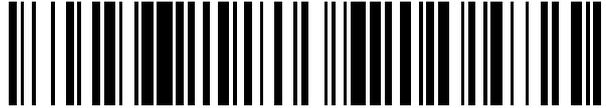


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 782**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2003 E 10185191 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013 EP 2418287**

54 Título: **Cebadores de amplificación de ácidos nucleicos para estudios de clonalidad basados en PCR del gen TCR-beta**

30 Prioridad:

**11.10.2002 US 417779 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**20.01.2014**

73 Titular/es:

**ERASMUS UNIVERSITEIT ROTTERDAM (100.0%)  
Dr. Molewaterplein 50  
3015 GE Rotterdam, NL**

72 Inventor/es:

**VAN DONGEN, JACOBUS JOHANNES MARIA;  
LANGERAK, ANTHONIE WILLEM;  
SCHUURING, EDUARDUS MARIA DOMINICUS;  
SAN MIQUEL, JESUS FERNANDO;  
GARCIA SANZ, RAMON;  
PARREIRA, ANTONIO;  
SMITH, JOHN LEWIS;  
LAVENDER, FRANCES LOUISE;  
MORGAN, GARETH JOHN;  
EVANS, PAUL ANTHONY STUART;  
KNEBA, MICHAEL;  
HUMMEL, MICHAEL;  
MACINTYRE, ELIZABETH ANNE;  
BASTARD, CHRISTIAN;  
DAVI, FREDERIC BERNARD LOUIS y  
BRÜGGEMANN, MONIKA**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 438 782 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Cebadores de amplificación de ácidos nucleicos para estudios de clonalidad basados en PCR del gen TCR-beta

La presente invención se refiere a estudios de clonalidad basados en PCR para, entre otros, el diagnóstico precoz de trastornos linfoproliferativos. En la mayoría de los pacientes en los que se sospecha de trastornos linfoproliferativos, la histomorfología o la citomorfología complementadas con inmunohistología o inmunofenotipificación por citometría de flujo pueden discriminar entre linfoproliferaciones malignas y reactivas. Sin embargo, en 5 a 10% de los casos, realizar el diagnóstico es más complicado. El diagnóstico de los tumores malignos linfoides puede ser apoyado por la evaluación de la clonalidad basada en el hecho de que, en principio, todas las células de un tumor maligno tienen un origen clonal común.

La mayor parte de los tumores malignos linfoides pertenece al linaje de células B (90 a 95%) y solo una minoría pertenece al linaje de células T (5-7%) o el linaje de células NK (<2%). Las leucemias linfoblásticas agudas (LLA) tienen su origen en las células T en 15 a 20% de los casos, pero en el grupo de las leucemias linfoides maduras y de los linfomas no Hodgkin (LNH), los tumores malignos de células T son relativamente poco frecuentes, excepto en subgrupos específicos tales como los linfomas cutáneos (Tabla 1). Por consiguiente, la gran mayoría de los tumores malignos linfoides (> 98%) contienen genes de inmunoglobulinas (Ig) y/o receptores de células T (TCR) idénticamente reorganizados (clonalmente) y en 25 a 30% de los casos también se encuentran aberraciones cromosómicas bien definidas, todos los cuales pueden servir como marcadores para la clonalidad

Los loci de genes de Ig y TCR contienen muchos segmentos de genes variables (V), de diversidad (D), y de unión (J) diferentes, que se someten a procesos de reordenamiento durante la diferenciación linfoide temprana.<sup>3,4</sup> Los reordenamientos VDJ están mediados por un complejo de la enzima recombinasa en el que las proteínas RAG1 y RAG2 juegan un papel clave al reconocer y cortar el ADN en las secuencias señal de recombinación (RSS), que se encuentran aguas abajo de los segmentos del gen V, a ambos lados de los segmentos del gen D, y aguas arriba de los segmentos del gen J (Figura 1). Las RSS inapropiadas reducen o incluso evitan por completo el reordenamiento.

El proceso de reordenamiento comienza generalmente con un reordenamiento D a J seguido de un reordenamiento V a D-J en el caso de los genes de la cadena pesada de Ig (*IGH*), TCR beta (*TCRB*), y TCR delta (*TCRD*) (Figura 1) o afectas a reordenamientos V a J directos en caso de los genes de Ig kappa (*IGK*), Ig lambda (*IGL*), TCR alfa (*TCRA*), y TCR gamma (*TCRG*). Las secuencias entre los segmentos de genes de reordenamiento son generalmente suprimidas en forma de un producto de escisión circular, también denominado círculo de escisión de TCR (TREC) o círculo escisión receptor de células B (BREC) (Figura 1).

Los reordenamientos de los genes de Ig y TCR durante la diferenciación linfoide temprana siguen generalmente un orden jerárquico. Durante la diferenciación de las células B: primero se reordenan los genes de *IGH*, a continuación, los de *IGK*, dando como resultado potencialmente la expresión de IgH/k o seguido de la delección de *IGK* y el reordenamiento de *IGL*, potencialmente seguido de la expresión de IgH/λ.<sup>5</sup> Esto implica que prácticamente todas las células B Igλ<sup>+</sup> tienen delecciones del gen *IGK* monoalélicas o bialélicas. Durante la diferenciación de las células T: primero se reordenan los genes *TCRD*, a continuación, *TCRG*, dando como resultado potencialmente la expresión TCRγδ o seguido de un nuevo reordenamiento de *TCRB* y la delección de *TCRD* con el subsiguiente reordenamiento de *TCRA*, seguido potencialmente por la expresión de TCRαβ. Los patrones de reordenamiento de los genes de Ig y TCR en los tumores malignos linfoides generalmente se ajustan al orden jerárquico descrito anteriormente, aunque también se encuentran patrones de reordenamiento inusuales, concretamente en la LLA.<sup>6</sup>

Las muchas combinaciones diferentes de los segmentos de los genes V, D, y J representan el denominado repertorio combinatorio (Tabla 2), que se estima en ~ 2x10<sup>6</sup> para las moléculas de Ig, ~ 3x10<sup>6</sup> para las moléculas TCRαβ y ~ 5x10<sup>3</sup> para las moléculas de TCRγδ. En los sitios de unión de los segmentos de los genes V, D, y J, se produce la delección e inserción al azar de nucleótidos durante el proceso de reordenamiento, lo que da como resultado regiones de unión muy diversas, que contribuyen significativamente al repertorio total de moléculas de Ig y TCR, que se estima que es >10<sup>12,5</sup>.

Los linfocitos B maduros amplían adicionalmente su repertorio de Ig tras el reconocimiento del antígeno en los centros de los folículos por medio de *hipermutación somática*, un proceso que conduce a la maduración por afinidad de las moléculas de Ig. El proceso de *hipermutación somática* se centra en el exón V-(D)-J de los genes de *IGH* y de la cadena ligera de Ig y afecta a mutaciones de un único nucleótido y, a veces también a inserciones o delecciones de nucleótidos. También se encuentran genes de Ig mutados somáticamente en los tumores malignos de células B maduras de origen folicular o post-folicular.<sup>7</sup>

Los genes de Ig y TCR reordenados funcionalmente dan como resultado la expresión en la membrana superficial de moléculas Ig, TCRαβ, o TCRγδ. Basándose en el concepto de que solo un único tipo de molécula Ig o TCR es expresado por un linfocito o un clon de linfocito, los genes reordenados clonalmente de los tumores malignos linfoides maduros podrían ser detectables a nivel de proteínas. La detección de la expresión de la cadena ligera de Ig (Igκ o Igλ) sola se ha utilizado durante mucho tiempo para discriminar entre linfocitos B reactivos (policlonales) (razón Igκ/Igλ normal: 0,7-2,8) frente a linfocitos B aberrantes (clonales) con razones de Igλ/Igκ >4,0 o <0,5.<sup>8-10</sup> En la

inmensa mayoría (>90%) de los tumores malignos de células B maduras, la expresión de la cadena ligera de Ig sola puede apoyar el origen clonal del tumor maligno.

Asimismo, el desarrollo de muchos anticuerpos diferentes contra dominios variables de las diversas cadenas de TCR permite la detección de los dominios V $\beta$ , V $\gamma$  y V $\delta$  monotípicos, cuando se compara con valores de referencia apropiados.<sup>11-18</sup> En la interpretación de los resultados V $\beta$  monotípico utilizando de 20 a 25 anticuerpos contra diferentes familias de V $\beta$  (Tabla 2), hay que darse cuenta de que las expansiones de las células T TCR $\alpha\beta^+$  clonales clínicamente benignas (frecuentemente CD8<sup>+</sup>) se encuentran de manera regular en sangre periférica (SP) de individuos de más edad.<sup>13,17</sup> Estas expansiones de las células T clonales en SP tienen sin embargo un tamaño relativamente pequeño: <40% de linfocitos T de SP y <0,5x10<sup>6</sup>/ml de SP.<sup>13</sup> Todavía no está claro hasta qué punto tales clones de células T clínicamente benignos pueden ser encontrados también en tejidos linfoides.

Los resultados de la expresión del dominio V $\gamma$  y V $\delta$  monotípico deben ser interpretados con cautela, ya que en individuos sanos se ha seleccionado una gran fracción de linfocitos T TCR $\gamma\delta^+$  policlonales normales para el uso de V $\gamma$ 9-J $\gamma$ 1.2 y V $\delta$ 2-J $\delta$ 1.<sup>18,19</sup> Por consiguiente, las elevadas frecuencias de linfocitos T V $\gamma$ 9<sup>+</sup>/V $\delta$ 2<sup>+</sup> en SP deben considerarse como un descubrimiento normal, a menos que los recuentos absolutos sean de 1 a 2x10<sup>6</sup>/ml de SP. Se debe observar que la mayor parte de los tumores malignos de células T TCR $\gamma\delta^+$  expresan V $\delta$ 1 u otro segmento del gen no V $\delta$ 2 combinado con un único dominio V $\gamma$  (generalmente no V $\gamma$ 9).<sup>15,20</sup>

La detección de la expresión restringida Ig $\kappa$  o Ig $\lambda$  o expresión de V $\beta$ , V $\gamma$  o V $\delta$  monotípica es relativamente fácil en los estudios de citometría de flujo de muestras de SP y médula ósea (MO) de pacientes con leucemias de células B o de células T maduras. Sin embargo, esto parece ser más difícil en muestras de tejido en las que se sospecha de trastornos linfoproliferativos que se entremezclan con linfocitos normales (reactivos).

En contraste con las técnicas basadas en anticuerpos, las técnicas moleculares son ampliamente aplicables para la detección de los genes de Ig/TCR reordenados clonalmente, así como aberraciones cromosómicas bien definidas. Esto tenía que ver previamente con el análisis mediante transferencia Southern, pero hoy en día se utilizan concretamente técnicas de PCR.

Las dificultades para realizar un diagnóstico definitivo de un tumor maligno linfóide se producen en una proporción de casos (5 al 10%) a pesar de la amplia inmunofenotipificación. Por lo tanto, se necesita un diagnóstico adicional (clonalidad molecular) para generar o para confirmar el diagnóstico final, tal como en el caso de:

-cualquier sospecha de proliferación de células B cuando la morfología y la inmunofenotipificación no son concluyentes;

-todas las sospechas de proliferaciones de células T (PRECAUCIÓN: B-LNH rico en células T);

-linfoproliferaciones en pacientes inmunodeficientes o pacientes trasplantados;

-evaluación de la relación clonal entre dos tumores malignos linfoides en un paciente o discriminación entre una recaída y un segundo tumor maligno;

-clasificación adicional de un tumor maligno, p. ej. por medio de patrones de reordenamiento de genes de Ig/TCR o aberraciones cromosómicas concretas;

-ocasionalmente: estadificación de los linfomas.

Durante mucho tiempo, el análisis de transferencia Southern ha sido la técnica convencional de referencia para los estudios moleculares de clonalidad. La transferencia de Southern se basa en la detección de fragmentos de ADN que no son de línea germinal ("reordenados"), obtenidos después de la digestión con enzimas de restricción. Las enzimas de restricción bien seleccionadas (que dan como resultado fragmentos de 2 a 15 kb) y las sondas de ADN bien ubicadas (concretamente sondas de segmentos J aguas abajo) permiten la detección de prácticamente todos los reordenamientos de genes de Ig y TCR, así como aberraciones cromosómicas que implican a segmentos de genes J.<sup>21-28</sup> Se debe observar que el análisis de transferencia Southern se centra en la diversidad de los reordenamientos de los segmentos de los genes de Ig/TCR y por lo tanto se aprovecha del repertorio combinatorio.

Se pueden obtener resultados óptimos de la transferencia Southern para la evaluación de la clonalidad con los genes *IGH*, *IGK*, y *TCRB*, debido a que estos genes tienen un extenso repertorio combinatorio, así como una estructura génica relativamente sencilla que se pueden evaluar con solo una o dos sondas de ADN.<sup>22,24,28</sup> Los genes *IGL* y *TCRA* son más complejos y requieren múltiples conjuntos de sondas.<sup>25,26,29</sup> Por último, los genes *TCRG* y *TCRD* tienen un repertorio combinatorio limitado, que es menos óptimo para la discriminación entre la monoclonalidad y la policlonalidad a través del análisis de transferencia Southern.<sup>20,21</sup>

A pesar de la alta fiabilidad del análisis de transferencia Southern, éste está siendo remplazado cada vez más por técnicas de PCR, debido a varias desventajas inherentes: el análisis de transferencia Southern lleva tiempo, es técnicamente exigente, requiere de 10 a 20  $\mu$ g de ADN de alta calidad, y tiene una sensibilidad limitada de 5 a 10%.<sup>21</sup>

La detección de los genes de Ig/TCR reordenados y de las aberraciones cromosómicas mediante técnicas de PCR requiere un conocimiento preciso de los segmentos génicos reordenados con el fin de diseñar cebadores apropiados en lados opuestos de las regiones de unión y regiones de fusión de los puntos de rotura, respectivamente.

5 En los estudios de clonalidad basados en PCR rutinarios, la distancia entre los cebadores debe ser menor de 1 kb, preferiblemente menor de 500 pb. Esto es particularmente importante para la discriminación entre los productos de PCR de diferentes reordenamientos de genes de Ig/TCR monoclonales frente a policlonales, que se base en la diversidad de las regiones de unión (diversidad en el tamaño y la composición). Hasta el momento, se han utilizado principalmente reordenamientos de los genes *IGH* y *TCRG* para los estudios de clonalidad basados en PCR, debido al número limitado de cebadores necesarios para detectar los reordenamientos VH-JH y Vy-Jy.

10 Las principales ventajas de las técnicas de PCR son su velocidad, las bajas cantidades de ADN requeridas, la posibilidad de utilizar ADN de menor calidad, y la relativamente buena sensibilidad de 1 a 5%, para algunos tipos de reordenamientos incluso <1%. En consecuencia, las técnicas de PCR permiten el uso de pequeñas biopsias (p. ej., biopsias por aspiración con aguja fina), o el uso de muestras incluidas en parafina fijadas con formaldehído, que generalmente producen ADN de menor calidad. Por lo tanto también se podría utilizar material de archivo, si fuera necesario.

Los estudios de clonalidad molecular pueden resultar muy informativos, pero numerosas limitaciones y dificultades podrían impedir la interpretación de los resultados obtenidos con los métodos de detección convencionales:

1. *Sensibilidad limitada, relacionada con un fondo policlonal normal*

20 El límite de detección varía entre 1% y 10% (o incluso 15%), dependiendo de la técnica aplicada (análisis de transferencia Southern o técnicas de PCR) y depende del tamaño relativo del "fondo" de los linfocitos B y T normales (policlonales). Una sensibilidad limitada podría impedir la detección de las poblaciones de células clonales pequeñas con menos de 5 a 10% de células linfoides clonales.

2. *Clonalidad no es equivalente a tumor maligno*

25 La detección de clonalidad no siempre implica la presencia de un tumor maligno. Algunas proliferaciones clínicamente benignas tienen un origen clonal, tal como muchos casos de linfocitosis T CD8<sup>+</sup> (o, a veces CD4<sup>+</sup>), gammapatías monoclonales benignas, fases iniciales de linfoproliferaciones EBV<sup>+</sup> (siendo con frecuencia oligoclonales) en pacientes inmunodeficientes, y proliferaciones de células T cutáneas benignas, tales como papulosis linfomatoide, etc. Esto implica que los resultados de los estudios de clonalidad molecular siempre deben ser interpretados en el contexto del diagnóstico clínico, morfológico e inmunofenotípico, es decir, en estrecha colaboración con hematólogos, citomorfólogos, patólogos, e inmunólogos.

3. *Los reordenamientos de los genes Ig y TCR no son marcadores de linaje*

35 En contraste con la suposición inicial, desde hace más de una década ahora está claro que los reordenamientos de los genes de Ig y TCR no están necesariamente restringidos a los linajes de células B y de células T, respectivamente. Los reordenamientos de los genes de TCR de linaje cruzado se producen con relativa frecuencia en tumores malignos de células B inmaduras, concretamente en LLA de células B precursoras (>90% de los casos),<sup>30</sup> pero también las leucemias mieloides agudas (LMA) y los tumores malignos de células B maduras podrían contener reordenamientos del gen de TCR.<sup>31-33</sup> Aunque con menor frecuencia, también se producen reordenamientos del gen de Ig de linaje cruzado en los tumores malignos de células T y la LMA, que implican principalmente al locus de la cadena pesada de Ig (*IGH*).<sup>33,34</sup>

40 Prácticamente todos (>98%) los tumores malignos de células T TCRαβ<sup>+</sup> tienen reordenamientos del gen *TCRG* (generalmente bialélicos) y muchos tumores malignos de células T TCRγδ<sup>+</sup> tienen reordenamientos del gen *TCRB*, que implican que la detección de los reordenamientos de *TCRB* o *TCRG* no es indicativa tampoco de células T del linaje de células T αβ o γδ, respectivamente.

45 Además de estos reordenamientos de linaje cruzado, se ha establecido que varios tumores malignos linfoides tienen patrones de reordenamiento del gen de Ig/TCR inusuales. Esta información está disponible en detalle para LLA de células B precursoras y LLA-T, pero todavía no lo está para la mayor parte de los otros tumores malignos linfoides.<sup>6</sup>

4. *Pseudoclonalidad y oligoclonalidad*

50 La detección de una población de células linfoides aparentemente clonales o aparentemente oligoclonales (pseudoclonalidad) es rara en el análisis de transferencia Southern, a menos que se utilicen genes con un repertorio combinatorio limitado, tales como *TCRG* o *TCRD*. Esto podría dar como resultado bandas reordenadas débiles, p. ej., que representan reordenamientos Vy9-Jy1.2 o Vδ2-Jδ1 derivados de linfocitos T TCRγδ<sup>+</sup> de antígeno seleccionado. Sin embargo, esta es una deficiencia bien conocida del análisis de transferencia Southern y no dará como resultado bandas reordenadas de alta densidad.

La pseudoclonalidad en los estudios de clonalidad basados en PCR es más difícil de reconocer. La alta sensibilidad de la PCR puede causar la amplificación de los pocos reordenamientos de los genes de Ig o TCR derivados de un número limitado de células B o células T en la muestra de tejido estudiada. Particularmente las pocas células T reactivas (policlonales) de una biopsia con aguja pequeña o de una muestra LNH de células B con alta carga tumoral podrían dar lugar a productos de PCR (oligo)clonales. Con frecuencia, la cantidad de tales productos de la PCR es limitada. Esto se observa particularmente cuando se utilizan genes *TCRG* como diana de la PCR. Los análisis mediante PCR por duplicado o triplicado seguido de la mezcla de los productos de PCR obtenidos deberían ayudar a aclarar si los productos de la PCR aparentemente clonales derivan de hecho de diferentes linfocitos.

Por último, los ganglios linfáticos reactivos pueden mostrar una menor diversidad del repertorio de Ig/TCR, causada por el predominio de varios subclones de antígeno seleccionado (oligoclonalidad). Concretamente los ganglios linfáticos o las muestras de sangre de pacientes con una infección activa por EBV o CMV pueden mostrar un repertorio de TCR o una oligoclonalidad del gen TCR restringidos. Asimismo los cuadros clínicos de inmunosupresión se asocian frecuentemente con repertorios restringidos de TCR, p. ej., en pacientes con trasplante o pacientes con leucemia de células pilosas.<sup>35</sup> La recuperación de los trasplantes y la remisión hematológica están seguidos de la restauración del repertorio TCR policlonal.<sup>36,37</sup>

#### 5. Resultados falsos positivos

En el análisis de transferencia de Southern, los resultados falsos positivos son poco frecuentes y generalmente se pueden prevenir mediante la comprobación de la digestión incompleta y mediante la exclusión de sitios de restricción polimórficos.<sup>21</sup>

Los resultados de PCR falsos positivos comprenden un grave problema, si no se realiza ningún análisis adecuado de los productos de PCR obtenidos para discriminar entre los productos de la PCR monoclonales o policlonales. Semejante discriminación se puede lograr por medio de un análisis de polimorfismo de la conformación de la hebra sencilla (SSCP en sus siglas en inglés),<sup>38</sup> electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE en sus siglas en inglés),<sup>39</sup> análisis de heterodúplex (HD en sus siglas en inglés),<sup>40,41</sup> o Barrido Génico "GeneScanning (GS en sus siglas en inglés)".<sup>42,43</sup> Estas técnicas aprovechan la diversidad de la región de unión para la discriminación entre las células monoclonales con regiones de unión idénticas y células policlonales con muy diversas regiones de unión.

#### 6. Resultados falsos negativos

Los resultados falsos negativos son poco frecuentes en el análisis de transferencia Southern si se utilizan sondas del segmento del gen J apropiadas. Sin embargo, pueden perderse algunos reordenamientos poco frecuentes (por lo general reordenamientos no funcionales), tales como los reordenamientos V-D o las delecciones de las regiones J. El análisis mediante PCR de los genes de Ig y TCR podría verse obstaculizado por los resultados falsos negativos debido a una renaturalización incorrecta de los cebadores de PCR aplicados a los segmentos génicos reordenados. Esta renaturalización incorrecta de cebadores puede estar causada por dos fenómenos diferentes. En primer lugar, la detección precisa de todos los segmentos de los genes V, D y J diferentes, requerirían muchos cebadores diferentes (Tabla 1), lo que no es factible en la práctica. Por consiguiente, se diseñan cebadores de familia, que reconocen específicamente la mayoría o todos los miembros de una familia V, D, o J particular. Como alternativa, se utilizan cebadores consenso, que se supone que reconocer prácticamente todos los segmentos de los genes V y J del locus en estudio. Los cebadores de la familia y concretamente los cebadores consenso son generalmente óptimos para una parte de los segmentos génicos relevantes, pero muestran una homología inferior (70 a 80%) con los otros segmentos génicos. Esto puede conducir eventualmente a resultados falsos negativos, concretamente en genes de Ig/TCR con muchos segmentos génicos diferentes. En los genes *TCRG* y *TCRD* este problema es mínimo, debido al número limitado de segmentos génicos diferentes.

El segundo fenómeno es la aparición de hipermutaciones somáticas en los genes de Ig reordenados de tumores malignos de células B foliculares y post-foliculares, concretamente tumores malignos de células B con genes *IGH* sometidos a cambio de clase.

Un conocimiento y una experiencia suficientes pueden evitar los primeros cuatro escollos, debido a que afectan principalmente a problemas de interpretación. Los dos últimos escollos tienen que ver con problemas técnicos, que se pueden resolver seleccionando técnicas fiables para el análisis de los productos de PCR y mediante el diseño de mejores conjuntos de cebadores.

La optimización de los análisis de transferencia Southern de los genes de Ig/TCR durante los últimos diez años ha dado como resultado la selección de combinaciones fiables de enzimas de restricción (fragmentos de entre 2 y 15 kb, que evitan sitios de restricción polimórficos) y sondas (principalmente aguas abajo de los segmentos del gen J). Aunque el análisis de transferencia de Southern es una técnica "de referencia", muchos laboratorios han sustituido gradualmente el análisis de transferencia Southern por la tecnología de PCR, debido a que la PCR es rápida, requiere cantidades mínimas de ADN de calidad media, y tiene una buena sensibilidad global.

A pesar de las ventajas obvias, la sustitución del análisis mediante transferencia Southern por técnicas de PCR para unos estudios de Ig/TCR fiables se ve obstaculizada por dos problemas técnicos principales:

-resultados negativos falsos debido a una renaturalización incorrecta de cebadores;

-dificultades en la discriminación entre los reordenamientos de los genes de Ig/TCR monoclonales y policlonales.

5 El documento WO 90/04648 se refiere a una PCR múltiplex con cebadores degenerados específicos para la región V y cebadores degenerados específicos para la región J. Además, el documento describe que las condiciones de PCR son las mismas que en los ensayos llevados a cabo para las otras regiones de clonalidad, p. ej., IgH, TCR alfa y TCR gamma. Por lo tanto, el documento describe un análisis de clonalidad de múltiples tubos múltiplex. Varios laboratorios de diagnóstico individual trataron de resolver los problemas de los estudios de clonalidad basados en PCR, pero se hasta ahora no se habían obtenido protocolos de PCR normalizados de forma fiable. En contraste, se  
10 están utilizando muchos conjuntos de cebadores diferentes, todos los cuales difieren en su sensibilidad y aplicabilidad.

La presente invención proporciona ahora conjuntos de cebadores de amplificación de ácidos nucleicos, como se definen en las reivindicaciones, y protocolos de PCR normalizados para la detección esencialmente de todos los loci de Ig y TCR relevantes y dos aberraciones cromosómicas que se producen con frecuencia. Los conjuntos de  
15 cebadores que comprenden un cebador directo y uno inverso son capaces de amplificar reordenamientos clonales de los genes de la cadena pesada de Ig (*IGH*), genes de la cadena kappa de Ig (*IGK*), genes de la cadena lambda de Ig (*IGL*), genes de TCR beta (*TCRB*), genes de TCR gamma (*TCRG*), y genes TCR delta (*TCRD*) o de amplificar la translocación cromosómica t (11; 14) (*BCL1-IGH*) y t (14; 18) (*BCL2-IGH*). Los cebadores permiten que los reordenamientos tanto completos como incompletos sean detectables y que se puedan reconocer segmentos de  
20 genes de familias diferentes V, (D), y J.

Dos técnicas que se pueden utilizar en un método de la invención para la discriminación entre reordenamientos de genes de Ig/TCR monoclonales y policlonales son el análisis de heterodúplex y GeneScanning. El análisis de heterodúplex utiliza productos de PCR de doble hebra y se aprovecha de la longitud y la composición de las regiones de unión, mientras que en GeneScanning los productos de PCR de cadena sencilla se separan en un gel o  
25 polímero de alta resolución solamente de acuerdo con su longitud (Figura 2).

Se proporcionan 107 cebadores específicos, diferentes para todos los loci de Ig/TCR relevantes, así como para t (11; 14) (*BCL1-IGH*) y t (14; 18) (*BCL2-IGH*), o variantes de los mismos, (véanse las Figuras 3 y 11). El término "variante" se refiere a un cebador que difiere en 1 a 5 nucleótidos, preferiblemente de 1 a 3 nucleótidos, en tamaño y/o posición del nucleótidos de una secuencia cebadora mostrada, a condición de que la secuencia de nucleótidos de dicho cebador variante contenga a lo sumo 2 emparejamientos erróneos, a lo sumo 1 emparejamiento erróneo, lo más preferiblemente sin emparejamientos erróneos con el locus diana. Además, un cebador variante comprende un cebador marcado (diferencialmente), es decir, un cebador que tiene una marca que se puede identificar o distinguir de otras marcas por cualquier método, incluyendo el uso de un aparato analítico. Los ejemplos de los cebadores  
30 marcados diferencialmente son los cebadores provistos de una marca fluorescente tales como un colorante 6-FAM, HEX, TET o NED. Los cebadores marcados son particularmente ventajosos para su uso en análisis de fragmentos de PCR de alta resolución automatizados (tecnología de Barrido Génico) para la detección de productos de PCR. Como se ilustra a continuación, los cebadores marcados de forma diferencial permiten distinguir entre diferentes productos de amplificación de PCR de aproximadamente la misma longitud (tamaño), preferiblemente usando GeneScanning de varios colores. Por supuesto, un cebador de amplificación de ácido nucleico variante, ya sea un  
40 cebador directo o inverso (marcado con colorante), no debería ser capaz de formar dímeros con cualquier otro cebador de amplificación de ácido nucleico directo y/o inverso (variante) que se utilice en una reacción de amplificación, ya que éste puede interferir en la renaturalización del cebador con un locus diana y por lo tanto en la amplificación del reordenamiento o la translocación de interés.

En una realización, la invención proporciona un análisis de amplificación de ácido nucleico, preferiblemente un análisis de PCR, que utiliza al menos un conjunto de cebadores de acuerdo con la invención. Dicho análisis de PCR puede ser una PCR sencilla (monoplex) o múltiplex. En una realización preferida, se utiliza un conjunto de cebadores de acuerdo con la invención en un análisis de PCR múltiplex normalizado, usando por ejemplo dos o más cebadores directos, o tres o cuatro cebadores directos, o variantes de los mismos (p. ej., seleccionados de un grupo de "cebadores de familia", por ejemplo de los cebadores de la familia de  $V_H$ ), junto con uno o más cebadores inversos  
50 consenso. Los cebadores de familia se diseñan de tal manera que reconocen la mayor parte o todos los segmentos génicos de una familia concreta (véase la Tabla 2). En una realización específica, los 107 cebadores se utilizan solo en 18 tubos de PCR múltiplex: 5 para *IGH* (3x  $V_H-J_H$  y 2x  $D_H-J_H$ ), 2 para *IGK*, 1 para *IGL*, 3 para *TCRB* (2x  $V_\beta-J_\beta$  y 1x  $D_\beta-J_\beta$ ), 2 para *TCRG*, 1 para *TCRD*, 3 para *BCL2-IGH*, y 1 para *BCL1-IGH* (Figuras 3 y 11). Dicho análisis permite evaluar los reordenamientos clonales y/o las aberraciones cromosómicas. Además, permite la detección de un trastorno linfoproliferativo. El ensayo de PCR múltiplex de los cebadores sobre aproximadamente 90  
55 linfoproliferaciones definidas mediante transferencia de Southern demostraron que en más de 95% de las muestras los resultados de la transferencia Southern y de la PCR fueron concordantes.

En otra realización, se proporciona un método para detectar un reordenamiento; como se define en las reivindicaciones 8-9, preferiblemente dos o más reordenamientos.

Se proporciona un conjunto de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaz de amplificar un gen humano seleccionado del grupo que consiste en el gen *AF4* humana (exón 3), el gen *AF4* humano (exón 11), el gen *PLZF1* humano, el gen *RAG1* humano y el gen *TBXAS1* humano (véase la Fig. 12). Utilizando uno o más de estos cinco conjuntos de cebadores que consisten en un cebador directo (o una variante del mismo) y un cebador inverso (o una variante del mismo) en un análisis de amplificación de ácido nucleico de la invención, es posible detectar uno o más "Genes de Control" seleccionado del grupo que consiste en el gen *AF4* humano (exón 3), el gen *AF4* humano (exón 11), el gen *PLZF1* humano, el gen *RAG1* humano y el gen *TBXAS1* humano. Tal método de detección se utiliza ventajosamente para evaluar la calidad (p. ej., la integridad y la amplificabilidad) de una muestra de ácido nucleico (ADN) extraída o aislada de una muestra biológica, por ejemplo ADN extraído de una muestra embebida en parafina (véase el Ejemplo 10).

Se ha sometido a ensayo la capacidad de los diferentes conjuntos de cebadores para amplificar los reordenamientos clonales y/o las aberraciones cromosómicas (translocaciones) en muchos tipos diferentes de linfomas malignos, entre ellos linfoma folicular, linfoma de células B grandes difuso, y mieloma múltiple. Se encontró que un conjunto de cebadores es muy útil para la evaluación de los reordenamientos clonales y/o las translocaciones cromosómicas. Parecía que la tasa de detección de los reordenamientos clonales utilizando los tubos de cebadores múltiplex era increíblemente alta, es decir, al menos 95%.

El ensayo paralelo de tejidos embebidos en parafina disponibles de las muestras anteriores reveló resultados en gran medida idénticos, si la calidad del ADN de estos tejidos es suficientemente alta, lo que significa que se pueden amplificar fragmentos de al menos 300 pb en una PCR de genes de control diseñada especialmente.

La aplicabilidad de los análisis de PCR múltiplex desarrollados se evaluó en una serie de 50 a 100 casos por cada tipo de tumor maligno linfoide. Siguiendo una revisión de un panel de patología nacional, y una revisión del panel de patología central en caso de dificultades, todos los casos incluidos fueron definidos de acuerdo con la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Las categorías de diagnóstico estudiadas incluyeron tumores malignos tales como el linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, linfoma de células B grandes difuso, linfoma angioinmunoblástico de células T, linfoma de células T periféricas, y linfoma anaplásico de células grandes, así como lesiones reactivas. Los resultados muestran un nivel muy alto de detección de clonalidad, incluso en entidades que son conocidas por tener hipermutaciones somáticas, tales como el linfoma folicular y el linfoma de células B grandes difuso. En particular, el uso de los tres tubos con  $V_H-J_H$  de *IGH*, complementado con los dos tubos de  $D_H-J_H$  de *IGH* y los dos tubos de *IGK* parecía ser altamente eficaz en la detección de los reordenamientos del gen de Ig clonal. Esta alta eficacia se obtiene por medio de la complementariedad de los tubos de Ig, así como por el hecho de que los reordenamientos  $D_H-J_H$  e *IGK-Kde* no están (o rara vez están) somáticamente mutado. Tal complementariedad se encontró para los cebadores *TCRB* y *TCRG* en el caso de los tumores malignos de células T.

Además, se observaron patrones de reordenamiento interesantes e inesperados, tales como patrones de reordenamientos linaje cruzado inusuales. Sorprendentemente, en aproximadamente 10% de las lesiones reactivas se detectaron reordenamientos clonales. Estas linfoproliferaciones reactivas incluyeron linfoproliferaciones relacionadas con EBV e hiperplasias atípicas, como la enfermedad de Castleman, así como lesiones que se sospechaba que eran un clon de células B o T.

Se proporciona un método para la detección de enfermedad residual mínima (ERM). El término enfermedad residual mínima (ERM) describe la situación en la que, después de la quimioterapia para la leucemia aguda (LA), una médula ósea morfológicamente normal puede todavía albergar una cantidad relevante de células malignas residuales. La detección de enfermedad residual mínima (ERM) es una nueva herramienta práctica para una medición más exacta de la inducción de la remisión durante la terapia debido a que los blastos leucémicos se pueden detectar hasta  $10^{-4}$ - $10^{-6}$ . El análisis de ERM basado en PCR conocido utiliza reordenamientos de los receptores antigénicos clonales detectables en ~90-95% de las muestras de los pacientes investigados. Sin embargo, la amplificación de los productos policlonales a menudo conduce a amplicones de PCR falsos positivos no adecuados para el análisis de ERM. La descripción proporciona ahora un método para la detección de genes de Ig y TCR idénticamente (clonalmente) reordenados o la detección de aberraciones cromosómicas bien definidas y frecuentes, tales como t (11; 14), y t (14; 18). De este modo, los reordenamientos y las translocaciones detectados utilizando un conjunto de cebadores de la invención no solo sirven como marcadores para la clonalidad en el diagnóstico, sino también como dianas de PCR para la detección de ERM durante el seguimiento.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un kit (de diagnóstico) para la detección de un reordenamiento de *TCRB*  $V\beta$ - $J\beta$  que comprende al menos un conjunto de cebadores como se define en la reivindicación 14. Un kit de la invención es muy adecuado para el diagnóstico de clonalidad basado en PCR. Opcionalmente, tal kit comprende también al menos un conjunto de cebadores capaces de amplificar un "gen de control" humano como se ha mencionado anteriormente. La inclusión de uno, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente al menos tres de estos conjuntos de cebadores de genes de control en un Tubo de Control puede ser útil en la estimación de la calidad de la muestra de ADN que se va a diagnosticar, por ejemplo ADN extraído de tejido embebido en parafina.

Se describe un método para la discriminación rápida de diferentes tipos de reordenamientos del gen de Ig/TCR en el mismo tubo de PCR múltiplex. GeneScanning permite la aplicación de múltiples cebadores diferentes conjugados

con fluorocromos en un solo tubo. Tal marcaje diferencial de los cebadores se puede utilizar para una discriminación extra entre diferentes tipos de reordenamientos del gen de Ig o TCR.

El marcaje diferencial de los cebadores V generalmente tiene un valor añadido limitado, pero el marcaje diferencial de los cebadores aguas abajo puede apoyar la identificación rápida y fácil del tipo de reordenamiento del gen de Ig/TCR, que es útil para la detección basada en PCR de la enfermedad residual mínima.<sup>44,45</sup> No se considera que el marcaje de cebadores J sea informativo para *IGH* (VH-JH o DH-JH), *IGK* (Vk-Jk) o *IGL* (VL-JL). Para una rápida identificación de los reordenamientos de *IGK*-Kde, podría ser interesante discriminar entre los reordenamientos de Vk-Kde y el intrón RSS-Kde mediante marcaje diferencial de los cebadores de Kde y el intrón RSS (véase la Figura 5B).

Se puede diseñar el GeneScanning multicolor más informativo para los reordenamientos del gen de TCR, que facilita el reconocimiento rápido de los diferentes tipos de reordenamientos de los genes *TCRB*, *TCRG*, y *TCRD*. Por ejemplo, el marcaje diferencial de los cebadores J $\beta$ 1 y J $\beta$ 2 en tubo A de *TCRB* (véase la Figura 7B) permite una fácil identificación de los reordenamientos V $\beta$ -J $\beta$ 1 frente V $\beta$ -J $\beta$ 2 policlonales y monoclonales (Figura 13A). El marcaje diferencial de los cebadores J $\gamma$ 1.3/2.3 y J $\gamma$ 1.1/2.1 (Figura 8B) da como resultado una fácil identificación de los diferentes tipos de reordenamientos del gen *TCRG* (Figura 13B). El marcaje diferencial de los cebadores J $\delta$ , el cebador D $\delta$ 2 y el cebador D $\delta$ 3 en el tubo de *TCRD* (Figura 9B) da como resultado una fácil identificación de los reordenamientos del gen *TCRD* más relevantes, tales como los reordenamientos D $\delta$ 2-J $\delta$ , V $\delta$ -J $\delta$ , D $\delta$ 2-D $\delta$ 3 y V $\delta$ 2-D $\delta$ 3 (Figura 13C).

Estos tubos de PCR múltiplex multicolor parecen ser manejables y conveniente en la práctica diaria de los diagnósticos de clonalidad basados en PCR.

#### Leyendas de las figuras

Figura 1. Diagrama esquemático de las etapas sucesivas de ordenamiento, transcripción y traducción del gen de *TCRB*. En este ejemplo se produce primero un reordenamiento D $\beta$ 2 a J $\beta$ 2.3, seguido de un reordenamiento V $\beta$ 4 a D $\beta$ 2-J $\beta$ 2.3, lo que da como resultado la formación de una unión codificante V $\beta$ 4-D $\beta$ 2-J $\beta$ 2.3. El gen *TCRB* reordenado se transcribe a ARNm precursor, se empalma a ARNm maduro, y finalmente se traduce en una cadena de proteína TCR $\beta$ . Los dos círculos de escisión de TCR extracromosómicos (TREC) que se forman durante este proceso de recombinación también están indicados; estos contienen la unión de la señal DJ y la unión de la señal VD, respectivamente.

Figura 2. Diagrama esquemático del análisis de heterodúplex y GeneScanning de productos de PCR, obtenido a partir de genes de Ig y TCR reordenados. A. Los genes de Ig y TCR reordenados (*IGH* en el ejemplo) muestran regiones de unión heterogéneas con respecto al tamaño y a la composición de nucleótidos. Los nucleótidos de la línea germinal de los segmentos génicos V, D, y J se proporcionan en mayúsculas grandes y los nucleótidos insertados aleatoriamente en mayúsculas pequeñas. La heterogeneidad de la región de unión se emplea en el análisis de heterodúplex (tamaño y composición) y en GeneScanning (sólo tamaño) para discriminar entre los productos derivados de poblaciones de células linfoides monoclonales y policlonales. B. En el análisis de heterodúplex, los productos de PCR son desnaturalizados con calor (5 min, 94°C) y con posterioridad se enfrían rápidamente (1 hora, 4°C) para inducir la formación de dúplex (homo- o heterodúplex). En las muestras de células que consisten en células linfoides clonales, los productos de PCR de los genes *IGH* reordenados dan lugar a homodúplex después de la desnaturalización y la renaturalización, mientras que en las muestras que contienen poblaciones de células linfoides policlonales los fragmentos de PCR de hebra sencilla formarán principalmente heterodúplex, que dan como resultado una mancha de fondo de fragmentos que migran lentamente después de la electroforesis. C. En GeneScanning los productos de la PCR marcados con fluorocromos de los genes *IGH* reordenados se desnaturalizan antes del análisis de fragmentos de alta resolución de los fragmentos de hebra sencilla resultantes. Las muestras de células monoclonales darán lugar a productos de PCR de tamaño idéntico (único pico), mientras que en las muestras policlonales se formarán muchos productos de PCR de *IGH* diferentes, que muestran una distribución de tamaño Gaussiana característica.

Figura 3. Análisis por PCR de reordenamientos de *IGH* (V<sub>H</sub>-J<sub>H</sub>). A. Diagrama esquemático del complejo del gen *IGH* sobre la banda del cromosoma 14q32.3 (adaptado de la base de datos ImMunoGeneTics).<sup>46,47</sup> Solamente están incluidos los segmentos del gen VH no polimórficos reordenables en color azul (V<sub>H</sub> funcional), o en color gris (pseudogenes reordenables). No están indicados los pseudogenes de VH recientemente descubiertos (generalmente truncados). B. Diagrama esquemático del reordenamiento VH-JH de *IGH* con tres conjuntos de cebadores VH y un cebador consenso JH, combinados en tres tubos múltiplex. Se proporciona la posición relativa de los cebadores VH y JH de acuerdo con su nucleótido más 5' aguas arriba (-) o aguas abajo (+) de la RSS implicada. El segmento del gen VH utilizado como miembro representativo de la familia VH para el diseño del cebador se indica entre paréntesis. C, D, y E. Análisis de heterodúplex y GeneScanning de las mismas poblaciones de células policlonales y monoclonales, que muestran las manchas de heterodúplex y las bandas de homodúplex típicos (paneles de la izquierda) y las curvas Gaussianas policlonales y picos monoclonales típicos (paneles de la derecha). La distribución aproximada de las curvas Gaussianas policlonales se indica en nt.

Figura 4. Análisis por PCR de reordenamientos de *IGH* (DH-JH). A. Diagrama esquemático del reordenamiento de *IGH* (DH-JH) con siete cebadores de la familia de DH y un cebador consenso JH, dividido en dos tubos (tubos D y E de *IGH*). El cebador DH7 (7-27) se separó de los otros seis cebadores de DH, debido a que el cebador DH7 y JH consenso proporcionarán un producto de PCR de la línea germinal de 211 nt. La posición relativa de los cebadores de DH y JH se proporciona de acuerdo con su nucleótido más 5' aguas arriba de nucleótidos (-) o aguas abajo (+) de la RSS implicada. El segmento del gen de DH utilizado como miembro representativo de la familia de DH para el diseño del cebador se indica entre paréntesis. B y C. Análisis de heterodúplex (paneles de la izquierda) y GeneScanning (paneles de la derecha) de las mismas poblaciones de células policlona y monoclonales. Se indica la distribución aproximada de los picos policlona y monoclonales. La banda/pico de fondo potencial en el tubo D está indicada con un asterisco y se encuentra fuera del rango esperado de reordenamientos DH-JH. La banda DH7-JH de la línea germinal del tubo E también se indica con un asterisco.

Figura 5. Análisis por PCR de los reordenamientos del gen *IGK*. A. Diagrama esquemático del complejo del gen *IGK* sobre la banda del cromosoma 2p11.2 (adaptado de la base de datos ImMunoGeneTics).<sup>46,47</sup> Solamente se indican los segmentos del gen Vκ no polimórficos reordenables en color azul (Vκ funcional) o en color gris (Vκ no funcional). La agrupación de segmentos del gen Vκ invertidos (codificados con la letra D) se encuentra ~800 kb aguas arriba de los segmentos del gen Vκ no invertidos. Estos segmentos del gen Vκ aguas arriba se presentan como una imagen especular de sus contrapartes no invertidas correspondientes. B. Diagramas esquemáticos del reordenamiento de Vκ-Jκ y los dos tipos de reordenamientos KDE (Vκ-Kde e intrón RSS-Kde). Se proporciona la posición relativa de los cebadores Vκ, Jκ, Kde e intrón RSS (INTR) de acuerdo con su nucleótido más 5' aguas arriba (-) o aguas abajo (+) de la RSS implicada. El segmento del gen Vκ utilizado como miembro representativo de las familias de Vκ1, Vκ2 y Vκ3 se indica entre paréntesis. Vκ4, Vκ5 y Vκ7 son familias de Vκ de un solo miembro. Los cebadores se dividen en dos tubos: Tubo A con los cebadores Vκ y Jκ y tubo B con los cebadores Vκ, intrón de RSS, y Kde. C y D. Análisis de heterodúplex y GeneScanning de las mismas poblaciones de células policlona y monoclonales, que muestran las manchas de heterodúplex y las bandas de homodúplex típicos (panel de la izquierda) y las curvas Gaussianas y los picos monoclonales típicos (paneles de la derecha). La distribución aproximada de las curvas Gaussianas policlona se indica en nt.

Figura 6. Análisis por PCR de los reordenamientos del gen *IGL*. A. Diagrama esquemático del complejo del gen *IGL* sobre la banda del cromosoma 22q11.2 (adaptado de base de datos ImMunoGeneTics).<sup>46,47</sup> Solamente están incluidos los segmentos del gen Vλ no polimórficos reordenables en color azul (Vλ funcional) o en color gris (Vλ no funcional) B. Diagrama esquemático del reordenamiento Vλ-Jλ con dos cebadores de la familia de Vλ y un cebador consenso Jλ. Solo se diseñaron dos cebadores Vλ para Vλ1 más Vλ2 y para Vλ3, debido a que estas tres familias de Vλ abarcan aproximadamente 70% de los segmentos del gen Vλ reordenables y debido a que aproximadamente 90% de todos los reordenamiento del gen *IGL* implican segmentos del gen Vλ1, Vλ2, o Vλ3.<sup>48</sup> Aunque cinco de los siete segmentos del gen Jλ se pueden reordenar, solo se diseño un único cebador consenso Jλ para Jλ1, Jλ2 y Jλ3, debido a que 98% de todos los reordenamientos del gen *IGL* implican uno de estos tres segmentos de genes.<sup>49</sup> Se proporciona la posición relativa de los cebadores Vλ y Jλ de acuerdo con su nucleótido más 5' aguas arriba de nucleótidos (-) o aguas abajo (+) de la RSS implicada. C. Análisis de heterodúplex y GeneScanning de las mismas poblaciones de células policlona y monoclonales, que muestran las manchas de heterodúplex y las bandas homodúplex típicos (panel de la izquierda) y las curvas Gaussianas policlona y los picos monoclonales (panel de la derecha). La posición aproximada de las curvas Gaussianas policlona se indica en nt.

Figura 7. Análisis por PCR de los reordenamientos del gen de *TCRB*. A. Diagrama esquemático del locus de *TCRB* humano. La denominación del segmento del gen se realiza de acuerdo a Arden et al.<sup>50</sup>, con la denominación de acuerdo con Rowen et al.<sup>51</sup> y Lefranc et al.<sup>46,47</sup> entre paréntesis. La figura está adaptada de la base de datos de ImMunoGeneTics internacional.<sup>46,47</sup> Solo se representan los segmentos del gen Vβ no polimórficos reordenables se representan en color azul (Vβ funcional), en medio de color azul/medio de color gris (funcional potencial, pero sin encontrar expresión de proteína) y en color gris (Vβ no funcional). B. Diagrama esquemático de los reordenamientos Vβ-Jβ y Dβ-Jβ. Los 23 cebadores Vβ, 13 cebadores Jβ y dos cebadores Dβ se combinan en tres tubos: Tubo A con 23 cebadores Vβ y nueve cebadores Jβ, tubo B con 23 cebadores Vβ y cuatro cebadores Jβ, y tubo C con dos cebadores Dβ y 13 cebadores Jβ. Los 23 cebadores Vβ y los 13 cebadores Jβ están alineados con el fin de obtener productos de PCR de tamaño comparable (véanse los paneles C y D). Los cebadores Vβ abarcan aproximadamente 90% de todos los segmentos del gen Vβ. La posición relativa de los cebadores Vβ, Dβ, y Jβ se proporciona de acuerdo a su nucleótidos más 5' aguas arriba (-) o aguas abajo (+) de la RSS implicada. C, D, y E. Análisis de heterodúplex y GeneScanning de las mismas poblaciones de células policlona y monoclonales, que muestran las manchas de heterodúplex y las bandas de homodúplex típicos (paneles de la izquierda) y las curvas Gaussianas policlona y los picos monoclonales típicos (paneles de la derecha). La distribución aproximada de las curvas Gaussianas policlona se indica en nt.

Figura 8. Análisis por PCR de los reordenamientos del gen *TCRG*. A. Diagrama esquemático del locus de *TCRG* humano sobre la banda del cromosoma 7p14. Solo se representan los segmentos del gen Vγ reordenables en color azul (Vγ funcional) o en color gris (Vγ no funcional). Para los segmentos del gen Jγ, se utilizan ambas nomenclaturas.<sup>46,47,52</sup> B. Diagrama esquemático del reordenamiento Vγ-Jγ de *TCRG* con cuatro cebadores Vγ y

dos cebadores J $\gamma$ , que se dividen en dos tubos. Se indica la posición relativa de los cebadores V $\gamma$  y J $\gamma$  de acuerdo con su nucleótidos más 5' aguas arriba (-) o aguas abajo (+) de la RSS implicada. C y D. Análisis de heterodúplex y GeneScanning de las mismas poblaciones de células policlonales y monoclonales, que muestran las manchas de heterodúplex y las bandas homodúplex típicos (paneles de la izquierda) y las curvas Gaussianas policlonales y los picos monoclonales típicos (paneles de la derecha). La distribución aproximada de las curvas Gaussianas policlonales se indica en nt.

