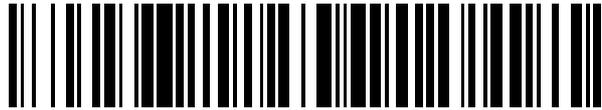


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 791**

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 10185204 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2460889**

54 Título: **Cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos para estudios de clonalidad basados en PCR de transposiciones en BCL2-IGH**

30 Prioridad:

11.10.2002 US 417779 P

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

13.02.2014

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 2 442 791 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 para la amplificación de ácidos nucleicos para estudios de clonalidad basados en PCR de transposiciones en BCL2-IGH

5 La presente invención se refiere a estudios de clonalidad basados en PCR para entre otros el diagnóstico precoz de trastornos linfoproliferantes. En la mayoría de los pacientes en los que se sospecha la presencia de trastornos linfoproliferantes, la histomorfología o citomorfología complementada con inmunohistología o inmunofenotipado citométrico de flujo puede discriminar entre linfoproliferaciones malignas y reactivas. Sin embargo, en el 5 a 10% de los casos, realizar el diagnóstico es más complicado. El diagnóstico de neoplasias malignas linfoides se puede apoyar en la determinación de la clonalidad basada en el hecho de que en principio todas las células de una neoplasia maligna tienen un origen clonal común.

15 La mayoría de las neoplasias malignas linfoides pertenece al linaje de linfocitos B (90 a 95%) y sólo una minoría pertenece al linaje de linfocitos T (5-7%) o al linaje de linfocitos asesinos naturales (abreviadamente NK por la expresión inglesa "*natural killer*") (<2%). Las leucemias linfoblásticas agudas (abreviadamente ALL por la expresión inglesa "*acute lymphoblastic leukemia*") se originan en linfocitos T en el 15 a 20% de los casos, pero en el grupo de leucemias linfoides maduras y en los linfomas no Hodgkin (abreviadamente NHL por la expresión inglesa "*non-Hodgkin lymphoma*") las neoplasias malignas de linfocitos T son relativamente poco frecuentes, excepto en subgrupos específicos, tales como linfomas cutáneos (Tabla 1). En consecuencia, la gran mayoría de las neoplasias malignas linfoides (>98%) contiene genes de inmunoglobulina (Ig) idénticamente (clonalmente) transpuestos y/o del receptor de linfocitos T (abreviadamente TCR por la expresión inglesa "*T-cell receptor*") y en el 25 a 30% de los casos también se encuentran anomalías cromosómicas bien definidas, los cuales pueden servir como marcadores para la clonalidad^{1,2}.

20 Los locus de los genes Ig y TCR contienen muchos y diferentes segmentos génicos variables (V), de diversidad (D) y de unión (J), que están sometidos a procesos de transposición durante la diferenciación linfoide temprana^{3,4}. Las transposiciones de V-D-J son mediadas por un complejo de enzimas recombinasas en el que las proteínas RAG1 y RAG2 desempeñan un papel clave reconociendo y cortando el DNA en las secuencias de señal de recombinación (abreviadamente RSS por la expresión inglesa "*recombination signal sequences*"), que están situadas aguas abajo de los segmentos génicos V, a ambos lados de los segmentos génicos D y aguas arriba de los segmentos génicos J (Figura 1). Unas RSS inadecuadas reducen o incluso evitan completamente la transposición.

25 El proceso de transposición comienza generalmente con una transposición de D a J seguida de una transposición de V a D-J en caso de genes de una cadena pesada de Ig (abreviadamente *IGH* por la expresión inglesa "*Ig heavy*"), de TCR beta (*TCRB*) y de TCR delta (*TCRD*) (Figura 1) o se refiere a transposiciones directas de V a J en caso de genes de Ig kappa (*IGK*), de Ig lambda (*IgL*), de TCR alfa (*TCRA*) y de TCR gamma (*TCRG*). Las secuencias entre los segmentos génicos transpuestos se eliminan generalmente en forma de un producto de escisión circular, denominado también círculo de escisión del TCR (abreviadamente TREC por la expresión inglesa "*TCR excision circle*") o círculo de escisión del receptor de linfocitos B (abreviadamente BREC por la expresión inglesa "*B cell receptor excision circle*") (Figura 1).

30 Las transposiciones de los genes Ig y TCR durante la diferenciación linfoide temprana siguen generalmente un orden jerárquico. Durante la diferenciación de linfocitos B: en primer lugar se transponen los genes *IGH*, a continuación *IGK*, dando potencialmente como resultado la expresión de IgH/k o seguido por la delección de *IGK* y transposición de *IgL*, seguido potencialmente por la expresión de IgH/λ⁵. Esto implica que virtualmente todos los linfocitos B con Igλ⁺ tengan delecciones monoalélicas o bialélicas de los genes *IGK*. Durante la diferenciación de los linfocitos T: en primer lugar se transponen los genes *TCRD*, a continuación *TCRG*, dando potencialmente como resultando la expresión de TCRγδ o seguido de otra transposición de *TCRB* y delección de *TCRD* con subsiguiente transposición de *TCRA*, seguido potencialmente por la expresión de TCRαβ. Los patrones de transposición de los genes Ig y TCR en neoplasias malignas linfoides se ajustan en general al orden jerárquico descrito anteriormente, aunque también se encuentran patrones de transposición inusuales, particularmente en la ALL⁶.

35 Las muchas combinaciones diferentes de los segmentos génicos V, D y J representan la llamada variedad combinatoria (Tabla 2), que se estima en ~2x10⁶ para las moléculas de Ig, ~3x10⁶ para las moléculas de TCRαβ y ~5x10³ para las moléculas de TCRγδ. En los sitios de unión de los segmentos génicos V, D y J tienen lugar la delección e inserción aleatoria de nucleótidos durante el proceso de transposición, dando como resultado regiones de unión muy diversas, que contribuyen significativamente a la variedad total de moléculas de Ig y de TCR, que se estima >10^{12,5}.

40 Los linfocitos B maduros amplían más su variedad de Ig por el reconocimiento de antígenos en los centros foliculares por medio de la *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 *IGH* y de la cadena ligera de Ig y afecta a las mutaciones de un solo nucleótido y algunas veces también a las inserciones o delecciones de nucleótidos. Los genes Ig mutados somáticamente se encuentran también en las neoplasias malignas de linfocitos B maduros de origen folicular o post-folicular⁷.

