

# VYUŽITÍ METODY REAL-TIME PCR (KVANTITATIVNÍ PCR, PCR V REÁLNÉM ČASE) V HEMATOLOGII A STUDIU MNOHOČETNÉHO MYELOMU

## APPLICATIONS OF REAL-TIME PCR IN HEMATOLOGY WITH SPECIAL FOCUS ON MULTIPLE MYELOMA

DUDOVÁ S.<sup>1</sup>, HÁJEK R.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> UNIVERZITNÍ VÝZKUMNÉ CENTRUM – ČESKÁ MYELOMOVÁ SKUPINA (URC-CMG), LF MU BRNO

<sup>2</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), OKH, FN BRNO, PMDV

<sup>3</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO A LF MU BRNO, PMDV

### Souhrn

Real-time PCR je citlivá metoda pro analýzu RNA založená na základě měření fluorescence. Je využívána v základním výzkumu, molekulární medicíně a v biotechnologiích. Kvantitativní PCR je jednoduchá, s vysokou citlivostí a spolehlivostí. Tato technika se rychle rozvíjí s objevem nových enzymů, chemikálií a přístrojů a slouží mimo jiné k potvrzení dat získaných pomocí sledování genové exprese mikročipovou analýzou. Tato práce seznamuje s principem real-time PCR a popisuje její využití ve studiu mnohočetného myelomu a celkově v hematologii.

**Klíčová slova:** real-time PCR, kvantitativní PCR, mnohočetný myelom

### Summary

Real-time PCR is a sensitive method for RNA analysis based on fluorescence measurement. It is used in basic research, applied molecular medicine, and biotechnology. Real-time PCR assays are easy to perform and combine high sensitivity with reliability. The technology is evolving rapidly with the introduction of new reagents and instrumentation. It can be used for the confirmation of data acquired by microarray analysis of gene expression. We review basic principles of real-time PCR and describe its application in hematology and especially in multiple myeloma research.

**Keywords:** real-time PCR, quantitative PCR, multiple myeloma

### Úvod

Každý typ buňky vytváří svůj soubor molekul mediátorové RNA (mRNA), tzv. transkriptom. Jako odpověď na stimul jsou buňky schopny zvyšovat nebo snižovat hladinu mRNA, které jsou poté překládány do proteinů. Použití cDNA mikročipů umožňuje detekovat v jednom experimentu změnu exprese až u 30 000 genů. S rozvojem nových metodik detekce genové exprese se objevuje potřeba jednoduchého a rychlého stanovení hladiny vybraných transkriptů. Toto splňuje metoda real-time PCR (kvantitativní PCR). Detekce pomocí kvantitativní PCR je charakteristická vysokou specifitou a citlivostí. Hladina mRNA byla dříve stanovována pomocí Northern blotu. Tato metoda bývá označována jako zlatý standard v měření genové exprese/hladiny mRNA. Používá radioaktivně značenou sondu komplementární k příslušné testované RNA. Po separaci transkriptů na elektroforéze a jejich přenesení na membránu, je reakce s radioaktivní sondou detekována na filmu. Tato technika je spolehlivá, její nevýhodou je však nižší citlivost, nutnost práce s radioaktivním materiálem a dostatečné vstupní množství RNA. V posledních letech byl Northern blot nahrazen metodou real-time PCR, která eliminuje zmiňované nevýhody.

### Co je to real-time PCR?

Real-time PCR (kvantitativní PCR) je metodika založená na polymerázové řetězové reakci (PCR), objevené Kary Mullisem v roce 1983. V klasické PCR je amplifikovaný produkt (amplikon) detekován po skončení reakce elektroforeticky. Naproti tomu real-time PCR umožňuje měření zmnoženého produktu v průběhu reakce, tzn. v reálném čase (real time). Detekce produktů reakce je umožněna využíváním fluorescenčních molekul, které odpovídají množství amplifikované DNA v každém cyklu. Tyto fluorescenční chemikálie mohou být barviva vázající se na DNA a nebo sekvenčně specifické primery či sondy. Protože hledaná sekvence DNA může být stanovena jak kvalitativně, tak i kvantitativně (počet kopií DNA), je real-time PCR označována také jako kvantitativní PCR (qPCR). Výhodou této metody je široký rozsah kvantifikace v řádu 7-8 logaritmických dekad, vysoká senzitivita (< 5 kopií) a vysoká přesnost (< 2% standardní odchylka) (3, 8). Vysoká specifita reakce je zajištěna třemi oligonukleotidy: dvěma primery a jednou sondou. První zmínka o real-time PCR se objevuje v roce 1992 (7). Reakce byla založena na interkalaci barviva ethidium bromid a amplifikaci zajišťoval upravený termální cyklus pro ozařování vzorků ultrafialovým světlem a detekci fluorescence CCD kamerou.

