

*Originalni članci/  
Original articles*

MOLEKULARNA DETEKCIJA  
DOMINANTNOG KLONA B- I T- LIMFOCITA -  
KLINIČKI ZNAČAJ

MOLECULAR DETECTION OF DOMINANT  
CLONE OF B- AND T-LYMPHOCYTES –  
CLINICAL IMPORTANCE

**Correspondence to:**

**Bojana Cikota-Aleksić, PhD.**  
Naučni saradnik  
Institut za medicinska istraživanja  
Vojnomedicinska akademija  
Crnotravska 17 Beograd  
Tel: +381 11 3608 482  
Fax: +381 11 662 722  
E mail: cbojana@ptt.rs

Bojana Cikota-Aleksić<sup>1</sup>, Budimir Šegrt<sup>2</sup>, Zvonko Magić<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut za medicinska istraživanja Vojnomedicinska akademija,  
Beograd, Srbija

<sup>2</sup> Bolnički centar Meljine, Herceg Novi, Crna Gora

*Apstrakt*

Prema podacima iz literature, korišćenjem histo/citomorfoloških analiza dopunjenih imunohistohemijom i protočnom citofluorimetrijom nije moguće razlikovati maligne od reaktivnih proliferacija u 5-10% bolesnika sa limfoproliferativnim poremećajima/bolestima. U takvim slučajevima se može uraditi test klonalnosti limfocita PCR metodom kako bi se potvrdila ili isključila dijagnoza maligne bolesti (limfoma ili leukemije). Analiza klonalnosti limfocita PCR-om je našla primenu i u detekciji limfomskih ćelija u koštanoj srži prilikom utvrđivanja raširenosti bolesti, detekciji minimalne rezidualne bolesti po završetku terapije kao i za procenu efikasnosti tehnika prečišćavanja kojima se iz uzoraka kostne srži/krvii uklanjaju maligne ćelije.

Testiranje klonalnosti se može primeniti u svim limfoproliferativnim oboljenjima, a zasni-va se na analizi rearanžiranih gena za imunoglobuline (Ig) ili T-ćelijske receptore (TCR) koji su jedinstveni za svaki limfocit. Reaktivne proliferacije limfocita se odlikuju poliklonalnim rearanžmanima Ig/TCR gena dok se u leukemijama i limfomima detektuju uni-formni rearanžmani (monoklonalnost). U literaturi se može naći veliki broj radova koji analiziraju senzitivnost i specifičnost različitih protokola za testiranje klonalnosti „in house“ PCR-om. Na osnovu svih poznatih saznanja o procesu rearanžiranja gena za Ig i TCR osmišljen je BIOMED-2 projekat u koji je bilo uključeno 47 instituta iz sedam evrop-skih zemalja. Ovaj projekat je započet u cilju razvijanja i standardizacije reagenasa i metodologije za analizu klonalnosti PCR-om, a koji bi se primenjivali u rutnskoj dijagnos-tičkoj praksi. Preporuke BIOMED-2 studije za upotrebu reagenasa i procedura su objavljene u časopisu Leukemia 2003, a potom i 2007. godine. Međutim, veliki broj laboratorija i dalje koristi „in house“ PCR protokole.

U ovom članku ćemo objasniti principe testiranja klonalnosti limfocita PCR metodom, prednosti i nedostake „in house“ PCR-a, ali i BIOMED-2 protokola. Takođe ćemo komentarisati najnovije radove iz ove oblasti.

*Ključne reči*

limfomi-leukemije, klonalnost limfocita, rearanžmani gena za IgH i TCR

*Key words*

lymphoma-leukaemia, dominant clone of lymphocytes, gene rearrangements of IgH and TCR

