

## ESTUDIO DE REORDENAMIENTOS CLONALES EN LOS GENES DEL RECEPTOR DE CÉLULA T (TCR) MEDIANTE PCR

### El receptor de célula T

El receptor de célula T (TCR), es un receptor de membrana, presente en los linfocitos T (LT) maduros, constituido por dos cadenas polipeptídicas transmembrana diferentes, comúnmente, una cadena tipo  $\alpha$  y otra tipo  $\beta$ . Cada una de ellas consta a su vez de dos dominios de tipo inmunoglobulina, uno constante (C), que se inserta en la membrana plasmática, y uno variable (V), orientado al exterior celular. Las cadenas están estabilizadas y se unen entre sí por puentes disulfuro, intra e intercatenarios, respectivamente.

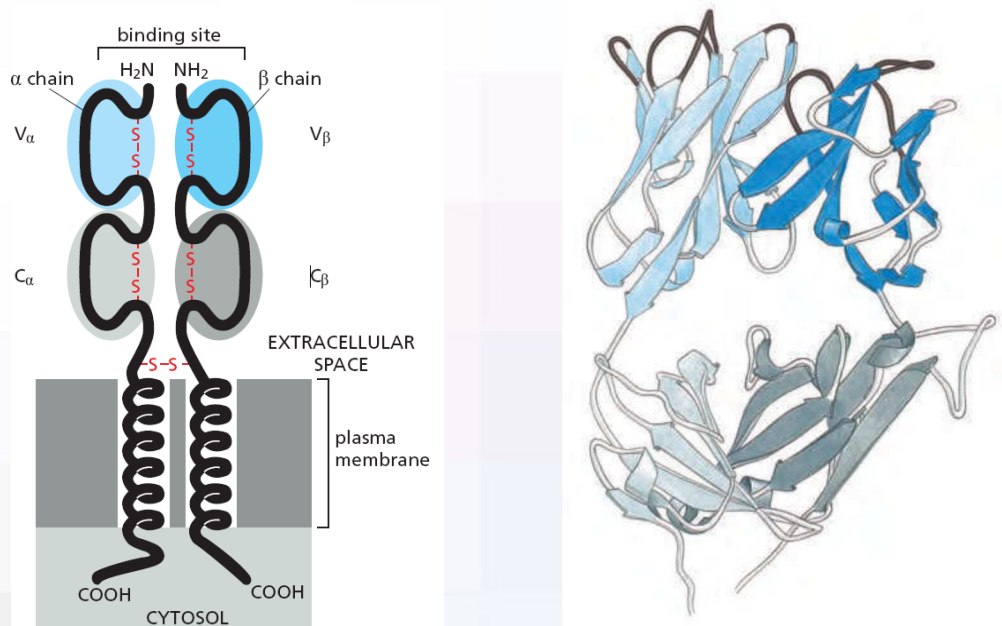


Figura 1. Esquema de la estructura del TCR  $\alpha\beta$  (izquierda) y modelo tridimensional de su región extracelular (derecha) (de Murphy et al, 2017).

**El TCR es capaz de reconocer antígenos proteicos previamente procesados y presentados por otros tipos celulares, a través de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), de tipo I y II. El reconocimiento del**

# Catlab Informa

antígeno, junto con otros coestímulos necesarios, desencadena una cascada de señalización celular, con efectos variables, según el tipo de linfocito T y su estadio de diferenciación.

Existen dos clases de linfocitos T, en función del tipo de cadenas constituyentes de su receptor TCR. Los linfocitos T  $\alpha\beta$  constituyen en torno al 95% del total de linfocitos T circulantes en sangre periférica y son los mejor caracterizados en cuanto a su biología y sus funciones. Su TCR es un heterodímero formado por una cadena  $\alpha$  y una  $\beta$ . Los linfocitos T  $\gamma\delta$ , con un TCR formado por una cadena  $\gamma$  y una  $\delta$ , se localizan en todos los tejidos linfoides, pero son especialmente abundantes en los epitelios, especialmente en la piel y el tracto genital femenino. A diferencia del TCR  $\alpha\beta$ , **el TCR  $\gamma\delta$  no quiere la mediación del MHC** para el reconocimiento antigénico, y las funciones de los LT  $\gamma\delta$ , aún no han sido completamente dilucidadas, aunque se considera que constituyen un paso evolutivo intermedio entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa.