5 Los genes Ig y TCR transpuestos funcionalmente dan como resultado la expresión en la membrana de superficie de las moléculas de Ig, TCR $\alpha\beta$ o TCR $\gamma\delta$. Basándose en el concepto de que sólo un único tipo de moléculas de Ig o de TCR es expresado por un linfocito o un clon de linfocitos, los genes clonalmente transpuestos de neoplasias malignas linfoides maduras podrían ser detectables a nivel de las proteínas. Durante largo tiempo se ha utilizado la

10 También, el desarrollo de muchos anticuerpos diferentes contra dominios variables de las diversas cadenas de TCR permite la detección de los dominios monotípicos V β , V γ y V δ , en comparación con valores de referencia apropiados¹¹⁻¹⁶. En la interpretación de los resultados de V β monotípicos utilizando 20 a 25 anticuerpos contra diferentes familias de V β (Tabla 2), se debe apreciar que las expansiones de linfocitos T de TCR $\alpha\beta^+$ clonales clínicamente benignas (frecuentemente CD8⁺) se encuentran regularmente en la sangre periférica (abreviadamente PB por la expresión inglesa "*peripheral blood*") de los individuos de más edad^{13, 17}. Estas expansiones de linfocitos T

15 clonales en la PB tienen sin embargo un tamaño relativamente pequeño: <40% de linfocitos T de PB y <0,5x10⁶/mL de PB¹³. Todavía no está claro hasta qué punto dichos clones de linfocitos T clínicamente benignos pueden también encontrarse en los tejidos linfoides.

20 Los resultados de la expresión de los dominios monotípicos V γ y V δ se deben interpretar con cautela, ya que en individuos sanos se ha seleccionado una fracción grande de linfocitos T de TCR $\gamma\delta^+$ policlonales normales para el uso de V γ 9-J γ 1.2 y V δ 2-J δ 1^{18, 19}. En consecuencia, las altas frecuencias de linfocitos T de V γ 9⁺/V δ 2⁺ en la PB deben considerarse como un hallazgo normal, salvo que los recuentos absolutos sean 1 a 2x10⁹/mL de PB. Se debe señalar que la mayoría de neoplasias malignas de linfocitos T de TCR $\gamma\delta^+$ expresan el segmento génico V δ 1 u otro segmento no V δ 2 en combinación con un único dominio V γ (generalmente no V γ 9)^{15, 20}.

25 La detección de la expresión restringida de Ig κ o Ig λ o la expresión de V β , V γ o V δ monotípico es relativamente fácil en los estudios por citometría de flujo de muestras de PB y de médula ósea (abreviadamente BM por la expresión inglesa "*bone marrow*") de pacientes con leucemias de linfocitos B o linfocitos T maduros. Sin embargo, esto parece ser más difícil en muestras de tejido en los que se sospecha la presencia de trastornos linfoproliferantes que están entremezclados con los linfocitos normales (reactivos).

30 En contraste con las técnicas basadas en anticuerpos, las técnicas moleculares son ampliamente aplicables para la detección de genes Ig/TCR transpuestos clonalmente así como anomalías cromosómicas bien definidas. Estas técnicas se referían anteriormente al análisis por transferencia de Southern (abreviadamente SB por la expresión inglesa "*Southern Blot*"), pero hoy en día se utilizan particularmente técnicas de PCR.

35 En una proporción de casos (del 5 al 10%) se presentan dificultades para hacer un diagnóstico definitivo de la neoplasia maligna linfóide a pesar de un amplio inmunofenotipado. Por tanto, se necesitan más diagnósticos (clonalidad molecular) para generar o confirmar el diagnóstico definitivo, tal como en el caso de:

- que se sospeche una proliferación de linfocitos B donde no son concluyentes la morfología y el inmunofenotipado;
- que se sospechen todas las proliferaciones de linfocitos T (PRECAUCIÓN: B-NHL rico en linfocitos T);
- linfoproliferaciones en pacientes inmunodeficientes o pacientes trasplantados;

40

- evaluación de la relación clonal entre dos neoplasias malignas linfoides en un paciente o discriminación entre una recaída y una segunda neoplasia maligna;
- otra clasificación de una neoplasia maligna, por ejemplo por medio de patrones de transposición de genes Ig/TCR o anomalías cromosómicas particulares;
- ocasionalmente: estadificación de linfomas.

45 Durante mucho tiempo, el análisis por transferencia de Southern ha sido la técnica de referencia para los estudios de clonalidad molecular. La transferencia de Southern se basa en la detección de fragmentos de DNA (transpuestos) no en la línea germinal, obtenidos después de digestión con enzimas de restricción. Enzimas de restricción bien elegidas (que dan como resultado fragmentos de 2 a 15 kb) y sondas de DNA bien posicionadas (particularmente sondas para el segmento J aguas abajo) permiten la detección de virtualmente todas las transposiciones de los

50 genes Ig y TCR así como de las anomalías cromosómicas que impliquen los segmentos génicos J²¹⁻²⁸. Debe observarse que el análisis por transferencia de Southern se centra en la diversidad de transposición de los segmentos génicos de Ig/TCR y por tanto se aprovecha de la variedad combinatoria.

55 Con la transferencia de Southern se pueden obtener particularmente resultados óptimos para la determinación de la clonalidad con los genes *IGH*, *IGK* y *TCRB*, debido a que estos genes tienen una amplia variedad combinatoria, así como una estructura génica relativamente sencilla que se puede evaluar sólo con una o dos sondas de DNA^{22, 24, 28}. Los genes *IGL* y *TCRA* son más complejos y requieren múltiples conjuntos de sondas^{25, 26, 29}. Por último, los genes *TCRG* y *TCRD* tienen una variedad combinatoria limitada, que es menos óptima para la discriminación entre monoclonalidad y policlonalidad por medio del análisis por transferencia de Southern^{20, 21}.

A pesar de la alta fiabilidad del análisis por transferencia de Southern, cada vez se sustituye más por técnicas de PCR, debido a varias desventajas inherentes: el análisis por transferencia de Southern es técnicamente exigente y lleva más tiempo, requiere de 10 a 20 µg de DNA de alta calidad y tiene una sensibilidad limitada de 5 a 10%.

5 La detección de genes Ig/TCR transpuestos y de anomalías cromosómicas por técnicas de PCR requiere un conocimiento preciso de los segmentos génicos transpuestos con el fin de diseñar cebadores apropiados en lados opuestos de las regiones de unión y de las regiones de fusión del punto de rotura, respectivamente.