Figura 9. Análisis por PCR de los reordenamientos del gen *TCRD*. A. Diagrama esquemático del locus de *TCRD* humano sobre la banda del cromosoma 14q11.2. Los seis segmentos del gen V $\delta$  "clásicos" se indican en color azul, dispersados entre los segmentos del gen V $\alpha$  en color negro. Puesto que V $\delta$ 4, V $\delta$ 5 y V $\delta$ 6 también son reconocidos como segmentos del gen V $\alpha$ , se proporciona entre paréntesis su código del gen V $\alpha$ . B. Diagrama esquemático de los reordenamientos V $\delta$ -J $\delta$ , D $\delta$ 2-J $\delta$ , D $\delta$ 2-D $\delta$ 3, y V $\delta$ -D $\delta$ 3, que muestra la posición de seis cebadores V $\delta$ , cuatro J $\delta$ , y dos D $\delta$ , todos combinados en un solo tubo. Se indica la posición relativa de los cebadores V $\delta$ , D $\delta$ , y J $\delta$  de acuerdo con su nucleótido más 5' aguas arriba (-) o aguas abajo (+) de la RSS implicada. C. Análisis de heterodúplex (panel de la izquierda) y GeneScanning (panel de la derecha) de las mismas poblaciones de células policlonal y monoclonales. Las poblaciones de células policlonales muestran una mancha vaga en el análisis de heterodúplex y un patrón de picos complejo y amplio en GeneScanning. Las bandas y los picos monoclonales son claramente visibles. Se indica la posición aproximada de los productos de PCR de los diferentes tipos de reordenamientos en GeneScanning.

Figura 10. Detección de los reordenamientos de *BCL1-IGH*. A. Diagrama esquemático del gen *CCND1* y región de rotura de *BCL1* MTC sobre la banda del cromosoma 11q13, así como el segmento del gen JH sobre la banda del cromosoma 14q32. Para el diseño del cebador en la región *BCL1*-MTC se compuso una secuencia de unión *BCL1*-MTC/JH4 artificial (como se informa parcialmente para JVM2<sup>53</sup>): los primeros 50 nucleótidos referidos por Williams<sup>54</sup> se conectaron a los nucleótidos 1-439 de la secuencia MTC presente en NCBI (número de acceso S77049<sup>55</sup>); se añadió la región N "GCC" de JVM2<sup>53</sup> seguido de los nucleótidos 1921-3182 que representan la región genómica JH4-JH6 (número de acceso J00256). B. Electroforesis en gel de agarosa de una serie de productos de PCR de *BCL1-IGH* de diferentes pacientes con LCM y la línea celular de control positivo JVM2. Los productos de la PCR difieren en tamaño, lo que indica diferentes posiciones de los puntos de rotura de *BCL1*-MTC. Las bandas más grandes de densidad menor representan los productos de PCR que se extienden al siguiente segmento del gen de JH de la línea germinal aguas abajo.

Figura 11. Detección por PCR de los reordenamientos de *BCL2-IGH*. A. Diagrama esquemático del gen *BCL2* sobre la banda del cromosoma 18q21. La mayor parte de los puntos de rotura de *BCL2* se agrupa en tres regiones: MBR, 3'MBR y mcr. Por consiguiente, se han diseñado cebadores múltiple para cubrir los puntos de rotura potenciales en estas tres regiones: dos cebadores MBR, cuatro cebadores 3'MBR, y tres cebadores mcr. La posición relativa de los cebadores de *BCL2* se indica de acuerdo con su nucleótido más 5' aguas arriba (-) o aguas abajo (+) con respecto al extremo 3' del exón 3 de *BCL2* (de acuerdo con el número de acceso de NCBI AF32519451), a excepción de los dos cebadores *BCL2*-mcr; su posición se indica aguas abajo del primer nucleótido de la secuencia AF275873. B, C, y D. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de diferentes pacientes con LCF y diversas líneas de células de control positivo (DoHH2, K231, OZ, y SC1). Los paneles B y D contienen las mismas muestras y muestran complementariedad en la positividad, lo que ilustra que el tubo C (tubo mcr) tiene un valor añadido. Los productos de PCR difieren en tamaño, con respecto a diferentes posiciones de los puntos de rotura de *BCL2*. Las bandas más grandes de densidad más baja en las mismas calles representan productos de PCR que se extienden hasta el siguiente segmento del gen JH de la línea germinal aguas abajo o al siguiente cebador *BCL2* aguas arriba.

Figura 12. PCR del gen de control para la evaluación de amplificabilidad y la integridad de las muestras de ADN. A. Diagrama esquemático de cinco exones de genes de control y los cinco conjuntos de cebadores para la obtención de productos de PCR de 600 pb, 400 pb, 300 pb, 200 pb y 100 pb. Se proporciona la posición relativa de los cebadores de los genes de control de acuerdo con su nucleótido más 5' aguas abajo del sitio de empalme 5' del exón del gen de control implicado. B. Productos de la PCR del gen de control de seis muestras de ADN, separadas en un gel de poliacrilamida al 6%. Dos muestras de control contenían ADN de alto peso molecular (calles exteriores) y se obtuvieron cuatro muestras de ADN a partir de muestras de tejido incluidas en parafina, que mostraban una amplificabilidad reducida (p. ej., GBS-4 50 ng frente a GBS-4 500 ng) o una integridad reducida del ADN (PT-4).

Figura 13. GeneScanning multicolor para apoyar la identificación rápida y fácil de los reordenamientos del gen de TCR. A. Análisis bicolor del tubo A de *TCRB* con un marcaje diferencial de los cebadores J $\beta$ 1 (marcado con TET; verde) y cebadores J $\beta$ 2 (marcados con FAM; azul). El panel superior muestra muy bien los dos patrones de reordenamiento J $\beta$ 1 y J $\beta$ 2 policlonales (véase la Figura 7C), mientras que los otros dos paneles muestran los reordenamientos de J $\beta$ 2 clonales. B. Análisis bicolor del tubo A de *TCRG* con marcaje diferencial del cebador J $\gamma$ 1.3/2.3 (marcado con FAM; azul) y el J $\gamma$ 1.1/2.1 (marcado con TET; verde). El panel superior muestra muy bien los patrones de reordenamiento policlonales (véase la Figura 8C), mientras que los otros dos paneles muestran los reordenamientos de J $\gamma$ 1.3/2.3 clonal y J $\gamma$ 1.1/2.1 clonal, respectivamente. C. Análisis tricolor de los reordenamientos del gen *TCRD* con marcaje diferencial de los cebadores J $\delta$  (marcado con FAM; azul), cebador D $\delta$ 2 (marcado con HEX; verde) y cebador D $\delta$ 3 (marcado con NED; negro). Dentro de los patrones de

reordenamiento complejos del tubo de *TCRD* (Figura 9C), el análisis tricolor permite la detección directa de reordenamientos V $\delta$ -J $\delta$  (picos de color azul), reordenamientos D $\delta$ 2-J $\delta$  (picos de color azul y de color verde, que no migraban de manera totalmente simultánea debido a diferencias en la velocidad de migración de los dos fluocromosomas), reordenamiento V $\delta$ 2 -D $\delta$ 3 (picos de color negro) y reordenamiento D $\delta$ 2-D $\delta$ 3 (picos de color verde y color negro que migran a la vez).

## Materiales y métodos

Selección de dianas de la PCR: objetivo de complementariedad

Se decidió apuntar a la disponibilidad de al menos una diana de clonalidad detectable por medio de PCR en cada tumor maligno linfóide. En los tumores malignos de células B maduras este objetivo podría verse obstaculizado por la aparición de hipermutaciones somáticas en los genes de Ig, que se encuentran particularmente en tumores malignos de células B foliculares y post-foliculares. Por lo tanto, se decidió incluir dianas de PCR que tuvieran algún grado de complementariedad.

Se utilizaron varios fundamentos para la selección de la diana:

-genes *IGH*: se incluyeron no solo reordenamientos V<sub>H</sub>-J<sub>H</sub> completos sino también reordenamientos D<sub>H</sub>-J<sub>H</sub> incompletos como dianas de la PCR, debido a que los reordenamientos D<sub>H</sub>-J<sub>H</sub> probablemente no resultan afectados por las hipermutaciones somáticas;

-genes *IGK* e *IGL*: se incluyeron ambos genes de las cadenas ligeras de Ig como dianas de la PCR, debido a que esto aumenta la posibilidad de encontrar un reordenamiento del gen Ig detectable mediante PCR en cada tumor maligno de células B maduras;

-genes *IGK*: se incluyeron no solo reordenamientos V<sub>k</sub>-J<sub>k</sub>, sino también reordenamientos del elemento de supresión kappa (Kde), ya que se producen en uno o ambos alelos en (virtualmente) todos los tumores malignos de células B Ig $\lambda$ <sup>+</sup> y en un tercio de los tumores malignos de células B Ig $\kappa$ <sup>+</sup> y debido a que los reordenamientos de Kde probablemente no resultan afectados por la hipermutación somática;

-genes *TCRB*: reordenamientos tanto V $\beta$ -J $\beta$  completos como D $\beta$ -J $\beta$  incompletos, debido a que se producen reordenamiento del gen *TRCB* completos e incompletos en todos los tumores malignos de células T TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> maduras y también en muchos tumores malignos de células T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>;

-genes *TCRG*: esta diana de clonalidad por PCR clásica es útil en todos los tumores malignos de células T de linaje TCR $\gamma\delta$  y TCR $\alpha\beta$ .

-genes *TCRD*: esta es una diana potencialmente útil en tumores malignos de células T inmaduras, así como en tumores malignos de células T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>;

-gen *TCRA*: este gen no se incluyó como diana de la PCR, debido a su alto grado de complejidad con ~ 50 segmentos génicos V y 61 J. Además, todos los tumores malignos de células T con reordenamientos del gen *TCRA* contienen reordenamientos del gen *TCRB* y generalmente también tienen reordenamientos del gen *TCRG*;

-segmentos génicos funcionales: la mayor parte de las linfoproliferaciones sospechosas tienen que ver con linfocitos maduros, que por lo tanto tienen reordenamientos del gen de Ig o TCR funcionales. Por lo tanto el diseño de cebadores de la PCR procuran la inclusión de (virtualmente) todos los segmentos del gen de Ig/TCR funcionales.

-aberraciones cromosómicas bien definidas: se incluyeron t (11; 14) con *BCL1-IGH* y t (14; 18) con *BCL2-IGH* como dianas adicionales, debido a que estas dos aberraciones son detectables por PCR a frecuencias relativamente altas en linfomas es decir, en 30% de linfoma de células del manto (LCM) y en 60 a 70% de linfomas de células foliculares (LCF), respectivamente.

Diseño de cebadores para PCR múltiple

La detección precisa de todos los segmentos de los genes V, D, J y de los genes de Ig y TCR reordenados requeriría muchos cebadores diferentes (Tabla 2). Para algunos complejos génicos que esto podría ser posible (p. ej., *TCRG* y *TCRD*), pero para otros loci en la práctica esto no es posible debido al alto número de diferentes segmentos de genes. Para resolver este problema, se pueden diseñar cebadores de la familia, que reconocen la mayoría o todos los segmentos génicos de una familia en particular (Tabla 2). Alternativamente, se pueden elaborar cebadores de consenso, que reconocen secuencias conservadas que se producen en muchos o todos los segmentos génicos implicados.

El diseño de cebadores de familia y de cebadores consenso se equilibra entre un número limitado de cebadores y una homología máxima con todos los segmentos génicos de interés. En este estudio, los autores de la presente invención desean una homología máxima con todos los segmentos génicos de interés (concretamente segmentos

génicos funcionales) con el fin de evitar la renaturalización subóptima del cebador, que podría causar resultados falsos negativos. Por otra parte, los autores de la presente invención desean el diseño de cebadores de familia específicos sin renaturalización cruzada con otras familias

5 Con el fin de limitar el número de tubos de PCR por locus, adquirió importancia la multiplexación de cebadores de PCR por razones prácticas. En consecuencia, se elaboraron pautas especiales para asegurar las máximas posibilidades de diseño de cebadores útiles en tubos de PCR múltiplex. Para este fin el Dr. W. Rychlick (Molecular Biology Insights, Cascade, CO, USA) presentó su programa de soporte lógico OLIGO 6.2 especialmente adaptado y apoyó el desarrollo de las pautas para el diseño de cebadores óptimos.

Las pautas generales para el diseño de cebadores fueron las siguientes:

- 10 -la posición de los cebadores se debe elegir de tal manera que el tamaño de los productos de PCR sea preferiblemente <300 pb (preferiblemente de 100 a 300 pb) con el fin de poder utilizar el material incluido en parafina;
- 15 -se debe tener en cuenta una distancia mínima a la región de unión de preferiblemente >10-15 pb (con el fin de evitar la falsa negatividad debido a la imposibilidad de que el extremo 3' del cebador hibride con la diana reordenada debido a la delección de nucleótidos de la secuencia de la línea germinal);
- los cebadores preferiblemente no deben ser demasiado largos (por ejemplo, <25 nucleótidos).

Los siguientes parámetros se utilizaron para el diseño de cebadores con el programa OLIGO 6.2:

- la búsqueda de cebadores se debe realizar con un rigor *moderado*;
- 20 -el valor de eficacia del cebador (PE) debe ser preferiblemente ~400 (y>630, si el cebador se va a utilizar también como cebador consenso para otros segmentos génicos);
- el dímero 3' más estable de cebadores superior/superior, inferior/inferior o superior/inferior no debe exceder de -4 Kcal (estrategia de búsqueda moderada); siendo el dímero más estable en general menos importante;
- 25 -a la vista de la PCR múltiplex, se tomaron en consideración las siguientes pautas: tendría que haberse diseñado un cebador común en la región de más consenso (es decir, alta PE en la búsqueda de consenso), a la vez que se tendrían que haber diseñado cebadores individuales (familia o miembro) en el región de menos consenso (es decir, bajo valor de PE de ese cebador para los segmentos génicos que no deben ser cubiertos) para evitar la renaturalización cruzada con otros segmentos génicos y de ese modo productos de PCR múltiples (no deseados).

Protocolo de PCR

30 Se desarrolló un protocolo de PCR normalizado basado en la experiencia preexistente de anteriores estudios colaborativos europeos. Después de un ensayo y una aprobación inicial, el protocolo fue aceptado como se resume en la Tabla 3.

Técnicas para el análisis de los productos de la PCR obtenidos a partir de reordenamientos del gen de Ig/TCR

35 Los productos de PCR obtenidos de los reordenamientos del gen de Ig y TCR tienen que ser analizados para la discriminación entre las células linfoides monoclonales con regiones de unión idénticas y células linfoides policlonales con muy diversas regiones de unión.

40 Basándose en la experiencia combinada de los laboratorios participantes, se seleccionaron dos técnicas: análisis heterodúplex (HD) y análisis Gene Scanning (GS). El análisis HD utiliza productos de la PCR de doble hebra y se aprovecha de la longitud y la composición de las regiones de unión, mientras que en GS se separan los productos de PCR de hebra sencilla en un gel o polímero de alta resolución solamente de acuerdo con su longitud de (Figura 2).

Análisis de heterodúplex de productos de PCR

45 Los productos de PCR obtenidos con cebadores *no marcados* se desnaturalizan a alta temperatura (~ 95°C durante 5 min), seguido por una rápida renaturalización al azar a baja temperatura (preferiblemente a 4°C durante 1 hora). Esta formación de dúplex forzada da como resultado muchos heterodúplex diferentes con diferente velocidad de migración en el caso de las linfoproliferaciones policlonales, pero da como resultado homodúplex con una rápida migración idéntica en el caso de las linfoproliferaciones monoclonales. La electroforesis de los homodúplex en un gel de poliacrilamida 6% da como resultado una única banda de tamaño predecible, mientras que los heterodúplex forman una mancha en una posición más alta (Figura 2). La técnica de heterodúplex es rápida, sencilla y económica (véase la Tabla 4 para los detalles técnicos) y tiene un límite de detección de ~ 5%.<sup>40,41</sup> El límite de detección se ve influenciado por la frecuencia de linfocitos policlonales, debido a que la formación de muchos heterodúplex también consumirá una parte de los productos monoclonales de la PCR.<sup>41</sup>

50

## Análisis GeneScanning de los productos de PCR

Los cebadores de PCR para el análisis GeneScanning deben ser marcados con un fluorocromo para permitir la detección de los productos de PCR con un equipo de secuenciación automatizado (Figura 2).

5 Los productos de la PCR de hebra sencilla marcados con fluorocromo (desnaturalizados) se separan por tamaños en un gel de secuenciación de poliacrilamida desnaturalizante o un polímero de secuenciación capilar y se detectan por medio de un barrido automático con un láser (véase la Tabla 5 para los detalles técnicos). Esto da como resultado una distribución gaussiana de múltiples picos, que representan muchos productos de PCR diferentes en el caso de las linfoproliferaciones policlonales, pero proporciona un solo pico que consiste en un tipo de producto de PCR en el caso de una linfoproliferación totalmente monoclonal (Figura 2).

10 GeneScanning es rápido y relativamente sencillo, pero necesita un equipo costoso. GeneScanning es generalmente más sensible que el análisis de heterodúplex y puede alcanzar sensibilidades de 0,5 a 1% de las células linfoides clonales.

## Genes de control y tejidos incluidos en parafina

15 En varios países europeos, el material de tejido fresco no está fácilmente disponible para diagnósticos moleculares, tales como los estudios de clonalidad basados en PCR. Por lo tanto uno de los propósitos del presente estudio fue desarrollar una estrategia para estudios de clonalidad basados en PCR en tejidos incluidos en parafina.

20 Para controlar la calidad y la amplificabilidad del ADN procedente de material incluido en parafina, se desarrolló una PCR de genes de control múltiplex especial, que dio como resultado una escala de cinco fragmentos (100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, y 600 pb). De 45 de los 90 casos descritos anteriormente estuvo disponible para la extracción de ADN suficiente tejido incluido en parafina. Estas muestras de ADN se sometieron a ensayo en paralelo con las muestras de ADN recién obtenidas, utilizando el tubo múltiplex del gen de control, así como tubos múltiplex de Ig/TCR /BCL1/BCL2 para los diagnósticos de clonalidad (véase el Ejemplo 10).

Ejemplo 1. Reordenamientos del gen *IGH* completo: V<sub>H</sub>-J<sub>H</sub>

## Antecedentes

25 El reordenamiento funcional del *gen IGH*, primero D<sub>H</sub> a J<sub>H</sub> y posteriormente V a D<sub>H</sub>-J<sub>H</sub>, está seguido de la expresión del anticuerpo, el sello distintivo de las células B maduras. El gen *IGH* se localiza en el cromosoma 14q32.3 en una zona que abarca aproximadamente 1.250 kilobases. Se han identificado 46 a 52 segmentos V<sub>H</sub> funcionales (dependiendo del haplotipo individual), que se pueden agrupar en función de su homología en seis o siete subgrupos V<sub>H</sub>. Además se han descrito aproximadamente 30 segmentos V<sub>H</sub> no funcionales. Además, se han encontrado  
30 consistentemente 27 segmentos D<sub>H</sub> y seis segmentos J<sub>H</sub> funcionales (Tabla 2 y Figura 3A).<sup>56</sup>

Los segmentos V<sub>H</sub> contienen tres regiones marco (FR) y dos determinantes de la complementariedad (CDR) (Figura 3B). Las FR se caracterizan por su similitud entre los distintos segmentos V<sub>H</sub> mientras que las CDR son muy diferentes incluso dentro de la misma familia de V<sub>H</sub>. Además, las CDR representan las secuencias diana preferidas para las hipermutaciones somáticas en el curso de la reacción del centro germinal, que aumentan la variabilidad dentro de esas regiones. Aunque las FR por lo general resultan menos afectadas por las mutaciones somáticas,  
35 también se pueden producir sustituciones de nucleótidos dentro de estas regiones, especialmente en las células B en virtud de un proceso mutacional intenso.

Las regiones V<sub>D</sub>-J<sub>H</sub> altamente variables se pueden amplificar mediante PCR para detectar poblaciones de células B clonales indicativas de la presencia de un trastorno de células B maligno. Las células B clonales se pueden discriminar de células B policlonales (es decir, tejidos linfoides normales o reactivos) basándose en el tamaño y composición idénticos de los productos de PCR clonales en comparación con los muchos productos de PCR policlonales diferentes con un intervalo de tamaño de aproximadamente 60 pb, dispuestos en una distribución gaussiana. Ya se han establecido estrategias basadas en PCR para la detección de poblaciones de células B clonales en secciones histológicas y suspensiones celulares a principios de los noventa. Sin embargo, los protocolos de PCR iniciales usaron cebadores consenso de V<sub>H</sub> individuales que eran capaces de unirse a una de las tres regiones marco, principalmente FR3. Tales cebadores consenso no eran adecuados para amplificar todos los segmentos V<sub>H</sub> con la misma eficacia conduciendo a la no detectabilidad de un número significativo de reordenamientos clonales. Además, las mutaciones somáticas introducidas en el curso de la reacción del centro germinal no se limitan a las CDR, sino que también se pueden producir en las FR, impidiendo de este modo la renaturalización del cebador y conduciendo por consiguiente a la ausencia de productos de PCR clonales a pesar de la presencia de una población de células B neoplásicas. Esto es especialmente cierto para los linfomas foliculares, los linfomas de células B grandes difusos, y los mielomas múltiples que por lo general contienen un alto número de mutaciones somáticas.

55 Para aumentar adicionalmente la tasa de detección de la PCR de *IGH*, se han realizado varios intentos para diseñar cebadores específicos de familia para superar las limitaciones de los cebadores consenso. Sin embargo, estos cebadores específicos de la familia se basan en gran parte en las secuencias de los cebadores consenso previos.

Aunque estas estrategias de PCR han ayudado a mejorar la tasa de detección, todavía hay una necesidad de sistemas de cebadores que sean menos sensibles a hipermutaciones somáticas, permitiendo de este modo la amplificación de (virtualmente) todos los posibles reordenamientos VD-JH.

#### Diseño de cebadores

5 Se diseñaron tres conjuntos de cebadores de VH con la ayuda del programa Oligo-6.2 que corresponde a las tres regiones marco de VH (FR1, FR2 y FR3) (Figura 3B). Cada conjunto de cebadores consistía en seis o siete oligonucleótidos susceptibles de renaturalización con sus segmentos VH correspondientes (VH<sub>1</sub> a VH<sub>7</sub>) sin emparejamientos erróneos para la mayoría de los segmentos VH y uno o como máximo dos emparejamientos erróneos en algunos segmentos VH raros. El diseño fue tal que los emparejamientos erróneos estarían situados en el mismo extremo 5' del cebador. Estos conjuntos de cebadores de VH se utilizaron junto con un único cebador consenso de JH, diseñado para la renaturalización con el extremo 3' más homólogo de los seis segmentos JH, aproximadamente 35 pb aguas abajo de la RSS de JH. Esto asegura que todos los segmentos JH son detectables con la misma eficacia de unión y que la unión del cebador no resultará fácilmente afectada por extensa delección de nucleótidos en el curso del proceso de reordenamiento. Además, no hubo renaturalización cruzada entre los cebadores de VH y el cebador JH como se evalúa mediante el programa Oligo-6.2.

También se diseñó el cebador JH que se iba a utilizar para la amplificación de las otras dianas de PCR, tales como los reordenamientos DH-JH incompletos, así como t (11; 14) (*BCL1-IGH*) y t (14; 18) (*BCL2-IGH*). Esto permite la detección de diferentes productos de PCR mediante análisis GS empleando el mismo cebador JH marcado.

#### Resultados de la fase de ensayo inicial

20 Se realizó el ensayo inicial de la PCR de V<sub>H</sub>-J<sub>H</sub> recién diseñada mediante la aplicación por separado de cada cebador VH junto con el cebador JH en una PCR individual. Para este propósito, se utilizó ADN extraído de líneas de células B así como muestras de pacientes clonales bien definidas. Además, los reordenamientos clonales se sometieron a ensayo para determinar la sensibilidad mediante dilución seriada en ADN extraído de las amígdalas reactivas. Las muestras de control clonales no estaban disponibles para cada posible reordenamiento de *IGH*, pero todos los segmentos VH principales y varios segmentos VH reordenados raramente han sido incluidos en la fase de ensayo inicial.

30 Todos los pares de cebadores funcionaron con alta eficacia y sensibilidad. Los reordenamientos de VH clonales esperados fueron detectables y la sensibilidad fue de al menos 1% (10<sup>-2</sup>). No hubo fondo dentro del rango de tamaño esperado y la amplificación de ADN de amígdala dio la curva con distribución gaussiana esperada. (Figura 3C, D, y E).

35 Sobre la base de estos resultados, los autores de la presente invención iniciaron la siguiente fase del ensayo de cebadores inicial mediante la combinación de los cebadores de VH en tres conjuntos, cada uno específico para una de las tres regiones marco, que se utilizaron junto con el cebador JH común (Figura 3B). Los resultados fueron los mismos que los obtenidos con los pares de cebadores individuales, pero con una sensibilidad ligeramente inferior. Además, los productos no específicos no se amplificaron dentro del intervalo de tamaño esperado, con la excepción de un producto de PCR de 340 pb que apareció en la PCR múltiplex de FR1. Este producto de PCR se generó con independencia de la fuente del ADN (linfoide y no linfoide) utilizada para la PCR, mientras que no se obtuvo producto de PCR cuando no se aplicó ningún molde de ADN. Además, este amplicón solo fue detectable en el análisis de heterodúplex, no en GeneScanning. Esto indica que el cebador JH marcado fluorescente no estaba implicado en la generación de este producto de PCR. El análisis de la secuencia de este producto de PCR reveló un fragmento VH4 amplificado por el cebador FR1 VH4 junto con el cebador FR1 VH2 que aparentemente actuaba como un cebador aguas abajo mediante la unión a la secuencia VH4 intrónica. Este problema se pudo resolver mediante el diseño de un nuevo cebador FR1 VH2 que estaba localizado 25 pb aguas arriba del sitio de unión del cebador anterior.

#### Resultados de la fase de ensayo general

45 Se aplicó la PCR de *IGH* aprobada a las 90 muestras de ADN definidas mediante transferencia Southern, que se habían obtenido de casos bien caracterizados. Seis de los 11 laboratorios que participan en la fase de ensayo general llevaron a cabo el análisis GS de los productos de la PCR y cinco llevaron a cabo el análisis HD. Además se incluyeron como controles varias muestras policlonales así como monoclonales (ADN de la línea celular). Cuarenta y cinco de estos casos presentaron productos de PCR dominantes después del análisis GS y 40 casos después de la detección HD, indicando la presencia de una población monoclonal de células B. Los reordenamientos clonales fueron detectables con los tres conjuntos de cebadores de FR en 33 de los 45 casos clonales (GS) y en los 12 restantes con uno o dos de los tres conjuntos de cebadores de FR. Se concluyó que los resultados más negativos estaban causados por hipermutaciones somáticas en el sitio de unión al cebador, evitando la renaturalización del cebador y por lo tanto la amplificación.

55 La comparación de los resultados de la PCR de VH-JH con los resultados de la transferencia Southern reveló un alto grado de concordancia. Ochenta u cinco por ciento (46 de 55) y 76% (42 de 55) de las muestras con los genes VH reordenados por análisis de transferencia Southern mostraron un producto de amplificación dominante mediante análisis GS y análisis HD, respectivamente. Por el contrario, todas menos dos muestras que albergaban genes de

VH de la línea germinal mediante transferencia Southern presentaron un patrón policlonal mediante análisis GS y HD.

#### Conclusión

- 5 En conclusión, las tres PCR múltiplex para la detección de reordenamientos clonales de VH-JH proporcionan un análisis nuevo y fiable para identificar proliferaciones de células B clonales. El uso combinado de cebadores normalizados en las tres FR diferentes ayuda a disminuir la tasa de resultados falsos negativos debidos a la hipermutación somática en los sitios de unión al cebador de los segmentos del gen VH implicados.

#### Ejemplo 2. Reordenamientos del gen IGH incompletos: DH-JH

##### Antecedentes

- 10 La formación de reordenamientos V-D-J completos en el locus de *IGH* en el cromosoma 14q32.3 es un proceso secuencial que se da en dos etapas: el acoplamiento de VH va precedido generalmente por un reordenamiento inicial entre los segmentos génicos DH y JH en las células B precursoras tempranas (revisado por <sup>57</sup>). Además de los muchos segmentos génicos VH distintos y de los seis segmentos génicos JH funcionales (véase el Ejemplo 1), el locus de *IGH* humano contiene también 27 segmentos génicos DH.<sup>58</sup> Basándose en la homología de secuencias, los  
15 27 segmentos DH se pueden agrupar en siete familias: DH1 (anteriormente conocida como DM), DH2 (DLR), DH3 (DXP), DH4 (DA), DH5 (DK), DH6 (DN), y DH7 (DQ52); todas las familias comprenden al menos cuatro miembros, excepto la séptima, que consiste en el segmento único DH7-27 inmediatamente aguas arriba de la región JH (Figura 3A).<sup>58,59</sup>

- 20 La recombinación entre cualquiera de los segmentos DH y JH dará como resultado la formación de uniones DH-JH incompletas, que se pueden detectar fácilmente en las células B precursoras CD10<sup>+</sup>/CD19<sup>-</sup> derivadas de médula ósea<sup>60,61</sup> y por lo tanto también en un subconjunto (20-25%) de leucemias linfoblásticas agudas de células B precursoras, que muestran un genotipo inmaduro.<sup>62</sup> La secuenciación reveló el predominio de los segmentos génicos DH2 (DH2-2), DH3 (DH3-9), y DH7-27 en LLA de células B precursoras, que comprendían 36%, 33%, y 19% de todos los segmentos identificados, respectivamente.<sup>62</sup>

- 25 Sin embargo, también se han informado sobre reordenamientos DH-JH incompletos en los tumores malignos de células B maduras.<sup>61,63</sup> Por otra parte, incluso en un subgrupo de mielomas múltiples negativos para IgH-, que se pueden considerar como el tipo más maduro de tumor maligno del linaje B, se observaron uniones DH-JH.<sup>64</sup> Estos reordenamientos DH-JH se obtuvieron del segundo alelo no codificante e implicaron segmentos de las familias DH1 a DH4.<sup>64</sup> Basándose en la descripción de las uniones DH-JH en LLA de células B precursoras y en mielomas  
30 múltiples, se supone que los reordenamientos DH-JH incompletos también están presentes en otros tipos de leucemias y linfomas de células B. En los tumores malignos de células T inmaduras se han identificado acoplamientos DH-JH en forma de reordenamientos de linajes cruzados;<sup>34</sup> de manera interesante, estos se produjeron casi exclusivamente en el subconjunto de LLA-T no TCRαβ+ más inmaduras e implicó principalmente los segmentos DH6-19 y DH7-27 más aguas abajo. El último segmento se usa frecuentemente (hasta 40%) en las  
35 células B fetales, pero poco frecuentemente en las células B adultas.<sup>65,66</sup> Las células B precursoras y maduras de adultos humanos parecen usar principalmente los segmentos de las familias DH2 y DH3, tal como se demuestra a partir de las secuencias de los reordenamientos VH-DH-JH completos.<sup>66</sup>

- Aunque se desconocen en gran medida las frecuencias exactas de los acoplamientos DH-JH incompletos en los diferentes tipos de tumores malignos de células B maduras, es evidente que serán al menos menores que las de las uniones VH-JH. Sin embargo, los reordenamientos DH-JH podrían representar todavía una diana complementaria importante para la evaluación de la clonalidad basado en PCR. Esta supuesta contribución de los reordenamientos DH-JH como dianas de PCR se basa en la suposición de que los reordenamientos incompletos en el locus de *IGH* no contendrán hipermutaciones somáticas, debido a que no se produce la transcripción que comienza a partir de los promotores de los segmentos génicos V, lo cual se considera un prerrequisito esencial para que la hipermutación somática tenga lugar.<sup>67,68</sup> En especial en aquellos tipos de proliferaciones del linaje B en los que las hipermutaciones somáticas son frecuentes, el análisis mediante PCR de un posible producto de recombinación DH-JH, por lo tanto, podría ser relevante, y a veces incluso la única posibilidad de detectar el clon de células B.

##### Diseño de cebadores

- Basándose en el elevado grado de homología dentro de cada familia DH, se diseñaron siete cebadores de DH  
50 específicos de familia (Figura 4) en combinación con el cebador JH consenso que se usa también para la detección de reordenamientos VH-JH (véase el Ejemplo 1) y t(11;14) (*BCL1-IGH*) y t(14;18) (*BCL2-IGH*) (Ejemplos 8 y 9). Los cebadores se diseñaron de manera que la renaturalización cruzada con otros segmentos de la familia DH fuera mínima o preferiblemente inexistente, lo que da como resultado posiciones distintas para los diversos cebadores de familia respecto de los elementos RSS (Figura 4). Los tamaños de los productos de PCR esperados de las uniones  
55 DH-JH oscilan de 110-130 pb (para las uniones DH7-JH) a 395-415 pb (para los reordenamientos DH3-JH). Es de destacar que debido a la posición del segmento DH7-27 cercano a los segmentos de la región JH, los productos de PCR de 211 pb (y también 419, 1031, 1404, 1804, y 2420 pb en caso de que el cebador se renaturalice con los segmentos génicos JH aguas abajo) se amplificarán a partir de alelos no reordenados, y se detectarán en forma de

una escala de bandas de la línea germinal prácticamente en todas las muestras.

#### Resultados de la fase de ensayo inicial

Para el ensayo inicial de los cebadores de DH individuales, se usaron muestras de LLA de células B precursoras o LLA-T con carga tumoral elevada con reordenamientos DH-JH clonales bien definidos. Bajo condiciones de PCR convencionales mediante el uso de MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM y tampón AmpliTaq Gold, las siete combinaciones de cebadores parecieron detectar las dianas DH-JH clonales con longitudes del productos dentro de los intervalos de tamaño esperados. La renaturalización cruzada de los cebadores de DH con los segmentos génicos reordenados de otras familias DH fue muy débil o no se observó en absoluto. Además, también en ADN de amígdala o de MNC de control sanos se observaron productos de PCR de los intervalos de tamaño correctos. No se observó renaturalización inespecífica de los cebadores prácticamente para todos los conjuntos de cebadores, mediante el uso de ADN de control que no era específico del molde; solamente en el caso del conjunto de cebadores de DH2/JH se observó (a veces débilmente) un producto de 340-350 pb en el ADN de HeLa. La secuenciación posterior reveló que este producto inespecífico era debido a un cebado falso del cebador DH2 a una secuencia de ADN aguas arriba del segmento JH4. Sin embargo, ya que el tamaño de este producto inespecífico era tan diferente de los tamaños de cualquiera de los productos de PCR de DH-JH auténticos, se decidió no diseñar un nuevo cebador DH2. De hecho, la banda inespecífica de 350 pb se puede emplear como un marcador interno de la amplificación eficaz del ADN y por lo tanto de la calidad del ADN molde, que es difícilmente o solo débilmente visible cuando hay disponible suficiente molde de DH-JH clonal o policlonal (p. ej. en ADN de amígdala o ADN de muestras leucémicas particulares), pero que es especialmente intensa en muestras que contienen un número bajo de células linfoides con reordenamientos DH-JH.

Las diluciones seriadas de ADN de las muestras de referencia clonales en ADN de amígdala dieron como resultado en general sensibilidades del 5% o menores (0,5-1% en el caso del reordenamiento DH6-JH) mediante el uso del análisis HD; las sensibilidades en el análisis GS fueron en general 1-2 etapas de dilución mejores, es decir 1% o menos. La diana DH7-JH clonal se pudo detectar solamente con una sensibilidad del ~10%, lo cual está muy probablemente provocado por el consumo de cebadores en amplicones de PCR que implican los segmentos génicos DH7 y JH de la línea germinal sin reordenar.

Aunque la estrategia múltiple inicial, como indicó el diseño de cebadores asistido por OLIGO 6.2, fue dividir los diversos cebadores de DH en dos tubos, después de someter a ensayo diversas aproximaciones múltiple se decidió combinar todos los cebadores en un tubo múltiple (tubo D del ensayo de clonalidad de *IGH*), excepto para el cebador DH7, que se incluyó en un tubo separado (tubo E del análisis de clonalidad de *IGH*). La razón para excluir el cebador DH7 fue el patrón complejo de la línea germinal, debido a la amplificación sencilla de alelos con segmentos DH7 sin reordenar. Mediante el uso de esta aproximación múltiple de dos tubos, todavía fueron detectables todas las muestras de referencia clonales. En las condiciones múltiple, los límites de detección para estas diversas dianas clonales fueron lógicamente menos óptimos en comparación con los análisis simples, que oscilaban de ~5% (DH3, DH4, y DH6) a ~10% (DH2, y DH5). Para la muestra la referencia clonal DH1 que estaba disponible, se observó una sensibilidad de ~20%; en una etapa posterior, se descubrió que el reordenamiento DH1-JH de la línea celular KCA era detectable hasta 10% en el análisis múltiple. Debido a que el tubo E contiene solamente el cebador DH7, la sensibilidad de 10% para este tubo fue la misma que se mencionó anteriormente. El mismo análisis múltiple, llevado a cabo con 500 ng en vez de 100 ng de ADN de las diluciones seriadas, dio como resultado sensibilidades ligeramente mejores. El uso de diluciones seriadas en ADN de MNC en vez de ADN de amígdala no afectó claramente a los límites de detección de los análisis de las recombinaciones DH-JH.

#### Resultados de la fase de ensayo general

Tras el análisis inicial en los tres laboratorios implicados en el diseño de cebadores, el análisis de PCR múltiple de DH-JH de *IGH* desarrollado se evaluó adicionalmente mediante el uso de las 90 muestras definidas mediante transferencia Southern. Cada muestra se analizó en paralelo en cuatro laboratorios mediante análisis HD y en cinco laboratorios mediante análisis GS; en otros dos laboratorios se analizaron todas las muestras mediante ambas técnicas. En conjunto, se obtuvieron en total resultados de seis análisis HD y siete análisis GS por muestra por tubo. A pesar de los resultados concordantes (>80% de laboratorios con resultados idénticos) en la gran mayoría de las muestras, nueve mostraron discordancias entre los laboratorios en el tubo D. El análisis posterior reveló que éstos se podían explicar por la presencia de un pequeño clon con productos clonales débiles, o a productos de gran tamaño (~390 y mayores). En unos cuantos casos, los productos fueron tan grandes, que solamente tras la secuenciación se pudo aclarar que estaban relacionados con reordenamientos DH-JH auténticos pero prolongados, desde los segmentos génicos DH aguas arriba (p. ej., DH6-25-DH1-26-JH en NL-12) o desde JH aguas abajo (p. ej. DH6-25-JH4-JH5 en PT-14). En los tres casos (NL-17, micosis fungoide; FR-1, LLC-B; FR-5, LCF) en los que se hallaron productos clonales mediante el uso del tubo E, los resultados fueron completamente concordantes entre los laboratorios.

Cuando se estudiaron los resultados de los análisis HD y GS, pareció que éstos eran comparables, aunque en general el número de laboratorios que mostraron resultados idénticos fue ligeramente superior tras el análisis HD en comparación con el análisis GS (Figuras 4B y C).

La comparación directa de los resultados de PCR múltiple de DH-JH con los datos de SB es prácticamente imposible, ya que la hibridación con una única sonda (IGHJ6) en la región JH no permite la distinción entre los reordenamientos VH-JH y DH-JH. En tres muestras fue evidente que la detección de los productos clonales de los análisis VH-JH y DH-JH combinados no se ajustó a la configuración del locus de *IGH* en el análisis SB. De manera notable, no se observaron productos de PCR de DH-JH clonales en los tumores malignos de células B pre-foliculares. En contraste, las muestras 11/16 de LLC-B y 12/25 de tumor maligno de células B (post-)foliculares contuvieron productos de PCR de DH-JH reordenados clonalmente. En tres de los dieciocho casos de tumor maligno de células T se observaron reordenamientos DH-JH clonales; éstos estuvieron asociados a los casos de T-LBL (ES-9) y micosis fungoide (NL-17) con reordenamientos de *IGH* detectados mediante SB, y a un caso de LNH-T/LTAE (PT-4) sin reordenamientos de *IGH* detectados mediante SB, probablemente debido a la baja carga tumoral de <15%. Los 15 casos reactivos mostraron solamente productos de PCR de DH-JH policlonales, de acuerdo con los resultados de SB. En la categoría D con diagnósticos difíciles, tres muestras (PT-12, GBS-10, y GBN-8) mostraron productos de PCR de DH-JH de *IGH* clonales, lo cual estuvo de acuerdo con los datos de SB así como con los datos de PCR de *IGK* en dos de tres casos; en otras dos muestras (PT-6 y GBS-9), ambos casos de LNH-B ricos en células T, se hallaron productos de DH-JH clonales además de productos de *IGK* y/o *IGL* clonales, pero sin signos de clonalidad a partir del análisis SB, lo que se podría explicar mejor por el pequeño tamaño del clon de células B en estas muestras.

Para determinar el valor adicional del análisis de PCR de DH-JH, los resultados se compararon con los del análisis de PCR de VH-JH. En cinco tumores malignos de células B (NL-4, PT-14, GBN-2, FR-7, NL-12) se hallaron productos de PCR de DH-JH clonales, mientras se observaron solamente productos de PCR de VH-JH policlonales.

#### Conclusión

En conclusión, basándose en las fases de ensayo inicial y general, el análisis mediante PCR de DH-JH parece tener valor añadido para la evaluación de la clonalidad. Aunque los resultados del análisis HD se podrían interpretar de manera ligeramente más sencilla, no existe una preferencia clara por el análisis HD o GS ya que ambos son adecuados para analizar los productos de PCR amplificados. Una dificultad potencial en el análisis de PCR de DH-JH es el intervalo de tamaños relativamente grande de los productos de PCR esperados, debido a las posiciones dispersas de los cebadores y a las amplificaciones prolongadas desde los segmentos génicos DH aguas arriba o JH aguas abajo, lo que implica que se recomiendan tiempos de funcionamiento largos para los análisis GS. Finalmente, la posición notable del segmento génico DH7-27 en el locus de *IGH* provoca una escala de productos de amplificación de la línea germinal en el tubo E, siendo fácilmente reconocibles los productos clonales en forma de bandas/picos mucho menores.

#### Ejemplo 3: Reordenamientos del gen *IGK*: Vk-Jk, Vk-Kde/Intrón-RSS-Kde

##### Antecedentes

El locus de la cadena ligera de *IGK* humana (en el cromosoma 2p11.2) contiene muchos segmentos génicos Vk diferentes, agrupados en siete familias génicas Vk, así como cinco segmentos génicos Jk aguas arriba de la región Ck. En un principio, los segmentos génicos Vk se designaron de acuerdo con la nomenclatura descrita por Zachau et al.<sup>69</sup> Una nomenclatura alternativa agrupa los segmentos génicos Vk en siete familias, y se usa en la base de datos ImMunoGeneTics.<sup>46</sup> En el presente documento los autores de la presente invención siguen la última nomenclatura. Las familias Vk1, Vk2, y Vk3 son familias de múltiples miembros que incluyen segmentos génicos tanto funcionales como pseudofuncionales, mientras las otras familias solamente contienen un único segmento (Vk4, Vk5, Vk7) o unos cuantos segmentos (Vk6).<sup>70</sup> De manera notable, todos los segmentos génicos Vk están dispersos a lo largo de dos grandes agrupaciones duplicadas, una inmediatamente aguas arriba y en la misma orientación que los segmentos Jk, y la otra más distal y en una orientación invertida (Figura 5A).<sup>71</sup> Lo último implica que se requieren los denominados reordenamientos por inversión para formar uniones Vk-Jk que implican genes Vk de la agrupación distal. Además de los segmentos Vk y Jk, existen otros elementos en el locus de *IGK* que pueden estar implicados en la recombinación. El elemento de delección kappa (Kde), aproximadamente 24 kb aguas abajo de la región Jk-Ck, se puede reordenar hasta los segmentos génicos Vk (Vk-Kde), pero también hasta una RSS aislada en el intrón de Jk-Ck (intrón-RSS-Kde).<sup>24,72</sup> Ambos tipos de reordenamientos conducen a la inactivación funcional del alelo de *IGK*, por medio de la delección o bien del exón de Ck (reordenamiento intrón-RSS-Kde) o bien del área completa Jk-Ck (reordenamiento Vk-Kde).

Debido a que la recombinación de *IGK* humano comienza en las células B precursoras en la médula ósea, los reordenamientos de *IGK* también se pueden detectar en las leucemias agudas de células B precursoras (30-45% de los alelos, dependiendo de la edad). Aunque las uniones Vk-Jk están presentes, estos reordenamientos de *IGK* afectan principalmente a recombinaciones que implican Kde (25-35% de los alelos). En la infancia, la recombinación Vk-Kde de LLA de células B precursoras predomina sobre intrón-Kde, mientras en LLA de adultos las delecciones afectan exclusivamente a los acoplamientos Vk-Kde.<sup>24,73,74</sup> En las leucemias de células B crónicas los reordenamientos de *IGK* son aún más frecuentes, siendo detectables en 75% (casos Igκ+) o incluso en 95% (casos Igλ+) de todos los alelos de *IGK*. Por definición, se hallan reordenamientos Vk-Jk funcionales en al menos un alelo en las leucemias de células B Igκ+; el segundo alelo no codificante está en la configuración de la línea germinal, o inactivado por medio de la recombinación Vk-Kde (8% de los alelos) o intrón-RSS-Kde (8% de los alelos). Los

reordenamientos Kde son frecuentes en las leucemias de células B Igλ+ (~85% de los alelos), con un ligero predominio de las recombinaciones intrón-RSS-Kde sobre los reordenamientos Vκ-Kde. Esto implica que prácticamente todas las leucemias Igλ+ contienen un reordenamiento Kde, mientras todos los acoplamientos Vκ-Jκ potencialmente funcionales son relativamente poco frecuentes.<sup>24,75</sup> Varios estudios han demostrado que el uso del segmento génico Vκ es casi idéntico entre diversas poblaciones de células B normales y malignas, y refleja en gran medida el número de segmentos génicos disponibles dentro de cada familia. Tanto en los reordenamientos Vκ-Jκ como en los reordenamientos Vκ-Kde, predominan los segmentos génicos Vκ de las primeras cuatro familias (Vκ1 a Vκ4). El uso del gen Vκ2 pareció ser mayor en LLA de células B precursoras que en las linfoproliferaciones de células B más maduras o en las células B normales. De manera notable, la agrupación de Vκ invertida distal se usó de manera poco frecuente en los reordenamientos Vκ-Jκ, mientras los segmentos pseudogénicos Vκ nunca estuvieron implicados, tampoco en los casos Igλ+.<sup>76</sup> Se sabe poco sobre el uso del segmento génico Jκ, pero los escasos datos 15 muestran que Jκ1, Jκ2, y Jκ4 son los segmentos génicos Jκ usados más frecuentemente.<sup>75</sup>

Los reordenamientos Vκ-Jκ pueden ser una diana de PCR complementaria importante para aquellos tipos de proliferaciones de células B en los que las hipermutaciones somáticas pueden dificultar la amplificación de la diana VH-JH, pero las recombinaciones que implican Kde probablemente son aún más valiosas. La delección de las secuencias intermedias en el intrón de Jκ-Cκ da como resultado la eliminación del potenciador de *IGK*, lo cual se cree que es esencial para que se produzca el proceso de hipermutación somática. Por lo tanto, se supone que los reordenamientos que implican Kde están exentos de hipermutaciones somáticas, y por lo tanto se deberían amplificar de manera bastante fácil.

#### 20 Diseño de cebadores

Se diseñaron seis cebadores Vκ específicos de familia mediante el uso del programa informático OLIGO 6.2 para que reconociesen los diversos segmentos génicos Vκ de las siete familias Vκ; los segmentos génicos de la familia Vκ6 estuvieron cubiertos por el cebador de la familia Vκ1 (Figura 5B). En el caso de las familias Vκ1, Vκ2, y Vκ3 relativamente grandes, solamente se tomaron en consideración los segmentos génicos Vκ funcionales, ya que los segmentos pseudo-génicos menos homólogos complicaron demasiado el diseño de cebadores óptimos. Los cebadores Vκ específicos de familia se diseñaron para usarlos combinados con un conjunto de dos cebadores Jκ (Jκ1-4, que cubrían los primeros cuatro segmentos Jκ y Jκ5 que cubría el quinto) o un cebador Kde (Figura 5B). Para el análisis de los reordenamientos de Kde, se produjo un cebador directo adicional que reconocía una secuencia aguas arriba de intrón-RSS. Para demostrar la renaturalización cruzada mínima con otros segmentos de la familia Vκ y para que todavía fueran útiles en las reacciones múltiplex, los diversos cebadores no se pudieron diseñar en posiciones similares respecto de los elementos de RSS (Figura 5B). Los tamaños de los productos de PCR esperados de las uniones Vκ-Jκ oscilan de ~115-135 pb (para las uniones Vκ7-Jκ) a ~280-300 pb (reordenamientos Vκ2-Jκ). Para los reordenamientos de Kde, los intervalos de los tamaños de los productos son de ~195-215 pb (Vκ7-Kde) a ~360-380 pb (Vκ2-Kde), mientras los productos de intrón-RSS-Kde son de ~275-295 pb.

#### 35 Resultados de la fase de ensayo inicial

Para el ensayo inicial de los cebadores individuales, se usaron varias líneas celulares y muestras de pacientes con reordenamientos Vκ-Jκ, o Vκ-Kde/intrón-RSS-Kde clonales definidos con precisión. Las muestras de pacientes con uniones Vκ-Jκ estuvieron relacionadas en su mayor parte con leucemias de células B crónicas, que se seleccionaron adicionalmente en base a una carga tumoral elevada para una detección fácil y sensible del reordenamiento implicado. Desafortunadamente, no hubo disponibles muestras de referencia clonales para todas las dianas Vκ-Jκ; en especial, los tipos más infrecuentes de reordenamientos que implicaban Vκ5, Vκ7 y/o Jκ5 no estuvieron representados en las series de muestras de referencia. Para estas dianas y también para las dianas para las cuales había muestras de referencia clonales, se emplearon muestras de ADN de amígdala o de MNC de control sanas, en las que se observaron en efecto los productos de PCR de los tamaños correctos esperados. La única excepción fue la combinación de cebadores Vκ7/Jκ5; muy probablemente, las uniones Vκ7-Jκ5 son tan infrecuentes en las células B normales que estos productos de PCR fueron difícilmente detectables o indetectables en las amígdalas. Se pudieron detectar productos reordenados dentro de los intervalos de tamaños esperados en todas las muestras de referencia clonales, en condiciones de PCR convencionales mediante el uso de MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM y tampón ABI Gold o tampón ABI II. Sin embargo, en unos cuantos casos, se observó una amplificación débil de reordenamientos Vκ-Jκ concretos con otros conjuntos de cebadores de la familia de Vκ/Jκ, debido a una ligera renaturalización cruzada del cebador Vκ3 con unos cuantos segmentos génicos Vκ1. Además, en algunas de las muestras de referencia clonales se observaron productos de PCR clonales adicionales evidentes con otros conjuntos de cebadores Vκ/Jκ o incluso Vκ/Kde e intrón-RSS/Kde; en la mayoría de las muestras esto se pudo explicar por la configuración completa de los dos alelos de *IGK*. Esta existencia de múltiples productos de PCR clonales ilustra la complejidad de los patrones de reordenamiento de *IGK* en una muestra celular dada, principalmente provocada por la existencia potencial de dos reordenamientos clonales en un alelo (Vκ-Jκ e intrón-RSS-Kde). Esta complejidad no dificulta, sino que respalda, la distinción entre la policlonalidad y monoclonalidad.