## Genética del TCR

Los genes que codifican para cada una de las cadenas del TCR están formados por un conjunto de segmentos diferentes (figura 2) que, durante la maduración del LT, se unen de forma aleatoria e irreversible a través de un proceso dirigido de **recombinación somática** del DNA. Cada linfocito T maduro expresa en su membrana un TCR virtualmente único, constituido por una pareja de cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  (o  $\gamma$  y  $\delta$ ), reordenadas cada una de forma independiente.

Además, el fenómeno de recombinación no ocurre de forma idéntica entre dos segmentos concretos, sino que durante el proceso de corte y empalme actúan complejos enzimáticos que eliminan y añaden nucleótidos en la zona de unión, de forma aleatoria. De esta manera, se consigue generar una **diversidad casi ilimitada (del orden de  $10^{12}$ ) de LT con TCRs diferentes**

# Catlab Informa

que, en conjunto, son capaces de interactuar con cualquier antígeno exógeno presentado a través de las moléculas del MHC.

Los genes codificantes de las cadenas  $\alpha$  (*TCRA*) y (*TCRG*) están formados por dos tipos de segmentos, V (del inglés, *variability*) y J (*joining*), que se combinan al azar (un segmento V con un J) durante el proceso de recombinación somática. Los genes  $\beta$  (*TCRB*) y  $\delta$  (*TRCD*) contienen un tipo adicional de segmentos, D (de *diversity*), que se localizan entre los V y los J, y también se combinan al azar con ambos. Además, los cuatro genes tienen una secuencia adicional, C (*constant*), única para cada gen, que codifica la región constante de cada cadena. El número de segmentos diferentes de cada uno de los tipos, es mucho menor en los genes *TCRG* y *TRCD*. Además el fenómeno de recombinación, está restringido a unos determinados segmentos génicos que dependen del tejido linfóide en el que se va a asentar el LT maduro. Por esta razón, **la diversidad de receptores de los LT  $\gamma\delta$  es mucho más limitada que la de los LT  $\alpha\beta$ .**

