

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2010

Bc. Aleš Efenberk

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Analýza molekulárních markerů lymfoproliferativních
onemocnění**

Diplomová práce

Bc. Aleš Efenberk

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2010

Vedoucí práce: doc. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením doc. RNDr. Jany Šmardové, CSc. a uvedl jsem veškerou použitou literaturu.

V Olomouci dne 2. 8. 2010

podpis:

Poděkování

Rád bych zde poděkoval své vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Janě Šmardové, CSc. za její pomoc při práci v laboratoři, odborné vedení a čas, který mi věnovala při konzultacích a psaní diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Janě Slováčkové za pomoc, připomínky a konzultace při provádění experimentální části diplomové práce.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat všem pracovníkům Laboratoře molekulární patologie Ústavu patologie FN Brno za pomoc při práci v laboratoři.

SOUHRN

V oblasti klinické praxe se v současné době objevují nové přístupy a metody, které se zabývají analýzou zbytnělých lymfatických tkání či analýzou lymfocytárních populací v periferní krvi. Tyto techniky jsou založené na principu polymerázové řetězové reakce využívající různých primerů. Primery jsou nejčastěji připravené tak, že rozpoznávají určité úseky na DNA, kódující řetězce B-lymfocytárního či T-lymfocytárního buněčného receptoru. Díky tomu jsou schopné rozpoznat monoklonální zmnožení lymfocytárních populací, které je ve většině případů důsledkem rakovinného zmnožení. Tyto výsledky mohou poté pomoci lékařům při určení správné diagnózy.

Předložená diplomová práce se zabývá analýzou těžkých řetezců B-lymfocytárních buněčných receptorů za pomoci PCR. Primery používané při této metodě rozpoznávají sekvenci na DNA kódující variabilní část těžkého řetězce.

Po počáteční optimalizaci bylo analyzováno 32 kontrolních vzorků, u kterých byla předem známa diagnóza. Deset z nich bylo určeno jako pozitivní na nádorové lymfoproliferativní onemocnění a zbylých 22 bylo určeno od patologů jako lymfoproliferace nenádorového charakteru. Této diagnóze odpovídal výsledek analýzy v 28 případech. Pouze ve 4 případech byly výsledky analýzy odlišné od očekávaných výsledků. Na základě toho byla stanovena detekční míra metody na 87 %.

SUMMARY

In the area of clinical investigation at present, there are new approaches and methods dealing with an analysis of hypertrophic lymphatic tissues or analysis of lymphocyte populations in peripheral blood. These techniques are based on a polymerase chain reaction using different primers. Primers are usually prepared to recognize specific segments of DNA encoding B- or T-cell receptor chains. For this reason they are able to identify monoclonal lymphocyte populations, which are in most cases caused by cancer multiplication. These results then can help pathologists in determining the correct diagnosis.

This diploma thesis deals with the analysis of B-cell receptor heavy chain using PCR. Primers which are used in this method are recognizing a sequence of DNA encoding the variable part of heavy chain.

After the initial optimization, 32 control samples, which had been previously unambiguously diagnosed, were analyzed. Ten of them were identified as positive for malignant lymphoproliferative disease, and the remaining 22 were determined by pathologists as reactive tissue without any malignant proliferation. This diagnosis corresponded with the results of B-cell clonality analysis in 28 cases. Only in 4 cases, the results of our analysis were different from the expected results. Based on these data, the detection rate of this method was determined as 87 %.

OBSAH

1 Úvod	8
2 Literární přehled	9
2.1 Lymfoproliferativní onemocnění	9
2.1.1 Vznik lymfoproliferativních onemocnění	9
2.1.2 Klasifikace lymfoproliferativních onemocnění	10
2.2 Lymfocyty	13
2.2.1 B-lymfocyty	13
2.2.2 T-lymfocyty	14
2.2.3 Antigenní receptory lymfocytů	15
2.2.3.1 B-lymfocytární receptor BcR	15
2.2.3.1.1 Struktura BcR	15
2.2.3.1.2 Diverzita BcR	17
2.2.3.2 T-lymfocytární receptor TcR	20
2.2.3.2.1 Struktura TcR	20
2.2.3.2.2 Diverzita TcR	22
2.3 Metody sloužící k analýze lymfoidních tkání	23
2.3.1 Imunohistochemie	24
2.3.2 Molekulárně-biologické metody	25
2.3.2.1 Southernův přenos	27
2.3.2.2 Polymerázová řetězová reakce - PCR	29
2.3.2.2.1 Biomed-2	33
3 Cíle práce	37
4 Materiál a metodika	38
4.1 Metody	38
4.1.1 Izolace genomické DNA z formol-parafinových bločků	38
4.1.2 Izolace genomické DNA z lymfocytů periferní krve	39
4.1.3 Měření koncentrace gDNA ve vzorku	40
4.1.4 Příprava deionizované vody ošetřené DEPC (DEPC H ₂ O)	41
4.1.5 Reakce PCR	41

4.1.5.1	Systém PCR využívající pro detekci IGH genu dvou klasických a dvou poloodstupňovaných reakcí PCR	42
4.1.5.2	Systém PCR využívající pro detekci kompletních VH-JH přeskupení IGH genu tří mnohonásobných reakcí PCR	45
4.1.6	Heteroduplexní analýza	48
4.1.7	Gelová elektroforéza	48
4.1.7.1	Agarózová gelová elektroforéza	48
4.1.7.2	Gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	49
4.2	Použité chemikálie a roztoky	52
4.3	Použité vybavení laboratoře	53
5	Výsledky	54
5.1	Zavedení a optimalizace metody	54
5.1.1	Izolace gDNA	54
5.1.2	Otestování funkčnosti PCR systému dle Svachova <i>et Tichy</i> (2008)	56
5.1.3	Optimalizace množství chloridu hořečnatého (MgCl ₂) ve směsi PCR	57
5.1.4	Analýza IGH u vzorků pomocí PCR systému dle Svachova <i>et Tichy</i> (2008)	59
5.1.5	Stanovení optimálního množství DNA dodané do PCR v systému detekce VH-JH přeskupení dle van Dongen <i>et al.</i> (2003)	62
5.1.6	Určení závislosti mnohonásobné PCR na množství DNA hydratačního pufru v reakci	64
5.1.7	Vyhodnocení zaváděcí fáze	66
5.2	Ověřování spolehlivosti metody na kontrolních vzorcích	68
5.2.1	Provedení analýz kontrolních vzorků	68
5.2.2	Provedení analýzy u lymfocytů izolovaných z periferní krve	75
5.2.3	Vyhodnocení spolehlivosti metody	76
5.3	Zavedení metody detekce VH-JH přeskupení pomocí PCR do klinické praxe	77
6	Diskuse	78
7	Závěr	83
8	Literatura	84
9	Seznam použitých zkratk	93

1 ÚVOD

Pro většinu typů nádorového bujení je hlavním znakem monoklonální zmnožení nádorových buněk. Toto je způsobeno tím, že některá buňka dosáhne takového poškození své genetické informace, že v důsledku toho ztratí kontrolu nad svým buněčným cyklem. Tato buňka se poté začne nekontrolovatelně množit, a dá tak vznik monoklonální populaci buněk se stejnou genetickou informací a se schopností růstu bez vlivu regulačních mechanismů buňky.

Výjimkou není ani lymfoidní tkáň. Za normálního zdravotního stavu probíhá proliferace buněk lymfatického systému kontrolovaně a normální rychlostí. V případě vzniku nějakého problému rychlost proliferace buněk lymfoidní tkáně vzroste a vyskytne se zbytnělá tkáň. Nejčastěji se takto děje v případě vzniku nějakého zánětlivého ložiska. Úkolem lékařů je poté určit, zda se jedná o proliferaci buněk právě z důvodu zánětu, či zda se jedná o proliferaci buněk nádorového charakteru.

V běžné klinické praxi se vyšetření takovýchto tkání provádí za použití imunohistologických technik. Za použití těchto technik ale není možné ve všech případech jednoznačně určit výsledek, a tudíž nelze ani určit přesnou diagnózu. Občas se vyskytují sporné případy, kdy se nedaří určit, zda jsou buňky, v tomto případě lymfocyty, zmnoženy v důsledku rakovinného bujení, či se jedná o proliferaci způsobenou lokálním zánětem.

V těchto případech je možné pro přesnější určení diagnózy využít informaci, zda se u vyšetřované tkáně jedná o monoklonalitu či tkáň proliferující polyklonálně. Této informace je možné dosáhnout použitím metody analyzující klonalitu u B-lymfocytů pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR, polymerase chain reaction) úseků variabilní části těžkých řetězců B-lymfocytárních buněčných receptorů.

Ale ani tato metoda není 100 % spolehlivá. Monoklonalita nemusí vždy znamenat malignitu a naopak malignita se nemusí vždy projevit jako monoklonálně proliferující buňky.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Lymfoproliferativní onemocnění

Lymfoproliferace je proces množení výkonných buněk lymfoidních tkání, lymfocytů. Za běžných fyziologických podmínek je tento proces u zdravého jedince plně regulovaný. V případě kontaktu lymfocytů jedince s cizorodým antigenem dojde ke zvýšení rychlosti proliferace u buněk k danému antigenu kompatibilních, ale stále je tento proces plně pod kontrolou regulačních mechanismů organismu. V tomto procesu však může dojít k poruše, a může tak vzniknout lymfoproliferativní onemocnění. Při tomto onemocnění dochází k abnormální proliferaci lymfocytů. Ty se poté mohou uchycovat v lymfatických uzlinách, nebo mohou být následně vyplavovány do krevního řečiště (Krejsek *et* Kopecký, 2004; Swerdlow *et al.*, 2008).

2.1.1 Vznik lymfoproliferativních onemocnění

Lymfoproliferativní onemocnění může vzniknout dvěma způsoby. V prvním případě se může jednat o reaktivní změny způsobené zánětem, v jehož důsledku může dojít ke zvýšené proliferaci buněk (Feit *et al.*, 2007), které bývají mnohokrát spojené s imunodeficiencemi. Tento druh lymfoproliferativního onemocnění nemá rakovinný charakter tkáně. Nejčastěji se jedná o polyklonálně proliferující populace buněk mající benigní charakter (Swerdlow *et al.*, 2008).

Druhým možným způsobem vzniku lymfoproliferativního onemocnění je neregulovatelná proliferace lymfocytů jako důsledek poškození deoxyribonukleové kyseliny (DNA, deoxyribonucleic acid) lymfocytární buňky. Stejně jako u většiny nádorových onemocnění ztratila tato buňka díky poškození DNA kontrolu nad svým buněčným cyklem, a tím i kontrolu nad svým dělením. Takto vzniklé buněčné populace vykazují maligní charakter a většinou mají tendence k destruktivnímu růstu a tvorbě ložiskové nekrotizace. Ve většině případů vykazují tyto buňky monoklonální charakter proliferace (Swerdlow *et al.*, 2008), což je způsobeno tím, že všechny buňky dané malignity vznikly z jedné původní buňky bez kontroly proliferace (van Dongen *et al.*, 2003). Malignita může vzniknout jak z B-lymfocytární, tak i T-lymfocytární vývojové řady a v jakémkoliv vývojovém stupni

lymfocytů. Z tohoto důvodu existuje velice široká řada lymfocytárních onemocnění (Medeiros *et Carr*, 1999).

2.1.2 Klasifikace lymfoproliferativních onemocnění

Jak již bylo uvedeno, lymfoproliferativní onemocnění lze rozdělit na dvě základní skupiny na základě charakteru proliferace, a to lymfoproliferace nenádorového charakteru a nádorová, maligní lymfoproliferace. Nádorovou lymfoproliferaci můžeme dále obecně rozdělit na leukémie a lymfomy (Feit *et al.*, 2007).

Leukémie lze stručně charakterizovat jako onemocnění, při kterých dochází k poškození kostní dřeně a následnému vyplavování leukemických buněk do krve. Naproti tomu lymfomy jsou onemocnění, kdy poškozené lymfocyty vytvářejí léze a tumory. V dnešní době je však toto rozdělení velmi zastaralé a nepřesné, protože jsou popsány případy, kdy v případě leukémií dochází k usazování leukemických buněk a tvorbě lézí, nebo naopak u lymfomů dochází k uvolňování jednotlivých buněk do krve (Feit *et al.*, 2007).

Celková klasifikace nádorových lymfoproliferativních onemocnění je však značně složitá. Historické klasifikace rozdělovaly onemocnění na základě nějakého vybraného kritéria. Následně s rozvojem nových vyšetřujících technik se pak vždy ukázalo, že předchozí rozdělení není úplně správné a bylo třeba klasifikovat lymfoproliferativní onemocnění podle nových kritérií. Mezi prvními všeobecně uznávanými klasifikacemi byla Rappaportova (Rosenberg, 1994). Ta byla následně nahrazena Kielskou klasifikací, rozdělující lymfomy na základě histomorfologie (Küppers *et al.*, 1997). Ve stejné době byla postulována i Lukesova-Collinsova klasifikace. Obě tyto klasifikace se od sebe lišily terminologií, ale obě už rozdělovaly lymfoproliferativní onemocnění na základě, zda vznikly z B-lymfocytů nebo T-lymfocytů. Obě byly používány v místě svého vzniku, Kielská v Evropě a Lukesova-Collinsova v Americe (Harris *et al.*, 1994; Papajík *et al.*, 2005; Rosenberg, 1994). V roce 1982 byla postulována „pracovní klasifikace“ (Working formulation for international use). Její příprava byla po 15 let financována National Cancer Institute a slibovala lepší porozumění. Tato klasifikace navazovala na Rappaportovu terminologii a byla dobře přijata v Severní Americe. V Evropě se však příliš neujala (Rosenberg, 1994).

V roce 1994 publikovala skupina 19 hematopatologů tvořících skupinu s názvem International Lymphoma Study Group klasifikaci lymfoidních nádorů s názvem A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms (REAL). Tato klasifikace

sjednotila klasifikování lymfoidních nádorů na celém světě a přinesla nový způsob rozdělení těchto onemocnění. Při klasifikaci se vychází z existující nomenklatury a zařazování probíhá na základě morfologických kritérií, ke kterým ovšem ještě přidává klinický pohled. Například dva lymfomy mohou být morfologicky shodné, ale jejich klinické chování je rozdílné (Harris *et al.*, 1994).

Na tuto klasifikaci později navázal společný projekt Evropské asociace pro hematopatologii (European Association for haematopathology) a americké Společnosti pro hematopatologii (Society for Haematopathology) vedený pod záštitou Světové zdravotnické organizace (WHO, World Health Organization). Tento projekt odstartoval roku 1995 a spolupracovalo na něm přes 130 patologů z celého světa. Výsledkem byla The World Health Organization Classification of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Tato klasifikace je dnes celosvětově používaná a stále se upravuje a rozvíjí podle vzniku nových metod a přístupů v analýze nádorů lymfoidních tkání. V poslední době se v této oblasti hodně rozvíjí imunotypizace nádorů a analýza klonality buněk tvořících tyto tkáně. V současnosti se při klasifikaci hledí na morfologické, cytochemické a imunofenotypické znaky buněk, původ buněk, stupeň vyzrání buněk a celkovou strukturu a aktivitu nádorové tkáně. Nádorová lymfoproliferativní onemocnění se dnes rozdělují do 12 hlavních skupin (tab. I) (Swerdlow *et al.*, 2008). Celosvětově se však v 90 - 95% případů malignit jedná o B-lymfoidní malignitu (van Dongen *et al.*, 2003), přičemž nejčastější lymfoidní malignitou je difuzní velkobuněčný B-lymfom spadající do skupiny neoplazmat ze zralých B-lymfocytů (Yamauchi *et al.*, 2008).

Tab. I: Základní skupiny a podskupiny maligních lymfoproliferativních onemocnění dle klasifikace WHO (data převzata z Swerdlow *et al.*, 2008)

1.	Myeloproliferativní onemocnění
2.	Myeloidní a lymfoidní neoplazmata s eozinofilií a abnormalitami v PDGFRA ¹⁾ , PDGFRB ²⁾ nebo FGFR1 ³⁾
3.	Myelodysplasticko–myeloproliferativní onemocnění
4.	Myelodysplastický syndrom
5.	Akutní myeloidní leukemie (AML) a související neoplazmata
	AML s rekurentními genetickými abnormalitami
	AML s myelodysplazií asociovanými změnami
	AML asociovaná s terapií
	Dále nespecifikovaná AML
	Myeloidní sarkom
	Myeloidní proliferace asociovaná s Downovým syndromem
	Neoplazmata blastických plasmacytoidních dendritických buněk
6.	Akutní leukemie s podvojnou diferenciací
7.	Prekurzorová lymfoidní neoplazmata
	Neoplazmata B lymfoblastická
	Neoplazmata T lymfoblastická
8.	Neoplazmata zralých B-lymfocytů
9.	Neoplazmata zralých T-lymfocytů a NK (natural killer) buněk
10.	Hodgkinův lymfom
11.	Neoplazmata histiocytů a dendritických buněk
12.	Posttransplantační lymfoproliferativní onemocnění

1) PDGFRA - receptor destičkových růstových faktorů alfa (platelet-derived growth factor receptor alpha)

2) PDGFRB - receptor destičkových růstových faktorů beta (platelet-derived growth factor receptor beta)

3) FGFR1 - receptor fibroblastových růstových faktorů 1 (Fibroblast growth factor receptor 1)

2.2 Lymfocyty

Lymfocyty jsou buněčnou složkou lymfatického systému a jsou základní výkonnou jednotkou specifické imunity. Rozdělují se do dvou větví: B-lymfocyty a T-lymfocyty.

2.2.1 B-lymfocyty

Vývoj B-lymfocytů probíhá v kostní dřeni z hematopoetických progenitorových buněk. Tento proces je regulován pomocí cytokinů a také membránovými interakcemi a celkově je pečlivě kontrolován. B-lymfocyty jsou zodpovědné za specifickou protilátkovou imunitu (Krejsek *et* Kopecký, 2004).

V průběhu svého vývoje jsou B-lymfocyty vystavovány různým antigenním faktorům a prochází pozitivní a negativní selekcí. Při pozitivní selekci dochází k vystavování různých antigenů na molekuly HLA (Human leukocyte antigens) systému a jejich následnému předkládání B-lymfocytům. B-lymfocyty, které mají k těmto antigenům velmi vysokou afinitu, nebo naopak velmi slabou až žádnou afinitu, jsou v tomto kroku usmrčovány. Pozitivní selekcí procházejí úspěšně pouze ty B-lymfocyty, které mají k daným antigenům středně silnou afinitu. Naopak při negativní selekci jsou B-lymfocyty vystavovány antigenním strukturám vlastního organismu a úspěšně tímto krokem projdou pouze ty, které s antigeny vlastního těla nereagují. Souhrnně se tento proces nazývá indukce tolerance vlastního (Krejsek *et* Kopecký, 2004).

Zralé B-lymfocyty, které se ještě nesetkaly s antigenem, se kterým jsou kompatibilní, se nazývají naivní B-lymfocyty. Ty se nejvíce nacházejí v sekundárních lymfatických orgánech, na sliznicích, ve slezině a v periferní krvi. V případě, že dojde ke kontaktu infekčního antigenu s kompatibilním receptorem na povrchu B-lymfocytu (BcR, B-cell receptor), spustí se řada reakcí, které ještě za pomoci TH2 pomocných T-lymfocytů spustí protilátkovou imunitní odpověď. Pomocné T-lymfocyty poskytují B-lymfocytům potřebné aktivační podněty. B-lymfocyt se začne klonálně množit, díky čemuž dochází k množení BcR, které jsou účinné právě proti danému infekčnímu agens. B-lymfocyty dále vyžívají a stávají se z nich plazmatické buňky. Ty mají schopnost vylučovat imunoglobuliny, které jsou stejné jako B-lymfocytární receptory (BcR), ale jsou volně rozpuštěny v okolní tekutině a plní funkci protilátek. Imunoglobuliny se od B-lymfocytárních receptorů liší pouze koncovou doménou na C-konci těžkých řetězců. B-lymfocytární receptory mají na svém konci

transmembránovou hydrofobní doménu a imunoglobuliny doménu tvořenou hydrofilní sekvencí aminokyselin. Imunoglobuliny se navazují na patogeny, jejich produkty, či jiná infekční agens nacházející se v extracelulárních prostorech a díky tomu je označují. Tímto označením poté dojde k rychlejší likvidaci těchto látek či mikroorganismů cytotoxickými T-lymfocyty nebo fagocyty buňkami (Krejsek *et* Kopecký, 2004).

B-lymfocyty slouží i jako induktor imunitní reakce u T-lymfocytů. Antigeny, které se jim podaří nachytat na BcR jsou poté pohlceny dovnitř buňky. Zde probíhá jejich degradace a zbylé antigenní fragmenty jsou opět přeneseny na povrch B-lymfocytů, kde jsou navázány na molekuly HLA systému II. třídy. Takto vystupují jako antigen prezentující buňky (Krejsek *et* Kopecký, 2004).

2.2.2 T-lymfocyty

Prekurzorové buňky, ze kterých se T-lymfocyty vyvíjejí, se vytvářejí stejně jako u B-lymfocytů v kostní dřeni. Poté ale migrují do thymu, kde dále dozrávají. Podle thymu mají také T-lymfocyty pojmenování. Thymus je primární orgán imunitního systému, který má lobulární strukturu, člení se na další dílčí oblasti a nachází se ve střední ose těla v horní části hrudníku u horního okraje plic. Vyskytují se však i populace T-lymfocytů, které se nevyvíjejí v thymu, ale například v játrech nebo ve sliznici trávicí soustavy, ale jejich početní zastoupení je velmi malé. Struktura thymu je pro vývoj T-lymfocytů důležitá. Svým prostupem do dřeně thymu se T-lymfocyty v jednotlivých fázích vývoje setkávají s epiteliálními buňkami daných thymových oblastí, které na ně mají regulační vliv (Krejsek *et* Kopecký, 2004).

Kromě epiteliálních buněk je vývoj T-lymfocytů dále regulován některými makrofágovými buňkami a také humorálním prostředím, které v thymu panuje. Jedná se o peptidické fragmenty velké několik desítek aminokyselin. Někdy se označují jako thymové hormony. Jde hlavně o látky thymosin, thymopoetin a thymový faktor (Krejsek *et* Kopecký, 2004).

Stejně jako v případě B-lymfocytů probíhá u T-lymfocytů v průběhu jejich vývoje pozitivní a negativní selekce. Tento proces indukce tolerance vlastního u nich ale probíhá mnohem přísněji a na každém kroku je pečlivě kontrolován. Jakmile nastane sebemenší chyba či odchylka, je u těchto poškozených T-lymfocytů indukována apoptóza (Krejsek *et* Kopecký, 2004).

Další podobností s B-lymfocyty je to, že T-lymfocyty, které se ještě nesetkaly s kompatibilním antigenním podnětem, se vyskytují v naivním stádiu. V tomto stavu migrují

stále opakovaně mezi krevním řečištěm a lymfatickými tkáněmi do doby, než se s antigenem setkají (Krejsek *et* Kopecký, 2004).

T-lymfocyty lze dále rozdělit na dvě subpopulace: pomocné induktorové T-lymfocyty (T_H-lymfocyty) a cytotoxické T-lymfocyty (T_C-lymfocyty) (Krejsek *et* Kopecký, 2004).

2.2.3 Antigenní receptory lymfocytů

Lymfocyty mají na svém povrchu charakteristické molekuly, které jim slouží k rozpoznávání příslušných antigenů. V případě B-lymfocytů je to B-lymfocytární buněčný receptor (BcR, B-cell receptor) a u T-lymfocytů je to T-lymfocytární buněčný receptor (TcR, T-cell receptor) (Bagg, 2006; Krejsek *et* Kopecký, 2004).

2.2.3.1 B-lymfocytární receptor BcR

B-lymfocytární buněčné receptory (BcR), často označované souhrnně jako imunoglobuliny (Ig), se vždy skládají ze dvou lehkých a dvou těžkých řetězců. BcR patří do imunoglobulinových tříd IgM a IgD (Krejsek *et* Kopecký, 2004; Medeiros *et* Carr, 1999).

2.2.3.1.1 Struktura BcR

Lehké řetězce se vyskytují ve dvou typech, kappa (κ , IGK) nebo lambda (λ , IGL). Geny pro jejich tvorbu se nacházejí na dlouhém raménku 22. chromozomu, v oblasti 22q11.2, v případě IGK a na krátkém raménku 2. chromozomu, konkrétně v oblasti 2p11.2, u IGL. Oba geny kódující jak IGK tak i IGL jsou rozděleny do mnoha genových segmentů náležících do tří různých genových oblastí. Těmito oblastmi jsou variabilní oblast V (variability), spojující oblast J (joining) a konstantní oblast C (constant) (obr. 1). Segment L kóduje peptid, který je zodpovědný za nasměrování kódované molekuly do správného kompartmentu buňky. Při zrání této molekuly je peptid následně proteolyticky odštěpen (Krejsek *et* Kopecký, 2004; van Dongen *et al.*, 2003).

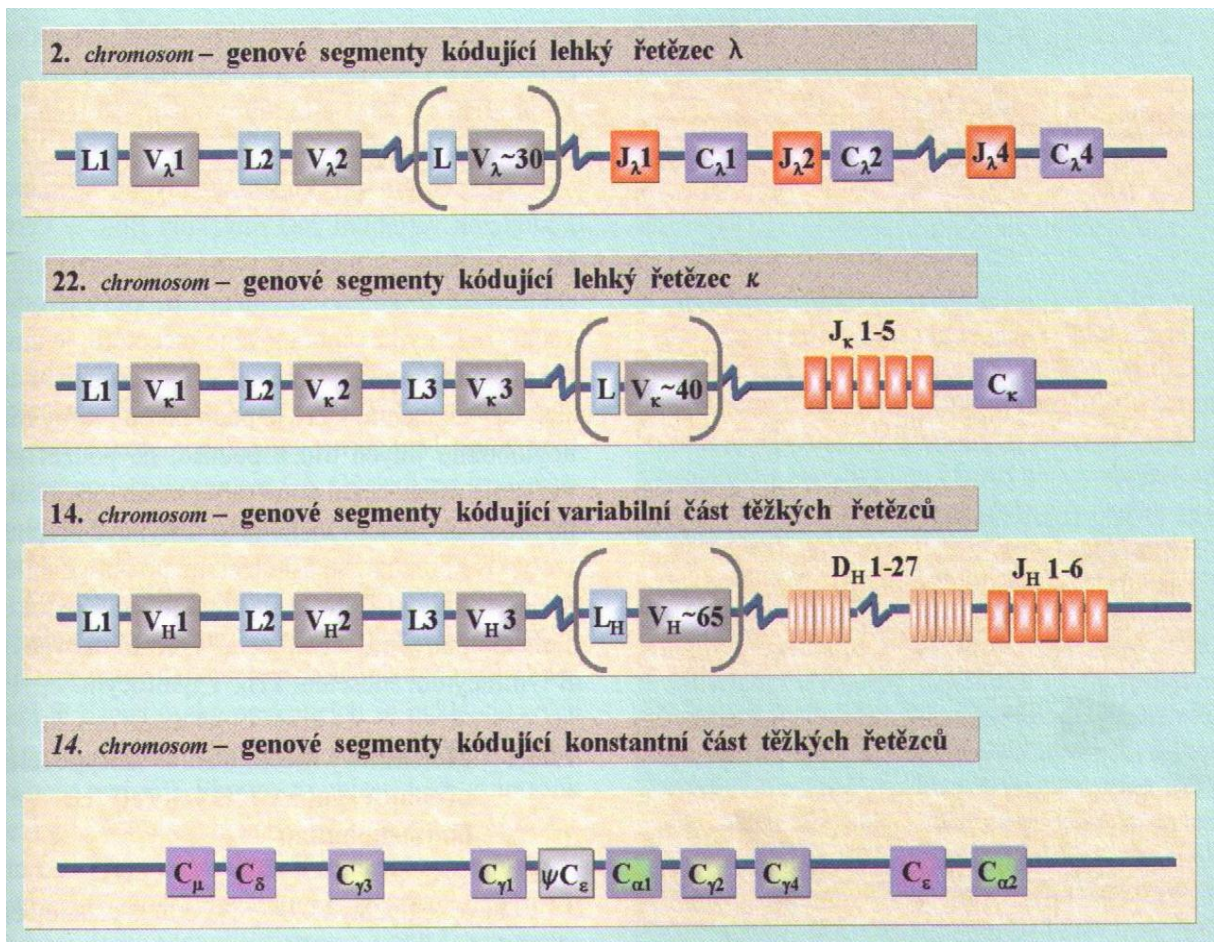
Oblasti V a J patří dohromady do variabilní části řetězce. Tato část se vyznačuje velmi rozmanitým složením aminokyselin mezi jednotlivými lehkými řetězci BcR, na rozdíl od

konstantní části, do které patří genový segment konstantní oblasti C, která je shodná s ostatními lehkými řetězci BcR (Krejsek *et* Kopecký, 2004).

Každý ze segmentů variabilní oblasti V je dále rozdělen na dvě hypervariabilní podoblasti CDR1 a CDR2 (complementary determining region), které jsou oddělené třemi méně variabilními podoblastmi FR1 - FR3 (framework region) obsahujícími částečně konzervované sekvence společné pro všechny typy BcR. Právě CDR podoblasti jsou hlavními částmi tvořícími variabilitu u BcR (Gleissner *et al.*, 2000; Nihal *et al.*, 2000) a díky tomu to jsou oblasti zodpovědné za komplementaritu k antigenům (Aubin *et al.*, 1995). Ve variabilní části se vyskytují ještě jeden typ CDR a jeden typ FR podoblasti. Obě se u lehkých řetězců IGH nacházejí na každém ze segmentů J oblasti a označují se CDR3 a FR4 (Tonegawa, 1983; van Dongen *et al.*, 2003). Největší míru variability ze všech CDR jak ve smyslu sekvence, tak i délky úseku, vykazuje oblast CDR3 (Lukowsky *et al.*, 2006).

Těžké řetězce (IGH, Immunoglobulin heavy chain) jsou kódovány na dlouhém raménku 14. chromozomu. Jedná se o oblast 14q32.3, která má přibližně velikost 1 250 kb (kilobase) (van Dongen *et al.*, 2003). Stejně jako lehké řetězce se IGH skládají z konstantní a variabilní části. Variabilní část IGH je tvořena oblastmi V a J, ale mezi nimi se navíc nachází oblast D (diversity) (Krejsek *et* Kopecký, 2004). Genové segmenty oblasti V u IGH také obsahují 2 CDR a 3 FR podoblasti. Ale z důvodu přítomnosti D oblasti se u IGH hypervariabilní podoblast CDR3 nachází na segmentech tvořících oblast D. Méně variabilní podoblast FR4 se nachází stejně jako u lehkých řetězců BcR na genových segmentech tvořících oblast J (Tonegawa, 1983; Trainor *et al.*, 1990).