## přehled

V současné době jsou pro detekci produktů využívány převážně čtyři různé metody. Nejjednodušší a nejlevnější varianta je založena na interkalaci fluorescenčních látek, které se váží na dvouřetězcovou DNA. Interkalární barvivo SYBR Green I se váže do malého žlábků dvouřetězcové DNA. Během PCR amplifikace se zvyšuje počet dsDNA produktů exponenciálně a tím se zvyšuje i množství barviva, které se na ně váže. Fluorescenční signál je nejvyšší na konci každé exponenciální fáze, v následující denaturační fázi je minimální. Detekce PCR produktů pomocí SYBR Green I není sekvenčně specifická, během reakce mohou vznikat nespecifické PCR produkty a nebo produkty vzniklé reakcí samotných primerů (primer-dimery). Zbývající tři přístupy vychází z vazby fluorescenčně značených oligonukleotidů. V současnosti jsou nejvíce rozšířeny hydrolyzační sondy, tzv. Taqman systému. Krátká oligonukleotidová sonda komplementární k jednomu z řetězců obsahuje na jednom konci fluorescenční látku (tzv. reportér, např. FAM, VIC nebo JOE) a na druhém konci zhášec fluorochromu (např. TAMRA). Protože je v intaktní formě zhášec v blízkosti fluorochromu, je fluorescence vyzářená reportérem „absorbována“ zhášečem a není tak měřitelná (10). Při syntéze komplementárních vláken dochází 5'→3' aktivitou *Taq* DNA polymerázy k hydrolyze sondy, separaci reportérové molekuly a zhášec a tím k nárůstu fluorescence. Během dalších cyklů se fluorescence dále zvyšuje z důvodu exponenciálně se zvyšujících volných molekul fluorochromu. V závislosti na počtu cyklů, případně z kalibrační křivky paralelně amplifikovaného standardu, je pak možno stanovit koncentraci mRNA studovaného genu v neznámém vzorku (6, 5). Existují také další typy sond, například molekulární majáky (19), škorpióny nebo hybridizační sondy (21).

Existují dvě kvantifikační strategie – absolutní a relativní. Při absolutní kvantifikaci je stanovován přesný počet kopií templátu ve vzorku, zatímco relativní stanovení sleduje změny množství templátu mezi vzorky vzhledem k interní kontrole. Jako interní kontrola (tzv. housekeeping gen) se používá gen, který má podobnou hladinou exprese v jednotlivých testovaných vzorcích, bez vztahu k buněčnému cyklu nebo aktivaci buněk (13). Nejčastěji se využívá gen pro albumin,  $\beta$ -aktin,  $\beta$ -globin nebo GAPDH (20, 16, 14, 9).

Hladiny RNA neodpovídají vždy hladině proteinů produkovaných buňkou z důvodu posttranskripčních úprav a regulace translace. I když kvantitativní PCR je citlivou a přesnou metodou, relevantní závěry o studovaných dějích vyžadují další informace o proteinové hladině a aktivitě.

### Specifické problémy a nastavení u mnohočetného myelomu

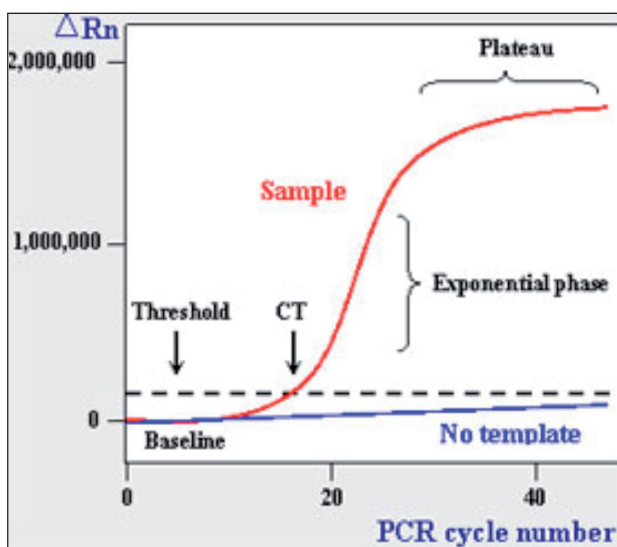
Pro stanovení genové exprese v testovaném vzorku je nutné zajistit v dostatečném množství a čistotě CD138 pozitivní buňky. Pro tento účel lze využít magnetické nebo flowcytometrické separace (MACS, FACS). Čistota potřebná pro analýzu ( $\geq 90\%$  MM buněk) je stanovována morfologicky a s využitím průtokové cytometrie (1).