Se observó la renaturalización inespecífica de los cebadores para cada uno de los conjuntos de cebadores Vκ-Jκ y Vκ-Kde/intrón-RSS-Kde, al usar ADN de HeLa como control que no era específico del molde. Las diluciones seriadas de ADN de las muestras de referencia clonales en ADN de amígdala dieron como resultado generalmente sensibilidades de 5-10% para los reordenamientos Vκ-Jκ y de 1-10% para los reordenamientos Vκ-Kde, mediante el

5 uso del análisis HD. En general, las sensibilidades del análisis GS fueron aproximadamente una etapa dilución mejores. La única diana ligeramente problemático fue la diana intrón-RSS-Kde que se pudo detectar solamente hasta la dilución seriada de 10% en la muestra de paciente empleada. Esto está provocado probablemente por el hecho de que los reordenamientos intrón-RSS-Kde son abundantes en el ADN de las células B de amígdala Igk+ e Igλ+, que se usaron en los experimentos de dilución.

10 La estrategia múltiplex que se eligió después de someter a ensayo varias aproximaciones consistió en dos tubos de reacción de PCR múltiplex diferentes. En el tubo Vk-Jk (tubo A) todos los cebadores Vk se combinaron con ambos cebadores Jk, mientras el tubo B contuvo todos los cebadores Vk más el cebador intrón-RSS combinado con el cebador inverso Kde (Figura 5B). Todas las muestras de referencia clonales anteriormente mencionadas fueron detectables mediante el uso de esta aproximación múltiplex de dos tubos. Es de destacar la observación de que en las muestras de amígdala no clonales se detectó una banda aparentemente clonal predominante de ~150 pb mediante el uso del análisis con el tubo A múltiplex Vk-Jk. La presencia de este producto, que se observa en el análisis HD pero en especial en el análisis GS, se puede explicar por la heterogeneidad limitada de las regiones de unión Vk-Jk, lo que conduce a una frecuencia elevada de productos de un tamaño medio de ~150 pb. Además, en algunas muestras se observó una banda inespecífica de 404 pb a veces débil en el tubo B. Aunque las sensibilidades fueron como media ligeramente mejores en otras aproximaciones múltiplex en las que los cebadores Vk se subdividieron adicionalmente en múltiples tubos, la viabilidad de tener solamente dos tubos para analizar todos los reordenamientos *IGK* relevantes, finalmente fue el argumento más importante para elegir la estrategia múltiplex de dos tubos tal como se muestra en la Figura 5B. Los límites de detección para las diversas dianas clonales en la aproximación múltiplex de dos tubos fueron de ~10% para la mayoría de los reordenamientos Vk-Jk clonales (Vk1-Jk4, Vk2-Jk4, Vk3-Jk4) procedentes de muestras informativas con una elevada carga tumoral; varias de las dianas Vk-Kde fueron detectables con una sensibilidad todavía razonable de ~10%, pero algunas muestras que contenían dianas Vk2-Kde, Vk5-Kde, y también intrón-RSS-Kde mostraron límites de detección por encima de 10%. Incluso el uso de 500 ng de ADN diluido en serie en vez de 100 ng difícilmente dio como resultado sensibilidades mejores, mientras las diluciones seriadas en ADN de MNC tampoco afectaron a los límites de detección. Sin embargo, los límites de detección de las diluciones seriadas del ADN de referencia en agua estuvieron todos en el orden de 0,5-1%, lo que demuestra que el análisis elegido de PCR múltiplex de *IGK* es bueno. Es importante indicar que las poblaciones de células clonales potenciales en nódulos linfáticos o en sangre periférica tendrán que ser detectadas en la práctica en un fondo de células policlonales, lo que puede dificultar la detección sensible de la clonalidad, en especial en muestras con un fondo relativamente elevado de células B policlonales.

#### Resultados de la fase de ensayo general

35 Tras el análisis inicial en los cuatro laboratorios implicados en el diseño de cebadores, el análisis de PCR múltiplex de *IGK* desarrollado se evaluó adicionalmente mediante el uso de 90 muestras definidas mediante transferencia Southern. Cada muestra se analizó en paralelo mediante análisis HD 45 (cinco laboratorios) y GS (dos laboratorios); en otros cuatro laboratorios se analizaron todas las muestras mediante ambas técnicas. En conjunto, estuvieron disponibles los resultados de ocho análisis HD y cinco análisis GS por muestra por tubo. En la gran mayoría de muestras >80% de los laboratorios produjeron resultados idénticos, es decir, bandas/picos clonales o manchas/curvas policlonales en uno o ambos tubos. Sin embargo, en nueve (~10%) muestras se hallaron discordancias entre los laboratorios, que persistieron tras el análisis repetitivo de estas muestras. Los análisis más detallados revelaron que en al menos seis casos los tamaños de aproximadamente 150 y 200 pb de los productos clonales del tubo A no se pudieron distinguir fácilmente de los productos policlonales de aproximadamente el mismo tamaño. Esta es una dificultad inherente en especial en el análisis de Vk-Jk, que está provocada por la heterogeneidad de unión relativamente limitada de estos reordenamientos. En dos muestras los resultados del tubo B fueron tan evidentes en todos los laboratorios con ambas técnicas que de hecho no prevaleció ninguna discrepancia. En una muestra (ES-8) un producto grande de aproximadamente 500 pb pareció ser la razón de los resultados discrepantes entre laboratorios; la secuenciación posterior reveló que la amplificación comenzando desde el segmento Jk aguas abajo provocó la producción de un producto de PCR Vk1-Jk3-Jk4 prolongado.

50 Cuando se evaluaron los resultados del análisis HD y GS, pareció que estos eran bastante comparables, aunque en general el número de laboratorios que mostraron resultados idénticos fue ligeramente superior en el análisis HD en comparación con el análisis GS (Figuras 5C y D). De manera notable, en una muestra (GBS-4) el análisis HD reveló un producto evidente en ambos tubos, mientras el análisis GS mostró solamente policlonalidad. La clonación del producto de HD mostró un producto de PCR Vk3-Vk5 peculiar, que no se observó en ninguna otra muestra; la configuración Vk-Vk de este producto explicó por qué no se detectaba con los cebadores Jk marcados en el análisis GS.

55 La comparación de los resultados de PCR con los datos de SB no reveló discrepancias SB-PCR en las muestras de tumores malignos de células B pre-foliculares y LLC-B; de acuerdo con la presencia de bandas de *IGK* reordenadas en el análisis SB, todas las muestras contuvieron productos de PCR de *IGK* clonales. En contraste, en las 25 muestras de tumor maligno de células B (post-)foliculares se perdieron los productos de PCR de *IGK* clonales en cuatro casos de LDCG (ES-5, PT-13, PT-14, FR-7) y una leucemia PC (NL-19) con ambas técnicas y en otro caso de LDCG (GBS-4, véase anteriormente) con el análisis GS solo. En todos los casos, esto estuvo provocado muy probablemente por la hipermutación somática. De manera interesante, en un caso de LCF (NL-4), se halló un producto de PCR clonal, mientras el análisis SB reveló una banda de la línea germinal en el caso de los genes *IGK* y

bandas clonales débiles en el análisis de *IGH*. En los 18 casos de tumores malignos de células T y en los 15 casos reactivos (categoría C) se hallaron productos de PCR de *IGK* policlonales de acuerdo con los resultados de SB, excepto en un caso de LNH-T periférico (FR-10). A continuación de los productos de TCR e *IGK* clonales, esta muestra también mostró productos de PCR de *IGH* e *IGL* clonales, pero no reordenamientos de Ig clonales en el análisis SB, lo que probablemente refleja la presencia de un clon de células B pequeño adicional en esta muestra. Finalmente, en la categoría de diagnóstico difícil (D), dos muestras (GBS-10 y GBN-8) mostraron productos de PCR de *IGK* clonales, de acuerdo con los datos de SB; sin embargo, en otras dos muestras (PT-6 y GBS-9), ambas de casos de LNH-B ricos en células T, se hallaron productos de PCR de *IGK* clonales así como productos de *IGH* y/o *IGL* clonales, pero sin pruebas de clonalidad a partir de los análisis SB. Además, esta discrepancia se puede explicar probablemente por el tamaño pequeño del clon de células B en estas dos muestras de pacientes.

Para determinar el valor adicional de analizar el locus de *IGK*, se compararon los resultados del análisis de PCR de *IGK* con los del análisis de PCR de *IGH*. En cinco (ES-2, NL-4, PT-8, GBN-2, ES-8) de las nueve muestras en las cuales no se hallaron productos de PCR de VH-JH clonales, los productos clonales se observaron fácilmente en el análisis de *IGK*. Teniendo en cuenta tanto el análisis de VH-JH como de DH-JH, el análisis de PCR de *IGK* fue todavía complementario al análisis de PCR de *IGH* en tres de estos casos para detectar productos de PCR de Ig clonales.

#### Conclusión

En conclusión, basándose en las fases de ensayo inicial y general, así como las pruebas preliminares a partir del uso de estos análisis múltiplex en series patológicamente bien definidas de linfoproliferaciones, el análisis de PCR del locus de *IGK* tiene un valor evidente (adicional) para la detección de la clonalidad. No obstante, se debería tener cuidado con la interpretación de las bandas aparentemente clonales especialmente en el tubo A, debido a la heterogeneidad de unión de *IGK* restringida inherente. Puesto que este problema es especialmente evidente en el análisis GS, se prefiere ligeramente del análisis HD sobre el análisis GS, aunque se debería indicar que en ciertos casos el análisis GS puede facilitar la interpretación apropiada de los resultados. Otra dificultad potencial es el intervalo de tamaños relativamente grande de los productos de *IGK* reordenados esperados, debido a las posiciones de los cebadores dispersas, y a las amplificaciones prolongadas desde los segmentos génicos Jk aguas abajo. Esto implica que se recomiendan tiempos de funcionamiento largos para el análisis GS. Finalmente, la complejidad inherente de los reordenamientos múltiples en el locus de *IGK* (reordenamientos Vk-Jk y Kde en el mismo alelo), junto con un nivel bajo de renaturalización cruzada de los cebadores Vk, puede dar como resultado ocasionalmente patrones con múltiples bandas o picos, que se parecen a la oligoclonalidad. Sin embargo, teniendo en cuenta estas consideraciones, el sistema de PCR múltiplex de *IGK* de dos tubos puede ser valioso en el diagnóstico de la clonalidad basado en PCR.

#### Ejemplo 4. Reordenamientos del gen IGL

##### Antecedentes

Los reordenamientos del gen IGL están presentes en 5 al 10% de los tumores malignos de células B Igk+ y en todos los tumores malignos de células B Igλ+.<sup>75</sup> Por lo tanto, los reordenamientos Vλ-Jλ representan potencialmente una diana de PCR extra atractiva para los estudios de clonalidad para compensar los resultados de PCR de VH-JH de *IGH* falsos negativos, causados principalmente por mutaciones somáticas. El locus de *IGL* abarca 1 Mb en el cromosoma 22q11.2.<sup>77-79</sup> Hay 73-74 genes Vλ a lo largo de 900 kb, de los cuales 30-33 son funcionales (Figura 6A). Basándose en la homología de secuencias, los genes Vλ se pueden agrupar en 11 familias y tres clanes. Los miembros de la misma familia tienden a estar agrupados en el cromosoma. Los genes Jλ y Cλ están organizados en tándem con un segmento Jλ precediendo a un gen Cλ. Generalmente, hay 7 segmentos génicos J-Cλ, de los cuales J-Cλ1, J-Cλ2, J-Cλ3, y J-Cλ7 son funcionales y codifican los cuatro isotipos de Igλ (Figura 6A).<sup>80,81</sup> Sin embargo, hay una variación polimórfica en el número de segmentos génicos J-Cλ, ya que algún individuo puede portar hasta 11 de ellos, debido a una amplificación de la región Cλ2-Cλ3.<sup>82,83</sup>

Varios estudios han demostrado que el repertorio de genes IGL tanto de las células B tanto normales como malignas está sesgado.<sup>48,49,84,85</sup> Así, más de 90% de los genes Vλ usados por las células B normales pertenecen a las familias Vλ1, Vλ2 y Vλ3, lo que constituye el 60% de los genes funcionales. Por otra parte, tres genes (2-14, 1-40, 2-8) representan aproximadamente la mitad del repertorio expresado. Aunque las células B normales usan los segmentos génicos J-Cλ1, J-Cλ2 y J-Cλ3 en proporciones aproximadamente equivalentes, las células B neoplásicas tienden a usar de manera predominante los segmentos génicos J-Cλ2 y J-Cλ3.<sup>49</sup> En las células B normales y malignas el J-Cλ7 se usa muy poco frecuentemente (1%). Este último hallazgo fue puesto en duda, sin embargo, por un estudio con una única célula de células normales que descubrió que más de la mitad de los reordenamientos emplearon los segmentos génicos J-Cλ7.<sup>86</sup> En contraste con el ratón, existe cierta diversidad de unión debido a la actividad exonucleasa y la adición de nucleótidos en N en los reordenamientos del gen *IGL* humano.<sup>82,85-87</sup> Sin embargo, es menos exhaustivo que el del locus de *IGH*, y varios reordenamientos resultan del acoplamiento directo de los segmentos génicos Vλ y Jλ de la línea germinal. No obstante, el locus de *IGL* podría representar un locus complementario alternativo a *IGH* para los estudios de clonalidad de células B.

## Diseño de cebadores

Tomando en consideración el repertorio de V $\lambda$  sesgado, los autores de la presente invención eligieron amplificar solamente los reordenamientos que usan los segmentos génicos V $\lambda$ 1, V $\lambda$ 2 y V $\lambda$ 3. Se diseñó un único cebador consenso que reconoce ambos segmentos génicos V $\lambda$ 1 y V $\lambda$ 2, así como un cebador V $\lambda$ 3, en regiones de homología elevada entre los miembros de la misma familia (Figura 6B). Los experimentos iniciales demostraron que funcionaron tan bien en múltiplex como por separado. De hecho, se pudo observar la renaturalización cruzada del cebador V $\lambda$ 3 que hibridaba con ciertos genes V $\lambda$ 1 o V $\lambda$ 2 (o a la inversa) cuando se usaron los cebadores V $\lambda$  por separado; no se observó, sin embargo, en la PCR múltiplex.

Se diseñó un único cebador consenso para los segmentos génicos J $\lambda$ 1, J $\lambda$ 2 y J $\lambda$ 3, y tiene un emparejamiento erróneo en su porción central en comparación con cada una de las secuencias de la línea germinal. En los experimentos preliminares se descubrió que proporcionaba mejores resultados que una combinación de cebadores J $\lambda$ 1 y J $\lambda$ 2-J $\lambda$ 3 perfectamente emparejados. Debido a que un único estudio informó del uso frecuente del gen J $\lambda$ 7 en las células B normales,<sup>85</sup> los autores de la presente invención también diseñaron un cebador J $\lambda$ 7 específico. Cuando se analizó en varias muestras de células B policlonales, difícilmente se pudo detectar una señal en el análisis HD, en contraste con las amplificaciones llevadas a cabo con las mismas muestras mediante el uso de los cebadores J $\lambda$ 1, J $\lambda$ 2-J $\lambda$ 3 o el cebador J $\lambda$  consenso. De forma similar, los autores de la presente invención no pudieron detectar ningún reordenamiento con este cebador cuando se analizó una colección de tumores de células B monoclonales. Basándose en estos resultados, así como en los otros informes de la bibliografía<sup>49</sup>, los autores de la presente invención concluyeron que la elevada frecuencia sin confirmar de los reordenamientos de J $\lambda$ 7 (en un único estudio)<sup>66</sup> había sido causada por una dificultad técnica y, por lo tanto, los autores de la presente invención decidieron no incluir el cebador J $\lambda$ 7. El análisis de PCR para la detección de los reordenamientos del gen *IGL* en el estudio de clonalidad, por lo tanto, consiste en un único tubo que contiene tres cebadores (Figura 6B). Se esperó que este único tubo detectase la gran mayoría de los reordenamientos.

## Resultados de la fase de ensayo inicial

El ensayo inicial en un conjunto de muestras monoclonales y policlonales demostró que se podrían diferenciar muy bien mediante análisis HD de los productos de PCR en electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (Figura 6C). Los reordenamientos de *IGL* clonales se observaron en la región homodúplex, con una o a veces dos bandas más débiles en la región heterodúplex, mientras los reordenamientos policlonales aparecieron en forma de una mancha en la región heterodúplex (Figura 6C). No se observaron bandas inespecíficas. Se debería indicar que debido al tamaño limitado de la región de unión, es extremadamente difícil distinguir los reordenamientos policlonales de los reordenamientos monoclonales utilizando un simple gel de poliacrilamida sin llevar a cabo una formación de heterodúplex. De acuerdo con esto, se demostró que el análisis de los productos de PCR mediante GS fueron menos sencillos (Figura 6C). Aunque se identificaron claramente los reordenamientos monoclonales, el patrón de reordenamientos policlonales tuvo un aspecto oligoclonal debido a la diversidad de unión limitada. La interpretación fue más difícil, en particular para distinguir los casos policlonales de aquellos con una población menor de células B clonales en un fondo de células B policlonales. Por lo tanto, los autores de la presente invención recomiendan el análisis HD como el método de elección para analizar los reordenamientos del gen *IGL*.

La sensibilidad del análisis, llevado a cabo en varios casos, demostró ser de aproximadamente el 5% (2,5% - 10%) cuando la dilución del ADN tumoral se realizó en PB-MNC y aproximadamente el 10% (5% - 20%) cuando se diluyó en ADN de nódulo linfático.

## Resultados de la fase de ensayo general

El análisis de PCR de *IGL* en un único tubo se estudió en una serie de 90 proliferaciones linfoides definidas mediante transferencia Southern. Este ensayo se llevó a cabo en nueve laboratorios, cuatro con análisis HD solamente, uno con análisis GS solamente, y cuatro que usaban ambas técnicas. Los reordenamientos del gen *IGL* clonales se detectaron en 19 casos. En 15 de ellos se obtuvo una concordancia de más del 70% en los nueve laboratorios. En cuatro casos se obtuvo una concordancia menor del 70%, que se pudo explicar por los reordenamientos del gen *IGL* clonales menores en tres de ellos (ES-12, GB-10, y FR-10). Esta discordancia en el cuarto caso (PT-11) permanece sin explicar, en particular debido a que no se detectaron reordenamientos del gen *IGL* mediante transferencia Southern. Tal como se concluyó a partir del análisis inicial, la interpretación del análisis GS fue más difícil que en el análisis HD, en especial en el caso de las poblaciones clonales menores. De estos 19 casos de gen *IGL* clonal, 17 fueron proliferaciones de células B (16 maduras y una de células B precursoras). Un caso (ES12) correspondió a la enfermedad de Hodgkin y otro (FR-10) a una LNH-T. Ambos tuvieron solamente un reordenamiento del gen *IGL* clonal menor, y FR-10 exhibió también un reordenamiento del gen *IGK* clonal.

La comparación con los datos de la transferencia de Southern mostró ciertas discrepancias. Seis casos con reordenamientos del gen *IGL* clonales mediante PCR parecieron policlonales mediante el análisis de transferencia Southern. Tres de ellos (PT-6, ES-12, FR-10) estaban relacionados con poblaciones clonales menores que pueden haber estado por debajo del nivel de sensibilidad de la técnica de transferencia Southern. En los otros tres casos (NL-19, ES-1, PT-11) se puede haber perdido una banda reordenada clonalmente debido al patrón de reordenamiento bastante complejo del locus de *IGL* en la transferencia Southern.<sup>26,49</sup> Por el contrario, el análisis de

PCR no fue capaz de detectar los reordenamientos clonales que se observaron mediante el análisis de transferencia Southern en dos casos (GBS-6, FR-5). Sin embargo, estos fueron linfomas foliculares en los que el grado elevado de hipermutaciones somáticas puede haber evitado la renaturalización de los cebadores del gen *IgL*.

#### Conclusión

5 En conclusión, un análisis de PCR en un único tubo para la detección de los reordenamientos del gen *IgL* que contiene solamente tres cebadores (Figura 6B) permite detectar la gran mayoría de los reordenamientos del gen *IgL* (reordenamientos génicos V $\lambda$ 1, V $\lambda$ 2, y V3). El análisis heterodúplex es el método analítico preferido, aunque se puede usar el análisis GeneScan, pero se recomienda una precaución máxima para evitar la sobreinterpretación de la clonalidad debida a la diversidad de unión limitada.

10 Ejemplo 5: Reordenamientos del gen *TCRB*: V $\beta$ -J $\beta$ , D $\beta$ -J $\beta$

#### Antecedentes

El análisis molecular de los genes *TCRB* es una herramienta importante para el estudio de la clonalidad en proliferaciones de células T sospechosas. Los reordenamientos del gen *TCRB* ocurren no solamente en la mayoría de los tumores malignos de células T maduras, sino también en aproximadamente 80% de las leucemias linfoblásticas agudas de células T CD3 negativas (LLA-T) y en 95% de las LLA-T CD3 positivas.<sup>28</sup> Los reordenamientos de *TCRB* no se limitan a los tumores malignos del linaje T, ya que aproximadamente de un tercio de las LLA de células B precursoras albergan genes *TCRB* reordenados.<sup>30</sup> Su frecuencia es mucho menor (0 a 7%) en las proliferaciones de células B maduras.<sup>21</sup>

El locus de *TCRB* humano está localizado en el brazo largo del cromosoma 7, en la banda 7q34, y abarca una región de 685 kb. En contraste con los loci de *TCRG* y *TCRD*, la agrupación génica de la región V del locus de *TCRB* es mucho más compleja (Figura 7A).<sup>1</sup> Contiene aproximadamente 65 elementos génicos V $\beta$  para los cuales se usan dos nomenclaturas diferentes: la resumida por Arden et al.<sup>50</sup> sigue la denominación génica de Wei et al.<sup>88</sup> y agrupa los genes V $\beta$  en 34 familias. La nomenclatura alternativa propuesta por Rowen et al.<sup>51</sup> subdivide los subgrupos de genes V $\beta$  y fue adoptada más tarde por el IMGT, la base de datos internacional ImMunoGeneTics <http://imgt.cines.fr> (iniciadora y coordinadora: Marie-Paule Lefranc, Montpellier, Francia). [Lefranc, 2003 #212; Lefranc, 2003 #219] Las familias más grandes, V $\beta$ 5, V $\beta$ 6, V $\beta$ 8 y V $\beta$ 13 (nomenclatura de Arden) alcanzan un tamaño de siete, nueve, cinco y ocho miembros, respectivamente. Doce familias V $\beta$  contienen solamente un único miembro. En general, las familias se demarcan claramente entre sí.<sup>50</sup> En este informe los autores de la presente invención siguen la nomenclatura de Arden.<sup>50</sup>

De los elementos génicos V $\beta$  39-47 se califican como funcionales, y pertenecen a 23 familias. De los elementos V $\beta$  no funcionales 7-9 tienen un marco de lectura abierto, pero contienen alteraciones en los sitios de corte y empalme, las señales de recombinación y/o los elementos reguladores. 10-16 están clasificados como pseudogenes. Además, se ha informado de que una agrupación de seis genes V $\beta$  huérfanos no funcionales están localizados en el brazo corto del cromosoma 9 (9p21)<sup>89,90</sup> Estos no se detectan en los transcritos.<sup>50,51</sup>

35 Todos los genes V $\beta$  excepto uno están localizados aguas arriba de dos agrupaciones D $\beta$ -J $\beta$ -C $\beta$ . La Figura 7A ilustra que ambos segmentos génicos C $\beta$  (C $\beta$ 1 y C $\beta$ 2) están precedidos por un gen D $\beta$  (D $\beta$ 1 y D $\beta$ 2) y una agrupación J $\beta$  que comprende seis (J $\beta$ 1.1 a J $\beta$ 1.6) y siete (J $\beta$ 2.1 a J $\beta$ 2.7) segmentos J $\beta$  funcionales. Los loci de la región J $\beta$  se clasifican en dos familias de acuerdo con su localización genómica, pero no por la similitud de secuencias.<sup>51,88,91</sup>

Debido al gran repertorio codificado por la línea germinal, la diversidad combinatoria de los reordenamientos del gen *TCRB* es extensa en comparación con los reordenamientos de *TCRG* y *TCRD*. El repertorio principal de las moléculas TCR $\beta$  se amplía adicionalmente por la adición de una media de 3,6 (unión V-D) y 4,6 (unión D-J) nucleótidos y la delección de una media de 3,6 (V), 3,8 (5' de D), 3,7 (3' de D) y 4,1 (J) nucleótidos.<sup>51</sup> La región hipervariable completa que resulta de la unión de los segmentos V, D y J comprende de manera característica nueve o diez codones. La variación de tamaños es limitada, ya que 7 a 12 residuos explican más de 80% de todos los reordenamientos funcionales en contraste con el repertorio de longitud amplia de la región CDR3 de *IGH*.<sup>92</sup>

Durante el desarrollo temprano de las células T, el reordenamiento del gen *TCRB* consiste en dos etapas consecutivas: reordenamiento de D $\beta$  a J $\beta$  y reordenamiento de V $\beta$  a D-J $\beta$  con un intervalo de uno a dos días entre estos dos procesos.<sup>93</sup> El segmento génico D $\beta$ 1 se puede unir a los segmentos génicos J $\beta$ 1 o J $\beta$ 2, pero el segmento génico D $\beta$ 2 se une generalmente solamente a los segmentos génicos J $\beta$ 2 debido a su posición en el locus del gen *TCRB*.<sup>28,51</sup> Debido a la presencia de dos agrupaciones D-J en *TCRB* consecutivas, también es posible que sean detectables dos reordenamientos en un alelo: un reordenamiento incompleto D $\beta$ 2-J $\beta$ 2 de *TCRB* además de un reordenamiento completo o incompleto en la región D $\beta$ 1-J $\beta$ 1 de *TCRB*.<sup>1</sup>

En los reordenamientos del gen *TCRB*, se observa una distribución no aleatoria del uso de los segmentos génicos. En los individuos sanos, ciertas familias V $\beta$  predominan en el repertorio de células T de sangre periférica (p. ej. V $\beta$ 1-V $\beta$ 5), mientras otros se usan de manera infrecuente solamente (p. ej. V $\beta$ 11, V $\beta$ 16, V $\beta$ 18, V $\beta$ 23). Los valores medios del repertorio de V $\beta$  parecen ser estables durante el envejecimiento, aunque la desviación típica se incrementa en los ancianos.<sup>13,94</sup> Además, en el timo humano dominan ciertos segmentos génicos V $\beta$ : los siete genes V $\beta$  más

prevalentes (V $\beta$ 3-1, V $\beta$ 4-1, V $\beta$ 5-1, V $\beta$ 6-7, V $\beta$ 7-2, V $\beta$ 8-2, V $\beta$ 13-2) cubren casi la mitad del repertorio de *TCRB* funcionales.<sup>95</sup> La representación de segmentos J también está lejos de ser uniforme. La familia J $\beta$ 2 se usa con más frecuencia que la familia J $\beta$ 1 (72% frente a 28% de reordenamientos de *TCRB*).<sup>96</sup> En particular, la proporción de J $\beta$ 2.1 es mayor de lo esperado (24%) seguida por J $\beta$ 2.2 (11%) y J $\beta$ 2.3 y J $\beta$ 2.5 (10% cada una).<sup>95</sup>

- 5 Los patrones de reordenamiento del gen *TCRB* difieren entre las categorías de tumores malignos de células T. Los reordenamientos V $\beta$ -J $\beta$ 1 de *TCRB* completos y los alelos reordenados de forma incompleta en la agrupación D $\beta$ -J $\beta$ 2 de *TCRB* se observan con más frecuencia en LLA-T TCR $\alpha$  $\beta$ + en comparación con LLA-T CD3- y LLA-T TCR $\gamma$  $\delta$ +.<sup>28</sup> En el grupo total de LLA-T, la región D $\beta$ -J $\beta$ 1 de *TCRB* está implicada con relativa frecuencia en los reordenamientos en contraste con los otros reordenamientos del gen *TCRB* entre linajes en LLA de células B precursoras que implican exclusivamente la región D $\beta$ -J $\beta$ 2 de *TCRB*.<sup>30,73</sup>

10 El desarrollo de anticuerpos monoclonales contra la mayoría de los dominios V $\beta$  ha ayudado a identificar las expansiones de la familia V $\beta$ .<sup>13</sup> Sin embargo, el análisis de los reordenamientos de los genes de TCR es esencial para el estudio de la clonalidad en los trastornos linfoproliferativos de las células T. Puesto que el repertorio codificado por la línea germinal restringido de los loci de *TCRG* y *TCRD* facilita los enfoques de PCR basados en ADN, se han establecido diversos métodos de PCR para la detección de los reordenamientos de los genes *TCRG* y *TCRD*.<sup>97-99</sup> No obstante, la diversidad de unión limitada de los reordenamientos *TCRG* conduce a una amplificación de fondo elevada de reordenamientos similares en células T normales (Ejemplo 6). El gen *TCRD*, por otra parte, está suprimido en la mayoría de los tumores malignos de células T maduras.<sup>21</sup> Por lo tanto, son necesarias las técnicas de PCR de *TCRB* basadas en ADN para el estudio de la clonalidad. Además, los reordenamientos de *TCRB* son de gran interés para los estudios de seguimiento de los trastornos linfoproliferativos, debido a que el extenso repertorio combinatorio de los reordenamientos de *TCRB* y la gran región hipervariable permiten una detección muy específica de células tumorales residuales clínicamente ocultas. Sin embargo, el extenso repertorio codificado por la línea germinal hace más difíciles los análisis de PCR. Algunos enfoques de PCR publicados usan el procedimiento costoso de enfoques con múltiples tubos con un panel de cebadores específicos de familia o de subfamilia.<sup>95,100</sup> El uso de cebadores consenso muy degenerados limita el número de reordenamientos detectables que están cubiertos en teoría por los cebadores, debido a que no hay una única secuencia común de suficiente identidad para permitir una amplificación fiable de todos los reordenamientos posibles.<sup>42,101,102</sup> Ciertos análisis publicados usan una PCR anidada que requiere una reacción de PCR adicional.<sup>42,102</sup> Otros análisis se centran en el análisis de los transcritos V $\beta$ -D $\beta$ -J $\beta$ -C $\beta$  de *TCRB* para limitar el número de cebadores necesarios.<sup>16,100,103</sup> Sin embargo, un inconveniente importante de estas aproximaciones basadas en ARNm es la necesidad de material reciente o congelado y una etapa de transcripción inversa antes de la amplificación mediante PCR.

Los autores de la presente invención intentaron superar estas limitaciones creando una PCR de *TCRB* basada en ADN completamente nueva y práctica. Los autores de la presente invención diseñaron múltiples cebadores V $\beta$  y J $\beta$ , que cubrían todos los segmentos génicos V $\beta$  y J $\beta$  funcionales y que eran adecuados para la combinación en reacciones de PCR múltiplex. Además, el análisis es aplicable al análisis HD y al análisis GS, y también detecta los reordenamientos D $\beta$ -J $\beta$  de *TCRB* incompletos con el mismo conjunto de cebadores J $\beta$ . Para evitar problemas debido al cebado cruzado, los autores de la presente invención decidieron diseñar todos los cebadores V $\beta$  y J $\beta$  en la misma región conservada de cada segmento génico.

#### Diseño de cebadores

40 Inicialmente, se diseñó un total de 23 cebadores V $\beta$ , 2 D $\beta$  (D $\beta$ 1 y D $\beta$ 2) y 13 J $\beta$  (J $\beta$ 1.1 a 1.6 y J $\beta$ 2.1 a 2.7) con todos los cebadores V $\beta$  y J $\beta$  situados en la misma región conservada de cada segmento génico V $\beta$  y J $\beta$ , de forma que se pudieran omitir los efectos de la renaturalización cruzada en una reacción múltiplex. Además, los reordenamientos V-J de *TCRB* policlonales poco frecuentes no se confundirían con un reordenamiento clonal incluso si no produjera un patrón de picos Gaussianos completamente policlonal, debido a que los productos de PCR de todos los reordenamientos posibles están situados en el mismo intervalo de tamaños.

45 Para el diseño de los cebadores, cuando fue posible se tuvieron en cuenta los pseudogenes reordenables o los genes con marcos de lectura abiertos con alteraciones en los sitios de corte y empalme, las señales de recombinación y/o los elementos reguladores o los cambios de aminoácidos conservados. Sin embargo, el objetivo principal fue cubrir todos los genes V $\beta$  funcionales. La eficacia de cebado de cada cebador V $\beta$  se comprobó para cada gen V $\beta$  mediante el uso del programa informático OLIGO 6.2. Esto condujo a cebadores que no fueron estrictamente específicos de la familia V $\beta$ , y algunos de los cuales cubrieron los segmentos génicos V $\beta$  de más de una familia (Figura 7B). Debido a que los 13 cebadores J $\beta$  se renaturalizaron con el mismo segmento de cada cebador del gen J $\beta$ , la dimerización hizo necesario dividir los cebadores J en dos tubos. Inicialmente, se planeó usar los cebadores en cuatro grupos de reacciones múltiplex de la siguiente manera: los 23 cebadores V $\beta$  combinados con los seis cebadores de la familia J $\beta$ 1 (240-285 pb), los 23 cebadores V $\beta$  con los siete cebadores de la familia J $\beta$ 2 (240-285 pb), D $\beta$ 1 (280-320 pb) con los seis cebadores J $\beta$ 1, y D $\beta$ 1 (280-320 pb) más D $\beta$ 2 (170-210 pb) con los siete cebadores de la familia J $\beta$ 2.

#### Resultados de la fase de ensayo inicial

El análisis monoplex inicial de cada combinación de cebadores posible se llevó a cabo mediante el uso de muestras

con reordenamientos de *TCRB* monoclonales conocidos y controles policlonales. Se generaron productos de PCR en el intervalo de tamaños esperado con diferencias en la intensidad de los productos, y el perfil de señales para las muestras policlonales dependió de la frecuencia de uso de los distintos segmentos génicos V $\beta$  y J $\beta$ . Sin embargo, cuando los cebadores se combinaron en una reacción múltiplex, ciertos reordenamientos de J $\beta$ 2 en particular se perdieron y se observaron productos inespecíficos en los tubos B y D. Además, el cebado cruzado entre los cebadores J $\beta$ 1 y J $\beta$ 2 dio como resultado problemas de interpretación. Como consecuencia, los cebadores J $\beta$ 2 tuvieron que ser rediseñados y se tuvieron que reordenar las combinaciones de cebadores en diferentes tubos: los cebadores J $\beta$  J $\beta$ 2.2, 2.6 y 2.7 se modificaron ligeramente y se añadieron al tubo A. La localización de los cebadores J $\beta$ 2.1, 2.3, 2.4 y 2.5 se desplazó 4 pb aguas abajo para evitar la dimerización de los cebadores y el cebado cruzado con los cebadores J $\beta$  restantes. Solamente las bandas inespecíficas con una intensidad variable fuera del intervalo de tamaños esperado persistieron en el tubo B (bandas <150 pb, 221 pb) y en el tubo C (128 pb, 337 pb) mediante el uso de ADN molde específico. Sin embargo, debido a que todos los productos de amplificación inespecíficos estuvieron fuera de los intervalos de tamaño de los productos específicos de *TCRB*, no afectaron a la interpretación, y no se consideraron un problema. Sin embargo, mediante el uso de los controles inespecíficos del molde, fue visible un débil pico adicional inespecífico de 273 pb en el tubo A mediante el análisis GS. Este producto se inhibe completamente cuando el ADN contiene suficientes reordenamientos de *TCRB* clonales o policlonales, pero puede aparecer en las muestras que comprenden un número bajo de células linfoides. En la fase de ensayo inicial, se generaron productos de PCR de V-D-J relativamente débiles. Así, se optimizaron las condiciones de PCR para los reordenamientos V-D-J completos incrementando la concentración de MgCl<sub>2</sub> y la cantidad de polimerasa Taq. Además, el uso de cebadores sumamente purificados y la aplicación del tampón ABI II en vez del tampón ABI Gold resultó ser muy importante. Para la detección de los reordenamientos D $\beta$ -J $\beta$  incompletos, fue posible finalmente mezclar todos los cebadores J $\beta$  en un tubo sin pérdida de sensibilidad o de información. Por lo tanto, el número total de reacciones múltiplex se pudo reducir a tres tubos.

El conjunto de cebadores aprobado finalmente es (Figura 7B):

tubo A: 23 cebadores V $\beta$  y 9 cebadores J $\beta$ : J $\beta$ 1.1-1.6, 2.2, 2.6 y 2.7

tubo B: 23 cebadores V $\beta$  y 4 cebadores J $\beta$ : J $\beta$ 2.1, 2.3, 2.4 y 2.5

tubo C: D $\beta$ 1, D $\beta$ 2 y los 13 cebadores J $\beta$ .

Puesto que los tubos A y C contienen los cebadores J $\beta$ 1 y J $\beta$ 2, el marcaje diferencial de los cebadores J $\beta$ 1 y J $\beta$ 2 con colorantes diferentes (TET para los cebadores J $\beta$ 1.1-1.6 y FAM para los cebadores J $\beta$ 2.1-2.7) permite la distinción mediante GS del uso de J $\beta$ 1 o J $\beta$ 2 en las reacciones de los tubos A y C (véase la Figura 13A).

El análisis de la sensibilidad se llevó a cabo por medio de experimentos de dilución con diversas líneas celulares y muestras de pacientes con genes *TCRB* reordenados clonalmente en MNC. Los experimentos de dilución con PCR simple alcanzaron generalmente niveles de sensibilidad de al menos 0,1% a 1%. Tal como se esperaba, la sensibilidad disminuyó en los ensayos múltiplex, probablemente debido a un incremento de la amplificación del fondo. Especialmente en el análisis GS, este fondo dificultó la interpretación debido a la variación de longitudes relativamente pequeña de los productos de PCR de *TCRB*. No obstante, en 40 de los 46 controles positivos sometidos a ensayo se alcanzó una sensibilidad de al menos 1% a 10% mediante el uso de análisis de heterodúplex o GeneScanning (Tabla 6).

Resultados de la fase de ensayo general

Once grupos participaron en el análisis del ADN de una serie de 90 trastornos linfoproliferativos malignos y reactivos definidos mediante transferencia Southern mediante el uso del protocolo múltiplex de *TCRB*. Cada muestra se analizó mediante HD en dos laboratorios, y en seis laboratorios mediante el uso del análisis GS. Otros tres laboratorios usaron ambas técnicas para el análisis de PCR (Figuras 7C, D, y E). Esta fase de ensayo, así como la experiencia del uso de estos análisis de PCR de *TCRB* generaron ciertos problemas generales sobre el protocolo que ya se describieron en parte en la fase de ensayo inicial: 1. La variación de la longitud limitada de los productos de PCR de *TCRB* puede dificultar la detección mediante GS de las señales clonales en un fondo policlonal. 2. Solamente las bandas/picos dentro del intervalo de tamaños esperado representan reordenamientos del gen *TCRB* clonales. Especialmente para el tubo A, se debe incluir un ADN de control inespecífico para definir el pico de 273 pb no específico que se puede dar en situaciones sin competición. 3. Es extremadamente importante usar cebadores sumamente purificados y tampón ABI II (y no tampón ABI Gold) para obtener buenos resultados de PCR, así como el protocolo de preparación de productos de PCR recomendado para el análisis HD. De los 90 casos definidos mediante transferencia Southern presentados, 29 fueron SB positivos para los reordenamientos de *TCRB* monoclonales. Veinticinco de estos reordenamientos clonales (86%) fueron detectables también mediante la PCR de *TCRB*. Veintitrés reordenamientos fueron revelados mediante análisis GS y análisis HD, dos casos adicionales solamente mediante HD. Uno de los casos GS negativo y HD positivo (FR-9) fue interpretado como monoclonal en el análisis GS por cuatro de los nueve laboratorios implicados en la fase de análisis general (Figura 7C). Sin embargo, debido a un fondo policlonal significativo, la interpretación de los patrones de GS fue difícil en este caso particular. El otro caso GS negativo y HD positivo exhibió un producto de PCR atípico en el tubo C con un tamaño de aproximadamente 400 pb (Figura 7E). El producto de PCR fue claramente visible en los geles de agarosa y el

análisis HD, pero no mediante GS. Tras la secuenciación del ADN de este fragmento, se identificó un producto de amplificación D $\beta$ 1-D $\beta$ 2 de *TCRB* que explicaba el producto de PCR sin marcar. Cuatro casos positivos por SB (NL-15, NL-16, GBN-2 y FR-6) tampoco fueron detectados mediante el análisis GS ni mediante HD, y todos ellos tenían un tumor maligno linfóide B subyacente. Las explicaciones posibles para este fallo son los reordenamientos atípicos (p. ej. reordenamientos V $\beta$ -D $\beta$  incompletos),<sup>28,104</sup> las variaciones de secuencias de los segmentos génicos V $\beta$  reordenados<sup>51</sup> o la carencia de sensibilidad para reordenamientos particulares.

Los autores de la presente invención consideraron que 62 de las muestras eran policlonales mediante SB. Para 61 (98%) de estos casos los resultados de PCR fueron concordantes con al menos un método de análisis, para 57 (92%) casos los resultados fueron concordantes mediante el uso de ambos métodos. La muestra negativa para SB (ES-14) que se descubrió que era monoclonal mediante el análisis HD y el análisis GS mostró un reordenamiento D $\beta$ 2 incompleto. Se obtuvieron resultados que no eran uniformes para cuatro muestras: se consideró que una muestra era clonal mediante GS, pero solamente por 50% de los laboratorios que analizaron los productos de PCR mediante HD (GBS-4). Se descubrió que tres muestras producían señales clonales débiles solamente mediante el análisis HD (ES-6, GBS-9 y DE-2). Los subclones reordenados de *TCRB* que son demasiado pequeños para ser detectados mediante el análisis SB se pueden observar solamente mediante la metodología de PCR más sensible. En los tumores malignos de células B, los reordenamientos detectados pueden representar también expansiones clonales u oligoclonales de las células T residuales.<sup>105</sup> En este caso, estos productos de PCR clonales débiles no se deberían considerar una prueba de un trastorno de células T clonal. Esto subraya la importancia de la interpretación de los resultados de PCR en el contexto de otros ensayos diagnósticos y el cuadro clínico de los pacientes. El estudio de PCR óptimo de los reordenamientos de *TCRB* se obtiene mediante el uso combinado del análisis HD y análisis GS. La sensibilidad puede diferir entre los dos métodos de detección en función del tamaño de los productos de PCR clonales en comparación con la distribución de tamaños policlonales: por una parte, el análisis HD dispersa el fondo policlonal de los productos clonales, y por otra parte los productos de PCR fuera del intervalo de tamaños principal permiten una detección mediante GS más sensible. Además, el riesgo de resultados falsos positivos se reduce con el uso combinado del análisis HD y el análisis GS. Además, el análisis HD permite la detección de ciertos reordenamientos D $\beta$ 1-D $\beta$ 2 de *TCRB* atípicos adicionales que no se pueden detectar mediante el análisis GS del producto de PCR ya que no hay implicado un cebador marcado en la amplificación. Sin embargo, el análisis GS es en general el método más informativo para las muestras con una carga tumoral elevada, debido a que se indica el tamaño exacto del producto de PCR monoclonal, que se puede usar con fines de verificación, y los cebadores J $\beta$  marcados de manera diferencial proporcionan información adicional sobre el uso del gen J $\beta$ .

#### Conclusión

En conclusión, el sistema de PCR múltiple de *TCRB* de tres tubos proporciona un análisis nuevo y práctico para el estudio de la clonalidad en proliferaciones de células T sospechosas con una tasa de detección de la clonalidad inéditamente elevada.

#### Ejemplo 6: Reordenamientos del gen *TCRG*

##### Antecedentes

Los reordenamientos del gen *TCRG* se han usado durante mucho tiempo para la detección mediante PCR de ADN de la clonalidad linfóide, y representan el "prototipo" de dianas con un repertorio restringido. Es una diana preferente para los análisis de clonalidad, ya que se reordena en una etapa temprana del desarrollo linfóide T, probablemente justo después de *TCRD*,<sup>106</sup> en los precursores de linaje tanto TCR $\alpha\beta$  como TCR $\gamma\delta$ . Se reordena en más del 90% de LLA-T, LGL-T y LPL-T, en 50-75% de LNH-T periférico y micosis fungoide, pero no en las proliferaciones de células NK auténticas. También se reordena en una parte importante de las LLA de linaje B, pero mucho menos en LNH-B.<sup>1,30,73</sup> A diferencia de otros diversos loci de Ig/TCR, la estructura genómica completa se conoce desde hace muchos años. Contiene un número limitado de segmentos V $\gamma$  y J $\gamma$ . La amplificación de todas las combinaciones V $\gamma$ -J $\gamma$  importantes es posible con un número limitado de cuatro cebadores V $\gamma$  y tres J $\gamma$ .

El locus de *TCRG* humano en el cromosoma 7p14 contiene 14 segmentos V $\gamma$ , de los cuales solamente en diez se ha demostrado que experimenten reordenamientos (Figura 8A). El repertorio de V $\gamma$  expresado incluye solamente seis genes V $\gamma$  (V $\gamma$ 2, V $\gamma$ 3, V $\gamma$ 4, V $\gamma$ 5, V $\gamma$ 8 y V $\gamma$ 9) pero también se da el reordenamiento con los segmentos  $\psi$ V $\gamma$ 7,  $\psi$ V $\gamma$ 10,  $\gamma\psi$ V $\gamma$ 11.<sup>107,108</sup> El reordenamiento de  $\psi$ V $\gamma$ B (también conocido como V $\gamma$ 12)<sup>107</sup> es tan excepcional que se usa raramente en las estrategias de PCR diagnósticas. Los segmentos V $\gamma$  que se reordenan se pueden subdividir en aquellos que pertenecen a la familia V $\gamma$ I (V $\gamma$ I: V $\gamma$ 2, V $\gamma$ 3, V $\gamma$ 4, V $\gamma$ 5,  $\psi$ V $\gamma$ 7 y V $\gamma$ 8; homología total >90% y la mayor entre V $\gamma$ 2 y V $\gamma$ 4 y entre V $\gamma$ 3 y V $\gamma$ 5) y las familias V $\gamma$ 9,  $\psi$ V $\gamma$ 10,  $\psi$ V $\gamma$ 11 de un solo miembro. El locus de *TCRG* contiene cinco segmentos J $\gamma$ : J $\gamma$ 1.1 (J $\gamma$ P1), J $\gamma$ 1.2 (J $\gamma$ P), J $\gamma$ 1.3 (J $\gamma$ 1), J $\gamma$ 2.1 (J $\gamma$ P2), J $\gamma$ 2.3 (J $\gamma$ 2), de los cuales J $\gamma$ 1.3 y J $\gamma$ 2.3 son sumamente homólogos, al igual que J $\gamma$ 1.1 y J $\gamma$ 2.1.<sup>109</sup>

Aunque el repertorio de la línea germinal de *TCRG* restringido facilita la amplificación mediante PCR, la diversidad de unión limitada de los reordenamientos de *TCRG* complica la distinción entre los productos de PCR clonales y policlonales. El locus de *TCRG* no contiene segmentos D, y muestra adiciones de nucleótidos relativamente limitadas. La longitud de la unión V-J de *TCRG*, por lo tanto, varía en 20-30 pb, en comparación con aproximadamente 60 pb para *IGH* y *TCRD*. La capacidad de distinguir los reordenamientos de *TCRG* clonales de los

policlonales depende de la complejidad del repertorio policlonal. En general, las poblaciones clonales menores que usan reordenamientos V $\gamma$ -J $\gamma$  frecuentes tales como V $\gamma$ fl-J $\gamma$ 1.3/2.3 corren el riesgo de perderse entre el repertorio policlonal, mientras se detectarán combinaciones infrecuentes con una sensibilidad mayor. No obstante, los linfocitos T policlonales ocasionales que muestran reordenamientos V $\gamma$ -J $\gamma$  infrecuentes se pueden confundir con un reordenamiento clonal, debido a la ausencia de un fondo policlonal para ese tipo de reordenamiento. Una posible fuente adicional de resultados falsos positivos resulta de la presencia de linfocitos T que expresan TCR $\gamma\delta$  que muestran reordenamientos de *TCRG* "canónicos", que no muestran adiciones de nucleótidos en N. El reordenamiento de *TCRG* canónico humano reconocido más habitualmente implica los segmentos V $\gamma$ 9-J $\gamma$ 1.2 y se da en aproximadamente 1% de los linfocitos T de la sangre.<sup>110,111</sup> Es, por lo tanto, extremadamente importante analizar los productos de PCR de *TCRG* mediante el uso de técnicas electroforéticas de alta resolución o separar los productos de PCR basándose en criterios distintos del tamaño puramente, para reducir el riesgo de resultados falsos positivos. También es importante ser consciente del perfil de los reordenamientos canónicos y de las situaciones en las que se dan más habitualmente. Los reordenamientos V $\gamma$ 9-J $\gamma$ 1.2 canónicos, por ejemplo, se hallan de forma predominante en la sangre periférica, y se incrementan en frecuencia con la edad, ya que resultan de la acumulación de linfocitos T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>.

A diferencia de *TCRD*, *TCRG* no está suprimido en las células del linaje TCR $\alpha\beta$ . Debido a que los reordenamientos de *TCRG* se dan en los precursores de los linajes TCR $\alpha\beta$  y TCR $\gamma\delta$ , no se puede usar su identificación para la determinación del tipo de linaje de las células T. De forma similar, los reordenamientos de *TCRG* se dan en 60% de las LLA de linaje B,<sup>30</sup> lo que implica que no se pueden usar para el estudio del linaje de células B frente al linaje de células T en las proliferaciones inmaduras.

Sin embargo, se dan con mucha menor frecuencia en los trastornos linfoproliferativos B maduros, que incluyen la mayoría de LNH-B,<sup>1</sup> y se podrían usar, por lo tanto, combinados con los datos clínicos e inmunofenotípicos para determinar la implicación del linaje en los trastornos linfoproliferativos maduros.