---

# Catlab Informa

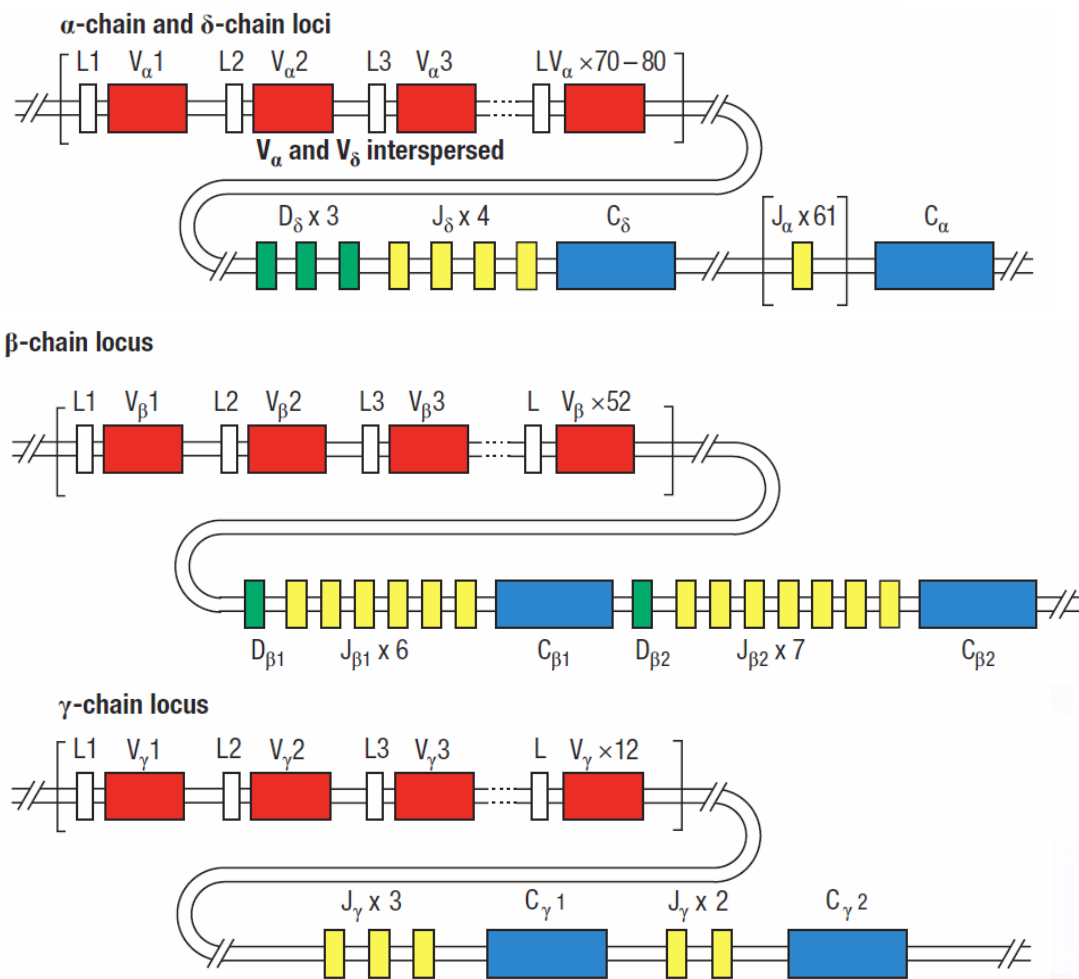


Figura 2. Representación esquemática de los *loci* de las cadenas  $\alpha$  y  $\delta$  (*locus* compartido para los genes *TCRA* y *TCRD*, en el cromosoma 14),  $\beta$  y  $\gamma$  (cromosoma 7) (de Murphy et al, 2017).

Durante el proceso de maduración de los linfocitos, la recombinación somática se produce tras la migración de los progenitores linfoides al timo. Inicialmente se producen los reordenamientos de los genes *TCRD* y *TCRG*, seguidos muy poco después del de *TCRB*. Ninguno de estos tres procesos de recombinación es exclusivo de linaje ( $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$ ). Aunque los mecanismos reguladores de la diferenciación hacia una u otra clase todavía no se han dilucidado, parece que se trata de un proceso flexible, puesto que **los LT  $\gamma\delta$  maduros pueden contener genes *TCRB* reordenados y de la misma manera, los LT  $\alpha\beta$  maduros presentan a menudo reordenamientos en el gen *TCRG*.**

# Catlab Informa

## Reordenamientos génicos del TCR como marcador de clonalidad

Ante una sospecha de un síndrome linfoproliferativo (SLP), la combinación de citología e histología, inmunohistoquímica e inmunotipado por citometría de flujo, permite diferenciar, la mayor parte de las veces, una proliferación linfoide maligna de una reactiva. Sin embargo, en un 5-10 % de los casos, es más complicado alcanzar un diagnóstico.

En principio, todas las células de una neoplasia tienen origen clonal común. El estudio de los reordenamientos génicos de los genes codificantes del TCR, es un marcador de clonalidad y, por tanto, de malignidad, ideal en el diagnóstico y seguimiento de los SLP de linaje T, puesto que, en la práctica, **cada LT presenta un conjunto de reordenamientos de sus genes codificantes del TCR único, y la probabilidad de que dos LT posean un TCR idéntico es ínfima.**

## Estudio de los reordenamientos génicos de *TCRG* y *TCRB* por PCR

En las últimas dos décadas, el estudio basado en la PCR ha ido sustituyendo progresivamente al *Southern blot* como técnica de elección para el estudio del patrón de reordenamientos somáticos en los genes codificantes del TCR, lo que ha permitido su introducción en la rutina diagnóstica.