Oblasti V, D, J a C jsou u IGH také rozděleny na genové segmenty, které jsou podobné jako u lehkých řetězců (obr. 1). Genových segmentů je ve V oblasti 46 - 52, bylo ale popsáno dalších přibližně 30 nefunkčních segmentů, v D oblasti 27 a v J oblasti 6 (van Dongen *et al.*, 2003). Uvedené počty platí pro buňky u kterých ještě neproběhlo přeskupení genových segmentů a DNA je tak v zárodečném stavu (Medeiros *et* Carr, 1999). Genové segmenty konstantní oblasti těžkého řetězce C_H jsou velmi důležité pro určení typu IGH. V závislosti na tom, který z genových segmentů C_H následuje za J oblastí, je určen typ IGH a tím i to, do jaké imunoglobulinové třídy celý imunoglobulin, či BcR, patří. Na DNA leží nejbližší oblasti J genové segmenty C_μ a C_δ, které specifikují imunoglobulinové třídy IgM a IgD. Z tohoto důvodu jsou právě tyto třídy zastoupeny na povrchu B-lymfocytů v podobě BcR. Vznik jiných tříd se uskutečňuje procesem izotypového přepnutí, které probíhá až poté, co se zralý B-lymfocyt setkal s antigenem (Krejsek *et* Kopecký, 2004).



Obr. 1: Organizace genových segmentů kódujících řetězce BcR (převzato z Krejsek *et* Kopecký, 2004)

2.2.3.1.2 Diverzita BcR

Vzhledem k tomu, že imunitní systém musí reagovat na velké množství antigenních determinant, je také potřebné velké množství variant BcR na B-lymfocytech. Toto množství variant by nebylo možné v DNA kódovat jako jednotlivé geny. Místo toho je tak velkého množství variant docíleno procesem nazývaným přeskupení genových segmentů (Bagg, 2006; Krejsek *et* Kopecký, 2004).

Tento proces probíhá v raném stádiu vyžívání lymfocytů a je pro funkci lymfocytů zcela nezbytný (Medeiros *et* Carr, 1999). Klíčovými činiteli jsou místně specifické rekombinázy Rag-1 a Rag-2, které jsou přítomné v nezralých lymfocytech. Dalším důležitým prvkem jsou rozpoznávací signální sekvence (RSS, recognition signal sequences) (González *et al.*, 2007; van Dongen *et al.*, 2003). RSS se skládají z konzervovaného heptamerového a nonamerového

motivů, které jsou od sebe odděleny „spacery“. To jsou nekonzervované sekvence dlouhé buď 12 párů bazí (bp, base pair) nebo 23 bp (Bagg, 2006; Krejsek *et* Kopecký, 2004; Svachova *et* Tichy, 2008). RSS se nacházejí směrem ke 3' konci od každého V segmentu, na obou stranách D segmentů a směrem k 5' konci od J segmentů (van Dongen *et al.*, 2003). Při procesu přeskupení se RSS na opačných koncích daného úseku přiblíží k sobě, pomocí heptamerů se tyto úseky spolu spojí, a vytvoří tak kruhovou strukturu. Poté se spolu spojí i nonamerové úseky. Dvě molekuly rekombinázy Rag-1 a dvě molekuly rekombinázy Rag-2 vytvářejí společně tetramer, který na dvoušroubovici DNA (dsDNA, double-stranded DNA) rozpoznává uvedené RSS. Po jeho připojení pomocí Rag-1 na nonamerovou část RSS a Rag-2 na heptamerovou část RSS se na dsDNA vytvoří zářez, který vede ke vzniku zlomu obou řetězců. Tím dojde k vyštípnutí kruhově uzavřeného úseku DNA a vlákna, mezi kterými k vyštípnutí došlo, jsou pomocí vlásenky kovalentně uzavřena pomocí RSS. Vlášenska je poté otevřena pomocí enzymatického působení komplexu Rag-1 a Rag-2, ale nikdy k otevření nedojde v místě původního rozštěpení. Dokončení přeskupení a spojení řetězců vzniklých po vyštípnutí dané oblasti zajišťují běžné opravné mechanismy DNA. Sekvence RSS jsou velice důležité, protože v případě jejich poškození může dojít až k nefunkčnosti přeskupení a dané lymfocyty ztratí schopnost funkce v imunitním systému (Krejsek *et* Kopecký, 2004; van Dongen *et al.*, 2003).

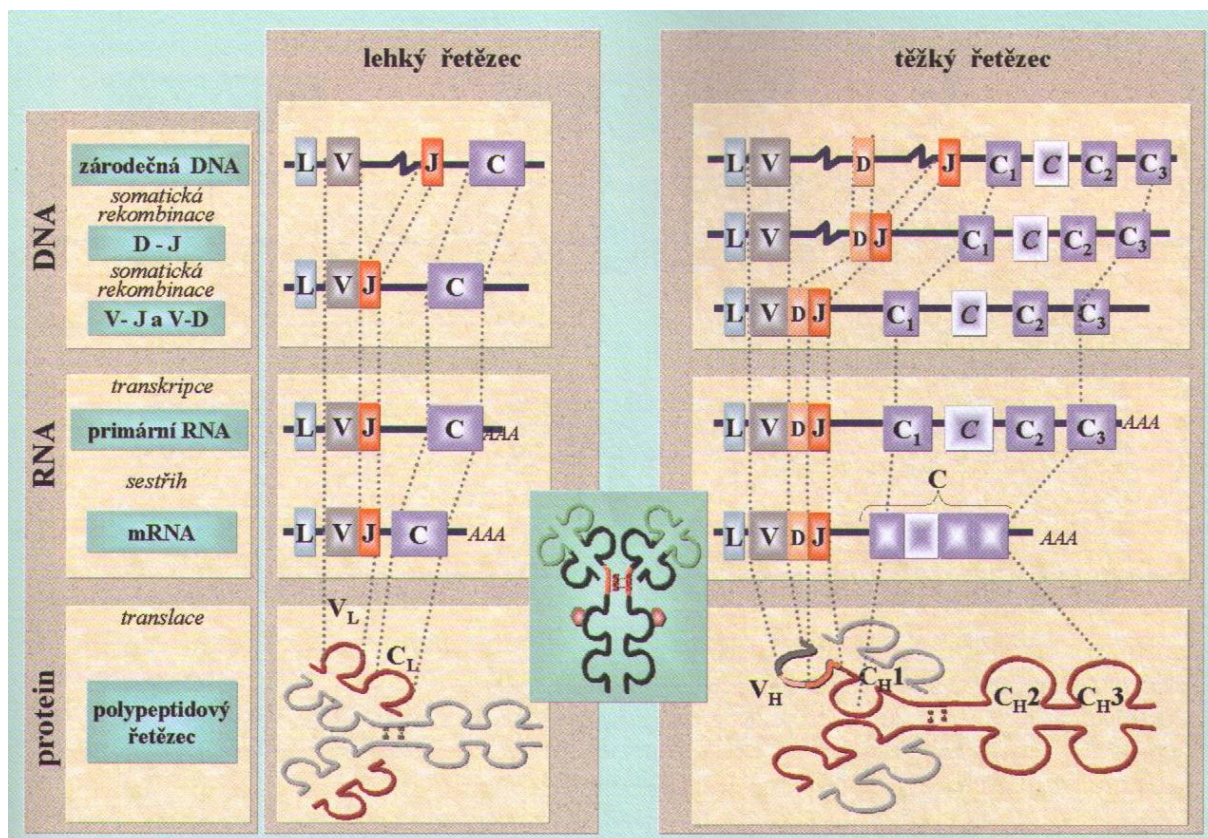
Diverzita se dále u lehkých i těžkých řetězců BcR zvyšuje za pomoci terminální deoxynukleotidyl-transferázy (TdT) a exonukleáz, které jsou schopné vkládat nukleotidy v případě TdT, či deletovat nukleotidy v případě exonukleáz do spojení mezi přeskupované genové segmenty. To je umožněno díky nesymetrickému otevírání vlásenek, kdy na kódujících koncích vznikají palindromní úseky, neboli krátké repeticity vzniklé tímto způsobem otevírání, ke kterým TdT může připojovat další nukleotidy a vytvářet tak N-regiony (Krejsek *et* Kopecký, 2004; McCarthy *et al.*, 1992). Nejčastěji se tyto změny vyskytují v hypervariabilní podoblasti CDR3. Celkově mají tyto jednobodové změny dopad na posun čtecích rámců, a výrazně se tak diverzita zvyšuje (Aubin *et al.*, 1995; Krejsek *et* Kopecký, 2004; van Dongen *et al.*, 2003).

Dalším způsobem jak mohou B-lymfocyty diverzitu dále zvyšovat je to, že zralé B-lymfocyty jsou schopné upravovat vazebné místo pro antigen. Děje se tak v procesu somatické hypermutace. V principu se jedná o časté bodové mutace v segmentech kódujících V oblasti řetězců BcR a mohou tak v některých případech zvyšovat afinitu BcR k antigenu (Bagg, 2006; Krejsek *et* Kopecký, 2004; Medeiros *et* Carr, 1999). Pokud ale díky tomuto procesu lymfocyt ztratí schopnost vázat antigeny, je pomocí apoptózy odstraněn (Küppers *et*

al., 1999). Mechanismus somatické hypermutace je kódován v malém 1,5 - 2 kb úseku na DNA a je iniciován z promotorů umístěných 300 bp „upstream“ od každého segmentu genové oblasti V (Evans *et al.*, 2007). Bylo také prokázáno, že proces somatické hypermutace se vyskytuje u IGH ve větší míře, než na lehkých řetězcích BcR (Halldórsdóttir *et al.*, 2007).

U IGH probíhá přeskupení ve dvou krocích. Nejprve probíhá přeskupení mezi D a J segmenty. Po jeho proběhnutí následuje druhé přeskupení mezi segmenty V a již přeskupeným úsekem D-J segmentů. U genů lehkých řetězců BcR, které neobsahují D oblast genových segmentů, probíhá přeskupení pouze mezi V a J genovými segmenty (obr. 2) (Krejsek *et Kopecký*, 2004; van Dongen *et al.*, 2003).

Celkový proces přeskupení genových segmentů a tvorba příslušných receptorů je celkově striktně řízený, protože exprese antigenního receptoru je pro lymfocyty velmi důležitá. Po skončení přeskupování genů přežívají pouze ty lymfocyty, které mají na svém povrchu funkční antigenní receptor. U lymfocytů, u kterých došlo k neproduktivnímu přeskupení a nemají na svém povrchu antigenní receptor ve správném složení, jsou pomocí apoptózy odstraňovány (González *et al.*, 2007; Küppers *et al.*, 1999). Nejprve probíhá přeskupení segmentů u genu pro IGH, které je pro všechny BcR společné. Poté může proběhnout přeskupení segmentů u genu pro IGK a daný B-lymfocyt tvoří receptory BcR skládající se ze 2 řetězců IGH a 2 lehkých řetězců IGK. V případě, že po přeskupení genových segmentů pro IGK na obou chromozomech nedojde k vytvoření funkčního řetězce, je tento úsek inaktivován pomocí přeskupení κ -delečního elementu (Kde) do V_{κ} či C_{κ} segmentů. Poté následuje přeskupení genových segmentů u genu pro IGL. Takto vzniklý B-lymfocyt bude mít na svém povrchu BcR skládajícího se ze 2 IGH a 2 lehkých řetězců typu λ . B-lymfocytů s BcR tvořených IGH a IGL je z celkového počtu 30 - 40 % (González *et al.*, 2007; Küppers *et al.*, 1995; van Dongen *et al.*, 2003). Procesem přeskupení genových segmentů je docíleno přibližně 2×10^6 možných typů BcR. Ale díky dalším procesům, jako je inserce, či delece nukleotidů, může být počet různých variant BcR více než 10^{12} (van Dongen *et al.*, 2003).



Obr. 2: Schématické znázornění kroků předcházejících vzniku BcR (převzato z Krejssek *et* Kopecký, 2004)

2.2.3.2 T-lymfocytární receptor TcR

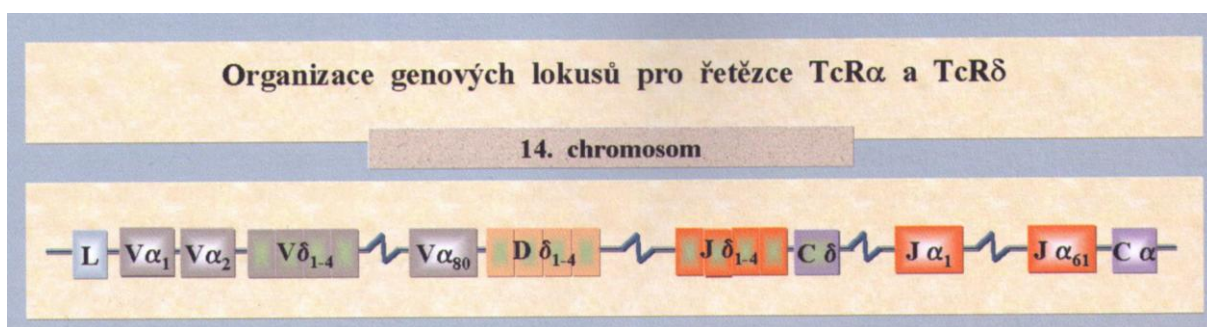
Rozpoznávací funkci pro antigenní podněty mají na povrchu T-lymfocytů T-lymfocytární buněčné receptory (TcR, T-cell receptor). Jednotlivé receptory jsou vždy tvořeny dvěma řetězci, a tvoří tak heterodimery (Geissinger *et al.*, 2005). U valné většiny T-lymfocytů se jedná o heterodimery řetězců α (TcRA) a β (TcRB) a pouze málo početné zastoupení některých T-lymfocytů periferní krve, přibližně 5 % všech T-lymfocytů, nese na svém povrchu heterodimer tvořený řetězci typů γ (TcRG) a δ (TcRD) (Krejssek *et* Kopecký, 2004; Medeiros *et* Carr, 1999).

2.2.3.2.1 Struktura TcR

Struktura jednotlivých řetězců TcR je velmi podobná řetězcům BcR. Genetická informace kódující tyto řetězce je opět rozdělena do segmentů. Celkově můžeme jednotlivé segmenty

zařadit do dvou částí, variabilní, zodpovědnou za navázání antigenu, a konstantní. Do variabilní části patří genové oblasti V a J, a u řetězců typu β a δ ještě oblast D. Do konstantní části patří stejně jako u B-lymfocytů genová oblast C (Krejsek *et* Kopecký, 2004).

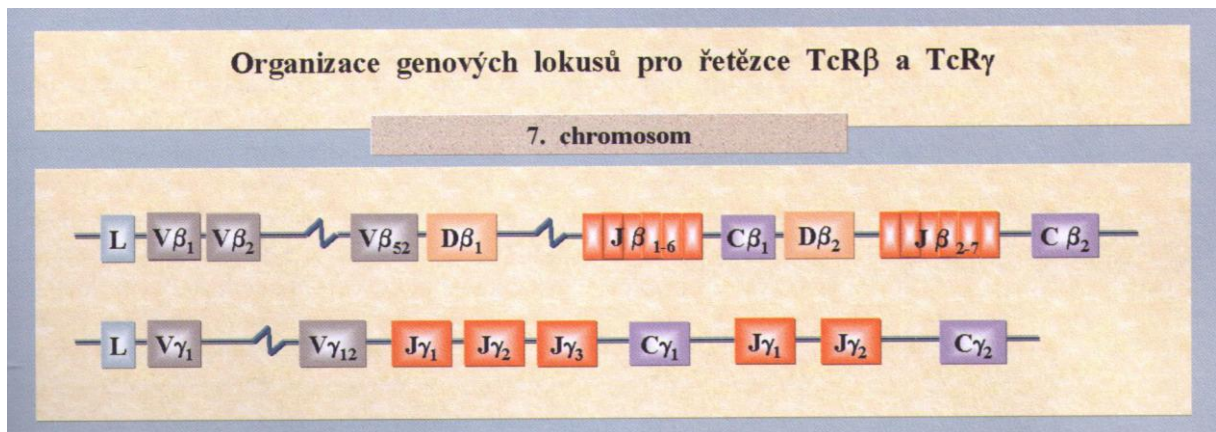
Řetězce α a δ jsou kódovány na dlouhém raménku 14. chromozomu v oblasti 14q11.2. Jejich genetická informace má však zvláštní uspořádání. Genové segmenty pro δ řetězec jsou v genetické informaci uspořádány mezi genové segmenty kódující V a J oblast α . Konstantní oblast C je u obou řetězců kódována jedním C segmentem, podobně, jak je tomu u lehkých řetězců BcR (obr. 3) (Krejsek *et* Kopecký, 2004; van Dongen *et al.*, 2003).



Obr. 3: Organizace genových segmentů kódujících TcR řetězce α a δ (převzato z Krejsek *et* Kopecký, 2004)

Řetězce β a γ jsou kódovány na chromozomu číslo 7. Pro β řetězec se genetická informace nachází na dlouhém raménku tohoto chromozómu v oblasti 7q34 a v případě γ řetězce se jeho genové segmenty nacházejí na krátkém raménku v oblast 7p14. V případě β řetězce je genová oblast C kódována dvěma segmenty, ale v případě γ řetězce je množství genových segmentů kódujících oblast C variabilní (obr. 4) (Krejsek *et* Kopecký, 2004; van Dongen *et al.*, 2003).

Vzhledem k tomu, že části TcR zasahující do cytoplazmy T-lymfocytů jsou relativně krátké, jsou heterodimery TcR nekovalentně vázané s komplexem CD3, který umožňuje přenos aktivačních signálů do buňky (Krejsek *et* Kopecký, 2004).



Obr. 4: Organizace genových segmentů kódujících TcR řetězce β a γ (převzato z Krejsek *et* Kopecký, 2004)

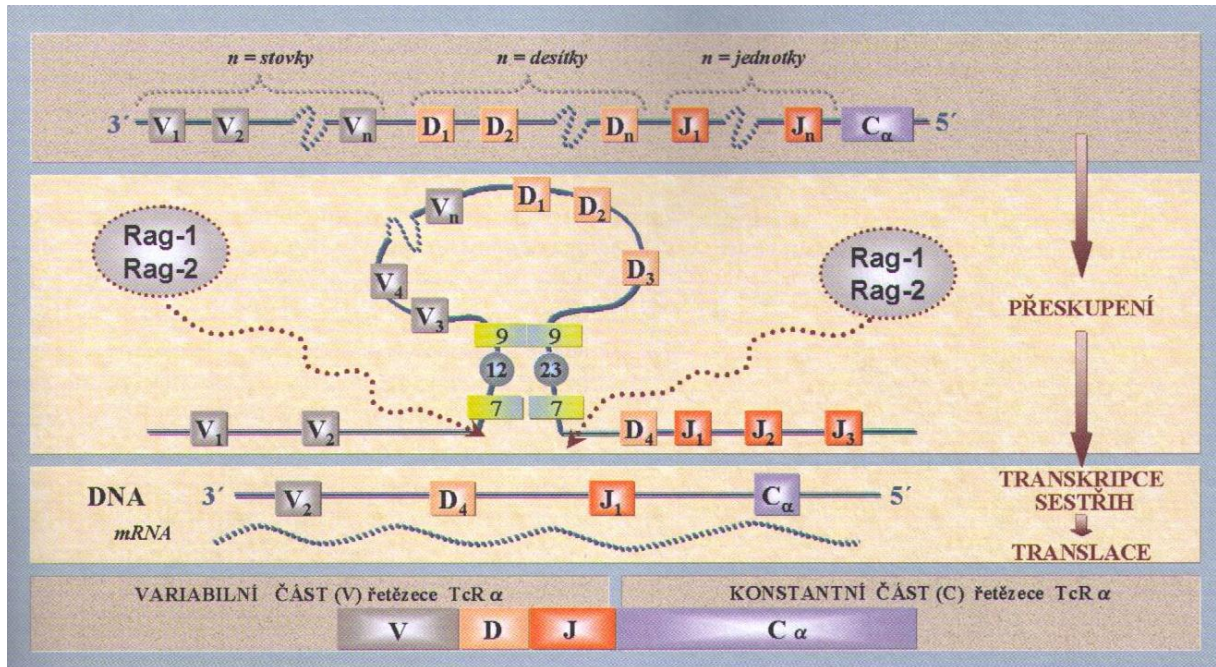
2.2.3.2.2 Diverzita TcR

I v případě T-lymfocytů je zapotřebí velkého množství variant vazebných míst pro antigenní determinanty. Jejich tvorba je stejně jako u B-lymfocytů zajištěna pomocí mechanismu přeskupení genových segmentů a inserce či delece nukleotidů. Vše probíhá stejně jako v případě B-lymfocytů. V procesu přeskupení genových segmentů se uplatňují rekombinázy Rag-1 a Rag-2 a sekvence RSS (obr. 5). Za inserci nukleotidů je zodpovědná TdT. Jedinými rozdíly v diverzitě mezi BcR a TcR je neschopnost upravovat vazebné místo pomocí somatické hypermutace a neschopnost izotypového přepnutí u TcR (Krejsek *et* Kopecký, 2004; McCarthy *et al.*, 1991).

U TcR také probíhá nejprve přeskupení mezi genovými segmenty D a J, které je následováno přeskupením mezi segmenty V a D-J úsekem. Toto platí pro TcR řetězce typů TcRB a TcRD. V řetězcích TcRA a TcRG, které neobsahují genové segmenty oblasti D, probíhá pouze přeskupení segmentů V a J. U T-lymfocytů probíhá nejdříve přeskupení u genu pro TcRD. To je společné pro všechny T-lymfocyty. To může být následováno přeskupením genu pro TcRG a T-lymfocyt tvoří na svém povrchu heterodimer TcR tvořený řetězci typů γ a δ . Ve druhém případě je přeskupení u genu pro TcRD následováno přeskupením u genu pro TcRB. Poté dojde k deleci genu pro TcRD a k přeskupení segmentů v genu pro TcRA. Výsledný T-lymfocyt má na svém povrchu TcR složený z řetězců typů α a β (McCarthy *et al.*, 1991; van Dongen *et al.*, 2003).

Kombinatorní repertoár je u TcR vlivem přeskupení přibližně 3×10^6 variant u heterodimerů TcR $\alpha\beta$ a 5×10^3 u heterodimerů TcR $\gamma\delta$. Inserce a delece nukleotidů množství

variant opět zvyšuje. Teoreticky může tento počet dosáhnout hodnoty opět více než 10^{12} (Gallardo *et al.*, 2008; van Dongen *et al.*, 2003).



Obr. 5: Mechanismus přeskupení genových segmentů (převzato z Krejsek *et* Kopecký, 2004)

2.3 Metody sloužící k analýze lymfoidních tkání

Jako materiál pro analýzu lymfoidní tkáně slouží ve většině případů tkáň odebraná při biopsii. Nejčastěji je tato tkáň fixována ve formol-parafinových bločcích. Jde o tkáň fixovanou v roztoku formaldehydu a prosycenou parafinem. Dalším, ale méně používaným zpracováním tkáně je technika, při které je tkáň velice rychle zmrazena na teplotu tekutého dusíku (Feit *et al.*, 2007).

U většiny vyšetřovaných vzorků s podezřením na lymfoproliferativní onemocnění lze za pomoci histomorfologie, cytomorfologie a imunohistologie určit, zda se jedná o maligní, či pouze reaktivní, benigní, lymfoproliferaci. V poslední době se nejvíce uplatňuje imunotypizace. Vyskytují se ale i případy, u kterých s pomocí běžně používaných klinických technik nelze s jistotou určit, o jaký typ proliferace se jedná. Přibližně se tak stává v 5 - 10 % případů. V těchto případech může být klinická diagnostika doplněna molekulárně-biologickou

analýzou klonality lymfocytů ve vzorku (Sandberg *et al.*, 2005; van Dongen *et al.*, 2003). Jedním z takovýchto případů může být periferní T-lymfom, jehož výskyt je relativně skromný. Tvoří přibližně 8 - 10 % nově diagnostikovaných lymfomů. Pro tento druh lymfomu není dostatek dobrých imunofenotypových značek a v mnoha případech nelze jasně rozlišit od reaktivní tkáně (Geissinger *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2006). Další komplikované případy mohou být ty, kdy se jedná o maligní tkáň, ale jedná se o pomalu postupující onemocnění. Takovým příkladem mohou být leukémie z velkých granulárních lymfocytů. I zde mohou pomoci molekulárně-biologické analýzy (McCarthy *et al.*, 1991).

2.3.1 Imunohistochemie

Hlavním principem této metody je detekce antigenů za pomoci specifických značených protilátek. Jsou vyvinuty monoklonální protilátky, které se váží na antigenní determinanty na povrchu lymfoidních buněk (Zola *et al.*, 2005). Pokud je tkáň inkubována s těmito protilátkami, je po vyhodnocení navázaných protilátek možné určit, které antigeny se nacházejí na povrchu vyšetřovaných buněk a podle jejich spektra je možné určit, o který typ buněk a zároveň typ lymfomu jde. Bohužel tato metoda není vždy účinná, neboť jsou případy, kdy nádorové buňky v průběhu svého vývoje určité antigeny ztratí a z tohoto důvodu vykazují jiné spektrum antigenů, než by měly vykazovat, a nelze je přesně definovat (Feit *et al.*, 2007). Ale i tak je imunofenotypizace důležitým doplňkem při analýze lymfoproliferativních onemocnění. Na jejím základě lze rozdělovat neoplazmata podle původu jejich vzniku, jestli vznikly z B či T lymfocytární řady a také lze v mnoha případech i určit v jakém stupni vývoje se tak stalo (Swerdlow *et al.*, 2008).

Antigenní molekuly na povrchu lymfocytů se souhrnně označují CD nomenklaturou. Nomenklatura CD (Cluster of differentiation) byla definována na konferenci First International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens (HLDA) v Paříži (Foon *et Todd*, 1986). HLDA vzniklo v osmdesátých letech a popudem byl velký chaos a nepřehlednost, které panovaly v oblasti klasifikace lymfocytárních antigenních struktur (Zola *et al.*, 2005).

Mezi nejběžnější antigeny, proti kterým jsou připravovány protilátky, patří CD3, CD4, CD5 a CD8 u T-lymfocytů, CD10, CD20, CD79a a CD138 u B-lymfocytů, nebo CD56 pro NK buňky. Antigen CD45 mají na svém povrchu všechny lymfocyty. Používají se ale i protilátky proti antigenům jiných typů buněk, jako například CD14 u monocytů nebo CD68 u

histiocytů a také protilátky proti speciálním antigenním determinantám, jako například Ki67, což je proliferační marker, který se vyskytuje pouze u rychle proliferujících typů buněk a značí tak agresivní formy tumorů (Feit *et al.*, 2007).

Další antigenní determinanta CD30 je důležitá pro detekci anaplastického velkobuněčného lymfomu pozitivního na anaplastickou lymfomovou kinázu. Tento lymfom ve většině případů vzniká z T-lymfocytů, ale v malém množství může vzniknout i z B-lymfocytů. Právě na základě detekce antigenu CD30 je možné určit, zda se jedná o T-lymfocytární či B-lymfocytární typ, neboť se CD30 vyskytuje pouze u T-lymfocytárního lymfomu (Küppers *et al.*, 1997). Dále bylo zjištěno, že i v případě, kdy tento lymfom vzniká ze zralých T-lymfocytů, tak v některých případech nebyly u buněk tvořících tento lymfom detekované ostatní antigeny specifické pro T-lymfocyty (Klapper *et al.*, 2008).

Jako další důležitý antigen se jeví transmembránový povrchový protein CD43 známý též jako sialoporin. Tento antigen se vyskytuje na všech T-lymfocytech. U B-lymfocytů se vyskytuje v mnohem menší míře, nejčastěji pod hranicí citlivosti detekce. Bylo ale zjištěno, že v případech nějaké B-lymfocytární malignity výskyt CD43 na povrchu B-lymfocytů narůstá. Vzhledem k rozdílnému výskytu na B a T-lymfocytech může tento antigen sloužit jako jeden z ukazatelů toho, zda se ve vzorku jedná o B-lymfocyty či T-lymfocyty. Bylo zjištěno, že tento antigen se podílí na aktivaci T-lymfocytů a při jeho nesprávné funkci vzniká onemocnění zvané Wiskott-Aldrichův syndrom. Pro detekci CD43 se používají protilátky MT1, DF-T1 a L60 (Leu-22) (Stross *et al.*, 1989).

Nepoužívají se však pouze protilátky proti CD antigenům, ale také protilátky detekující například cyklin D1, nebo κ a λ lehké řetězce BcR (Venkatraman *et al.*, 2006).

Celkově lze konstatovat, že rozdělování a zařazování lymfoproliferativních onemocnění do určitých tříd je značně složité a kritéria rozdělování se velmi často mění. Z tohoto důvodu se imunotypizace a zařazení lymfoproliferativních onemocnění do skupin dle antigenních struktur na povrchu buněk vyšetřovaných vzorků jeví jako relativně spolehlivá a přesná metoda (Yang *et al.*, 1990).

2.3.2 Molekulárně - biologické metody

Koncem osmdesátých let se v důsledku rozvoje v oblasti molekulární biologie objevují nové přístupy, kterými je možné analyzovat klonální proliferaci u B- a T-lymfocytů na základě genových přeskupení u BcR a TcR a využít tyto informace při studiu a

diagnostikování lymfoproliferativních onemocnění (Angel *et al.*, 1993; Raghavachar *et al.*, 1988).

Základem je fakt, že většina nádorových tkání má svůj původ v jedné buňce, která vlivem poškození DNA ztratila kontrolu nad svou proliferací a začala se nekontrolovatelně množit. Tím došlo k velkému množstevnímu zastoupení monoklonální populace buněk, tvořené klony původní buňky (van Dongen *et al.*, 2003). Pokud vezmeme v úvahu, že díky rozdílnému přeskupení genových segmentů a hlavně náhodnému začleňování nukleotidů v N-regionech u lymfocytů, je daná varianta BcR či TcR na povrchu lymfocytu unikátním markerem pro každý z lymfocytů (Lukowsky *et al.*, 2006; McCarthy *et al.*, 1992; Wan *et al.*, 1990) a také to, že většina malignit vzniká z lymfocytů až po proběhnutí přeskupení genových segmentů, díky kterému obsahují monoklonální buňky shodnou specifickou variantu BcR či TcR odlišnou od variant polyklonálních buněk nenádorové populace (Berezcki *et al.*, 2007; Medeiros *et Carr*, 1999; van Krieken *et al.*, 2007), představuje detekce přeskupení genových segmentů u BcR či TcR výhodný marker pro detekci maligních proliferací (Lukowsky *et al.*, 2006). Pro tuto detekci jsou používány dvě metody. Po dlouhou dobu byla standardem analýza pomocí Southernova přenosu, ale později se začaly objevovat techniky založené na principu PCR (van Dongen *et al.*, 2003).

