

Immunglobulin (IgH) nehézlánc-génátrendeződés vizsgálata follicularis lymphomában

Mezei Tibor¹, Horváth Emőke¹, Tóth Erika³, Csernák Erzsébet², Pap Zsuzsanna², Pávai Zoltán²,
Szentirmay Zoltán³, Jung János¹

Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem,¹Patológia Tanszék,²Anatómia és Embriológia Tanszék,³Országos Onkológiai Intézet Budapest

Studiul rearanjamentului genelor lanțului greu al imunoglobulinelor în limfomul folicular

Diagnosticul de biologie moleculară din cadrul limfoamelor este reprezentat în primul rând de determinările clonalității respectiv al translocațiilor cromozomiale non-randomice. Scopul studiului nostru a fost de a evalua utilitatea determinării clonalității limfoamelor foliculare din material arhivat în parafină. Studiul a cuprins 19 cazuri de limfom folicular din cazuistica Serviciului de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic de Urgență Târgu Mureș. Diagnosticul s-a formulat pe baza colorațiilor uzuale, completate cu determinări de imunohistochimie. Determinările de biologie au fost reprezentate de metode PCR real time și clasic. Primeri utilizați au fost aleși conform indicațiilor studiului BIOMED-2. În 3 cazuri ADN-ul obținut era inadecvat pentru determinări, acestea incluzând 2 cazuri de limfom și un limfonodul. 68,42% dintre cazuri (13 cazuri) s-au dovedit a fi monoclonale, 15,78% (2 cazuri) oligoclonale și 5,26% (1 caz) policlonal. Determinările de biologie moleculară aduc dovezi suplimentare și pot confirma sau infirma natura leziunilor în cazul unor leziuni asemănătoare limfoamele. În aceste cazuri, determinarea clonalității poate confirma diagnosticul prin evidențierea originii monoclonale a celulelor tumorale.

Cuvinte cheie: limfomul folicular, determinarea clonalității, rearanjamentul genelor IgH, PCR

Immunoglobulin heavy chain gene rearrangement in follicular lymphoma

Molecular biology studies used in the diagnosis of lymphomas are being represented especially by clonality analysis and the study of non-random chromosomal translocations. The aim of our study was to evaluate the usefulness of clonality assessment in paraffin embedded archived bioplastic material. 19 cases from the archives of the Pathology Department of the Emergency Clinical Hospital Targu Mures were included in the study. Molecular biology studies consisted of conventional and real time PCR. The primers used were chosen according to the BIOMED-2 study. In 3 cases the obtained DNA was unsuitable for molecular studies, two of these being lymphoma cases and one lymph node with reactive lesions. 68,42% of the cases (13 cases) proved to be monoclonal, 15,78% (2 cases) oligoclonal and 5,26% (1 case) polyclonal. Molecular biology studies bring further support or dismiss the malignant nature of the lesions. This is especially valid in cases where the tissue architecture is highly suggestive of reactive lesion. In these cases, clonality assessment may confirm the malignant nature of the lesion by proving the monoclonal origin of the tumour cells.

Keywords: follicular lymphoma, clonality assessment, IgH gene rearrangement, PCR

Orvostudományi Értesítő, 2009, 82 (4): 257-260

www.orvudert.ro

A molekuláris vizsgálatok alapját a lymphomák diagnózisában a klonális immunoglobulingének átrendeződése, illetve a nem random kromozómatranszlokációk kimutatása képezi. Ezen vizsgálatok alkalmasak a tumorsejtek B- vagy T-sejtes eredetének tisztázására, továbbá az elváltozás monoklonális (tumoros) vagy poliklonális (reaktív) természetének meghatározására [1, 2, 4]. A follicularis lymphomák (FL) esetében ezen módszerek különlegesen fontosak, mivel más mérsékelt malignitású B-sejtes non-hodgkin lymphomák (köpenysejtes-, marginális zóna lymphoma), a FL-hoz hasonlóan, járhatnak follicularis növekedési mintázattal. Továbbá a nyirokcsomó reaktív elváltozásai (progresszíven transzformált tüszők, follicularis hyperplasia) sok esetben differenciáldiagnosztikai nehézségeket okoznak. Az IgH/BCL-2 génhibrid kimutatása egyaránt használatos a betegség diagnosztizálásában és a kezelést követően a minimális reziduális betegség kimutatásában [3, 14, 17, 18].