En nuestro laboratorio, empleamos dos kits comerciales en paralelo (Indenticlone *TCRG* Gene Clonality Assay e Indenticlone *TCRB* Gene Clonality Assay, Invivoscribe), basados en los protocolos desarrollados por el consorcio EuroClonality (llamado anteriormente BIOMED-2), la referencia internacional en los estudios de clonalidad de neoplasias linfoides.

El estudio consta de dos pasos consecutivos: la **amplificación mediante PCR *multiplex*** de las regiones de interés

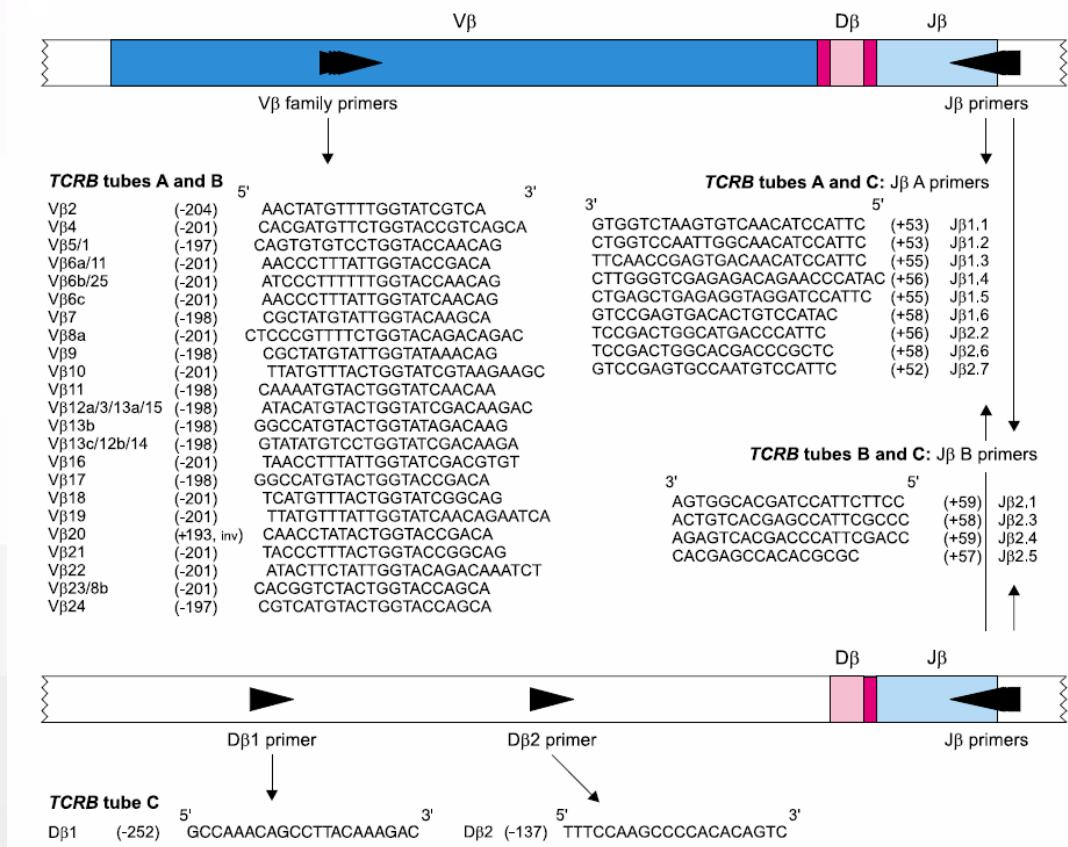
---

# Catlab Informa

y el posterior análisis de los productos mediante una **electroforesis de alta resolución**.