10 En los estudios de clonalidad habituales basados en la PCR, 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 procedentes de las transposiciones de genes Ig/TCR monoclonales frente a las policlonales, que se basa en la diversidad de las regiones de unión (diversidad de tamaño y composición). Hasta ahora, se han usado principalmente transposiciones de genes *IGH* y *TCRG* para estudios de clonalidad basados en PCR, debido al número limitado de cebadores necesarios para detectar las transposiciones V_H-J_H y V_Y-J_Y .

15 Las principales ventajas de las técnicas de PCR son su velocidad, las bajas cantidades de DNA requeridas, la posibilidad de utilizar DNA de menor calidad y la sensibilidad relativamente buena de 1 a 5%, para algunos tipos de transposiciones incluso <1%. En consecuencia, las técnicas de PCR permiten el uso de biopsias pequeñas (por ejemplo, biopsias por aspiración con aguja fina) o el uso de muestras embebidas en parafina fijadas con formaldehído, que generalmente dan como resultado un DNA de menor calidad. Por consiguiente, también podría utilizarse, si es necesario, material archivado.

20 Los estudios de clonalidad molecular pueden ser muy informativos, pero varias limitaciones y dificultades podrían obstaculizar la interpretación de los resultados obtenidos con los métodos de detección convencionales:

1. *Sensibilidad limitada, en relación con el fondo policlonal normal*

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

2. *Clonalidad no es equivalente a neoplasia maligna*

30 La detección de clonalidad no siempre implica la presencia de una neoplasia maligna. Algunas proliferaciones clínicamente benignas tienen un origen clonal, tales como muchos casos de linfocitosis T $CD8^+$ (o algunas veces $CD4^+$), gammapatías monoclonales benignas, fases iniciales de linfoproliferaciones de EBV^+ (siendo frecuentemente oligoclonales) en pacientes inmunodeficientes y proliferaciones de linfocitos T cutáneas benignas, tales como papulosis linfomatoide, etc. Esto implica que los resultados de los estudios de clonalidad molecular deben ser siempre interpretados en el contexto del diagnóstico clínico, morfológico e inmunofenotípico, es decir, en estrecha colaboración con hematólogos, citomorfólogos, patólogos e inmunólogos.

3. *Las transposiciones de genes Ig y TCR no son marcadores para el linaje*

35 Contrariamente a la suposición inicial, es ahora evidente desde hace más de una década que las transposiciones de los genes Ig y TCR no están necesariamente restringidas a los linajes de los linfocitos B y linfocitos T, respectivamente. Las transposiciones de genes TCR entre linajes ocurren con relativa frecuencia en neoplasias malignas de linfocitos B inmaduros, en particular en ALL de B precursores (>90% de los casos)³⁰, pero también las leucemias mieloides agudas (abreviadamente AML por la expresión inglesa "*acute myeloid leukemias*") y las neoplasias malignas de linfocitos B maduros podrían contener transposiciones del gen TCR³¹⁻³³. Aunque con menor frecuencia, también ocurre una transposición del gen Ig entre linajes en neoplasias malignas y AML de linfocitos T, implicando principalmente al locus de la cadena pesada de Ig (*IGH*)^{33, 34}.

45 Virtualmente todas (>98%) las neoplasias malignas de linfocitos T de $TCR\alpha\beta^+$ tienen transposiciones del gen *TCRG* (generalmente bialélico) y muchas neoplasias malignas de linfocitos T de $TCR\gamma\delta^+$ tienen transposiciones del gen *TCRB*, lo que implica que la detección de transposiciones de *TCRB* o *TCRG* no es tampoco indicativa de linfocitos T del linaje de linfocitos T $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$, respectivamente.

Además de estas transposiciones entre linajes, se ha establecido que varias neoplasias malignas linfoides tienen patrones de transposición de genes Ig/TCR inusuales. Esta información está disponible con detalle para ALL de precursores B y T, pero no todavía para la mayoría de otras neoplasias malignas linfoides⁶.

50 4. *Pseudoclonalidad y oligoclonalidad*

La detección de una población de células linfoides aparentemente clonales o aparentemente oligoclonales (pseudoclonalidad) es rara en el análisis por transferencia de Southern, salvo que se utilicen genes con una variedad combinatoria limitada, tales como *TCRG* o *TCRD*. Esto podría dar como resultado bandas transpuestas débiles, por ejemplo, que representan las transposiciones $V\gamma 9-J\gamma 1.2$ o $V\delta 2-J\delta 1$ procedentes de linfocitos T de $TCR\gamma\delta^+$

seleccionado de antígenos. Sin embargo, esta es una dificultad bien conocida del análisis por transferencia de Southern y no se obtendrán como resultado bandas transpuestas 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 provocar la amplificación de las pocas transposiciones de los genes Ig o TCR procedentes de un número limitado de linfocitos B o linfocitos T en la muestra de tejido estudiada. Particularmente, los pocos linfocitos T (policlonales) reactivos en una biopsia con una aguja pequeña o en una muestra de B-NHL con alta carga tumoral podrían dar como resultado productos de PCR (oligo)clonales. Con frecuencia, la cantidad de dichos productos de PCR está limitada. Esto se observa particularmente cuando se utilizan genes *TCRG* como diana de la PCR. Los análisis por PCR duplicados o triplicados seguidos por la mezcla de los productos de PCR obtenidos deben ayudar a aclarar si los productos de PCR aparentemente clonales proceden en efecto de diferentes linfocitos.

Por último, los ganglios linfáticos reactivos pueden mostrar una diversidad reducida de la variedad de Ig/TCR, provocada por el predominio de varios subclones seleccionados del antígeno (oligoclonalidad). Particularmente los ganglios linfáticos o muestras de sangre de pacientes con una infección activa por EBV o CMV pueden mostrar una gama restringida de TCR u oligoclonalidad de genes TCR. También cuadros clínicos de inmunosupresión se asocian frecuentemente con variedades restringidas de TCR, por ejemplo, en pacientes con trasplante o pacientes con tricoleucemia³⁵. La recuperación de un trasplante y de una remisión hematológica va seguida por la restauración de la variedad de TCR policlonales^{36, 37}.

5. Resultados positivos falsos

En el análisis por transferencia de Southern, los resultados positivos falsos son raros y generalmente se pueden evitar por la comprobación durante la digestión y por exclusión de sitios de restricción polimórficos²¹.