Tyto techniky mají několik omezení (van Dongen *et al.*, 2003):

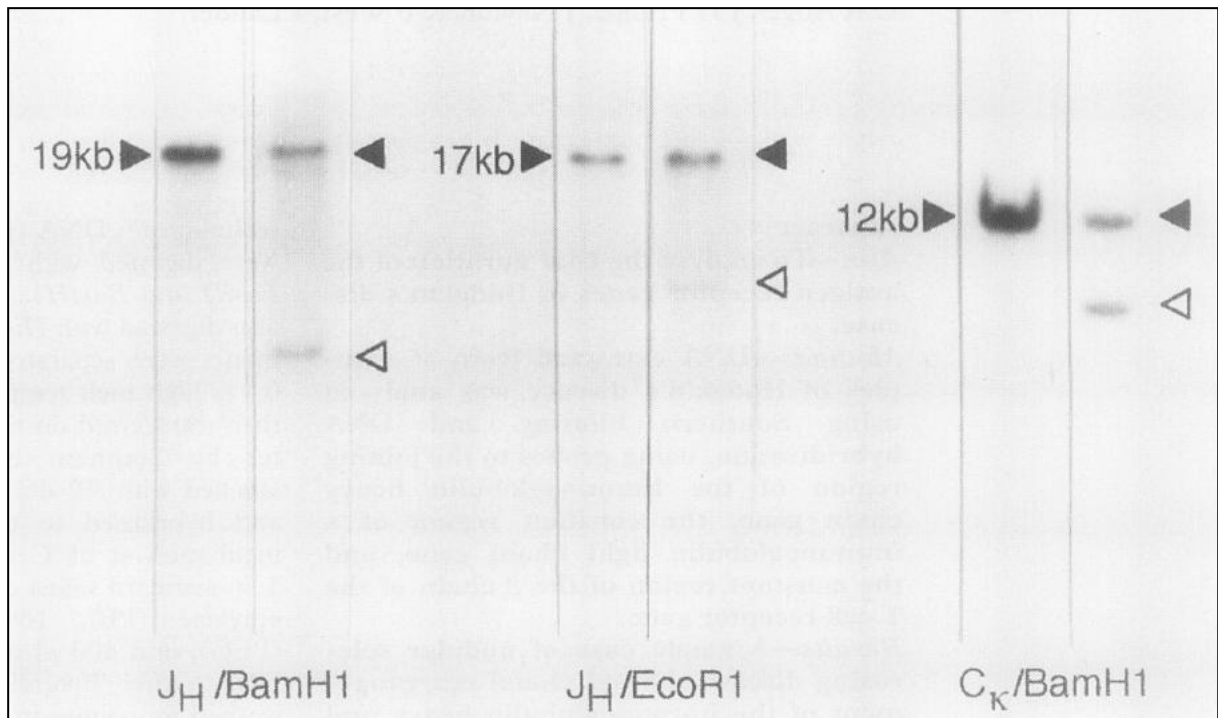
- 1) Senzitivita - hodně závisí na použité tkáni, množství monoklonálních buněk v polyklonálním pozadí a použité technologii
- 2) Klonalita neznamena vždy malignitu - jsou případy, kdy i u benigní tkáně je část buněk zmnožena monoklonálně, vždy je nutné porovnat s klinickými daty a ostatními analýzami
- 3) BcR nebo TcR přeskupení není markerem pro určení vývojové řady - například u prekursorových B-malignit se relativně často vyskytují i TcR přestavbové klonality
- 4) Pseudoklonalita - v některých případech může polyklonální tkáň dávat výsledky jako monoklonální. To může vzniknout například v případě, kdy je analyzována tkáň s obsahem jen velmi malého množství lymfocytů.
- 5) Falešná pozitivita - hlavně problém u PCR, je velice citlivá
- 6) Falešná negativita - opět více u PCR - například způsobená somatickou hypermutací u zralých B-lymfocytů. V jejím průběhu díky mutacím došlo k pozměnění sekvence v místě nasedání primerů a ty poté nemohou nasednout.

2.3.2.1 Southernův přenos

Základním schématem této metody je rozštěpení genomické DNA (gDNA) na specifické fragmenty v závislosti na použitém restričním enzymu. Štěpení mimo jiné probíhá i uvnitř nebo v okolí zkoumaných genových oblastí obsahujících přestavby. Pro analýzu klonality u B- a T-lymfocytů je to oblast genových segmentů pro BcR nebo TcR. Pro tento účel se nejčastěji používají endonukleázy štěpící šestinukleotidové sekvence (Medeiros *et Carr*, 1999). Mezi nejběžněji používané endonukleázy patří *Bam*HI, *Eco*RI a *Hind*III (Angel *et al.*, 1993; Mitha *et McGlennen*, 2001), které štěpí DNA na fragmenty o velikosti 2 - 15 kb. Výběr endonukleázy závisí na vyšetřované tkáni a na kritériích, která si pro analýzu zvolíme (van Dongen *et al.*, 2003). Mezi další používané endonukleázy patří například *Bgl*II (Mitha *et McGlennen*, 2001), *Pst*I (Raghavachar *et al.*, 1988) nebo *Sau*3AI (Knauf *et al.*, 1993).

Vzniklé fragmenty jsou následně rozděleny za pomoci gelové elektroforézy (GE) a následně jsou pomocí Southernova přenosu přeneseny na nylonovou membránu. Zde jsou hybridizovány se značenou sondou. Ta může být značena radioaktivně, například pomocí deoxycitidintrifosfátu značeného izotopem ^{32}P ($\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP) a začleněného do řetězce sondy (Angel *et al.*, 1993; Mitha *et McGlennen*, 2001). Dobře zvolené použití restričních endonukleáz a správné umístění sond umožňuje teoreticky detekovat všechna BcR a TcR genová přeskupení (van Dongen *et al.*, 2003).

Následuje vizualizace a vyhodnocení. V případě vzorku s monoklonální populací buněk obsahujících stejnou přestavbu BcR nebo TcR genových segmentů se při analýze objeví specifický proužek odlišné velikosti než je proužek tvořený DNA v zárodečném stavu. Tato DNA se vyskytuje ve všech buňkách, u kterých ještě nedošlo k žádnému přeskupení genových segmentů. Z tohoto důvodu mají všechny tyto buňky stejnou kombinaci genových segmentů, a tudíž mají na gelu stejné charakteristiky jako buňky vzniklé monoklonální proliferací. Zjednodušeně lze říci, že tuto DNA obsahují kromě lymfocytů, u kterých nedošlo k přeskupení, i všechny ostatní nelymfoidní buňky (Angel *et al.*, 1993; Mitha *et McGlennen*, 2001). Monoklonálně zmnožená tkáň obsahující genová přeskupení má oproti buňkám s DNA v zárodečném stavu jinou velikost fragmentů díky faktu, že při přeskupení dochází k delecí úseků DNA, ale zároveň také dochází k vyštěpení některých štěpných míst pro endonukleázy zde používané (obr. 6) (Medeiros *et Carr*, 1999).



Obr. 6: Výsledek analýzy vzorku s monoklonálními lymfocyty analyzovaného pomocí Southernova přenosu (převzato z Angel *et al.*, 1993); černé trojúhelníky označují oblast DNA v zárodečném stavu, bílé trojúhelníky označují DNA z monoklonálních lymfocytů

Pro detekci klonality u lymfocytů se využívají sondy nasedající do genových segmentů genů pro řetězce BcR či TcR. Mezi tyto segmenty patří nejčastěji využívaný úsek segmentů J 3 - 6 u IGH (van Dongen *et al.*, 2003). Dále C_μ u IGH, C_κ u IGK, $C\lambda 1$ a $C\lambda 2$ u IGL, $C\beta 1$ u TcR řetězce β a $J\gamma 1$ a $J\gamma 2$ u TcR řetězce γ (Angel *et al.*, 1993; Knauf *et al.*, 1993; Raghavachar *et al.*, 1988).

Southernův přenos našel své uplatnění při analýze vzorků pacientů trpících některým z lymfoproliferativních onemocnění. Jako příklad lze použít analýzu vzorků pacientů s mnohočetným myelomem, kde se podařilo pomocí této metody zjistit, že přítomnost buněk monoklonálního charakteru v periferní krvi je indikátor pokročilejšího stavu nemoci. V raných stádiích nemoci se monoklonálně zmnožené buňky vyskytují pouze v kostní dřeni (Knauf *et al.*, 1993).

Southernovým přenosem se ale nemusí detekovat genové přestavby pouze u genů pro BcR a TcR. Příkladem může být výzkum u pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML), který provedl Schmetzer *et al.* (2000). Při analýze použili sondy jak pro TcR (pro segment $C\beta 1$ pro β řetězec) a BcR (J_h 3-6 pro IGH), tak i pro geny růstových faktorů (cytokiny GM-CSF, G-CSF, IL-3), M-bcr (major breakpoint cluster region), gen pro receptor kyseliny α -retinové

nebo gen pro myeloidní lymfoidní leukemii. Na základě analýzy těchto přestaveb bylo zjištěno, že výskyt určité přestavby či kombinace přestaveb jsou charakteristické pro určité typy AML a mají vliv na progresi nemoci a přežívání pacientů.

Při Southernově přenosu je nevýhodou malé množství sond s vysokou specifitou, vyšší cena a delší doba na provedení (Mitha *et* McGlennen, 2001; van Dongen *et al.*, 2003). Například expozice při vyvolání filmu u radioaktivního značení může trvat i několik dní (Angel *et al.*, 1993) a celkové provedení a vyhodnocení analýzy může zabrat 1 až 2 týdny (Trainor *et al.*, 1990). Velkou nevýhodou je také potřeba velkého množství (10 - 20 ng) kvalitní vysokomolekulární gDNA, kterou například není možné získat z formol-parafinových bločků. Nejčastěji se využívá čerstvá nebo velice rychle zamražená tkáň (Gurbity *et al.*, 2003; Raghavachar *et al.*, 1988; van Dongen *et al.*, 2003). Detekční limit u této varianty činí 1 - 5 % zastoupení maligních buněk ve vyšetřovaném vzorku (Mitha *et* McGlennen, 2001; van Dongen *et al.*, 2003).

2.3.3.2 Polymerázová řetězová reakce - PCR

Stejně jako v případě Southernova přenosu, tak i analýzy zkoumající klonální populace lymfocytů založené na principu PCR jsou zaměřené na detekci různých variant jednotlivých řetězců BcR nebo TcR po proběhnutém přeskupení genových segmentů. Od provedení prvních analýz založených na principu PCR na začátku devadesátých let minulého století (Trainor *et al.*, 1990) se začalo uvažovat, že tyto techniky mohou být reálnou alternativou pro Southernův přenos pro analýzu klonality lymfocytů (Gleissner *et al.*, 2000). Od té doby bylo provedeno mnoho výzkumů, které provedly různé modifikace vedoucí ke zvýšení senzitivity a spolehlivosti těchto metod a jejich uplatnění v praxi (Liu *et al.*, 2007).

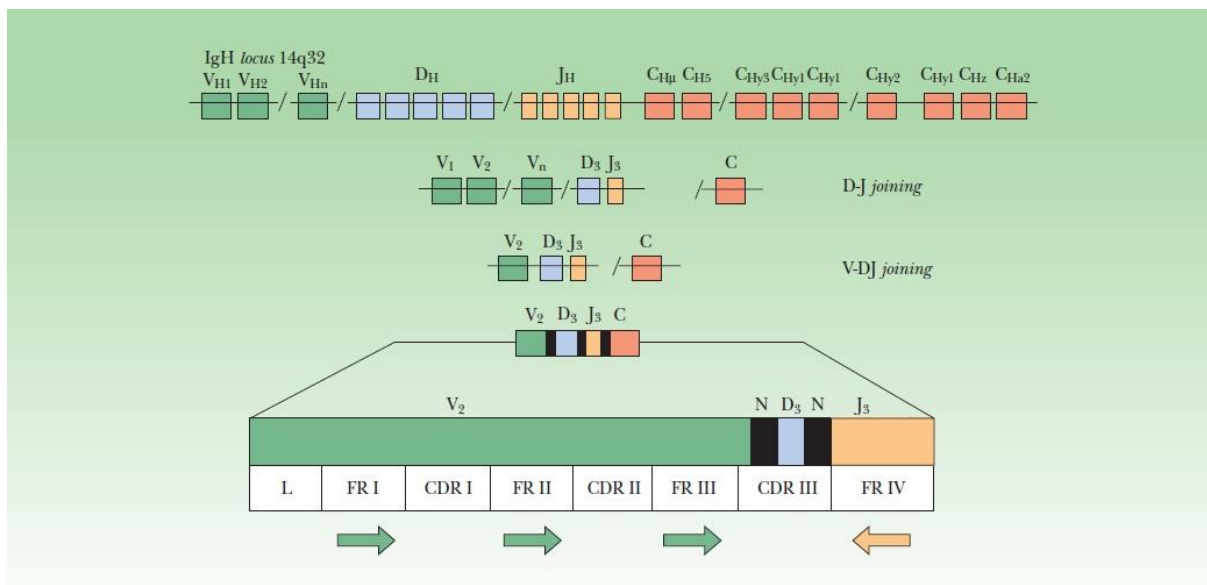
Principem těchto metod je PCR amplifikace určitého úseku na DNA pomocí námi zvolných primerů. V případě analýzy klonálního zmnožení u lymfocytů se amplifikované úseky nacházejí v oblastech kódujících některý z lehkých či těžký řetězec BcR nebo některý z řetězců TcR. Proběhlé amplifikace jsou poté nejčastěji vyhodnocovány na gelu po provedení gelové elektroforézy. V případě, že vzorek obsahuje monoklonální buněčnou populaci se shodným genovým přeskupením, projeví se tato skutečnost na gelu vytvořením ohraničeného proužku, který je tvořený fragmenty o stejné, předem definované velikosti v závislosti na primerovém složení reakce (Mitha *et* McGlennen, 2001; Nelson *et al.*, 2007). V případě polyklonálně zmnožených buněk jsou PCR produkty různých délek v závislosti na

proběhnutém genovém přeskupení a aktuální kombinaci genových segmentů na DNA u každého z lymfocytů. Jejich velikost je opět závislá na použitých primerech, ale rozptyl velikostí od nejkratších po nejdelší fragmenty bývá nejčastěji přibližně 60 bp. Tento rozptyl ve velikostech fragmentů se na gelu projeví jako neohraničený „smear“, neboli směs velkého počtu různě dlouhých fragmentů DNA (Nelson *et al.*, 2007).

Oproti Southernovu přenosu, kde se při vyhodnocování muselo hledět na proužek tvořený z DNA v zárodečném stavu bez přeskupení genových segmentů, je u PCR technik tato skutečnost vyřešena tím, že místa, do kterých bývají primery navrženy, jsou u nepřeskupených DNA od sebe hodně vzdálené. Tyto vzdálenosti mohou činit několik stovek bp až několik kb v závislosti na analyzovaném řetězci BcR nebo TcR. To je příliš daleko na to, aby byly v průběhu PCR tyto úseky úspěšně amplifikovány. V důsledku přeskupení genových segmentů a vystřížení velkých úseků na DNA dochází k velkému přiblížení těchto úseků a zkrácení vzdálenosti mezi primery. Díky tomuto procesu je již možné takto dlouhé úseky úspěšně amplifikovat (Medeiros *et Carr*, 1999; Vargas *et al.*, 2008; Wan *et al.*, 1990).

Pro detekci klonalit lymfocytů pomocí PCR je nutná dobrá znalost přeskupení genových segmentů pro přípravu vhodných primerů. Vzdálenost mezi nimi by měla být menší než 1 kb, v optimálním případě i menší než 500 bp (van Dongen *et al.*, 2003).

Pro analýzu přeskupení genových segmentů u B-lymfocytů je většina metod založena na amplifikaci úseků DNA kódujících oblasti V, D a J těžkého řetězce BcR (VH, DH, JH), přičemž primery nasedající v oblasti VH jsou navrženy tak, že v drtivé většině nasedají do méně variabilních podoblastí FR1 - FR3, které obsahují částečně konzervované sekvence (Gleissner *et al.*, 2000; Mitha *et McGlennen*, 2001). Proti nim jsou používány primery nasedající na JH segmenty, nejčastěji na konsenzuální sekvenci vyskytující se ve všech šesti JH segmentech (obr.7) (Lukowsky *et al.*, 2006; Nelson *et al.*, 2007). Tato oblast, po genovém přeskupení, má od počátku VH segmentu po konec JH segmentu velikost přibližně 400 bp (Trainor *et al.*, 1990).



Obr. 7: Schéma přeskupení IGH genu s naznačenými úseky nasedání primerů (převzato z Gallardo *et al.*, 2008); Zelené šipky naznačují místa nasedání přímých primerů na V segment, oranžová šipka naznačuje oblast nasedání zpětných primerů na J segmentu

Celkově lze VH-JH oblast amplifikovat několika různými variantami PCR. Pravděpodobně nejjednodušší variantou je provedení pomocí klasické PCR. Při tomto provedení je použit primer nasedající na DNA do oblasti jednoho ze 3 FR regionů pomocí částečně konzervované, konsenzuální sekvence, která se zde vyskytuje. Nejčastěji se používá primer VHFRIII, nasedající na FR3 region. Proti tomuto primeru je nejčastěji použit primer JH rozeznávající konsenzuální sekvenci, která se vyskytuje na všech šesti JH segmentech. U tohoto provedení je míra detekce 50 % - 70 % (Gleissner *et al.*, 2000; Medeiros *et Carr*, 1999; Nelson *et al.*, 2007).

Další možnou variantou, která se hodně využívá i v dnešní době, je analýza pomocí odstupňované (nested), či poloodstupňované (semi-nested) PCR. Při poloodstupňované variantě je použit primer nasedající opět na konzervované sekvence v regionech FR1 - FR3. Například primer FR3A je schopen nasedat na 17 různých V segmentů. Proti tomuto primeru je v prvním kole PCR použit primer LJH a ve druhém kole primer VLJH. V případě provedení odstupňované PCR jsou v prvním kole použity stejné primery jako v případě poloodstupňované varianty, ale ve druhém kole je proti VLJH primeru použit primer nasedající do FR regionu blíže JH segmentu. Například pokud je v prvním kole použit primer FR2A, ve druhém kole je použit primer FR3A (Diss *et al.*, 1994; Nihal *et al.*, 2000; Wan *et al.*, 1990). Míra detekce tohoto systému je větší než v případě jednokolové PCR. Tento fakt potvrdil Gleissner *et al.* (2000), kdy bylo provedeno kontrolní PCR 31 monoklonálních

vzorků pomocí obou variant PCR. V případě normální varianty byly použity primery VHFRIII a JH. Touto variantou bylo odhaleno 21 monoklonalit (67%). V druhém případě s použitím poloodstupňované varianty byly použity primery FR3A a LJH/VLJH. V tomto případě bylo detekováno 24 monoklonalit (77%). Detekční míra je tak u těchto variant PCR kolem 80 % - 90 % (Nihal *et al.*, 2000; Svachova *et Tichy*, 2008).

Pravděpodobně nejvyužívanější variantou v dnešní době je detekce přeskupení genových segmentů pomocí mnohonásobných (multiplex) PCR. Ty jsou navrženy jak pro detekci VH-JH přeskupení, tak i pro detekci přeskupení na lehkých řetězcích BcR. Dále jsou schopné detekovat i přeskupení na řetězcích TcR. V tomto případě jsou nejvyužívanější detekce na γ řetězci TcR v úseku $V\gamma - J\gamma$ (Bagg, 2006; Sandberg *et al.*, 2005; van Dongen *et al.*, 2003). Další možnou detekcí je též detekce některých chromozomových aberací. Nejpropracovanějším a celosvětově nejvyužívanějším systémem mnohonásobných reakcí PCR je protokol Biomed-2 (The European Biomedicine and Health) (Gallardo *et al.*, 2008; van Dongen *et al.*, 2003). U těchto variant je míra detekce skoro 100 % a senzitivita je zde 1 - 10 %. V některých případech i méně než 1 % (Mitha *et McGlennen*, 2001; Nelson *et al.*, 2007; van Dongen *et al.*, 2003).

Nově se také objevuje zcela nový přístup detekce klonality lymfocytů. Všechny dosud uvedené varianty jsou pouze kvalitativní. Vyskytují se ale případy, kdy pouze informace o přítomnosti či nepřítomnosti nestačí a je zapotřebí kvantitativní zhodnocení. Jedním z těchto případů je vyšetření minimální reziduální choroby. To je stav, kdy díky klinické terapii už nejsou maligní buňky detekovatelné běžnými technikami. Ale stále je v těle pacienta relativně velké množství těchto buněk, které by v budoucnu mohly být původci relapsu onemocnění (Flohr *et al.*, 2008; Hoshino *et al.*, 2004). Právě z tohoto důvodu je zapotřebí sledovat množství těchto buněk. Pro kvantitativní zhodnocení lze použít kvantitativní PCR v reálném čase. Principem této varianty je provedení klasické analýzy na BcR nebo TcR nejčastěji pomocí Biomed-2. Po vyhodnocení a v přítomnosti monoklonality jsou výsledné fragmenty tvořící proužky na gelu osekvenovány. Díky známé sekvenci je možné připravit specifické primery pro danou přeskupenou variantu DNA, kterou zkoumané maligní buňky obsahují a následně je možné provedení kvantitativní PCR v reálném čase (Flohr *et al.*, 2008; Sayed *et al.*, 2009; Zehentner *et al.*, 2006).

Sekvenování fragmentů tvořících proužky na gelu může mít uplatnění i při běžné kvalitativní analýze. Lze ho například využít při výskytu abnormalit při analýze. Například Vargas *et al.* (2008) provedli klasickou analýzu VH-JH v systému Biomed-2. Ale při PCR s použitím primerů pro FR2 a JH se jim objevil proužek o velikosti 140 bp. Správně by měl

mít velikost 250 - 295 bp. Při použití primerů pro FR3 a JH se jim neobjevil žádný proužek. Proužek o velikosti 140 bp proužek byl osekvenován a zjistilo se, že obsahuje úsek kódující část V segmentu, kam nasedají primery FR2 a také úsek kódující část J segmentu. Zbytek sekvence byl deletován. Tudíž primery pro FR3 oblast neměly kam nasedat a amplifikace neproběhla. Tento výsledek ukazuje, že se skutečně jedná o monoklonálně zmnožené buňky s přestavěnými genovými segmenty. Jak je zde vidět, tak výskyt produktů o jiných než očekávaných velikostech nemusí znamenat nepřítomnost monoklonálně zmnožených lymfocytů.

Díky rychlému provedení, nízkým nákladům, běžné laboratorní instrumentaci a potřebě relativně malého množství méně kvalitní DNA byl namáhavý, pracný a časově náročný Southernův přenos v detekci klonalit lymfocytů v dnešní době téměř úplně nahrazen PCR technikami (Halldórsdóttir *et al.*, 2007; Mitha *et* McGlennen, 2001; van Dongen *et al.*, 2003).

Díky potřebě jen malého množství DNA a menších nároků na její kvalitu je možné pomocí PCR technik, na rozdíl od Southernova přenosu, provádět analýzy klonalit i ze tkání fixovaných ve formol-parafinových bločcích, které jsou dnes patrně nejrozšířenější způsob fixace v hematopatologii (Gurbity *et al.*, 2003; Halldórsdóttir *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007; van Dongen *et al.*, 2003).

Velkou nevýhodou je u PCR analýz velká míra falešně negativních výsledků, nejčastěji vznikajících v důsledku nesprávného nasedání primerů na DNA způsobeného například somatickou hypermutací (Gurbity *et al.*, 2003; Hummel *et al.*, 2006; Medeiros *et* Carr, 1999).

2.3.3.2.1 Biomed-2

Vzhledem k velkému výskytu falešně negativních výsledků, které stále bránily uvedení PCR technik detekce klonality lymfocytů do běžné klinické praxe, se skupina přibližně 90 hematopatologů, imunologů a molekulárních biologů koncem devadesátých let rozhodla modifikovat provedení PCR tak, aby bylo co nejvíce spolehlivé a bylo možné jej používat pro analýzy v klinickém prostředí. Do toho projektu, který byl pojmenován Biomed-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936, bylo zapojeno 47 laboratoří ze 7 evropských zemí. Projekt měl dvě pracovní fáze. Nejdříve bylo třeba připravit a standardizovat PCR protokol pro detekci přestaveb BcR a TcR genových segmentů a pro detekci dobře definovaných chromozomových aberací. Poté následovala druhá fáze a to vyhodnocení možností uplatnění

protokolu PCR a primerových setů pro analýzu klonality u maligních lymfoproliferací (van Dongen *et al.*, 2003; van Krieken *et al.*, 2007).

V roce 2003 dospěl tento výzkum do zdárného konce. Výsledkem byl set PCR reakcí detekujících BcR a TcR přestavby, ale také translokace t(11;14) a t(14;18), které jsou charakteristické pro některé druhy lymfomů. Například t(14;18) je asociovaná s folikulárním lymfomem (Luthra *et al.*, 1998; van Dongen *et al.*, 2003).

Celkem tento set obsahuje celkem 107 primerů, aby bylo přeskupení genových segmentů kompletně pokryto a předešlo se tak falešné negativitě. Primery byly sestaveny do 18 mnohonásobných reakcí PCR (3 reakce pro VH-JH přeskupení u IGH, 2 pro DH-JH, 2 pro přeskupení na IGK, 1 pro IGL, 3 pro TcRB, 2 pro TcRG, 1 pro TcRD, 3 pro detekci translokací mezi Bcl1 lokusem a JH segmentem IGH a 1 mezi Bcl2 lokusem a JH segmentem). Jak již bylo uvedeno, tak PCR techniky trpěly hodně na falešně negativní výsledky, které byly nejčastěji způsobeny somatickou hypermutací. Ta postihuje pouze V segmenty. Z tohoto důvodu při použití DH-JH úseku pro detekci není analýza somatickou hypermutací zatížena. Celkově lze teoreticky použitím kombinace VH-JH, DH-JH a IGK úseků detekovat všechny monoklonality u B-lymfocytů a kombinací TcRB a TcRG všechny T-monoklonality (van Dongen *et al.*, 2003). Analýza přeskupení na TcRA řetězci se neprovádí. Jedná se o velice složitou oblast, vzhledem k vmezezení TcRD řetězce (van Krieken *et al.*, 2007).

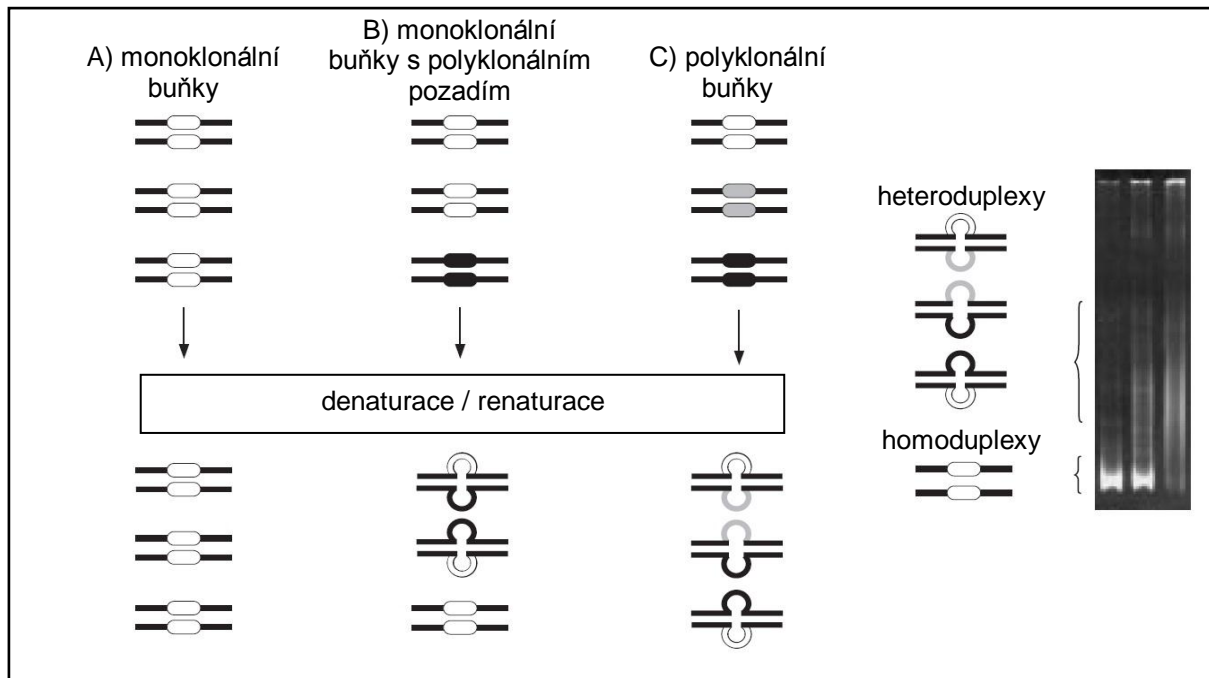
Pro odrušení polyklonálního pozadí se doporučuje používat heteroduplexní analýzu nebo novější technologii GeneScanning (Sandberg *et al.*, 2005; van Dongen *et al.*, 2003).

Polyklonální pozadí je tvořeno díky tomu, že při izolaci gDNA je izolována tato nukleová kyselina ze všech přítomných buněk. Těmi jsou kromě lymfocytů i buňky vlastní tkáň. Lymfocyty mohou být maligního, monoklonálního či reaktivního polyklonálního charakteru. V některých případech, kdy by se ve vzorku vyskytovaly polyklonálně zmnožené lymfocyty, tak by mohly mít vliv na výsledek analýzy. Je to dáno tím, že i v nepřítomnosti monoklonálních lymfocytů by mohly lymfocyty polyklonálně namnožené produkovat v reakci PCR produkty, které by se na gelu projevíly velice podobně, jak je tomu v případě monoklonálních lymfocytů a dávaly by tak falešně pozitivní výsledky (van Dongen *et al.*, 2003).

Heteroduplexní analýza byla původně používána pro detekci mutací u genetických poruch, ale později začala být používána právě pro analýzu produktů po PCR při vyšetřování klonalit u lymfocytárních receptorů (Langerak *et al.*, 1997).

Její princip je založen na denaturaci DNA a její následné rychlé renaturaci. Díky tomuto postupu dochází v případě monoklonálních populací lymfocytů ke vzniku homoduplexů, tedy úseků dsDNA se 100 % komplementaritou vláken. Naopak u polyklonálních populací vznikají heteroduplexy, což jsou úseky dsDNA, které nemají plně komplementární charakter vláken a v místech kde nejsou komplementární úseky dochází ke vzniku jednořetězcových DNA (ssDNA, single-stranded DNA) úseků. Tyto ssDNA úseky způsobují místní rozvolnění dvouvlákna DNA. Při gelové elektroforéze pak mají heteroduplexy menší mobilitu než homoduplexy právě díky místním rozvolněním. Navíc vznikají vždy heteroduplexy s různě velkou shodou v komplementaritě a tudíž i s různým počtem a velikostí ssDNA úseků. Toto se na gelu projevuje vznikem roztáhlého neohrazeného „smearu“ na rozdíl od jasně ohraničeného proužku tvořeného homoduplexy u monoklonální populace lymfocytů (obr. 8) (van Dongen *et al.*, 2003; González *et al.*, 1999; Langerak *et al.*, 1997).

Pro denuraci se obvykle používá teplota okolo 95°C po dobu 5 min. (van Dongen *et al.*, 2003). Pro renaturaci je možné používat teploty v rozmezí od 40°C do 4°C. Závisí na produktu, který se analyzuje. Celkově se ale proužky jeví nejčistší při renaturaci za teploty 4°C (García-Sanz *et al.*, 1999).