A follicularis lymphoma gyakorisága világviszonylatban tág határok között változik. A fejlett országokban a B-sejtes lymphomák 30-40%-át teszik ki, az Amerikai Egyesült Államokban még ennél is magasabb, 45%-os előfordulásról tanuskodnak a statisztikák, Közép-Kelet Európában a gyakoriság 15-20% közöttire tehető [19]. Intézetünk anyagában

az előfordulás 12-16% volt, amely a vizsgált 8 éves periódusban (2000-2007) egyértelmű növekvő tendenciát mutat.

Retrospektív vizsgálatunk célja az IgH génátrendeződés vizsgálatának lehetőségéből adódó diagnosztikai eltérések felmérése volt, immunfenotipizálás során FL-nek diagnosztizált B-sejtes non-hodgkin lymphomára vonatkoztatva. Ezen belül, célunk az volt, hogy a Marosvásárhelyi Patológiai Intézet anyagában diagnosztizált follicularis lymphoma esetekben megvizsgáljuk az immunglobulin génátrendeződést, molekuláris biológiai módszerek felhasználásával.

Anyag és módszer

Összesen 19 follicularis lymphomában vizsgáltuk meg az immunglobulin nehézlánc génátrendeződést. A diagnózis felállítása a standard festési eljárásokat követő immunhisztokémiai meghatározás alapján történt. A kórisme felállításához szükséges minimális diagnosztikus panelt (CD20, CD3, CD5, Ki67, bcl-2, CD10) kiegészítettük a CD23, CD21, bcl-6, p53, cyclin D1 antigének meghatározásával. A reakciótermékek vizualizálása a peroxidáz-antiperoxidáz módszerrel történt.

A vizsgált eseteken kívül, monoklonális kontrollként egy diffúz nagy B-sejtes lymphoma mintát, poliklonális kontrollként 4, reaktív elváltozást mutató nyirokcsomó mintát használtunk.

A génátrendeződés vizsgálatokhoz szükséges DNS-t, a minták archivált, 4%-os formalinban rögzített, paraffinos

Dr. Mezei Tibor

Patológia Tanszék, Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem
Marosvásárhely - Târgu Mureș
str. Gh. Marinescu 54,
e-mail: tmezei@pathologia.ro

1. táblázat. A hagyományos PCR reakció paramétereit

# Művelet	Inkubálás	Denaturálás	Annealing	Extenzió	Ciklusszám
1. szakasz	95 °C – 10 min				1×
2. szakasz		95 °C – 30 sec	60 °C – 30 sec	72 °C – 15 sec	10 ×
3. szakasz		95 °C – 30 sec	60 °C – 30 sec	72 °C – 15 sec	10 × (-0,5°C/ciclu)
4. szakasz		95 °C – 30 sec	55 °C – 30 sec	72 °C – 15 sec	20 ×

A ciklusok lejárta után 5 percig 72°C maradnak a minták.

