

## Molekularna diagnostika limfomov

Ira Koković in Srdjan Novaković

### Povzetek

Določanje klonalnosti limfoidnih proliferacij in dokazovanje specifičnih genetskih sprememb ima pomembno vlogo v diagnostiki limfoidnih neoplazem, saj omogoča ločevanje med neoplastičnimi lezijami in reaktivnimi procesi. Klonalno populacijo limfoidnih celic lahko dokažemo s pomnoženjem preurejenih genov, ki kodirajo polipeptidne verige receptorjev na površini celic B in T. Z metodo PCR lahko dokažemo tudi kromosomske translokacije, značilne za posamezne vrste limfomov. Uvedli smo tehnike za določanje klonalnosti limfoidnih proliferacij in dokazovanje kromosomskih translokacij t(11;14) pri pllašnoceličnem ter t(14;18) pri folikularnem limfomu, ki temeljijo na polimerazni verižni reakciji. Tehnike so preproste, hitre in uporabne za molekularnobiološko preiskavo široke palete vzorcev. Specifičnost uvedenih metod je primerljiva s podatki v literaturi. Molekularnobiološke preiskave uporabljamo v diagnostiki limfomov od leta 1997.

### Uvod

Določanje klonalnosti limfoidnih proliferacij in dokazovanje specifičnih genetskih sprememb ima v diagnostiki limfoidnih neoplazem pomembno vlogo, saj omogoča ločevanje med neoplastičnimi lezijami in reaktivnimi procesi. Monoklonalnost je pomembno diagnostično merilo za neoplazijo, čeprav ni nujno sinonim za malignost, poliklonalnost pa je značilna za reaktivne limfoidne proliferacije. Monoklonska populacija celic v vzorcu torej govori v prid diagnoze malignega limfoma. Klonalno populacijo limfoidnih celic lahko dokažemo s pomnoženjem preurejenih genov, ki kodirajo težko verigo imunoglobulina (IgH) in gama verigo T-celičnega receptorja (TcR $\gamma$ ). Dokazovanje genetskih sprememb, zlasti kromosomskih translokacij, specifičnih za posamezne vrste limfomov, pomembno prispeva k diagnostiki in nadaljnjemu spremljanju bolnikov z limfomom. Z metodo PCR lahko dokažemo kromosomsko translokacijo t(11;14)(q13;q32) pri pllašnoceličnem limfomu, t(14;18)(q32;q21) pri folikularnem limfomu in nekatere druge.

V letih 1997–1999 smo na Onkološkem inštitutu uvedli tehnike za določanje klonalnosti limfoidnih proliferacij in dokazovanje specifičnih kromosomskih translokacij t(11;14) in t(14;18), ki temeljijo na polimerazni verižni reakciji. V letih 2006–2007 smo izboljšali metodologijo za dokazovanje kromosomske translokacije t(14;18) ter uvedli tehniko za analizo pomnoženih produktov na bioanalizatorju (Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies, Waldbronn, Nemčija). Tehnike so preproste, hitre in uporabne za molekularnobiološko preiskavo različnih vzorcev: aspiracijskih biopsij s tanko iglo, tkivnih vzorcev, fiksiranih v formalinu in vklopljenih v parafin, krvi in aspiratov kostnega mozga.

### Kako določamo klonalnost in dokazujemo kromosomske translokacije?

Najprej izoliramo genomsko DNA. Nato z ustreznimi oligonukleotidnimi začetniki in encimom polimeraze Taq pomnožimo želena območja DNA, pomnožene produkte pa analiziramo z gelsko elektroforezo. Glede na obrazec potovanja pomnoženih fragmentov DNA določimo klonalnost limfoidne proliferacije, glede na prisotnost oziroma odsotnost ustreznega pomnoženega produkta pa ugotavljamo prisotnost določene kromosomske translokacije. Celoten postopek traja 2–3 dni, v primeru nejasnih rezultatov pa preiskavo ponovimo.

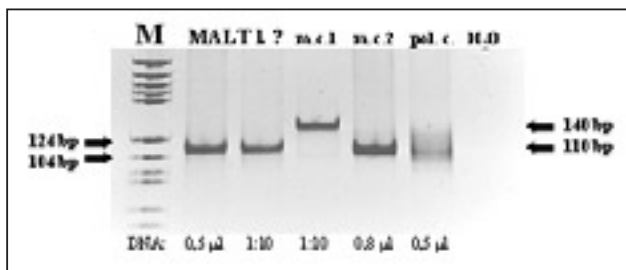
**Za izolacijo DNA** iz vzorcev tankoigelnih biopsij, parafinskih rezin ter do 300  $\mu$ l krvi in aspiratov kostnega mozga uporabljamo komplet High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Applied Science, Penzberg, Nemčija). Parafinske rezine najprej deparafiniziramo v ksilolu, prečistimo v absolutnem etanolu in posušimo. Nato po proizvajalčevih navodilih nadaljujemo postopek izolacije DNA. V primeru krvi in aspiratov kostnega mozga navadno zadostuje 300  $\mu$ l vzorca, iz katerega še isti dan izoliramo DNA z zgoraj opisanim kompletom, preostanek vzorca pa shranimo pri  $-80$  °C.

