



MASARYKOVA UNIVERZITA

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE



**Chromozomové přestavby
s místy zlomů v genech
pro T-buněčné receptory**

Disertační práce

Jitka Drbalová

Školitel: Prof. MVDr. Jiří Rubeš, CSc.

Brno 2015

Bibliografický záznam

Autor: MVDr. Jitka Drbalová
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita
Ústav experimentální biologie

Název práce: Chromozomové přestavby s místy zlomů v genech pro T-buněčné receptory

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Obecná a molekulární genetik

Školitel: Prof. MVDr. Jiří Rubeš, CSc.
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno
Oddělení genetiky a reprodukce

Akademický rok: 2015/2016

Počet stran: 140

Klíčová slova: chromozomové přestavby; nelegitimní rekombinace; geny pro T-buněčný receptor; evoluce karyotypů; T lymfom; $\gamma\delta$ T lymfocyty; prase; koňovití; kůň; skot; ovce

Bibliographic Entry

Author: MVDr. Jitka Drbalová
Faculty of Science, Masaryk University
Department of Experimental Biology

Title of Dissertation: Chromosomal rearrangements with breakpoints in T cell receptor genes

Degree Programme: Biology

Field of Study: General and Molecular Genetics

Supervisor: Prof. MVDr. Jiří Rubeš, CSc.
Veterinary Research Institute, Brno
Department of Genetics and Reproduction

Academic Year: 2015/2016

Number of Pages: 140

Keywords: Chromosome rearrangements; Illegitimate recombination; T cell receptor gene; Karyotype evolution; T cell lymphoma; $\gamma\delta$ T lymphocytes; Pig; Equidae; Horse; Cattle; Sheep

Abstrakt

T lymfocyty na svém povrchu exprimují $\alpha\beta$ nebo $\gamma\delta$ T-buněčný receptor (TCR) zodpovědný za jejich antigenní specifitu. TCR je kódován celkem čtyřmi geny – *TRA*, *TRB*, *TRD* a *TRG*, které se nachází ve třech různých chromozomových oblastech. Během maturace T lymfocytů jsou geny pro TCR přeskupovány místně–specifickou rekombinací mezi klastry variabilních (V), diverzifikačních (D) a spojovacích (J) segmentů. Tento proces označovaný jako V(D)J rekombinace predisponuje T lymfocyty ke vzniku aberantních přestaveb, především reciprokých translokací a inverzí. K nelegitimním rekombinacím mezi rozdílnými TCR geny dochází v malé míře také u zdravých jedinců a u lidí a myši je absolutní počet těchto přestaveb považován za ukazatel rizika vzniku lymfomu.

Cílem této práce bylo určit frekvence nelegitimních rekombinací mezi TCR geny metodou fluorescenční *in situ* hybridizace s využitím malovacích sond a BAC konstruktů a jejich analýza sekvenováním PCR produktů u různých živočišných druhů včetně člověka. Výskyt chromozomových přestaveb s místy zlomů v TCR genech u prasat, skotu, ovcí, koní a čtyř dalších zástupců čeledi koňovitých byl zjišťován vůbec poprvé.

Ukázalo se, že frekvence nelegitimních rekombinací mezi TCR geny se liší nejen při porovnání nálezů u různých živočišných druhů (a to i v případě vysoce příbuzných zástupců čeledi koňovitých), ale i v rámci druhu. Jsou zde diskutovány vlivy stáří vyšetřovaných jedinců, zastoupení $\gamma\delta$ T lymfocytů v periferní krvi, komplexity, lokalizace a orientace TCR lokusů. Nemůžeme vyloučit ani souvztažnost mezi vysokým počtem aberantních přestaveb s místy zlomů v TCR genech u prasete, koně, skotu a ovcí a rizikem vzniku T buněčného lymfomu.

Abstract

T cells express either $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ antigen-specific T cell receptors (TCR). There are four TCR genes – *TRA*, *TRB*, *TRD* and *TRG* located in three different chromosome regions. During maturation of T cells, TCR genes are rearranged by site-specific recombination between clusters of variable (V), diversity (D) and joining (J) segments. The process of V(D)J recombination predisposes T cells to aberrant rearrangements such as reciprocal translocations and inversions. Illegitimate recombination of different TCR genes occurs at a low level in healthy individuals and it has been suggested that the absolute number of these trans-rearrangements correlates with the risk of lymphoma in humans and mice.

The objective of this work was to assess the frequencies of interlocus recombination between TCR genes by means of fluorescence *in situ* hybridization using painting probes and BAC probes and their analysis by sequencing of PCR products in different species including humans. The occurrence of trans-rearrangements with breakpoints in TCR genes in pigs, cattle, sheep, horses and four other equids was investigated for the first time.

We show that frequencies of illegitimate recombinations between TCR loci differ not only when comparing findings in different species (and even highly related species in case of equids) but also within the species. The effect of age of examined individuals, $\gamma\delta$ T cells proportion in peripheral blood, complexity, localization and orientation of TCR loci are discussed here. The correlation between high number of trans-rearrangements with breakpoints in TCR genes in pig, horse, cattle and sheep and the risk of T cell lymphoma cannot be ruled out.

Předkládaná práce byla vypracována na Oddělení genetiky a reprodukce Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. v Brně za podpory Grantové agentury České republiky (projekt P502/12/1966) a Evropského fondu regionálního rozvoje – Středoevropský technologický institut Brno CEITEC (ED1.1.00/02.0068).

Poděkování

Ráda bych poděkovala prof. MVDr. Jiřímu Rubešovi, CSc. za odborné vedení a možnost získat cenné praktické zkušenosti z oblasti cytogenetiky. Poděkování patří také celému kolektivu Oddělení genetiky a reprodukce Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně za vytvoření příjemných pracovních podmínek, za cenné rady a připomínky zvláště pak RNDr. Petře Musilové, Ph.D., RNDr. Svatavě Kubíčkové a Mgr. Halině Černohorské.

V neposlední řadě chci na tomto místě velmi poděkovat celé své rodině za podporu při psaní této práce.

OBSAH

1. ÚVOD	11
1.1 T-buněčný receptor	11
1.1.1 Exprese genů pro T-buněčný receptor.....	14
1.1.1.1 V(D)J rekombinace	16
1.1.1.2 Regulace V(D)J rekombinace	18
1.1.2 Diverzita T-buněčných receptorů.....	19
1.1.3 Vývoj a diferenciací T lymfocytů.....	20
1.1.4 Chromozomová lokalizace TCR genů – mezidruhové srovnání.....	22
1.1.5 Genomová organizace TCR genů	25
1.2 Chromozomové abnormality (chromozomové aberace).....	27
1.2.1 Numerické chromozomové aberace	27
1.2.2 Strukturní chromozomové aberace (chromozomové přestavby).....	28
1.2.2.1 Dvouvláknové zlomy DNA (DSBs).....	28
1.2.2.2 Typy chromozomových přestaveb	29
1.2.2.3 Chromozomové přestavby s místy zlomů v TCR genech	31
1.3 Metody detekce chromozomových přestaveb v periferních lymfocytech	34
1.3.1 Cytogenetické metody.....	34
1.3.1.1 Barvení chromozomů a karyotypizace	35
1.3.1.2 Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace	35
1.3.1.3 Komparativní genomová hybridizace.....	40
1.3.2 Metody založené na polymerázové řetězové reakci.....	40
1.3.2.1 RT-PCR	41
1.3.2.2 Multiplex PCR.....	41
1.3.2.3 Real-time PCR.....	42
1.3.2.4 Nested PCR	43
1.3.3 Sekvenování nové generace	43
1.3.3.1 Sekvenování transkriptomu (RNA-sekvenování).....	44
1.3.3.2 Cílené sekvenování (amplikonové sekvenování).....	45
2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	46

3. MATERIÁL A METODY	47
3.1 Předmět studia	47
3.2 Kultivace lymfocytů periferní krve	47
3.2.1 Chemikálie a roztoky	47
3.2.2 Pracovní postup	48
3.3 Izolace a kultivace prasečích T lymfocytů a $\gamma\delta$ T lymfocytů	48
3.3.1 Chemikálie a roztoky	48
3.3.2 Pracovní postup	49
3.4 Analýza $\gamma\delta$ T lymfocytů pomocí průtokové cytometrie	49
3.4.1 Chemikálie a roztoky.....	49
3.4.2 Pracovní postup	50
3.5 Příprava preparátů metafázních chromozomů	50
3.5.1 Chemikálie a roztoky	50
3.5.2 Pracovní postup	50
3.6 Příprava sond pro fluorescenční <i>in situ</i> hybridizaci	51
3.7 Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace	52
3.7.1 Chemikálie a roztoky.....	52
3.7.2 Pracovní postup	53
3.8 Vyhodnocení preparátů a statistická analýza	54
3.9 Charakterizace hybridních TCR genů pomocí nested PCR	55
3.9.1 Chemikálie a roztoky.....	55
3.9.2 Pracovní postup	56
3.10 Genomová organizace <i>TRA</i> a <i>TRG</i> koně domácího (<i>Equus caballus</i>).....	57
4. VÝSLEDKY	58
4.1 Ilegitimní přestavby mezi TCR geny u lidí a prasat.....	58
4.2 Ilegitimní přestavby mezi TCR geny u zástupců čeledi koňovitých (<i>Equidae</i>)..	63
4.3 Ilegitimní přestavby mezi TCR geny u skotu a ovcí.....	71
4.4 Ilegitimní přestavby v TCR genech – mezidruhové srovnání.....	76

4.5	Detekce hybridních TCR genů pomocí PCR	78
4.6	Genomová organizace <i>TRA</i> a <i>TRG</i> koně domácího (<i>Equus caballus</i>).....	80
5.	DISKUZE.....	82
5.1	Subpopulace periferních T lymfocytů.....	82
5.2	Věk vyšetřovaného jedince	83
5.3	Struktura TCR lokusu.....	84
5.4	Tvorba DSBs v prostoru a čase	85
5.5	Genomová lokalizace TCR lokusů.....	86
5.6	Orientace TCR genů.....	87
5.7	Riziko vzniku lymfomu.....	89
5.8	Jiné faktory.....	90
6.	ZÁVĚR.....	92
7.	SEZNAM ZKRATEK.....	94
8.	LITERATURA.....	96
9.	PUBLIKAČNÍ ČINNOST A ÚČAST NA KONFERENCÍCH.....	110
9.1	Publikace v impaktovaných časopisech	110
9.2	Posterová sdělení.....	110
10.	PŘÍLOHY.....	111

1. ÚVOD

Předkládaná disertační práce se zabývá detekcí chromozomových přestaveb s místy zlomů v genech pro T-buněčné receptory v lymfocytech periferní krve u vybraných živočišných druhů včetně člověka. V první části teoretického úvodu práce je pozornost věnována základní charakteristice T-buněčného receptoru, popisu exprese genů pro T-buněčný receptor během vývoje a diferenciaci T lymfocytů, chromozomové lokalizaci a genomové organizaci těchto genů s přihlédnutím k mezidruhovým rozdílům. Další část je koncipována jako přehled chromozomových abnormalit se zaměřením na strukturní chromozomové aberace – jejich rozdělení, podmínky jejich vzniku a konečně výskyt chromozomových přestaveb se zlomovými místy v lokusech pro T-buněčné receptory ve spojení s lymfoproliferativními onemocněními, některými syndromy chromozomální nestability a možnostmi jejich využití jako biomarkeru genotoxicity. Na závěr jsou uvedeny metody detekce chromozomových přestaveb v periferních lymfocytech. V této části je širěji rozvedena metoda fluorescenční *in situ* hybridizace, která představuje stěžejní techniku používanou v rámci této disertační práce.

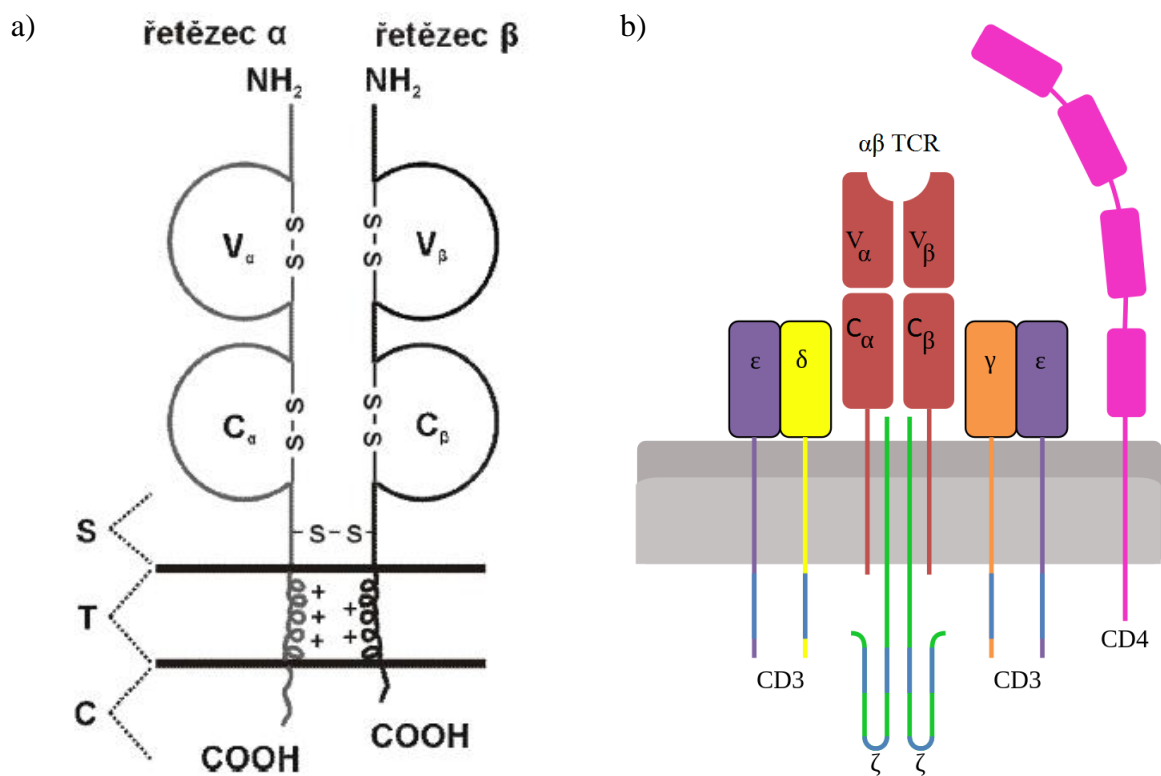
1.1 T-buněčný receptor

T-buněčný receptor (TCR, z angl. T cell receptor) je molekula vázaná v membráně T lymfocytu zodpovědná za jeho antigenní specifitu. Tuto významnou složku adaptivní imunity můžeme nalézt u všech zástupců čelistnatců (*Gnathostomata*), tedy u všech žijících obratlovců s výjimkou sliznatek a mihulí (Hofmann a kol., 2010). Jedná se o heterodimer složený ze dvou polypeptidových řetězců. Podle toho, kterou dvojicí řetězců je tvořen, rozlišujeme dva typy TCR – $\alpha\beta$ TCR (řetězce α a β) a $\gamma\delta$ TCR (γ a δ řetězec). U lidí, myší, potkanů, morčat a psů exprimuje většina periferních T lymfocytů $\alpha\beta$ TCR a T lymfocyty nesoucí $\gamma\delta$ TCR ($\gamma\delta$ T lymfocyty) tvoří méně než 10 % (Kabelitz a kol., 1999; Richards a Nelson, 2000), zatímco u prasete (Yang a Parkhouse, 1996), skotu, ovcí (Davis a kol., 1996) a dalších přežvýkavců, králíka a kuřete představují $\gamma\delta$ T lymfocyty podstatnou část populace cirkulujících T lymfocytů (Su a kol., 1999; Bailey a kol., 2013; Holderness a kol., 2013).

Tab. 1: Zastoupení $\gamma\delta$ T lymfocytů v periferní krvi u vybraných druhů (upraveno dle Holderness a kol., 2013)

Druhy s nízkým zastoupením $\gamma\delta$ T lymfocytů (do 10 %)		Druhy s vysokým zastoupením $\gamma\delta$ T lymfocytů	
Člověk (<i>Homo sapiens</i>)	0,5-10 %	Kuře (<i>Gallus gallus</i>)	15 %
Myš (<i>Mus musculus</i>)	0,5-10 %	Prase (<i>Sus scrofa</i>)	30 %
Potkan (<i>Rattus norvegicus</i>)	1-5 %	Skot (<i>Bos taurus</i>)	20-40 %
Morče (<i>Cavia porcellus</i>)	8,6 %	Ovce (<i>Ovis aries</i>)	17 %
Pes (<i>Canis familiaris</i>)	2,5 %	Koza (<i>Capra hircus</i>)	5-20 %
		Zebu (<i>Bos indicus</i>)	11-20 %
		Jelen lesní (<i>Cervus elaphus</i>)	17 %
		Jelen wapiti (<i>Cervus canadensis</i>)	18 %
		Králík (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	20 %

Svoji doménovou strukturou se TCR řadí do velké imunoglobulinové rodiny (obr. 1a). Na každém řetězci najdeme dvě extracelulární imunoglobulinové domény – variabilní (V) a konstantní (C) doménu tvořící neúplné prstence kovalentně spojené disulfidickou (S-S) vazbou. N-koncová doména představuje variabilní oblast řetězce TCR tím, že vykazuje vysokou sekvenční variabilitu ve třech hypervariabilních oblastech – tzv. oblasti určující komplementaritu (CDR1, CDR2, CDR3, z angl. complementarity determining region). Tato část molekuly TCR zajišťuje interakci s antigenem. Řetězec β má v oblasti V domény navíc hypervariabilní úsek, který pravděpodobně neparticipuje na rozpoznávání antigenu, ale slouží jako vazebné místo pro mikrobiální produkty označované jako superantigeny. Konstantní oblast se vyznačuje konzervativní sekvencí. Kromě konstantní domény je její součástí také krátká spojovací oblast (S), kde jsou oba řetězce heterodimeru spojeny S-S vazbou. Hydrofobní transmembránová oblast (T) obsahuje pozitivně nabitě zbytky aminokyselin lysinu a argininu. Navazuje na ni krátká cytoplazmatická oblast (C) na karboxylovém konci řetězce.



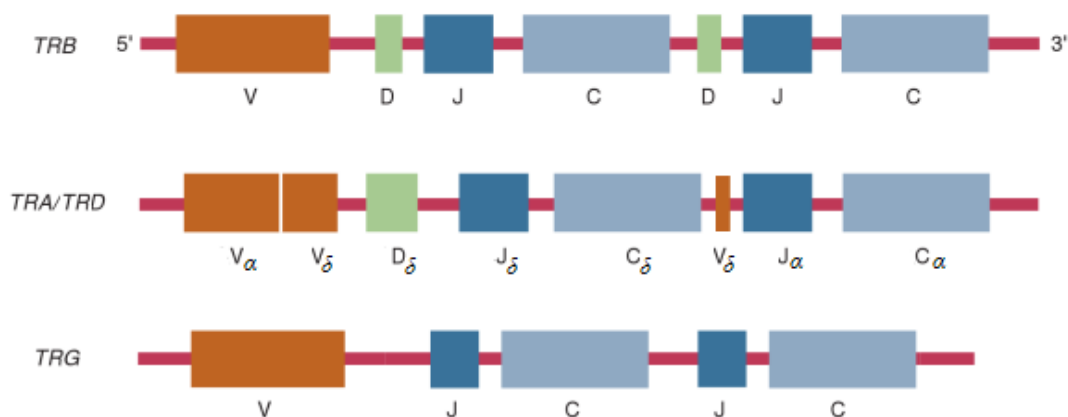
Obr. 1: a) Schématické znázornění $\alpha\beta$ T-buněčného receptoru. V, C – variabilní a konstantní doména, S, T, C – spojovací, transmembránová a cytoplazmatická oblast (převzato z Kindt a kol., 2007)
 b) Schématické znázornění T-buněčného receptorového komplexu (převzato z https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3ATCR_complex.svg)

Molekula TCR je na povrchu T lymfocytu prostřednictvím pozitivně nabitých zbytků aminokyselin transmembránové oblasti asociována s komplexem molekul CD3 (z angl. cluster of differentiation) a společně se dvěma ζ řetězci tvoří tzv. TCR-CD3 komplex (Clevers a kol., 1988; Weiss a kol., 1995). TCR-CD3 komplex spolu s koreceptory CD4 nebo CD8 (dle subpopulace T lymfocytů) bývá dále označován jako T-buněčný receptorový komplex (obr. 1b), jehož úlohou je rozpoznat antigeny. Po interakci specifického TCR s odpovídajícím antigenem se molekuly CD3 komplexu účastní přenosu aktivačního signálu do nitra buňky, kde jsou spuštěny signální dráhy navozující proliferaci (tzv. klonální expanzi) a diferenciaci T lymfocytů. Zatímco $\alpha\beta$ T lymfocyty jsou aktivovány pouze prostřednictvím vazby antigenních peptidů na molekuly hlavního histokompatibilního komplexu MHC (z angl. major histocompatibility complex), $\gamma\delta$ T lymfocyty jsou schopné rozpoznat i solubilní antigeny nepeptidové povahy (Kabelitz a kol., 2011; Born a kol., 2011).

Mezi T lymfocyty bývají zahrnuty také invariantní NK T lymfocyty (iNKT buňky) nesoucí na svém povrchu invariantní TCR a molekuly specifické pro NK buňky.

1.1.1 Exprese genů pro T-buněčný receptor

Rozlišujeme celkem čtyři geny kódující TCR - *TRA*, *TRB*, *TRD* a *TRG* pro α , β , γ a δ řetězec TCR. Lokus *TRD* je umístěn uvnitř *TRA* lokusu, proto se užívá označení *TRA/TRD* lokus. Každý lokus obsahuje genové segmenty tří až čtyř typů - variabilní (V), diverzifikační (D), spojovací (J) a konstantní (C) segmenty. Segmenty D najdeme pouze u *TRB* a *TRD* (obr. 2). Přestavbou těchto genových segmentů, tzv. V(D)J rekombinací, vzniká během raných stadií diference T lymfocytů funkční podoba TCR genu. Segmenty C kódují konstantní oblast TCR řetězce, zatímco přeskupení segmentů V, D a J dává vzniknout variabilní doméně molekuly TCR.

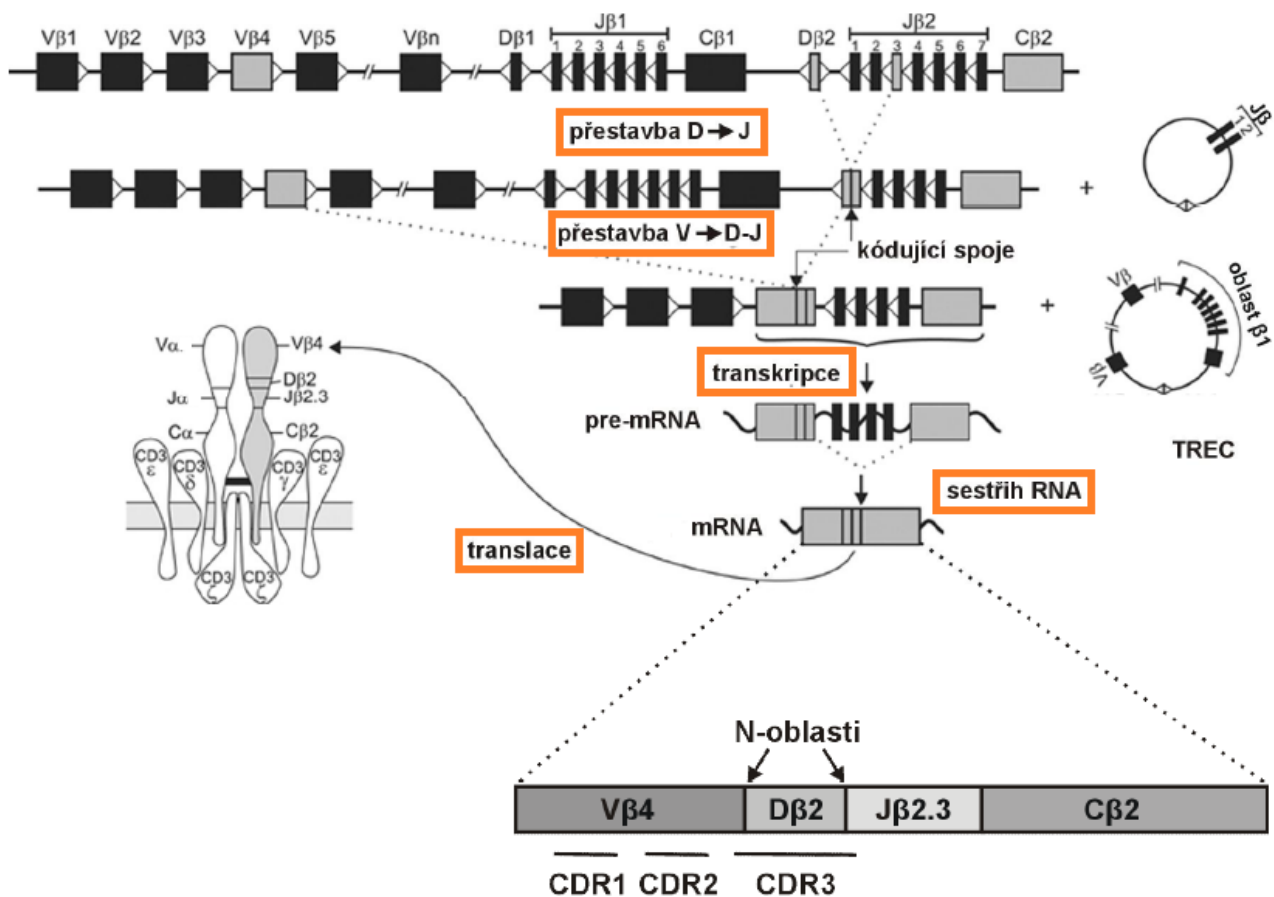


Obr. 2: Základní struktura TCR lokusů člověka. Genové segmenty δ řetězce jsou umístěny mezi V_α a J_α segmenty (převzato a upraveno dle Tizard, 2012).

Místně specifickou V(D)J rekombinací zprostředkovává komplex enzymů obsahující proteiny RAG-1 a RAG-2 (z angl. recombinase-activating gene), které rozeznávají a štěpí DNA v oblastech rekombinačních signálních sekvencí (RSS) na 3' konci všech genových segmentů V, na 5' konci segmentů J a po obou stranách segmentů D (Olaru a kol., 2005). RSS obsahují konzervativní palindromické heptamery (5'-CACAGTG-3') a na AT nukleotidy bohaté nonamery (5'-ACAAAACC-3') nebo jejich komplementární sekvence (Tonegawa, 1983; Messier a kol., 2003), které jsou odděleny mezerou o délce 12 nebo 23 párů bazí. Podle

pravidla 12/23 se přeskupování vyskytuje mezi genovými segmenty s různě velkými mezerami (Przybylski a kol., 2003). Nemohou se tedy spojit např. dva genové segmenty V-V, ale pouze V-J, D-J nebo V-D-J segmenty (Sadofsky, 2001; Olaru a kol., 2005).

V(D)J rekombinace *TRB* a *TRD* genu probíhá ve dvou krocích. Nejprve dojde k připojení segmentu $D\beta/\delta$ k segmentu $J\beta/\delta$ a poté následuje přestavba segmentů $V\beta/\delta$ k dané dvojici $D\beta/\delta$ - $J\beta/\delta$ (Tsuda a kol., 1996). Přestavba *TRA* a *TRG* se liší tím, že probíhá pouze v jednom kroku, neboť tyto geny se skládají jen ze segmentů V, J a C. Jedná se o přímou přestavbu segmentu $V\alpha/\gamma$ k segmentu $J\alpha/\gamma$. Zbylá sekvence mezi přestavěnými segmenty je odstraněna ve formě malých kruhových molekul DNA zvaných TREC (z angl. T cell receptor excision circles). Teprve po této přestavbě je umožněna transkripce. Následně jsou z RNA odstraněny ostatní nadbytečné genové segmenty (sestrih RNA) a k již přeskupěným segmentům V-D-J nebo V-J je připojen segment C (obr. 3).



Obr. 3: Schéma exprese *TRB* genu. Bílé trojúhelníky představují rekombinační signální sekvence (RSS). V N-oblastech v místech kódujících spojů dochází k náhodné inzerci N-nukleotidů (převzato a upraveno z van Dongen a kol., 2003).

1.1.1.1 V(D)J rekombinace

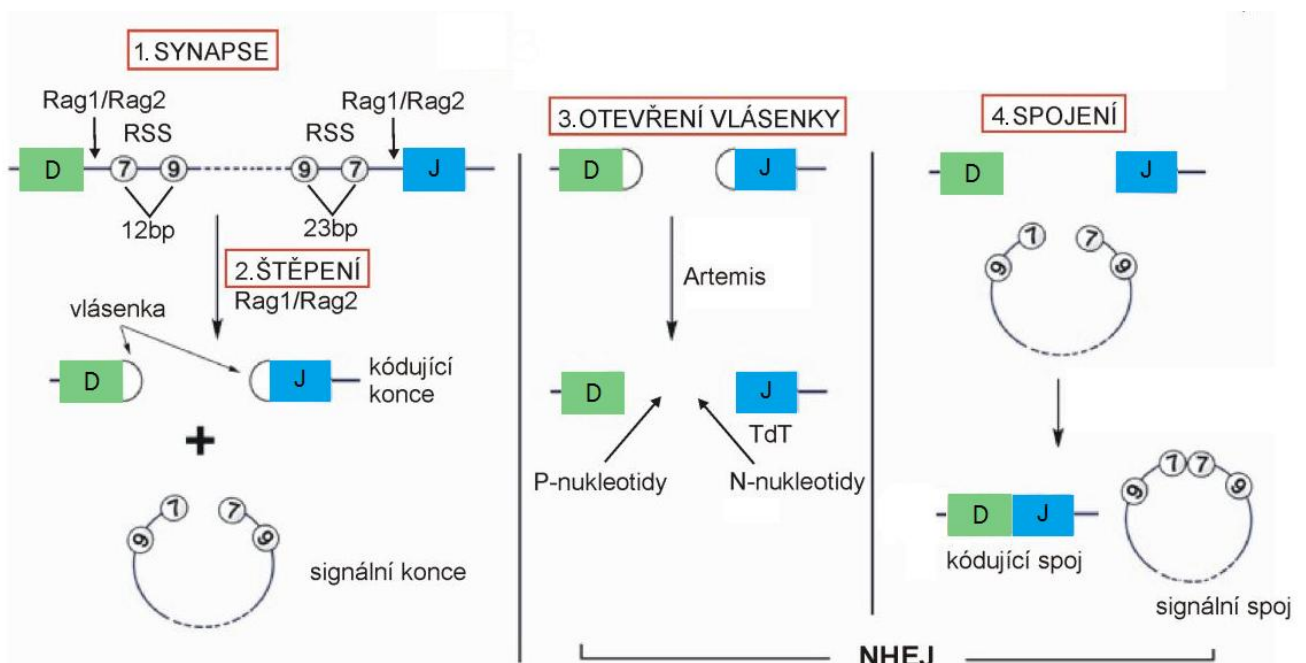
Proces V(D)J rekombinace můžeme rozdělit do těchto čtyř kroků (obr. 4):

1. Synapse

Části chromozomů, na kterých jsou antigenní receptorové geny lokalizovány, se stávají dostupnými pro rekombinační proces tím, že kódující segmenty a jejich RSS se dostávají do blízkosti vytvořením chromozomální smyčky.

2. Štěpení

V(D)J rekombinace je iniciována rozpoznáním RSS a štěpením DNA komplexem RAG enzymů za vzniku dvouřetězcových zlomů (DSBs, z angl. double-strand breaks) mezi dvěma genovými segmenty a jejich RSS za vzniku terminální vlásenky na kódujících koncích a vznikem tupých 5'-fosforylovaných signálních konců obsahujících kompletní RSS (Sadofsky, 2001). Spojením signálních konců obsahujících heptamer a zbytek RSS se vytváří buď extrachromozomální kruhová molekula DNA (TREC molekula), která se ztrácí z buňky během buněčného dělení (Messier a kol., 2003), nebo fúzané RSS elementy, které zůstávají



Obr. 4: Schéma V(D)J rekombinace – vytvoření segmentu D-J (převzato a upraveno dle Soulas-Sprauel a kol., 2007)

začleněny v chromozomu a zajišťují chromozomální integritu (Cortes a kol., 1996; Sadofsky, 2001).

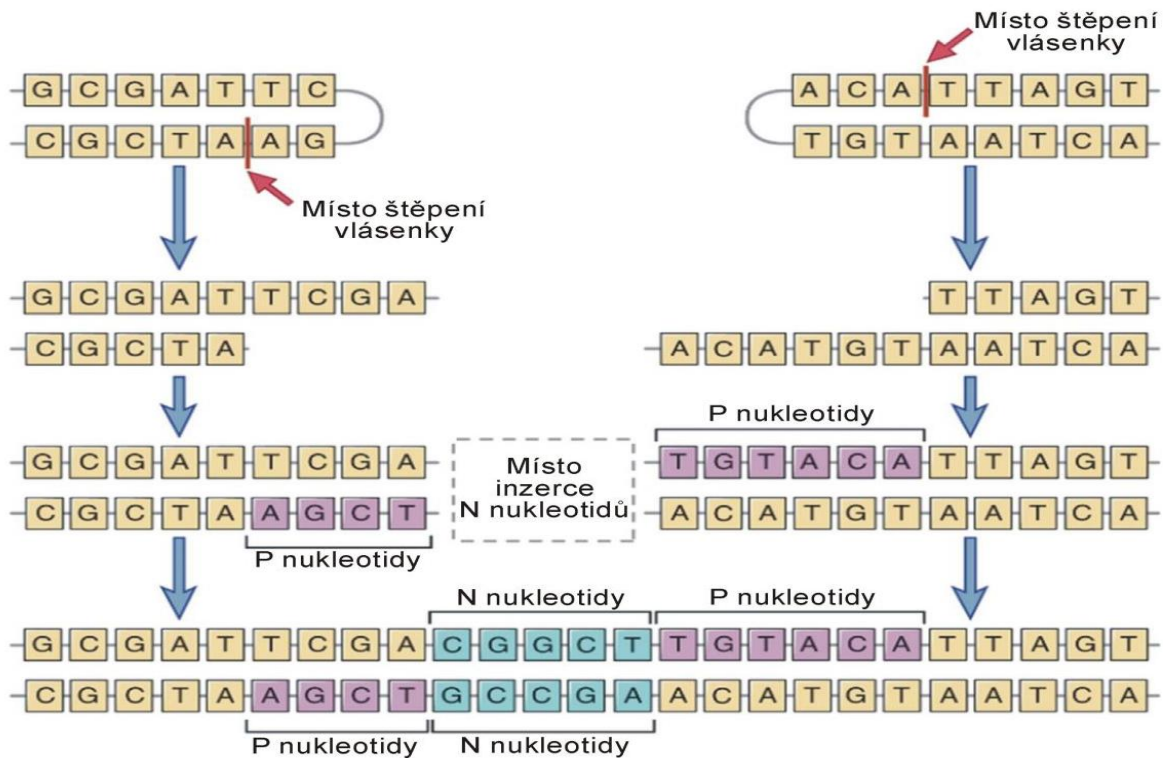
3. Otevření vlásenky a zpracování konců

Na rozdíl od precizních signálních spojů je tvorba kódujících spojů nepřesná. Volné komplementární konce řetězců přeskupujících se genových segmentů, které vznikly asymetrickým štěpením vlásenky endonukleázou Artemis (Bassing a kol., 2002; Ma a kol., 2002), jsou různě dlouhé. Po zaplnění tzv. P-nukleotidy (z angl. palindromic) a ligaci tvoří palindromatické oblasti (Chu, 1997). Konce DNA jsou následně modifikovány odštěpením různého počtu nukleotidů exonukleázou a přidáním náhodné sekvence až šesti N-nukleotidů (z angl. nontemplated), jejichž inserce do kódujících spojů (N-oblastí) je katalyzována enzymem TdT (terminální deoxynukleotidyl-transferáza) (Chu, 1997; Bassing a kol., 2002). TdT je exprimována pouze v lymfatické tkáni v lymfocytech, ve kterých probíhá přeskupování subgenů. Náhodné zařazování N-nukleotidů přispívá k variabilitě kódujících spojů a diverzifikaci antigenních receptorů během V(D)J rekombinace (Boulé a kol., 2001). Inserce P- a N-nukleotidů (obr. 5) však může mít za následek i přerušení čtecího rámce, např. vytvořením terminačního kodónu, čímž se přeskupování genových segmentů stává neproduktivním (Abbas a kol., 2012).

4. Spojování

DSBs vzniklé během V(D)J rekombinace (signální i kódující konce) jsou opraveny pomocí nehomologního spojování konců (NHEJ, z angl. nonhomologous end-joining). Tato dráha je hlavním reparačním mechanismem opravy DSBs v savcích buňkách (Chu, 1997; Karran, 2000). NHEJ probíhá přímým spojením zlomů DNA bez překrytí, příp. s minimálním překrytím, bez přítomnosti homologie mezi dvěma rekombinantními molekulami DNA (Labhart, 1999).

Proces NHEJ sestává ze tří základních kroků - rozpoznání zlomu, odstranění nekompatibilních struktur, které by mohly bránit navázání proteinů, a vlastní spojení konců DNA. V savcích buňkách se jej účastní sedm hlavních proteinů, mezi nimi i protein Artemis s endonukleázovou aktivitou (viz výše). Výhodou NHEJ je rychlost a operativnost, nevýhodou pak nepřesnost při ligaci, která může vést ke ztrátě genetické informace nukleolytickým štěpením a v konečném důsledku k defektům, které jsou spojeny s radiosenzitivitou, predispozicí k výskytu malignit a imunodeficientním syndromům (Labhart, 1999; Karran, 2000).



Obr. 5: Inzerce P- a N-nukleotidů v průběhu V(D)J rekombinace (převzato a upraveno dle Abbas a kol., 2012)

1.1.1.2 Regulace V(D)J rekombinace

V(D)J rekombinace je kontrolována několika způsoby. Jedná se o specifický proces, ke kterému dochází pouze u buněk lymfoidní linie, tzn. pouze ve vyvíjejících se B a T lymfocytech (Bassing a kol., 2002). Proces je vývojově specifický, probíhá tedy pouze v určitých fázích lymfocytární diferenciace. Přeskupení genových segmentů a sestavování funkčních genů probíhá podle určité hierarchie, kdy např. přeskupení *TRB* předchází přeskupení *TRA* (Bassing a kol., 2002). A konečně alelická exkluze při přestavbě *TRB* a *TRG* subgenů zajišťuje, že jeden T lymfocyt a z něj vzniklý klon exprimuje na svém povrchu pouze jeden typ daného řetězce TCR. Jde vlastně o regulaci zpětnou vazbou, kdy produktivní V(D)J přeskupení jedné alely inhibuje přeskupení alely druhé (Inlay a Xu, 2003). Vzácně k této alelické exkluzi nedochází u *TRA*. Nejsou tedy výjimkou T lymfocyty exprimující na svém povrchu dva rozdílné $\alpha\beta$ TCR, z nichž však pouze jeden je schopen vázat vlastní MHC a je tudíž funkční.

Na úrovni epigenetické je V(D)J rekombinace antigenních receptorů regulována rozdílnou dostupností příslušných genových lokusů pro V(D)J rekombinační komplex. Konfigurace chromatinu každého lokusu se zpočátku nachází v „uzavřeném“ stavu bránícím

vazbě V(D)J rekombinázy na RSS. V okamžiku, kdy lymfocyty dosáhnou odpovídajícího stupně vývoje, se chromatin stává přístupným procesu rekombinace (Inlay a Xu, 2003; Nakase a kol., 2003). Liniově a vývojově specifické alterace, remodelace a modifikace chromatinu zahrnují procesy demethylace DNA, acetylace a metylace histonů a změny senzitivity enzymu DNázy. V(D)J rekombinace tedy vyžaduje minimálně dvě rozdílné úrovně remodelace chromatinu. Kromě změny ve vysoce organizované struktuře chromatinu je nutná také přesná remodelace nukleozomů (Bolland a kol., 2004).

Jak již bylo zmíněno, *RAG* geny jsou exprimovány pouze v lymfoidních buňkách, ve kterých probíhá přeskupení genových segmentů antigenních receptorů, a tato exprese je během lymfocytární diferenciace vývojově regulována (Kitagawa a kol., 1996). Hladina exprese proteinových komplexů RAG-1 a RAG-2 se během různých fází sestavování TCR liší. Lymfocyty exprimují RAG aktivně v časných stádiích vývoje až do iniciační fáze přeskupení genových segmentů a následně se exprese během proliferace vypíná. Ukončením fáze buněčného dělení až do konečné fáze přeskupení genových segmentů se exprese RAG znovu obnovuje (obr. 6).

Lokus *TRD* je umístěn mezi segmenty *V α* a *J α* *TRA*, což v důsledku znamená, že při přeskupování segmentů pro α řetězec dojde k trvalému odstranění segmentů pro δ řetězec z genomu buňky. V jediném T lymfocytu nemůže tedy být současně exprimován $\alpha\beta$ TCR i $\gamma\delta$ TCR.

1.1.2 Diverzita T-buněčných receptorů

Kombinace různých genových segmentů při V(D)J rekombinaci je primárním zdrojem rozmanitosti TCR molekul (kombinační repertoár). Dále je tato různorodost navýšena delecí a/nebo náhodnou inzercí nukleotidů v N-oblastech kódujících spojů (obr. 5). Výsledkem je celkový repertoár T-buněčných receptorů. Neméně významným zdrojem rozmanitosti TCR je alelický polymorfismus *V β* segmentů (Abbas a kol., 2012) a možnost současně využívat více než jeden genový segment D v případě *TRD* lokusu (Girardi a kol., 2006; van Rhijn a kol., 2007).

Díky výše zmíněným procesům T lymfocyty každého jedince exprimují obrovské množství různých TCR a imunitní systém může reagovat na širokou škálu antigenů. Tato variabilita se ovšem neprojevuje u všech $\gamma\delta$ T lymfocytů (Kauffman a kol., 1996). U lidí a myši $\gamma\delta$ T lymfocyty i přes svůj potenciál k tvorbě velmi rozdílných receptorů většinou nesou tkáňově specifickou sadu *V γ* a *V δ* domén (Allison a kol., 2001).

1.1.3 Vývoj a diferenciacie T lymfocytů

Vývoj T lymfocytů je evolučně konzervovaný v rámci skupiny čelistnatců, s výjimkou vačnatců a žraloků (Flajnik a Kasahara, 2010; Hirano a kol., 2011).

Prekurzory T lymfocytů odvozené od společných lymfoidních prekurzorů jsou z fetální kostní dřeně dopraveny do brzlíku (lat. thymus), kde během procesu zrání proliferují, diferencují se a prochází tzv. pozitivní a negativní selekcí. Část $\gamma\delta$ T lymfocytů vyzrává mimo brzlík, ve fetálních játrech, ve střevním epitelu, v pokožce a ve slezině (McVay a kol., 1998; Przybylski a kol., 2000).

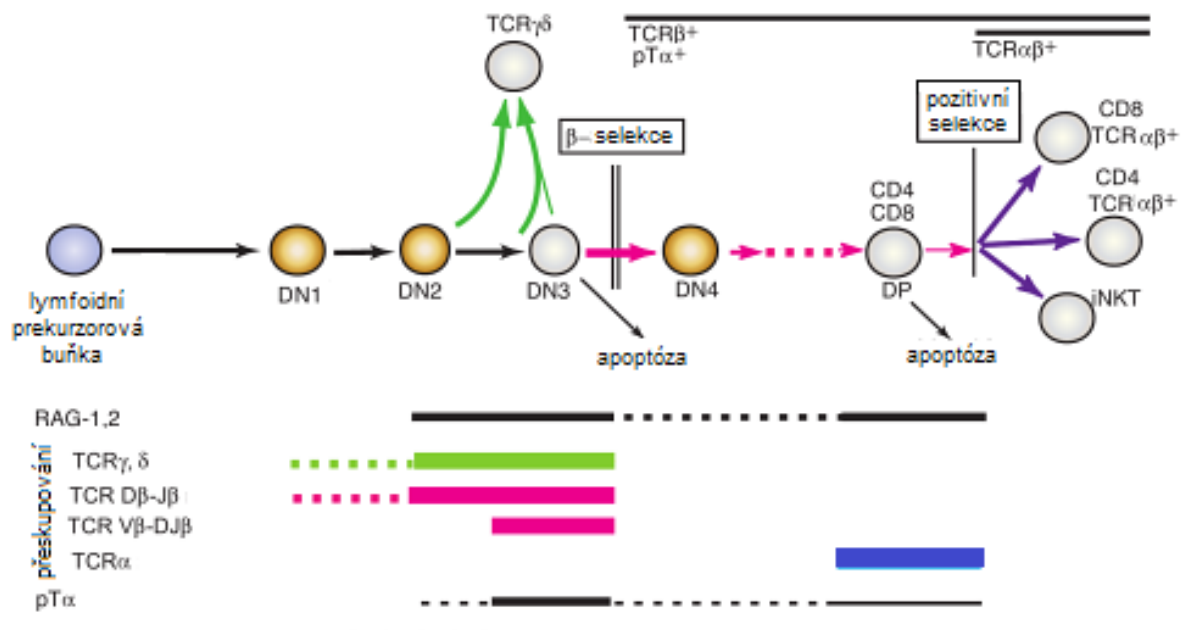
Proliferační aktivita raných lymfocytů ustává před procesem přeskupení antigenních receptorových genů. Ten probíhá bez závislosti na přítomnosti antigenu. Dále pak proliferují jen buňky, u kterých bylo úspěšné přeskupení β řetězce (β selekce) (obr. 6). Ostatní buňky nemohou přijímat signály nezbytné pro přežití a podstupují apoptózu (programovaná buněčná smrt). Pouze buňky s kompletním $\alpha\beta$ TCR následně prochází oběma selekčními procesy (obr. 6). Výsledkem pozitivní a negativní selekce je, že dozrávají pouze ty $\alpha\beta$ T lymfocyty, které jsou tolerantní k vlastním peptidům antigenní povahy a jsou schopné rozpoznat antigeny navázané na organizmu vlastní MHC molekuly.

Zrání T lymfocytů zahrnuje kromě přestavby genů pro TCR také expresi dalších povrchových molekul typických pro různé podskupiny T lymfocytů - molekuly CD4 a CD8. První čtyři stadia zrajících T lymfocytů neexprimují ani molekulu CD4 ani CD8, a jsou proto označovány jako dvojnásobně negativní (DN, $CD4^-CD8^-$). V těchto buňkách dochází nejdříve k přestavbě genů pro β , γ a δ řetězce TCR.

$\gamma\delta$ T lymfocyty jsou prvními vznikajícími T lymfocyty, neboť V(D)J rekombinace začíná přestavbou *TRD* subgenů a následuje rekombinace segmentů $V\gamma$ a $J\gamma$ (Przybylski a kol., 2003; Carding a Egan, 2002). Produktivní přeskupení *TRD* a *TRG* genových segmentů dává vzniknout $\gamma\delta$ TCR (obr. 6). Většina $\gamma\delta$ T lymfocytů jsou vlastně fenotypově nezralé dvojnásobně negativní buňky ($CD4^-CD8^-$) (Girardi a kol., 2006), ale malé množství zralých $\gamma\delta$ T lymfocytů exprimuje CD8 a ještě menší množství CD4 molekuly. Vývoj $\gamma\delta$ T lymfocytů vůbec nezahrnuje $CD4^+CD8^+$ přechodový stav (dvojnásobně pozitivní buňky, DP) (Allison, 1993). Rané stádium vývoje $\gamma\delta$ T lymfocytů je charakterizováno postupujícími vlnami různých $\gamma\delta$ podskupin, které se překrývají (Xiong a Raulet, 2007; Allison, 1993) a jsou charakteristické expresí určitých genových segmentů $V\gamma$ a $V\delta$ (Xiong a Raulet, 2007).

V případě $\alpha\beta$ TCR se po expresi přeskupeného *TRB* genu nově syntetizovaný β řetězec spáruje s invariantním pre-T α řetězcem a spolu s CD3 vytvoří dočasný receptor pre-TCR. To vede k další proliferaci a diferenciaci buněk, kdy je potlačena přestavba druhé alely *TRB* genu (alelická exkluze) a naopak dochází k přestavbě *TRA* genu. Zároveň lze pozorovat expresi molekul CD4 a CD8, buňky tedy označujeme jako dvojnásobně pozitivní (DP, CD4⁺CD8⁺). V tomto stádiu je exprimován také *TRA* gen (Anderson a kol., 2000). Teprve buňky s kompletním $\alpha\beta$ TCR, které projdou oběma selekčními procesy, zrají do stádia jednoduše pozitivních CD4⁺ nebo CD8⁺ (obr. 6).

Funkčně kompetentní zralé T lymfocyty opouštějí brzlík a migrují jako klidové buňky ve fázi G0 buněčného cyklu do periferní krve, sekundárních lymfoidních orgánů (slezina a lymfatické uzliny) a lymfy. Opakovanou cirkulací (recirkulací) těchto naivních T lymfocytů se zvyšuje pravděpodobnost kontaktu s buňkou prezentující antigen. $\gamma\delta$ T lymfocyty hojně osidlují kůži a sliznice.



Obr. 6: Schématické znázornění vývojových stadií T lymfocytů. DN1, DN2, DN4 – stádia extenzivní proliferace; DN3, DP, CD8/CD4⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺, TCR $\gamma\delta$ – stádia s nulovou nebo velmi nízkou proliferací; vyznačeno časování exprese RAG-1, RAG-2, pT α a jednotlivých přestaveb v rámci V(D)J rekombinace (převzato a upraveno dle Paul, 2012).

1.1.4 Chromozomová lokalizace TCR genů – mezidruhové srovnání

Vzhledem k umístění *TRD* lokusu uvnitř lokusu *TRA* zaujímají všechny čtyři TCR geny celkem tři různé chromozomové oblasti. Chromozomová lokalizace TCR genů u vybraných živočišných druhů je uvedena v tab. 2a), b), c). U většiny studovaných druhů (např. člověk, skot, ovce, kůň) se geny pro TCR nalézají na dvou chromozomech – *TRA/TRD* lokus zvlášť (u člověka na 14. chromozomu) a zbylé lokusy *TRB* a *TRG* na jiném chromozomu (u člověka *TRB* na dlouhém raménku 7. chromozomu a *TRG* na jeho krátkém raménku). U některých druhů (myš, potkan, prase, zebra Hartmannové) je však každý TCR gen lokalizován na jiném chromozomu, dohromady se tedy nachází na třech různých autozomech.

Tab. 2: Chromozomová lokalizace TCR genů u vybraných živočišných druhů

a) *TRA/TRD* lokus

Druh	Lokalizace	Velikost	Zdroj
Člověk (<i>Homo sapiens</i>)	14q11.2	1 Mb	HGNC, http://www.genenames.org ; IMGT, http://www.imgt.org
Myš (<i>Mus musculus</i>)	14C2 (19.7 cM)	1,6 Mb	Bosc a kol., 2005
Potkan (<i>Rattus norvegicus</i>)	15p13-14		IMGT, http://www.imgt.org
Prase (<i>Sus scrofa</i>)	7q15.3q21		Hiraiwa a kol., 2001
Skot (<i>Bos taurus</i>)	10q (prox*)	2,4 Mb	Reinink a van Rhijn, 2009; van Rhijn a kol., 2007
Ovce (<i>Ovis aries</i>)	7q14q22		Massari a kol., 1997
Kůň (<i>Equus caballus</i>)	1q		NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Osel (<i>Equus asinus</i>)	2q		Yang a kol., 2003; Musilova a kol., 2013
Zebra Grévyho (<i>Equus grevyi</i>)	2q		Yang a kol., 2003; Musilova a kol., 2013
Zebra stepní (<i>Equus burchelli</i>)	2q		Yang a kol., 2003; Musilova a kol., 2013
Zebra Hartmannové (<i>Equus zebra hartmannae</i>)	3q		Yang a kol., 2003; Musilova a kol., 2013

Tab. 2: Chromozomová lokalizace TCR genů u vybraných živočišných druhů (*pokračování*)

a) *TRA/TRD* lokus

Druh	Lokalizace	Velikost	Zdroj
Pes (<i>Canis familiaris</i>)	8		NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Kočka (<i>Felis catus</i>)	B3		NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov

b) *TRB* lokus

Druh	Lokalizace	Velikost	Zdroj
Člověk (<i>Homo sapiens</i>)	7q34	620 kb	HGNC, http://www.genenames.org ; IMGT, http://www.imgt.org
Myš (<i>Mus musculus</i>)	6B2 (20.5 cM)	700 kb	Bosc a kol., 2005
Potkan (<i>Rattus norvegicus</i>)	4q22		IMGT, http://www.imgt.org
Prase (<i>Sus scrofa</i>)	18q11.3q12		Hiraiwa a kol., 2001
Skot (<i>Bos taurus</i>)	4q34 (dist*)		Antonacci a kol., 2001
Ovce (<i>Ovis aries</i>)	4q34 (dist*)		Antonacci a kol., 2001
Kůň (<i>Equus caballus</i>)	4q		NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Osel (<i>Equus asinus</i>)	1q (dist*)		Yang a kol., 2003; Musilova a kol., 2013
Zebra Grévyho (<i>Equus grevyi</i>)	8q		Yang a kol., 2004; Musilova a kol., 2007
Zebra stepní (<i>Equus burchelli</i>)	8q		Yang a kol., 2004; Musilova a kol., 2007
Zebra Hartmannové (<i>Equus zebra hartmannae</i>)	1q		Yang a kol., 2003; Musilova a kol., 2013
Pes (<i>Canis familiaris</i>)	16		Lindblad-Toh a kol., 2005; Mineccia a kol., 2012
Kočka (<i>Felis catus</i>)	A2		Davis a kol., 2009; NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov

Tab. 2: Chromozomová lokalizace TCR genů u vybraných živočišných druhů (*pokračování*)

c) TRG lokus

Druh	Lokalizace	Velikost	Zdroj
Člověk (<i>Homo sapiens</i>)	7p14	160 kb	HGNC, http://www.genenames.org ; IMGT, http://www.imgt.org
Myš (<i>Mus musculus</i>)	13A3.1 (10 cM)	205 kb	Folch a kol., 2005
Potkan (<i>Rattus norvegicus</i>)	17q11		IMGT, http://www.imgt.org
Prase (<i>Sus scrofa</i>)	9q21q22		Hiraiwa a kol., 2001
Skot (<i>Bos taurus</i>)	TRG1: 4q31 (int*) TRG2: 4q22 (prox*)	250 kb 190 kb	Reinink a van Rhijn, 2009; Antonacci a kol., 2007
Ovce (<i>Ovis aries</i>)	TRG1: 4q31 (int*) TRG2: 4q22 (prox*)	150 kb 90 kb	Vaccarelli a kol., 2005; Miccoli a kol., 2003
Kůň (<i>Equus caballus</i>)	4p15p14		Lear a kol., 2001
Osel (<i>Equus asinus</i>)	1q (prox*)		Yang a kol., 2004; Musilova a kol., 2013
Zebra Grévyho (<i>Equus grevyi</i>)	8p		Yang a kol., 2004; Musilova a kol., 2007
Zebra stepní (<i>Equus burchelli</i>)	8p		Yang a kol., 2004; Musilova a kol., 2007
Zebra Hartmannové (<i>Equus zebra hartmannae</i>)	4p		Yang a kol., 2003; Musilova a kol., 2013
Pes (<i>Canis. familiaris</i>)	18		Massari a kol., 2009; IMGT, http://www.imgt.org
Kočka (<i>Felis catus</i>)	A2		Weiss a kol., 2008; NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Velbloud jednohrbý (<i>Camelus dromedarius</i>)	7q11-12		Vaccarelli a kol., 2012

* poloha vzhledem k centromere – dist = distální, int = intersticiální, prox = proximální

U skotu a ovcí se vyskytují dva *TRG* lokusy označované jako *TRG1* a *TRG2*. Oba jsou lokalizovány na stejném autozomu, *TRG2* proximálněji vzhledem k centromere. *TRG1* lokus vykazuje syntenii s lidským *TRG* lokusem, zatímco *TRG2* vznikl duplikací a je specifický pouze pro tyto dva zástupce čeledi turovitých (*Bovidae*) (Reinink a van Rhijn, 2009; Antonacci a kol., 2007; Vaccarelli a kol., 2008; Miccoli a kol., 2003).