blokkjaiból izoláltak. Blokkonként 3-4 darab 8-10 mikronos metszetet készítettünk, amelyekből két gyári protokoll szerint tisztítottuk a DNS-t: a Roche High Pure DNA Extraction and Isolation Kit és a Fermentas Genomic Purification Kit segítségével. Az emésztéshez proteináz K enzimet használtunk („overnight” inkubálással). Az izolált DNS-ek tisztaságát és koncentrációját Biospectrophotometer és NanoDrop Spectrophotometer készülékek segítségével mértük meg. Az elegyek tisztaságának megítélésére spektrofotometriás módszerrel meghatározott, a fény különböző hullámhosszán mért, abszorpciós értékek arányaiból következtettünk [15]. A DNS fényelnyelése a 260 nm-en a maximális (A_{260}), a fehérjéké 280 nm-en (A_{280}), míg az egyéb összetevők (szénhidrátok, peptidok, fenolok, aromás vegyületek) fényelnyelése 230 nm-en a maximális (A_{230}). Mintáink esetén az A_{260}/A_{230} arányt elemeztük, ugyanis ez adja meg a nukleinsavak tisztaságát, illetve az izolálás hatékonyságát. A szakirodalomban javasolt A_{260}/A_{230} érték 1,8.

Az immunglobulin nehézlánc gének átrendeződését hagyományos és real time PCR módszerrel vizsgáltuk. A primerek megválasztásánál figyelembe vettük a BIOMED-2 tanulmány ajánlásait és annak néhány módosítását [5, 8, 9]. Az immunglobulin gén különböző régiói közül az FR3 (framework region 3) az, amelyik megtartott (conserved motif) szekvenciát tartalmaz, és szinte mindegyik átrendeződött immunglobulin génben megtalálható. Ez tulajdonképpen a különbözőképpen átrendeződött immunglobulin gének, egyféle „közös vonása” (consensus VH FR3 region), ennél fogva alkalmas arra, hogy biztos támpontként szolgáljon a primer tervezésekor [7, 11, 13]. Ilyen megfontolások alapján választottuk az alábbi primer szekvenciákat és oligonukleotid próbákat:

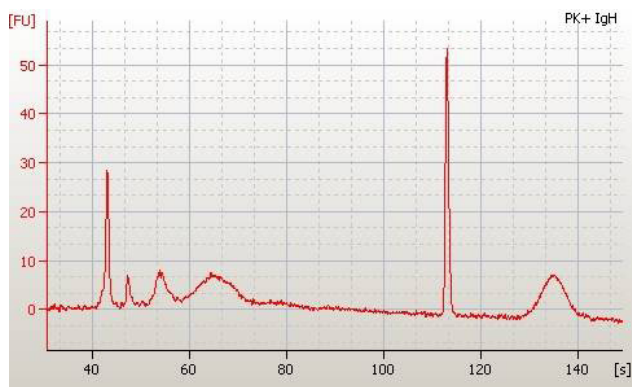
- forward FR3A primer (consensus VH FR3 region): 5'-ACACGGCCGTGTATTACTGT-3'
- reverse IgJH2 primer (consensus JH region): 3'-ACCTGAGGAGACGGTGACG-5'
- probe 1: CTGGCTTCCTTCCCTCTGT
- probe 2: TCAGTCTCTGGGGAGGAGT

A primerek tervezése és tesztelése során felhasználtuk a különböző nukleotid-szekvenciákat tartalmazó adatbázisokat [21-23].

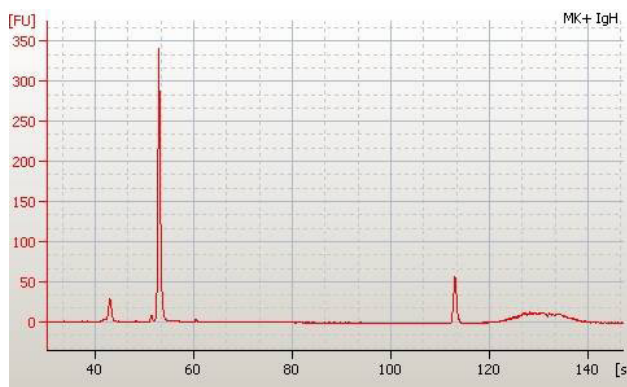
A hagyományos PCR reakció paramétereit az **1. táblázatban** foglaltuk össze. A hagyományos PCR reakció termékeit agaróz gélben és gél-kapillaris chip segítségével elemeztük (Agilent Bioanalyzer 2100). A real time PCR reakciókat egy Roche LightCycler 2.0 készülékkel végeztük, a reakcióhoz az LC705 és az FL fluorescens jelölőket használtuk fel.