Obr. 8: Schéma průběhu heteroduplexní analýzy (převzato z Langerak *et al.*, 1997); Příklady obsahu buněk ve vzorku A), B) a C) jsou ve stejném pořadí naneseny na uvedeném gelu

Druhá uvedená metoda, GeneScanning, neboli též fluorescenční fragmentová analýza, je založena na používání jednoho z primerů označených fluorochromním barvivem. Po PCR jsou denaturované jednořetězcové produkty separovány na denaturačním polyakrylamidovém sekvenačním gelu. Poté proběhne vyhodnocení a na základě fluorescenčních spekter je určen tvar rozložení výsledného grafu, ze kterého lze určit, zda se jedná o polyklonalitu, či monoklonalitu. Citlivost metody Biomed-2 je v případě použití heteroduplexní analýzy 1 - 10 % a v případě použití metody GeneScanning 0,5 % - 5 % (Gallardo *et al.*, 2008; Sandberg *et al.*, 2005; van Dongen *et al.*, 2003).

V rámci vývoje PCR systému Biomed-2 bylo otestováno celkem 90 vzorků. Jednalo se převážně o B-malignity, ale byly zde zastoupeny i T-malignity, či reaktivní tkáně. Robustnost tohoto systému byla v největší míře prokázána v případě B-malignit. V případě analýzy pouze VH-JH přeskupení byla detekční míra 82 %. Se společným použitím analýzy DH-JH přeskupení vzrostla míra detekce na 92 %. Při současném použití analýzy IGK dosáhla tato míra již 98%. V případě T-lymfocytárních klonalit se dosáhlo téměř 99 % detekční míry (van Krieken *et al.*, 2007). Na závěr byla tato metoda úspěšně vyzkoušena i v provedení analýzy z formol-parafinových bločků (van Dongen *et al.*, 2003).

Po uvedení této technologie následovalo mnoho výzkumů, které si kladly za cíl otestovat spolehlivost tohoto systému. Jedním z nich byl test prováděný Liu *et al.* (2007), který testoval, zda je Biomed-2 vhodný i na formol-parafinové bločky. Zjistilo se, že díky amplifikovaným fragmentům o velikosti kolem 300 bp a menší je možné Biomed-2 bez problému na analýzu DNA z těchto bločků aplikovat. Nevyskytl se žádný výrazný rozdíl ve výsledcích mezi testováním čerstvé tkáně a tkáně z bločků.

Další výzkum provedli Evans *et al.* (2007), během kterého bylo otestováno 369 vzorků z různých druhů lymfoidních malignit, ze kterých se jim podařilo detekovat 367 (99 %). Výsledkem tohoto výzkumu bylo potvrzení faktu, že Biomed-2 je velice spolehlivý a funguje při analýze vzorků ze všech druhů lymfoidních malignit bez rozdílu toho, jakého jsou původu.

Vzhledem k výše uvedené vysoké spolehlivosti a citlivosti, komerční dostupnosti a mnohonásobnému otestování se Biomed-2 stal nejpoužívanější metodou detekce klonalit genových přeskupení u BcR a TcR. Dalším pozitivem Biomed-2 je i ten fakt, že díky velkému rozšíření byla již mnohokrát ověřena (Halldórsdóttir *et al.*, 2007; van Krieken *et al.*, 2007).

3 CÍLE PRÁCE

- 1) Zavedení a optimalizace metody sloužící k analýze klonální proliferace lidských B-lymfocytů.
- 2) Využití této metody k analýze klinických vzorků, u kterých nelze po klasických vyšetřeních s jistotou určit diagnózu, a na základě informace, zda se jedná o polyklonalitu či monoklonalitu B-lymfocytů, pomoci tuto diagnózu upřesnit.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Metody

4.1.1 Izolace genomické DNA z formol-parafinových bločků

Genomická DNA (gDNA) byla standardně izolována ze tkáně fixované ve formol-parafinových bločcích. Izolace byla prováděna za použití Puregene Core Kitu A (Qiagen). Postup byl převzatý z laboratorního manuálu Gentra Puregene Handbook – March 2007 (Qiagen) a mírně modifikován.

- 1) Do jedné 1,5 ml mikrozkušavky bylo na mikrotomu nařezáno 7 – 15 řezů tkáně z formol-parafinového bločku. Počet řezů závisí na velikosti tkáně v bločku. Řezy připravuje personál histopatologické laboratoře.
- 2) Do mikrozkušavky bylo přidáno 800 μ l xylenu, vzorek byl promíchán na vortexu a inkubován 7 min na rotátoru. Následovala centrifugace 3 min při 13 000 otáčkách za min (rpm, revolutions per minute) a supernatant byl opatrně odpipetován. Tento krok byl prováděn celkem 4x aby došlo k dokonalému odstranění parafinu, který by mohl v dalších fázích izolace způsobovat komplikace.
- 3) Do mikrozkušavky bylo napipetováno 800 μ l 96 % etanolu, vzorek byl promíchán na vortexu, inkubován 7 min na rotátoru, následovala centrifugace 3 min při 13 000 rpm a odsátí supernatantu. V 800 μ l 96 % etanolu byl vzorek promýván ještě jednou 7 min, následovala centrifugace 6 min při 13 000 rpm a odpipetování supernatantu. Ještě jednou probíhala centrifugace 1 min při stejné rychlosti a odpipetování zbytku supernatantu.
- 4) Sušení vzorku 10 min při 37°C v termobloku s otevřeným víčkem mikrozkušavky.
- 5) Do mikrozkušavky bylo přidáno 320 μ l lyzačního pufru a drtítkem byl vzorek důkladně homogenizován. Do vzorku bylo přidáno 8 μ l proteinázy K, směs byla krátce promíchána na vortexu a inkubována přes noc při 55°C v inkubované třepačce.
- 6) Následující den bylo ke vzorku přidáno 8 μ l proteinázy K, inkubace pokračovala při 55°C 1 h. Pro větší efektivnost byl vzorek vždy po 10 min krátce promíchán na vortexu.

- 7) Bylo přidáno 0,7 µl RNazy A. Vzorek byl promíchán přibližně 20x obrácením v ruce. Dále probíhala inkubace 45 min při 37°C v termobloku za občasného promíchání obrácením v ruce. Tento krok nebyl zcela nezbytný, ale z důvodu zlepšení kvality vzorku gDNA byl zařazen.
- 8) Po inkubaci v termobloku byl vzorek 2 min inkubován na ledu.
- 9) Do mikrozkušavky bylo přidáno 120 µl protein-precipitačního roztoku a vzorek byl inkubován další 2 min na ledu. Vzorek byl důkladně 20 s vortexován a následně byl centrifugován 6 min při 13 000 rpm.
- 10) Mezitím co probíhala centrifugace, bylo do čisté 1,5 ml mikrozkušavky pipetováno 450 µl izopropanolu. Po skončení centrifugace byl do této zkušavky opatrně pipetován supernatant z centrifugovaného vzorku. Mikrozkušavka s peletem nebyla dále potřebná. Mikrozkušavka s obsahem izopropanolu byla důkladně vortexována, po dobu 10 min centrifugována při 13 000 rpm a supernatant byl opatrně odpipetován.
- 11) Ke vzorku bylo přidáno 400 µl 70 % etanolu vychlazeného na 4°C a vortexem byl vzorek promíchán. Centrifugace 6 min při 13 000 rpm. Supernatant byl opatrně odpipetován. Opět centrifugace 1 min při stejných otáčkách. Zbylý supernatant byl opatrně odpipetován a vzorek byl nechán 40 min vysychat při laboratorní teplotě s otevřeným víčkem.
- 12) Bylo přidáno 50 µl DNA hydratačního pufru, vzorek byl lehce při středních otáčkách vortexován a uložen do ledničky do 4°C. Pro dlouhodobější uchování byl vzorek uložen do -20°C.

4.1.2 Izolace genomické DNA z lymfocytů periferní krve

Z 5 ml nesrážlivé periferní krve byly izolovány lymfocyty pomocí Lymfoprepu[®]. Dále probíhala izolace obdobně jako v případě izolace gDNA z formol-parafinových bločků od fáze lyze buněk.

- 1) K 5 ml nesrážlivé periferní krve bylo přidáno 5 ml 1x PBS.
- 2) Do dvou 15 ml zkušavek bylo pipetováno po 3 ml Lymfoprepu[®]. Na napipetovaný Lymfoprep[®] bylo velice opatrně navrstveno vždy 5 ml směsi 1x PBS a nesrážlivé periferní krve. Bylo potřeba dát pozor, aby se krev s Lymfoprepem[®] nepromíchaly.
- 3) Centrifugace zkušavek 30 min při 1 800 rpm.

- 4) Po centrifugaci byla směs rozdělena na 3 fáze (nahore krevní plazma – žlutá barva; uprostřed Lymfoprep[®] - téměř bezbarvá; dole erytrocyty – červená barva). Pasteurovou pipetou bylo provedeno odsátí lymfocytů, nacházejících se mezi krevní plazmou a Lymfoprem[®]. Zde vytvářely mléčně zakalenou tenkou vrstvu vytvářející prstenec. Lymfocyty byly přeneseny do čistých 15 ml zkumavek.
- 5) K lymfocytům bylo přidáno 8 ml 1x PBS, vzorky byly lehce promíchány. Následovala centrifugace 7 min při 1 200 rpm a odsátí supernatantu odsávačkou. Tento krok byl prováděn celkem 3x.
- 6) Při posledním odsávání supernatantu bylo malé množství (max. 1 ml) 1x PBS necháno ve zkumavkách. K tomuto množství bylo k lymfocytům připipetováno dalších 500 μ l 1x PBS. Pipetou byly vzorky důkladně promíchány a pipetovány do čistých 1,5 ml mikrozkuvek. Následovala 30 s centrifugace na minicentrifuze v režimu „short spin“.
- 7) Z jedné mikrozkuvky byl veškerý supernatant odpipetován a zůstal pouze pelet z lymfocytů. Tato zkumavka byla uložena do -80°C .
- 8) Ze druhé mikrozkuvky byl supernatant také odpipetován, ale přibližně 10 μ l supernatantu bylo v mikrozkuvce necháno. Důkladné promíchání peletu na vortexu.
- 9) Do mikrozkuvky bylo přidáno 300 μ l lyzačního pufru shodného jako u izolace gDNA z formol-parafinových bločků. Vzorek byl důkladně vortexován. Do mikrozkuvky bylo přidáno 0,6 μ l RNazy A.
- 10) Inkubace 15 min při 37°C v termobloku za občasného promíchání.
- 11) Následný postup byl již zcela shodný jako při izolaci gDNA z formol-parafinových bločků od bodu č. 8) – Inkubace 2 min na ledu, přidáno 120 μ l protein-precipitačního roztoku... (viz. výše)

4.1.3 Měření koncentrace gDNA ve vzorku

Koncentrace gDNA ve vzorcích byla měřena na přístroji NanoPhotometr.

- 1) Před zahájením měření byly vzorky lehce promíchány vortexem.
- 2) U vzorků byly změřeny absorbance při vlnových délkách 230, 260 a 280 nm, porovnány s „blankem“ a na základě naměřených hodnot přístroj vypočítal koncentraci izolované DNA v $\text{ng}/\mu\text{l}$.

- 3) Při spektrofotometrickém stanovení nebylo možné odlišit, zda se jedná o DNA či RNA, a proto byl při izolaci gDNA zařazen krok inkubace s RNázou A.

4.1.4 Příprava deionizované vody ošetřené DEPC (DEPC H₂O)

Vzhledem ke skutečnosti, že na našem pracovišti bylo pracováno i s RNA, které byly používány i pro PCR, byla voda používaná pro všechny prováděné PCR ošetřena inhibitorem ribonukleáz (RNáz) diethylpyrokarbonátem (DEPC).

- 1) Ze zásobního roztoku DEPC a deionizované vody byl připraven 0,1 % roztok DEPC
- 2) Následovala inkubace po dobu 24 h při 37°C pro odstranění RNáz z roztoku
- 3) Na závěr bylo provedeno autoklávování po dobu 20 min při teplotě 120°C, aby se zastavil účinek DEPC

4.1.5 Reakce PCR

Pro amplifikaci úseků DNA kódujících IGH byly používány varianty mnohonásobné (multiplex) PCR a poloodstupňované (seminested) PCR.

Nejprve byla prováděna analýza genu IGH za pomoci PCR systému skládajícího se ze dvou klasických reakcí PCR a dvou poloodstupňovaných reakcí PCR. V případě klasických reakcí PCR byly používány primery nasedající do oblastí FR2 (primer JH2-S) a FR3 (primer JH1-S). Proti nim byl v obou případech použit primer JH-A, který nasedá na konsenzuální sekvenci vyskytující se ve všech šesti J segmentech IGH (Mitha *et* McGlennen, 2001; Svachova *et* Tichy, 2008).

Pro první a druhé kolo poloodstupňovaných reakcí PCR byly používány rozdílné pouze vnitřní a vnější primery nasedající do J-oblasti IGH genu. Jednalo se o primery LJH a VLJH. Proti nim byly používány stejné primery v obou kolech PCR, nasedající do oblastí regionu FR2 (FR-2A) popřípadě FR3 (FR-3A) (Nihal *et al.*, 2000; Svachova *et* Tichy, 2008).

Později byla analýza prováděna systémem PCR skládajícího se ze 3 mnohonásobných reakcí PCR analyzujících kompletní VH-JH přeskupení, využívající primerové sady pro FR1, FR2 a FR3 regiony, proti kterým byl vždy použit JH primer nasedající na konsenzuální sekvenci všech šesti J segmentů (van Dongen *et al.*, 2003).

Pro pozitivní a negativní kontrolu byly používány primery CF 20i-5' a CF 20i-3' nasedající na DNA do oblasti exonu 20 provozního genu CF (cystic fibrosis) (Grossman *et al.*, 1994) skládajícího se celkově z 24 exonů a nacházejícího se na 7. chromozomu. Produktem tohoto genu je transmembránový regulátor cystické fibrózy (CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) (Riordan *et al.*, 1989).

4.1.5.1 Systém PCR využívající pro detekci IGH genu dvou klasických a dvou poloodstupňovaných reakcí PCR

Pracovní postup byl proveden podle Svachova *et Tichy* (2008) a byl částečně modifikován.

- 1) V pracovním postupu dle Svachova *et Tichy* (2008) bylo určeno jako optimální množství 50 – 500 ng gDNA na jednu reakci. V našich podmínkách bylo zvoleno dodávat do reakce vždy 300 ng gDNA. Reakční směs byla do výsledného objemu 25 μ l byla doplňována DEPC H₂O.
- 2) Pro analýzu jednoho vzorku bylo potřeba pro první kolo PCR připravit směs celkem do 6 0,5 ml mikrozkušavek. Do 2 mikrozkušavek byly použity primery pro klasické PCR, do dalších 2 mikrozkušavek primery pro první kolo poloodstupňovaných PCR, a po jedné mikrozkušavce pro pozitivní a negativní kontrolu (tab. II, III). V případě pozitivní kontroly byla do reakce přidána gDNA z analyzovaného vzorku ve stejném množství jako v ostatních mikrozkušavkách. U negativní kontroly byla gDNA nahrazena DEPC H₂O. Pro pozitivní i negativní kontrolu byla též použita klasická varianta PCR.
- 3) Míchání reagensů a celková příprava PCR byla prováděna za sterilních podmínek v laminárním boxu.
- 4) Do šesti 0,5 ml mikrozkušavek pro jeden vzorek byly pipetovány příslušné primery ze zásobního 7 μ M roztoku (tab. III) a reagensie v potřebném množství (tab. IV).

Tab. II: Sekvence primerů (převzato z Svachova *et* Tichy, 2008)

Primery pro IgH genový komplex	
JH1 – S	5' – CTG TCG ACA CGG CCG TGT ATT ACT G – 3'
JH2 – S = FR – 2A	5' – TGG (A/G)TC CG(C/A) CAG (G/C)C(T/C) (T/C)CN GG – 3'
JH – A	5' – AAC TGC AGA GGA GAC GGT GAC C – 3'
FR – 3A	5' – ACA CGG C(C/T)(G/C) TGT ATT ACT GT – 3'
LJH	5' – TGA GGA GAC GGT GAC C – 3'
VLJH	5' – GTG ACC AGG GTN CCT TGG CCC CAG – 3'
Primery pro provozní gen CF	
CF 20i-5'	5' – GGT CAG GAT TGA AAG TGT GCA – 3'
CF 20i-3'	5' – CTA TGA GAA AAC TGC ACT GGA – 3'

Tab. III: Přehled a použití jednotlivých primerů

Zkumavka č.:	Primery:	Varianta:	Velikost získaných produktů [bp]:
1	JH1 – S	klasická PCR, jednokolové	100 – 150
	JH – A		
2	JH2 – S	klasická PCR, jednokolové	220 – 250
	JH – A		
3	FR – 2A	poloodstupňovaná PCR, první kolo	
	LJH		
4	FR – 3A	poloodstupňovaná PCR, první kolo	
	LJH		
5	CF 20i-5'	pozitivní kontrola, jednokolové	460 – 500
	CF 20i-3'		
6	CF 20i-5'	negativní kontrola, bez DNA	
	CF 20i-3'		
3-2	FR – 2A	poloodstupňovaná PCR, druhé kolo	240 – 260
	VLJH		
4-2	FR – 3A	poloodstupňovaná PCR, druhé kolo	100 – 120
	VLJH		
6-2	CF 20i-5'	negativní kontrola, bez DNA, druhé kolo	
	CF 20i-3'		

Tab. IV: Reakční směs o objemu 25 µl pro první kolo PCR

	Obsah jedné zkumavky PCR
10x ImmoBuffer:	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM):	2,0 µl
10 mM dNTPs:	1,2 µl
Immolase DNA Polymeráza (c = 5U/ µl):	0,3 µl
7 µM Primer F:	2,5 µl
7 µM Primer R:	2,5 µl
Templát:	300 ng
DEPC H ₂ O:	Doplníme do 25µl

5) Mikrozukavky byly přeneseny do termocycleru a bylo provedeno PCR. Používaná Immolase (Bioline) je DNA polymeráza s horkým startem („hot-start“), proto byla nutná počáteční aktivační denaturace v programu PCR (tab. V). Doba běhu programu byla 1,5 h.

Tab. V: Teplotní schéma prvního kola PCR cyklu

Inicializace reakce:	95°C	7 min	
Vlastní PCR:			
Denaturace DNA:	95°C	20 s	35x
Annealing primerů:	58°C	20 s	
Elongace:	72°C	15 s	
Finální elongace:	72°C	10 min	
Zchlazení na 4°C			

6) Do tří 0,5 ml mikrozukavek byla namíchána směs příslušných reagensů (tab. VI) a primerů (tab. III) pro druhé kolo PCR.

Tab. VI: Reakční směs o objemu 25 µl pro druhé kolo PCR

	Obsah jedné zkumavky PCR
10x ImmoBuffer:	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM):	2,0 µl
10 mM dNTPs:	1,2 µl
Immolase DNA Polymeráza (c = 5U/ µl):	0,3 µl
7 µM Primer F:	2,5 µl
7 µM Primer R:	2,5 µl
Templát:	0,5 µl (přeneseno ze zkumavek z prvního kola PCR)
DEPC H ₂ O:	13,5 µl

- 7) Z mikrozkušavek s PCR prvního kola obsahujících primer LJH (zkumavky č. 3, 4) a negativní kontrolu (zkumavka č. 6) bylo přepipetováno po 0,5 µl produktu do mikrozkušavek druhého kola PCR obsahujících primer VLJH a negativní kontrolu (zkumavky č. 3-2, 4-2, 6-2) (tab. III).
- 8) Mikrozkušavky byly přeneseny do termocycleru, kde byl nastaven program druhého kola PCR. Ten měl stejné teplotní schéma jako v prvním kole (tab. V), ale cyklus probíhal pouze 20x místo 35x. Doba průběhu druhého kola PCR byla 1 h a 5 min.
- 9) Po skončení druhého kola PCR byly vzorky vyjmuty z termocycleru a uloženy do 4°C. Později byly použity pro separaci na agarózové gelové elektroforéze.

4.1.5.2 Systém PCR využívající pro detekci kompletních VH-JH přeskupení IGH genu tří mnohonásobných reakcí PCR

Pracovní postup byl částečně převzat z van Dongen *et al.* (2003) a byl upraven pro provedení s použitím reagentů podle Svachova *et Tichy* (2008).

- 1) Do reakce bylo opět přidáváno 300 ng gDNA. Celkový objem jedné reakční směsi byl 25 µl a pro doplnění tohoto objemu se opět doplňovala DEPC H₂O.
- 2) V tomto systému bylo pro analýzu jednoho vzorku potřeba pět 0,5 ml mikrozkušavek. Ve 3 z nich byly prováděny mnohonásobné reakce PCR se směsmi primerů A, B, C. V těchto

zkumavkách byly jednotlivé směsi primerů, z nichž na jednom konci nasedaly primery do FR1 regionu VH oblasti IGH genu v případě směsi A, FR2 regionu u směsi B a FR3 ve směsi C. Proti nim byl vždy použit JH primer opět nasedající na JH oblasti IGH genu (tab. VII). Zbylé 2 mikrozkušavky byly použity pro pozitivní a negativní kontrolu se stejným provedením jako v předchozím systému.

- 3) Následný postup byl shodný s provedením v předchozím systému. Vše bylo připravováno za sterilních podmínek v laminárním boxu.

Tab. VII: Sekvence primerů (převzato z van Dongen *et al.*, 2003; Svachova *et Tichy*, 2008)

Primery pro IgH genový komplex	
Směs A	
VH1 – FR1	5' – GGC CTC AGT GAA GGT CTC CTG CAA G – 3'
VH2 – FR1	5' – GTC TGG TCC TAC GCT GGT GAA ACC C – 3'
VH3 – FR1	5' – CTG GGG GGT CCC TGA GAC TCT CCT G – 3'
VH4 – FR1	5' – CTT CGG AGA CCC TGT CCC TCA CCT G – 3'
VH5 – FR1	5' – CGG GGA GTC TCT GAA GAT CTC CTG T – 3'
VH6 – FR1	5' – TCG CAG ACC CTC TCA CTC ACC TGT G – 3'
Směs B	
VH1 – FR2	5' – CTG GGT GCG ACA GGC CCC TGG ACA A – 3'
VH2 – FR2	5' – TGG ATC CGT CAG CCC CCA GGG AAG G – 3'
VH3 – FR2	5' – GGT CCG CCA GGC TCC AGG GAA – 3'
VH4 – FR2	5' – TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG G – 3'
VH5 – FR2	5' – GGG TGC GCC AGA TGC CCG GGA AAG G – 3'
VH6 – FR2	5' – TGG ATC AGG CAG TCC CCA TCG AGA G – 3'
VH7 – FR2	5' – TTG GGT GCG ACA GGC CCC TGG ACA A – 3'
Směs C	
VH1 – FR3	5' – TGG AGC TGA GCA GCC TGA GAT CTG A – 3'
VH2 – FR3	5' – CAA TGA CCA ACA TGG ACC CTG TGG A – 3'
VH3 – FR3	5' – TCT GCA AAT GAA CAG CCT GAG AGC C – 3'
VH4 – FR3	5' – GAG CTC TGT GAC CGC CGC GGA CAC G – 3'
VH5 – FR3	5' – CAG CAC CGC CTA CCT GCA GTG GAG C – 3'
VH6 – FR3	5' – GTT CTC CCT GCA GCT GAA CTC TGT G – 3'
VH7 – FR3	5' – CAG CAC GGC ATA TCT GCA GAT CAG – 3'
Zpětný primer	
JH	5' – CTT ACC TGA GGA GAC GGT GAC C – 3'
Primery pro provozní gen CF	
CF 20i-5'	5' – GGT CAG GAT TGA AAG TGT GCA – 3'
CF 20i-3'	5' – CTA TGA GAA AAC TGC ACT GGA – 3'

- 4) Potřebné reagenty (tab. VIII) byly namíchané do 0,5 ml mikrozkušavek a do těchto mikrozkušavek byly přidány příslušné primery ze zásobního 7 μM roztoku v případě primerů CF 20i-5' a CF 20i-3' a ze zásobního 10 μM roztoku v případě ostatních primerů (tab. IX).

Tab. VIII: Reakční směs PCR o objemu 25 μl

	Obsah jedné zkumavky PCR
10x ImmoBuffer:	2,5 μl
MgCl ₂ (50 mM):	2,2 μl
10 mM dNTPs:	1,2 μl
Immolase DNA Polymeráza (c = 5U/ μl):	0,3 μl
10 μM Primer(y) F: (7 μM u CF 20i-5')	0,5 μl (u CF 20i-5' 2,5 μl)
10 μM Primer R: (7 μM u CF 20i-3')	0,5 μl (u CF 20i-3' 2,5 μl)
Templát:	300 ng
DEPC H ₂ O:	Doplníme do 25 μl

Tab. IX: Přehled a použití jednotlivých primerů

Zkumavka č.:	Primery:	Varianta:	Velikost získaných produktů [bp]:
A	Směs A	mnohonásobné PCR	310 – 360
	JH		
B	Směs B	mnohonásobné PCR	250 – 295
	JH		
C	Směs C	mnohonásobné PCR	100 – 170
	JH		
K ⁺	CF 20i-5'	pozitivní kontrola	460 – 500
	CF 20i-3'		
K ⁻	CF 20i-5'	negativní kontrola, bez DNA	
	CF 20i-3'		

- 5) Mikrozkušavky byly přeneseny do termocycleru, kde byla spuštěna reakce PCR (tab. X), jejíž provedení trvalo 3 h a 20 min.

Tab. X: Teplotní schéma PCR cyklu

Inicializace reakce:	95°C	7 min	
Vlastní PCR:			
Denaturace DNA:	95°C	45 s	35x
Annealing primerů:	60°C	60 s	
Elongace:	72°C	90 s	
Finální elongace:	72°C	10 min	
Zchlazení na 4°C			

- 6) Po skončení programu byly vzorky uloženy do 4°C. Následně byly použity pro heteroduplexní analýzu a gelovou elektroforézu na polyakrylamidovém gelu.

4.1.6 Heteroduplexní analýza

K odrušení polyklonálního pozadí byla používána heteroduplexní analýza produktů vzniklých v průběhu PCR, která byla v našich podmínkách prováděna v termocycleru za následujících teplotních podmínek:

- 1) denaturace: 96°C po dobu 6 min
- 2) renaturace: 4°C po dobu 1 h

4.1.7 Gelová elektroforéza

4.1.7.1 Agarózová gelová elektroforéza

Tento typ gelové elektroforézy (GE) byl používán pro vyhodnocování výsledků PCR systému amplifikace úseků genu pro IGH, zahrnujícího dvě poloodstupňované PCR a dvě klasické PCR (Svachova *et* Tichy, 2008). Byla prováděna horizontální agarózová GE s použitím 2,5 % agarózového gelu a TAE pufu.

- 1) Bylo naváženo 2,5 g agarózy, ta byla smíchána se 100 ml 1x TAE pufu a směs byla řádně promíchána. Následně byla sestavena forma na přípravu agarózového gelu.

- 2) V mikrovlnné troubě byla směs pufru s agarózou přivedena k varu. Následně bylo zahřívání přerušeno a směs byla promíchána. Poté byla opět zahřívána do bodu varu a promíchána. Takto byla agaróza zahřívána a promíchávána do doby, než vytvořila homogenní a čirý roztok bez sraženin.
- 3) Roztok byl nechán 3 min chladit při laboratorní teplotě za občasného promíchání. Následně bylo přidáno 10 μ l ethidium bromidu, roztok byl promíchán a nalit do připravené formy. Do formy byl zasazen hřeben vytvářející v gelu nanášecí jamky a roztok byl nechán 30 min tuhnout ve formě při laboratorní teplotě.
- 4) Z formy byl vyjmut hřebínek a forma byla rozebrána. Gel umístěný na podložce byl umístěn do elektroforetické vany naplněné 1x TAE pufrem tak, aby byl celý gel pod hladinou.
- 5) Do jamek v gelu byly nanášeny vzorky po provedené PCR. Vždy bylo smícháno 9 μ l vzorku se 3 μ l 1x Gel „loading“ pufru a nanášeno opatrně do jamek. Gel „loading“ pufr byl připraven zředěním zásobního roztoku tohoto pufru 40 % glycerolem v poměru 1 : 9 (pufr : glycerol). Na gel bylo také nanášeno 7 μ l velikostního standardu HyperLadder V[®].
- 6) Byla provedena GE. Doba běhu byla 45 min při napětí 80 V. Po skončení GE byl gel vyndán z elektroforetické vany, přenesen pod zdroj UV světla, vyfocen a v počítačovém programu BioCaptMW (Vilber Lourmat) byl obraz zpracován, uložen v počítači a vyhodnocen.

4.1.7.2 Gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Tento druh GE byl používán pro vyhodnocování výsledků po proběhnutém PCR systému 3 mnohonásobných reakcí (van Dongen *et al.*, 2003). Byla prováděna vertikální GE za použití 8 % polyakrylamidového (PAA) gelu a TBE pufru.

- 1) Byla sestavena aparatura pro přípravu gelu sestávající ze dvou skel, majících mezi sebou mezeru (0,75 mm) a podpurných držáků pro uchycení těchto skel do vertikální polohy.

- 2) V čisté plastové 50 ml Falconově zkumavce bylo smícháno 3,15 ml 2x předestilované sterilizované vody (ddH₂O), 1,35 ml 30 % směsi akrylamidu a N,N'-metylenbisakrylamidu (poměr 5 : 1) (AA) a 500 µl 10x TBE pufru. Roztok byl důkladně promíchán. Následně bylo přidáno 35 µl 10 % amonium persulfátu (APS) a 5 µl N,N,N,N-tetramethylethylendiaminu (TEMED). Roztok byl důkladně promíchán a Pasteurovou pipetou byl nanesen do prostoru mezi připravenými skly. Byl nalit až po okraj menšího skla. Do roztoku mezi skla byl ponořen hřeben, který po zpolymerizování gelu vytvořil nanášecí jamky. Uvedená množství použitých látek byla použita pro přípravu jednoho 8 % PAA gelu. Pro více gelů byl používán požadovaný násobek těchto hodnot (tab. XI)

Tab. XI: Přehled složení 8 % PAA gelu a násobná množství

	1 gel	2 gely	4 gely
dd H ₂ O:	3,15 ml	6,3 ml	12,6 ml
30 % AA:	1,35 ml	2,7 ml	5,4 ml
10x TBE pufr:	500 µl	1 ml	2 ml
10 % APS:	35 µl	70 µl	140 µl
TEMED:	5 µl	10 µl	20 µl

- 3) Po dobu 30 min byl gel nechán polymerizovat. Následně byla skla vyjmuta ze stojanu a byla přenesena do elektroforetické kazety. V kazetě byla umístěna do elektroforetické vany, kde byl z gelu vyjmut hřeben. Následně byl do vany nalit 1x TBE pufr.
- 4) Do nanášecích jamek na gelu byly nanесeny vzorky a velikostní standard HyperLadder V[®]. Vzorku bylo vždy použito 12,5 µl a smícháno s 2,5 µl 1x Gel „loading“ pufru. Velikostního standardu bylo nanášeno 6 µl.
- 5) Následovalo provedení GE. Nejprve bylo použito napětí 80 V po dobu 30 min a poté následovalo přepnutí napětí na 100 V na dobu 50 min.