El repertorio limitado de la línea germinal permite la determinación de la utilización de los segmentos V $\gamma$  y J $\gamma$ , mediante transferencia Southern o análisis de PCR. La identificación del uso de V $\gamma$  y J $\gamma$  no tiene un interés puramente académico, ya que la amplificación específica es necesaria para el análisis de la ERM.<sup>112</sup>

Los autores de la presente invención emprendieron el desarrollo de un número mínimo de estrategias de *TCRG* múltiplex que mantendrían una sensibilidad y una informatividad óptimas, minimizarían el riesgo de resultados falsos positivos y permitirían la identificación de V $\gamma$  y J $\gamma$  simple, que incluye el análisis HD o las estrategias de GS monofluorescente. Los autores de la presente invención eligieron incluir cebadores V $\gamma$  que detectaban todos los segmentos que se reordenaban distintos de  $\psi$ V $\gamma$ B ( $\psi$ V $\gamma$ 12), dada su baja frecuencia. Para reducir el riesgo de identificar en falso reordenamientos canónicos como productos clonales, los autores de la presente invención excluyeron el cebador J $\gamma$ 1.2, ya que raramente está implicado en las neoplasias linfoides y está asociado normalmente, aunque no siempre, a un reordenamiento de *TCRG* en el otro alelo.<sup>113</sup>

#### 35 Diseño de cebadores

Los autores de la presente invención desarrollaron inicialmente 3 cebadores V $\gamma$  y 2 J $\gamma$ , para usarlos en dos reacciones múltiplex, como sigue: un tubo con J $\gamma$ 1.3/2.3 con V $\gamma$ 9 específico (160-190 pb), V $\gamma$ fl consenso (200-230 pb) y V $\gamma$ 10/11 consenso (220-250 pb) y un segundo tubo con J $\gamma$ 1.1/2.1 con V $\gamma$ 9 específico (190-220 pb), V $\gamma$ fl consenso (230-260 pb) y V $\gamma$ 10/11 consenso (250-280 pb). El uso de V $\gamma$  se iba a identificar por el tamaño de los productos de PCR mediante análisis HD. No se intentó una distinción entre J $\gamma$ 1.3 y J $\gamma$ 2.3 o J $\gamma$ 1.1 y J $\gamma$ 2.1.

#### Resultados de la fase de ensayo inicial

Aunque todas las combinaciones V $\gamma$ -J $\gamma$  proporcionaron los perfiles esperados en una amplificación de PCR simple, la amplificación múltiplex condujo a la competición de productos de PCR mayores, con la amplificación preferente de fragmentos más pequeños, y el fracaso para detectar ciertos reordenamientos V $\gamma$ fl y V $\gamma$ 10/11. Esto se complicó adicionalmente por la formación significativa de dímeros de cebadores entre los cebadores V $\gamma$ 10/11 consenso y los cebadores V $\gamma$ fl. La competición entre los fragmentos de diferentes tamaños y la formación de dímeros de los cebadores condujo a una sensibilidad e informatividad insatisfactorias, y por lo tanto se abandonó esta estrategia.

Los autores de la presente invención razonaron que la competición se minimizaría separando los cebadores V $\gamma$  usados más habitualmente (V $\gamma$ fl y V $\gamma$ 9) y combinándolos con cebadores específicos V $\gamma$ 10 y V $\gamma$ 11, respectivamente. Estos últimos reordenamientos se usan de manera infrecuente, y por lo tanto minimizan la competición por los repertorios predominantes. El cebador consenso V $\gamma$ 10/11 se sustituyó, por lo tanto, por dos cebadores V $\gamma$  específicos que generaron productos de PCR más pequeños (Figura 8B). Mezclando J $\gamma$ 1.3/2.3 y J $\gamma$ 1.1/2.1 fue posible mantener un múltiplex de dos tubos que permite la identificación aproximada basándose en el tamaño de los productos del uso de V $\gamma$  mediante análisis HD y del uso de J $\gamma$  y V $\gamma$  mediante análisis GS.

El conjunto aprobado de tubos de PCR de *TCRG* múltiplex con cuatro cebadores V $\gamma$  y dos cebadores J $\gamma$  incluye (Figura 8B):

Tubo A: V $\gamma$ fl + V $\gamma$ 10 + J $\gamma$ 1.1/2.1 + J $\gamma$ 1.3/2.3

Tubo B: V $\gamma$ 9 + V $\gamma$ 11 + J $\gamma$ 1.1/2.1 + J $\gamma$ 1.3/2.3

5 La posición y la secuencia de los cebadores se muestra en la Figura 8B. Estos cebadores proporcionaron una amplificación satisfactoria en los formatos de PCR simple y múltiple, y permitieron la detección de prácticamente todas las combinaciones V $\gamma$ -J $\gamma$  conocidas. No se observó más la competición de fragmentos de PCR mayores, aunque no se puede excluir que se pueda dar cierta competición de reordenamientos de V $\gamma$ 9 o V $\gamma$ fl si éstos están presentes en una población minoritaria.

10 La sensibilidad de la detección varió entre 1% y 10%, en función de la complejidad del repertorio policlonal y de la posición del reordenamiento clonal respecto del pico Gaussiano policlonal.<sup>114</sup> La interpretación de los reordenamientos de  $\psi$ V $\gamma$ 11 puede ser difícil, ya que el repertorio normal está extremadamente limitado, y ya que estos reordenamientos primitivos están presentes a menudo en los subclones.

15 Debido a que el segmento V $\gamma$ 4 es aproximadamente 40 pb más largo que los otros miembros de V $\gamma$ fl y que los reordenamientos de V $\gamma$ 4 son relativamente habituales en las células linfoides tanto fisiológicas como patológicas, el repertorio policlonal puede estar sesgado hacia fragmentos de tamaños mayores, y los reordenamientos V $\gamma$ 4-J $\gamma$ 1.3/2.3 clonales se podrían confundir teóricamente con los reordenamientos V $\gamma$ fl-J $\gamma$ 1.1/2.1. La proximidad de los diferentes repertorios hace también la identificación de V $\gamma$  y J $\gamma$  mucho más fiable si se usan cebadores J $\gamma$  marcados de forma diferencial. Por ejemplo, se analizó el uso de un J $\gamma$ 1.1/2.1 marcado con TET y un J $\gamma$ 1.3/2.3 marcado con FAM en un único centro, y se demostró que proporcionaba resultados satisfactorios (Figura 13B). Es posible, sin embargo, estimar el uso de V $\gamma$  y J $\gamma$  tras el análisis GS basándose solamente en el tamaño (Figuras 8C y D).

20 Resultados de la fase de ensayo general

25 Dado el repertorio de *TCRG* de la línea germinal limitado y la diversidad de unión limitada, los linfocitos T reactivos que han experimentado reordenamientos de *TCRG* mediante el uso de un único segmento V $\gamma$  y J $\gamma$  con las secuencias CDR3 variables que tienen una longitud uniforme, migrarán en forma de una población aparentemente clonal mediante análisis GS. La formación de HD dispersará estos reordenamientos más fácilmente, y por lo tanto evitará su interpretación errónea como prueba de la clonalidad linfoide. En contraste, el análisis GS proporciona una resolución y sensibilidad mejoradas en comparación con el análisis HD. Por estas razones, el estudio óptimo de los reordenamientos de *TCRG* requiere tanto el análisis HD como el análisis GS. Si esto no es posible, probablemente es preferible el análisis HD solamente, ya que podría estar asociado a un riesgo de resultados falsos negativos, mientras el análisis GS solo incrementará los resultados falsos positivos.

30 De los 18 reordenamientos de *TCRG* detectados mediante transferencia Southern en los 90 casos, 16 se detectaron también mediante PCR. El reordenamiento V $\gamma$ fl-J $\gamma$ 1.3/2.3 menor detectado mediante transferencia Southern en el caso oligoclonal de NL-1 se detectó solamente mediante PCR en una proporción de laboratorios que realizaban el análisis GS. Se descubrió que un reordenamiento V $\gamma$ 9-J $\gamma$ 1.3/2.3 importante detectado en GBS-6 fue policlonal mediante HD y GS en todos los laboratorios y, como tal, probablemente representa un resultado falso negativo.

35 La comparación de la identificación de alelos demostró que, para todos los alelos identificados mediante transferencia Southern, la identificación de V $\gamma$  y J $\gamma$  mediante PCR basándose en el tamaño proporcionó resultados concordantes. Se detectaron siete reordenamientos mediante transferencia Southern, pero no fue posible la identificación precisa de los alelos. Seis de éstos se debieron al uso de J $\gamma$ 1.1/2.1, lo que sugiere que la PCR permite la detección preferente de este tipo de reordenamiento.

40 Se consideró que setenta y dos muestras eran policlonales mediante transferencia Southern. Dieciséis (22%) de éstas mostraron un total de 24 reordenamientos mediante PCR de *TCRG*. De éstas, 13 (81%) fueron proliferaciones linfoides B. Dieciséis de los 24 reordenamientos clonales fueron menores, y solamente 15 se detectaron mediante GS en la mayoría de los laboratorios. Merece la pena indicar que, de estos reordenamientos menores, nueve (39%) implicaron el segmento  $\psi$ V $\gamma$ 10 y ocho (33%) V $\gamma$ 9. No se detectaron reordenamientos de  $\psi$ V $\gamma$ 11. No se detectaron reordenamientos de  $\psi$ V $\gamma$ 10 mediante el análisis de transferencia Southern. La PCR, por lo tanto, permitió una detección más sensible de los reordenamientos de  $\psi$ V $\gamma$ 10 clonales menores, en particular mediante el análisis GS. Es probable que estos reordenamientos representen linfocitos T de un linaje predominantemente TCR $\alpha\beta$ , residuales, con un repertorio limitado, que pueden estar relacionados o no con el tumor maligno linfoide B subyacente. Estos picos menores no se deberían interpretar, obviamente, como una prueba de un trastorno de células T clonales. Acentúan la importancia de entender la naturaleza de los reordenamientos de *TCRG* antes de usar este locus como una diana de PCR en el ámbito del diagnóstico de la clonalidad linfoide. Por lo tanto, también es extremadamente importante interpretar los resultados del gen *TCRG* dentro de su contexto clínico.

#### Conclusión

55 En conclusión, los dos tubos múltiple de *TCRG* permiten la detección de la gran mayoría de reordenamientos de *TCRG* clonales. El riesgo potencial de resultados falsos positivos debido a la sobreinterpretación de picos clonales menores se puede minimizar mediante el uso combinado del análisis de heterodúplex y el análisis GeneScanning e interpretando los resultados dentro de su contexto clínico, en particular cuando la clonalidad aparente implica los

segmentos  $\psi V\gamma 10$  y  $\psi V\gamma 11$ . Se debería estudiar el mérito relativo del análisis de *TCRG* en comparación con el análisis de *TCRB* en el futuro para la detección de trastornos linfoproliferativos T clonales. Es probable que representen estrategias complementarias.

Ejemplo 7. Reordenamientos del gen *TCRD*: V $\delta$ -D $\delta$ -J $\delta$ , D $\delta$ -D $\delta$ , V $\delta$ -D $\delta$ , y D $\delta$ -J $\delta$

## 5 Antecedentes

El locus del gen *TCRD* humano está localizado en el cromosoma 14q11.2 entre los segmentos génicos V $\alpha$  y J $\alpha$ . La parte principal del locus de *TCRD* (D $\delta$ -J $\delta$ -C $\delta$ ) está flanqueada por elementos de delección de *TCRD*,  $\psi J\alpha$  y  $\delta$ REC de forma que el reordenamiento de los elementos de delección entre sí o el reordenamiento de los segmentos génicos V $\alpha$  a J $\alpha$  provoca la delección del locus del gen *TCRD* intermedio (Figura 9A). El locus de *TCRD* codificado por la línea germinal consiste en los segmentos génicos 8V $\delta$ , 4J $\delta$ , y 3D $\delta$ , de los cuales al menos cinco de los ocho segmentos génicos V $\delta$  se pueden reordenar también con los segmentos génicos J $\alpha$ .<sup>115</sup> También se pueden utilizar otros segmentos génicos V $\alpha$  en los reordenamientos del gen *TCRD* en casos poco frecuentes. La nomenclatura WHO-IUIS<sup>116</sup> para los segmentos génicos de TCR usa un sistema de numeración diferente para los genes V usados principalmente o exclusivamente en las cadenas TCR $\delta$  del que se puede utilizar en cualquiera de las cadenas TCR $\alpha$  o TCR $\delta$ . Así, *TCRDV101S1* (V $\delta 1$ ), *TCRDV102S1* (V $\delta 2$ ) y *TCRDV103S1* (V $\delta 3$ ) se usan casi exclusivamente en los reordenamientos de *TCRD*, mientras *TCRADV6S1* (V $\delta 4$ ), *TCRADV21S1* (V $\delta 5$ ) y *TCRADV17S1* (V $\delta 6$ ) se pueden usar en las cadenas TCR $\delta$  o  $\alpha$ . *TCRADV28S1* (V $\delta 7$ ) y *TCRADV14S1* (V $\delta 8$ ) se usan de manera muy poco frecuente en los reordenamientos de *TCRD*.

El repertorio codificado por la línea germinal de las células T TCR $\gamma\delta^+$  es pequeño en comparación con el de las células T TCR $\alpha\beta^+$ , y el repertorio combinatorio es aún más limitado debido a la recombinación preferente en células T TCR $\gamma\delta^+$  de sangre periférica y timocitos. En el nacimiento, el repertorio de células T TCR $\gamma\delta^+$  de sangre de cordón es amplio, sin ninguna restricción aparente o expresión preferida de combinaciones V $\gamma$ /V $\delta$  particulares. Durante la infancia, sin embargo, el repertorio de células T TCR $\gamma\delta^+$  de sangre periférica se perfila extraordinariamente de forma que las células V $\gamma 9$ /V $\delta 2$  predominan claramente en los adultos.<sup>117</sup> Los estudios han demostrado que los repertorios V $\delta 1$  y V $\delta 2$  se limitan con la edad, lo que conduce a la aparición de células V $\delta 1^+$  y V $\delta 2^+$  oligoclonales en la sangre y el intestino.<sup>118</sup> Las células T TCR $\gamma\delta^+$  están distribuidas de manera uniforme por todos los tejidos linfoides humanos, pero existe una expresión preferente de segmentos V $\delta$  particulares en las localizaciones anatómicas especificadas. De manera notable, la mayoría de células T TCR $\gamma\delta$  intraepiteliales que se dan en el intestino delgado y el colon expresan V $\delta 1$ . De manera similar, las células T TCR $\gamma\delta^+$  de bazo normal expresan V $\delta 1$ , pero las células T TCR $\gamma\delta^+$  de la piel expresan el gen V $\delta 2$ .

Aunque el pequeño número de segmentos génicos V, D y J disponibles para la recombinación limita la diversidad combinatoria potencial, la diversidad de CDR3 o de unión es extensa debido a la adición de las regiones N, las regiones P y la delección aleatoria de nucleótidos por las recombinasas. Esta diversidad se amplía también por la recombinación de hasta tres segmentos D $\delta$ , y por lo tanto hasta cuatro regiones N dentro del locus de *TCRD* reordenado. Esta diversidad de la línea germinal limitada codificada en el locus de *TCRD* junto con la diversidad de unión extensa da como resultado una diana útil para el análisis de PCR, y se han usado los sucesos de recombinación de *TCRD* exhaustivamente como marcadores clonales en la leucemia linfoblástica aguda (LLA) de células T y B.<sup>119,120</sup> El locus de *TCRD* es el primero de todos los locus de TCR en reordenarse durante la ontogenia de las células T. El primer suceso es un reordenamiento D $\delta 2$ -D $\delta 3$ , seguido por un reordenamiento V $\delta 2$ -(D $\delta 1$ -D $\delta 2$ )-D $\delta 3$ , y finalmente un reordenamiento V $\delta$ -D $\delta$ -J $\delta$ . Los reordenamientos inmaduros (V $\delta 2$ -D $\delta 3$  o D $\delta 2$ -D $\delta 3$ ) se dan en el 70% de LLA de células B precursoras (y por lo tanto no están limitados a un linaje)<sup>30</sup>, a la vez que existe un predominio de los reordenamientos maduros que comprenden los D $\delta 2$ -J $\delta 1$  incompletos y V $\delta 1$ , V $\delta 2$ , V $\delta 3$  a J $\delta 1$  completos hallados en LLA-T.<sup>23,121</sup> Así, se pueden usar conjuntos de cebadores específicos para identificar los diferentes tipos de reordenamientos completos e incompletos que corresponden a los diferentes tipos de LLA.<sup>122</sup>

Las LLA-T TCR $\gamma\delta^+$  forman un subgrupo relativamente pequeño de LLA, que representa 10-15% de LLA-T pero que constituye todavía solamente 2% de todas las LLA. Los reordenamientos V $\delta 1$ -J $\delta 1$  predominan en LLA-T TCR $\gamma\delta^+$ ; de manera interesante, V $\delta 1$  no se halla nunca combinado con los segmentos J $\delta$  distintos de J $\delta 1$ .<sup>15,20</sup> Otras recombinaciones se dan en menos del 25% de los alelos. Además, las cadenas V $\delta 1$ -J $\delta 1$ -C $\delta$  están casi siempre unidas por puentes disulfuro a las familias génicas V $\gamma I$  o V $\gamma II$  recombinadas con J $\gamma 2.3$ -C $\gamma 2$ . Tal uso de los genes es coherente con el origen tímico inmaduro de estas células leucémicas.

La mayoría de linfomas de células T expresan TCR $\alpha\beta$ , mientras la minoría expresa TCR $\gamma\delta$  y comprende varias entidades diferentes. Los linfomas de células T periféricas (LCTP) que expresan TCR $\gamma\delta$  comprenden 8-13% de todos los LCTP, y se han documentado recombinaciones V $\delta 1$ -J $\delta 1$  así como otras recombinaciones V $\delta$  a J $\delta 1$ .<sup>123,124</sup> El linfoma de células T  $\gamma\delta$  hepatoesplénico procede de las células T TCR $\gamma\delta$  esplénicas que expresan normalmente V $\delta 1$ . Es una entidad poco común que exhibe características clinicopatológicas distintivas, y el análisis del uso de genes ha indicado reordenamientos V $\delta 1$ -J $\delta 1$  clonales asociados con estos linfomas.<sup>125</sup> Además, el tipo infrecuente de linfomas de células T TCR $\gamma\delta^+$  cutáneas expresa V $\delta 2$ , y por lo tanto parece representar una expansión clonal de células T TCR $\gamma\delta^+$  que residen normalmente en la piel.<sup>126</sup> Otras proliferaciones de TCR $\gamma\delta$  clonales incluyen las proliferaciones de linfocitos granulares grandes (LGL) CD3+ TCR $\gamma\delta^+$  que comprenden aproximadamente 5% de todas las LGL CD3+ y a menudo muestran reordenamientos V $\delta 1$ -J $\delta 1$ .<sup>127</sup>

El desarrollo de anticuerpos monoclonales hacia las regiones marco de TCR $\gamma\delta$  y más recientemente hacia segmentos génicos V $\delta$  específicos ha ayudado a identificar las poblaciones de células T TCR $\gamma\delta^+$  mediante análisis de citometría de flujo,<sup>15</sup> pero todavía son necesarios estudios de clonalidad mediante PCR para identificar si estas poblaciones representan expansiones clonales o policlonales.<sup>128</sup>

## 5 Diseño de cebadores

Los segmentos génicos de *TCRD*, que consisten en ocho segmentos génicos V $\delta$ , cuatro J $\delta$  y tres D $\delta$ , muestran poca o ninguna homología entre sí, y así se diseñaron cebadores específicos de segmento que no mostrarían renaturalización cruzada con otros segmentos génicos. El uso de los segmentos génicos V $\delta 7$  y V $\delta 8$  se consideró demasiado infrecuente para justificar la inclusión de los cebadores de estos segmentos y así, siguiendo las directrices generales para el diseño de cebadores, se diseñó un total de 16 cebadores: 6 V $\delta$ , 4 J $\delta$  y 5' y 3' de los 3 segmentos génicos D $\delta$  (Figura 9B). Todos los cebadores se diseñaron para PCR múltiplex juntos en cualquier combinación, pero en principio se planeó tener un tubo (A) con todos los cebadores V y todos los cebadores J que amplificarían todos los reordenamientos V(D)J completos y un segundo tubo (B) con cebadores V $\delta 2$ , D $\delta 2$ -5', D $\delta 3$ -3' y J $\delta 1$  para amplificar los principales reordenamientos parciales (V $\delta 2$ -D $\delta 3$ , D $\delta 2$ -D $\delta 3$  y D $\delta 2$ -J $\delta 1$ ). En conjunto, estos tubos deberían amplificar 95% de los reordenamientos conocidos. Los otros cebadores (D $\delta 1$ -5', D $\delta 3$ -5', D $\delta 1$ -3' y D $\delta 2$ -3') se podrían usar para amplificar otros reordenamientos D $\delta$ -J $\delta$ , V $\delta$ -D $\delta$  o D $\delta$ -D $\delta$ , pero siempre se pretendería que fueran opcionales.

### Resultados de la fase de ensayo inicial

Todas las combinaciones de pares de cebadores se analizaron mediante el uso de ADN policlonal (amígdala y MNC). La mayoría de ellas proporcionaron productos del tamaño esperado, pero algunas (D $\delta 1$ -5', D $\delta 1$ -3' y D $\delta 2$ -3') no proporcionaron un producto visible combinadas con cualquier otro cebador. Es probable que los reordenamientos que implican las regiones de estos cebadores sean extremadamente infrecuentes, así que éstos, y D $\delta 3$ -5', se excluyeron de los ensayos posteriores. Se analizaron casos clonales en busca de los seis reordenamientos principales (V $\delta 1$ -J $\delta 1$ , V $\delta 2$ -J $\delta 1$ , V $\delta 3$ -J $\delta 1$ , D $\delta 2$ -D $\delta 3$ , V $\delta 2$ -D $\delta 3$  y D $\delta 2$ -J $\delta 1$ ) inicialmente en una PCR monoplex y después en los tubos A y B múltiplex (véase lo anterior). Las diluciones seriadas del ADN clonal en ADN policlonal (amígdala o MNC) mostraron sensibilidades de detección de al menos 5% en todos los casos. Sin embargo, en los casos clonales con reordenamientos bialélicos, que se detectaron claramente en reacciones simples de PCR, el segundo alelo, normalmente mayor, no se pudo amplificar en condiciones múltiplex. Además, se descubrió, mediante el uso de un grupo diferente de casos clonales, que no se pudieron amplificar varios de los reordenamientos V $\delta 2$ -J $\delta 1$ . Posteriormente se identificó un sitio polimórfico en la posición del cebador V $\delta 2$  original;<sup>129</sup> la frecuencia de este polimorfismo en la población general es desconocida, y así se rediseñó este cebador hasta una región nueva del segmento génico V $\delta 2$ , se volvió a someter a ensayo y se descubrió que se amplificaba en todos los casos. El problema sobre la incapacidad de amplificar el segundo alelo se superó incrementando la concentración de MgCl<sub>2</sub> de 1,5 mM a 2,0 mM.

Los autores de la presente invención también sometieron a ensayo la posibilidad de combinar los dos tubos en una única reacción múltiplex. Se sometieron a ensayo doce casos clonales, que tuvieron un total de 21 reordenamientos génicos entre ellos. Se usó un único tubo múltiplex que contenía 12 cebadores (6 V $\delta$ , 4 J $\delta$ , D $\delta 2$ -5' y D $\delta 3$ -3') con tampón ABI Gold y MgCl<sub>2</sub> 2,0 mM para amplificar todos los casos. De hecho, se detectaron todos los reordenamientos génicos con una sensibilidad de 0,5-10% mediante análisis HD cuando se diluyeron en ADN de MNC policlonal (Tabla 7). El único problema con la combinación de todos los cebadores de *TCRD* en un único tubo fue la aparición de una banda inespecífica de aproximadamente 90 pb en todas las amplificaciones, que no estuvo presente cuando se usaron los dos tubos múltiplex por separado. Debido a que la banda estaba fuera del intervalo de tamaños de los productos de *TCRD* y no interfirió con la interpretación, no se consideró que fuera un problema.

### Resultados de la fase de ensayo general

El ensayo de las 90 muestras definidas mediante transferencia Southern en diez laboratorios generó ciertas cuestiones generales sobre el protocolo de *TCRD*:

La interpretación de ciertos resultados de GS fue difícil. Debido al gran intervalo de tamaños de los productos para el locus de *TCRD*, no hay una distribución Gaussiana clásica para las muestras policlonales (véase la Figura 9C) y esto, unido al uso bajo de *TCRD* en muchas muestras, significó que en ciertos casos fue difícil determinar si una muestra era policlonal o clonal. Este mismo problema no surgió con el análisis HD, y así la recomendación es que solamente se debería usar el análisis GS para *TCRD* con un gran cuidado y el conocimiento de los problemas potenciales.

La banda inespecífica de 90 pb fue bastante intensa en ciertos laboratorios, pero menor en otros. Pareció ser más débil cuando se usó el tampón II en vez del tampón Gold (confirmado por los ensayos posteriores) y es también sensible a la concentración de MgCl<sub>2</sub>, y se hace más intensa a medida que se incrementa la concentración de MgCl<sub>2</sub>. Este producto se ha secuenciado y se ha descubierto que es un gen no relacionado mediante la utilización de los cebadores D $\delta 2$  y J $\delta 3$ .

Los resultados del ensayo general de las 90 muestras definidas mediante transferencia Southern demostraron que la

concordancia global de todos los grupos de PCR que realizaron el ensayo fue muy elevada (95%). De los 90 casos, seis fueron positivos mediante transferencia Southern para los reordenamientos clonales de *TCRD*, cinco de los cuales se descubrió que eran clonales mediante PCR. Todos los laboratorios descubrieron que el caso restante (DE-10, una LLA-T con una carga tumoral elevada) era policlonal. De los 84 casos negativos mediante transferencia Southern, se descubrió que 75 eran policlonales mediante PCR, se descubrió que cuatro eran clonales y los cinco casos restantes mostraron discordancias entre los resultados mediante GS y HD. De los casos clonales, dos (DE-2 y GBS-9) fueron LNH-B ricas en T con una carga tumoral presumiblemente baja, y así los resultados pueden reflejar la sensibilidad más alta de la PCR sobre la transferencia Southern. Los otros dos casos clonales (GBS-15 y ES-7) tuvieron una carga tumoral elevada. De los cinco casos, que mostraron discrepancias entre los resultados de GS y HD, uno (NL-1) fue un caso oligoclonal difícil, que causó problemas para otros diversos loci. Se descubrió que los cuatro restantes eran policlonales mediante HD y clonales mediante GS. En tres de los casos (NL-13, N-15 y NL-18) esto puede reflejar la sensibilidad mayor del análisis GS sobre el análisis HD, pero el caso restante (PT-1, un nódulo linfático reactivo) se puede atribuir a la "pseudoclonalidad" en el análisis GS debido al repertorio limitado del uso de *TCRD* en ciertas muestras.

## 15 Conclusión

En conclusión, el protocolo recomendado para la detección de los reordenamientos del gen *TCRD* es un análisis de un único tubo que contiene 12 cebadores para la detección de los principales reordenamientos V $\delta$ (D)J $\delta$ , V $\delta$ -D $\delta$ , D $\delta$ -D $\delta$  y D $\delta$ -J $\delta$  mediante el uso de tampón II y MgCl<sub>2</sub> 2,0 mM para asegurar la máxima especificidad y detección. El método de análisis preferido es HD, pero se puede usar GS con cuidado si se tienen en cuenta los problemas de pseudoclonalidad provocados por el uso limitado de *TCRD* en ciertas muestras. Sin embargo, el uso del análisis GeneScanning multicolor (véase la Figura 13C) puede ser útil en el reconocimiento rápido de los diferentes tipos de reordenamientos del gen *TCRD* completos e incompletos en los diferentes tipos de LLA. Con estas limitaciones en mente, *TCRD* puede ser, no obstante, una diana valioso para las leucemias de células T más inmaduras, así como para las proliferaciones de células T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>.

## 25 Ejemplo 8. t(11;14) con reordenamiento *BCL1-IGH*

### Antecedentes

La t(11;14)(q13;q32) es característica del linfoma de las células del manto (LCM) debido a que esta translocación recíproca citogenética se ha observado en 60-70% de casos de LCM y solamente de manera esporádica en otros LNH de células B.<sup>130</sup> La región de rotura fue clonada originariamente por Tsujimoto et al (1983) y denominada región *BCL1*.<sup>131</sup> Sin embargo, solamente en unos casos con una t(11;14) citogenética se identificó un punto de rotura genómico en la región *BCL1*. Mediante el uso de FISH de fibras y en interfase con sondas que cubren la región 11q13-*BCL1* de aproximadamente 750 kb, en casi todas las LCM (33 de 34) se observó un punto de rotura, y todos los puntos de rotura estaban limitados en una región de 360 kb en 5' del gen D1 de ciclina.<sup>132,133</sup> En casi la mitad de los casos de LCM (41%), los puntos de rotura estuvieron agrupados dentro de una región de 85 pb que se denominó región de agrupamiento principal de translocaciones, *BCL1-MTC*.<sup>130,134,135</sup> En la mayoría de los casos de LCM, si no en todos, la rotura en el locus de *IGH* localizada en 14q32 implica los genes JH que yuxtaponen el potenciador *IGH*-E $\mu$  en las secuencias del cromosoma 11q13 y por lo tanto dan como resultado la activación transcripcional del gen de ciclina D1.<sup>135</sup> La ciclina D1 junto con CDK4 fosforila (e inactiva) pRB y permite la progresión por la fase G1 del ciclo celular. Debido a que la ciclina D1 es silenciosa en los linfocitos B y en LNH de células B distinto de LCM, y la presencia de esta translocación se correlaciona bien con la expresión de la ciclina D1, se considera que este gen es la diana biológica relevante en LCM.<sup>136</sup> La expresión de la ciclina D1 y/o la presencia de t(11;14)(q13;q32) se usa como una herramienta adicional en el diagnóstico diferencial de LNH.<sup>2</sup> La estrategia de detección de referencia para la presencia de t(11;14) que identificará casi todos los puntos de rotura es la FISH en interfase mediante el uso de sondas flanqueantes del punto de rotura en material reciente o congelado<sup>133</sup>, así como en muestras archivadas.<sup>137</sup> Sin embargo, podría ser útil una estrategia de detección basada en PCR para t(11;14), p. ej., para el control de la enfermedad residual. Muchos grupos han desarrollado análisis basados en PCR para detectar los puntos de rotura *BCL1/JH*, en general mediante el uso de un cebador JH consenso combinado con cebadores de la región *BCL1-MTC* que estaban todos localizados en una región de 392 pb.<sup>54,55</sup> Las roturas dentro de la región *BCL1-MTC* se pueden dar hasta 2 kb aguas abajo de la región MTC, pero la mayoría de los puntos de rotura están muy agrupados dentro de un segmento de 85 pb, inmediatamente aguas abajo del cebador más 3' referido ("cebador B" en<sup>54,134</sup>). Debido a que las roturas en esta región *BCL1-MTC* suponen solamente parte de los puntos de rotura de la región 11q13-*BCL1* en los casos de LCM (41%), la estrategia basada en PCR para t(11;14) reduce seriamente la capacidad de diagnóstico con una tasa elevada de resultados falsos negativos en comparación con FISH.

Se ha informado también de que t(11;14)(q13;q32) se observa en otras enfermedades proliferativas de células B tales como mieloma múltiple (20%), SLVL (30%), LPL-B (33%) y LLC-B (8%).<sup>130,138,139</sup> Una razón para la presencia de t(11;14) en LLC-B en ciertos estudios podría ser debida a la clasificación incorrecta de LLC-B.<sup>130</sup> En el mieloma, los puntos de rotura son bastante diferentes de los de LCM debido a que (i) la frecuencia es mucho menor; (ii) la mayoría de las roturas implican sitios de recombinación de cambio de clase; y (iii) aunque todos los casos sometidos a ensayo están localizados en la misma región de *BCL1* de 360 kb, no parece haber un agrupamiento preferente dentro de la región *BCL1-MTC*. Por otra parte, en todos los casos con una rotura está activado el gen de ciclina D1. Es de destacar, en un subgrupo de mielomas múltiples con un *myeou* con rotura modificada de *IGH*, que está

implicada una región adicional en la región 11q13-*BCL1*.<sup>138</sup>

#### Diseño de cebadores

Basándose en la localización del punto de rotura más en 5' referido y las secuencias de nucleótidos disponibles de la región *BCL1*-MTC (número de acceso de GenBank S77049), los autores de la presente invención diseñaron un único cebador *BCL1* (5'-GGATAAAGGCGAGGAGCATAA-3') en la región de 472 pb en 5' de este punto de rotura mediante el uso del programa de diseño de cebadores OLIGO 6.2 respecto del cebador JH consenso.

#### Resultados de la fase de ensayo inicial

Mediante el uso del cebador JH consenso combinado con el cebador único *BCL1*-MTC en una pequeña serie de LCM (n=5) identificada previamente como positiva con una PCR de *BCL1*/JH interna mediante el uso de un cebador JH18 consenso (18 nt) similar y 5'-GCACTGTCTGGATGCACCGC-3' como cebador *BCL1*-MTC, los autores de la presente invención compararon inicialmente ambos análisis en paralelo. En contraste con el análisis de los reordenamientos de los genes de Ig/TCR por medio del análisis GS y/o análisis HD, los productos de la PCR de *BCL1*-JH (como para los productos de *BCL2*-JH) se identifican por medio de una electroforesis en gel de agarosa usando solamente una tinción de bromuro de etidio. Los resultados de las cinco muestras positivas y las dos negativas fueron idénticos, excepto en que los productos de PCR fueron significativamente más débiles. Para determinar si los autores de la presente invención podría incrementar la sensibilidad de la PCR, los autores de la presente invención determinaron el efecto de diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub> y cebadores, y diferentes temperaturas en un aparato de PCR Stratagene-Robocycler (todas las demás PCR se llevaron a cabo en ABI-480 o ABI-9700). Lo más intrigante fue la variación debida a pequeños cambios en la concentración de MgCl<sub>2</sub>. A 2,0 mM se hizo evidente un producto inespecífico débil de 550 pb, mientras a 2,5 mM y más este producto inespecífico fue muy prominente en todos los ADN, lo que incluye los controles de ADN que no eran moldes. A concentraciones menores (menores de 1,5 mM) no se observaron fragmentos inespecíficos, pero los productos específicos esperados fueron muy débiles.

Las hibridaciones con una oligo-sonda interna de *BCL1*-MTC (5'-ACCGAATATGCAGTGCAGC-3') no mostraron hibridación con este producto de 550 pb. Las PCR con cada uno de los cebadores por separado revelaron que el producto de 550 pb se podía generar mediante el uso del cebador consenso JH solamente. En ciertos casos de LCM, además de los productos de PCR que oscilaban en 150-350 pb (Figura 10B), podrían ser evidentes productos de PCR específicos mayores debido a la renaturalización del cebador JH consenso con segmentos JH5 y JH6 aguas abajo tal como se describió para *BCL2*/JH.<sup>140</sup> A partir de la fase de ensayo inicial, las condiciones de PCR más óptimas para la PCR de *BCL1*-MTC/JH fueron: temperatura de renaturalización de 60°C, MgCl<sub>2</sub> 2,0 mM y 10 pmol de cada cebador (para 35 ciclos de PCR en el ABI 9700).

Para determinar la especificidad de la PCR en una serie mayor de casos, se llevó a cabo la PCR de *BCL1*-MTC/JH en tres laboratorios con ADN de un total de 25 casos de LCM que se identificaron previamente como positivos mediante PCR de *BCL1*/JH interna, y de 18 controles negativos. Ninguno de los casos negativos reveló un producto de PCR, mientras 22 de 25 casos positivos mostraron productos del tamaño esperado. En los tres casos que no revelaron un producto en el gel de agarosa, se detectó un producto con GS, lo que sugiere que la sensibilidad es menor cuando se compara con la PCR interna.

La sensibilidad de la PCR se determinó amplificando diluciones de ADN de una LCM en ADN de amígdala normal. Se observó una sensibilidad de entre 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-4</sup> en el gel de agarosa mediante el uso de los cebadores de PCR desarrollados. Una PCR interna llevada a cabo en paralelo con las mismas muestras fue al menos 10x más sensible. Las hibridaciones con la oligo-sonda de *BCL1*-MTC interna revelaron una sensibilidad 10-100x mayor de ambas PCR. Se usan diluciones con ADN de una línea celular JVM2 establecida (disponible de DSMZ; <http://www.dsmz.de>) con un punto de rotura *BCL1*-MTC/JH<sup>53</sup> como control positivo estándar. Como control negativo, se podría usar tejido de amígdala normal o células de sangre periférica, pero casi cualquier LNH de células B que no sea LCM debería ser adecuado debido a la frecuencia muy baja de estas anomalías.<sup>130</sup>

#### Resultados de la fase de ensayo general

Para estudiar las variaciones entre laboratorios para la detección de los puntos de rotura en la región *BCL1*-MTC, diez grupos participaron en el análisis de ADN de una serie de 90 linfoproliferaciones malignas y reactivas definidas histológicamente mediante el uso del protocolo de PCR de *BCL1*-MTC/JH. Todos los casos se definieron por su estado en los loci de Ig y TCR mediante el uso de técnicas de hibridación Southern. De los 90 casos, siete se caracterizaron histológicamente como LCM. Se demostró que los siete casos de LCM tenían un reordenamiento de *IGH* clonal mediante hibridación Southern. La determinación de los reordenamientos dentro de la región de *BCL1*-MTC en el cromosoma 11q13 mediante hibridación Southern o FISH no se llevó a cabo en todos los casos. En seis de los siete casos de LCM, el producto de PCR se identificó en los diez laboratorios. En el caso de LCM NL-15 en seis de los laboratorios se identificó el producto de PCR esperado de 1,8 kb. Este caso particular porta un punto de rotura excepcional con un producto de PCR grande poco común (normalmente oscilan de 150 a 350 pb) y representa el punto de rotura de *BCL1*-MTC detectable más lejano aguas abajo conocido. En dos de los seis laboratorios, se observó el producto de PCR pero inicialmente se consideró inespecífico debido a su tamaño poco

común. En ES-4, caracterizado histológicamente como LCM, no se pudo detectar en ninguno de los diez laboratorios un producto de PCR, lo que sugiere que este caso porta un punto de rotura fuera de *BCL1*-MTC. Se debería subrayar que los casos de LCM presentados en esta serie para la fase de ensayo general fueron seleccionados, y así se espera que porten roturas en la región *BCL1*-MTC con una incidencia superior a la normal. De manera importante, excepto para un único caso (FR-1), en los demás 83 casos que no eran LCM, que incluían 16 casos que se caracterizaron histológicamente como LLC-B, no se detectó un producto de PCR de *BCL1*-MTC/JH en ningún laboratorio. En el caso FR-1, caracterizado histológicamente como LLC-B, en tres de los diez laboratorios se identificó un producto que indicaba que el número de células con esta rotura era bajo. El estado de *IGH* determinado mediante un análisis de transferencia Southern reveló que esta muestra estaba compuesta de 90% de células B clonales, de acuerdo con el examen histológico. Los análisis de clonalidad de células B basados en PCR para *IGH* e *IGK* (sensibilidad de aproximadamente 1%) revelaron un único clon, y el análisis de transferencia Southern para *IGK* mostró solamente un único reordenamiento importante de *IGK*. Además, el análisis mediante transferencia Northern de la expresión de la ciclina D1 no mostró expresión en exceso. Todos estos datos indicaron que el número muy pequeño (menos de 1%) de células positivas para t(11;14) representan (i) un subclón derivado de LLC-B, (ii) un segundo tumor maligno de células B independiente o (iii) células B normales como las descritas para las células B positivas para t(14;18) en individuos normales.<sup>140</sup> sin embargo, con los datos disponibles de este paciente, actualmente los autores de la presente invención no pueden distinguir entre estas tres alternativas. En resumen, el análisis de los diez laboratorios ilustra la elevada especificidad de la estrategia de PCR de *BCL1*-MTC/JH.

Para determinar la presencia de posibles casos falsos negativos debidos a la relativa baja sensibilidad de la PCR, en un laboratorio se llevó a cabo la PCR interna descrita previamente (con una sensibilidad aproximadamente 10 veces mayor) con ADN de los 90 casos, y los productos de PCR de ambos análisis se hibridaron también con una oligopsonda de *BCL1*-MTC interna que incrementa la sensibilidad otras 10-100 veces. Este análisis no reveló productos de PCR en otros casos.

#### Conclusión

Los autores de la presente invención concluyen también que la sensibilidad de la PCR de *BCL1*-MTC/JH (entre  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ ) es lo suficientemente elevada para la detección del punto de rotura de *BCL1*-MTC/JH en el material de diagnóstico. Los resultados de esta aproximación son muy alentadores, y sugieren que la definición de las aproximaciones comunes y de las condiciones de reacción pueden minimizar los resultados erróneos. No obstante, se debería recordar que se detectarán como máximo aproximadamente el 50% de los puntos de rotura de t(11;14) en LCM, y que para el diagnóstico se recomiendan herramientas de detección adicionales.

#### Ejemplo 9. t(14;18) con reordenamiento *BCL2*-*IGH*

##### Antecedentes

La t(14;18) es una de las anomalías citogenéticas recurrentes mejor caracterizadas en la enfermedad linfoproliferativa de células B periféricas.<sup>141</sup> Es detectable en hasta 90% de los linfomas foliculares y el 20% de los linfomas de células B grandes, dependiendo del análisis de diagnóstico utilizado.<sup>142</sup> Como consecuencia de la translocación, el gen *BCL2* de 18q32 se coloca bajo control de los potenciadores intensos del locus de *IGH*, lo que da como resultado la disregulación de su patrón de expresión normal.<sup>143,144</sup> *BCL2* está localizado en la membrana mitocondrial externa y su función normal es suscitar antagonismo sobre la apoptosis, y cuando está disregulado está implicado íntimamente en la patogénesis del tumor.<sup>145-148</sup> Como consecuencia de este papel en la patogénesis, la t(14;18) proporciona una diana ideal tanto para el diagnóstico como para el control molecular de la enfermedad residual.

El locus de *IGH* está localizado en 14q32.3 con las regiones VH dispuestas en posición telomérica y las regiones DH, JH y constantes colocadas en posición más centromérica. La orientación de la transcripción es desde el telómero al centrómero con potenciadores localizados 5' de las regiones V entre cada una de las regiones constantes. La forma más habitual de la translocación implica el proceso de recombinación VDJ, y una de las seis regiones J<sub>H</sub> de la línea germinal está estrechamente opuesta a *BCL2*. La mayoría de las estrategias de detección basadas en PCR han utilizado un cebador JH consenso que detectará la mayoría de las translocaciones.<sup>149,150</sup> En contraste con el locus de *IGH*, el patrón de las roturas en *BCL2* es más complicado. *BCL2* está localizado en el cromosoma 18q21 y está orientado 5' a 3' desde el centrómero al telómero. La mayoría de los puntos de rotura están dentro de la MBR de 150 pb localizada en la región sin traducir 3' del exón 3.<sup>151</sup> Como consecuencia de la translocación, el potenciador S<sub>μ</sub> localizado 3' de las regiones J<sub>H</sub> se coloca en estrecha proximidad al gen *BCL2*, lo que conduce a su disregulación. A medida que se han investigado más translocaciones se ha hecho evidente que hay otras diversas regiones de puntos de rotura que se deben tener en cuenta para una estrategia de detección mediante PCR eficaz. Colocado a 4 kb aguas abajo de la MBR hay otra región adicional de punto de rotura, la subagrupación 3' MBR, que abarca una región de 3,8 kb.<sup>152</sup> El mcr está localizado a 20 kb en 3' de la MBR y cubre una región de 500 pb.<sup>153</sup> Sin embargo, aunque análogo a MBR, el mcr es más extenso de lo que se previó inicialmente, y se ha descrito una región de 10 kb aguas arriba del mcr, la subagrupación 5' mcr.<sup>154,155</sup> Además de estos puntos de rotura clásicos, se describen varias translocaciones variantes en las que las roturas ocurren 5' de *BCL2*.<sup>156</sup> Estas son, sin embargo, poco frecuentes, y así no se pueden tener en cuenta al usar una estrategia de detección basada en PCR.

No existe una única estrategia de detección de referencia para la t(14;18), y en general se ha usado una combinación de métodos citogenéticos y de transferencia Southern.<sup>157,158</sup> Las estrategias de detección mediante FISH en interfase ofrecen una alternativa aplicable que tiene la posibilidad de hallar más translocaciones.<sup>159</sup> En contraste, el FISH de fibras basado en ADN ha sido muy informativo para la definición de translocaciones variantes, pero es inadecuado para la aplicación rutinaria.<sup>160</sup> Para los laboratorios de diagnóstico molecular las estrategias de detección basadas en PCR ofrecen resultados rápidos, generalmente son aplicables y se pueden usar para el control de la enfermedad residual. Sin embargo, los cebadores usados habitualmente se han obtenido de acuerdo con las necesidades, y no se han diseñado para tener en cuenta la información reciente sobre la anatomía molecular de los puntos de rotura. Como consecuencia, cuando se comparan con las aproximaciones de referencia, las técnicas basadas en PCR detectan solamente hasta 60% de las translocaciones, lo cual reduce seriamente la capacidad de diagnóstico de la PCR. La composición de este porcentaje elevado de resultados falsos negativos es el problema de los resultados falsos positivos que surgen de la contaminación de otras muestras y de productos de PCR amplificados previamente.

#### Diseño de cebadores

Inicialmente los autores de la presente invención evaluaron un sistema múltiplex de dos tubos, un tubo diseñado para detectar los puntos de rotura dentro de la MBR y un segundo tubo usado para identificar los puntos de rotura fuera de esta región. La estrategia de MBR contuvo tres cebadores MBR1, MBR2 y el cebador JH consenso. La segunda reacción múltiplex contuvo cinco cebadores, MCR1, MCR2, 5'mcr, 3' MBR1 y el JH consenso (Figura 11A), y se diseñó para detectar los puntos de rotura dentro de las regiones mcr, 5'mcr y 3' MBR.

#### Resultados de la fase de ensayo inicial

El estudio de estos cebadores se llevó a cabo en tres laboratorios con ADN procedente de un total de 124 casos de linfoma folicular que se sabe que portan una t(14; 18). 109 casos (88%) se identificaron con una fusión *BCL2-IGH*, 83/124 (67%) fueron positivos mediante el uso de MBR múltiplex y 26/124 (21%) fueron positivos mediante el uso de la estrategia múltiplex que no era de MBR. En 15/124 (12%) casos no hubo productos de PCR amplificables. El examen adicional de los casos identificados con la estrategia múltiplex que no era de MBR demostró que 11 (9%) tenían un punto de rotura dentro de mcr, cinco casos (4%) dentro de 5'mcr y 10/124 (8%) dentro de 3'MBR.

Para investigar adicionalmente el valor de este conjunto de cebadores para la detección de los puntos de rotura dentro de las regiones de sub-agrupaciones 5'mcr y 3'MBR se analizó una serie de 32 casos de linfomas foliculares positivos para t(14;18) que se sabía que eran de la línea germinal en la MBR y mcr mediante hibridación Southern en un laboratorio. Cinco de los casos tuvieron puntos de rotura dentro de 5'mcr (260-490 pb) y se amplificaron mediante el uso del cebador de 5'mcr aislado y con la reacción múltiplex. Ninguno de los casos restantes mostró un resultado positivo. De la serie de 32 casos, ya se sabía que nueve tenían puntos de rotura dentro de la región 3'MBR, y la aproximación múltiplex fue capaz de detectar 5/9 de estos casos.

Para mejorar la sensibilidad del análisis dentro de esta región se diseñaron tres cebadores adicionales que abarcaban la región de la sub-agrupación de 3'MBR; 3'MBR2, 3'MBR3 y 3'MBR4 y se combinaron con 3'MBR1 y el JH consenso en una reacción múltiplex adicional; 3'MBR múltiplex (Figura 11). Esta nueva aproximación confirmó que ocho de los 32 casos fueron positivos, pero no detectó el noveno caso. Los cebadores se usaron después de manera individual, y en este experimento 11 de los 32 casos fueron positivos. Los puntos de rotura se distribuyeron como sigue; 2/11 casos tuvieron un punto de rotura presente entre los cebadores 3'MBR1 y 3'MBR2, 3/11 casos entre los cebadores 3'MBR2 y 3'MBR3, 2/11 casos entre los cebadores 3'MBR3 y 3'MBR4, y los cuatro casos restantes se amplificaron mediante el uso del cebador 3'MBR4 y estuvieron distribuidos a 200-1000 pb en 3' de este cebador. En esta serie de casos hubo tres resultados falsos negativos mediante el uso del múltiplex de 3'MBR. Uno de los casos fue un falso negativo auténtico en el que la rotura ocurrió en mitad de 3'MBR, en la proximidad de una secuencia de repeticiones Alu. La translocación se detectó mediante el uso del cebador 3'MBR3 cuando se usó de manera aislada y se generó un producto de 450 pb, lo que sugiere una sensibilidad reducida del múltiplex. Los dos casos falsos negativos restantes generaron productos mayores de 1000 pb con el cebador 3'MBR4, lo que les colocó en la 3'MBR lejana no cubierta completamente por esta aproximación. Se ha conseguido una mejora adicional de la sensibilidad del análisis con 3'MBR siguiendo la fase de ensayo general de este estudio. La sustitución del cebador 3'MBR3 con un nuevo cebador aguas abajo 5'-GGTGACAGAGCAAACATGAACA-3' (véase la Figura 11A) mejoró significativamente tanto la sensibilidad como la especificidad del análisis con 3'MBR.

Basándose en esto, se incorporó la múltiplex de 3'MBR a la estrategia de diagnóstico. El análisis de los casos definidos mediante transferencia Southern, por lo tanto, se llevó a cabo mediante el uso del sistema múltiplex de tres tubos presentado en la Figura 11A.