Los resultados de PCR positivos falsos presentan un grave problema si no se realiza ningún análisis adecuado de los productos obtenidos por PCR para discriminar entre los productos de PCR monoclonales o policlonales. Dicha discriminación se puede conseguir por análisis por polimorfismo conformacional de una sola cadena (abreviadamente SSCP por la expresión inglesa "*single-strand conformation polymorphism*")³⁸, electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (abreviadamente DGGE por la expresión inglesa "*denaturing gradient gel electrophoresis*")³⁹, análisis de heterodúplex (HD)^{40, 41} o por *GeneScanning* (GS)^{42, 43}. Estas técnicas aprovechan la diversidad de la región de unión para la discriminación entre células monoclonales con regiones de unión idénticas y células policlonales con regiones de unión muy diversas.

6. Resultados negativos falsos

En el análisis por transferencia de Southern, los resultados negativos falsos son raros si se utilizan sondas para los segmentos génicos J apropiadas. Sin embargo, podrían faltar algunas transposiciones poco comunes (generalmente transposiciones no funcionales), tales como las transposiciones o deleciones V-D de las regiones J. El análisis por PCR de los genes Ig y TCR podría verse obstaculizado por los resultados negativos falsos debido a la asociación inapropiada de los cebadores de PCR aplicados a los segmentos de genes transpuestos. Esta asociación inapropiada de cebadores puede ser causada por dos fenómenos diferentes. En primer lugar, la detección precisa de todos los segmentos génicos V, D y J diferentes requeriría muchos cebadores diferentes (Tabla 1), que en la práctica no es factible. En consecuencia, se diseñan cebadores de una familia, que reconozcan específicamente la mayoría o todos los miembros de una familia de V, D o J particular. Alternativamente, se utilizan cebadores de consenso, que se supone que reconocen virtualmente todos los segmentos génicos V y J del locus en estudio. Los cebadores de una familia y en particular los cebadores de consenso son generalmente óptimos para una parte de los segmentos génicos pertinentes, pero muestran una homología inferior (70 a 80%) con otros segmentos génicos. Esto puede conducir finalmente a resultados negativos falsos, particularmente en genes Ig/TCR con muchos segmentos génicos diferentes. En los genes *TCRG* y *TCRD* este problema es mínimo, debido a su limitado número de segmentos génicos diferentes.

El segundo fenómeno es la presencia de hipermutaciones somáticas en los genes Ig transpuestos de neoplasias malignas de linfocitos B foliculares y post-foliculares, particularmente neoplasias malignas de linfocitos B con genes *IGH* de clase conmutada.

Conocimiento y experiencia suficientes pueden evitar las primeras cuatro dificultades, principalmente debido a que se refieren a problemas de interpretación. Las dos últimas dificultades se refieren a problemas técnicos, que pueden resolverse por la elección de técnicas fiables para el análisis de los productos de PCR y por el diseño de mejores conjuntos de cebadores.

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

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

- resultados negativos falsos debido a la asociación inapropiada al cebador;
- dificultades en la discriminación entre las transposiciones de los genes Ig/TCR monoclonales y policlonales.

5 El documento WO 00/28086 describe una PCR múltiple con cebadores de consenso para las regiones principales con puntos de rotura (abreviadamente MBR por la expresión inglesa "*major breakpoint regions*"), FR1 y FR3 del gen BCL-2 y un cebador de consenso para J_H. El de consenso para J_H tiene 19 nucleótidos que son idénticos a los 19 nucleótidos del extremo 3' del cebador para J_H mostrado en la Figura 11A.

10 Varios laboratorios de diagnósticos individuales trataron de resolver los problemas de los estudios de clonalidad basados en PCR, pero hasta ahora no se han obtenido protocolos de PCR estandarizados fiables. Por el contrario, se están utilizando muchos conjuntos de cebadores diferentes, que todos difieren en su sensibilidad y aplicabilidad.

15 La presente invención proporciona ahora conjuntos de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos, como se definen en las reivindicaciones y protocolos de PCR estandarizados para detectar esencialmente todos los locus de Ig y de TCR relevantes y dos anomalías cromosómicas que se presentan frecuentemente. Los conjuntos de cebadores que comprenden un cebador directo y otro inverso son capaces de amplificar transposiciones clonales de 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 TCR beta (*TCRB*), genes 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 sean detectables tanto las transposiciones completas como las incompletas y que puedan ser reconocidos los segmentos génicos de diferentes familias V, (D) y J.

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

25 Se proporcionan 107 cebadores específicos diferentes para todos los locus de Ig/TCR relevantes así como para t(11;14)(*BCL1-IGH*) y t(14;18)(*BCL2-IGH*), o sus variantes, (véanse las Figuras 3 a 11). El término "variante" se refiere a un cebador que difiere en 1 a 5 nucleótidos, preferiblemente en 1 a 3 nucleótidos, del tamaño y/o de la posición del nucleótido de una secuencia de cebador mostrada, siempre que la secuencia de nucleótidos de dicha variante del cebador contenga como máximo 2 desapareamientos, como máximo 1 desapareamiento, más preferiblemente ningún desapareamiento con el locus diana. Además, una variante del cebador comprende un cebador marcado (diferencialmente), es decir, un cebador que tiene un marcador que se puede identificar o distinguir de otros marcadores por cualquier medio, incluyendo el uso de un instrumento analítico. Ejemplos de cebadores marcados diferencialmente son cebadores provistos de un marcador fluorescente, tal como un colorante 30 6-FAM, HEX, TET o NED. Los cebadores marcados son particularmente ventajosos para uso en análisis automatizado de fragmentos de PCR de alta resolución (tecnología *GeneScanning*) para la detección de productos de PCR. Como se ilustra más adelante, los cebadores marcados diferencialmente permiten distinguir diferentes productos de amplificación de PCR de aproximadamente la misma longitud (tamaño), usando preferiblemente *GeneScanning* multicolor. Naturalmente, una variante de un cebador para amplificación de ácidos nucleicos, ya sea un cebador directo o inverso (marcado con colorante), no debe ser capaz de formar dímeros con cualquier otro (variante) cebador directo y/o inverso para amplificación de ácidos nucleicos que se utilice en una reacción de amplificación, ya que esto puede interferir con la asociación del cebador a un locus diana y por tanto con la amplificación de la transposición o translocación de interés.