1.1.5 Genomová organizace TCR genů

Zárodečná organizace TCR genů v rámci genomu je evolučně poměrně konzervovaná (Guo a kol., 2009; Hirano a kol., 2013; Boehm a Swann, 2014). Charakteristická je prostorová segregace mnohočetných sekvencí, kódujících variabilní a konstantní domény receptorových polypeptidových řetězců. Zárodečné uspořádání TCR lokusů se vyskytuje ve všech buněčných typech, ale funkční antigenní receptory se tvoří pouze ve vyvíjejících se lymfocytech po procesu V(D)J rekombinace.

Dosud bylo identifikováno velké množství genových segmentů kódujících variabilní a konstantní oblast TCR řetězců u různých živočišných druhů. Jejich přehled najdeme v mezinárodní genomové databázi genů pro TCR a imunoglobuliny IMGT (ImMunoGeneTics database, <http://www.imgt.org>), která byla vyvinuta za účelem klasifikace těchto genů a organizace znalostí o nich (Giudicelli a kol., 2006; Lefranc, 2014). Názvosloví TCR genů v IMGT databázi bylo schváleno také komisí HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) (Wain a kol., 2002).

Ne všechny identifikované genové segmenty V, D a J jsou funkční. Některé z nich mají sice otevřený čtecí rámec, ale obsahují změny v místech sestřihu, rekombinačních signálních sekvencích či regulačních elementech. Dále se zde vyskytují pseudogeny. U části dokonce nebylo zatím rozhodnuto, zda se jedná o funkční segmenty, pseudogeny či otevřené čtecí rámce (Arden a kol., 1995; Giudicelli a kol., 2006).

Každý TCR lokus obsahuje dva a více segmentů C. V rámci *TRA/TRD* lokusu se nachází jeden segment C pro α řetězec a jeden segment C pro δ řetězec. V *TRB* lokusu najdeme dva identické *TRBC* geny. Počet *TRGC* genů u studovaných domestikovaných savčích druhů je poměrně vysoký (např. osm segmentů *TRGC* u psa), zatímco u člověka jsou pouze dva (Tizard, 2012).

Počet a uspořádání genových segmentů se liší v jednotlivých lokusech i mezidruhově (tab. 3). Např. u psa se v místě *TRG* lokusu nalézá osm genových kazet, každá obsahující základní V-J-J-C jednotku (s výjimkou J-J-C kazety na 3' konci) (Massari a kol., 2009),

podobně u skotu (Herzig a kol., 2006; Conrad a kol., 2007) a ovcí (Miccoli a kol., 2003; Vaccarelli a kol., 2005, 2008) multiplikací genových segmentů vzniklo šest V-J-C kazet, u člověka však najdeme v *TRG* po segmentech V pouze dvě J-C oblasti (Lefranc a Rabbitts, 1991; Giudicelli a kol., 2005). *TRB* lokus je obecně organizován tak, že po klastru segmentů V následují dvě (v případě prasete tři) téměř identické D-J-C kazety obsahující několik funkčních segmentů J. Segmenty D jsou si velmi podobné délkou i sekvencí. *TRBV* segmenty mohou být během V(D)J rekombinace spojeny s kteroukoliv genovou kazetou, a to buď přes segment D, nebo segment J (segmenty D nemusí být využity) (Tizard, 2012).

Organizace genových segmentů v TCR lokusech úzce souvisí s mírou diverzity T-buněčných receptorů. U přežvýkavců tak nacházíme mnohem širší repertoár $\gamma\delta$ TCR v porovnání s lidmi a myši, neboť počet variabilních segmentů v *TRD* lokusu daleko přesahuje jejich počet u lidí a myši (tab. 3). U skotu byla navíc publikována možnost využití až čtyř segmentů D v rámci jediného δ řetězce (van Rhijn a kol., 2007).

Tab. 3: Počet genových segmentů v rámci TCR lokusů u vybraných živočišných druhů (převzato a upraveno dle Tizard, 2012)

Druh	TRA			TRB				TRG			TRD			
	V	J	C	V	D	J	C	V	J	C	V	D	J	C
Člověk (<i>Homo sapiens</i>)	54 ^a	60	1	88	2	14	2	15	5	2	8 ^a	3	4	1
Myš (<i>Mus musculus</i>)	100	61	1	52	2	13	2	7	4	4	10	2	2	1
Prase (<i>Sus scrofa</i>)	33	61	1	10	3	21	3			6	31	6	10	1
Skot (<i>Bos taurus</i>)	> 300	52	1	134	3	21	3	17	8	6	> 100	5 ^b	5	1
Ovce (<i>Ovis aries</i>)	4			120	3	18	3	13	13	5	> 40 ^b			
Kůň (<i>Equus caballus</i>)	5	5	1	16	1	14	2				8		3	
Pes (<i>Canis familiaris</i>)				38	1	6	1	16	16	8				
Kočka (<i>Felis catus</i>)								4	8	6				
Kuře (<i>Gallus gallus</i>) ^c	20			3	1	4		26	3		30	2	2	

^a z toho 5 společných TRAV/DV

^b opraveno dle Guzman a kol., 2012

^c převzato z Holderness a kol., 2013

1.2 Chromozomové abnormality (chromozomové aberace)

Chromozomové abnormality (CHA) představují odchylku od normálního karyotypu daného druhu. Jedná se buď o atypický počet chromozomů na genomové úrovni (numerické CHA) nebo o strukturní abnormality jednoho nebo více chromozomů v buňce. Existuje velký počet typů chromozomových poruch, které mají různě závažný klinický význam. Některé CHA se u svého nositele nemusí ani projevit nebo mají vliv pouze na jeho reprodukci. Na druhou stranu řada chromozomálních odchylek není slučitelná se životem nebo způsobuje závažné onemocnění. V nádorově transformovaných buňkách nalzáme komplexní (numerické i strukturní) a mnohočetné chromozomální změny. CHA ve většině případů vznikají jako důsledek chybného buněčného dělení – meiózy nebo mitózy. Aberace chromozomů jsou považovány za projev časného genotoxického účinku, jejich zvýšená hladina v periferních lymfocytech jedince je určitým prediktorem (biomarkerem) rizika nádorového onemocnění, které je projevem pozdního genotoxického účinku.

Dle jejich původu rozlišujeme CHA vrozené a získané:

- **Vrozené (gametické) CHA** – přítomné ve všech buňkách těla (i v zárodečných buňkách) a mohou se tedy přenášet na potomky. Některé vrozené CHA mohou být primární příčinou malignity (např. translokace vedoucí k fúzním genům u chronické myeloidní leukemie nebo translokace vedoucí k nadměrné transkripci onkogenu v nové pozici, např. u Burkittova lymfomu).
- **Získané (somatické) CHA** – vznikají v průběhu života jedince a to pouze v některých buňkách, nikdy však v gametách, nepřenáší se tedy na potomky. Typickým příkladem jsou zlomy a přestavby, které najdeme v malém procentu buněk při vyšetřování chromozomů periferních lymfocytů, nebo chromozomální přestavby v nádorových buňkách.

1.2.1 Numerické chromozomové aberace

Numerické CHA zahrnují případy, kdy struktura chromozomů je neporušená, ale patologicky se uplatňuje abnormální množství genetického materiálu v buňce. Nerovnoměrná exprese několika stovek až tisíce genů vede k výraznému dopadu na fenotyp jedince.

Numerické změny vznikají často v důsledku chyby při rozchodu chromozomů do dceřiných buněk během buněčného dělení (nondisjunkce) nebo opožděním chromozomu při

rozchodu v anafázi buněčného dělení (nejčastěji v meióze), dále při fertilizaci nebo výše uvedenými chybami v časně embryogenezi.

Rozlišujeme aneuploidie, kdy v karyotypu daného druhu jeden nebo více chromozomů chybí (nulizomie, monozomie) nebo naopak přebývá (trizomie, tetrazomie). Pokud je znásobena celá chromozomová sada, nazývá se tato aberace polyploidií (triploidie, tetraploidie).

1.2.2 Strukturní chromozomové aberace (chromozomové přestavby)

Strukturní abnormality chromozomů jsou následkem zlomů v dvoušroubovici DNA, po kterých následuje napojení na nepůvodní místo, případně ztráta části chromozomu. Dochází tedy ke změně polohy a počtu genů. Široké spektrum a velký počet strukturních CHA nalzáme zejména v buňkách solidních nádorů a hematologických malignit, kde jsou důsledkem chybně fungujících kontrolních mechanismů buněčného dělení, což je typické právě pro nádorové buňky.

1.2.2.1 Dvouvláknové zlomy DNA (DSBs)

Chromozomové přestavby vznikají spontánně (endogenní příčina) anebo působením fyzikálních, chemických nebo biologických mutagenů (obecně klastogenů). Podstatou je chromozomální nestabilita projevující se vznikem dvouvláknových zlomů (DSBs, z angl. double strand breaks) nebo zhoršená funkce reparačních mechanismů.

Endogenně vznikají zlomy v DNA v signifikantních frekvencích v průběhu přirozených buněčných procesů - působením topoizomeráz, během oxidativního metabolismu, v průběhu DNA replikace, reparace DNA, DNA rekombinace (crossing-over v meióze) a při somatické V(D)J rekombinaci imunoglobulinových genů a genů pro TCR. Mezi exogenní faktory s klastogenními účinky patří ionizující záření, UV záření, volné kyslíkové radikály, alkylační látky, analogy bází, alkyl epoxidy, aromatické aminy, nitrozosloučeniny, těžké kovy nebo restriční endonukleázy. DSBs mohou být indukovány přímo (např. působením ionizujícího záření) nebo nepřímo, kdy primární poškození DNA (alkylace, hydroxylace nebo jiné alterace bází) je enzymatickou reparací transformováno v jednovláknové zlomy a poté ve zlomy dvouvláknové.

Frekvence vzniku DSBs je v porovnání s ostatními typy poškození jaderné DNA (jednořetězcový zlom DNA, oxidační léze, depurinace, alkylace, deaminace báze) velmi

nízká. Narozdíl od všech ostatních typů poškození DNA však buňka nemá pro opravu k dispozici templát v podobě nepoškozeného vlákna DNA. Z tohoto důvodu jsou DSBs silnými induktory mutací s vysokým cytotoxickým účinkem (Vilenchik a Knudson, 2003). Bylo experimentálně prokázáno, že i jediný DSB může způsobit zánik celé buňky (Khanna a Jackson, 2001).

DSBs jsou v eukaryotických buňkách opravovány dvojím způsobem. Prvním z nich je homologní rekombinace, která vyžaduje přítomnost homologních sekvencí, tj. sesterské chromatidy v případě mitózy (probíhá tedy v S fázi nebo G2 fázi mitotického buněčného cyklu) nebo přítomnost homologního chromozomu v případě meiotické rekombinace. Oproti tomu nehomologní spojování zlomených konců (NHEJ, z angl. non-homologous end joining) probíhá hlavně v G0 a G1 fázích buněčného cyklu, tj. bez přítomnosti homologního templátu, i když může probíhat ve všech fázích buněčného cyklu. NHEJ hraje zásadní roli v průběhu V(D)J rekombinace imunoglobulinových genů a genů pro T-buněčné receptory (Jung a Alt, 2004) a během izotypového přesmyku. Tento druhý způsob reparace zlomů je náchylnější k chybám, protože využívá krátkých homologií v blízkosti zlomených konců chromozomů a zahrnuje úpravu zlomených konců, která může vést k delecím nebo inzercím nukleotidů v místě zlomů při jejich spojování. Oba způsoby reparace DSBs – homologní rekombinace i NHEJ mohou vést jak k jejich bezchybné eliminaci, tak i ke vzniku bodových mutací a chromozomálních aberací v případě neopraveného nebo chybně opraveného poškození DNA.

1.2.2.2 Typy chromozomových přestaveb

Rozlišujeme strukturní CHA intrachromozomové (obr. 7a), které postihují pouze jeden chromozom, a interchromozomové, tedy ty které postihují dva i více chromozomů (obr. 7b). Buňky nesoucí nestabilní CHA (např. dicentrický chromozom, ring chromozom) nepřežívají opakovaná buněčná dělení, stabilní CHA se buněčným dělením uchovávají (balancované aberace, ale i některé nebalancované CHA) (Lobo, 2008).

Strukturní CHA dále dělíme na balancované, kdy je zachováno původní množství genetického materiálu, a nebalancované, kdy část genetického materiálu chybí či přebývá. Ve druhém případě dochází u nositele k fenotypovým projevům, jejichž závažnost závisí na tom, jak velký úsek a která část genomu je zasažena. Jedinci postižení balancovanou

strukturní aberací jsou obvykle bez klinických příznaků, ale hrozí riziko pro potomstvo, které může zdědit přestavbu v nebalancované podobě.

1. Nebalancované strukturní změny na chromozomech zahrnují:

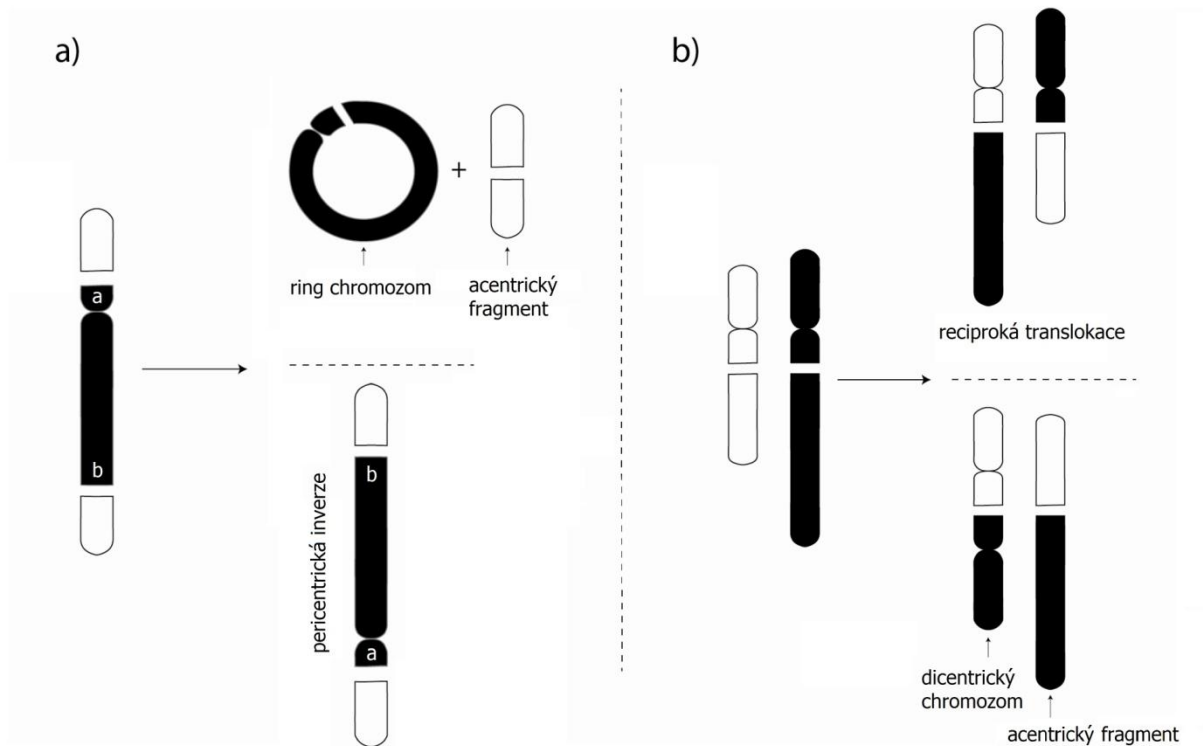
- Delece (částečná monozomie) – chybění části chromozomu, jehož důsledkem je tvorba nedostatečného množství genového produktu (haploinsuficience) nebo porušení genomického imprintingu. Rozlišujeme delecii terminální (delece koncové části raménka) a intersticiální (chybí střední část raménka).
- Duplikace (částečná trizomie) – zdvojení části chromozomu (celého chromozomového raménka nebo jeho části), které vede k porušení rovnováhy genové exprese
- Izochromozom – chromozom se po ztrátě svých ramen skládá pouze z krátkých nebo dlouhých ramének spojených v centromere (má duplikované jedno rameno, zatímco druhé je deletované)
- Dicentrický chromozom (obr. 7b) – důsledek zlomů dvou chromozomů a fúzí těchto chromozomů zlomenými konci, takže výsledný abnormální chromozom má dvě centromery (v případě vrozené CHA je jedna z centromer inaktivní a chromozom se chová jako monocentrický a může tedy projít opakovaně buněčným dělením)
- Ring chromozom (prstencový, kruhový chromozom) (obr. 7a) – po delecii konců obou ramének se zlomené konce navzájem spojí, přičemž dochází ke ztrátě distálních částí obou ramen
- Marker chromozom – malý nadpočetný chromozom, jehož původ je různý - může to být reciproký produkt robertsonské translokace (viz dále) tvořený oblastmi krátkých ramen akrocentrů, izochromozom tvořený krátkými rameny malého chromozomu (např. lidský chromozom 18) nebo pericentromerická oblast nějakého chromozomu apod.

2. Mezi balancované strukturní aberace patří:

- Translokace – část chromozomu je přemístěna na jiný chromozom. Dále rozlišujeme translokaci reciprokou, kdy se zlomené části dvou nehomologních chromozomů navzájem vymění (obr. 7b), a translokaci robertsonskou, kdy dojde ke spojení (fúzi) dvou akrocentrických chromozomů v místě centromer a přitom oba ztrácejí svá krátká raménka.
- Inverze – dvěma zlomy na stejném chromozomu vzniká volný chromozomový segment, který se zpět napojí v opačné orientaci. Inverze paracentrická nezahrnuje centromeru

a vzniká v rámci jednoho chromozomového raménka a inverze pericentrická vzniká otočením segmentu, ve kterém se nachází centromera (obr. 7a).

- Inzerce – vzácnější typ strukturní CHA, kdy je úsek chromozomu vyštěpen a vložen do jiného chromozomu.



Obr. 7: Vybrané typy strukturních chromozomových aberací (a) intrachromozomových (ring chromozom, pericentrická inverze) a (b) interchromozomových (reciproká translokace, dicentrický chromozom). Převzato a upraveno dle Robertson a kol., 2013.

1.2.2.3 Chromozomové přestavby s místy zlomů v TCR genech

Vysoce regulovaný proces V(D)J rekombinace není vždy přesný. Tato chybovost je na jednu stranu přínosná, protože v případě vzniku funkčního hybridního genu zvyšuje variabilitu TCR a tím i diverzitu imunitní odpovědi (Davodeau a kol., 1994; Hinz a kol., 2000). Na druhou stranu je však v případě nelegitimních rekombinací příčinou vzniku chromozomových přestaveb, především reciprokových translokací a inverzí (Hecht a kol., 1987; Kirsch, 1994).

Tyto přestavby mohou na molekulární úrovni vyústit v juxtapozici onkogenů do blízkosti regulačních sekvencí pro TCR geny, jak můžeme vidět u některých T lymfocytárních malignit (Boehm a Rabbitts, 1989; Korsmeyer 1992). V důsledku V(D)J rekombinace se promotory lokalizované na 5' konci subgenů V dostávají do blízkosti zesilovačů v intronech segmentů J a C, případně na 3' konci oblasti C, čímž dojde k navýšení transkripční aktivity promotorů genových segmentů V. Geny z jiných lokusů, které jsou abnormálně translokovány do těchto míst, jsou následně aberantně transkribovány.

1. Lymfoproliferativní onemocnění

Lymfocytární neoplazie bývají často spojovány s interchromozomálními nebo intrachromozomálními přestavbami v TCR lokusech a v lokusech pro imunoglobulin (Ig). Nejčastěji se body zlomu nacházejí v *TRA/TRD*, což může být způsobeno tím, že v průběhu celého procesu V(D)J rekombinace během maturace T lymfocytů musí být tento lokus přístupný nejdéle – *TRD* je přeskupován v průběhu ontogeneze T lymfocytu jako první, zatímco *TRA* až jako poslední. Také svou velikostí (asi 1 Mb u člověka) *TRA/TRD* představuje významný cíl pro vznik translokace (Paul, 2012).

TRA/TRD je u člověka lokalizován na stejném chromozomu jako *IGH* lokus pro těžký řetězec imunoglobulinu a v některých případech lymfocytárních malignit bývá uváděna jejich vzájemná přestavba [*inv*(14)(q11.2;q32) nebo *t*(14;14)(q11.2;q32)]. Zpřesněním diagnostických metod se však ukázalo, že maligní transformaci způsobuje spíše onkogen lokalizovaný v blízkosti *IGH* lokusu (Przybylski a kol., 2005; Boyer, 2001).

Poměrně často se u lidí vyskytuje translokace mezi chromozomy 8 a 14 [*t*(8;14)(q24;q11)], kdy dochází k připojení protoonkogenu *c-MYC* k *TRA/TRD* (Lundin a kol., 2013; Parolini a kol., 2014). Tato přestavba je analogická k *IGH* → *c-MYC* translokaci, která je spojena s řadou myších myelomů a s Burkittovým lymfomem u lidí (Paul, 2012). Zdá se, že tyto přestavby zahrnující gen *c-MYC* zvyšují jeho expresi a jsou tedy hlavní příčinou nekontrolovatelného buněčného růstu charakteristického pro nádorové buňky (Smith a kol., 2010; Ott a kol., 2013).

Mezi další protoonkogeny, které nacházíme v translokacích s *TRA* nebo *TRB*, patří např. transkripční faktory *TTG-1* a *TTG-2* zúčastněné ve vývoji nervové tkáně, *LYL-1* a *SCL* významné v časně hematopoéze a homeoboxový gen *HOX11* (Paul a kol., 2012).

Leukémie spojená s infekcí lidským T-buněčným lymfotropním virem typu 1 (angl. human T-cell lymphotropic virus, HTLV-1) bývá provázána také zvýšeným výskytem

translokací s místy zlomů v TCR (Sawadikosol a kol., 1993). Předpokládá se, že virus samotný není leukemogenní, ale přispívá ke vzniku aberantních přestaveb v infikovaných T lymfocytech (Satou a Matsuoka, 2012).

2. Syndromy chromozomální nestability

Další skupinou onemocnění, pro kterou je typický nález translokací s místy zlomů v genech pro TCR a s tím spojené zvýšené riziko výskytu lymfocytárních malignit, jsou syndromy chromozomální nestability (Hecht a Hecht, 1990; Peterson a kol., 1992), jmenovitě ataxie-telangiectazie a Nijmegenský syndrom lomivosti. Jedná se o autozomálně recesivně dědičná onemocnění, jejichž podstatou je porucha reparace dvouvláknových zlomů DNA (DSBs).

Patří sem především ataxie-telangiectazie (AT, Louis-Barové syndrom). Jedná se o raritní onemocnění s celosvětovou prevalencí 1:40 000 až 1:100 000 (Shiloh a Kastan, 2001; Swift a kol., 1986). Postižený jedinec je nositelem monogenní mutace genu *ATM* (z angl. ataxia telangiectasia mutated). Produkt tohoto genu - DNA-dependentní protein kináza se uplatňuje při vyhledávání DSBs. Po jejich rozpoznání a aktivaci spouští signální dráhu vedoucí k opravným mechanismům a zástavě buněčného cyklu v kontrolních bodech (Mitui a kol., 2009). Mutovaný protein je kratší a inaktivovaný. Tato choroba je charakteristická příznaky jako cerebelární ataxie (porucha koordinace pohybů v důsledku narušené migrace Purkyňových buněk v mozečku a jejich degenerace), vaskulární telangiectazie (rozšíření koncových cév viditelné především na spojivce a ušních boltcích), sterilita a imunodeficience, dále již zmíněným zvýšeným výskytem neoplazií - hl. T-buněčných leukémií a B-buněčných lymfomů (Reiman a kol., 2011) a zvýšenou citlivostí k ionizujícímu záření (radiosenzitivita). Nástup klinických příznaků je poměrně časný, kolem 3 let věku (i dříve). V lymfocytech periferní krve bývají nacházeny hlavně translokace a inverze zahrnující chromozomy 7 a 14 (Kojis a kol. 1991; Kobayashi a kol., 1991), s místy zlomů v lokusech *TRA/TRD*, *TRB*, *TRG* a *IGH*.

Nijmegenský syndrom lomivosti (NBS, z angl. Nijmegen breakage syndrome) (Taalman a kol., 1989) se vyskytuje především u slovanského obyvatelstva Evropy – prevalence nejčastěji detekované mutace v genu *NBN* v populaci České republiky, Polska a Ukrajiny se udává 1:177 (Varon a kol., 2000). Mezi jeho klinické projevy patří vrozená mikrocefalie, mentální retardace, poruchy imunity, vysoké riziko malignit, jako je akutní lymfatická leukémie (ALL), lymfomy, nádory mozku, gonadoblastomy, aj. Kauzální mutace

se vyskytuje v genu *NBN*, který kóduje protein nibrin NBS1). NBS1 je součástí proteinového MRN komplexu (proteiny MRE11, RAD50 a NBS1), který je v lidských buňkách součástí reparačních systémů DSBs. Po navázání do místa zlomu se komplex účastní i aktivace ATM. V rámci laboratorní diagnostiky jsou při cytogenetickém vyšetření lymfocytů periferní krve nalézány ve velké míře chromozomové přestavby s místy zlomů v TCR lokusech a v lokusu pro IgH a další strukturální aberace jako např. chromozomové a chromatidové zlomy, acentrické fragmenty (Chrzanowska a kol., 2012).

3. Biomarker genotoxicity a rizika vzniku lymfomu

Ilegitimní přestavby v genech pro TCR bývají ve velmi malém množství zastoupeny také v periferních lymfocytech zdravých jedinců. Frekvence jejich výskytu u lidí byly publikovány s využitím údajů z rutinních cytogenetických vyšetření G-pruhováním (Hecht a kol., 1987; Prieur a kol., 1988; Tawn, 1988) a ve studiích využívajících polymerázové řetězové reakce u lidí a myši (Tycko a kol., 1989; Lipkowitz a kol., 1990; Kobayashi a kol., 1991; Lista a kol., 1997). Zvýšený výskyt nelegitimních rekombinací mezi TCR geny byl ve studii publikované Lipkowitzem a kol. (1992) pozorován u farmářů v souvislosti s expozicí pesticidům. Také onkologičtí pacienti podstupující chemoterapii vykazovali zvýšenou míru těchto přestaveb (Abdallah a kol., 1995; Lopes a kol., 2001). Efekt chemoterapie byl však pouze přechodný a studie u pediatrických pacientů ukázala, že je tento jev omezen pouze na skupinu pacientů homozygotních pro normální variantu *CYP3A4* (cytochrom P450 3A4) (Lopes a kol., 2004).

Z výsledků studií vyplývá, že absolutní počet těchto chromozomových přestaveb v lymfocytech periferní krve může sloužit jako biomarker genomové instability, expozice genotoxickým látkám a rizika vzniku lymfomů (Lipkowitz a kol., 1992; Lista a kol., 1997; Kirsch, 1997; Allam a Kabelitz, 2006).

1.3 Metody detekce chromozomových přestaveb v periferních lymfocytech

1.3.1 Cytogenetické metody

Strukturální chromozomové aberace mohou být detekovány klasickými cytogenetickými metodami (pruhovací techniky) nebo některou z metod molekulární

cytogenetiky, která díky poznatkům molekulární biologie, mikroskopie a analýzy obrazu umožňuje diagnostikovat i abnormality těžko rozpoznatelné pomocí klasických cytogenetických metod. Molekulárně cytogenetické metody mají tedy vyšší rozlišení (detekují i submikroskopické změny).

1.3.1.1 Barvení chromozomů a karyotypizace

Karyotypizace mitotických preparátů patří mezi základní metodu klasické cytogenetiky. Zahrnuje kultivaci buněk, jejich následnou fixaci na podložní sklo a barvení (pruhování) chromozomů. Mitotické preparáty lze připravit z krevních vzorků a z tkáňových kultur s vysokým počtem dělicích se buněk. Karyotypizace je problematická u buněk, u nichž je dělení v podmínkách kultivace obtížné (např. buňky některých solidních nádorů, diferencovaných tkání apod.). Karyotypizací mitotických chromozomů získáme komplexní a poměrně přesnou informaci o numerických i strukturních chromozomových aberacích vyšetřovaných buněk.

Vyšetřované T lymfocyty mohou být nespecificky aktivovány k proliferaci látkami zvanými mitogeny. Mezi nejčastěji používané patří rostlinné lektiny phytohemaglutinin (PHA), pokeweed-mitogen (PWM) a concanavalin A (ConA).

Analýza získaných CHA v konvenčně barvených lymfocytech periferní krve se využívá jako metoda biologického monitorování genotoxických účinků faktorů prostředí (Komárek a kol., 2003). Některé chromozomové aberace jsou nestabilní a při opakovaném buněčném dělení se ztrácí (např. dicentrický chromozom, ring chromozom, fragmenty bez centromery), je tedy nezbytné získané chromozomální aberace vyšetřovat v prvních mitózách, tj. po 48h kultivace. Na klasicky obarvených preparátech je však obtížné rozpoznat reciproké translokace a inverze.

1.3.1.2 Fluorescenční *in situ* hybridizace

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) se řadí mezi molekulárně cytogenetické metody a intenzivně se rozvíjí od počátku 80. let 20. století. Pro svoji propracovanost a spolehlivost je hojně využívána. K hybridizaci dochází přímo ve vyšetřovaném biologickém materiálu, kterým mohou být histologické řezy nebo na mikroskopickém sklíčku fixovaný preparát chromozomů v interfázní nebo metafázní buňce. Při FISH se fluorescenčně značené sondy v podobě sekvence DNA nahybridizují k cílovým komplementárním sekvencím DNA

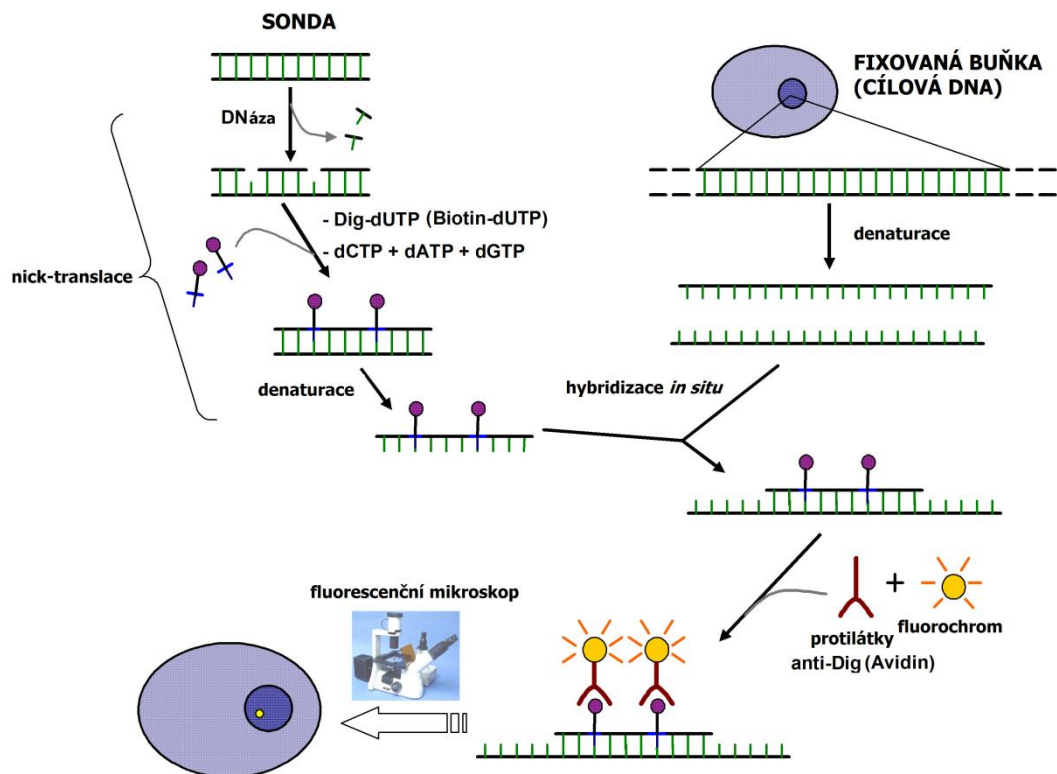
na chromozomu. Tyto cílové sekvence DNA se následně zviditelní ve fluorescenčním mikroskopu vybaveném fluorescenčními filtry, které odpovídají použitým fluoroforům.

Významným krokem při fluorescenční *in situ* hybridizaci je denaturace sondy a cílového místa. Obě denaturace mohou být provedeny společně nebo zvlášť. Působením vysoké teploty (72-75 °C) a chemických sloučenin (roztok formamidu, NaOH) dojde k porušení vodíkových vazeb mezi bázemi a oddělení řetězců DNA. Následným snížením teploty a inkubací při 37°C je umožněna hybridizace sondy a cílové DNA (obr. 8). Po hybridizaci je pro minimalizaci rušivého pozadí nutné odmyt nenavázané či nespecificky navázané sondy. Pro zvýraznění buněčných jader či chromozomů se používá nespecifické podbarvení (tzv. counterstaining) fluorescenčními barvivy (např. 4',6-Diamidine-2'-phenylindol dihydrochlorid, DAPI). Vyšetřované vzorky uchováváme v temnu, protože dochází k jejich vysvěcování (Pinkel a kol., 1986).

Většinou se používají dvě až tři fluorescenční sondy současně, přestože fluoroforů, kterými jsou sondy značené, je větší množství. Jejich emisní spektra se však často překrývají natolik, že by nebylo možné je rozlišit. Tento nedostatek lze do jisté míry řešit rehybridizací, kdy se již nahybridizované sondy odmyjí a vzorek se hybridizuje s dalšími sondami. Je ovšem třeba brát v potaz, že při každé další hybridizaci výrazně klesá kvalita vyšetřovaného biologického materiálu a tím i spolehlivost metody FISH. Kromě omezeného množství sond, které je možné současně použít, je další nevýhodou této metody obtížná automatizace práce a s tím spojená časová náročnost. Jisté omezení pro použití této metody spočívá také v maximálním možném rozlišení, které je v případě metafázních chromozomů 1-2 Mb. Na rozdíl od dalších zmíněných metod však umožňuje FISH zachytit také balancované přestavby (Nussbaum a kol., 2004), které by při použití jiných metod mohly uniknout pozornosti.

Zdrojem DNA pro přípravu sond mohou být klonované sekvence DNA inkorporované do vektorů (plazmidy, kosmidy, umělý bakteriální chromozom - BAC, umělý kvasinkový chromozom - YAC), somatické hybridní buňky, chromozomy získané průtokovou cytometrií (fluorescence-activated cell sorting, FACS) a mikrodisekce chromozomů či jejich součástí.

Pro amplifikaci DNA pro přípravu sond slouží klonování, metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) či některá z jejich modifikací – inter-Alu PCR, DOP-PCR (z angl. degenerate oligonucleotide-primed PCR).



Obr. 8: Schéma FISH s využitím nepřímo značené sondy (značení nick-translací). Převzato a upraveno z [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:FISH_\(Fluorescent_In_Situ_Hybridization\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:FISH_(Fluorescent_In_Situ_Hybridization).jpg).

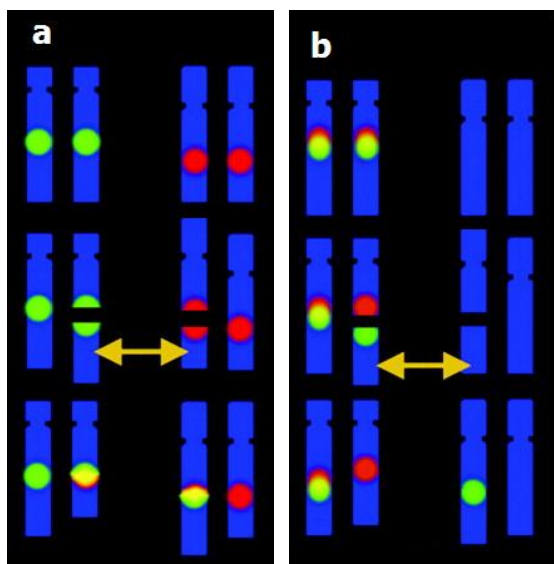
1. Typy DNA sond

Malovací sondy (celochromozomové sondy) hybridizují po celé délce chromozomu nebo jeho části (celá raménka i menší oblasti) v případě parciálních malovacích sond. Tyto sondy mohou být využity k detekci translokací a inverzí na metafázních chromozomech, nelze je však použít v interfázních jádrech, kde poskytují difuzní signál.

Sondy, které detekují repetitivní sekvence DNA (tandemové repeticce), nazýváme souhrnně satelitní sondy. Centromerické sondy obsahují repetitivní sekvence, které se vyskytují právě v centromerách, a telomerické sondy obsahují opakující se úseky DNA vyskytující se v telomerách.

Genově specifické sondy (lokus specifické sondy) jsou použitelné pro lokalizaci určitého genu na metafázních chromozomech nebo s jejich pomocí můžeme zjišťovat přítomnost či absenci daného genu v interfázních buňkách.

Pro vyšetření chromozomálních přestaveb lze využít translokační sondy, které sestávají ze dvou dceřiných sond, z nichž každá je označena jinou barvou (nejčastěji červená a zelená). V případě „break-apart“ sond (signál-segregační strategie) sondy generují v normálních buňkách signály, které jsou si velmi blízké co do velikosti a jsou kolokalizované (pozorujeme tedy dvě fúze v podobě žlutého fluorescenčního signálu). Po translokaci se signály rozejdou a výsledkem je jeden žlutý signál (příp. žádný), jeden červený a jeden zelený signál (příp. dva a dva od obou barev) (obr. 9b). Tato metoda má uplatnění v případech, kdy je znám pouze jeden bod zlomu (van der Burg a kol., 2004). Při použití „dual fusion“ sond získáme u normální buňky dva červené a dva zelené fluorescenční signály. U vzorku pozitivního na translokaci pak pozorujeme dva fúzní žluté signály a po jednom červeném a zeleném (obr. 9a).



Obr. 9: Schématické znázornění metafázních chromozomů nahybridizovaných (a) dvojicí translokačních sond typu „dual fusion“ a (b) „break-apart“ sondami. V horní části normální chromozomy, uprostřed a dole pozitivní nález v případě reciproké translokace. Pro zjednodušení zakreslen pouze jeden fluorescenční signál, ale ve skutečnosti pozorujeme signály dva – na každé chromatidě (převzato a upraveno dle Ventura a kol., 2006).

2. Značení sond

Při syntéze značených sond se do DNA sondy inkorporují chemicky modifikované nukleotidy (obr. 8). Jejich začlenění se obvykle provádí enzymaticky metodou nick-translace, metodou prodlužování primeru, *in vitro* transkripce, „random primed“ značením nebo pomocí polymerázové řetězové reakce.

Sondy mohou být značeny buď přímo inkorporací dUTP nesoucích molekulu fluorochromu (např. SpectrumOrange-dUTP, SpectrumGreen-dUTP), nebo se využívá nepřímé značení. Signál přímo značených sond lze ihned po hybridizaci pozorovat ve

fluorescenčním mikroskopu (přímá detekce). Působením záření o patřičné vlnové délce na preparát dojde k vybuzení molekul fluorescenční látky a jejich návrat na původní energetickou hladinu je doprovázen vyzářením fotonů světla neboli fluorescencí.

Při nepřímém značení se nejčastěji používá dUTP s kovalentně navázanou reportérovou molekulou biotinem nebo digoxigeninem. K jejich vizualizaci se následně využívá imunodetekce pomocí protilátky pro digoxigenin (anti-Dig) konjugované s fluorochromem nebo v případě biotinu pomocí jeho vazby s molekulou avidinu nebo streptavidinu, které jsou opět konjugované s fluorochromem (nepřímá detekce) (obr. 8). I když je použití přímo značených sond časově méně náročné, nepřímá detekce poskytuje výhodu v možné amplifikaci signálu a tím zesílení výsledného fluorescenčního signálu nad úroveň pozadí.

3. Modifikace metody FISH

V současné době existuje velké množství modifikací FISH. Nejčastěji se používá dvoubarevná FISH (D-FISH), při které je jedna sonda značena červeně a druhá zeleně.

Jednou z výhod FISH oproti karyotypování je její použitelnost i pro interfázní jádra buněk (interfázní FISH, I-FISH). Využití různých fluorochromů k současné detekci většího počtu sond – mnohobarevná FISH (M-FISH) (Nussbaum a kol., 2004) aplikovaná na interfázní buňky byla velmi významným krokem ve vývoji preimplantační a prenatalní genetické diagnostiky (vyšetření aneuploidií gamet a embryí).

Spektrální karyotypování (SKY) umožňuje podobně jako M-FISH jednoznačnou identifikaci všech chromozomů. Každý chromozom je obarven specifickou kombinací fluorescenčního spektra. Pouhým okem nerozeznatelný rozdíl barev vyhodnotí počítač na základě emisního spektra a přiřadí chromozomu pseudobarvu. Tato celogenomová zobrazovací metoda současně upozorňuje na chromozomové přestavby mezi chromozomy.

K rozlišení zlomových míst a intrachromozomových přestaveb (inverzí) slouží M-banding (modifikace metody M-FISH) za použití parciálních malovacích sond hybridizujících k jednotlivým oblastem chromozomů. Sondy se částečně překrývají a v místech překryvu dochází ke změně intenzity fluorochromů – přiřazení pseudobarev.

Vyšší rozlišení (asi 1-500 kb) při mapování genů poskytuje metoda fiber-FISH, při které jsou hybridizována vlákna DNA extrahovaná z jádra.

ZOO-FISH neboli komparativní barvení chromozomů spočívá v mezidruhové hybridizaci, kdy jsou specifické sondy určitého druhu hybridizovány na chromozomální

preparáty jiného druhu. Tato metoda nám dovoluje určit konzervované homologní úseky chromozomů u různě příbuzných druhů, a je tedy užitečným nástrojem pro stanovení evoluční divergence genomů a pro srovnávací mapování genů (Chowdhary a Raudsepp, 2001).

1.3.1.3 Komparativní genomová hybridizace

Molekulárně cytogenetická metoda komparativní genomové hybridizace (CGH, z angl. comparative genomic hybridization) byla vyvinuta v roce 1992 (Kallioniemi a kol., 1992). Jedná se vlastně o modifikaci výše uvedené metody FISH. Umožňuje detekci počtu kopií všech chromozomů i jejich menších částí u testovaného biologického materiálu v jediném vyšetření. Pokud vzorek obsahuje malé množství genetického materiálu (např. u embryí), je nutné CGH spojit s některou z technik celogenomové amplifikace, která má za cíl zvýšit původní počet kopií sekvencí DNA ve vzorku. Kombinací této techniky s mikročipy vznikla o pět let později metoda array CGH (aCGH) (Solinas-Toldo a kol., 1997), u které jsou metafázní chromozomy na sklíčku nahrazeny fragmenty klonované DNA různých sekvencí. Využívá se k diagnostice aneuploidií, mikrodelečních syndromů, subtelomerických přestaveb a jiných nebalancovaných strukturních chromozomových aberací. I přes své vysoké rozlišení však aCGH nedokáže analyzovat balancované změny genomu jako jsou inverze a balancované translokace.

1.3.2 Metody založené na polymerázové řetězové reakci

Metoda polymerázové řetězové reakce (PCR, z angl. polymerase chain reaction) slouží k amplifikaci specifického úseku DNA. Tento úsek musí být ohraničen sekvencí, kterou alespoň zčásti známe, abychom mohli navrhnout vhodnou dvojici primerů komplementárních k této sekvenci. Výhodou metody je její vysoká citlivost. Stačí pouze malé množství DNA, aby došlo k amplifikaci daného úseku.

Během PCR se mnohokrát opakuje cyklus sestávající ze tří kroků: denaturační fáze, anelační fáze a syntetické fáze. Nejčastěji se počet opakování pohybuje v rozmezí 25 - 35 cyklů. V denaturační fázi dochází působením vysoké teploty (94-98 °C) k rozrušení vodíkových můstků v molekule DNA a k rozvolnění dvoušroubovice. Vzniká tak jednovláknová DNA, na kterou mohou v dalším kroku po snížení teploty na 50-65 °C nasednout primery. Následně se na dvouvláknové úseky DNA-primer váže DNA polymeráza.

Nejběžněji používaná Taq polymeráza má optimum aktivity při 75-80 °C. Při syntéze DNA vlákno komplementární k původní molekule DNA přirůstá ve směru od 5' konce ke 3' konci.

Metody založené na PCR jsou důležitými prostředky především v detekci bodových mutací a malých inzercí a delecí. V případě detekce velkých genových delecí je nezbytné přesné určení počátečního množství testované DNA, tedy využití kvantitativních metod nebo alespoň semi-kvantitativních metod pro přibližné určení počátečního množství testované DNA ve srovnání s kontrolní DNA.

Při detekci chromozomových přestaveb balancovaného typu v periferních lymfocytech se v klinické praxi nejčastěji setkáváme s využitím multiplex RT-PCR, real-time PCR (RQ-PCR) anebo RT-RQ-PCR. Lista a kol. (1997) ve své studii přestaveb v genech pro antigenní receptory u myši použili metodu nested PCR.

1.3.2.1 RT-PCR

RT-PCR je kombinací technik reverzní transkripce a PCR. Pomocí této metody se nejprve přepíše mRNA do komplementární DNA (cDNA), která se následně amplifikuje pomocí PCR. Při RT-PCR se využívá RNA dependentní DNA polymerázy nazývané reverzní transkriptáza.

RT-PCR se provádí ve třech základních typech uspořádání. Prvním způsobem je dvoustupňová RT-PCR ve dvou zkumavkách. V první zkumavce probíhá reverzní transkripce pomocí oligo(dT) primerů, náhodných hexanukleotidových primerů nebo sekvenčně specifických primerů. Část vzorku se přenesse do druhé zkumavky, kde probíhá PCR. Dalším systémem je dvoustupňová RT-PCR v jedné zkumavce, kde nejprve probíhá reverzní transkripce za přítomnosti reverzní transkriptázy, Mg^{2+} , dNTP a primerů a před zahájením samotné PCR se do zkumavky přidá DNA polymeráza, specifické primery a pufr. Při jednostupňové RT-PCR v jedné zkumavce probíhá reverzní transkripce i PCR za stejných podmínek.

RT-PCR se využívá např. pro amplifikaci cDNA kopií vzácných mRNA, při studiu genové exprese, v diagnostice přítomnosti transkriptu fúzního genu nebo sekvenování RNA.

1.3.2.2 Multiplex PCR

Multiplex PCR je varianta polymerázové řetězové reakce umožňující amplifikaci dvou a více lokusů v jedné PCR. Využívá se při ní více párů primerů, které se váží k různým

úsekům DNA. Podmínky každé multiplex PCR je třeba optimalizovat, hlavně co se týče designu a koncentrace primerů.

Multiplex PCR slouží v mnoha oblastech testování DNA, např. při analýze delecí, mutací nebo polymorfismů (Henegariu a kol., 1997).

1.3.2.3 Real-time PCR

Real-time PCR neboli kvantitativní PCR (RQ-PCR, z angl. real-time quantitative PCR) je založena na monitorování fluorescence emitované v průběhu polymerázové řetězové reakce jakožto indikátoru amplifikace požadovaného fragmentu v každém cyklu.

Nejčastěji používaným způsobem kvantifikace je použití interkalačního barviva Sybergreen, které patří k nespecifickým fluorescenčním substrátům. Přesnost výsledků s použitím Sybergreenu může být v některých případech nižší, proto se pro detekci používají také hydrolyzační sondy (molecular beacon, TaqMan) a hybridizační sondy.

TaqMan test je založen na 5' nukleázové aktivitě Taq polymerázy, která rozštěpí a nahradí oligonukleotidovou sondu hybridizovanou s cílovou molekulou DNA. Oligonukleotidová sonda nese na svém 5' konci fluorescenční reportérovou barvu a na 3' konci fluorescenční barvu označovanou jako zhášec (quencher). Pokud sonda není rozštěpena, zhášec redukuje fluorescenční signál reportéru. Po rozštěpení sondy dochází k emisi fluorescenčního signálu. Molecular beacon (molekulární majáček) sonda tvoří vlásenkové uspořádání a na svém 5' konci obsahuje fluorofor a na 3' konci zhášec. V takovéto vlásenkové konformaci nedochází k fluorescenci. Při hybridizaci na cílovou sekvenci dojde k oddálení fluoroforu a zhášec a tím i k fluorescenci (Tyagi a Kramer, 1996).

Dalším způsobem detekce fluorescenčního signálu je použití hybridizačních sond. Tato metoda nazývaná FRET (z angl. fluorescence resonance energy transfer) je založena na použití dvou oligonukleotidových sekvencí značených dvěma různými fluorescenčními barvami (jedna na 3' konci - donor, druhá na 5' konci - akceptor). Obě sondy nasedají těsně vedle sebe na cílovou DNA. Donorový fluorochrom po excitaci externím zdrojem světla přenese část své excitační energie na akceptorový fluorochrom. Excitovaný akceptorový fluorochrom emituje světlo o jiné vlnové délce, které je detekováno. Fluorochromy jsou vybrány tak, aby se emisní spektrum jednoho fluorochromu překrývalo s excitačním spektrem druhého.

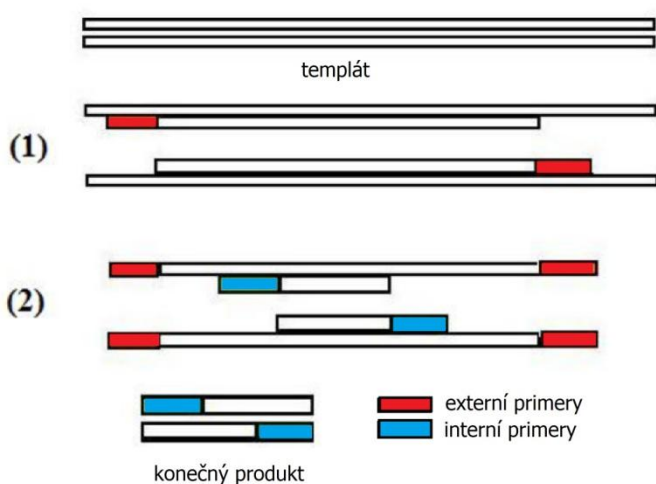
Real-time PCR se obvykle provádí v 96-ti jamkových destičkách, kdy se úroveň fluorescence zaznamenává v jednotlivých jamkách s využitím speciálního cycleru, který v průběhu PCR kontinuálně zaznamenává množství DNA.

Pro detekci a kvantifikaci cílové DNA je real-time PCR vysoce citlivou metodou, a pokud jsou využity specifické fluorescenční substráty, je tato metoda i vysoce specifická.

1.3.2.4 Nested PCR

Nested PCR umožňuje amplifikaci určité sekvence z dlouhého fragmentu DNA. Při nested PCR se využívají dva páry primerů – vnitřní a vnější. Vnější (externí) pár primerů vymezí z dlouhého fragmentu DNA určitý lokus. Uvnitř tohoto lokusu se nachází místo komplementární pro vnitřní (interní) pár primerů. Nejprve se provede reakce s vnějšími páry primerů a vzniklý produkt je využit jako templát pro reakci s vnitřními primery.

Tento způsob detekce se využívá tehdy, pokud se v dlouhém fragmentu DNA může vyskytnout více míst komplementárních k primerům, čímž by vznikaly nespecifické produkty. Přidáním vnějšího páru primerů se specifikuje, která sekvence bude amplifikována.



Obr. 10: Schéma nested PCR. V prvním kole (1) je za pomoci externích primerů naamplifikovaný delší fragment DNA, který je (2) templátem pro amplifikaci konečného produktu s využitím interních primerů ve 2. kole nested PCR.

1.3.3 Sekvenování nové generace

V současnosti se experimentálně i v klinické diagnostice stále více využívá nových technologií sekvenování – souhrnně sekvenování nové generace (NGS, z angl. next generation sequencing). Tyto technologie se vyznačují vysokou automatizací a slibují

zefektivnění, zjednodušení a zpřesnění DNA, příp. RNA sekvenování. Společným znakem jednotlivých platform na trhu je masivně paralelní sekvenování klonálně amplifikovaných molekul DNA (např. Roche 454 Genome Sequencer, Illumina Genome Analyzer a Life Technologies SOLiD System.) nebo jednotlivých molekul DNA (např. HeliScope, PacBio RS SMRT Ssystem, Oxford Nanopore), které jsou prostorově odděleny na čipu. NGS produkuje nukleotidové sekvence o velikosti stovek Mb až Gb v jediném běhu přístroje v závislosti na použité platformě (Voelkerding a kol., 2009).

Obecné schéma NGS metod zahrnuje přípravu tzv. knihovny, což je soubor fragmentů DNA (amplikonů), které slouží jako templát, zatupení konců fragmentů (enzymaticky) a ligaci tzv. adaptérů – krátkých oligonukleotidů, od kterých pak probíhá sekvenování jednotlivých fragmentů (vážou se k nim primery). Technologie založené na PCR amplifikaci templátu dále zahrnují namnožení klonů jednotlivých fragmentů DNA. Vlastní sekvenování je zpravidla založeno na základě detekce bazí, které se začleňují do vznikajícího řetězce.

Nové metody sekvenování jsou využívány především pro celogenomové sekvenování (de novo sekvenování neznámých genomů), sekvenování jednotlivých chromozomů, plazmidů či mitochondrií (cílené sekvenování), studium genetické variability, mutační analýzu, kvantifikaci jednotlivých alel, transkriptomovou analýzu (RNA-sekvenování) – analýza exprese kódující i nekódující RNA v genomu, detekci nebalancovaných i balancovaných chromozomových přestaveb, studium DNA-proteinových interakcí (ChIP-sequencing) a v oblasti metagenomiky (analýza biologické diverzity, např. genotypizace bakterií). V klinické praxi nacházejí NGS technologie široké uplatnění v molekulární diagnostice dědičných chorob, infekčních onemocnění, prenatální diagnostice, farmakogenomice a v molekulární diagnostice nádorů (Guan a kol., 2012).

Výstupem NGS je obrovský objem dat, který je třeba zpracovat, resp. roztřídit, aby bylo možné získaná data smysluplně interpretovat a vytěžit z nich co nejvíce. Právě to je v současné době největší limitací využití NGS technologií v praxi.

1.3.3.1 Sekvenování transkriptomu (RNA-sekvenování)

Transkriptom představuje soubor všech molekul RNA (mRNA, rRNA, tRNA a další nekódující RNA molekuly) v buňce nebo populaci buněk. RNA-sekvenování se používá pro kvantifikaci transkriptomu (studium exprese genů) a strukturní analýzy.

V onkologii je analýza transkriptomu jedním z nejdůležitějších přístupů pro komplexní charakterizaci nádorů na molekulární úrovni. Sekvenování transkriptomu slouží v diagnostice malignit k detekci genových fúzí, somatických mutací a alternativních sestřihových variant. K tvorbě fúzního genu dochází v důsledku chromozomálních aberací. Přesná lokalizace zlomových míst a identifikace fúzních genů je významná také pro vývoj nových léčiv. Fúze genů se velmi často vyskytují především u hematologických malignit (Koubková a kol., 2014). Pomocí RNA-sekvenování byly objeveny nové fúze genů např. u karcinomu mléčné žlázy, prostaty, lymfomu a melanomu (Xuan a kol., 2013). Výskyt určitých fúzí genů je spojován s procesem kancerogeneze specifických tkání nebo orgánů a tyto změny mohou být využity jako diagnostické markery onemocnění (Koubková a kol., 2014).

1.3.3.2 Cílené sekvenování (amplikonové sekvenování)

Cílené sekvenování umožňuje sekvenovat pouze vybrané geny nebo definované oblasti genomu, což je ekonomicky i časově výhodnější a vyžaduje i méně prostoru pro skladování dat.

Typickým využitím této techniky je sekvenování velkého počtu vzorků při screeningu nebo validaci genetických variant v populaci. Tímto způsobem mohou být zachyceny neobvyklé sekvenační varianty v populaci s frekvencí výskytu pod 1 % (Koubková a kol., 2014).

V klinické praxi je amplikonové sekvenování vhodné pro odhalování somatických mutací v komplexních biologických vzorcích, jako je např. smíšený vzorek nádorové a normální DNA. V současné době si lze vybrat ze standardních kitů navržených např. pro záchyt nejběžnějších mutací u onkologických pacientů – tzv. nádorové panely (testování vzácných hereditárních nádorových onemocnění, jednotlivé nádorové typy) nebo si navrhnout vlastní panel genů.