U kliničkoj onkologiji je od neprocenjivog značaja (pouzdanost) postavljanje dijagnoze maligne bolesti u što je moguće kraćem roku, kao i pravovremeno uočavanje progresije bolesti ili relapsa. I pored jasno ustanovljenih morfoloških i imunofenotipskih kriterijuma, dijagnostikovanje i klasifikacija limfoproliferativnih bolesti može biti problematična oblast za patologe. Prema podacima iz literature, u 5-10% bolesnika sa limfoproliferativnim poremećajima, na osnovu histo/citomorfološke koja je dopunjena imunohistohemijskim analizama ili protočnom citofluorimetrijom

nije moguće razlikovati maligne od reaktivnih proliferacija<sup>(1)</sup>. U tim slučajevima dijagnostička procedura može uključiti i analizu klonalnosti limfocita PCR (*Polymerase Chain Reaction*) metodom. Klinička primena ovog testa takođe podrazumeva i detekciju malignih limfocita u kostnoj srži i krvi prilikom utvrđivanja stepena proširenosti limfoma, detekciju rezidualnih malignih ćelija (minimalne rezidualne bolesti) nakon završene terapije, kao i procenu uspešnosti tehnika prečišćavanja uzoraka kostne srži/krvii od malignih limfocita pre autologe transplantacije.

Klonalnost limfocita može biti testirana u svim limfoproliferativnim poremećajima/bolestima, a zasniva se na analizi uniformnosti rearanžiranih gena za antigene receptore – imunoglobuline (Ig), odnosno T-ćeljske receptore (TCR).

### *Osnovi procesa rearanžiranja gena za Ig i TCR*

Procesi rearanžiranja Ig i TCR gena kao i enzimi koji u njima učestvuju su u osnovi isti. Međutim, i pored toga, Ig geni su funkcionalno rearanžirani samo u B-, a TCR geni samo u T-ćelijama. Osnova „linijske specifičnosti“ za ekspresiju gena za antigene receptore je još uvek nejasna (2.).

Tehnikama rekombinantne DNK utvrđeno je da se genski lokus za teški lanac Ig nalazi na 14, a za  $\kappa$  i  $\lambda$  lake lance Ig na drugom, odnosno 22. hromozomu. Genski lokusi za  $\beta$  i  $\gamma$  lance TCR-a su smešteni na sedmom, a za  $\alpha$  i  $\delta$  lance na 14. hromozomu (2). Genski lokusi za Ig i TCR sadrže različit broj V (*variable*) i J (*joining*) genskih segmenata, dok su u lokuse za teški lanac Ig, TCR  $\beta$  i TCR  $\delta$  uključeni i D (*diversity*) genski segmenti. Proces rearanžiranja gena za Ig i TCR podrazumeva spajanje jednog J sa jednim D i jednim V segmentom (odnosno jednog J sa jednim V segmentom) aktivnošću RAG-1 i RAG-2 enzima. Rearanžiranje sledi određeni obrazac, tačnije uvek počinje na jednom alelu i tek ako je tu stvoren nefunkcionalni produkt, nastavlja se na drugom. Ovaj proces se naziva alelsko isključivanje i omogućava da svaki limfocit eksprimira samo jedan tip receptora. Isto tako, uvek se prvo rearanžiraju geni za  $\kappa$  lanac Ig, a ukoliko je to rearanžiranje bilo neproduktivno na oba alela, rearanžiraju se geni za  $\lambda$  lake lance. Odstupanja od ovog redosleda su uočena u nekim B-ćeljskim akutnim leukemijama (3). Kada je reč o TCR-u, prvo se rearanžira  $\delta$ , a potom i  $\gamma$  lanac. Ukoliko ne dođe do ekspresije  $\gamma\delta$  receptora, dalje se rearanžira gen za  $\beta$  lanac TCR-a, dolazi do delecije  $\delta$  lanca i nastavlja sa rearanžiranjem  $\alpha$  lanca. Prilikom rearanžiranja  $\alpha$  lanca ne dolazi do alelskog isključivanja, pa tako, na primer, do 30% zrelih T-limfocita eksprimira dva tipa  $\alpha$  i jedan tip  $\beta$  lanca. Funkcionalne posledice ovog fenomena još uvek nisu potpuno poznate (2).