- 6) Po skončení GE bylo nutné gel obarvit fluorescenčním barvivem GelRed[®]. Kazeta byla vyjmuta z elektroforetické vany a rozebrána, skla byla oddělena od sebe a gel byl ze skla přenesen do barvicí misky s barvicím roztokem (tab. XII). V roztoku byla provedena inkubace 20 min na třepačce. Barvicí roztok bylo možné používat vícenásobně, ale poté bylo nutné prodlužovat délku barvení. Celkově bylo možné na jeden roztok obarvit až 8 gelů, přičemž barvení posledních gelů bylo nutné provádět po dobu 45 min.

Tab. XII: Složení barvicího roztoku pro PAA gel

destilovaná voda	45 ml
1M NaCl	5 ml
GelRed [®] 10 000x	15 μ l

- 7) Po skončení barvení byl gel opatrně vyjmut z barvicího roztoku a přenesen na kousek nefluoreskující folie. Za pomoci folie byl gel přenesen pod zdroj UV světla, vyfocen a v počítačovém programu BioCaptMW (Vilber Lourmat) byl obraz zpracován, uložen v počítači a vyhodnocen.

4.2 Použité chemikálie a roztoky

Agaróza	(Serva)
Akrylamid : N,N' – methylenbisakrylamid - 40 % - poměr AA : MBAA = 5 : 1	(Fluka Analytical)
Amonium persulfát (APS) – 98 %	(Sigma-Aldrich)
ddH ₂ O	
Diethyl pyrokarbonát (DEPC) – 97 %	
DNA Gel loading pufr – 10x	(Eppendorf)
dNTPs (dinukleotid trifosfáty) – 10 nM	(Invitrogen)
Etanol – 96 %	(Lach-Ner)
Ethidiumbromid (EtBr) – 10 mg/ml	(Q-Bio gene)
GelRed [®] - 10 000x	(Biotium)
Glycerol	(Lach-Ner)
HyperLadder V	(Bioline)
Immolase DNA polymeráza - 5U/μl - MgCl ₂ - 50 mM - ImmoBuffer – 10x	(Bioline) (Bioline) (Bioline)
Izopropanol	(Lach-Ner)
Lymfoprep [®]	(Axis-Shield)
N,N,N,N–tetramethylethylendiamin (TEMED) – 99 %	(Sigma-Aldrich)
NaCl	(Sigma-Aldrich)
PBS pufr – 10x	(Roche Diagnostics)
Proteináza K – 4 mg/ml	(Sigma-Aldrich)
Puregene Core Kit A - DNA hydratační pufr (DNA hydration solution) - lyzační pufr (Cell lysis solution) - protein-precipitační roztok (Protein precipitation solution)	(Qiagen)
RNaza (Ribonukleáza) A – 10 mg/ml	(Sigma-Aldrich)
TAE pufr – 50x	(Eppendorf)
TBE pufr – 10x	(Sigma-Aldrich)
Xylen	(Mach Chemikálie)

4.3 Použité vybavení laboratoře

Barvicí misky	(Sarstedt)
Centrifuga	
- Biofuge Fresco	(Heraeus)
- T 54	(MLW)
- Univerzal 32R	(Hettich)
Drtítka	(Eppendorf)
Falconovy zkumavky – 50 ml	
Kalkulačka – 036SE	(Peach)
Laminární box	(Labox)
Lednička	(Liebherr)
Mikrovlnná trouba	(Whirlpool)
Mikrozkumavky	
- 1,5 ml	(Dispolab)
- 0,5 ml	(Eppendorf)
Minicentrifuga – MiniSpin	(Eppendorf)
Mrazák - (-20°C)	(Liebherr)
- VIP Series (-80°C)	(Sanyo)
NanoPhotometr	(Implen)
Odsávačka	(Biometra)
Pasteurovy pipety – 3 ml	
Pipetovač - Easypet	(Eppendorf)
Pipety jednobáňové	(Eppendorf)
- 2,5 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1 000 µl, 10 ml	
Pipety skleněné - 10 ml, 5 ml	(Qualicolor)
Rotátor	(MIX 15)
Set na přípravu a provedení agarózové GE	(Bio-Rad)
- Sub-Cell GT agarose GE systems	
Set na přípravu a provedení PAA GE - Mini Protean 3	(Bio-Rad)
Skla pro PAA GE – 0,75 mm	(Bio-Rad)
Software pro zpracování obrazu pod UV - BioCaptMW	(VilberLourmat)
Stojánek na mikrozkumavky chlazený - Labtop Cooler	(Nalgene)
Stojánek na 1,5 ml mikrozkumavky na led	(Bel-Art)
– ScienceWare	
Termoblok - TB1 Thermoblock	(Biometra)
Termocycler	
- PTC-100	(MJ Research)
- PTC-200	(MJ Research)
Třepačka inkubovaná - Thermomixer komfort	(Eppendorf)
Třepačka na barvení - WT16	(Biometra)
Váha – GF-1200	(A & D instruments)
Vortex - Genie 2	(Fisher Scientific)
- MS1 Minishaker	(IKA)
Zdroj napětí pro agarózovou GE - PowerPAC 300	(Bio-Rad)
Zdroj napětí pro PAA GE - PowerPAC HC	(Bio-Rad)
Zdroj UV světla a kamera – 365 nm	(VilberLourmat)
Zkumavka – 15 ml	(Gama Group)

5 VÝSLEDKY

5.1 Zavedení a optimalizace metody

5.1.1 Izolace gDNA

Pro analýzu klonality bylo nejprve nutné vyizolovat gDNA z vyšetřované tkáně. Tkáň byla fixována do formol-parafinových bločků. Izolace gDNA z těchto bločků byla prováděna za pomoci Puregene Core Kitu A (Qiagen). Již při první izolaci byla úspěšně získána gDNA v dostačující kvalitě i čistotě pro další využití v analýze genu IGH.

Izolace gDNA byla zatím provedena celkem 51x. V 46 případech se podařilo izolovat gDNA v použitelné kvalitě i koncentraci pro další aplikace.

Ve 2 případech se sice podařilo gDNA vyizolovat, ale byla velmi slabé koncentrace a při provedení PCR a následném vyhodnocení nebyly k dispozici použitelné výsledky. U obou těchto vzorků byla později izolace opakována a byla získána již použitelná gDNA.

Ve 3 případech se izolace vůbec nepodařila a výtěžek gDNA byl nulový. Dva z těchto případů se týkaly jednoho vzorku. Izolace gDNA z tohoto vzorku se nikdy nezdařila. Nejspíše se jednalo o tkáň, kde byla gDNA degradována již při fixaci a přípravě tkáně do formol-parafinového bločku. Třetí z těchto případů byl jiným pokusem úspěšně izolován (tab. XIII).

Tab. XIII: Seznam vzorků, u kterých byla prováděna izolace gDNA a analýza klonality

Vzorek č.:	Koncentrace izolované DNA: [ng/μl]	Závěr po imunohistochemii:	Systém PCR na analýzu:*	Výsledek PCR analýzy:	Shoda s lékaři:
11485/09	98	pozitivní	2	pozitivní	ano
11927/08	830	pozitivní	1	----	----
	830	pozitivní	2	pozitivní	ano
12933/09	108	pozitivní	2	pozitivní	ano
14909/09	522	pozitivní	2	pozitivní	ano
15648/09	560	pozitivní	2	pozitivní	ano
15840/09	52	pozitivní	2	pozitivní	ano
7767/08	952	pozitivní	1	----	----
	952	pozitivní	2	pozitivní	ano
8805/08	1186	pozitivní	1	----	----
	1186	pozitivní	2	pozitivní	ano
8938/09	106	pozitivní	2	pozitivní	ano
9875/09	168	pozitivní	2	pozitivní	ano
8286/09 - 1	143	negativní	2	negativní	ano
8286/09 - 2	105	negativní	2	negativní	ano
10906/09	205	negativní	2	negativní	ano
11506/09 - 1	220	negativní	2	negativní	ano
11506/09 - 2	792	negativní	2	negativní	ano
12466/09 - 1	260	negativní	2	negativní	ano
12466/09 - 2	180	negativní	2	negativní	ano
16008/08 - 1	258	negativní	1	----	----
16008/08 - 2	550	negativní	1	----	----
	550	negativní	2	negativní	ano
17123/09 - A1	128	negativní	2	negativní	ano
17123/09 - A2	90	negativní	2	negativní	ano
17621/09	298	negativní	2	negativní	ano
17697/09	312	negativní	2	negativní	ano
17757/09	354	negativní	2	pozitivní	NE
	763	negativní	2	pozitivní	NE
17807/09	147	negativní	2	negativní	ano
18020/09	152	negativní	2	negativní	ano
4310/09	34	negativní	1	----	----
	120	negativní	2	negativní	ano
4723/09	60	negativní	1	----	----
	314	negativní	1	----	----
	314	negativní	2	negativní	ano
5146/09 - A1	152	negativní	1	----	----
	152	negativní	2	negativní	ano

Tab. XIII: Seznam vzorků, u kterých byla prováděna izolace gDNA a analýza klonality

5146/09 - A1	293	negativní	2	negativní	ano
	348	negativní	1	----	----
5146/09 - A2	250	negativní	2	pozitivní	NE
5146/09 - B	104	negativní	2	pozitivní	NE
1932/10 - A	291	----	2	negativní	----
1932/10 - B	63	----	2	negativní	----
20749/09 - A2	845	----	2	pozitivní	----
20749/09 - A3	974	----	2	pozitivní	----
21332/09	112	----	2	pozitivní	----
2234/10 - A5	528	----	2	negativní	----
2234/10 - A6	588	----	2	negativní	----
3593/10	78	----	2	pozitivní	----
4065/10	71	----	2	pozitivní	----
4723/09	neúspěšná izolace	----	----	----	----
4947/10	282	----	2	pozitivní	----
5155/10	1520	----	2	negativní	----
5432/09	48	----	2	negativní	----
7106/08	2x neúspěšná izolace	----	----	----	----
Lymfocyty z PK	357	----	2	negativní	----

* systém č.1: dle Svachova *et* Tichy (2008); systém č.2: dle van Dongen *et al.* (2003)

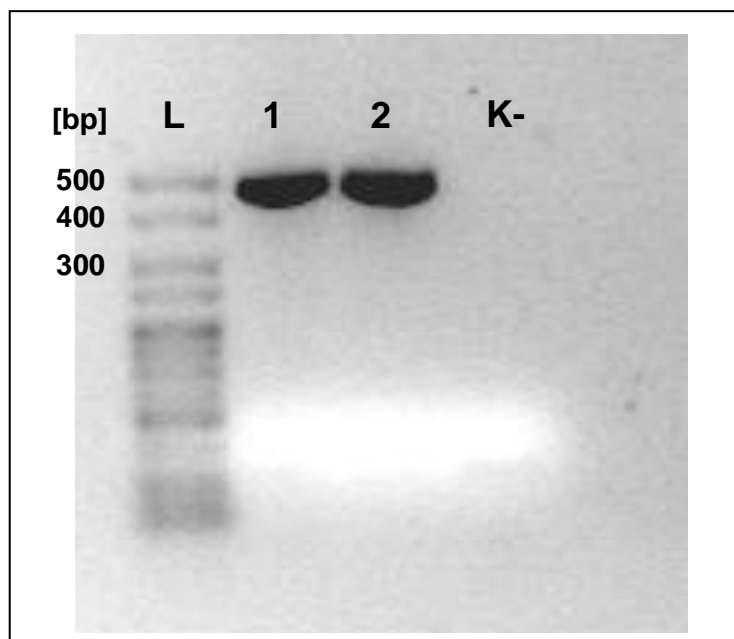
5.1.2 Otestování funkčnosti PCR systému dle Svachova *et* Tichy (2008)

Po úspěšném provedení izolace gDNA bylo provedeno zkušební PCR. Díky ní bylo možné zjistit, zda nastavení teplotního schématu a složení reakční směsi převzaté ze Svachova *et* Tichy (2008), je proveditelné v podmínkách naší laboratoře.

Pro tento experiment byla použita gDNA ze vzorků 16008/08 – 1, 2. Pro reakci byly použity primery CF 20i-3' a CF 20i-5' a teplotní schéma PCR pro tento systém (viz kap. 4.1.5.1). Složení reakční směsi bylo kromě chloridu hořečnatého (MgCl₂) též shodné. I obsah gDNA byl 300 ng. Objem MgCl₂ do jedné reakce byl pokusně určen na 1,5 μl a objem reakce byl do 25 μl doplněn DEPC H₂O.

Po provedení této PCR a následném proběhnutí separace 9 μl PCR produktu pomocí agarózové gelové elektroforézy bylo potvrzeno, že dané podmínky reakce a složení reakční směsi je funkční. Výsledkem experimentu byl agarózový gel, na kterém byla dráha obsahující

velikostní standard Hyperladder V[®] a dále 2 dráhy obsahující proužky tvořené fragmenty DNA o velikosti přibližně 500 bp amplifikovaných ze vzorků 16008/08 – 1, 2 (obr. 9).



Obr. 9: Otestování funkčnosti PCR systému dle Svachova *et Tichy* (2008); Po provedeném testovacím PCR (viz text) byla část produktu analyzována elektroforézou v agarózovém gelu; dráha 1 - vzorek 16008/08 – 1; dráha 2 - vzorek 16008/08 – 2; dráha L - velikostní standard HyperLadder V[®]; v dráha K - negativní kontrola bez gDNA

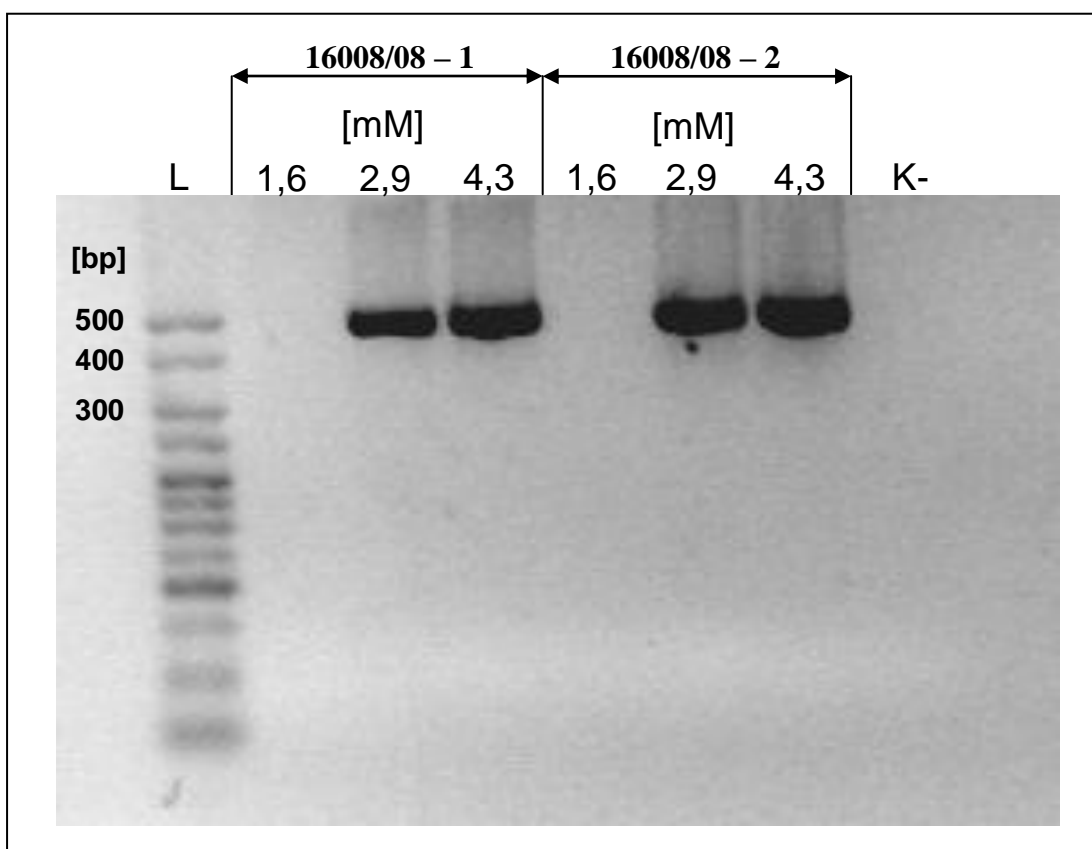
5.1.3 Optimalizace množství chloridu hořečnatého (MgCl₂) ve směsi PCR

Od výrobce DNA polymerázy Immolase (Bioline), která byla používána při PCR, byl dodán i reakční pufr 10x ImmoBuffer a 50mM MgCl₂. Jako optimální množství MgCl₂ dodávané do reakce bylo výrobcem stanoveno v relativně širokém rozmezí. Z tohoto důvodu, abychom zjistili jaké množství MgCl₂ je optimální pro naše složení reakční směsi, bylo provedeno PCR s použitím 2 vzorků gDNA 16008/08 – 1, 2, ve kterém byly použity 3 různé koncentrace MgCl₂ v reakci pro 1 vzorek. U obou vzorků byla použita nejnižší, střední a nejvyšší hodnota koncentrace doporučené výrobcem.

Výrobcem byl určen optimální objem 1,5 µl – 4 µl na 50 µl objem reakční směsi. V našem případě bylo používáno 25 µl reakční směsi, a z tohoto důvodu byly hodnoty poloviční. Pro optimalizační PCR bylo do reakce použito 0,8 µl, 1,4 µl a 2 µl 50 mM MgCl₂ a výsledné koncentrace MgCl₂ v 25 µl reakci tedy byly 1,6 mM, 2,9 mM a 4,3 mM.

Následně bylo použito teplotní schéma i ostatní složení reakční směsi dle Svachova *et Tichy* (2008) (viz kap. 4.1.5.1) jako v předchozím pokuse, ve kterém bylo pokusně použito střední množství $MgCl_2$. Primerový pár byl také shodný, a to CF 20i-3' a CF 20i-5', a množství gDNA tvořilo 300 ng na jednu reakci.

Na základě získaných výsledků byla stanovena jako optimální koncentrace 4,3 mM v reakci, neboť ze všech tří různých koncentrací byl u obou vzorků nejsilnější proužek vzniklý během PCR obsahující v reakci právě tuto koncentraci. Při nejnižší koncentraci (1,6 mM) amplifikace neproběhla vůbec (obr. 10). Vzhledem k tomu, že jsme používali 25 μ l reakční směsi a zásobní roztok $MgCl_2$ měl koncentraci 50 mM, byl optimální objem $MgCl_2$ dodaného do reakce PCR stanoven na 2 μ l.



Obr. 10: Stanovení optimální koncentrace $MgCl_2$ v reakci PCR; Po provedeném PCR s různými koncentracemi $MgCl_2$ (viz text) byla část produktu analyzována elektroforézou v agarózovém gelu; dráha L - velikostní standard HyperLadder V[®]; 2. - 3. dráha - vzorek 16008/08 - 1; 4. - 6. dráha - vzorek 16008/08 - 2; dráha K - negativní kontrola bez gDNA

5.1.4 Analýza IGH u vzorků pomocí PCR systému dle Svachova *et* Tichy (2008)

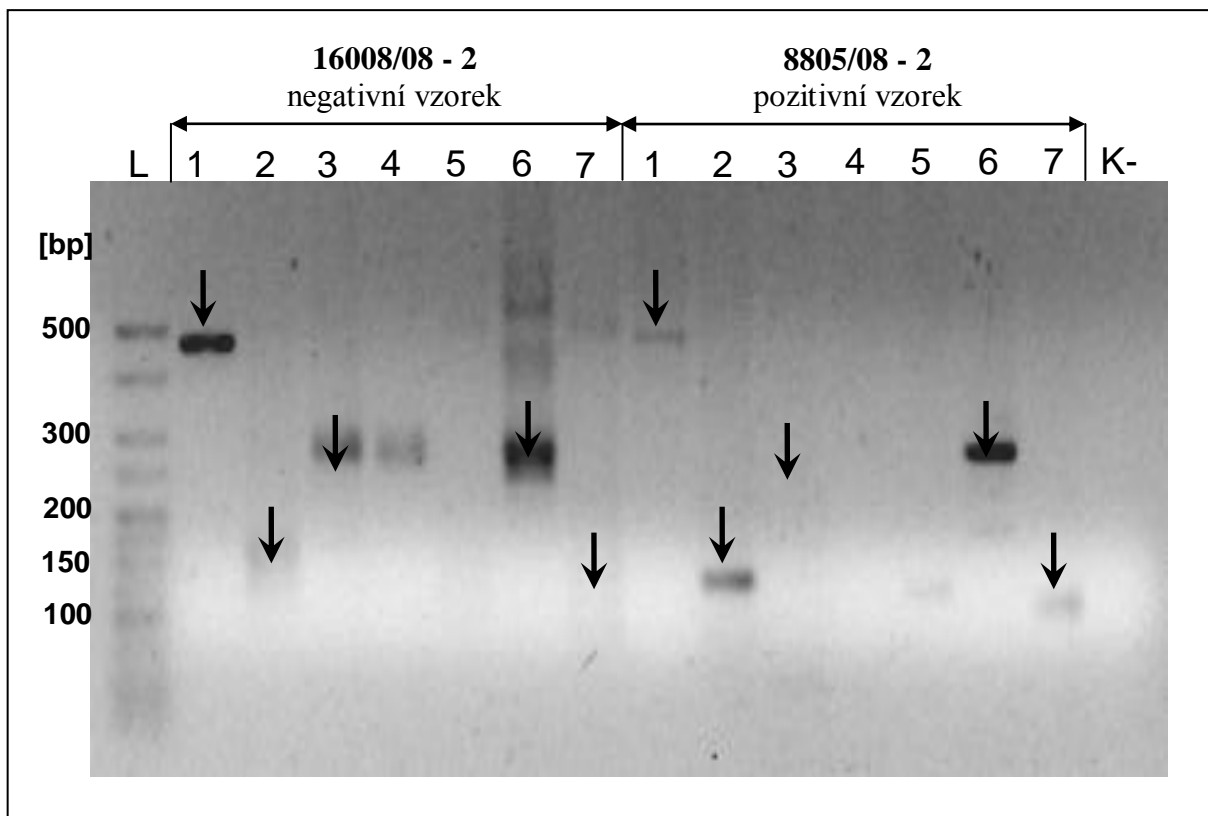
Po výše uvedené optimalizaci složení reakční směsi byla provedena analýza klinických vzorků. Byly použity vzorky, u kterých byla diagnóza jednoznačně určena dostupnými klinickými metodami. Bylo nutné nejdříve vyzkoušet, zda je tato metoda funkční v našich podmínkách a také jaký je výsledek této analýzy provedené v našich podmínkách v případě monoklonálního či polyklonálního vzorku.

Tímto systémem byla provedena analýza celkem 9 vzorků (tab. XVIII). Z tohoto počtu byly 3 vzorky pozitivní, neboli vzorky, u kterých byla diagnostikována některá z forem B-lymfocytární malignity a s největší pravděpodobností bychom měli sledovat výskyt populace monoklonálně zmnožených buněk, který by se na gelu projevil ve formě ohraničeného proužku. Zbylých 6 vzorků bylo negativních. Jednalo se tedy o vzorky, u kterých byla diagnostikována pouze reaktivní tkáň bez přítomnosti malignity a byla zde očekávána populace buněk polyklonálního charakteru. Ta by měla být na gelu detekována pouze jako neohraničený „smear“, neboli směs velkého počtu různě dlouhých fragmentů DNA.

Pro analýzu byla pro provedení PCR použita metodika dle Svachova *et* Tichy (2008). Byly provedeny dvě klasické reakce PCR s použitím párů primerů JH1-S / JH-A a JH2-S / JH-A a dvě poloodstupňované dvoukolové PCR s použitím primerů FR-2A / LJH-VLJH a FR-3A / LJH-VLJH. Pro pozitivní kontrolu byly použity primery CF 20i-5' a CF 20i-3'.

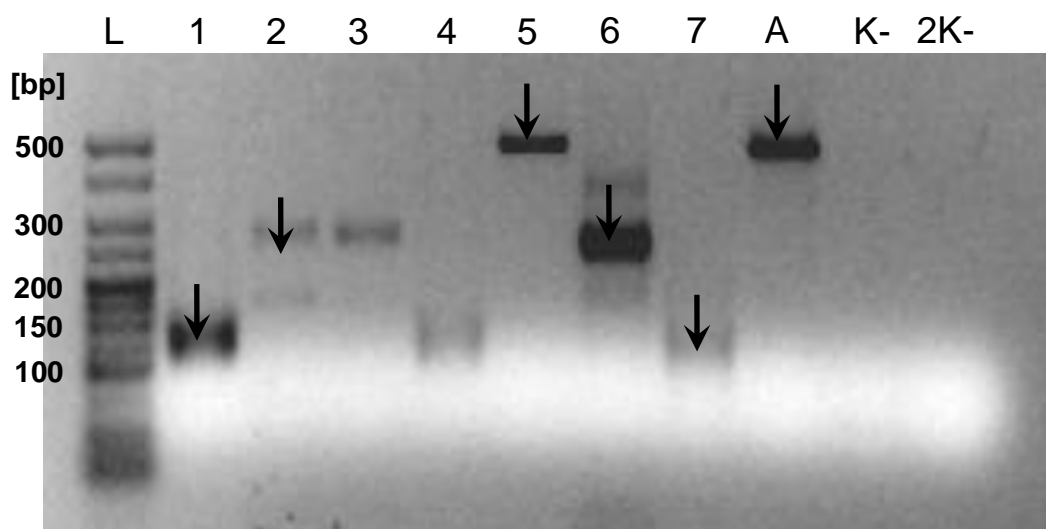
Přesto, že byly prováděny různé modifikace ve složení reakční směsi jako například snížení koncentrace primerů ve směsi nebo snížení obsahu DNA v reakci a také přesto, že některé vzorky byly analyzovány i vícekrát, tak se nepodařilo u žádného vzorku po provedení analýzy v našich podmínkách s jistotou určit, zda se jedná o monoklonální či polyklonální proliferaci.

Negativní vzorky vykazovaly na gelu vždy jeden či více ohraničených proužků a v mnoha případech byla velikost těchto fragmentů shodná s očekávanou velikostí u monoklonálních vzorků. Naopak pozitivní vzorky s předpokládanou monoklonalitou na gelu netvořily produkty ve všech analyzovaných reakcích (obr. 11, 12).

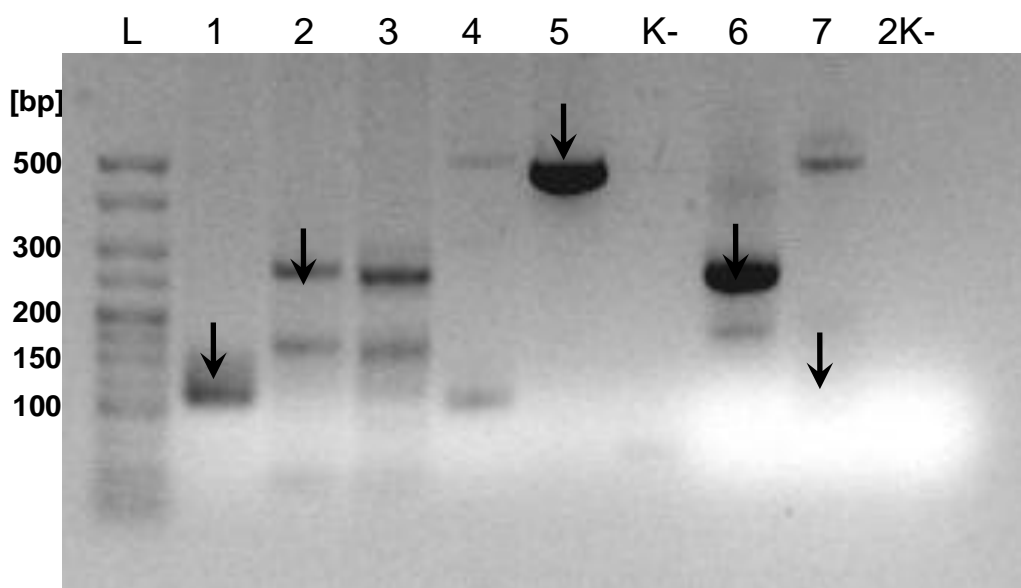


Obr. 11: Analýza přeskupení genových segmentů IGH dle Svachova *et* Tichy (2008) se vzorky 16008/08 a 8805/08; S těmito vzorky byla provedena analýza pomocí PCR (viz text) a následně byla část PCR produktu analyzována elektroforézou v agarózovém gelu; šipky označují oblast hledaných produktů; dráha L - velikostní standard HyperLadder V®; dráha 1 - primery CF 20i-5'/CF 20i-3'; dráha 2 - primery JH1-S/JH-A; dráha 3 - primery JH2-S/JH-A; dráha 4 - primery FR-2A/LJH; dráha 5 - primery FR-3A/LJH; dráha 6 - primery FR-2A/VLJH; dráha 7 - primery FR-3A/VLJH; dráha K- - negativní kontrola bez gDNA

4723/09 - negativní vzorek



7767/08 - pozitivní vzorek



Obr. 12: Analýza přeskupení genových segmentů IGH dle Svachova *et* Tichy (2008) se vzorky 4723/09 a 7767/08; S těmito vzorky byla provedena analýza pomocí PCR (viz text) a následně byla část PCR produktu analyzována elektroforézou v agarózovém gelu; šipky označují oblast hledaných produktů; dráha L - velikostní standard HyperLadder V[®]; dráha 1 - primery JH1-S/JH-A; dráha 2 - primery JH2-S/JH-A; dráha 3 - primery FR-2A/LJH; dráha 4 - primery FR-3A/LJH; dráha 5 - primery CF 20i-5'/CF 20i-3'; dráha 6 - primery FR-2A/VLJH; dráha 7 - primery FR-3A/VLJH; dráha A - vzorek 5146/09-A1, primery CF 20i-5'/CF 20i-3'; dráhy K-, 2K- - negativní kontroly bez gDNA

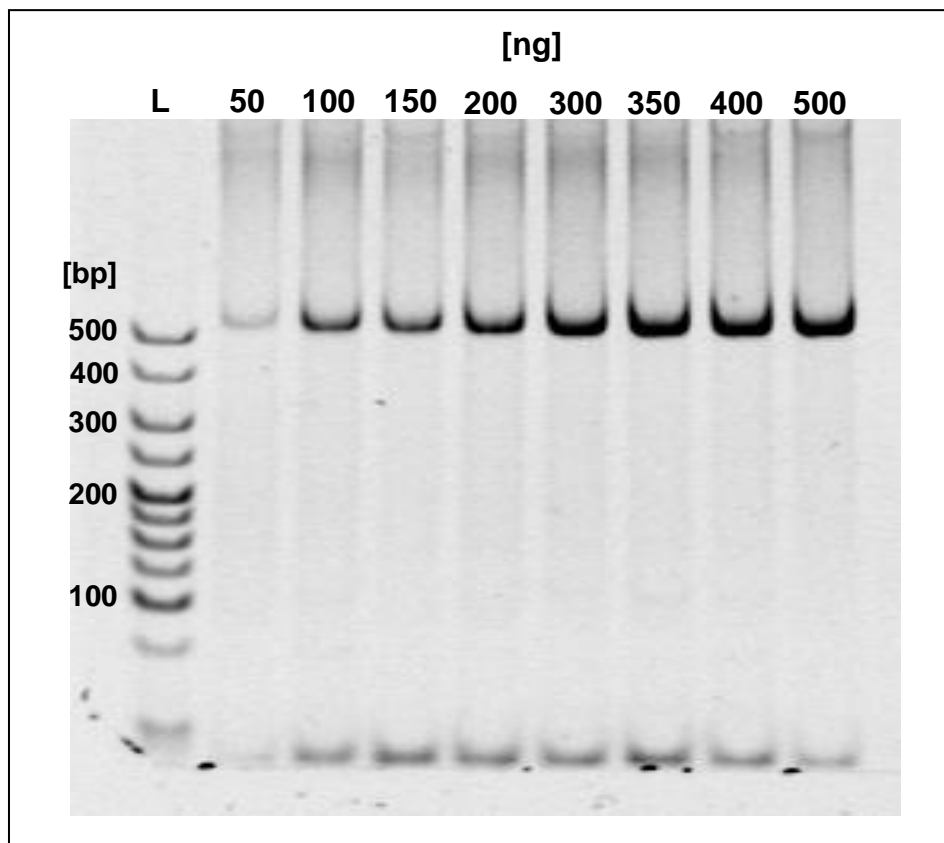
5.1.5 Stanovení optimálního množství DNA dodané do PCR v systému detekce VH-JH přeskupení dle van Dongen *et al.* (2003)

Vzhledem k uvedeným výsledkům bylo od předchozí metody upuštěno a analýza klonalit lymfocytů byla testována pomocí detekce přeskupení genových segmentů v úseku kódujícím VH-JH oblast na IGH. Tato metodika byla převzata z van Dongen *et al.* (2003).