45 En una realización, la invención proporciona un ensayo de amplificación de ácidos nucleicos, preferiblemente un ensayo de PCR, que usa al menos un conjunto de cebadores de acuerdo con la invención. Dicho ensayo de PCR puede ser una PCR simple (monoplex) o múltiple. En una realización preferida, se utiliza un conjunto de cebadores de acuerdo con la invención en un ensayo de PCR múltiple estandarizado, usando por ejemplo dos o más cebadores directos, o tres o cuatro cebadores directos, o sus variantes (por ejemplo, seleccionados de un grupo de "cebadores de una familia", por ejemplo de cebadores de la familia V_H), junto con el cebador inverso de consenso. 50 Los cebadores de una familia se diseñan de tal manera que reconozcan la mayoría o todos los segmentos génicos de una familia particular (véase la Tabla 2). En una realización específica, los 107 cebadores se utilizan sólo en 18 tubos de PCR múltiple: 5 para *IGH* (3x V_H-J_H y 2x D_H-J_H), 2 para *IGK*, 1 para *IGL*, 3 para *TCRB* (2x Vβ-Jβ y 1x Dβ-Jβ), 2 para *TCRG*, 1 para *TCRD*, 3 para *BCL2-IGH* y 1 para *BCL1-IGH* (Figuras 3 a 11). Dicho ensayo permite evaluar las transposiciones clonales y/o las anomalías cromosómicas. Además, permite la detección de un trastorno linfoproliferante. El ensayo de PCR múltiple de los cebadores en aproximadamente 90 linfoproliferaciones definidas por transferencia de Southern mostró que coincidía en más del 95% de las muestras los resultados de la transferencia de Southern y de la PCR.

55 En otra realización, se proporciona un método para detectar una transposición, como se define en la reivindicación 8.

Se proporciona un conjunto de cebadores para amplificación de ácidos nucleicos capaces de amplificar un gen humano 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 (véase la Fig. 12). Usando uno o más de estos cinco conjuntos de cebadores que consisten en un cebador directo (o una de sus variantes) y un cebador inverso (o una de sus variantes) en un ensayo de amplificación de ácidos nucleicos de la invención, es posible detectar uno o más "gen(es) de control" seleccionados 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. Dicho método de detección se utiliza ventajosamente para determinar la calidad (por ejemplo, integridad y amplificabilidad) de una muestra de ácido nucleico (DNA) extraída o aislada de una muestra biológica, por ejemplo DNA extraído de una muestra embebida en parafina (véase el Ejemplo 10).

La capacidad de los diferentes conjuntos de cebadores para amplificar transposiciones clonales y/o anomalías cromosómicas (translocaciones) ha sido analizada en muchos tipos diferentes de linfomas malignos, entre los que se encuentran linfoma folicular, linfoma de linfocitos B grandes difusos y mieloma múltiple. Se encontró que un conjunto de cebadores es muy útil para determinar las transposiciones clonales y/o translocaciones cromosómicas. Parecía que la tasa de detección de las transposiciones clonales utilizando los tubos de cebadores múltiples es inauditamente alta, es decir, al menos 95%.

Ensayos en paralelo de tejidos embebidos en parafina disponibles de las muestras anteriores revelaron resultados esencialmente idénticos, si la calidad del DNA de estos tejidos era suficientemente alta, lo que significaba que fragmentos de al menos 300 pb podrían ser amplificados en una PCR de genes de control especialmente diseñada.

La aplicabilidad de los ensayos de PCR múltiple desarrollados se evaluó en series de 50 a 100 casos por tipo de neoplasia maligna linfoide. Siguiendo la revisión de los expertos nacionales en patología y la revisión de los expertos centrales en patología en caso de dificultades, todos los casos incluidos se definieron según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Las categorías de diagnóstico estudiadas incluían neoplasias malignas, tales como linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, linfoma de linfocitos B grandes difusos, linfoma de linfocitos T angioinmunoblásticos, linfoma de linfocitos T periféricos y linfoma de células grandes anaplásicas, así como lesiones reactivas. Los resultados muestran un nivel muy alto de detección de la clonalidad, incluso en entidades que se sabe que llevan hipermutaciones somáticas, tales como linfoma folicular y linfoma de linfocitos B grandes difusos. Particularmente, el uso de los tres tubos con V_H-J_H de *IGH*, complementados con los dos tubos con D_H-J_H de *IGH* y los dos tubos con *IGK* parecía que era altamente eficaz en la detección de transposiciones clonales de genes Ig. Esta alta eficiencia se obtiene por la complementariedad de los tubos con Ig, así como por el hecho de que las transposiciones D_H-J_H e *IGK-K* de no están (o rara vez) mutadas somáticamente. Esta complementariedad también se encontró para los cebadores para *TCRB* y *TCRG* en caso de neoplasias malignas de linfocitos T.

Además, se observaron patrones de transposición interesantes e inesperados, tales como transposiciones inusuales entre linajes. Notablemente, en aproximadamente 10% de lesiones reactivas se detectaron transposiciones clonales. Estas linfoproliferaciones reactivas incluían linfoproliferaciones relacionadas con EBV e hiperplasias atípicas, como la enfermedad de Castleman, así como lesiones en las que se sospechaba la presencia de un clon de linfocitos B o T.

Se proporciona un método para la detección de la enfermedad mínima residual (abreviadamente MRD por la expresión inglesa "*minimal residual disease*"). El término enfermedad mínima residual (MRD) describe la situación en la que, después de quimioterapia para la leucemia aguda (AL), una médula ósea morfológicamente normal puede albergar todavía una cantidad relevante de células malignas residuales. La detección de la enfermedad mínima residual (MRD) es una nueva herramienta práctica para una medida más exacta de la inducción de la remisión durante la terapia debido a que se pueden detectar hasta 10^{-4} - 10^{-6} blastocitos leucémicos. El análisis de la MRD basado en la PCR conocido utiliza transposiciones clonales de los receptores de antígenos detectables en ~90-95% de las muestras de los pacientes investigados. Sin embargo, la amplificación de los productos policlonales conduce con frecuencia a amplicones de PCR positivos falsos no adecuados para el análisis de la MRD. La descripción proporciona ahora un método para la detección de genes Ig y TCR idénticamente (clonalmente) transpuestos o para la detección de anomalías cromosómicas bien definidas y frecuentes, tales como t(11;14) y t(14;18). Por tanto, las transposiciones y translocaciones detectadas usando un conjunto de cebadores de la invención no sólo sirven como marcadores para la clonalidad en el diagnóstico, sino también como dianas de PCR para la detección de la MRD durante su seguimiento.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un kit (de diagnóstico) para la detección de una translocación t(14;18)(*BCL2-IGH*), que comprende al menos un conjunto de cebadores de acuerdo con la invención. Un kit de la invención es muy adecuado para el diagnóstico de la clonalidad basado en la PCR. Opcionalmente, dicho 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 DNA que se va a diagnosticar, por ejemplo el DNA extraído de tejido embebido en parafina.