Eredmények

A DNS-izolálás során 3 esetben nem sikerült megfelelő minőségű DNS-t nyerni a paraffinba ágyazott blokkokból, ebből 2 FL (ez a lymphomás esetek 10,5%-át jelenti) és egy normális nyirokcsomó. Az izolálás során kapott tisztított DNS-elegyek nukleinsav koncentrációja tág határok között változott (27-3257 ng/μl, medián érték 255±551 ng/μl). Az elegyek tisztaságát megadó A_{260}/A_{230} arány mintáink esetében 1,1-3 között változott, medián 1,6±0,54. Két esetben, ahol a DNS-koncentráció alacsony volt (<30 ng/μl), megismételtük a nukleinsavak tisztítását, hasonló értékeket kapva. Ezt úgy értelmeztük, hogy az adott mintában nem volt kellő mennyiségű DNS, vagy az nagyon töredezett (fragmentált) volt.



1. ábra. Poliklonális kontroll (Agilent 2100 Bioanalyzer)



2. ábra. Monoklonális kontroll (Agilent 2100 Bioanalyzer)

2. táblázat. A génátrendeződések mintázatainak előfordulása follicularis lymphomában

Lymphoma típus	Monoklonális	Oligoklonális	Poliklonális	X	Összesen
FL grade 1	6	0	1	1	8
FL grade 2	5	1	0	1	7
FL grade 3	2	2	0	0	4
Összesen	13	3	1	2	19
Normális nyirokcsomó	0	0	3	1	4

X – nem volt értékelhető.

Az immunglobulin nehézlánc átrendeződésének vizsgálata során háromféle mintázatot találtunk: poliklonális (1. ábra), monoklonális (2. ábra) és oligoklonális (3. ábra). Mintáink 68,42%-ban (13 eset) bizonyultak monoklonálisnak, 15,78%-ban (3 eset) oligoklonálisnak és 5,26%-ban (1 eset) poliklonálisnak. A génátrendeződések jellegének grade-ek szerinti leosztását a 2. táblázat tartalmazza. Ezen adatok alapján elmondhatjuk, hogy a korábbi 19 lymphomás eset közül 15 esetben (78,94%) igazoltuk az elváltozás malignus eredetét. A maradék 4 esetből, egyben (5,26%) kizártuk a malignitás lehetőségét, ugyanis ebben az esetben poliklonális génátrendeződési mintázatot kaptunk, míg 3 esetben (15,78%) oligoklonálisat. Ez utóbbi esetek elváltozásainak tisztázása végett további molekuláris biológiai vizsgálatokra lenne szükség, ugyanis az oligoklonális mintázat két malignus sejt-klón jelenlétét egy reaktív háttérben vagy csupán egy reaktív sejtpopulációt jelenthet.

Következtetések, megbeszélés

A follicularis lymphomák hematoxilin-eozinnal festett metszeteit alapvető morfológiai sajátosságok jellemzik, azonban a biztonságos diagnózist csak az immunhisztokémiai vizsgálatok adják meg. A minimális diagnosztikus panell elvégzése az esetek nagy részében indokolt (CD20, CD3, CD10, Bcl-2, Bcl-6), mivelhogy számos olyan elváltozás van, ami morfológiájában hasonlít az FL-re, mint például reaktív elváltozások (reaktív follicularis hyperplasia, progresszíven transzformált tüszők), alacsony malignitású lymphomák, amelyekben follicularis kolonizáció jelenik meg (CLL,