Pro základní optimalizaci metody bylo nejprve nutné určit, jaké je optimální množství gDNA, které se má do PCR dodávat. Experiment byl založen na předpokladu, že by se toto množství mělo pohybovat v rozmezí 50 – 500 ng (Svachova *et Tichy*, 2008).

Byla použita izolovaná gDNA z kontrolního vzorku, která měla koncentraci 80 ng/μl. Byla připravena koncentrační řada, kdy do jednotlivých zkumavek bylo přidáno 50 ng, 100 ng, 150 ng, 200 ng, 300 ng, 350 ng, 400 ng a 500 ng této gDNA. Ostatní postup včetně teplotního průběhu reakce byl shodný jako v případě PCR analýzy systémem dle van Dongen *et al.* (2003) (viz kap. 4.1.5.2). Do všech reakcí byly použity primery CF 20i-3' a CF 20i-5'. Po proběhnutí reakce byla provedena heteroduplexní analýza, polyakrylamidová gelová elektroforéza a obarvení gelu pomocí barviva GelRed[®]. Velikost očekávaných produktů byla 460 – 500 bp.

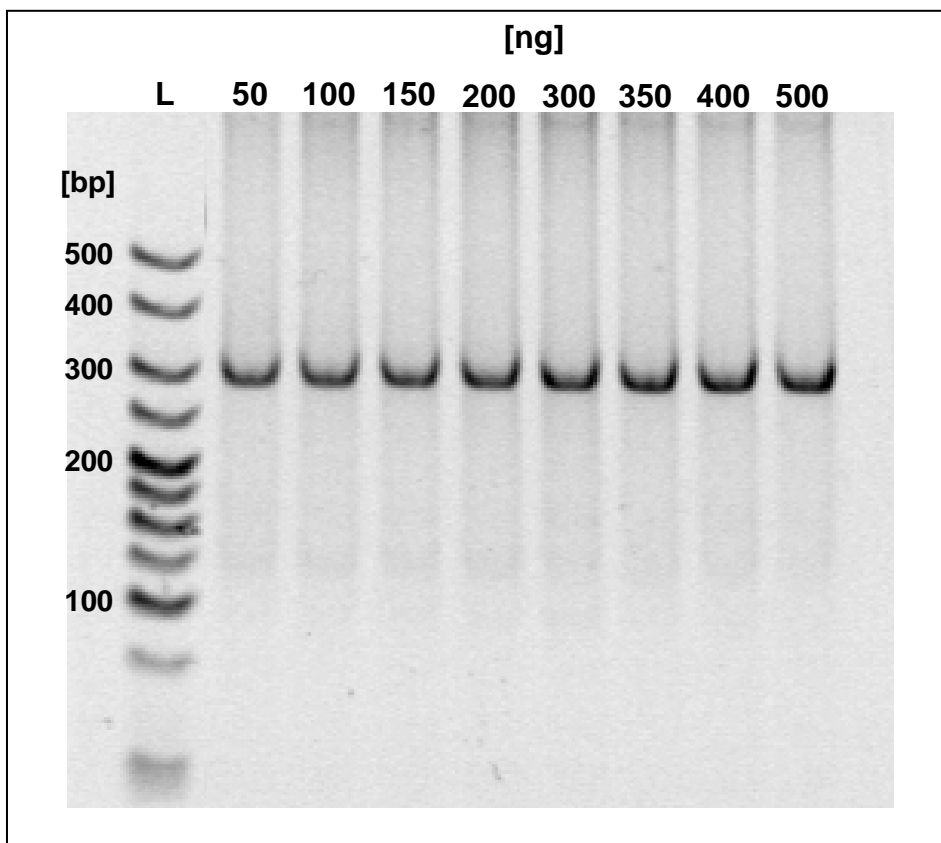
Po vyhodnocení gelu bylo zjištěno, že optimální množství DNA dodávané do reakce je 300 ng. Intenzita proužků na gelu směrem k tomuto použitému množství postupně rostla, ale od této hodnoty směrem k většímu dodanému množství zůstala intenzita stejná (obr. 13). Tímto byl potvrzen náš původní předpoklad.



Obr. 13: Stanovení optimální koncentrace gDNA v reakci PCR pro pozitivní kontrolu; Po provedeném PCR dle van Dongen *et al.* (2003) s různými koncentracemi gDNA (viz text) byla část produktu analyzována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu

Abychom zjistili, zda je toto množství DNA optimální i pro analýzu klonality s použitím PCR systému tří mnohonásobných reakcí (van Dongen *et al.*, 2003), byl tento experiment zopakován. Bylo dodáno stejné množství DNA i stejný teplotní průběh reakce, ale tentokrát bylo nutné použít vzorek, který byl určen jako pozitivní a do reakce byla použita směs primerů B se zpětným primerem JH (van Dongen *et al.*, 2003). V tomto případě byla očekávaná velikost produktů 250 – 295 bp.

Po vyhodnocení na gelu bylo opět potvrzeno, že optimální množství DNA je 300 ng na jednu reakci i pro PCR analýzu klonality, neboť stejně jako v předchozím experimentu dosáhla intenzita proužků na gelu maxima při množství 300 ng DNA a se zvyšujícím se množstvím zůstala intenzita stejná (obr. 14).



Obr. 14: Stanovení optimální koncentrace gDNA v reakci PCR pro analýzu IGH; Po provedeném PCR dle van Dongen *et al.* (2003) s různými koncentracemi gDNA pozitivního vzorku s použitím primerů směsi B a JH primeru (viz text) byla část produktu analyzována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu

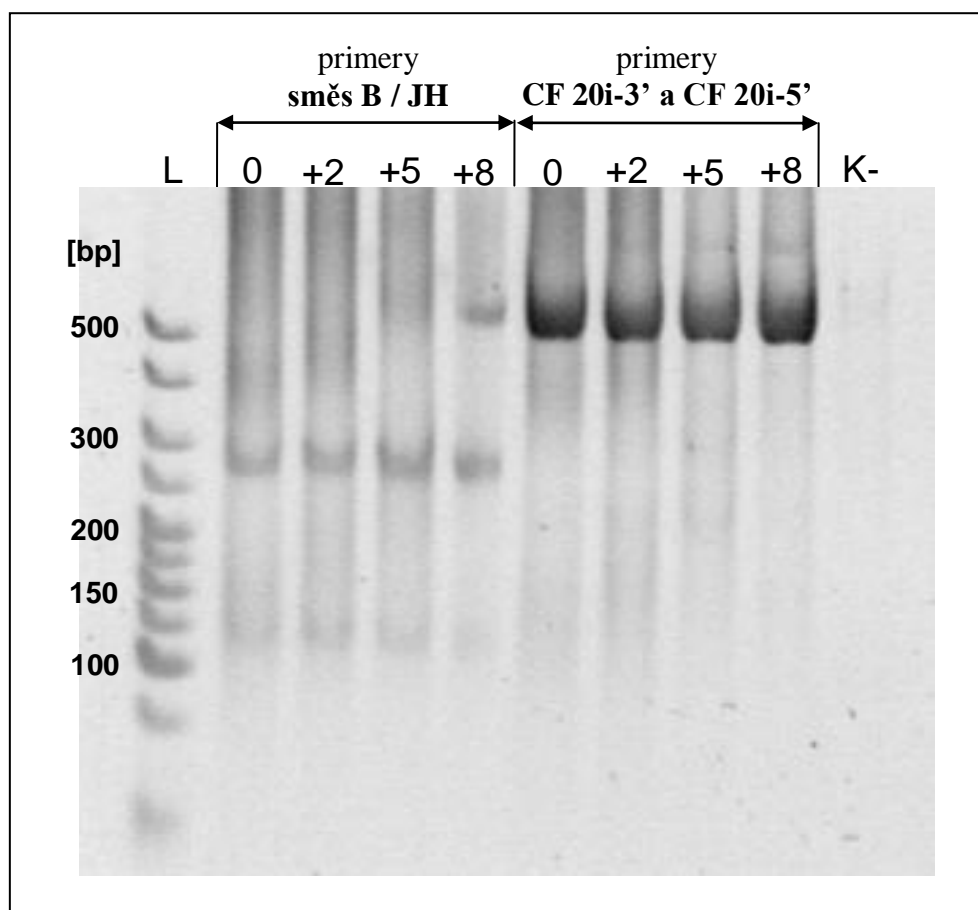
5.1.6 Určení závislosti mnohonásobné PCR na množství DNA hydratačního pufru v reakci

Vzhledem k tomu, že při izolaci gDNA docházelo k velkým odchylkám ve vytěženém množství gDNA, tak to s sebou přinášelo i velké odchylky v objemu gDNA dodávaného do reakce. Při izolaci byla gDNA resuspendována v DNA hydratačním pufru (Qiagen).

Z tohoto důvodu byl proveden tento pokus. Do jednotlivých reakčních směsí bylo dodáno rozdílné množství DNA hydratačního pufru. V jedné zkumavce bylo standardní množství dodané do reakce při dodání gDNA. V dalších zkumavkách byl přídavek 2 μ l, 5 μ l a 8 μ l DNA hydratačního pufru na úkor DEPC H₂O. Při přípravě reakční směsi bylo dále dodáno standardní množství gDNA (300 ng) ze vzorku 7767/08, u kterého bylo při izolaci docíleno koncentrace 952 ng/ μ l (tab. XIII).

Tento vzorek byl určen jako pozitivní a i z tohoto důvodu byl použit právě tento vzorek, neboť bylo potřeba vyzkoušet, zda má DNA hydratační pufr vliv nejen na průběh PCR pozitivní kontroly při použití primerů CF 20i-3' a CF 20i-5', ale také zda má vliv i na průběh PCR analýzy klonalit. Z tohoto důvodu byly připraveny stejné reakční směsi ale s použitím primerové směsi B a JH primeru. Zbytek reagensů a celkový průběh PCR byl shodný se standardním postupem dle van Dongen *et al.* (2003).

Po vyhodnocení výsledků na polyakrylamidovém gelu bylo zjištěno, že ani v případě pozitivní kontroly a ani při PCR analýze klonalit nemá množství DNA hydratačního pufru v reakci vliv na průběh a celkový výsledek těchto reakcí (obr. 15). Z tohoto důvodu bylo možné i v případě nízké koncentrace vyizolované gDNA provádět analýzu vzorku díky dodání velkého objemu roztoku resuspendované gDNA v DNA hydratačním pufru do reakce.



Obr. 15: Stanovení optimální koncentrace gDNA v reakci PCR pro analýzu IGH; Po provedeném PCR dle van Dongen *et al.* (2003) s různými koncentracemi gDNA pozitivního vzorku s použitím primerů směsi B a JH primeru (viz text) byla část produktu analyzována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu

5.1.7 Vyhodnocení zaváděcí fáze

Po vyhodnocení výše uvedených pokusů byl na základě získaných zkušeností a dat použitých z literatury sestaven kompletní protokol na analýzu klonality u B-lymfocytů na základě PCR amplifikace genových úseků pro VH-JH oblast IGH. Tento postup byl založen na primerovém složení a teplotním průběhu reakce PCR dle van Dongen *et al.* (2003), ale při použití reakčních složek dle Svachova *et Tichy* (2008).

Nejprve je nutné namíchat reakční směs (tab XIV). Jak bylo otestováno, je optimální použít do reakční směsi 300 ng gDNA. Objem pufru, dinukleotid trifosfátů a DNA polymerázy v reakční směsi byl určen výrobcem DNA polymerázy. Koncentrace MgCl₂ v reakční směsi byla během zaváděcí fáze nakonec stanovena na 4,8 mM, v našem případě tedy 2,2 μl.

Do reakce byly dodávány primerové směsi A (nasedající na FR1 IGH), B (nasedající na FR2) a C (nasedající na FR3). Proti nim byl vždy použit primer JH nasedající na všech 6 J segmentech díky konsenzuální sekvenci. Pro pozitivní i negativní kontrolu byl používán primerový pár CF 20i-3' a CF 20i-5'.

Tab. XIV: Reakční směs PCR o objemu 25 μl

	Obsah jedné zkumavky PCR
10x ImmoBuffer:	2,5 μl
MgCl ₂ (50 mM):	2,2 μl
10 mM dNTPs:	1,2 μl
Immolase DNA Polymeráza (c = 5U/ μl):	0,3 μl
10 μM Primer(y) F: (7 μM u CF 20i-5')	0,5 μl (u CF 20i-5' 2,5 μl)
10 μM Primer R: (7 μM u CF 20i-3')	0,5 μl (u CF 20i-3' 2,5 μl)
Templát:	300 ng
DEPC H ₂ O:	Doplníme do 25μl

Reakce PCR byla provedena podle následujícího teplotního schématu (tab. XV).

Tab. XV: Teplotní schéma PCR cyklu

Inicializace reakce:	95°C	7 min	
Vlastní PCR:			
Denaturace DNA:	95°C	45 s	35x
Annealing primerů:	60°C	60 s	
Elongace:	72°C	90 s	
Finální elongace:	72°C	10 min	
Zchlazení na 4°C			

Poté byla prováděna heteroduplexní analýza. Následně byla provedena gelová elektroforéza za použití 8 % polyakrylamidovém gelu. Na ten bylo naneseno 12,5 µl PCR produktu smíchaného se 2,5 µl 40 % glycerolu obarveného 1x gel „loading“ puffrem. Na závěr byla DNA na gelu vizualizována za pomoci fluorescenčního barviva GelRed[®] a proběhlo vyhodnocení velikostí fragmentů jednotlivých reakcí PCR (tab. XVI).

Tab. XVI: Přehled očekávaných velikostí PCR produktů

Dráha	Primery:	Velikost získaných produktů [bp]:
A	Směs A	310 – 360
	JH	
B	Směs B	250 – 295
	JH	
C	Směs C	100 – 170
	JH	
K ⁺	CF 20i-5'	460 – 500
	CF 20i-3'	

5.2 Ověřování spolehlivosti metody na kontrolních vzorcích

5.2.1 Provedení analýz kontrolních vzorků

Po proběhnutí a vyhodnocení výše uvedených pokusů byly postupně analyzovány klinické vzorky s předem známou diagnózou. Tyto vzorky sloužily k otestování funkčnosti tohoto PCR systému a také sloužily pro určení spolehlivosti metody.

Nejprve byly analyzovány vzorky, které byly používány i pro předchozí metodu analýzy dle Svachova *et* Tichy (2008). Jako srovnání těchto metod je uveden obrázek č. 16, na kterém jsou analyzovány vzorky 16008/08-2 a 8805/08, které byly použity i při analýze na obrázku č. 11.

Kromě těchto 9 vzorků bylo analyzováno dalších 24 kontrolních vzorků (tab. XIII). Celkem bylo tedy touto metodou analyzováno 32 vzorků. Z tohoto počtu bylo 10 vzorků diagnostikováno jako pozitivní (tab. XVII) a po analýze pomocí PCR byla u těchto vzorků přítomná monoklonalita, která byla na polyakrylamidovém gelu detekována jako ohraničené proužky v drahách, kde byly naneseny PCR produkty s použitím směsí primerů A, B a C. Očekávané produkty těchto reakcí měly velikosti 310 – 360 bp v případě směsi A, 250 - 295 bp u směsi B a 100 – 170 bp u směsi C. Pozitivní kontrola s použitím primerů CF 20i-3' a CF 20i-5' měla očekávanou velikost opět 460 – 500 bp (obr. 16, 17).

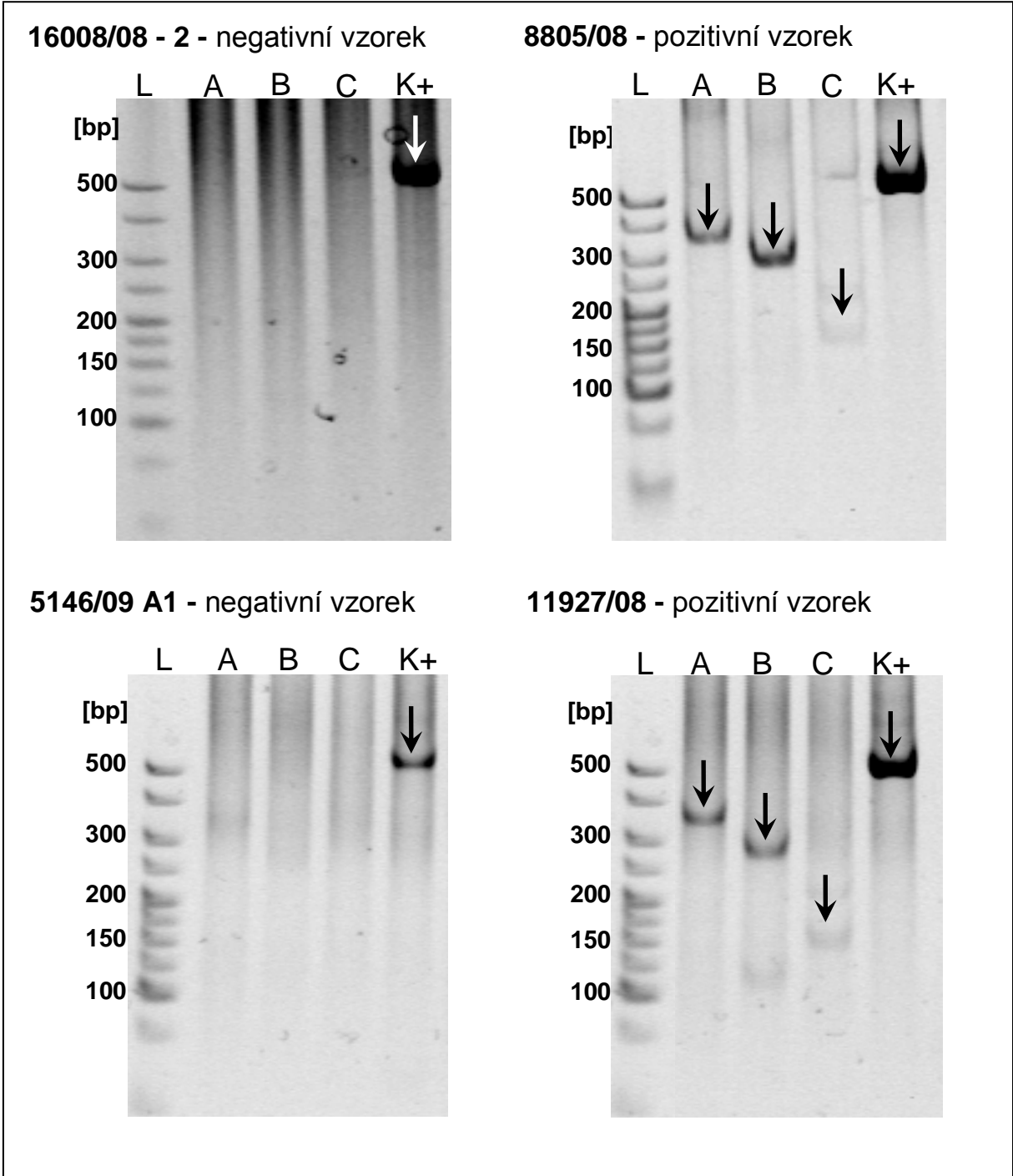
Tab. XVII: Seznam analýz pozitivních kontrolních vzorků s diagnózou

Vzorek č.:	Diagnóza po imunohistochemii:	Výsledek PCR analýzy:	Shoda s lékaři:
11485/09	SLL (lymfom z malých lymfocytů)/ CLL (chronická lymfocytární leukémie)	pozitivní	ano
11927/08	Folikulární lymfom - stupeň 1	pozitivní	ano
12933/09	DLBCL (difúzní velkobuněčný B-lymfom)	pozitivní	ano
14909/09	Folikulární lymfom - stupeň 1	pozitivní	ano
15648/09	Folikulární lymfom - stupeň 1	pozitivní	ano
15840/09	SLL / CLL	pozitivní	ano
7767/08	DLBCL	pozitivní	ano
8805/08	SLL/CLL neoplazie ze zralých buněk	pozitivní	ano
8938/09	Folikulární lymfom - stupeň 2	pozitivní	ano
9875/09	Nodální MZL (lymfom z marginální zóny) se známkami transformace do DLBCL	pozitivní	ano

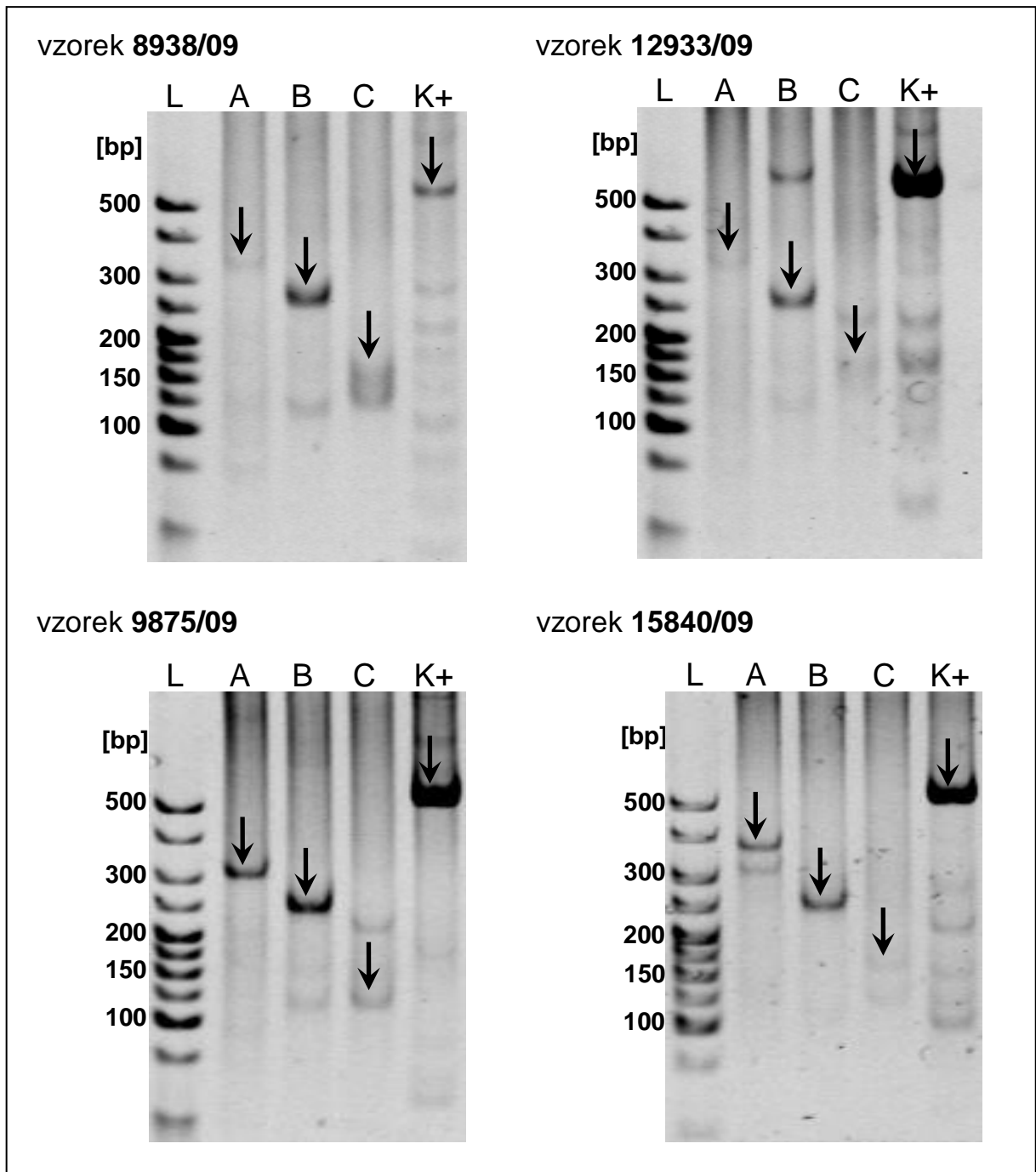
Zbýlých 22 vzorků bylo předem diagnostikováno jako negativní (tab. XVIII). U těchto vzorků byla s největší pravděpodobností očekávána populace buněk polyklonálního charakteru, které by se po průběhu PCR na gelu projevíly jako řady bez jakýchkoliv proužků, nebo jen s přítomností neohrazených „smearů“. Jediná řada, kde by měly být ohraničené proužky byla ta, kde byly naneseny produkty PCR s pozitivní kontrolou tvořenou opět primery CF 20i-3' a CF 20i-5'. Z tohoto počtu se u 18 vzorků tento předpoklad skutečně vyplnil (tab. XIII, XVIII) (obr. 16, 18).

Tab. XVIII: Seznam analýz negativních kontrolních vzorků s diagnózou

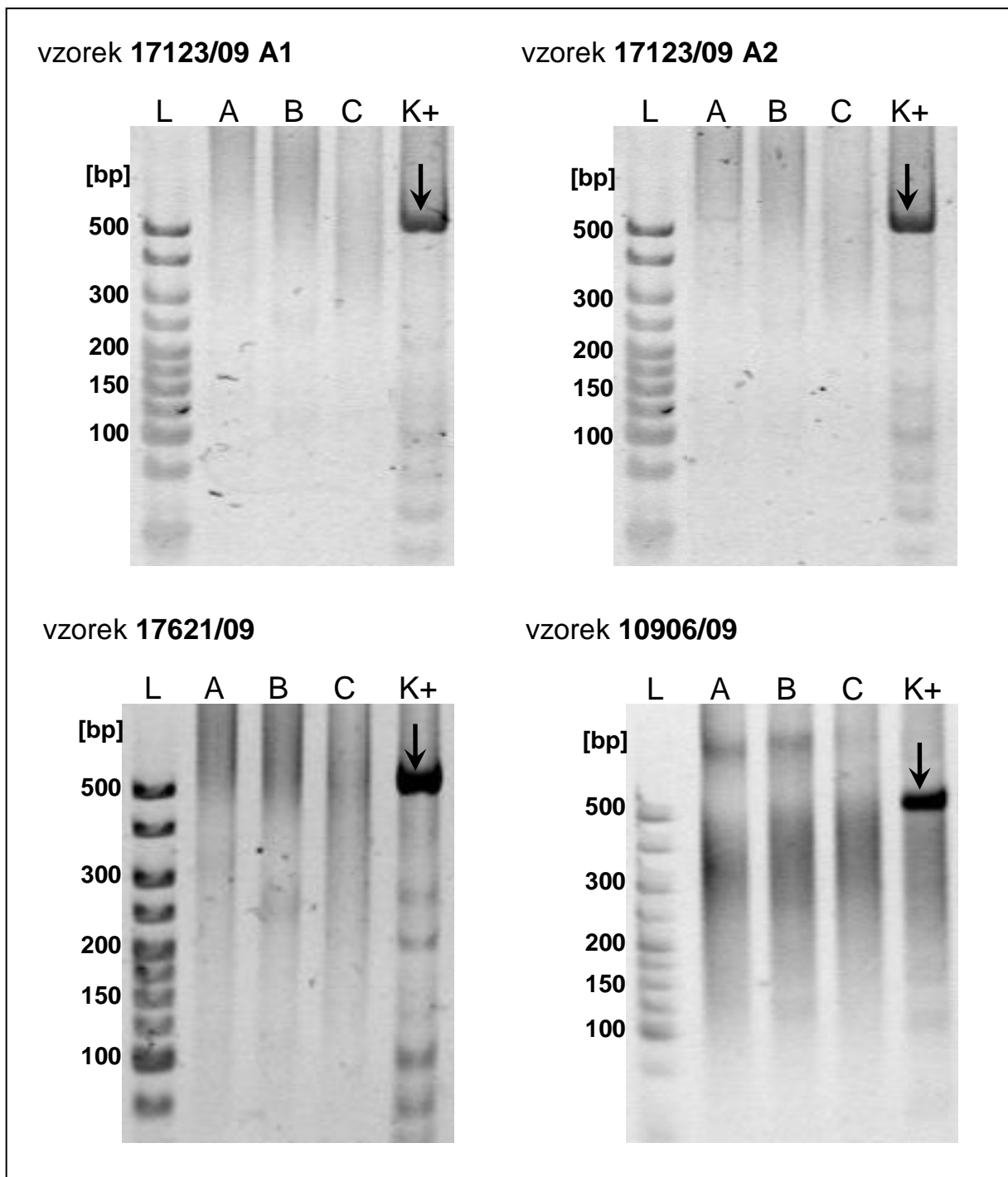
Vzorek č.:	Diagnóza po imunohistochemii:	Výsledek PCR analýzy:	Shoda s lékaři:
8286/09 - 1	Nespec.reakt.změny uzliny bez známek neoplazie	negativní	ano
8286/09 - 2	Nespec.reakt.změny uzliny bez známek neoplazie	negativní	ano
10906/09	Nespec.reakt.změny uzliny bez známek neoplazie	negativní	ano
11506/09 - 1	Nespec.katarální lymfadenitida	negativní	ano
11506/09 - 2	Nespec.katarální lymfadenitida	negativní	ano
12466/09 - 1	Nespec.reakt.změny uzliny bez známek neoplazie	negativní	ano
12466/09 - 2	Nespec.reakt.změny uzliny bez známek neoplazie	negativní	ano
16008/08 - 2	Tonsilitis lacunaris	negativní	ano
17123/09 - A1	Bez známek neoplazie	negativní	ano
17123/09 - A2	Metastáza spinocelulárního karcinomu (není lymfoidního původu)	negativní	ano
17621/09	Nespec.katarální lymfadenitida	negativní	ano
17697/09	Chron.lakunární amygdalitida	negativní	ano
17757/09	Chron.lakunární tonsilitida	pozitivní	NE
17757/09	Chron.lakunární tonsilitida	pozitivní	NE
17807/09	Chron.lakunární amygdalitida	negativní	ano
18020/09	Chron.lakunární amygdalitida	negativní	ano
4310/09	Adenokarcinom choledochu, lymfatické uzliny bez metastáz	negativní	ano
4723/09	Nespec.reakt.změny uzliny bez známek neoplazie	negativní	ano
5146/09 - A1	Chron.lakunární amygdalitida	negativní	ano
5146/09 - A1	Chron.lakunární amygdalitida	negativní	ano
5146/09 - A2	Chron.lakunární amygdalitida	pozitivní	NE
5146/09 - B	Hyperplastická lymf.tkáň – adenoidní vegetace	pozitivní	NE