2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

1. Zjistit frekvenci balancovaných chromozomových přestaveb s místy zlomů v genech pro T-buněčné receptory v periferních lymfocytech u lidí a prasat s použitím metody fluorescenční *in situ* hybridizace a porovnat tyto frekvence mezi sebou.
2. Pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace stanovit frekvenci výskytu balancovaných chromozomových přestaveb s místy zlomů v genech pro T-buněčné receptory u prasat v kulturách separovaných $\gamma\delta$ T lymfocytů a T lymfocytů a srovnat jejich výskyt s výskytem v kulturách lymfocytů periferní krve.
3. Určit výskyt balancovaných chromozomových přestaveb s místy zlomů v genech pro T-buněčné receptory v periferních lymfocytech u vybraných zástupců čeledi koňovitých (*Equidae*) s využitím fluorescenční *in situ* hybridizace a porovnat získané výsledky mezi sebou.
4. Stanovit frekvenci výskytu balancovaných chromozomových přestaveb s místy zlomů v genech pro T-buněčné receptory v periferních lymfocytech dvou zástupců čeledi turovitých (*Bovidae*) – skotu a ovcí pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace a porovnat tyto frekvence mezi sebou.
5. Srovnat výsledky získané u různých živočišných druhů.
6. Charakterizovat hybridní geny pro T-buněčné receptory pomocí polymerázové řetězové reakce a sekvenace.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Předmět studia

Předmětem našeho studia byly metafázní chromozomy získané ze vzorků plné krve 6 mužů ve věku 39 až 46 let (zdraví, nekuřáci), prasat domácích (*Sus scrofa domestica*) – 10 mladých zvířat ve věku 5-7 měsíců a 3 starší zvířata ve věku 5 let (vše kříženci různých plemen), 4 prasat divokých (*Sus scrofa*), 10 koní domácích (*Equus caballus*) rozdílných plemen, 5 oslů domácích (*Equus asinus f. domestica*), 2 oslů afrických (*Equus asinus*), 5 zeber Grévyho (*Equus grevyi*), 6 zeber stepních (*Equus burchelli*) – zástupci 3 poddruhů (*E. b. boehmi*, *E. b. antiquorum*, *E. b. cunninghami*), 4 zeber Hartmannové (*Equus zebra hartmannae*), 15 zástupců tura domácího (*Bos taurus*) různých plemen a 5 ovcí (*Ovis aries*) – kříženci různých plemen. Všechna zvířata byla v době odběru klinicky zdravá. Mezi vyšetřovanými zvířaty jsou zahrnuti jedinci obou pohlaví.

Vzorky krve divokých zástupců čeledi koňovitých (*Equidae*) poskytla ZOO ve Dvoře Králové. Prasata domácí a část skotu byla odebírána v experimentálních stájích Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně, vzorky krve koní, ovcí a části skotu poskytla Klinika chorob koní a Klinika chorob přežvýkavců a prasat Veterinární a farmaceutické univerzity Brno. Zástupci oslů domácích byli v majetku soukromé chovatelky z Hustopečí u Brna. Vzorky krve divokých prasat byly získány při lovu na Tišnovsku. V případě humánních vzorků se jednalo o dobrovolné dárce.

3.2 Kultivace lymfocytů periferní krve

3.2.1 Chemikálie a roztoky

Kultivační médium (100 ml) – při přípravě dodržovat zásady aseptické laboratorní práce

77,6 ml RPMI 1640 média s glutaminem (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, USA)

20 ml fetálního telecího séra (BioTech)

1-2 ml phytohemaglutininu (Gibco) nebo 0,75 ml pokeweed mitogenu (Sigma)

0,3 ml heparinu (Zentiva)

1 ml	roztoku antibiotik a antimykotik (Sigma)
<u>Kolcemid</u> (Sigma)	10 µg/ml
<u>Fixační roztok</u>	1:3 kyselina octová (Merck) a metanol (Dorapis)
<u>Hypotonický roztok</u>	0,56 g chloridu draselného rozpustit ve 100 ml převařené deionizované vody

3.2.2 Pracovní postup

1. Do kultivační nádoby bylo napipetováno 5 ml kultivačního média a 0,5 ml heparinizované krve, buněčné kultury byly kultivovány 48-72h v termostatu při 37 °C ± 1°C.
2. Asi 1h před ukončením kultivace bylo přidáno 50 µl kolcemidu/5 ml.
3. Po přenesení do zkumavek byly kultury zcentrifugovány 10 minut při 1200 otáčkách/min.
4. Vodní vývěvou byl odstraněn supernatant, sediment byl resuspendován v 7 ml hypotonického roztoku chloridu draselného a inkubován 20 minut při 37 °C ± 1°C.
5. Byly přidány 3 kapky fixačního roztoku a po zamíchání bylo vše stočeno 10 minut při 1200 otáčkách/min.
6. Vodní vývěvou byl odstraněn supernatant, sediment byl resuspendován v 5 ml fixačního roztoku a po inkubaci 30 minut při laboratorní teplotě zcentrifugován 10 minut při 1200 otáčkách/min.
7. Krok 6 byl opakován až do doby, kdy jsme získali čistou suspenzi lymfocytů (nesmí být zabarvena dohněda).

3.3 Izolace a kultivace prasečích T lymfocytů a γδ T lymfocytů

3.3.1 Chemikálie a roztoky

Histopaque®-1077 (Sigma)

PBS 8,9 g chloridu sodného, 2,9 g hydrogenfosforečnanu sodného a 0,3 g dihydrogenfosforečnanu sodného doplnit do 1 l destilovanou vodou, upravit pH na 7,2

Mouse anti-CD3 antibody (8E6, VMRD, WA, USA)

Mouse anti-porcine TcR1-N4-delta chain (PGBL22A, VMRD)

Goat anti-mouse IgG MicroBeads (Miltenyi Biotec)

Kultivační médium (100 ml) – viz Kultivace lymfocytů periferní krve, jako mitogen použit phytohemagglutinin

3.3.2 Pracovní postup

1. Z heparinizované plné krve jsme gradientovou centrifugací na Histopaque®-1077 vyseparovali mononukleární buňky dle protokolu uvedeného na webových stránkách výrobce (Sigma-Aldrich): http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/10771pis.pdf.
2. Izolované mononukleární buňky byly označeny protilátkami anti-CD3 nebo anti- $\gamma\delta$ TCR (mouse anti-porcine TcR1-N4-delta chain) a následovalo jejich magnetické značení (goat anti-mouse IgG MicroBeads).
3. Byla provedena magnetická separace T lymfocytů ($CD3^+$) a $\gamma\delta$ T lymfocytů ($\gamma\delta TCR^+$) s použitím QuadroMACS separátoru (Miltenyi Biotec) dle doporučení výrobce: <https://www.miltenyibiotec.com/~media/Images/Products/Import/0001300/IM0001300.asas?force=1>.
4. Kvalita separace prasečích T lymfocytů a $\gamma\delta$ T lymfocytů byla zkontrolována průtokovou cytometrií na přístroji BD LSRFortessa vybaveném BD FACSDiva™ Software (Becton Dickinson, CA, USA).
5. Izolované T lymfocyty a $\gamma\delta$ T lymfocyty byly kultivovány v kompletním kultivačním médiu, které bylo obohaceno o kultivační médium ze 2-denních kultur periferních lymfocytů.

3.4 Analýza $\gamma\delta$ T lymfocytů pomocí průtokové cytometrie

3.4.1 Chemikálie a roztoky

Hemolytický roztok 8,26 g NH_4Cl , 1 g $KHCO_3$ a 0,037 g EDTA doplnit do 1 l destilovanou vodou

<u>PBS</u>	8,9 g chloridu sodného, 2,9 g hydrogenfosforečnanu sodného a 0,3 g dihydrogenfosforečnanu sodného doplnit do 1 l destilovanou vodou, upravit pH na 7,2
<u>Promývací roztok</u>	1,84 g EDTA, 1 g azidu sodného a 4 ml želatiny na 1 l PBS
<u>Propidium jodid (Sigma)</u>	
<u>Mouse anti-porcine TcR1-N4-delta chain (klon PGBL22A, VMRD)</u>	
<u>Anti-bovine TcR1-N6 cluster (klon CACTB14A, VMRD)</u>	
<u>Alexa Fluor®488 goat anti-mouse IgG1 (Life Technologies, CA, USA)</u>	

3.4.2 Pracovní postup

1. Vzorky plné krve a kultury periferních lymfocytů s přidavkem mitogenu byly promyty hemolytickým roztokem pro odstranění erytrocytů.
2. Po ošetření promývacím roztokem byly vzorky inkubovány s anti- $\gamma\delta$ TCR protilátkami a propidium jodidem (PI), který slouží k označení apoptotických a poškozených buněk.
3. Následovala inkubace se sekundárními protilátkami Alexa Fluor®488 goat anti-mouse IgG1.
4. Zastoupení $\gamma\delta$ T lymfocytů ve vzorcích bylo stanoveno pomocí průtokového cytometru BD LSRFortessa vybaveného analytickým softwarem BD FACSDiva™ Software (Becton Dickinson, CA, USA).

3.5 Příprava preparátů metafázních chromozomů

3.5.1 Chemikálie a roztoky

<u>Fixační roztok</u>	1:3 kyselina octová (Merck) a metanol (Verkon)
<u>96% etanol (Dr. Kulich Pharma) s přidavkem 5 % éteru (Verkon)</u>	

3.5.2 Pracovní postup

1. Suspenze lymfocytů byla zcentrifugována 10 minut při 1200 otáčkách/minutu.

2. Vodní vývěvou byl odstraněn supernatant, sediment byl resuspendován v malém množství fixačního roztoku.
3. Podložní skla skladovaná v 96% etanolu s 5 % éteru (minimálně 24 hodin před použitím) byla orosena destilovanou vodou a pipetou na ně byla nanášena suspenze.
4. Podložní sklo s preparátem jsme ponechali uschnout na vyhřívací ploténce při 37 °C.
5. V mikroskopu s fázovým kontrastem bylo zkontrolováno množství a rozložení metafázních chromozomů, suspenze byla případně zředěna fixačním roztokem nebo opakovanou centrifugací zahuštěna.

Pozn: Suspenzi lze uchovávat ve fixačním roztoku při -20 °C po dobu několika let.

3.6 Příprava sond pro fluorescenční *in situ* hybridizaci

Malovací sondy (celochromozomové, raménkové) použité v této studii byly získány pomocí laserové mikrodisekce s využitím přístroje PALM®microLaser system (P.A.L.M. GmbH, Bernried, Germany) dle metodiky publikované naší laboratoří (Kubickova a kol., 2002). DNA z izolovaných chromozomů byla amplifikována pomocí PCR s degenerovanými oligonukleotidovými primery (DOP-PCR). SONDY byly značeny metodou PCR za využití nukleotidů značených Orange-dUTP a Green-dUTP (Abbott Molecular Inc.) nebo digoxigenin-11-dUTP a biotin-16-dUTP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Při konstrukci lokus-specifické sondy pro *TRA* skotu byly podle sekvence AY227782 (NCBI) vybrány primery z exonů segmentů C. Tyto primery (5'-AGGACCCCAACCCCACTGTGTACC-3' a 5'-AGGAGCTAGAGCCCAGGAGAACCC-3') při PCR z genomové DNA amplifikovaly produkt o velikosti 4761 bp. PCR produkt byl následně přečištěn pomocí High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH) a klonován do pDrive vektoru pomocí QIAGEN PCR Cloning Kit (QIAGEN). Rekombinantní plazmid byl značen biotinem-16-dUTP metodou nick-translace s využitím Nick Translation Reagent Kit (Abbott Molecular Inc).

Pozn.: Část experimentů byla provedena s využitím komerčně dostupných sond a sond odvozených z BAC klonů (viz Výsledky).

3.7 Fluorescenční *in situ* hybridizace

3.7.1 Chemikálie a roztoky

70%, 85%, 96% etanol (Dr. Kulich Pharma)

Formamid (Fluka)

Dextran sulfát (Serva)

Salmon Testes DNA 10 mg/ml (Sigma)

Human/Porcine/Bovine/Ovine Hybloc DNA (Applied Genetics Laboratories, Florida, USA)

Igepal (Sigma)

Tween 20 (Serva)

Blocking reagent (Boehringer Mannheim)

Anti-digoxigenin-rhodamine (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)

Fluorescein avidin DCS 2 mg/ml (Vector Laboratories, Burlingame, Calif., USA)

Vectashield antifade mounting medium 0,24 µg/ml (Vector H)

Imerzní olej pro mikroskopii (Olympus)

Denaturační roztok - 70% formamid/2xSSC

28 ml formamidu a 4 ml 20 x SSC doplnit do 40 ml, pH upravit na 7-7,2; skladovat při teplotě 4-10 °C

Master mix (MM) - konc.

5 ml formamidu, 1 g dextran sulfátu a 1 ml 20xSSC doplnit do 7 ml vodou, pH 7, skladovat při -20 °C

20 x SSC - zásobní roztok

175,32 g chloridu sodného a 88,23 g citrátu sodného doplnit do 1 l destilovanou vodou, upravit pH na 7,0-7,2, přefiltrovat, autoklávovat, uchovávat při 4-10 °C

2 x SSC

10 ml 20 x SSC (pH 7,0) doplnit do 100 ml destilovanou vodou, připravovat vždy čerstvé

0,4 x SSC/0,3% Igepal

pH 7,0; uchovávat při 2-10 °C max. 1 měsíc

0,7 x SSC/0,3% Igepal

pH 7,0; uchovávat při 2-10 °C max. 1 měsíc

10 x TN pufr

27 g Trizma HCl, 23,6 g Trizma Base a 87,66 g chloridu sodného smíchat a doplnit do 1 l destilovanou vodou, upravit pH na 7,0-7,5

10 x TNT pufr

200 ml 10 x TN pufru a 1 ml Tweenu 20

<u>TNB</u>	10 ml 1 x TN a 0,1g Blocking reagent zahřát a rozpustit na třepačce, uchovávat při -20 °C
<u>Mcilvainův pufr</u>	5,86 g Na ₂ HP0 ₄ .12 H ₂ 0 a 0,382 g kyseliny citrónové doplnit do 100 ml deionizovanou vodou, upravit pH na 7,0, přefiltrovat, autoklávovat, uchovávat při 4-10 °C
<u>DAPI 6 µg/ml (Sigma)</u>	zásobní roztok připravit v Mcilvainově pufru, skladovat při -15 °C až -25 °C, chránit před světlem
<u>DAPI v Antifade mounting medium Vectashield (0,1 µg/ml)</u>	4 µl zásobního roztoku DAPI (6 µg/ml) a 100 µl Antifade mounting medium Vectashield (0,24 µg/ml), uchovávat při 2-8 °C, chránit před světlem

3.7.2 Pracovní postup

Pozn.: V případě komerčně dostupných sond (viz Výsledky) bylo postupováno podle doporučení výrobce.

1. Podložní skla s nakapanou suspenzí buněk byla dehydratována ve vzestupné alkoholové řadě 70% →85% →96% etanol po 2 minutách při pokojové teplotě.
2. Preparáty byly denaturovány v denaturačním roztoku 70% formamid/2xSSC po dobu 2 minut při 72 °C.
3. Preparáty byly dehydratovány ve vzestupné alkoholové řadě 70% →85% →96% etanol po 2 minutách při - 20 °C a nakonec v 96% etanolu laboratorní teploty po dobu 2 minut.
4. Byla připravena hybridizační směs (množství dle plochy, kterou zaujímá nakapaná suspenze buněk na podložním skle) obsahující hybridizační pufr (7 µl konc. MM), minimálně 0,1 µg od každé sondy v případě malovacích sond, 10 ng od každé sondy v případě BAC sond, 1 µg až 1,5 µg kompetitorové DNA (Human/Porcine/Bovine/Ovine Hybloc DNA nebo kompetitorová DNA připravená v naší laboratoři – kůň, osel, zebra stepní) a 1 µg Salmon Testes DNA na 10 µl hybridizační směsi. Vše bylo dobře promícháno a stočeno.
5. Hybridizační směs byla denaturována 10 minut při 72 °C a prehybridizována 45-60 minut při 37 °C.

6. Na krycí sklíčko byla nanášena hybridizační směs (na ohřívací plotýnce při 37 °C), krycí sklíčko bylo přiklopeno podložním sklem se suspenzí buněk a po vytlačení vzduchových bublin byly okraje zalepeny lepidlem.
7. Hybridizace probíhala v termostatu při 37 °C 12 až 72 hodin.
8. Krycí sklíčko se nechalo odmočit v 2x SSC při laboratorní teplotě.
9. Nahybridizované preparáty byly promývány v 0,4xSSC/0,3%Igepal nebo 0,7xSSC/0,3% Igepal (ZOO-FISH) při 72 °C 2 minuty.
10. Preparáty byly opláchnuty ve 2xSSC při laboratorní teplotě.
11. Skla s preparáty byla opláchnuta v 1xTNT pufru při laboratorní teplotě.
- 12a. V případě použití přímo značených sond bylo na krycí sklo nanášeno DAPI v montovacím médiu (Antifade mounting medium Vectashield) a bylo přiloženo podložní sklo. Preparáty byly uchovávány ve tmě při teplotě 4-10°C.
- 12b. V případě použití nepřímo značených sond následovala detekce a příp. amplifikace sond:
 13. Na podložní sklo bylo nanášeno 100 µl TNB, po zakrytí parafilmem bylo sklo inkubováno 10 minut ve tmě při laboratorní teplotě.
 14. Po okapání bylo nanášeno 0,25 µl protilátky anti-digoxigenin-rhodamine (při použití sondy značené digoxigenin-11-dUTP) nebo fluorescein avidin DCS (při použití biotinylované sondy) ve 100 µl TNB, po zakrytí parafilmem bylo inkubováno minimálně 40 minut ve tmě při 37 °C.
 15. Skla byla promývána v 1xTNT na třepačce 3x 5 minut.
 16. Skla byla zamontována do DAPI/Antifade mounting medium Vectashield (viz 12a).

3.8 Vyhodnocení preparátů a statistická analýza

Bylo hodnoceno alespoň 5000 metafázních buněk u každého vyšetřovaného jedince a z každé buněčné kultury (výjimky viz Výsledky). V rámci druhu bylo vyšetřeno alespoň 5 jedinců (výjimky viz Výsledky). Preparáty byly posuzovány ve fluorescenčním mikroskopu Olympus BX51, Olympus BX60 nebo Zeiss Axio Imager.Z2 vybaveném automatickým skenovacím systémem skel Metafer (MetaSystems, Altlussheim, Germany). Metafázní buňky s pozitivním nálezem chromozomové aberace byly nasnímány a analyzovány v programu ISIS (MetaSystems). Tyto nálezy byly hodnoceny dvěma nezávislými evaluátory.

Při statistické analýze dat byly použity metody chí-kvadrát test a Mann-Whitneyův test s využitím SPSS software package, v.18 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, Ill., USA). Při vyhodnocení statistické významnosti zjištěných rozdílů byla zvolena hladina významnosti 0,05.

3.9 Charakterizace hybridních TCR genů pomocí nested PCR

3.9.1 Chemikálie a roztoky

1 x Combi PPP Master Mix (Top-Bio, Praha, Česká republika)
Primery (viz Výsledky)

Agaróza (Top-Bio)

5xTBE (Tris-borátový pufr) 54g Tris (Lachema), 27,5g kyselina boritá ČSL 4 (Chemoform) a 20 ml 0,5 M EDTA nebo 3,8g Chelaton 3 doplnit do 1 l destilovanou vodou

Ethidium bromid (EtBr) - zásobní roztok

10 mg/ml v H₂O, uchovávat ve tmě při teplotě 4 °C, 1,5μl roztoku EtBr do 30 ml gelu

Nanášecí pufr

0,63g 0,16 M EDTA, 1,5g 15% Ficoll 400 a 0,004g xylene cyanose doplnit do 10 ml destilovanou vodou

2-Log DNA Ladder (NEW ENGLAND BioLabs Inc.)

pDrive Cloning Vector (QIAGEN)

LB médium

10 g trypton, 5g Yeast extrakt a 10g NaCl doplnit do 1 l destilovanou vodou, upravit pH na 7,5; rozplnit po 200 ml, autoklávovat 10 minut při 110°C, uchovávat při 2-8 °C

Roztok KB1

0,48 g HEPES (finální koncentrace 10mM), 0,29g CaCl₂ (finální koncentrace 10mM) doplnit do 200 ml destilovanou vodou, autoklávovat, uchovávat při 2-6 °C

Roztok KB2

0,12 g HEPES (finální koncentrace 10mM), 0,55g CaCl₂ (finální koncentrace 75mM), doplnit do

50 ml destilovanou vodou, autoklávovat, uchovávat při 2-6 °C

IPTG (Sigma)

rozpustit 47,6 mg IPTG v 1 ml injekční vody

Xgal (SERVA)

zásobní roztok v dimethylformamidu

Kultivační půda s IPTG, Xgal a ATB

do 100 ml kultivační půdy s antibiotiky přidat 100 µl IPTG a 100 µl Xgal

3.9.2 Pracovní postup

1. Byla izolována genomová DNA z heparinizované plné krve s využitím QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) dle protokolu dodávaného výrobcem (a také https://moodle.ufsc.br/pluginfile.php/1379318/mod_resource/content/0/QIAamp_DNA_Mini_Blood.pdf).
2. V prvním cyklu nested PCR – 5 amplifikačních reakcí z každého DNA vzorku, 20 µl reakční směsi obsahovalo 4 µl gDNA, 10 µl 1x Combi PPP Master Mix (Top-Bio, Praha, Česká republika) a 1,6 µM primery (externí). Reakční podmínky (PTC-200 thermocycler – MJ Research, Watertown, USA) byly 95 °C/4 min; 30 cyklů: 95 °C/1 min, 56 °C/1 min, 72 °C/2 min; 72 °C/5 min.
3. Ve druhém cyklu nested PCR byly použity 3 µl amplifikačního produktu z 1. PCR reakce do 30 µl reakční směsi obsahující 2. pár primerů (interních), reakční podmínky byly stejné jako v prvním cyklu nested PCR.
4. Vizualizace produktu PCR byla provedena na 2% agarózovém gelu. Bylo nanášeno 8 µl amplifikačního produktu.
5. PCR produkty byly přečištěny pomocí kitu High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) dle metodiky udávané výrobcem: <https://lifescience.roche.com/shop/products/high-pure-pcr-product-purification-kit>.
6. Přečištěné PCR produkty byly klonovány do vektoru pDrive Cloning Vector (QIAGEN). Transformace do kompetentních buněk (*E. coli*), jejich kultivace na selekční kultivační půdě s IPTG a Xgal detekce rekombinantních klonů byla prováděna podle postupu uvedeného výrobcem kitu QIAGEN PCR Cloning Kit: <https://www.qiagen.com/cz/shop/assay-technologies/end-point-pcr-and-rt-pcr-reagents/qiagen-pcr-cloning-kit#productdetails>.

7. Z rekombinantních plazmidů byla izolována plazmidová DNA kitem Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, USA).
8. Sekvence izolovaných rekombinantních plazmidů Sangerovou metodou byla provedena v komerční laboratoři.
9. Nález hybridního TCR genu byl potvrzen s využitím programu BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

3.10 Genomová organizace *TRA* a *TRG* koně domácího (*Equus caballus*)

Znamé sekvence koňského chromozomu 1 (NC_009144) a chromozomu 4 (NC_009147) byly prohledány za účelem identifikace segmentů V, J a C *TRA* a *TRG* genů. Sekvence NC_009144 byla porovnána s mRNA sekvencemi *TRA* lokusu koně domácího (NCBI: L38315, L38316, L38355, L38383, L38400, L38401) a se sekvencí bovinního *TRA* genu (AY227782) s využitím BL2seq programu. Podobně byla analyzována sekvence NC_009147 srovnáním s mRNA sekvencí *TRG* lokusu koně domácího (NCBI: L38392, L38393) a se sekvencí ovčího *TRG1* (DQ992075) a *TRG2* (DQ992074) genu.

4. VÝSLEDKY

4.1 Ilegitimní přestavby mezi TCR geny u lidí a prasat

Metodou fluorescenční *in situ* hybridizace jsme zjišťovali frekvenci chromozomových přestaveb s místy zlomů v genech pro T-buněčné receptory v periferních lymfocytech u lidí a prasat. Pro FISH humánních preparátů byly použity komerčně dostupné celochromozomové malovací sondy (Cambio, Cambridge, UK) pro chromozom 7 (HSA7, značení FITC) a 14 (HSA14, biotin) a malovací sondy specifické pro raménka HSA7p (FITC) a HSA7q (Texas Red) (MetaSystems, Altussheim, Germany). Biotinylovaná sonda pro HSA14 byla detekována pomocí avidin-Cy3.

Metafázní chromozomy lymfocytů periferní krve prasat byly nejprve hybridizovány malovacími sondami pro prasečí chromozom 7 (SSC7, Spectrum Green) a SSC9 (Spectrum Orange), příp. SSC7 (Spectrum Orange) a SSC18 (Spectrum Green). Preparáty byly následně rehybridizovány s použitím malovací sondy pro SSC18 (Spectrum Green), příp. SSC9 (Spectrum Orange) v kombinaci s jednou z výše zmíněných sond. Pro potvrzení translokací s místy zlomů v *TRA/TRD* lokusu bylo ve třetím kole FISH využito signál-segregační strategie. BAC konstrukty lemující *TRA/TRD* byly získány z Children's Hospital of Oakland Research Institute (CHORI): CH242-436B1 pro oblast proximální vzhledem k centroměře a CH242-105M6 pro distální oblast. BAC sondy byly značeny nepřímo biotin-16-dUTP a digoxigenin-11-dUTP. K detekci byl použit fluorescein avidin a anti-digoxigenin-rhodamine.

U lidí jsou přestavby mezi *TRA/TRD* a *TRB* detekovány jako reciproké translokace $t(7q;14)$, mezi *TRA/TRD* a *TRG* jako $t(7p;14)$ a mezi *TRB* a *TRG* jako inverze $inv(7)$, příp. translokace mezi homologními chromozomy $t(7p;7q)$. U prasat se ilegitimní rekombinace mezi *TRA/TRD* a *TRB* geny projevuje jako $t(7;18)$, mezi *TRA/TRD* a *TRG* jako $t(7;9)$ a mezi *TRB* a *TRG* jako $t(9;18)$ (obr. 11).

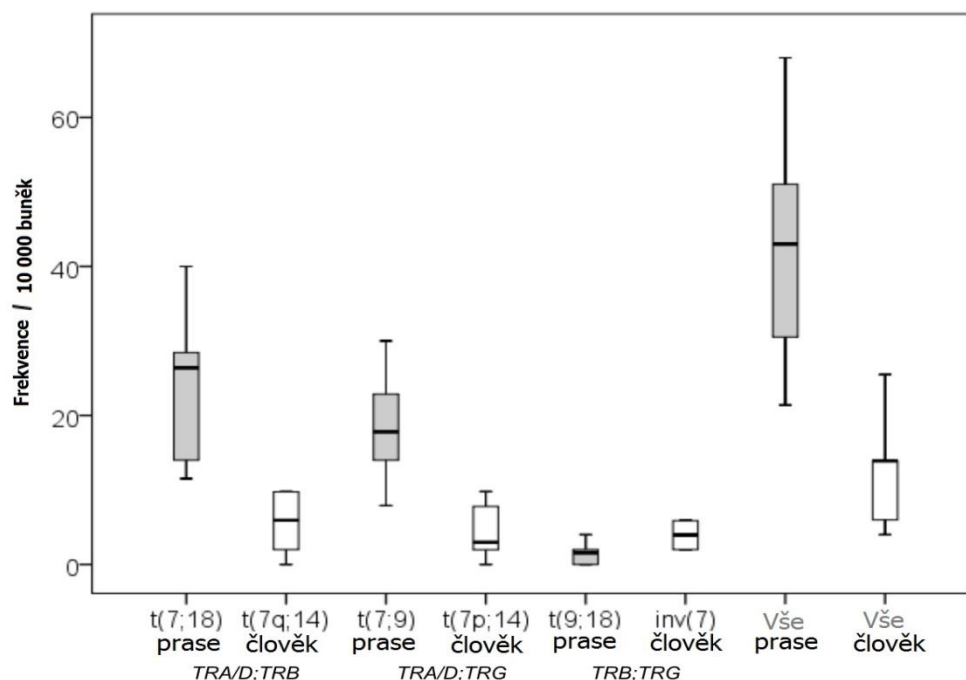
Průměrné hodnoty frekvence výskytu ilegitimních přestaveb mezi TCR geny u lidí a prasat znázorňuje tab. 4. Mezi jednotlivými typy přestaveb v lymfocytech periferní krve u lidí jsme nezaznamenali signifikantní rozdíly.

Frekvence výskytu chromozomových přestaveb s místy zlomů v TCR genech u prasat domácích (*Sus scrofa domestica*) byla zjišťována s využitím dvou různých kombinací

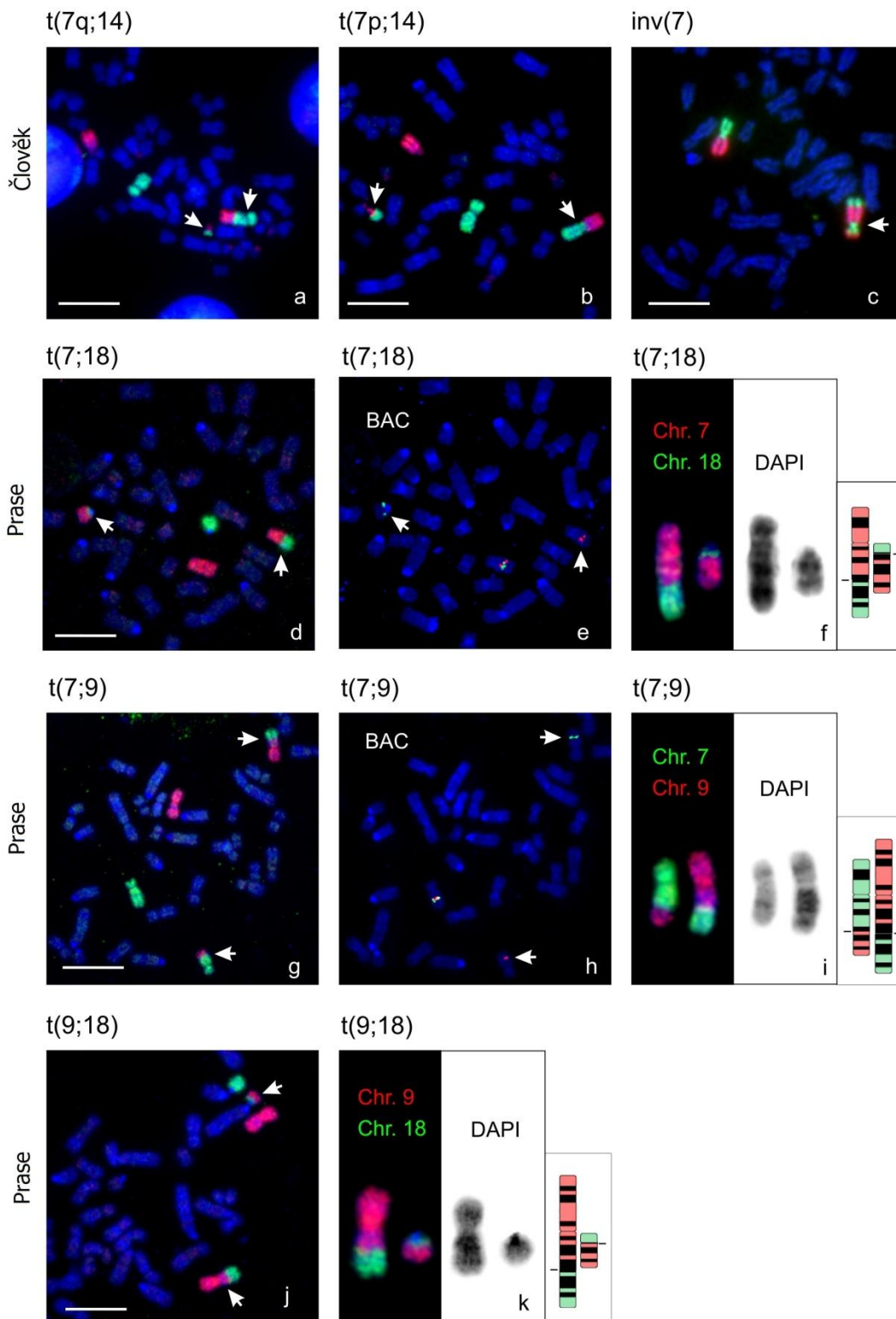
malovacích sond (viz výše). Mezi průměrnými hodnotami u těchto dvou skupin zvířat však nebyl významný rozdíl. Kromě 10 jedinců stáří 5-7 měsíců byla vyšetřena také 3 starší zvířata ve věku 5 let. Opět jsme nezaznamenali signifikantní rozdíly v hodnotách zjištěných u těchto věkově odlišných skupin, proto jsou do výsledků zahrnuty obě skupiny zvířat. Frekvence výskytu translokací zahrnujících lokus *TRA/TRD* je statisticky významně vyšší ($P < 0,001$) než frekvence výskytu translokace mezi geny *TRB* a *TRG*.

Porovnáním výsledků zjištěných u lidí a prasat domácích jsme sledovali významné rozdíly ($P < 0,001$) především ve frekvenci výskytu obou translokací zahrnujících *TRA/TRD* lokus a v celkovém výskytu ilegitimních přestaveb mezi TCR geny, které jsou vyšší u prasat. Naopak ilegitimní rekombinace mezi geny *TRB* a *TRG* se častěji vyskytovala u lidí ($P = 0,017$) (obr. 12).

Dle výsledků vyšetření lymfocytů periferní krve 4 divokých prasat (*Sus scrofa*) (tab. 4) se zdá, že výskyt ilegitimní přestavby mezi *TRA/TRD* a *TRB* geny může být u těchto divokých předků nižší ($P < 0,001$) než u prasete domácího. K vyvození definitivního závěru by však bylo třeba rozšířit soubor vyšetřených jedinců.



Obr. 12: Boxplot znázorňující frekvence výskytu ilegitimních přestaveb u lidí a prasat domácích. Horizontální linie uvnitř každého boxu reprezentuje hodnotu mediánu, výška každého boxu odpovídá 25-75 % rozsahu dat, horní a spodní linie prodloužení představují min. a max. hodnoty (upraveno dle Musilova a kol., 2014).



Obr. 11: Chromozomové přestavby s místy zlomů v TCR genech u lidí a prasat. Šipky označují zlomová místa. Černobílé snímky DAPI jsou invertované, vpravo od nich najdeme schématické znázornění translokací na G-pruhovaných chromozomech. Použité sondy viz text (upraveno dle Musilova a kol., 2014).

Narozdíl od člověka reprezentuje prase živočišný druh s vysokým zastoupením $\gamma\delta$ T lymfocytů, proto jsme v rámci naší studie zaměřili pozornost na tuto subpopulaci T lymfocytů. S využitím průtokové cytometrie jsme určili zastoupení $\gamma\delta$ T lymfocytů v plné krvi i v buněčných kulturách po stimulaci mitogenem u 5 mladých jedinců a 2 starších zvířat prasete domácího a u 4 jedinců prasete divokého (19,4-25,1 % v plné krvi). U mladších jedinců jsme pozorovali vyšší zastoupení $\gamma\delta$ T lymfocytů (33,1-56,1 % v plné krvi) než u obou starších zvířat (11,5 %; 12,6 % v plné krvi). Abychom zjistili, do jaké míry zastoupení $\gamma\delta$ T lymfocytů ovlivňuje výskyt chromozomových přestaveb mezi TCR geny, vyšetřili jsme kultury separovaných $\gamma\delta$ T lymfocytů ($\gamma\delta$ TCR+) u 5 mladých prasat domácích a u čtyř z nich také kultury separovaných T lymfocytů (CD3+) (tab. 4). Čistota kultur separovaných buněk byla ověřena průtokovou cytometrií ($\geq 99,4$ % ve všech případech). Zaznamenali jsme významně nižší frekvenci výskytu obou translokací zahrnujících *TRA/TRD* lokus u $\gamma\delta$ T lymfocytů v porovnání s kulturami plné krve [$P < 0,001$ u $t(7;18)$ a $P = 0,002$ u $t(7;9)$] a separovaných T lymfocytů ($P < 0,001$ u obou translokací). Mezi nálezy v kulturách lymfocytů periferní krve a separovaných T lymfocytů nebyly významné rozdíly. Z uvedeného vyplývá, že ilegitimní přestavby zahrnující lokus *TRA/TRD* u prasat domácích postihují spíše $\alpha\beta$ T lymfocyty.

Za účelem zjištění vlivu použitého mitogenu ve vyšetřovaných kulturách buněk na výskyt ilegitimních rekombinací mezi TCR geny byly porovnány nálezy v kulturách stimulovaných PWM a PHA u skupiny 3 starších prasat domácích (tab. 4). Mezi jednotlivými typy přestaveb nebyly pozorovány významné rozdíly, celkový výskyt přestaveb byl však vyšší ($P = 0,042$) u kultur stimulovaných PWM. K učinění definitivního závěru by bylo třeba vyšetřit větší počet jedinců.

U prasat zahrnovaly translokace detekované malovacími sondami nejčastěji SSC7. Pro ověření místa zlomu na tomto chromozomu bylo u části preparátů prasat domácích ve třetím kole FISH využito signál-segregační strategie s použitím rozdílně značených BAC konstruktů lemujících *TRA/TRD* lokus (obr. 11). Celkem bylo ověřeno 45 $t(7;9)$ a 52 $t(7;18)$, z nichž pouze jedna $t(7;18)$ vykazovala jiné místo zlomu než v *TRA/TRD*.

V ojedinělých případech jsme při vyšetřování lymfocytů periferní krve prasat domácích pozorovali chromozomové přestavby mezi chromozomy nesoucími geny pro T-buněčné receptory a jinými chromozomy. V kulturách plné krve 5 mladých zvířat jsme detekovali šest translokací zahrnujících SSC7 (2,4/10 000 buněk) a tři translokace zahrnující SSC9 (0,1/10 000 buněk). S využitím BAC konstruktů (viz výše) jsme potvrdili místo zlomu v *TRA/TRD* lokusu u všech šesti translokací zahrnujících chromozom 7. Co se týká přestaveb zahrnujících chromozom 9, výsledky FISH s použitím malovacích sond naznačují, že ve dvou případech ze tří se jedná o odlišná místa zlomu než v genu *TRG*.

Tab. 4: Frekvence výskytu ilegitimních přestavb mezi TCR geny u lidí a prasat v různých kulturách buněk

Druh	Vyšetřených jedinců	Typ buněk	Mitogen	Vyšetřených mitóz	Počet				Frekvence /10 000 buněk			
					Typ ilegitimní přestavby				Typ ilegitimní přestavby			
					TRA/D; TRB	TRA/D; TRG	TRB; TRG	Celkem	TRA/D; TRB	TRA/D; TRG	TRB; TRG	Celkem
Člověk	6	lymfocyty	PHA	30 377	17	13	13	43	5,6	4,3	4,3	14,2
Prase domácí	10+3*	lymfocyty	PHA	71 814	163	130	11	304	22,7	18,1	1,5	42,3
Prase domácí	4	CD3+	PHA	20 000	41	38	2	81	20,5	19,0	1,0	40,5
Prase domácí	5	$\gamma\delta$ TCR+	PHA	25 000	18	20	4	42	7,2	8,0	1,6	16,8
Prase domácí	3*	lymfocyty	PWM	17 311	39	49	1	89	22,5	28,3	0,6	51,4
			PHA	19 027	32	36	2	70	16,8	18,9	1,1	36,8
Prase divoké	4	lymfocyty	PHA	20 000	20	23	5	48	10,0	11,5	2,5	24,0

* starší jedinci ve věku 5 let

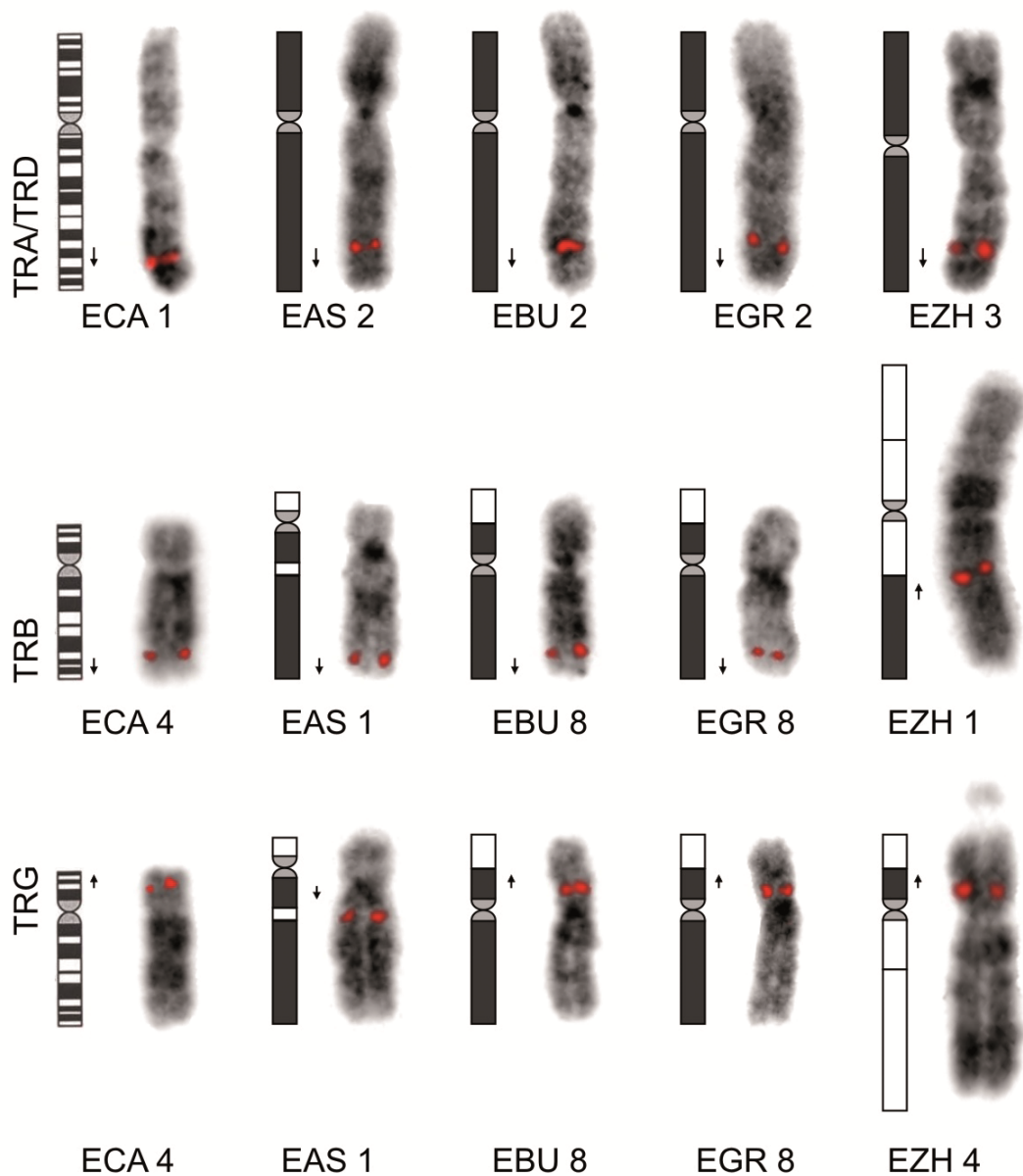
4.2 Ilegitimní přestavby mezi TCR geny u zástupců čeledi koňovitých (*Equidae*)

S využitím BAC konstruktů (tab. 5) jsme cytogeneticky zmapovali geny pro T-buněčné receptory u koně domácího (*Equus caballus*), osla (*Equus asinus*), zebry stepní (*Equus burchelli*), zebry Grévyho (*Equus grevyi*) a zebry Hartmannové (*Equus zebra hartmannae*) (obr. 13). Koňský *TRA/TRD* lokus byl lokalizován do oblasti 1q24q25, *TRB* do oblasti 4q24q26 a *TRG* do oblasti 4p15p13. Vzhledem k tomu, že dosud nebyl stanoven standardní karyotyp u ostatních zástupců čeledi koňovitých, byla lokalizace u těchto druhů omezena pouze na chromozomová raménka. Všechny TCR geny spadají do oblastí konzervované syntenie (Musilova a kol., 2013).

Tab. 5: Koňské BAC konstrukty použité při fluorescenční *in situ* hybridizaci. prox = oblast proximální k TCR genu vzhledem k centromeře; dist = oblast distální k TCR genu vzhledem k centromeře; (*) BAC konstrukty použité při mapování TCR genů

BAC klon	TCR lokus	ECA chromozom	Pozice (bp, dle NCBI – EquCab2.0)
CH241-428K2(*)	<i>TRA/TRD</i>	1q	158 784 876 – 159 016 735
CH241-26N23(*)	<i>TRB</i>	4q	95 446 801 – 95 682 553
CH241-12H15(*)	<i>TRG</i>	4p	9 549 123 – 9 788 129
CH241-302L24	<i>TRA/TRD</i> prox	1q	158 053 053 – 158 313 396
CH241-252P17	<i>TRA/TRD</i> dist	1q	160 995 178 – 161 264 251
CH241-250H15	<i>TRB</i> prox	4q	94 515 516 – 94 761 181
CH241-420O5	<i>TRB</i> dist	4q	96 253 142 – 96 477 235
CH241-290P1	<i>TRG</i> prox	4p	9 937 734 – 10 207 909
CH241-366E24	<i>TRG</i> dist	4p	8 097 256 – 8 342 822

Při určování frekvencí výskytu ilegitimních přestaveb mezi TCR geny pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace u vybraných zástupců čeledi koňovitých byly použity malovací sondy pro koňský chromozom (ECA) 1q, 4, 4p a 4q a chromozom 4p zebry Hartma-



Obr. 13: Fyzické mapování TCR lokusů pomocí FISH s využitím BAC konstruktů na chromozomech koně (ECA), osla (EAS), zebry stepní (EBU), zebry Grévyho (EGR) a zebry Hartmannové (EZH). Jednotlivé chromozomy jsou obarveny DAPI a černobílý snímek je invertován. Hybridizační signály svítí červeně. Nalevo od každého chromozomu jsou schématické diagramy znázorňující G-pruhované chromozomy u koně a oblasti homologní ke koňským chromozomům u ostatních zástupců čeledi koňovitých (tmavě šedá). Šipky označují pozici a orientaci TCR genů na chromozomu (Drbalova a kol., 2014).

nnové (EZH4p), který je homologní k ECA4p a ECA31 (viz dále). Všechny tyto sondy byly získány metodou laserové mikrodisekce v naší laboratoři.

S výjimkou vzorků zebry Hartmannové byly preparáty lymfocytů periferní krve u všech vyšetřovaných zvířat hybridizovány ve dvou kolech. Nejdříve bylo použito dvojice malovacích sond pro ECA1q (značeno Spectrum Green) a ECA4 (Spectrum Orange). Poté byly vzorky rehybridizovány sondami ECA4p (Spectrum Orange) a ECA4q (Spectrum Green). Vzhledem k tomu, že u zástupců oslů a zeber došlo během evoluce k fúzi chromozomů homologních k ECA4p a ECA31, byla u těchto zvířat do hybridizační směsi přidána také sonda pro EZH4p (Spectrum Orange). Při FISH vzorků zebry Hartmannové jsme použili kombinaci sond pro ECA4 a EZH4p (obě Spectrum Orange) a ECA1q a 4q (obě Spectrum Green). Výsledkem byla trojbarevná FISH. V důsledku toho, že sonda pro ECA4q nepokrývala pericentrickou oblast chromozomu, oblast odpovídající ECA4q u zebry Hartmannové na EZH1q se vybarvovala žlutě s červenou terminální částí (obr. 14 u-w).

Pro ověření míst zlomů v chromozomových přestavbách ve vzorcích koní bylo využito BAC klonů, které byly získány z Children's Hospital of Oakland Research Institute (CHORI) (tab. 5). Jedna z dvojice translokačních sond byla značena digoxigenin-11-dUTP, druhá biotin-16-dUTP a k detekci jsme použili protilátky anti-digoxigenin-rhodamine a fluorescein avidin.

Metafázní chromozomy s jednotlivými typy ilegálních přestaveb mezi TCR geny u vybraných zástupců čeledi koňovitých znázorňuje obr. 14.

Hodnoty frekvence výskytu ilegálních rekombinací v TCR genech u zástupců koňovitých shrnuje tab. 6. Od každého jedince bylo vyšetřeno 5 000 metafázních buněk s výjimkou jedné zebry Hartmannové, u které bylo z důvodu nedostatku materiálu vyšetřeno pouze 3 474 mitóz. Snahou bylo do studie zahrnout alespoň 5 jedinců od každého vyšetřovaného druhu, což však nebylo splněno v případě osla divokého (2 zvířata) a zebry Hartmannové (4 zvířata). Důvodem byl jednak nedostatek dodaných vzorků – obtížná manipulace s divokými zvířaty limituje odběr krve pouze pro účely experimentů, ale také neúspěšná kultivace plné krve v případě některých jedinců.

Výskyt translokací mezi lokusy *TRA/TRD* a *TRB* vykazoval vysokou variabilitu v rámci všech vyšetřovaných druhů, s nejvyšší průměrnou hodnotou u zebry stepní ($53,0 \cdot 10^{-4}$) a nejnižší u zebry Hartmannové ($3,8 \cdot 10^{-4}$). V porovnání s ostatními zástupci koňovitých byla frekvence výskytu této přestavby významně vyšší u zebry stepní ($P < 0,01$) a nižší u zebry Hartmannové ($P < 0,05$). Frekvence výskytu ilegální přestavby mezi *TRA/TRD* a *TRG* lokusy se pohybovala mezi $14,4 \cdot 10^{-4}$ u koně a $22,2 \cdot 10^{-4}$ u zebry

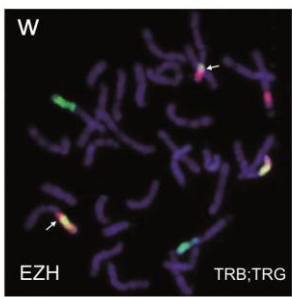
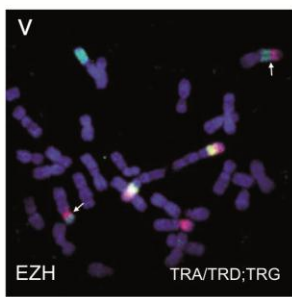
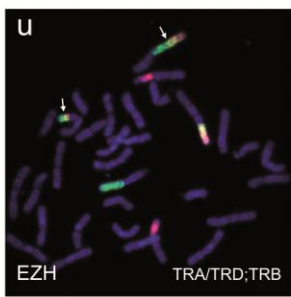
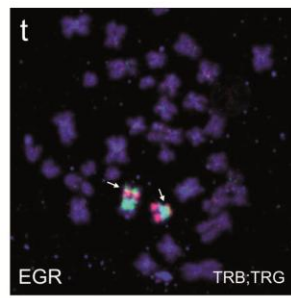
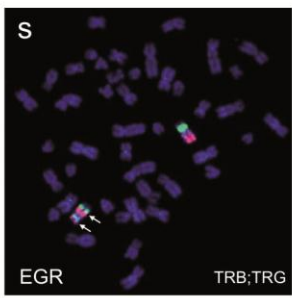
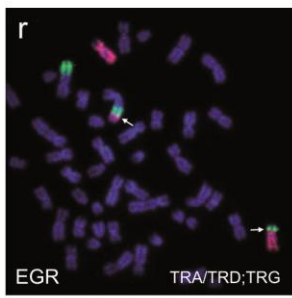
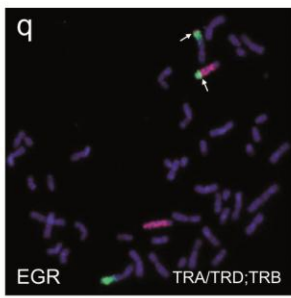
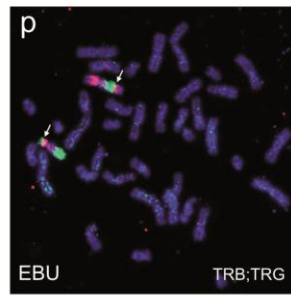
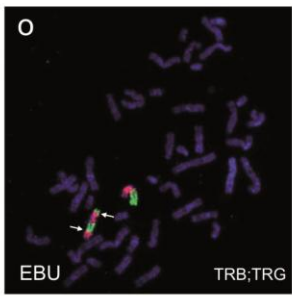
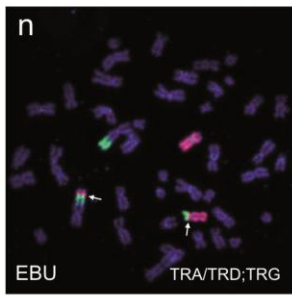
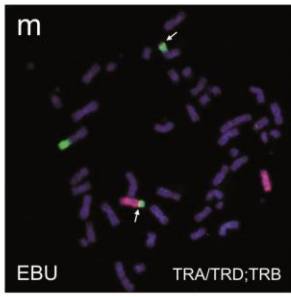
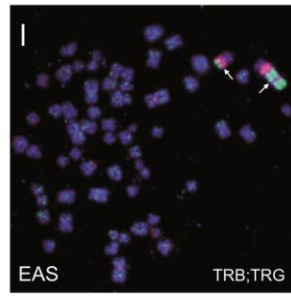
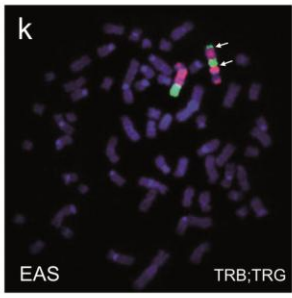
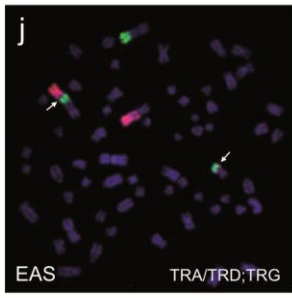
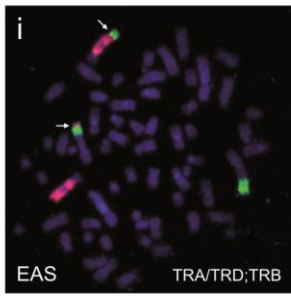
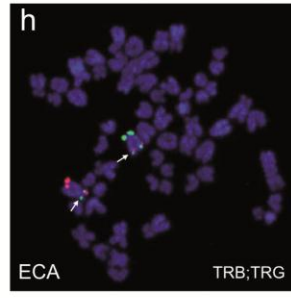
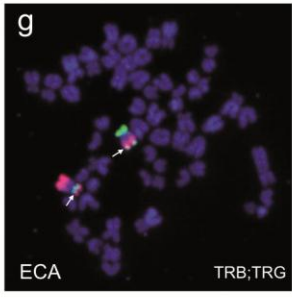
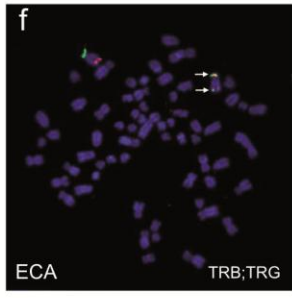
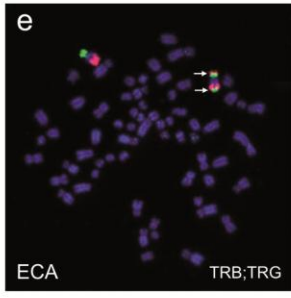
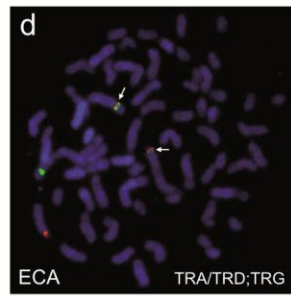
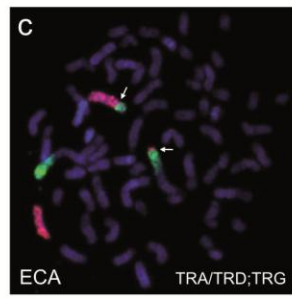
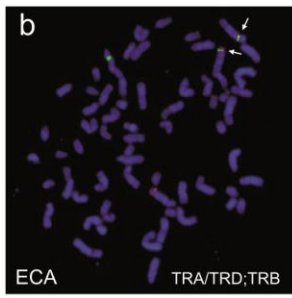
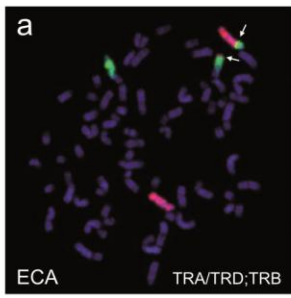
Hartmannové. Neshledali jsme významné rozdíly mezi jednotlivými vyšetřovanými druhy. Chromozomové přestavby mezi geny *TRB* a *TRG* se v rámci vyšetřovaných zástupců čeledi koňovitých vyskytovaly ve významně nižší frekvenci u zebry Hartmannové ($1,1 \cdot 10^{-4}$; $P < 0,05$) (obr. 15). Zajímavý je významně vyšší ($P < 0,001$) výskyt translokace mezi *TRA/TRD* a *TRB* u dvou jedinců divokého osla afrického v porovnání se skupinou 5 oslů domácích. K vyvození definitivního závěru by však bylo třeba rozšířit soubor vyšetřených jedinců.