#### Resultados de la fase de ensayo general

Las variaciones entre los laboratorios están presentes de manera significativa en las estrategias de PCR de diagnóstico. Para estudiar esto, 11 grupos participaron en un ejercicio de control de calidad externo exhaustivo. Se extrajo ADN de una serie de 90 linfoproliferaciones malignas y reactivas definidas histológicamente y se analizaron mediante el uso del protocolo múltiplex de t(14;18) (Figuras 11B, C, y D). Todos los casos se definieron por su

estado en los loci de Ig y TCR mediante el uso de técnicas de hibridación Southern. La confirmación cariotípica de la t(14;18) no estuvo disponible para esta serie. Por lo tanto, los autores de la presente invención adoptaron una aproximación que requería una concordancia mayor del 70% entre los miembros de la red para la aceptación de la t(14;18). De los 90 casos, 11 se caracterizaron histológicamente como linfoma folicular. Se demostró que 11 casos tenían un reordenamiento de *IGH* clonal mediante hibridación Southern. También se llevó a cabo el estudio de los reordenamientos dentro del gen *BCL2* mediante hibridación Southern usando sondas específicas para MBR, mcr y 3'MBR en 10/11 casos. 4/10 casos mostraron un reordenamiento dentro de la MBR que fue coherente con el resultado de la PCR. Un único caso, GBS-7, mostró ser positivo para múltiplex de mcr, no proporcionó un resultado de SB concluyente con la sonda de mcr. Inmunofenotípicamente, este caso mostró dos poblaciones clonales diferentes, que representaban aproximadamente 5% y 15% del material de diagnóstico original. La discrepancia entre las dos técnicas en este caso representa probablemente la sensibilidad reducida de SB en comparación con PCR. No hubo pruebas de un reordenamiento de 3'MBR en ninguno de los casos restantes mediante SB.

De los seis casos de LCF negativos mediante SB, un único caso, ES-7, mostró una t(14;18) mediante el uso de múltiplex de MBR. 5/11 casos de LCF no mostraron evidencia de una t(14;18) mediante SB o PCR. Se detectó una t(14;18) en dos casos adicionales mediante PCR; FR-6, un caso de LDCBG, mostró un punto de rotura en MBR y fue identificado por los 11 laboratorios, y este hallazgo es compatible con los estudios previos que habían detectado una t(14; 18) en 20-40% de los casos de LDCBG.<sup>161,162</sup> Mediante el uso del múltiplex de 3'MBR, 10/11 laboratorios informaron de un resultado positivo para la muestra ES-12, que fue un caso de enfermedad de Hodgkin que contenía muy pocas células B. Es difícil explicar este resultado en ausencia de un reordenamiento de *IGH* mediante transferencia Southern. La contaminación o el marcaje incorrecto de la muestra en la fuente es la explicación más probable.

Globalmente hubo una concordancia excelente en toda la red, aunque se encontró un pequeño número de resultados tanto falsos positivos como falsos negativos. En total, se identificaron 12 resultados falsos positivos, que representaban menos de 0,4% (12/3036) del número total de análisis. Estos fueron referidos por cinco laboratorios, e implicaron seis de las muestras. La mayoría de los falsos positivos (9/12) se hallaron en tres casos. Tres laboratorios informaron sobre cinco resultados falsos negativos, que representaban una tasa de error de 6% (5/88), ES-7 no fue detectado por dos laboratorios, otros tres grupos de la red comentaron que este caso había mostrado señales de amplificación débiles con la múltiplex de MBR. Los tres casos falsos negativos restantes fueron referidos aisladamente por laboratorios individuales. Los resultados de los diagnósticos mediante el uso de esta aproximación son muy esperanzadores, y sugieren que la definición de las aproximaciones y condiciones comunes de reacción puede minimizar los resultados erróneos.

#### Conclusión

En conclusión, se ha diseñado y estudiado una PCR múltiplex sólida de tres tubos para maximizar la detección de la t(14;18). Esta estrategia es capaz de amplificar a través de la región del punto de rotura en la mayoría de los casos de LCF con una translocación definida citogenéticamente. Aunque la sensibilidad de esta estrategia es menor que la de las aproximaciones de PCR simples o anidadas convencionales, todavía es perfectamente aceptable para los procedimientos de diagnóstico. La adopción extendida de los reactivos y las metodologías estándar ha ayudado a minimizar los resultados inexactos dentro de esta gran red multicéntrica. Sin embargo, es digno de mención a partir de la fase de ensayo general de este estudio que es imposible detectar una t(14;18) en todos los casos. Esto se ve influido ciertamente por mecanismos moleculares adicionales capaces de desregular el gen *BCL2*.<sup>163,164</sup>

Ejemplo 10: Uso de ADN extraído de biopsias de tejidos incluidos en parafina y desarrollo del conjunto de cebadores de genes de control

#### Antecedentes

Se considera que el tejido reciente/congelado es el tipo de muestra ideal para la extracción de ADN para el uso en el análisis de la clonalidad basado en PCR. Sin embargo, el material reciente/congelado no está disponible siempre para los laboratorios de diagnóstico, y en muchos laboratorios de toda Europa las muestras de tejidos incluidos en parafina constituyen la mayoría de las biopsias para diagnóstico sometidas a análisis. El ADN extraído de este material incluido en parafina es a menudo de baja calidad, y, así, es necesario estudiar los protocolos de PCR para el uso con este tipo de muestras antes de que se puedan usar de manera generalizada en los laboratorios de diagnóstico.

La integridad del ADN extraído de las muestras incluidas en parafina y su amplificación mediante PCR se ven afectadas por varios factores tales como el grosor del tejido, el tipo de fijador, el tiempo de fijación, la duración del almacenamiento antes del análisis, los procedimientos de extracción de ADN y la extracción simultánea de inhibidores de PCR.<sup>165-172</sup> El fijador más usado habitualmente es la formalina tamponada neutra al diez por ciento (NBF al 10%), aunque los laboratorios también usan otros diversos fijadores, que incluyen la formalina sin tamponar y el fijador de Bouin. El uso de NBF al 10% permite la amplificación de fragmentos de ADN con un intervalo amplio de tamaños, mientras que el fijador de Bouin parece ser el menos adecuado para el uso en el análisis mediante PCR.<sup>167,168,171,173</sup> La integridad de los fragmentos del ADN extraídos de las muestras incluidas en parafina depende también del espacio de tiempo durante el cual se han almacenado los bloques, y los mejores resultados se obtienen

normalmente a partir de bloques de menos de 2 años, mientras los bloques de más de 15 años tienden a producir fragmentos muy degradados.<sup>174</sup>

#### Diseño de cebadores

5 Inicialmente, se diseñaron cinco pares de cebadores de PCR de genes de control para amplificar productos de exactamente 100, 200, 400, 600 y 1.000 pb para determinar la calidad del ADN sometido a análisis. Los genes diana se seleccionaron basándose en que tuvieran exones grandes con marcos de lectura abiertos para reducir el riesgo de seleccionar regiones polimórficas, y los cebadores se diseñaron para el uso múltiplex en los protocolos normalizados. Se seleccionaron los siguientes genes diana: gen de tromboxano sintasa humana (TBXAS1, Exón 9; número de acceso de GenBank D34621), gen activador de la recombinación humana (RAG1, Exón 2; número de acceso de GenBank M29474), gen de dedo de zinc de leucemia promielocítica humana (PLZF, Exón 1; número de acceso de GenBank AF060568), y gen AF4 humano (Exón 3; número de acceso de GenBank Z83679, y Exón 11; número de acceso de GenBank Z83687).

#### Resultados de la fase de ensayo inicial

15 Los pares de cebadores se analizaron en reacciones por separado y posteriormente en reacciones múltiples mediante el uso de ADN de peso molecular elevado. Debido al gran intervalo de tamaños de los productos (100 a 1.000 pb), fue necesario variar la proporción de concentraciones de cebadores para obtener bandas de intensidades iguales en las reacciones múltiplex. Sin embargo, se comprobó que era extremadamente difícil amplificar todas las bandas de manera reproducible, y se decidió que el producto de 1.000 pb era probablemente innecesario, ya que todos los protocolos de PCR de acuerdo con la invención proporcionan productos de menos de 600 pb. Por lo tanto, se decidió excluir el producto de 1.000 pb para mejorar la reproducibilidad del análisis. Incrementando la concentración de MgCl<sub>2</sub> hasta 2 mM y añadiendo los cebadores en una proporción 1:1:1:2, fue posible amplificar de manera reproducible cuatro bandas (100, 200, 400 y 600 pb) de igual intensidad a partir de las muestras de ADN de peso molecular elevado. Sin embargo, para el ADN extraído a partir de bloques de parafina, se consideró que un marcador de tamaño extra a 300 pb sería muy informativo, y que el marcador de 600 pb podría ser innecesario. Mediante el uso de la secuencia génica para el marcador de 1.000 pb (PLZF), se rediseñaron los cebadores para generar un producto de 300 pb. Estos se analizaron con éxito tanto en 45 reacciones monoplex como en reacciones múltiplex combinando los cebadores de 100, 200, 300, 400 y 600 pb (véase la Figura 12A).

20 Así, están disponibles dos conjuntos de cebadores para determinar la calidad del ADN para la amplificación: Los cebadores de 100, 200, 300 y 400 pb usados a 2,5 pmol cada uno se pueden usar para estudiar el ADN de tejidos incluidos en parafina. La adición de los cebadores de 600 pb a 5 pmol permite que este grupo se use para comprobar la calidad de cualquier muestra de ADN para el uso con los cebadores y los protocolos de acuerdo con la invención. Ambos conjuntos de cebadores se pueden usar con tampón ABI II y MgCl<sub>2</sub> 2,0 mM en condiciones de amplificación normalizadas. Los productos se pueden analizar en una PAGE al 6% o agarosa al 2% (véase la Figura 12B).

#### 35 Resultados de la fase de ensayo general

Se recogieron cuarenta y cinco biopsias incluidas en parafina que correspondían a 30 de los tumores malignos de células B, ocho de los tumores malignos de células T y siete de las linfoproliferaciones reactivas presentadas como muestras de tejido recientes/congeladas. La edad de los bloques de parafina, así como los métodos de fijación y de inclusión de las muestras, varió entre las redes nacionales. Las muestras ES se presentaron en forma de secciones precortadas, NL-14, 15 y 16 se presentaron en forma de muestras de ADN y las biopsias restantes se presentaron en forma de bloques de parafina. Se cortaron cinco secciones (10 pm cada una) de los bloques de parafina, y se extrajo el ADN mediante el uso del QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) siguiendo el protocolo del fabricante para el aislamiento del ADN genómico a partir del tejido incluido en parafina. Se eligió este método de extracción de ADN debido a que el equipo se puede usar para extraer rápidamente ADN de buena calidad de sangre, tejido reciente/congelado y tejido incluido en parafina, y así permite el procesamiento en paralelo de una diversidad de tipos de muestras con un control de calidad asegurado. Se han publicado numerosos protocolos para la extracción de ADN a partir de tejido incluido en parafina para el análisis mediante PCR.<sup>171, 172, 175-177</sup> Muchos de éstos se dirigen a reducir la degradación del ADN y la extracción simultánea de inhibidores de PCR, pero muchos de estos métodos requieren procedimientos de extracción prolongados y pueden ser inadecuados para el uso en el laboratorio de diagnóstico rutinario.<sup>166,178,179</sup>

Se estimó la concentración de la muestra de ADN y la integridad mediante espectrofotometría y mediante la comparación del ADN de la muestra con patrones conocidos en electroforesis en gel de agarosa. Después se analizó la integridad y la amplificabilidad de las muestras de ADN (100 ng) mediante el uso de los cebadores de PCR de genes de control (100-400 pb) y se estudió la clonalidad en todos los loci diana mediante el uso de los protocolos de PCR.

En la reacción de PCR de genes de control de 24/45 casos, los productos amplificados fueron de al menos 300 pb, mientras en las 21 muestras restantes los productos amplificados fueron de 200 pb o menos. No se pudo demostrar una correlación clara entre la calidad del ADN y la edad del bloque o el método de fijación. Por lo tanto, es probable

que una combinación de factores sea responsable de la calidad del ADN en estas muestras.

Se estudió la clonalidad en las muestras de ADN mediante el uso de las 18 reacciones de PCR múltiplex, y se analizaron mediante HD y GS. Se comparó el número de muestras de parafina que mostró clonalidad y translocaciones en los nueve loci diana con los datos de las muestras recientes/congeladas correspondientes. En las muestras con productos de PCR de genes de control de hasta 200 pb, la detección global de la clonalidad en los nueve loci diana fue 9/55 (16%). De los 46 reordenamientos no detectados, 45 se pudieron explicar por el hecho de que los productos de PCR clonales esperados tuvieron un peso molecular superior que el tamaño máximo amplificado por la muestra en la PCR de genes de control. La muestra restante (PT-9) amplificó hasta 100 pb en la PCR de genes de control, pero no se detectó el producto clonal de *TCRG* esperado de 81 pb. En las muestras con productos de PCR de genes de control de al menos 300 pb, la detección total de la clonalidad en los nueve loci diana fue 42/55 (76%). De los 13 reordenamientos no detectados, cinco se pudieron explicar de nuevo por el hecho de que los productos de PCR clonales esperados fueron mayores que el tamaño máximo amplificado por la muestra en la PCR de genes de control. Los ocho reordenamientos no detectados restantes no se pudieron explicar directamente por la calidad del ADN. Se detectó un resultado clonal falso positivo (GBN-9; *IgL*) en un nódulo linfático reactivo, lo cual puede representar pseudoclonalidad.

Se sabe que se encuentran presentes inhibidores de PCR en el ADN extraído a partir de muestras de parafina. La dilución de la muestra de ADN puede reducir la concentración de estos inhibidores hasta niveles que permiten que se produzca una amplificación eficaz. Para investigar el efecto de la dilución de las muestras de ADN sobre la eficacia de la amplificación, se sometieron a ensayo cuatro concentraciones diferentes de ADN en la reacción de PCR de genes de control: 5, 50, 100 y 500 ng. Los autores de la presente invención observaron que la dilución de las muestras de ADN tiene un efecto significativo sobre el tamaño de los productos de PCR en la PCR de genes de control. En total, 24/45 casos (53%) mostraron un aumento de la eficacia de la amplificación cuando se diluyeron de 100 ng a 50 ng. La concentración de ADN óptima parece estar entre 50 a 100 ng, mientras el uso de 500 ng parece inhibir la amplificación de productos grandes (300 pb o más). Aunque el uso de 5 ng de ADN proporciona resultados aceptables con la PCR de genes de control, esto puede conducir a resultados falsos positivos en los análisis de clonalidad basados en PCR debidos a la baja representación del ADN total de las células linfoides.<sup>160,181</sup> De manera más importante, 5 ng de ADN no tiene ninguna ventaja sobre una dilución a 50 ng de ADN.

Para determinar si el uso de 50 ng de ADN incrementaría también la detección de la clonalidad, se volvieron a someter a ensayo todas las muestras en el locus de V-J de *IGH* mediante el uso de esta concentración de ADN. El número de reordenamientos clonales detectados en los tres tubos V-J de *IGH* mediante el uso de 100 ng de ADN fue de 12, en comparación con 23 mediante el uso de las muestras recientes/congeladas correspondientes. La detección global de la clonalidad en este locus se incrementó hasta 17 de 23 cuando se usaron 50 ng de ADN, y se detectaron otros 9 productos clonales de FR1, 6 de FR2 y 4 de FR3. De este modo, la dilución del ADN puede incrementar la detección de los productos clonales, presumiblemente debido a la dilución de los inhibidores de PCR. Lógicamente, solo es probable que la dilución del ADN mejore tanto los resultados de la PCR de genes de control como la detección de la clonalidad, si están presentes los inhibidores de PCR, no si la muestra de ADN está muy degradada. Por lo tanto, se recomienda que se sometan a ensayo al menos dos diluciones de ADN mediante el uso de la PCR de genes de control, y que se use la dilución que proporciona mejor resultado en el análisis de la clonalidad posterior.

Nueve reordenamientos clonales permanecieron sin detectar tras el análisis inicial, lo cual no se pudo explicar por la calidad del ADN (*TCRG* en PT-9 y NL-11; *TCRB* en GBS-4; *TCRD* en NL-15; *IGK* en GBN-4, NL-4 y NL-5; V-JH de *IGH* en GBS-6 y GBS-8). Estas muestras se volvieron a someter a ensayo mediante el uso de 50 ng de ADN, pero solamente una muestra (GBS8; *IGH*) mostró una detección mejorada, lo que sugiere que otros factores, desconocidos, pueden evitar la amplificación de dianas específicas en un pequeño número de casos. Sin embargo, se debería indicar que para siete de estas muestras (NL-11, GBS-4, NL-15, GBN-4, NL-5, GBS-6 y GBS-8) se detectaron productos clonales en al menos un locus distinto. Esto demuestra que el ensayo para determinar la clonalidad en múltiples loci diana incrementa la probabilidad de detectar poblaciones de linfocitos clonales.

#### Conclusión

En conclusión, los protocolos proporcionados en la presente memoria funcionan bien con ADN extraído a partir de material incluido en parafina, con tal de que el ADN pueda amplificar productos de 300 pb o más en la PCR de genes de control. Se someten a ensayo preferiblemente dos concentraciones de ADN en la PCR de genes de control, y se debería usar la concentración más "amplificable" en los ensayos posteriores, aunque con la condición de que las concentraciones de ADN menores de 20 ng puedan contribuir a la detección de pseudoclonalidad debido a la baja representación del ADN linfocito diana.<sup>180,181</sup> Globalmente, los datos demuestran que la determinación de la calidad del ADN mediante el uso de la PCR de genes de control proporciona una buena indicación de lo adecuado que es el ADN para el análisis de la clonalidad mediante el uso de los protocolos proporcionados. También es importante indicar que la PCR de genes de control no dará ninguna indicación de la cantidad de ADN de células linfocitos presente en la muestra, y por lo tanto el ADN de buena calidad todavía puede producir resultados negativos en el análisis de la clonalidad. Para asegurar que los resultados monoclonales son reproducibles (y para evitar una pseudoclonalidad potencial), todos los análisis de clonalidad, en particular mediante el uso de ADN extraído de parafina, se llevan a cabo preferiblemente por duplicado, y se analizan mediante HD y GS, siempre que sea posible.

## Referencias

1. Van Dongen JJM and Wolvers-Tettero ILM. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part II: Possibilities and limitations in the diagnosis and management of lymphoproliferative diseases and related disorders. *Clin Chim Acta* 1991; 198:93-174.
- 5 2. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 2001, IARC Press: Lyon.
3. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983; 302: 575-581.
4. Davis MM and Björkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 1988; 334: 395-402.
- 10 5. Van Dongen JJM, Szczepanski T, Adriaansen HJ, Immunobiology of leukemia, in *Leukemia*, E.S. Henderson, T.A. Lister, and M.F. Greaves, Editors. 2002, WB Saunders Company: Philadelphia. pág. 85-129.
6. Szczepanski T, Pongers-Willems MJ, Langerak AW, van Dongen JJM. Unusual immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangement patterns in acute lymphoblastic leukemias. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 246: 205-215.
- 15 7. Küppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 1999; 341: 1520-1529.
8. Smith BR, Weinberg DS, Robert NJ, Towle M, Luther E, Pinkus GS, Ault KA. Circulating monoclonal B lymphocytes in non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1984; 311: 1476-1481.
9. Letwin BW, Wallace PK, Muirhead KA, Hensler GL, Kashatus WH, Horan PK. An improved clonal excess assay using flow cytometry and B-cell gating. *Blood* 1990; 75: 1178-1185.
- 20 10. Fukushima PI, Nguyen PK, O'Grady P, Stetler-Stevenson M. Flow cytometric analysis of kappa and lambda light chain expression in evaluation of specimens for B-cell neoplasia. *Cytometry* 1996; 26: 243-252.
11. McCoy JP, Jr., Overton WR, Schroeder K, Blumstein L, Donaldson MH. Immunophenotypic analysis of the T cell receptor V beta repertoire in CD4+ and CD8+ lymphocytes from normal peripheral blood. *Cytometry* 1996; 26: 148-153.
- 25 12. Van Dongen JJM, van den Beemd MWM, Schellekens M, Wolvers-Tettero ILM, Langerak AW, Groeneveld K. Analysis of malignant T cells with the V $\beta$  antibody panel. *Immunologist* 1996; 4: 37-40.
13. Van den Beemd MWM, Boor PPC, Van Lochem EG, Hop WCJ, Langerak AW, Wolvers-Tettero ILM, Hooijkaas H, Van Dongen JJM. Flow cytometric analysis of the V $\beta$  repertoire in healthy controls. *Cytometry* 2000; 40: 336-345.
- 30 14. Lima M, Almeida J, Santos AH, dos Anjos Teixeira M, Alguero MC, Queiros ML, Balanzategui A, Justica B, Gonzalez M, San Miguel JF, Orfao A. Immunophenotypic analysis of the TCR-Vbeta repertoire in 98 persistent expansions of CD3(+)/TCR-alpha/beta(+) large granular lymphocytes: utility in assessing clonality and insights into the pathogenesis of the disease. *Am J Pathol* 2001; 159: 1861-1868.
- 35 15. Langerak AW, Wolvers-Tettero ILM, van den Beemd MWM, van Wering ER, Ludwig W-D, Hähnen K, Necker A, van Dongen JJM. Immunophenotypic and immunogenotypic characteristics of TCRgd +T cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 206-214.
16. Langerak AW, van Den Beemd R, Wolvers-Tettero ILM, Boor PP, van Lochem EG, Hooijkaas H, van Dongen JJM. Molecular and flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire for clonality assessment in mature TCRalpha/beta T-cell proliferations. *Blood* 2001; 98: 165-173.
- 40 17. Semenzato G, Zambello R, Starkebaum G, Oshimi K, Loughran TP, Jr. The lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: updated criteria for diagnosis. *Blood* 1997; 89: 256-260.
18. Triebel F, Faure F, Graziani M, Jitsukawa S, Lefranc MP, Hercend T. A unique V-J-C-rearranged gene encodes a gamma protein expressed on the majority of CD3+ T cell receptor-alpha/beta- circulating lymphocytes. *J Exp Med* 1988; 167: 694-699.
- 45 19. Breit TM, Wolvers-Tettero IL, van Dongen JJ. Unique selection determinant in polyclonal V delta 2-J delta 1 junctional regions of human peripheral gamma delta T lymphocytes. *J Immunol* 1994; 152: 2860-2864.
20. Breit TM, Wolvers-Tettero ILM, Hähnen K, Van Wering ER, Van Dongen JJM. Limited combinatorial repertoire of gd T-cell receptors expressed by T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Leukemia* 1991; 5: 116-124.

21. Van Dongen JJM and Wolvers-Tettero ILM. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: Basic and technical aspects. *Clin Chim Acta* 1991; 198: 1-91.
22. Beishuizen A, Verhoeven MA, Mol EJ, Breit TM, Wolvers-Tettero ILM, van Dongen JJM. Detection of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements by Southern blot analysis: recommendations for optimal results. *Leukemia* 1993; 7: 2045-2053.
23. Breit TM, Wolvers-Tettero ILM, Beishuizen A, Verhoeven M-AJ, van Wering ER, van Dongen JJM. Southern blot patterns, frequencies and junctional diversity of T-cell receptor d gene rearrangements in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993; 82: 3063-3074.
24. Beishuizen A, Verhoeven MA, Mol EJ, van Dongen JJM. Detection of immunoglobulin kappa light-chain gene rearrangement patterns by Southern blot analysis. *Leukemia* 1994; 8: 2228-2236.
25. Tümkaya T, Comans-Bitter WM, Verhoeven MA, van Dongen JJM. Southern blot detection of immunoglobulin lambda light chain gene rearrangements for clonality studies. *Leukemia* 1995; 9: 2127-2132.
26. Tümkaya T, Beishuizen A, Wolvers-Tettero ILM, van Dongen JJM. Identification of immunoglobulin lambda isotype gene rearrangements by Southern blot analysis. *Leukemia* 1996; 10: 1834-1839.
27. Moreau EJ, Langerak AW, van Gastel -Mol EJ, Wolvers-Tettero ILM, Zhan M, Zhou Q, Koop BF, van Dongen JJM. Easy detection of all T cell receptor gamma (TCRG) gene rearrangements by Southern blot analysis: recommendations for optimal results. *Leukemia* 1999; 13: 1620-1626.
28. Langerak AW, Wolvers-Tettero ILM, van Dongen JJM. Detection of T cell receptor beta (TCRB) gene rearrangement patterns in T cell malignancies by Southern blot analysis. *Leukemia* 1999; 13: 965-974.
29. Hara J, Benedict SH, Mak TW, Gelfand EW. T cell receptor alpha-chain gene rearrangements in B-precursor leukemia are in contrast to the findings in T cell acute lymphoblastic leukemia. Comparative study of T cell receptor gene rearrangement in childhood leukemia. *J Clin Invest* 1987; 80: 1770-1777.
30. Szczepanski T, Beishuizen A, Pongers-Willemse MJ, Hählen K, van Wering ER, Wijkhuijs JM, Tibbe GJM, De Bruijn MAC, van Dongen JJM. Cross-lineage T-cell receptor gene rearrangements occur in more than ninety percent of childhood precursor-B-acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1999; 13: 196-205.
31. Szczepanski T, Langerak AW, van Dongen JJ, van Krieken JH. Lymphoma with multi-gene rearrangement on the level of immunoglobulin heavy chain, light chain, and T-cell receptor beta chain. *Am J Hematol* 1998; 59: 99-100.
32. Przybylski G, Oettle H, Ludwig WD, Siegert W, Schmidt CA. Molecular characterization of illegitimate TCR delta gene rearrangements in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 1994; 87: 301-307.
33. Boeckx N, Willemse MJ, Szczepanski T, van Der Velden VHJ, Langerak AW, Vandekerckhove P, van Dongen JJM. Fusion gene transcripts and Ig/TCR gene rearrangements are complementary but infrequent targets for PCR-based detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2002; 16: 368-375.
34. Szczepanski T, Pongers-Willemse MJ, Langerak AW, Harts WA, Wijkhuijs JM, van Wering ER, van Dongen JJM. Ig heavy chain gene rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia exhibit predominant DH6-19 and DH7-27 gene usage, can result in complete V-D-J rearrangements, and are rare in T-cell receptor alpha lineage. *Blood* 1999; 93: 4079-4085.
35. Kluin-Nelemans HC, Kester MG, van deCorput L, Boor PP, Landegent JE, van Dongen JJ, Willemze R, Falkenburg JH. Correction of abnormal T-cell receptor repertoire during interferon-alpha therapy in patients with hairy cell leukemia. *Blood* 1998; 91: 4224-4231.
36. Sarzotti M, Patel DD, Li X, Ozaki DA, Cao S, Langdon S, Parrott RE, Coyne K, Buckley RH. T cell repertoire development in humans with SCID after nonablative allogeneic marrow transplantation. *J Immunol* 2003; 170: 2711-2718.
37. Mariani S, Coscia M, Even J, Peola S, Foglietta M, Boccadoro M, Sbaiz L, Restagno G, Pileri A, Massaia M. Severe and long-lasting disruption of T-cell receptor diversity in human myeloma after high-dose chemotherapy and autologous peripheral blood progenitor cell infusion. *Br J Haematol* 2001; 113: 1051-1059.
38. Davis TH, Yockey CE, Balk SP. Detection of clonal immunoglobulin gene rearrangements by polymerase chain reaction amplification and single-strand conformational polymorphism analysis. *Am J Pathol* 1993; 142: 1841-1847.

39. Bourguin A, Tung R, Galili N, Sklar J. Rapid, nonradioactive detection of clonal T-cell receptor gene rearrangements in lymphoid neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 8536-8540.
40. Bottaro M, Berti E, Biondi A, Migone N, Crosti L. Heterodúplex analysis of T-cell receptor gamma gene rearrangements for diagnosis and monitoring of cutaneous T-cell lymphomas. *Blood* 1994; 83: 3271-3278.
- 5 41. Langerak AW, Szczepanski T, van der Burg M, Wolvers-Tettero ILM, van Dongen JJM. Heterodúplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. *Leukemia* 1997; 11: 2192-2199.
42. Kneba M, Bolz I, Linke B, Hiddemann W. Analysis of rearranged T-cell receptor beta-chain genes by polymerase chain reaction (PCR) DNA sequencing and automated high resolution PCR fragment analysis. *Blood* 10 1995; 86: 3930-3937.
43. Linke B, Bolz I, Fayyazi A, von Hofen M, Pott C, Bertram J, Hiddemann W, Kneba M. Automated high resolution PCR fragment analysis for identification of clonally rearranged immunoglobulin heavy chain genes. *Leukemia* 1997; 11: 1055-1062.
44. Szczepanski T, Flohr T, van der Velden VH, Bartram CR, van Dongen JJ. Molecular monitoring of residual disease using antigen receptor genes in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 15 2002; 15: 37-57.
45. Willemsse MJ, Seriu T, Hettinger K, d'Aniello E, Hop WC, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, Schrappe M, Kamps WA, Masera G, Gadner H, Riehm H, Bartram CR, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease identifies differences in treatment response between T-ALL and precursor B-ALL. *Blood* 2002; 99: 4386-4393.
- 20 46. Lefranc MP. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 307-310.
47. Lefranc MP. IMGT databases, web resources and tools for immunoglobulin and T cell receptor sequence analysis, <http://imgt.cines.fr>. *Leukemia* 2003; 17: 260-266.
48. Ignatovich O, Tomlinson IM, Jones PT, Winter G. The creation of diversity in the human immunoglobulin V(lambda) repertoire. *J Mol Biol* 1997; 268: 69-77.
- 25 49. Tümkaya T, van der Burg M, Garcia Sanz R, Gonzalez Diaz M, Langerak AW, San Miguel JF, van Dongen JJM. Immunoglobulin lambda isotype gene rearrangements in B-cell malignancies. *Leukemia* 2001; 15: 121-127.
50. Arden B, Clark SP, Kabelitz D, Mak TW. Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 1995; 42: 455-500.
51. Rowen L, Koop BF, Hood L. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science* 1996; 272: 1755-1762.
- 30 52. Quertermous T, Strauss WM, Van Dongen JJ, Seidman JG. Human T cell gamma chain joining regions and T cell development. *J Immunol* 1987; 138: 2687-2690.
53. Rabbitts P, Douglas J, Fischer P, Nacheva E, Karpas A, Catovsky D, Melo J, Baer R, Stinson M, Rabbitts T. Chromosome abnormalities at 11q13 in B cell tumours. *Oncogene* 1988; 3: 99-103.
- 35 54. Williams ME, Swerdlow SH, Meeker TC. Chromosome t(11;14)(q13;q32) breakpoints in centrocytic lymphoma are highly localized at the bcl-1 major translocation cluster. *Leukemia* 1993; 7: 1437-1440.
55. Segal GH, Masih AS, Fox AC, Jorgensen T, Scott M, Braylan RC. CD5-expressing B-cell non-Hodgkin's lymphomas with bcl-1 gene rearrangement have a relatively homogeneous immunophenotype and are associated with an overall poor prognosis. *Blood* 1995; 85: 1570-1579.
- 40 56. Matsuda F, Ishii K, Bourvagnet P, Kuma K, Hayashida H, Miyata T, Honjo T. The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. *J Exp Med* 1998; 188: 2151-2162.
57. Ghia P, ten Boekel E, Rolink AG, Melchers F. B-cell development: a comparison between mouse and man. *Immunol Today* 1998; 19: 480-485.
- 45 58. Corbett SJ, Tomlinson IM, Sonnhammer ELL, Buck D, Winter G. Sequence of the human immunoglobulin diversity (D) segment locus: a systematic analysis provides no evidence for the use of DIR segments, inverted D segments, "minor" D segments or D-D recombination. *J Mol Biol* 1997; 270: 587-597.
59. Ichihara Y, Matsuoka H, Kurosawa Y. Organization of human immunoglobulin heavy chain diversity gene loci. *EMBO J* 1988; 7: 4141-4150.

60. Bertrand FE, III, Billips LG, Burrows PD, Gartland GL, Kubagawa H, Schroeder HW, Jr. Ig D(H) gene segment transcription and rearrangement before surface expression of the pan-B-cell marker CD19 in normal human bone marrow. *Blood* 1997; 90: 736-744.
- 5 61. Ghia P, ten Boekel E, Sanz E, de la Hera A, Rolink A, Melchers F. Ordering of human bone marrow B lymphocyte precursors by single-cell polymerase chain reaction analyses of the rearrangement status of the immunoglobulin H and L chain gene loci. *J Exp Med* 1996; 184: 2217-2229.
62. Szczepanski T, Willemse MJ, van Wering ER, Weerden JF, Kamps WA, van Dongen JJM. Precursor-B-ALL with DH-JH gene rearrangements have an immature immunogenotype with a high frequency of oligoclonality and hyperdiploidy of chromosome 14. *Leukemia* 2001; 15: 1415-1423.
- 10 63. Davi F, Faili A, Gritti C, Blanc C, Laurent C, Sutton L, Schmitt C, Merle-Beral H. Early onset of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements in normal human bone marrow CD34+ cells. *Blood* 1997; 90: 4014-4021.
- 15 64. Szczepanski T, van 't Veer MB, Wolvers-Tettero ILM, Langerak AW, van Dongen JJM. Molecular features responsible for the absence of immunoglobulin heavy chain protein synthesis in an IgH(-) subgroup of multiple myeloma. *Blood* 2000; 96: 1087-1093.
65. Schroeder HW, Jr. and Wang JY. Preferential utilization of conserved immunoglobulin heavy chain variable gene segments during human fetal life. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 6146-6150.
- 20 66. Raaphorst FM, Raman CS, Tami J, Fischbach M, Sanz I. Human Ig heavy chain CDR3 regions in adult bone marrow pre-B cells display an adult phenotype of diversity: evidence for structural selection of DH amino acid sequences. *Int Immunol* 1997; 9: 1503-1515.
67. Lebecque SG and Gearhart PJ. Boundaries of somatic mutation in rearranged immunoglobulin genes: 5' boundary is near the promoter, and 3' boundary is approximately 1 kb from V(D)J gene. *J Exp Med* 1990; 172: 1717-1727.
- 25 68. Fukita Y, Jacobs H, Rajewsky K. Somatic hypermutation in the heavy chain locus correlates with transcription. *Immunity* 1998; 9: 105-114.
69. Zachau HG. *The Immunologist* 1996; 4: 49-54.
70. Schäble KF and Zachau HG. The variable genes of the human immunoglobulin kappa locus. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1993; 374: 1001-1022.
- 30 71. Weichhold GM, Ohnheiser R, Zachau HG. The human immunoglobulin kappa locus consists of two copies that are organized in opposite polarity. *Genomics* 1993; 16: 503-511.
72. Siminovitch KA, Bakhshi A, Goldman P, Korsmeyer SJ. A uniform deleting element mediates the loss of kappa genes in human B cells. *Nature* 1985; 316: 260-262.
- 35 73. Szczepanski T, Langerak AW, Wolvers-Tettero ILM, Ossenkoppele GJ, Verhoef G, Stul M, Petersen EJ, de Bruijn MAC, van't Veer MB, van Dongen JJM. Immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangement patterns in acute lymphoblastic leukemia are less mature in adults than in children: implications for selection of PCR targets for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1998; 12: 1081-1088.
74. Van der Velden VHJ, Willemse MJ, van der Schoot CE, van Wering ER, van Dongen JJM. Immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in precursor-B acute lymphoblastic leukemia are stable targets for detection of minimal residual disease by real-time quantitative PCR. *Leukemia* 2002; 16: 928-936.
- 40 75. van der Burg M, Tumkaya T, Boerma M, de Bruin-Versteeg S, Langerak AW, van Dongen JJM. Ordered recombination of immunoglobulin light chain genes occurs at the IGK locus but seems less strict at the IGL locus. *Blood* 2001; 97: 1001-1008.
- 45 76. Cannell PK, Amlot P, Attard M, Hoffbrand AV, Foroni L. Variable kappa gene rearrangement in lymphoproliferative disorders: an analysis of V kappa gene usage, VJ joining and somatic mutation. *Leukemia* 1994; 8: 1139-1145.
77. Fripiat JP, Williams SC, Tomlinson IM, Cook GP, Cherif D, Le Paslier D, Collins JE, Dunham I, Winter G, Lefranc MP. Organization of the human immunoglobulin lambda light-chain locus on chromosome 22q11.2. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 983-991.
- 50 78. Williams SC, Fripiat JP, Tomlinson IM, Ignatovich O, Lefranc MP, Winter G. Sequence and evolution of the human germline V lambda repertoire. *J Mol Biol* 1996; 264: 220-232.

79. Kawasaki K, Minoshima S, Nakato E, Shibuya K, Shintani A, Schmeits JL, Wang J, Shimizu N. One-megabase sequence analysis of the human immunoglobulin lambda gene locus. *Genome Res* 1997; 7: 250-261.
80. Hieter PA, Korsmeyer SJ, Waldmann TA, Leder P. Human immunoglobulin kappa light-chain genes are deleted or rearranged in lambda-producing B cells. *Nature* 1981; 290: 368-372.
- 5 81. Vasicek TJ and Leder P. Structure and expression of the human immunoglobulin lambda genes. *J Exp Med* 1990; 172: 609-620.
82. Taub RA, Hollis GF, Hieter PA, Korsmeyer S, Waldmann TA, Leder P. Variable amplification of immunoglobulin lambda light-chain genes in human populations. *Nature* 1983; 304: 172-174.
- 10 83. van der Burg M, Barendregt BH, van Gastel-Mol EJ, Tumkaya T, Langerak AW, van Dongen JJ. Unraveling of the polymorphic C lambda 2-C lambda 3 amplification and the Ke+Oz- polymorphism in the human Ig lambda locus. *J Immunol* 2002; 169: 271-276.
84. Bridges SL, Jr. Frequent N addition and clonal relatedness among immunoglobulin lambda light chains expressed in rheumatoid arthritis synovia and PBL, and the influence of V lambda gene segment utilization on CDR3 length. *Mol Med* 1998; 4: 525-553.
- 15 85. Kiyoi H, Naito K, Ohno R, Saito H, Naoe T. Characterization of the immunoglobulin light chain variable region gene expressed in multiple myeloma. *Leukemia* 1998; 12: 601-609.
86. Farner NL, Dorner T, Lipsky PE. Molecular mechanisms and selection influence the generation of the human V lambda J lambda repertoire. *J Immunol* 1999; 162: 2137-2145.
- 20 87. Ignatovich O, Tomlinson IM, Popov AV, Bruggemann M, Winter G. Dominance of intrinsic genetic factors in shaping the human immunoglobulin V lambda repertoire. *J Mol Biol* 1999; 294: 457-465.
88. Wei S, Charmley P, Robinson MA, Concannon P. The extent of the human germline T-cell receptor V beta gene segment repertoire. *Immunogenetics* 1994; 40: 27-36.
89. Charmley P, Wei S, Concannon P. Polymorphisms in the TCRB-V2 gene segments localize the Tcrb orthon genes to human chromosome 9p21. *Immunogenetics* 1993; 38: 283-286.
- 25 90. Robinson MA, Mitchell MP, Wei S, Day CE, Zhao TM, Concannon P. Organization of human T-cell receptor beta-chain genes: clusters of V beta genes are present on chromosomes 7 and 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 2433-2437.
91. Toyonaga B, Yoshikai Y, Vadasz V, Chin B, Mak TW. Organization and sequences of the diversity, joining, and constant region genes of the human T-cell receptor beta chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 8624-8628.
- 30 92. Liu D, Callahan JP, Dau PC. Intrafamily fragment analysis of the T cell receptor beta chain CDR3 region. *J Immunol Methods* 1995; 187: 139-150.
93. Tsuda S, Rieke S, Hashimoto Y, Nakauchi H, Takahama Y. 11-7 supports D-J but not V-DJ rearrangement of TCR-beta gene in fetal liver progenitor cells. *J Immunol* 1996; 156: 3233-3242.
- 35 94. Weidmann E, Whiteside TL, Giorda R, Herberman RB, Trucco M. The T-cell receptor V beta gene usage in tumor-infiltrating lymphocytes and blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1992; 52: 5913-5920.
95. Jores R and Meo T. Few V gene segments dominate the T cell receptor beta-chain repertoire of the human thymus. *J Immunol* 1993; 151: 6110-6122.
- 40 96. Rosenberg WM, Moss PA, Bell JI. Variation in human T cell receptor V beta and J beta repertoire: analysis using anchor polymerase chain reaction. *Eur J Immunol* 1992; 22: 541-549.
97. Pongers-Willems MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P, Gonzalez M, Bartram CR, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, San Miguel JF, van Dongen JJM. Primers and protocols for standardized MRD detection in ALL using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 110-118.
- 45 98. Hansen-Hagge TE, Yokota S, Bartram CR. Detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by in vitro amplification of rearranged T-cell receptor delta chain sequences. *Blood* 1989; 74: 1762-1767.

99. Cave H, Guidal C, Rohrlrich P, Delfau MH, Broyart A, Lescoeur B, Rahimy C, Fenneteau O, Monplaisir N, d'Auriol L, Elion J, Vilmer E, Grandchamp B. Prospective monitoring and quantitation of residual blasts in childhood acute lymphoblastic leukemia by polymerase chain reaction study of delta and gamma T-cell receptor genes. *Blood* 1994; 83: 1892-1902.
- 5 100. Gorski J, Yassai M, Zhu X, Kissela B, Kissella B, Keever C, Flomenberg N. Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analyzed by CDR3 size spectratyping. Correlation with immune status. *J Immunol* 1994; 152: 5109-1519.
101. McCarthy KP, Sloane JP, Kabarowski JH, Matutes E, Wiedemann LM. The rapid detection of clonal T-cell proliferations in patients with lymphoid disorders. *Am J Pathol* 1991; 138: 821-828.
- 10 102. Assaf C, Hummel M, Dippel E, Goerdts S, Muller HH, Anagnostopoulos I, Orfanos CE, Stein H. High detection rate of T-cell receptor beta chain rearrangements in T-cell lymphoproliferations by family specific polymerase chain reaction in combination with the GeneScan technique and DNA sequencing. *Blood* 2000; 96: 640-646.
- 15 103. O'Shea U, Wyatt JI, Howdle PD. Analysis of T cell receptor beta chain CDR3 size using RNA extracted from formalin fixed paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol* 1997; 50: 811-814.
104. Duby AD and Seidman JG. Abnormal recombination products result from aberrant DNA rearrangement of the human T-cell antigen receptor beta-chain gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 4890-4894.
105. Alatrakchi N, Farace F, Frau E, Carde P, Munck JN, Triebel F. T-cell clonal expansion in patients with B-cell lymphoproliferative disorders. *J Immunother* 1998; 21: 363-370.
- 20 106. Blom B, Verschuren MC, Heemskerk MH, Bakker AQ, van Gastel-Mol EJ, Wolvers-Tettero IL, van Dongen JJM, Spits H. TCR gene rearrangements and expression of the pre-T cell receptor complex during human T-cell differentiation. *Blood* 1999; 93: 3033-3043.
107. Chen Z, Font MP, Loiseau P, Bories JC, Degos L, Lefranc MP, Sigaux F. The human T-cell V gamma gene locus: cloning of new segments and study of V gamma rearrangements in neoplastic T and B cells. *Blood* 1988; 72: 776-783.
- 25 108. Zhang XM, Tonnel C, Lefranc MP, Huck S. T cell.receptor gamma cDNA in human fetal liver and thymus: variable regions of gamma chains are restricted to V gamma I or V9, due to the absence of splicing of the V10 and V11 leader intron. *Eur J Immunol* 1994; 24: 571-578.
109. Huck S and Lefranc MP. Rearrangements to the JP1, JP and JP2 segments in the human T-cell rearranging gamma gene (TRG gamma) locus. *FEBS Lett* 1987; 224: 291-296.
- 30 110. Delfau MH, Hance AJ, Lecossier D, Vilmer E, Grandchamp B. Restricted diversity of V gamma 9-JP rearrangements in unstimulated human gamma/delta T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1992; 22: 2437-2443.
111. Porcelli S, Brenner MB, Band H. Biology of the human gamma delta T-cell receptor. *Immunol Rev* 1991; 120: 137-183.
- 35 112. Van der Velden VHJ, Wijkhuijs JM, Jacobs DCH, van Wering ER, van Dongen JJM. T cell receptor gamma gene rearrangements as targets for detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by real-time quantitative PCR analysis. *Leukemia* 2002; 16: 1372-1380.
113. Szczepanski T, Langerak AW, Willemse MJ, Wolvers-Tettero ILM, van Wering ER, van Dongen JJM. T cell receptor gamma (TCRG) gene rearrangements in T cell acute lymphoblastic leukemia reflect "end-stage" recombinations: implications for minimal residual disease monitoring. *Leukemia* 2000; 14: 1208-1214.
- 40 114. Delabesse E, Burtin ML, Million C, Madonik A, Arnulf B, Beldjord K, Valensi F, Macintyre EA. Rapid, multifluorescent TCRG Vgamma and Jgamma typing: application to T cell acute lymphoblastic leukemia and to the detection of minor clonal populations. *Leukemia* 2000; 14: 1143-1152.
115. Verschuren MC, Wolvers-Tettero IL, Breit TM, van Dongen JJ. T-cell receptor V delta-J alpha rearrangements in human thymocytes: the role of V delta-J alpha rearrangements in T-cell receptor-delta gene deletion. *Immunology* 1998; 93: 208-212.
- 45 116. Nomenclature for T-cell receptor (TCR) gene segments of the immune system. WHO-IUIS Nomenclature Sub-Committee on TCR Designation. *Immunogenetics* 1995; 42: 451-453.
117. Kabelitz D, Wesch D, Hinz T. Gamma delta T cells, their T cell receptor usage and role in human diseases. *Springer Semin Immunopathol* 1999; 21: 55-75.
- 50

118. Shen J, Andrews DM, Pandolfi F, Boyle LA, Kersten CM, Blatman RN, Kurnick JT. Oligoclonality of Vdelta1 and Vdelta2 cells in human peripheral blood mononuclear cells: TCR selection is not altered by stimulation with gram-negative bacteria. *J Immunol* 1998; 160: 3048-3055.
- 5 119. Breit TM, Wolvers-Tettero ILM, Hählen K, Van Wering ER, Van Dongen JJM. Extensive junctional diversity of gd T-cell receptors expressed by T-cell acute lymphoblastic leukemias: implications for the detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1991; 5: 1076-1086.
120. Langlands K, Eden OB, Micallef-Eynaud P, Parker AC, Anthony RS. Direct sequence analysis of TCR V delta 2-D delta 3 rearrangements in common acute lymphoblastic leukaemia and application to detection of minimal residual disease. *Br J Haematol* 1993; 84: 648-655.
- 10 121. Schneider M, Panzer S, Stolz F, Fischer S, Gadner H, Panzer-Grumayer ER. Crosslineage TCR delta rearrangements occur shortly after the DJ joinings of the IgH genes in childhood precursor B ALL and display age-specific characteristics. *Br J Haematol* 1997; 99: 115-121.
122. Hettinger K, Fischer S, Panzer S, Panzer-Grumayer ER. Multiplex PCR for TCR delta rearrangements: a rapid and specific approach for the detection and identification of immature and mature rearrangements in ALL. *Br J Haematol* 1998; 102: 1050-1054.
- 15 123. Theodorou I, Raphael M, Bigorgne C, Fourcade C, Lahet C, Cochet G, Lefranc MP, Gaulard P, Farcet JP. Recombination pattern of the TCR gamma locus in human peripheral T-cell lymphomas. *J Pathol* 1994; 174: 233-242.
124. Kanavaros P, Farcet JP, Gaulard P, Haioun C, Divine M, Le Couedic JP, Lefranc MP, Reyes F. Recombinative events of the T cell antigen receptor delta gene in peripheral T cell lymphomas. *J Clin Invest* 1991; 87: 666-672.
- 20 125. Przybylski GK, Wu H, Macon WR, Finan J, Leonard DG, Felgar RE, DiGiuseppe JA, Nowell PC, Swerdlow SH, Kadin ME, Wasik MA, Salhany KE. Hepatosplenic and subcutaneous panniculitis-like gamma/delta T cell lymphomas are derived from different Vdelta subsets of gamma/delta T lymphocytes. *J Mol Diagn* 2000; 2: 11-19.
- 25 126. Kadin ME. Cutaneous gamma delta T-cell lymphomas--how and why should they be recognized? *Arch Dermatol* 2000; 136: 1052-1054.
127. Hodges E, Quin C, Farrell AM, Christmas S, Sewell HF, Doherty M, Powell RJ, Smith JL. Arthropathy, leucopenia and recurrent infection associated with a TcR gamma delta population. *Br J Rheumatol* 1995; 34: 978-983.
- 30 128. Van Oostveen JW, Breit TM, de Wolf JT, Brandt RM, Smit JW, van Dongen JJM, Borst J, Melief CJ. Polyclonal expansion of T-cell receptor-gd+ T lymphocytes associated with neutropenia and thrombocytopenia. *Leukemia* 1992; 6: 410-418.
129. Triebel F, Faure F, Mami-Chouaib F, Jitsukawa S, Griscelli A, Genevee C, Roman-Roman S, Hercend T. A novel human V delta gene expressed predominantly in the Ti gamma A fraction of gamma/delta+ peripheral lymphocytes. *Eur J Immunol* 1988; 18: 2021-2027.
- 35 130. De Boer CJ, van Krieken JH, Schuurung E, Kluin PM. Bcl-1/cyclin D1 in malignant lymphoma. *Ann Oncol* 1997; 8: 109-117.
131. Tsujimoto Y, Yunis J, Onorato-Showe L, Erikson J, Nowell PC, Croce CM. Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science* 1984; 224: 1403-1406.
- 40 132. Vaandrager JW, Kleiverda JK, Schuurung E, Kluin-Nelemans JC, Raap AK, Kluin PM. Cytogenetics on released DNA fibers. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1997; 81: 306-311.
133. Vaandrager JW, Schuurung E, Zwikstra E, de Boer CJ, Kleiverda KK, van Krieken JH, Kluin-Nelemans HC, van Ommen GJ, Raap AK, Kluin PM. Direct visualization of dispersed 11q13 chromosomal translocations in mantle cell lymphoma by multicolor DNA fiber fluorescence in situ hybridization. *Blood* 1996; 88: 1177-1182.
- 45 134. Pott C, Tiemann M, Linke B, Ott MM, von Hofen M, Bolz I, Hiddemann W, Parwaresch R, Kneba M. Structure of Bcl-1 and IgH-CDR3 rearrangements as clonal markers in mantle cell lymphomas. *Leukemia* 1998; 12: 1630-1637.
- 50 135. Luthra R, Hai S, Pugh WC. Polymerase chain reaction detection of the t(11; 14) translocation involving the bcl-1 major translocation cluster in mantle cell lymphoma. *Diagn Mol Pathol* 1995; 4: 4-7.