Procenjeno je da se procesom rearanžiranja genskih segmenata postiže repertoar od oko  $2 \times 10^6$  različitih Ig molekula, oko  $3 \times 10^6$   $\alpha\beta$  i  $5 \times 10^3$  kombinacija  $\gamma\delta$  TCR-a (1). Osim različitih V-D-J kombinovanja, varijabilnosti ovih molekula doprinose i takozvane N-insercije koje podrazumevaju nasumično umetanje nukleotida na mestima vezivanja genskih segmenata aktivnošću enzima terminalne deoksi transferaze (TdT). Pokazano je da se broj N-insercija povećava u toku razvika. Tako ove insercije poseduje 68% B-ćelija fetusa, 86% B-ćelija novorođenčeta i 91 - 100% zrelih B-ćelija odrasle osobe. Uz to, aktivnošću različitih nukleaza koje isecaju terminalne nukleotide u već rearanžiranim

V-D-J produktima moguće je na kraju dobiti više od  $10^{12}$  različitih Ig i TCR molekula (Stewart, 1994.). Zreli B-limfociti svoj antigeni repertoar mogu proširiti i preko somatskih mutacija koje se dešavaju tokom sazrevanja kako u teškim, tako i u lakim lancima (1).

Na Slici 1 je shematski prikazan proces rearanžiranja gena za teški lanac Ig.

Unutar varijabilnih regiona Ig i TCR-a razlikuju se CDR (*Complementarity Determining Regions*) delovi izuzetno visoke varijabilnosti i FR (*Framework*) regioni relativno konzervisane strukture. Najvarijabilniji deo Ig i TCR molekula je CDR3 i to je upravo onaj deo molekula koji je u kontaktu sa antigenom (3).

Shematski prikaz organizacije gena za varijabilni deo teškog lanca Ig je prikazan na Slici 2.

### *Princip testiranja klonalnosti limfocita*

Pošto su tumori klonalne proliferacije, svi maligni limfociti potiču od jedne B- ili T-ćelije i imaju istu nukleotidnu sekvencu rearanžiranih gena za Ig i TCR. Ukoliko je u uzorku koji se analizira prisutan dominantni klon limfocita on će, zbog prirode PCR reakcije, biti favorizovan i na gelu nakon elektroforeze će biti uočljiva dominantna traka odgovarajuće molekulske mase. Ako u uzorku nije prisutan dominantni klon, na gelu će se videti veći broj traka ili razmaz (Slika 3). Za analizu klonalnosti B-limfocita PCR-om najčešće se koriste komercijalni prajmeri koji su dizajnirani tako da hibridizuju sa komplementarnim sekvencama unutar konzervisanih FR regiona teških lanaca imunoglobulina. Pomoću prajmera iz prvog seta se umnožava deo gena između FRI i FRIV regiona, a veličina produkata PCR reakcije je od 300 do 400 bp. Korišćenjem prajmera iz drugog seta umnožavaju se produkti od oko 240 do 260 bp, a koji obuhvataju sekvence između FRII i FRIV regiona. Kada se koriste prajmeri iz trećeg seta produkti PCR reakcije sadrže deo gena između FRIII i FRIV regiona, a njihova veličina je od 100 do 150 bp. Rezultati naših istraživanja, kao i podaci koji se mogu naći u literaturi, govore da je osetljivost metode najveća kada se koriste prajmeri iz trećeg seta. Pomoću FRIII/FRIV prajmera se umnožavaju najmanji fragmenti što podrazumeva veću verovatnoću uspešnosti amplifikacije, čak i ako se radi sa fragmentisanom DNK iz tkiva koje je bilo fiksirano formalinom i ukalupljeno u parafin (4-11). Za analizu klonalnosti T-limfocita PCR-om se koriste komercijalni prajmeri koji hibridizuju sa komplementarnim sekvencama unutar V i J segmenata rearanžiranih gena za  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ili  $\delta$  lance TCR-a. Ipak, većina autora ističe prednosti analize gena za  $\gamma$  lance pošto su oni rearanžirani u svim T-limfocitima bez obzira na to da li oni ekspimiraju  $\alpha\beta$  ili  $\gamma\delta$  TCR (12.).