**Klonalnost limfoidne proliferacije določamo** tako, da pri limfocitih B pomnožimo preurejeno območje (V–D–J) gena za težko verigo imunoglobulina (IgH), pri limfocitih T pa preurejeno območje (V–J) gena za gama verigo T-celičnega receptorja (TcR $\gamma$ ). Oligonukleotidni začetniki so izbrani tako, da »spoznajo« t. i. homologna območja variabilnih (V) in spajalnih (angl. joining, J) genskih segmentov oziroma območja, ki so si v nukleotidnem zaporedju zelo podobna. V primeru gena za IgH zadostujeta dva t. i. konsenzusna začetnika, eden, ki spozna približno 85 % znanih variabilnih zaporedij (V<sub>H</sub>), in eden, ki spozna vseh šest zaporedij J. Začetnik V<sub>H</sub> je specifičen za tretje okvirno območje (angl. Framework Region III, FRIII), to je območje največje homologije med posameznimi genskimi segmenti V<sub>H</sub> (metoda IgH-FRIII PCR). V nasprotju z genom za IgH pa so variabilna zaporedja gena za TcR $\gamma$  zelo raznolika, zato uporabljamo več oligonukleotidnih začetnikov (V $\gamma$ 2–V $\gamma$ 12 in J $\gamma$ 1–3) v dveh t. i. reakcijah »multiplex« TcR $\gamma$ -PCR.

**Kromosomsko translokacijo t(14;18)(q32;q21) pri folikularnem limfomu (FL)** dokažemo s pomnoženjem preurejenega zaporedja BCL-2/JH, ki nastane s povezovanjem gena BCL-2 (kromosom 18) in gena za IgH (kromosom 14). Prelomi v genu BCL-2 nastanejo v enem izmed treh značilnih območij, MBR (angl. major breakpoint region), mcr (angl. minor cluster region) in t. i. far3<sup>1</sup>-MBR (zaporedje v 3<sup>1</sup>-smerni od MBR proti mcr). Približno 50–60 % prelomov je v območju MBR, 10–20 % v območju mcr, okrog 8 % pa v območju far3<sup>1</sup>-MBR. Za dokazovanje kromosomske translokacije t(14;18) uporabljamo klasično kvalitativno in občutljivejšo kvantitativno metodo. Oligonukleotidni začetniki in **klasični**

metodi so izbrani tako, da pokrivajo prelome v vseh treh območjih (MBR, mcr in far3'-MBR), pomnožene produkte pa analiziramo z gelsko elektroforezo. **Kvantitativna** metoda omogoča relativno kvantifikacijo produktov, nastalih v translokaciji, pri čemer spremljamo naraščanje količine produkta PCR v realnem času. Uporabljamo napravo LightCycler® in komplet LightCycler®-t(14;18) Quantification Kit (mbr) (Roche Applied Science, Penzberg, Nemčija), ki omogoča odkrivanje translokacije t(14;18) s prelomom v območju MBR. Metoda temelji na pomnoževanju 200 bp dolgega odseka MBR/JH z uporabo specifičnih oligonukleotidnih začetnikov in odkrivanjem pomnoženega produkta v realnem času s pomočjo para fluorescenčno označenih sond (Roche Applied Science). Podatke analiziramo s kombinacijo programskih paketov LightCycler® software version 3.5 in LightCycler® Relative Quantification software. Občutljivost metode je ena celica, ki nosi t(14;18) na 50.000–100.000 mononuklearnih celic periferne krvi.

**Kromosomsko translokacijo t(11;14)(q13;q32) pri plaščnodeličnem limfomu** dokažemo s pomnoževanjem preurejenega zaporedja JH/BCL-1, ki nastane s povezovanjem gena za IgH (kromosom 14) in gena BCL-1 (kromosom 11). Približno polovica prelomov v genu BCL-1 je v območju MTC (angl. minor translocation cluster), drugi pa so razsuti po celotnem genu. Z metodo PCR lahko dokažemo le translokacijo t(11;14) s prelomom v območju MTC, za katero lahko izberemo ustrezne oligonukleotidne začetnike. Uporabljamo dvostopenjsko reakcijo (t. i. semi-nested PCR) in dva oligonukleotidna začetnika, specifična za območje MTC (»zunanji« v prvi in »notranji« v drugi reakciji).

