

Določanje klonalnosti limfoidnih proliferacij –

uvedba nove metode in primerjava z dosedanjimi metodami

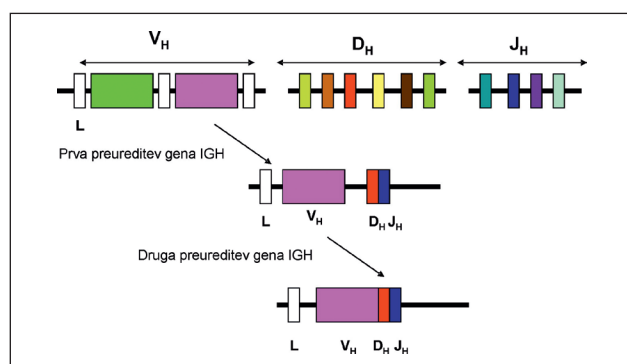
P. Cerkovnik, I. Koković, V. Prevodnik Kloboves in S. Novaković

Povzetek

Na Oddelku za molekularno diagnostiko smo na področju diagnostike limfomov uvedli dodatno metodo za določanje klonalnosti limfoidnih proliferacij. Tudi nova metoda temelji na verižni reakciji s polimerazo (PCR) in na uporabi različnih konsenzusnih oligonukleotidnih začetnikov. Metoda je validirana in registrirana za diagnostične potrebe (oznaka CE). Z razširjenim naborom oligonukleotidnih začetnikov in uporabo večjega števila začetnikov smo, po naših izračunih, izboljšali občutljivost določanja klonalnosti limfocitov B za 23,1 %, določanje klonalnosti limfocitov T pa za 14,3 %. Teoretično lahko sedaj z obema metodama določimo monoklonalno populacijo limfocitov pri 84,6 % B- in 85,7 % T-limfomov.

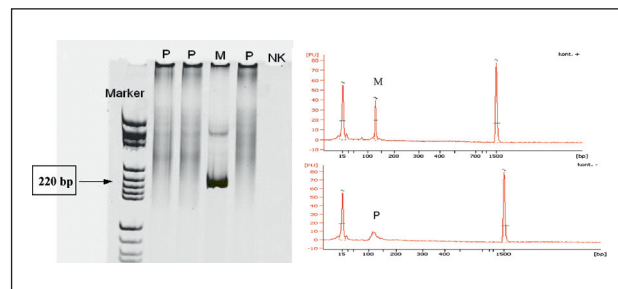
Uvod

Pravočasna opredelitev in klasifikacija limfomov je pomembna, toda zahtevno področje onkološke diagnostike. Za potrditev diagnoze in opredelitev tipa limfoma je nujna odstranitev celotne bezgavke in natančna histološka preiskava. Velikokrat pa je razlikovanje med reaktivnimi, torej vnetnimi bezgavkami in limfomom težavno. Da bi preprečili nepotrebno odstranitev bezgavke, si pomagamo z določitvijo klonalnosti limfoidnih proliferacij z molekularnimi metodami. Izhajamo iz dejstva, da so rakaste celice nastale po klonalni teoriji, kar pomeni, da so vse rakaste celice v tumorju potomke ene maligno spremenjene celice. Ta lastnost rakastih celic nam omogoča razlikovanje med t. i. poliklonalnimi (reaktivnimi) procesi in t. i. monoklonalnimi (malignimi) procesi.



Slika 1. Shematski prikaz preureditve gena za težko verigo imunoglobulina (IGH). Na sliki je prikazana preureditev gena IGH pri limfocitih B. Vsak limfocit B ali T ima naključno preureditev različnih genskih segmentov – t. i. V (ang. Variable), D (ang. Diversity) in J (ang. Joining) genskih segmentov, ki so edinstvene tako v dolžini kot v sekvenci. Posledica je ogromna raznolikost antigenskih receptorjev. L – t. i. vodilna (ang. leader) regija, ki je del variabilnega genskega segmenta (V).