Pro sledování genových expresních profilů je důležité rychlé zpracování a izolace RNA po separaci CD138 pozitivních buněk. Expres genů se rychle mění nejen v průběhu růstu a diferenciaci buněk, ale také jako reakce na změny prostředí. Zpoždění zpracování vzorků již o tři ho-

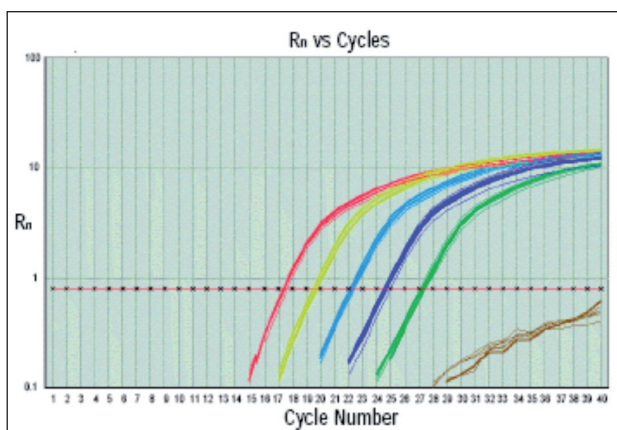
diny vede k podstatným změnám v genové expresi (2, 15). Pro expresní studie je nutné snížit čas nezbytný do izolace RNA (4).

### Ukázka reprezentativního výsledku

Amplifikační graf je zobrazení fluorescenčního signálu v závislosti na počtu cyklů (Obrázek č.1). V počátečních cyklech PCR je detekován pouze malý fluorescenční signál. Zvýšení signálu nad tzv. prahovou hodnotu značí počátek detekce hromadění se produktu. Pro každý sledovaný gen je stanovena tzv. Ct hodnota (threshold cycle). Parametr Ct udává číslo cyklu, ve kterém fluorescence dosáhla nad prahovou hodnotu. Čím vyšší je počáteční množství vzorku, tím dříve je detekována zvyšující se fluorescence produktu a tím nižší je hodnota Ct. Výhodou parametru Ct je jeho dobrá reprodukovatelnost.

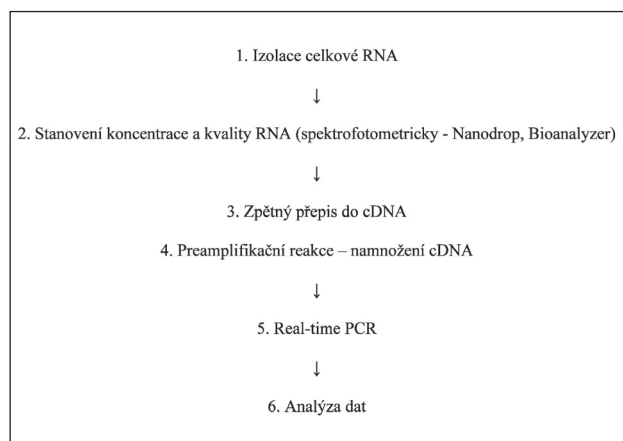


Obrázek č. 1: Detekce produktu real-time PCR a stanovení Ct hodnoty. Převzato z <http://www.rt-pcr.com/>. Osa y představuje počet kopií genu, osa x počet cyklů amplifikace. Parametr Ct (threshold cycle) je definován jako číslo cyklu, ve kterém emise fluorescence překročí prahovou hodnotu (threshold). Čím nižší hodnota Ct, tím více kopií sledovaného genu je přítomno ve vzorku. Amplifikační graf vykazuje sigmoidální průběh s exponenciální, lineární a plató fází.



Obrázek č. 2: Stanovení fluorescence během 40 amplifikačních cyklů u vzorků se snižující se koncentrací DNA (červená až zelená křivka) a kontroly bez DNA templátu (hnědá křivka). Převzato u <http://www.biotechnologie.unibo.it/capranicolab/realtime.php>

**Schéma 1:** Metody real-time PCR:



### Aplikace real-time PCR u mnohočetného myelomu

Metoda real-time PCR se ve studiu mnohočetného myelomu používá pro monitorování minimální zbytkové choroby (MRD minimal residual disease) a umožňuje tak předpovědět relaps onemocnění (12). Spolu s mikročipovou analýzou slouží ke stanovení exprese genů, které jsou spojová-

ny s přežitím pacientů či rezistencí na léčbu (17). Metoda umožňuje také stanovit míru exprese nádorových antigenů u myelomových buněk a tak posoudit vhodnost jejich použití v imunoterapii (18). V laboratořích Univerzitního výzkumného centra – CMG byl připraven panel genů významných u mnohočetného myelomu, jejichž exprese je sledována pomocí real-time PCR. Tyto geny podávají informaci o prognóze pacientů a jejich případné rezistenci na léčbu.