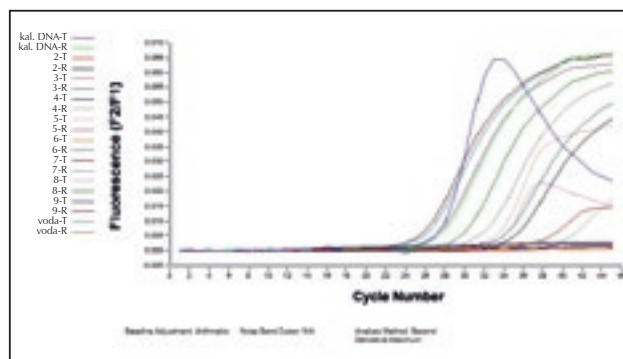


**Slika 1.** Določanje klonalnosti limfocitov B z metodo IgH-FR11 PCR. M – označevalec dolžine fragmentov DNA (pBR322/HaeIII); MALT I. ? – diagnostični vzorec: limfom tipa MALT vs. reaktivna limfoidna proliferacija (0,5 µl DNA in DNA, razredčena v razmerju 1 : 10); m. c. 1 in m. c. 2 – dve monoklonski kontroli; pol. c. – poliklonska kontrola; H2O – kontrola kontaminacije (reakcija brez DNA). Pomnoženi produkt velikosti ~ 110 bp kaže, da je v vzorcu monoklonska populacija limfocitov B. Pri poliklonski kontroli vidimo več šibkih, difuznih fragmentov, ki jih ne moremo ločiti.

Primer določanja klonalnosti limfocitov B je prikazan na sliki 1, primer pomnožitvene krivulje dobljene s kompletom LightCycler®-t(14;18) Quantification Kit (mbr) pa na sliki 2.

### Dosedanji rezultati

V letih 1997–2005 smo na Oddelku za patologijo OI preiskali 166 vzorcev različnih limfoproliferativnih bolezni, ki jih nismo mogli diagnosticirati s klasičnimi histopatološkimi preiskavami. Klonalnost smo določili pri 159 od 165 (96,4 %) analiziranih vzorcev. Občutljivost metode IgH-FR11 PCR je bila 60-odstotna, občutljivost metode TcRγ-PCR je bila 76-odstotna,



**Slika 2.** Pomnožitvena krivulja, dobljena s kompletom LightCycler® t(14;18) Quantification kit (mbr), po proizvajalčevih navodilih. Analizirali smo približno 50 ng DNA vsakega vzorca in kalibratorja (celična linija DOHH2). Vzorci 2, 5, 8 in 9 so pozitivni za t(14;18) s prelomom v območju MBR, vzorci 3, 4, 6 in 7 pa so negativni. Relativno izražanje fragmenta t(14;18) v posameznem vzorcu smo izračunali, kot je opisano v prispevku. Normalizirana razmerja T : R (število kopij tarčnega proti referenčnemu genu) pozitivnih vzorcev (2, 5, 8, in 9) so 0,03, 0,01, 0,06 in < 0,01. Normalizirano razmerje kalibratorja T : R ima po definiciji vrednost 1,0.

skupna občutljivost obeh metod za določanje klonalnosti limfoidnih proliferacij pa je bila 70-odstotna. Kromosomsko translokacijo t(14;18)(q32;q21) pri FL določamo od leta 1998. V letih 1998–2005 smo preiskali 26 od 144 primerov (18,1 %) z metodo MBR-PCR. Občutljivost metode je bila 43-odstotna.

Kromosomsko translokacijo t(11; 14)(q13; q32), značilno za plaščnodelični limfom, določamo z metodo MTC-PCR od oktobra 1999. V testni seriji 16 izbranih primerov plaščnodeličnega limfoma smo t(11; 14) dokazali pri štirih primerih (25 %).

Od leta 2005 poteka molekularna diagnostika limfomov na Oddelku za molekularno diagnostiko OI. Od 2006 do konca aprila 2008 smo preiskali 130 vzorcev (117 bolnikov). Z Oddelka za citopatologijo je bilo v preiskavo poslanih 69 vzorcev tankoigelnih biopsij, z Oddelka za patologijo 37 vzorcev formalinsko fiksiranih in v parafin vklopljenih biopsij in z Oddelka za maligne limfome 24 vzorcev krvi in aspiratov kostnega mozga. Skupaj smo opravili 251 preiskav, od tega 115 preiskav z metodo IgH-FR11 PCR, 95 preiskav z metodo TcRγ-PCR, 8 preiskav za dokazovanje t(11; 14) in 33 preiskav za dokazovanje t(14; 18).