Na molekularni ravni je določanje klonalnosti (teoretično) možno pri vseh limfoidnih proliferacijah, saj med diferenciacijo limfocitov (iz limfoidnih prekurzorjev) poteka preureditev genov za antigenske receptorje, ki je edinstvena za vsak posamezni limfocit. Med preureditvijo genov za imunoglobuline (Ig) ali T-celični receptor (TCR) med zgodnjo diferenciacijo limfocitov prihaja do naključnega združevanja različnih genskih segmentov – t. i. segmentov V (angl. Variable), D (angl. Diversity) in J (angl. Joining). Poleg tega pa med preureditvijo genov prihaja še do delecij naključnih nukleotidov in do naključnega vstavljanja nukleotidov na vezavna mesta, kar še poveča že tako ogromno raznolikost antigenskih receptorjev (slika 1). Pri limfoidnih proliferacijah reaktivnih lezij bomo tako zasledili poliklonalno preureditev genov Ig ali TCR, v nasprotju z malignimi limfoidnimi proliferacijami, ki kažejo večinoma monoklonalno preureditev teh genov (slika 2).



Slika 2. Analiza pomnoženih produktov na poliakrilamidnem gelu (levo) in s kapilarno elektroforezo na bioanalizatorju (desno). Na sliki je prikazan primer PCR-produktov pri določanju preureditve genov za TCRG. M – pri monoklonalni populaciji dobimo en pomnožen fragment z značilno dolžino, podano v baznih parih (bp) oz. vidimo kot izrazit vrh na elektroferogramu po kapilarni elektroforezi. P – pri poliklonalni (ali normalni) populaciji limfocitov se na gelu vidi t. i. poliklonalska sled oz. značilna Gaussova porazdelitev na elektroferogramu. NK – vodna kontrola ali kontrola kontaminacije.

Molekularna diagnostika limfomov temelji na metodi PCR (verižni reakciji s polimerazo) in na uporabi različnih konsenzusnih oligonukleotidnih začetnikov, ki se vežejo na visoko ohranjene homologne sekvence nukleotidov znotraj genov za imunoglobuline in T-celični receptor. Na našem oddelku določamo klonalnost limfoidnih proliferacij pri limfomih tipa B in T. Klonalno populacijo limfocitov B dokažemo s pomnoževanjem preurejenega območja (V-D-J) gena za težko verigo imunoglobulina (IGH), v primeru limfocitov T pa s pomnoževanjem preurejenega območja (V-J) gena za gama verigo T-celičnega receptorja (TCRG). Ker so geni za antigenske receptorje zelo polimorfni (sestavljani iz heterogenih sorodnih sekvenc DNA), je uporaba čim večjega

števíla oligonukleotidnih začetnikov, ki se vežejo na različne ohranjene regije V-D-J, nujna za zanesljivo odkrivanje večine klonalnih preureditev. Zato smo določanje klonalnosti limfoidnih proliferacij razširili z uvedbo nove metode, t. i. IdentiClone Gene Clonality Assay proizvajalca InVivo Scribe Technologies (www.invivoscribe.com). Novo metodo smo primerjali z že utečeno »hišno« metodo za določanje klonalnosti limfoidnih proliferacij.

Testna skupina in primerjava metod

Testna skupina vzorcev

Za uvedbo nove metode IdentiClone Gene Clonality Assay (v nadaljevanju IdentiClone) in za primerjavo z že uveljavljeno »hišno« metodo za določanje limfoidnih proliferacij smo izbrali skupino testnih vzorcev z že znano histopatološko diagnozo. Skupaj smo analizirali 41 vzorcev aspiracijskih biopsij, med katerimi je bilo 13 limfomov tipa B, 14 limfomov tipa T, 14 vzorcev pa je bilo opredeljenih kot reaktivne lezije. Genomsko DNA smo po navodilih proizvajalca izolirali s kompletom HighPure PCR Template Preparation Kit (Roche Applied Science, Penzberg, Nemčija). Kakovost in (zadostno) količino izolirane DNA smo preverili z reakcijsko mešanico za pomnožitev različnih »house-keeping« genov (geni, ki so vedno prisotni v vsaki molekuli DNA) po navodilih proizvajalca InVivo Scribe Technologies. V vsakem testiranem vzorcu (ne glede na diagnozo) smo prisotnost klonalne populacije limfocitov B in T določali z obema metodama.