Při porovnání frekvence výskytu jednotlivých typů ilegitimních přestaveb mezi TCR geny u zástupců jednoho druhu jsme pozorovali statisticky významné rozdíly. U zebry stepní byl výskyt translokace mezi *TRA/TRD* a *TRB* lokusy významně vyšší ($P < 0,01$) než v případě přestaveb zahrnujících lokus *TRG*. Mezi zástupci osla domácího se ve významně nižší míře ($P < 0,05$) vyskytovaly přestavby mezi *TRB* a *TRG*. U zástupců zebry Hartmannové jsme pozorovali významně nižší ($P < 0,05$) výskyt chromozomových přestaveb zahrnujících lokus *TRB*.

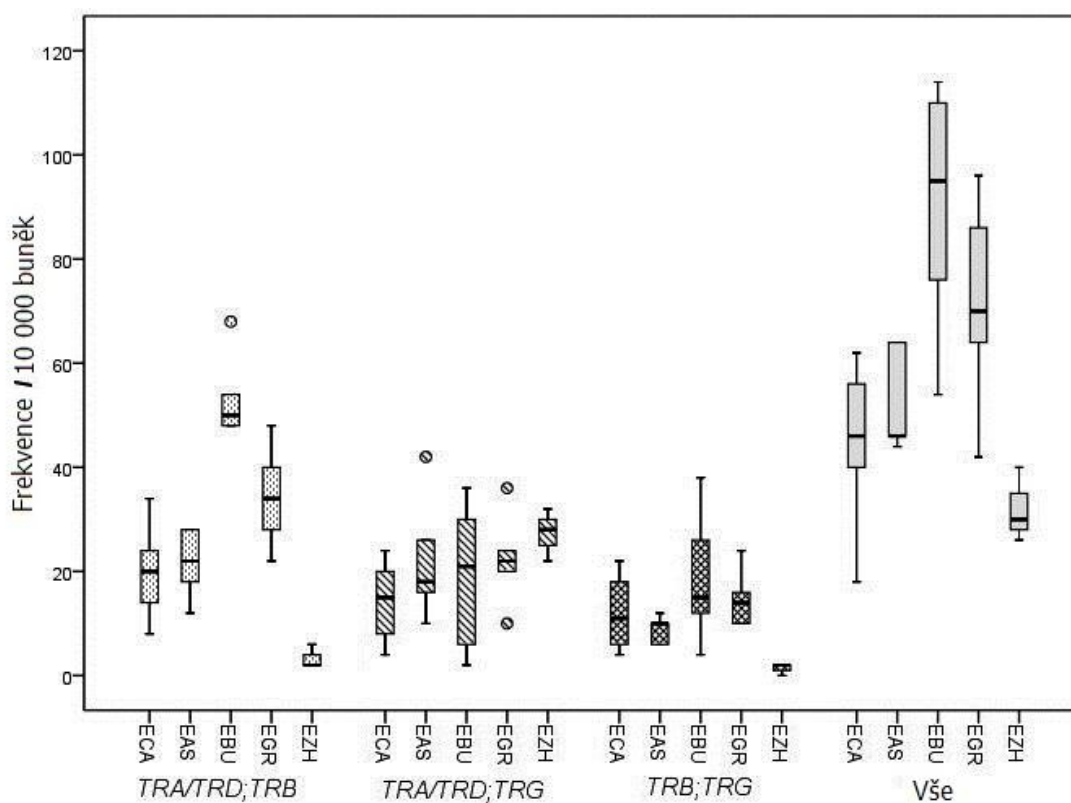
Ilegitimní přestavby mezi *TRB* a *TRG* lokusy u druhů, u nichž jsou oba tyto geny lokalizovány na stejném chromozomu, mohou být pozorovány buď jako inverze (paracentrická či pericentrická), anebo jako translokace mezi homologními chromozomy (obr. 15). Ve většině případů námi zaregistrovaných přestaveb tohoto typu šlo o inverze. Translokace mezi homologními chromozomy se vyskytovaly pouze v 10 % (6/58) těchto pozorovaných přestaveb u koně, v 9 % (2/22) u osla domácího, ve 13 % (7/55) u zebry stepní a ve 3 % (1/37) u zebry Grévyho. Frekvence výskytu inverzí byla tedy významně vyšší ($P < 0,01$).

Pro ověření zlomových míst bylo u části preparátů koně domácího ve třetím kole FISH využito jako translokačních sond rozdílně značených BAC konstruktů lemujících TCR lokusy (obr. 14). Celkem bylo ověřeno 33 translokací s místy zlomu v *TRA/TRD* a *TRB*, 16 translokací s místy zlomu v *TRA/TRD* a *TRG* a v rámci přestaveb mezi *TRB* a *TRG* lokusy 14 inverzí a 3 translokace mezi homologními chromozomy. Pouze jedna translokace mezi *TRA/TRD* a *TRB* vykazovala jiné místo zlomu než v *TRA/TRD*.

Při vyšetřování metafázních chromozomů lymfocytů periferní krve vybraných zástupců čeledi koňovitých jsme detekovali také přestavby zahrnující kromě chromozomu nesoucího geny pro T-buněčné receptory také jiný chromozom. V preparátech koně domácího se jednalo o 46 takovýchto translokací zahrnujících ECA1q (frekvence výskytu $9,2 \cdot 10^{-4}$) a 17 translokací zahrnujících ECA4 ($3,4 \cdot 10^{-4}$). S využitím BAC konstruktů (viz výše) jsme



Obr. 14: Chromozomové přestavby s místy zlomů v TCR genech detekované pomocí FISH na metafázních chromozomech lymfocytů periferní krve u koně (ECA), osla (EAS), zebry stepní (EBU), zebry Grévyho (EGR) a zebry Hartmannové (EZH). Při FISH bylo použito a), c), i), j), m), n), q), r) malovacích sond pro ECA1q (zeleně) a ECA4 (červeně); b) BAC konstruktů lemujících koňský *TRA/TRD* (zeleně) a *TRB* (červeně); d) BAC konstruktů lemujících equinní *TRA/TRD* (zeleně) a *TRG* (červeně); e), g), s), t) malovacích sond pro ECA4p (zeleně) a ECA4q (červeně); f), h) BAC konstruktů lemujících equinní *TRG* (zeleně) a *TRB* (červeně); k), l), o), p) malovacích sond pro ECA4p (červeně) a ECA4q (zeleně); u), v), w) malovacích sond pro ECA1q (zeleně), ECA4 (červeně), EZH4p (červeně) a ECA4q (žlutě a červeně). Ilegitimní přestavba mezi *TRB* a *TRG* u koně, osla, zebry stepní a zebry Grévyho může být pozorována jako e), f), o), s) pericentrická inverze, k) paracentrická inverze nebo g), h), l), p), t) translokace mezi homologními chromozomy. Místa zlomů jsou označena šipkami (upraveno dle Drbalova a kol., 2014).



Obr. 15: Boxplot znázorňující frekvence výskytu ilegitimních přestaveb u u koně (ECA), osla domácího (EAS), zebry stepní (EBU), zebry Grévyho (EGR) a zebry Hartmannové (EZH). Horizontální linie uvnitř každého boxu reprezentuje hodnotu mediánu, výška každého boxu odpovídá 25-75 % rozsahu dat, horní a spodní linie prodloužení představují min. a max. hodnoty (upraveno dle Drbalova a kol., 2014).

Tab. 6: Frekvence výskytu ilegitimních přestavby mezi TCR geny v kulturách periferních lymfocytů u vybraných zástupců čeledi koňovitých

Druh	Vyšetřených jedinců	Vyšetřených mitóz	Počet				Frekvence /10 000 buněk			
			Typ ilegitimní přestavby				Typ ilegitimní přestavby			
			TRA/D; TRB	TRA/D; TRG	TRB; TRG	Celkem	TRA/D; TRB	TRA/D; TRG	TRB; TRG	Celkem
Kůň	10	50 000	99	72	57	228	19,8	14,4	11,4	45,6
Osel domácí	5	25 000	54	56	22	132	21,6	22,4	8,8	52,8
Osel africký	2	10 000	51	23	6	80	51,0	23,0	6,0	80,0
Zebra stepní	6	30 000	159	58	55	272	53,0	19,3	18,3	90,7
Zebra stepní *	1	5 000	39	18	9	66	78,0	36,0	18,0	132,0
Zebra Grévyho	5	25 000	86	56	37	179	34,4	22,4	14,8	71,6
Zebra Hartmannové	4	18 474	5	44	2	51	2,7	23,8	1,1	27,6

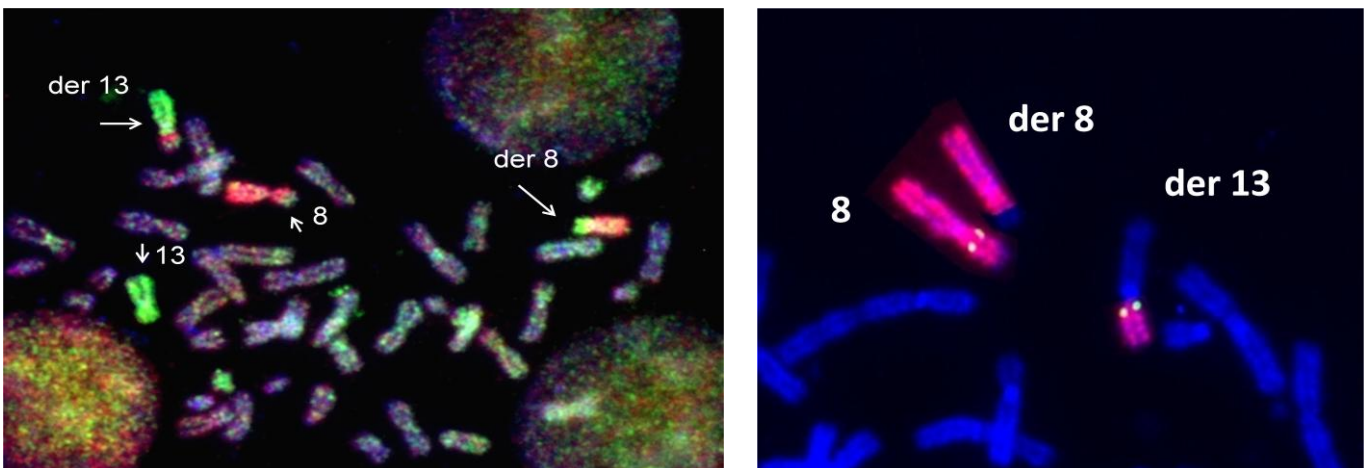
* nositelka translokace t(8;13)(p;p)

potvrdili místo zlomu v *TRA/TRD* lokusu u 8/14 translokací zahrnujících ECA1q. V případě 16 translokací zahrnujících koňský chromozom 4 však nebylo potvrzeno ani jedno místo zlomu v TCR genu. Nicméně oblasti chromozomu označeného malovací sondou translokované na neobarvený chromozom v případě splítu v lokusu *TRB* nebo *TRG* jsou velmi krátké a mohou tedy být snadno přehlédnuty.

V průběhu vyšetřování preparátů zeber stepních jsme narazili na jedince samičího pohlaví nesoucího konstituční (vrozenou) de novo translokaci t(8;13)(p;p) (obr. 16a). Následným vyšetřením potomstva jsme tuto translokaci odhalili také u potomka samičího pohlaví a v další generaci u potomka samčího pohlaví této nositelky translokace. Hybridizací s využitím BAC klonu CH241-290P1 (tab. 5) pro oblast proximálně od *TRG* vzhledem k centromeře jsme vyloučili místo zlomu v *TRG* lokusu (obr. 16b). Tato přestavba však vyústila v přemístění *TRG* na derivovaný chromozom 13. Porovnání frekvence výskytu jednotlivých typů ilegitimních přestaveb mezi TCR geny u této probandky (tab. 6) a ve skupině vyšetřených zeber stepních odhalilo zvýšený výskyt chromozomových přestaveb zahrnujících lokus *TRA/TRD* u nositelky translokace t(8;13)(p;p) ($P < 0,05$).

a)

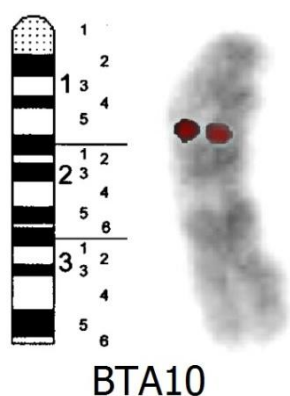
b)



Obr. 16: Metafázní chromozomy zebry stepní (EBU) nesoucí konstituční translokaci t(8;13)(p;p) nahybridizované a) malovacími sondami pro EBU8 (červeně) a EBU13 (zeleně) a b) BAC klonem pro oblast proximálně od *TRG* vzhledem k centromeře (žlutě) spolu s malovací sondou pro EBU8 (červeně).

4.3 Ilegitimní přestavby mezi TCR geny u skotu a ovcí

S využitím lokus-specifické sondy zkonstruované na základě znalosti publikované sekvence pro bovinní *TRA* (viz Materiál a metody) jsme cytogeneticky zmapovali gen *TRA/TRD* u skotu (*Bos taurus*) (obr. 17). Bovinní *TRA/TRD* lokus byl lokalizován do oblasti 10q15-q21.



Obr. 17: Fyzické mapování *TRA/TRD* lokusu pomocí FISH s využitím lokus-specifické sondy (červeně) u skotu (BTA). Chromozom je obarven DAPI a černobílý snímek je invertován. Nalevo od chromozomu je schématický diagram znázorňující G-pruhovaný chromozom BTA10.

Při určování frekvencí výskytu chromozomových přestaveb mezi TCR geny pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace u skotu (*Bos taurus*) a ovcí (*Ovis aries*) byly použity malovací sondy pro bovinní chromozom (BTA) 4 (Spectrum Orange) a 10 (Spectrum Green) (obr. 18) získané metodou laserové mikrodisekce v naší laboratoři a nepřímou značené BAC konstrukty z Children's Hospital of Oakland Research Institute (CHORI) (tab. 7).

Pro určení výskytu recipročních translokací zahrnujících *TRA/TRD* lokus jsme použili dvoubarevnou FISH s využitím malovacích sond. Vzhledem k vzájemné poloze a vzdálenosti lokusů *TRB*, *TRG1* a *TRG2* bychom však tímto postupem nebyli schopni rozeznat jednotlivé přestavby mezi těmito TCR geny, proto bylo přistoupeno k použití pětice BAC klonů (tab. 7 s výj. CH240-131E4, obr. 19a). Analyzovány byly pouze metafázní buňky s dostatečně protaženými chromozomy, na kterých byly fluorescenční signály navzájem odlišitelné. Tyto metafázní buňky byly vybírány ze snímků předhledaných skenovacím systémem skel Metafer nasnímaných pod filtrem pro DAPI při zvětšení 10x. Sporné nálezy byly rehybridizovány dvojicí BAC konstruktů CH240-131E4 (*TRG1* dist) a CH240-165L5 (*TRB* prox) (tab. 7, obr. 19b). Tímto způsobem jsme z důvodu časové náročnosti a velké spotřeby materiálu vyšetřili pouze 6 615 mitóz od 7 jedinců skotu.

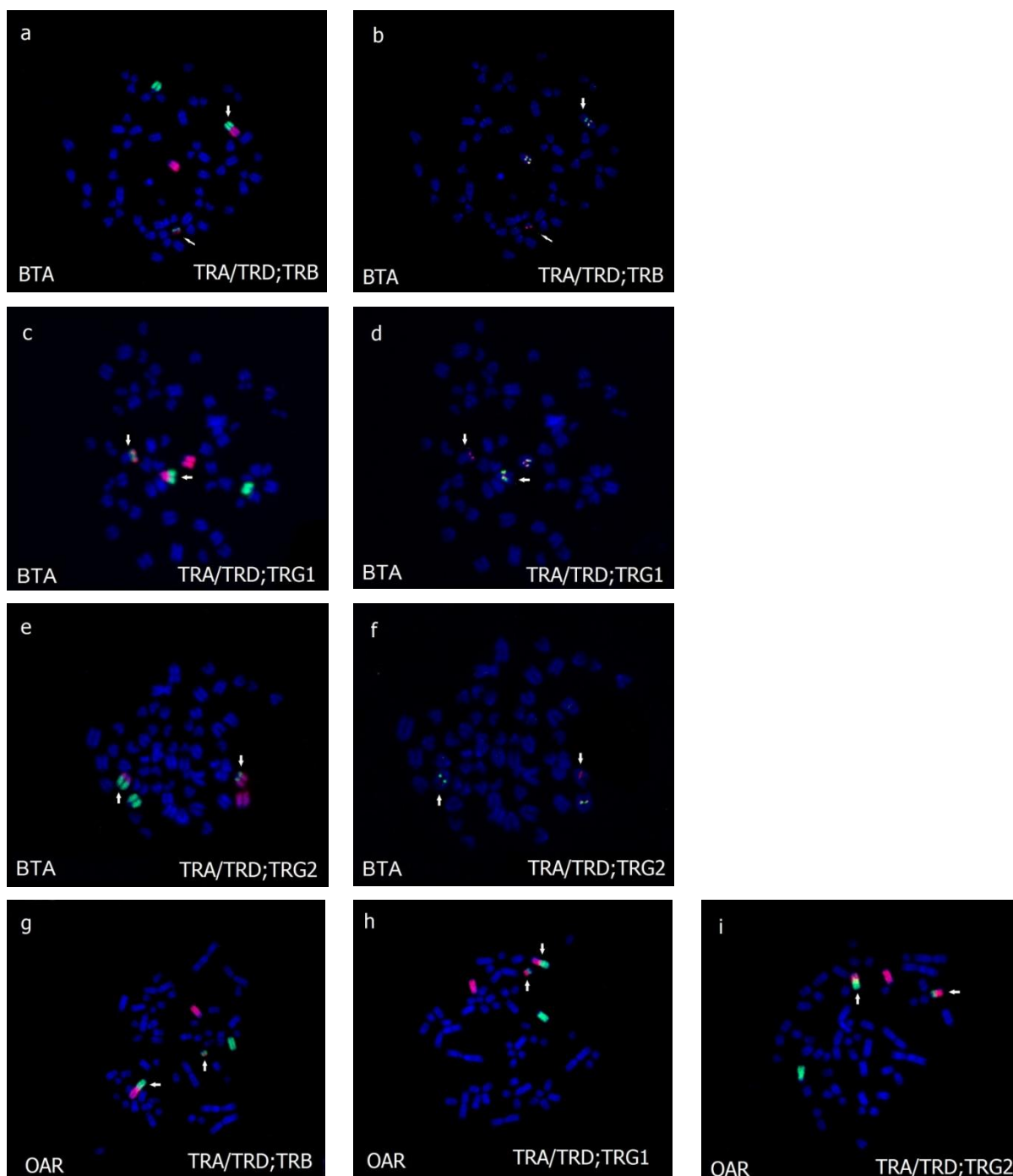
Tab. 7: Bovinní BAC konstrukty použité při fluorescenční *in situ* hybridizaci. prox = oblast proximálně od TCR genu vzhledem k centromere; dist = oblast distálně od TCR genu vzhledem k centromere

BAC klon	TCR lokus	BTA chromozom	Pozice (bp, dle NCBI)
CH240-507G24	<i>TRB</i> prox	4q (distálně*)	108 307 053-108 524 311
CH240-165L5	<i>TRB</i> prox	4q (distálně*)	107 719 630-107 946 542
CH240-78N6	<i>TRB</i> dist	4q (distálně*)	109 891 967-110 151 372
CH240-291I10	<i>TRG1</i> prox	4q (intersticiálně*)	84 758 228-84 945 848
CH240-131E4	<i>TRG1</i> dist	4q (intersticiálně*)	85 411 176-85 633 814
CH240-422L18	<i>TRG2</i> prox	4q (proximálně*)	51 515 031-51 705 633
CH240-161F9	<i>TRG2</i> dist	4q (proximálně*)	52 105 841-52 332 947

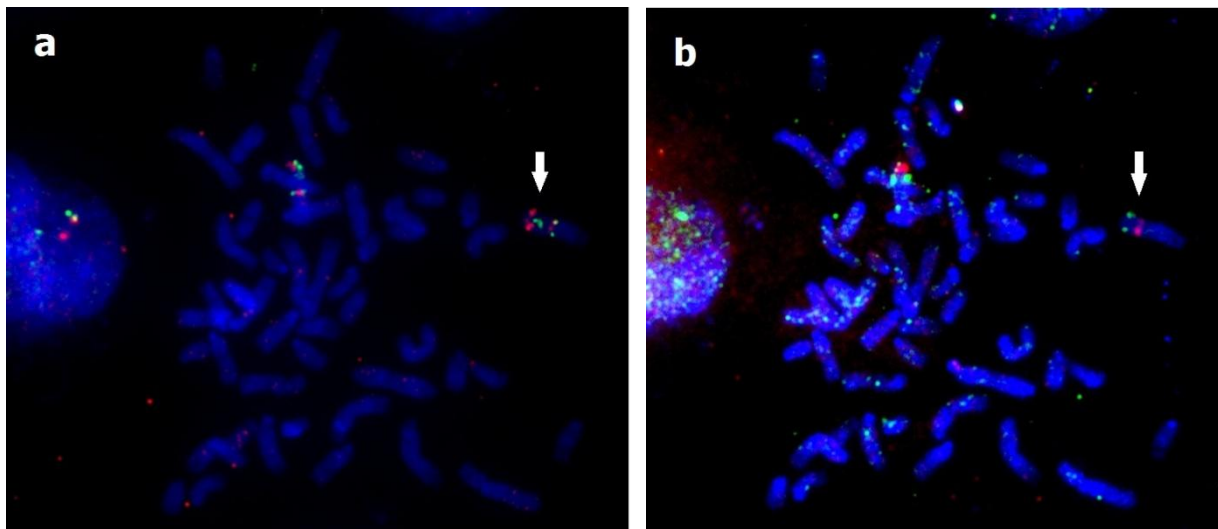
* lokalizace vzhledem k centromere

Pro ověření míst zlomů v ilegitimních přestavbách mezi *TRA/TRD* a ostatními TCR geny v některých preparátech bylo ve 2. kole FISH využito signál-segregační strategie (obr. 18b, d, f). Jeden z dvojice BAC klonů byl značen digoxigenin-11-dUTP, druhý biotin-16-dUTP a k detekci byly použity protilátky anti-digoxigenin-rhodamine a fluorescein avidin. Takto jsme u skotu potvrdili celkem 53 translokací, z nichž 46 obsahovalo místo zlomu v *TRG2*, 5 přestaveb vykazovalo místo zlomu v *TRB* a 2 zbylé v *TRG1*. Ve vzorcích ovcí jsme tímto způsobem potvrdili jedenkrát místo zlomu v *TRG2*.

Metafázní chromozomy s jednotlivými typy ilegitimních přestaveb zahrnujících *TRA/TRD* lokus u zástupců skotu a ovcí znázorňuje obr. 18. Frekvence výskytu nelegitimních rekombinací zahrnujících *TRA/TRD* lokus u skotu a ovcí shrnuje tab. 8. Od každého jedince bylo vyšetřeno 5 000 metafázních buněk s výjimkou jednoho zástupce skotu (4455 vyšetřených mitóz) a jedné ovce (2105 mitóz) z důvodu nedostatku materiálu. Porovnáním nálezů v kulturách stimulovaných různými mitogeny (PWM a PHA) ani u věkově rozdílných skupin jedinců nebyly zjištěny významné rozdíly. V 6 615 metafázních buňkách skotu jsme detekovali celkem dvě přestavby mezi *TRB* a *TRG1* ($0,3 \cdot 10^{-4}$) a jednu inverzi mezi *TRG1* a *TRG2* ($0,2 \cdot 10^{-4}$). Tyto výsledky naznačují, že nelegitimní přestavby mezi *TRB*, *TRG1* a *TRG2* se u skotu vyskytují ve velmi malé míře.



Obr. 18: Chromozomové přestavby s místy zlomů v TCR genech detekované pomocí FISH na metafázních chromozomech lymfocytů periferní krve u skotu (BTA) a ovce (OAR). Při FISH bylo použito a), c), e), g), h), i) malovacích sond pro BTA4 (červeně) a BTA10 (zeleně); b) BAC konstruktů lemujících bovinní *TRA/TRD* (žlutě) a *TRB* (žlutě); d) BAC konstruktů lemujících bovinní *TRG1* (žlutě) a *TRG2* (žlutě); f) BAC konstruktů lemujících bovinní *TRG2* (žlutě). V případě pozitivního nálezu při použití BAC konstruktů došlo k rozchodu signálů, pozorovali jsme tedy jeden červený a jeden zelený signál. Šipky označují místa zlomů.



Obr. 19: Inverze mezi lokusy *TRB* a *TRG1* na metafázních chromozomech skotu (BTA) hybridizovaných a) pěticí BAC konstruktů CH240-422L18 (zeleně), CH240-161F9 (červeně), CH240-291I10 (zeleně), CH240-507G24 (zeleně) a CH240-78N6 (červeně); b) BAC konstrukty CH240-131E4 (zeleně) a CH240-165L5 (červeně). Šipky označují chromozom nesoucí chromozomovou aberaci.

U skotu i ovcí frekvence výskytu nelegitimních přestaveb mezi *TRA/TRD* a *TRG2* významně převyšuje zjištěné hodnoty u ostatních možných typů přestaveb mezi TCR lokusy ($P < 0,01$). Porovnáním frekvencí výskytu translokací zahrnujících *TRA/TRD* lokus u skotu a ovcí jsme nezaznamenali signifikantní rozdíl.

Během vyšetřování metafázních chromozomů skotu jsme detekovali 19 translokací chromozomu BTA10 nesoucího *TRA/TRD* lokus s jiným chromozomem (frekvence výskytu $2,4 \cdot 10^{-4}$) a 2 translokace chromozomu BTA4 s jiným nedefinovaným chromozomem (frekvence výskytu $0,3 \cdot 10^{-4}$). U ovcí bylo nalezeno 6 translokací chromozomu 7 nesoucího lokus *TRA/TRD* s neobarveným chromozomem ($2,2 \cdot 10^{-4}$) a 3 translokace zahrnující chromozom 4 nesoucí lokusy *TRB*, *TRG1* a *TRG2* ($1,1 \cdot 10^{-4}$).

Skot i ovce reprezentují živočišný druh s vysokým zastoupením $\gamma\delta$ T lymfocytů. V rámci naší studie jsme s využitím průtokové cytometrie určili zastoupení $\gamma\delta$ T lymfocytů v plné krvi i v buněčných kulturách po stimulaci mitogenem u 7 mladých jedinců (9 měsíců) a 2 starších zástupců tura domácího a u 6 ovcí, z toho ve dvou případech šlo o 5denní mláďata. U mladších jedinců jsme pozorovali vyšší zastoupení $\gamma\delta$ T lymfocytů (11,5-18,5 % v plné krvi u skotu; 2,8 % v plné krvi u ovcí) než u starších zvířat (1,7-2,8 % v plné krvi u skotu; 0,2-1,6 % v plné krvi u ovcí).

Tab. 8: Frekvence výskytu ilegitimních přestavby mezi *TRA/TRD* a ostatními TCR geny v kulturách periferních lymfocytů u skotu a ovcí.

Srovnání a) kultur stimulovaných různými mitogeny (PHA a PWM), b) skupin mladých a starých zvířat.

a)

				Počet				Frekvence /10 000 buněk			
				Typ ilegitimní přestavby				Typ ilegitimní přestavby			
Druh	Vyšetřených jedinců	Mitogen	Vyšetřených mitóz	TRA/D; TRB	TRA/D; TRG1	TRA/D; TRG2	Vše	TRA/D; TRB	TRA/D; TRG1	TRA/D; TRG2	Vše
Skot	7	PHA	35 000	1	1	44	46	0,3	0,3	12,6	13,1
	16	PWM	79 455	5	3	133	141	0,6	0,4	16,7	17,7
Ovce	4	PHA	17 105	0	1	26	27	0,0	0,6	15,2	15,8
	2	PWM	10 000	1	1	14	16	1,0	1,0	14,0	16,0

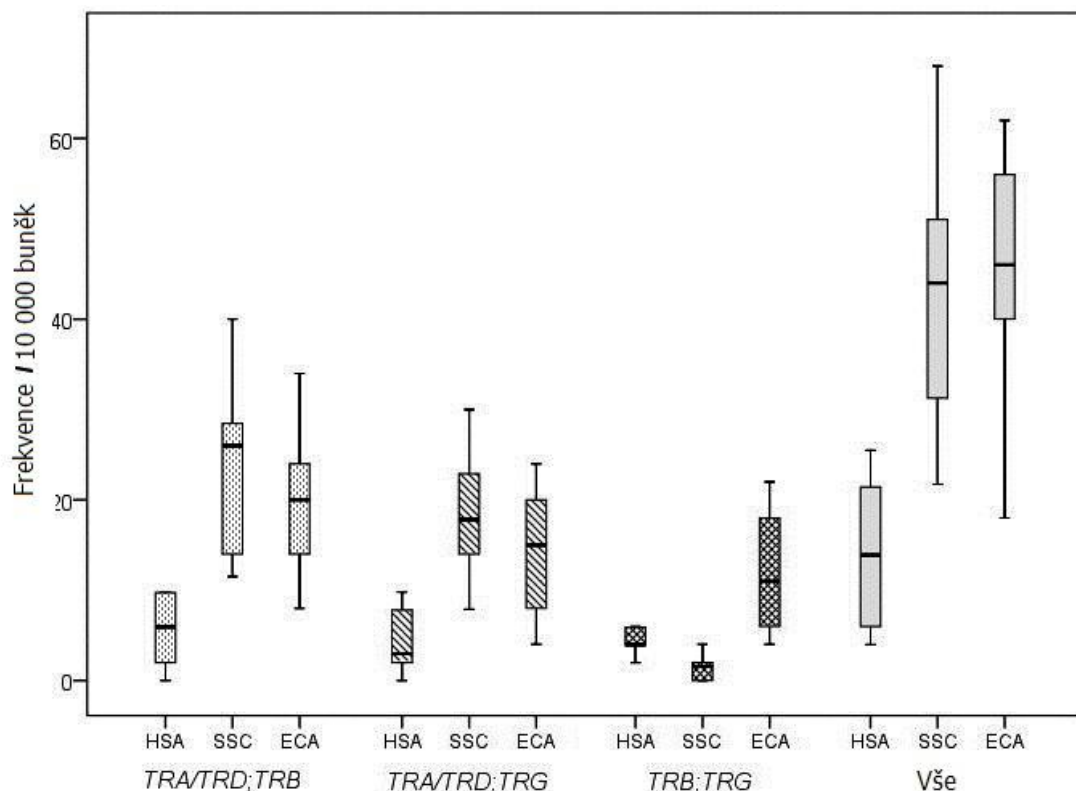
b)

				Počet				Frekvence /10 000 buněk			
				Typ ilegitimní přestavby				Typ ilegitimní přestavby			
Druh	Vyšetřených jedinců	Věk	Vyšetřených mitóz	TRA/D; TRB	TRA/D; TRG1	TRA/D; TRG2	Vše	TRA/D; TRB	TRA/D; TRG1	TRA/D; TRG2	Vše
Skot	8	> 9 m.	39 455	3	2	74	79	0,8	0,5	18,8	20,0
	8	< 9 m.	40 000	2	1	59	62	0,5	0,3	14,8	15,5
Ovce	3	5-7 let	12 105	0	1	21	22	0,0	0,8	17,3	18,2
	2	5 dní	15 000	1	1	19	21	0,7	0,7	12,7	14,0

4.4 Ilegitimní přestavby v TCR genech – mezidruhové srovnání

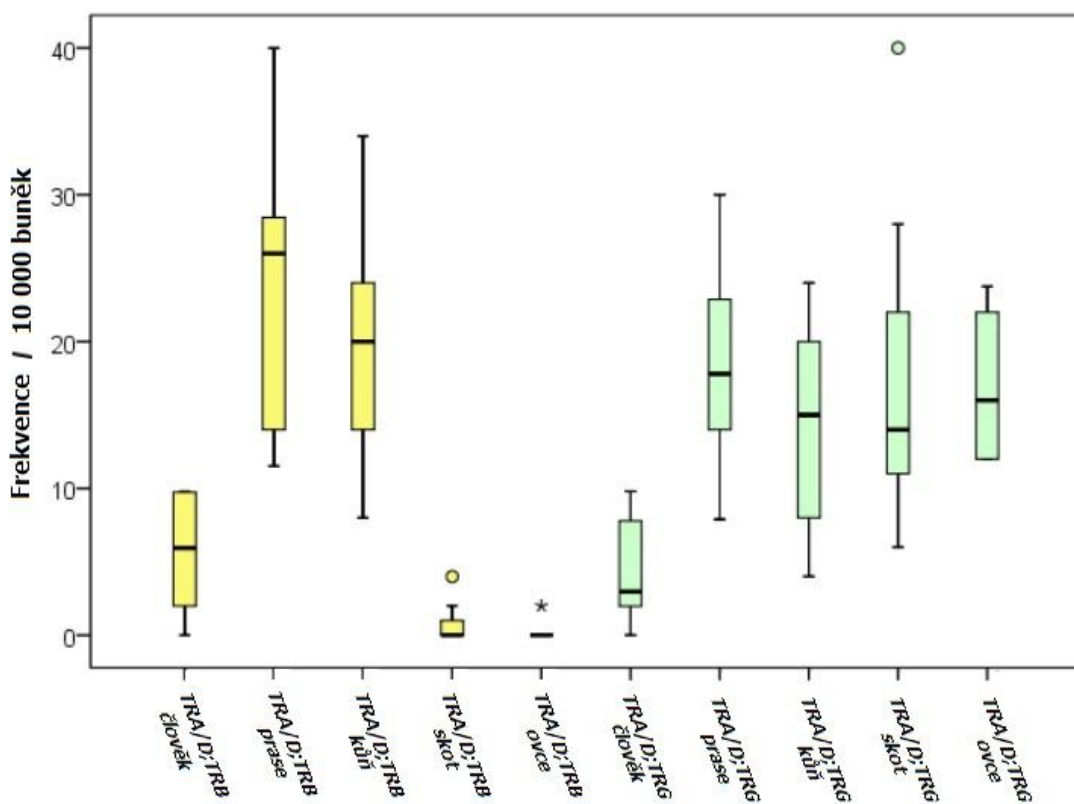
V naší studii frekvence výskytu translokací zahrnujících *TRA/TRD* lokus u prasete domácího významně převyšovala frekvence výskytu odpovídajících přestaveb u lidí ($P < 0,01$). Podobně jsou také hodnoty u všech tří typů přestaveb u zástupců koně domácího významně vyšší v porovnání s nálezy u člověka ($P < 0,01$). U koní jsme jedinou odlišností od prasat zaznamenali ve vyšší frekvenci nelegitimních rekombinací mezi *TRB* a *TRG* lokusy ($P < 0,01$) (obr. 20).

Výsledky získané vyšetřením preparátů skotu a ovcí naznačují, že výskyt ilegitimní rekombinace mezi *TRA/TRD* a *TRG2* odpovídá výskytu translokace mezi *TRA/TRD* a *TRG* u prasat a koní a je tedy významně vyšší než u člověka ($P < 0,01$). Na druhou stranu frekvence výskytu přestavby mezi *TRA/TRD* a *TRG1* je významně nižší ($P < 0,01$) jak ve srovnání s frekvencí výskytu přestavby mezi *TRA/TRD* a *TRG2* v rámci druhu, tak ve srovnání



Obr. 20: Boxplot znázorňující frekvence výskytu ilegitimních přestaveb u člověka (HSA), prasete domácího (SSC) a koně (ECA). Horizontální linie uvnitř každého boxu reprezentuje hodnotu mediánu, výška každého boxu odpovídá 25-75 % rozsahu dat, horní a spodní linie prodloužení představují min. a max. hodnoty (upraveno dle Drbalova a kol., 2014).

s frekvencí výskytu translokace mezi *TRA/TRD* a *TRG* u lidí, prasat i koní. Porovnáním frekvence výskytu součtu obou translokací zahrnujících *TRA/TRD* a lokusy *TRG1* a *TRG2* u skotu a ovcí s výskytem translokací mezi *TRA/TRD* a *TRG* u ostatních výše zmiňovaných druhů však získáme shodné výsledky jako v případě ilegitimní rekombinace mezi *TRA/TRD* a *TRG2* (obr. 21). Frekvence výskytu rekombinace mezi *TRA/TRD* a *TRB* je významně nižší ($P < 0,01$) ve srovnání s hodnotami u člověka, prasat a koní (obr. 21).



Obr. 21: Boxplot znázorňující frekvence výskytu ilegitimních přestavb zahrnujících lokus *TRA/TRD* u člověka, prasate domácího, koně, skotu a ovcí. Horizontální linie uvnitř každého boxu reprezentuje hodnotu mediánu, výška každého boxu odpovídá 25-75 % rozsahu dat, horní a spodní linie prodloužení představují min. a max. hodnoty. „*“ označuje extrémní hodnotu. U skotu a ovcí hodnoty „*TRA/D:TRG*“ představují součet frekvence výskytu přestavb mezi *TRA/TRD* a lokusy *TRG1* a *TRG2*.

4.5 Detekce hybridních TCR genů pomocí PCR

Hybridní TCR geny vzniklé ilegitimními přestavbami mezi segmenty V a J byly detekovány u prasete domácího (*Sus scrofa domestica*), koně (*Equus caballus*), osla domácího (*Equus asinus*), zebry stepní (*Equus burchelli*), zebry Grévyho (*Equus grevyi*), zebry Hartmannové (*Equus zebra hartmannae*) a skotu (*Bos taurus*) pomocí nested PCR, příp. semi-nested PCR (prase domácí). Primery (tab. 9) byly navrženy na základě těchto známých sekvencí TCR genů (NCBI):

- AB476299 (*Sus scrofa* germline T-cell receptor beta VDJC region genes) – forward (FW) primery pro *TRBV20-29*
- AB053451 (*Sus scrofa* DNA, constant regions and joining segments of T cell receptor alpha/delta chain) – reverse (REV) primery pro *TRDJ1-4*
- AY644518 (*Bos taurus* T cell receptor gamma cluster 2 gene) – forward primery pro *TRGV5, TRGV6*
- AY227782 (*Bos taurus* T cell receptor alpha gene, J segments and C region) – reverse primery pro *TRAJ1, TRAJ2, TRAJ31* a *TRAJ38*
- NC_009144 (*Equus caballus* isolate Twilight breed thoroughbred chromosome 1, EquCab2.0) – forward primery pro *TRAV*
- NC_009147 (*Equus caballus* isolate Twilight breed thoroughbred chromosome 4, EquCab2.0) – reverse primery pro *TRGJ*

V případě zástupců čeledi koňovitých byly srovnáním sekvencí všech identifikovaných variabilních segmentů *TRA* (*TRAV*) na chromozomu 1 a spojovacích segmentů *TRG* (*TRGJ*) na chromozomu 4 pomocí CLUSTALW nejprve nalezeny vysoce konzervované oblasti, ze kterých byly následně odvozeny použité primery.

Vyšetřeno bylo 7 jedinců prasete domácího, 18 zástupců skotu, 9 koní, 5 oslů domácích, 4 zebry stepní, 3 zebry Grévyho a 4 zebry Hartmannové.

U prasete domácího byl záchyt hybridních TCR genů nulový. V případě skotu jsme obdrželi specifický amplifikační produkt při použití dvou párů primerů - *TRGV5/TRAJ31* a *TRGV5/TRAJ38*. Byly sekvenovány a analyzovány 3 produkty různé velikosti. Všechny tyto rekombinační produkty obsahovaly fragment *TRGV5* o velikosti 130 bp, dva z nich zahrnovaly *TRAJ38* a zbylý *TRAJ31*.

Tab. 9: Primery použité při detekci hybridních TCR genů pomocí PCR

Druh	FW primery	REV primery
Prase	AGTTTCTCATCAGCCACCCAAACC	GAGTTACTTACGTGGTCCACAAC
	TGCCTCTGTGACCATCCAGTGCC	GTCCCTTTTCCAAAGATGAGTTTA
	AACTTCTAACATGGGCTCTAATGC	CACCCTGAGTTGAGTCCCATTTC
	TTATAACAGCGCCAAGTTTCTCAT	AGGTTCCACCCTGAGTTGAGTCCC
	AACTTCTAACATGGGCTCTAATGC	GCCAGCTCCAAAATACATCTGTCG
	TTATAACAGCGCCAAGTTTCTCAT	GGGCTCCACAAAGAGTTTGGTGCC
	GCCACAACATATGTTCTGGTATCAT	CACAAAGAGTTTGGTGCCAGCTCC
	AACTTCTAACATGGGCTCTAATGC	CTCCACAAAGAGTTTGGTGCCAGC
	AAACAGCGATTACAGCCGAGTGC	AATACATCTGTCCGGGTGTCCCAGG
	AAAGCAAAGATGGAGTGTGTCCCC	TTAACAAAGATAACTGCCAAATGC
	GGAAGAAGTTGGAAGAAGCATTGG	GTTCAACGTTTCAGATAGGTTTCCTT
	GCTATCTGGTCAAAGGAAAAGAAC	
	ATTGGTATTGGAAGAAGTTGGAAG	
	GCTATCTGGTCAAAGGAAAAGAAC	
	ATTGGTATTGGAAGAAGTTGGAAG	
	AAGGAAAAGAACAGAAAGCAAAGA	
	TGGATGCTGCTGTAACCCAGATCC	
	TCAGCCCTTACTTCTGTGCCAGC	
	CAAGGAACAAGATCACAAACACAG	
	TCCGGTCCATCTACTACTCCTATG	
	CAAGGAACAAGATCACAAACACAG	
	TCCGGTCCATCTACTACTCCTATG	
	TCACAAACACAGGGAAGATAACTG	
	TCCGGTCCATCTACTACTCCTATG	
	GTTACCAGACCCCAAGACACTGC	
	AGAAGCCGAATTTCCCCTTGATCC	
	TCCTGATGGCTACAATGTCTCTCG	
	GTTCTCAGAATATGGACCACGAC	
	CCAAAGCTGATCTACTTTTCAAGG	
	GTTCTCAGAATATGGACCACGAC	
	CCAAAGCTGATCTACTTTTCAAGG	
	TGTTCTCAGAATATGGACCACGAC	
	TCCAAAGCTGATCTACTTTTCAAG	
	ATGTTCTGGTATCGACAAGACCCG	
	GCACCAACCAGACATCTGTGTACC	
	AACTCCAGGATATCTGGTCAAAG	
	TCCATTTGTCATATGATGCTAACC	
	AACTCCAGGATATCTGGTCAAAG	
	TCCATTTGTCATATGATGCTAACC	
	CATGGATGCAAAGTAACTCAAAC	
GAATGTGTACCAGACATGAACCAC		
AGTTTCCCATTAGCCGCCAAACC		
ATTCTGACCGTGAGCAACGTGAGC		
GTAAGTGGTACCGTCAGCTTCTAGG		
CTTCTAGGACAAAGCTTGACACTG		
GTAAGTGGTACCGTCAGCTTCTAGG		
CTTCTAGGACAAAGCTTGACACTG		
CCTACATGTAAGTGGTACCGTCAGC		
CTTCTAGGACAAAGCTTGACACTG		

Tab. 9: Primery použité při detekci hybridních TCR genů pomocí PCR (*pokračování*)

Druh	FW primery	REV primery
Skot	ATACTGGGGAGACTGCTTCGTTCC	GCTCTGGCTTCAAAGGATTCTGCC
	AAATCTGCAAGCAAGTGATTCCG	TCCAATCTCCATGTGCCTGAGAGG
	AGTAATACTGGGGAGACTGCTTCG	TACCTGGAGTGATGGAGACTCTGG
	CTCAAAGGCTGTGCTTGAATCAGG	ACTCTGGTTCCCTTGCCAAACTGC
	TGGATTACGTCCACTGGTTCCGC	GGAGTGATGGAGACTCTGGTTCCC
	CTCTATCTAGCCTTGTCCAAGCGG	AGCGTGCCAGTCCCAAAGATGAGC
	GCAGTGGGATTCGGTCCTAAGAGG	AGTGCCTTTTCCAAAGATGAGC
		AGTCCCAAAGATGAGCTGGTTGGC
Kůň	ACATCACTGTCTCTGAAGGAGCC	AGAGGGAGTTACTATGAGCTTAGTCC
	TCTGAAGGAGCCCCTCTGGAGC	TACTATGAGCTTAGTCCCTTTTCC

U zástupců čeledi koňovitých (25 vyšetřených jedinců) bylo detekováno celkem 18 pozitivních amplifikačních produktů o velikosti cca 300 bp (7 z 9 koní, 5 z 5 oslů domácích, 2 ze 4 zeber stepních, 2 ze 3 zeber Grévyho, 2 ze 4 zeber Hartmannové). Tyto fragmenty byly sekvenovány a analyzovány pomocí BLAST. Zahrnovaly 3 různé variabilní segmenty *TRA* a 5 spojovacích segmentů *TRG*. Tyto segmenty *TRAV* byly lokalizovány v oblastech 159 412 kb, 159 545 kb a 160 242 kb na ECA1 (NC_009144) a segmenty *TRGJ* v oblastech 8 782 kb, 8 860 kb, 8 918 kb, 8 981 kb a 9 025 kb na ECA4 (NC_009147). Celkem bylo identifikováno 10 různých hybridních genů, přičemž u jednotlivých zvířat byly detekovány až 4 různé rekombinační produkty.

4.6 Genomová organizace *TRA* a *TRG* koně domácího (*Equus caballus*)

Za účelem určení genomové organizace *TRA* lokusu u koně domácího (*Equus caballus*) byla známá sekvence koňského chromozomu 1 (NC_009144) porovnána s mRNA sekvencemi *TRA* lokusu koně domácího (NCBI: L38315, L38316, L38355, L38383, L38400, L38401) s využitím BL2seq programu. Bylo identifikováno asi 30 oblastí odpovídajících segmentům V (73–94% podobnost) a 4 oblasti odpovídající segmentům J (91–98% podobnost). Porovnáním této sekvence se sekvencí bovinního *TRA* genu (AY227782) bylo navíc nalezeno 37 spojovacích segmentů (80–98% podobnost). Segmenty *TRAV* byly lokalizovány v oblasti 158 504–160 279 kb ECA1. Celkem bylo identifikováno 38 různých

segmentů *TRAJ* v oblasti 160 707–160 767 kb ECA1. Exony jediného segmentu *TRAC* (90–98% podobnost s L38383 sekvencí) byly nalezeny v oblasti 160 767–160 771 kb ECA1.

Dále byla analyzována sekvence NC_009147 koňského chromozomu 4 srovnáním s mRNA sekvencí *TRG* lokusu koně domácího (NCBI: L38392, L38393). Takto bylo identifikováno 14 oblastí odpovídajících konstantním segmentům (77–99% podobnost). Porovnání sekvence ECA4 se sekvencí ovčího *TRG1* (DQ992075) a *TRG2* (DQ992074) genu odhalilo ještě komplexnější strukturu zahrnující 17 segmentů C (77–81% podobnost), 19 segmentů V (64–78% podobnost) a 18 segmentů J (77–89% podobnost) uspořádaných v klastrech v oblasti 8 766–9 816 kb koňského chromozomu 4.

5. DISKUZE

V rámci této dizertační práce jsme určili frekvence výskytu nelegitimních chromozomových přestaveb mezi TCR geny v preparátech metafázních buněk metodou FISH u lidí, prasete domácího, prasete divokého, skotu, ovcí a vybraných zástupců čeledi koňovitých. U vyjmenovaných zvířecích druhů byly tyto frekvence zjišťovány vůbec poprvé.

V předchozích studiích využívajících metodu G-pruhování lidských chromozomů byly publikovány tyto hodnoty frekvence chromozomových přestaveb s místy zlomů v TCR lokusech – $3,1 \cdot 10^{-4}$ až $4,9 \cdot 10^{-4}$ u $t(7q;14)$, $2,6 \cdot 10^{-4}$ až $6,2 \cdot 10^{-4}$ u $t(7p;14)$ a $0,2 \cdot 10^{-4}$ až $3,7 \cdot 10^{-4}$ u $inv(7)$ (Hecht a kol., 1987; Prieur a kol., 1988; Tawn, 1988). Frekvence obou translokací mezi HSA7 a HSA14 se významně neliší od námi získaných výsledků (tab. 4). Pokud jde o nálezy $inv(7)$, naše výsledky odpovídají těm uvedeným Prieurem a kol. (1988) a Tawnem (1988), ve srovnání s hodnotami uváděnými Hechtem a kol. (1987) jsou však námi zjištěné hodnoty významně vyšší ($P < 0,001$) (tab. 4). Kromě použité metody se uvedené studie lišily také ve strategii. Hecht a kol. (1987) vyšetřili velké množství jedinců (2 595), ale jen omezený počet metafázních buněk jedince (ve většině případů 20). V naší studii bylo naopak analyzováno více než 5 000 metafázních buněk u každého jedince a vyšetřeno bylo celkem 6 jedinců (tab. 4). Prieur a kol. (1988) zahrnuli do své studie 8 jedinců, u nichž vyhodnotili celkem jen přibližně 9 000 metafázních buněk.

Porovnáním frekvencí nelegitimních rekombinací mezi geny pro T-buněčné receptory u různých živočišných druhů i v rámci jednoho druhu, případně celé čeledi, jsme odhalili některé z možných faktorů ovlivňujících jejich výskyt.

5.1 Subpopulace periferních T lymfocytů

Vzhledem k tomu, že prasata patří mezi živočišné druhy s vysokým zastoupením $\gamma\delta$ T lymfocytů v periferní krvi (tab. 1), bylo cílem naší studie zjistit, do jaké míry tato populace T lymfocytů přispívá k výskytu chromozomových přestaveb mezi TCR geny. Naše výsledky naznačují, že za zvýšený výskyt ilegitimních rekombinací zahrnujících *TRA/TRD* lokus v prasečích lymfocytech zodpovídají především $\alpha\beta$ T lymfocyty. Zatímco *TRB*, *TRD* a *TRG* geny jsou přeskupovány současně v průběhu maturace obou linií T lymfocytů (Capone a kol., 1998), *TRA* je přeskupován pouze u $\alpha\beta$ T lymfocytů (obr. 6). Dlouhodobá dostupnost

TRA/TRD lokusu k možné rekombinaci během maturace $\alpha\beta$ T lymfocytů se zdá být příčinou zvýšeného výskytu translokací zahrnujících tento lokus v prasečích metafázních buňkách exprimujících $\alpha\beta$ TCR oproti těm nesoucím $\gamma\delta$ TCR. Chromozomové přestavby s místy zlomu v TCR genech v populaci $\gamma\delta$ T lymfocytů u lidí a ostatních živočišných druhů nebyly dosud studovány.

U prasat bývá zastoupení periferních $\gamma\delta$ T lymfocytů udáváno až 50 % u mladých jedinců (4-12 měsíců) a tyto hodnoty postupně klesají u starších zvířat (Gerner a kol., 2009; Talker a kol., 2013; Yang a Parkhouse, 1996; Takamatsu a kol., 2006; Sedlak a kol., 2014). Rovněž skot a ovce jsou řazeny mezi druhy s vysokým zastoupením $\gamma\delta$ T lymfocytů. Dle Davise a kol. (1996) $\gamma\delta$ T lymfocyty představují až 60 % populace T lymfocytů periferní krve u telat, s nižším zastoupením (15 %) u starších zvířat. Také my jsme zaznamenali pokles procentuálního zastoupení této populace T lymfocytů u starších jedinců.

5.2 Věk vyšetřovaného jedince

Dle výsledků publikovaných Priurem a kol. (1988) jsou frekvence translokací nebo inverzí s místy zlomů v TCR genech vyšší u novorozenců v porovnání s hodnotami zjištěnými u dospělých. V této studii však bylo hodnoceno omezené množství metafázních buněk u každého jedince (celkem 9 000 vyšetřených buněk a 8 jedinců) a výsledky nebyly signifikantní. Práce založené na PCR detekci rekombinací mezi variabilními segmenty *TRG* a segmenty D-J lokusu *TRB* odpovídajících u lidí *inv(7)* zdokumentovaly mírný nárůst frekvence výskytu této přestavby od narození po dospělost a následný pokles se zvyšujícím se věkem (Ballinger a kol., 2002; Meydan a kol., 1999).

V naší studii jsme však neshledali žádný významný rozdíl mezi skupinami vyšetřovaných mladých zvířat (u prasat domácích ve věku 5-7 měsíců, u skotu 9 měsíců, u ovce 5 dní) a starších jedinců (u prasat ve věku 5 let, u skotu 3 roky a 6 let, u ovcí 5-7 let) (tab. 4, tab. 8). U mladých prasat byla pouze bez statistické významnosti zvýšena frekvence výskytu *t(7;18)*, přestože ti to vykazovali v plné krvi vyšší zastoupení $\gamma\delta$ T lymfocytů (33,1-56,1 %), u nichž jsme pozorovali menší výskyt nelegitimních přestaveb mezi TCR geny než u $\alpha\beta$ T lymfocytů. Počet vyšetřovaných zvířat ovšem není dostačující k vyvození jednoznačného závěru.

5.3 Struktura TCR lokusu

Obě přestavby zahrnující *TRA/TRD* lokus se u prasat domácích vyskytují ve vyšší míře než translokace s místy zlomů v *TRB* a *TRG* lokusech a také v porovnání s výskytem odpovídajících přestaveb u člověka (obr. 12). V práci publikované Huangem a kol. (2007) bylo ukázáno, že frekvence výskytu chromozomových zlomů a translokací zahrnujících TCR lokusy koresponduje s potenciálním počtem přeskupení segmentů V, D a J uvnitř daného genu. To by mohlo vysvětlovat námi pozorované rozdíly ve frekvencích výskytu nelegitimních přestaveb mezi TCR geny u lidí a prasat. *TRA/TRD* lokus prasete má mnohem komplexnější strukturu než myši a lidský *TRA/TRD* gen (Uenishi a kol., 2009). Zvýšený počet *TRDV* a *TRDD* segmentů (tab. 3), které zajišťují kombinatoriální diverzitu molekul δ řetězce, může navýšit pravděpodobnost nelegitimních přestaveb mezi *TRA/TRD* a ostatními TCR geny. Rozsáhlý repertoár *TRD* genů a duplikaci v *TRB* lokusu najdeme také u dalších druhů s vysokým zastoupením $\gamma\delta$ T lymfocytů v periferní krvi – u skotu (Conrad a kol., 2002; Connelley a kol., 2009; Herzig a kol., 2010) a ovcí (Antonacci a kol., 2005, 2008), u nichž jsme zaznamenali zvýšený výskyt translokace mezi *TRA/TRD* a *TRG2* oproti lidem. Prasečí *TRB* sestává ze tří funkčních D-J-C klastrů (Eguchi-Ogawa a kol., 2009; Uenishi a kol., 2009), zatímco u lidí a myši *TRB* lokus obsahuje pouze dva takovéto klastry. Studie publikované Huangem a kol. (2007) a Bowenem a kol. (2013) zabývající se výskytem translokací s místy zlomu v TCR genech u myši s využitím malovacích sond naznačují, že frekvence výskytu těchto přestaveb bude pravděpodobně nižší než u prasete a spíše se bude blížit nálezům u člověka. Vyšetřeno bylo ovšem pouze omezené množství metafázních buněk.

Pokud jde o strukturu TCR lokusů u koní, máme k dispozici pouze omezené informace. Několik genových segmentů T-buněčného receptoru bylo identifikováno analýzou cDNA (Schrenzel a kol., 1994; Schrenzel a Ferrick, 1995), žádná studie ovšem nepracovala s genomovou DNA. V rámci této disertační práce jsme identifikovali 17 *TRGC* segmentů přerušovaných segmenty *TRGV* a *TRGJ*, což nasvědčuje tomu, že koňský lokus *TRG* má komplexnější strukturu než lidský *TRG* s pouhými dvěma J-C oblastmi (Lefranc a Rabbitts, 1991; Giudicelli a kol., 2005). Multiplikaci genových segmentů vykazuje také ovčí (Miccoli a kol., 2003; Vaccarelli a kol., 2005, 2008) a bovinní *TRG1* a *TRG2* lokus (Herzig a kol., 2006; Conrad a kol., 2007) sestávající ze šesti V-J-C kazet. Složitá struktura *TRG* u koní může přispívat ke zvýšenému výskytu rekombinací v tomto lokusu v porovnání s lidmi (obr. 20). Podobně můžeme vysvětlit také vyšší zastoupení přestaveb mezi *TRA/TRD* a *TRG2*

u skotu a ovcí oproti lidem. Ačkoliv počet segmentů v *TRA* lokusu koně identifikovaných v naší studii (viz Výsledky) nenasvědčuje tomu, že by jeho struktura byla komplexnější než u lidí (Giudicelli a kol., 2005) (tab. 3), jejich skutečný počet může být vyšší. Informace o složitosti *TRD* a *TRB* lokusů u koní bohužel zcela chybí, stejně jako o struktuře genů pro T-buněčné receptory u ostatních zástupců čeledi koňovitých. Vzhledem k poměrně nedávné diverzifikaci této čeledi (Steiner a Ryder, 2011; Jónsson a kol., 2014) lze však předpokládat, že jejich složení bude podobné. Vliv složitosti skladby jednotlivých genů na výskyt nelegitimních přestaveb v TCR lokusech každopádně nelze zcela vyloučit.

