>-terminální V doména obou řetězců vykazuje významnou sekvenční variabilitu, skládá se ze sendviče dvou  $\beta$ -skládaných listů s pěti vnitřními a pěti vnějšími vlákny [4; 18] a je rozdělena na úsek základní struktury a CDR [25]. Variabilní domény mají tři hypervariabilní oblasti, které se zdají být ekvivalentní k CDR lehkých a těžkých řetězců imunoglobulinů. Po variabilní doméně následuje konstantní doména, která je tvořena dvěma  $\beta$ -skládanými listy se čtyřmi vnitřními a třemi vnějšími vlákny. Na konstantní doménu navazuje krátká připojovací oblast, ve které cysteinové zbytky tvoří disulfidický můstek s druhým řetězcem heterodimeru. Po připojovací oblasti následuje transmembránová oblast tvořená 24 až 26 aminokyselinami, která řetězec upevňuje v plazmatické membráně. Poslední částí TCR řetězce je cytoplazmatický konec o délce 40 až 44 aminokyselin, který se nachází na COOH-konci [4; 18].



**Obrázek 1.3: Struktura  $\gamma\delta$  TCR**, V – variabilní domény, C – konstantní domény  $\gamma$  a  $\delta$  řetězců; V oblast zelená, C oblast červená, J oblast žlutá, D oblast oranžová, S-S disulfidický můstek, ● sacharid; převzato z <http://imgt.cines.fr> a upraveno



Úhel, který svírají V a C domény je pouze  $110^\circ$  ( $\alpha\beta$  TCR  $140 - 159^\circ$ , Fab  $125 - 225^\circ$ ) a je výsledkem nejmenšího V-C interdoménového úhlu  $42^\circ$  pozorovaného u  $\gamma$  řetězce [19; 26]. Úhel a jeho případná variabilita má vliv na vazbu rozpoznávaných antigenů.

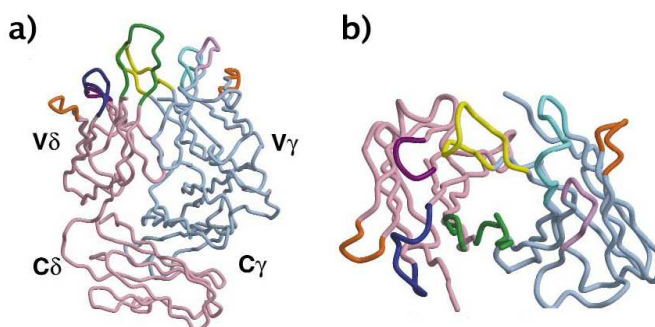


**Obrázek 1.4:**  $\gamma\delta$ TCR, a) jednotlivé domény  $\gamma\delta$ TCR –  $V\delta$  a  $C\delta$  červená,  $V\gamma$  a  $C\gamma$  zlatá, CDR smyčky nahoře molekuly; b) úhel v  $\gamma\delta$ TCR  $110^\circ$ ; převzato z [18] a upraveno

Při porovnání  $\gamma$  a  $\delta$  řetězců TCR s H a L řetězci imunoglobulinů a  $\alpha$  a  $\beta$  řetězci TCR co do množství stejných aminokyselinových páru bylo zjištěno, že  $\gamma\delta$  TCR je podobnější imunoglobulinům než  $\alpha\beta$  TCR (H: 90-100 a L: 60-70,  $\alpha$ : 50-55 a  $\beta$ : 65-75 stejných aminokyselinových zbytků) [19].

CDR smyčky se nacházejí na vrcholu V domén  $\gamma$  a  $\delta$  řetězců a vyčnívají z receptoru [18]. Nesou znaky jak imunoglobulinů tak  $\alpha\beta$  TCR. Jsou místem rozpoznání antigenů. Při tomto procesu je hlavní CDR3 (CDR1 a CDR2 mají zcela zanedbatelnou nebo žádnou roli), který je rozhodující pro přesnost vazby  $\gamma\delta$  TCR–antigen [27; 28]. Jejich délka je pro  $\gamma$  řetězec 1-12 a pro  $\delta$  řetězec 8-21 aminokyselinových zbytků, což je více než u imunoglobulinů i  $\alpha\beta$  TCR. U CDR3 platí, že délky  $\gamma$  a  $\delta$  řetězců jsou sice velmi podobné délkám  $\alpha$  a  $\beta$  řetězcům TCR, ale vyčnívají takovým způsobem, že mezera, které mezi nimi vzniká, umožňuje přímou vazbu ligandu [19]. Přesto je CDR3 považován za podobnější imunoglobulinům nežli  $\alpha\beta$  TCR [16; 27]. Další podobností s imunoglobuliny a  $\alpha\beta$  TCR je solný můstek  $\text{Glu}^{40\gamma}\text{-Lys}^{40\delta}$ , který nahrazuje vodíkový můstek  $\text{Gln}^{39\text{H}}\text{-Gln}^{38\text{K}}$  a  $\text{Gln}^{37\alpha}\text{-Gln}^{37\beta}$ .  $\gamma\delta$  TCR mají na této pozici často Gln (pro  $\gamma$  je to až 34 % a pro  $\delta$  55 %), ale mohou být přítomny i další aminokyseliny, Lys 33 % pro  $\delta$ , Glu 13 % a His 39 % pro  $\gamma$ . Toto platí pro

875 V $\gamma$  a 2065 V $\delta$  sekvencí. Solný můstek nalezneme také na druhém konci mezi CDR3 oblastmi, mezi Lys<sup>109 $\gamma$</sup>  a Asp<sup>105 $\delta$</sup> , který přispívá k párování bází řetězců [19].

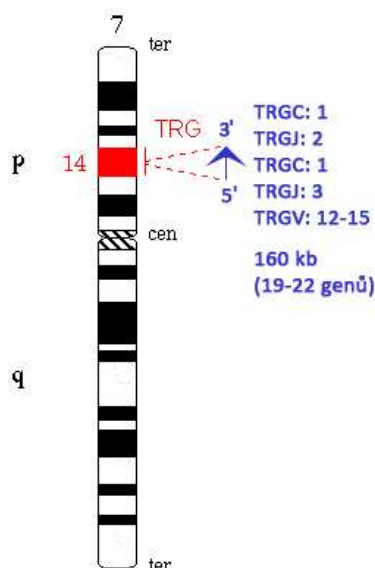


**Obrázek 1.5: Anatomie  $\gamma\delta$  TCR, a) pohled ze strany, b) pohled seshora;  $\delta$  řetězec růžový, CDR1 modrý, CDR2 fialový, CDR3 zelený,  $\gamma$  řetězec světle modrý, CDR1 tyrkysový, CDR2 růžový, CDR3 žlutý, HV4 oranžová; převzato z [19] a upraveno**

### 1.3.3 Rozdělení rodin

#### 1.3.3.1 Gama rodina

Čtrnáct TCRGV genových segmentů je umístěných na chromozomu 7, lokus p14. Rozdělují se do 6 rozdílných podrodin, ale pouze dvě z nich (GV1, GV2) obsahují členy, kteří jsou schopni kódovat funkční peptidy [29; 30].



**Obrázek 1.6: Chromozom 7, lokus pro  $\gamma$  TCR, převzato z <http://imgt.cines.fr> a upraveno**

GV1 podrodina se skládá z devíti příbuzných členů, ale pouze pět z nich kóduje funkční peptidy (GV1S2A, GV1S3A1N, GV1S4A1N, GV1S5, GV1S8). GV2 podrodina obsahuje pouze jednoho člena, přesto zvyšuje počet genů kódujících funkční peptidy na šest (GV2S1A). Jednočlenné podrodiny GV3, GV4 jsou považována za pseudogeny, protože jejich vedoucí introny nejsou u všech transkriptů

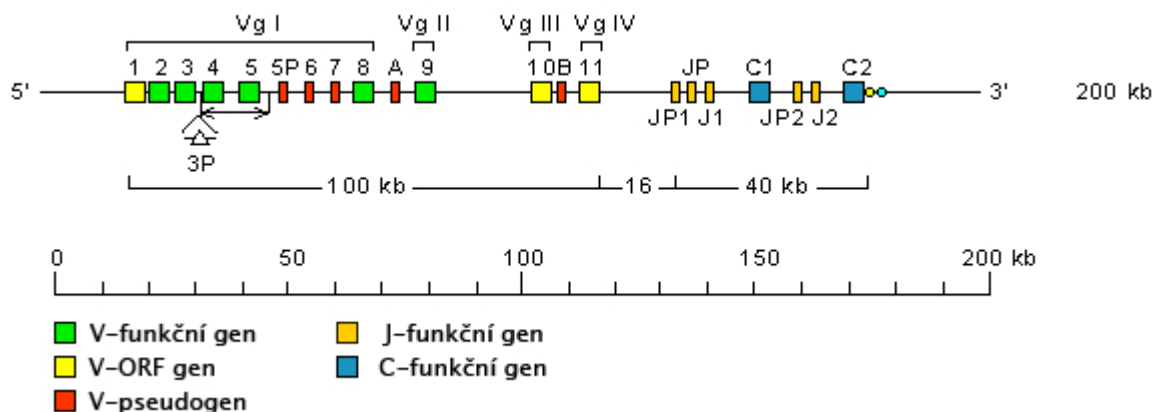
sestříženy. Absence sestřihu může způsobit, že spojení donorového a akceptorového místa je odlišné od spojení shodné sekvence. Rovněž GV5 a GV6 jsou zahrnuty mezi pseudogeny [29].

Tabulka II  
Rozdělení V $\gamma$  genů do podrodin

podrodina	geny	druh genu
GV1	V $\gamma$ 2, V $\gamma$ 3, V $\gamma$ 4, V $\gamma$ 5, V $\gamma$ 8	funkční geny
	V $\gamma$ 1, V $\gamma$ 5P, V $\gamma$ 6, V $\gamma$ 7	pseudogeny
GV2	V $\gamma$ 9	funkční gen
GV3	V $\gamma$ 10	pseudogen
GV4	V $\gamma$ 11	pseudogen
GV5	$\psi$ VA	pseudogen
GV6	$\psi$ VB	pseudogen

převzato z [29; 30; 31] a upraveno

TCRG sekvence obsahuje čtrnáct V, pět J a dvě C oblasti [13; 32]. Neobsahuje D oblast a tím se snižuje množství vzniklých úplných genů a  $\gamma$  řetězců. Ze čtrnácti V oblastí jich pouze pět kóduje funkční geny [6].



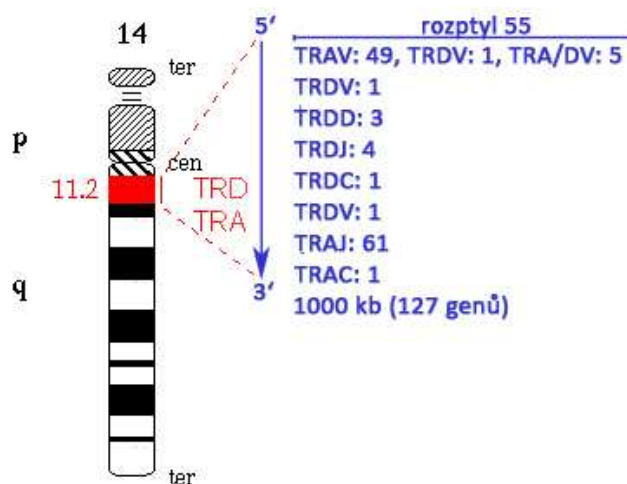
Obrázek 1.7: TRG lokus na chromozomu 7, převzato z <http://imgt.cines.fr> a upraveno

Uspořádání peptidu zahrnuje všechny čtyři TCRV rodiny ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  a  $\delta$ ) s tím, že  $\beta$  a  $\gamma$  peptidy jsou si podobné. Především V $\gamma$  peptidy mají společně s V $\beta$  o čtyři aminokyselinové zbytky více v CDR2. GV2 má navíc dva zbytky v CDR1 na rozdíl od V $\beta$  peptidů [29].

### 1.3.3.2 Delta rodina

TCRDV sekvence jsou zařazeny do stejné skupiny s TCRAV ( $\alpha$  rodina), protože jsou rozptýleny na chromozomu 14, lokus q11.2. Rozděluje se do tří podrodin (DV101, DV102 a DV103).

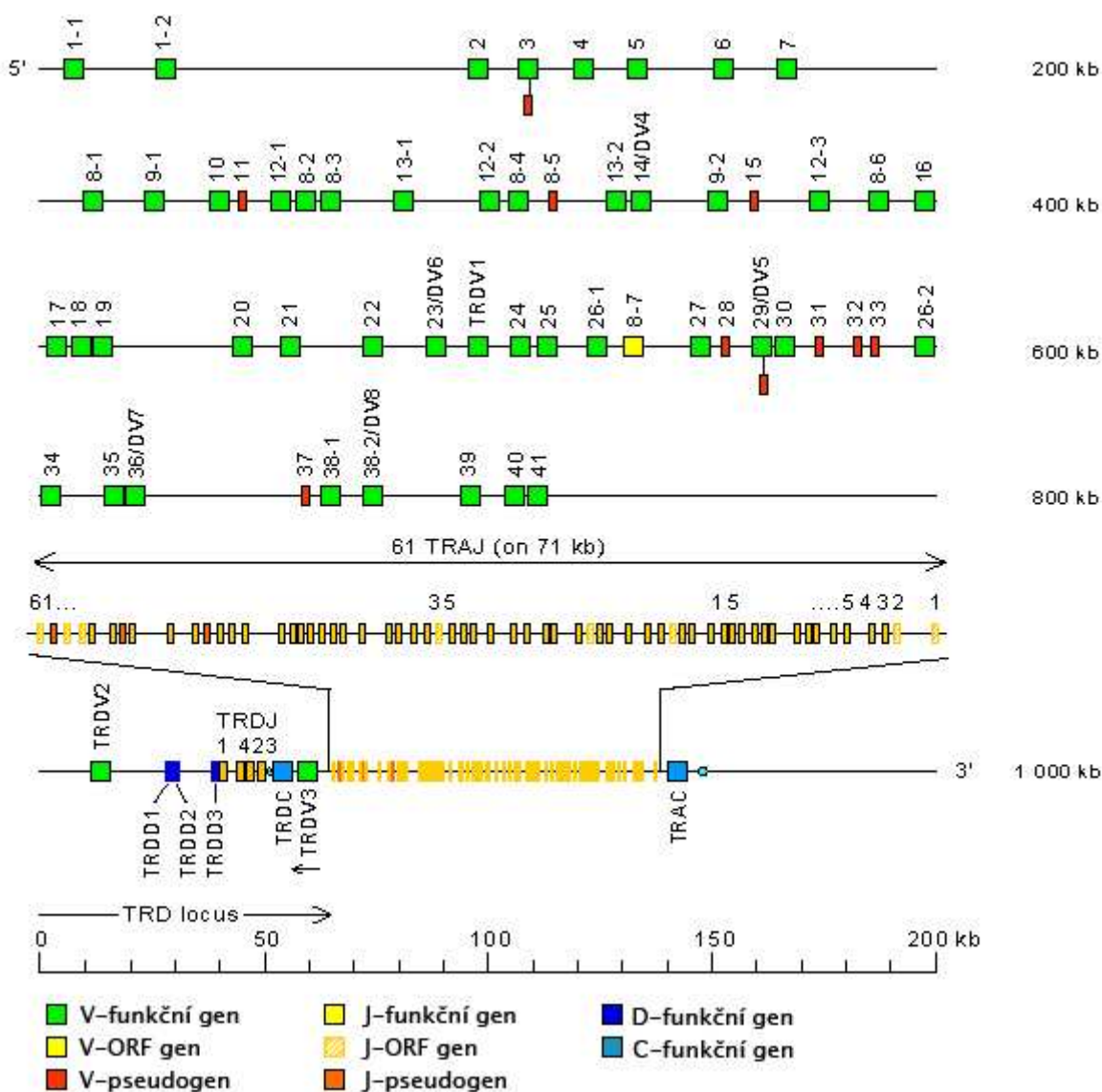
DV101, DV102 a DV103 (dříve označované jako V $\delta$ 1, V $\delta$ 2 a V $\delta$ 3) jsou jednodělné podrodiny, jejichž geny kódují funkční peptidy. Jejich číselné označení nad 100 vzniklo proto, aby se zabránilo použití stejného čísla pro AV a DV genové segmenty, které spolu nesouvisí. ADV6, ADV17 a ADV21 (dříve označované jako V $\delta$ 4, V $\delta$ 5 a V $\delta$ 6) jsou v dnešní době zařazeny mezi TCRAV, protože bylo zjištěno, že vznikají přesmyky buď DJ, nebo AJ genových segmentů [29]. Dále existují ještě DV228S1A3T a ADV14S1 (V $\delta$ 7 a V $\delta$ 8), které jsou rovněž oba řazeny mezi TCRAV a to vzhledem k tomu, že v případě DV228S1A3T se jedná o alelickou variantu AV28S1 a ADV14S1 je shodný s AV14S1 [29]. Z těchto genových segmentů mohou vznikat jak  $\delta$  tak  $\alpha$  funkční řetězce [16].



Obrázek 1.8: Chromozom 14, lokus pro  $\delta$  TCR, převzato z <http://imgt.cines.fr> a upraveno

TCRD sekvence obsahuje osm V, tři D, čtyři J a jednu C oblast [33; 34]. V, D a J genové segmenty jsou lemovány RSS, které obsahují konzervativní palindromickou heptamerní a nonamerní sekvenci oddělenou mezerou o délce 12 nebo 23 párů bází [33; 35]. Podle pravidla 12/23 se přeskupování vyskytuje mezi genovými segmenty s různě velkými mezerami [33; 13]. V, D, J a C genové segmenty se během ontogenetického vývoje přeskupují a tím vzniká úplný gen [17]. Různorodost těchto genů je dána rekombinací jednotlivých genových segmentů a inzercí

nebo delecí nukleotidů, která se při spojování segmentů vyskytuje a zvyšuje se schopností současně využívat více než jeden D genový segment [6; 36].



Obrázek 1.9: TRA/D lokus na chromozomu 14, převzato z <http://imgt.cines.fr> a upraveno

DV102 a GV2 se přednostně spojují v  $\gamma\delta$  heterodimery a delší CDR1 se může vázat na restriční element odlišný od MHC molekul nebo se podílet přímo na vazbě na antigen. GV2 vykazuje alelický polymorfismus na zbytku 26A (alanin) a záměna Thr  $\rightarrow$  Lys může mít dopad na vazbu ligandu. GV1 a DV103 mají dva zbytky na CDR2 navíc. V obou případech je druhý z těchto dvou zbytků v CDR1 a CDR2 vysoce konzervativní a tvoří hydrofobní zbytek. Od delších CDR1 a CDR2 společně se zvyšující se délkou CDR3 se odvozuje obecný princip  $V\gamma$  a klasických  $V\delta$  proteinů [29].

### 1.3.4 Výskyt

Množství  $\gamma\delta$  T lymfocytů je omezené, představuje 1 až 10 %  $CD3^+$  T lymfocytů [16; 37]. Vyskytují se v periferní krvi, v epiteliálních vrstvách vnějších a vnitřních tkání: pokožka, plíce, jazyk [7], střevo [7; 25], jícen, průdušnice [38] a reprodukční orgány [25], a v brzlíku [39]. Jejich zastoupení je následující: v periferní krvi a lymfatických uzlinách 1 až 5 % [16; 25; 40], v tenkém střevě 10 až 15 % a tlustém střevě až 40 % [36].

V prenatálním vývoji je populace  $\gamma\delta$  T lymfocytů nejrozmanitější [21]. Při narození nepřevládá v pupečnickové krvi žádná  $V\gamma V\delta$  kombinace [16; 41]. Poté se začne vyvíjet oligoklonální populace  $V\gamma 9V\delta 2$ , která přetrvává po 90 let života. Nárůst této populace je od narození do 6 až 10 roku života [23]. Tento jev nastává v důsledku působení antigenů prostředí a není geneticky podmíněn [16; 41]. V těle člověka se dále vyskytují  $V\delta 1$  T lymfocyty v kombinaci s různými  $V\gamma$  genovými segmenty [27; 42].

$V\gamma 9V\delta 2$  T lymfocyty převládají v periferní krvi a tvoří zde 50 až 90 % ze všech  $\gamma\delta$  T lymfocytů [16; 18; 19; 27; 42]. Jejich hlavními funkcemi je obrana proti intracelulárním patogenům a nádorům krve. Dále se podílí na ničení buněk myelomů a lymfomů a ve větší míře se vyskytují u pacientů s akutní leukémií, kteří jsou po transplantaci kostní dřeně bez příznaků nemoci [38].

Naproti tomu  $V\delta 1$  T lymfocyty převládají mezi IEL. Hrají významnou roli při patogenezi zánětlivých onemocnění, jako jsou kožní léze u leishmaniózy, pokožka při lepře, lačník v případě celiakie a synoviální tekutina nebo tkáň při revmatické artritidě, a při nádorových onemocnění [38; 43]. Rovněž se vyskytují v periferní krvi kde, však tvoří maximálně 30 %  $\gamma\delta$  T lymfocytů [28; 42].

Ostatní skupiny  $\gamma\delta$  T lymfocytů jsou zastoupeny jen ve velmi malém počtu a jejich klinický význam není zmapován.

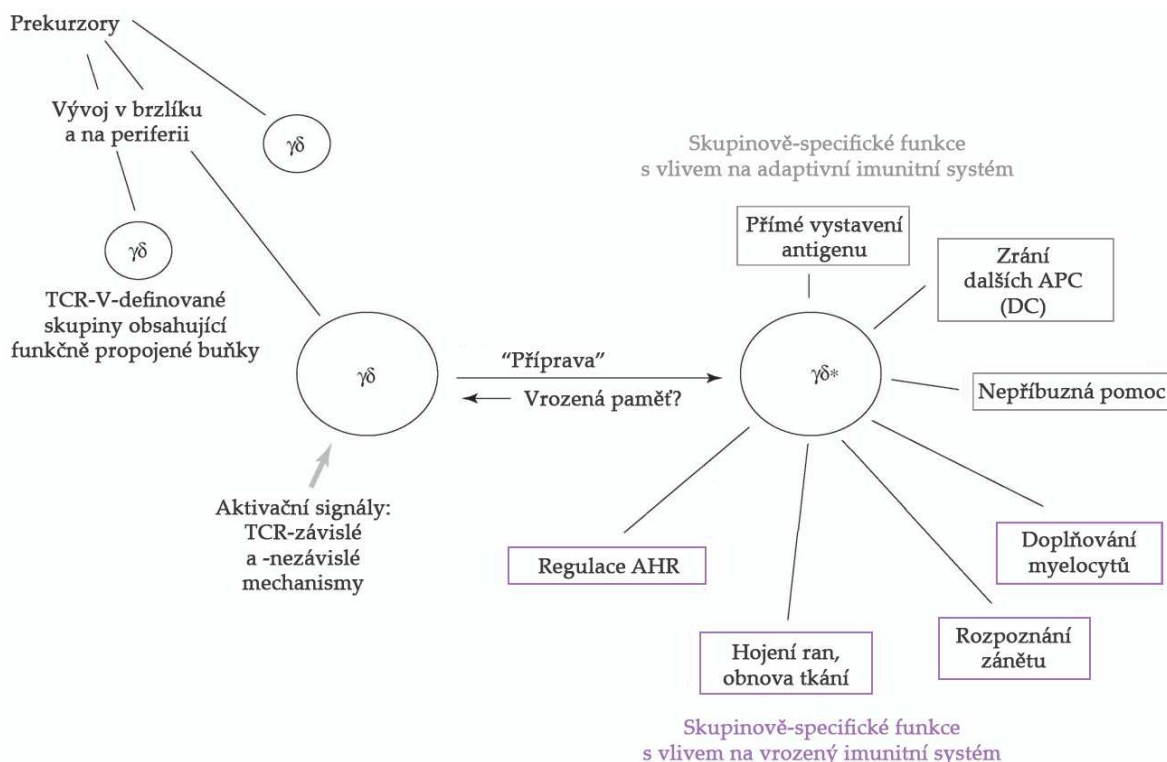
### 1.3.5 Vlastnosti

Populace T lymfocytů se rozděluje na ty nesoucí BCR a ty nesoucí TCR, které se dále rozlišují na  $\alpha\beta$  a  $\gamma\delta$  TCR. V průběhu zrání tyto receptory přeskupují své

V(D)J genové segmenty, aby vytvořily různé sekvence [19]. Přeskupování TCR genů během diferenciaci T lymfocytů začíná VDJ rekombinací TCRD genů, následuje rekombinace VJ TCRG a poté VDJ TCRB genů [33], z toho tedy plyne, že  $\gamma\delta$  T lymfocyty jsou prvními vznikajícími lymfocyty [21]. Produktivní přeskupení TCRD a TCRG genů vede k expresi  $\gamma\delta$  TCR, které představují malou populaci zralých T lymfocytů [33]. I přes omezené množství V $\gamma$  a V $\delta$  genů při zárodečném vývoji je množství vznikajících  $\gamma\delta$  TCR velké a různorodé, a to v důsledku inserce nukleotidů v N variabilní oblasti [16; 27; 44] a translace D $\delta$  sekvencí do všech tří možných čtecích rámců [16]. Tato variabilita se ovšem neprojevuje u všech  $\gamma\delta$  T lymfocytů [27].