Primerjava metod za določanje klonalnosti limfoidnih proliferacij

Obe metodi, »hišna« in IdentiClone, temeljita na pomnoževanju DNA z encimom polimeraza (PCR), na uporabi ustreznih oligonukleotidnih začetnikov, na analizi pomnoženih produktov na poliakrilamidnem gelu ali na analizi s kapilarno elektroforezo na bioanalizatorju. Če je v bezgavki limfom, na gelu vidimo en pomnožen fragment z določeno dolžino, podano v baznih parih (bp). Gre za prevladujočo monoklonsko proliferacijo limfocitov B ali T, ki je posledica klonalnega razvoja bolezni. Rezultat, ki ga vidimo pri reaktivni bezgavki, je enak kot pri normalni bezgavki – poliklonska proliferacija. Na gelu dobimo t. i. poliklonsko sled, ki je posledica prisotnosti različnih limfocitov, ki imajo različne preureditve genov. Pomnoženi fragmenti se tako razlikujejo v velikosti in se na gelu razporedijo znotraj pričakovanega velikostnega ranga po Gaussovi porazdelitvi (slika 2).

Določanje klonalnosti limfoidnih proliferacij tipa B

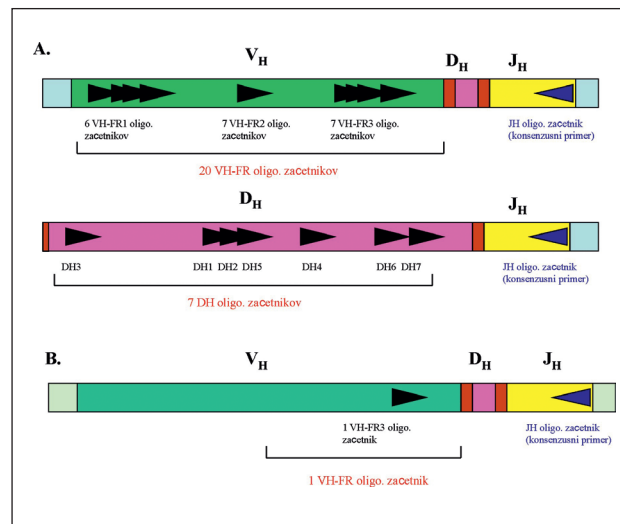
»Hišna« metoda

Pri pomnoževanju preurejenega območja gena za težko verigo imunoglobulina IGH po že utečeni »hišni« metodi uporabljamo 2 konsenzusna oligonukleotidna začetnika: prvi začetnik spozna približno 85 % znanih zaporedij v t. i. tretjem okvirnem območju variabilnih genskih segmentov (VH-FR3), drugi pa spozna vseh 6 zaporedij JH (slika 3).

IdentiClone

Komplet IdentiClone IGH Gene Clonality Assay (InVivoScribe Technologies, San Diego, ZDA) vsebuje 5 reakcijskih mešanic z različnimi konsenzusnimi oligonukleotidnimi začetniki: v 3 reakcijskih mešanicah (t. i. A, B in C) je skupaj 20 različnih začetnikov, ki se vežejo na ohranjena zaporedja v prvem,

drugem in tretjem okvirnem območju variabilnih genskih segmentov (VH-FR1, VH-FR2 in VH-FR3); v 2 reakcijskih mešanicah (t. i. D in E) pa je 7 začetnikov, ki prepoznajo ohranjena zaporedja znotraj genskega segmenta D (angl. *diversity*) (DH). V vseh reakcijskih mešanicah je tudi konsenzusni začetnik, ki se veže na ohranjena zaporedja genskega segmenta JH (slika 3).