5.4 Tvorba DSBs v prostoru a čase

Proces V(D)J rekombinace je založen na formování dvouvláknových zlomů v DNA (DSBs) a svým průběhem značně připomíná mechanizmy oprav DNA (Roukos a Misteli, 2014). Prostorová vzdálenost DSBs a jejich časová koincidence jsou pravděpodobně hlavním faktorem ovlivňujícím výskyt rekurentních chromozomových translokací (Roix a kol., 2003; Bowen a kol., 2013). Bowen a kol. (2013) nezaznamenali významné rozdíly mezi inter-TCR rozestupem a vzdálenostmi mezi TCR lokusy a jinými receptorovými geny u tymocytů v průběhu V(D)J rekombinace u divokého typu myši a ATM-deficientních myši. Časová souslednost přeskupování jednotlivých TCR genů v průběhu V(D)J rekombinace je zmíněna výše.

Již dříve bylo prokázáno, že přednostně dochází k intrachromozomovému spojení DSBs spíše než mezi chromozomy (Klein a kol., 2011; Zhang a kol., 2012) a poloha segmentů v rámci jediné chromozomové oblasti ovlivňuje prostorovou vzdálenost lokusů v interfázním jádře a tím i jejich vzájemnou dostupnost v případě rekombinace. Tomu odpovídá také naše pozorování vyššího výskytu inverzí oproti translokacím mezi homologními chromozomy v případě nelegitimních rekombinací mezi *TRB* a *TRG*, které jsou umístěny na stejném chromozomu (poměr 12:1 u lidí a 156:16 u koně). Dle Kleina a kol. (2011) tento jev souvisí se vzdáleností DSBs na daném chromozomu. Naše výsledky ukazují, že toto pravidlo platí i pro relativně vzdálené lokusy – u koně jsou *TRB* a *TRG* vzdáleny 86 Mb, u člověka 104 Mb.

5.5 Genomová lokalizace TCR lokusů

Chromozomy, stejně jako geny na nich umístěné, jsou v rámci interfázního jádra specificky rozmístěny (Parada a Misteli, 2002; Meaburn a kol., 2007). Zdá se tedy, že výskyt chromozomových přestaveb s místy zlomů v určitém lokusu může korespondovat s jeho genomovou lokalizací.

Na dostupnost TCR lokusů pro nelegitimní rekombinace mohou mít vliv přestavby uskutečněné v průběhu evoluce karyotypů následující po diverzifikaci různých živočišných druhů. Jejich výsledkem je lokalizace genů pro TCR na dvou různých chromozomech u lidí, koní, oslů, zeber (s výj. zebry Hartmannové), koček, skotu a ovcí a na třech chromozomech u zebry Hartmannové, psa, myši a prasat (tab. 2).

Zajímavým příkladem je poměrně rychlá evoluce karyotypů zástupců čeledi koňovitých (*Equidae*). Tato čeleď je tvořena jediným rodem *Equus* a zahrnuje zástupce koní (*E. caballus*, *E. przewalskii*), afrických a asijských oslů (*E. asinus*, *E. hemionus*, *E. kiang*) a zeber (*E. grevyi*, *E. burchelli*, *E. zebra*) (Nowak a Wilson, 1999). Fylogenezi tohoto rodu byly věnovány rozsáhlé studie (Steiner a Ryder, 2011; Jónsson a kol., 2014). Přestože k diverzifikaci čeledi koňovitých došlo poměrně nedávno, karyotypy jednotlivých zástupců se značně liší vlivem rychlé evoluce (Musilova a kol., 2013). Dle Steiner a Rydera (2011) se koně oddělili od ostatních zástupců koňovitých asi před 3,8 mil. let, poté následovala linie zeber a oslů před zhruba 1,69–1,9 mil. let (Jónsson a kol., 2014). Afričtí a asijské osly se oddělili asi před 1,47–1,75 mil. let a zebra Hartmannové se stala sesterským taxonem zebry stepní a zebry Grévyho před 1,28–1,59 mil. let (Jónsson a kol., 2014).

U koní jsou lokusy pro T-buněčný receptor lokalizovány na chromozomech 1q (*TRA/TRD*), 4p (*TRG*) a 4q (*TRB*). Chromozom 1 je zachován u všech zástupců čeledi koňovitých, pouze u zebry Hartmannové (*E. z. hartmannae*) a kianga (*E. kiang*) došlo k posunu centromery (Yang a kol., 2003; Musilova a kol., 2013). V linii oslů a zeber došlo k fúzi koňského chromozomu 4 a 31 (Yang a kol., 2004; Musilova a kol., 2007). Tento chromozom 4/31 následně u osla afrického (*E. asinus*) prodělal pericentrickou inverzi (Yang a kol., 2004; Musilova a kol., 2013), čímž se *TRB* a *TRG* lokusy dostaly na stejné chromozomové rameno. Naopak rozštěpení centromery chromozomu 4/31 u zebry Hartmannové (Richard a kol., 2001; Yang a kol., 2003) separovalo *TRG* a *TRB* na dva různé chromozomy. Navíc u zebry Hartmannové tandemová fúze segmentu odpovídajícího

koňskému chromozomu 4q vyústila v opačnou orientaci tohoto segmentu vzhledem k centromere oproti ostatním zástupcům koňovitých (Musilova a kol., 2013) (obr. 13).

Sestavení fylogenetického stromu třídy savců (*Mammalia*) s využitím genetických, morfologických a fosilních dat umožnilo zpřesnění fylogenetických vztahů mezi jednotlivými řády savců (Froenicke, 2005; Ferguson-Smith a Trifonov, 2007). Prasata, skot a ovce náležející do řádu sudokopytníků (*Cetartiodactyla*) jsou bližšími příbuznými zástupců koňovitých (řád lichokopytníci, *Perissodactyla*) než lidí (řád primáti, *Primates*). Tomu částečně odpovídají také námi získané výsledky. Frekvence výskytu nelegitimních přestaveb zahrnujících *TRA/TRD* se neliší u prasat a koní, oproti hodnotám zjištěným u lidí jsou však významně vyšší ($P < 0,01$) (obr. 20, 21). Nižší frekvence přestaveb mezi *TRB* a *TRG* u prasat v porovnání s koňmi (obr. 20) může být zapříčiněna právě tím, že během evoluce karyotypů těchto druhů došlo u prasat k rozchodu obou lokusů na dva různé chromozomy (Hiraiwa a kol., 2001). Podobný pokles ve frekvenci výskytu rekombinací mezi *TRB* a *TRG* v porovnání s ostatními zástupci téže čeledi ($P < 0,05$) jsme zaznamenali u zebry Hartmannové, která představuje jediného zástupce koňovitých, u něhož došlo k rozmístění těchto lokusů na dva různé chromozomy (Richard a kol., 2001; Yang a kol., 2003). U skotu a ovcí výskyt ilegitimní rekombinace mezi *TRA/TRD* a *TRG2* odpovídá výskytu translokace mezi *TRA/TRD* a *TRG* u prasat a koní a je tedy významně vyšší než u člověka ($P < 0,01$). Frekvence výskytu ostatních přestaveb mezi *TRA/TRD* a jinými TCR geny je ovšem významně nižší ($P < 0,01$) oproti nálezům u lidí, prasat i koní.

5.6 Orientace TCR genů

Kromě výše zmíněného nízkého výskytu přestavby mezi *TRG* a *TRB* u zebry Hartmannové způsobené separací obou lokusů na dva různé chromozomy jsme u tohoto druhu zaznamenali také nižší frekvenci rekombinace mezi *TRA/TRD* a *TRB* oproti frekvenci translokací mezi *TRA/TRD* a *TRG* ($P < 0,05$) a rovněž ve srovnání s odpovídajícími přestavbami u ostatních zástupců koňovitých ($P < 0,05$) (obr. 15). Vysvětlením může být další chromozomová přestavba v rámci evoluce karyotypu tohoto druhu. V důsledku tandemové fúze dvou telomer má segment nesoucí *TRB* lokus u zebry Hartmannové opačnou orientaci vzhledem k centromere oproti *TRB* lokusu u ostatních zástupců čeledi a také oproti dalším TCR lokusům (obr. 13) (Musilova a kol., 2013). Stejný typ nelegitimní rekombinace

zahrnující *TRB* tedy můžeme pozorovat jako translokaci nebo inverzi u koní, oslů, zebry stepní a zebry Grévyho, anebo dojde ke vzniku dicentrického chromozomu a acentrického fragmentu jako v případě zebry Hartmannové. Tyto typy chromozomových aberací jsou však nestabilní a postižená buňka je v průběhu buněčného dělení eliminována. To může být důvodem, proč jsme takovýto typ přestavby v průběhu vyšetřování metafázních buněk nezaznamenali. U zebry Hartmannové patrně opačná orientace *TRB* lokusu přispěla ke snížení výskytu obou translokací zahrnujících tento lokus.

Další úpravou karyotypu týkající se chromozomů nesoucích TCR geny v rámci čeledi koňovitých je pericentrická inverze v linii afrických oslů (Yang a kol., 2004), která vyústila v lokalizaci *TRB* i *TRG* lokusů na stejném chromozomovém rameni a pozměnila jejich vzájemnou orientaci (Musilova a kol., 2013) (obr. 13). Nelegitimní přestavba mezi těmito lokusy u koní, zebry stepní a zebry Grévyho vede ke vzniku pericentrické inverze, zatímco u osla afrického a osla domácího může být jejím výsledkem delece chromozomové oblasti ohraničené oběma lokusy a tvorba acentrického ring chromozomu. Vzhledem k tomu, že jsme v průběhu naší studie v preparátech oslů na podobný jev nenarazili, tyto aberace jsou patrně pro buňku letální. Změny v karyotypu u zástupců oslů afrických a oslů domácích tedy mají za následek nižší frekvenci výskytu přestaveb mezi *TRB* a *TRG* oproti dalším dvěma typům nelegitimních rekombinací mezi TCR geny ($P < 0,05$). Frekvence výskytu paracentrických inverzí mezi *TRB* a *TRG* u oslů a pericentrických inverzí u ostatních koňovitých se však významně neliší. Přítomnost relativně vysokého počtu inverzí v periferních lymfocytech může poukazovat buďto na fakt, že invertované TCR genové segmenty byly zahrnuty v nelegitimních přestavbách, nebo na nepřesnost rekombinace.

U skotu je *TRA/TRD* a *TRG2* lokus orientován na chromozomu opačně vzhledem k centromere než *TRG1* a *TRB*. To by mohlo vysvětlovat rozdílný výskyt translokací mezi *TRA/TRD* a oběma *TRG* lokusy, stejně jako rozdíl ve frekvenci přestaveb zahrnujících *TRA/TRD* obecně.

Je ovšem nutno zdůraznit, že orientace TCR genů nemá vliv na samotný vznik nelegitimních rekombinací, ale ovlivňuje životaschopnost buněk nesoucích produkty těchto rekombinací a následně tedy i počet pozorovaných přestaveb v periferních lymfocytech.

5.7 Riziko vzniku lymfomu

Proces V(D)J rekombinace v průběhu maturace predisponuje lymfoidní buňky k výskytu aberantních přestaveb včetně fúze TCR lokusů s jinými geny. V případě, že jde o onkogen, může tato fúze vyústit v malignitu. Zvláště časté jsou tyto přestavby zahrnující lokus *TRD* u pacientů s lymfomem (Larmonie a kol., 2013). Obecně je juxtapozice onkogenů a regulačních sekvencí genů pro TCR znakem několika T-buněčných malignit (Boehm a Rabbitts, 1989; Korsmeyer, 1992; Marculescu a kol., 2006). Také my jsme v průběhu naší studie pozorovali v malé míře výskyt přestaveb zahrnujících chromozom nesoucí *TRA/TRD* a jiný blíže neidentifikovaný chromozom.

Z výsledků mnohých studií vyplývá, že absolutní počet nelegitimních přestaveb s místy zlomů v TCR genech koreluje s rizikem vzniku lymfomu bez ohledu na genetické predispozice nebo míru expozice. Analýza těchto chromozomových aberací může tedy sloužit jako biomarker rizika vzniku lymfomu (Lipkowitz a kol., 1992; Lista a kol., 1997; Kirsch, 1997; Lopes a kol., 2001; Allam a Kabelitz, 2006).

Zvýšený výskyt nelegitimních rekombinací zahrnujících *TRA/TRD* u prasat by mohl naznačovat, že tento živočišný druh je více zatížen rizikem vzniku T-buněčného lymfomu než člověk. Maligní lymfom je nejčastěji uváděným nádorovým onemocněním prasat, především mladých zvířat (Misdorp, 2003). Podle Jacobse a kol. (2002) se výskyt odhaduje na 2-6,5 jedince na 100 000 poražených zvířat. Přestože lze předpokládat, že převažujícím typem lymfomu u prasat podobně jako u lidí je B-buněčný lymfom, byly popsány také případy T-buněčného lymfomu a B lymfomu bohatého na T lymfocyty (Tanimoto a Ohtsuki, 1998; Ogihara a kol., 2012). Jejich prevalence je ovšem neznámá. Vzhledem k tomu, že veterinární prohlídkou prochází velké množství prasat porážených na jatkách, je k dispozici dostatečně rozsáhlý vzorek i v případě nízké prevalence T lymfomu.

Prase domácí by tedy mohlo být využito jako modelový organismus pro přirozeně se vyskytující T lymfomy a poskytnout průkaz korelace mezi frekvencí výskytu nelegitimních přestaveb zahrnujících *TRA/TRD* a vznikem T-buněčného lymfomu. V současné době je prase nejčastěji používaným velkým druhem laboratorních zvířat. Díky fyziologickým a morfologickým podobnostem a také analogiím na genomické úrovni se tento živočišný druh stal významným biomedicínským modelem v oblasti výzkumu nádorových a jiných onemocnění člověka. Jejich velikost je oproti malým druhům laboratorních zvířat činí

ideálním modelovým druhem v preklinických studiích při testování léčiv, při studiu zobrazovacích metod, účinků chemoterapie a radiace (Kuzmuk a Schook, 2011).

Také u koní může vysoký počet ilegálních přestaveb v TCR genech poukazovat na zvýšené riziko vzniku lymfomu u tohoto druhu oproti člověku. I když hematopoetické neoplazie u koní jsou spíše vzácným jevem, prevalence lymfomu v populaci koní je udávána 0,002–0,5% (Taintor a Schleis, 2011). Ačkoliv stejně jako u lidí převažuje výskyt B lymfomů, jsou běžně popisovány také případy T lymfomů (Rendle a kol., 2012; Durham a kol., 2013).

Lymfom patří k nejčastěji diagnostikovaným neoplaziím rovněž u skotu, koček a psů. Dle Jacobse a kol. (2002) je roční incidence lymfomu u skotu 18 případů na 100 000 poražených zvířat. U mléčného skotu je lymfom považován za nejběžněji se vyskytující neoplastické onemocnění, nejčastěji ve spojení s virovou infekcí BLV (z angl. Bovine Leukosis Virus), kdy se jedná o B-buněčný typ lymfomu. Jsou však zdokumentovány také případy sporadického lymfomu neasociovaného s BLV včetně T-buněčného lymfomu (Vernau a kol., 1992; Yokota a kol., 2015; Ito a kol., 2011). U ovcí je tento typ malignity spíše vzácný (Ceribasi a kol., 2013). U psů je lymfom třetí nejčastější neoplazií s roční incidencí odhadovanou na 33/100 000 psů (Teske, 1994). U koček je dokonce roční incidence udávána 200/100 000 (Jacobs a kol., 2002). Obecně lze říci, že většina lymfomů (asi 80 %) vzniká z prekurzorových buněk B lymfocytů. Přibližně 10-40 % všech lymfomů u psů (Jacobs a kol., 2002) a 15 % lymfomů u lidí (The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997) je T-buněčného původu.

Tak jako komplexita a vzájemná poloha TCR genů ovlivňují frekvenci nelegálních rekombinací mezi těmito lokusy, mohou hrát významnou roli také ve výskytu aberantních přestaveb mezi TCR lokusy a jinými geny. Chromozomová kolokalizace TCR genů s onkogeny může tedy zvýšit pravděpodobnost jejich nelegálních přestavby.

5.8 Jiné faktory

Příčina vysoké frekvence výskytu translokace mezi *TRA/TRD* a *TRB* u zebry stepní zůstává nejasná. Významný rozdíl byl pozorován dokonce mezi nálezy u blízce příbuzných zebek stepních a zebek Grévyho (obr. 15), k jejichž divergenci došlo teprve před 1,2 mil. let (Steiner a Ryder, 2011). Vliv příbuznosti můžeme vyloučit vzhledem k tomu, že v rámci

druhu byly vyšetřeny tři poddruhy zebry stepní (viz Materiál a metody), mezi nimiž jsme nezaznamenali významné rozdíly.

Zvýšené frekvence výskytu obou translokací zahrnujících *TRA/TRD* u samice zebry stepní s konstituční $t(8;13)$ lze vysvětlit spíše individuální variabilitou ve výskytu těchto přestaveb u všech vyšetřených zvířat ve skupině zeber stepních než změnami v karyotypu.

Podobně neumíme zatím vysvětlit rozdílný výskyt translokací mezi *TRA/TRD* a *TRB* u zástupců domestikovaných druhů prasete a osla a jejich divokých předků. Pro jednoznačný závěr by bylo třeba v každém případě rozšířit soubor vyšetřených jedinců.

6. ZÁVĚR

Metodou fluorescenční *in situ* hybridizace s využitím malovacích sond a BAC konstruktů jsme určili frekvence výskytu nelegitimních přestaveb mezi geny pro T-buněčné receptory (TCR) u lidí, prasat, skotu, ovcí a vybraných zástupců čeledi koňovitých. Ve všech případech se jednalo o klinicky zdravé jedince. U skotu a zástupců čeledi koňovitých jsme rovněž úspěšně analyzovali fúzní TCR geny sekvenací PCR produktů.

Frekvence výskytu aberantních rekombinací mezi TCR geny u lidí odpovídaly již dříve publikovaným hodnotám s výjimkou jedné práce. Použité metody i strategie těchto studií se však lišily od námi předkládané.

Při vyšetřování výskytu nelegitimních přestaveb s místy zlomů v TCR genech u prasat jsme pozornost zaměřili na subpopulaci $\gamma\delta$ T lymfocytů v periferní krvi, neboť prase na rozdíl od člověka patří mezi živočišné druhy s vysokým zastoupením $\gamma\delta$ T lymfocytů. Hypotéza, že by příčinou zvýšeného výskytu translokací zahrnujících lokus *TRA/TRD* u prasete oproti člověku byla právě tato subpopulace T lymfocytů, se však nepotvrdila. Naopak, v kulturách separovaných $\gamma\delta$ TCR+ lymfocytů prasat jsme zaznamenali pokles ve frekvencích výskytu těchto translokací, zapříčiněný pravděpodobně absencí přestavby *TRA* v průběhu maturace této linie T lymfocytů. Rozdíl ve výskytu přestaveb zahrnujících gen *TRA/TRD* u prasat a člověka může být dán komplexní strukturou prasečího *TRA/TRD* lokusu.

Část studie se věnovala stanovení frekvence výskytu chromozomových přestaveb mezi TCR geny u koní a dalších zástupců čeledi koňovitých – osla domácího, osla afrického, zebry stepní, zebry Grévyho a zebry Hartmannové. Navzdory vysokému stupni příbuznosti mezi jednotlivými zástupci čeledi koňovitých jsme u vyšetřovaných druhů pozorovali rozdíly ve frekvencích výskytu nelegitimních rekombinací v TCR genech. Mnohé z těchto rozdílů lze vysvětlit změnami v karyotypu daných druhů v průběhu evoluce a tedy rozdílnou organizací chromozomů nesoucích TCR geny. Kolokalizace lokusů na stejném chromozomu zvyšuje incidenci rekombinace mezi těmito lokusy. Orientace TCR genů sice neovlivní výskyt nelegitimních rekombinací, ale v důsledku rozdílné životaschopnosti buněk nesoucích různé produkty těchto rekombinací může být zkreslen počet pozorovaných přestaveb s místy zlomů v TCR genech v lymfocytech periferní krve.

Porovnáním výskytu aberantních přestaveb mezi TCR lokusy u lidí, prasat a koní jsme zjistili, že nálezy u prasat a koní se liší pouze v jednom typu rekombinace zahrnující *TRG* a *TRB*, která se vyskytuje ve vyšší míře u koní, a tedy frekvence výskytu všech tří typů

nelegitimních přestaveb mezi TCR geny u koní převyšuje hodnoty zjištěné u lidí. Námí analyzovaná struktura koňského *TRA* a *TRG* lokusu napovídá, že by příčinou opět mohla být vyšší komplexita těchto genů.

U zástupců čeledi koňovitých (25 vyšetřených jedinců) bylo detekováno celkem 18 amplifikačních produktů fúzních genů o velikosti cca 300 bp, které zahrnovaly tři různé variabilní segmenty *TRA* a pět spojovacích segmentů *TRG*. Celkem bylo identifikováno 10 různých hybridních genů, přičemž v rámci jednotlivých zvířat byly detekovány až čtyři různé rekombinační produkty.

U zástupců skotu a ovcí jsme určili frekvence translokací zahrnujících *TRA/TRD* lokus. Mezi těmito dvěma druhy jsme nezaznamenali významné rozdíly. *TRG* lokus skotu i ovcí byl v průběhu evoluce duplikován. Vysoký výskyt translokací mezi *TRA/TRD* a *TRG2* odpovídal nálezům u prasat a koní a může být tedy opět přisuzován složitější struktuře *TRA/TRD* lokusu oproti *TRA/TRD* lokusu u člověka. V případě zbylých dvou přestaveb s místy zlomů v *TRG1* a *TRB* byla frekvence jejich výskytu významně nižší než frekvence odpovídajících přestaveb u lidí, prasat i koní. Příčinou by mohla být vzájemná orientace TCR genů podobně jako u zástupců čeledi koňovitých.

Byly sekvenovány a analyzovány celkem tři rekombinační PCR produkty detekované vyšetřením 18 jedinců skotu. Všechny tyto produkty obsahovaly fragment *TRGV5* o velikosti 130 bp, dva z nich zahrnovaly *TRAJ38* a zbylý *TRAJ31*.

Frekvence výskytu chromozomových přestaveb s místy zlomů v genech pro T-buněčné receptory u zdravých jedinců se liší nejen mezi jednotlivými živočišnými druhy - a to i v případě vysoce příbuzných zástupců čeledi koňovitých, ale také v rámci druhu porovnáním výskytu konkrétních typů nelegitimní rekombinace.

7. SEZNAM ZKRATEK

aCGH	array CGH
AT	ataxie-telangiektazie
<i>ATM</i>	ataxia telangiectasia mutated
BAC	umělý bakteriální chromozom
BLV	bovine leucosis virus
CD	cluster of differentiation
CDR1-3	oblasti určující komplementaritu
CGH	komparativní genomová hybridizace
CoA	concanavalin A
DAPI	4',6-Diamidine-2'-phenylindol dihydrochlorid
D-FISH	dvoubarevná FISH
DN	dvojnásobně negativní
DOP-PCR	PCR s degenerovanými oligonukleotidovými primery
DP	dvojnásobně pozitivní
DSBs	dvouřetězcové zlomy
EtBr	ethidium bromid
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FRET	fluorescence resonance energy transfer
FW	forward
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee
HTLV-1	lidský T-buněčný lymfotropní virus typu 1
CHA	chromozomové abnormality (chromozomové aberace)
CHORI	Children's Hospital of Oakland Research Institute
I-FISH	interfázní FISH
IMGT	ImMunoGeneTics database
iNKT	invariantní NK T lymfocyty
M-FISH	mnohobarevná FISH

MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MRN	MRE11, RAD50 a NBS1
NBS	Nijmegenský syndrom lomivosti
NGS	sekvenování nové generace
NHEJ	nehomologní spojování konců
PCR	polymerázová řetězová reakce
PHA	phytohemaglutinin
PI	propidium jodid
PWM	pokeweed-mitogen
<i>RAG</i>	recombinase-activating gene
REV	reverse
RQ-PCR	real-time quantitative PCR
RSS	rekombinační signální sekvence
RT-PCR	PCR spojená s reverzní transkripcí
SKY	spektrální karyotypování
TCR	T-buněčný receptor
TdT	terminální deoxynukleotidyl-transferáza
<i>TRA</i>	T-buněčný receptor α lokus
<i>TRB</i>	T-buněčný receptor β lokus
<i>TRD</i>	T-buněčný receptor δ lokus
TREC	T cell receptor excision circles
<i>TRG</i>	T-buněčný receptor γ lokus
VDJ	variabilní, diverzifikační a spojovací (segmenty)
YAC	umělý kvasinkový chromozom

8. LITERATURA

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S. Cellular and molecular immunology. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Inc. Saunders, 2012. 545 p. ISBN 978-1-4377-1528-6.

Abdallah, J.M., Lombardi, D.P., and Kirsch, I.R. (1995). Genetic instability in patients with Hodgkin's disease undergoing chemotherapy. *J. Clin. Invest.* 96, 2744–2747.

Allam, A., and Kabelitz, D. (2006). TCR trans-rearrangements: biological significance in antigen recognition vs the role as lymphoma biomarker. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 5707–5712.

Allison, J.P. (1993). $\gamma\delta$ T-cell development. *Curr. Opin. Immunol.* 5, 241–246.

Allison, T.J., Winter, C.C., Fournié, J.-J., Bonneville, M., and Garboczi, D.N. (2001). Structure of a human $\gamma\delta$ T-cell antigen receptor. *Nature* 411, 820–824.

Anderson, G., Harman, B.C., Hare, K.J., and Jenkinson, E.J. (2000). Microenvironmental regulation of T cell development in the thymus. *Semin. Immunol.* 12, 457–464.

Antonacci, R., Massari, S., De Iaco, R., and Ciccarese, S. (2001). Assignment¹ of the TRB@ locus encoding the T-cell receptor beta chain to sheep, cattle, goat and river buffalo chromosomes by in situ hybridization. *Cytogenet. Genome Res.* 94, 82–83.

Antonacci, R., Lanave, C., Del Faro, L., Vaccarelli, G., Ciccarese, S., and Massari, S. (2005). Artiodactyl emergence is accompanied by the birth of an extensive pool of diverse germline TRDV1 genes. *Immunogenetics* 57, 254–266.

Antonacci, R., Vaccarelli, G., Meo, G.P.D., Piccinni, B., Miccoli, M.C., Cribiu, E.P., Perucatti, A., Iannuzzi, L., and Ciccarese, S. (2007). Molecular In Situ Hybridization Analysis of Sheep and Goat BAC Clones Identifies the Transcriptional Orientation of T Cell Receptor Gamma Genes on Chromosome 4 in Bovids. *Vet. Res. Commun.* 31, 977–983.

Antonacci, R., Di Tommaso, S., Lanave, C., Cribiu, E.P., Ciccarese, S., and Massari, S. (2008). Organization, structure and evolution of 41kb of genomic DNA spanning the D-J-C region of the sheep TRB locus. *Mol. Immunol.* 45, 493–509.

Arden, B., Clark, S.P., Kabelitz, D., and Mak, T.W. (1995). Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 42, 455–500.

Bailey, M., Christoforidou, Z., and Lewis, M.C. (2013). The evolutionary basis for differences between the immune systems of man, mouse, pig and ruminants. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 152, 13–19.

Ballinger, S.W., Judice, S.A., Nicklas, J.A., Albertini, R.J., and O'Neill, J.P. (2002). DNA sequence analysis of interlocus recombination between the human T-cell receptor gamma variable (GV) and beta diversity-joining (BD/BJ) sequences on chromosome 7 (inversion 7). *Environ. Mol. Mutagen.* 40, 85–92.

Bassing, C.H., Swat, W., and Alt, F.W. (2002). The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* 109 Suppl, S45–S55.

- Boehm, T., and Rabbitts, T.H. (1989). The human T cell receptor genes are targets for chromosomal abnormalities in T cell tumors. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 3, 2344–2359.
- Boehm, T., and Swann, J.B. (2014). Origin and Evolution of Adaptive Immunity. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2, 259–283.
- Bolland, D.J., Wood, A.L., Johnston, C.M., Bunting, S.F., Morgan, G., Chakalova, L., Fraser, P.J., and Corcoran, A.E. (2004). Antisense intergenic transcription in V(D)J recombination. *Nat. Immunol.* 5, 630–637.
- Born, W.K., Zhang, L., Nakayama, M., Jin, N., Chain, J.L., Huang, Y., Aydintug, M.K., and O'Brien, R.L. (2011). Peptide antigens for gamma/delta T cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 2335–2343.
- Bosc, N., Folch, G., Ginestoux, C., Giudicelli, V. and Lefranc, M.-P. IMGT overview: the mouse T cell receptor beta TRB genes. 19th International Mouse Genome Conference (IMGC), November 5-8, 2005, Strasbourg, France (2005).
- Bosc, N., Folch, G., Ginestoux, C., Giudicelli, V. and Lefranc, M.-P. IMGT overview: the mouse T cell receptor delta TRD genes. 19th International Mouse Genome Conference (IMGC), November 5-8, 2005, Strasbourg, France (2005).
- Bosc, N., Scaviner, D., Folch, G., Ginestoux, C., Giudicelli, V. and Lefranc, M.-P. IMGT overview: the mouse T cell receptor alpha TRA genes. 19th International Mouse Genome Conference (IMGC), November 5-8, 2005, Strasbourg, France (2005).
- Boulé, J.-B., Rougeon, F., and Papanicolaou, C. (2001). Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Indiscriminately Incorporates Ribonucleotides and Deoxyribonucleotides. *J. Biol. Chem.* 276, 31388–31393.
- Bowen, S., Wangsa, D., Ried, T., Livak, F., and Hodes, R.J. (2013). Concurrent V(D)J recombination and DNA end instability increase interchromosomal trans-rearrangements in ATM-deficient thymocytes. *Nucleic Acids Res.* 41, 4535–4548.
- Van der Burg, M., Poulsen, T.S., Hunger, S.P., Beverloo, H.B., Smit, E.M.E., Vang-Nielsen, K., Langerak, A.W., and van Dongen, J.J.M. (2004). Split-signal FISH for detection of chromosome aberrations in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 18, 895–908.
- Capone, M., Hockett, R.D., and Zlotnik, A. (1998). Kinetics of T cell receptor beta, gamma, and delta rearrangements during adult thymic development: T cell receptor rearrangements are present in CD44(+)CD25(+) Pro-T thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 12522–12527.
- Carding, S.R., and Egan, P.J. (2002). $\gamma\delta$ T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 336–345.
- Chowdhary, B.P., and Raudsepp, T. (2001). Chromosome painting in farm, pet and wild animal species. *Methods Cell Sci. Off. J. Soc. Vitro Biol.* 23, 37–55.
- Chrzanowska, K.H., Gregorek, H., Dembowska-Bagińska, B., Kalina, M.A., and Digweed, M. (2012). Nijmegen breakage syndrome (NBS). *Orphanet J. Rare Dis.* 7, 13.

- Chu, G. (1997). Double strand break repair. *J. Biol. Chem.* 272, 24097–24100.
- Connelley, T., Aerts, J., Law, A., and Morrison, W.I. (2009). Genomic analysis reveals extensive gene duplication within the bovine TRB locus. *BMC Genomics* 10, 192.
- Conrad, M.L., Pettman, R., Whitehead, J., McKinnel, L., Davis, S.K., and Koop, B.F. (2002). Genomic sequencing of the bovine T cell receptor beta locus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87, 439–441.
- Conrad, M.L., Mawer, M.A., Lefranc, M.-P., McKinnell, L., Whitehead, J., Davis, S.K., Pettman, R., and Koop, B.F. (2007). The genomic sequence of the bovine T cell receptor gamma TRG loci and localization of the TRGC5 cassette. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 115, 346–356.
- Cortes, P., Weis-Garcia, F., Misulovin, Z., Nussenzweig, A., Lai, J.-S., Li, G., Nussenzweig, M.C., and Baltimore, D. (1996). In vitro V(D)J recombination: Signal joint formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 14008–14013.
- Davis, B.W., Raudsepp, T., Pearks Wilkerson, A.J., Agarwala, R., Schäffer, A.A., Houck, M., Chowdhary, B.P., and Murphy, W.J. (2009). A high-resolution cat radiation hybrid and integrated FISH mapping resource for phylogenomic studies across Felidae. *Genomics* 93, 299–304.
- Davis, W.C., Brown, W.C., Hamilton, M.J., Wyatt, C.R., Orden, J.A., Khalid, A.M., and Naessens, J. (1996). Analysis of monoclonal antibodies specific for the $\gamma\delta$ TcR. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 52, 275–283.
- Davodeau, F., Peyrat, M.A., Gaschet, J., Hallet, M.M., Triebel, F., Vié, H., Kabelitz, D., and Bonneville, M. (1994). Surface expression of functional T cell receptor chains formed by interlocus recombination on human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 180, 1685–1691.
- van Dongen, J.J.M., Langerak, A.W., Brüggemann, M., Evans, P. a. S., Hummel, M., Lavender, F.L., Delabesse, E., Davi, F., Schuurin, E., García-Sanz, R., et al. (2003). Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 17, 2257–2317.
- Drbalova, J., Musilova, P., Kubickova, S., Sebestova, H., Vahala, J., and Rubes, J. (2014). Impact of karyotype organization on interlocus recombination between T cell receptor genes in Equidae. *Cytogenet. Genome Res.* 144, 306–314.
- Durham, A.C., Pillitteri, C.A., San Myint, M., and Valli, V.E. (2013). Two hundred three cases of equine lymphoma classified according to the World Health Organization (WHO) classification criteria. *Vet. Pathol.* 50, 86–93.
- Eguchi-Ogawa, T., Toki, D., and Uenishi, H. (2009). Genomic structure of the whole D–J–C clusters and the upstream region coding V segments of the TRB locus in pig. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 1111–1119.
- Ferguson-Smith, M.A., and Trifonov, V. (2007). Mammalian karyotype evolution. *Nat. Rev. Genet.* 8, 950–962.

File:FISH (Fluorescent In Situ Hybridization).jpg [Internet]. [USA]: Wikimedia Commons; c1997-2014. Scheme of the principle of the FISH (Fluorescent in situ hybridization) experiment to localize a gene in the nucleus. 2007 Nov 1 [cited 2015 Aug 13]. Available from:

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:FISH_\(Fluorescent_In_Situ_Hybridization\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:FISH_(Fluorescent_In_Situ_Hybridization).jpg)

File:TCR complex.svg [Internet]. [USA]: Wikimedia Commons; c1997-2014. TCR complex. 2010 Nov 2 [cited 2015 Aug 13]. Available from:

https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3ATCR_complex.svg

Flajnik, M.F., and Kasahara, M. (2010). Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 47–59.

Folch, G., Scaviner, D., Ginestoux, C., Giudicelli, V. and Lefranc, M.-P. IMGT overview: the mouse T cell receptor gamma TRG genes. 19th International Mouse Genome Conference (IMGC), November 5-8, 2005, Strasbourg, France (2005).

Froenicke, L. (2005). Origins of primate chromosomes - as delineated by Zoo-FISH and alignments of human and mouse draft genome sequences. *Cytogenet. Genome Res.* *108*, 122–138.

Gerner, W., Käser, T., and Saalmüller, A. (2009). Porcine T lymphocytes and NK cells--an update. *Dev. Comp. Immunol.* *33*, 310–320.

Girardi, M. (2006). Immunosurveillance and Immunoregulation by $\gamma\delta$ T Cells. *J. Invest. Dermatol.* *126*, 25–31.

Giudicelli, V., Chaume, D., and Lefranc, M.-P. (2005). IMGT/GENE-DB: a comprehensive database for human and mouse immunoglobulin and T cell receptor genes. *Nucleic Acids Res.* *33*, D256–D261.

Giudicelli, V., Duroux, P., Ginestoux, C., Folch, G., Jabado-Michaloud, J., Chaume, D., and Lefranc, M.-P. (2006). IMGT/LIGM-DB, the IMGT comprehensive database of immunoglobulin and T cell receptor nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res.* *34*, D781–D784.

Guan, Y.-F., Li, G.-R., Wang, R.-J., Yi, Y.-T., Yang, L., Jiang, D., Zhang, X.-P., and Peng, Y. (2012). Application of next-generation sequencing in clinical oncology to advance personalized treatment of cancer. *Chin. J. Cancer* *31*, 463–470.

Guo, P., Hirano, M., Herrin, B.R., Li, J., Yu, C., Sadlonova, A., and Cooper, M.D. (2009). Dual nature of the adaptive immune system in lampreys. *Nature* *459*, 796–801.

Guzman, E., Price, S., Poulson, H., and Hope, J. (2012). Bovine $\gamma\delta$ T cells: cells with multiple functions and important roles in immunity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* *148*, 161–167.

Clevers, H., Alarcon B., Wileman T., and Terhorst C. (1988). The T Cell Receptor/CD3 Complex: A Dynamic Protein Ensemble. *Annu. Rev. Immunol.* *6*, 629–662.

Hecht, F., and Hecht, B.K. (1990). Cancer in ataxia-telangiectasia patients. *Cancer Genet. Cytogenet.* *46*, 9–19.

Hecht, F., Hecht, B.K., and Kirsch, I.R. (1987). Fragile sites limited to lymphocytes: Molecular recombination and malignancy. *Cancer Genet. Cytogenet.* 26, 95–104.

Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H., and Vogt, P.H. (1997). Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques* 23, 504–511.

Herzig, C., Blumerman, S., Lefranc, M.-P., and Baldwin, C. (2006). Bovine T cell receptor gamma variable and constant genes: combinatorial usage by circulating $\gamma\delta$ T cells. *Immunogenetics* 58, 138–151.

Herzig, C.T., Lefranc, M.-P., and Baldwin, C.L. (2010). Annotation and classification of the bovine T cell receptor delta genes. *BMC Genomics* 11, 100.

HGNC home page: <http://www.genenames.org>

High Pure PCR Product Purification Kit [Internet]. Czech Republic: Roche Diagnostics; c1996-2015 c2015 [cited 2015 Aug 13]. Available from: <https://lifescience.roche.com/shop/products/high-pure-pcr-product-purification-kit>.

Hinz, T., Allam, A., Wesch, D., Schindler, D., and Kabelitz, D. (2000). Cell-surface expression of transrearranged $V\gamma-C\beta$ T-cell receptor chains in healthy donors and in ataxia telangiectasia patients. *Br. J. Haematol.* 109, 201–210.

Hiraiwa, H., Uenishi, H., Kiuchi, S., Watanabe, M., Takagaki, Y., and Yasue, H. (2001). Assignment of T cell receptor (TCR) alpha-chain gene (A), beta-chain gene (B), gamma-chain gene (G), and delta-chain gene (D) loci on swine chromosomes by in situ hybridization and radiation hybrid mapping. *Cytogenet. Genome Res.* 93, 94–99.

Hirano, M., Das, S., Guo, P., and Cooper, M.D. (2011). The evolution of adaptive immunity in vertebrates. *Adv. Immunol.* 109, 125–157.

Hirano, M., Guo, P., McCurley, N., Schorpp, M., Das, S., Boehm, T., and Cooper, M.D. (2013). Evolutionary implications of a third lymphocyte lineage in lampreys. *Nature* 501, 435–438.

Hofmann, J., Greter, M., Du Pasquier, L., and Becher, B. (2010). B-cells need a proper house, whereas T-cells are happy in a cave: the dependence of lymphocytes on secondary lymphoid tissues during evolution. *Trends Immunol.* 31, 144–153.

Holderness, J., Hedges, J.F., Ramstead, A., and Jutila, M.A. (2013). Comparative Biology of $\gamma\delta$ T Cell Function in Humans, Mice, and Domestic Animals. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 1, 99–124.

Huang, C.-Y., Sharma, G.G., Walker, L.M., Bassing, C.H., Pandita, T.K., and Sleckman, B.P. (2007). Defects in coding joint formation in vivo in developing ATM-deficient B and T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 204, 1371–1381.

IMGT home page: <http://www.imgt.org>

Inlay, M., and Xu, Y. (2003). Epigenetic regulation of antigen receptor rearrangement. *Clin. Immunol.* 109, 29–36.

- Ito, M., Kubo, M., Takayama, H., Ishikawa, Y., and Kadota, K. (2011). Cytologic variants of $\gamma\delta$ T cell lymphoma in cattle. *J. Vet. Med. Sci. Jpn. Soc. Vet. Sci.* 73, 399–402.
- Jacobs R.M., Messick J.B., Valli V.E. (2002): Tumors of the hemolymphatic system. In: Meuten D.J. (ed) Tumors in domestic animals. A Blackwell Publishing Company, Iowa, 119–198
- Jónsson, H., Schubert, M., Seguin-Orlando, A., Ginolhac, A., Petersen, L., Fumagalli, M., Albrechtsen, A., Petersen, B., Korneliusson, T.S., Vilstrup, J.T., et al. (2014). Speciation with gene flow in equids despite extensive chromosomal plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 18655–18660.
- Jung, D., and Alt, F.W. (2004). Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell* 116, 299–311.
- Kabelitz, D. (2011). $\gamma\delta$ T-cells: cross-talk between innate and adaptive immunity. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 2331–2333.
- Kabelitz, D., Wesch, D., and Hinz, T. (1999). $\gamma\delta$ T cells, their T cell receptor usage and role in human diseases. *Springer Semin. Immunopathol.* 21, 55–76.
- Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J.W., Waldman, F., and Pinkel, D. (1992). Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258, 818–821.
- Karran, P. (2000). DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 144–150.
- Kaufmann, S.H.E. (1996). γ/δ and Other Unconventional T Lymphocytes: What do they See and What do they do? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 2272–2279.
- Khanna, K.K., and Jackson, S.P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.* 27, 247–254.
- Kindt, T.J., Goldsby, R.A., and Osborne, B.A. *Kuby's immunology*. 6th ed. New York: W.H. Freeman, 2007. 574 p. ISBN 978-0-7167-8590-3
- Kirsch, I.R. (1994). V(D)J Recombination and Ataxia-telangiectasia: A Review. *Int. J. Radiat. Biol.* 66, S97–S108.
- Kirsch, I.R. (1997). Trans-rearrangements and the risk of lymphoid malignancy. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 8 *Suppl* 2, 45–48.
- Kitagawa, T., Mori, K., Kishi, H., Tagoh, H., Nagata, T., Kurioka, H., and Muraguchi, A. (1996). Chromatin structure and transcriptional regulation of human RAG-1 gene. *Blood* 88, 3785–3791.
- Klein, I.A., Resch, W., Jankovic, M., Oliveira, T., Yamane, A., Nakahashi, H., Di Virgilio, M., Bothmer, A., Nussenzweig, A., Robbiani, D.F., et al. (2011). Translocation-capture sequencing reveals the extent and nature of chromosomal rearrangements in B lymphocytes. *Cell* 147, 95–106.

- Kobayashi, Y., Tycko, B., Soreng, A.L., and Sklar, J. (1991). Transrearrangements between antigen receptor genes in normal human lymphoid tissues and in ataxia telangiectasia. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *147*, 3201–3209.
- Kojis, T.L., Gatti, R.A., and Sparkes, R.S. (1991). The cytogenetics of ataxia telangiectasia. *Cancer Genet. Cytogenet.* *56*, 143–156.
- Komárek, L., Benecko, V., Mika, J., Rettich, F., Svobodová, A., Veselá, J., and Volf, J. (2003). Standardní operační postupy pro biologické monitorování genotoxických účinků faktorů prostředí. Praha: Státní zdravotní ústav v Praze. ISSN 0862-5956
- Korsmeyer, S.J. (1992). Chromosomal Translocations in Lymphoid Malignancies Reveal Novel Proto-Oncogenes. *Annu. Rev. Immunol.* *10*, 785–807.
- Koubková, L., Vojtěšek, B., and Vyzula, R. (2014). Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi. *Klin. Onkol. Cas. České Slov. Onkol. Společnosti* *27 Suppl 1*, S61–S68.
- Kubickova, S., Cernohorska, H., Musilova, P., and Rubes, J. (2002). The use of laser microdissection for the preparation of chromosome-specific painting probes in farm animals. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* *10*, 571–577.
- Kuzmuk, K.N., Schook L.B. (2011): Pigs as a model for biomedical sciences. In: Rothschild M.F., Ruvinsky A. (eds) *The genetics of the pig*. CAB International, Wallingford, 426–444
- Labhart, P. (1999). Nonhomologous DNA end joining in cell-free systems. *Eur. J. Biochem. FEBS* *265*, 849–861.
- Larmonie, N.S.D., Dik, W.A., Meijerink, J.P.P., Homminga, I., van Dongen, J.J.M., and Langerak, A.W. (2013). Breakpoint sites disclose the role of the V(D)J recombination machinery in the formation of T-cell receptor (TCR) and non-TCR associated aberrations in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* *98*, 1173–1184.
- Lear, T.L., Brandon, R., Piumi, F., Terry, R.R., Guérin, G., Thomas, S., and Bailey, E. (2001). Mapping of 31 horse genes in BACs by FISH. *Chromosome Res.* *9*, 261–262.
- Lefranc, M.-P. (2014). Immunoglobulin and T Cell Receptor Genes: IMGT(®) and the Birth and Rise of Immunoinformatics. *Front. Immunol.* *5*, 22.
- Lefranc, M.P., and Rabbitts, T.H. (1991). Genetic organization of the human T cell receptor gamma locus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *173*, 3–9.
- Lindblad-Toh, K., Wade, C.M., Mikkelsen, T.S., Karlsson, E.K., Jaffe, D.B., Kamal, M., Clamp, M., Chang, J.L., Kulbokas, E.J., Zody, M.C., et al. (2005). Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* *438*, 803–819.
- Lipkowitz, S., Stern, M.H., and Kirsch, I.R. (1990). Hybrid T cell receptor genes formed by interlocus recombination in normal and ataxia-telangiectasis lymphocytes. *J. Exp. Med.* *172*, 409–418.

- Lipkowitz, S., Garry, V.F., and Kirsch, I.R. (1992). Interlocus V-J recombination measures genomic instability in agriculture workers at risk for lymphoid malignancies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 5301–5305.
- Lista, F., Bertness, V., Guidos, C.J., Danska, J.S., and Kirsch, I.R. (1997). The absolute number of trans-rearrangements between the TCRG and TCRB loci is predictive of lymphoma risk: a severe combined immune deficiency (SCID) murine model. *Cancer Res.* *57*, 4408–4413.
- Lopes, L.F., Dias Neto, E., Lorand-Metze, I., Latorre, M.R., and Simpson, A.J. (2001). Analysis of Vgamma/Jbeta trans-rearrangements in paediatric patients undergoing chemotherapy. *Br. J. Haematol.* *113*, 1001–1008.
- Lopes, L.F., Piccoli, F.D.S., Paixão, V.A., Latorre, M. do R.D.O., Camargo, B. de, Simpson, A.J.G., and Caballero, O.L. (2004). Association of CYP3A4 genotype with detection of Vgamma/Jbeta trans-rearrangements in the peripheral blood leukocytes of pediatric cancer patients undergoing chemotherapy for ALL. *Leuk. Res.* *28*, 1281–1286.
- Lundin, C., Hjorth, L., Behrendtz, M., Ehinger, M., Biloglav, A., and Johansson, B. (2013). Submicroscopic genomic imbalances in Burkitt lymphomas/leukemias: association with age and further evidence that 8q24/MYC translocations are not sufficient for leukemogenesis. *Genes. Chromosomes Cancer* *52*, 370–377.
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., and Lieber, M.R. (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* *108*, 781–794.
- Marculescu, R., Vanura, K., Montpellier, B., Roulland, S., Le, T., Navarro, J.-M., Jäger, U., McBlane, F., and Nadel, B. (2006). Recombinase, chromosomal translocations and lymphoid neoplasia: targeting mistakes and repair failures. *DNA Repair* *5*, 1246–1258.
- Massari, S., Antonacci, R., De Caro, F., Lipsi, M.R., and Ciccarese, S. (1997). Assignment of the TCRA/TCRD locus to sheep chromosome bands 7q1.4-->q2.2 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* *79*, 193–195.
- Massari, S., Bellahcene, F., Vaccarelli, G., Carelli, G., Mineccia, M., Lefranc, M.-P., Antonacci, R., and Ciccarese, S. (2009). The deduced structure of the T cell receptor gamma locus in *Canis lupus familiaris*. *Mol. Immunol.* *46*, 2728–2736.
- McVay, L.D., Jaswal, S.S., Kennedy, C., Hayday, A., and Carding, S.R. (1998). The generation of human gammadelta T cell repertoires during fetal development. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *160*, 5851–5860.
- Meaburn, K.J., Misteli, T., and Soutoglou, E. (2007). Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. *Semin. Cancer Biol.* *17*, 80–90.
- Messier, T.L., O'Neill, J.P., Hou, S.-M., Nicklas, J.A., and Finette, B.A. (2003). In vivo transposition mediated by V(D)J recombinase in human T lymphocytes. *EMBO J.* *22*, 1381–1388.
- Meydan, D., Nilsson, T., Törnblom, M., Hagmar, L., Hellgren, D., Fuscoe, J.C., and Lambert, B. (1999). The frequency of illegitimate TCRbeta/gamma gene recombination in human lymphocytes: influence of age, environmental exposure and cytostatic treatment, and correlation with frequencies of t(14;18) and hprt mutation. *Mutat. Res.* *444*, 393–403.

Miccoli, M.C., Antonacci, R., Vaccarelli, G., Lanave, C., Massari, S., Crihiu, E.P., and Ciccarese, S. (2003). Evolution of TRG Clusters in Cattle and Sheep Genomes as Drawn from the Structural Analysis of the Ovine TRG2@ Locus. *J. Mol. Evol.* 57, 52–62.

Mineccia, M., Massari, S., Linguiti, G., Ceci, L., Ciccarese, S., and Antonacci, R. (2012). New insight into the genomic structure of dog T cell receptor beta (TRB) locus inferred from expression analysis. *Dev. Comp. Immunol.* 37, 279–293.

Misdorp W. (2003) Congenital and hereditary tumours in domestic animals. 2. Pigs. A review. *Vet Q* 25:17–30

Mitui, M., Nahas, S.A., Du, L.T., Yang, Z., Lai, C.H., Nakamura, K., Arroyo, S., Scott, S., Purayidom, A., Concannon, P., et al. (2009). Functional and computational assessment of missense variants in the ataxia-telangiectasia mutated (ATM) gene: mutations with increased cancer risk. *Hum. Mutat.* 30, 12–21.

MS Columns [Internet]. USA: MACS Miltenyi Biotec; c2015 [cited 2015 Aug 13]. Available from:

<https://www.miltenyibiotec.com/~media/Images/Products/Import/0001300/IM0001300.asas?force=1>.

Musilova, P., Kubickova, S., Zrnova, E., Horin, P., Vahala, J., and Rubes, J. (2007). Karyotypic relationships among *Equus grevyi*, *Equus burchelli* and domestic horse defined using horse chromosome arm-specific probes. *Chromosome Res.* 15, 807–813.

Musilova, P., Kubickova, S., Vahala, J., and Rubes, J. (2013). Subchromosomal karyotype evolution in Equidae. *Chromosome Res.* 21, 175–187.

Musilova, P., Drbalova, J., Kubickova, S., Cernohorska, H., Stepanova, H., and Rubes, J. (2014). Illegitimate recombination between T cell receptor genes in humans and pigs (*Sus scrofa domestica*). *Chromosome Res.* 22, 483–493.

Nakase, H., Takahama, Y., and Akamatsu, Y. (2003). Effect of CpG methylation on RAG1/RAG2 reactivity: implications of direct and indirect mechanisms for controlling V(D)J cleavage. *EMBO Rep.* 4, 774–780.

NCBI home page: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Nowak, R.M., and Wilson, D.E. (1999). *Walker's Mammals of the World* (Baltimore: Johns Hopkins University Press).

Nussbaum, R.I., McIlhnes, R.R., Willard H.F. *Klinická genetika: Thompson and Thompson*. 6. vydání. Praha: Triton, 2004. 492 str. ISBN 80-7254-475-6

Ogihara, K., Ohba, T., Takai, H., Ishikawa, Y., and Kadota, K. (2012). Lymphoid neoplasms in swine. *J. Vet. Med. Sci. Jpn. Soc. Vet. Sci.* 74, 149–154.

Olaru, A., Petrie, H.T., and Livák, F. (2005). Beyond the 12/23 rule of VDJ recombination independent of the Rag proteins. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 6220–6226.

Ott, G., Rosenwald, A., and Campo, E. (2013). Understanding MYC driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification. *Blood* 122:4983–4992.

Parada, L.A., and Misteli, T. (2002). Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trends Cell Biol.* 12, 425–432.

Parolini, M., Mecucci, C., Matteucci, C., Giussani, U., Intermesoli, T., Tosi, M., Rambaldi, A., and Bassan, R. (2014). Highly aggressive T-cell acute lymphoblastic leukemia with t(8;14)(q24;q11): extensive genetic characterization and achievement of early molecular remission and long-term survival in an adult patient. *Blood Cancer J.* 4, e176.

Paul, W.E. *Fundamental immunology*. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2012. 1283 p. ISBN 978-1-4511-1783-7

Peterson, R.D., Funkhouser, J.D., Tuck-Muller, C.M., and Gatti, R.A. (1992). Cancer susceptibility in ataxia-telangiectasia. *Leukemia* 6 *Suppl 1*, 8–13.

Pinkel, D., Straume, T., and Gray, J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 2934–2938.

Prieur, M., Al Achkar, W., Aurias, A., Couturier, J., Dutrillaux, A.M., Dutrillaux, B., Flüry-Herard, A., Gerbault-Seureau, M., Hoffschir, F., and Lamoliatte, E. (1988). Acquired chromosome rearrangements in human lymphocytes: effect of aging. *Hum. Genet.* 79, 147–150.

Product Information: Histopaque®-1077 [Internet]. USA: Sigma-Aldrich; 2002 Nov 1 [cited 2015 Sep 13]. Available from: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/10771pis.pdf

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., et al. (2000). Hepatosplenic and Subcutaneous Panniculitis-Like γ/δ T Cell Lymphomas Are Derived from Different V δ Subsets of γ/δ T Lymphocytes. *J. Mol. Diagn. JMD* 2, 11–19.

Przybylski, G.K., Wanzeck, J., Verschuren, M.C.M., Van Dongen, J.J.M., Serke, S., and Schmidt, C.A. (2003). Identification of a new cluster of T-cell receptor delta recombining elements. *Immunology* 108, 16–23.

Przybylski, G.K., Dik, W.A., Wanzeck, J., Grabarczyk, P., Majunke, S., Martin-Subero, J.I., Siebert, R., Dölken, G., Ludwig, W.-D., Verhaaf, B., et al. (2005). Disruption of the BCL11B gene through inv(14)(q11.2q32.31) results in the expression of BCL11B-TRDC fusion transcripts and is associated with the absence of wild-type BCL11B transcripts in T-ALL. *Leukemia* 19, 201–208.

QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook [Internet]. [USA]: QIAGEN; c1999-2012 [cited 2015 Sep 13]. Available from: https://moodle.ufsc.br/pluginfile.php/1379318/mod_resource/content/0/QIAamp_DNA_Mini_Blood.pdf.

Qiagen PCR Cloning Kit [Internet]. [USA]: QIAGEN; c1999-2012 [cited 2015 Sep 13]. Available from: <https://www.qiagen.com/cz/shop/assay-technologies/end-point-pcr-and-rt-pcr-reagents/qiagen-pcr-cloning-kit#productdetails>

Reiman, A., Srinivasan, V., Barone, G., Last, J.I., Wootton, L.L., Davies, E.G., Verhagen, M.M., Willemsen, M.A., Weemaes, C.M., Byrd, P.J., et al. (2011). Lymphoid tumours and

breast cancer in ataxia telangiectasia; substantial protective effect of residual ATM kinase activity against childhood tumours. *Br. J. Cancer* *105*, 586–591.

Reinink, P., and Van Rhijn, I. (2009). The bovine T cell receptor alpha/delta locus contains over 400 V genes and encodes V genes without CDR2. *Immunogenetics* *61*, 541–549.