$\gamma\delta$  T lymfocyty se dají charakterizovat jako:

- první obrana proti patogenům [10; 43]
- regulační buňky [10]
- most mezi vrozenými a adaptivními imunitními odpověďmi [10; 23]



**Obrázek 1.10: Vývoj specializovaných populací  $\gamma\delta$  T lymfocytů;**  $\gamma\delta$  - diferenciované  $\gamma\delta$  T lymfocyty;  $\gamma\delta^*$  - diferenciované a indukované (připravené)  $\gamma\delta$  T lymfocyty, AHR - alergická přecitlivělost dýchacích cest (allergic airway responsiveness), APC - buňka nabízející antigen (antigen presenting cell), DC - dendritická buňka (dendritic cell); převzato z [10] a upraveno

$\gamma\delta$  T lymfocyty vytváří malý počet většinou tkáňově specifických  $\gamma$  a  $\delta$  párů, nesou tkáňově specifickou sadu  $V\gamma$  a  $V\delta$  domén, a to i přes jejich potenciál k tvorbě velmi rozdílných receptorů antigenů v důsledku možného vzniku různých spojení V(D)J v jejich CDR3 [18; 19].

Některé vlastnosti mají shodné s  $\alpha\beta$  T lymfocyty a NK buňkami. S  $\alpha\beta$  T lymfocyty sdílí cytotoxickou aktivitu a produkci cytokinů IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 a TNF- $\alpha$  [9; 16], dále produkují antimikrobiální peptid granulysin [45] a jejich lytická aktivita je podobná lytické aktivitě NK buněk [9]. Disponují myelosupresivní aktivitou, kdy působením IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  inhibují růst hematopoetických progenitorů [16], a v neposlední řadě také regulují zrání dendritických buněk [45] a funkce B lymfocytů,  $\alpha\beta$  T lymfocytů, NK a NKT buněk a makrofágů [6; 46].

Další vlastností  $\gamma\delta$  T lymfocytů je tvorba paměťových buněk. Jedná se o buňky s  $V\delta 2$  genovým segmentem [16; 23; 27], protože obvykle exprimují také CD45RO, který je považován za paměťový marker. Buňky s ostatními  $V\delta$  genovými segmenty tento marker neexprimují [16; 27]. Téměř všechny  $\gamma\delta$  T lymfocyty exprimují na svém povrchu CD2 a CD16 molekuly. CD2 je receptor pro CD58 [16] a CD16 uděluje buňkám vlastnosti podobné vlastnostem NK/LAK buněk, protože rovněž tyto buňky exprimují tuto molekulu [47]. Značná část, hlavně  $V\gamma 9V\delta 2$ , exprimuje rovněž jednu z několika KIR molekul, která má spolu s CD94 podíl na aktivaci daných T lymfocytů a má hlavní roli při kontrole reaktivity  $\gamma\delta$  T lymfocytů [16].

$V\gamma 9V\delta 2$  T lymfocyty dále exprimují mnoho CC-chemokinových receptorů včetně CCR1 a CCR5, které jsou receptory pro výše zmíněné cytokiny.  $V\delta 1$  T lymfocyty, které pronikají do nádoru plic exprimují CXCR3, který je receptorem pro IP-10 (inflammatory protein 10), a CCR5 [38].

$\gamma\delta$  TCR rozpoznává antigeny přímo ve formě intaktních proteinů nebo nepeptidových sloučenin [6; 27; 40]. Povaha rozpoznání je podobná jako rozpoznávání u imunoglobulinů [4; 6; 18; 27]. Převážně se jedná o nízkomolekulární ligandy, jako jsou fosfolipidy, glykolipidy, hsp, fosforylované nepeptidové antigeny, alkylaminy, aminobisfosfonáty [4; 18; 26; 27], látky obsahující fosforylovaný uridin



a tymidin a pyrofosfátové deriváty prenylu a isoprenyly [38]. Rozpoznávají bakteriální ligandy, některé nádorové buňky [44], jako jsou buňky Daudi Burkittova lymfomu a některé buněčné linie (gliové buňky) [48]. Dále jsou rovněž rozpoznávány molekuly buněčného stresu, jako je CD1, MIC-A a -B a F1-ATPasa [44]. Některé bakteriální infekce zvyšují rozpoznávání vlastních glykolipidů a některé navozují tvorbu vlastních glykosfingolipidů u APC, které jsou následně presentovány na povrchu spolu s CD1 molekulami. F1-ATPasa je exprimována na povrchu nádorových buněk a podporuje rozpoznávání těchto buněk  $\gamma\delta$  T lymfocyty.

Epiteliální  $\gamma\delta$  T lymfocyty jsou rozhodující populací, která reguluje pozdější imunitní reakce, pomáhá ukončit reakci tím, že produkuje protizánětlivé cytokiny (IL-10) [40]. Zvláštní případ tvoří  $\gamma\delta$  T lymfocyty pokožky, které umí rozpoznávat keratinocyty a regulovat jejich tvorbu při poranění [10; 23].

Kromě rozpoznávání antigenů jsou  $\gamma\delta$  T lymfocyty schopné lyzovat některé typy buněk, jedná se především o rakovinné buňky glioblastomu, neuroblastomu, mnohačetného myelomu a rakoviny plic a usmrcují buňky primárních leukémií [38; 48].

$\gamma\delta$  T lymfocyty mají důležitou roli v imunitní odpovědi proti infekčním agens a také v dalších klinicky relevantních situacích, jako jsou autoimunitní onemocnění [16]. Při bakteriálních a virových infekcích tvoří  $\gamma\delta$  T lymfocyty až 50 % a u autoimunitních onemocnění až 30% všech T lymfocytů [28].

### **1.3.6 Klinický význam**

#### **1.3.6.1 Onemocnění**

$\gamma\delta$  T lymfocyty mají významnou roli při infekčních onemocněních způsobených některými bakteriemi, viry a parazity, při homeostáze střevního epitelu, při alergických zánětech dýchacích cest, autoimunitních a nádorových onemocněních a rovněž je zkoumána jejich funkce při transplantacích orgánů a kostní dřeně. V takovýchto případech lze zjistit zvýšenou hladinu  $\gamma\delta$  T lymfocytů v krvi a jiných tělních tekutinách a v epitelech.

Jedná se o následující **bakteriální onemocnění**: brucelóza (*Brucella melitensis*) [16; 19], alimentární otravy (*Campylobacter jejuni*), lepra (*Mycobacterium leprae*), listerióza (*Listeria monocytogenes*), lymská borelióza (*Borrelia burgdorferi*), tularémie (*Francisella tularensis*), záněty tenkého a tlustého střeva, průjmy (*Yersinia enterocolitica*) [16], salmonelóza (*Salmonella sp.*) [19; 26; 27] a tuberkulóza (*Mycobacterium tuberculosis*) [16; 19; 26]; **virová onemocnění** způsobená HIV, virem Epstein-Barrové [16] a virem Herpes simplex [38] a **parazitická onemocnění**: malárie (*Plasmodium falciparum*) [16; 19], leishmanióza (*Leishmania donovani*), Q horečka (*Coxiella burnetii*) a toxoplazmóza (*Toxoplasma gondii*) [16].

U autoimunitních onemocnění je nárůst pozorován u:

- revmatické artritidy – zkoumá se jak krev, tak synoviální tekutina, ve které je zvýšená hladina V $\delta$ 1<sup>+</sup> buněk [16; 26; 37]. V případě periferní krve se jedná o snížení množství  $\gamma\delta$  T lymfocytů [23; 46].
- roztroušené sklerózy –  $\gamma\delta$  T lymfocyty se nacházejí v lézích a mozkomíšním moku, v krvi se může objevit zvýšená hladina V $\delta$ 2J $\delta$ 3  $\gamma\delta$  T lymfocytů [16; 26; 37].
- celiakie a zánětlivých onemocnění vnitřností, mezi něž patří Crohnova choroba a ulcerózní kolitida – jsou charakteristické zvýšeným množstvím IEL a V $\delta$ 1<sup>+</sup> buněk [16; 26].
- bronchiálního astmatu – množství  $\gamma\delta$  T lymfocytů v periferní krvi klesá, ale roste množství BAL  $\gamma\delta$  T lymfocytů exprimujících CD4, V $\delta$ 1 a CD30 a v reakci na alergeny produkují zejména IL-4 [16].
- IgA nefropatie (Bergerova choroba) [16], polymyositis, systémového lupus erythematoses, Sjögrenova syndromu, idiopatické trombocytopenické purpury, plicní sarkoidózy [26; 37], syndromu Guillain Barré, zánětu srdečního svalu, opakovaných spontánních potratech [26].

U nádorových onemocnění aktivované  $\gamma\delta$  T lymfocyty zabíjejí transformované buňky a přispívají k imunitní obraně proti nádorovým buňkám. U rakoviny plic, ledvin, tlustého střeva, varlat, vaječníků a karcinomu prsu jsou přítomny TIL,

ale jejich význam nebyl zatím přesně určen [16; 48]. Dále byly popsány případy výskytu  $\gamma\delta$  T lymfocytů u leukémií a lymfomů [44].

### 1.3.6.2 Transplantace kostní dřeně

Transplantace kostní dřeně (štěpu) je proces, při kterém je stávající kostní dřeň nahrazena novou. Včetně kostní dřeně se při transplantaci přenáší také kmenové buňky, z nichž vznikají všechny zralé krvinky a lymfocyty [1; 4]. Tímto procesem by se měla obnovit obranyschopnost organismu [49]. Provádí se při léčbě hematopoetických nebo lymfopoetických poruch a nádorových onemocnění [1]. Existují dva druhy transplantací a to: a) autologní, kdy se použije kostní dřeň pacienta a b) alogenní, kdy je použita kostní dřeň buď příbuzného, anebo nepříbuzného dárce [49].

K přihojení štěpu dochází obvykle 7. až 14. den po transplantaci. Závažnou komplikací u alogenních transplantací je odhojení (rejekce) štěpu a GvHD. K odhojení štěpu dochází, když imunitní systém příjemce rozpozná neidentické struktury v HLA a nonHLA antigenech štěpu. Jsou zde přítomny T lymfocyty a monocyty a tento stav připomíná reakci organismu při infekcích. Může rovněž pocházet i k opačné situaci, a taky když T lymfocyty obsažené ve štěpu rozpoznají antigeny příjemce, dojde ke vzniku GvHD [49; 50]. Ta je základním omezením k úspěšné transplantaci kostní dřeně. Rozděluje se na akutní a chronickou formu. **Akutní GvHD** je charakterizována nekrózou epiteliálních buněk, zejména kůže, jater (žlučového) a trávicího traktu [1; 14]. Klinickými projevy jsou vyrážka, žloutenka, průjem a krvácení z trávicího traktu. Jestliže dochází k masivnímu odumírání tkání, může mít akutní GvHD fatální následky. **Chronická GvHD** je charakterizována fibrózou a atrofií jednoho nebo více stejných orgánů, ale nedochází k akutnímu odumírání buněk. Vede k úplnému selhání zasaženého orgánu a rovněž může mít fatální následky [1]. T lymfocyty štěpu zprostředkovávají rovněž GvL, která pomáhá odstraňovat některé nádorové buňky, které mohou způsobovat návrat nemoci po transplantaci [50]. Tato reakce je narozdíl od předchozích žádoucí.

Dobrou prevencí GvHD se jeví odstranění T lymfocytů z dárcovské kostní dřeně, bohužel je tento proces spojen se zvýšeným rizikem odhojení štěpu a návratem leukémie. Vývoj GvHD je spojen jen s určitou skupinou T lymfocytů, proto může být možná prevence onemocnění bez způsobení nežádoucích následků spojených s odstraněním všech T lymfocytů [14].

Základem studia  $\gamma\delta$  T lymfocytů u příjemců kostní dřeně je předpoklad, že představují primitivnější nebo jednodušší buňky, které mohou být spojeny s časnou repopulizací T lymfocytů [11].

Při alogenní transplantaci kostní dřeně dochází k abnormální diferenciaci nezralých dárcovských T lymfocytů v těle příjemce a přednostní expanzi podskupin T lymfocytů, které jsou u zdravých lidí málokdy detekovatelné [51]. Během prvních dvou měsíců po transplantaci tak vzniká rozmanitý repertoár  $\gamma\delta$  T lymfocytů, který pochází od dárce [11], a krátce po ní mohou dokonce tvořit většinovou populaci T lymfocytů [39]. Ještě několik měsíců po transplantaci lymfatické orgány vykazují nedostatek lymfocytů způsobený předtransplantačními podmínkami. V tomto období je pozorovatelný nárůst množství  $\gamma\delta$  T lymfocytů v periferní krvi [14; 47].

$\gamma\delta$  T lymfocyty zprostředkovávají nejdříve protinádorové reakce, dále jsou schopné usnadnit přijetí štěpu a mohou přispívat proti návratu nemoci. Nárůst množství  $\gamma\delta$  T lymfocytů je spojen s úbytkem  $\alpha\beta$  T lymfocytů [48; 52].

$\gamma\delta$  T lymfocyty nejsou primárními iniciátory GvHD a ve skutečnosti upravují GvHD aktivitu  $\alpha\beta$  T lymfocytů [48; 52]. V současné době je zkoumána jejich přesná role při transplantaci kostní dřeně a vzniku GvHD.

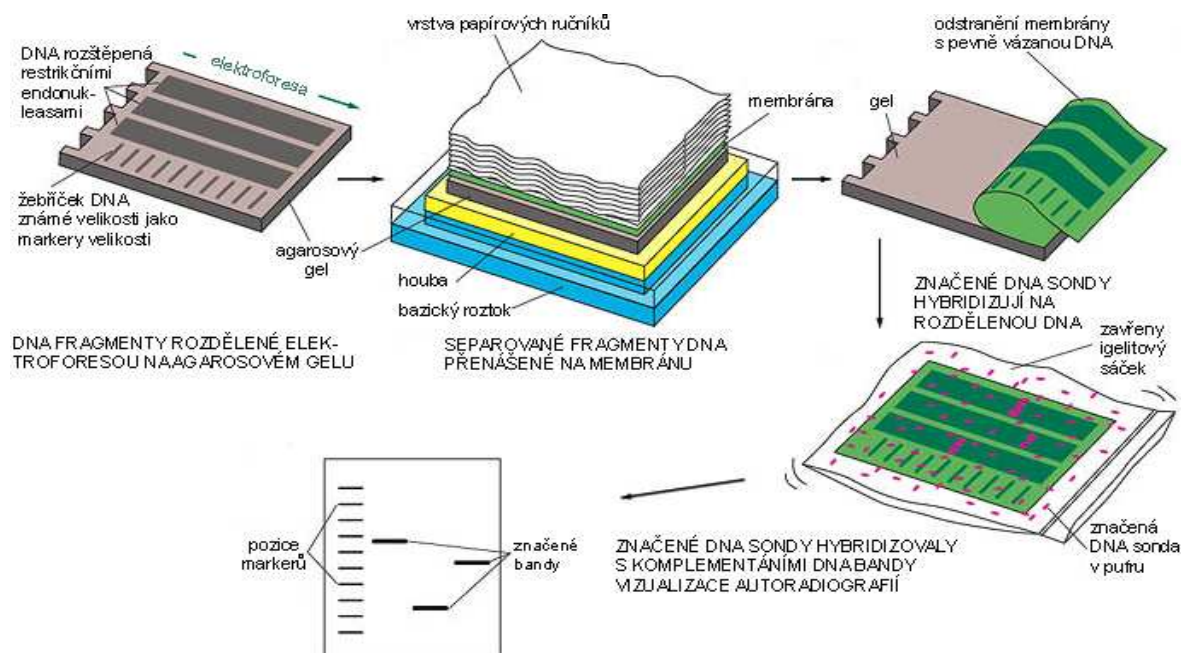
## **1.4 Metody detekce a studia $\gamma\delta$ T lymfocytů z periferní krve**

### **1.4.1 Southern a Northern Blot analýza hybridizace**

#### **1.4.1.1 Princip metody**

**Southern blotting** neboli **Southernův přenos** je metoda používaná v molekulární biologii při ověřování přítomnosti sekvence DNA ve vzorku [53;

54]. Tato metoda kombinuje elektroforézu na agarózovém gelu, která zajišťuje rozdělení DNA podle velikosti, s metodami, které takto rozdělenou DNA přenášejí na membránu kde následně hybridizuje s probami [1; 54].



**Obrázek 1.11: Southern blotting;** převzato z <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/dna/oldnlanguage.html> a upraveno

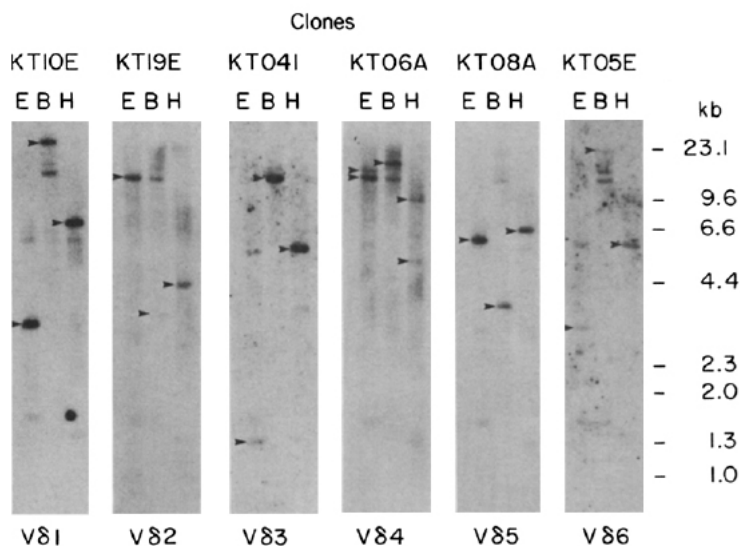
**Northern Blotting** neboli **Northernův přenos** je metoda molekulární biologie používaná ke studiu genové exprese, kdy se používá mRNA [1; 53]. Používá gelovou elektroforézu a hybridizační sondy. Gel obsahuje denaturační činidlo a je agarózový s formaldehydem nebo polyakrylamidový s močovinou. Hybridizační sondy mohou být vyrobeny jak z DNA, tak z RNA [1].

#### 1.4.1.2 Využití pro detekci a studium $\gamma\delta$ T lymfocyty

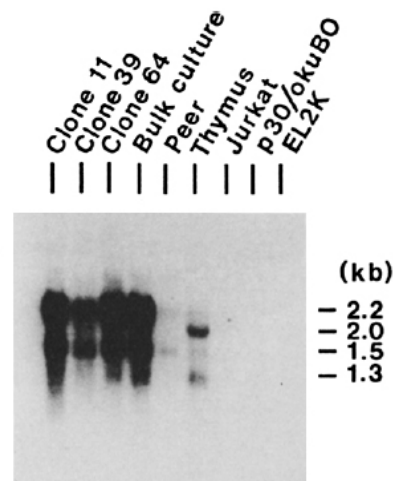
Při studiu  $\gamma\delta$  T lymfocytů se Southernův přenos používal ke zjištění sekvence kódujících jednotlivé řetězce a ke studiu sekvencí jednotlivých podrodin, a Northernův přenos ke studiu exprese proteinů a porovnávání jednotlivých řetězců s  $\alpha$  a  $\beta$  řetězci [17].

$\gamma\delta$  T lymfocyty jsou získávány z mononukleárních buněk periferní krve pomocí monoklonálních protilátek OKT3 (anti-CD3), CK.79 (anti-CD4), B9.4 (anti-CD8) a WT31 [17; 51; 55].

Pro Southernův přenos se používají *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII* [17; 51] a *kpnI* [51] restriční endonukleasy a elektroforéza je prováděna na 0,7% [51] nebo 0,8% [17] agarózovém gelu. Northernův přenos je prováděn na 1% agarózovém gelu [17] se 7 % formaldehydem [55].



Obrázek 1.12: Southernův přenos, analýza zárodečné DNA sestřižené *EcoRI* (E), *BamHI* (B) nebo *HindIII* (H); KT10E, KT19E, KT04I, KT08A, KT05E jsou označení pro jednotlivé klony  $\delta$  podrodin; převzato z [17]



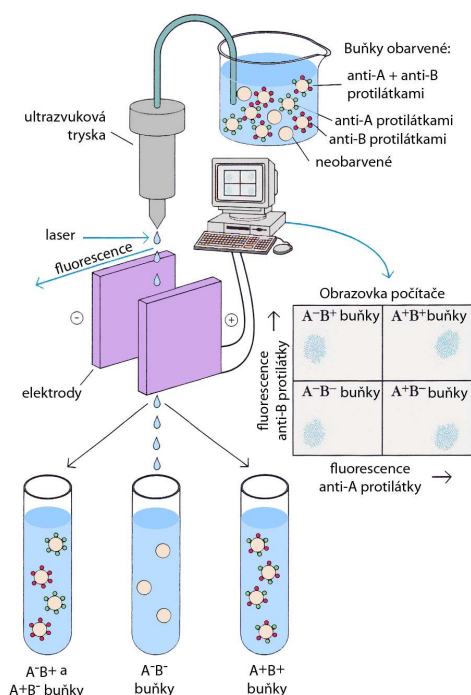
Obrázek 1.13: Northernův přenos, analýza  $\gamma\delta$  T lymfocytů z periferní krve (clone 11,39,64), tymocytů (thymus) a leukemické linie T lymfocytů (PEER, Jurkat, EL2K) [17]

## 1.4.2 Průtoková cytometrie, FACS

### 1.4.2.1 Princip metody

Tato metoda umožňuje třídění buněk do dvou a více frakcí, a to na základě fluorescenční charakteristiky. Buňky jsou barveny fluorescenčně značenými sondami, které jsou specifické pro dané molekuly a poté se měří množství fluorescence vyzářené buňkou. Používá se při ní průtokový cytometr, který kromě detekce fluorescenčních signálů měří také čelní a boční rozptyl světla charakterizující buňku co do velikosti a vnitřní struktury [1].

**FACS** (fluorescence-activated cell sorter) je upravený průtokový cytometr, který umožňuje rozdělování buněčných populací podle druhu a množství vázané fluorescenční sondy za použití elektromagnetického pole [1].



Obrázek 1.14: Separace průtokovým cytometrem, převzato z [4] a upraveno

#### 1.4.2.2 Využití pro detekci a studium $\gamma\delta$ T lymfocyty

Tato metoda se používá ke zjišťování zastoupení jednotlivých podrodin jak u zdravých, tak u nemocných jedinců. Dále je používána při sledování nárůstu a poklesu jednotlivých populací během léčby onemocnění a při transplantacích.

$\gamma\delta$  T lymfocyty se izolují z periferní heparinizované krve použitím monoklonálních protilátek OKT3 (anti-CD3), Leu2a (anti-CD8) a Leu3a (anti-CD4) [37], Leu18 (anti-CD45RA), anti-TCR $\alpha\beta$  (anti-TCR1), TCR $\delta$ 1 (anti-TCR $\gamma\delta$ ),  $\delta$ TCS-1 (anti-V $\delta$ 1), Ti $\gamma$ A (anti.V $\gamma$ 9), BB3 (anti-V $\delta$ 2) [39; 43], UCHT1 (anti-CD3) [43], SK7 (anti-CD3), MT310 (anti-CD4), 11F2 (anti-TCR pan  $\gamma\delta$ ) [11], Leu-4 (anti-CD3) I1F2 (pan- $\gamma\delta$ ), 5A6.E9 (pan- $\gamma\delta$ ), 15D (anti-V $\delta$ 2), 4A11 (anti-V $\gamma$ 4), 7A5 (anti-V $\gamma$ 9), 23D12 anti-V $\gamma$ 2, -V $\gamma$ 3, -V $\gamma$ 4) [30]. Izolace je prováděna z mononukleárních buněk periferní krve.