## Naša iskustva u testiranju klonalnosti limfocita

Kompleksnost procesa rearanžiranja, varijabilnost gena za Ig i TCR i njihova podložnost promenama tokom evolucije bolesti otežavaju kreiranje komercijalnih testova za analizu klonalnosti limfocita. U literaturi se mogu naći različiti protokoli i preporuke za ovu vrstu testiranja. Pre nego što smo počeli sa rutinskom primenom analize klonalnosti limfocita u našoj laboratoriji, analizirali smo osetljivost i specifičnost pet pari komercijalnih prajmera za umnožavanje sekvenci varijabilnog dela gena za teški lanac Ig i osam prajmera koji se koriste u „multiplex“ reakciji za umnožavanje varijabilnog dela rearanžiranog gena za  $\gamma$  lanac TCR-a.

Osetljivost prajmera za analizu klonalnosti B-limfocita je testirana na uzorcima limfnih žlezda (parafinski kalupi) bolesnika sa B nehočkinskim limfomima (B-NHL) dok su za testiranje specifičnosti korišćeni uzorci bolesnika sa reaktivnim proliferacijama limfocita (parafinski kalupi) i periferna krv zdravih osoba.

U analiziranom setu komercijalnih prajmera, najveća osetljivost je dobijena kada su korišćeni prajmeri pomoću kojih se umnožavaju sekvence između FR III i FR IV regiona (monoklonalna populacija limfocita je detektovana u 85% analiziranih uzoraka B-NHL). Kada su korišćeni prajmeri pomoću kojih se umnožavaju sekvence između FR I i FR IV regiona (tri para), monoklonalna populacija B-limfocita je detektovana u 15%, 40%, odnosno 65% analiziranih uzoraka B-NHL. Monoklonalnost je detektovana u 55% uzoraka B-NHL kada su korišćeni prajmeri koji umnožavaju sekvence između FR II i FR IV regiona teškog lanca Ig. Kada je korišćeno svih pet pari prajmera iz ovog seta, osetljivost je bila 100%. Najveća specifičnost je takođe dobijena sa FR III/FR IV prajmerima (100%) pošto je u svim uzorcima reaktivnih limfocitnih proliferacija, kao i u svim uzorcima periferne krvi zdravih osoba detektovana poliklonalnost<sup>(11)</sup>. Na osnovu navedenih rezultata opredelili smo se da u rutinskom radu koristimo FR III/FR IV prajmere, a ukoliko dobijemo negativan rezultat analizu ponovimo sa najosetljivijim parom prajmera kojima se umnožava Ig sekvenca između FR I i FR IV.

Osetljivost komercijalnih prajmera za analizu klonalnosti T-limfocita testirana je na uzorcima kože bolesnika sa *Mycosis fungoides*. Korišćenjem seta od osam prajmera koji se koriste u „multiplex“ PCR reakciji, prisustvo monoklonalne populacije T-limfocita je detektovano u 88% uzoraka<sup>(13)</sup>.

Uzevši u obzir osetljivost PCR metode, analiza klonalnosti limfocita je našla primenu i u detekciji minimalne rezidualne bolesti (MRB) nakon primenjene terapije. U brojnim radovima koji se bave ovom oblašću, provlači se pitanje o značaju ovog testiranja. Preciznije, postavlja se pitanje kako da kliničar na osnovu