136. de Boer CJ, Schuurung E, Dreef E, Peters G, Bartek J, Kluin PM, van Krieken JH. Cyclin D1 protein analysis in the diagnosis of mantle cell lymphoma. *Blood* 1995; 86: 2715-2723.
137. Haralambieva E, Kleiverda K, Mason DY, Schuurung E, Kluin PM. Detection of three common translocation breakpoints in non-Hodgkin's lymphomas by fluorescence in situ hybridization on routine paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol* 2002; 198: 163-170.
138. Janssen JW, Vaandrager JW, Heuser T, Jauch A, Kluin PM, Geelen E, Bergsagel PL, Kuehl WM, Drexler HG, Otsuki T, Bartram CR, Schuurung E. Concurrent activation of a novel putative transforming gene, myeov, and cyclin D1 in a subset of multiple myeloma cell lines with t(11;14)(q13;q32). *Blood* 2000; 95: 2691-2698.
139. Troussard X, Mauvieux L, Radford-Weiss I, Rack K, Valensi F, Garand R, Vekemans M, Flandrin G, Macintyre EA. Genetic analysis of splenic lymphoma with villous lymphocytes: a Groupe Francais d'Hematologie Cellulaire (GFHC) study. *Br J Haematol* 1998; 101: 712-721.
140. Limpens J, Stad R, Vos C, de Vlaam C, de Jong D, van Ommen GJ, Schuurung E, Kluin PM. Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood* 1995; 85: 2528-2536.
141. Fukuhara S, Rowley JD, Variakojis D, Golomb HM. Chromosome abnormalities in poorly differentiated lymphocytic lymphoma. *Cancer Res* 1979; 39: 3119-3128.
142. Weiss LM, Warnke RA, Sklar J, Cleary ML. Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N Engl J Med* 1987; 317: 1185-1189.
143. Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, Korsmeyer SJ. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 1985; 41: 899-906.
144. Cleary ML and Sklar J. Nucleotide sequence of a t(14; 18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 7439-7443.
145. Korsmeyer SJ. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* 1999; 59: 1693s-1700s.
146. Lithgow T, van Driel R, Bertram JF, Strasser A. The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth Differ* 1994; 5: 411-417.
147. Woodland RT, Schmidt MR, Korsmeyer SJ, Gravel KA. Regulation of B cell survival in xid mice by the proto-oncogene bcl-2. *J Immunol* 1996; 156: 2143-2154.
148. Hsu SY, Lai RJ, Finegold M, Hsueh AJ. Targeted overexpression of Bcl-2 in ovaries of transgenic mice leads to decreased follicle apoptosis, enhanced folliculogenesis, and increased germ cell tumorigenesis. *Endocrinology* 1996; 137: 4837-4843.
149. Lee MS, Chang KS, Cabanillas F, Freireich EJ, Trujillo JM, Stass SA. Detection of minimal residual cells carrying the t(14; 18) by DNA sequence amplification. *Science* 1987; 237: 175-178.
150. Crescenzi M, Seto M, Herzig GP, Weiss PD, Griffith RC, Korsmeyer SJ. Thermostable DNA polymerase chain amplification of t(14;18) chromosome breakpoints and detection of minimal residual disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 4869-4873.
151. Lee MS. Molecular aspects of chromosomal translocation t(14;18). *Semin Hematol* 1993; 30: 297-305.
152. Buchonnet G, Lenain P, Ruminy P, Lepretre S, Stamatoullas A, Parmentier F, Jardin F, Duval C, Tilly H, Bastard C. Characterisation of BCL2-JH rearrangements in follicular lymphoma: PCR detection of 3' BCL2 breakpoints and evidence of a new cluster. *Leukemia* 2000; 14: 1563-1569.
153. Cleary ML, Galili N, Sklar J. Detection of a second t(14;18) breakpoint cluster region in human follicular lymphomas. *J Exp Med* 1986; 164: 315-320.
154. Akasaka T, Akasaka H, Yonetani N, Ohno H, Yamabe H, Fukuhara S, Okuma M. Refinement of the BCL2/immunoglobulin heavy chain fusion gene in t(14;18)(q32;q21) by polymerase chain reaction amplification for long targets. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 21: 17-29.
155. Willis TG, Jadayel DM, Coignet LJ, Abdul-Rauf M, Treleaven JG, Catovsky D, Dyer MJ. Rapid molecular cloning of rearrangements of the IGHJ locus using long-distance inverse polymerase chain reaction. *Blood* 1997; 90: 2456-2464.

156. Yabumoto K, Akasaka T, Muramatsu M, Kadowaki N, Hayashi T, Ohno H, Fukuhara S, Okuma M. Rearrangement of the 5' cluster region of the BCL2 gene in lymphoid neoplasm: a summary of nine cases. *Leukemia* 1996; 10: 970-977.
- 5 157. Pezzella F, Ralfkiaer E, Gatter KC, Mason DY. The 14; 18 translocation in European cases of follicular lymphoma: comparison of Southern blotting and the polymerase chain reaction. *Br J Haematol* 1990; 76: 58-64.
158. Turner GE, Ross FM, Krajewski AS. Detection of t(14;18) in British follicular lymphoma using cytogenetics, Southern blotting and the polymerase chain reaction. *Br J Haematol* 1995; 89: 223-225.
- 10 159. Vaandrager JW, Schuurin E, Raap T, Philippo K, Kleiverda K, Kluin P. Interphase FISH detection of BCL2 rearrangement in follicular lymphoma using breakpoint-flanking probes. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 27: 85-94.
160. Vaandrager JW, Schuurin E, Kluin-Nelemans HC, Dyer MJ, Raap AK, Kluin PM. DNA fiber fluorescence in situ hybridization analysis of immunoglobulin class switching in B-cell neoplasia: aberrant CH gene rearrangements in follicle center-cell lymphoma. *Blood* 1998; 92: 2871-2878.
- 15 161. Jacobson JO, Wilkes BM, Kwaiatkowski DJ, Medeiros LJ, Aisenberg AC, Harris NL. bcl-2 rearrangements in de novo diffuse large cell lymphoma. Association with distinctive clinical features. *Cancer* 1993; 72: 231-236.
162. Hill ME, MacLennan KA, Cunningham DC, Vaughan Hudson B, Burke M, Clarke P, Di Stefano F, Anderson L, Vaughan Hudson G, Mason D, Selby P, Linch DC. Prognostic significance of BCL-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. *Blood* 1996; 88: 1046-1051.
- 20 163. Vaandrager JW, Schuurin E, Philippo K, Kluin PM. V(D)J recombinase-mediated transposition of the BCL2 gene to the IGH locus in follicular lymphoma. *Blood* 2000; 96: 1947-1952.
164. Fenton JA, Vaandrager JW, Aarts WM, Bende RJ, Heering K, van Dijk M, Morgan G, van Noesel CJ, Schuurin E, Kluin-PM. Follicular lymphoma with a novel t(14; 18) breakpoint involving the immunoglobulin heavy chain switch mu region indicates an origin from germinal center B cells. *Blood* 2002; 99: 716-718.
- 25 165. Alaibac M, Filotico R, Giannella C, Paradiso A, Labriola A, Marzullo F. The effect of fixation type on DNA extracted from paraffin-embedded tissue for PCR studies in dermatopathology. *Dermatology* 1997; 195: 105-107.
166. An SF and Fleming KA. Removal of inhibitor(s) of the polymerase chain reaction from formalin fixed, paraffin wax embedded tissues. *J Clin Pathol* 1991; 44: 924-927.
- 30 167. Camilleri-Broet S, Deveze F, Tissier F, Ducruit V, Le Tourneau A, Diebold J, Audouin J, Molina T. Quality control and sensitivity of polymerase chain reaction techniques for the assessment of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements from fixed- and paraffin-embedded samples. *Ann Diagn Pathol* 2000; 4: 71-76.
168. Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB, Manos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. *Am J Clin Pathol* 1991; 95: 117-124.
- 35 169. Legrand B, Mazancourt P, Durigon M, Khalifat V, Crainic K. DNA genotyping of unbuffered formalin fixed paraffin embedded tissues. *Forensic Sci Int* 2002; 125: 205-211.
170. Lo YM, Mehal WZ, Fleming KA. In vitro amplification of hepatitis B virus sequences from liver tumour DNA and from paraffin wax embedded tissues using the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 1989; 42: 840-846.
- 40 171. Longy M, Duboue B, Soubeyran P, Moynet D. Method for the purification of tissue DNA suitable for PCR after fixation with Bouin's fluid. Uses and limitations in microsatellite typing. *Diagn Mol Pathol* 1997; 6: 167-173.
172. Sato Y, Sugie R, Tsuchiya B, Kameya T, Natori M, Mukai K. Comparison of the DNA extraction methods for polymerase chain reaction amplification from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Diagn Mol Pathol* 2001; 10: 265-271.
- 45 173. Tbakhi A, Totos G, Pettay JD, Myles J, Tubbs RR. The effect of fixation on detection of B-cell clonality by polymerase chain reaction. *Mod Pathol* 1999; 12: 272-278.
174. Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 130: 118-126.
175. Chan PK, Chan DP, To KF, Yu MY, Cheung JL, Cheng AF. Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral DNA. *J Clin Pathol* 2001; 54: 401-403.

176. Coombs NJ, Gough AC, Primrose JN. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: e12.

5 177. Wickham CL, Boyce M, Joyner MV, Sarsfield P, Wilkins BS, Jones DB, Ellard S. Amplification of PCR products in excess of 600 base pairs using DNA extracted from decalcified, paraffin wax embedded bone marrow trephine biopsies. *Mol Pathol* 2000; 53: 19-23.

178. Cawkwell L and Quirke P. Direct multiplex amplification of DNA from a formalin fixed, paraffin wax embedded tissue section. *Mol Pathol* 2000; 53: 51-52.

179. Diaz-Cano SJ and Brady SP. DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: protein digestion as a limiting step for retrieval of high-quality DNA. *Diagn Mol Pathol* 1997; 6: 342-346.

10 180. Hoeve MA, Krol AD, Philippo K, Derksen PW, Veenendaal RA, Schuurin E, Kluin PM, van Krieken JH. Limitations of clonality analysis of B cell proliferations using CDR3 polymerase chain reaction. *Mol Pathol* 2000; 53: 194-200.

15 181. Zhou XG, Sandvej K, Gregersen N, Hamilton-Dutoit SJ. Detection of clonal B cells in microdissected reactive lymphoproliferations: possible diagnostic pitfalls in PCR analysis of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement. *Mol Pathol* 1999; 52: 104-110.

Tabla 1. Linaje B, T y NK de tumores malignos linfoides<sup>a</sup>

Linaje	LLA		Leucemias linfocíticas crónicas	Linfomas no Hodgkin			Mieloma múltiple
	infancia	adulto		nodal	extranodal	piel	
B	82 - 86%	75 - 80%	95 - 97%	95 - 97%	90 - 95%	30 - 40%	100%
T	14 - 18%	20 - 25%	3 - 5%	3 - 5%	5 - 100%	60 - 70%	0%
NK	<1%	<1%	1 - 2%	<2%	<2%	<2%	0%

Véase. Ver Van Dongen et al. 1991<sup>1</sup>, Jaffe et al. 2001<sup>2</sup> y Van Dongen et al: 2002<sup>5</sup>

Tabla 2. Número estimado de segmentos génicos V, D y J humanos no polimórficos y que potencialmente pueden estar implicados en los reordenamientos del gen Ig o TCR<sup>a</sup>

Segmento génico	<i>IGH</i>	<i>IGK</i>	<i>IGL</i>	<i>TCRA</i>	<i>TCRB</i>	<i>TCRG</i>	<i>TCRD</i>
Segmentos V							
- Funcional (familia)	44 (7)	43 (7)	38 (10)	46 (32)	47 (23)	6 (4)	8
	66 (7) <sup>b</sup>	76 (7)	56 (11)	54 (32)	67 (30)	9 (4)	8
- Reordenable (familia)							
Segmentos D							
- Reordenable (familia)	27 (7)	-	-	-	2	-	3
Segmentos J							
- Funcional	6 <sup>c</sup>	5 <sup>d</sup>	4	53	13	5	4
- Reordenable	6 <sup>c</sup>	5 <sup>d</sup>	5 <sup>e</sup>	61	13	5	4

ES 2 438 782 T3

Segmento génico	<i>IGH</i>	<i>IGK</i>	<i>IGL</i>	<i>TCRA</i>	<i>TCRB</i>	<i>TCRG</i>	<i>TCRD</i>
<p>a. Solo se incluyen en esta tabla segmentos génicos no polimórficos con una RSS adecuada.                      b. Esta estimación no incluye los pseudogenes VH descubiertos recientemente (generalmente truncados), que se agrupan en tres clanes                      c. Los seis segmentos génicos JH son altamente homólogos en un tramo de ~20 nucleótidos, lo cual es suficiente para el diseño de un cebador consenso.                      d. Los segmentos Jk tienen una alta homología, que permite el diseño de 2 a 3 cebadores consenso Jk.                      e. Cinco de los siete segmentos génicos Jλ tienen una RSS adecuada.</p>							

Tabla 3. Protocolo de PCR normalizado

<i>Condiciones de reacción.</i>			
• Tampón: Tampón ABI II o Tampón ABI Gold			
• volumen final 50 µl			
• ADN 100 ng			
• 10 pmol de cada cebador (no marcado o marcado con 6-FAM)			
(Independientemente del número totales de cebadores en cada tubo de PCR múltiplex)			
• dNTP: concentración final 200 µM			
• MgCl <sub>2</sub> : Concentración final 1,5 mM (para que sea optimizado por la diana)			
• enzima <i>Taq</i> <sup>a</sup> : 1U en la mayoría de los tubos; 2U en tubos con muchos cebadores (>15)			
<i>Condiciones de ciclación</i>			
• preactivación 7 min. a 95°C			
• Temperatura de renaturalización: 60°C			
• Tiempos de ciclación:		"Clásica"	"Nueva"
		<i>Equipo de PCR</i>	<i>Equipo de PCR</i>
	-Desnaturalización	45 seg.	30 seg.
	-Renaturalización	≥ 45 seg.	≥ 30 seg.
	-Extensión	1.30 min.	≥ 30 seg.
	-Extensión final	≥ 10 min.	≥ 10 min.
• Número de ciclos: 35			
• Mantenimiento 15°C (o temperatura ambiente)			
<p>a. Se utilizó Ampli <i>Taq</i> Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA) combinada con 1x Tampón ABI II o 1x Tampón ABI Gold (Applied Biosystems), dependiendo de la diana.</p>			

5

10

Tabla 4. Protocolo normalizado para el análisis de heterodúplex de productos de PCR

<i>Preparación del producto de PCR</i>
• tubo con 10-20 µl de producto de PCR
• desnaturalización del producto de PCR: 5 min. a 95°C
• nueva renaturalización del producto de PCR: 60 min. a 4°C
<b>Condiciones de electroforesis (geles de poliacrilamida no comerciales)</b>
• gel: poliacrilamida al 6% no desnaturalizante (acrilamida: bisacrilamida 29:1)
• tampón: 0,5 x TBE
• tampón de carga: 5 µl de tampón de carga de azul de bromofenol no desnaturalizante enfriado con hielo
• electroforesis: típicamente 2-3 horas a 110 V o durante la noche a 40-50 V <sup>a</sup>
<i>Condiciones de electroforesis (geles de poliacrilamida comerciales)</i>
• gel: poliacrilamida no desnaturalizante (p. ej. BioRad PreCast Gel System o Amersham Pharmacia Biotech Gene Gel Excel Kit)
• tampón: 1 x TBE
• tampón de carga: azul de bromofenol no desnaturalizante enfriado con hielo
• electroforesis: 1,5 horas a 100 V
<i>Visualización</i>
• tinción: 5-10 min. en 0,5 µg/ml EtBr en H <sub>2</sub> O
• decoloración/lavado: 2x 5-10 min. en H <sub>2</sub> O
• visualización: UV iluminación
• alternativa: tinción con plata utilizando el kit de tinción Amersham Pharmacia Biotech DNA Silver
a. El voltaje y el tiempo de electroforesis dependen de los tamaños de los amplicones para la PCR, del grosor del gel de poliacrilamida, y del tipo de equipo de PCR, y se deben adaptar según las circunstancias.

5

Tabla 5. Protocolo normalizado para los productos de PCR GeneScanning

A. Secuenciadores basados en geles
<i>Preparación del producto de PCR</i>
1. dilución del producto de PCR: inicialmente 1:10 en formamida o H <sub>2</sub> O (se puede alterar si la señal fluorescente está fuera del intervalo óptimo; véanse las condiciones de electroforesis)
2. volumen de la muestra: 2 µl de producto de PCR diluido
3. volumen del tampón de carga: 0,5 µl de tampón de carga de azul dextrano + 0,5 µl de patrón interno TAMRA + 2 µl de formamida desionizada
4. desnaturalización del producto de la PCR: 2 min. a 95°C o temperatura superior
5. enfriamiento del producto de la PCR a 4°C
<i>Condiciones de electroforesis</i>
6. gel: poliacrilamida desnaturalizante al 5%
7. tampón: 1 x TBE
8. electroforesis: 2-3,5 horas <sup>a</sup> (véase la Tabla 25)
9. intensidad óptima de la señal fluorescente:
- 600-4.000 unidades fluorescentes (373 plataformas)
- 400-7.000 unidades fluorescentes (377 plataformas)

A. Secuenciadores basados en geles	
<i>Preparación del producto de PCR</i>	
B. Secuenciadores capilares (que van a ser optimizados por secuenciador)	
<i>Preparación del producto de PCR</i>	
1. 1 µl de producto de PCR (el volumen del producto de PCR o los tiempos para la toma de muestras se pueden alterar si la señal fluorescente se encuentra fuera del intervalo óptimo; véanse las condiciones de electroforesis)	
2. volumen de la muestra: 1 µl de producto de la PCR + 9,5 µl (Hi-Di) formamida + 0,5 µl de patrón interno para el análisis de heterodúplex ROX-400	
3. desnaturalización del producto de PCR: 2 min. a 95°C o temperatura superior	
4. enfriamiento del producto de PCR a 4°C durante una hora	
<i>Condiciones de Electroforesis</i>	
5. gel: polímero 3100 POP4	
6. tampón: tampón 1x 3100 con EDTA	
7. electroforesis: 45 minutos <sup>b</sup>	
8. intensidad óptima de la señal de fluorescencia:	
	- hasta 10.000 unidades fluorescentes
<sup>a</sup> el tiempo de electroforesis depende de los tamaños de los amplicones y de la plataforma empleada.	
<sup>b</sup> Para una capilaridad de 36 cm; el tiempo requerido depende del capilar utilizado.	

Tabla 6. Sensibilidad de detección de los reordenamientos *TCRB* clonales

tubo <i>TCRB</i>	Par de cebadores implicado		Control Clonal	Tamaño del producto de PCR	Sensibilidad de detección	
	V	J			PCR <sup>a</sup> sencilla	PCR múltiplex
tubo A	Vβ2	Jβ1.2	paciente	261 nt	1-5%	5%
	Vβ2	Jβ1.3	paciente	267 nt	5%	5%
	Vβ2	Jβ1.6	paciente	267 nt		<5%
	Vβ7	Jβ2.2	paciente	254 nt		10%
	Vβ8a	Jβ1.2	Jurkat	267 nt	0,1%	0,5-1%
	Vβ8a	Jβ2.7	paciente	264 nt		10%
	Vβ10	Jβ2.7	PEER	263 nt		20%
	Vβ3/12a/13a/1 5	Jβ1.6	paciente	278 nt	<5%	5%
	Vβ3/12a/13a/1 5	Jβ2.7	paciente	286 nt		10%
	Vβ17	Jβ2.7	RPMI-8402	260 nt		10%
	Vβ17	Jβ1.1	paciente	260 nt	1%	10%
	Vβ18	Jβ1.2	DND41	261 nt	1%	10%
	Vβ22	Jβ1.1	paciente	265 nt	0,1%	10%
	Vβ8b/23	Jβ1.2	H9	257 nt	0,1%	0,5%
	Vβ24	Jβ1.5	RPMI-8402	264 nt	0,5%	10%
tubo B	Vβ2	Jβ2.1	Molt-4	267 nt	5%	5%
	Vβ1/5	Jβ2.1	paciente	266 nt	5%	1-5%
	Vβ6a/11	Jβ2.1	paciente	265 nt	1%	5%

tubo TCRB	Par de cebadores implicado		Control Clonal	Tamaño del producto de PCR	Sensibilidad de detección	
	V	J			PCR <sup>a</sup> sencilla	PCR múltiplex
	Vβ6a/11	Jβ2.5	paciente	258 nt		5%
	Vβ7	Jβ2.3	PEER	271 nt		<5%
	Vβ8a	Jβ2.1	paciente	293 nt	0,1%	1%
	Vβ3/12a/13a/1 5	Jβ2.1	paciente	258 nt	5%	10%
	Vβ3/12a/13a/1 5	Jβ2.3	paciente	258 nt		<5%
	Vβ16	Jβ2.1	paciente	258 nt	0.5%	10%
	Vβ17	Jβ2.5	CML-T1	270 nt	0,1 - 1%	1%
	Vβ21	Jβ2.3	paciente	282 nt	0,5%	<10%
tubo C	Dβ1	Jβ.11	paciente	304 nt	0.10%	<5%
	Dβ1	Jβ1.2	paciente	306 nt	5%	5%
	Dβ1	Jβ1.4	paciente	310 nt		5-10%
	Dβ1	Jβ1.6	paciente	320 nt		20%
	Dβ1	Jβ2.1	paciente	309 nt	5%	20%
	Dβ1	Jβ2.7	paciente	307 nt		<5%
	Dβ1	Jβ2.5	paciente	310 nt		<1%
	Dβ2	Jβ1.4	paciente	182 nt		<1%
	Dβ2	Jβ2.1	paciente	185 nt	1%	<5%
	Dβ2	Jβ2.5	paciente	191 nt		5%

a. El experimento de dilución para evaluar la sensibilidad de la PCR sencilla no se realizó en cada caso.

Tabla 7. Sensibilidad de detección de los reordenamientos génicos TCRD clonales

Reordenamiento TCRD	Muestra de control clonal (tamaño aproximado)	Sensibilidad de detección por heterodúplex
Vδ1-Jδ1	paciente (200 nt)	5%
	paciente (190 nt)	1-5%
	paciente (200 nt)	5%
Vδ2-Jδ1	paciente (200 nt)	5%
	paciente (220 nt)	5%
	paciente (210 nt)	5%
Vδ2-Jδ3	paciente (220 nt)	5%
Vδ3-Jδ1	paciente (270 nt)	5%
Vδ6-Jδ2	Loucy (210 nt)	0,5%
	paciente (210 nt)	10%
Dδ2-Jδ1	Loucy (150 nt)	0,2%
	paciente (160 nt)	0,5%
	paciente (135 nt)	0,5%
Dδ2-Jδ3	paciente (150 nt)	5%
Dδ2-Dδ3	NALM-16(170 nt)	1%
	paciente (200 nt)	1%

Reordenamiento <i>TCRD</i>	Muestra de control clonal (tamaño aproximado)	Sensibilidad de detección por heterodúplex
	paciente (190 nt)	0,5%
	paciente (170 nt)	0,5%
V $\delta$ 2-D $\delta$ 3	REH (240 nt)	5-10%
	NALM-16 (230 nt)	1-5%
	paciente (250 nt)	5%

Tabla 8. Concordancia entre los resultados de PCR múltiplex y los resultados del análisis mediante transferencia Southern (SB) (PCR/SB) en reordenamientos génicos Ig/TCR por (sub)categoría de muestras congeladas incluidas

Diagnosis	<i>IGH</i> <sup>a</sup>	<i>IGK</i>	<i>IGL</i>	<i>TCRB</i>	<i>TCRG</i>	<i>TCRD</i>
pre-folicular (n=8)	C <sup>b</sup> : 8/8	C: 8/8	C: 4/4	C: 2/4 <sup>b</sup>	C: 0/0	C: 0/0
	P <sup>b</sup> : 0/0	P: 0/0	P: 4/4	P: 4/4	P: 8/8	P: 8/8 <sup>e</sup>
B-CLL (n=16)	C: 15/16	C: 16/16	C: 5/5	C: 1/1	C: 0/0	C: 2/2
	P: 0/0	P: 0/0	P: 9/11	P: 15/15	P: 16/16	P: 14/14
(post-)folicular (n=25)	C: 22/25 <sup>b</sup>	C: 19/24 <sup>c</sup>	C: 3/5	C: 2/4	C: 0/1	C: 0/0
	P: 0/0	P: 0/1	P: 19/20	P: 21/21 <sup>d,e</sup>	P: 22/24	P: 24/25 <sup>e</sup>
Todos tumores malignos de células B (n=49)	C:	C:	C:	C: 4/8	C: 0/1	C: 2/2
	45/49	43/48	12/14			
	P: 0/0	P: 0/1	P: 32/35	P: 41/41	P: 46/48	P: 46/47
Tumores malignos de células T (n=18)	C: 2/2	C: 0/0	C: 0/0	C: 17/17 <sup>c</sup>	C: 15/16 <sup>b</sup>	C: 2/3
	P: 15/16 <sup>e</sup>	P: 17/18	P: 17/18	P: 1/1	P: 1/2	P: 14/15 <sup>e</sup>
Muestras reactivas (n=15)	C: 0/0	C: 0/0	C: 0/0	C: 0/0	C: 0/0	C: 0/0
	P:	P:	P:	P: 14/15	P:	P:
	15/15	15/15	15/15		15/15	15/15
Variadas (n=8)	C: 3/3	C: 2/2	C: 0/0	C: 3/3	C: 1/1	C: 1/1
	P: 3/5	P: 4/6	P: 6/8	P: 5/5 <sup>d,d</sup>	P: 6/7	P: 5/7
Todas las muestras (n=90)	C: 50/54	C: 45/50	C: 12/14	C: 25/29	C: 16/18	C: 5/6
	P: 33/36	P: 36/40	P: 70/76	P: 60/61	P: 68/72	P: 80/84

- a. Incluye análisis de PCR tanto VH-JH como DH-JH  
 b. C, reordenamientos clonales; P, reordenamientos policlonales  
 c. Clonalidad en una muestra solo en GeneScanning  
 d. Clonalidad en una muestra solo en análisis heterodúplex  
 e. Policlonalidad en una muestra solo en GeneScanning  
 f. Policlonalidad en una muestra solo en análisis heterodúplex

5

10

15 Tabla 9. Complementariedad de diferentes Ig dianas de PCR múltiplex para la detección de la clonalidad en tumores malignos de células B definidos mediante transferencia Southern

Tubos de PCR múltiplex	Diagnosis <sup>a</sup>
------------------------	------------------------

ES 2 438 782 T3

	Centro pre-germinal B (n=8)	LLC-B (n=16)	Centro (post-)germinal B (n=25)	Todos los tumores malignos de células B (n=49)
<i>IGH</i> VH-JH FR1	8/8 <sup>b</sup> (100 %)	14/16 <sup>c</sup> (88 %)	15/25 <sup>b</sup> (60 %)	37/49 (76 %)
<i>IGH</i> VH-JH FR2	8/8 (100 %)	15/16 (94 %)	14/25 <sup>b</sup> (56 %)	37/49 (76 %)
<i>IGH</i> VH-JH FR3	8/8 (100 %)	14/16 (88 %)	11/25 <sup>c</sup> (44 %)	33/49 (67 %)
<i>IGH</i> VH-JH 3FR	8/8 (100 %)	15/16 (94 %)	17/25 (68 %)	40/49 (82 %)
<i>IGH</i> D <sub>H</sub> -J <sub>H</sub>	0/8 (0 %)	11/16 (69 %)	11/25 (44 %)	22/49 (45 %)
<i>IGH</i> VH-JH + <i>IGH</i> DH-JH	8/8 (100 %)	15/16 (94 %)	22/25 (88 %)	45/49 (92 %)
<i>IGK</i>	8/8 (100 %)	16/16 (100 %)	21/25 <sup>d</sup> (84 %)	45/49 (92 %)
<i>IGL</i>	4/8 (50 %)	7/16 <sup>e</sup> (44 %)	4/25 <sup>f</sup> (16 %)	15/49 (31 %)
<i>IGH</i> VH-JH + <i>IGK</i>	8/8 (100 %)	16/16 (100 %)	21/25 (84 %)	45/49 (92 %)
<i>IGH</i> VH-JH + <i>IGL</i>	8/8 (100 %)	15/16 (94 %)	17/25 (68 %)	40/49 (82 %)
<i>IGH</i> VH-JH + <i>IGH</i> DH-JH + <i>IGK</i>	8/8 (100 %)	16/16 (100 %)	24/25 (96 %)	48/49 (98 %)
<i>IGH</i> VH-JH + <i>IGH</i> DH-JH + <i>IGK</i> + <i>IGL</i>	8/8 (100 %)	16/16 (100 %)	24/25 (96 %)	48/49 (98 %)

a. Todas las muestras tienen reordenamientos génicos clonales en al menos el locus *IGH* según se determina por medio de análisis de transferencia Southern

b. Dos casos mostraron productos clonales en GeneScanning, pero productos policlonales en análisis de heterodúplex

c. Un caso mostró productos clonales en GeneScanning, pero productos policlonales en análisis de heterodúplex

d. Incluyendo el caso 25-NL-4 con reordenamientos génicos *IGH* clonales pero *IGK* policlonales débiles en el análisis mediante transferencia Southern

e. Incluyendo los casos 11-NL-19 y 12-ES-1 con reordenamientos génicos *IGH* + *IGK* clonales pero *IGL* policlonales en el análisis mediante transferencia Southern

Tabla 10. Condiciones y muestras de control para el análisis mediante PCR múltiplex de reordenamientos Ig/génicos TCR y translocaciones t(11;14) y t(14;18)

PCR múltiplex	Tubos	Condiciones de PCR			Controles Positivos (ejemplos)	
		Tampón	<i>Taq</i> Gold (U)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	policlonal	monoclonal <sup>a</sup>
<i>IGH</i> VH-JH	A/B/C	Gold/II	1	1,5	amígdala	A: NALM-6; SU-DHL-5; SU-DHL-6
						B: NALM-6; SU-DHL-5; SU-DHL-6
						C: NALM-6; SU-DHL-5; SU-DHL-6
<i>IGH</i> DH-JH	D/E	Gold	1	1,5	amígdala	D: KCA; ROS15
						E: HSB-2, HPB-LLA
<i>IGK</i>	A/B	Gold/II	1	1,5	amígdala	A: KCA; ROS 15
						B: ROS 15, 380
<i>IGL</i>	A	Gold/II	1	2,5	amígdala	A: CLL-1; EB-4B; KCA
<i>TCRB</i>	A/B/C	II	2 (A,B) <sup>b</sup> 1 (C)	3,0 (A,B) 1,5 (C)	PB-MNC <sup>c</sup>	A: RPMI-8402; Jurkat; PEER; DND-41
						B: PEER; CML-T1, MOLT-3
						C: Jurkat
<i>TCRG</i>	A/B	II	1	1,5	PB-MNC <sup>c</sup>	A: MOLT-3; RPMI-8402; Jurkat; PEER

PCR múltiplex	Tubos	Condiciones de PCR			Controles Positivos (ejemplos)	
		Tampón	Taq Gold (U)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	policlonal	monoclonal <sup>a</sup>
						B: Jurkat; PEER
<i>TCRD</i>	A	II	1	2,0	PB-MNC <sup>c</sup>	A: PEER, REH
<i>BCL1-IGH</i>	A	II	1	2,0	NA <sup>c</sup>	A: JVM 2
<i>BCL2-IGH</i>	A/B/C	II	1	1,5	NA <sup>c</sup>	A: DoHH2; SU-DHL-6
						B: K231 <sup>d</sup>
						C: OZ; SC1 <sup>d</sup> ; SU-DHL-16

a. La mayoría de los controles de la línea celular clonal se pueden obtener a través de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; persona de contacto: Dr. H.G. Drexler (dirección: Department of Human and Animal Cell Cultures, Mascheroder Weg 1B, 38124 Braunschweig, Germany).<sup>192,193</sup>

b. En la mayoría de los tubos múltiplex solo se necesita 1 U de TaqGold, pero se necesitan 2 U de TaqGold en tubos A y B de *TCRB* debido a que contienen >15 cebadores diferentes.

c. Abreviaturas: PB-MNC, células mononucleares de sangre periférica; NA, no aplicable.

d. Las líneas celulares positivas K231, OZ, y SC1 t(14;18) fueron proporcionadas amablemente por el Prof. Martin Dyer, Universidad de Leicester, Leicester, GB.

Tabla 11. Intervalos de tamaño, bandas no específicas, y método de detección en el análisis de PCR múltiplex de los reordenamientos génicos Ig/TCR y aberraciones cromosómicas t(11;14) y t(14;18)

PCR múltiplex	Intervalo de tamaño (pb)	Bandas no específicas (pb)	Método de análisis preferido	GeneScan tiempo de migración: gel/capilar
<i>IGH</i> VH-JH	Tubo A: 310-360	Tubo A: ~85	GeneScanning y análisis de heterodúplex igualmente adecuados	3 - 3,5 h/45 min
	Tubo B: 250-295	Tubo B: -		
	Tubo C: 100-170	Tubo C: -		
<i>IGH</i> DH-JH	Tubo D: 110-290 (DH1/2/4/5/6-J <sub>H</sub> ) +390-420 (D <sub>H</sub> 3-J <sub>H</sub> )	Tubo D: 350 <sup>a</sup>	análisis de heterodúplex ligeramente preferido a GeneScanning (la variación de los tamaños de los productos dificulta GeneScanning)	3 - 3,5 h/45 min
	Tubo E: 100-130	Tubo E: 211 <sup>b</sup>		
<i>IGK</i>	Tubo A: 120-160 (V <sub>K</sub> 1f/6/V <sub>K</sub> 7-J <sub>K</sub> ) +190-210 (V <sub>K</sub> 3f-J <sub>K</sub> ) +260-300 (V <sub>K</sub> 2f/V <sub>K</sub> 4/V <sub>K</sub> 5-J <sub>K</sub> )	Tubo A: -	análisis de heterodúplex ligeramente preferido a GeneScanning (el pequeño tamaño de empalme + la variación de los tamaños de los productos dificulta GeneScanning)	3 - 3,5h/ 45 min
	Tubo B: 210-250 V <sub>K</sub> 1f/6/V <sub>K</sub> 7-Kde +270-300 (V <sub>K</sub> 3f/intron-Kde) +350-390 (V <sub>K</sub> 2f/V <sub>K</sub> 4/V <sub>K</sub> 5-Kde)	Tubo B: ~404		
<i>IGL</i>	Tubo A: 140-165	Tubo A: -	análisis de heterodúplex claramente preferido a GeneScanning (el pequeño tamaño de empalme dificulta GeneScanning)	2 h/45 min
<i>TCRB</i>	Tubo A: 240-285	Tubo A: (273) <sup>c</sup>	análisis de heterodúplex ligeramente preferido a GeneScanning (repertorio limitado, particularmente en caso de uso de ψVγ10 y ψVγ11)	2 h/45 min
	Tubo B: 240-285	Tubo B: <150, 221 <sup>d</sup>		
	Tubo C: 170-210 (Dβ2) + 285-325 (Dβ1)	Tubo C: 128, 337 <sup>d</sup>		
<i>TCRG</i>	Tubo A: 145-255	Tubo A: -	GeneScanning y análisis de heterodúplex igualmente adecuados	2 h/45 min
	Tubo B: 80-220	Tubo B: -		
<i>TCRD</i>	Tubo A: 120-280	Tubo A: ~ 90	análisis de heterodúplex claramente preferible a	2 h/45 min

ES 2 438 782 T3

PCR múltiplex	Intervalo de tamaño (pb)	Bandas no específicas (pb)	Método de análisis preferido	GeneScan tiempo de migración: gel/capilar
			GeneScanning (la baja cantidad de molde + la variación de tamaños de los productos dificulta GeneScanning)	
<i>BCL1-IGH</i>	Tubo A: 150-2000	Tubo A: ~ 550 (débil)	agarosa	NA <sup>e</sup>
<i>BCL2-IGH</i>	Tubo A: variable	Tubo A: -	agarosa	NA <sup>e</sup>
	Tubo B: variable	Tubo B: -		
	Tubo C: variable	Tubo C: -		

- a. La banda de 350 pb no específica es el resultado de la renaturalización cruzada del cebador D<sub>H</sub>2 a una secuencia en la región aguas arriba de J<sub>H</sub>4. En GeneScanning esta banda no específica no migraba simultáneamente con los productos de DJ (véase la Figura 5B).
- b. El producto de PCR de 211 pb que representa la banda de fondo más pequeño derivada de la región D<sub>H</sub>7-J<sub>H</sub>1 de la línea germinal. Cuando la amplificación por PCR es muy eficaz, también se pueden obtener productos de la PCR más largos debido a la renaturalización del cebador con reordenamiento del gen J<sub>H</sub> aguas abajo, por ejemplo 419 pb (D<sub>H</sub>7-J<sub>H</sub>2), 1031 pb (D<sub>H</sub>7-J<sub>H</sub>3), etc.
- c. La banda de 273 pb (principalmente visible por GeneScanning) se ve particularmente en muestras con bajo número de células linfoides contaminantes.
- d. La intensidad de la banda no específica depende de la calidad del cebador.
- e. NA, no aplicable

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un conjunto de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaz de amplificar un reordenamiento de *TCRB*  $V\beta$ - $J\beta$  que comprende al menos un cebador directo y al menos un cebador inverso, en donde dicho cebador directo se selecciona entre los cebadores de la familia  $V\beta$  mostrados en la Fig. 7B, y en donde dicho cebador inverso se selecciona entre los cebadores  $J\beta A$  y  $J\beta B$  mostrados en la Fig. 7B.
2. El conjunto de cebadores de amplificación de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cebador inverso se selecciona entre los cebadores  $J\beta A$  mostrados en la Fig. 7B.
3. El conjunto de cebadores de amplificación de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cebador inverso se selecciona entre los cebadores  $J\beta B$  mostrados en la Fig. 7B.
- 10 4. El conjunto de cebadores de amplificación de ácido nucleicos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende adicionalmente un conjunto de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaz de amplificar un reordenamiento de *TCRB*  $D\beta$ - $J\beta$  que comprende al menos un cebador directo y al menos un cebador inverso, en donde dicho cebador directo se selecciona entre los cebadores  $D\beta 1$  o  $D\beta 2$  mostrados en la Fig. 7B, y en donde dicho cebador inverso se selecciona entre los cebadores  $J\beta A$  y  $J\beta B$  mostrados en la Fig. 7B.
- 15 5. Un análisis de amplificación de ácido nucleico, preferiblemente un análisis de PCR, más preferiblemente un análisis de PCR múltiplex, que utiliza al menos un conjunto de cebadores de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3, o 4.
6. El análisis de amplificación de ácido nucleico de la reivindicación 5, caracterizado por que es un análisis de PCR.
- 20 7. El análisis de amplificación de ácido nucleico de la reivindicación 5 o 6, caracterizado por que es un análisis de PCR múltiplex, que comprende adicionalmente uno o más de los conjuntos de cebadores seleccionados del grupo que consiste en:
- a. un conjunto de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaz de amplificar un reordenamiento de *IGH*  $V_H$ - $J_H$  que comprende al menos un cebador directo y un cebador inverso, en donde dicho cebador directo se selecciona entre los miembros de la familia de  $V_H$  mostrados en la Fig. 3B, y en donde dicho cebador inverso es el cebador consenso  $J_H$  mostrado en la Fig. 3B.
- 25 b. un conjunto de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaz de amplificar un reordenamiento de *IGH*  $D_H$ - $J_H$  que comprende al menos un cebador directo y un cebador inverso, en donde dicho cebador directo se selecciona entre los cebadores de la familia  $D_H$  mostrados en la Fig. 4A, y en donde dicho cebador inverso es el cebador consenso  $J_H$  mostrado en la Fig. 4A.
- 30 c. un conjunto de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaz de amplificar un reordenamiento de *IGK*  $V_K$ - $J_K$  que comprende al menos un cebador directo y al menos un cebador inverso, en donde dicho cebador directo se selecciona entre los cebadores  $V_K$  de la familia mostrados en la Fig. 5B, y en donde dicho cebador inverso se selecciona entre entre los cebadores  $J_K$  mostrados en la Fig. 5B.
- 35 d. un conjunto de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaz de amplificar un reordenamiento de *IGK*  $V_K$ /Intrón-Kde que comprende al menos un cebador directo y un cebador inverso, en donde dicho cebador directo se selecciona entre los cebadores  $V_K$  o el cebador INTR mostrado en la Fig. 5B, y en donde dicho cebador inverso es el cebador Kde mostrado en la Fig. 5B.
- 40 e. un conjunto de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaz de amplificar un reordenamiento de *IGL*  $V_\lambda$ - $J_\lambda$  que comprende al menos un cebador directo y un cebador inverso, en donde dicho cebador directo se selecciona entre los cebadores  $V_\lambda$  mostrados en la Fig. 6B, y en donde dicho cebador inverso es el cebador  $J_\lambda$  mostrado en la Fig. 6B.
- 45 f. un conjunto de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaz de amplificar un reordenamiento de *TCRG*  $V_\gamma$ - $J_\gamma$  que comprende al menos un cebador directo y al menos un cebador inverso, en donde dicho cebador directo se selecciona entre los cebadores de la familia  $V_\gamma$  mostrados en la Fig. 8B, y en donde dicho cebador inverso se selecciona entre los cebadores  $J_\gamma$  mostrados en la Fig. 8B.
- g. un conjunto de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaz de amplificar un reordenamiento de *TCRD*  $V\delta$ - $J\delta$  que comprende al menos un cebador directo y al menos un cebador inverso, en donde dicho cebador directo se selecciona entre los cebadores  $V\delta$  mostrados en la Fig. 9B, y en donde dicho cebador inverso se selecciona entre los cebadores  $J\delta$  mostrados en la Fig. 9B.
- 50 h. un conjunto de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaz de amplificar un reordenamiento de *TCRD*  $D\delta$ - $D\delta$  que comprende un cebador directo y un cebador inverso, en donde dicho cebador directo es el cebador  $D\delta 2$  mostrado en la Fig. 9B, y en donde dicho cebador inverso es el cebador  $D\delta 3$  mostrado en la Fig. 9B.

- i. un conjunto de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaz de amplificar un reordenamiento de *TCRD* D $\delta$ -J $\delta$  que comprende un cebador directo y al menos un cebador inverso, en donde dicho cebador directo es el cebador D $\delta$ 2 mostrado en la Fig. 9B, y en donde dicho cebador inverso se selecciona entre los cebadores J $\delta$  mostrados en la Fig. 9B.
- 5 j. un conjunto de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaz de amplificar un reordenamiento de *TCRD* V $\delta$ -D $\delta$  que comprende al menos un cebador directo y un cebador inverso, en donde dicho cebador directo se selecciona entre los cebadores V $\delta$  mostrados en la Fig. 9 B, y en donde dicho cebador inverso es el cebador D $\delta$ 3 mostrado en la Fig. 9B.
- 10 k. un conjunto de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaz de amplificar una translocación cromosómica (11;14)(*BCL1-IGH*) que comprende un cebador directo y un cebador inverso, en donde dicho cebador directo es el cebador *BCL1/MTC* como se muestra en la Fig. 10A, y en donde dicho cebador inverso es el cebador consenso J<sub>H</sub> mostrado en la Fig. 10A.
- 15 l. un conjunto de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaz de amplificar una translocación cromosómica t(14;18)(*BCL2-IGH*), que comprende al menos un cebador directo y un cebador inverso, en donde dicho cebador directo se selecciona entre los cebadores MBR, los cebadores 3'MBR y los cebadores mcr mostrados en la Fig. 11A, y en donde dicho cebador inverso es el cebador consenso J<sub>H</sub> mostrado en la Fig. 11A.
- m. un conjunto de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaz de amplificar el gen *TBXAS1* humano que comprende un cebador directo y un cebador inverso, en donde dicho cebador directo es el cebador *TBXAS1/X9U* de la Fig. 12A, y en donde dicho cebador inverso es el cebador *TBXAS1/X9L* de la Fig. 12A.
- 20 n. un conjunto de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaz de amplificar el gen de la proteína activadora de la recombinación humana (*RAG1*) que comprende un cebador directo y un cebador inverso, en donde dicho cebador directo es el cebador *RAG1/X2U* de la Fig. 12A, y en donde dicho cebador inverso es el cebador *RAG1/X2L* de la Fig. 12A.
- 25 o. un conjunto de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaz de amplificar proteína de dedo de zinc de la leucemia promielocítica humana (*PLZF*) que comprende un cebador directo y un cebador inverso, en donde dicho cebador directo es el cebador *PLZF/X1U* de la Fig. 12A, y en donde dicho cebador inverso es el cebador *PLZF/X1L* de la Fig. 12A.
- 30 p. un conjunto de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaz de amplificar el gen *AF4* humano (exón 3) que comprende un cebador directo y un cebador inverso, en donde dicho cebador directo es el cebador *AF4/X3U* de la Fig. 12A, y en donde dicho cebador inverso es el cebador *AF4/X3L* de la Fig. 12A.
- q. un conjunto de cebadores de amplificación de ácido nucleico capaz de amplificar el gen *AF4* humano (exón 11) que comprende un cebador directo y un cebador inverso, en donde dicho cebador directo es el cebador *AF4/X11U* de la Fig. 12A, y en donde dicho cebador inverso es el cebador *AF4/X11L* de la Fig. 12A.
- 35 8. Un método para detectar un reordenamiento de *TCRB* V $\beta$ -J $\beta$ , que comprende el uso de uno o más conjuntos de cebadores de acuerdo con las reivindicaciones 1-4 en un análisis de amplificación de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-7.
9. Un método para detectar un reordenamiento *TCRB* D $\beta$ -J $\beta$ , que comprende el uso de conjuntos de cebadores de acuerdo con la reivindicación 4 en un análisis de amplificación de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-7.
- 40 10. Un método para detectar dos o más reordenamientos, dos o más translocaciones o al menos un reordenamiento y al menos una translocación, seleccionados del grupo que consiste de un reordenamiento de *IGH* V<sub>H</sub>-J<sub>H</sub>, un reordenamiento de *IGH* D<sub>H</sub>-J<sub>H</sub>, un reordenamiento de *IGK* V<sub>K</sub>-J<sub>K</sub>, un reordenamiento de *IGK* V<sub>K</sub>/Intrón-Kde, un reordenamiento de *IGL* V $\lambda$ -J $\lambda$ , un reordenamiento de *TCRB* V $\beta$ -J $\beta$ , un reordenamiento de *TCRB* D $\beta$ -J $\beta$ , un reordenamiento de *TCRG* V $\gamma$ -J $\gamma$ , un reordenamiento de *TCRD* V $\delta$ -J $\delta$ , un reordenamiento de *TCRD* D $\delta$ -D $\delta$ , un reordenamiento de *TCRD* D $\delta$ -J $\delta$ , un reordenamiento de *TCRD* V $\delta$ -D $\delta$ , una translocación t(11, 14)(*BCL1-IGH*) y una translocación t(14;18)(*BCL2-IGH*), utilizando un análisis de amplificación nucleico de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicho reordenamiento comprende al menos un reordenamiento de *TCRB* V $\beta$ -J $\beta$ .
- 45 11. Un método para evaluar reordenamientos clonales, que comprende al menos un reordenamiento de *TCRB* V $\beta$ -J $\beta$ , y/o aberraciones cromosómicas utilizando al menos el conjunto de cebadores de acuerdo con la reivindicación 1, y opcionalmente al menos un conjunto de cebadores como se define en las reivindicaciones 4 y 7a-7q.
- 50 12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11 para la detección de enfermedad residual mínima (ERM) o para la identificación de dianas de la PCR que se van a utilizar para la detección de ERM a través de PCR cuantitativa en tiempo real.