Rendle, D.I., Hughes, K.J., Farish, C., and Kessell, A. (2012). Multicentric T-cell lymphoma presenting as inferior palpebral swelling in a Standardbred mare. *Aust. Vet. J.* *90*, 485–489.

van Rhijn, I., Spiering, R., Smits, M., van Blokland, M.T.M., de Weger, R., van Eden, W., Rutten, V.P.M.G., and Koets, A.P. (2007). Highly diverse TCR delta chain repertoire in bovine tissues due to the use of up to four D segments per delta chain. *Mol. Immunol.* *44*, 3155–3161.

Richard, F., Messaoudi, C., Lombard, M., and Dutrillaux, B. (2001). Chromosome homologies between man and mountain zebra (*Equus zebra hartmannae*) and description of a new ancestral synteny involving sequences homologous to human chromosomes 4 and 8. *Cytogenet. Cell Genet.* *93*, 291–296.

Richards, M.H., and Nelson, J.L. (2000). The Evolution of Vertebrate Antigen Receptors: A Phylogenetic Approach. *Mol. Biol. Evol.* *17*, 146–155.

Robertson, A., Allen, J., Laney, R., and Curnow, A. (2013). The cellular and molecular carcinogenic effects of radon exposure: a review. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 14024–14063.

Roix, J.J., McQueen, P.G., Munson, P.J., Parada, L.A., and Misteli, T. (2003). Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. *Nat. Genet.* *34*, 287–291.

Roukos, V., and Misteli, T. (2014). The biogenesis of chromosome translocations. *Nat. Cell Biol.* *16*, 293–300.

Sadofsky, M.J. (2001). The RAG proteins in V(D)J recombination: more than just a nuclease. *Nucleic Acids Res.* *29*, 1399–1409.

Satou, Y., and Matsuoka, M. (2012). Molecular and Cellular Mechanism of Leukemogenesis of ATL: Emergent Evidence of a Significant Role for HBZ in HTLV-1-Induced Pathogenesis. *Leuk. Res. Treat.* *2012*, 213653.

Sawasdikosol, S., Hague, B.F., Zhao, T.M., Bowers, F.S., Simpson, R.M., Robinson, M., and Kindt, T.J. (1993). Selection of rabbit CD4- CD8- T cell receptor-gamma/delta cells by in vitro transformation with human T lymphotropic virus-I. *J. Exp. Med.* *178*, 1337–1345.

Schrenzel, M.D., and Ferrick, D.A. (1995). Horse (*Equus caballus*) T-cell receptor alpha, gamma, and delta chain genes: nucleotide sequences and tissue-specific gene expression. *Immunogenetics* *42*, 112–122.

Schrenzel, M.D., Watson, J.L., and Ferrick, D.A. (1994). Characterization of horse (*Equus caballus*) T-cell receptor beta chain genes. *Immunogenetics* *40*, 135–144.

Sedlak, C., Patzl, M., Saalmüller, A., and Gerner, W. (2014). CD2 and CD8 α define porcine $\gamma\delta$ T cells with distinct cytokine production profiles. *Dev. Comp. Immunol.* *45*, 97–106.

Shiloh, Y., and Kastan, M.B. (2001). ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths. *Adv. Cancer Res.* *83*, 209–254.

- Smith, S.M., Anastasi, J., Cohen, K.S., and Godley, L.A. (2010). The impact of MYC expression in lymphoma biology: beyond Burkitt lymphoma. *Blood Cells. Mol. Dis.* 45, 317–323.
- Solinas-Toldo, S., Lampel, S., Stilgenbauer, S., Nickolenko, J., Benner, A., Döhner, H., Cremer, T., and Lichter, P. (1997). Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes. Chromosomes Cancer* 20, 399–407.
- Soulas-Sprauel, P., Rivera-Munoz, P., Malivert, L., Le Guyader, G., Abramowski, V., Revy, P., and de Villartay, J.-P. (2007). V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining. *Oncogene* 26, 7780–7791.
- Steiner, C.C., and Ryder, O.A. (2011). Molecular phylogeny and evolution of the Perissodactyla. *Zool. J. Linn. Soc.* 163, 1289–1303.
- Su, C., Jakobsen, I., Gu, X., and Nei, M. (1999). Diversity and evolution of T-cell receptor variable region genes in mammals and birds. *Immunogenetics* 50, 301–308.
- Swift, M., Morrell, D., Cromartie, E., Chamberlin, A.R., Skolnick, M.H., and Bishop, D.T. (1986). The incidence and gene frequency of ataxia-telangiectasia in the United States. *Am. J. Hum. Genet.* 39, 573–583.
- Taalman, R.D., Hustinx, T.W., Weemaes, C.M., Seemanová, E., Schmidt, A., Passarge, E., and Scheres, J.M. (1989). Further delineation of the Nijmegen breakage syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 32, 425–431.
- Taintor, J., and Schleis, S. (2011). Equine lymphoma. *Equine Vet. Educ.* 23, 205–213.
- Takamatsu, H.-H., Denyer, M.S., Stirling, C., Cox, S., Aggarwal, N., Dash, P., Wileman, T.E., and Barnett, P.V. (2006). Porcine $\gamma\delta$ T cells: Possible roles on the innate and adaptive immune responses following virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112, 49–61.
- Talker, S.C., Käser, T., Reutner, K., Sedlak, C., Mair, K.H., Koinig, H., Graage, R., Viehmann, M., Klingler, E., Ladinig, A., et al. (2013). Phenotypic maturation of porcine NK- and T-cell subsets. *Dev. Comp. Immunol.* 40, 51–68.
- Tanimoto, T., and Ohtsuki, Y. (1998). T-cell-rich B-cell lymphoma in a pig. *Vet. Pathol.* 35, 147–149.
- Tawn, E.J. (1988). The non-random occurrence of exchanges involving chromosomes 7 and 14 in human lymphocytes: A prospective study of control individuals. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 199, 215–220.
- Teske, E. (1994). Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. *Vet. Q.* 16, 209–219.
- The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma (1997). *Blood* 89, 3909–3918

Tizard, R.I. *Veterinary Immunology*. 9th ed. Missouri: Elsevier Inc./Saunders, 2012. 568 p. ISBN: 978-1-4557-0362-3

Tyagi, S., and Kramer, F.R. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* 14, 303–308.

Tycko, B., Palmer, J.D., and Sklar, J. (1989). T cell receptor gene trans-rearrangements: chimeric gamma-delta genes in normal lymphoid tissues. *Science* 245, 1242–1246.

Uenishi, H., Eguchi-Ogawa, T., Toki, D., Morozumi, T., Tanaka-Matsuda, M., Shinkai, H., Yamamoto, R., and Takagaki, Y. (2009). Genomic sequence encoding diversity segments of the pig TCR δ chain gene demonstrates productivity of highly diversified repertoire. *Mol. Immunol.* 46, 1212–1221.

Vaccarelli, G., Miccoli, M.C., Lanave, C., Massari, S., Cribiu, E.P., and Ciccarese, S. (2005). Genomic organization of the sheep TRG1@ locus and comparative analyses of Bovidae and human variable genes. *Gene* 357, 103–114.

Vaccarelli, G., Miccoli, M.C., Antonacci, R., Pesole, G., and Ciccarese, S. (2008). Genomic organization and recombinational unit duplication-driven evolution of ovine and bovine T cell receptor gamma loci. *BMC Genomics* 9, 81.

Vaccarelli, G., Antonacci, R., Tasco, G., Yang, F., Giordano, L., El Ashmaoui, H.M., Hassanane, M.S., Massari, S., Casadio, R., and Ciccarese, S. (2012). Generation of diversity by somatic mutation in the *Camelus dromedarius* T-cell receptor gamma variable domains. *Eur. J. Immunol.* 42, 3416–3428.

Varon, R., Seemanova, E., Chrzanowska, K., Hnateyko, O., Piekutowska-Abramczuk, D., Krajewska-Walasek, M., Sykut-Cegielska, J., Sperling, K., and Reis, A. (2000). Clinical ascertainment of Nijmegen breakage syndrome (NBS) and prevalence of the major mutation, 657del5, in three Slav populations. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 8, 900–902.

Ventura, R.A., Martin-Subero, J.I., Jones, M., McParland, J., Gesk, S., Mason, D.Y., and Siebert, R. (2006). FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J. Mol. Diagn. JMD* 8, 141–151.

Vernau, W., Valli, V.E., Dukes, T.W., Jacobs, R.M., Shoukri, M., and Heeney, J.L. (1992). Classification of 1,198 cases of bovine lymphoma using the National Cancer Institute Working Formulation for human non-Hodgkin's lymphomas. *Vet. Pathol.* 29, 183–195.

Vilenchik, M.M., and Knudson, A.G. (2003). Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 12871–12876.

Voelkerding, K.V., Dames, S.A., and Durtschi, J.D. (2009). Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin. Chem.* 55, 641–658.

Wain, H.M., Bruford, E.A., Lovering, R.C., Lush, M.J., Wright, M.W., and Povey, S. (2002). Guidelines for human gene nomenclature. *Genomics* 79, 464–470.

- Weiss, A., Kadlecsek, T., Iwashima, M., Chan, A., and Van Oers, N. (1995). Molecular and Genetic Insights into T-Cell Antigen Receptor Signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 766, 149–156.
- Weiss, A.T.A., Hecht, W., Henrich, M., and Reinacher, M. (2008). Characterization of C-, J- and V-region-genes of the feline T-cell receptor gamma. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 124, 63–74.
- Xiong, N., and Raulet, D.H. (2007). Development and selection of $\gamma\delta$ T cells. *Immunol. Rev.* 215, 15–31.
- Xuan, J., Yu, Y., Qing, T., Guo, L., and Shi, L. (2013). Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges. *Cancer Lett.* 340, 284–295.
- Yang, H., and Parkhouse, R.M. (1996). Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues. *Immunology* 89, 76–83.
- Yang, F., Fu, B., O'Brien, P.C.M., Robinson, T.J., Ryder, O.A., and Ferguson-Smith, M.A. (2003). Karyotypic relationships of horses and zebras: results of cross-species chromosome painting. *Cytogenet. Genome Res.* 102, 235–243.
- Yang, F., Fu, B., O'Brien, P.C.M., Nie, W., Ryder, O.A., and Ferguson-Smith, M.A. (2004). Refined genome-wide comparative map of the domestic horse, donkey and human based on cross-species chromosome painting: insight into the occasional fertility of mules. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* 12, 65–76.
- Yokota, R., Sato, K., Wada, Y., Ishikawa, Y., and Kadota, K. (2015). Immature T cell neoplasms in three young cattle. *J. Vet. Med. Sci. Jpn. Soc. Vet. Sci.*
- Zhang, Y., McCord, R.P., Ho, Y.-J., Lajoie, B.R., Hildebrand, D.G., Simon, A.C., Becker, M.S., Alt, F.W., and Dekker, J. (2012). Chromosomal translocations are guided by the spatial organization of the genome. *Cell* 148, 908–921.

9. PUBLIKAČNÍ ČINNOST A ÚČAST NA KONFERENCÍCH

9.1 Publikace v impaktovaných časopisech

Drbalova, J., Musilova, P., Kubickova, S., Sebestova, H., Vahala, J., and Rubes, J. (2014). Impact of karyotype organization on interlocus recombination between T cell receptor genes in Equidae. *Cytogenet. Genome Res.* 144, 306–314.

Musilova, P., Drbalova, J., Kubickova, S., Cernohorska, H., Stepanova, H., and Rubes, J. (2014). Illegitimate recombination between T cell receptor genes in humans and pigs (*Sus scrofa domestica*). *Chromosome Res.* 22, 483-493

9.2 Posterová sdělení

Krchnava J., Musilova P., Kubickova S. and Rubes J. Chromosomal rearrangements with breakpoints in T cell receptor genes in Equidae. 9th European Cytogenetics Conference; June 29-July 2, 2013, Dublin, Ireland (2013).

Musilova P., Krchnava J., Kubickova S., Leva L., Cernohorska H., Stepanova H. and Rubes J. Are frequencies of chromosomal rearrangements with breakpoints in T cell receptor genes affected by the proportion of $\gamma\delta$ T lymphocytes? 9th European Cytogenetics Conference; June 29-July 2, 2013, Dublin, Ireland (2013).

Musilova P., Drbalova J., Kubickova S., Cernohorska H., Stepanova H. and Rubes J. Illegitimate recombination between T cell receptor genes. 21th International Colloquium on Animal Cytogenetics and Gene Mapping; June 7-10, 2014, Ischia, Italy (2014)

Impact of Karyotype Organization on Interlocus Recombination between T Cell Receptor Genes in Equidae

Jitka Drbalova^a Petra Musilova^a Svatava Kubickova^a Hana Sebestova^a
Jiri Vahala^b Jiri Rubes^a

^aCentral European Institute of Technology, Veterinary Research Institute, Brno, and ^bThe Dvur Kralove Zoo, Dvur Kralove n. L., Czech Republic

Key Words

Chromosome rearrangements · Equidae · Horse · Interlocus recombination · Karyotype · T cell receptor gene

Abstract

The T cell receptor (TCR) genes (*TRA*, *TRB*, *TRD* and *TRG*) reside in 3 different chromosomal regions. During the maturation of T lymphocytes, the TCR genes are rearranged by site-specific recombination, a process that also predisposes T cells to aberrant rearrangements. Illegitimate recombination between the TCR genes occurs at a low level in healthy individuals, but this frequency may correlate with the risk of lymphoma. The aim of this work was to investigate interlocus recombination in equids. Illegitimate rearrangements were studied in peripheral blood lymphocytes by FISH with painting and BAC probes and by sequencing of PCR products, and the frequencies of recombination were assessed in horses and 4 other equids. The presence of several trans-rearrangement products between the *TRA* and *TRG* genes was verified by PCR in all investigated equids. Frequencies of trans-rearrangements in horses are higher than in humans, and colocalization of the TCR genes on the same chromosome increases the incidence of trans-rearrangements between them. The orientation of the TCR genes does not impact in-

terlocus recombination itself but does affect the viability of cells carrying its products and consequently the number of trans-rearrangements observed in lymphocytes.

© 2015 S. Karger AG, Basel

The T cell receptor (TCR), a heterodimer composed of 2 different protein chains $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$, expressed as a part of the TCR complex, is responsible for recognizing antigens on the surface of T lymphocytes (or T cells). There are 4 TCR genes encoding T cell receptor chains: *TRA*, *TRB*, *TRD*, and *TRG* for the α , β , δ , and γ chains, respectively. As *TRD* is embedded within the *TRA* locus, for which the symbol *TRA/TRD* is used, the TCR genes are located in 3 different chromosomal regions.

During the maturation of T cells, the TCR genes are rearranged by site-specific recombination between clusters of variable (V), diversity (D), and joining (J) segments. This random gene rearrangement helps to generate diverse antigen receptors. However, transient failure in this process can lead to interlocus recombination of different TCR genes, resulting in chromosomal rearrangements that include the reciprocal translocation or inversion of chromosomes [Hecht et al., 1987; Kirsch, 1994]. The resulting hybrid antigen receptor chains may be func-

tional and extend the diversity of the immune response [Davodeau et al., 1994; Hinz et al., 2000]. A low percentage of peripheral blood T lymphocytes in healthy humans carry such illegitimate rearrangements [Hecht et al., 1987; Prieur et al., 1988; Tawn, 1988], and their frequencies have also been assessed in pigs, showing that the incidence is higher in pigs than in humans [Musilova et al., 2014].

V(D)J recombination in T cells is principally based on the formation of double-strand breaks (DSBs), and this multistep process resembles DNA repair mechanisms [Roukos and Misteli, 2014]. It has been suggested that the spatial proximity and temporal coincidence of DSBs play an important role in the occurrence of chromosomal rearrangements [Roix et al., 2003; Bowen et al., 2013]. As chromosomes as well as their genes are positioned within interphase nuclei in a specific manner [Parada and Misteli, 2002; Meaburn et al., 2007], it appears that the frequency of chromosomal rearrangements with breakpoints at particular gene loci may correspond to their location on chromosomes.

The family Equidae is composed of a single genus, *Equus*, which comprises horses (*E. caballus*, *E. przewalskii*), African and Asiatic asses (*E. asinus*, *E. hemionus*, *E. kiang*), and zebras (*E. grevyi*, *E. burchelli*, *E. zebra*) [Nowak, 1999]. The phylogeny of this genus has been extensively studied [Steiner and Ryder, 2011; Jónsson et al., 2014], and although equids diverged quite recently, their karyotypes differ widely due to their rapid evolution [Musilova et al., 2013].

In horses, the TCR genes are located on chromosomes 1q (*TRA/TRD*), 4p (*TRG*), and 4q (*TRB*). Chromosome 1 has been preserved in all equids, with centromere repositioning in Hartmann's zebra (*E. z. hartmannae*) and kiang [Yang et al., 2003; Musilova et al., 2013]. Horse chromosome 4 fused with chromosome 31 in the lineage leading to asses and zebras [Yang et al., 2004; Musilova et al., 2007]. The chromosome 4/31 subsequently underwent a pericentric inversion in African ass (*E. asinus*) [Yang et al., 2004; Musilova et al., 2013] which situated *TRG* and *TRB* on the same chromosome arm. A centric fission of chromosome 4/31, which occurred in Hartmann's zebra [Richard et al., 2001; Yang et al., 2003], separated *TRG* and *TRB* onto 2 chromosomes. Moreover, tandem telomere-telomere fusion of the segment corresponding to horse chromosome 4q with another chromosome in Hartmann's zebra resulted in an inverse orientation of the segment with respect to the centromere compared to the orientation in other equids [Musilova et al., 2013]. Here, we tested the hypothesis that the organization of chromosomes carrying the TCR genes impacts the

frequency of interlocus rearrangements between these genes.

The aim of this study was to assess the frequencies of chromosome rearrangements with breakpoints in TCR gene loci in peripheral blood lymphocyte cultures of the domestic horse and 4 other representative equids by means of fluorescence in situ hybridization (FISH) using painting probes. We also compared these frequencies with those of corresponding rearrangements in pig and human lymphocytes to investigate whether karyotype rearrangements can influence the incidence of interlocus recombinations between the TCR genes. The rough annotation of the genomic organization of the horse *TRA* and *TRG* genes also enabled us to detect the presence of certain interlocus rearrangements in equids using molecular biology methods.

Materials and Methods

Animals

Whole blood samples used for metaphase preparations were obtained from 10 domestic horses (*E. caballus*, ECA) of different breeds from the Equine Clinic of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic, 5 donkeys (*E. asinus*, EAS) from a private owner (Hustopec u Brna, Czech Republic), 5 Grevy's zebras (*E. grevyi*, EGR), 6 Burchell's zebras (*E. burchelli*, EBU) including 3 subspecies (*E. b. boehmi*, *E. b. antiquorum*, *E. b. cuninghami*), and 4 Hartmann's zebras (*E. z. hartmannae*, EZH) from the collection of the Dvur Kralove Zoo, Czech Republic. Animals of both sexes were included, and all were clinically healthy.

Lymphocyte Cultures

Lymphocyte cultures were prepared in complete medium RPMI1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) supplemented with 20% calf serum (Biotech, Prague, Czech Republic), 15 µg/ml pokeweed mitogen (Sigma-Aldrich), heparin (Zentiva, Prague, Czech Republic) at a final concentration of 15 IU/ml, and an antibiotic-antimycotic solution (Sigma-Aldrich). The cultures were incubated at 37°C for 72 h. One hour before the end of cultivation, colcemid (Sigma-Aldrich) was added at a final concentration of 1 µg/ml. The cells were centrifuged, suspended in a hypotonic solution of 0.075 M KCl for 20 min, and fixed in 3:1 methanol:acetic acid according to a standard procedure. Metaphase chromosome spreads were prepared by dropping the cell suspensions onto moistened microscopic slides which were then air-dried.

Fluorescence in situ Hybridization

Chromosome painting probes for horse chromosomes 1q, 4, 4p, and 4q and Hartmann's zebra chromosome 4p (homologous to horse chromosomes 4p and 31) were prepared by laser microdissection according to a described method [Kubickova et al., 2002]. Only good-quality probes with a high signal-to-noise ratio were used for the study. Except for the Hartmann's zebra samples, a 2-round FISH procedure was performed.

The first round of FISH was performed using probes for horse chromosome 1q (Spectrum Green) and horse chromosome 4

Table 1. Horse BAC clones used in FISH experiments

BAC clone	Locus	Chromosome	Position
CH241-428K2	<i>TRA/TRD</i>	1q	158,784,876–159,016,735
CH241-26N23	<i>TRB</i>	4q	95,446,801–95,682,553
CH241-12H15	<i>TRG</i>	4p	9,549,123–9,788,129
CH241-302L24	<i>TRA/TRD</i> prox	1q	158,053,053–158,313,396
CH241-252P17	<i>TRA/TRD</i> dist	1q	160,995,178–161,264,251
CH241-250H15	<i>TRB</i> prox	4q	94,515,516–94,761,181
CH241-420O5	<i>TRB</i> dist	4q	96,253,142–96,477,235
CH241-290P1	<i>TRG</i> prox	4p	9,937,734–10,207,909
CH241-366E24	<i>TRG</i> dist	4p	8,097,256–8,342,822

BAC clones in bold were used for the mapping of the TCR genes. Position of BAC clone is given in bp according to NCBI, EquCab2.0.

prox = Region proximal to TCR loci in relation to the centromere; dist = region distal to TCR loci in relation to the centromere.

(Spectrum Orange). In the second round of FISH, the slides were rehybridized with the probes for horse chromosomes 4p (Spectrum Orange) and 4q (Spectrum Green). As chromosomes homologous to horse chromosomes 4 and 31 are fused in asses and zebras, the probe cocktails were enriched with Hartmann's zebra chromosome 4p probe (Spectrum Orange) for these species. For the examination of the Hartmann's zebra slides, we used a combination of probes for horse chromosome 4 and Hartmann's zebra chromosome 4p (both Spectrum Orange) and horse chromosomes 1q and 4q (both Spectrum Green) that resulted in a 3-colored FISH. As horse probe 4q did not cover the pericentric region of this chromosome, a region corresponding to horse chromosome 4q in Hartmann's zebra was painted in yellow with a red terminal part (online suppl. fig. 1u–w; for all online suppl. material, see www.karger.com/doi/10.1159/000377712).

BAC probes, used for the physical mapping of the TCR genes and as dual fusion probes for the confirmation of breakpoints in these genes (table 1), were obtained from the Children's Hospital Oakland Research Institute (CHORI). The dual fusion probes for the equine TCR loci consisted of 2 pairs of BAC probes flanking the genes. Clones were labeled with digoxigenin-11-dUTP or biotin-16-dUTP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and detected using anti-digoxigenin-rhodamine (Roche) or fluorescein avidin (Vector Laboratories, Burlingame, Calif., USA), respectively.

Hybridization was performed according to a previous report [Musilova et al., 2007] with slight modifications. A 10- μ l aliquot of the hybridization mixture (50% formamide, 10% dextran sulfate, 2 \times SSC) contained a minimum of 0.1 μ g of each painting probe or 10 ng of each BAC probe and 1–1.5 μ g of competitor horse DNA (prepared in our laboratory). After overnight hybridization, the slides with horse metaphase cells were washed in 0.4 \times SSC/0.3% IGEPAL (pH 7.0), and the slides with other equid metaphase cells were washed in 0.7 \times SSC/0.3% IGEPAL (pH 7.0) at 72°C for 2 min.

Analysis

We evaluated 5,000 metaphase cells from each animal, with the exception of one Hartmann's zebra; due to the lack of material, we were able to evaluate only 3,474 metaphases for this animal. The slides were examined using a Zeiss microscope equipped with the

slide scanning system Metafer (MetaSystems, Altussheim, Germany). Metaphase cells with translocations or inversions were captured and analyzed using the ISIS software (MetaSystems). The findings were checked by 2 evaluators.

A statistical analysis was performed with the nonparametric Mann-Whitney exact test using the SPSS software package, version 18 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, Ill., USA). Differences between groups were considered significant if probability values of $p < 0.05$ were obtained.

Equine TCR Genomic Organization

Sequences of chromosome 1 (NC_009144) and chromosome 4 (NC_009147) were searched for the presence of V, J, and C (constant) regions of the *TRA* and *TRG* genes. NC_009144 was compared with mRNA sequences of the horse *TRA* gene (L38315, L38316, L38355, L38383, L38400, L38401) and the bovine (*Bos taurus*) *TRA* gene (AY227782) using the BL2seq program. NC_009147 was analyzed by alignment with the horse *TRG* mRNA sequence (L38392, L38393) and the ovine (*Ovis aries*) *TRG1* (DQ992075) and *TRG2* (DQ992074) genes.

Detection of TRAV-TRGJ Trans-Rearrangements

Sequences of all identified V regions of *TRA* on NC_009144 or J segments of *TRG* on NC_009147 were aligned by CLUSTALW, and a highly conserved region among the sequences was used for the design of primers for a nested PCR. Forward primers (outer 5'-ACATCACTGTCCTCTGAAGGAGCC-3', inner 5'-TCTGAGGAGCCCCTCTGGAGC-3') were selected for V regions of *TRA* on chromosome 1 and 2 reverse primers (outer 5'AGAGGGAGTTACTATGAGCTTAGTCC-3', inner 5'-TACTATGAGCTTAGTCCCTTTCC-3') for J segments of *TRG* on chromosome 4.

A 2-step nested PCR was used to detect TCR trans-rearrangements. Genomic DNA was extracted from blood samples using a QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Five separate amplification reactions were performed on the same DNA sample. Each tube contained 4 μ l of DNA in a 20- μ l PCR reaction with 1 \times Combi PPP Master Mix (Top-Bio, Prague, Czech Republic) and 1.6 μ M primers. The cycling parameters were 95°C for 4 min for the initial denaturation, 30 cycles at 95°C for 1 min,

56°C for 1 min, and 72°C for 2 min, with a final extension for 5 min at 72°C. A volume of 3 µl of each primary reaction product was used in a 30-µl secondary reaction with the same cycling parameters as for the first PCR. An 8-µl sample of the secondary reaction was visualized on a 2% agarose gel to indicate the presence of rearrangements. The amplification products were cloned into the pDrive Cloning vector (Qiagen), and recombinant plasmids were sequenced using BigDye terminator chemistry with an automated sequencer. The identification of the sequence as an illegitimate rearrangement was confirmed using the Blast program.

Results

The TCR genes were cytogenetically mapped in horse, donkey, Burchell's zebra, Grevy's zebra, and Hartmann's zebra. In horse, *TRA/TRD* was assigned to chromosome bands 1q24q25, *TRB* to 4q24q26, and *TRG* to 4p15p13. As the standard karyotype was not established in the other equids, the genes were localized only on chromosome arms in these species (fig. 1). All TCR genes mapped to regions of conserved synteny [Musilova et al., 2013].

Because the TCR genes are located in 3 chromosomal regions, interlocus recombination can result in 3 different chromosomal trans-rearrangements in each species (online suppl. fig. 1). The frequencies of chromosome rearrangements with breakpoints in the TCR loci were studied using painting probes hybridized to metaphase lymphocytes in 10 domestic horses, 5 donkeys, 6 Burchell's zebras, 5 Grevy's zebras, and 4 Hartmann's zebras (fig. 2, online suppl. table 1).

The frequencies of the translocations between *TRA/TRD* and *TRB* showed high variability among the investigated species, with the highest average frequency in Burchell's zebras (53.0×10^{-4}) and the lowest occurrence in Hartmann's zebras (3.8×10^{-4}). Compared to other equids, the frequency of this rearrangement was significantly higher in Burchell's zebras ($p < 0.01$) and lower in Hartmann's zebras ($p < 0.05$). The average frequencies of rearrangements between *TRA/TRD* and *TRG* ranged from 14.4×10^{-4} in horses to 22.2×10^{-4} in Hartmann's zebras. Differences between the respective species were not significant. Frequencies of rearrangements between *TRB* and *TRG* were significantly lower in Hartmann's zebras (1.1×10^{-4}) than in the other equids ($p < 0.05$), with frequencies ranging from 8.8×10^{-4} in donkeys to 18.3×10^{-4} in Burchell's zebras.

We observed some differences among respective rearrangements within the species. The frequency of rearrangements between the *TRA/TRD* and *TRB* loci was significantly higher than the frequencies of rearrangements

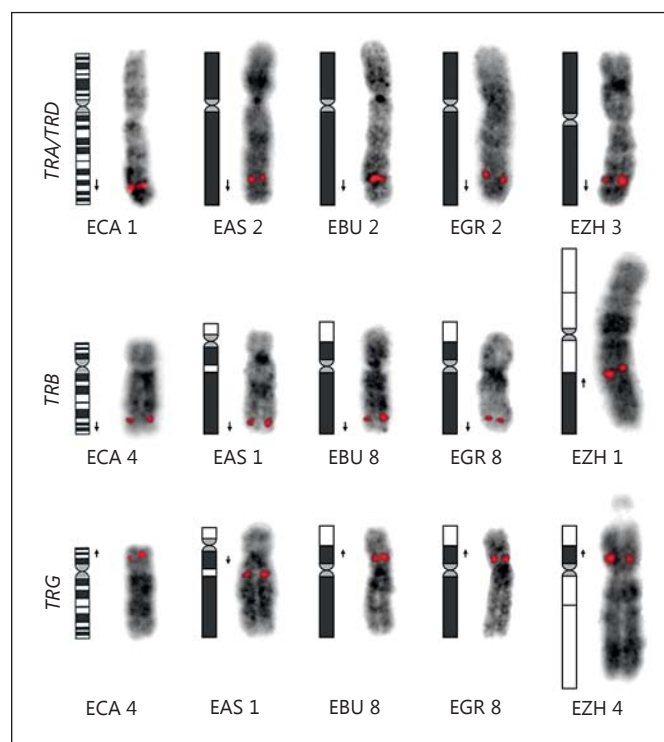


Fig. 1. Physical mapping of *TRA/TRD*, *TRB*, and *TRG* by FISH in horse, donkey, Burchell's zebra, Grevy's zebra, and Hartmann's zebra. The identity of each chromosome is shown below the chromosomes. The DAPI images are converted to black and white and inverted, the hybridization signals are in red, and a schematic diagram is shown on the left of each chromosome. Horse diagrams represent G-banded chromosomes. Regions homologous to respective horse chromosomes are depicted in dark grey in the diagrams of other equids. The arrows mark the position and orientation of the TCR genes on the chromosomes.

involving the *TRG* locus in Burchell's zebras ($p < 0.01$). In donkeys, the frequency of rearrangements between the *TRB* and *TRG* loci was significantly lower than the frequencies of rearrangements involving the *TRA/TRD* locus ($p < 0.05$). In Hartmann's zebras, the frequencies of rearrangements involving the *TRB* locus were significantly lower than the frequencies of rearrangements between the *TRA/TRD* and *TRG* loci ($p < 0.05$).

In species in which *TRB* and *TRG* are located on the same chromosome, the rearrangement between these genes can manifest itself as either an inversion or translocation between homologous chromosomes (online suppl. fig. 1e, g, k, l, o, p, s, t). This applies to all equids except Hartmann's zebra (fig. 1). The majority of trans-rearrangements between *TRB* and *TRG* in the investigated species with both genes located on the same chromosome were found to be inversions. Indeed, translocations between ho-

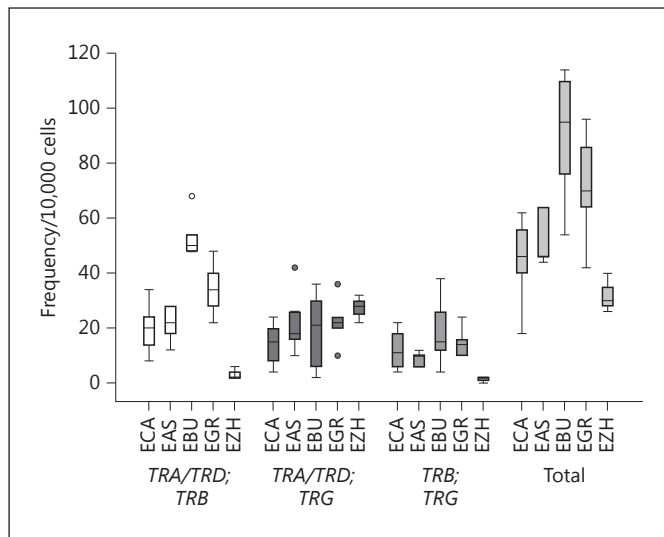


Fig. 2. Box plot showing the frequencies of trans-rearrangements in horse, donkey, Burchell's zebra, Grevy's zebra, and Hartmann's zebra. The vertical height of each box represents the 25–75% data range, the horizontal line within each box represents the median value, and the upper and lower extensions represent the maximum and minimum values.

mologous chromosomes accounted for only 10% (6/58) of these rearrangements in horse, 9% (2/22) in donkey, 13% (7/55) in Burchell's zebra, and 3% (1/37) in Grevy's zebra. The frequencies of inversions were significantly higher than the frequencies of translocations between homologous chromosomes in these species ($p < 0.01$).

To verify the breakpoints of chromosome rearrangements in horses, differentially labeled pairs of BAC probes flanking the TCR loci (dual fusion probes) were used for subsequent FISH in some experiments (online suppl. fig. 1b, d, f, h). Overall, we checked 33 translocations $t(1;4q)$, 16 translocations $t(1;4p)$, 14 inversions $inv(4)$, and 3 translocations $t(4p;4q)$. Only one translocation $t(1;4q)$ exhibited a breakpoint in a locus different from *TRA/TRD*, though the other breakpoint was located in *TRB*, as expected.

Other rearrangements of the painted chromosomes with undefined chromosomes were rarely observed during our examination. We detected 46 such translocations involving the q-arm of chromosome 1 (9.2/10,000 cells) and 17 translocations involving chromosome 4 (3.4/10,000 cells) in horses. BAC probes were used to verify the breakpoints in some of these rearrangements. A breakpoint in *TRA/TRD* was confirmed in 8 of 14 translocations involving chromosome 1, but none of the 16 translocations involving chromosome 4 had a breakpoint in

the TCR genes. Nonetheless, the painted regions translocated to unpainted chromosomes are very short in cases of a split in *TRB* or *TRG* and can easily be missed.

To estimate the equine TCR genomic organization, the sequence of equine chromosome 1 (NC_009144) was compared with mRNA sequences of the horse *TRA* gene (L38315, L38316, L38355, L38383, L38400, L38401). Approximately 30 regions have 73–94% similarity with V segments, and 4 regions show 91–98% similarity with J fragments. In addition, 37 J segments with 80–98% similarity were found by alignment with the bovine *TRA* gene (AY227782). The V segments were localized in the region 158,504–160,279 kb of equine chromosome 1. In total, 38 distinct J segments were identified in the region 160,707–160,767 kb. Exons of the single C segment with 90–98% similarity to the L38383 sequence were identified between 160,767–160,771 kb of NC_009144. Furthermore, the sequence of equine chromosome 4 (NC_009147) was searched for the presence of the V, J, and C regions of *TRG*. By alignment with the horse *TRG* mRNA sequence (L38392, L38393), we assessed 14 regions with 77–99% similarity to the C segment. Comparison with the ovine *TRG1* (DQ992075) and *TRG2* (DQ992074) genes showed a more complex structure, with 17 C segments (similarity 77–81%), 19 V segments (similarity 64–78%), and 18 J segments (similarity 77–89%) organized into clusters in the 8,766–9,816 kb region of chromosome 4.

Blood samples from 25 equids were examined for the presence of *TRAV-TRGJ* rearrangement by a 2-step nested PCR. Positive amplification products (~300-bp fragments) were detected in 18/25 DNA samples (7/9 horses, 5/5 donkeys, 2/4 Burchell's zebras, 2/3 Grevy's zebras, 2/4 Hartmann's zebras). These fragments were sequenced and the alignment using Blast analysis confirmed that these sequences correspond to a *TRAV-TRGJ* hybrid gene. Three different V regions of *TRA* and 5 J segments of *TRG* were involved in recombinant products. These V segments were located in the regions 159,412 kb, 159,545 kb, and 160,242 kb of NC_009144 and the J segments in the regions 8,782 kb, 8,860 kb, 8,918 kb, 8,981 kb, and 9,025 kb of NC_009147. In total, 10 different rearrangement products were identified, and up to 4 different products were detected in individual animals.

Discussion

The frequencies of chromosomal rearrangements with breakpoints in T cell receptor genes in the domestic horse and 4 other representative species from the family Equi-

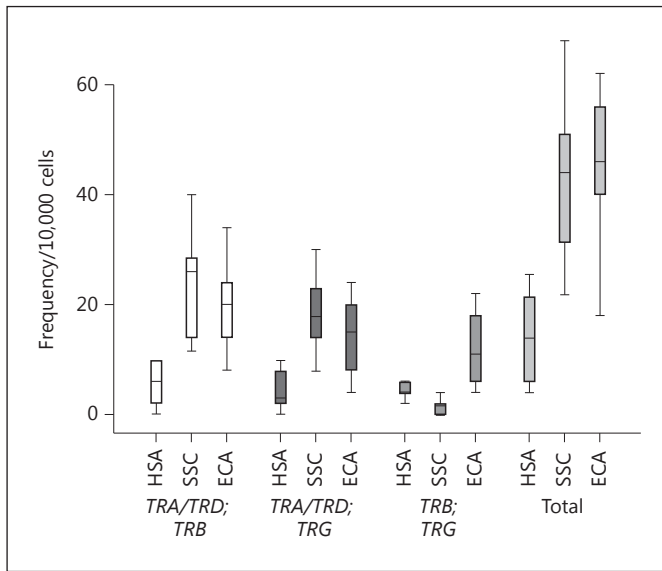


Fig. 3. Box plot showing the frequencies of trans-rearrangements in human, pig, and horse. The vertical height of each box represents the 25–75% data range, the horizontal line within each box represents the median value, and the upper and lower extensions represent the maximum and minimum values. Pig and human data are adopted from the study by Musilova et al. [2014].

dae are reported here for the first time. To date, the number of illegitimate recombinations between the TCR genes has been studied in humans [Hecht et al., 1987; Prieur et al., 1988; Tawn, 1988; Lipkowitz et al., 1990; Kobayashi et al., 1991; Musilova et al., 2014], mice [Huang et al., 2007; Bowen et al., 2013], and pigs [Musilova et al., 2014].

We used the same methodological approach as Musilova et al. [2014] who showed that the frequencies of translocations involving pig *TRA/TRD* were significantly higher than the frequencies of corresponding trans-rearrangements involving *TRA/TRD* in humans. Comparing the frequencies of trans-rearrangements in the TCR genes in equine peripheral blood lymphocytes from our study with those assessed in human and porcine peripheral blood lymphocytes in the study by Musilova et al. [2014], we discovered that the occurrence of all 3 types of trans-rearrangements is significantly higher in domestic horses than in humans ($p < 0.01$, Mann-Whitney test). Horses differ from pigs only in the higher frequency of translocations with breakpoints in *TRB* and *TRG* ($p < 0.01$) (fig. 3).

The construction of a mammalian evolutionary tree based on genetic, morphological, and fossil data has facilitated the precise assessment of phylogenetic relationships among mammalian orders [Froenicke, 2005; Ferguson-Smith and Trifonov, 2007]. Pigs (*Sus scrofa*), belong-

ing to Cetartiodactyla, are more related to domestic horses, members of the Perissodactyla order, than to humans (Primate order). This is in accordance with the fact that the frequencies of trans-rearrangements involving *TRA/TRD* do not differ between pigs and horses, though both are higher than in humans ($p < 0.01$). The decrease in the frequency of rearrangements between *TRB* and *TRG* in pigs can be attributed to the chromosomal location of these genes. Owing to karyotype evolution, both genes are located on the same chromosome in humans and horses but on 2 different chromosomes in pigs [Hiraiwa et al., 2001]. We observed a similar decrease in the frequency of recombination between *TRB* and *TRG* in Hartmann's zebra compared with other equids ($p < 0.05$). Hartmann's zebra is the only representative of Equidae with the split of the segments carrying these genes to 2 chromosomes (fig. 1) [Richard et al., 2001; Yang et al., 2003]. It has been previously shown that the intra-chromosomal joining of DSBs is favored over trans-chromosomal joining [Klein et al., 2011; Zhang et al., 2012], and the situation of these segments within the same chromosomal region influences the spatial proximity of the loci in interphase cells and thus alters their mutual accessibility for interlocus recombination. This is also consistent with our observation of the preferential occurrence of inversions to translocations between homologous chromosomes caused by recombination between the *TRB* and *TRG* genes co-harbored on a single chromosome. The observed ratio was 12:1 in humans [Musilova et al., 2014] and 156:16 in equids. The effect diminishes with the distance of DSBs on the chromosomes [Klein et al., 2011], and our results indicate that the effect is evident even for distant loci, as *TRB* and *TRG* are separated by 86 Mb in horses and 104 Mb in humans.

All Equidae species are closely related. It has been estimated by Steiner and Ryder [2011] that horses diverged from other equids ~ 3.8 Mya, prior to the split of zebras and asses ~ 1.69 – 1.9 Mya [Jónsson et al., 2014]. African and Asiatic asses diverged ~ 1.47 – 1.75 Mya, and Hartmann's zebra became a sister taxon of Burchell's zebra and Grevy's zebra ~ 1.28 – 1.59 Mya [Jónsson et al., 2014]. Despite the close relationship among equids, we observed differences in the frequencies of illegitimate recombination between the TCR loci. Apart from the low frequency of recombination between *TRB* and *TRG* in Hartmann's zebra caused by the separation of the TCR genes to 2 chromosomes (see above), we observed a decreased frequency of recombination between *TRA/TRD* and *TRB* in this species compared to the translocation with breakpoints in *TRA/TRD* and *TRG* ($p < 0.05$) and compared to

the frequencies of corresponding trans-rearrangements in other equids ($p < 0.05$). This can be ascribed to another chromosome rearrangement that occurred during karyotype evolution in this species. Due to the tandem fusion of the telomere-telomere type, the segment carrying the *TRB* locus in Hartmann's zebra has the opposite orientation with respect to the centromere compared to the orientation of this locus in other equids and other TCR loci (fig. 1) [Musilova et al., 2013]. Thus, the same type of trans-rearrangement involving the *TRB* locus, which results in translocation or inversion in horse, donkey, Burchell's zebra, and Grevy's zebra, results in the formation of a dicentric chromosome and an acentric fragment in Hartmann's zebra. However, cells carrying these unstable types of aberrations are supposed to be eliminated during cell division. In fact, we did not note such rearrangements during our examination. The orientation of the TCR genes does not influence interlocus recombination itself but the viability of the cells carrying the recombination product and thus the number of observed trans-rearrangements in peripheral blood lymphocytes. In Hartmann's zebra, the opposite orientation of *TRB* apparently contributed to a decrease in the frequency of both translocations involving this locus.

Another karyotype alteration concerning chromosomes carrying the TCR genes in equids is a pericentric inversion that occurred during the evolution in the lineage leading to African ass [Yang et al., 2004]. This rearrangement resulted in *TRG* and *TRB* being on the same chromosome arm and altered their mutual orientation on the chromosome (fig. 1) [Musilova et al., 2013]. Thus, the same type of trans-rearrangement between *TRB* and *TRG* that results in a pericentric inversion in horse, Burchell's zebra, and Grevy's zebra would result in the formation of a chromosome with a deletion of the region delimited by the TCR genes and an acentric ring chromosome in donkey. Such rearrangements are apparently lethal for the cell, as we did not note them in our study. Karyotype changes in donkey resulted in a significantly lower observed number of rearrangements between *TRB* and *TRG* compared to the number of the other 2 rearrangements ($p < 0.05$). However, the frequency of paracentric inversions in donkey did not significantly differ from the frequencies of pericentric inversions in other equids. The presence of a relatively high number of inversions in lymphocytes suggests either the involvement of inverted TCR gene segments in interlocus recombination or erroneous recombination.

The reason for the high frequency of translocations between *TRA/TRD* and *TRB* in Burchell's zebras remains

unclear. A significant difference was observed even between closely related Burchell's and Grevy's zebras, with divergence dating back to only 1.2 Mya [Steiner and Ryder, 2011]. The impact of consanguinity in Burchell's zebras can be ruled out, as our group included 3 subspecies with no significant variation among them. We conclude that there is high variability in the incidence of interlocus rearrangements involving these TCR genes among Equidae.

It has been shown that the potential number of intra-locus rearrangements is correlated with the frequency of trans-rearrangement between the TCR genes [Huang et al., 2007]. The complex structure of pig *TRA/TRD* may account for the difference in the occurrence of trans-rearrangements involving this locus between pigs and humans [Musilova et al., 2014]. Unfortunately, information on the structure of the TCR genes in horses is scarce. Several TCR gene segments have been identified by cDNA analyses [Schrenzel et al., 1994; Schrenzel and Ferrick, 1995], but no study has examined genomic DNA. Here, we report 17 *TRGC* segments interspersed with V and J segments, suggesting that the equine *TRG* locus is much more complex than that of humans, with only 2 J-C regions [Lefranc and Rabbitts, 1991; Giudicelli et al., 2005]. Multiplication of *TRG* segments also occurs in sheep [Miccoli et al., 2003; Vaccarelli et al., 2005, 2008] and cattle [Herzig et al., 2006; Conrad et al., 2007] in which the *TRG1* and *TRG2* loci harbor 6 V-J-C cassettes. The high complexity of the equine *TRG* gene may contribute to a higher frequency of trans-rearrangements involving this locus in horses compared to the frequencies in humans. Expansion of *TRDV* segments and duplication of the D-J-C cluster unit of *TRB* have been reported in cattle [Connelley et al., 2009; Herzig et al., 2010], sheep [Antonacci et al., 2005, 2008], and pig [Eguchi-Ogawa et al., 2009; Uenishi et al., 2009]. Unfortunately, information on the structure of these genes is lacking in horses. Although the number of equine *TRA* segments identified in our study does not indicate a higher complexity of the locus in horses than in humans [Giudicelli et al., 2005], the actual number of segments may be higher than our reported number. No data on the TCR gene structure in asses and zebras are available. As equids diverged quite recently [Steiner and Ryder, 2011; Jónsson et al., 2014], we presume that they share a similar structure of the TCR genes. However, the impact of gene complexity on the number of trans-rearrangements cannot be completely ruled out.

V(D)J recombination also predisposes cells to erroneous rearrangements with other genes. We observed a low frequency of such rearrangements involving the *TRA/*

TRD locus during our examination. These erroneous rearrangements can result in the juxtaposition of oncogenes with TCR regulatory sequences, which are recurrent in several T cell malignancies [Boehm and Rabbitts, 1989; Korsmeyer, 1992; Marculescu et al., 2006]. It has been suggested that the absolute number of interlocus rearrangements correlates with the risk of lymphoma [Kirsch, 1997; Lista et al., 1997; Allam and Kabelitz, 2006]. A high number of trans-rearrangements in horses may thus indicate a higher risk of T cell lymphoma than in humans. Although hematopoietic neoplasms are rare in horses, lymphoma is frequent, and the prevalence in the population is 0.002–0.5% [Taintor and Schleis, 2011]. In addition to predominant B cell lymphomas, T cell lymphomas are also common in horses [Rendle et al., 2012; Durham et al., 2013].

Lymphomas are also among the most common types of neoplasms in pigs, cats, dogs, cattle, and other mammals. For example, lymphoma is the third most common neoplasm in dogs, with an estimated annual incidence of approximately 33 per 100,000 dogs [Teske, 1994]. The estimated rate of annual incidence is 200 per 100,000 at-risk cats, and the annual incidence rate in slaughtered cattle is 18 per 100,000 [Jacobs et al., 2000]. In general, the majority of lymphomas (~80%) arise in developing B lymphocytes, with the remainder arising in developing T lymphocytes. Approximately 10–40% of lymphomas in dogs [Jacobs et al., 2002] and 15% of lymphomas in humans are of T cell origin [The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997]. As the complexity and mutual position of the TCR genes impact the frequency of interlocus rearrangements, these factors can also impact

the frequency of erroneous rearrangements with other genes. Thus, chromosomal colocalization of the TCR genes with oncogenes may increase the probability of illegitimate recombination between them. Mammalian karyotypes have been extensively rearranged during evolution, resulting in different synteny groups among species. *TRB* and *TRG* are located on the same chromosome in humans, horses, asses, and cats, but synteny has been disrupted in pigs, Hartmann's zebras, dogs, and mice [Musilova et al., 2013].

In conclusion, chromosome rearrangements with breakpoints in TCR gene loci in Equidae are studied here for the first time. In addition to pigs, horses also have higher frequencies of trans-rearrangements than humans, and the complexity of the TCR genes may contribute to these differences. The comparison of results among closely related equids confirmed the hypothesis that the organization of chromosomes carrying the TCR genes impacts the frequency of rearrangements observed in lymphocytes. Colocalization of genes on the same chromosome increases the incidence of interlocus recombination. Although the orientation of the TCR genes does not impact recombination itself, it does impact the viability of cells carrying its products and consequently the number of trans-rearrangements observed in peripheral blood lymphocytes.

Acknowledgements

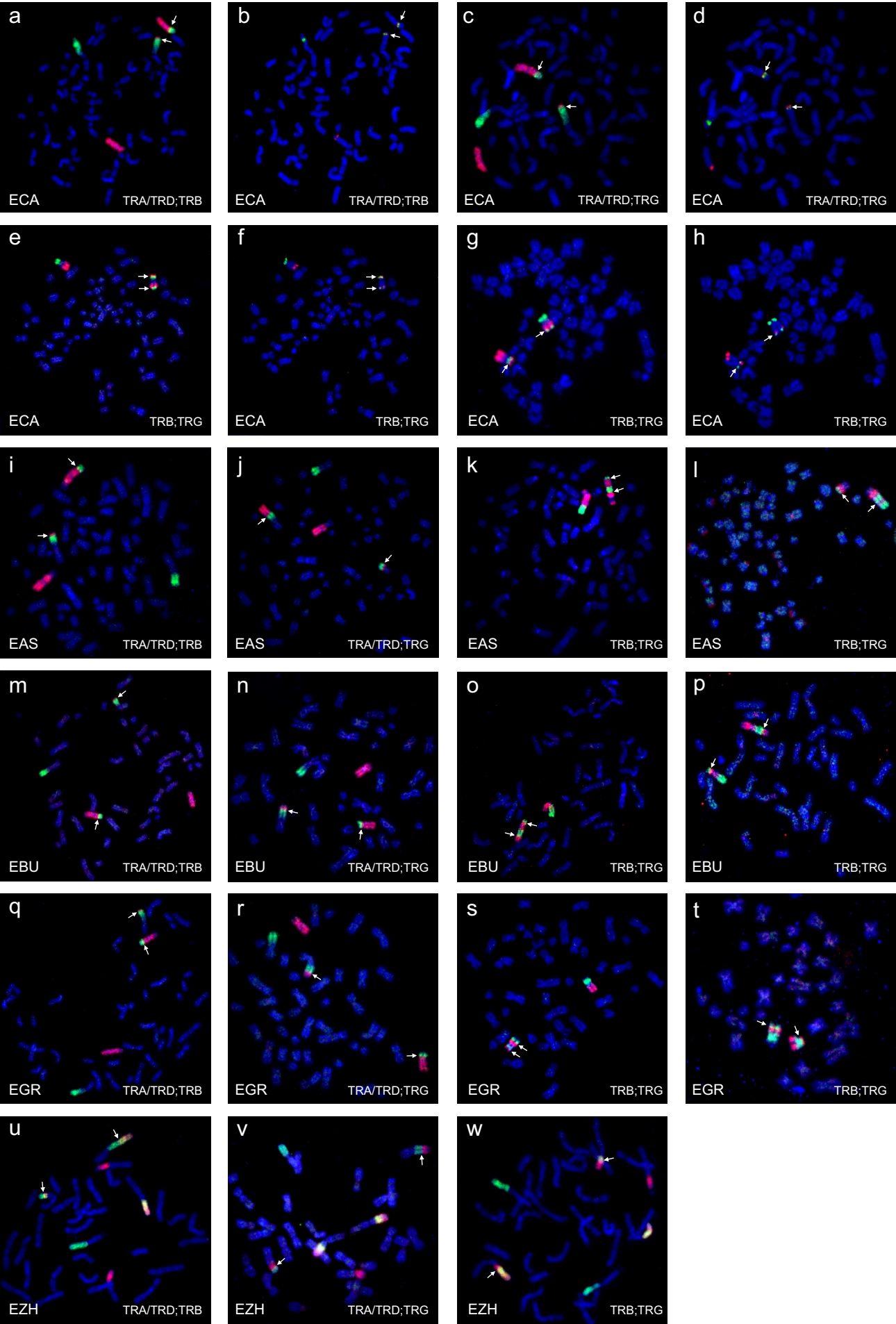
This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic, project P502/12/1966 and the Central European Institute of Technology (ED1.1.00/02.0068) via the European Regional Development Fund.

References

- Allam A, Kabelitz D: TCR trans-rearrangements: biological significance in antigen recognition vs the role as lymphoma biomarker. *J Immunol* 176:5707–5712 (2006).
- Antonacci R, Lanave C, Faro LD, Vaccarelli G, Ciccarese S, Massari S: Artiodactyl emergence is accompanied by the birth of an extensive pool of diverse germline *TRDV1* genes. *Immunogenetics* 57:254–266 (2005).
- Antonacci R, Di Tommaso S, Lanave C, Cribiu EP, Ciccarese S, Massari S: Organization, structure and evolution of 41 kb of genomic DNA spanning the D–J–C region of the sheep *TRB* locus. *Mol Immunol* 45:493–509 (2008).
- Boehm T, Rabbitts TH: The human T cell receptor genes are targets for chromosomal abnormalities in T cell tumors. *FASEB J* 3:2344–2359 (1989).
- Bowen S, Wangsa D, Ried T, Livak F, Hodes RJ: Concurrent V(D)J recombination and DNA end instability increase interchromosomal trans-rearrangements in ATM-deficient thymocytes. *Nucleic Acids Res* 41:4535–4548 (2013).
- Connelley T, Aerts J, Law A, Morrison WI: Genomic analysis reveals extensive gene duplication within the bovine *TRB* locus. *BMC Genomics* 10:192 (2009).
- Conrad ML, Mawer MA, Lefranc MP, McKinnell L, Whitehead J, et al: The genomic sequence of the bovine T cell receptor gamma *TRG* loci and localization of the *TRGC5* cassette. *Vet Immunol Immunopathol* 115:346–356 (2007).
- Davodeau F, Peyrat MA, Gaschet J, Hallet MM, Triebel F, et al: Surface expression of functional T cell receptor chains formed by interlocus recombination on human T lymphocytes. *J Exp Med* 180:1685–1691 (1994).
- Durham AC, Pillitteri CA, Myint MS, Valli VE: Two hundred three cases of equine lymphoma classified according to the World Health Organization (WHO) classification criteria. *Vet Pathol Online* 50:86–93 (2013).
- Eguchi-Ogawa T, Toki D, Uenishi H: Genomic structure of the whole D–J–C clusters and the upstream region coding V segments of the *TRB* locus in pig. *Dev Comp Immunol* 33:1111–1119 (2009).
- Ferguson-Smith MA, Trifonov V: Mammalian karyotype evolution. *Nat Rev Genet* 8:950–962 (2007).