Buňky jsou obarveny při vazbě s monoklonálními protilátkami konjugovanými s FITC, PE, PE-Cy5, biotinem a PerCP.

Pro vyhodnocení se používá většinou dvou- (FITC, PE) [11; 30; 39; 52] a méně často třibarevná (FITC, PE, PerCp) [37] (FITC, PE, PE-Cy5) [56] analýza pomocí FACS průtokového cytometru.

### 1.4.3 PCR

#### 1.4.3.1 Princip metody

Polymerasová řetězová reakce (polymerase chain reaction, PCR) je biochemická a molekulárně biologická metoda, která slouží k enzymatické replikaci DNA bez použití živého organismu [57]. Detekce produktů je prováděna na agarózovém gelu a vizualizaci pod UV světlem umožňuje přidávaný EtBr, restričními endonukleasami v kombinaci Southernovým přenos, na polyakrylamidových gelů a DNA čípech. Získané produkty lze podrobit sekvenaci pro zjištění přesné sekvence každého fragmentu [57].

#### 1.4.3.2 Využití pro detekci a studium $\gamma\delta$ T lymfocyty

Využití metody PCR pro detekci  $\gamma\delta$  T lymfocytů je výhodné proto, že tato metoda umožňuje pracovat s velmi malým množstvím DNA/RNA, což je žádoucí, protože zisk nukleových kyselin je omezen malým počtem  $\gamma\delta$  T lymfocytů. Nukleové kyseliny jsou izolovány jak z mononukleárních buněk periferní krve, tak z epiteliálních buněk různých tkání.

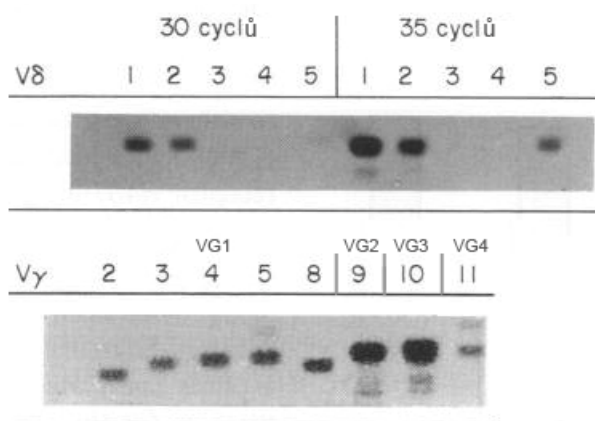
Využívá se pro detekci jednotlivých podrodin a rovněž k pozorování jejich exprese v průběhu výše zmíněných onemocnění a jejich léčbě.

Většinou se používá RT-PCR, která je modifikací PCR a slouží k detekci a kvantifikaci mRNA. RNA však nemůže sloužit při PCR jako templát, a proto je nejdříve převedena na cDNA pomocí retrovirové zpětné transkriptasy a poté amplifikována pomocí PCR se dvěma specifickými primery. V současné době je nejcitlivější metodou detekce a kvantifikace mRNA a v porovnání s Northernovým přenosem a RNase protection assay, dvěma dalšími používanými technikami kvantifikace mRNA, se při RT-PCR používá mnohem menších vzorků. Metoda je tak citlivá, že je možné detekovat jedinou buňku [57]. RNA je izolována buďto přímo z mononukleárních buněk periferní krve nebo jsou nejdříve z těchto buněk izolovány nejdříve izolovány  $\gamma\delta$  T lymfocyty a z nich je následně izolována RNA. Mezi další používané modifikace PCR patří nested-PCR a kvantitativní PCR.



Primery, které se používají, se vážou jeden na C a druhý na V oblast kódující řetězec. Primer vázající se na C oblast je vždy pro všechny  $\gamma$  a  $\delta$  podrodiny stejný a mění pouze primer vázající na V oblast.

Detekce PCR produktů je prováděna na 1,25 – 2,0% agarózovém gelu s Et-Br, následnou vizualizací UV světlem nebo Southernovým přenosem [43; 46; 58; 59] případně jsou podrobeny přímo sekvenaci [33; 36; 46; 58].



**Obrázek 1.15:** Southernův přenos PCR produktů u pacientů s Crohnovou chorobou, převzato z [43] a upraveno

## 2 Cíle práce

- zavedení metodiky PCR pro sestavování profilů  $\gamma\delta$  T lymfocytů
- porovnání profilů  $\gamma\delta$  T lymfocytů zdravých jedinců a pacientů s onkologickým onemocněním
- položit základ masivního testování v budoucnosti

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Získ periferní krve

Krev byla získávána od dobrovolných dárců z řad zdravých jedinců a pacientů, kteří podepsali informovaný souhlas. Odběr proběhl na oddělení Klinické biochemie a hematologie ve FN Brně Bohunicích.

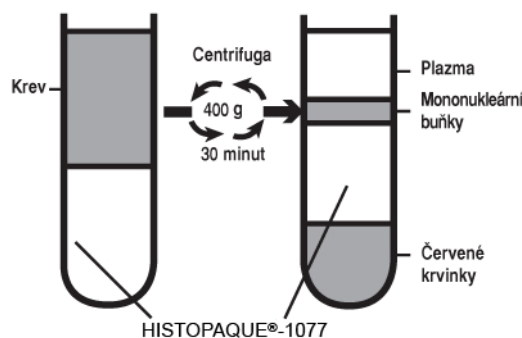
Bylo odebíráno 12 až 15 ml plné žilní krve do heparinizovaných zkumavek.

### 3.2 Zpracování periferní krve

#### 3.2.1 Získ mononukleárních buněk

Mononukleární buňky byly z krve izolovány gradientovou centrifugací na Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich). Postupovalo se dle protokolu HISTOPAQUE®-1077 (Procedure No. 1077) [60].

- 1) Odebraná krev byla rozdělena na čtyři stejné části do zkumavek se shodným množstvím PBS, promíchána a navrstvena na Histopaque®-1077, který byl 30 minut temperován při RT a jehož množství odpovídalo množství krve.
- 2) Následně byly zkumavky centrifugovány při 400 g/ 30 min/ RT.



Obrázek 3.1: Získ mononukleárních buněk pomocí Histopaque®-1077, převzato z [60] a upraveno

- 3) Pipetou byly odsáty interfáze s mononukleárními buňkami a byly přeneseny do nových zkumavek.
- 4) Do každé zkumavky bylo přidáno 10 ml PBS a obsah byl pipetou promíchán. Následovala centrifugace (250 g/ 10 min/ RT). Supernatant byl odstraněn.
- 5) Pelety byly promyty 5 ml PBS a suspenze byly centrifugovány 250 g/ 10 min/ RT.

- 6) Po odstranění supernatantů byly buňky rozsuspendovány v 0,5 ml PBS a spojeny do dvou zkumavek.

### **3.2.2 Odstranění erytrocytů**

- 1) K buňkám v 1 ml PBS bylo přidáno 5 ml 1x lyzačního pufru, směs byla inkubována (15 min/ 4 °C) a následně centrifugována (1500 rpm/ 5 min/ RT). Supernatant byl odstraněn.
- 2) Peleta byla promyta v 1 ml PBS a centrifugována (1500 rpm/ 5 min/ RT). Supernatant byl odstraněn.
- 3) Buňky byly rozsuspendovány v 1 ml PBS.

### **3.2.3 Izolace $\gamma\delta$ T lymfocytů**

Při izolaci  $\gamma\delta$  T lymfocytů z mononukleárních buněk byl použit Anti-TCR $\gamma/\delta$  MicroBead Kit human (Miltenyi Biotec). Bylo postupováno dle protokolu Anti-TCR $\gamma/\delta$  MicroBead Kit [61].

#### **3.2.3.1 Magnetické značení**

- 1) Buněčná suspenze byla centrifugována 300g/ 10 min/RT a vzniklý supernatant byl odstraněn.
- 2) Peleta byla rozsuspendována ve 40  $\mu$ l pufru, směs PBS (pH 7,2), 0,5% BSA a 2 mM EDTA.
- 3) Ke směsi bylo přidáno 10  $\mu$ l anti-TCR  $\gamma/\delta$  Hapten-Antibody. Následovala inkubace 10 minut/ 4 až 8 °C.
- 4) Dále bylo přidáno 30  $\mu$ l pufru a 20  $\mu$ l MACS Anti-Hapten MicroBeads-FITC, se kterými byla směs inkubována 15 min/ 4 až 8 °C.
- 5) Buňky byly promyty 1 až 2 ml pufru a centrifugovány (300g/ 10 min/ RT).
- 6) Supernatant byl odstraněn a peleta rozsuspendována v 500  $\mu$ l pufru.

#### **3.2.3.2 Magnetická separace**

- 1) Kolona byla umístěna do magnetického pole a byla promyta 500  $\mu$ l pufru.
- 2) Na kolonu byla nanášena rozsuspendovaná peleta.

- 3) Pro odstranění neznačených buněk byla kolona 3x promyta 500  $\mu$ l pufru.
- 4) Kolona byla odstraněna z magnetického pole a umístěna na novou zkumavku.
- 5) Následovalo propláchnutí kolony 1 ml pufru za použití pístu. Tímto byly získány  $\gamma\delta$  T lymfocyty.

### 3.2.4 Izolace total RNA

#### 3.2.4.1 RNAqueous®-Micro Kit

Izolace total RNA z  $\gamma\delta$  T lymfocytů získaných dle předešlého postupu byla provedena pomocí RNAqueous®-Micro Kit (Ambion). Postupovalo se dle protokolu RNAqueous®-Micro Kit [62].

1. Příprava buněk: Buňky byly centrifugovány 1500 rpm/ 5 min/ RT, supernatant byl odstraněn.

2. Lyze buněk: K buňkám bylo přidáno 200  $\mu$ l Lysis Solution a směs byla řádně promíchána vortexem. Dále bylo přidáno 50  $\mu$ l 100% EtOH, krátce promícháno vortexem, naneseo na kolonu a centrifugováno (13000 rpm/ 1 min/ RT). Na kolonu bylo naneseo 180  $\mu$ l Wash Solution 1 (centrifugace 13000 rpm/ 1 min/ RT) a 2x 180  $\mu$ l Wash Solution 2/3 (centrifugace 13000rpm/ 1 min/ RT). Pro vysušení byla kolona nasucho centrifugována (13000 rpm/ 1min/ RT), kolona byla umístěna na čistou 1,5ml zkumavku a bylo na ni 2x naneseo 6  $\mu$ l zahřátého (75 °C) Elution Solution. Po inkubaci (1min/ RT) byla provedena centrifugace (13000 rpm/ 1 min/ RT).

3. Odstranění DNA: Do směsi bylo přidáno 10x DNase I Buffer, a to v množství odpovídajícímu 1/10 množství získané RNA, a 1  $\mu$ l DNase I. Směs byla jemně promíchána a inkubována (20-30 min/ 37 °C). Byl přidán DNase Inactivation Reagent, a to v množství odpovídajícímu 1/10 objemu směsi. V polovině inkubace (2 min/ RT) byla směs promíchána na vortexu. Následovala centrifugace 13000 rpm/ 1,5 min/ RT. Supernatant obsahující RNA byl odebrán do nové zkumavky.

4. Určení koncentrace total RNA: K určení koncentrace získané total RNA byl použit přístroj nano-drop (Thermo Scientific). Jako blank sloužil Elution Solution.

Total RNA byla následně buďto uložena do -80 °C k pozdějšímu použití nebo byla dále zpracována.

### 3.2.4.2 RNeasy® Mini Kit

Izolace total RNA z mononukleárních buněk získaných dle předešlého postupu byla provedena pomocí RNeasy Mini Kit (Qiagen). Bylo postupováno dle protokolu Purification of Total RNA from Animal Cells Using Spin Technology [63].

- 1) Buňky byly centrifugovány 300 g/ 5 min/ RT a supernatant byl odstraněn.
- 2) Peleta byla uvolněna ze stěny zkumavky a bylo k ní přidáno 600 µl směsi RLT pufru a β-merkaptoethanolu v poměru 100:1. Směs byla 30 vteřin homogenizována mixérem.
- 3) Směs byla po přidání 600 µl 70% EtOH promíchána pipetou, ve dvou krocích nanesena na kolonu a vždy centrifugována (12000 rpm/ 1 min/ RT). Supernatant byl po každé centrifugaci odstraněn.
- 4) Na kolonu bylo naneseno 350 µl RW1 pufru. Po inkubaci (5 min/ RT) následovala centrifugace (12000 rpm/ 1 min/ RT). Supernatant byl odstraněn.
- 5) Dále bylo na kolonu naneseno 80 µl DNase mixu, se kterým se inkubovala 15 min/ RT. Následně bylo přidáno 350 µl RW1 pufru a kolona byla centrifugována 12000 rpm/ 1 min/ RT.
- 6) Spodní část kolony byla vyměněna, na kolonu bylo naneseno 500 µl RPE a kolona byla centrifugována (12000 rpm/ 1 min/ RT).
- 7) Na kolonu bylo opět naneseno 500 µl RPE a byla centrifugována 12000 rpm/ 2 min/ RT.
- 8) Kolona byla nasazena na novou zkumavku a nasucho centrifugována (12000 rpm/ 2 min/ RT).

9) Kolona byla opět umístěna na novou zkumavku, bylo na ní nanášeno 30  $\mu\text{l}$  RNase free vody, se kterými byla inkubována (5 min/ RT) a poté byla centrifugována (12000 rpm/ 1 min/ RT).

Po izolaci byla pro následnou práci určena koncentrace získané total RNA a to buď na spektrofotometru nebo přístroji nano-drop (Thermo Scientific). Total RNA byla buďto uložena do  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  k pozdějšímu použití nebo byla dále zpracována.

### 3.3 Amplifikace RNA

Získaná total RNA byla v případě potřeby namnožena pomocí SenseAMP Plus™ RNA Amplification Kit (Genisphere). Postupovalo se dle SenseAMP Plus protokolu [63]. Množství vkládané total RNA bylo 0,5  $\mu\text{g}$ .

### 3.4 Zpětná transkripce, syntéza cDNA

Do zkumavky bylo napipetováno 1  $\mu\text{l}$  oligo (dT)<sub>23</sub>, 2  $\mu\text{l}$  20 mM dNTP (směs dATP, dCTP, dGTP, dTTP), množství total RNA odpovídající 1  $\mu\text{g}$  a PCR voda, která směs doplnila na objem 12  $\mu\text{l}$ . Směs byla inkubována 5 min/ 65  $^{\circ}\text{C}$ , zchlazena na 0  $^{\circ}\text{C}$  a dána na led. Byly do ní přidány 4  $\mu\text{l}$  5x First-Strand Buffer, 2  $\mu\text{l}$  0,1 M DTT a 1  $\mu\text{l}$  RNazinu. Následovala inkubace 2 min/ 42  $^{\circ}\text{C}$ . Poté byl přidán 1  $\mu\text{l}$  RTasy a směs byla inkubována 60 min/ 42  $^{\circ}\text{C}$  a 15 min/ 70  $^{\circ}\text{C}$ .

Množství získané cDNA při jedné zpětné transkripci bylo 20  $\mu\text{l}$ .

### 3.5 PCR

Master mix 1 PCR reakce měl objem 50  $\mu\text{l}$ . Jeho složení bylo: 32,1  $\mu\text{l}$  PCR vody, 5  $\mu\text{l}$  10x Taq pufru, 2  $\mu\text{l}$  20mM dNTP (směs dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,5  $\mu\text{l}$  50  $\mu\text{M}$  V $\gamma$  (V $\delta$ ) primeru, 0,5  $\mu\text{l}$  50  $\mu\text{M}$  C $\gamma$  (C $\delta$ ) primeru, 1,5  $\mu\text{l}$  cDNA, 8  $\mu\text{l}$  směsi MgCl<sub>2</sub> s PCR vodou a 0,4  $\mu\text{l}$  Taq polymerasy.

Takto připravená směs byla vložena do termocykleru (Bio-Rad), kde probíhala amplifikace. Program byl:

- počáteční denaturace: 2,5 minuty/ 94  $^{\circ}\text{C}$

- amplifikační cyklus (3 kroky), 35 cyklů:
  - denaturace: 30 vteřin/ 94 °C
  - připojení primerů: 45 vteřin/  $t_a$  (dle V primeru)
  - prodloužení primerů: 45 vteřin/ 74 °C
- závěrečná extenze: 7 minut/ 74 °C

Oligonukleotidové sekvence jednotlivých primerů byly navrženy dle [59] a byly syntetizovány na Oddělení funkční genomiky a proteomiky ústavu experimentální biologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity. Primery byly dodány purifikované na Sephadexu G-25, se známou molární hmotností, extenčním koeficientem, absorbancí při 260 nm a  $t_m$  (tab. III).

Tabulka III  
Vlastnosti primerů

primer	sekvence (5' → 3')	$M_r$ (g.mol <sup>-1</sup> )	$\epsilon$ (l.μmol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ).10 <sup>-3</sup>	$A_{260}$	$t_m$ (°C)
V $\gamma$ 1	GGA GAA CGA AGT CAG TCA	5581,73	195,8	5,5	52,1
V $\gamma$ 2	CCA GTA CTA AAA CGC TGT C	5756,85	185,8	5,7	52,7
V $\gamma$ 3	CAG CTA TCC ATT TCC ACG G	5723,81	172,6	5,0	54,9
V $\gamma$ 4	GCA AAT AAG AGT GCC CAC	5501,69	187,8	4,9	52,1
V $\delta$ 1	TCT GGA TCA AGT GTG GC	5265,51	171,4	5,0	50,0
V $\delta$ 2	TCT GGG CAG GAG TCA TGT	5570,69	174,6	6,4	54,3
V $\delta$ 3	GGC ACG CTG TGT GAC AAA	5548,70	182,5	5,6	54,3
V $\delta$ 4	GAC ACC AGT GAT CCA AGT T	5796,87	189,8	5,9	52,7
V $\delta$ 5	GAT GAC CAG CAA GTT AAG C	5845,91	199,7	5,2	52,7
V $\delta$ 6	TAT CAT GGA TTC CCA	4527,04	142,4	4,0	42,0
C $\gamma$	AGG TAT GTT CCA GCC TTC	5465,63	164,1	5,4	52,1
C $\delta$	TTC ACC AGA CAA GCG ACA	5461,66	183,9	5,2	52,1

$M_r$ -molární hmotnost,  $\epsilon$ -extenční koeficient,  $A_{260}$ -absorbance při 260 nm

Na základě těchto údajů byla vypočítána koncentrace oligonukleotidů a ty byly následně rozpuštěny ve vodě tak, aby výsledná koncentrace byla 50 μM.



## **3.6 Elektroforéza PCR produktů**

### **3.6.1 Klasická elektroforéza**

#### **3.6.1.1 Příprava 2% gelu**

V baňce byly ve 100 ml 0,5x TBE pufru rozpuštěny 2 g agarózy, rozvařeny v mikrovlnné troubě a následně ochlazeny přibližně na 55 °C. Do zchladlé agarózy bylo přidáno 6 µl EtBr, které byly točením baňkou do agarózy zamíchány. Takto připravená agarózy byla nalita do předem připravené formy na gel a následně byl do gelu vložen 12 jamkový hřebínek. Gel nejméně 30 minut při RT tuhnul. Poté byl přelit 600 ml 0,5x TBE pufru a byl odstraněn hřebínek. Během a po přidání Et-Br do agarózy se pracovalo ve tmě.

#### **3.6.1.2 Příprava vzorků a žebříčku**

K 20 µl PCR reakce byly přidány 4 µl a k 1 µl žebříčku 1 µl 5x PCR vkládacího pufru.

#### **3.6.1.3 Vlastní elektroforéza**

Vzorky a žebříček byly nanесeny do jamek gelu a následně bylo vloženo napětí 68 V. Elektroforéza probíhala 3 hodiny a po celou dobu byla elektroforetická vana chlazena ledem.

#### **3.6.1.4 Vyhodnocení elektroforézy**

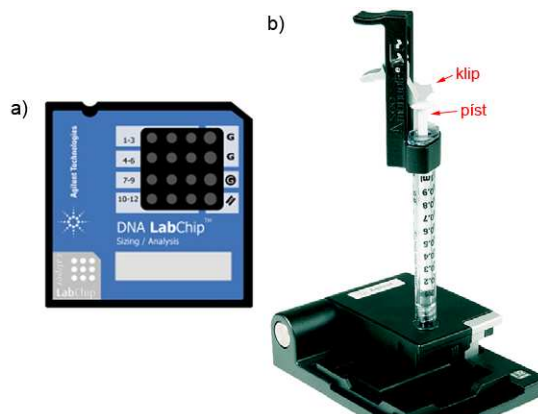
Vyhodnocení elektroforézy probíhalo pomocí UV transluminátoru (SynGene). Gel byl v temné místnosti prosvícen UV zářením a vyfocen digitálním fotoaparátem (Epson PhotoPC 3100Z).

### **3.6.2 Elektroforéza na čipu – Bioanalyzátor Agilent 2100**

Při analýze PCR produktů na čipu byl použit Agilent DNA 1000 Kit (Agilent Technologies, Molecular Probes Inc.). Bylo postupováno dle protokolu Agilent DNA 1000 Kit Quick Start Guide [64].

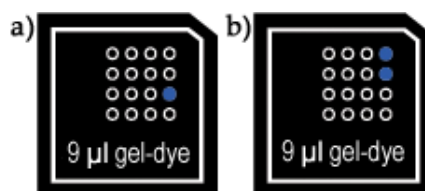
### 3.6.2.1 Vkládání Gel-Dye Mix

1) DNA Lab-chip (obr. 3.2 a) byl vložen do chip priming station (obr. 3.2 b).



Obrázek 3.2: a) DNA Lab-chip b) chip priming station

- 2) Do jamky s označením **G** bylo napipetováno 9,0  $\mu$ l směsi Gel-Dye (●, obr. 3.3 a), která byla před použitím temperována 30 min/ RT.
- 3) Chip priming station byla zavřena a píst byl stlačen až po klip a ponechán v této pozici 60 vteřin, kdy byl uvolněn.
- 4) Chip priming station byla otevřena a do jamek s označením **G** bylo napipetováno 9,0  $\mu$ l směsi Gel-Dye (obr. 3.3 b).



Obrázek 3.3: Vkládání směsi Gel-Dye


### 3.6.2.2 Vkládání markerů

1) Do jamek označených čísly 1 až 12 a symbolem bylo napipetováno 5  $\mu$ l markerů (●).

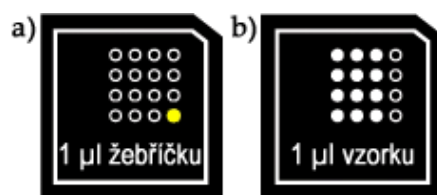


Obrázek 3.4: Vkládání markerů

### 3.6.2.3 Vkládání žebříčku a vzorků

1) Do jamky  s označením bylo napipetováno 1,0  $\mu$ l DNA žebříčku (●, obr. 3.5 a).

- 2) Do jamek označených čísly 1 až 10 byl napipetován 1,0  $\mu\text{l}$  vzorku ( $\circ$ , obr. 3.5 b). Jamky 11 a 12 byly vyplněny 1,0  $\mu\text{l}$  deionizované vody ( $\circ$ , obr. 3.5 b).



Obrázek 3.5: Vkládání a) žebříčku b) vzorků a deionizované vody

- 3) Čip byl v horizontální poloze vložen do speciálního vortexu a vortexován (1500 rpm/ 1 min).
- 4) Takto připravený čip byl následně vložen do bioanalyzáru Agilent 2100 (Agilent Technologies), kde byla provedena analýza vzorků.

### 3.7 Statistická analýza

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ( $\bar{x}$ )  $\pm$  SD. K vyhodnocení statistické významnosti zjištěných rozdílů byl použit Studentův  $t$  test.

## 4 Výsledky

Získané výsledky jsou rozděleny do tří částí

- Optimalizace metody PCR pro profilování  $\gamma\delta$  T lymfocytů
- Aplikace metody PCR na klinické vzorky
- Kvantifikace získaných dat

### 4.1 Optimalizace metody PCR pro profilování $\gamma\delta$ T lymfocytů

Pro sestavování a studium profilů  $\gamma\delta$  T lymfocytů byla vybrána metoda PCR. Aby bylo možné provádět kompletní panel PCR reakcí, který by obsahoval všechny podrodiny  $\gamma\delta$  T lymfocytů, bylo nezbytné metodu optimalizovat. Při optimalizaci byla určena hodnota  $t_a$  a koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů pro každou podrodinu. Výsledkem byl panel, jehož nastavení bylo použito při kvantifikaci klinických vzorků.