### Závěr

Analýza hladiny genové exprese pomocí kvantitativní amplifikace mRNA nalézá svůj význam v základním výzkumu, farmakogenomice a molekulární diagnostice. Při plánování designu experimentu je třeba provést rozhodnutí, zda expresi stanovovat pomocí absolutní nebo relativní kvantifikace a provést výběr vhodné interní kontroly. I když kvantitativní PCR je citlivá a přesná metoda v klinické diagnostice, musí být použita vhodně s vědomím určitých omezení.

### Poděkování

Práce byla podpořena projekty MŠMT LC06027 a MSM0021622434.

### Literatura

1. Agnelli L, Biccato S, Mattioli M et al. Molecular classification of multiple myeloma: a distinct transcriptional profile characterizes patients expressing CCND1 and negative for 14q32 translocations. *J Clin Oncol*. 2005; 23(29):7296-306
2. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G et al. Expression levels for many genes in human peripheral blood cells are highly sensitive to ex vivo incubation. *Genes Immun*. 2004; 5(5):347-53
3. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 2000; 25(2):169-93
4. Debey S, Schoenbeck U, Hellmich M, Gathof BS, Pillai R, Zander T, Schultze JL. Comparison of different isolation techniques prior gene expression profiling of blood derived cells: impact on physiological responses, on overall expression and the role of different cell types. *Pharmacogenomics J*. 2004;4(3):193-207
5. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*. 1996;6(10):995-1001
6. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996; 6(10):986-94
7. Higuchi R, Dollinger G, Walsh P S., Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*. 1992; 10:413-417
8. Klein D, Leutenegger CM, Bahula C, Gold P et al. Influence of pre-assay and sequence variations on viral load determination by a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for feline immunodeficiency virus. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2001; 26(1):8-20
9. Ladetto M, Omedè P, Sametti S et al. Real-time polymerase chain reaction in multiple myeloma: quantitative analysis of tumor contamination of stem cell harvests. *Exp Hematol*. 2002 ;30(6):529-36
10. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J et al. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*. 1995 Jun;4(6):357-62
11. Mahtouk K, Hose D, Raynaud P et al. Heparanase influences expression and shedding of syndecan-1, and its expression by the bone marrow environment is a bad prognostic factor in multiple myeloma. *Blood*. 2007; 109(11):4914-23
12. Martinez-Lopez J, Martinez-Sanchez P, Garcia-Sanz R et al. Application of self-quenched JH consensus primers for real-time quantitative PCR of IGH gene to minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. *J Mol Diagn*. 2006; (3):364-70
13. Nakamura H, Dan S, Akashi T et al.. Absolute quantification of four isoforms of the class I phosphoinositide-3-kinase catalytic subunit by real-time RT-PCR. *Biol Pharm Bull*. 2007;30(6):1181-4
14. Pfitzner T, Reiser M, Barth S et al. Quantitative molecular monitoring of residual tumor cells in chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol*. 2002 ;81(5):258-66
15. Radich JP, Mao M, Stepanians S et al. Individual-specific variation of gene expression in peripheral blood leukocytes. *Genomics*. 2004; 83(6):980-8
16. Rasmussen T, Poulsen TS, Honoré L, Johnsen HE. Quantitation of minimal residual disease in multiple myeloma using an allele-specific real-time PCR assay. *Exp Hematol*. 2000; 28(9):1039-45
17. Shaughnessy JD Jr, Zhan F, Burington BE, et al. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood*. 2007;109:2276-2284
18. Taylor BJ, Reiman T, Pittman JA et al. SSX cancer testis antigens are expressed in most multiple myeloma patients: co-expression of SSX1, 2, 4, and 5 correlates with adverse prognosis and high frequencies of SSX-positive PCs. *J Immunother*. 2005; 28(6):564-75
19. Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*. 1996;14(3):303-8
20. van der Velden VH, Joosten SA, Willemse MJ, van Wering ER et al. Real-time quantitative PCR for detection of minimal residual disease before allogeneic stem cell transplantation predicts outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2001;15(9):1485-7
21. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*. 1997;22(1):130-1, 134-8