Obr. 16: Srovnání výsledků po PCR analýze VH-JH pozitivních a negativních vzorků;
 Po provedení analýz IGH přeskupení pozitivních a negativních vzorků za pomoci PCR (viz text) byla část produktu PCR analyzována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu; šipky označují oblast hledaných produktů; dráha L - velikostní standard HyperLadder V[®]; dráha A - primery: směs A / JH; dráha B - primery: směs B / JH; dráha C - primery: směs C / JH; dráha K+ - primery: CF 20i-5' / CF 20i-3'



Obr. 17: PCR analýza VH-JH přeskupení pozitivních vzorků; Po provedení analýzy IGH přeskupení pozitivních vzorků za pomoci PCR (viz text) byla část produktu PCR analyzována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu; šipky označují oblast hledaných produktů; dráha L - velikostní standard HyperLadder V[®]; dráha A - primery: směs A / JH; dráha B - primery: směs B / JH; dráha C - primery: směs C / JH; dráha K+ - primery: CF 20i-5' / CF 20i-3'

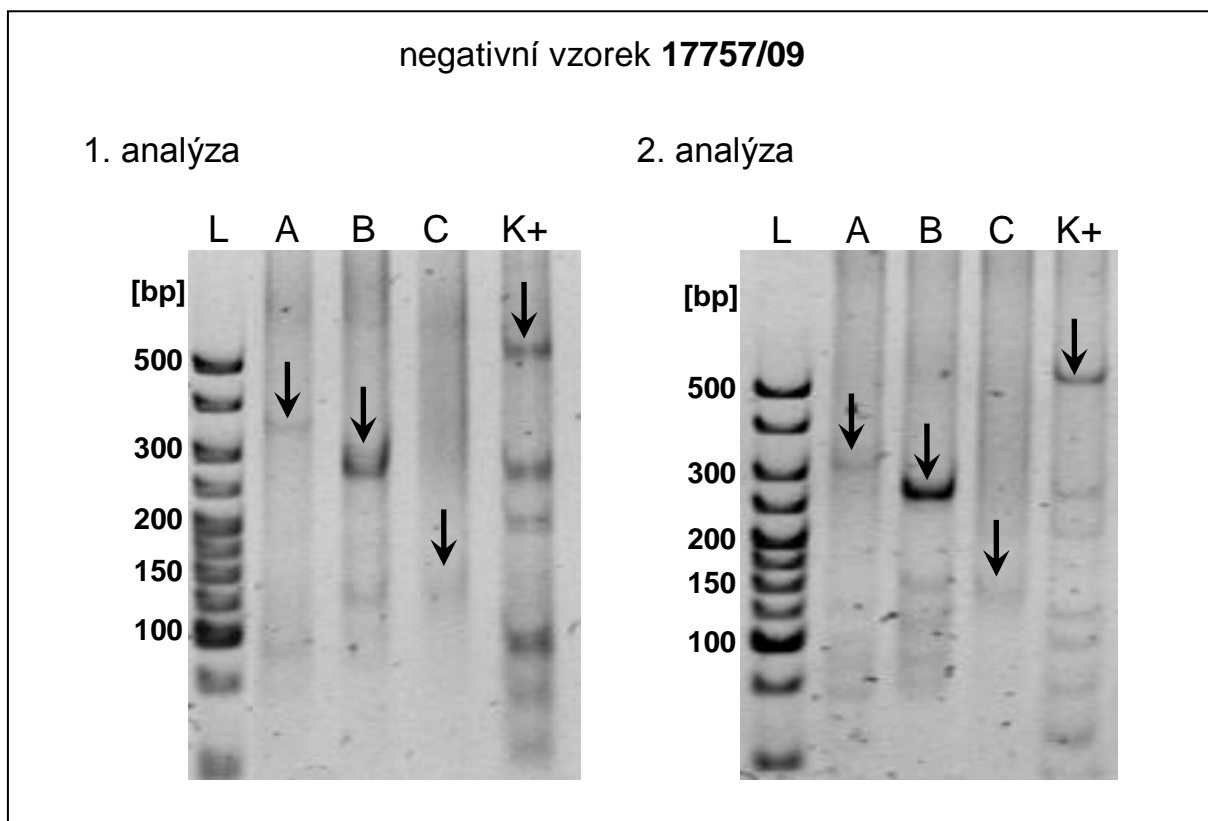


Obr. 18: PCR analýza VH-JH přeskupení negativních vzorků; Po provedení analýzy IGH přeskupení negativních vzorků za pomoci PCR (viz text) byla část produktu PCR analyzována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu; šipky označují oblast hledaných produktů u pozitivní kontroly; dráha L - velikostní standard HyperLadder V[®]; dráha A - primery: směs A / JH; dráha B - primery: směs B / JH; dráha C - primery: směs C / JH; dráha K+ - primery: CF 20i-5' / CF 20i-3'

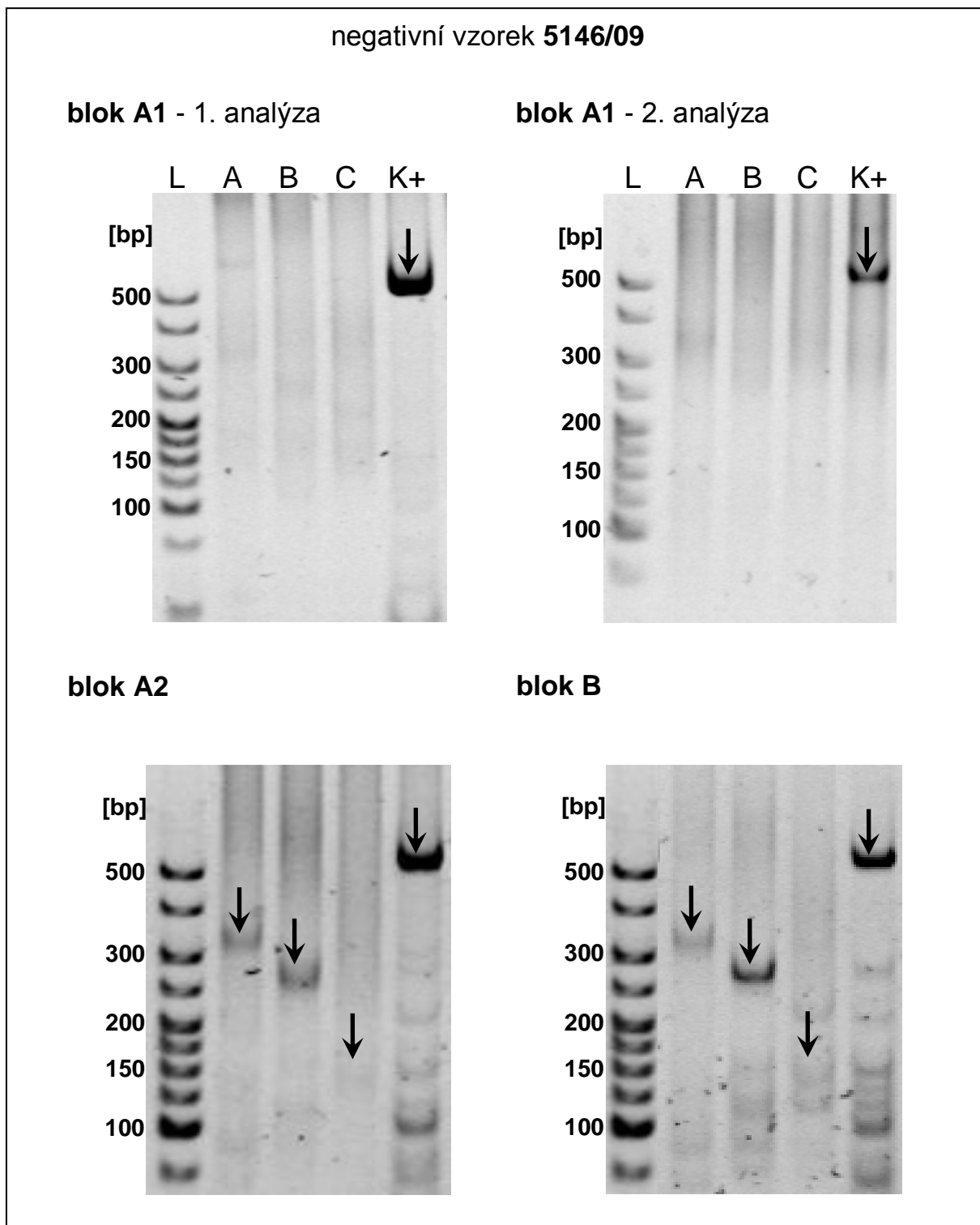
Ve zbylých 4 případech se však na gelu vytvořily ohraničené proužky, které měly stejnou charakteristiku jako proužky vytvářené v případě monoklonálně zmnožených buněk u B-lymfocytárních malignit.

Dva z těchto případů tvořil vzorek 17757/09, který byl 2x izolován a v obou případech byla provedena analýza pomocí PCR. Výsledek byl v obou případech stejný (obr. 19) a poukazoval na přítomnost monoklonálně zmnožených buněk.

Ve zbylých dvou případech se jednalo o vzorky z bločků 5146/09-A2 a 5146/09-B. Oba tyto vzorky byly odebrané od jednoho pacienta. Od tohoto pacienta byl i bloček 5146/09-A1 a všechny tři byly diagnostikovány jako negativní. U vzorku 5146/09-A1 byla tato diagnóza opakovaně naší analýzou potvrzena a na gelu se neobjevovaly žádné ohraničené proužky. Ale u vzorků 5146/09-A2 a 5146/09-B se na gelu objevily proužky poukazující na monoklonálně zmnožené buňky (obr. 20).



Obr. 19: Analýza VH-JH přeskupení negativního vzorku 17757/09; Po provedení analýz IGH přeskupení tohoto vzorku za pomoci PCR (viz text) byla část produktu PCR analyzována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu; šipky označují oblast hledaných produktů v případě pozitivního vzorku; dráha L - velikostní standard HyperLadder V[®]; dráha A - primery: směs A / JH; dráha B - primery: směs B / JH; dráha C - primery: směs C / JH; dráha K+ - primery: CF 20i-5' / CF 20i-3'



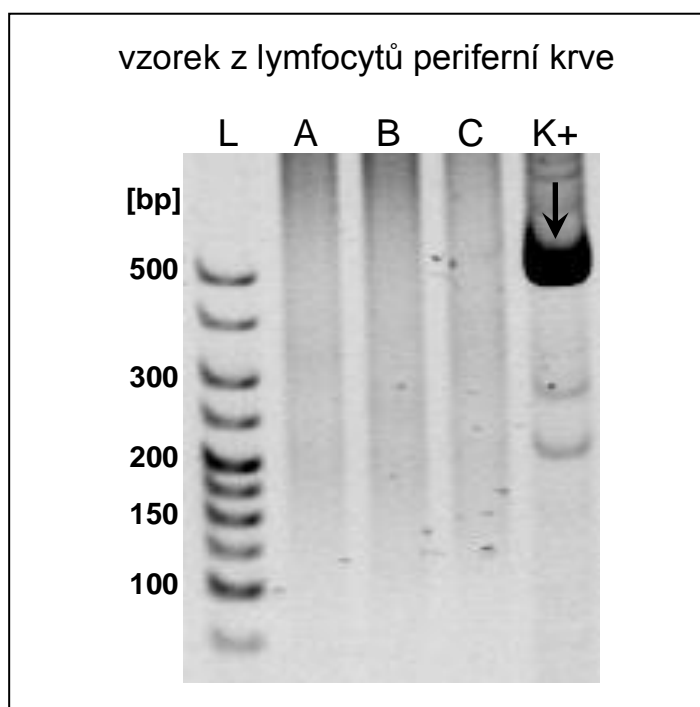
Obr. 20: Analýzy VH-JH přeskupení negativních vzorků pacienta 5146/09; Po provedení analýz IGH přeskupení těchto vzorků za pomoci PCR (viz text) byla část produktu PCR analyzována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu; šipky označují oblast hledaných produktů v případě pozitivního vzorku; dráha L - velikostní standard HyperLadder V[®]; dráha A - primery: směs A / JH; dráha B - primery: směs B / JH; dráha C - primery: směs C / JH; dráha K+ - primery: CF 20i-5' / CF 20i-3'

5.2.2 Provedení analýzy u lymfocytů izolovaných z periferní krve

Po otestování metody na kontrolních vzorcích byla pouze pokusně provedena analýza přeskupení genových segmentů u lymfocytů periferní krve. Periferní krev pro tento pokus byla odebrána zdravému jedinci A. E.. Z této krve byly nejprve izolovány lymfocyty, ze kterých byla následně provedena izolace gDNA.

S touto gDNA byla provedena analýza za pomoci PCR s použitím standardní reakční směsi i reakčních podmínek jako v případě analýzy vzorku z formol-parafinového bločku. Byly použity primerové směsi A, B a C, proti kterým byl použit primer JH. Pro pozitivní kontrolu byly použity primery CF 20i-5' a CF 20i-3'.

Následně byla provedena gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu. Po vyhodnocení výsledků byl potvrzen náš předpoklad, že by se v periferní krvi tohoto jedince neměly nacházet monoklonálně zmnožené lymfocyty (obr. 21).

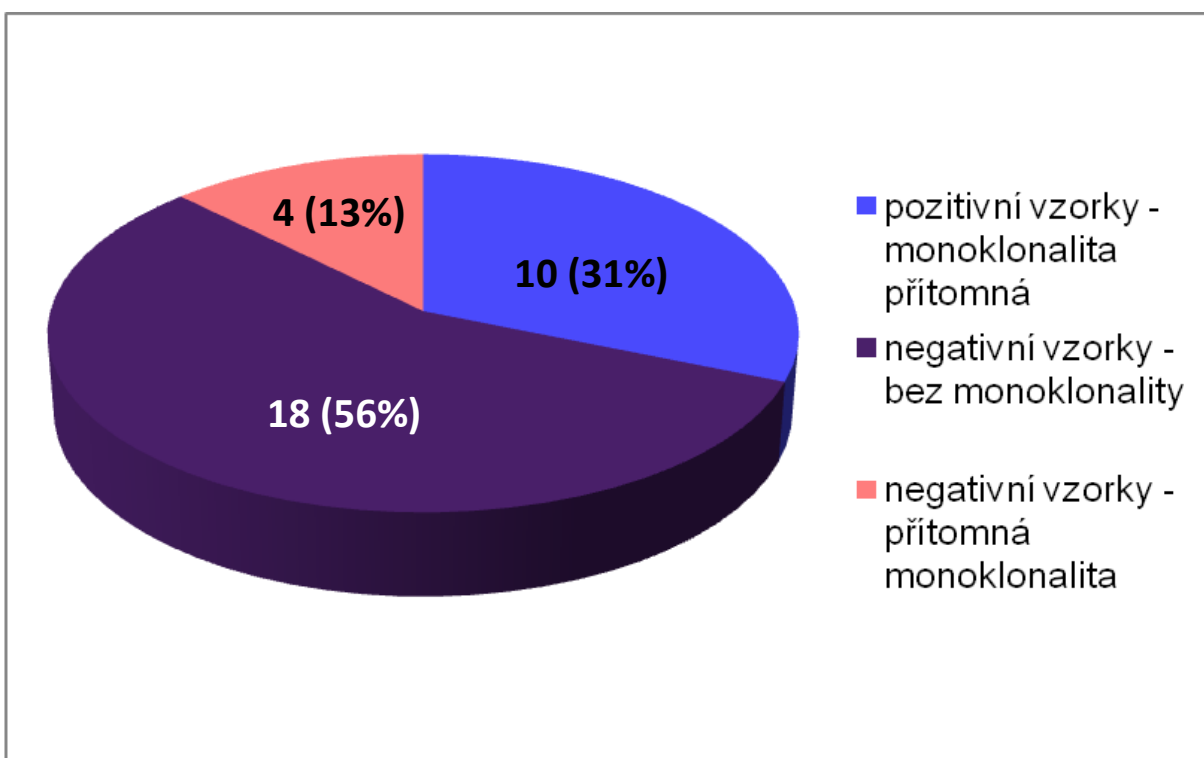


Obr. 21: Analýza VH-JH přeskupení lymfocytů periferní krve; Po provedení analýzy IGH přeskupení tohoto vzorku za pomoci PCR (viz text) byla část produktu PCR analyzována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu; šipka označuje oblast hledaných produktů v případě pozitivní kontroly; dráha L - velikostní standard HyperLadder V[®]; dráha A - primery: směs A / JH; dráha B - primery: směs B / JH; dráha C - primery: směs C / JH; dráha K+ - primery: CF 20i-5' / CF 20i-3'

5.2.3 Vyhodnocení spolehlivosti metody

Celkově lze tedy shrnout, že z celkového počtu 32 analyzovaných kontrolních vzorků byl u 28 z nich potvrzen předpoklad, že v případě výskytu B-lymfocytárního maligního onemocnění jsou buňky monoklonálně množeny a po analýze za pomoci mnohonásobné PCR se tato monoklonalita na gelu projeví jako ohraničené proužky předem definované velikosti. V opačném případě kdy tkáň není postižena maligním lymfoproliferativním onemocněním a jedná se pouze o reaktivní tkáň, dochází pouze k polyklonálnímu zmnožení buněk projevujícím se na gelu jako neohraničený „smear“ (obr. 16).

Tento předpoklad nebyl potvrzen pouze ve 4 případech, kdy i reaktivní tkáň nepostížená malignitou vykazovala na gelu monoklonální zmnožení buněk. Na základě těchto získaných výsledků byla stanovena spolehlivost metody na 87 % (obr. 22).



Obr. 22: Schématické znázornění spolehlivosti metody

5.3 Zavedení metody detekce VH-JH přeskupení pomocí PCR do klinické praxe

Po proběhnutí výše uvedených testovacích analýz a vyhodnocení úspěšnosti a spolehlivosti této metody pro analýzu klonality lidského IGH bylo rozhodnuto, že od 1. 1. 2010 je tato metoda v Laboratoři molekulární patologie Ústavu patologie FN Brno zavedena do rutinní praxe jako doplňková analýza klinických případů.

Je používána v případech, kdy za pomoci klasických vyšetřovacích postupů není možné s jistotou určit diagnózu pacienta a informace o přítomnosti či nepřítomnosti monoklonálního zmnožení lymfocytů ve vyšetřované tkáni může napomoci pro správné určení této diagnózy.

6 DISKUSE

Vzhledem k tomu, že při diagnostikování lymfoidních malignit se relativně často, přibližně v 10 - 15 %, vyskytují sporné případy, bývají u těchto vzorků prováděné analýzy, které poskytují doplňující informace, následně vedoucí ke správnému diagnostikování daného případu. Jednou z těchto analýz může být analýza klonálního zmnožení lymfocytů na základě detekce přeskupení genových segmentů kódujících BcR nebo TcR, protože až 98 % lymfoidních malignit má monoklonální populace lymfocytů. V dnešní době se pro tuto analýzu nejčastěji používají PCR techniky (van Dongen *et al.*, 2003).

Tato práce se zabývá zavedením analýzy klonálního zmnožení lymfocytů na základě detekce přeskupení genových segmentů těžkého řetězce BcR, neboť 90 - 95 % všech lymfoidních malignit je B-lymfocytárního typu (van Dongen *et al.*, 2003).

Tkáň používaná pro analýzu byla fixována ve formol-parafinových bločcích. Tento způsob fixace je v oblasti patologie nejrozšířenější. Jeho výhodou je jednodušší skladování vzorků, které nevyžaduje žádné speciální zacházení, a také preparáty, které jsou z těchto vzorků připraveny jsou tenčí a méně deformované než při přípravě řezů ze zmrazené tkáně. Bohužel díky procesu fixace dochází vlivem používaných fixativ k nezvratným změnám ve struktuře DNA, v některých případech dokonce dochází k její úplné degradaci. Při dlouhodobém skladování vzorků ve formol-parafinových bločcích také dále dochází k samovolné degradaci DNA (Nelson *et al.*, 2007), na rozdíl od tkáně zamrazené na teplotu tekutého dusíku, kde může být DNA skladována teoreticky neomezeně dlouho. Z tohoto důvodu jsou v případě analýz klonalit lymfocytů prováděných na gDNA izolovaných z formol-parafinových bločků primery navrženy tak, aby velikost jejich produktu nebyla příliš velká (přibližně 300bp) (Berezki *et al.*, 2007; Halldórsdóttir *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007; van Dongen *et al.*, 2003).

Z tohoto důvodu bylo nejprve potřeba zavést úspěšnou metodu izolace gDNA z těchto bločků, která by poskytovala minimálně 300 bp dlouhé fragmenty této gDNA. Kratší fragmenty by nemusely obsahovat kompletní úseky, které se během PCR amplifikují (van Dongen *et al.*, 2003). Metodu izolace gDNA se podařilo úspěšně zavést s použitím Puregene Core Kitu A (Qiagen) a vzhledem k následujícím proběhlým analýzám se podařilo vyizolovat gDNA i o fragmentech větších než 500 bp, neboť pro pozitivní kontrolu byl amplifikován úsek o velikosti 460 - 500 bp (Svachova *et Tichy*, 2008). Až na pár výjimek, kdy byla snížena intenzita proužku pozitivní kontroly pravděpodobně v důsledku izolování gDNA horší kvality, byla pozitivní kontrola během PCR bez problémů amplifikována. Izolace

z formol-parafinových bločků však není vždy jednoduchá. Například Liu *et al.* (2007) uvedli, že vyizolovat gDNA z formol-parafinových bločků o fragmentech větších než 300 bp se jim podařilo pouze v 79 % případů. Pokud se ale již podaří vyizolovat gDNA o požadované velikosti ze tkáně ve formol-parafinovém bločku, tak po provedení analýzy klonality není ve výsledku mezi touto gDNA a gDNA izolované z čerstvé tkáně rozdíl (Liu *et al.*, 2007).

Během námi prováděné analýzy za pomoci PCR byla konkrétně detekována oblast mezi V segmenty (VH) a J segmenty (JH), přičemž nejdůležitější oblast a zároveň nejlepší marker v tomto úseku je od 3' konce VH segmentu po 5' konec JH segmentu. V tomto místě se nachází hypervariabilní oblast CDR3, která projevuje největší variabilitu a tudíž má největší podíl na variabilitě mezi BcR. Z tohoto důvodu je pro analýzu přeskupení genových segmentů nejužitečnější a bývá amplifikována vždy při analýze úseku VH-JH bez ohledu na to, který z FR regionů 1 - 3 oblasti V je využit. (Gleissner *et al.*, 2000; Lukowsky *et al.*, 2006; Nelson *et al.*, 2007). Pro detekci této oblasti byly použity dva různé systémy PCR.

V prvním případě byl použit systém převzatý z Svachova *et Tichy* (2008). Tento systém se skládal z provedení dvou klasických reakcí PCR a dvou poloodstupňovaných reakcí PCR. V obou variantách byly použity primery nasedající do FR2 nebo FR3 podoblasti V segmentu, proti kterým byly použity primery nasedající na J segment. V obou variantách také tyto primery pro J segment nasedaly do částečně konzervované, konsenzuální sekvence a byly schopny nasedat na všech 6 J segmentů. Po úspěšném otestování funkčnosti PCR systému s použitím reakční směsi dle Svachova *et Tichy* (2008) byly provedeny analýzy 9 kontrolních vzorků s předem známou diagnózou. Po vyhodnocení výsledků však nebylo možné u žádného vzorku s jistotou rozlišit, zda se jedná o monoklonalitu či nikoliv. Po analýze negativních vzorků se na gelu objevovaly v některých drahách ohraničené proužky podobných specifikací, které bychom očekávali v případě pozitivních vzorků. Naopak pozitivní vzorky v některých reakcích netvořily předem očekávané specifické produkty.

Následně byly prováděny různé modifikace tohoto systému. Například byla snížena koncentrace primerů, aby bylo prověřeno, zda nedochází k nespecifickým vazbám primerů na DNA či vazbám primerů mezi sebou. Tato skutečnost se nepotvrdila. Snížení primerů vedlo pouze ke snížení intenzity proužků na gelu. Stejný účinek mělo i snížení množství DNA v reakci a také snížení koncentrace MgCl₂ v reakci. Ani po provedení těchto modifikací se nepodařilo v našich podmínkách tuto metodu úspěšně zavést.

Z tohoto důvodu byl později pro analýzu klonalit lymfocytů převzat systém 3 mnohonásobných reakcí podle van Dongen *et al.* (2003) detekující VH-JH úsek IGH. V těchto reakcích byly použity primery nasedající do FR1, FR2 i FR3 regionu, proti kterým

byl použit JH primer nasedající na konsenzuální sekvenci vyskytující se ve všech šesti J segmentech IGH. Tato oblast byla zvolena z toho důvodu, protože s použitím detekce přestaveb pouze VH-JH úseku genu IGH je klonalita odhalena v 82 % případů (van Dongen *et al.*, 2003). Složky reakční směsi kromě zde uvedených primerů využitých v tomto systému byly shodné se systémem dle Svachova *et Tichy* (2008).

Po úvodních optimalizacích se nám postupně podařilo danou metodu úspěšně zavést. Celkem se otestovalo 32 kontrolních vzorků s předem známou diagnózou. U 28 vzorků byla tato diagnóza analýzou klonality potvrzena. Po analýze kontrolních vzorků touto metodou se tak dosáhlo detekční míry 87 %, což je zhruba shodná hodnota s předpokládanou úspěšností.

Při vyhodnocování PCR analýz klonality lymfocytů je však třeba si vždy uvědomit fakt, že výsledek poukazující na přítomnost monoklonality nemusí nutně znamenat malignitu a naopak negativní výsledek na přítomnost monoklonality malignitu nevylučuje. Vyskytují se případy, u kterých je přítomná monoklonalita, ale tkáň nemá maligní charakter. Z nejčastěji se vyskytujících případů lze uvést CD8⁺ T-lymfocytózu, benigní monoklonální gamapatií, či různé druhy benigní kožní T-lymfoproliferace (van Dongen *et al.*, 2003). Dalším případem mohou být pseudoklonální či falešně pozitivní výsledky analýz. Na gelu se po analýze negativních vzorků objeví ohraničené proužky, které vykazují velmi podobné charakteristiky jako v případě analýzy pozitivního vzorku. To se může stát například v případě, kdy je ve vyšetřované reaktivní tkáni velmi malé množství lymfocytů. Ty jsou sice polyklonálního původu, ale díky jejich malému početnímu zastoupení v jinak neklonální tkáni, která není tvořená lymfocyty, mohou být v případě překročení citlivosti PCR amplifikovány a na gelu by mohly produkovat proužky podobné těm jako v případě monoklonálních lymfocytů. Druhým případem může být situace, kdy je variabilita délek analyzovaných fragmentů velmi minimální, a tak i když se jedná o polyklonální populaci lymfocytů nesoucí různé varianty BcR, mohou být po PCR velikostní rozdíly produktů velmi malé a na gelu se to může zdánlivě jevit jako ohraničený proužek (Mitha *et McGlennen*, 2001; van Dongen *et al.*, 2003).

Naproti tomu se vyskytují případy, kdy jde o maligně proliferující tkáň, ale tato tkáň neobsahuje monoklonality. Například v případě B-lymfoidních malignancí je uváděno, že monoklonalita bývá přítomná pouze u 83 % případů (Trainor *et al.*, 1990).

V neposlední řadě jsou analýzy klonality založené na PCR hodně zatížené falešně negativními výsledky. V tomto případě jde o monoklonální lymfocyty, u kterých se ale po proběhnutí analýzy neobjeví na gelu žádný ohraničený proužek. Jako jeden z důvodů těchto výsledků mohou být další mutace vzniklé v těchto nádorových tkáních. Například v důsledku chromozomálních translokací či delecí v oblasti genů pro řetězce BcR nebo TcR

může dojít ke změně sekvence gDNA, kde nasedají používané primery a ty se díky tomu nemohou navázat (Mitha *et* McGlennen, 2001). Dalším z důvodů může být somatická hypermutace pozměňující sekvenci v oblasti V u BcR. Tento proces je nejčastějším původcem falešně negativních výsledků u analýz IGH zralých B-lymfocytů pomocí detekce přeskupení genových segmentů VH-JH (van Dongen *et al.*, 2003). Při provádění analýzy pouze tohoto úseku může míra falešně negativních výsledků dosáhnout až 35 % (Gleissner *et al.*, 2000). Falešně negativních výsledků se může též dosáhnout i v případě přítomnosti maligních buněk v počtu pod senzitivním limitem (Hummel *et al.*, 2006). Všechny tyto skutečnosti mají vliv na spolehlivost metod využívajících analýzu klonality (Mitha *et* McGlennen, 2001).

U čtyř případů, u kterých po vyhodnocení analýzy nebyly potvrzeny předpokládané výsledky, se jednalo o vzorky, které byly diagnostikovány patologem jako negativní. Po provedení analýzy klonality se však na gelu ukázaly proužky, které měly shodnou velikost jako v případě pozitivních vzorků. Vzhledem k výše uvedeným příkladům není možné s jistotou potvrdit, zda se jedná skutečně o monoklonalitu. Existuje několik možných vysvětlení. Mohlo se jednat o benigní tkáň, která však může být tvořena monoklonálně zmnoženými buňkami. Vzhledem k tomu, že se jednalo o tkáň odebranou z lymfatických uzlin je zde nepravděpodobné, že by zde bylo přítomné pouze malé množství polyklonálních lymfocytů schopných vyvolat pseudoklonalitu. Jedna z pravděpodobnějších variant je, že se jedná o populaci polyklonálních lymfocytů, které po proběhnutí analýzy vytvořily produkty, které se od sebe lišily svou délkou jen velmi málo a ani s pomocí heteroduplexní analýzy jsme na polyakrylovém gelu nebyli schopni produkty rozlišit. Je však možné, že kdybychom použili vyhodnocení pomocí metody GeneScanning, která má vyšší rozlišovací schopnost, byly by již rozdíly více patrné. Dalším možným postupem by mohlo být provedení analýzy přeskupení i v jiných oblastech IGH, například DH-JH, nebo v genech pro lehké řetězce BcR, pomocí kterých by bylo možné upřesnit, zda se skutečně jedná o monoklonalitu či nikoliv. Je velmi nepravděpodobné, že kdyby se jednalo o polyklonalitu, tak by byly tvořeny produkty o malých délkových rozdílech i při analýze přestaveb ostatních BcR genů.