K optimalizaci byla používána reakční směs, master mix. Složení směsi bylo: 32,1  $\mu$ l PCR vody, 5  $\mu$ l Taq pufru, 2  $\mu$ l směsi dNTP, 0,5  $\mu$ l V primeru, 0,5  $\mu$ l C primeru, 8  $\mu$ l směsi  $MgCl_2$  a PCR vody, 1,5  $\mu$ l cDNA a 0,4  $\mu$ l Taq polymerasy. V průběhu optimalizace byla používána cDNA získaná zpětnou transkripcí RNA (tab. IV).

Tabulka IV  
RNA používaná při optimalizaci

vzorek	věk/pohlaví	RNA	koncentrace (ng. $\mu$ l <sup>-1</sup> )	amplifikace
1	34/Ž	$\gamma\delta$	176,9	+/-
2	26/M	$\gamma\delta$	0	+
3	25/Ž	$\gamma\delta$	116,0	+/-
4	62/M	MNC	420,3	-
5	61/Ž	MNC	686,3	-
6	24/Ž	MNC	231,7	-

M/Ž, muž/žena;  $\gamma\delta$ , RNA izolovaná z  $\gamma\delta$  T lymfocytů; MNC, RNA izolovaná z mononukleárních buněk; +/-, cDNA získaná při použití/nepoužití amplifikované RNA

Na začátku procesu optimalizace byl každý primer amplifikován při sérii PCR reakcí. Složení jednotlivých reakcí se lišilo pouze koncentrací  $Mg^{2+}$  iontů, tedy množstvím přítomné  $MgCl_2$ . Byla vytvořena tzv. koncentrační řada (tab. V).

**Tabulka V**  
Koncentrační řada  $MgCl_2$

konečné ředění ( $\mu M$ )	25 mM $MgCl_2$ ( $\mu l$ )	PCR voda ( $\mu l$ )
0,8	1,6	6,4
1,5	3,0	5,0
2,0	4,0	4,0
2,5	5,0	3,0
3,0	6,0	2,0
3,5	7,0	1,0
4,0	8,0	0

množství jednotlivých složek pro jednu PCR reakci (8  $\mu l$ )

Reakční podmínky byly při všech reakcích shodné a rozdíly byly pouze v hodnotách  $t_a$  u jednotlivých primerů (tab. VI). Určení výchozí hodnoty  $t_a$  každého V primeru je odvíjelo od hodnoty  $t_m$ , která byla stanoven při syntéze. Pro získání  $t_a$  bylo od této hodnoty odečteno 5 až 6 °C. Výjimkou byl V $\delta$ 6 primer, jehož teplota  $t_m$  byla navržena na 42 °C. Tato teplota není sama o sobě jako  $t_a$  zcela vhodná, protože při ní mohou vznikat nespecifické produkty. Snížení této teploty o 5 až 6 °C by mohlo tuto pravděpodobnost ještě zvýšit, a proto bylo přistoupeno k opačnému kroku a jako výchozí  $t_a$  byla zvolena teplota vyšší než je  $t_m$ .

**Tabulka VI**  
Výchozí hodnoty  $t_a$  pro jednotlivé V $\delta$  primery v porovnání s jejich  $t_m$

primer	$t_m$ (°C)	$t_a$ (°C)	primer	$t_m$ (°C)	$t_a$ (°C)
V $\gamma$ 1	52,1	47,0	V $\delta$ 1	50,0	45,0
V $\gamma$ 2	52,7	47,0	V $\delta$ 2	54,3	49,0
V $\gamma$ 3	54,9	50,0	V $\delta$ 3	54,3	49,0
V $\gamma$ 4	52,1	47,0	V $\delta$ 4	52,7	47,0
			V $\delta$ 5	52,7	47,0
			V $\delta$ 6	42,0	45,0

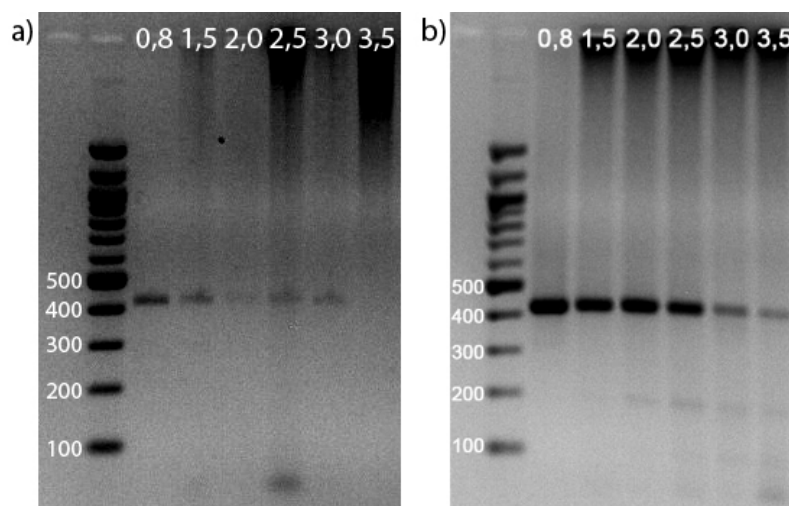
Výsledkem reakcí měl být vznik produktů (sekvencí) příslušné délky (tab. VII), které by se po provedení gelové elektroforézy ukázaly v příslušné oblasti jako viditelné bandy.

**Tabulka VII**  
Přibližné délky produktů jednotlivých primerů

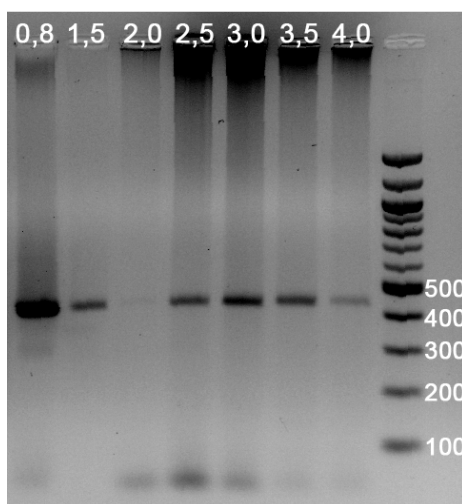
primery	délka (bp)
V $\gamma$	400 – 450
V $\delta$	200 – 500

převzato z [58; 59]

Nejprve byly vyzkoušeny V $\gamma$  primery. V $\gamma$ 1, V $\gamma$ 2 a V $\gamma$ 3 primery poskytly elektroforeticky detekovatelné produkty téměř při každé koncentraci Mg<sup>2+</sup> iontů. Pouze u V $\gamma$ 4 primeru nebyly patrné žádné bandy, ať již specifické či nespecifické, a to ani při vyšších koncentracích Mg<sup>2+</sup> iontů.

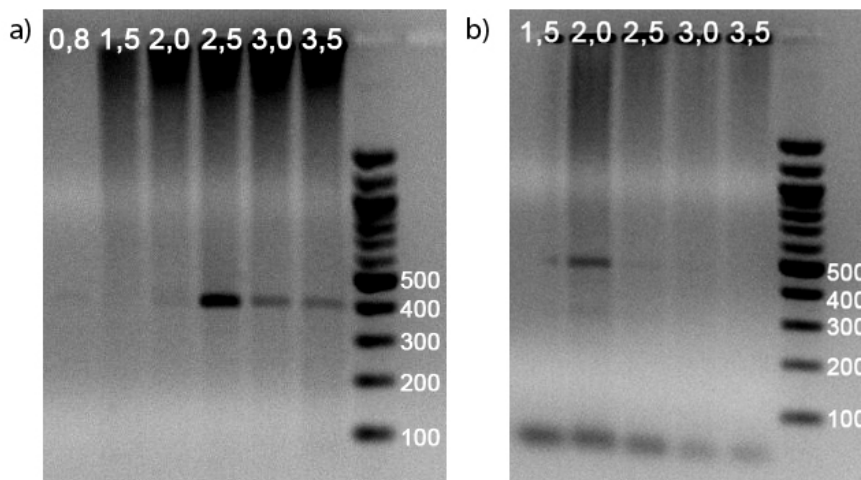


Obrázek 4.1: Snímky gelů po elektroforéze a) V $\gamma$ 1 b) V $\gamma$ 2, koncentrační řada Mg<sup>2+</sup> iontů od 0,8 do 3,5 mM



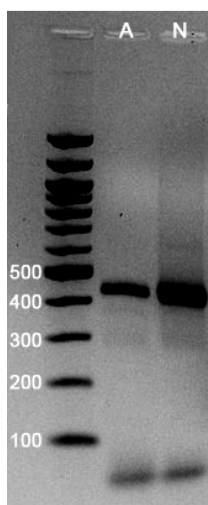
Obrázek 4.2: Snímek gelu po elektroforéze V $\gamma$ 3 primeru, koncentrační řada Mg<sup>2+</sup> iontů od 0,8 do 4,0 mM

Následovaly reakce s V $\delta$  primery. Elektroforeticky detekovatelné produkty vznikly u V $\delta$ 3 a V $\delta$ 5 primerů. Bandy byly patrné opět téměř při všech koncentracích Mg<sup>2+</sup> iontů, ale měly slabší intenzitu než u V $\gamma$  primerů. Ostatní V $\delta$  primery dávaly po elektroforéze stejný výsledek jako V $\gamma$ 4 primer.



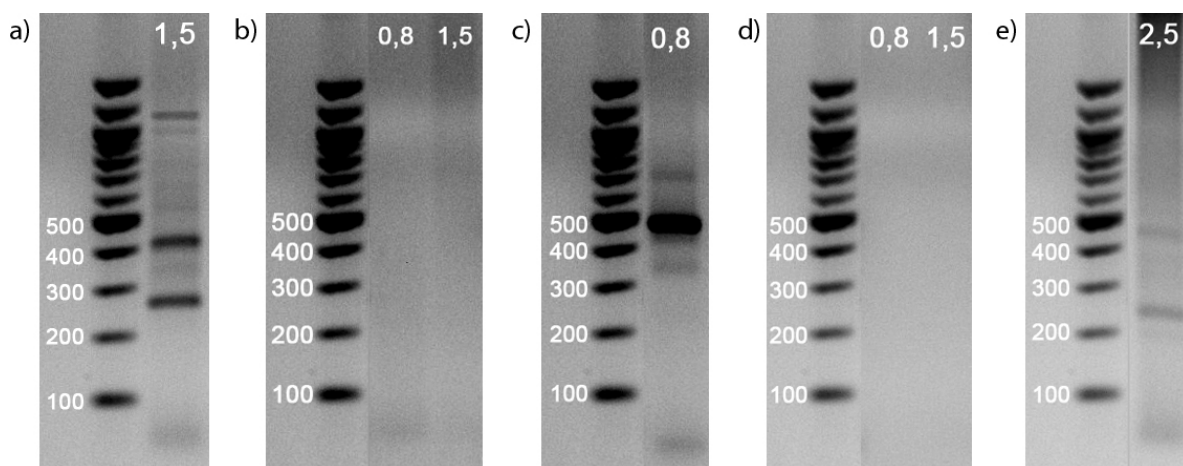
**Obrázek 4.3:** Snímky gelů po elektroforéze a) V $\delta$ 3 v koncentrační řadě Mg<sup>2+</sup> od 0,8 do 3,5 mM b) V $\delta$ 5 primerů v koncentrační řadě Mg<sup>2+</sup> od 1,5 do 3,5 mM

Po odzkoušení všech primerů bylo provedeno srovnání reakcí při použití cDNA syntetizované z amplifikované a neamplifikované RNA, které mělo ukázat, zda může mít amplifikace RNA vliv na konečný výsledek. K tomuto srovnání byl vybrán V $\gamma$ 3 primer, koncentrace Mg<sup>2+</sup> iontů byla 0,8 mM,  $t_a$  měla výchozí hodnotu a množství vkládané cDNA bylo u amplifikované 1,5  $\mu$ l a u neamplifikované 2,5  $\mu$ l. Při následné elektroforéze bylo zjištěno, že neamplifikovaná RNA, potažmo cDNA, poskytla dobrý výsledek.

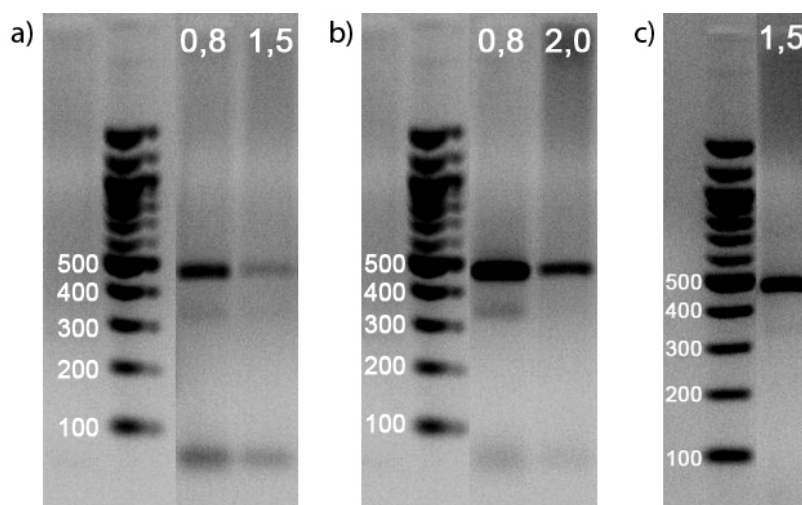


**Obrázek 4.4:** Porovnání použití amplifikované (A) a neamplifikované (N) RNA u V $\gamma$ 3 primeru

Pro ověření byly provedeny další reakce a jinými primery. Množství cDNA vkládané do master mixu bylo nejprve 2,5  $\mu$ l a poté 1,5  $\mu$ l. Koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů byly vybrány podle předchozích výsledků (primery s elektroforeticky detekovatelnými produkty) nebo byly zvoleny nižší koncentrace (primery, které neposkytly elektroforeticky detekovatelné produkty). Byly použity výchozí hodnoty  $t_a$ . V $\gamma$ 4 a V $\delta$ 2 primery nově poskytly elektroforeticky detekovatelné produkty (obr. 4.5 a, c).



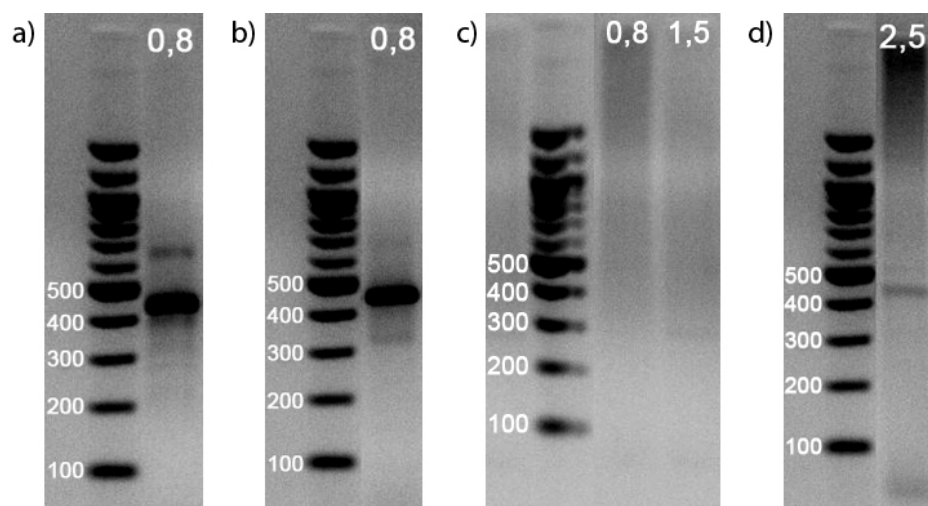
Obrázek 4.5: Snímky gelů po elektroforéze a) V $\gamma$ 4 b) V $\delta$ 1 c) V $\delta$ 2 d) V $\delta$ 4 e) V $\delta$ 5 primerů, vloženo 2,5  $\mu$ l neamplifikované cDNA, koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů (mM) uvedena v záhlaví gelů



Obrázek 4.6: Snímky gelů po elektroforéze a) V $\gamma$ 1 b) V $\gamma$ 2 c) V $\delta$ 3 primerů, vloženo 1,5  $\mu$ l neamplifikované cDNA, koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů (mM) uvedena v záhlaví gelů

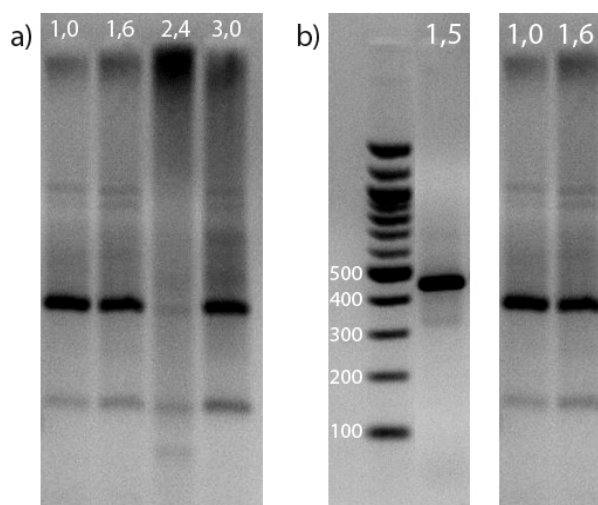
U čtyř primerů bylo za těchto nových podmínek vyzkoušeno navýšení teploty  $t_a$  o 2  $^{\circ}C$ . Pro primery V $\gamma$ 1, V $\gamma$ 2 a V $\delta$ 5 byla hodnota  $t_a$  zvýšena na 49  $^{\circ}C$  a pro V $\gamma$ 4 na 47  $^{\circ}C$ . U V $\gamma$ 1, V $\gamma$ 2 a V $\delta$ 5 primerů nemělo zvýšení teploty na výsledek negativní vliv, ale u V $\gamma$ 4 primeru nevznikl elektroforeticky detekovatelný produkt (obr. 4.7).





**Obrázek 4.7:** Snímky gelů po elektroforéze a) V $\gamma$ 1 b) V $\gamma$ 2 c) V $\gamma$ 4 d) V $\delta$ 5 primerů, vloženo 1,5  $\mu$ l neamplifikované cDNA, koncentrace Mg<sup>2+</sup> iontů (mM) uvedena v záhlaví gelů

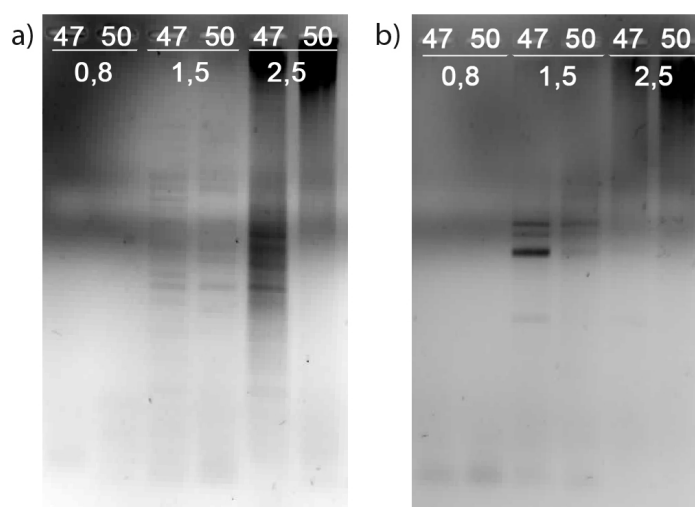
Na základě těchto výsledků bylo přistoupeno k používání pouze neamplifikované RNA, a proto bylo nutné zvýšit její zisk. Dosavadní izolační postup poskytoval pouze malé množství RNA, bylo tedy přistoupeno ke změně v izolaci RNA. Byla vynechána izolace  $\gamma\delta$  T lymfocytů, protože každý krok této izolace vede ke ztrátě buněk, tedy RNA, a RNA byla izolována přímo z mononukleárních buněk. Pro ověření zda takto získaná RNA nemá negativní vliv na výsledek reakce, byly provedeny reakce s V $\gamma$ 2 primerem. Do master mixu bylo v tomto případě vloženo různé množství cDNA tak, aby bylo možné porovnat závislost vzniku produktů na množství cDNA a určit kolik cDNA se bude v dalším průběhu optimalizace do reakcí vkládat. Zvolená koncentrace Mg<sup>2+</sup> iontů 1,5 mM a  $t_a$  byla 49 °C.



**Obrázek 4.8:** Snímky gelů V $\gamma$ 2 primeru po elektroforéze a) při použití RNA z mononukleárních buněk, množství vkládané cDNA uvedeno v záhlaví ( $\mu$ l) b) porovnání V $\gamma$ 2 primeru při použití RNA z  $\gamma\delta$  T lymfocytů (vlevo) a z mononukleárních buněk (vpravo), množství vložené cDNA uvedeno v záhlaví ( $\mu$ l)

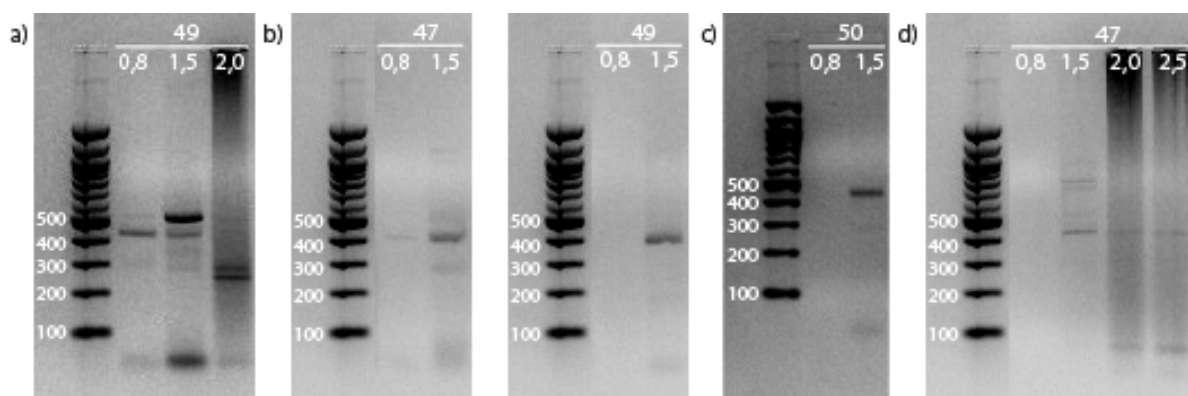
Výsledkem tohoto porovnání bylo, že se při optimalizaci dále používala RNA získaná z mononukleárních buněk a množství cDNA vkládané do master mixu bylo 1,0  $\mu$ l.

Následovaly reakce s V $\delta$ 1 a V $\delta$ 4 primery, u kterých do té doby nevznikly detekovatelné produkty. Reakční podmínky byly následující: byly stanoveny tři různé koncentrace Mg<sup>2+</sup> iontů, 0,8, 1,5 a 2,5 mM, a dvě hodnoty t<sub>a</sub>, 47 a 50 °C. S každým primerem byla provedena reakce při všech koncentracích Mg<sup>2+</sup> iontů a při obou t<sub>a</sub>. Výsledkem byl vznik elektroforeticky detekovatelných produktů u obou primerů.