köpenysejtes, marginális zóna lymphoma), valamint nodularis lymphocyt praedominans Hodgkin-lymphoma. Ha az immunhisztokémiai reakciók nem adnak egyértelmű választ az elváltozás reaktív vagy tumoros jellegére, indokolt elvégezni a klonalitás vizsgálatát, ami sok esetben megkíméli a beteget a malignus lymphomák citosztatikus terápiájától, a kórházat pedig a tumoros betegek gondozását feltételező költségektől. Ilyen esetekben nélkülözhetetlen az immunhisztokémiai reakciók kiegészítése az általunk használt vizsgálatokkal. Vizsgálatainkhoz felhasznált paraffinba ágyazott minták az estek nagy részében alkalmasnak bizonyultak ilyen típusú vizsgálatok elvégzéséhez, bár olyan eset is volt, amelyben a DNS nem volt megfelelő.

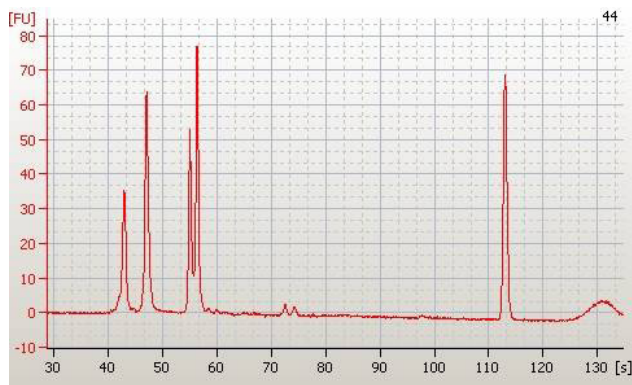
A diagnosztikai tévedéseket sok esetben az immunhisztokémiai reakciók nem megfelelő minősége, vagy azok értelmezési problémái okozzák. Ez főleg a reaktív elváltozások és a malignus folyamatok elkülönítése esetén okoz nehézséget olyan esetekben, amikor a hematoxilin-eozin módszerrel festett metszetekben a morfológiai kép nem egyértelmű a két folyamat elkülönítésére. Az IgH génátrendeződés vizsgálata noha fontos diagnosztikai információkat nyújthat, nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy a DNS-fragmentáció ezen lehetőségnek is határt szab, ez a jelenség elsősorban nem megfelelően fixált (pl. túl savas formalin) archivált paraffinos minták esetén jelentkezik [6].

A talált eredményeink (a korábban lymphomának kórismézett 19 esetből, 1 esetben reaktív elváltozást találtunk) hangsúlyozzák a molekuláris biológiai vizsgálatok jelentőségét a kórszövettani diagnózisban.

A kutatást részben az Országos Tudományos Kutatási Hivatal (Autoritatea Națională pentru Cercetare Științifică, ANCS) támogatta (7CB/30.5.2008)

Irodalom

1. Ben-Ezra J., Hazelgrove K., Ferreira-Gonzalez A. et al. – *Can polymerase chain reaction help distinguish benign from malignant lymphoid aggregates in bone marrow aspirates?* Arch Pathol Lab Med. 2000, 124(4):511-515.
2. Bernicot I., Douet-Guilbert N., Le Bris M. et al. – *Molecular cytogenetics of IGH rearrangements in non-Hodgkin B-cell lymphoma.* Cytogenet Genome Res. 2007, 118(2-4):345-352.
3. Colleoni G.W.B., Duarte L.C.C., Kerbauy F.R. et al. – *Correlation between histological subtype and type of bcl-2/IgH rearrangement in follicular lymphomas.* Leuk Lymphoma.