Právě tyto další způsoby analýzy B-lymfocytárních malignit by mohly být pro zpřesnění diagnostiky v budoucnu zavedeny. Například analýzou přeskupení DH-JH je možné zachytit malignitu, která vznikla z lymfocytu, u kterého proběhlo teprve přeskupení D-J, ale už ne V-DJ. Takto vzniklou monoklonalitu není možné s použitím detekce VH-JH oblasti prokázat, protože by nemohlo vlivem velké vzdálenosti míst pro nasednutí primerů dojít k amplifikaci. Varianta s použitím detekce DH-JH má i schopnost odhalit monoklonalitu v případě proběhlé somatické hypermutace v segmentu V na IGH, která by také nemusela být jen s použitím

detekce VH-JH přeskupení detekována díky pozměnění sekvence v místě nasedání primeru pro V segment (van Dongen *et al.*, 2003; van Krieken *et al.*, 2007).

Další možnou variantou by bylo zavedení detekce přeskupení i na řetězcích TcR. Díky nim by byla možná analýza monoklonality ve tkáních proliferujících z T-lymfocytární řady. I když je tato skupina co se týče celkového zastoupení lymfoidních malignit minoritní, tak i zde se vyskytují po klasických klinických vyšetřeních sporné případy. Pro tuto analýzu se nejvíce hodí detekce přeskupení na TcRG řetězci. Využití analýzy přeskupení TcR by však bylo možné i pro vzorky s B-lymfoidní proliferací, neboť jsou případy, kdy u monoklonálně zmnožených B-lymfocytů tvořících maligní tkáň dochází k přeskupení genových segmentů TcR řetězců (van Dongen *et al.*, 2003).

I přes uvedený výskyt sporných případů má tato metoda v daném provedení a s danou spolehlivostí 87 % velký přínos pro upřesnění diagnóz klinických vzorků. Právě díky této metodě a na základě jejích výsledků je možné v některých případech s nejednoznačnou diagnózou o správné diagnóze rozhodnout či tuto diagnózu upřesnit, což má pro vyšetřovaného pacienta velký význam.

7 ZÁVĚR

Mezi cíle této diplomové práce patřilo zavedení a optimalizace metody, kterou by bylo možné provádět analýzu klonální proliferace lidských B-lymfocytů. Tato metoda je založena na principu PCR amplifikace VH-JH úseku těžkého řetězce BcR a následné analýze vzniklých produktů po proběhnutí gelové elektroforézy.

Nejprve bylo nutné izolovat gDNA z vyšetřované tkáně. V našem případě se jednalo o tkáň fixovanou ve formol-parafinových bločcích. Pro tuto izolaci se nám osvědčilo používání Puregene Core Kitu A (Qiagen), pomocí kterého byla izolována gDNA v kvalitě i kvantitě vyhovující pro použití v následující analýze.

Analýza klonálního zmnožení B-lymfocytů byla nejprve prováděna systémem dvou poloodstupňovaných a dvou klasických reakcí PCR. I přes různé modifikace ve složení reakční směsi se v našich podmínkách nepodařilo analýzu tímto systémem zavést.

Z tohoto důvodu jsme pro analýzu následně zvolili systém tří mnohonásobných reakcí PCR. Ten byl postupně optimalizován a nakonec úspěšně zaveden. Po provedení analýz na 32 kontrolních vzorcích bylo dosaženo 87 % úspěšnosti v detekci monoklonální či polyklonální proliferace B-lymfocytů.

Druhým cílem práce bylo využití metody analýzy klonální proliferace lymfocytů u sporných klinických vzorků. I tohoto cíle bylo dosaženo. Od 1. 1. 2010 byla metoda analýzy klonality B-lymfocytů uvedena do rutinní praxe jako doplňková analýza klinických případů.

8 LITERATURA

- ANGEL, C.A., PRINGLE, J.H., NAYLOR, J., WEST, K.P., LAUDER, I. (1993): Analysis of antigen receptor genes in Hodgkin's disease. *J Clin Pathol* 46 (4): 337 - 340
- AUBIN, J., DAVI, F., NGUYEN-SALOMON, F., LEBOEUF, D., DEBERT, C., TAHER, M., VALENSI, F., CANIONI, D., BROUSSE, N., VARET, B., FLANDRIN, G., MACINTYRE, E.A. (1995): Description of a novel FR1 IgH PCR strategy and its comparison with three other strategies for the detection of clonality in B cell malignancies. *Leukemia* 9 (3): 471 - 479
- BAGG, A. (2006): Immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements: Minding your B's and T's in assessing lineage and clonality in neoplastic lymphoproliferative disorders. *J Mol Diagn* 8 (4): 426 - 429
- BERECZKI, L., KIS, G., BAGDI, E., KRENACS, L. (2007): Optimization of PCR amplification for B- and T-cell clonality analysis on formalin-fixed and paraffin-embedded samples. *Pathol Oncol Res* 13 (3): 209 - 214
- DISS, T.C., PAN, L., PENG, H., WOTHERSPOON, A.C., ISAACSON, P.G. (1994): Sources of DNA for detecting B cell monoclonality using PCR. *J Clin Pathol* 47 (6): 493 - 496
- EVANS, P.A., POTT, C.H., GROENEN, P.J., SALLES, G., DAVI, F., BERGER, F., GARCIA, J.F., VAN KRIEKEN, J.H., PALS, S., KLUIN, P., SCHUURING, E., SPAARGAREN, M., BOONE, E., GONZÁLEZ, D., MARTINEZ, B., VILLUENDAS, R., GAMEIRO, P., DISS, T.C., MILLS, K., MORGAN, G.J., CARTER, G.I., MILNER, B.J., PEARSON, D., HUMMEL, M., JUNG, W., OTT, M., CANIONI, D., BELDJORD, K., BASTARD, C., DELFAU-LARUE, M.H., VAN DONGEN, J.J.M., MOLINA, T.J., CABEÇADAS, J. (2007): Significantly improved PCR-based clonality testing in B-cell malignancies by use of multiple immunoglobulin gene targets. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 21 (2): 207 - 214

- FEIT, J., FEITOVÁ, V., HERMANOVÁ, M., PAVLOVSKÝ, Z., MOULIS, M., SOUČEK, O., ŽAMPACHOVÁ, V., SVOBODOVÁ, I., JANDÁKOVÁ, E., JEŽOVÁ, M., MÚČKOVÁ, K., ŠACHLOVÁ, M. (2007): Atlas patologie pro studenty medicíny. Brno: elektronický zdroj
- FLOHR, T., SCHRAUDER, A., CAZZANIGA, G., PANZER-GRÜMAYER, R., VAN DER VELDEN, V., FISCHER, S., STANULLA, M., BASSO, G., NIGGLI, F.K., SCHÄFER, B.W., SUTTON, R., KOEHLER, R., ZIMMERMANN, M., VALSECCHI, M.G., GADNER, H., MASERA, G., SCHRAPPE, M., VAN DONGEN, J.J.M., BIONDI, A., BARTRAM, C.R. (2008): Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 22 (4): 771 - 782
- FOON, K.A., TODD, R.F. (1986): Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood* 68 (1): 1 – 31
- GALLARDO, F., BELLOSILLO, B., SERRANO, S., PUJOL, R.M. (2008): Genotypic analysis in primary cutaneous lymphomas using the standardized BIOMED-2 polymerase chain reaction protocols. *Actas Dermosifiliogr* 99 (8): 608 - 620
- GARCÍA-SANZ, R., LÓPEZ-PÉREZ, R., LANGERAK, A.W., GONZÁLEZ, D., CHILLÓN, M.C., BALANZATEGUI, A., MATEOS, M.V., ALAEJOS, I., GONZÁLEZ, M., VAN DONGEN, J.J., SAN MIGUEL, J.F. (1999): Heteroduplex PCR analysis of rearranged immunoglobulin genes for clonality assessment in multiple myeloma. *Haematologica* 84 (4): 328 – 335
- GEISSINGER, E., BONZHEIM, I., KRENÁCS, L., ROTH, S., STRÖBEL, P., OTT, G., REIMER, P., WILHELM, M., MÜLLER-HERMELINK, H.K., RÜDIGER, T. (2005): Identification of the tumor cells in peripheral T-cell lymphomas by combined polymerase chain reaction-based T-cell receptor beta spectrotyping and immunohistological detection with T-cell receptor beta chain variable region segment-specific antibodies. *J Mol Diagn* 7 (4): 455 - 464

- GLEISSNER, B., MAURER, J., THIEL, E. (2000): Detection of immunoglobulin heavy chain genes rearrangements in B-cell leukemias, lymphomas, multiple myelomas, monoclonal and polyclonal gammopathies. *Leuk Lymphoma* 39 (1-2): 151 - 155
- GONZÁLEZ, M., GONZÁLEZ, D., LÓPEZ-PÉREZ, R., GARCÍA-SANZ, R., CHILLÓN, M.C., BALANZATEGUI, A., MATEOS, M.V., ALAEJOS, I., LANGERAK, A.W., ORFÃO, A., VAN DONGEN, J.J., SAN MIGUEL, J.F. (1999): Heteroduplex analysis of VDJ amplified segments from rearranged IgH genes for clonality assessments in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. A comparison between different strategies. *Haematologica* 84 (4): 779 – 784
- GONZÁLEZ, D., VAN DER BURG, M., GARCÍA-SANZ, R., FENTON, J.A., LANGERAK, A.W., GONZÁLEZ, M., VAN DONGEN, J.J.M., SAN MIGUEL, J.F., MORGAN, G.J. (2007): Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood* 110 (9): 3112 - 3121
- GROSSMAN, P.D., BLOCH, W., BRINSON, E., CHANG, C.C., EGGERDING, F.A., FUNG, S., IOVANNISCI, D.A., WOO, S., WINN-DEEN, E.S. (1994): High-density multiplex detection of nucleic acid sequences: Oligonucleotide ligation assay and sequence-coded separation. *Nucleic Acids Res* 22 (21): 4527 - 4534
- GURBITY, T.P., BAGDI, E., GROEN, N.A., BUDEL, L.M., ABBOU, M., KRENACS, L., DINJENS, W.N. (2003): Increased sensitivity of B-cell clonality analysis in formalin-fixed and paraffin-embedded B-cell lymphoma samples using an enzyme blend with both 5'→3' DNA polymerase and 3'→5' exonuclease activity. *Virchows Arch* 443 (5): 643 - 648
- HALLDÓRSDÓTTIR, A.M., ZEHNB AUER, B.A., BURACK, W.R. (2007): Application of BIOMED-2 clonality assays to formalin-fixed paraffin embedded follicular lymphoma specimens: superior performance of the IGK assays compared to IGH for suboptimal specimens. *Leuk Lymphoma* 48 (7): 1338 - 1343

- HARRIS, N.L., JAFFE, E.S., STEIN, H., BANKS, P.M., CHAN, J.K.C., CLEARY, M.L., DELSOL, G., DEWOLFPEETERS, C., FALINI, B., GATTER, K.C., GROGAN, T.M., ISAACSON, P.G., KNOWLES, D.M., MASON, D.Y., MULLERHERMELINK, H.K., PILERI, S.A., PIRIS, M.A., RALFKIAER, E., WARNKE, R.A. (1994): A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84 (5): 1361 - 1392
- HOSHINO, A., FUNATO, T., MUNAKATA, Y., ISHII, T., ABE, S., ISHIZAWA, K., ICHINOHASAMA, R., KAMEOKA, J., MEGURO, K., SASAKI, T. (2004): Detection of clone-specific immunoglobulin heavy chain genes in the bone marrow of B-cell-lineage lymphoma after treatment. *Tohoku J Exp Med* 203 (3): 155 - 164
- HUMMEL, M., OESCHGER, S., BARTH, T.F., LODDENKEMPER, C., COGLIATTI, S.B., MARX, A., WACKER, H.H., FELLER, A.C., BERND, H.W., HANSMANN, M.L., STEIN, H., MÖLLER, P. (2006): Wotherspoon criteria combined with B cell clonality analysis by advanced polymerase chain reaction technology discriminates covert gastric marginal zone lymphoma from chronic gastritis. *Gut* 55 (6): 782 - 787
- KLAPPER, W., BÖHM, M., SIEBERT, R., LENNERT, K. (2008): Morphological variability of lymphohistiocytic variant of anaplastic large cell lymphoma (former lymphohistiocytic lymphoma according to the Kiel classification). *Virchows Arch* 452 (6): 599 - 605
- KNAUF, W.U., POCHANKE, G., HO, A.D. (1993): Detection of circulating monoclonal lymphocytes in multiple myeloma patients by analysis of gene rearrangements: correlation with progressive disease. *Leuk Res* 17 (4): 341 - 345
- KREJSEK, J., KOPECKÝ, O. (2004): *Klinická imunologie*. Nucleus HK, Hradec Králové: 209 - 270
- KÜPPERS, R., WILLENBROCK, K., RAJEWSKY, K., HANSMANN, M.L. (1995): Detection of clonal λ light chain gene rearrangements in frozen and paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 147 (3): 806 - 814

- KÜPPERS, R., RAJEWSKY, K., HANSMANN, M.L. (1997): Diffuse large cell lymphomas are derived from mature B cells carrying V region genes with a high load of somatic mutation and evidence of selection for antibody expression. *Eur J Immunol* 27 (6): 1398 - 1405
- KÜPPERS, R., KLEIN, U., HANSMANN, M.L., RAJEWSKY, K. (1999): Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 341 (20): 1520 - 1529
- LANGERAK, A.W., SZCZEPAŃSKI, T., VAN DER BURG, M., WOLVERS-TETTERO, I.L., VAN DONGEN, J.J.M. (1997): Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. *Leukemia* 11 (12): 2192 - 2199
- LIU, H., BENCH, A.J., BACON, C.M., PAYNE, K., HUANG, Y., SCOTT, M.A., ERBER, W.N., GRANT, J.W., DU, M.Q. (2007): A practical strategy for the routine use of BIOMED-2 PCR assays for detection of B- and T-cell clonality in diagnostic haematopathology. *Br J Haematol* 138 (1): 31 - 43
- LUKOWSKY, A., MARCHWAT, M., STERRY, W., GELLRICH, S. (2006): Evaluation of B-cell clonality in archival skin biopsy samples of cutaneous B-cell lymphoma by immunoglobulin heavy chain gene polymerase chain reaction. *Leuk Lymphoma* 47 (3): 487 - 493
- LUTHRA, R., MCBRIDE, J.A., CABANILLAS, F., SARRIS, A. (1998): Novel 5' exonuclease-based real-time PCR assay for the detection of t(14;18)(q32;q21) in patients with follicular lymphoma. *Am J Pathol* 153 (1): 63 - 68
- MCCARTHY, K.P., SLOANE, J.P., KABAROWSKI, J.H., MATUTES, E., WIEDEMANN, L.M. (1991): The rapid detection of clonal T-cell proliferations in patients with lymphoid disorders. *Am J Pathol* 138 (4): 821 - 828
- MCCARTHY, K.P., SLOANE, J.P., KABAROWSKI, J.H., MATUTES, E., WIEDEMANN, L.M. (1992): A simplified method of detection of clonal rearrangements of the T-cell receptor- γ chain gene. *Diagn Mol Pathol* 1 (3): 173 - 179

- MEDEIROS, L.J., CARR, J. (1999): Overview of the role of molecular methods in the diagnosis of malignant lymphomas. *Arch Pathol Lab Med* 123 (12): 1189 - 1207
- MITHA, N., MCGLENNEN, R.C. (2001): Methods to detect clonal gene rearrangements in lymphomas and leukemias. *Methods in molecular medicine* 49 (Molecular pathology protocols), Humana press: 189 – 209 (ed. Killeen, A.A.)
- NELSON, D., NELSON, A., HJORTHAGEN, L., SJÖVALL, E., EHINGER, M. (2007): A limited number of IgH-primers binding to framework region 1 is sufficient to detect the majority of mature small B-cell non-Hodgkin lymphomas on formalin-fixed paraffin-embedded tissue by PCR. *Leuk Lymphoma* 48 (9): 1806 - 1815
- NIHAL, M., MIKKOLA, D., WOOD, G.S. (2000): Detection of clonally restricted immunoglobulin heavy chain gene rearrangements in normal and lesional skin: Analysis of the B cell component of the skin-associated lymphoid tissue and implications for the molecular diagnosis of cutaneous B cell lymphomas. *J Mol Diagn* 2 (1): 5 – 10
- PAPAJÍK, T., RAIDA, L., INDRÁK, K. (2005): REAL/WHO klasifikace nádorů lymfatické tkáně: 10 let fungování společného jazyka z pohledu klinické praxe. *Vnitř Lék* 51 (6): 690 - 698
- RAGHAVACHAR, A., BINDER, T., BARTRAM, C.R. (1988): Immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in Hodgkin's disease. *Cancer Res* 48 (13): 3591 - 3594
- RIORDAN, J.R., ROMMENS, J.M., KEREM, B., ALON, N., ROZMAHEL, R., GRZELCZAK, Z., ZIELENSKI, J., LOK, S., PLAVSIC, N., CHOU, J.L., DRUMM, M.L., IANNUZZI, M.C., COLLINS, F.S., TSUI, L. (1989): Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245: 1066 - 1073
- ROSENBERG, S.A. (1994): Classification of Lymphoid Neoplasms. *Blood* 84 (5): 1359 - 1360

- SANDBERG, Y., VAN GASTEL-MOL, E.J., VERHAAF, B., LAM, K.H., VAN DONGEN, J.J.M., LANGERAK, A.W. (2005): BIOMED-2 multiplex immunoglobulin/T-cell receptor polymerase chain reaction protocols can reliably replace Southern blot analysis in routine clonality diagnostics. *J Mol Diagn* 7 (4): 495 - 503
- SAYED, D., BADRAWY, H., ALI, A.M., SHAKER, S. (2009): Immunophenotyping and immunoglobulin heavy chain gene rearrangement analysis in cerebrospinal fluid of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 33 (5): 655 - 661
- SCHMETZER, H.M., BRAUN, S., WIESNER, D., DUELL, T., GERHARTZ, H.H., MITTERMUELLER, J. (2000): Gene rearrangements in bone marrow cells of patients with acute myelogenous leukemia. *Acta Haematol* 103 (3): 125 - 134
- STROSS, W.P., WARNKE, R.A., FLAVELL, D.J., FLAVELL, S.U., SIMMONS, D., GATTER, K.C., MASON, D.Y. (1989): Molecule detected in formalin fixed tissue by antibodies MT1, DF-T1, and L60 (Leu-22) corresponds to CD43 antigen. *J Clin Pathol* 42 (9): 953 - 961
- SVACHOVA, M., TICHY, M. (2008): PCR analysis of immunoglobulin heavy chain and TCR gene rearrangements in diagnosis of lymphoproliferative disorders on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Neoplasma* 55 (1): 36 – 41
- SWERDLOW, S.H., CAMPO, E., HARRIS, N.L., JAFFE, E.S., PILERI, S.A., STEIN, H., THIELE, J., VARDIMAN, J.W (2008): WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition. IARC Press, Lyon
- TAN, B.T., WARNKE, R.A., ARBER, D.A. (2006): The frequency of B- and T-cell gene rearrangements and epstein-barr virus in T-cell lymphomas: A comparison between angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma, unspecified with and without associated B-cell proliferations. *J Mol Diagn* 8 (4): 466 - 475
- TONEGAWA, S. (1983): Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302: 575 - 581
- TRAINOR, K.J., BRISCO, M.J., STORY, C.J., MORLEY, A.A. (1990): Monoclonality in B-lymphoproliferative disorders detected at the DNA level. *Blood* 75 (11): 2220 - 2222

VAN DONGEN, J.J., LANGERAK, A.W., BRÜGGEMANN, M., EVANS, P.A., HUMMEL, M., LAVENDER, F.L., DELABESSE, E., DAVI, F., SCHUURING, E., GARCÍA-SANZ, R., VAN KRIEKEN, J.H., DROESE, J., GONZÁLEZ, D., BASTARD, C., WHITE, H.E., SPAARGAREN, M., GONZÁLEZ, M., PARREIRA, A., SMITH, J.L., MORGAN, G.J., KNEBA, M., MACINTYRE, E.A. (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

VAN KRIEKEN, J.H., LANGERAK, A.W., MACINTYRE, E.A., KNEBA, M., HODGES, E., SANZ, R.G., MORGAN, G.J., PARREIRA, A., MOLINA, T.J., CABEÇADAS, J., GAULARD, P., JASANI, B., GARCIA, J.F., OTT, M., HANNSMANN, M.L., BERGER, F., HUMMEL, M., DAVI, F., BRÜGGEMANN, M., LAVENDER, F.L., SCHUURING, E., EVANS, P.A., WHITE, H., SALLES, G., GROENEN, P.J., GAMEIRO, P., POTT, C.H., VAN DONGEN, J.J.M. (2007): Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 21 (2): 201 - 206

VARGAS, R.L., FELGAR, R.E., ROTHBERG, P.G. (2008): Detection of clonality in lymphoproliferations using PCR of the antigen receptor genes: Does size matter?. *Leuk Res* 32 (2): 335 - 338

VENKATRAMAN, L., CATHERWOOD, M.A., PATTERSON, A., LIOE, T.F., MCCLUGGAGE, W.G., ANDERSON, N.H. (2006): Role of polymerase chain reaction and immunocytochemistry in the cytological assessment of lymphoid proliferations. *J Clin Pathol* 59 (11): 1160 - 1165

WAN, J.H., TRAINOR, K.J., BRISCO, M.J., MORLEY, A.A. (1990): Monoclonality in B-cell lymphoma detected in paraffin wax embedded sections using the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 43 (11): 888 - 890

- YAMAUCHI, A., IKEDA, J., NAKAMICHI, I., KOHARA, M., FUKUHARA, S., HINO, M., KANAKURA, Y., OGAWA, H., SUGIYAMA, H., KANAMARU, A., AOZASA, K. (2008): Diffuse large B-cell lymphoma showing an interfollicular pattern of proliferation: a study of the Osaka Lymphoma Study Group. *Histopathology* 52 (6): 731 - 737
- YANG, W.I., JUNG, S.H., CHOI, I.J. (1990): Non-Hodgkin's lymphoma: a histopathologic and immunohistochemical study of 79 cases. *Yonsei Med J* 31 (2): 123 - 133
- ZEHENTNER, B.K., FRITSCHLE, W., STELZER, T., GHIRARDELLI, K.M., HUNTER, K., WENTZEL, C., BENNINGTON, R., HANSEN, C.L., MYERSON, D., KALNOSKI, M., WELLS, D.A., LOKEN, M.R. (2006): Minimal disease detection and confirmation in hematologic malignancies: combining cell sorting with clonality profiling. *Clin Chem* 52 (3): 430 - 437
- ZOLA, H., SWART, B., NICHOLSON, I., AASTED, B., BENSUSSAN, A., BOUMSELL, L., BUCKLEY, C., CLARK, G., DRBAL, K., ENGEL, P., HART, D., HOREJSÍ, V., ISACKE, C., MACARDLE, P., MALAVASI, F., MASON, D., OLIVE, D., SAALMUELLER, A., SCHLOSSMAN, S.F., SCHWARTZ-ALBIEZ, R., SIMMONS, P., TEDDER, T.F., UGUCCIONI, M., WARREN, H. (2005): CD molecules 2005: human cell differentiation molecules. *Blood* 106 (9): 3123 - 3126

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	Směs akrylamidu a N,N' - methylenbisakrylamidu
AML	Akutní myeloidní leukémie
APS	Amonium persulfát
BcR	B-lymfocytární buněčný receptor (B-cell receptor)
bp	Pár bází (Base pair)
CD	Diferenciační znaky (Cluster of differentiation)
CDR	Oblast určující komplementaritu (Complementary determining region)
CLL	Chronická lymfocytární leukémie (Chronic Lymphocytic Leukemia)
ddH ₂ O	2x předestilovaná voda (double distilled water)
DEPC H ₂ O	Deionizovaná voda ošetřená inhibítorem ribonukleáz diethylpyrokarbonátem
DH	Oblast D na těžkém řetězci B-lymfocytárního buněčného receptoru (D region of Immunoglobulin heavy chain)
DLBCL	Difúzní velkobuněčný B-lymfom (Diffuse Large B-cell Lymphoma)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
dNTPs	Dinukleotid trifosfáty
dsDNA	Dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina (double-stranded deoxyribonucleic acid)
FGFR1	Receptor fibroblastových růstových faktorů 1 (Fibroblast growth factor receptor 1)
FR	Úsek struktury základu (Framework region)
gDNA	genomická deoxyribonukleová kyselina (genomic deoxyribonucleic acid)
GE	Gelová elektroforéza
HLA	Hlavní histokompatibilní komplex člověka (Human leukocyte antigens)
HLDA	Lidské leukocytární diferenciační antigeny (Human Leucocyte Differentiation Antigens)
Ig	Imunoglobulin
IGH	Těžký řetězec B-lymfocytárního buněčného receptoru (Immunoglobulin heavy chain)
IGK	Lehký řetězec B-lymfocytárního buněčného receptoru typu κ (Immunoglobulin kappa chain)
IGL	Lehký řetězec B-lymfocytárního buněčného receptoru typu λ (Immunoglobulin lambda chain)
JH	Oblast J na těžkém řetězci B-lymfocytárního buněčného receptoru (J region of Immunoglobulin heavy chain)
kb	Kilobáze (Kilobase)
Kde	deleční element na lehkém řetězci κ BcR (kappa deleting element)
M-bcr	Major breakpoint cluster region
MZL	Lymfom z marginální zóny (Marginal Zone Lymphoma)

NK	Přirození zabíječi (Natural killer)
PAA	Polyakrylamid
PAGE	Gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)
PDGFRA	Receptor destičkových růstových faktorů alfa (platelet-derived growth factor receptor alpha)
PDGFRB	Receptor destičkových růstových faktorů beta (platelet-derived growth factor receptor beta)
PK	Periferní krev
REAL	Revidovaná evropsko-americká lymfomová klasifikace (A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms)
RNA	Ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
Rnáza A	Ribonukleáza A
rpm	Otáčky za minutu (revolutions per minute)
RSS	Rozpoznávací signální sekvence (Recognition signal sequences)
SLL	Lymfom z malých lymfocytů (small lymphocytic lymphoma)
ssDNA	Jednovláknová deoxyribonukleová kyselina (single-stranded deoxyribonucleic acid)
TcR	T-lymfocytární buněčný receptor (T-cell receptor)
TcRA	Řetězec α T-lymfocytární buněčný receptor (T-cell receptor alpha chain)
TcRB	Řetězec β T-lymfocytární buněčný receptor (T-cell receptor beta chain)
TcRD	Řetězec δ T-lymfocytární buněčný receptor (T-cell receptor delta chain)
TcRG	Řetězec γ T-lymfocytární buněčný receptor (T-cell receptor gamma chain)
TdT	Terminální deoxynukleotidyl-transferasa (Terminal deoxynucleotidyl transferase)
TEMED	N,N,N,N –Tetramethylethylenediamin
TH	Označení pomocných lymfocytů (T-cell helper)
UV	Ultrafialové záření (ultraviolet light)
VH	Oblast V na těžkém řetězci B-lymfocytárního buněčného receptoru (V region of Immunoglobulin heavy chain)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

PREZENTACE PRÁCE

Tato práce byla prezentována ve formě „posteru“ na konferenci XIV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů konané 20. - 21. dubna 2010.

*Masarykova univerzita – Přírodovědecká fakulta, Ústav biochemie
a
Česká společnost pro biochemii a molekulární biologii*

pod záštitou

rektora Masarykovy univerzity prof. PhDr. Petra Fialy, Ph.D.
děkana Přírodovědecké fakulty MU doc. RNDr. Jaromíra Leichmanna, Dr.

XIV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů

Sborník příspěvků



20.–21. dubna 2010

Konferenční centrum hotelu Continental v Brně

Na konferenci byl uveden abstrakt k prezentovanému „posteru“ v následující podobě:

URČENÍ KLONALITY B-LYMFOCYTŮ

Aleš Efenberk^{1,2}, Jana Slováčková¹, Jana Šmardová¹

¹Laboratoř molekulární patologie, ÚPA FN Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno

²Katedra buněčné biologie a genetiky, UP Olomouc

Při lymfoproliferativním onemocnění dochází ke zvýšené tvorbě lymfocytů a jejich následnému vyplavování do krve. Většina nádorů či rakovinných ložisek vzniká z jedné buňky a vzniklá léze tak má klonální charakter. Později však může dojít k dalším mutacím a přestavbám a díky tomu se tvoří populace buněk i s odlišnou genetickou výbavou.

B-lymfocyty mají na svém povrchu imunoglobuliny (BcR), které jim slouží jako buněčné receptory. Jedná se o imunoglobuliny třídy IgM a IgD. Skládají se vždy ze dvou lehkých a dvou těžkých řetězců. Lehké řetězce mohou být typu kappa (IGK) nebo lambda (IGL). Geny pro jejich tvorbu se nacházejí na 22. chromozomu v případě IGK a na 2. chromozomu u IGL. Těžké řetězce (IGH) jsou kódovány na 14. chromozomu a stejně jako lehké řetězce se skládají z konstantní a variabilní části. Variabilní část IGH je tvořena oblastmi V, D, J. Kombinací genových segmentů je dána základní diverzita BcR. Ta je dále zvětšována inzercí či delecí nukleotidů do oblasti mezi přeskupované segmenty.

Cílem práce bylo zavedení a optimalizace metody pro diagnostiku klonality B-lymfocytů z tkáně pacientů fixované ve formol-parafinových blocích. Z této tkáně jsme izolovali gDNA pomocí Puregene Core Kitu A (Qiagen) a tu použili jako matici pro tři multiplex PCR reakce. Použité primery rozpoznávají částečně konzervované sekvence ve variabilní oblasti V a oblasti J. Jako „forward“ primery se používají směsi primerů specifických pro FR (framework region) úseky segmentu V, „reverse“ primer se váže k segmentu J IGH. (1). Po PCR následuje heteroduplexní analýza, rozdělení vzorku pomocí elektroforézy v 8 % polyakrylamidovém gelu. Zvýšená klonální proliferace B-lymfocytů související s nádorovým onemocněním se projeví na gelu jako ohraničený band, v případě polyklonálního nenádorového vzorku se na gelu objeví pouze neohraničený smír.

Po optimalizaci metody jsme testovali 28 kontrolních vzorků, u kterých byla po imunohistologickém vyšetření jednoznačně stanovena diagnóza. U 15 z nich jsme potvrdili negativní výsledek, u 10 byla potvrzena klonalita. Pouze u 3 vzorků výsledek určení klonality B-lymfocytů nepodpořil stanovenou diagnózu. Úspěšnost metody je tedy 88%. V současné době tuto metodu rutinně používáme pro zpřesnění diagnostiky nejasných či sporných případů.

Tato práce byla podpořena granty NS/10448-3 IGA MZ a MŠMT 0021622415.

Literatura:

1. van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggermann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL et al. (2003) *Leukemia* 17:2257-2317