Se describe un método para la discriminación rápida de diferentes tipos de transposiciones de genes Ig/TCR en el

mismo tubo de PCR múltiple. El *GeneScanning* permite la aplicación de múltiples cebadores diferentes conjugados con fluorocromo en un solo tubo. Dicho marcado diferencial de cebadores se puede utilizar para la discriminación extra entre diferentes tipos de transposiciones de genes Ig o TCR.

5 El marcado diferencial de los cebadores para V ha limitado generalmente el valor añadido, pero el marcado diferencial de los cebadores aguas abajo puede ayudar a la identificación rápida y fácil del tipo de transposición de los genes Ig/TCR, que es útil para la detección basada en la PCR de la enfermedad mínima residual^{44, 45}. El marcado de los cebadores para J no se considera informativo de *IGH* (V_H - J_H o D_H - J_H), *IGK* (V_K - J_K) o *IGL* (V_L - J_L). Para una rápida identificación de las transposiciones *IGK*-Kde, podría ser interesante discriminar entre las transposiciones V_K -Kde y del intrón RSS-Kde por marcado diferencial de los cebadores para Kde y para el intrón RSS (véase la Figura 10 5B).

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

20 Estos tubos de PCR múltiple de multicolores parece que son fáciles y convenientes en la práctica diaria de diagnóstico de la clonalidad basado en la PCR.

Leyendas de las figuras

25 **Figura 1. Diagrama esquemático de las etapas secuenciales de transposiciones, la transcripción y la traducción del gen *TCRB*.** En este ejemplo se produce en primer lugar una transposición de $D\beta 2$ a $J\beta 2.3$, seguida por transposición de $V\beta 4$ a $D\beta 2$ - $J\beta 2.3$, dando como resultado la formación de una unión codificadora $V\beta 4$ - $D\beta 2$ - $J\beta 2.3$. El gen *TCRB* transpuesto es transcrito en RNAm precursor, empalmado en RNAm maduro y finalmente traducido en una cadena proteica del TCR β . También se indican los dos círculos de escisión del TCR extracromosómico (TREC) que se forman durante este proceso de recombinación; dichos círculos contienen la unión de señal D-J y la unión de señal V-D, respectivamente.

30 **Figura 2. Diagrama esquemático de análisis de heterodúplex y por *GeneScanning* de productos de PCR, obtenidos a partir de genes Ig y TCR transpuestos.** **A.** Los genes Ig y TCR transpuestos (*IGH* en el ejemplo) muestran regiones de unión heterogéneas respecto al tamaño y composición de nucleótidos. Los nucleótidos de la línea germinal de los segmentos génicos V, D y J se representan con letras mayúsculas grandes y los nucleótidos insertados aleatoriamente con letras versalitas. Se emplea la heterogeneidad de la región de unión en 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 desnaturalizado por calor (5 minutos, 94°C) y posteriormente enfriados rápidamente (1 hora, 4°C) para inducir la formación del dúplex (homo- o hetero-dúplex). En muestras de células que consisten en células linfoides clonales, los productos de PCR de genes *IGH* transpuestos dan lugar a homodúplex después de la desnaturalización y renaturalización, mientras que en muestras que contienen poblaciones de células linfoides policlonales los fragmentos monocatenarios de PCR formarán principalmente heterodúplex, que dan como resultado una mancha en fondo negro de fragmentos que migran lentamente por electroforesis. **C.** En *GeneScanning* los productos de PCR marcados con fluorocromo de genes *IGH* transpuestos se desnaturalizan antes del análisis de fragmentos por alta resolución de los fragmentos monocatenarios resultantes. Las muestras de células monoclonales darán lugar a productos de PCR de tamaño idéntico (pico único), mientras que en las muestras policlonales se formarán muchos productos de PCR de diferentes *IGH*, que muestran una distribución gaussiana de tamaños característica.

50 **Figura 3. Análisis por PCR de transposiciones (V_H - J_H) en *IGH*.** **A.** Diagrama esquemático de un complejo de genes *IGH* sobre la banda cromosómica 14q32.3 (adaptado de la base de datos ImMunoGeneTics)^{46, 47}. Sólo están incluidos segmentos génicos V_H no polimórficos transponibles en azul (V_H funcional) o en gris (pseudogenes transponibles). No se indican pseudogenes V_H (generalmente truncados) recientemente descubiertos. **B.** Diagrama esquemático de una transposición V_H - J_H en *IGH* con tres conjuntos de cebadores para V_H y un cebador de consenso para J_H , combinados en tres tubos múltiples. La posición relativa de los cebadores para V_H y para J_H se da de acuerdo con la mayoría de nucleótidos en 5' aguas arriba (-) o aguas abajo (+) de la RSS implicada. El segmento génico V_H usado como miembro representativo de la familia V_H para diseño del cebador se indica entre paréntesis. **C, D y E.** Análisis de heterodúplex y por *GeneScanning* de las mismas poblaciones de células policlonales y monoclonales, que muestran las manchas de heterodúplex y bandas homodúplex típicas (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 nucleótidos (nt).

Figura 4. Análisis por PCR de transposiciones (D_H-J_H) en IGH. **A.** Diagrama esquemático de una transposición (D_H-J_H) en *IGH* con siete cebadores para la familia D_H y un cebador de consenso para J_H, divididos en dos tubos (tubos D y E con *IGH*). El cebador para D_H7 (7-27) estaba separado de los otros seis cebadores para D_H, debido a que el cebador de consenso para D_H7 y J_H dará un producto de PCR de la línea germinal de 211 nt. La posición relativa de los cebadores para D_H y J_H se da de acuerdo con la mayoría de nucleótidos en 5' aguas arriba (-) o aguas abajo (+) de la RSS implicada. El segmento génico D_H utilizado como miembro representativo de la familia D_H para diseño del cebador se indica entre paréntesis. **B y C.** Análisis de heterodúplex (paneles de la izquierda) y por *GeneScanning* (paneles de la derecha) de las mismas poblaciones de células policlonales y monoclonales. Se indica la distribución aproximada de los picos policlonales y monoclonales. La banda/pico de fondo potencial en el tubo D se indica con un asterisco y se encuentra fuera del intervalo esperado de transposiciones D_H-J_H. También se indica con un asterisco la banda D_H7-J_H de la línea germinal del tubo E.