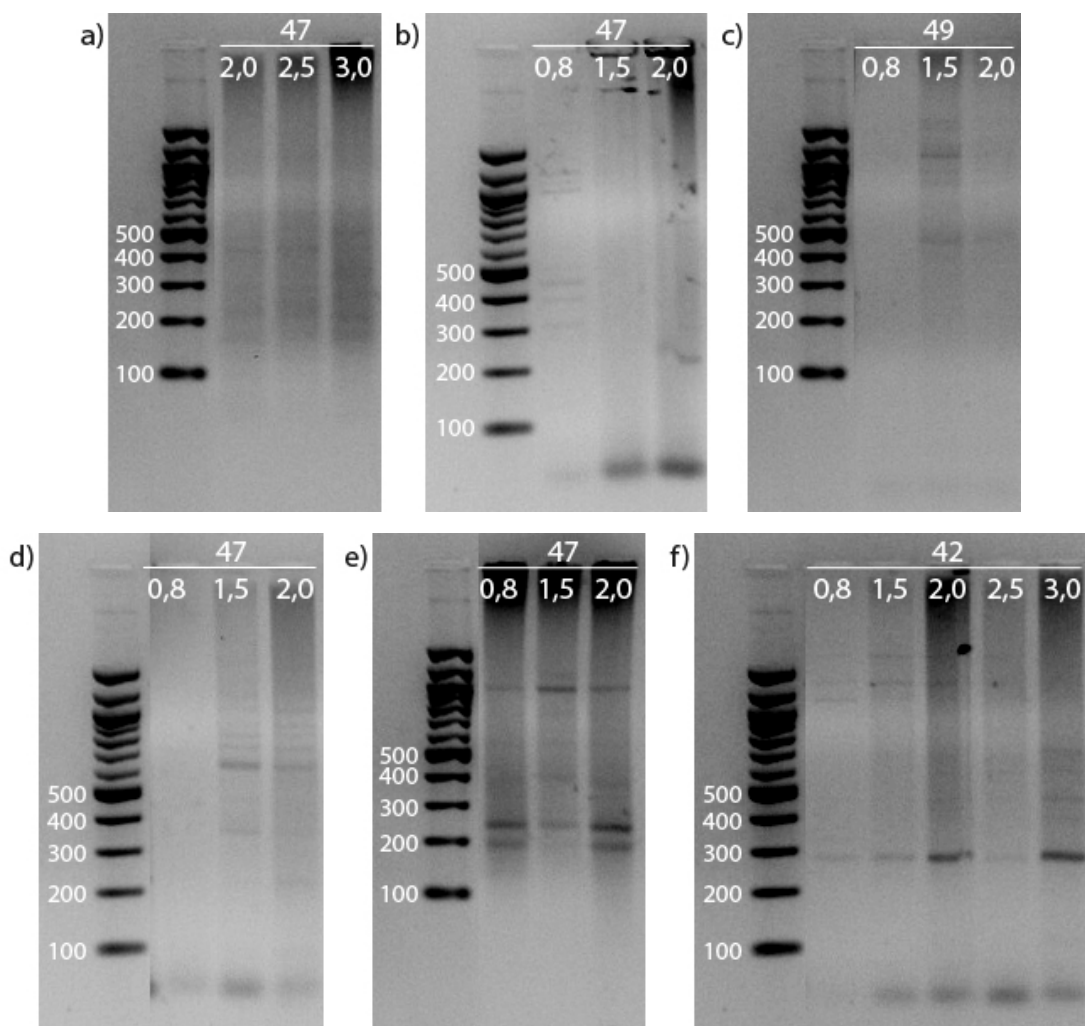


**Obrázek 4.9:** Snímky gelů po elektroforéze a) V $\delta$ 1 b) V $\delta$ 4 primerů, hodnoty t<sub>a</sub> (°C) a koncentrací Mg<sup>2+</sup> iontů (mM) uvedeny v záhlaví gelů

Před další částí optimalizace byly ověřeny dosavadní výsledky a s každým primerem byly provedeny reakce, kdy t<sub>a</sub> a koncentrace Mg<sup>2+</sup> iontů měly hodnoty, při kterých vznikaly detekovatelné produkty. V případě koncentrací Mg<sup>2+</sup> iontů byly použity vždy nejnižší hodnoty.



**Obrázek 4.10:** Snímky gelů V $\gamma$  primerů po elektroforéze a) V $\gamma$ 1 b) V $\gamma$ 2 c) V $\gamma$ 3 d) V $\gamma$ 4, hodnoty t<sub>a</sub> (°C) a koncentrací Mg<sup>2+</sup> iontů (mM) uvedeny v záhlaví gelů



Obrázek 4.11: Snímky gelů V $\delta$  primerů po elektroforéze a) V $\delta$ 1 b) V $\delta$ 2 c) V $\delta$ 3 d) V $\delta$ 4 e) V $\delta$ 5 f) V $\delta$ 6, hodnoty  $t_a$  (°C) a koncentrací Mg<sup>2+</sup> iontů (mM) uvedeny v záhlaví gelů

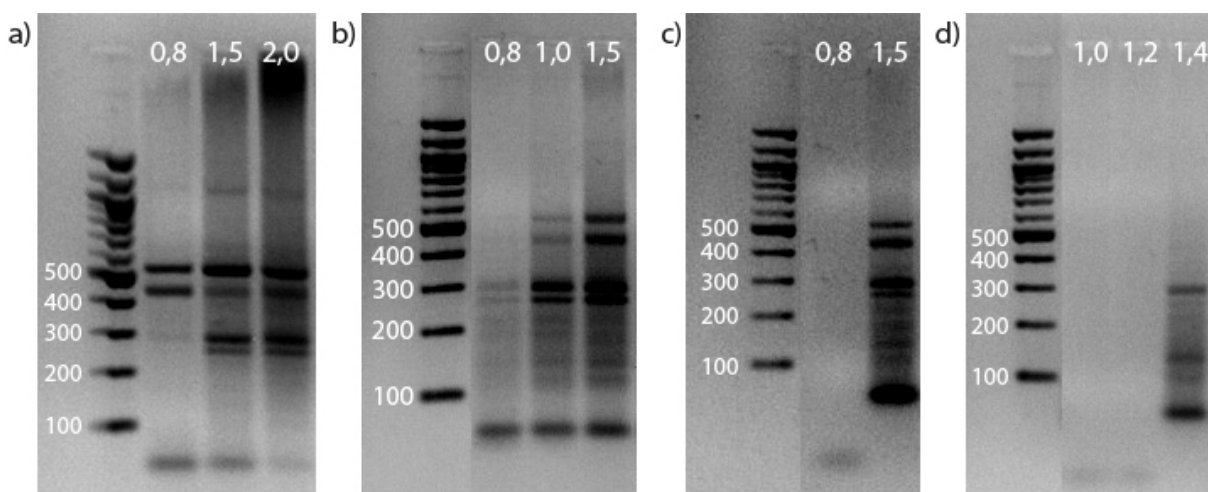
Náplní další části optimalizace bylo hledání nejvhodnější hodnoty  $t_a$  a koncentrace Mg<sup>2+</sup> iontů. Nejprve byla určována hodnota  $t_a$ . Při tomto procesu byla její hodnota v sérii reakcí navyšována do té doby, kdy poskytovala uspokojivé výsledky. Porovnáním takto získaných výsledků i výsledků z předchozích reakcí byla vybrána (vybrány)  $t_a$ , při které se dále pracovalo. Určení nejvhodnější koncentrace Mg<sup>2+</sup> iontů probíhalo v různých koncentračních řadách, které byly sestavovány podle aktuálních výsledků.

Pro lepší detekovatelnost vznikajících produktů bylo do master mixu nově vkládáno větší množství cDNA, a to 1,5  $\mu$ l.

- V $\gamma$ 1

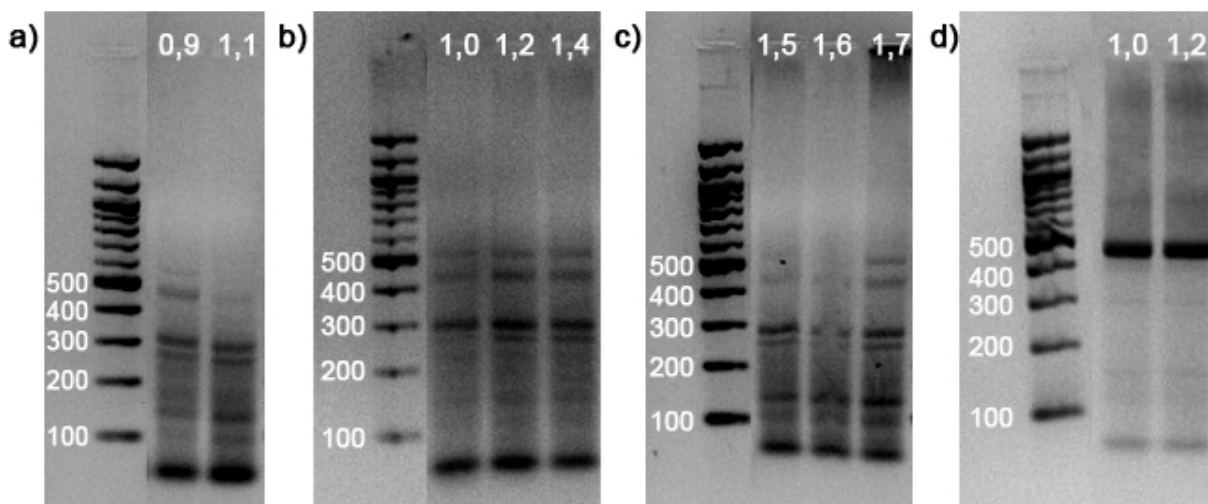
Optimalizace hodnoty  $t_a$  začala na 52 °C. Při pozitivním výsledku (obr. 4.12 a) následovalo postupné zvyšování na 54, 56 a 58 °C (obr. 4.15 b-d). Při teplotě 58

°C již nevznikl požadovaný detekovatelný, a proto se již teplota dále nezvyšovala a jako nejvhodnější hodnota  $t_a$  byla určena teplota 56 °C.



Obrázek 4.12: Snímky gelů V $\gamma$ 1 primeru po elektroforéze a) 52 °C b) 54 °C c) 56 °C d) 58 °C, hodnoty koncentrací Mg<sup>2+</sup> iontů (mM) uvedeny v záhlaví gelů

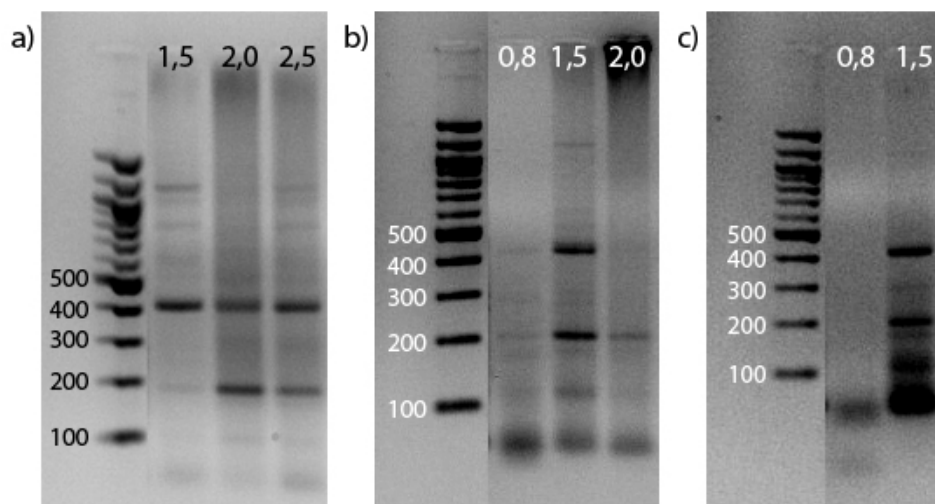
Poté byla optimalizována koncentrace Mg<sup>2+</sup> iontů. Začínalo se na nízkých hodnotách (obr. 4.13 a) a při neuspokojivém výsledku byla koncentrace postupně zvyšována (obr. 4.13 b) až na střední hodnoty (obr. 4.13 c), při kterých byly výsledky opět nevyhovující. Proto byly na závěr, podle předchozích výsledků, vybrány dvě koncentrace, 1,0 a 1,2 mM, které se jevily jako nejvhodnější a byly u nich opět provedeny PCR reakce (obr. 4.13 d). Na základě výsledků z těchto reakcí byla jako nejvhodnější hodnota koncentrace Mg<sup>2+</sup> iontů určena 1,0 mM. V porovnání s 1,2 mM koncentrací sice poskytovala totožný band, ale nižší koncentrace Mg<sup>2+</sup> iontů je více žádoucí pro nižší pravděpodobnost vzniku nespecifických produktů.



Obrázek 4.13: Snímky gelů V $\gamma$ 1 primeru po elektroforéze, koncentrační závislost vzniku produktů, v záhlaví uvedeny koncentrace Mg<sup>2+</sup> iontů (mM),  $t_a$  56 °C

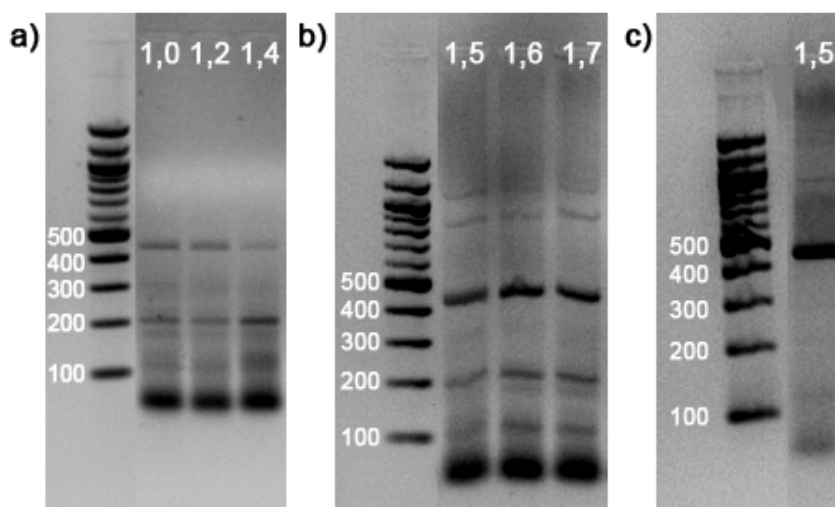
- V $\gamma$ 2

U tohoto primeru byl průběh optimalizace obdobný jako u V $\gamma$ 1 primeru. S ohledem na výsledek tohoto primeru při 58 °C nebyla tato teplota u V $\gamma$ 2 primeru zkoušena a jako konečná  $t_a$  byla určena teplota 56 °C.



Obrázek 4.14: Snímky gelů V $\gamma$ 2 primeru po elektroforéze a) 52 °C b) 54 °C c) 56 °C, hodnoty koncentrací Mg<sup>2+</sup> iontů (mM) uvedeny v záhlaví gelů

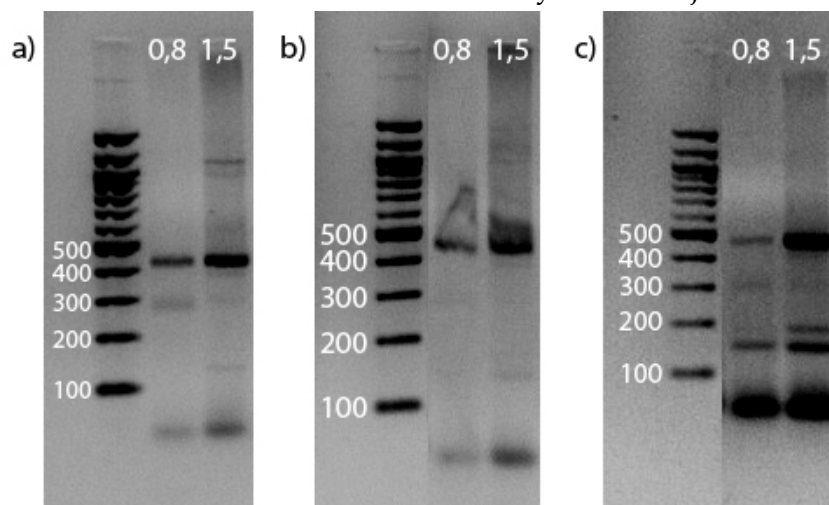
Při stanovování optimální koncentrace Mg<sup>2+</sup> iontů se nejprve použily nízké hodnoty (obr. 4.15 a). S ohledem na výsledky byly koncentrace navýšeny (obr. 4.15 b). Tyto výsledky byly výrazně lepší a bylo nutné rozhodnout, která z použitých koncentrací bude nejvhodnější. I zde bylo zohledněno, že nižší koncentrace Mg<sup>2+</sup> iontů vede ke vzniku menšího množství nespecifických produktů a byla vybrána 1,5 mM koncentrace. Pro ověření rozhodnutí byla provedena reakce s touto koncentrací, která byla úspěšná (obr. 4.15 c).



Obrázek 4.15: Snímky gelů V $\gamma$ 2 primeru po elektroforéze, koncentrační závislost vzniku produktů, v záhlaví uvedeny koncentrace Mg<sup>2+</sup> iontů (mM),  $t_a$  56 °C

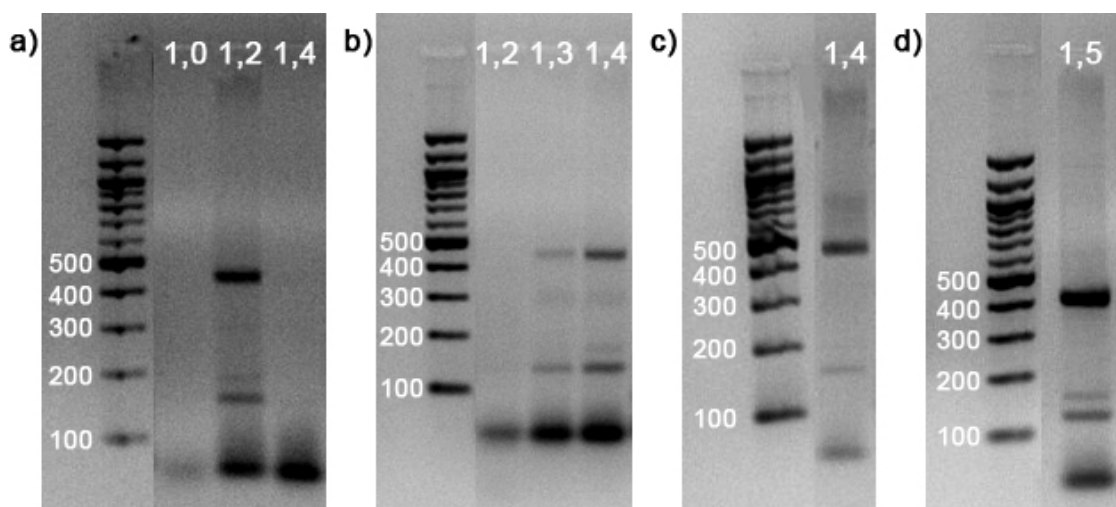
- V $\gamma$ 3

Zvyšování hodnoty  $t_a$  bylo obdobné jako u V $\gamma$ 1 primeru, ale stejně jako u V $\gamma$ 2 primeru se zastavilo na 56 °C. Tato hodnota byla určena jako koncová.



Obrázek 4.16: Snímky gelů V $\gamma$ 3 primeru po elektroforéze a) 52 °C b) 54 °C c) 56 °C, hodnoty koncentrací Mg<sup>2+</sup> iontů (mM) uvedeny v záhlaví gelů

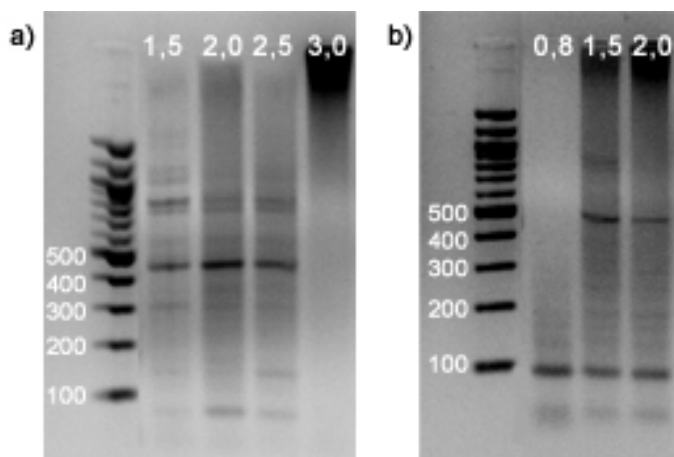
Určení optimální koncentrace Mg<sup>2+</sup> iontů opět začínalo na nízkých hodnotách (obr. 4.17 a) vzhledem k tomu, že při předchozích reakcích při nízkých koncentracích (obr. 4.15 c) vznikaly detekovatelné produkty. Z důvodu nejednoznačných výsledků bylo přistoupeno ke zvýšení koncentrace (obr. 4.17 b). Ani tento výsledek nebyl zcela přesvědčivý a proto byla reakce zopakována při koncentracích, které se jevily jako nejvhodnější (obr. 4.17 c, d), s ohledem na předchozí výsledky byla použita ještě vyšší koncentrace (1,5 mM), Výsledkem bylo, že jako optimální koncentrace Mg<sup>2+</sup> iontů byla vybrána hodnota 1,5 mM.



Obrázek 4.17: Snímky gelů V $\gamma$ 3 primeru po elektroforéze, koncentrační závislost vzniku produktů, v záhlaví uvedeny koncentrace Mg<sup>2+</sup> iontů (mM),  $t_a$  56 °C

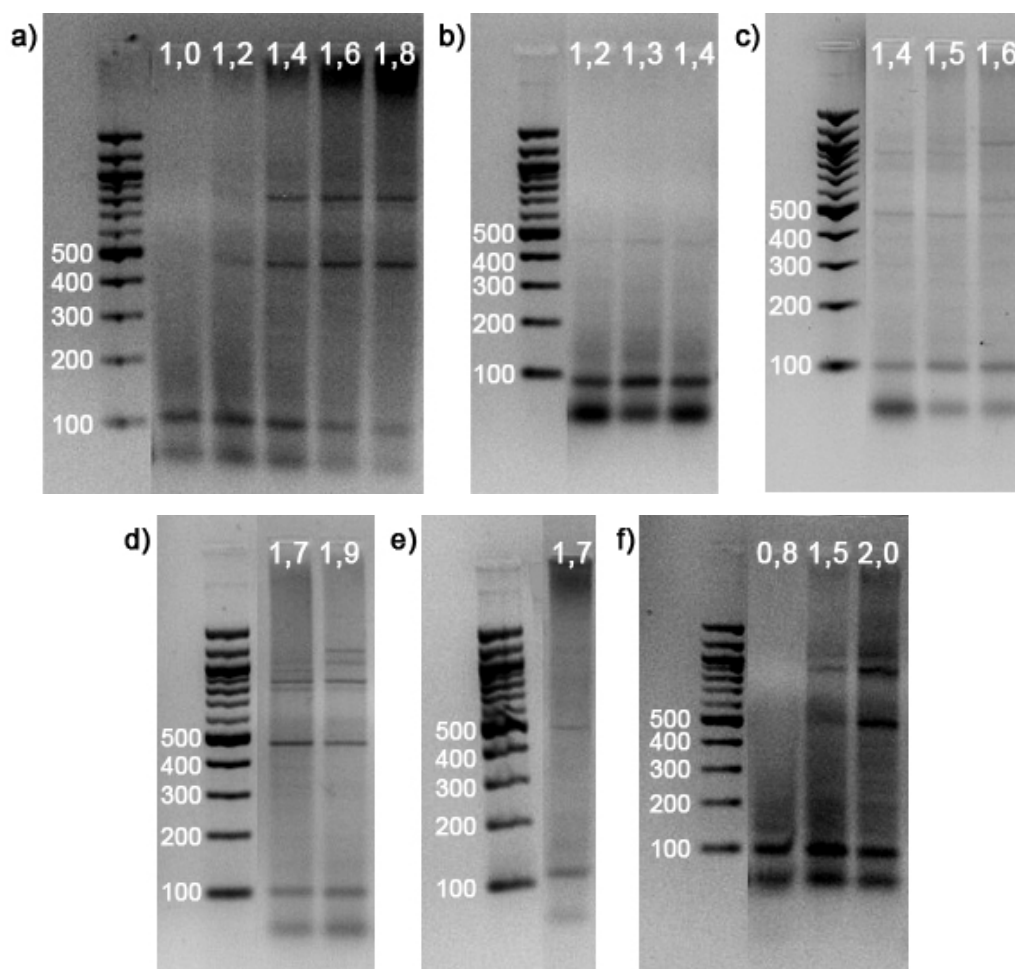
- V $\gamma$ 4

U V $\gamma$ 4 primeru se začínalo s navýšením  $t_a$  na 50 °C (obr. 4.18 a) a pokračovalo na 52 °C (obr. 4.18 b). Obě tyto teploty poskytovaly detekovatelné produkty. Bandy získané při 52 °C byly i při vyšších koncentracích Mg<sup>2+</sup> iontů slabé, a proto již nebyla hodnota  $t_a$  navyšována. Pro další optimalizaci byly vybrány obě teploty, protože nebylo možné rozhodnout, která z nich je vhodnější.