La etapa de amplificación para los genes *TCRB* y *TCRG* consta de cuatro y tres reacciones de PCR independientes, respectivamente. En una de ellas, se amplifican regiones invariantes del DNA genómico, como control de que la concentración de DNA en la muestra es la adecuada.

El resto son reacciones específicas que emplean un conjunto de cebadores, localizado en las regiones V (y también D, en el caso de *TCRB*) y J de los genes estudiados, diseñados de tal manera que los productos de amplificación de cada posible pareja de cebadores V y J tendrán un tamaño diferente (figura 3).



# Catlab Informa

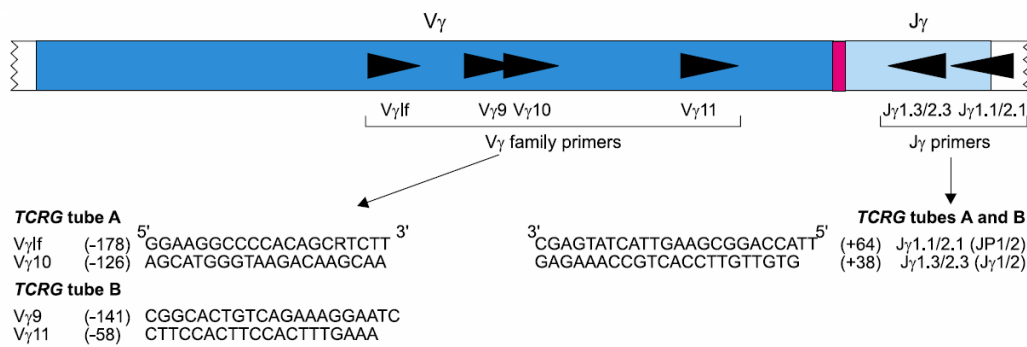
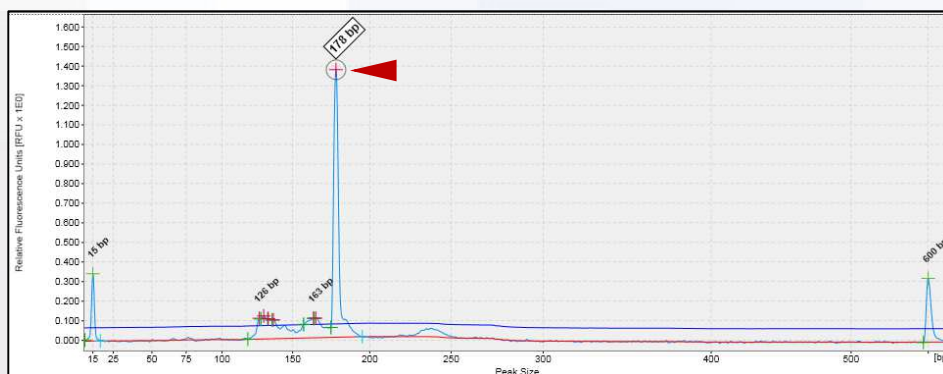


Figura 3. Diseño de cebadores empleado para la amplificación de los diferentes segmentos génicos para *TCRB* (arriba) y *TCRG* (abajo) (de van Dongen et al., 2003).

Una vez obtenidos los productos, se someten a una electroforesis capilar en gel de alta resolución, sobre una matriz comercial, empleando el equipo QiaExcel (QIAGEN). El equipo realiza la electroforesis de los amplificados de PCR y elabora un perfil que representa la cantidad relativa de amplificados de los diferentes tamaños.

La concentración de cada fragmento amplificado depende directamente de lo representada que está esa región en la muestra de DNA del paciente. De esta manera, puesto que cada reordenamiento da como resultado un producto de PCR de distinto tamaño, **si existe una proliferación clonal de un linfocito T, esto se traducirá en un pico**, correspondiente a su gen reordenado en particular, que destacará sobre el fondo producido por los productos del resto de linfocitos T (figura 4).