Figura 5. Análisis por PCR de transposiciones de genes IGK. **A.** Diagrama esquemático del complejo de genes *IGK* sobre la banda cromosómica 2p11.2 (adaptado de la base de datos ImMunoGeneTics)^{46, 47}. Sólo están indicados segmentos génicos V_k no polimórficos transponibles en azul (V_k funcional) o en gris (V_k no funcional). La agrupación de segmentos génicos V_k invertidos (codificados con la letra D) está situada ~800 kb aguas arriba de los segmentos génicos V_k no invertidos. Estos segmentos génicos V_k aguas arriba se presentan como una imagen especular de sus equivalentes no invertidos correspondientes. **B.** Diagramas esquemáticos de una transposición V_k-J_k y los dos tipos de transposiciones de Kde (V_k-Kde e intrón RSS-Kde). La posición relativa de los cebadores para V_k, J_k, Kde e intrón RSS (INTR) se da de acuerdo con la mayoría de nucleótidos en 5' aguas arriba (-) o aguas abajo (+) de la RSS implicada. El segmento génico V_k utilizado como miembro representativo de las familias V_k1, V_k2 y V_k3 está indicado entre paréntesis. V_k4, V_k5 y V_k7 son familias V_k de un solo miembro. Los cebadores se dividen en dos tubos: tubo A con cebadores para V_k y J_k y tubo B con cebadores para V_k, intrón RSS y Kde. **C y D.** Análisis de heterodúplex y por *GeneScanning* de las mismas poblaciones de células policlonales y monoclonales, que muestran las manchas de heterodúplex y bandas homodúplex típicas (paneles de la izquierda) y las curvas gaussianas y los picos monoclonales típicos (paneles de la derecha). La distribución aproximada de las curvas gaussianas policlonales se indica en nt.

Figura 6. Análisis por PCR de transposiciones de genes IGL. **A.** Diagrama esquemático de un complejo de genes *IGL* sobre la banda cromosómica 22q11.2 (adaptado de la base de datos de ImMunoGeneTics)^{46, 47}. Sólo están incluidos segmentos génicos V_λ no polimórficos transponibles en azul (V_λ funcional) o en gris (V_λ no funcional). **B.** Diagrama esquemático de la transposición V_λ-J_λ con dos cebadores para la familia V_λ y un cebador de consenso para J_λ. Sólo dos cebadores para V_λ fueron diseñados para V_λ1 más V_λ2 y para V_λ3, debido a que estas tres familias V_λ abarcan aproximadamente el 70% de los segmentos génicos V_λ transponibles y debido a que aproximadamente el 90% de todas las transposiciones de genes *IGL* implican los segmentos génicos V_λ1, V_λ2 o V_λ3⁴⁸. Aunque cinco de los siete segmentos génicos J_λ pueden transponerse, sólo se diseñó un único cebador de consenso para J_λ para J_λ1, J_λ2 y J_λ3, debido a que el 98% de todas las transposiciones de genes *IGL* implican uno de estos tres segmentos génicos⁴⁹. La posición relativa de los cebadores para V_λ y J_λ se da de acuerdo con la mayoría de nucleótidos en 5' aguas arriba (-) o aguas abajo (+) de la RSS implicada. **C.** Análisis de heterodúplex y por *GeneScanning* de las mismas poblaciones de células policlonales y monoclonales, que muestran las manchas de heterodúplex y bandas homodúplex típicas (panel de la izquierda) y las curvas gaussianas policlonales y los picos monoclonales (panel de la derecha). La posición aproximada de las curvas gaussianas policlonales se indica en nt.

Figura 7. Análisis por PCR de transposiciones de genes TCRB. **A.** Diagrama esquemático del locus de *TCRB* humano. La designación de los segmentos génicos se realizó según Arden et al.,⁵⁰ estando entre paréntesis la designación según Rowen et al.,⁵¹ y Lefranc et al.^{46, 47}. La figura está adaptada de la base de datos ImMunoGeneTics internacional^{46, 47}. Sólo los segmentos génicos V_β no polimórficos transponibles están representados en azul (V_β funcional), en medio azul/medio gris (funcional potencial, pero no se encontró expresión proteínica) y en gris (V_β no funcional). **B.** Diagrama esquemático de las transposiciones V_β-J_β y D_β-J_β. Los 23 cebadores para V_β, 13 cebadores para J_β y dos cebadores para D_β se combinan en tres tubos: tubo A con 23 cebadores para V_β y nueve cebadores para J_β, tubo B con 23 cebadores para V_β y cuatro cebadores para J_β y tubo C con dos cebadores para D_β y 13 cebadores para J_β. Los 23 cebadores para V_β y los 13 cebadores para J_β están alineados con el fin de obtener productos de PCR de tamaño comparable (véanse los paneles C y D). Los cebadores para V_β abarcan aproximadamente el 90% de todos los segmentos génicos V_β. La posición relativa de los cebadores para V_β, D_β y J_β se da en de acuerdo con la mayoría de los nucleótidos en 5' aguas arriba (-) o aguas abajo (+) de la RSS implicada. **C, D y E.** Análisis de heterodúplex y por *GeneScanning* de las mismas poblaciones de células policlonales y monoclonales, que muestran las manchas de heterodúplex y bandas homodúplex típicas (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 8. Análisis por PCR de transposiciones de genes TCRG. **A.** Diagrama esquemático del locus de *TCRG* humano sobre la banda cromosómica 7p14. Sólo los segmentos génicos V_γ transponibles están representados en azul (V_γ funcional) o en gris (V_γ no funcional). Para los segmentos génicos J_γ, se utilizan ambas nomenclaturas^{46, 47, 52}. **B.** Diagrama esquemático de una transposición V_γ-J_γ de *TCRG* con cuatro cebadores para V_γ y dos cebadores para J_γ, que se dividen en dos tubos. La posición relativa de los cebadores para V_γ y J_γ se indica de acuerdo con la mayoría de los nucleótidos en 5' aguas arriba (-) o aguas abajo (+) de la RSS implicada. **C y D.** Análisis de

heterodúplex y por *GeneScanning* de las mismas poblaciones de células policlonales y monoclonales, que muestran las manchas de heterodúplex y bandas homodúplex típicas (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.