**Obrázek 4.18:** Snímky gelů V $\gamma$ 4 primeru po elektroforéze a) 47 °C b) 50 °C c) 52 °C, hodnoty koncentrací Mg<sup>2+</sup> iontů (mM) uvedeny v záhlaví gelů

Při určování nejvhodnější hodnoty koncentrace Mg<sup>2+</sup> iontů byla nejdříve používána teplota 50 °C (obr. 4.19 a-e) v kombinaci s koncentrační řadou (obr. 4.19 a), která měla přiblížit vhodnou koncentraci. Poté byly provedeny další reakce s různými koncentracemi (obr. 4.19 b-d) a na základě těchto výsledků byla provedena kontrola pro vybranou koncentraci (obr. 4.19 e). Tato reakce však nepotvrdila předchozí výsledek. Proto bylo přistoupeno k provedení reakcí při teplotě 52 °C (obr. 4.19 f), která byla vybrána jako další možná (obr. 4.18 c). V tomto případě byla jako nejlepší koncentrace Mg<sup>2+</sup> iontů stanovena hodnota 2,0 mM. Tato hodnota byla shledána jako nejvhodnější také v důsledku předchozích výsledků (obr. 4.18 c)

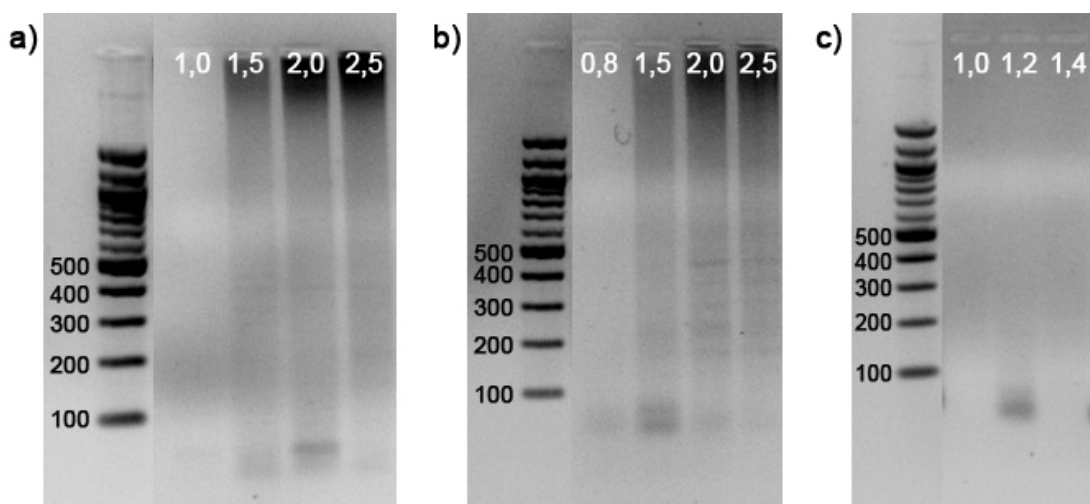


Obrázek 4.19: Snímky gelů V $\gamma$ 4 primeru po elektroforéze, koncentrační závislost vzniku produktů, v záhlaví uvedeny koncentrace Mg<sup>2+</sup> iontů (mM), t<sub>a</sub> 50 °C (a-e) a 52 °C (f)

- **V $\delta$ 1**

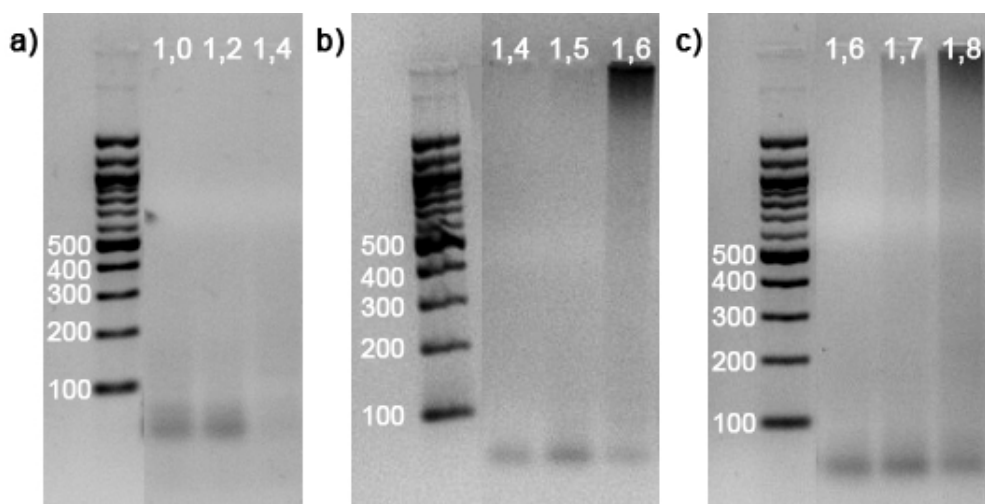
Navyšování hodnoty t<sub>a</sub> u V $\delta$ 1 primeru začalo na 49 °C, kdy vznik produktů byl podle viditelnosti bandů pouze malý (obr. 4.20a), následovala teplota 50 °C, kdy viditelnost bandů při vyšších koncentracích Mg<sup>2+</sup> iontů byla lepší (obr. 4.20 b), a poslední zkoušenou teplotou bylo 52 °C, kdy již nebyly produkty detekovatelné (obr. 4.20 c). Pro optimalizaci koncentrace Mg<sup>2+</sup> iontů byla vybrána zvýšená (50 °C) a také výchozí (47 °C) teplota.

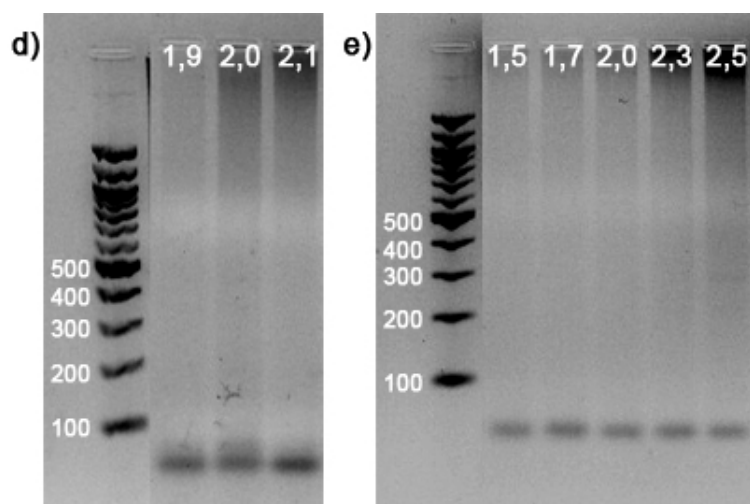




Obrázek 4.20: Snímky gelů V $\delta$ 1 primeru po elektroforéze a) 49 °C b) 50 °C c) 52 °C, hodnoty koncentrací Mg<sup>2+</sup> iontů (mM) uvedeny v záhlaví gelů

Optimalizace koncentrace Mg<sup>2+</sup> iontů probíhala při teplotě 50 °C. Byly vyzkoušeny různé koncentrace od nízkých hodnot (obr. 4.21 a), přes střední (obr. 4.21 b, c) až po vysoké (obr. 4.21 d) ovšem bez žádného výsledku. Proto bylo i na základě předchozích výsledků (obr. 4.9 b, 4.11 a) přistoupeno k teplotě nižší, 47 °C. Koncentrační řada byla sestavena podle předchozích výsledků v rozsahu, ve kterém byly dříve detekovány produkty. Jedinou koncentrací, při které vznikl detekovatelný produkt, i když band byl velmi slabý, bylo 2,5 mM. Tato hodnota již dříve poskytla obdobný výsledek (obr. 4.11 a) a proto byla stanovena jako nejvhodnější.

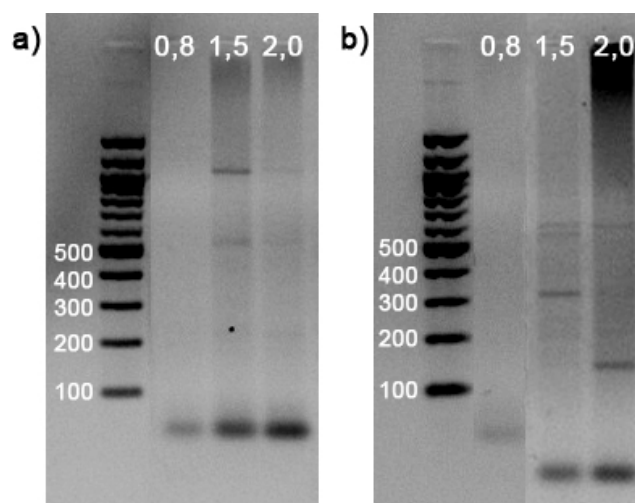




Obrázek 4.21: Snímky gelů Vđ1 primeru po elektroforéze, koncentrační závislost vzniku produktů, v záhlaví uvedeny koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů (mM),  $t_a$  50 °C (a-d) a 47 °C (e)

- Vđ2

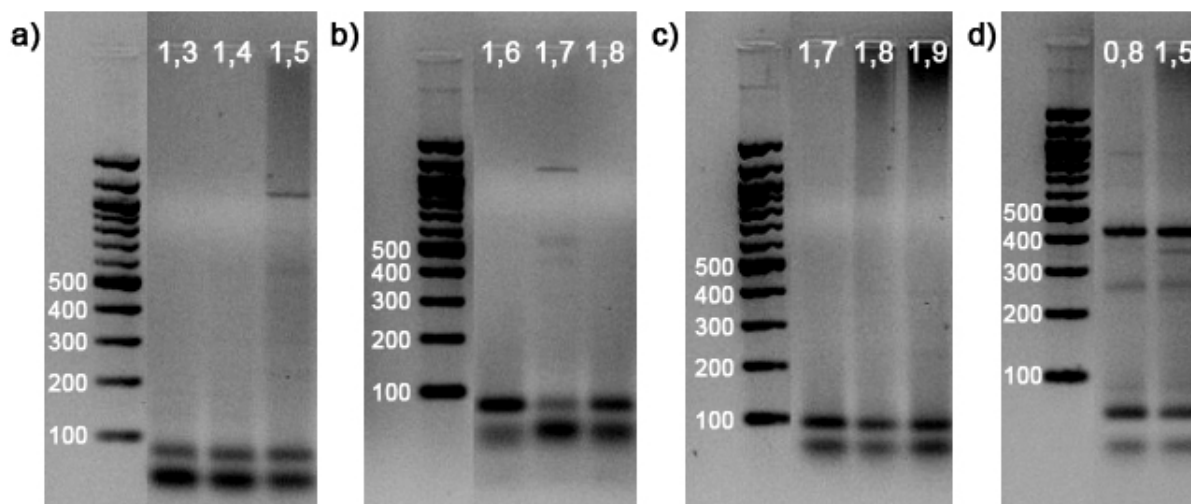
Určování optimální hodnoty  $t_a$  u tohoto primeru začalo navýšením teploty na 50 °C (obr. 4.22 a) a následně na 52 °C (obr. 4.22 b). Ani jedna z teplot neposkytla zcela uspokojivý výsledek, a proto se v další části optimalizace, při stanovování nejvhodnější koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů, použila původní (47 °C) a zvýšená (52 °C) teplota.



Obrázek 4.22: Snímky gelů Vđ2 primeru po elektroforéze a) 50 °C b) 52 °C, hodnoty koncentrací  $Mg^{2+}$  iontů (mM) uvedeny v záhlaví gelů

Stanovení optimální koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů nejdříve probíhalo při 47 °C. Podle předchozích výsledků byly použity nejprve střední hodnoty koncentrace (obr. 4.23 a), které byly při negativním výsledku navýšeny (obr. 4.23 b, c). Ani toto navýšení však neposkytlo uspokojivý výsledek a tak následovala optimalizace při 52 °C. Hodnoty koncentrací byly nastaveny dle předchozí reakce (obr. 4.22 b) a

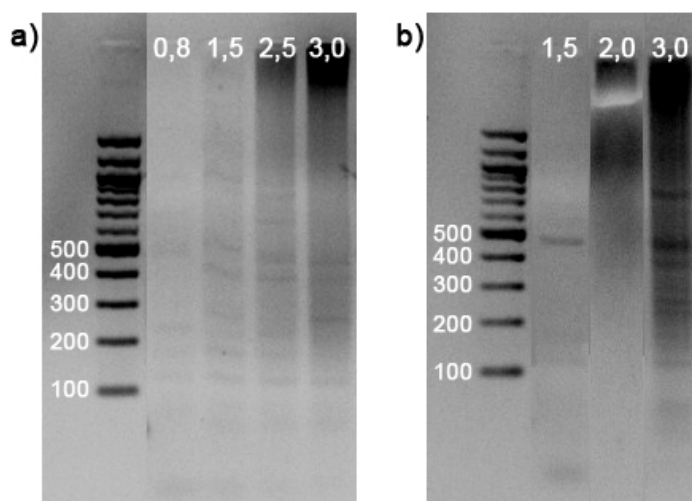
v obou případech poskytly dobrý výsledek. Na základě těchto posledních reakcí byla jako nejvhodnější koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů vybrána hodnota 0,8 mM, protože v porovnání s 1,5 mM koncentrací vznikalo kromě požadovaného produktu méně produktů nspecifických. Jako optimální  $t_a$  byla určena hodnota 52 °C.



Obrázek 4.23: Snímky gelů Vδ2 primeru po elektroforéze, koncentrační závislost vzniku produktů, v záhlaví uvedeny koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů (mM),  $t_a$  47 °C (a-c) a 52 °C (d)

#### • Vδ3

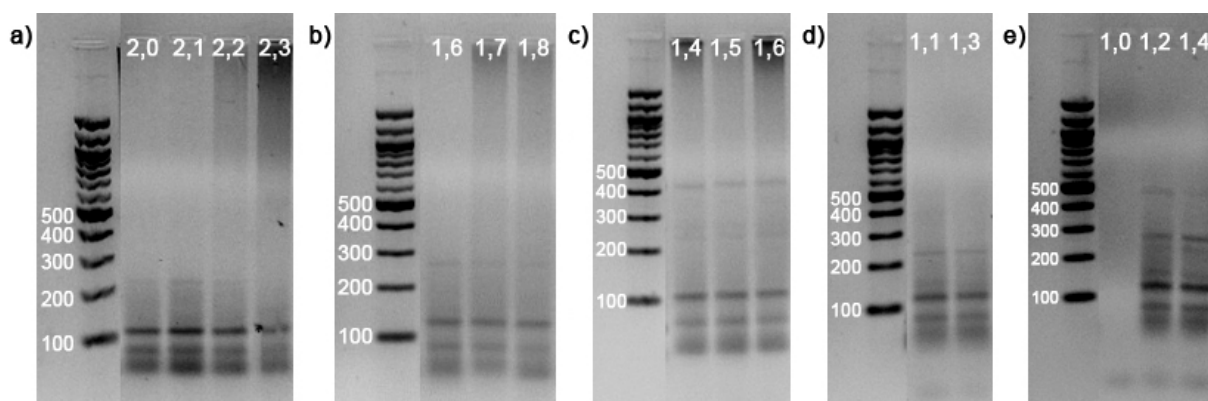
U tohoto primeru byla  $t_a$  navýšena na 50 °C, a přes nepřesvědčivé výsledky (obr. 4.24 a) byla teplota navýšena ještě o další 2 °C na 52°C. Při této teplotě již byl výsledek lepší, a proto byla tato hodnota určena jako optimální.



Obrázek 4.24: Snímky gelů Vδ3 primeru po elektroforéze a) 50 °C b) 52 °C, hodnoty koncentrací  $Mg^{2+}$  iontů (mM) uvedeny v záhlaví gelů

Optimalizace koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů začínala na vyšších hodnotách (obr. 4.25 a, b), které neposkytly žádný produkt. Koncentrace byla tedy dle předcházejících výsledků postupně snižována (obr. 4.25 c-e). Při koncentraci 1,4 mM (obr. 4.25

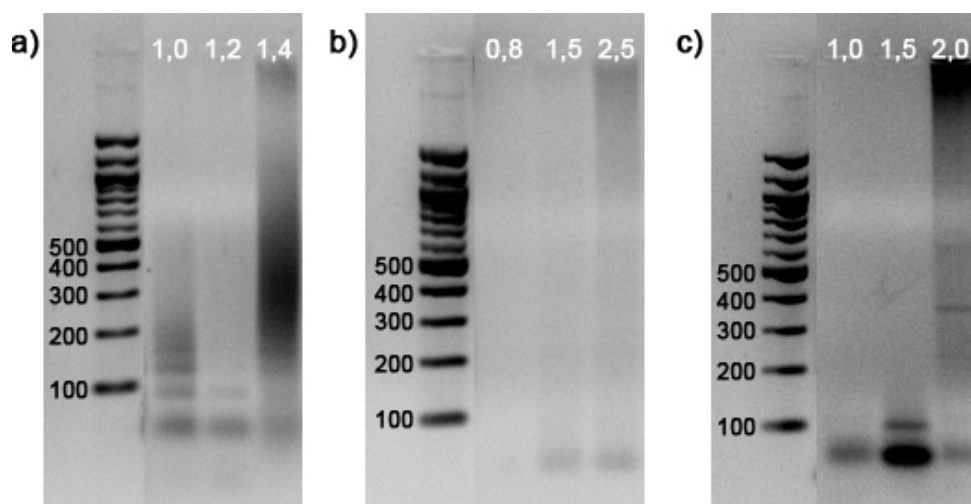
c) byl dobře patrný požadovaný band a to vedlo k dalšímu snížení koncentrace (obr. 4.25 d). Při těchto hodnotách však nevznikl detekovatelný produkt, a proto byla opětovně vyzkoušena hodnota 1,4 mM. K této hodnotě byly přidány ještě dvě nižší hodnoty pro ověření předchozí reakce (obr. 4.25 e). Výsledkem bylo, že jako vhodnější koncentrace byla shledána hodnota 1,2 mM, jejíž band byl výraznější než u 1,4 mM.



Obrázek 4.25: Snímky gelů V $\delta$ 3 primeru po elektroforéze, koncentrační závislost vzniku produktů, v záhlaví uvedeny koncentrace Mg $^{2+}$  iontů (mM),  $t_a$  52 °C

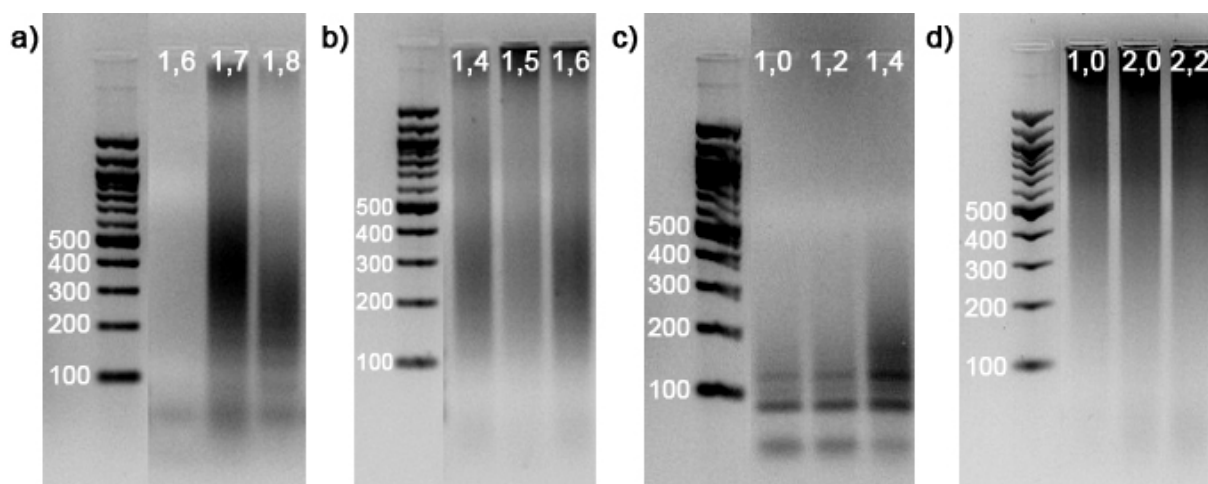
#### • V $\delta$ 4

Při optimalizaci  $t_a$  bylo nejdříve přistoupeno k zopakování reakce při výchozí  $t_a$  (obr 4.26 a). K tomuto kroku bylo přistoupeno vzhledem k tomu, že při předchozích reakcích vznikl produkt požadované délky pouze jedenkrát a poskytl pouze slabý band (obr. 4.11 d). I přes to, že výsledkem reakce nebyl detekovatelný produkt, byla teplota navýšena nejprve na 50 °C (obr. 4.26 b) a posléze na 52 °C (obr. 4.26 c). Při této teplotě byl detekován žádaný produkt a byla proto použita v dalším průběhu optimalizace.



Obrázek 4.26: Snímky gelů Vδ4 primeru po elektroforéze a) 47 °C b) 50 °C c) 52 °C, hodnoty koncentrací Mg<sup>2+</sup> iontů (mM) uvedeny v záhlaví gelů

Na základě předchozího výsledku (obr. 4.26 c) začínala optimalizace koncentrace Mg<sup>2+</sup> iontů na vyšších hodnotách (obr. 4.27 a). Při negativním výsledku byla koncentrace nejprve snížena (obr. 4.27 b, c), ale opět nevznikal detekovatelný produkt. Na závěr byl odzkoušen rozptyl koncentrace, který postihl i koncentraci, při které v předchozí reakci vznikl detekovatelný produkt, ale opět bez výsledku (obr. 4.27 d). Jako koncentrace, která se bude používat při dalších reakcích, byla vybrána hodnota 2,0 mM.

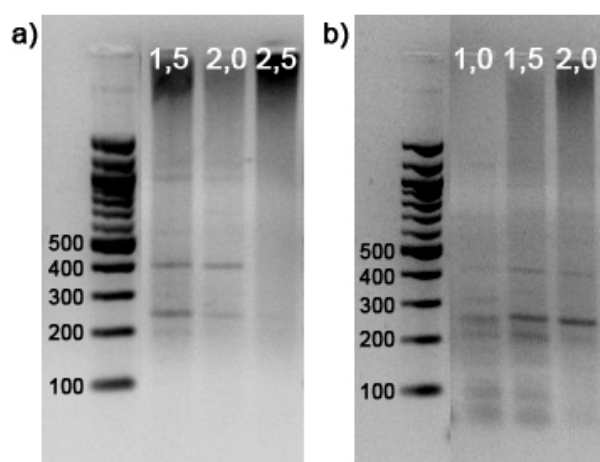


Obrázek 4.27: Snímky gelů Vδ4 primeru po elektroforéze, koncentrační závislost vzniku produktů, v záhlaví uvedeny koncentrace Mg<sup>2+</sup> iontů (mM), t<sub>a</sub> 52 °C

- Vδ5

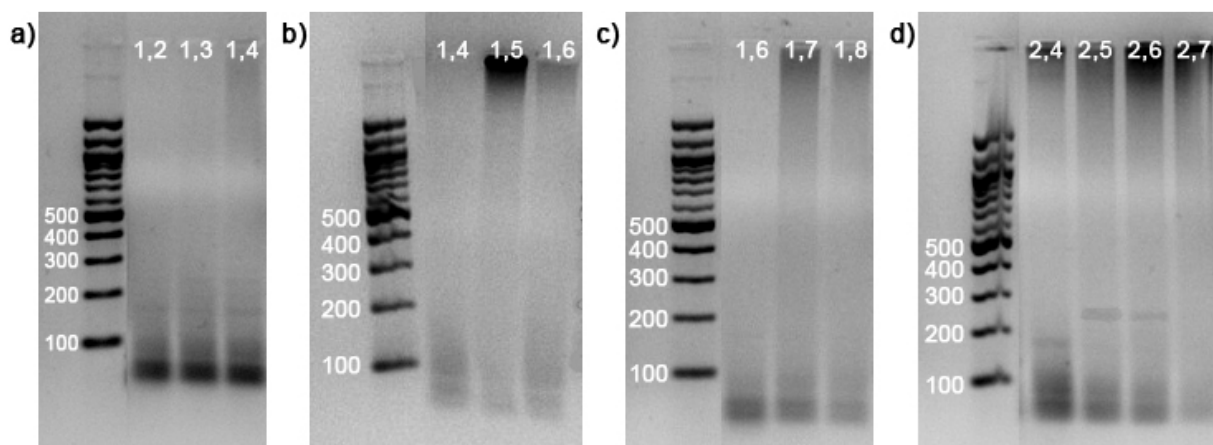
Zvyšování t<sub>a</sub> začalo na 50 °C a při pozitivním výsledku byla dále navýšena na 52 °C. I přes pozitivní výsledek i v tomto případě nebyla teplota dále navyšována, protože vzniklé bandy byly pouze slabé (obr. 4.28 b). Tyto výsledky nebyly

přesvědčivé, a proto byly v další části optimalizace používány kromě obou těchto teplot i výchozí teplota, která se v předchozích reakcích jevila jako vhodná (obr. 4.3 b, 4.11 e).