Slika 3. Shematski prikaz preureditve gena za težko verigo imunoglobulina (IGH). S črnimi puščicami je označeno približno območje vezave oligonukleotidnih začetnikov na ohranjena zaporedja znotraj t. i. okvirnih področij variabilnih genskih segmentov (VH-FR1, VH-FR2 in VH-FR3), D (angl. *diversity*) genskega segmenta (DH) in spajalnih (JH) genskih segmentov. A – nabor oligonukleotidnih začetnikov v reakcijskih mešanicah kompleta »IdentiClone IGH Gene Clonality Assay«. B – konsenzusna začetnika in njuna vezava na IGH, ki jih uporabljamo v naši »hišni« metodi.

Določanje klonalnosti limfoidnih proliferacij tipa T

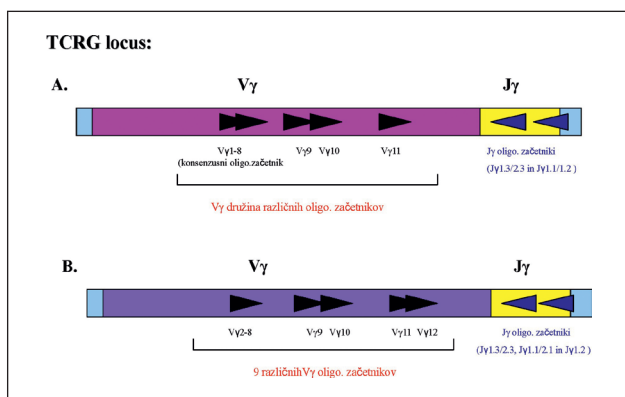
Pri limfocitih T pomnožimo preurejeno območje gena za gama verigo T-celičnega receptorja – TCRG. Ker je podobnost med posameznimi genskimi segmenti V γ oz. J γ mnogo manjša kot pri genskih segmentih VH in JH, je nujna uporaba več različnih konsenzusnih oligonukleotidnih začetnikov.

»Hišna« metoda

V že utečeni »hišni« metodi uporabljamo 2 reakcijski mešanici, ki skupaj vsebujeta 9 različnih konsenzusnih začetnikov, ki se vežejo znotraj ohranjenih območij genskega segmenta V γ (V γ 2–V γ 12), in 3 konsenzusne začetnike za vezavo na ohranjena zaporedja J γ (J γ 1-3) (slika 4).

IdentiClone

V komplet IdentiClone TCRG Gene Clonality Assay (InVivoScribe Technologies) sta vključeni 2 reakcijski mešanici (t. i. A in B), ki vsebujeta številne konsenzusne začetnike (natančno število ni podano), ki se vežejo na ohranjena zaporedja variabilnih segmentov V γ (V γ 1-8 + V γ 10 in V γ 9 + V γ 11), ter 4 konsenzusne začetnike za vezavo na ohranjena zaporedja J γ ob hipervariabilni antigeni vezavni regiji CDR3 (slika 4).

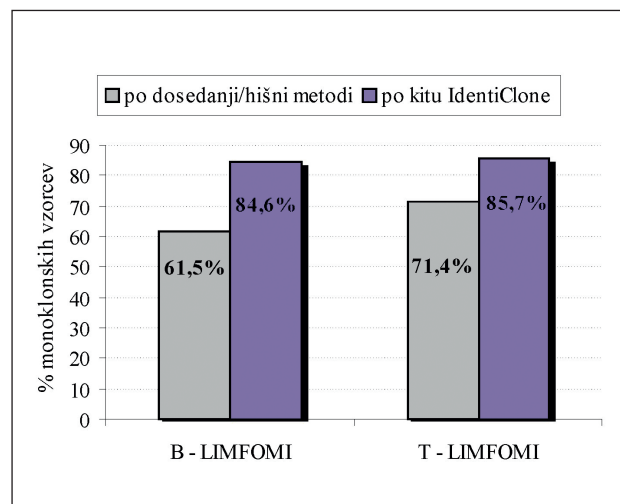


Slika 4. Shematski prikaz preureditve gena za gama verigo T-celičnega receptorja (TCRG). S črnimi puščicami je označeno približno območje vezave oligonukleotidnih začetnikov na ohranjena zaporedja znotraj variabilnih genskih segmentov (V γ) in spajalnega genskega segmenta (J γ) na genu za TCRG. A – nabor oligonukleotidnih začetnikov v reakcijskih mešanica kompleta »IdentiClone TCRG Gene Clonality Assay«. B – vezava oligonukleotidnih začetnikov, ki jih uporabljamo v naši »hišni« metodi.