informacije o prisustvu malog broja malignih limfocita koje i nije moguće detektovati drugim metodama (na primer citološkom, imunohistohemijskom ili citogenetskom analizom) donese odluku o daljem lečenju. Na osnovu publikovanih rezultata je jasno da prisustvo MRB predstavlja loš prognostički parametar<sup>(14-16)</sup>, ali ne treba zanemariti činjenicu da ponekad bolesnici kod kojih je detektovano prisustvo MRB i tokom dugotrajnog praćenja ostaju u kompletnoj kliničkoj remisiji. Ovakvi slučajevi su nametnuli potrebu za kvantifikacijom MRB. Naša iskustva u ovoj oblasti takođe su potvrdila značaj kvantifikacije MRB. Naime, kada smo analizirali rezultate praćenja bolesnika sa B-NHL niskog, odnosno visokog gradusa kod kojih je u toku dijagnostičkih procedura detektovano prisustvo monoklonalne proliferacije B-limfocita u kostnoj srži i/ili perifernoj krvi, MRB je češće detektovana kod bolesnika sa limfomima niskog gradusa<sup>(17)</sup>. Međutim, prisustvo MRB je imalo veći prognostički značaj kod bolesnika sa limfomima visokog gradusa. Rezultati kvantifikacije MRB su nam ukazali da kod bolesnika sa B-NHL ne postoji neki „kritični broj“ malignih ćelija koji bi „signalizirao“ relaps, već je potrebno pratiti kinetiku MRB. Povećanje broja malignih limfocita u odnosu na prethodnu kontrolu je kod svih bolesnika bilo povezano sa pojavom relapsa.

### BIOMED-2 studija

U ovom tekstu je već pomenuto da se u literaturi mogu naći brojni protokoli za analizu klonalnosti limfocita PCR-om. U većini protokola se koriste konsenzus prajmeri, najčešće za umnožavanje sekvenci rearanžiranog gena za teški lanac Ig i  $\gamma$  lanac TCR-a. Međutim, objavljeni podaci o specifičnosti i osetljivosti ovih protokola imaju širok raspon. Dobijene razlike u osetljivosti i specifičnosti pojedinih protokola se mogu objasniti dobijanjem lažno negativnih ili lažno pozitivnih rezultata, koji su najčešće posledica nedovoljne osetljivosti PCR prajmera, odnosno nedovoljne specifičnosti prajmera ili kontaminacije<sup>(5, 6, 10)</sup>.

Da bi se standardizovali reagensi i protokoli za testiranje klonalnosti limfocita za rutinsku primenu u dijagnostici i praćenju limfoma i leukemija, pokrenuta je BIOMED-2 studija u koju je bilo uključeno 47 institucija iz sedam evropskih zemalja. Rezultati ove studije su objavljeni u časopisu *Leukemia* 2003. godine, a autori su istakli da su u predložene protokole integrisana celokupna dotadašnja znanja o diferencijaciji i sazrevanju limfocita uključujući i procese rearanžiranja gena za antigene receptore<sup>(1)</sup>. Rezultati reevaluacije reagensa i protokola koji su predloženi 2003, kao i modifikacije istih, objavljeni su u istom časopisu 2007. godine. U ovoj studiji se ističe da se pomoću preporučenih setova prajmera i protokola za „multiplex“ reakcije monoklonalna populacija B-limfocita detektuje u 99% analiziranih B-ćelijskih maligniteta, dok se

monoklonalnost T-limfocita detektuje u 94% analiziranih T-ćelijskih limfoma i leukemija<sup>(18,19)</sup>. Reagensi i prajmeri koji su preporučeni na osnovu BIOMED-2 studije su danas dostupni na tržištu i primenjuju se u rutinskoj praksi u mnogim laboratorijama. Međutim, veliki broj autora ističe visoku cenu testova koji su proistekli iz BIOMED-2 projekta i to pokušavaju da prevaziđu kombinovanjem *in house* PCR protokola sa BIOMED-2 protokolima<sup>(20, 21)</sup>. I sami autori koji su bili uključeni u BIOMED-2 se osvrću na cenu sugerisanih analiza, ali sa druge strane naglašavaju da društvo snosi znatno veće troškove i bolesnici imaju potpuno drugi kvalitet života ukoliko nije postavljena dobra dijagnoza i ako to nije bilo u ranoj fazi bolesti<sup>(18)</sup>.