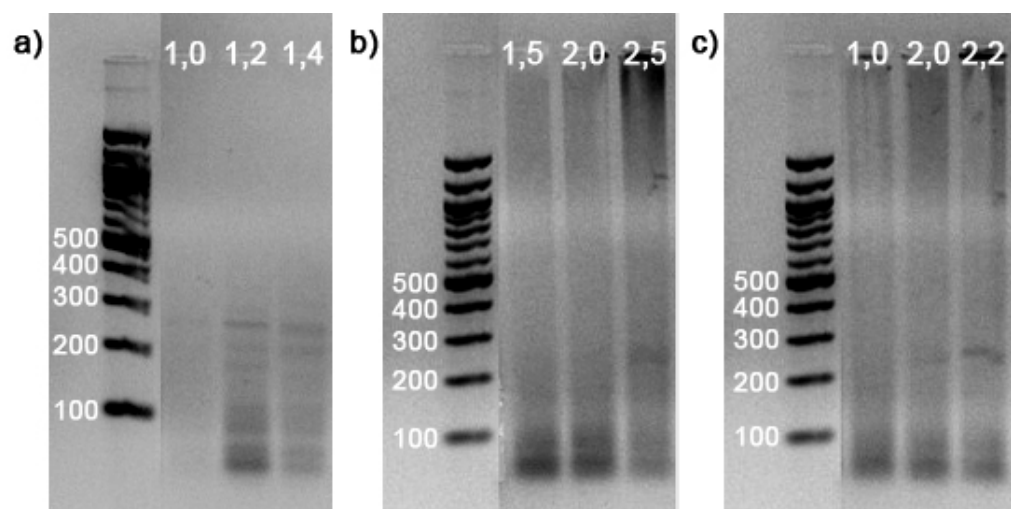
**Obrázek 4.28:** Snímky gelů Vδ5 primeru po elektroforéze a) 50 °C b) 52 °C, hodnoty koncentrací Mg<sup>2+</sup> iontů (mM) uvedeny v záhlaví gelů

Při stanovení optimální koncentrace Mg<sup>2+</sup> byly nejdříve použity teplota 50 °C a nízké hodnoty koncentrací (obr. 4.29 a, b), ale protože nevznikaly detekovatelné produkty, byla koncentrace navýšena až na vysoké hodnoty (obr. 4.29 c, d) a teprve při vysokých koncentracích (2,5 a 2,6 mM) vznikal detekovatelný produkt.



**Obrázek 4.29:** Snímky gelů Vδ5 primeru po elektroforéze, koncentrační závislost vzniku produktů, v záhlaví uvedeny koncentrace Mg<sup>2+</sup> iontů (mM), t<sub>a</sub> 50 °C

Vzhledem k předchozím výsledkům byly porovnány všechny tři zvažované teploty (47, 50, 52 °C) za koncentrací Mg<sup>2+</sup> iontů, které byly považovány za nejvhodnější.

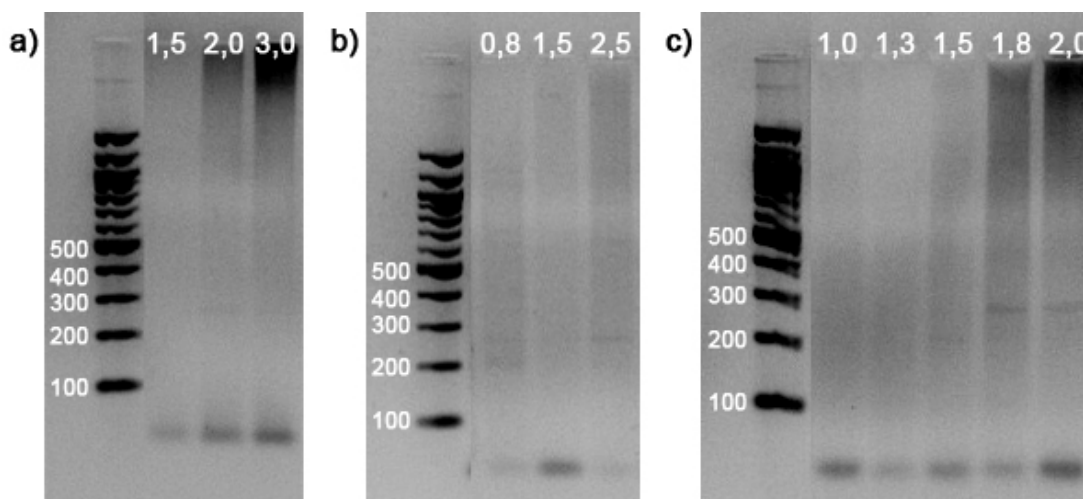


Obrázek 4.30: Snímky gelů Vδ5 primeru po elektroforéze, koncentrační závislost vzniku produktů při a) 52 °C b) 50 °C c) 47 °C, v záhlaví uvedeny koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů (mM)

Při tomto porovnání byly jako nejvhodnější teploty zvoleny 52 °C (obr. 4.30 a) a 47 °C (obr. 4.30 c). I přesto, že by 52 °C mělo být vhodnější pro nižší tvorbu nespecifických produktů, byla na základě předchozích reakcí jako optimální teplota vybrána 47 °C a jako optimální koncentrace 2,2 mM.

- Vδ6

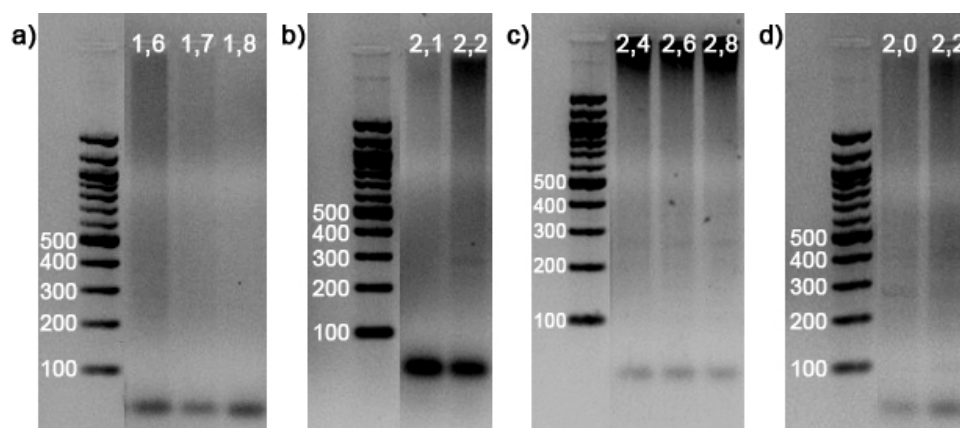
U Vδ6 primeru byla  $t_a$  nejprve navýšena na 45 °C a při negativním výsledku snížena na 43,5 °C. Ani tato teplota neposkytla detekovatelný produkt a tak byla teplota navrácena na 42 °C.



Obrázek 4.31: Snímky gelů Vδ6 primeru po elektroforéze a) 45 °C b) 43,5 °C c) 42 °C, hodnoty koncentrací  $Mg^{2+}$  iontů (mM) uvedeny v záhlaví gelů

Optimalizace koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů probíhala tedy při 42 °C. Na začátku byly použity střední hodnoty (obr. 4.32 a), které však neposkytly produkt a tak byla koncentrace navýšena (obr. 4.32 b). V tomto případě již produkt vznikl, ale

jeho množství podle viditelnosti bandu bylo malé a proto se koncentrace ještě zvýšila (obr. 4.32 c). K nárůstu množství produktu však nedošlo a v některých případech nebyl produkt vůbec detekován. Na závěr se přistoupilo k vyzkoušení dvou koncentrací, které v předchozích reakcích poskytly produkt, a to k 2,0 a 2,2 mM. Výsledek ovšem nebyl jednoznačný a proto byla na základě předchozích reakcí vybrána hodnota 2,0 mM (obr. 4.11 f, 4.31 c).



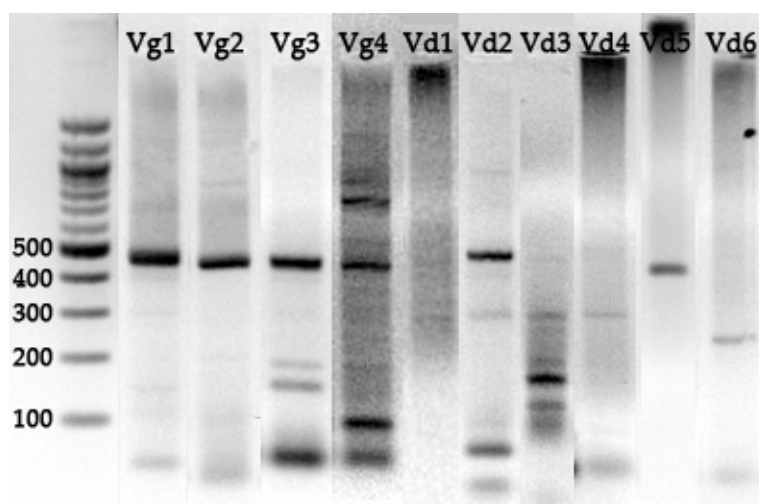
Obrázek 4.32: Snímky gelů Vδ6 primeru po elektroforéze, koncentrační závislost vzniku produktů, v záhlaví uvedeny koncentrace Mg<sup>2+</sup> iontů (mM), t<sub>a</sub> 42 °C

Výsledky optimalizace (tab. VII) byly použity v dalším průběhu práce při zpracování klinických vzorků.

Tabulka VIII  
Shrnutí výsledků optimalizace

primer	t <sub>a</sub> (°C)	koncentrace MgCl <sub>2</sub> (mM)
Vγ1	56	1,0
Vγ2	56	1,5
Vγ3	56	1,5
Vγ4	52	2,0
Vδ1	47	2,5
Vδ2	52	0,8
Vδ3	52	1,2
Vδ4	52	2,0
Vδ5	47	2,2
Vδ6	42	2,0





Obrázek 4.33: Souhrnný gel obsahující všechny primery při optimalizovaných podmínkách

## 4.2 Kvantifikace získaných dat

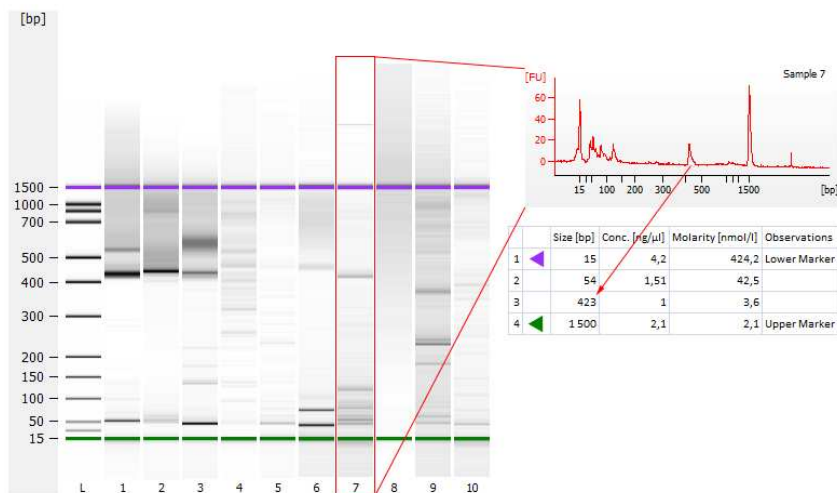
Data pro kvantifikaci byla získána aplikací optimálního panelu (tab. VIII) na klinické vzorky 5 zdravých dárců a 11 pacientů (tab. IX).

Tabulka IX  
Charakteristika klinických vzorků

vzorek	věk/pohlaví	diagnóza/stádium	RNA (ng.μl <sup>-1</sup> )
Z1	26/M	-	298,3
Z2	24/Ž	-	216,1
Z3	24/Ž	-	155,4
Z4	26/Ž	-	210,4
Z5	34/Ž	-	318,0
P1	62/M	MM/III A, IgA κ	420,3
P2	61/Ž	MM/III A, IgA λ	686,3
P3	58/M	MM, nesekreční	341,6
P4	53/M	MM	229,1
P5	62/M	MM/III A, oligosekreční	553,0
P6	42/M	MM/III B, IgA κ	309,2
P7	43/Ž	C834	597,2
P8	36/Ž	C834	286,6
P9	49/M	Waldenströmova makroglobulinémie	709,3
P10	55/Ž	MM, IgA λ	600,1
P11	49/Ž	MM, IgA κ	638,0

Z/P, zdravý dobrovolný dárce/pacient; M/Ž, muž/žena; MM, mnohočetný myelom; IgA, imunoglobulin A

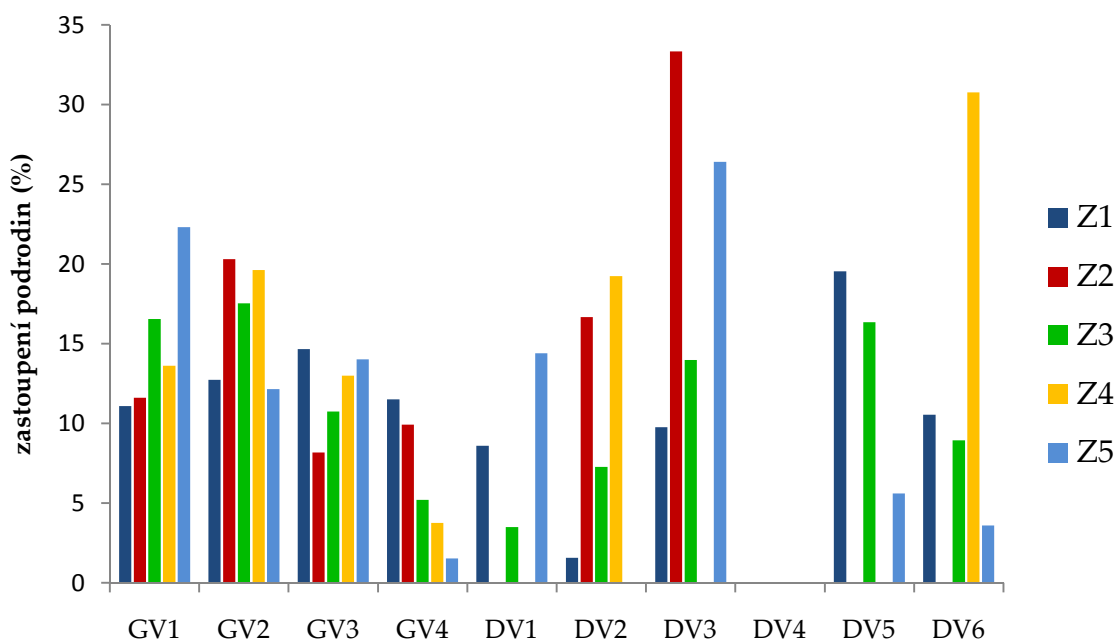
Kvantifikace byla provedena elektroforézou na čipu pomocí bioanalyzáru Agilent 2100. Analýza vzorků poskytla gel a soubor elektroforegramů (obr. 4.34). Jednotlivé píky elektroforegramů software přístroje vyhodnotil co do jejich délky (bp), koncentrace ( $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ) a molality ( $\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ).



**Obrázek 4.34:** Příklad gelu a elektroforegramu s vyhodnocením; L, žebříček; 1-4, podrodiny GV1-GV4, 5-10, podrodiny DV1-DV6

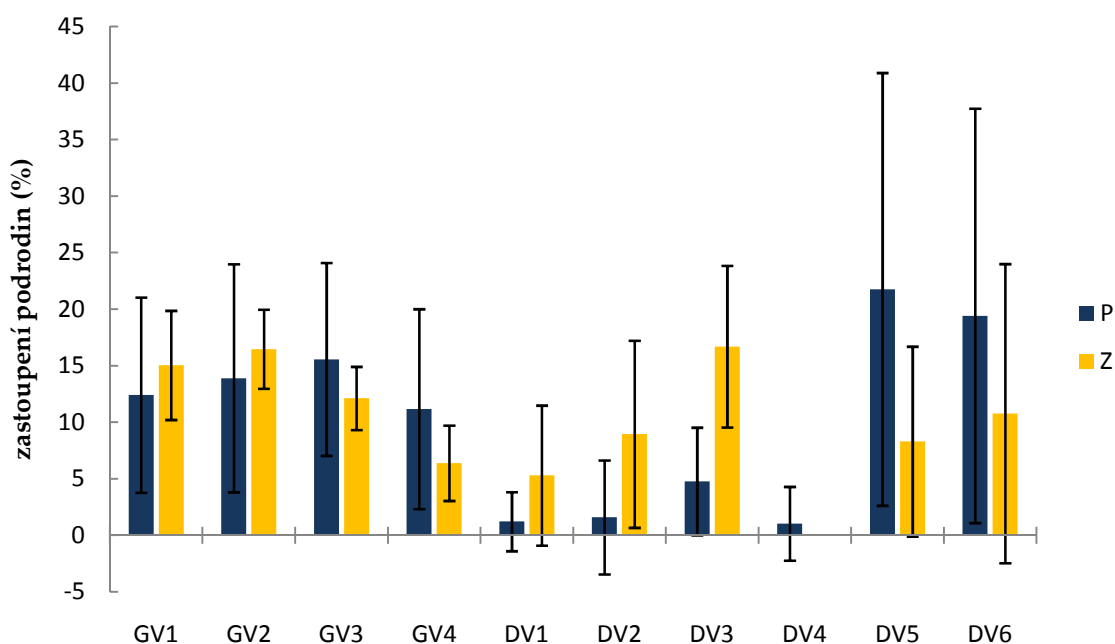
Na základě hodnot koncentrací produktů odpovídajících daným podrodinám byly sestaveny expresní profily  $\gamma\delta$  T lymfocytů zdravých dárců a pacientů.

Pro každou rodinu zvlášť byla vypočítána její celková koncentrace jako součet koncentrací všech jejích podrodin v daném vzorku. Následně bylo vypočítáno procentuální zastoupení každé podrodiny jako podíl koncentrace dané podrodiny ku koncentraci rodiny násobený 50 %. Vzhledem k tomu, že TCR  $\gamma\delta$  T lymfocytů je heterodimer, byla celková koncentrace každé rodiny brána jako polovina celku (50 %). Procentuální zastoupení jednotlivých podrodin zdravých dárců bylo vynešeno do jednoho grafu (obr. 4.35).



Obrázek 4.35: Srovnání expresních profilů  $\gamma\delta$  T lymfocytů u zdravých dárců, vodorovná osa - podrodiny  $\gamma\delta$  T lymfocytů

Pro porovnání průměrných expresních profilů  $\gamma\delta$  T lymfocytů byl jako pro skupinu zdravých dárců tak pro skupinu pacientů vypočítán aritmetický průměr ( $\bar{x}$ ) procentuálního zastoupení jednotlivých podrodin, přičemž při nepřítomnosti dané podrodiny ve vzorku byla koncentrace podrodiny považována za nulovou. Následně byly vypočítány směrodatné odchylky (SD). Tyto hodnoty byly vyneseny do společného grafu (obr. 4.36).



Obrázek 4.36: Porovnání průměrného profilu  $\gamma\delta$  T lymfocytů pacientů (P) a dobrovolných dárců (Z), vyjádřeno  $\bar{x} \pm SD$ , vodorovná osa - podrodiny  $\gamma\delta$  T lymfocytů

## 5 Diskuze

### 5.1 Referenční skupina

Referenční expresní profil  $\gamma\delta$  T lymfocytů (obr. 4.34) byl sestaven na základě dat získaných analýzou vzorků zdravých dobrovolných. Tato skupina obsahovala 5 osob označených Z1 – Z5 (tab. IX).

$\gamma$  rodina byla zastoupena ve všech vzorcích všemi podrodinami. GV1 byla dominantní podrodinou v jednom (Z5), GV2 ve třech (Z2 – Z4) a GV3 v jednom vzorku (Z1). GV4 netvořila dominantní podrodinu v žádném vzorku. Přítomnost všech  $\gamma$  podrodin se shoduje se zjištěními z předchozích studií [58; 59].

Expresie jednotlivých podrodin v rámci  $\delta$  rodiny byla různorodá. Do studie bylo zařazeno celkem šest podrodin, z nichž tři (DV4 – DV6) jsou řazeny do  $\alpha$  rodiny. DV1 byla přítomna ve třech vzorcích (Z1, Z3, Z5) a v žádném netvořila dominantní podrodinu. Tento výsledek bylo možno očekávat, protože DV1 se vyskytuje zejména u IEL a u  $\gamma\delta$  T lymfocytů tvoří pouze minoritní podrodinu [36; 42; 43]. DV2 byla přítomna ve čtyřech vzorcích (Z1 – Z4) a v žádném netvořila dominantní podrodinu. Dle předchozích studií by se tato podrodina měla vyskytovat ve všech vzorcích a měla by být dominantní podrodinou a to vzhledem k tomu, že v periferní krvi převládají  $V\gamma9V\delta2$  T lymfocyty [16; 23; 27]. Tento rozdíl může být způsoben použitou detekční metodou PCR. Její citlivost může být rozdílná než v případě průtokové cytometrie, která byla použita v uvedených studiích. DV3 byla přítomna ve čtyřech vzorcích (Z1 – Z3, Z5). V případě vzorku Z2 a Z5 se jednalo o dominantní podrodinu. Dle dosavadních studií je výskyt této podrodiny v periferní krvi vzácný, její zastoupení by mělo být minoritní [65; 66]. Zvýšená exprese této podrodiny byla sledována u zdravých dárců, kteří dle anamnézy prodělali blíže nespecifikované onemocnění (CMV, EBV) infekčního původu, a jednalo se pravděpodobně o klonální expanzi v reakci na nemoc [65]. Podrodiny DV4, DV5 a DV6 jsou vzhledem ke svému umístění v lokusu TRA/D řazeny do  $\alpha$  rodiny [29; 36]. Expresí jejich genů však mohou vznikat  $\delta$  řetězce [29], které tvoří s  $\gamma$  ře-

tězci funkční TCR na povrchu  $\gamma\delta$  T lymfocytů. Z tohoto důvodu byly zařazeny do této práce. DV4 nebyla přítomna v žádném ze vzorků. DV5 byla přítomna ve třech vzorcích (Z1, Z3 a Z5) a ve dvou případech se jednalo o dominantní podrodinu (Z1, Z3). DV6 byla přítomna ve čtyřech případech (Z1 – Z3, Z5) a v případě vzorku Z4 se jednalo o dominantní podrodinu. Zastoupení těchto podrodin v periferní krvi by mělo být minoritní [65], ale DV5 podrodina může mít v dominantní zastoupení [43].

V případě dobrovolných dárců se nepodařilo potvrdit, že dominantními podrodinami  $\gamma\delta$  T lymfocytů vyskytujících se v periferní krvi jsou GV2 a DV2, které poskytují V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 buňky [16; 18; 19; 28; 42]. Tento typ buněk tvoří 50 až 90 % všech  $\gamma\delta$  T lymfocytů periferní krve [27; 30; 42]. V $\delta$ 1 T lymfocyty mohou v periferní krvi tvořit maximálně 30 %  $\gamma\delta$  T lymfocytů [28; 41]. Ostatní typy  $\gamma\delta$  T lymfocytů tvoří pouze minoritní populace [66].

Nepotvrdily se rovněž výsledky předchozích studií, které uvádějí, že u zdravých jedinců se v periferní krvi vyskytují všechny podrodiny  $\gamma$  a  $\delta$ . Výjimkou může být DV4 podrodina, která není přítomna vždy [43; 58; 59].

## **5.2 Porovnání průměrných expresních profilů $\gamma\delta$ T lymfocytů pacientů s onkologickým onemocněním a zdravých jedinců**

Sledovanou skupinu tvořilo 11 pacientů s onkologickým onemocněním označených P1 – P11 (tab. IX), kteří sloužili jako model pro sledování změn expresního profilu  $\gamma\delta$  T lymfocytů. Tito pacienti podstoupili chemoterapii a jsou v remisi.