13. Un método de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en donde un ácido nucleico amplificado se detecta utilizando un análisis de fragmentos de PCR de alta resolución automatizado.
- 5 14. Un kit para la detección de al menos un reordenamiento de *TCRB* V $\beta$ -J $\beta$  y opcionalmente un reordenamiento seleccionado del grupo que consiste en, un reordenamiento de *IGH* V $_H$ -J $_H$ , un reordenamiento de *IGH* D $_H$ J $_H$ , un reordenamiento de *IGK* V $_K$ -J $_K$ , un reordenamiento de *IGK* V $_K$ /Intrón-Kde, un reordenamiento de *IGL* V $_L$ -J $_L$ , un reordenamiento de *TCRB* D $\beta$ -J $\beta$ , un reordenamiento de *TCRG* V $_G$ -J $_G$ , un reordenamiento de *TCRD* V $\delta$ -J $\delta$ , un reordenamiento de *TCRD* D $\delta$ -D $\delta$ , un reordenamiento de *TCRD* D $\delta$ -J $\delta$ , un reordenamiento de *TCRD* V $\delta$ -D $\delta$ , y una translocación seleccionada entre t(11;14)(*BCL1-IGH*) y t(14;18)(*BCL2-IGH*), que comprende el uso de al menos el conjunto de cebadores de acuerdo con la reivindicación 1, y opcionalmente al menos un conjunto de cebadores como se define en las reivindicaciones 4 y 7a-71.
- 10 15. Un kit de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende adicionalmente al menos un conjunto de cebadores como se define en la reivindicación 7m-7q.
16. El uso de un método de acuerdo con la reivindicación 11 para evaluar la calidad de una muestra de ADN extraído de una muestra biológica, preferiblemente una muestra biológica incluida en parafina.
- 15 17. El conjunto de cebadores de amplificación de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente cebadores directos que comprenden los cebadores D $\beta$ 1 y D $\beta$ 2 mostrados en la Fig. 7B, los cebadores de la familia V $_H$  mostrados en la Fig. 3B, los cebadores de la familia D $_H$  mostrados en la Fig. 4A, los cebadores de la familia V $_K$  e INTR mostrados en la Fig. 5B, los cebadores V $_L$  mostrados en la Fig. 6B, los cebadores de la familia V $_G$  mostrados en la Fig. 8B, los cebadores V $\delta$  y D $\delta$ 2 mostrados en la Fig. 9B, el cebador *BCL1/MTC* mostrado en la Fig. 10A, y los cebadores 3'MBR y mcr mostrados en la Fig. 11A y cebadores inversos que comprenden los cebadores J $\beta$ A y J $\beta$ B mostrados en la Fig. 7B, el cebador consenso J $_H$  mostrado en las Figs. 3B, 4A, 10A, y la Fig. 11A, los cebadores J $_K$  y Kde mostrados en la Fig. 5B, el cebador J $_L$  mostrado en la Fig. 6B, los cebadores J $_G$  mostrados en la Fig. 8B y los cebadores J $\delta$  y D $\delta$ 3 mostrados en la Fig. 9B.
- 20 18. El conjunto de cebadores de amplificación de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de la reivindicación 1 o la reivindicación 17, que comprende adicionalmente cebadores directos que comprenden los cebadores TBXAS1/X9U, RAG1/X2U, PLZF/X1U, AF4/X3U, AF4/X11U de la Fig. 12A y los cebadores inversos que comprenden los cebadores TBXAS1/X9L, RAG1/X2L, PLZF/X1L, AF4/X3L, AF4/X11L de la Fig. 12A.
- 25

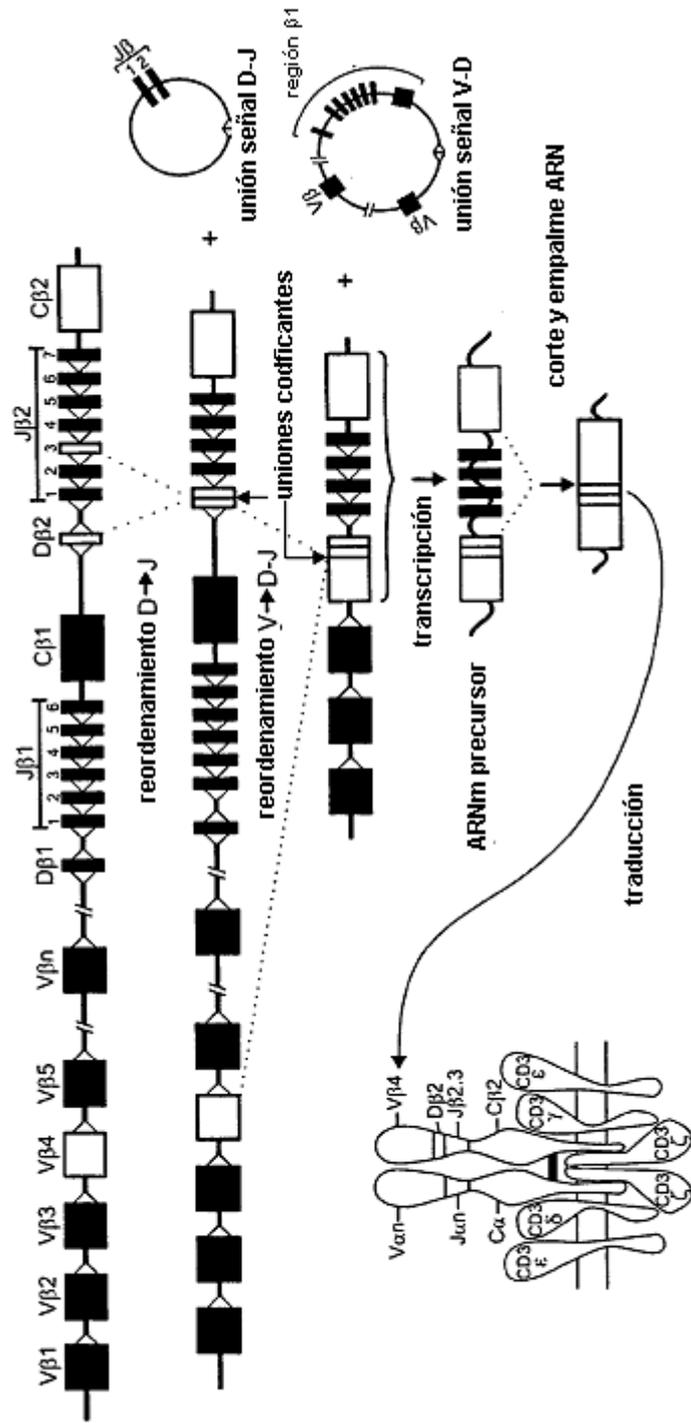


Fig. 1

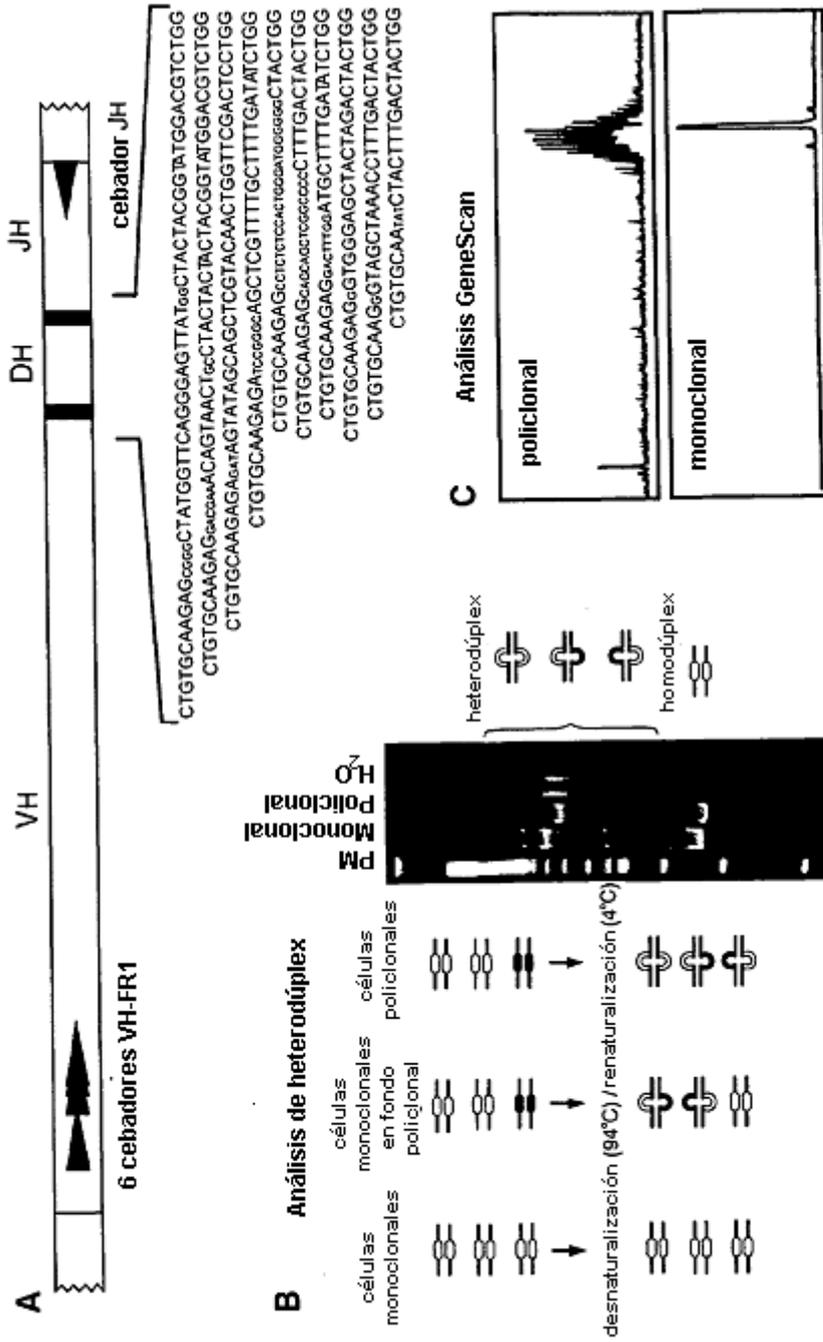


Fig. 2



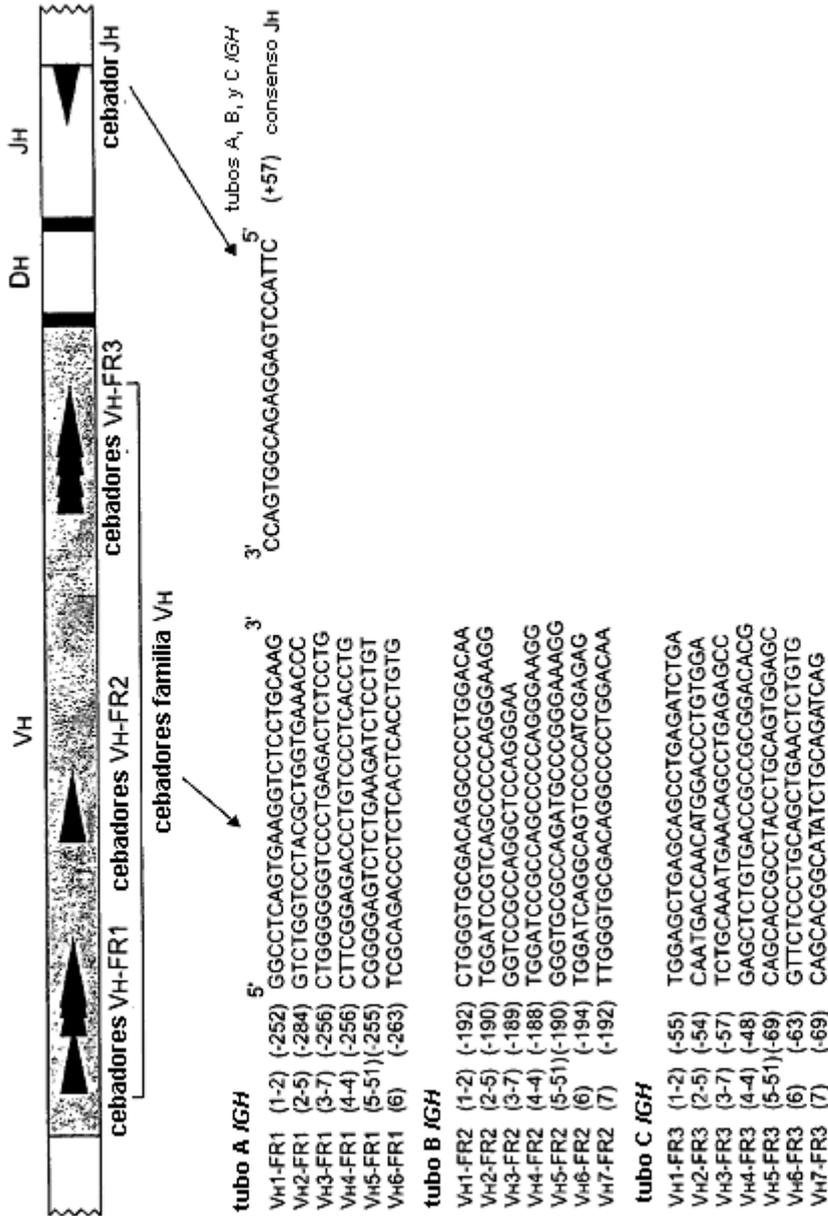


Fig. 3B

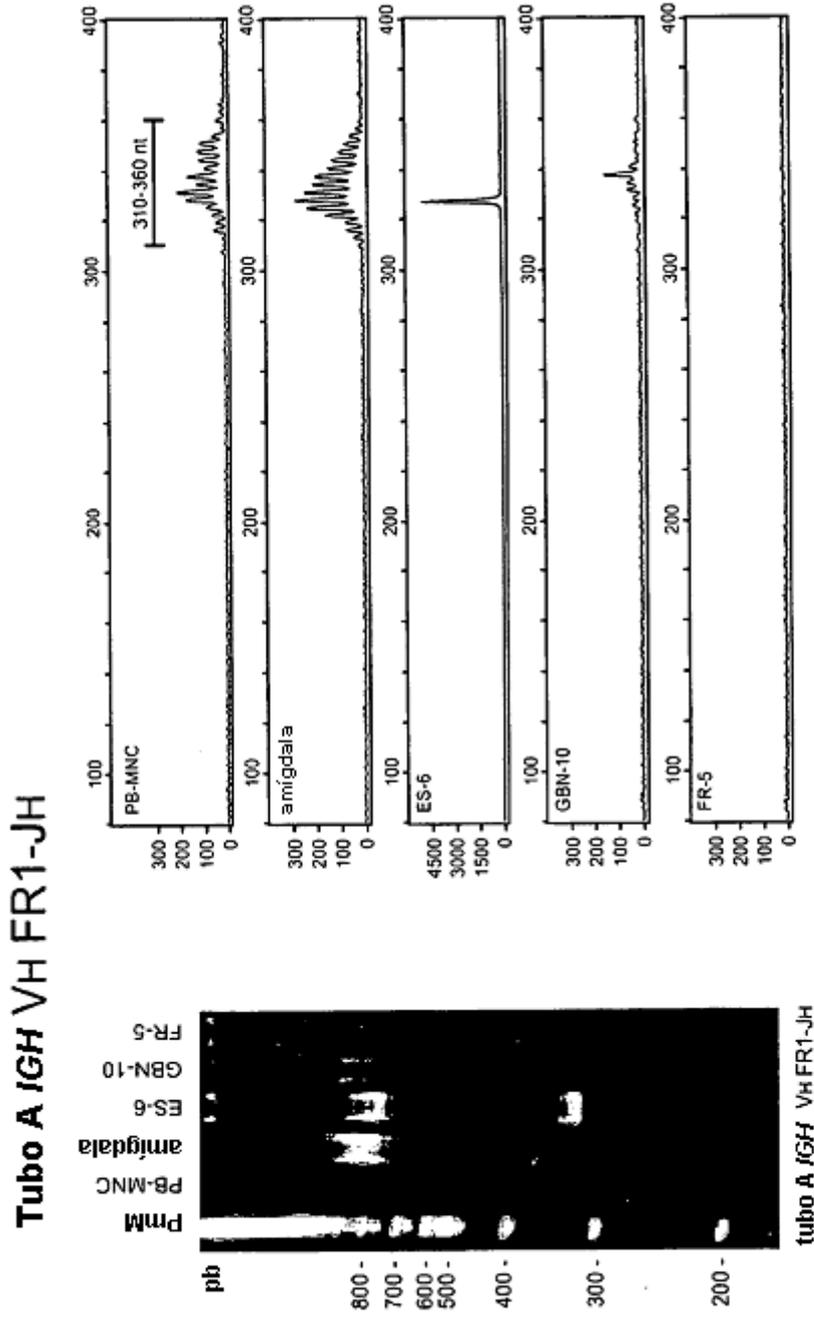


Fig. 3C

**Tubo B IGH VH FR2-JH**

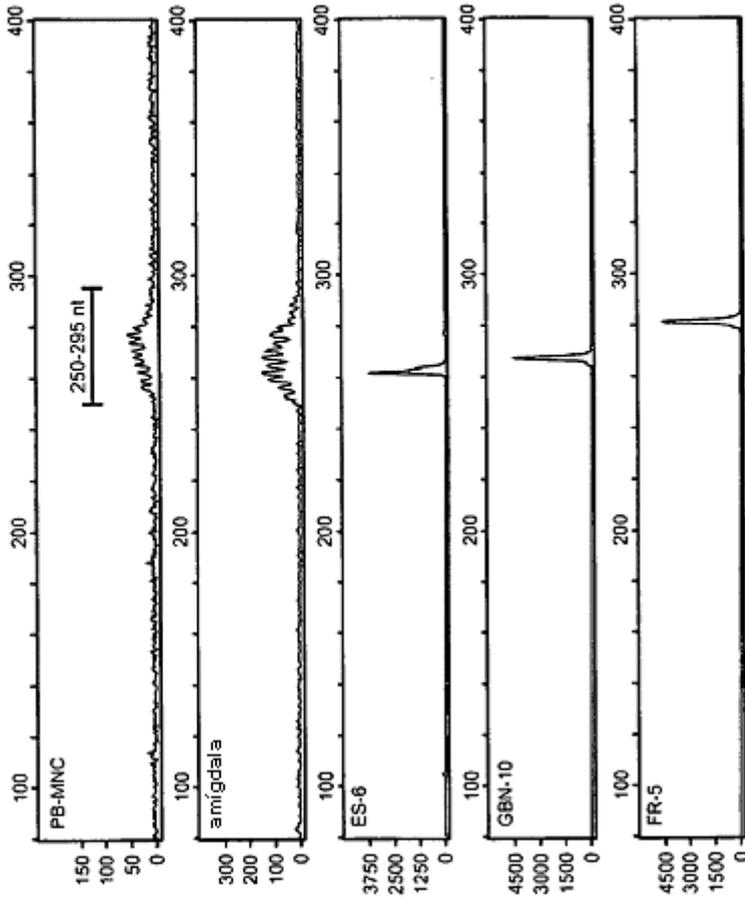
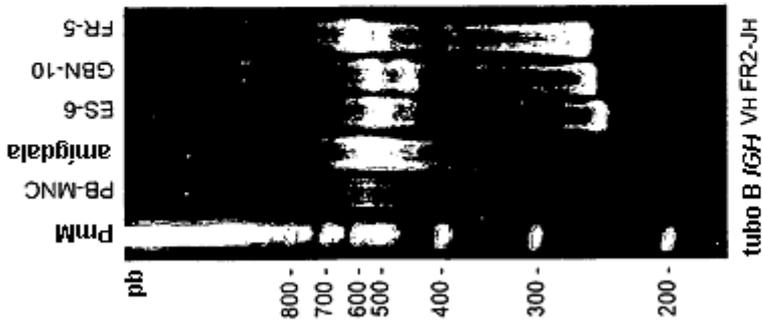
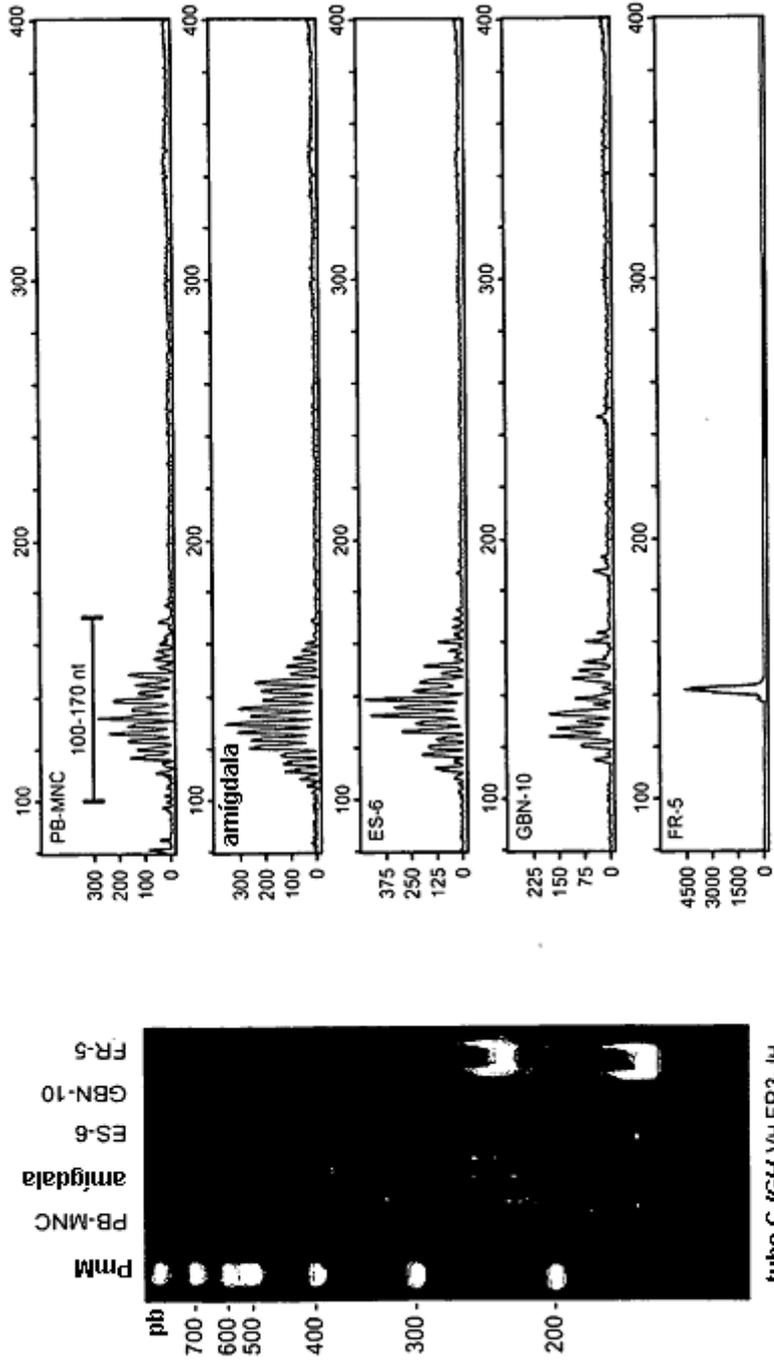


Fig. 3D

**Tubo C IGH VH FR3-JH**



**Fig. 3E**

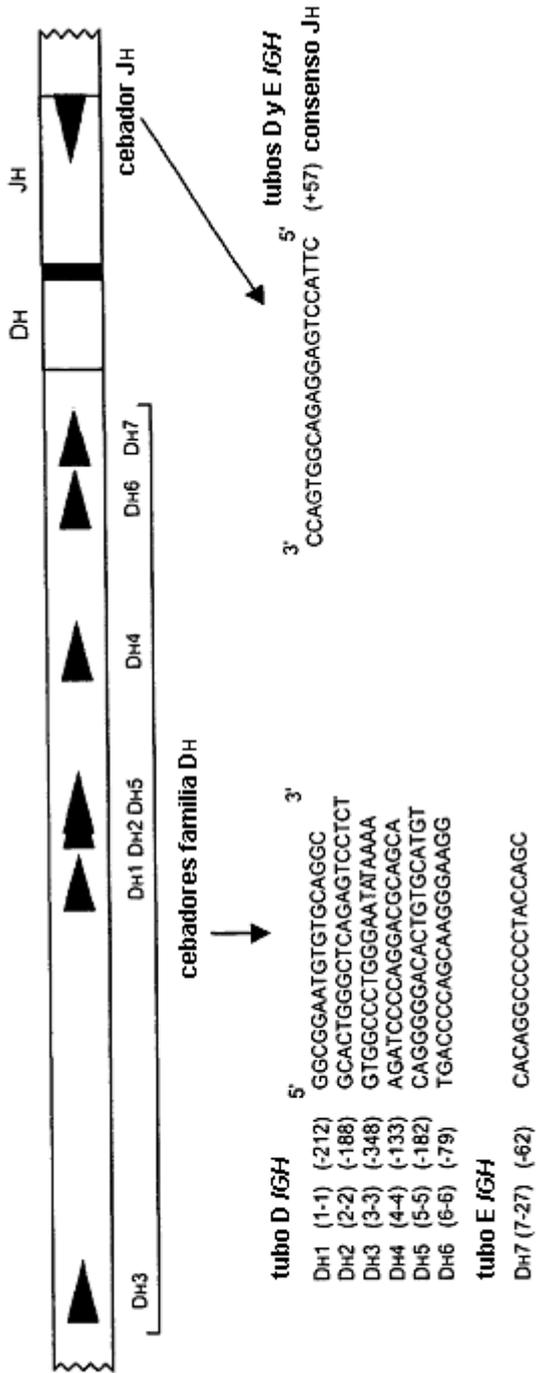


Fig. 4A

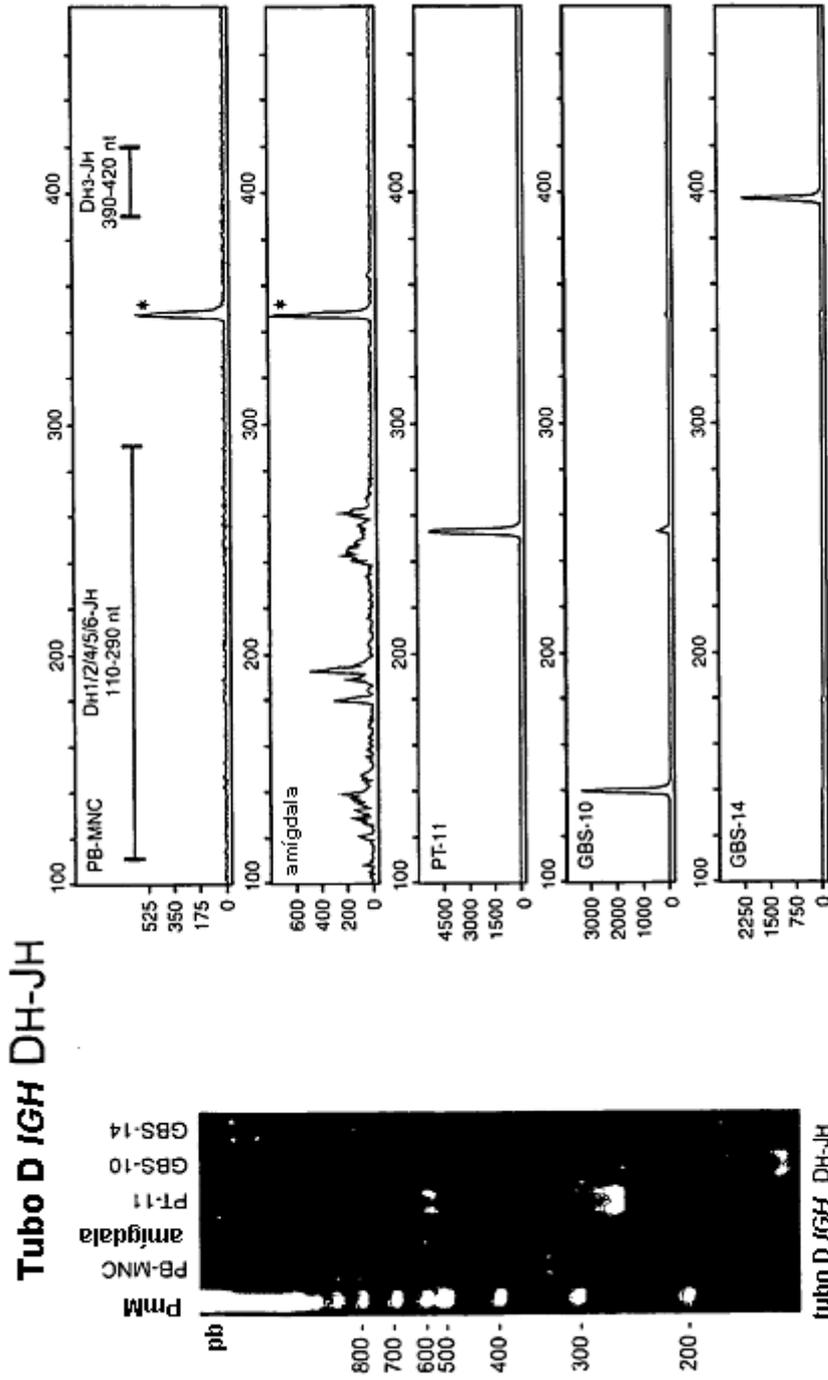


Fig. 4B

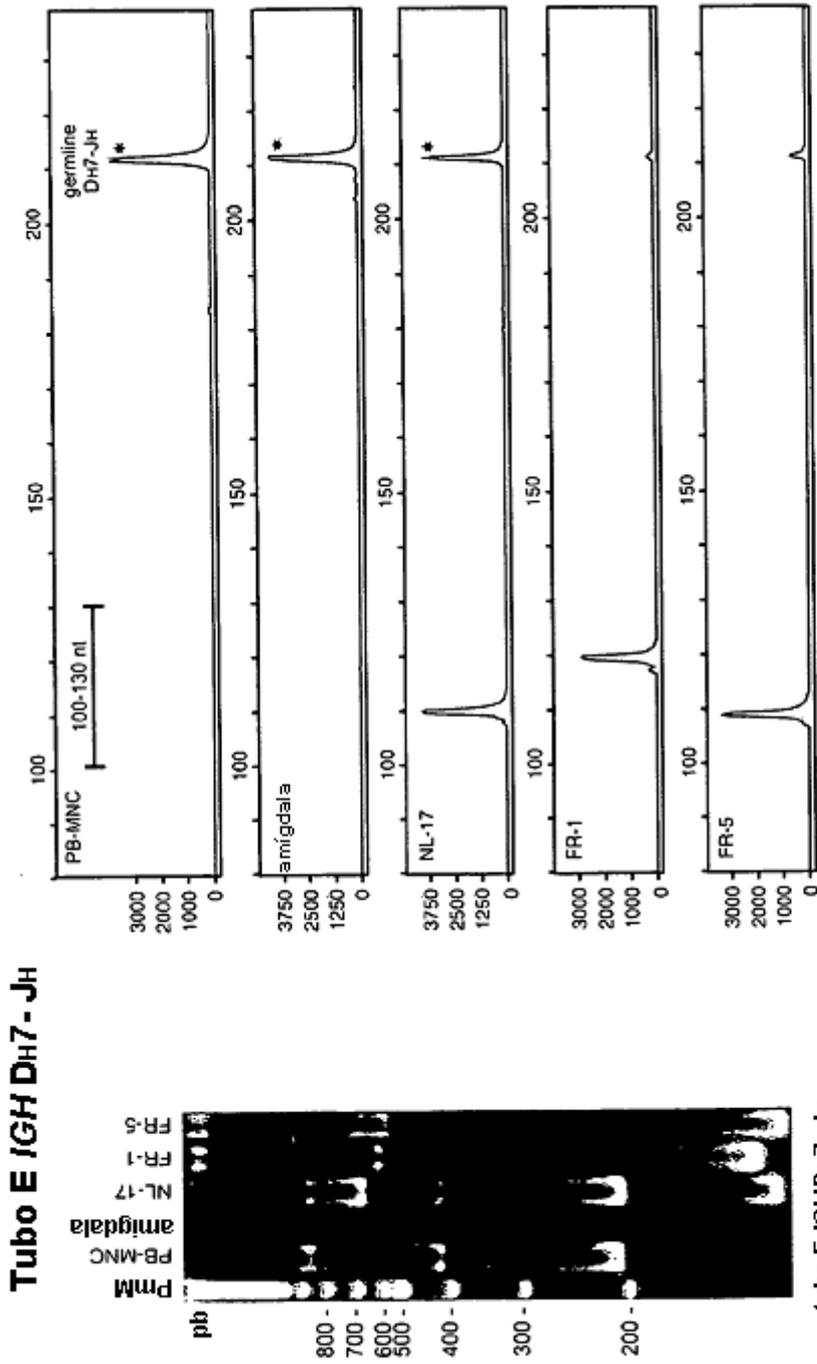


Fig. 4C

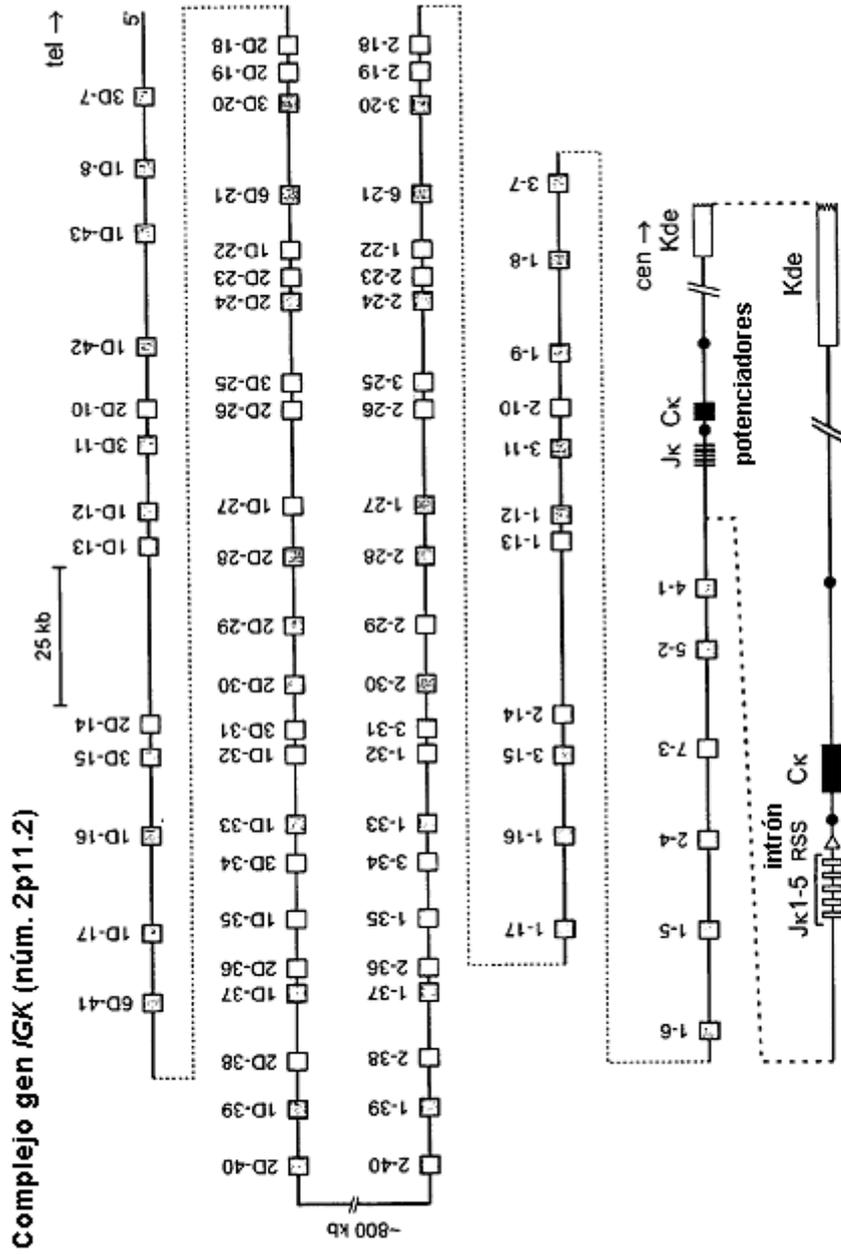


Fig. 5A

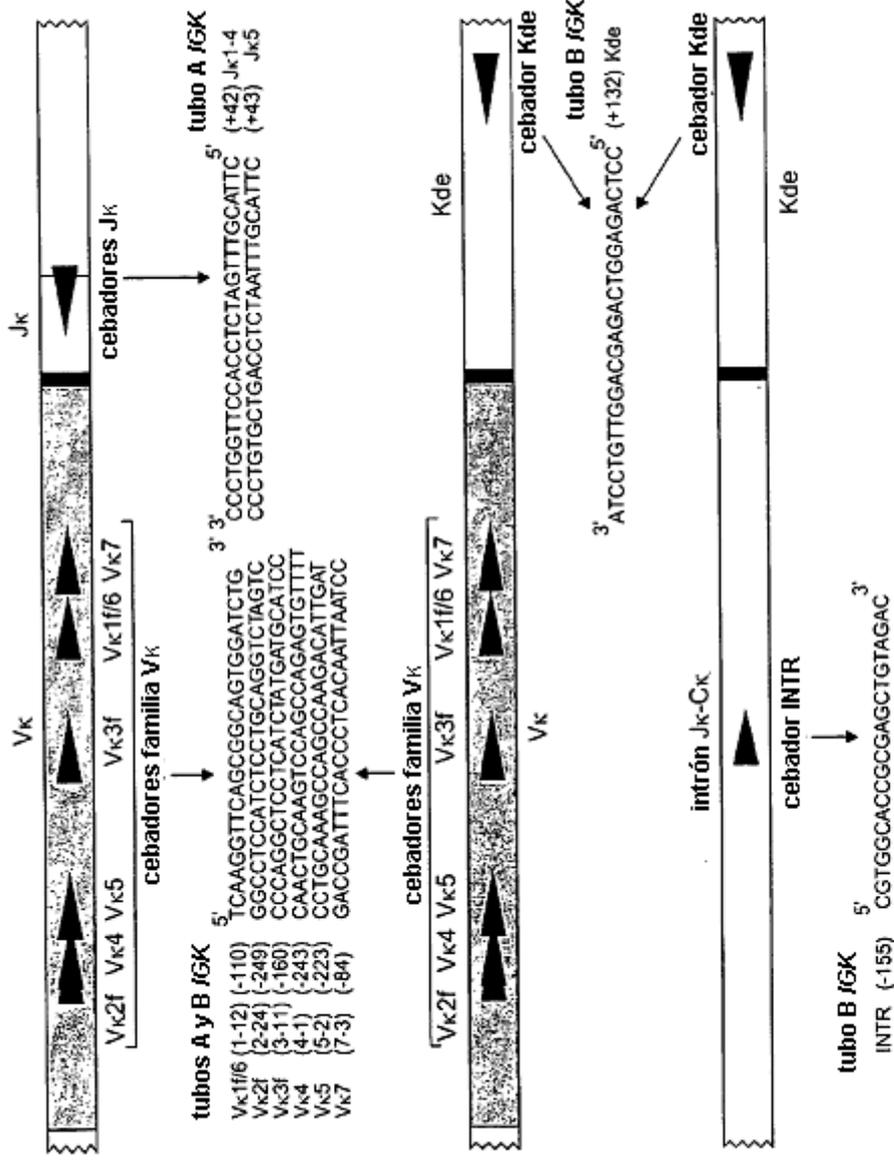


Fig. 5B



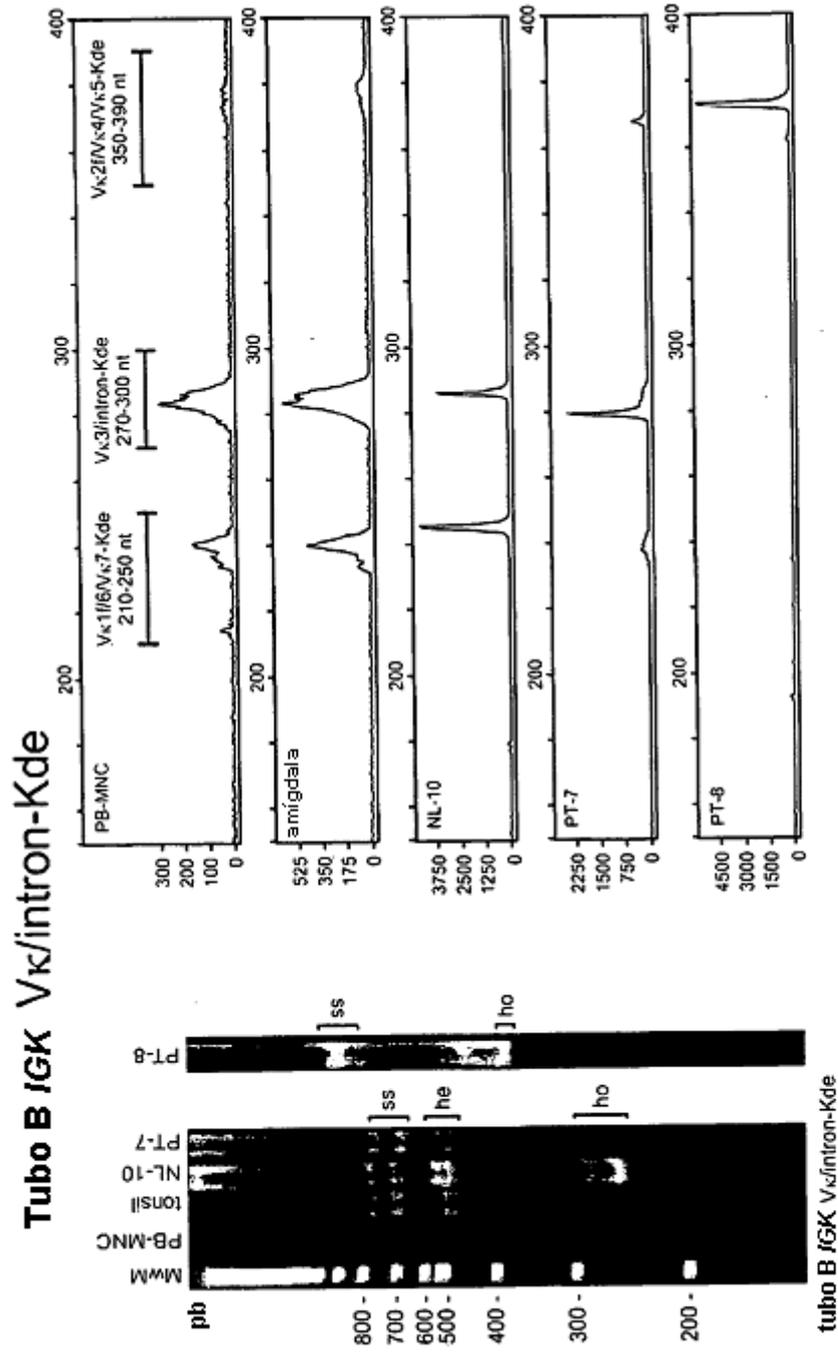


Fig. 5D



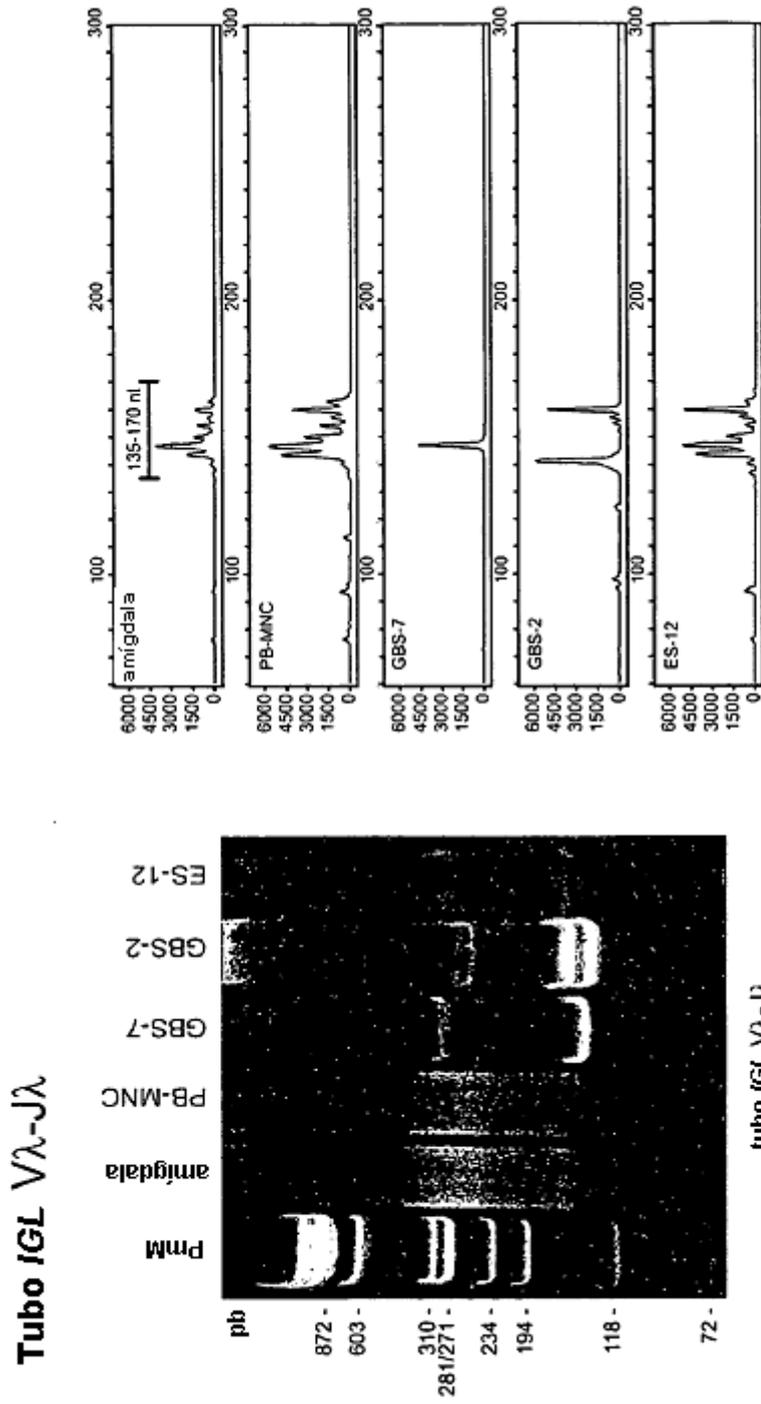
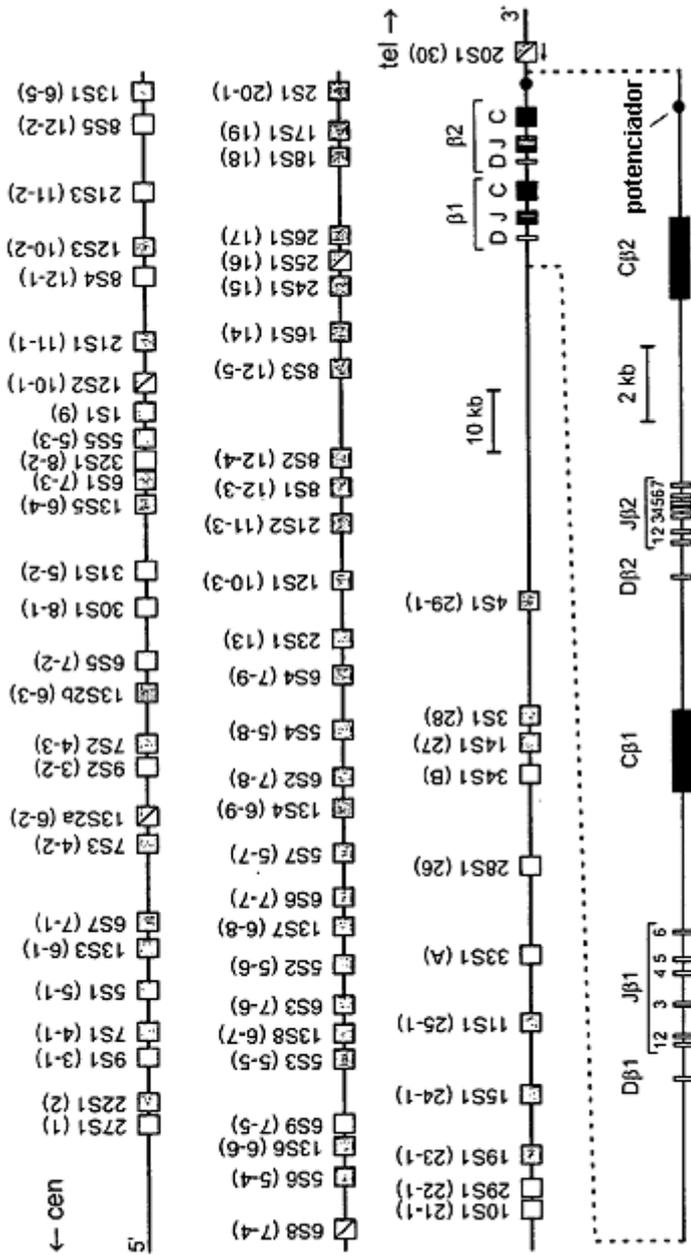