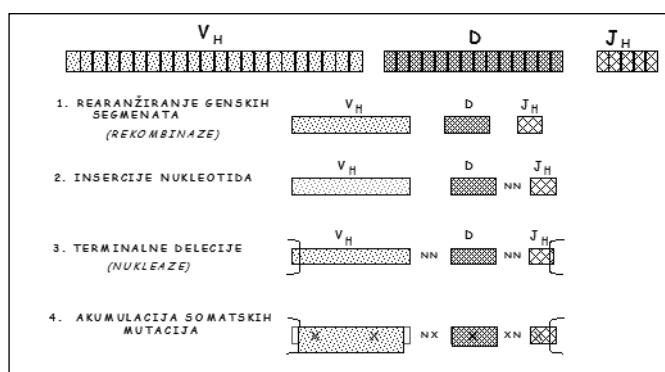
### Ograničena testa klonalnosti limfocita

Analiza klonalnosti limfocita je najčešće veoma informativan test i u najvećem broju situacija predstavlja dragocenu pomoć. Ipak, treba imati na umu njegova ograničenja. Pre svega, prisustvo klonalne proliferacije limfocita ne znači uvek i prisustvo leukemije/limfoma. Neke, klinički benigne proliferacije mogu imati klonalno poreklo (npr. neke CD8<sup>+</sup> i ređe CD4<sup>+</sup> T-limfocitoze, benigne monoklonalne gamopatije, inicijalni stadijumi u EBV<sup>+</sup> ili CMV<sup>+</sup> limfoproliferacijama kod imunodeficientnih bolesnika, neke benigne kutane T-ćelijske proliferacije). Iz tih razloga, rezultat PCR testa klonalnosti limfocita se interpretira isključivo u kontekstu kliničke slike, morfoloških i imunofenotipskih nalaza. Treba naglasiti, da pri tumačenju rezultata treba imati na umu i vrstu uzorka. Ponekad „background“ normalnih B- i T-limfocita

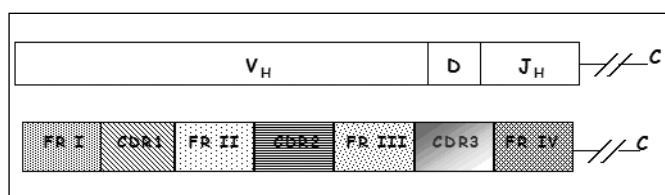
može maskirati prisustvo manjeg broja malignih limfocita. Nasuprot tome, u suviše oskudnom uzorku, sa malim brojem limfocita, može se detektovati lažna pozitivnost, posebno kada se analiziraju TCR rearanžmani. Takođe, u uzorcima bolesnika koji primaju veće doze imunosupresivne terapije se najčešće detektuju T-limfociti ograničenog TCR repertoara<sup>(1)</sup>.

Nasuprot prvobitnoj pretpostavci, danas se zna da Ig i TCR rearanžmani nisu strogo ograničeni na B-, odnosno T-limfocite. Kroslinijski TCR rearanžmani se mogu detektovati u malignitetima nezrelih B-limfocita (naročito u prekursorskoj B-ALL), ali i u akutnoj mijeloidnoj leukemiji (AML) i ređe, u malignitetima zrelih B-limfocita. Kroslinijski Ig rearanžmani (najčešće teškog lanca Ig) se mogu detektovati u T-ćelijskim malignitetima i AML, ali mnogo ređe<sup>(1)</sup>.

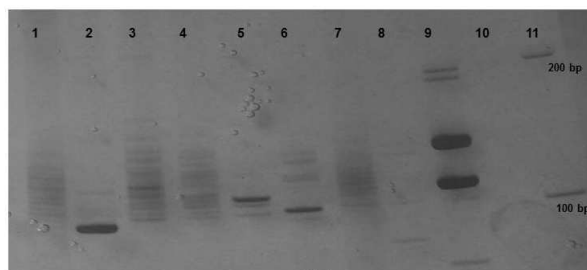
Na osnovu publikovanih rezultata, ali i na osnovu vlastitog iskustva, možemo zaključiti da test klonalnosti limfocita predstavlja dragocenu dopunu standardnim morfološkim, citološkim, imunohemijskim i citogenetičkim testovima u dijagnostici i praćenju limfoproliferativnih bolesti. U zavisnosti od iskustva i materijalne situacije, laboratorije se mogu opredeliti da ove testove izvode prema sopstvenim, interno evaluiranim *in house* PCR protokolima, da koriste reagensne i protokole koji su preporučeni u BIOMED-2 studiji ili da kombinuju *in house* PCR i BIOMED-2 protokole. U svakom slučaju, za pravilno tumačenje rezultata je potrebno iskustvo u ovoj oblasti i poznavanje biologije i patologije limfoma i leukemija kao i razumevanje procesa rearanžiranja gena za Ig i TCR.