# Catlab Informa

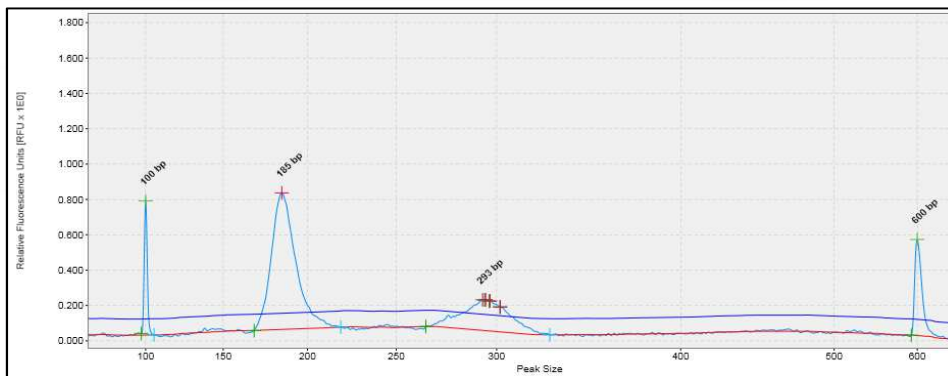


Figura 4. Visualización de una muestra con un pico correspondiente a un reordenamiento monoclonal para *TCRG* (arriba) frente a una muestra con un fondo policlonal característico (abajo).

En muestras con una baja proporción de linfocitos T, especialmente en tejidos epiteliales, más abundantes en LT  $\gamma\delta$ , con una diversidad de receptores limitada, se pueden producir falsos positivos debido a la amplificación preferencial, producto del azar, de reordenamientos concretos. En estos casos es recomendable repetir el proceso completo de amplificación y electroforesis para confirmar cualquier pico sugestivo de clonalidad. Solo se considerarán clonales los picos reproducibles.

## Algoritmo diagnóstico

El estudio de reordenamientos en *TCRB* es ligeramente más informativo que el de *TCRG*, y menos propenso a falso resultados positivos, debido a la mayor cantidad de reordenamientos posibles. Aún así, las guías diagnósticas recomiendan el estudio de ambos genes, bien de forma simultánea o bien secuencial, ante una sospecha de clonalidad T.

Es importante recalcar que **la presencia de un pico para el gen *TCRB* o *TCRG*, no permite determinar el linaje ( $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$ ) de la población clonal**, puesto que como se ha explicado anteriormente, la mayoría de LT, experimentan reordenamientos de los genes  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ , independientemente del receptor que expresan en membrana. Se sabe que más del 98% de las neoplasias de LT



# Catlab Informa

$\alpha\beta$  presentan reordenamientos del gen *TCRG* y muchos tumores de LT  $\gamma\delta$ , han reordenado su gen *TCRB*.

El consorcio EuroClonality, ha diseñado también un procedimiento para el estudio reordenamientos clonales del gen *TCRD*. Sin embargo, debido a las características estructurales y del gen y a limitaciones de la propia técnica, la utilidad de esta prueba se restringe a casos en los que exista una elevada sospecha de una proliferación de LT  $\gamma\delta$ , o bien de LT inmaduros, y siempre en combinación con el estudio del gen *TCRG*.

## **Bibliografía**

Alberts B, Wilson J. Molecular biology of the cell. New York: Garland Science; 2015.

Langerak AW, Groenen PJTA, Brüggemann M, Beldjord K, Bellan C, Bonello L, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia*. 2012;26(10):2159–71.

Murphy K, Weaver C. Janeways immunobiology. New York, NY: Garland Science, Taylor & Francis Group; 2017.

van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL, et al. 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*. 2003;17(12):2257–317.

**Carlos Lombardía**

Genética / Citometría

CATLAB

Tel. 93.748.56.00 - ext. 35018, 35044, 35041

[clombardia@catlab.cat](mailto:clombardia@catlab.cat)

[www.catlab.cat](http://www.catlab.cat)