Rezultati in diskusija

Za primerjavo obeh metod smo izbrali skupino aspiracijskih biopsij z že opredeljeno histopatološko diagnozo. V skupini vzorcev, opredeljenih kot limfomi tipa B, smo s svojo metodo določili prisotnost monoklonske populacije limfocitov B v 8 od 13 testiranih vzorcev, s kompletom IdentiClone IGH Gene Clonality Assay pa v 11 od 13 testiranih vzorcev. Občutljivost naše metode je bila 61,5-odstotna, občutljivost nove metode pa 84,6-odstotna (slika 5). Z uvedbo metode IdentiClone smo tako povečali občutljivost določanja klonalnosti limfocitov B za 23,1 %. Razlog za boljšo občutljivost te metode je večje število konsenzusnih oligozačetnikov, ki se vežejo na ohranjena zaporedja v vseh treh okvirnih območjih variabilnih genskih segmentov (VH-FR1, VH-FR2 in VH-FR3). Poleg tega so prisotni tudi začetniki, ki se vežejo na nepopolne genske preureditve DH-JH, ki so značilne za približno 30 % limfomov B. Za primerjavo naj povemo, da so v študiji BIOMED 2, kjer so testirali omenjeni komplet IGH na 400 vzorcih limfomov tipa B, dosegli 90-odstotno občutljivost metode. Nekoliko večja občutljivost je najverjetneje posledica uporabe DNA, izolirane iz zamrznjenega tkiva, kjer sta kvaliteta in kvantiteta limfocitne DNA boljši kot pri DNA, izolirani iz majhnih aspiracijskih biopsij in tkiva, vklopljenega v parafin. Specifičnost metode za določanje preureditve gena za IGH je bila pri obeh metodah v vseh testiranih reaktivnih vzorcih 100-odstotna. V nekaterih vzorcih, opredeljenih kot T-celični limfomi, pa smo poleg monoklonske populacije limfocitov T (klonalna preureditev gena TCRG) dokazali tudi klonalno preureditev gena IGH, in sicer v 1 vzorcu po naši metodi in v 2 vzorcih po novi metodi. V vseh primerih je šlo za periferni T-celični limfom. Po podatkih iz literature je možna detekcija preureditve genov za imunoglobuline v 5 do 10 % limfomov tipa T. Taki vzorci kažejo koeksistenco manjše klonalne B-celične populacije (pojavlja se šibek monoklonski produkt PCR). Interpretacija takih rezultatov zahteva posebno

pozornost in previdnost ter postavitve končne diagnoze v okviru sodelovanja med citopatologi in molekularnimi biologi. Poleg navedenega pa je predvsem za nezrele limfoidne linije značilna navzkrižna genska preureditev IGH/TCRG. Pri limfomih tipa T smo dokazali klonalno preureditev gena za gama verigo TCR (TCRG) pri 10 od 14 testiranih vzorcev z našo metodo in v 12 od 14 vzorcev s kompletom IdentiClone TCRG Gene Clonality Assay. Občutljivost »hišne« metode je bila 71,4-odstotna, občutljivost metode IdentiClone pa 85,7-odstotna (slika 5). Stopnja detekcije klonalnosti se je tako pri limfomih T povečala za 14,3 %. Občutljivost nove metode je primerljiva z rezultati študije BIOMED 2, kjer so testirali 200 vzorcev limfomov tipa T in pri določanju klonalne preureditve TCRG dosegli 89-odstotno občutljivost. Specifičnost obeh metod je bila pri analizi vzorcev, opredeljenih kot B-celični limfom, 100-odstotna. Po podatkih iz literature se klonalne preureditve gena TCRG pojavljajo v 10 do 20 % limfomov tipa B. V skupini reaktivnih vzorcev je bila specifičnost metode IdentiClone 100-odstotna, specifičnost »hišne« metode v tej skupini vzorcev pa je bila 85,7-odstotna (2 lažno pozitivna rezultata). Lažno pozitivni rezultati so lahko v nekaterih primerih posledica težkega razlikovanja med produkti PCR, ki izhajajo iz monoklonske oz. poliklonske genske preureditve.