- Froenicke L: Origins of primate chromosomes – as delineated by Zoo-FISH and alignments of human and mouse draft genome sequences. *Cytogenet Genome Res* 108:122–138 (2005).
- Giudicelli V, Chaume D, Lefranc MP: IMGT/ GENE-DB: a comprehensive database for human and mouse immunoglobulin and T cell receptor genes. *Nucleic Acids Res* 33:D256–D261 (2005).
- Hecht F, Hecht BK, Kirsch IR: Fragile sites limited to lymphocytes: molecular recombination and malignancy. *Cancer Genet Cytogenet* 26: 95–104 (1987).
- Herzig C, Blumerman S, Lefranc MP, Baldwin C: Bovine T cell receptor gamma variable and constant genes: combinatorial usage by circulating $\gamma\delta$ T cells. *Immunogenetics* 58:138–151 (2006).
- Herzig CT, Lefranc MP, Baldwin CL: Annotation and classification of the bovine T cell receptor delta genes. *BMC Genomics* 11:100 (2010).
- Hinz T, Allam A, Wesch D, Schindler D, Kabelitz D: Cell-surface expression of transrearranged V γ -C β T-cell receptor chains in healthy donors and in ataxia telangiectasia patients. *Br J Haematol* 109:201–210 (2000).
- Hiraiwa H, Uenishi H, Kiuchi S, Watanabe M, Takagaki Y, Yasue H: Assignment of T cell receptor (TCR) alpha-chain gene (A), beta-chain gene (B), gamma-chain gene (G), and delta-chain gene (D) loci on swine chromosomes by in situ hybridization and radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet* 93:94–99 (2001).
- Huang CY, Sharma GG, Walker LM, Bassing CH, Pandita TK, Sleckman BP: Defects in coding joint formation in vivo in developing ATM-deficient B and T lymphocytes. *J Exp Med* 204:1371–1381 (2007).
- Jacobs RM, Messick JB, Valli VE: Tumors of the hemolymphatic system, in Meuten DJ (ed): *Tumors in Domestic Animals*, pp 119–198 (A Blackwell Publishing Company, Ames 2002).
- Jónsson H, Schubert M, Seguin-Orlando A, Ginolhac A, Petersen L, et al: Speciation with gene flow in equids despite extensive chromosomal plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 18655–18660 (2014).
- Kirsch IR: V(D)J recombination and ataxia-telangiectasia: a review. *Int J Radiat Biol* 66:97–108 (1994).
- Kirsch IR: Trans-rearrangements and the risk of lymphoid malignancy. *Ann Oncol* 8:45–48 (1997).
- Klein IA, Resch W, Jankovic M, Oliveira T, Yamane A, et al: Translocation-capture sequencing reveals the extent and nature of chromosomal rearrangements in B lymphocytes. *Cell* 147:95–106 (2011).
- Kobayashi Y, Tycko B, Soreng AL, Sklar J: Transrearrangements between antigen receptor genes in normal human lymphoid tissues and in ataxia telangiectasia. *J Immunol* 147:3201–3209 (1991).
- Korsmeyer SJ: Chromosomal translocations in lymphoid malignancies reveal novel proto-oncogenes. *Annu Rev Immunol* 10:785–807 (1992).
- Kubickova S, Cernohorska H, Musilova P, Rubes J: The use of laser microdissection for the preparation of chromosome-specific painting probes in farm animals. *Chromosome Res* 10: 571–577 (2002).
- Lefranc MP, Rabbitts TH: Genetic organization of the human T cell receptor gamma locus. *Curr Top Microbiol Immunol* 173:3–9 (1991).
- Lipkowitz S, Stern MH, Kirsch IR: Hybrid T cell receptor genes formed by interlocus recombination in normal and ataxia-telangiectasia lymphocytes. *J Exp Med* 172:409–418 (1990).
- Lista F, Bertness V, Guidos CJ, Danska JS, Kirsch IR: The absolute number of trans-rearrangements between the TCRG and TCRB loci is predictive of lymphoma risk: a severe combined immune deficiency (SCID) murine model. *Cancer Res* 57:4408–4413 (1997).
- Marculescu R, Vanura K, Montpellier B, Roulland S, Le T, et al: Recombinase, chromosomal translocations and lymphoid neoplasia: targeting mistakes and repair failures. *DNA Repair* 5:1246–1258 (2006).
- Meaburn KJ, Misteli T, Soutoglou E: Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. *Semin Cancer Biol* 17:80–90 (2007).
- Miccoli MC, Antonacci R, Vaccarelli G, Lanave C, Massari S, et al: Evolution of TRG clusters in cattle and sheep genomes as drawn from the structural analysis of the ovine TRG2@ locus. *J Mol Evol* 57:52–62 (2003).
- Musilova P, Kubickova S, Zrnova E, Horin P, Vahala J, Rubes J: Karyotypic relationships among *Equus grevyi*, *Equus burchelli* and domestic horse defined using horse chromosome arm-specific probes. *Chromosome Res* 15:807–813 (2007).
- Musilova P, Kubickova S, Vahala J, Rubes J: Subchromosomal karyotype evolution in Equidae. *Chromosome Res* 21:175–187 (2013).
- Musilova P, Drbalova J, Kubickova S, Cernohorska H, Stepanova H, Rubes J: Illegitimate recombination between T cell receptor genes in humans and pigs (*Sus scrofa domestica*). *Chromosome Res* 22:483–493 (2014).
- Nowak RM: *Walker's Mammals of the World*, vol. 2, ed 6. (Johns Hopkins University Press, Baltimore 1999).
- Parada LA, Misteli T: Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trends Cell Biol* 12: 425–432 (2002).
- Prieur M, Al Achkar W, Aurias A, Couturier J, Dutrillaux AM, et al: Acquired chromosome rearrangements in human lymphocytes: effect of aging. *Hum Genet* 79:147–150 (1988).
- Rendle DJ, Hughes KJ, Farish C, Kessel A: Multicentric T-cell lymphoma presenting as inferior palpebral swelling in a Standardbred mare. *Aust Vet J* 90:485–489 (2012).
- Richard F, Messaoudi C, Lombard M, Dutrillaux B: Chromosome homologies between man and mountain zebra (*Equus zebra hartmannae*) and description of a new ancestral synteny involving sequences homologous to human chromosomes 4 and 8. *Cytogenet Cell Genet* 93:291–296 (2001).
- Roix JJ, McQueen PG, Munson PJ, Parada LA, Misteli T: Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. *Nat Genet* 34:287–291 (2003).
- Roukos V, Misteli T: The biogenesis of chromosome translocations. *Nat Cell Biol* 16:293–300 (2014).
- Schrenzel MD, Ferrick DA: Horse (*Equus caballus*) T-cell receptor alpha, gamma, and delta chain genes: nucleotide sequences and tissue-specific gene expression. *Immunogenetics* 42:112–122 (1995).
- Schrenzel MD, Watson JL, Ferrick DA: Characterization of horse (*Equus caballus*) T-cell receptor beta chain genes. *Immunogenetics* 40: 135–144 (1994).
- Steiner CC, Ryder OA: Molecular phylogeny and evolution of the Perissodactyla. *Zool J Linn Soc* 163:1289–1303 (2011).
- Taintor J, Schleis S: Equine lymphoma. *Equine Vet Educ* 23:205–213 (2011).
- Tawn EJ: The non-random occurrence of exchanges involving chromosomes 7 and 14 in human lymphocytes: a prospective study of control individuals. *Mutat Res* 199:215–220 (1988).
- Teske E: Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. *Vet Q* 16:209–219 (1994).
- The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 89: 3909–3918 (1997).
- Uenishi H, Eguchi-Ogawa T, Toki D, Morozumi T, Tanaka-Matsuda M, et al: Genomic sequence encoding diversity segments of the pig TCR δ chain gene demonstrates productivity of highly diversified repertoire. *Mol Immunol* 46:1212–1221 (2009).
- Vaccarelli G, Miccoli MC, Lanave C, Massari S, Cribiu EP, Ciccarese S: Genomic organization of the sheep TRG1@ locus and comparative analyses of Bovidae and human variable genes. *Gene* 357:103–114 (2005).
- Vaccarelli G, Miccoli MC, Antonacci R, Pesole G, Ciccarese S: Genomic organization and recombinational unit duplication-driven evolution of ovine and bovine T cell receptor gamma loci. *BMC Genomics* 9:81 (2008).
- Yang F, Fu B, O'Brien PC, Robinson TJ, Ryder OA, Ferguson-Smith MA: Karyotypic relationships of horses and zebras: results of cross-species chromosome painting. *Cytogenet Genome Res* 102:235–243 (2003).
- Yang F, Fu B, O'Brien PC, Nie W, Ryder OA, Ferguson-Smith MA: Refined genome-wide comparative map of the domestic horse, donkey and human based on cross-species chromosome painting: insight into the occasional fertility of mules. *Chromosome Res* 12:65–76 (2004).
- Zhang Y, McCord RP, Ho YJ, Lajoie BR, Hildebrand DG, et al: Chromosomal translocations are guided by the spatial organization of the genome. *Cell* 148:908–921 (2012).

Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 1. Chromosome rearrangements with breakpoints in TCR genes detected by FISH in horse (ECA), donkey (EAS), Burchell's zebra, Grevy's zebra (EGR) and Hartmann's zebra (EZH). Horse metaphase cells with translocation with breakpoints in *TRA/TRD* and *TRB* hybridized with a) painting probes for chromosomes 1q (green) and 4 (red) and b) dual fusion BAC probes flanking the *TRA/TRD* locus (green) and *TRB* locus (red). Horse metaphase cells with translocation with breakpoints in *TRA/TRD* and *TRG* hybridized with c) painting probes for chromosomes 1q (green) and 4 (red) and d) dual fusion BAC probes flanking the *TRA/TRD* locus (green) and *TRG* locus (red). Horse metaphase cells with pericentric inversion with breakpoints in *TRB* and *TRG* hybridized with e) painting probes for chromosome 4p (green) and 4q (red) and f) dual fusion BAC probes flanking the *TRB* locus (red) and *TRG* locus (green). Horse metaphase cells with translocation between homologous chromosomes with breakpoints in *TRB* and *TRG* hybridized with g) painting probes for chromosome 4p (green) and 4q (red) and h) dual fusion BAC probes flanking the *TRB* locus (red) and *TRG* locus (green). Donkey metaphase cells with translocations i) with breakpoints in *TRA/TRD* and *TRB* and j) with breakpoints in *TRA/TRD* and *TRG* hybridized with painting probes for horse chromosomes 1q (green) and 4 (red). Donkey metaphase cells with k) paracentric inversion and l) translocation between homologous chromosomes with breakpoints in *TRB* and *TRG* hybridized with painting probes for horse chromosome 4p (red) and 4q (green). Burchell's zebra metaphase cells with translocations m) with breakpoints in *TRA/TRD* and *TRB* and n) with breakpoints in *TRA/TRD* and *TRG* hybridized with painting probes for horse chromosomes 1q (green) and 4 (red). Burchell's zebra metaphase cells with o) pericentric inversion and p) translocation between homologous chromosomes with breakpoints in *TRB* and *TRG* hybridized

with painting probes for horse chromosome 4p (red) and 4q (green). Grevy's zebra metaphase cells with translocations q) with breakpoints in *TRA/TRD* and *TRB* and r) with breakpoints in *TRA/TRD* and *TRG* hybridized with painting probes for horse chromosomes 1q (green) and 4 (red). Grevy's zebra metaphase cells with s) pericentric inversion and t) translocation between homologous chromosomes with breakpoints in *TRB* and *TRG* hybridized with painting probes for horse chromosome 4p (green) and 4q (red). Hartmann's zebra metaphase cells with translocations u) with breakpoints in *TRA/TRD* and *TRB*, v) with breakpoints in *TRA/TRD* and *TRG* and w) in *TRB* and *TRG* hybridized with painting probes for horse chromosomes 1q (green), 4p (red) and 4q (yellow+red). Arrows show breakpoints in rearranged chromosomes.

Supplementary Table 1. Frequencies of *trans*-rearrangements with breakpoints in TCR in equids

Species Animal no.	F r e q u e n c y /10,000 cells			Total
	<i>TRAD;TRB</i>	<i>TRAD;TRG</i>	<i>TRB;TRG</i>	
Horse				
1	20.0	10.0	8.0	38.0
2	16.0	20.0	4.0	40.0
3	34.0	4.0	18.0	56.0
4	14.0	16.0	18.0	48.0
5	26.0	8.0	6.0	40.0
6	24.0	24.0	6.0	54.0
7	12.0	18.0	14.0	44.0
8	20.0	14.0	22.0	56.0
9	8.0	6.0	6.0	20.0
10	24.0	24.0	14.0	62.0
Mean	19.8	14.4	11.6	45.8
Donkey				
1	12.0	42.0	10.0	64.0
2	18.0	16.0	12.0	46.0
3	22.0	18.0	6.0	46.0
4	28.0	26.0	10.0	64.0
5	28.0	10.0	6.0	44.0
Mean	21.6	22.4	8.8	52.8
Burchell's zebra				
1	48.0	24.0	38.0	110.0
2	68.0	30.0	12.0	110.0
3	48.0	2.0	4.0	54.0
4	54.0	6.0	16.0	76.0
5	52.0	36.0	26.0	114.0
6	48.0	18.0	14.0	80.0
Mean	53.0	19.3	18.3	90.7
Grevy's zebra				
1	48.0	24.0	24.0	96.0
2	34.0	36.0	16.0	86.0
3	40.0	20.0	10.0	70.0
4	22.0	10.0	10.0	42.0
5	28.0	22.0	14.0	64.0
Mean	34.4	22.4	14.8	71.6
Hartmann's zebra				
1	2.0	22.0	2.0	26.0
2	6.0	28.0	0.0	34.0
3	6.0	32.0	2.0	40.0
4*	0.0	8.6	0.0	8.6
Mean	3.8	22.2	1.1	27.1

TRAD stands for *TRA/TRD*

* 3,474 metaphase cells were examined in this animal (5,000 cells were examined in all other animals)

Illegitimate recombination between T cell receptor genes in humans and pigs (*Sus scrofa domestica*)

Petra Musilova · Jitka Drbalova ·
Svatava Kubickova · Halina Cernohorska ·
Hana Stepanova · Jiri Rubes

Received: 3 March 2014 / Revised: 16 June 2014 / Accepted: 8 July 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract T cell receptor (TCR) genes (*TRA/TRD*, *TRB* and *TRG*) reside in three regions on human chromosomes (14q11.2, 7q34 and 7p14, respectively) and pig chromosomes (7q15.3-q21, 18q11.3-q12 and 9q21-22, respectively). During the maturation of T cells, TCR genes are rearranged by site-specific recombination. Occasionally, interlocus recombination of different TCR genes takes place, resulting in chromosome rearrangements. It has been suggested that the absolute number of these “innocent” *trans*-rearrangements correlates with the risk of lymphoma. The aims of this work were to assess the frequencies of rearrangements with breakpoints in TCR genes in domestic pig lymphocytes and to compare these with the frequencies of corresponding rearrangements in human lymphocytes by using fluorescence in situ hybridization with chromosome painting probes. We show that frequencies of *trans*-rearrangements involving *TRA/TRD* locus in pigs are significantly higher than the frequency

of translocations with breakpoints in *TRB* and *TRG* genes in pigs and the frequencies of corresponding *trans*-rearrangements involving *TRA/TRD* locus in humans. Complex structure of the pig *TRA/TRD* locus with high number of potential V(D)J rearrangements compared to the human locus may account for the observed differences. Furthermore, we demonstrated that *trans*-rearrangements involving pig *TRA/TRD* locus occur at lower frequencies in $\gamma\delta$ T cells than in $\alpha\beta$ T lymphocytes. The decrease of the frequencies in $\gamma\delta$ T cells is probably caused by the absence of *TRA* recombination during maturation of this T cell lineage. High numbers of innocent *trans*-rearrangements in pigs may indicate a higher risk of T-cell lymphoma than in humans.

Keywords T cell receptor gene · $\gamma\delta$ T lymphocytes · pig · chromosome rearrangements · interlocus recombination · T-cell lymphoma

Responsible Editor: Matthew Breen.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10577-014-9434-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

P. Musilova (✉) · J. Drbalova · S. Kubickova ·
H. Cernohorska · J. Rubes
Department of Genetics and Reproduction, Central European
Institute of Technology-Veterinary Research Institute,
Hudcova 70, 621 00 Brno, Czech Republic
e-mail: musilova@vri.cz

H. Stepanova
Department of Immunology, Veterinary Research Institute,
Hudcova 70, 621 00 Brno, Czech Republic

Abbreviations

BAC	Bacterial artificial chromosome
FISH	Fluorescence in situ hybridization
PBL	Peripheral blood lymphocyte
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PHA	Phytohaemagglutinin
PWM	Pokeweed mitogen
<i>TRA</i>	T cell receptor alpha locus
<i>TRB</i>	T cell receptor beta locus
<i>TRD</i>	T cell receptor delta locus
<i>TRG</i>	T cell receptor gamma locus
TCR	T cell receptor
VDJ	Variable, diversity and joining

Introduction

T cells express either the $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ type of antigen-specific receptor. The structures of these receptors closely resemble those of immunoglobulins produced by B cells. There are four genes that encode T cell receptor (TCR) proteins: *TRA*, *TRB*, *TRD* and *TRG* (previous symbols *TCRA*, *TCRB*, *TCRD* and *TCRG*). *TRD* is located within *TRA*; therefore, these four TCR genes reside in three chromosome regions overall. *TRA/TRD*, *TRB* and *TRG* are located on 14q11.2, 7q34 and 7p14, respectively, in humans (HGNC, <http://www.genenames.org>) and on 7q15.3-q21, 18q11.3-q12 and 9q21-22, respectively, in pigs (Hiraiwa et al. 2001). During T cell maturation, TCR genes are rearranged by site-specific recombination between clusters of variable, diversity and joining (VDJ) gene segments.

T lymphocytes with $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ receptors arise from a common progenitor. *TRB*, *TRD* and *TRG*, coding for the β , δ and γ chains, respectively, are rearranged concurrently (Capone et al. 1998). Cells that productively rearrange both *TRG* and *TRD* shut down *TRB* rearrangement and express TCR γ and δ on the surface. Cells that productively rearrange *TRB* produce the β chain, which can pair with an invariant pre-T-cell receptor α . This pairing arrests further gene rearrangement and signals to the thymocyte to proliferate. Finally, the rearrangement of *TRA* starts, and the *TRD* segment located within *TRA* is deleted. When the rearrangement is successful, the T cell expresses the $\alpha\beta$ TCR on the surface and undergoes intrathymic selection for its ability to recognize self-MHC and self-peptide.

Occasionally, interlocus recombination of different TCR genes occurs, which results in the reciprocal translocation or inversion of chromosomes (Hecht et al. 1987; Kirsch 1994). Such illegitimate rearrangements occur at a low frequency in the peripheral blood lymphocytes of healthy individuals but occur at a markedly higher rate in patients with spontaneous chromosomal breakage syndromes such as ataxia telangiectasia (Kojis et al. 1991; Kobayashi et al. 1991) or Nijmegen breakage syndrome (Taalman et al. 1989). Hybrid antigen receptor genes might be functional and may contribute to the diversity of the immune response (Davodeau et al. 1994; Hinz et al. 2000). However, the process of DNA rearrangement also allows errors to occur; these errors include chromosomal aberrations resulting in the juxtaposition of oncogenes with TCR regulatory sequences, which are recurrent in several T cell malignancies (Boehm and Rabbitts 1989; Korsmeyer

1992; Marculescu et al. 2006). Indeed, the risk of cancer is increased in patients with chromosomal breakage syndromes (Hecht and Hecht 1990; Peterson et al. 1992).

To date, the frequencies of translocations caused by interlocus recombination of TCR genes have been determined in human peripheral blood lymphocytes using data from routine cytogenetic investigations carried out on human G-banded chromosomes (Hecht et al. 1987; Prieur et al. 1988; Tawn 1988). Furthermore, in humans and mice, these *trans*-rearrangements have been studied by PCR (Tycko et al. 1989; Lipkowitz et al. 1990; Kobayashi et al. 1991; Lista et al. 1997). Increased levels of *trans*-rearrangements were observed in farmers exposed to pesticides (Lipkowitz et al. 1992) and in oncological patients undergoing chemotherapy (Abdallah et al. 1995; Lopes et al. 2001). The effect of chemotherapy was transient, and the study in paediatric patients showed that higher levels were exhibited only in patients homozygous for the wild type of *CYP3A4* (Lopes et al. 2004). The results suggest that the absolute number of TCR *trans*-rearrangements may serve as a biomarker of genomic instability, genotoxic exposure and lymphoma risk (Lista et al. 1997; Kirsch 1997; Allam and Kabelitz 2006).

The proportions of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T lymphocytes in the circulation differ among species. Whereas less than 5 % of circulating T lymphocytes bear the $\gamma\delta$ TCR in humans and mice, $\gamma\delta$ T cells may represent half of the peripheral blood lymphocyte (PBL) compartment in pigs (Yang and Parkhouse 1996) and other artiodactyls (Hein and Mackay 1991). To the best of our knowledge, TCR *trans*-rearrangements have not been studied in “ $\gamma\delta$ T cell high” species. The aims of this study were to assess the frequencies of reciprocal translocations with breakpoints in TCR loci in pig PBLs and to compare these with the frequencies of corresponding rearrangements in human lymphocytes. We used fluorescence in situ hybridization (FISH) and applied chromosome painting probes to analyse the chromosome rearrangements in both species. The study extends our knowledge of illegitimate V(D)J recombination.

Materials and methods

Animal and human blood donors

The experiments were performed using blood obtained from 10 young (5–12 months old) and 3 middle-aged

(5 years old) crossbred domestic pigs (*Sus scrofa domestica*) without any clinical symptoms of disease and from 6 healthy non-smoking men aged between 39 and 46 years.

PBL cultures

Phytohaemagglutinin (PHA)- and pokeweed mitogen (PWM)-stimulated whole blood lymphocyte cultures were prepared in RPMI1640 medium (Sigma-Aldrich, USA) supplemented with 20 % calf serum (Biotech, Prague, Czech Republic) and 2 % phytohaemagglutinin (Gibco, Grand Island, NY, USA) or 15 µg/ml pokeweed mitogen (Sigma). To prevent coagulation, heparin (Zentiva, Prague, Czech Republic) was added to pig lymphocyte cultures at a final concentration of 15 i.u./ml. The cultures were incubated at 37 °C for 72 h. One hour before the end of cultivation, colcemid (Sigma) was added at a final concentration of 1 µg/ml. The cells were collected by centrifugation, suspended in a hypotonic solution (0.075 M KCl) and fixed in 3:1 methanol/acetic acid according to the standard procedure. The cell suspensions were dropped on moistured microscopic slides.

Sorting and culturing of porcine T lymphocytes and $\gamma\delta$ T lymphocytes

T lymphocytes (CD3⁺) and $\gamma\delta$ T lymphocytes ($\gamma\delta$ TCR⁺) were sorted using indirect magnetic labelling. First, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by gradient centrifugation using Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich). Isolated PBMCs were stained with anti-CD3 antibody (8E6, VMRD, WA, USA) or anti- $\gamma\delta$ TCR antibody (PGBL22A, VMRD). After the incubation and washing steps, goat anti-mouse IgG MicroBeads (Miltenyi Biotec) were added. Positive cells were sorted using a QuadroMACS separator (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's recommendations. The purity of the sorted cells was checked by flow cytometry using a BD LSRFortessa operated with BD FACSDiva™ Software (both Becton Dickinson, CA, USA). The purity was ≥ 99.4 % in all cases.

Sorted lymphocytes were cultured in complete RPMI1640 medium supplemented with serum, phytohaemagglutinin and heparin as described for PBL cultures. To induce the proliferation of sorted $\gamma\delta$ TCR⁺ lymphocytes, fresh medium was mixed 1:1 with medium from a 2-day whole blood lymphocyte

culture. The cultures were incubated at 37 °C for 72 h in a 5 % CO₂ atmosphere.

Flow cytometry analysis of $\gamma\delta$ T lymphocytes

Samples of whole blood lymphocytes or lymphocytes after stimulation were washed with a haemolytic solution (8.26 g NH₄Cl, 1 g KHCO₃ and 0.037 g EDTA per litre of distilled water) to remove the erythrocytes. After being washed with cell-wash solution (PBS containing 1.84 g/l EDTA, 1 g/l sodium azide and 4 ml/l gelatine), the leukocytes were stained with an anti- $\gamma\delta$ TCR antibody (PGBL22A, VMRD). Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG1 (Life Technologies, CA, USA) was used as the secondary antibody. Data were acquired and analysed on a BD LSRFortessa flow cytometer operated with BD FACSDiva™ Software.

Fluorescence in situ hybridization

Whole chromosome painting probes for pig chromosomes 7, 9 and 18 were prepared by laser microdissection according to the method described in a previous paper (Kubickova et al. 2002). Only good quality probes with high signal to noise ratio were used for the study. In young pigs no. 1–5 and middle-aged pigs no. 11–13, the first round FISH was carried out using probes for pig chromosomes 7 (Spectrum Green) and 9 (Spectrum Orange). To verify translocations involving chromosome 18, the slides were rehybridized with the probe for chromosome 18 (Spectrum Green) in combination with the probe for either chromosome 7 or 9 (Spectrum Orange). In young pigs no. 6–10, the first round FISH was carried out using probes for pig chromosomes 7 (Spectrum Orange) and 18 (Spectrum Green). In the second round FISH, the slides were rehybridized with the probe for chromosomes 9 (Spectrum Orange) and 18 (Spectrum Green). Hybridization was performed according to Musilova et al. (2007), with a slight modification. Briefly, 10 µl of the hybridization mixture (50 % formamide, 10 % dextran sulphate, 2× saline sodium citrate (SSC)) contained a minimum of 0.1 µg of each painting probe and 1–1.5 µg of pig competitor DNA (Applied Genetics Laboratories, Melbourne, FL, USA). After overnight hybridization, the slides were washed in 0.4× SSC/0.3 % igeal (pH 7.0) at 72 °C for 2 min.

The break apart probe for porcine *TRA/TRD* locus consisted of two differently labelled BAC probes flanking the gene. BAC constructs were obtained from

the Children's Hospital of Oakland Research Institute (CHORI): CH242-436B1 for proximal and CH242-105M6 for distal region with respect to the centromere. Clones were labelled with biotin-16-dUTP or digoxigenin-11-dUTP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) using a nick translation kit (Abbott, Des Plaines, IL, USA) and used in subsequent FISH. Biotin- and digoxigenin-labelled BAC probes were detected by fluorescein avidin (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and anti-digoxigenin-rhodamine (Roche), respectively.

Commercially available whole chromosome painting probes (Cambio, Cambridge, UK) for chromosomes 7 (FITC) and 14 (biotin labelled; detected by avidin-Cy3) and arm-specific painting probes (MetaSystems, Altlußheim, Germany) for chromosomes 7p (fluorescein) and 7q (Texas Red) were used for FISH experiments in the human samples according to the manufacturer's instructions.

Analysis

Slides were examined under an Olympus fluorescence microscope or under a Zeiss microscope equipped with the slide scanning system Metafer (MetaSystems). ISIS (MetaSystems) software was used for image analysis. A minimum of 5,000 metaphases from each culture were investigated. Slides prepared from different pig lymphocyte subsets were coded for a blind analysis. Only cells with all painted chromosomes present were classified. The findings were checked by two evaluators.

The frequencies of respective chromosome rearrangements in pigs and humans were analysed using a chi-squared test. Differences between groups were considered significant if probability values of $P < 0.05$ were obtained.

Results

Chromosome rearrangements with breakpoints in TCR genes were studied using painting probes hybridized to metaphase lymphocytes (Fig. 1). The mean frequencies of $t(7q;14)$, $t(7p;14)$ and $inv(7)$ in PHA-stimulated PBLs from the six men were 5.6×10^{-4} , 4.3×10^{-4} and 4.3×10^{-4} , respectively (Fig. 2, Supplementary Table 1). Rearrangements between *TRB* and *TRG* include besides inversions also one translocation $t(7p;7q)$ between homologous chromosomes found in man no. 1. There

was no significant difference in the frequency of any of these three rearrangements.

The frequencies of *trans*-rearrangements in domestic pigs were determined in PHA-stimulated whole blood lymphocytes of 10 young and 3 middle-aged animals (Fig. 2, Supplementary Table 2). Differences between two groups of young animals examined by different combinations of painting probes (see **Materials and methods**) were not significant. As regards the age, we did not observe significant differences in numbers of *trans*-rearrangements between young and middle-aged pigs, although the frequency of $t(7;18)$ was slightly lower in middle-aged animals ($P = 0.058$). To assess the baseline frequencies of chromosomal translocations with breakpoints in T cell receptor genes in pigs, we combined the data obtained from all 13 animals. The total average frequencies of $t(7;18)$, $t(7;9)$ and $t(9;18)$ in porcine PHA-stimulated peripheral blood lymphocytes were 22.8×10^{-4} , 18.1×10^{-4} and 1.5×10^{-4} , respectively. The frequencies of translocations involving chromosome 7 (with breakpoints in *TRA/TRD*) were significantly higher ($P < 0.001$) than the frequency of $t(9;18)$ (with breakpoints in *TRB* and *TRG*). Comparison of the findings between pigs and humans showed significantly ($P < 0.001$) higher frequencies of both translocations involving the *TRA/TRD* gene and the total frequency of

Fig. 1 Chromosome rearrangements with breakpoints in TCR genes. Human metaphase cells with **a** translocation $t(7q;14)$, as determined by FISH with probes for chromosomes 7 (green) and 14 (red); **b** $t(7p;14)$, as determined by FISH with probes for chromosomes 7 (green) and 14 (red); and **c** inversion $inv(7)$, as determined by FISH with painting probes for chromosome arms 7p (green) and 7q (red). Translocation $t(7;18)$ in pigs: **d** a metaphase cell after FISH with painting probes for chromosomes 7 (red) and 18 (green); **e** the same metaphase cell rehybridized with BAC probes: CH242-436B1 for proximal (red) and CH242-105M6 for distal (green) region flanking the *TRA/TRD* gene; and **f** translocated chromosomes after painting, counterstained with DAPI (converted to black and white and inverted), and their diagram. Translocation $t(7;9)$ in pigs: **g** a metaphase cell after FISH with painting probes for chromosomes 7 (green) and 9 (red); **h** the same metaphase cell rehybridized with BAC probes: CH242-436B1 for proximal (red) and CH242-105M6 for distal (green) region flanking the *TRA/TRD* gene; and **i** translocated chromosomes after painting, counterstained with DAPI (converted to black and white and inverted), and their diagram. Translocation $t(9;18)$ in pigs: **j** a metaphase cell after FISH with painting probes for chromosomes 9 (red) and 18 (green); and **k** translocated chromosomes after painting, counterstained with DAPI (converted to black and white and inverted), and their diagram. Arrows show translocated chromosomes in metaphase cells. Scale bar 10 μ m

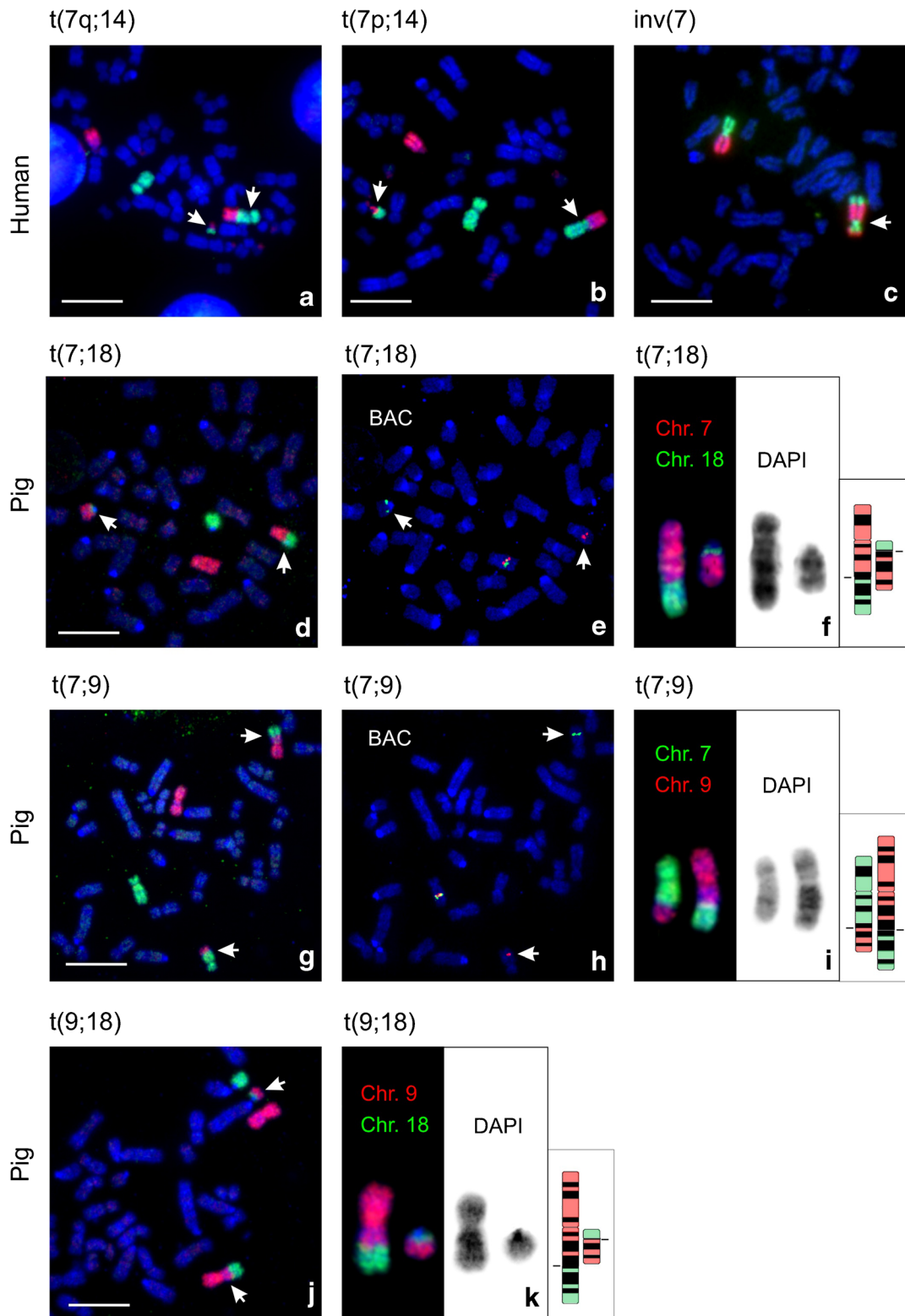
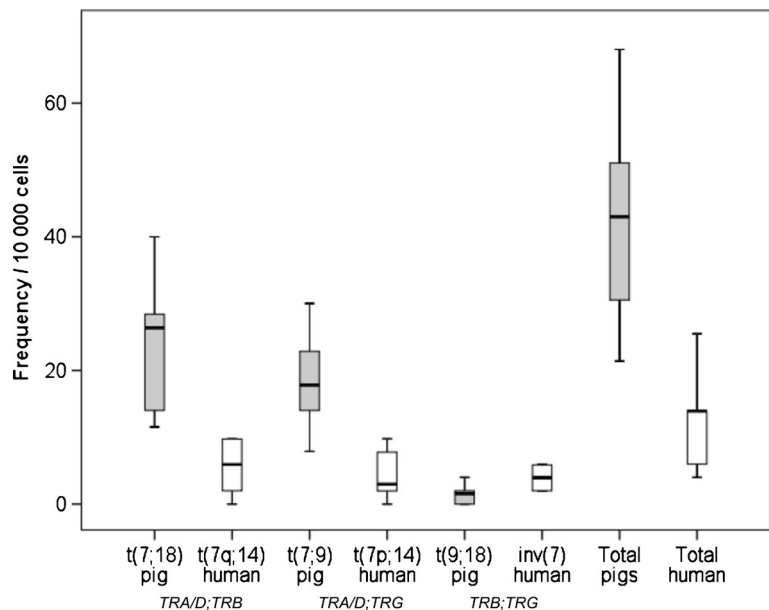


Fig. 2 Box plot showing the frequencies of *trans*-rearrangements in pigs and humans: the vertical height of each box represents the 25–75 % data range; the horizontal line within each box represents the median value; and the upper and lower extensions represent the maximum and minimum values. Data are representative of investigation of 71,814 metaphase cells in 13 pigs and 30,377 metaphase cells in 6 humans



all translocations in pigs, although the frequency of translocations with breakpoints in *TRB* and *TRG* was higher in humans ($P=0.017$). The distributions of the frequencies of the respective translocations in pigs and humans are shown in Fig. 2.

Pigs are among the “ $\gamma\delta$ T cell high” species. The percentage of $\gamma\delta$ T cells in PBLs and in lymphoblasts after stimulation was measured in five young pigs and two middle-aged animals (Table 1). The proportion of $\gamma\delta$ T cells was higher in younger pigs. To test the contribution of $\gamma\delta$ T cells to the frequencies of *trans*-rearrangements, we investigated PHA-stimulated cultures of separated $\gamma\delta$ T lymphocytes in five young domestic pigs and in cultures of total separated T lymphocytes in four of these animals (Fig. 3, Supplementary Table 3). Significantly fewer $t(7;18)$ and $t(7;9)$ translocations were observed in the separated $\gamma\delta$ T lymphocytes than in either the separated T lymphocyte culture ($P<0.001$ and $P=0.002$, respectively) or the PBL culture ($P<0.001$ for both translocations). There was no significant difference between the findings for PBLs and those for T lymphocytes. These data indicate that *trans*-rearrangements involving *TRA/TRD* locus occur at lower frequencies in $\gamma\delta$ T cells than in $\alpha\beta$ T lymphocytes. Despite this decrease, the frequencies of $t(7;18)$ and $t(7;9)$ in $\gamma\delta$ T cells were still significantly higher ($P=0.006$ and $P=0.002$, respectively) than the frequency of $t(9;18)$.

To assess the effect of mitogen stimulation on the frequency of *trans*-rearrangements, we examined

PWM-stimulated whole blood cultures and compared the results with those of PHA-stimulated cultures in the group of three middle-aged animals (Supplementary Table 4). No significant differences were observed between the groups as regards particular translocations. Only when pooled, the total number of *trans*-rearrangements was higher ($P=0.042$) in PWM-stimulated cultures than those in PHA-stimulated cultures. It is necessary to perform more experiments in order to ascertain whether stimulation with different mitogens has an effect on the frequency of *trans*-rearrangements.

Table 1 Percentage of $\gamma\delta$ T cells in pig peripheral blood lymphocytes and in lymphoblasts in 3-day cultures

Pig no.	δ T cells (%) in PBL	Mitogen	$\gamma\delta$ T cells (%) in lymphoblasts
1	47.5	PHA	27.8
2	40.6	PHA	17.4
3	56.1	PHA	25.7
4	33.1	PHA	10.9
5	34.4	PHA	18.4
6	11.5	PHA	2.5
		PWM	5.7
7	12.6	PHA	2.4
		PWM	3.9

Pig no. 1–5, young animals; pig no. 6 and 7, middle-aged animals

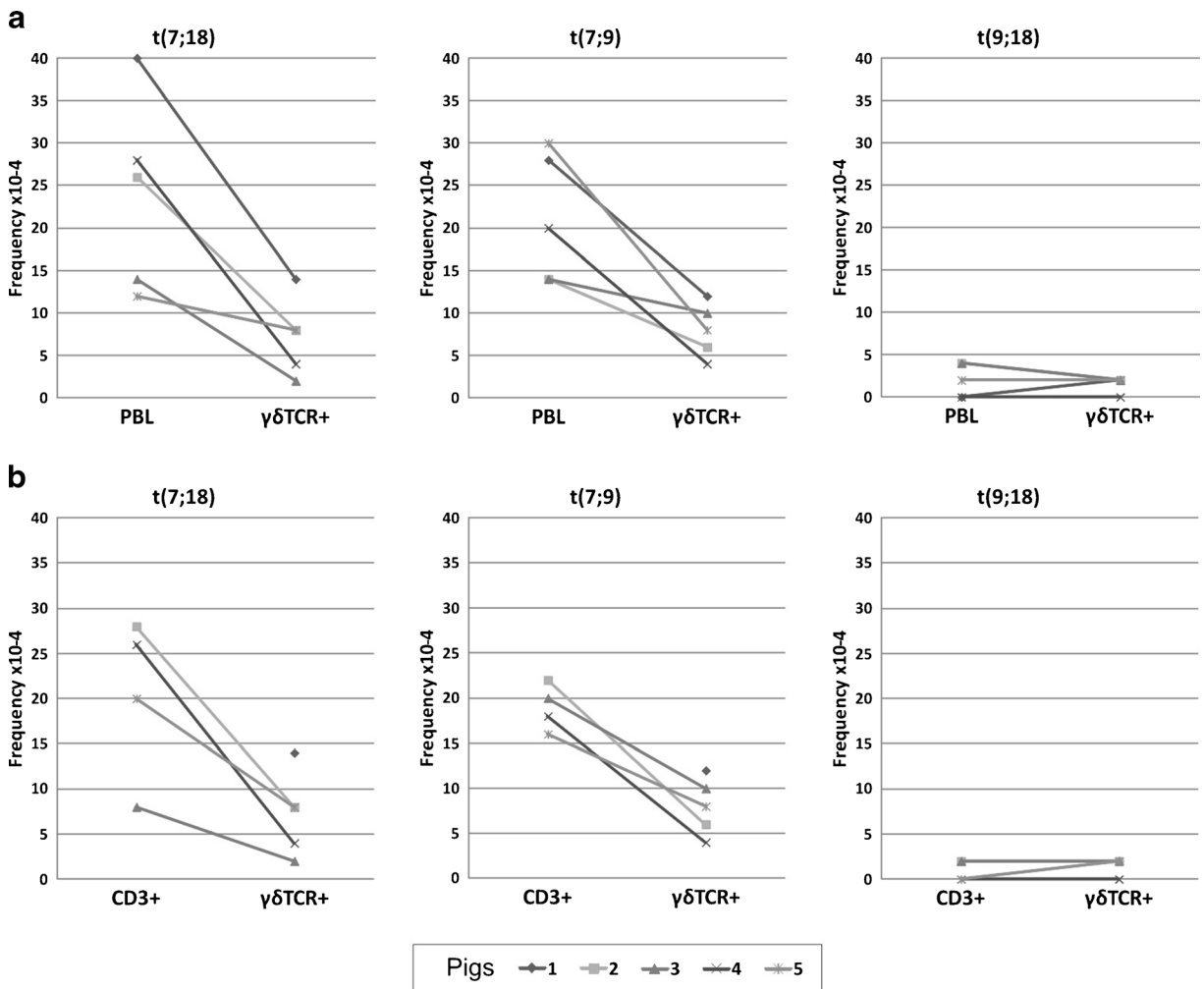


Fig. 3 Frequencies of respective *trans*-rearrangements in individual pigs in whole blood lymphocytes and $\gamma\delta$ T lymphocytes (a) and in T lymphocytes and $\gamma\delta$ T lymphocytes (b). In each animal, 5,000 metaphases were investigated per culture

Chromosome 7 was most frequently involved in translocations detected by painting probes in pigs. To verify the breakpoints in this chromosome, differently labelled BAC probes flanking *TRA/TRD* locus were used for subsequent FISH in some experiments. Only one out of 52 investigated translocations $t(7;18)$ and none out of 45 $t(7;9)$ exhibited a breakpoint in a locus different from *TRA/TRD*.

Rearrangements with chromosomes other than those carrying TCR genes were rarely detected during examination. In PBL cultures of young pigs no. 1–5, we observed six such translocations involving chromosome 7 (2.4/10,000 cells) and three translocations involving chromosome 9 (0.1/10,000 cells). Using BAC probes, we confirmed breakpoints in *TRA/TRD* locus in all six translocations involving chromosome 7. As regards

rearrangements involving chromosome 9, painting results indicate that the breakpoints are in loci different from *TRG* in two out of three observed translocations.

Discussion

In this paper, we report the frequencies of translocations with breakpoints in TCR loci in porcine PBLs, separated T lymphocytes and separated $\gamma\delta$ T lymphocytes using FISH with whole chromosome painting probes, and we compare these frequencies with the frequencies of the corresponding *trans*-rearrangements in human peripheral blood lymphocytes. The number of illegitimate recombinations between TCR genes in pigs was assessed for the first time.

We discovered that frequencies of *trans*-rearrangements involving *TRA/TRD* locus in pigs are higher than the frequency of translocations with breakpoints in *TRB* and *TRG* genes and the frequencies of corresponding *trans*-rearrangements involving *TRA/TRD* locus in humans (Fig. 2). It has been shown that the frequency of chromosome breaks and translocations involving the TCR genes correlates with the potential number of V(D)J rearrangements in the gene (Huang et al. 2007). This can explain the differences in frequencies of rearrangements between humans and pigs reported in this study. The porcine *TRA/TRD* has a more complex structure than the human and murine *TRA/TRD* (Uenishi et al. 2009). An increase in the number of *TRDV* and *TRDD* segments, which provide combinatorial diversity and explain the broad diversity of δ chain molecules in pigs, may also increase the probability of illegitimate *trans*-rearrangement between *TRA/TRD* and other TCR loci. Porcine *TRB* harbours three functional D-J-C cluster units (Eguchi-Ogawa et al. 2009); in contrast, human and mouse *TRB* has only two. An extensive *TRD* gene repertoire and duplication within the *TRB* locus have also been reported in other “ $\gamma\delta$ T cell high” species such as cattle (Conrad et al. 2002; Connelley et al. 2009; Herzig et al. 2010) and sheep (Antonacci et al. 2005, 2008). Studies of frequencies of translocations with breakpoints in TCR genes using whole chromosome painting probes in mice were performed on only a limited number of metaphases (Huang et al. 2007; Bowen et al. 2013). However, no rearrangement found among more than 1,000 evaluated cells suggests that frequencies in mice are probably lower than those in pigs and are rather similar to the frequencies in humans. To the best of our knowledge, *trans*-rearrangements have not been studied in cattle or sheep.

Spatial proximity of double strand breaks is thought to be a major factor contributing to recurrent chromosome translocations. Bowen et al. (2013) did not observe significant differences between inter-TCR distances and distances between TCR loci and non-antigen receptor locus in thymocytes undergoing V(D)J recombination in wild type and ataxia telangiectasia mutated (ATM) deficient mice. However, accessibility of TCR genes for interlocus recombination in pigs and humans can be influenced by the chromosome rearrangements which occurred during karyotype evolution after the diversification of these species. These rearrangements located TCR genes on two separate chromosomes in humans but three chromosomes in

pigs, in synteny with different chromosomal elements (Goureau et al. 1996).

As pigs are among the “ $\gamma\delta$ T cell high” species, we also investigated the contribution of $\gamma\delta$ T cells to the frequencies of *trans*-rearrangements. Our results suggest that mainly $\alpha\beta$ T lymphocytes account for the high incidence of illegitimate recombination involving *TRA/TRD* in porcine lymphocytes. *TRB*, *TRD* and *TRG* genes are rearranged concurrently during maturation of both $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T lymphocytes, whereas the *TRA* gene is rearranged only in the $\alpha\beta$ lineage. The long accessibility of the *TRA/TRD* locus for recombination during the maturation of $\alpha\beta$ T lymphocytes could account for the higher frequencies of translocations involving this locus in pig lymphocytes bearing the $\alpha\beta$ TCR than in those bearing the $\gamma\delta$ TCR. *Trans*-rearrangements in $\gamma\delta$ T lymphocytes have not been studied in humans.

In the previous studies carried out on human G-banded chromosomes, the frequencies of chromosome rearrangements with breakpoints in TCR loci were reported to be 3.1×10^{-4} to 4.9×10^{-4} for t(7q;14), 2.6×10^{-4} to 6.2×10^{-4} for t(7p;14) and 0.2×10^{-4} to 3.7×10^{-4} for inv(7) (Hecht et al. 1987; Prieur et al. 1988; Tawn 1988). The frequencies of both translocations t(7;14) do not significantly differ from the results in our study. As regards to inv(7), our result is in agreement with those by Prieur et al. (1988) and Tawn (1988), but is significantly higher ($P < 0.001$) than the frequency reported by Hecht et al. (1987). Apart from the method used, the studies differed in the strategy. Hecht et al. (1987) investigated a large number of individuals (2,595) but only a limited number of metaphase cells (in most cases 20) per person. On the contrary, we investigated more than 5,000 cells per person from 6 individuals.

Prieur et al. (1988) reported that the frequencies of translocations or inversions with breakpoints in TCR genes are higher in newborns than in adults. However, they examined only approximately 9,000 metaphases from eight individuals, and their results were not significant. Other studies based on PCR detection of recombination between γ variable and β diversity-joining sequences that corresponds to inv(7) in humans have reported a slight increase in frequency from birth to adulthood and then a decrease with increasing age (Ballinger et al. 2002; Meydan et al. 1999). In our study, we did not find any significant difference between the groups of young and middle-aged pigs. The frequency of t(7;18) was slightly higher in young pigs than in middle-aged animals (Supplementary Table 2), although

the former had a higher proportion of $\gamma\delta$ T cells which exhibit fewer trans-rearrangements than $\alpha\beta$ T cells (Table 1). However, the number of investigated animals was not sufficient to draw conclusions about the effect of age on the frequency of rearrangements involving TCR genes.

The process of DNA rearrangements during maturation predisposes lymphoid cells to aberrant DNA rearrangements involving the fusion of TCR loci to loci unrelated to the antigen receptor genes, which may be oncogenes. Such fusion to an oncogene may result in lymphoid malignancy. Rearrangements at the *TRD* locus are particularly common in lymphoma patients with juxtaposition of oncogene and TCR loci (Larmonie et al. 2013). It has been suggested that the absolute number of “innocent” *trans*-rearrangements with both breakpoints in TCR gene loci correlates with the risk of lymphoma, regardless of whether that risk is based on an inherited predisposition or acquired exposure. An assay of *trans*-rearrangements may serve as a biomarker of lymphoma risk (Lipkowitz et al. 1992; Lista et al. 1997; Kirsch 1997; Lopes et al. 2001; Allam and Kabelitz 2006). An increased number of innocent *trans*-rearrangements involving *TRA/TRD* in pigs may thus indicate a higher risk of T-cell lymphoma than in humans. In fact, malignant lymphoma is the most common tumour disease in pigs, and it is primarily observed in young animals (Misdorp 2003). The rates have been estimated to be 2–6.5 animals per 100,000 slaughtered swine (Jacobs et al. 2002). Even though B-cell lymphomas can be assumed to predominate in pigs as they do in humans, T and T-cell-rich B-cell lymphomas were described in pigs (Tanimoto and Ohtsuki 1998; Ogihara et al. 2012). However, their prevalence is unknown. As thousands of pigs slaughtered in abattoirs undergo veterinary meat inspection, a sufficient number of samples is available despite a low prevalence of T lymphomas. Thus, the pig can serve as a model for naturally occurring lymphomas of this type and provide evidence of a relationship between the frequency of innocent *trans*-rearrangements involving *TRA/TRD* and the occurrence of T-cell lymphomas. The pig is now the most common large laboratory animal species. Owing to the physiological, morphological and genomic similarities between pigs and humans, pigs became important biomedical models for cancer and other human diseases. Their large size makes them ideal models for preclinical studies

of drugs as well as imaging, chemotherapy and radiation, which cannot be accurately studied in small animal models (Kuzmuk and Schook 2011).

In conclusion, we assessed the frequencies of chromosome rearrangements that occurred via illegitimate recombination between TCR loci in pig and human lymphocytes, by using FISH with painting probes. The frequencies of both translocations involving pig *TRA/TRD* were significantly higher than the frequency of translocations with breakpoints in the *TRB* and *TRG* genes in pigs and the frequencies of corresponding *trans*-rearrangements involving *TRA/TRD* in humans. Complex structure of the pig *TRA/TRD* locus with high number of potential V(D)J rearrangements compared to the human locus may account for the observed differences. *Trans*-rearrangements involving *TRA/TRD* were significantly lower in $\gamma\delta$ T cells than in $\alpha\beta$ T lymphocytes in pigs. The decrease of the frequencies in $\gamma\delta$ T cells is probably caused by the absence of *TRA* recombination during maturation of this T cell lineage.

Acknowledgments This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic, project P502/12/1966, and the Central European Institute of Technology (ED1.1.00/02.0068) via the European Regional Development Fund. We would like to thank Lenka Leva for her technical help and Thuraya Awadova for her assistance with statistical analysis.

Conflict of interest Petra Musilova, Jitka Drbalova, Svatava Kubickova, Halina Cernohorska, Hana Stepanova and Jiri Rubes declare that they have no conflict of interest.

Ethical standards All procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000. Informed consent was obtained from all patients for being included in the study. All institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals were followed.