V letih 2006–2007 smo izboljšali metodologijo za dokazovanje t(14; 18) z uvajanjem širše palete oligonukleotidnih začetnikov, s katerimi lahko odkrivamo prelome v genu BCL-2 v treh značilnih območjih, MBR, far3'-MBR in mcr. Poleg tega smo uvedli občutljivejšo kvantitativno metodo (LightCycler), s katero spremljamo naraščanje količine pomnoženega produkta v realnem času. Občutljivost in specifičnost obeh, klasične kvalitativne in kvantitativne metode, smo ovrednotili v retrospektivni študiji na večji seriji arhiviranih tumorskih vzorcev (prispevek je v pripravi). Kromosomsko translokacijo t(14; 18) smo dokazali pri 30 od 57 parafinskih vzorcev bezgavk (52,6 %), kar je primerljivo s podatki v literaturi.

### Razprava in sklepi

V molekularni diagnostiki limfoproliferativnih bolezni smo dosegli največ na področju folikularnih limfomov. Poleg

klasične metode za dokazovanje t(14;18) z občutljivostjo ene pozitivne celice na 100 celic vzorca smo uvedli tudi občutljivejšo kvantitativno metodo, z občutljivostjo ene pozitivne celice na 50.000–100.000 mononuklearnih celic periferne krvi. S kombinacijo obeh metod lahko dokažemo translokacijo t(14;18) pri več kot polovici primerov folikularnega limfoma.

Občutljivost in specifičnost metod za dokazovanje klonalnosti limfocitov B in T, ki jih uporabljamo, je primerljiva s podatki v literaturi. V posameznih primerih ne moremo določiti klonalnosti s standardnimi metodami IgH-FRIII in TcR $\gamma$ -PCR. V primeru metode IgH-FRIII PCR je za to odgovornih več mehanizmov, predvsem pa s konsenzusnimi oligonukleotidnimi začetniki, ki spoznajo območja FRIII variabilnih genskih segmentov (V<sub>H</sub>), ne moremo spoznati vseh družin V1 pt. K negativnemu rezultatu prispevajo tudi napačne in nepopolne preureditve ali mutacije v genu za IgH in (zlasti pri FL) prisotnost številnih poliklonalnih celic B, ki zakrijejo monoklonalno populacijo. Precejšnje število T-celičnih limfomov ima klonalne preureditve v genu za beta verigo T-celičnega receptorja (TcR $\gamma$ ). Te preureditve lahko dokažemo z metodo TcR $\gamma$ -PCR, ki pa je nepraktična v vsakdanji diagnostiki, ker vključuje večje število oligonukleotidnih začetnikov v več reakcijah.

Podobno kot v primeru FL v prihodnje načrtujemo izboljšave v metodologiji za določanje klonalnosti limfoidnih proliferacij z uvajanjem dopolnilnih klasičnih metod (določanje preureditev v genih za lahke verige imunoglobulinov, uporaba večjega števila oligonukleotidnih začetnikov v komercialno dostopnih kompletih) in novih kvantitativnih metod (LightCycler).

## Viri

1. 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.
2. Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, Neoh S, Crist S, Morley AA. Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction. *Blood* 1991; 78(1): 192–195.
3. Ott MM, Helbing A, Ott G, Bartek J, Fischer L, Dürr, Kreipe H, Müller-Hermelink HK. Bcl-1 rearrangement and cyclin D1 protein expression in mantle cell lymphoma. *J Pathol* 1996; 179: 238–242.
4. Todorović I, Golouh R, Jančar J, Komel R. Določanje klonskosti limfoidnih proliferacij s pomočjo reakcije verižne polimerizacije. *Zdrav Vestn* 1998; 67(2): 83–87.
5. Koković I, Golouh R, Jančar J, Zidar A, Komel R. Importance of molecular analysis in diagnosis of lymphomas = Pomen molekularno bioloških preiskav v diagnostiki limfomov. V: Luzar B (ur.), Poljak M (ur.), Glavač D (ur.), Balažic J (ur.). Molekularna diagnostika v medicini: zbornik predavanj: proceedings. V Ljubljani: Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, 2005, str. 151–158.
6. Hoeve MA, Krol ADG, Philippo K, Derksen PWB, Veenendaal RA, Schuurung E, Kluin PM, van Krieken JHJM. Limitations of clonality analysis of B cell proliferations using CDR3 polymerase chain reaction. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2000; 53: 194–200.