Slika 1. Shematski prikaz rearanžiranja gena za teški lanac Ig



Slika 2. Shematski prikaz rearanžiranog gena za Ig



Slika 3. Analiza klonalnosti B-limfocita na 10% poliakrilamidnom gelu nakon elektroforeze i bojenja srebro nitratom

Prisustvo poliklonalne populacije B-limfocita je detektovano u kolonama 1, 3, 4, 7, 8;

Prisustvo monoklonalne populacije B-limfocita je detektovano u kolonama 2 (inicijalna analiza pri postavljanju dijagnoze), 5 i 6 (minimalna rezidualna bolest);

Pozitivna kontrola (uzorak limfne žlezde bolesnika sa B-NHL) je u koloni 9;

Negativna kontrola (uzorak bez genomske DNK, sadrži samo PCR reagensne) je u koloni 10;

Marker molekulske težine DNK je u koloni 11;

## Abstract

According to published data, in 5-10% of patients with suspect lymphoproliferative disorders, histo/cytomorphology supplemented with immunohistology or flow cytometric immunophenotyping cannot discriminate malignant and reactive processes. In such cases, diagnosis of lymphoid malignancies can be supported by PCR-based clonality testing. The clinical utility of clonality testing also includes detection of bone marrow infiltration as a part of staging procedure, detection of minimal residual disease following therapy and assessment of ability of purging technique to eradicate residual malignant cells in marrow/blood.

Clonality testing can be performed in all lymphoproliferations by analysis of immunoglobulin (Ig) or T-cell receptor (TCR) gene rearrangements that are unique for each kind of lymphocyte. Reactive lymphoproliferations have polyclonally rearranged Ig/TCR genes, whereas leukaemias and lymphomas show clonal rearrangements. In the literature, there are lot of reports on sensitivity and specificity of different PCR reagents and protocols for "in house" clonality testing. Therefore, a total of 47 institutes from seven European countries collaborated in the BIOMED-2 Concerted Action, exploiting the full knowledge of Ig and TCR genes and their rearrangement process. This project was initiated to develop and standardize reagents and methods for PCR-based clonality diagnostics. Reagents and procedures evaluated by BIOMED-2 are reported in Leukemia on 2003, and later on 2007. However, the large number of laboratories has continued the usage of "in house" procedures.

In the present article we review the principles of PCR-based clonality testing, usefulness and pitfalls of "in house" procedures and BIOMED-2 protocols. Furthermore, we overview the latest reports from literature about this topic.