Slika 5. Primerjava rezultatov določanja klonalnosti limfoidnih proliferacij, pridobljenih s »hišno« metodo in z uporabo nove metode IdentiClone. Preureditve genov za IGH in TCRG smo določali na 41 vzorcih aspiracijskih biopsij z že opredeljeno histopatološko diagnozo. Uporabili smo svojo »hišno« metodo za določanje klonalnosti in jo primerjali z metodo IdentiClone, ki vsebuje širši nabor oligonukleotidnih začetnikov. Na grafu je prikazan odstotek monoklonskih vzorcev pri posameznem tipu limfomov. Pri limfomih tipa B smo z uporabo nove metode izboljšali stopnjo detekcije za 23,1 %, pri limfomih tipa T pa za 14,3 %.

Z molekularnimi metodami za določanje klonalnosti, ki temeljijo na verižni reakciji s polimerazo (PCR), lahko v posameznih primerih prihaja do lažno negativnih rezultatov. To se večinoma zgodi zaradi pomanjkanja zadostnega števila oligonukleotidnih začetnikov, ki bi pokrili raznolike genske segmente V-D-J ali zaradi neuspešnega prileganja začetnikov na

zaporedja, ki so spremenjena zaradi somatskih hipermutacij v genih Ig. Za zmanjšanje števila lažno negativnih rezultatov in za povečanje občutljivosti določanja klonalnosti z molekularnimi metodami je pri limfomih tipa B priporočljivo še določanje preureditev v genih za *kapa* in *lambda* lahke verige imunoglobulinov (IGK in IGL) ter določanje klonalne preureditve v genu za *beta* verigo T-celičnega receptorja (TCRB) pri limfomih tipa T. Z dodatno analizo omenjenih preureditev genov so v študiji BIOMED 2 dosegli 99-odstotno občutljivost detekcije klonalne preureditve genov pri limfomih B in 94-odstotno občutljivost pri limfomih T. Posebej so izpostavili anaplastični velikocelični T-limfom, kjer pa detekcija klonalnosti v 30 % ni mogoča niti v genih TCRG niti v genih TCRB. Na podlagi omenjene študije so postavili tudi smernice za določanje klonalnosti limfoidnih proliferacij na molekularni ravni.

Na našem oddelku smo torej z uvedbo nove (razširjene) metode IdentiClone izboljšali diagnostiko limfomov na molekularni ravni. V prihodnosti načrtujemo še uvedbo metod za določanje preureditve genov za TCRB, IGK in IGL, s čimer bomo še bolj povečali občutljivost določanja klonalnosti limfoidnih proliferacij in izboljšali molekularno diagnostiko limfomov.

Viri

1. Van Krieken JHJM, Langerak AW, Macintyre EA et al. Improved reability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: - Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 2007; 21: 201–206.
2. Koković I, Novaković S. Molekularna diagnostika limfomov. *Onkologija* 2008; 2: 119–121.
3. Slack DN, McCarthy KP, Wiedemann LM, Sloane JP. Evaluation of sensitivity, specificity and reproducibility of an optimized method for detecting clonal rearrangements of immunoglobulin and T-cell receptor genes in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *Diagn Mol Pathol* 1993; 2(4): 223–232.
4. Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, Neoh S, Grist S, Morley AA. Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by polymerase chain reaction. *Blood* 1991; 78(1): 192–195.
5. IdentiClone TCRG Gene Clonality Assay, Technical support, InVivoScribe Technologies, San Diego, USA (www.invivoscribe.com).
6. IdentiClone IGH Gene Clonality Assay, Technical support, InVivoScribe Technologies, San Diego, USA (www.invivoscribe.com).