Fig. 6C

**Complejo gen TCRB (núm. 7q34)**



**Fig. 7A**

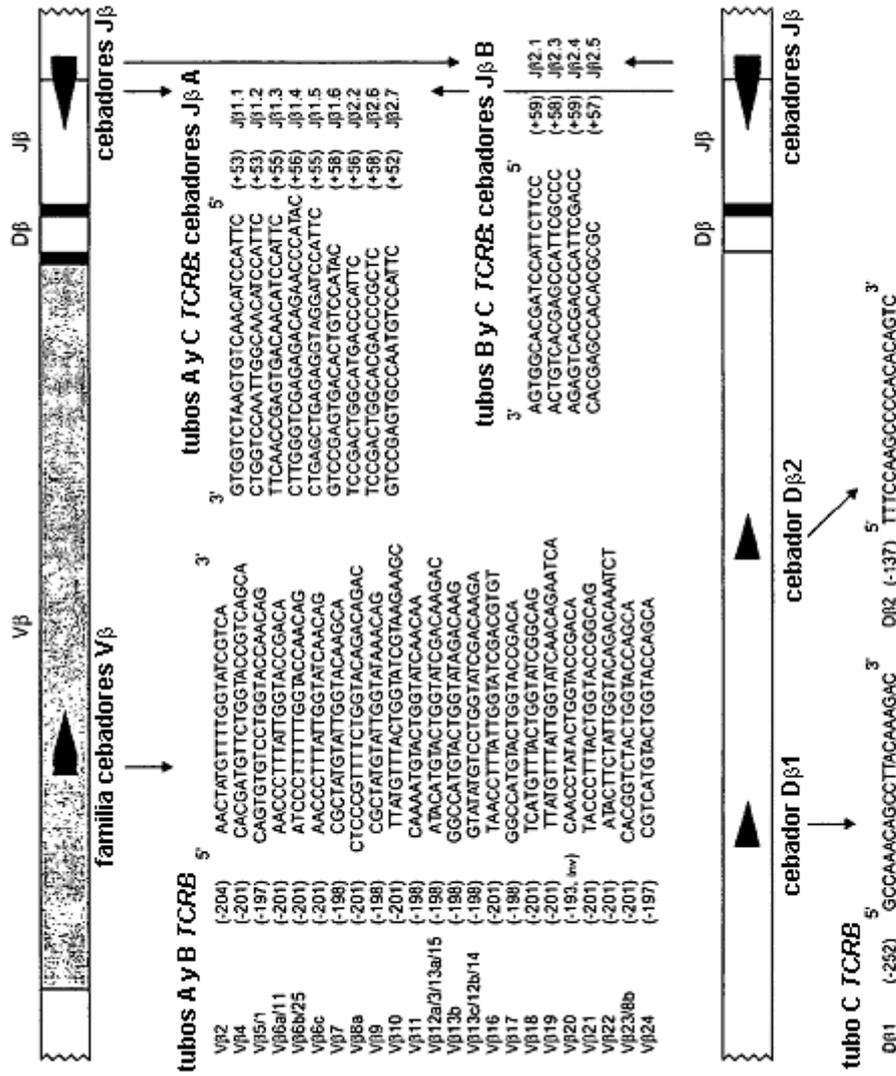


Fig. 7B

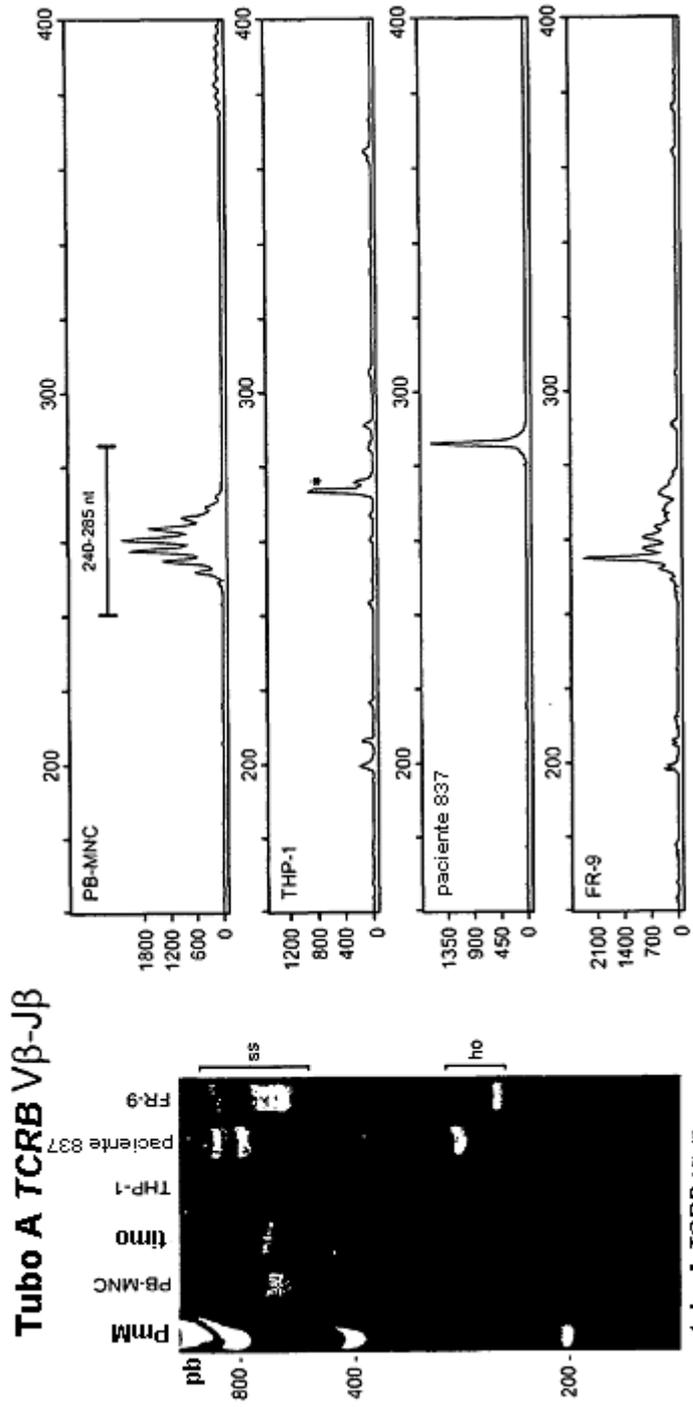


Fig. 7C

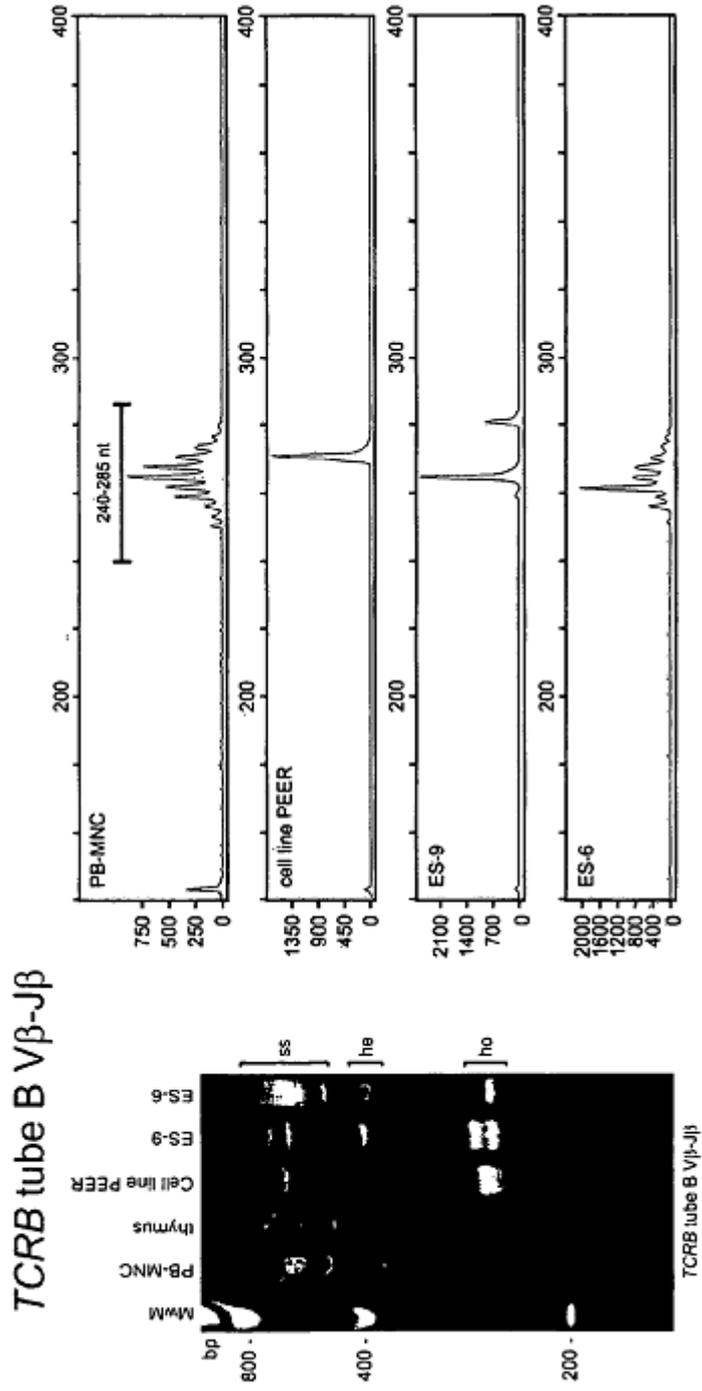


Fig. 7D

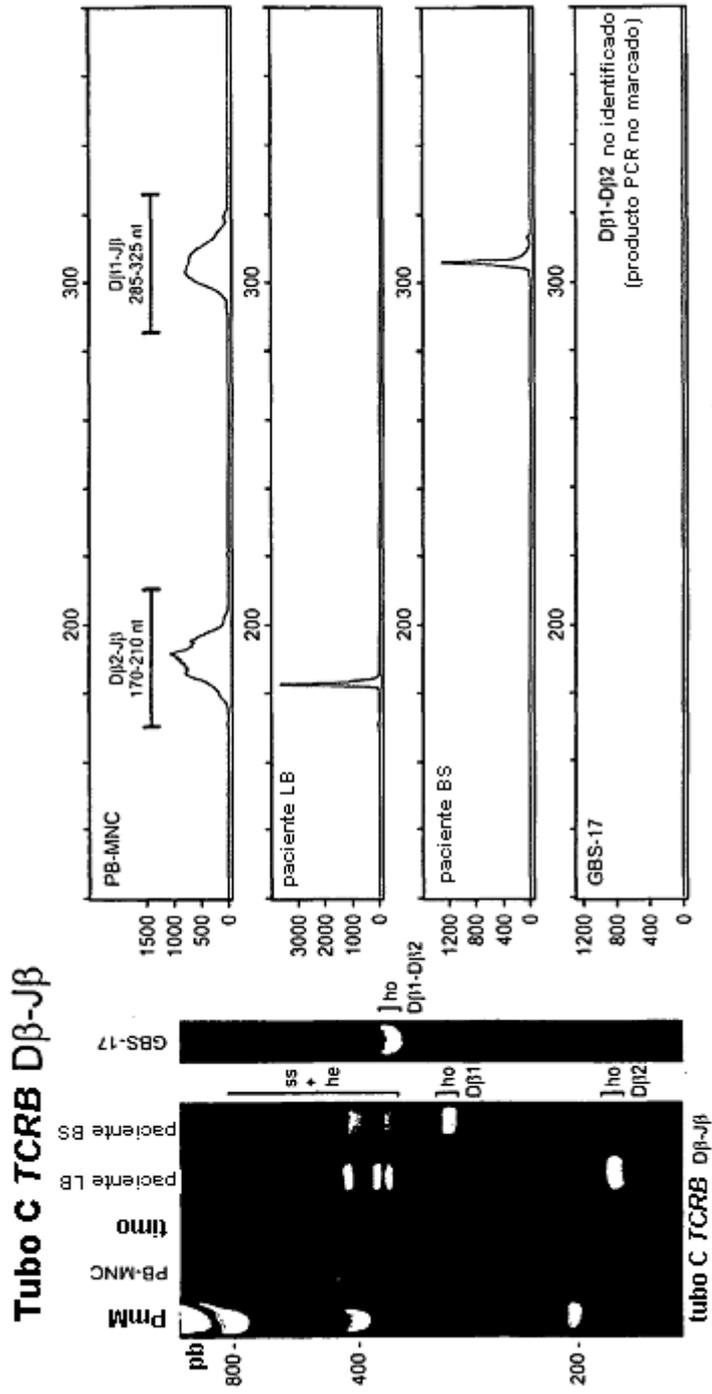
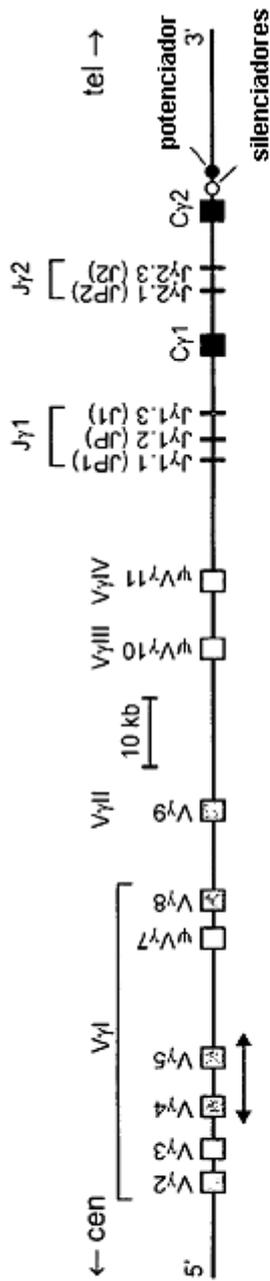
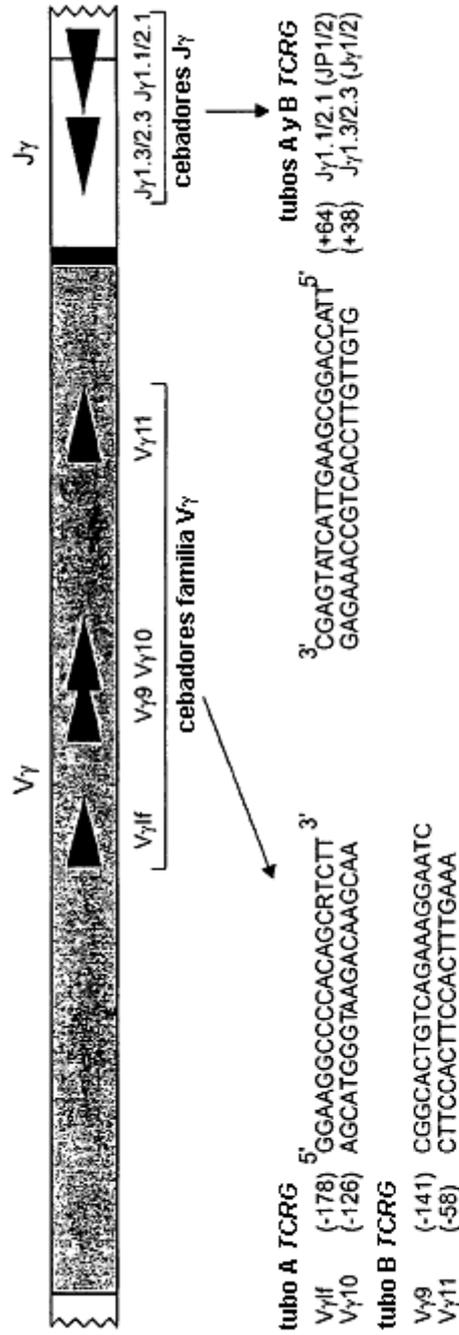


Fig. 7E

**Complejo gen TCRG (núm. 7p14)**



**Fig. 8A**



**Fig. 8B**

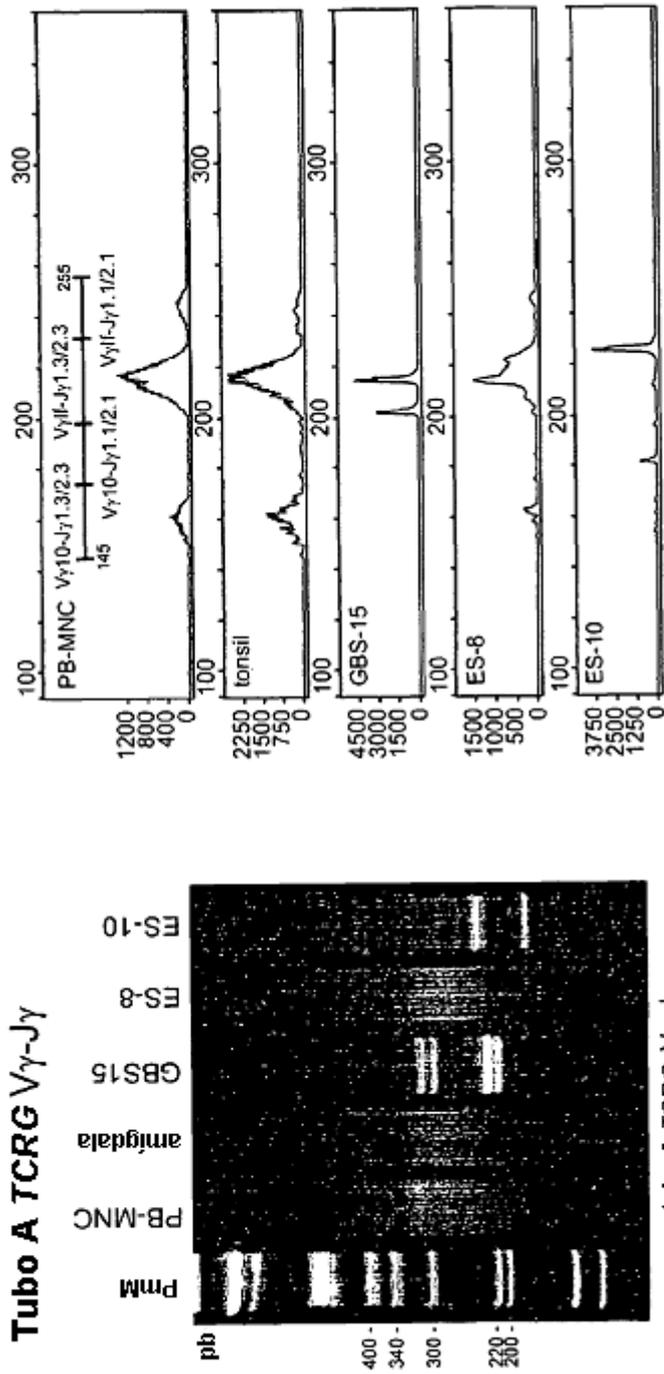


Fig. 8C

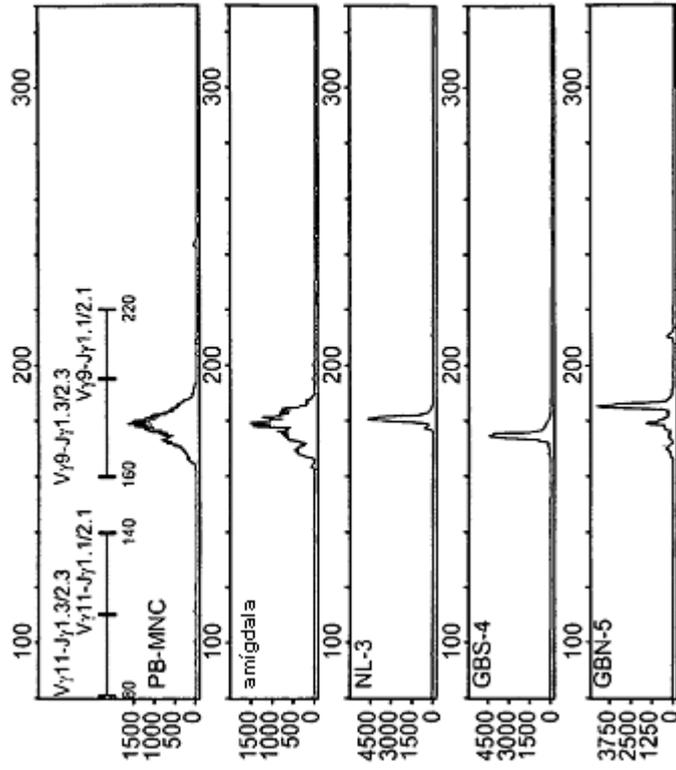
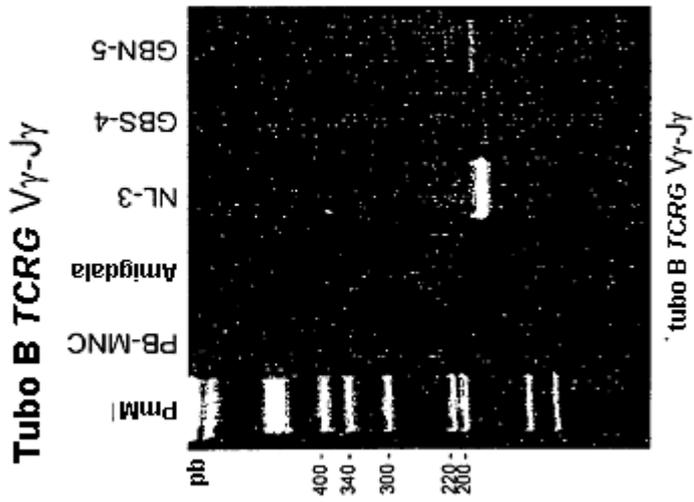


Fig. 8D



**Complejo gen TCRD (núm. 14q11.2)**

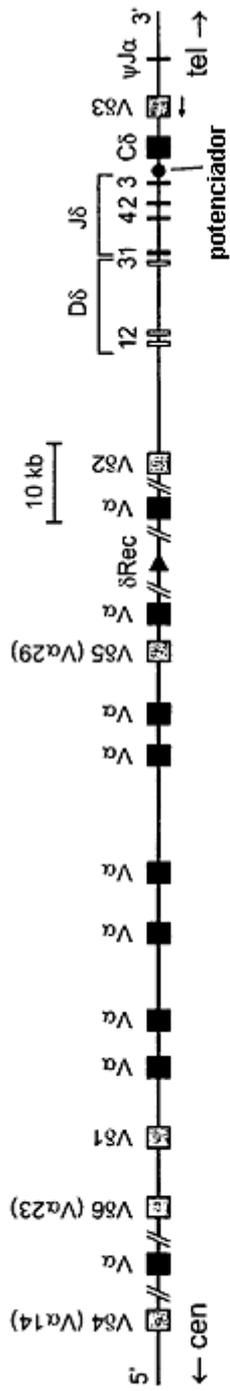


Fig. 9A

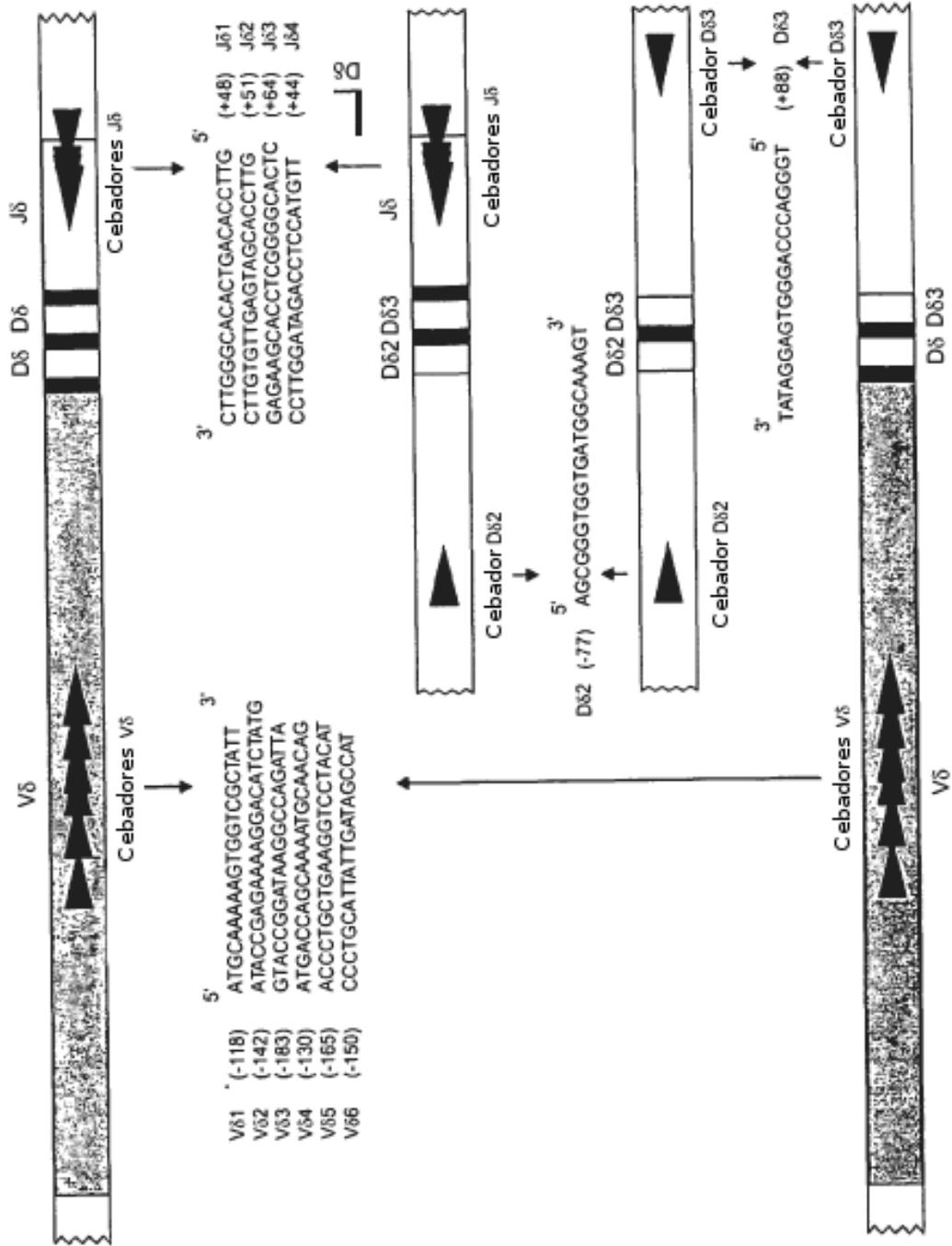


Fig. 9B

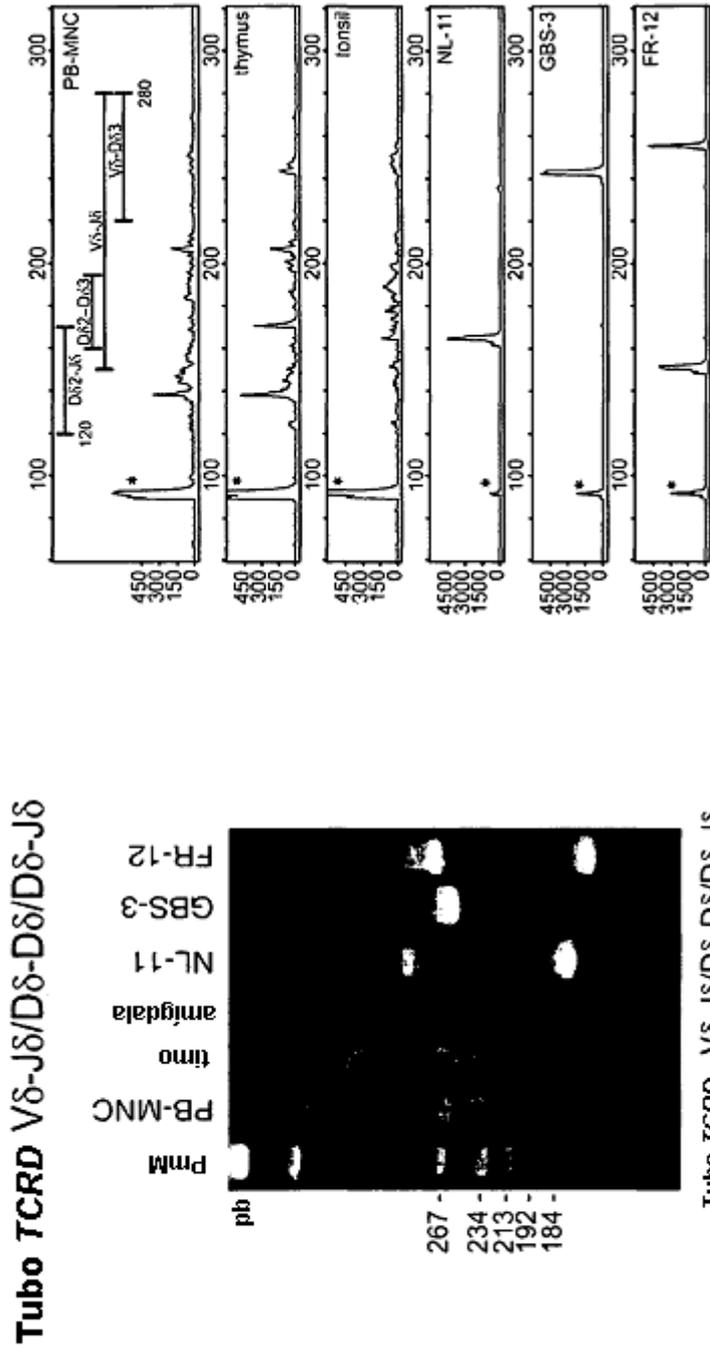


Fig. 9C

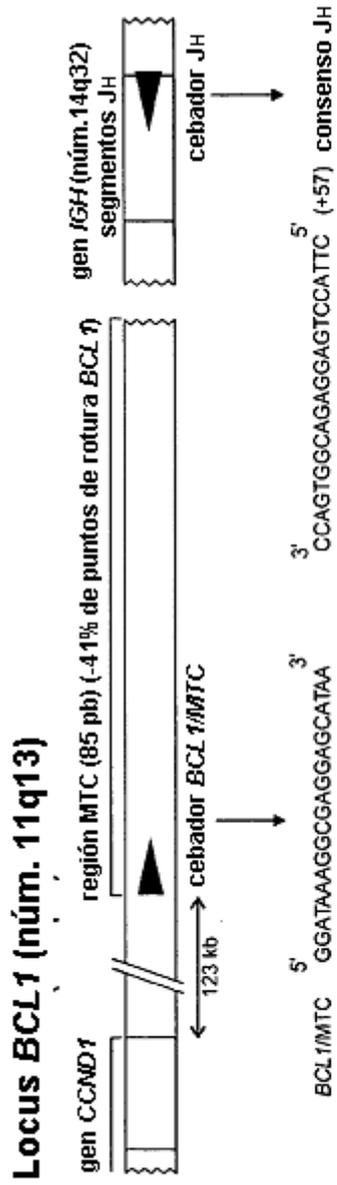
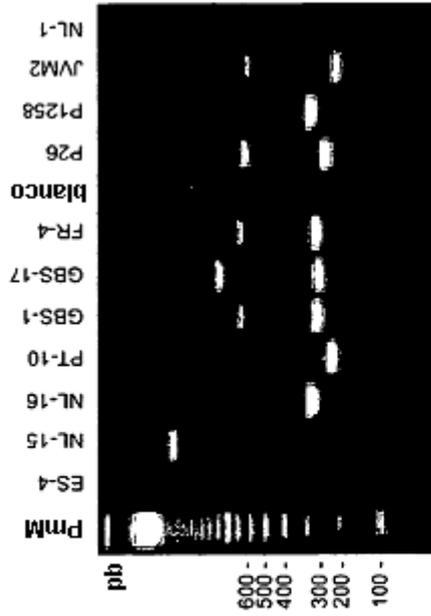


Fig. 10A

tubo t(11; 14) *BCL1/MTC-JH*



tubo t(11; 14) *BCL1/MTC-JH*

Fig. 10B

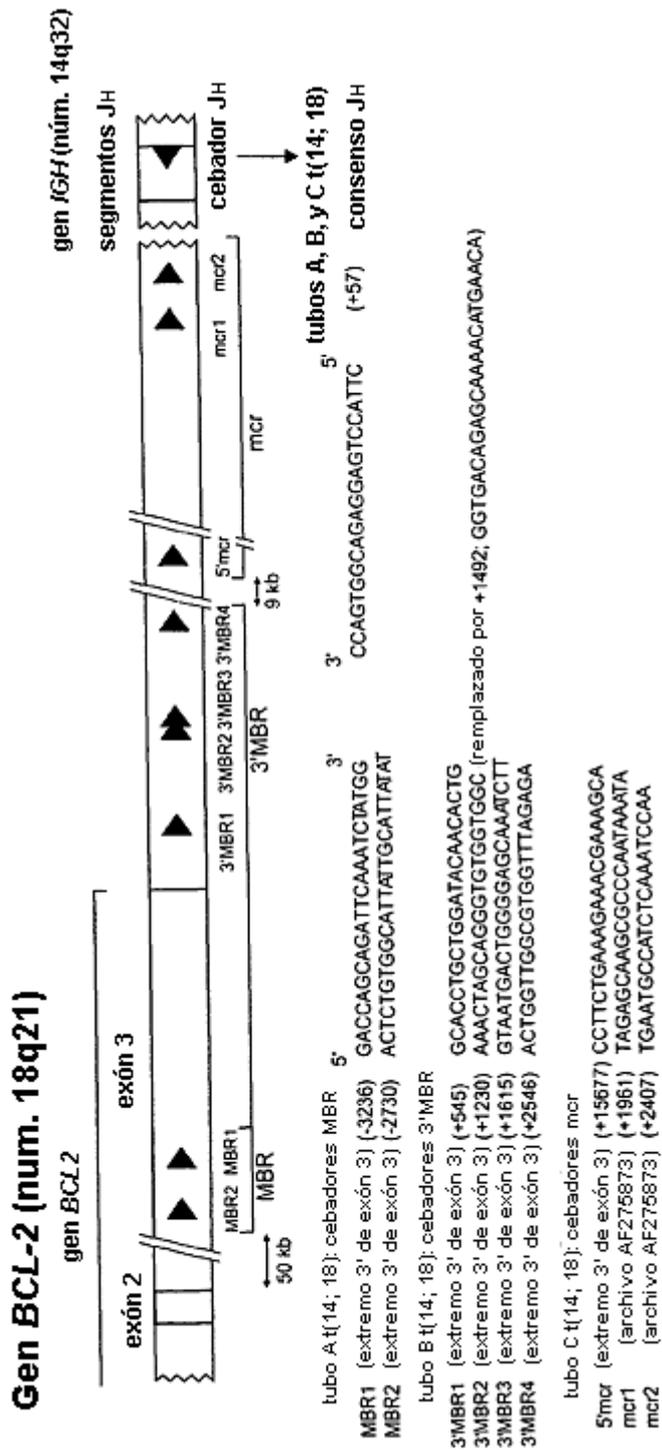


Fig. 11A

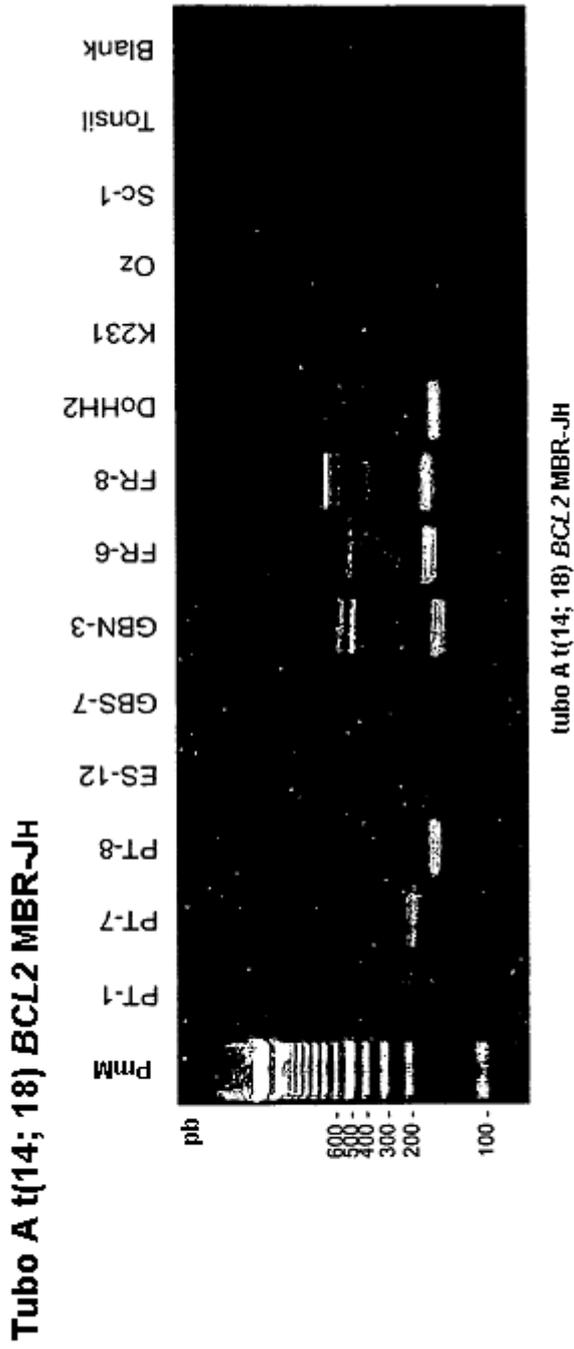


Fig. 11B

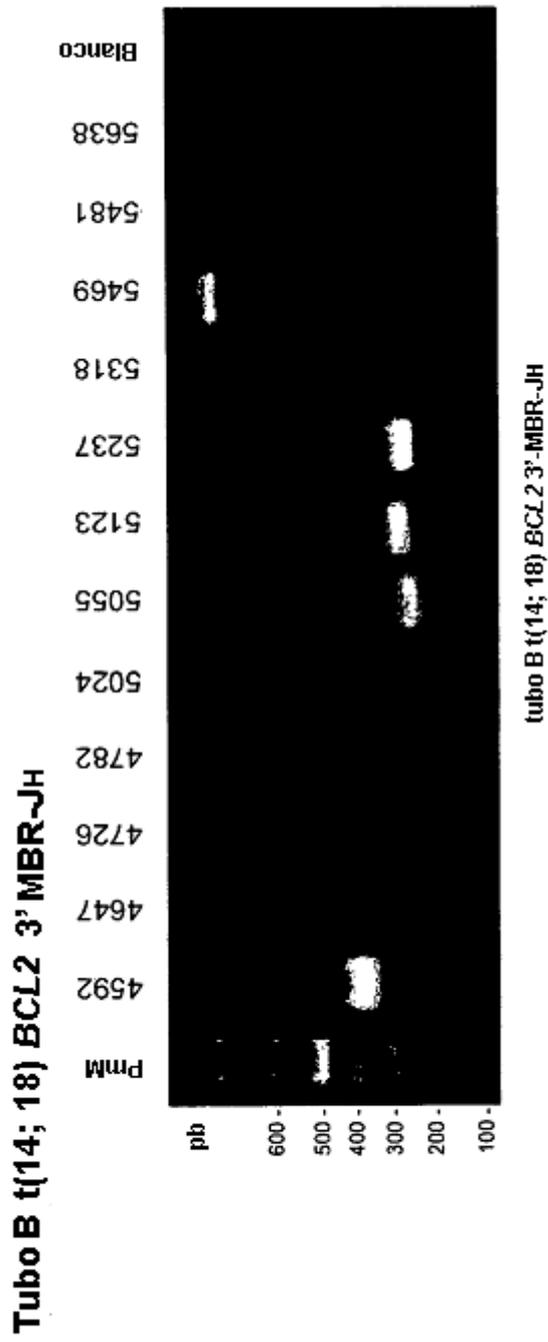


Fig. 11C

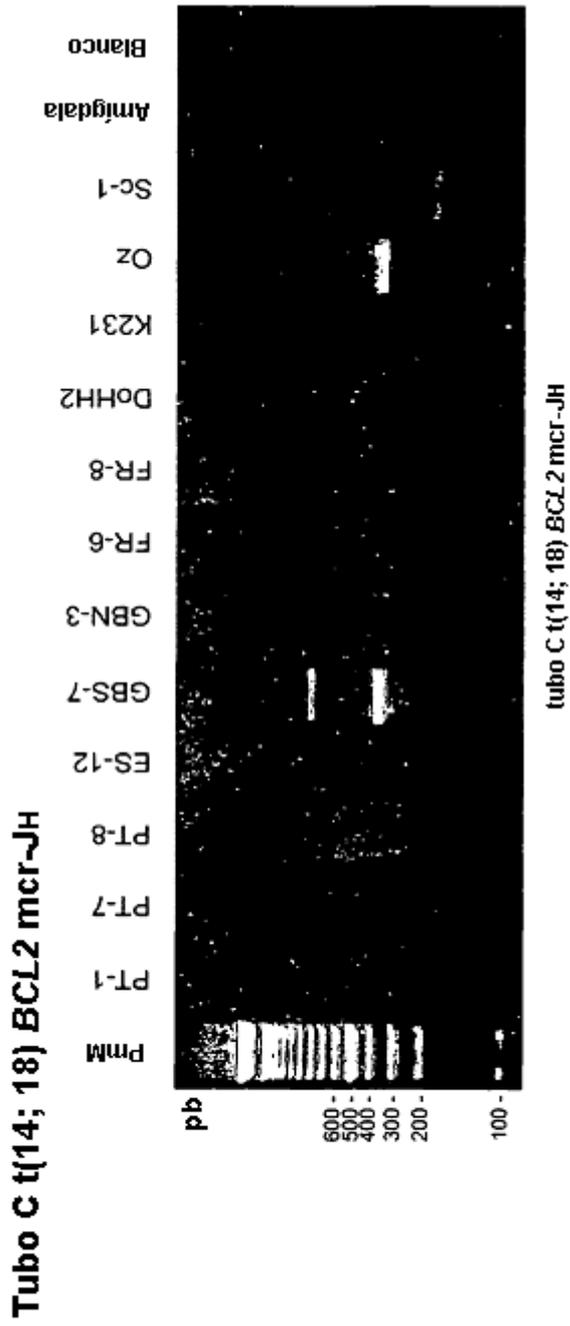


Fig. 11D

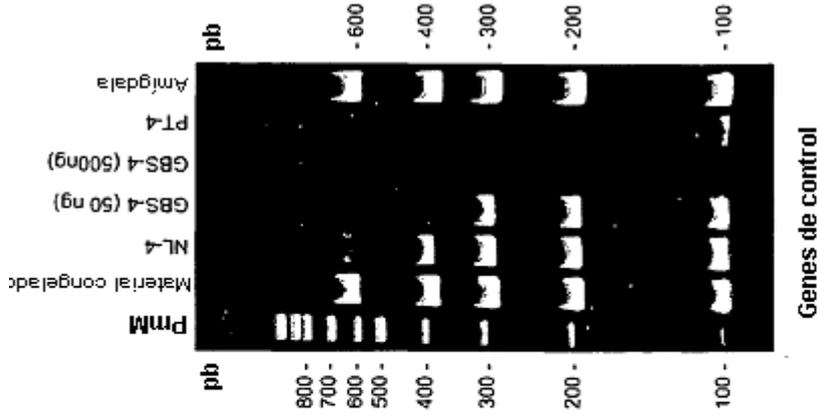


Fig. 12B

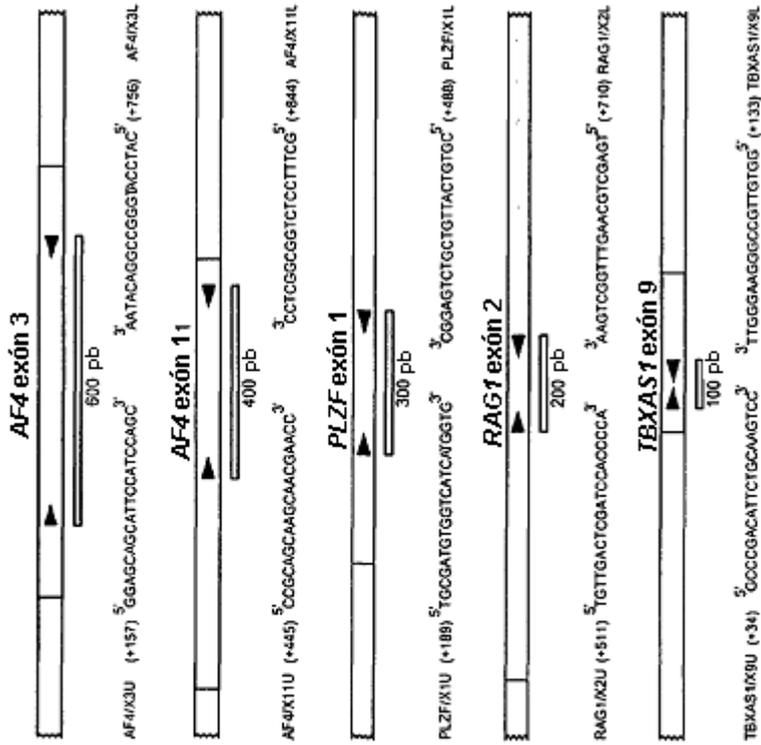


Fig. 12A

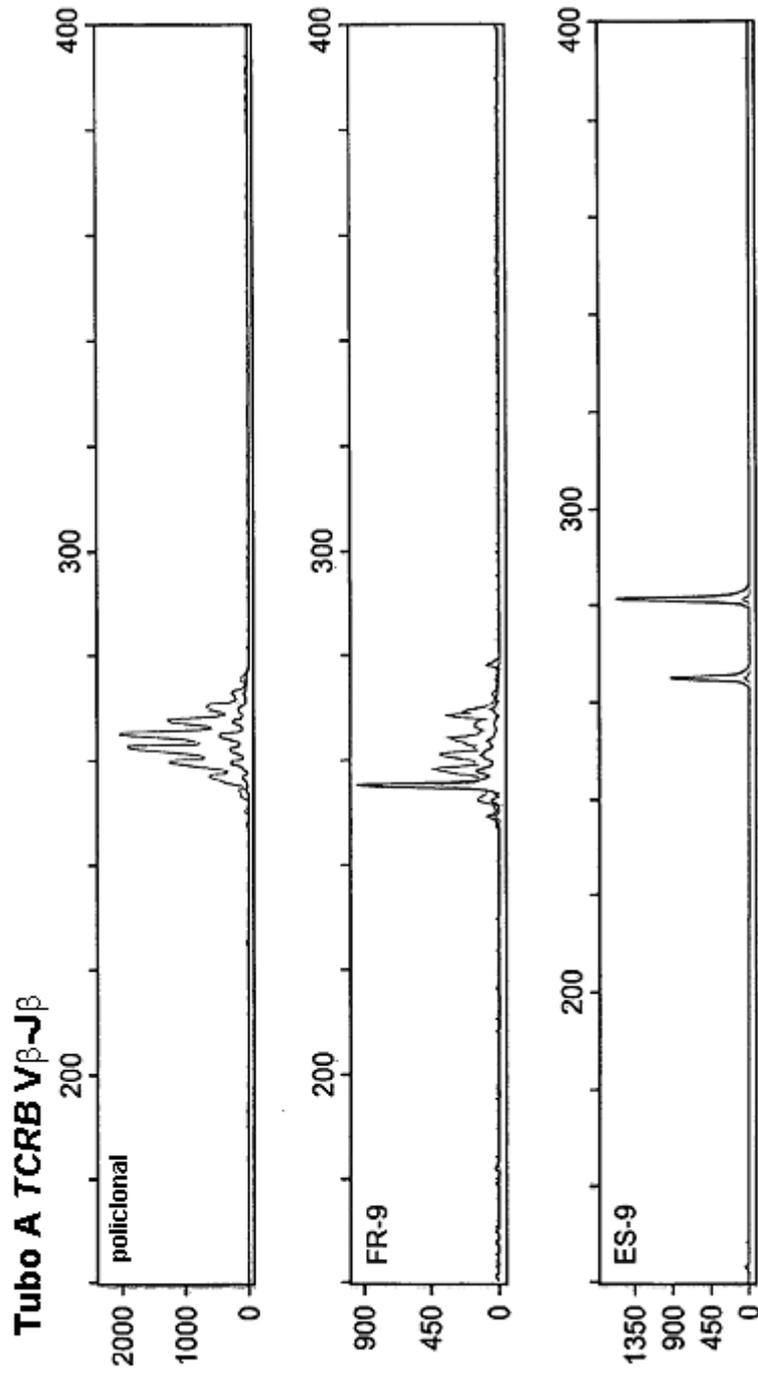


Fig. 13A

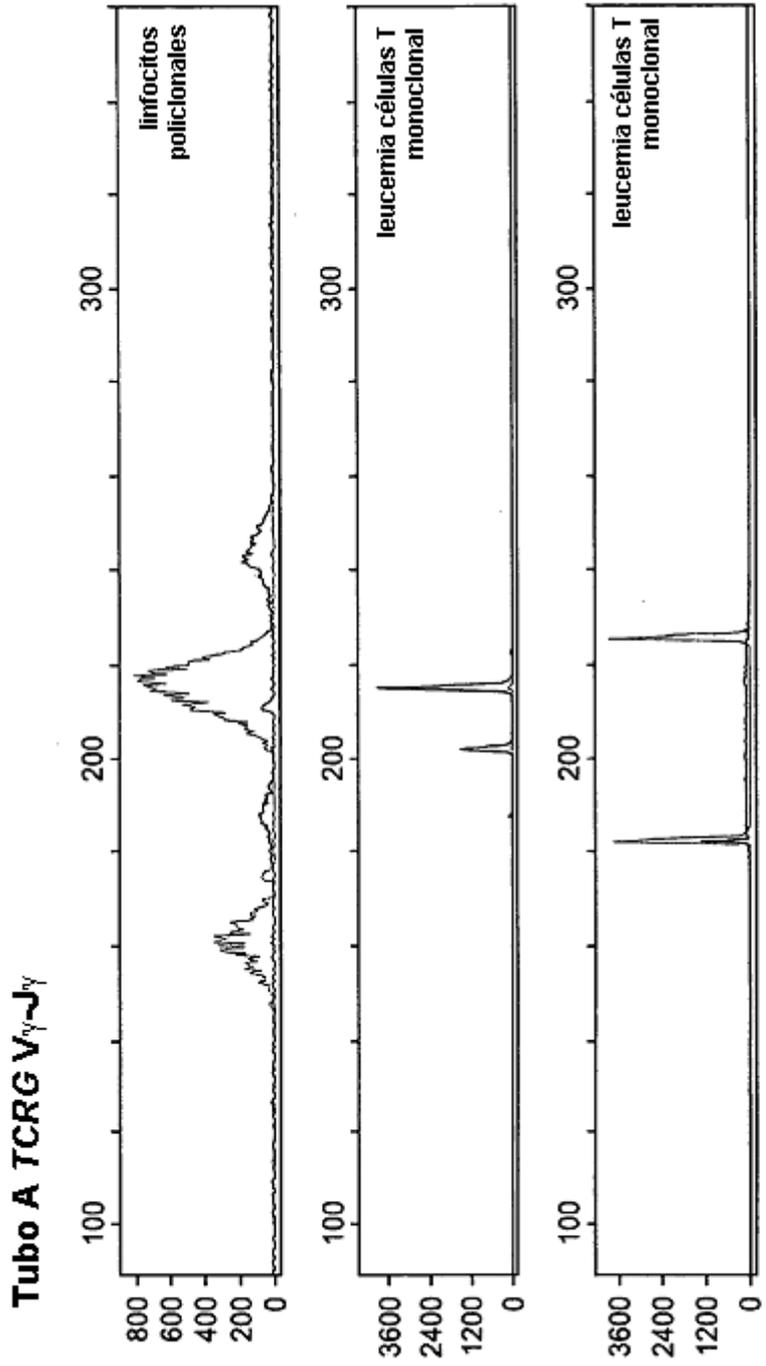


Fig. 13B

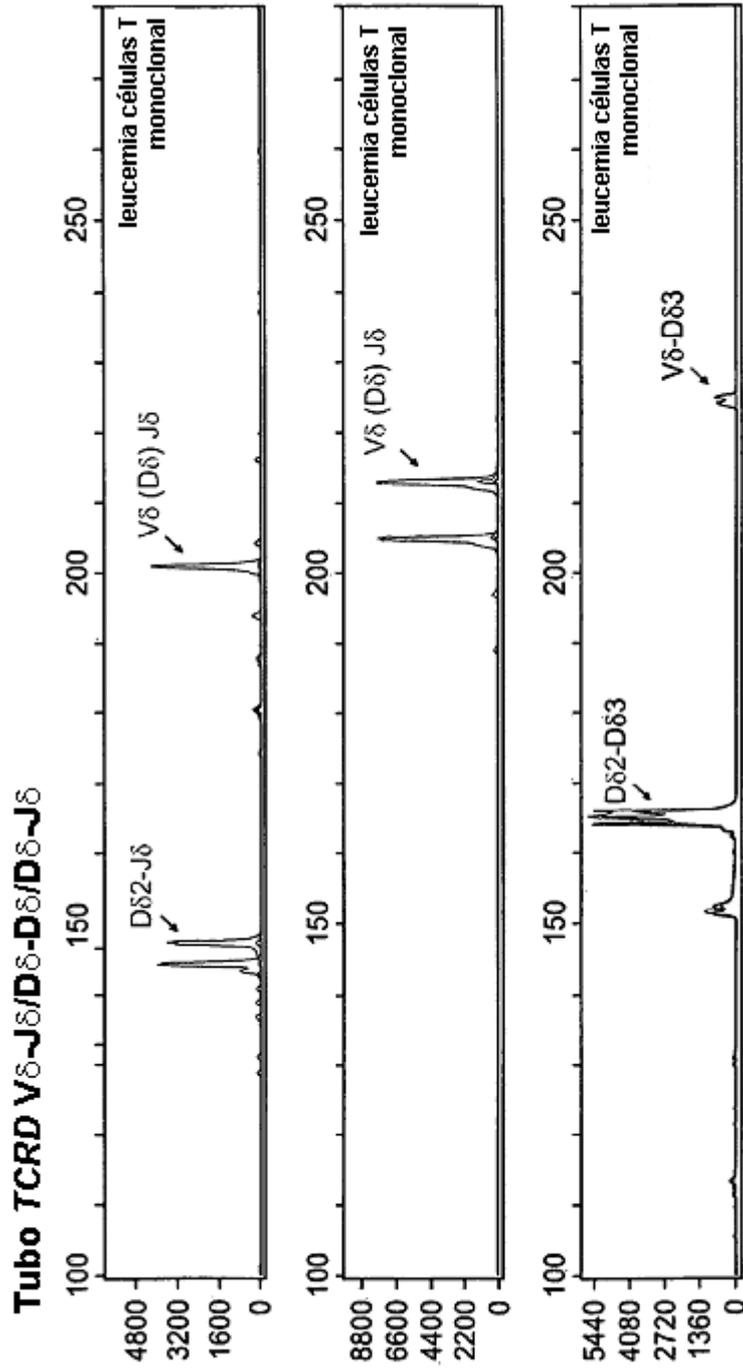


Fig. 13C