3. ábra. Oligoklonális kontroll (Agilent 2100 Bioanalyzer)

- 2004;45(2):331-338.
4. Derksen P.W., Langerak A.W., Kerkhof E. et al. – *Comparison of different polymerase chain reaction-based approaches for clonality assessment of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements in B-cell neoplasia*. *Mod Pathol*. 1999, 12(8):794-805.
 5. Evans P.A.S., Pott C., Groenen P.J.T.A. et al. – *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*. 2007, 21(2):207-214.
 6. Gillio-Tos A., De Marco L., Fiano V. et al. – *Efficient DNA extraction from 25-year-old paraffin-embedded tissues: study of 365 samples*. *Pathology*. 2007, 39(3):345-348.
 7. Gurbity T.P., Bagdi E., Groen N.A. et al. – *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*. 2003, 443(5):643-648.
 8. Halldórsdóttir A.M., Zehnauer B.A., Burack W.R. – *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*. 2007, 48(7):1338-1343.
 9. Lassmann S., Gerlach U.V., Technau-Ihling K. et al. – *Application of BIOMED-2 primers in fixed and decalcified bone marrow biopsies: analysis of immunoglobulin H receptor rearrangements in B-cell non-Hodgkin's lymphomas*. *J Mol Diagn*. 2005, 7(5):582-591.
 10. Liu H., Bench A.J., Bacon C.M. et al. – *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*. 2007, 138(1):31-43.
 11. Nyvold C.G., Bendix K., Brandsborg M. et al. – *Multiplex PCR for the detection of BCL-1/IGH and BCL-2/IGH gene rearrangements--clinical validation in a prospective study of blood and bone marrow in 258 patients with or suspected of non-Hodgkin's lymphoma*. *Acta Oncol*. 2007;46(1):21-30.
 12. Radojkovic M., Ristic S., Colovic M. et al. – *Molecular characteristics and prognostic significance of Bcl-2/IgH gene rearrangement in Serbian follicular lymphoma patients*. *Neoplasma*. 2008, 55(5):421-427.
 13. Rosenquist R., Lindström A., Holmberg D. et al. – *V(H) gene family utilization in different B-cell lymphoma subgroups*. *Eur J Haematol*. 1999, 62(2):123-128.
 14. Schmitt C., Balogh B., Grundt A. et al. – *The bcl-2/IgH rearrangement in a population of 204 healthy individuals: occurrence, age and gender distribution, breakpoints, and detection method validity*. *Leuk Res*. 2006, 30(6):745-750.
 15. Siwoski A., Ishkanian A., Garnis C. et al. – *An efficient method for the assessment of DNA quality of archival microdissected specimens*. *Mod Pathol*. 2002, 15(8):889-892.
 16. Stamatopoulos K., Kosmas C., Stavroyianni N. et al. – *Selection of immunoglobulin diversity gene reading frames in B cell lymphoproliferative disorders*. *Leukemia*. 1999, 13(4):601-604.
 17. Telatar M., Grody W.W., Emmanouilides C. – *Detection of bcl-2/IgH rearrangements by quantitative-competitive PCR and capillary electrophoresis*. *Mol Diagn*. 2001;6(3):161-8.
 18. Thériault C., Galoin S., Valmary S. et al. – *PCR analysis of immunoglobulin heavy chain (IgH) and TcR-gamma chain gene rearrangements in the diagnosis of lymphoproliferative disorders: results of a study of 525 cases*. *Mod Pathol*. 2000, 13(12):1269-1279.
 19. Tóth E., Schneider T., Melegh Z. et al. – *Follicularis lymphomák komplex diagnosztikája*. *Magy Onkol*. 2005, 49(2):135-140.
 20. van Krieken J.H.J.M., Langerak A.W., Macintyre E.A. et al. – *Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936*. *Leukemia*. 2007, 21(2):201-206.
 21. [***http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast) (BLAST, Basic Local Alignment Search Tool)
 22. [***http://imgt.cines.fr](http://imgt.cines.fr) (IMGT, the international ImMunoGeneTics information system)
 23. [***http://www.ebi.ac.uk/](http://www.ebi.ac.uk/) (EMBL Nucleotide Sequence Database)