## REFERENCES

- <sup>1</sup> 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: 2257-2317
- <sup>2</sup> Lymphocyte development and the rearrangement and expression of antigen receptor genes. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. (eds): *Cellular and molecular immunology*, 6th ed., Philadelphia, Saunders Elsevier, 2007, pp.153-188
- <sup>3</sup> Stewart AK, Schwartz RS: Immunoglobulin V gene regions and the B cell. *Blood*. 1994; 83:1717-1730
- <sup>4</sup> Sklar J, Weiss LM: Applications of antigen receptor gene rearrangements to the diagnosis and characterization of lymphoid neoplasms. *Annu Rev Med*. 1988; 39: 315-34
- <sup>5</sup> Slack DN, McCarthy, Wiedemann LM, Sloane: Evaluation of sensitivity, specificity, and reproducibility of an optimized method for detecting clonal rearrangements of immunoglobulin and T-cell receptor genes in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *Diagn Mol Pathol*. 1993; 2: 223-32
- <sup>6</sup> Segal GH, Jorgensen T, Masih AS, Braylan RC: Optimal primer selection for clonality assessment by polymerase chain reaction analysis: Low grade B-cell lymphoproliferative disorders of nonfollicular center cell type. *Hum Pathol*. 1994; 25: 1269-75
- <sup>7</sup> Segal GH, Wittwer CT, Fishleder AJ, Wittwer CT, Fishleder AJ, Stoler MH, Tubbs RR, Kjeldsberg CR: Identification of monoclonal B-cell populations by rapid cycle polymerase chain reaction. A practical screening method for the detection of immunoglobulin gene rearrangements. *Am J Pathol*. 1992; 141: 1291-97
- <sup>8</sup> Linke B, Pytlich J, Tiemann M, Bolz I, Fayyazi A, von Hofen M, Pott C, Bertram J, et al: Automated high resolution PCR fragment analysis for identification of clonally rearranged immunoglobulin heavy chain genes. *Leukemia*. 1997; 11: 1055-62
- <sup>9</sup> Diss TC, Pan L: Polymerase chain reaction in the assessment of lymphomas. *Cancer Surveys*. 1997; 30: 21-44
- <sup>10</sup> Diss TC, Peng H, Wotherspoon AC, Icaacson PG, Pan L: Detection of monoclonality in low-grade B-cell lymphomas using the polymerase chain reaction is dependent on primer selection and lymphoma type. *J Pathol*. 1993; 169: 291-5
- <sup>11</sup> Cikota B, Magić Z, Ilić V, Berger S, Stamatović D, Malešević M: B-cell clonality assessment by polymerase chain reaction in patients with B-non Hodgkin's lymphomas. *Balc J Med Gen*. 2000; 3: 31-6
- <sup>12</sup> Szczepanski T, Willemse MJ, Brinkhof B, van Wering ER, van der Burg M, van Dongen JJM: Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor – B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease. *Blood*. 2002; 99: 2315-23
- <sup>13</sup> Kandolf-Sekulović L, Cikota B, Stojadinović O, Bašanović D, Škiljević D, Medenica Lj et al: TCR $\alpha$  gene rearrangement analysis in skin samples and peripheral blood of mycosis fungoides patients. *Acta Dermatovenerol APA*. 16, 4: 149-155
- <sup>14</sup> Szczepanski T, Orfao A, van der Velden VHJ, San Miguel JF, van Dongen JJM: Minimal residual disease in leukemia patients. *The Lancet*. 2001; 2: 409-17
- <sup>15</sup> van Dongen JJM, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, Pongres-Willemse MJ, Corral L et al: Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia in childhood. *The Lancet*. 1998; 352: 1731-8
- <sup>16</sup> Cikota BM, Tukić LjJ, Tarabar OT, Stamatović DT, Elez MN, Magić ZM: PCR-based clonality assessment in patients with lymphocytic leukaemias: a single institution study. *J Genet*. 2009; 88: 309/314
- <sup>17</sup> Cikota BM, Tukić LjJ, Tarabar OT, Magić ZM: Detection of t(14;18), P53 and RAS gene mutations and quantification of residual disease in patients with B-cell non Hodgkin's lymphoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2007; 26, 4: 515-522
- <sup>18</sup> Van Kirken JHJM, Langerak AW, Macintyre EA, Kneba M, Hodges E, Garcia Sany R 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: 201-206
- <sup>19</sup> Evans PAS, Pott Ch, Groenen PJTA, Salles G, Davi F, Berger E 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: 207-214
- <sup>20</sup> Kuo SY, Liu H, Liao YL, Chang ST, Hsieh YC, Bandoh BA et al: A parallel comparison of T-cell clonality assessment between an in-house PCR assay and the BIOMED-2 assay leading to an efficient and cost-effective strategy. *J Clin Pathol*. 2011; 64, 6:536-42
- <sup>21</sup> Lukowsky A, Muche JM, Möbs M, Assaf C, Humme D, Hummel M et al: Evaluation of T-cell clonality in archival skin biopsy samples of cutaneous T-cell lymphomas using the biomed-2 PCR protocol. *Diagn Mol Pathol*. 2010; 19, 2:70-7

■ Rad je primljen 01.08.2012. Prihvaćen 15.08.2012.