

Detekcja monoklonalnej proliferacji limfocytów T skojarzonej z pierwotnymi chłoniakami skóry

Dr Katarzyna Zimna
Uniwersytet Adama Mickiewicza,
Poznań

Wstęp

Podczas dojrzewania limfocytów T dochodzi do rearanzacji różnych regionów genów TCR. Powstaje olbrzymia liczba różnych klas limfocytów T. U chorych z pierwotnymi chłoniakami skóry T-komórkowymi następuje proliferacja jednej klasy limfocytów T. Osoba taka w odróżnieniu od zdrowej posiada pewien znaczący procent (w zależności od stadium zaawansowania choroby) limfocytów monoklonalnych, o identycznym typie rearanzacji genów TCR. Identyfikacja frakcji komórek monoklonalnych (czasem biklonalnych) jest szeroko stosowaną metodą diagnozowania chłoniaków skóry T-komórkowych we wczesnych etapach rozwoju choroby, kiedy obraz kliniczny i histopatologiczny nie pozwala na postawienie 100% diagnozy. Ma to ogromne znaczenie terapeutyczne i jest związane z rokowaniem. Temporal Temperature Gel Electrophoresis (TTGE) przeprowadzone w systemie DNA Pointer wykorzystano do analizy rearanzacji genów receptora limfocytów T gamma (TCR gamma).

Materiały i Metody

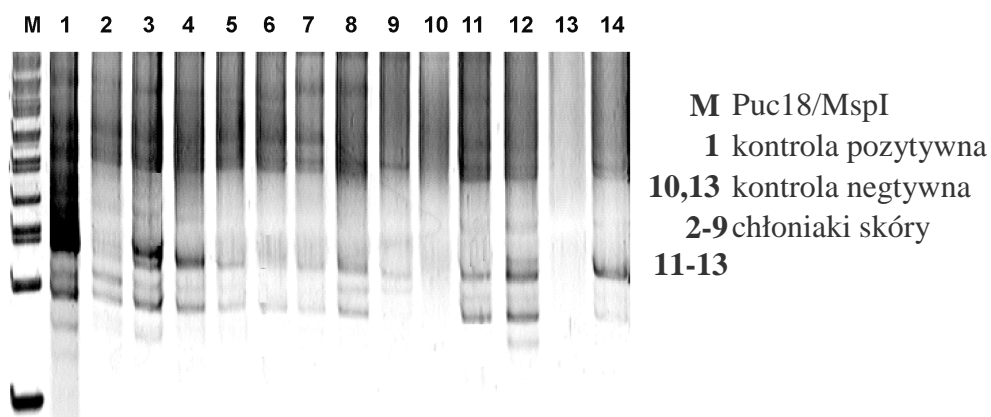
W badaniach genu wykorzystano startery reakcji PCR homologiczne do regionów V1-8 TCR gamma, w których wykrywane jest ok. 80% przypadków monoklonalności (pozostałe 20% lokalizuje się w regionach: V9-V11).

Otrzymany produkt PCR o wielkości 420 pz zdenaturowano termicznie przez 10 min w 95° C, a następnie w celu uzyskania heterozygot renaturowano przez 20 min w 55° C. Heterozygotyczne produkty nałożono na 9,6%T, 2%C żel poliakrylamidowy z 7 M mocznikiem, z dodatkiem 4% glicerolu w buforze 1 x MOPS. Rozdział elektroforetyczny metodą TTGE prowadzono w buforze 1 x MOPS (PH=8.0) w następujących warunkach: 30 min w 35° C, podgrzanie do 55°C (10 min), 35 min w 15°C, podgrzanie do 55°C (10 min), oraz 35 min w 5° C. Elektroforezę prowadzono przy stałej mocy 40 W. Po rozdziale DNA wybarwiano metodą srebrową przy użyciu zestawu Silver Stain (nr kat. 200-111).

Wyniki i dyskusja

U osób zdrowych występuje szereg różnych klas limfocytów T. Amplifikacja i renaturacja produktów PCR rejonu TCR powoduje powstanie olbrzymiej liczby różnych heterozygot (produkty PCR mają wprawdzie tę samą wielkość, lecz są mieszaniną różnych sekwencji). W wyniku tego po wybarwieniu żelu na którym rozdziela się taka mieszanina heterozygot uzyskuje się jednolicie zabarwioną ścieżkę.

U osób chorych u których nastąpiła nadprodukcja jednej klasy limfocytów T (frakcji komórek monoklonalnych o identycznej sekwencji nukleotydowej) widoczne są charakterystyczne dla tej klasy prążki. W badaniach jako kontrolę pozytywną użyto DNA izolowane z linii komórkowej "Jurkatt", jako ujemną - DNA izolowane z krwi zdrowych pacjentów.



Analiza produktów PCR rejonów V1-8 genu TCR gamma metodą TTGE w systemie DNA Pointer jest szybką, powtarzalną i tanią metodą pozwalającą wykryć monoklonalną proliferację limfocytów T, występującą w pierwotnych chłoniakach skóry T-komórkowych. Możliwość zmiany temperatury próbek w trakcie elektroforezy pozwala na stworzenie denaturujących, zmieniających się w czasie warunków w żelu bez użycia fizycznego gradientu denaturanta w żelu, co znacznie upraszcza procedurę jego przygotowania dzięki zastosowaniu jednorodnych żeli do rozdziału. Całkowity czas analizy (włączając barwienie zestawem Silver Stain) wynosi ok. 6 min na próbkę (przy użyciu komory na 32 próbki). Koszt odczynników niezbędnych do analizy próbki to ok. 2 PLN na próbkę (nie wliczając PCR).