Chemoterapie je léčba cílená na buňky imunitního systému, převážně B a T lymfocyty. Je proto důležité sledovat jak se mění procentuální zastoupení těchto buněk, v našem případě  $\gamma\delta$  T lymfocytů.

Porovnávali jsme průměrný expresní profil  $\gamma\delta$  T lymfocytů dobrovolných dárců s průměrným expresním profilem  $\gamma\delta$  T lymfocytů pacientů (obr. 4.35).

$\gamma$  rodina byla ve všech vzorcích zastoupena všemi podrodinami. Byl pozorován významný pokles ( $P < 0,05$ ) u GV1 a GV2 podrodin. Nárůst v případě GV3 a

GV4 podrodin byl naopak nevýznamný ( $P > 0,05$ ). Dominantními  $\gamma$  podrodinami byly všechny: GV1 a GV2 ve dvou, GV3 ve čtyřech a GV3 ve třech případech.

Podrodiny  $\delta$  nebyly vždy přítomny ve všech vzorcích. DV1 byla přítomna ve třech vzorcích (P2, P7, P11) a pozorovaný pokles byl velmi významný ( $P < 0,01$ ). Pokles DV2 byl statisticky také velmi významný ( $P < 0,01$ ). V případě této podrodiny je statistická analýza ovlivněna tím, že tato podrodina byla přítomna pouze v jediném vzorku (P2). DV3 byla přítomna v sedmi vzorcích (P2, P3, P6 – P9, P11) a její pokles byl významný ( $P < 0,05$ ). DV4 byla přítomna stejně jako v případě DV2 pouze v jediném vzorku (P2). Nárůst této podrodiny byl v porovnání s referenční skupinou statisticky nevýznamný ( $P > 0,05$ ). DV5 podrodina byla přítomná v sedmi vzorcích (P5 – P11) a její nárůst byl významný ( $P < 0,05$ ). DV6 podrodina byla přítomna v deseti vzorcích (P1 – P4, P6 – P11) a její nárůst byl nevýznamný ( $P > 0,05$ ). Dominantními  $\delta$  podrodinami v jednotlivých vzorcích byla DV2 (1 případ), DV5 (6 případů) a DV6 (4 případy) podrodina.

V případě sledované skupiny pacientů se rovněž nepodařilo potvrdit, že dominantním typem  $\gamma\delta$  T lymfocytů jsou ty, které na svém povrchu nesou V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR.

Změny v repertoáru  $\gamma\delta$  T lymfocytů mají několik příčin. V důsledku chemoterapie dochází ke snížení počtu  $\gamma\delta$  T lymfocytů [67; 68] a tím k poklesu hladin jednotlivých podrodin. Po ukončení chemoterapie se začíná nejprve zvyšovat množství paměťových buněk [67]. V případě  $\gamma\delta$  T lymfocytů se jedná o V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 buňky, tedy buňky s GV2 a DV2 podrodinami, protože tyto buňky jako jediné na svém povrchu vystavují CD45RO, který je považován za paměťový marker [16; 23; 27]. Tento nárůst by však neměl přesáhnout počet buněk u zdravých dárců [68]. Metoda PCR sice nestanovuje konkrétní počty buněk, ale jen kvantifikuje množství DNA kódující danou podrodinu a lze tak sledovat její hladinu. Pokles lze sledovat u GV1, GV2, DV1, DV2 a DV3 podrodin. V případě GV2 a DV2, jejichž pokles byl měl být menší než u ostatních podrodin, nebyla tato skutečnost potvrzena. U ostatních podrodin (GV3, GV4, DV4 – DV6) došlo naopak k jejich nárůstu. Zajímavým se jeví fakt, že po chemoterapii se proporcionální rozdělení přesunulo

v případě  $\gamma$  podrodin z GV1 a GV2 ve prospěch GV3 a GV4, a v případě  $\delta$  podrodin z DV1, DV2 a DV3 ve prospěch DV4, DV5 a DV6. Možné vysvětlení je, že a) buňky s danými podrodinami rostou po chemoterapii rychleji; b) tyto buňky nejsou k chemoterapii citlivé a jejich populace nejsou chemoterapií tak postiženy.

Repertoár jednotlivých podrodin  $\gamma\delta$  T lymfocytů je ovlivněn infekčními nemocemi (např. infekcí cytomegalovirem, bakteriální a mykotickou pneumonií, virovou hepatitidou). Tato onemocnění mají vliv na přítomnost či absenci jednotlivých podrodin, ale nemají vliv na počet buněk s těmito podrodinami po chemoterapii [69].

Pacienti s mnohočetným myelomem mohou vykazovat různé početní a funkční odchylky T lymfocytů. Jednotlivé skupiny T lymfocytů jsou často abnormální. Analýza TCR odhalila několik poruch v celkové rozmanitosti T lymfocytů [70]. V případě  $\gamma\delta$  T lymfocytů nebyly tyto rozdíly v literatuře zatím ani sledovány ani popsány. Tato práce položila základ pro následné kvalitní sledování různých souvztažností jak početních tak funkčních parametrů  $\gamma\delta$  T lymfocytů.

## 6 Souhrn

V této diplomové práci bylo úkolem zavést metodu PCR pro vytváření expresních profilů  $\gamma\delta$  T lymfocytů v periferní krvi. K tomu bylo nejprve potřeba určit typ buněk, ze kterých bude získávána RNA, následně navrhnout PCR primery a pro ně optimalizovat reakční podmínky. Součástí práce bylo také sestavení expresních profilů  $\gamma\delta$  T lymfocytů zdravých dárců a pacientů s onkologickým onemocněním. Dospěla jsem k následujícím závěrům:

- Pro sestavování expresních profilů  $\gamma\delta$  T lymfocytů je nejvhodnější používat RNA získanou z MNC. Při porovnání použití RNA z MNC a z  $\gamma\delta$  T lymfocytů nebyly pozorovány žádné rozdíly. Množství získané RNA bylo vyšší než u  $\gamma\delta$  T lymfocytů a délka analýzy se zkrátila.
- Expresní profily  $\gamma\delta$  T lymfocytů zdravých jedinců se od sebe navzájem liší. Projevená odlišnost je výsledkem vlastností těchto buněk, které nesou znaky vrozené i získané imunity a jejichž repertoár je formován převážně vnějšími vlivy.
- Expresní profily  $\gamma\delta$  T lymfocytů pacientů s onkologickým onemocněním léčených chemoterapií vykazují změny oproti profilům zdravých jedinců. Tyto změny budou muset být dále zkoumány, protože jejich význam není dosud relevantně popsán.
- Tato práce slouží jako pilotní studie. Skupina zkoumaných zdravých dárců a pacientů byla omezená a v budoucnosti bude muset být pro hlubší porozumění této problematiky rozšířena.



## 7 Summary

The task of this thesis was to prepare the PCR method for creating express profiles of  $\gamma\delta$  T cells from peripheral blood. The first step was to determine the cell type which would be used for RNA isolation. The second step was the designing of PCR primers and the third step was the optimalization of reaction conditions for PCR amplification. Part of this thesis was also the creation of express profiles of  $\gamma\delta$  T cells of healthy volunteers and patients with oncology disorder. I arrived at the following conclusions:

- The most suitable RNA for creating express profiles of  $\gamma\delta$  T cells is RNA isolated from MNC. In comparison with that from  $\gamma\delta$  T cells no differences were discovered. The amount of isolated RNA was higher than from  $\gamma\delta$  T cells and the analysis time was shorter.
- Healthy volunteers' express profiles of  $\gamma\delta$  T cells were different from each other. These differences are the result of these cells' features which carry signs of innate and acquired immunity and whose repertoire is formed mainly by extrinsic factors.
- Express profiles of  $\gamma\delta$  T cells from patients with oncology disorder treated with chemotherapy show changes against profiles of healthy volunteers. These changes will need to be further researched because their importance is not relevantly described nowadays.
- This thesis serves as a pilot study. Studied groups of healthy volunteers and patients were small, so they need further examination in order for us to attain profound understanding of this theme.

## 8 Literatura

1. **Abbas A. K., Lichtman A. H.** Cellular and Molecular Immunology. *Elsevier Inc.* 2005, 5: 4-6, 275-297, 388-389, 503, 525-530.
2. **Quesniaux V. F. J., Down J. D., Schuurman H.-J.** Hematopoiesis, including lymphocyte development and maturation. *Principles of Immunopharmacology.* 2005, 2: 3-15.
3. **Born W. K., Jin N., Aydintug M. K., Wands J. M., French J. D., Roark C. L., O'Brien R. L.**  $\gamma\delta$  T Lymphocytes – Selectable Cells Within the Innate System? *Journal of Clinical Immunology.* 2007, 27(2): 133-144.
4. **Kind T. J., Goldsby R. A., Osborne B. A.** *Kuby Immunology.* 2007, 6: 30-35, 53, 226-244, 558-559.
5. **Hořejší V., Bartůňková J.** Základy imunologie. *TRITON.* 2005, 3: 21.
6. **Giraldi M.** Immunosurveillance and Immunoregulation by  $\gamma\delta$  T Cells. *Journal of Investigative Dermatology.* 2006, 126: 25-31.
7. **Xiong N., Raulet D. H.** Development and selection of  $\gamma\delta$  T cells. *Immunological Reviews.* 2007, 215: 15-20.
8. **McVay L. D., Jaswal S. S., Kennedy C., Hayday A., Carding S. R.** The Generation of Human  $\gamma\delta$  T Cell Receptiores During Fetal Development. *The Journal of Immunology.* 1998, 160: 5851-5852.
9. **Przybylski G. K., Wu H., Macon W. R., Finan J., Leonard D. G. B., Felgar R. E., DiGiuseppe J. A., Nowell P. C., Swerdlow S. H., Kadin M. E., Wasik M. A., Salhany K. E.** Hepatosplenic and Subcutaneous Panniculitis-Like  $\gamma/\delta$  T Cell Lymphomas Are Derived from Different V $\delta$  Subsets of  $\gamma/\delta$  T Lymphocytes. *Journal of Molecular Diagnostics.* 2000, 2(1): 11.
10. **Born W. K., Reardon C. L., O'Brien R. L.** The function of  $\gamma\delta$  T cells in innate immunity. *Current Opinion in Immunology.* 2006, 18: 31-38.
11. **Hirokawa M., Horiuchi T., Kawabata Z., Kitabayashi A., Miura A. B.** Reconstruction of  $\gamma\delta$  T cell repertoire diversity after human allogeneic

- hematopoietic cell transplantation and the role of peripheral expansion of mature T cell population in the graft. *Bone Marrow Transplantation*. 2000, 26: 177-185.
12. **Joachims M. L., Chain J. L., Hooker S. W., Knott-Craig C. J., Thompson L. F.** Human  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  Thymocyte Development: TCR Gene Rearrangements, Intracellular TCR $\beta$  Expression, and  $\gamma\delta$  Development Potential-Differences between Men and Mice. *The Journal of Immunology*. 2006, 176: 1543-1544.
13. **Rosypal S.** Úvod do molekulární biologie, díl druhý. *Brno*. 2002, 3: 519-521, 549.
14. **Norton J., Al-Saffar N., Sloane J. P.** Immunohistological study of distribution of  $\gamma/\delta$  lymphocytes after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Pathol*. 1992, 45: 1027-1028.
15. **Allison J. P.**  $\gamma\delta$  T-cell development. *Current Opinion in Immunology*. 1993, 5: 241-246.
16. **Kabelitz D., Wesch D., Hinz T.**  $\gamma\delta$  T cells, their T cell receptor usage and role in human diseases. *Springer Seminars in Immunopathology*. 1999, 21(1): 55-75.
17. **Takahara Y., Reimann J., Michalopoulos E., Ciccone E., Moretta L., Mak T. W.** Diversity and structure of human T cell receptor  $\delta$  chain genes in peripheral blood  $\gamma/\delta$ -bearing T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1989, 169: 393.
18. **Allison T. J., Winter C. C., Fournié J.-J., Bonneville M., Garboczi D. N.** Structure of a human  $\gamma\delta$  T-cell antigen receptor. *Nature*. 2001, 411: 820-824.
19. **Wilson I. A., Stanfield R. L.** Unraveling the mysteries of  $\gamma\delta$  T cell recognition. *Nature Immunology*. 2001, 2(7): 579-581.
20. **Wells F. B., Tatsumi Y., Bluestone A., Hedrick S. M., Allison J. P., Matis L. A.** Phenotypic and Functional Analysis of Positive Selection in the T Cell Lineage. *The Journal of Experimental Medicine*. 1993, 177: 1061.
21. **Carding S. R., Egan P. J.**  $\gamma\delta$  T cells: Functional plasticity and heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*. 2002, 2: 336-345.
22. **Apasov S. G., Sitkovsky M. V.** T cell-mediated immunity. *Principles of Immunopharmacology*. 2005, 2: 19-21.

23. **Brandes M., Willimann K., Moser B.** Professional Antigen-Presentation Function by Human  $\gamma\delta$  T Cells. *Science*. 2005, 309: 264-266.
24. **Rothenberg E. V., Moore J. E., Yui M. A.** Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nature Reviews Immunology*. 2008, 8: 9-21.
25. **Richards M. H., Nelson J. L.** The Evolution of Vertebrate Antigen Receptors: A Phylogenetic Approach. *Molecular Biology and Evolution*. 2000, 17(1): 146-155.
26. **Allison T. J., Garboczi D. N.** Structure of  $\gamma\delta$  T cell receptors and their recognition of non-peptide antigens. *Molecular Immunology*. 2002, 38(14): 1051-1061.
27. **Kaufmann S. H. E.**  $\gamma/\delta$  and other unconventional T lymphocytes: What do they see and what do they do? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996, 93: 2272-2279.
28. **Konigshofer Y., Chien Y.-h.**  $\gamma\delta$  T cells – innate immune lymphocytes? *Current Opinion in Immunology*. 2006, 18: 527-533.
29. **Arden B., Clark S. P., Kalebitz D., Mak T. W.** Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics*. 1995, 42: 455-500.
30. **Schondelmaier S., Wesch D., Pechhold K., Kabelitz D.**  $V\gamma$  gene usage in peripheral blood  $\gamma\delta$  T cells. *Immunology Letters*. 1993, 38: 125.
31. **Tsuruta Y., Yoshioka T., Suzuki R., Sakata T.** Analysis of the population of human T cell receptor  $\gamma$  and  $\delta$  chain variable region subfamilies by reverse dot blot hybridization. *Journal of Immunological Methods*. 1993, 169: 22.
32. **Giudicelli V., Chaume D., Lefranc M.- P.** IMGT/GENE-DB: a comprehensive database for human and mouse immunoglobulin and T cell receptor genes. *Nucleic Acids Research*. 2005, 33: D256-D257.
33. **Przybylski G. K., Wanzeck J., Verschuren M. C. M., van Dongen J. J. M., Serke S., Schmidt C. A.** Identification of a new cluster of T-cell receptor delta recombining elements. *Immunology*. 2003, 108: 16.
34. **Loh E. Y., Cwirla S., Serafini A. T., Phillips J. H., Lanier L. L.** Human T-cell-receptor  $\delta$  chain: Genomic organization, diversity, and expression in populations of cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1988, 85: 9714-9718.

35. **Mackelprang R., Carlson C. S., Subrahmanyam L., Livingston R. J., Eberle M. A., Nickerson D. A.** Sequence variation in the human T-cell receptor loci. *Immunological Reviews*. 2002, 190: 26-28.
36. **Holtmeier W., Chowers Y., Lumeng A., Morzycka-Wroblewska E., Kagnoff M. F.** The  $\delta$  T Cell Receptor Repertoire in Human Colon and Peripheral Blood Is Oligoclonal Irrespective of V Region Usage. *J. Clin. Invest.* 1995, 96: 1108.
37. **Esin S., Shigematsu M., Nagai S., Eklund A., Wigzell H., Grunewald J.** Different Percentages of Peripheral Blood  $\gamma\delta$  T Cells in Healthy Individuals from Different Areas of the World. *Scandinavian Journal of Immunology*. 1996, 43: 593.
38. **Ferrarini M., Ferrero E., Dagna L., Poggi A., Zocchi M. R.** Human  $\gamma\delta$  T cells: a nonredundant system in the immune-surveillance against cancer. *TRENDS in Immunology*. 2002, 23(1): 14-16.
39. **van der Harst D., Brand A., van Luxemburg-Heijs S. A., Kooij-Winkelaar Y. M., Zwaan F. E., Koning F.** Selective outgrowth of CD45RO<sup>+</sup> V gamma 9+/V delta 2+ T-cell receptor gamma/delta T cells early after bone marrow transplantation. *Blood*. 1991, 78: 1875-1881.
40. **R., Hill G.** Host  $\gamma\delta$  T cells: an innate bridge to the epithelial targets of GVHD? *Blood*. 2005, 106(2): 393-394.
41. **Shen J., Andrews D. M., Pandolfi F., Boyle L. A., Kersten C. M., Blatman R. N., Kurnick J. T.** Oligoclonality of V $\delta$ 1 and V $\delta$ 2 Cell in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: TCR Selection Is Not Altered by Stimulation with Gram-Negative Bacteria. *The Journal of Immunology*. 1998, 160: 3048.
42. **De Rosa S. C., Andrus J. P., Perfetto S. P., Mantovani J. J., Herzenberg L. A., Herzenberg L. A., Roederer M.** Ontogeny of  $\gamma\delta$  T Cells in Humans. *The Journal of Immunology*. 2004, 172: 1637-1645.
43. **Bucht A., Söderström K., Esin S., Grunewald J., Hagelberg S., Magnusson I.** Analysis of  $\gamma\delta$  V region usage in normal and diseased human intestinal biopsies and peripheral blood by polymerase chain reaction (PCR) and flow cytometry. *Clin Exp Immunol*. 1995, 99: 57-64.

44. **Kabelitz D.** Function and specificity of human gamma/delta-positive T cells. *Critical Reviews of Immunology*. 1992, 11(5): 281.
45. **Modlin R. L., Sieling P. A.** Now Presenting:  $\gamma\delta$  T Cells. *Science*. 2005, 309: 252-253.
46. **Bank I., Cohen L., Mouallem M., Farfel Z., Grossman E., Ben-Nun A.**  $\gamma\delta$  T cell subsets in patients with arthritis and chronic neutropenia. *Ann Rheum Dis*. 2002, 61: 438-443.
47. **Nagai M., Azuma E., Qi J., Kumamoto T., Hiratake S., Hirayama M., Umemoto M., Komada Y., Sakurai M.** Suppression of alloreactivity with  $\gamma\delta$  T-cells: relevance to increased  $\gamma\delta$  T-cell following bone marrow transplantation. *Biomed & Pharmacother*. 1998, 52: 137.
48. **Lamb L. S. Jr, Lopez R. D.**  $\gamma\delta$  T Cells: A New Frontier for Immunotherapy? *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2005, 11: 161-168.
49. **Slováček L., Jebavý L., Blažek M., Kmoníček M., Žák P.** Transplantace kostní dřeně. Přehled základních pojmů, typy transplantací, indikace, vlastní provedení. *Vojenské zdravotnické listy*. 2005, 74 (3-4): 125-126.
50. **J., Martin P.** Winning the battle of graft versus host. *Nature Medicine*. 2000, 6 (1): 18-19.
51. **Vilmer E., Triebel F., David V., Rabian C., Schumpp M., Leca G., Degos L., Hercend T., Sigaux F., Bensussan A.** Prominent Expansion of Circulating Lymphocytes Bearing  $\gamma$  T-Cell Receptors, With Preferential Expansion of Variable  $\gamma$  Genes After Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *Blood*. 1988, 72 (3): 841-845.
52. **Lamb L. S. Jr., Musk P., Ye Z., van Rhee F., Geier S. S., Tong J.-J., King K. M., Henslee-Downey P. J.** Human  $\gamma\delta^+$  T lymphocytes have in vitro graft vs leukemia activity in the absence of an allogeneic response. *Bone Marrow Transplantation*. 2001, 27: 601-606.
53. **Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V., Koptíková J.** Metody molekulární biologie. *Masarykova univerzita Brno*. 2005, 1: 26.

54. **Onkologické centrum J. G. Mendela - Laboratoř molekulární biologie.** Laboratorní metody. <http://www.onkologickecentrum.cz/downloads/vysetreni/laborator-metody.pdf>.
55. **Vilmer E., Guglielmi P., David V., Leca G., Rabian C., Degos L., Boiron M., Bensussan A.** Predominant expression of circulating CD3+ lymphocytes bearing gamma T cell receptor in a prolonged immunodeficiency after allogeneic bone marrow transplantation. *The Journal of Clinical Investigation*. 1988, 82: 755.
56. **Pabst C., Schirutschke H., Ehninger G., Bornhäuser M., Platzbecker U.** The Graft Content of Donor T Cells Expressing  $\gamma\delta$ TCR+ and CD4+foxp3+ Predirects the Risk of Acute Graft versus Host Disease after Transplantation of Allogeneic Peripheral Blood Stem Cells from Unrelated Donors. *Clin Cancer Res*. 2007, 13(10): 2917.
57. **Dvořáková M.** Základní principy a využití kvantitativní PCR s ohledem na onkologickou diagnostiku. *Bakalářská práce*. 2007.
58. **Olive C., Gatenby P. A., Serjeantson S. W.** Restricted junctional diversity of T cell receptor  $\delta$  gene rearrangements expressed in systemic lupus erythematosus (SLE) patients. *Clin. Exp. Immunol*. 1994, 97: 430-437.
59. —. Variable gene usage of T cell receptor  $\gamma$ - and  $\delta$ -chain transcripts expressed in synovia and peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Clin. exp. Immunol*. 1992, 87: 172-176.
60. **Sigma-Aldrich, Inc.** HISTOPAQUE®-1077 (Procedure No. 1077). <http://www.sigmaaldrich.com/sigma/general%20information/1077.pdf>. 2003.
61. **Miltenyi Biotec GmbH.** Anti-TCR $\gamma/\delta$  MicroBead Kit human. [http://www.miltenyibiotec.com/download/datasheets\\_en/928/DS130-092-892.pdf](http://www.miltenyibiotec.com/download/datasheets_en/928/DS130-092-892.pdf).
62. **Ambion, Inc.** RNAqueous®-Micro Kit. [http://www.ambion.com/techlib/prot/fm\\_1931.pdf](http://www.ambion.com/techlib/prot/fm_1931.pdf). 2008.
63. **Qiagen.** RNeasy® Mini Handbook. [http://www1.qiagen.com/HB/RNeasyMiniKit\\_EN](http://www1.qiagen.com/HB/RNeasyMiniKit_EN). 2006.

64. **Agilent Technologies, Inc.** Agilent DNA 1000 Kit Quick Start Guide. [http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G2938-90015\\_QuickDNA1000.pdf](http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G2938-90015_QuickDNA1000.pdf). 2007.
65. **Kabelitz D., Hinz T., Dobmeyer T., Mentzel U., Marx S., Böhme A., Arden B., Rossol R., Hoelzer D.** Clonal expansion of V $\gamma$ 3/V $\delta$ 3-expressing  $\gamma\delta$  T cells in an HIV-1/2-negative patient with CD4 T-cell deficiency. *British Journal of Haematology*. 1997, 96: 266-271.
66. **Morita C. T., Mariuzza R. A., Brenner M. B.** Antigen recognition by human  $\gamma\delta$  T cells: pattern recognition by the adaptive immune system. *Springer Seminars in Immunopathology*. 2000, 22: 191-192.
67. **Mackall C. L., Hakim T., Gress R. E.** T-cell regeneration: all repertoires are not created equal. *Immunology today*. 1997, 18(5): 245-251.
68. **Usnarska-Zubkiewicz L., Sowinska E., Kuliczkowski K.** Gamma-delta T-cell receptor expression estimation in peripheral blood lymphocyte population in multiple myeloma and lymphoma malignum patients treated megachemotherapy with autologous bone marrow transplantation (auto-BMT). *Bone marrow transplantation*. 2007, 39: S158.
69. **Galimberti S., Benedetti E., Morabito F., Petrini I., Battolla B., Papineschi F., Fazzi R., Ciabatti E., Martino M., Cuzzola M., Console G., Iacopino P., Petrini M.** Different  $\gamma\delta$  T clones sustain GVM and GVH effects in multiple myeloma patients after non-myeloablative transplantation. *Leukemia Research*. 2006, 30(5): 529-535.
70. **Pratt G., Goodyear O., Moss P.** Immunodeficiency and immunotherapy in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*. 2007, 138: 566-579.