References

- Abdallah JM, Lombardi DP, Kirsch IR (1995) Genetic instability in patients with Hodgkin’s disease undergoing chemotherapy. *J Clin Invest* 96:2744–2747
- Allam A, Kabelitz D (2006) TCR trans-rearrangements: biological significance in antigen recognition vs the role as lymphoma biomarker. *J Immunol* 176:5707–5712
- Antonacci R, Lanave C, Del Faro L, Vaccarelli G, Ciccarese S, Massari S (2005) Artiodactyl emergence is accompanied by

- the birth of an extensive pool of diverse germline TRDV1 genes. *Immunogenetics* 57:254–266
- Antonacci R, Di Tommaso S, Lanave C, Criubi EP, Ciccarese S, Massari S (2008) Organization, structure and evolution of 41kb of genomic DNA spanning the D-J-C region of the sheep TRB locus. *Mol Immunol* 45:493–509
- Ballinger SW, Judice SA, Nicklas JA, Albertini RJ, O'Neill JP (2002) DNA sequence analysis of interlocus recombination between the human T-cell receptor gamma variable (GV) and beta diversity-joining (BD/BJ) sequences on chromosome 7 (inversion 7). *Environ Mol Mutagen* 40:85–92
- Boehm T, Rabbitts TH (1989) The human T cell receptor genes are targets for chromosomal abnormalities in T cell tumors. *FASEB J* 3:2344–2359
- Bowen S, Wangsa D, Ried T, Livak F, Hodes RJ (2013) Concurrent V(D)J recombination and DNA end instability increase interchromosomal trans-rearrangements in ATM-deficient thymocytes. *Nucleic Acids Res* 41:4535–4548
- Capone M, Hockett RD, Zlotnik A (1998) Kinetics of T cell receptor beta, gamma, and delta rearrangements during adult thymic development: T cell receptor rearrangements are present in CD44(+)/CD25(+) Pro-T thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12522–12527
- Connelley T, Aerts J, Law A, Morrison WI (2009) Genomic analysis reveals extensive gene duplication within the bovine TRB locus. *BMC Genomics* 10:192
- Conrad ML, Pettman R, Whitehead J, McKinnel L, Davis SK, Koop BF (2002) Genomic sequencing of the bovine T cell receptor beta locus. *Vet Immunol Immunopathol* 87:439–441
- Davodeau F, Peyrat MA, Gaschet J, Hallet MM, Triebel F, Vié H et al (1994) Surface expression of functional T cell receptor chains formed by interlocus recombination on human T lymphocytes. *J Exp Med* 180:1685–1691
- Eguchi-Ogawa T, Toki D, Uenishi H (2009) Genomic structure of the whole D-J-C clusters and the upstream region coding V segments of the TRB locus in pig. *Dev Comp Immunol* 33:1111–1119
- Goureau A, Yerle M, Schmitz A, Riquet J, Milan D, Pinton P et al (1996) Human and porcine correspondence of chromosome segments using bidirectional chromosome painting. *Genomics* 36:252–262
- Hecht F, Hecht BK (1990) Cancer in ataxia-telangiectasia patients. *Cancer Genet Cytogenet* 46:9–19
- Hecht F, Hecht BK, Kirsch IR (1987) Fragile sites limited to lymphocytes: molecular recombination and malignancy. *Cancer Genet Cytogenet* 26:95–104
- Hein WR, Mackay CR (1991) Prominence of gamma-delta T-cells in the ruminant immune system. *Immunol Today* 12:30–34
- Herzig CT, Lefranc MP, Baldwin CL (2010) Annotation and classification of the bovine T cell receptor delta genes. *BMC Genomics* 11:100
- Hinz T, Allam A, Wesch D, Schindler D, Kabelitz D (2000) Cell-surface expression of transrearranged Vgamma-cbeta T-cell receptor chains in healthy donors and in ataxia telangiectasia patients. *Br J Haematol* 109:201–210
- Hiraiwa H, Uenishi H, Kiuchi S, Watanabe M, Takagaki Y, Yasue H (2001) Assignment of T cell receptor (TCR) alpha-chain gene (A), beta-chain gene (B), gamma-chain gene (G), and delta-chain gene (D) loci on swine chromosomes by in situ hybridization and radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet* 93:94–99
- Huang CY, Sharma GG, Walker LM, Bassing CH, Pandita TK, Sleckman BP (2007) Defects in coding joint formation in vivo in developing ATM-deficient B and T lymphocytes. *J Exp Med* 204:1371–1381
- Jacobs RM, Messick JB, Valli VE (2002) Tumors of the hemolymphatic system. In: Meuten DJ (ed) *Tumors in domestic animals*. A Blackwell Publishing Company, Iowa, pp 119–198
- Kirsch IR (1994) V(D)J recombination and ataxia-telangiectasia, a review. *Int J Radiat Biol* 66:97–108
- Kirsch IR (1997) Trans-rearrangements and the risk of lymphoid malignancy. *Ann Oncol* 8:45–48
- Kobayashi Y, Tycko B, Soreng AL, Sklar J (1991) Transrearrangements between antigen receptor genes in normal human lymphoid tissues and in ataxia telangiectasia. *J Immunol* 147:3201–3209
- Kojis TL, Gatti RA, Sparkes RS (1991) The cytogenetics of ataxia telangiectasia. *Cancer Genet Cytogenet* 56:143–156
- Korsmeyer SJ (1992) Chromosomal translocations in lymphoid malignancies reveal novel proto-oncogenes. *Annu Rev Immunol* 10:785–807
- Kubickova S, Cernohorska H, Musilova P, Rubes J (2002) The use of laser microdissection for the preparation of chromosome-specific painting probes in farm animals. *Chromosome Res* 10:571–577
- Kuzmuk KN, Schook LB (2011) Pigs as a model for biomedical sciences. In: Rothschild MF, Ruvinsky A (eds) *The genetics of the pig*. CAB International, Wallingford, pp 426–444
- Larmonie NS, Dik WA, Meijerink JP, Homminga I, van Dongen JJ, Langerak AW (2013) Breakpoint sites disclose the role of the V(D)J recombination machinery in the formation of T-cell receptor (TCR) and non-TCR associated aberrations in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 98:1173–1184
- Lipkowitz S, Stern MH, Kirsch IR (1990) Hybrid T cell receptor genes formed by interlocus recombination in normal and ataxia-telangiectasia lymphocytes. *J Exp Med* 172:409–418
- Lipkowitz S, Garry VF, Kirsch IR (1992) Interlocus V-J recombination measures genomic instability in agriculture workers at risk for lymphoid malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5301–5305
- Lista F, Bertness V, Guidos CJ, Danska JS, Kirsch IR (1997) The absolute number of trans-rearrangements between the TCRG and TCRB loci is predictive of lymphoma risk: a severe combined immune deficiency (SCID) murine model. *Cancer Res* 57:4408–4413
- Lopes LF, Dias Neto E, Lorand-Metze I, Latorre MR, Simpson AJ (2001) Analysis of Vgamma/Jbeta trans-rearrangements in paediatric patients undergoing chemotherapy. *Br J Haematol* 113:1001–1008
- Lopes LF, Piccoli Fde S, Paixão VA, Latorre Mdo R, Bd C, Simpson AJ, Caballero OL (2004) Association of CYP3A4 genotype with detection of Vgamma/Jbeta trans-rearrangements in the peripheral blood leukocytes of pediatric cancer patients undergoing chemotherapy for ALL. *Leuk Res* 28:1281–1286
- Marculescu R, Vanura K, Montpellier B, Roulland S, Le T, Navarro JM, Jäger U, McBlane F, Nadel B (2006) Recombinase, chromosomal translocations and lymphoid neoplasia: targeting mistakes and repair failures. *DNA Repair* 5:1246–1258

- Meydan D, Nilsson T, Tornblom M, Hagmar L, Hellgren D, Fuscoe JC et al (1999) The frequency of illegitimate TCRbeta/gamma gene recombination in human lymphocytes: influence of age, environmental exposure and cytostatic treatment, and correlation with frequencies of t(14;18) and hprt mutation. *Mutat Res* 444:393–403
- Misdorp W (2003) Congenital and hereditary tumours in domestic animals. 2. Pigs. A review. *Vet Q* 25:17–30
- Musilova P, Kubickova S, Zrnova E, Horin P, Vahala J, Rubes J (2007) Karyotypic relationships among *Equus grevyi*, *Equus burchelli* and domestic horse defined using horse chromosome arm-specific probes. *Chromosome Res* 15:807–813
- Ogihara K, Ohba T, Takai H, Ishikawa Y, Kadota K (2012) Lymphoid neoplasms in swine. *J Vet Med Sci* 74:149–154
- Peterson RD, Funkhouser JD, Tuck-Muller CM, Gatti RA (1992) Cancer susceptibility in ataxia-telangiectasia. *Leukemia* 6:8–13
- Prieur M, Al Achkar W, Aurias A, Couturier J, Dutrillaux AM, Dutrillaux B et al (1988) Acquired chromosome rearrangements in human lymphocytes: effect of aging. *Hum Genet* 79:147–150
- Taalman RD, Hustinx TW, Weemaes CM, Seemanova E, Schmidt A, Passarge E et al (1989) Further delineation of the Nijmegen breakage syndrome. *Am J Med Genet* 32:425–431
- Tanimoto T, Ohtsuki Y (1998) T-cell-rich B-cell lymphoma in a pig. *Vet Pathol* 35:147–149
- Tawn EJ (1988) The non-random occurrence of exchanges involving chromosomes 7 and 14 in human lymphocytes: a prospective study of control individuals. *Mutat Res* 199:215–220
- Tycko B, Palmer JD, Sklar J (1989) T cell receptor gene trans-rearrangements: chimeric gamma-delta genes in normal lymphoid tissues. *Science* 245:1242–1246
- Uenishi H, Eguchi-Ogawa T, Toki D, Morozumi T, Tanaka-Matsuda M, Shinkai H et al (2009) Genomic sequence encoding diversity segments of the pig TCR delta chain gene demonstrates productivity of highly diversified repertoire. *Mol Immunol* 46:1212–1221
- Yang H, Parkhouse RM (1996) Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues. *Immunology* 89:76–83

Illegitimate recombination between T cell receptor genes in humans and pigs (*Sus scrofa domestica*)

Journal: Chromosome Research

Authors: Petra Musilova, Jitka Drbalova, Svatava Kubickova, Halina Cernohorska, Hana Stepanova, Jiri Rubes

Corresponding author: Petra Musilova, Veterinary Research Institute, Department of Genetics and Reproduction, Hudcova 70, 621 00 Brno, Czech Republic, E-mail address: musilova@vri.cz

Supplementary Table 1. Trans-rearrangements in PHA-stimulated PBL cultures in humans

Man No.	Examined metaphases	N u m b e r				F r e q u e n c y /10 000 cells			
		<i>TRA/D;TRB</i> t(7q;14)	<i>TRA/D;TRG</i> t(7p;14)	<i>TRB;TRG</i> inv(7)*	Total	<i>TRA/D;TRB</i> t(7q;14)	<i>TRA/D;TRG</i> t(7p;14)	<i>TRB;TRG</i> inv(7)	Total
1	5 134	5	4	2	11	9.7	7.8	3.9	21.4
2	5 102	5	5	3	13	9.8	9.8	5.9	25.5
3	5 029	1	0	1	2	2.0	0.0	2.0	4.0
4	5 022	0	1	2	3	0.0	2.0	4.0	6.0
5	5 053	4	1	2	7	7.9	2.0	4.0	13.9
6	5 037	2	2	3	7	4.0	4.0	6.0	13.9
	30 377	17	13	13	43	5.6	4.3	4.3	14.2

*inv(7) and t(7p;7q)

Illegitimate recombination between T cell receptor genes in humans and pigs (*Sus scrofa domestica*)

Journal: Chromosome Research

Authors: Petra Musilova, Jitka Drbalova, Svatava Kubickova, Halina Cernohorska, Hana Stepanova, Jiri Rubes

Corresponding author: Petra Musilova, Veterinary Research Institute, Department of Genetics and Reproduction, Hudcova 70, 621 00 Brno, Czech Republic, E-mail address: musilova@vri.cz

Supplementary Table 2. Trans-rearrangements in PHA-stimulated PBL cultures in pigs

Pig No.	Examined metaphases	Number			Total	Frequency /10 000 cells			Total
		TRA/D;TRB t(7;18)	TRA/D;TRG t(7;9)	TRB;TRG t(9;18)		TRA/D;TRB t(7;18)	TRA/D;TRG t(7;9)	TRB;TRG t(9;18)	
1	5 000	20	14	0	34	40.0	28.0	0.0	68.0
2	5 000	13	7	2	22	26.0	14.0	4.0	44.0
3	5 000	7	7	2	16	14.0	14.0	4.0	32.0
4	5 000	14	10	0	24	28.0	20.0	0.0	48.0
5	5 000	6	15	1	22	12.0	30.0	2.0	44.0
	25 000	60	53	5	118	24.0	21.2	2.0	47.2
6	7 381	21	9	1	31	28.5	12.2	1.4	42.0
7	5 053	18	9	1	28	35.6	17.8	2.0	55.4
8	5 244	9	7	0	16	17.2	13.3	0.0	30.5
9	5 065	7	4	0	11	13.8	7.9	0.0	21.7
10	5 044	16	12	2	30	31.7	23.8	4.0	59.5
	27 787	71	41	4	116	25.6	14.8	1.4	41.7
11	6 945	8	13	0	21	11.5	18.7	0.0	30.2
12	6 399	9	10	1	20	14.1	15.6	1.6	31.3
13	5 683	15	13	1	29	26.4	22.9	1.8	51.0
	19 027	32	36	2	70	16.8	18.9	1.1	36.8
Total	71 814	163	130	11	304	22.7	18.1	1.5	42.3

Pig No. 1-5: young animals examined with the probes for pig chromosomes 7 and 9 in the first round FISH

Pig No. 6-10: young animals examined with the probes for pig chromosomes 7 and 18 in the first round FISH

Pig No. 11-13: middle-aged animals examined with the probes for pig chromosomes 7 and 9 in the first round FISH

Illegitimate recombination between T cell receptor genes in humans and pigs (*Sus scrofa domestica*)

Journal: Chromosome Research

Authors: Petra Musilova, Jitka Drbalova, Svatava Kubickova, Halina Cernohorska, Hana Stepanova, Jiri Rubes

Corresponding author: Petra Musilova, Veterinary Research Institute, Department of Genetics and Reproduction, Hudcova 70, 621 00 Brno, Czech Republic, E-mail address: musilova@vri.cz

Supplementary Table 3. Trans-rearrangements in different lymphocyte cultures stimulated by PHA in young pigs

Pig No.	Culture	Examined metaphases	Number				Frequency /10 000 cells			
			TRA/D;TRB t(7;18)	TRA/D;TRG t(7;9)	TRB;TRG t(9;18)	Total	TRA/D;TRB t(7;18)	TRA/D;TRG t(7;9)	TRB;TRG t(9;18)	Total
1	PBL	5 000	20	14	0	34	40.0	28.0	0.0	68.0
2	PBL	5 000	13	7	2	22	26.0	14.0	4.0	44.0
3	PBL	5 000	7	7	2	16	14.0	14.0	4.0	32.0
4	PBL	5 000	14	10	0	24	28.0	20.0	0.0	48.0
5	PBL	5 000	6	15	1	22	12.0	30.0	2.0	44.0
		25 000	60	53	5	118	24.0	21.2	2.0	47.2
2	CD3 ⁺	5 000	14	11	1	26	28.0	22.0	2.0	52.0
3	CD3 ⁺	5 000	4	10	1	15	8.0	20.0	2.0	30.0
4	CD3 ⁺	5 000	13	9	0	22	26.0	18.0	0.0	44.0
5	CD3 ⁺	5 000	10	8	0	18	20.0	16.0	0.0	36.0
		20 000	41	38	2	81	20.5	19.0	1.0	40.5
1	γδTCR ⁺	5 000	7	6	1	14	14.0	12.0	2.0	28.0
2	γδTCR ⁺	5 000	4	3	1	8	8.0	6.0	2.0	16.0
3	γδTCR ⁺	5 000	1	5	1	7	2.0	10.0	2.0	14.0
4	γδTCR ⁺	5 000	2	2	0	4	4.0	4.0	0.0	8.0
5	γδTCR ⁺	5 000	4	4	1	9	8.0	8.0	2.0	18.0
		25 000	18	20	4	42	7.2	8.0	1.6	16.8

Illegitimate recombination between T cell receptor genes in humans and pigs (*Sus scrofa domestica*)

Journal: Chromosome Research

Authors: Petra Musilova, Jitka Drbalova, Svatava Kubickova, Halina Cernohorska, Hana Stepanova, Jiri Rubes

Corresponding author: Petra Musilova, Veterinary Research Institute, Department of Genetics and Reproduction,

Hudcova 70, 621 00 Brno, Czech Republic, E-mail address: musilova@vri.cz

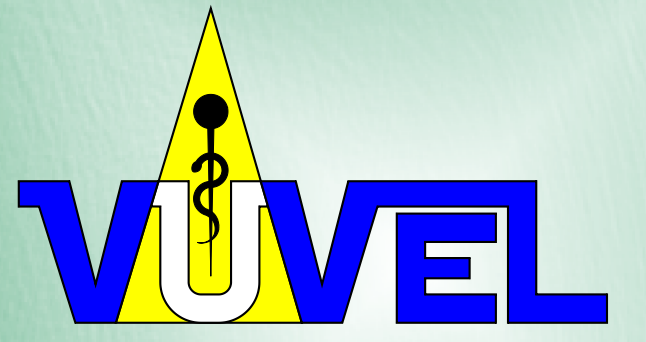
Supplementary Table 4. Trans-rearrangements in PHA and PW stimulated whole blood lymphocyte cultures in middle-aged pigs

Pig No.	Mitogen	Examined metaphases	Number				Frequency /10,000 cells			
			<i>TRA/D;TRB</i> t(7;18)	<i>TRA/D;TRG</i> t(7;9)	<i>TRB;TRG</i> t(9;18)	Total	<i>TRA/D;TRB</i> t(7;18)	<i>TRA/D;TRG</i> t(7;9)	<i>TRB;TRG</i> t(9;18)	Total
6	PHA	6 945	8	13	0	21	11.5	18.7	0.0	30.2
7	PHA	6 399	9	10	1	20	14.1	15.6	1.6	31.3
8	PHA	5 683	15	13	1	29	26.4	22.9	1.8	51.0
		19 027	32	36	2	70	16.8	18.9	1.1	36.8
6	PWM	6 145	11	16	1	28	17.9	26.0	1.6	45.6
7	PWM	5 148	6	18	0	24	11.7	35.0	0.0	46.6
8	PWM	6 018	22	15	0	37	36.6	24.9	0.0	61.5
		17 311	39	49	1	89	22.5	28.3	0.6	51.4

Chromosomal rearrangements with breakpoints in T cell receptor genes in *Equidae*

Jitka Krchnava, Petra Musilova, Svatava Kubickova, Jiri Rubes

Department of Genetics and Reproduction, Veterinary Research Institute, Hudcova 70, 621 00 Brno, Czech Republic



Introduction

The T cell receptor (TCR) is a molecule found on the surface of T lymphocytes (or T cells) that is responsible for recognizing antigens. It is a heterodimer composed of two different protein chains - $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$. There are four genes encoding T cell receptor chains – *TRA*, *TRB*, *TRD* and *TRG* for α , β , δ and γ chain, respectively. TR genes are rearranged by site-specific recombination between clusters of variable (V), diversity (D) and joining (J) segments during maturation of T cells. Occasionally, interlocus recombination of different TR genes takes place, resulting in reciprocal translocation or inversion of chromosomes. The family *Equidae* is composed of a single genus *Equus* which comprises horses, asses

and zebras. To find out whether chromosomal rearrangements which occurred during the evolution of the family *Equidae* can influence the frequency of TR trans-rearrangements, we assessed these frequencies in the horse (*Equus caballus*), African ass (*Equus asinus*) and Burchell's zebra (*Equus burchelli*) by means of fluorescence in situ hybridization (FISH) using painting probes. As frequencies of chromosomal rearrangements with breakpoints in T cell receptor genes have been determined in porcine and human lymphocyte cultures in our laboratory (Musilova et al., unpublished data), we compared these findings with frequencies of TR trans-rearrangement in horses.

Materials and methods

Peripheral blood lymphocyte cultures stimulated with pokeweed from five horses (Equine Clinic of Veterinary and Pharmaceutical University, Brno), two African asses and three Burchell's zebras (Dvur Kralove Zoo) were used in the study. Metaphase chromosome spreads prepared from these lymphocyte cultures were examined for TR trans-rearrangements using painting probes for horse chromosomes 1q, 4, 4p, 4q and 4p+31

(used in African ass and Burchell's zebra study) prepared by laser microdissection in our laboratory. At least 5000 metaphase cells were evaluated from each culture using metaphase finder Metafer v 3.9 (MetaSystems, Altlußheim, Germany). Metaphase cells with translocations or inversions were captured and analyzed using the ISIS software (MetaSystems, Altlußheim, Germany).

Results and discussion

We assessed frequencies of chromosomal rearrangements with breakpoints in T cell receptor genes in five horses, two African asses and three Burchell's zebras using FISH with painting probes (Fig. 1, 2 and 3). *TRD* being located within *TRA* (*TRA/D* locus), four TR genes are localized overall in three different chromosome regions (Fig. 4), and thus interlocus recombination can result in three different chromosomal rearrangements in each species. There are some highly significant differences in the frequency of TR trans-rearrangements amongst the three species from the family *Equidae*, especially between horses and African asses and comparing the findings in horses and Burchell's zebras in the frequency of translocation involving *TRA/D* and *TRB* loci (18×10^{-4} in horses, 51×10^{-4} in African asses and Burchell's zebras) as shown in Fig. 5.

Phylogeny of the family *Equidae* has been extensively studied (Steiner and Ryder, 2011). Even though equids diverged quite recently, their karyotypes widely differ due to rapid evolution (Musilova et al., 2013). In horses, the TR genes are located on chromosomes 1q (*TRA/D*), 4p (*TRG*) and 4q (*TRB*). Chromosome 1 has been preserved in all equids, with centromere repositioning in Hartmann's zebra (Fig. 4A). Chromosome 4 fused with chromosome 31 in the lineage leading to asses and zebras. Subsequently, chromosome 4/31 underwent pericentric inversion in African ass and centric fission in Hartmann's zebra, resulting in the occurrence of *TRG* and *TRB* on the same chromosome arm in African ass and separation of *TRG* and *TRB* to two chromosomes in Hartmann's zebra. Furthermore, chromosome 4q underwent tandem telomere-telomere fusion in Hartmann's zebra, resulting in opposite orientation of the segment with respect to the centromere (Fig. 4B). To find out whether these chromosomal rearrangements can influence the frequency of TR trans-rearrangements, further investigations have to be done, including more individuals to be examined as well as examination of lymphocyte cultures of Hartmann's zebra.

We compared the frequencies of TR trans-rearrangements determined in porcine and human lymphocyte cultures in our laboratory (Musilova et al., unpublished data) with the findings in horses. The occurrence of all three possible chromosome rearrangements with breakpoints in TR genes is highly significantly higher in horses (18×10^{-4} , 17×10^{-4} and 11×10^{-4}) than in men (6×10^{-4} , 4×10^{-4} and 4×10^{-4}). We found statistically significant difference in the frequencies of TR trans-rearrangements involving *TRA/D* and *TRB* loci and between *TRB* and *TRG* loci when comparing pigs (28×10^{-4} and 3×10^{-4} , respectively) and horses (18×10^{-4} and 11×10^{-4} , respectively) as shown in Fig 6. The absolute number of TR trans-rearrangements may serve as a biomarker of genomic instability, genotoxic exposure and lymphoma risk (Lipkowitz et al., 1992; Allam and Kabelitz, 2006). The estimated rates of lymphoma in slaughtered pigs are 0.002 – 0.007% (Jacobs et al., 2002) and the prevalence of lymphoma in horses ranges from 0.002% to 0.5% (Rendle et al., 2012). It remains uncertain whether this higher occurrence of lymphoma malignancies in horse population can be related to our findings of different frequencies in TR trans-rearrangements.

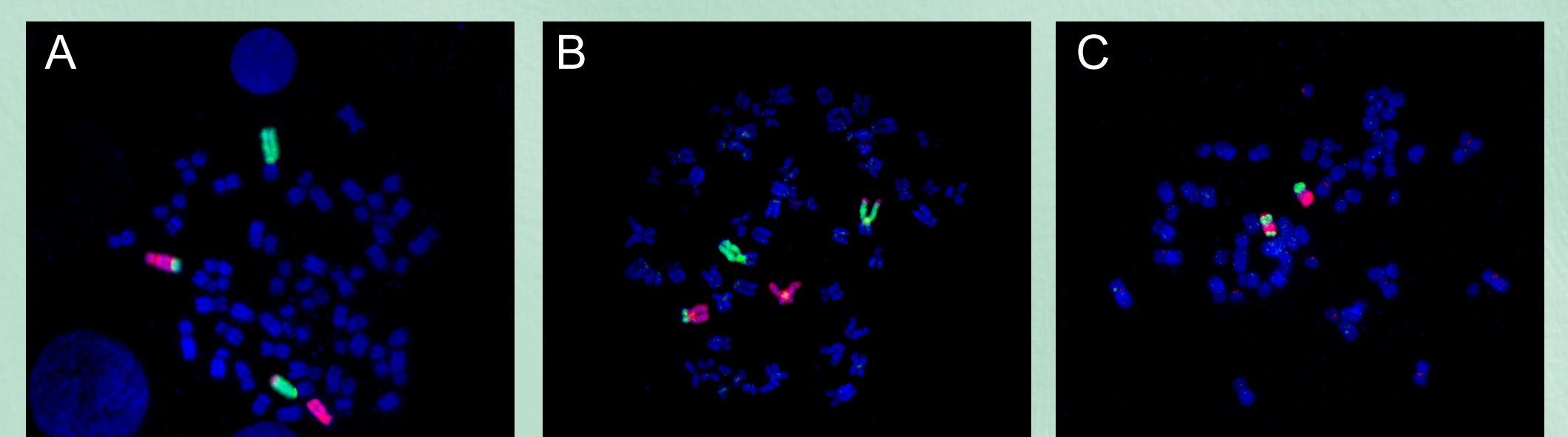


Fig. 1. FISH showing chromosomal rearrangements with breakpoints in TR genes in horse. (A) Reciprocal translocation $t(1;4)(q;q)$ with breakpoints in *TRA/D* and *TRB* genes. (B) Reciprocal translocation $t(1;4)(q;p)$ with breakpoints in *TRA/D* and *TRG* genes. (C) Inversion $inv(4)(pq)$ with breakpoints in *TRG* and *TRB* genes.

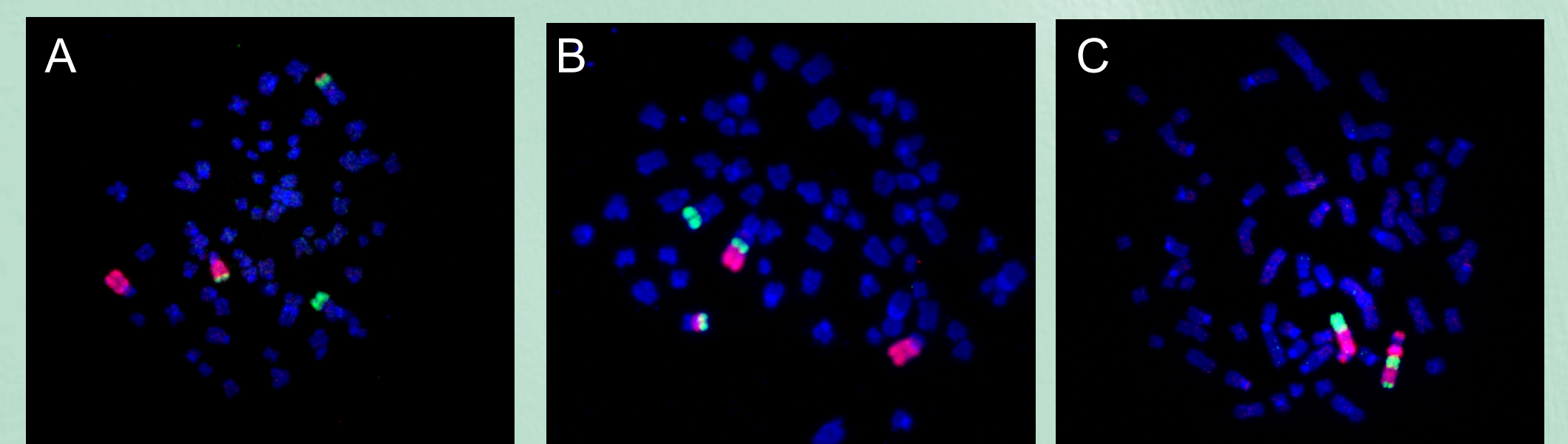


Fig. 2. FISH showing chromosomal rearrangements with breakpoints in TR genes in African ass. (A) Reciprocal translocation $t(1;2)(qd;q)$ with breakpoints in *TRA/D* and *TRB* genes. (B) Reciprocal translocation $t(1;2)(qp;q)$ with breakpoints in *TRA/D* and *TRG* genes. (C) Inversion $inv(1)(ppq)$ with breakpoints in *TRG* and *TRB* genes. qp indicates the proximal part of the q arm, qd indicates the distal part of the q arm.

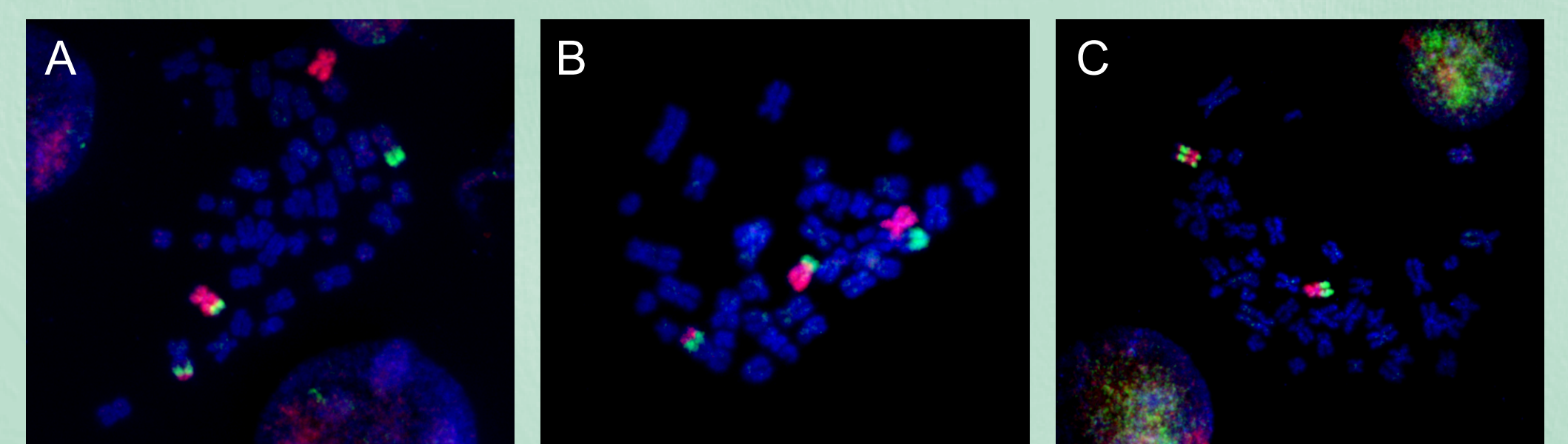


Fig. 3. FISH showing chromosomal rearrangements with breakpoints in TR genes in Burchell's zebra. (A) Reciprocal translocation $t(2;8)(q;q)$ with breakpoints in *TRA/D* and *TRB* genes. (B) Reciprocal translocation $t(2;8)(q;p)$ with breakpoints in *TRA/D* and *TRG* genes. (C) Inversion $inv(8)(pq)$ with breakpoints in *TRG* and *TRB* genes.

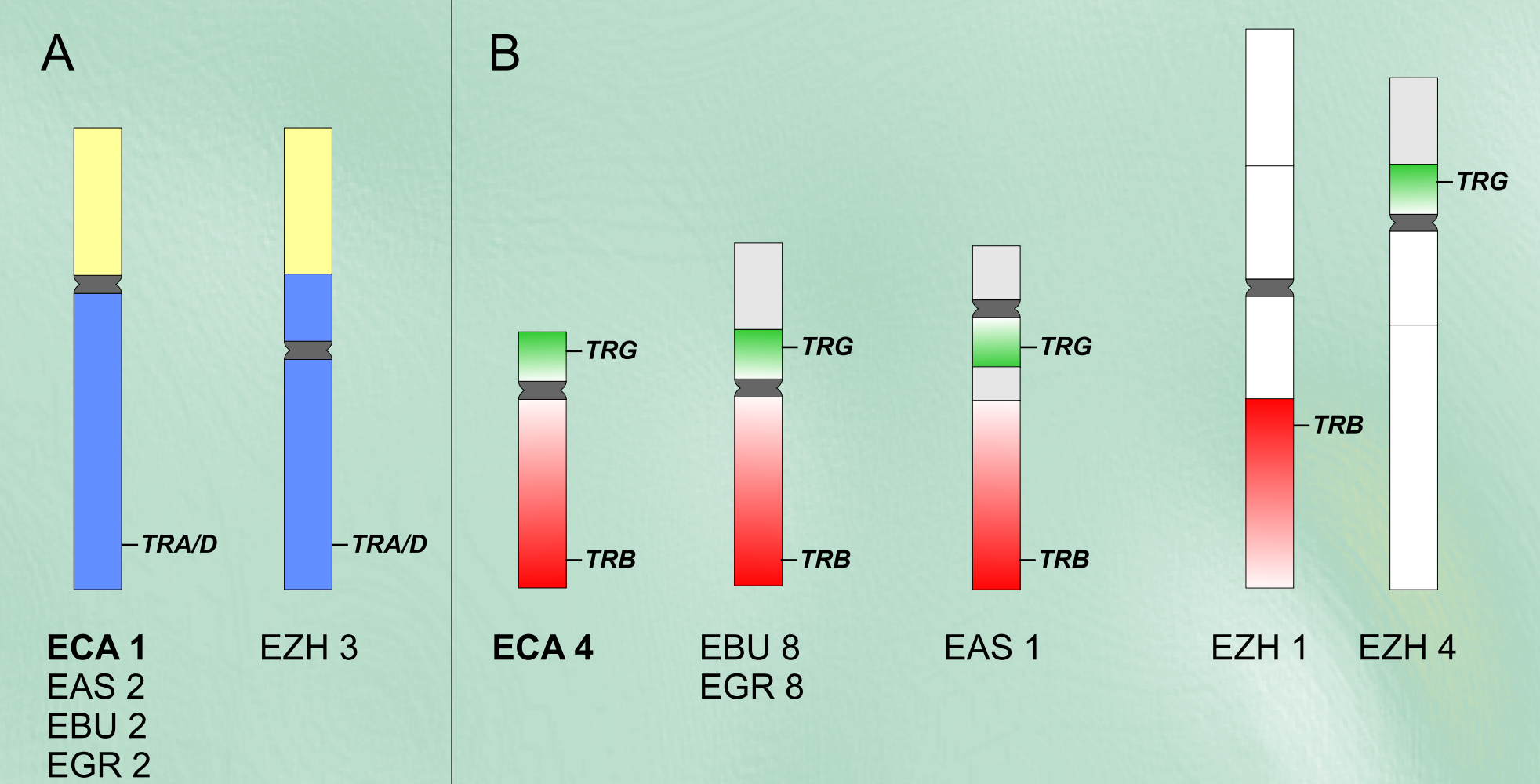


Fig. 4. Diagram showing the chromosomes homologous to the horse chromosome ECA 1 (A) and ECA 4 (B) with the location of TR genes in four species from the family *Equidae*. ECA, horse (*Equus caballus*); EAS, African ass (*E. asinus*); EBU, Burchell's zebra (*E. burchelli*); EGR, Grevy's zebra (*E. grevyi*); EZH, Hartmann's zebra (*E. zebra hartmannae*).

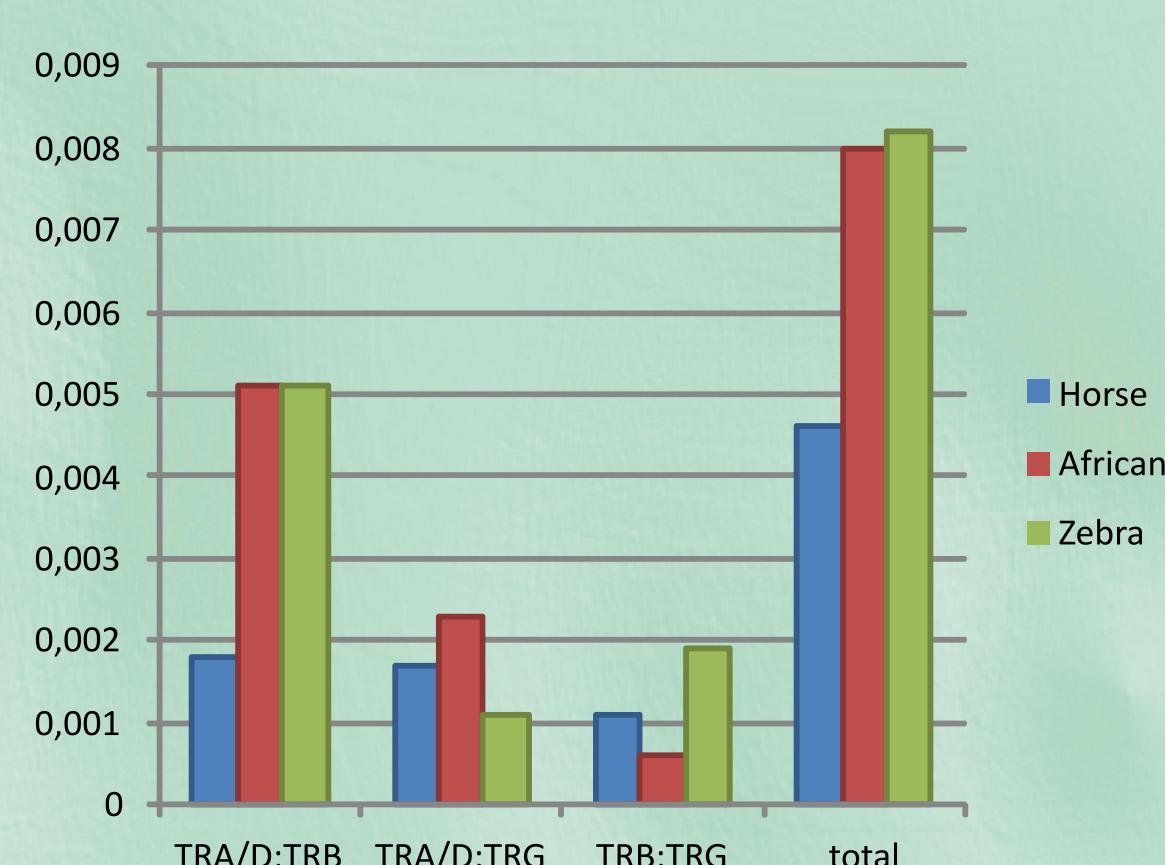


Fig. 5. Bar graph showing the frequencies of rearrangements with breakpoints in TR genes in equine, African ass and Burchell's zebra lymphocyte cultures.

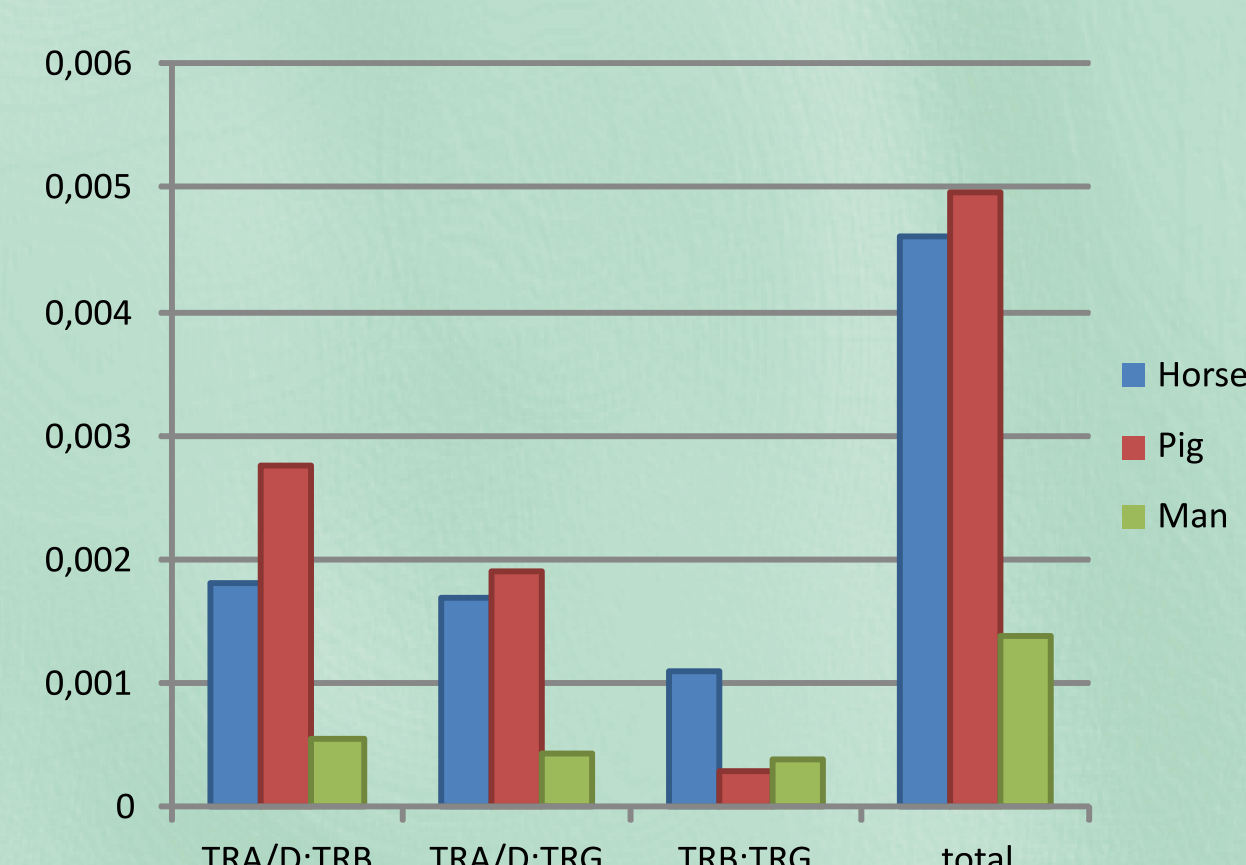


Fig. 6. Bar graph showing the frequencies of rearrangements with breakpoints in TR genes in human, porcine and equine lymphocyte cultures.

References

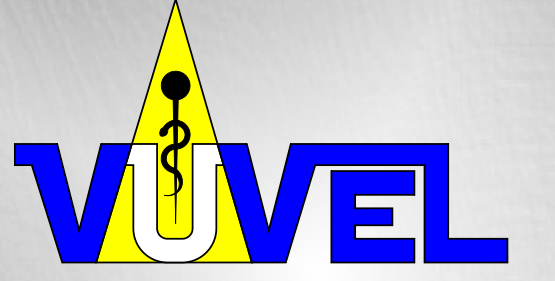
- Allam A, Kabelitz D. 2006. TCR trans-rearrangements: Biological significance antigen recognition vs the role as lymphoma biomarker. *J Immunol* 176:5707-5712.
- Jacobs RM, Messick JB, Valli VE. 2002. Tumors of the Hemolymphatic system. In: Meuten DJ, editor. *Tumors in domestic animals*. Iowa: A Blackwell Publishing Company, p 119-198.
- Lipkowitz S, Garry VF, Kirsch IR. 1992. Interlocus V-J recombination measures genomic instability in agriculture workers at risk for lymphoid malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5301-5305.
- Musilova P, Kubickova S, Vahala J, Rubes J. 2013. Subchromosomal karyotype evolution in Equidae. *Chromosome Res* 21:175-187.
- Rendle DI, Hughes KJ, Farish C, Kessel A. 2012. Multicentric T-cell lymphoma presenting as inferior palpebral swelling in a Standardbred mare. *Aust Vet J*. 90:485-489.
- Steiner CC, Ryder OA. 2011. Molecular phylogeny and evolution of the perissodactyla. *Zool J Linn Soc* 163:1289-1303.

Are frequencies of chromosomal rearrangements with breakpoints in T cell receptor genes affected by the proportion of $\gamma\delta$ T lymphocytes?

Petra Musilova^{1*}, Jitka Krchnava¹, Svatava Kubickova¹, Lenka Leva², Halina Cernohorska¹, Jiri Rubes¹

¹Department of Genetics and Reproduction, Veterinary Research Institute, Hudcova 70, 621 00 Brno, Czech Republic; *musilova@vri.cz

²Department of Immunology, Veterinary Research Institute, Hudcova 70, 621 00 Brno, Czech Republic



Introduction

T cells express either $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ antigen-specific receptors whose structure closely resembles that of immunoglobulins. There are four genes coding for T cell receptor (TCR) proteins: α - *TRA*, β - *TRB*, δ - *TRD* and γ - *TRG*. During maturation, T cell receptor genes (TR) are rearranged by site-specific recombination between clusters of variable, diversity, and joining segments. Occasionally, interlocus recombination occurs, which results in reciprocal translocation or inversion of chromosomes. Rearrangements of TR genes with oncogenes are recurrent in several T cell malignancies. It has been suggested that the absolute number of TR trans-rearrangements may serve as a biomarker of genomic instability, genotoxic exposure and lymphoma risk (Lipkowitz et al., 1992; Allam and

Kabelitz, 2006). We assessed the frequencies of reciprocal translocations $t(7;18)$, $t(7;9)$ and $t(9;18)$ with breakpoints in TR genes in pig lymphocytes and compared them with corresponding rearrangements $t(7;14)(q;q)$, $t(7;14)(p;q)$ and $inv(7)(p;q)$ in human lymphocytes by means of fluorescence in situ hybridization (FISH) using painting probes. To investigate whether the frequencies of trans-rearrangements are affected by the proportion of $\gamma\delta$ T lymphocytes, we prepared porcine lymphocyte cultures enriched with $\gamma\delta$ TCR+ cells. Frequencies of translocations in $\gamma\delta$ T cell cultures were compared with those in standard whole blood cultures and cultures enriched with T lymphocytes (CD3+).

Materials and methods

Phytohemagglutinin stimulated peripheral blood lymphocyte cultures from 4 pigs and 6 men were used in the study. Besides whole blood cultures, cultures enriched with $\gamma\delta$ T cells and CD3+ cells (T lymphocytes) were set up for all 4 and 3 investigated pigs, respectively. Lymphocytes were sorted using indirect magnetic labelling and MidiMACS™ separator. Percentages of $\gamma\delta$ TCR+ and CD3+ cells in peripheral blood lymphocyte cultures before harvesting were analysed by indirect immunophenotyping and flow cytometry. Metaphase

cells prepared from these pig lymphocyte cultures were examined for TR trans-rearrangements using painting probes for pig chromosomes 7, 18, and 9 prepared by laser microdissection. Commercial painting probes for human chromosomes 7, 14 (Cambio), 7p and 7q (MetaSystems) were used for human cultures. We investigated a minimum of 5000 metaphases from each culture.

Results and discussion

As four TR genes reside overall in three different chromosome regions (Fig.1 and 2), interlocus recombination can result in three different chromosomal rearrangements (Fig. 3 and 4). Baseline frequencies of chromosomal rearrangements with breakpoints in TR genes were determined in pig and human lymphocyte cultures using FISH with painting probes (Fig. 5, 6 and 7).

The frequencies of both translocations involving *TRA/TRD* locus in pigs (28×10^{-4} and 19×10^{-4}) are significantly higher than the frequency of the recombination between *TRB* and *TRG* loci (3×10^{-4}) in pigs and the frequencies of corresponding translocations in humans (6×10^{-4} and 4×10^{-4}) as shown in Fig. 8.

The immune system of pigs differs from that of humans. While less than 5% of T lymphocytes bear $\gamma\delta$ TCR in humans, pigs contain a high proportion of circulating $\gamma\delta$ T cells (Yang and Parkhouse, 1996). To investigate whether the frequencies of trans-rearrangements are affected by the proportion of $\gamma\delta$ T lymphocytes, we prepared porcine lymphocyte cultures enriched with $\gamma\delta$ T cells. Frequencies of translocations in $\gamma\delta$ T cell cultures (7×10^{-4} , 8×10^{-4} and 2×10^{-4}) were lower than those in standard whole blood cultures

and cultures enriched with CD3+ T cells (Fig. 9), similar to the low frequencies of corresponding rearrangements in humans. The low frequencies of translocations in $\gamma\delta$ T cell cultures imply higher frequencies in $\alpha\beta$ T lymphocytes in pigs. The differences in frequencies of trans-rearrangements between men and pigs can be caused by a more complex genomic structure of TR genes in pigs (Uenishi et al., 2009; Eguchi-Ogawa et al., 2009).

The process of DNA rearrangements during maturation predisposes lymphoid cells to aberrant DNA rearrangements involving fusion of TR to loci unrelated to the antigen receptor genes, which may be oncogenes. Such fusion to an oncogene may result in lymphoid malignancy. It has been suggested that the absolute number of "innocent" trans-rearrangements with both breakpoints in TR gene loci correlates with the risk of developing a lymphoma, regardless of whether that risk is based on an inherited predisposition or acquired as a result of exposure. This assay may thus serve as a biomarker of lymphoma risk. In pigs, malignant lymphoma is the most common tumour disease primarily seen in young animals (Misdorp, 2003).

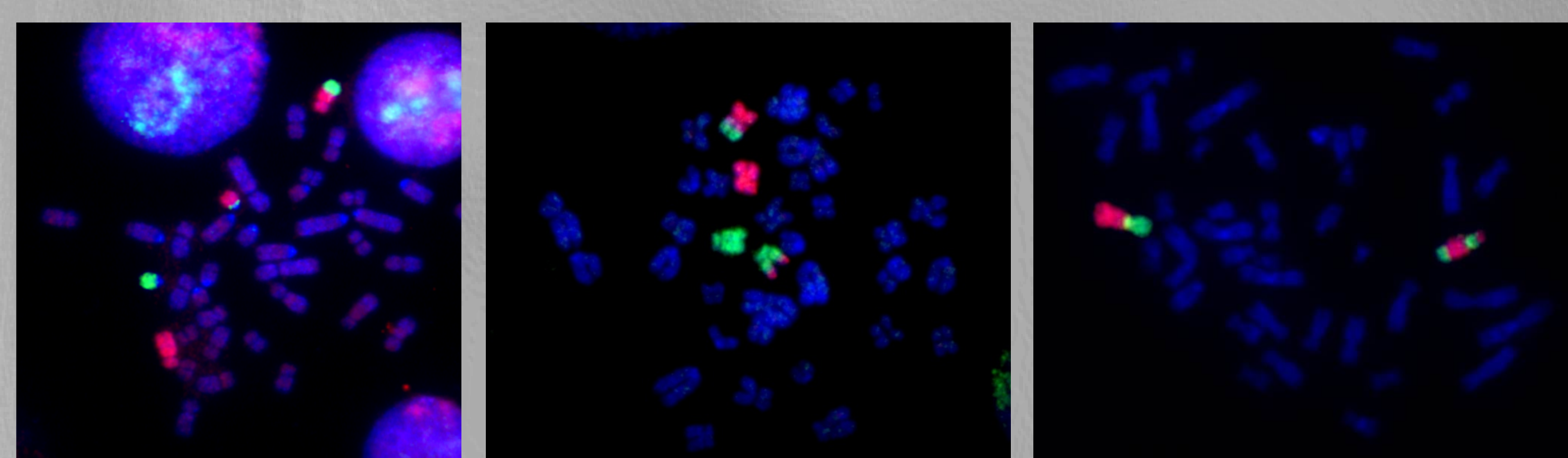
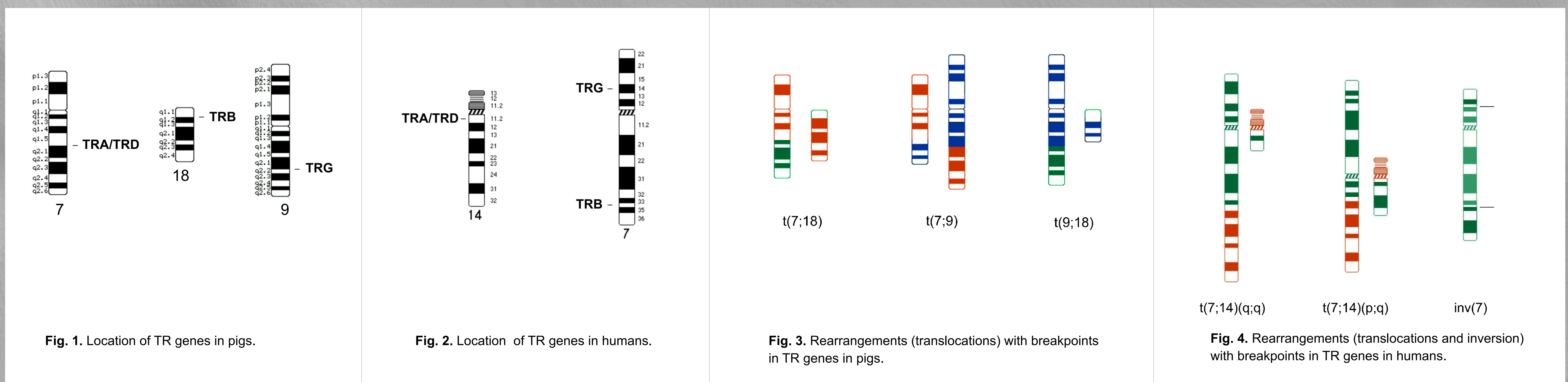


Fig. 5. Reciprocal translocation $t(7;18)$ with breakpoints in *TRA/TRD* and *TRB* genes in pigs.

Fig. 6. Reciprocal translocation $t(7;9)$ with breakpoints in *TRA/TRD* and *TRG* genes in pigs.

Fig. 7. Inversion $inv(7)$ with breakpoints in *TRB* and *TRG* genes in humans.

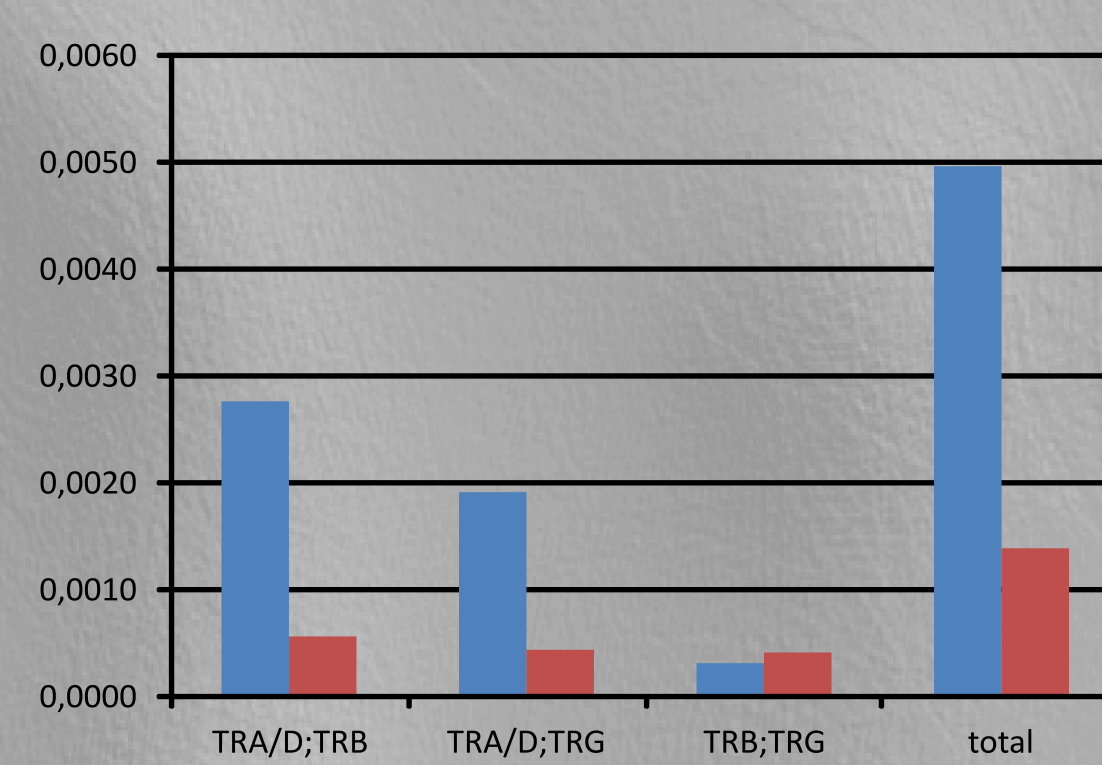


Fig. 8. Bar graph showing the frequencies of rearrangements with breakpoints in TR genes in porcine and human whole blood lymphocyte cultures.

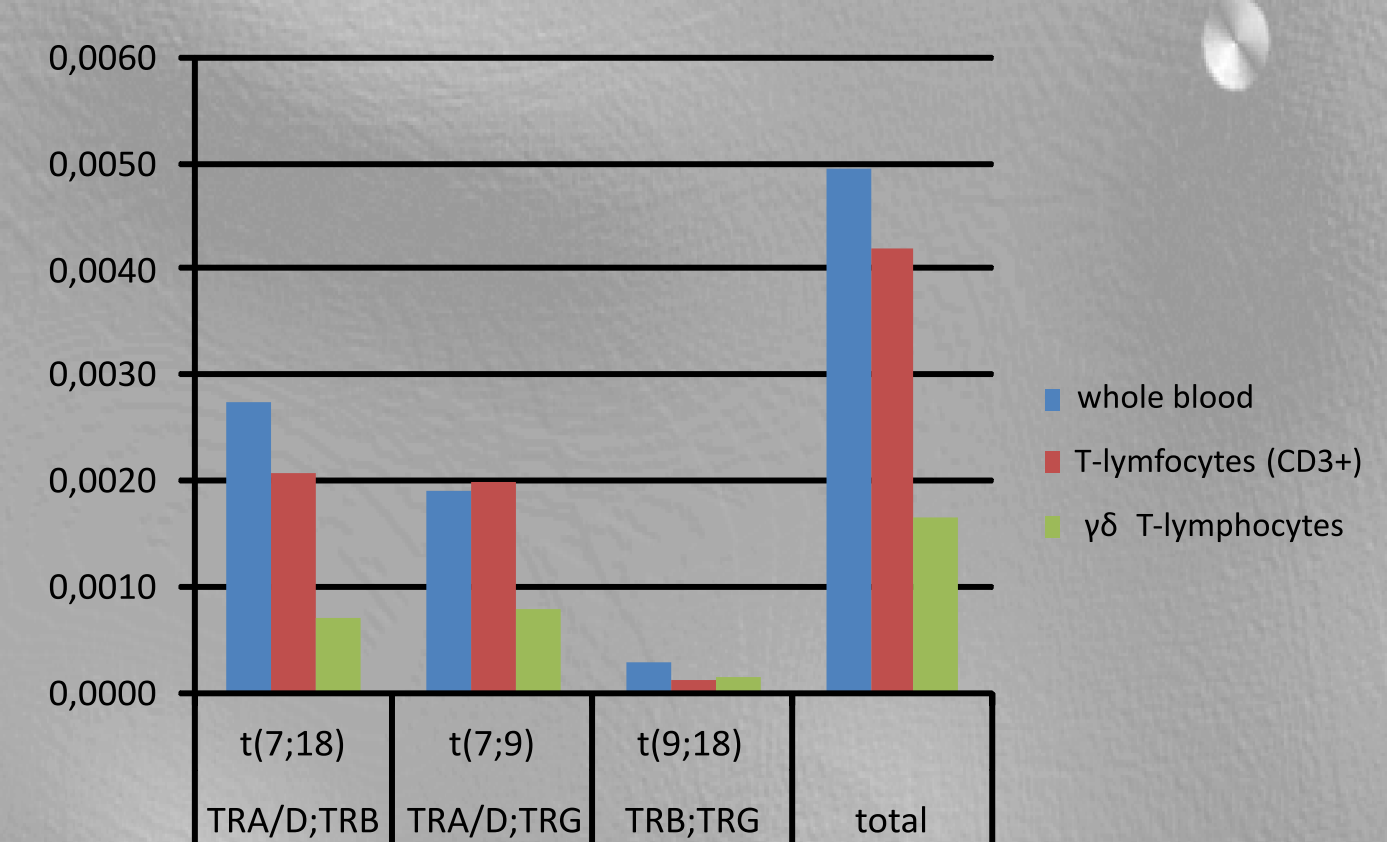


Fig. 9. Bar graph showing the frequencies of rearrangements with breakpoints in TR genes in porcine whole blood lymphocyte, T lymphocyte (CD3+) and $\gamma\delta$ T lymphocyte ($\gamma\delta$ TCR+) cultures.

References

Allam A, Kabelitz D. 2006. TCR trans-rearrangements: Biological significance antigen recognition vs the role as lymphoma biomarker. *J Immunol* 176:5707-5712.

Eguchi-Ogawa T, Toki D, Uenishi H. 2009. Genomic structure of the whole D-J-C clusters and the upstream region coding V segments of the TRB locus in pig. *Dev Comp Immunol* 33:1111-1119.

Lipkowitz S, Garry VF, Kirsch IR. 1992. Interlocus V-J recombination measures genomic instability in agriculture workers at risk for lymphoid malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5301-5305.

Misdorp W. 2003. Congenital and hereditary tumours in domestic animals. 2. pigs. A review. *Vet Q* 25:17-30.

Uenishi H, Eguchi-Ogawa T, Toki D, Morozumi T, Tanaka-Matsuda M, Shinkai H, Yamamoto R, Takagaki Y. 2009. Genomic sequence encoding diversity segments of the pig TCR delta chain gene demonstrates productivity of highly diversified repertoire. *Mol Immunol* 46:1212-1221.

Yang H, Parkhouse RM. 1996. Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues. *Immunology* 89:76-83.