5 **Figura 9. Análisis por PCR de transposiciones de genes *TCRD*.** **A.** Diagrama esquemático del locus de *TCRD* humano sobre la banda cromosómica 14q11.2. Los seis segmentos génicos V δ "clásicos" están indicados en azul, dispersados entre los segmentos génicos V α en negro. Desde V δ 4, V δ 5 y V δ 6 se reconocen también como segmentos génicos V α , su código genético V α está entre paréntesis. **B.** Diagrama esquemático de las transposiciones V δ -J δ , D δ 2-J δ , D δ 2-D δ 3 y V δ -D δ 3, que muestra la posición de seis cebadores para V δ , cuatro para J δ y dos para D δ , todos combinados en un solo tubo. La posición relativa de los cebadores para V δ , D δ y J δ se indica de acuerdo con la mayoría de nucleótidos en 5' aguas arriba (-) o aguas abajo (+) de la RSS implicada. **C.** Análisis de heterodúplex (panel de la izquierda) y por *GeneScanning* (panel de la derecha) de las mismas poblaciones de células policlonales y monoclonales. Las poblaciones de células policlonales muestran una mancha difusa en el análisis de heterodúplex y un patrón de picos complejos y anchos en *GeneScanning*. Las bandas y los picos monoclonales son claramente visibles. En *GeneScanning* se indica la posición aproximada de los productos de PCR de los diferentes tipos de transposiciones.

10 **Figura 10. Detección de transposiciones en *BCL1-IGH*.** **A.** Diagrama esquemático del gen *CCND1* y la región del punto de rotura MTC (del inglés "major translocation cluster") en el *BCL1* sobre la banda cromosómica 11q13 así como el segmento génico J $_H$ sobre la banda cromosómica 14q32. Para el diseño del cebador en la región *BCL1*-MTC se compuso una secuencia de unión *BCL1*-MTC/J $_H$ 4 artificial (como se documentó parcialmente para JVM2⁵³): los primeros 50 nucleótidos documentados por Williams⁵⁴ estaban unidos a los nucleótidos 1-439 de la secuencia de MTC presente en NCBI (número de acceso S77049⁵⁵); se añadió la región "GCCC" en el extremo N de JVM2⁵³ seguida por los nucleótidos 1921-3182 que representan la región genómica J $_H$ 4-J $_H$ 6 (número de acceso J00256). **B.** Electroforesis en gel de agarosa de una serie de productos *BCL1-IGH* de PCR de diferentes pacientes con linfoma de células del manto (abreviadamente MCL por la expresión inglesa "mantle cell lymphoma") y la línea de células de control positivo JVM2. Los productos de PCR difieren en tamaño, lo que indica diferentes posiciones de los puntos de rotura en *BCL1*-MTC. Las bandas mayores de menor densidad representan productos de PCR que se extienden hasta el siguiente segmento génico J $_H$ en la línea germinal aguas abajo.

15 **Figura 11. Detección por PCR de transposiciones en *BCL2-IGH*.** **A.** Diagrama esquemático del gen *BCL2* sobre la banda cromosómica 18q21. La mayoría de los puntos de rotura del *BCL2* se agrupan en tres regiones: MBR, 3' MBR y mcr. En consecuencia, los cebadores múltiples han sido diseñados para que abarquen los puntos de rotura potenciales en estas tres regiones: dos cebadores para MBR, cuatro cebadores para 3' MBR y tres cebadores para mcr. La posición relativa de los cebadores para *BCL2* se indica de acuerdo con la mayoría de los nucleótidos en 5' aguas arriba (-) o aguas abajo (+) hasta el extremo 3' del exón 3 de *BCL2* (de acuerdo con el nº de acceso AF325194S1 en NCBI), excepto para dos cebadores para *BCL2*-mcr; su posición se indica aguas abajo del primer nucleótido de la secuencia de AF275873. **B, C y D.** Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR de diferentes pacientes con linfoma de células foliculares (abreviadamente FCL por la expresión inglesa "follicular cell lymphoma") y diversas líneas celulares de control positivo (DoHH2, K231, OZ y SC1). Los paneles B y D contienen las mismas muestras y presentan complementariedad en la positividad, ilustrando que el tubo C (tubo con mcr) tiene un valor añadido. Los productos de PCR difieren en tamaño, en relación con la diferente posición de los puntos de rotura en *BCL2*. Las bandas mayores de menor densidad en las mismas pistas representan productos de PCR que se extienden hasta el siguiente segmento génico J $_H$ en la línea germinal aguas abajo o hasta el siguiente cebador para *BCL2* aguas arriba.

20 **Figura 12. PCR con genes de control para la determinación de la amplificabilidad e integridad de muestras de DNA.** **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. La posición relativa de los cebadores para genes de control se da de acuerdo con la mayoría de nucleótidos en 5' aguas abajo del sitio de empalme en 5' del exón del gen de control implicado. **B.** Los productos de PCR con genes de control de seis muestras de DNA, se separaron en un gel de poliacrilamida al 6%. Dos muestras de control contenían DNA de alto peso molecular (pistas externas) y se obtuvieron cuatro muestras de DNA de muestras de tejido embebido en parafina, que muestran una amplificabilidad reducida (por ejemplo, 50 ng de GBS-4 frente a 500 ng de GBS-4) o una integridad reducida del DNA (PT-4).

25 **Figura 13. *GeneScanning* multicolor para ayudar a la identificación rápida y fácil de transposiciones de genes TCR.** **A.** Análisis bicolor del tubo A con *TCRB* con marcado diferencial de los cebadores para J β 1 (marcados con TET; verde) y cebadores para J β 2 (marcados con FAM; azul). El panel superior muestra claramente los dos patrones de las transposiciones J β 1 y J β 2 policlonales (véase la Figura 7C), mientras que los otros dos paneles muestran las transposiciones J β 2 clonales. **B.** Análisis bicolor del tubo A con *TCRG* con marcado diferencial del cebador para J γ 1.3/2.3 (marcado con FAM; azul) y el cebador para J γ 1.1/2.1 (marcado con TET; verde). El panel superior muestra claramente los patrones de transposiciones policlonales (véase la Figura 8C), mientras que los otros dos paneles muestran las transposiciones J γ 1.3/2.3 clonal y J γ 1.1/2.1 clonal, respectivamente. **C.** Análisis tricolor de transposiciones de genes *TCRD* con marcado diferencial de cebadores para J δ (marcados con FAM;

azul), cebador para D δ 2 (marcado con HEX; verde) y cebador para D δ 3 (marcados con NED; negro). Dentro de los patrones de transposiciones complejas del tubo con *TCRD* (Figura 9C), el análisis tricolor permite la detección directa de las transposiciones V δ -J δ (picos azules), las transposiciones D δ 2-J δ (picos azules y verdes, que no migran conjuntamente por completo debido a las diferencias en la velocidad de migración de los dos fluocromosomas), la transposición V δ 2 -D δ 3 (picos negros) y la transposición D δ 2-D δ 3 (picos verdes y negros que migran conjuntamente).

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de dianas para PCR: teniendo como objetivo la complementariedad

Se decidió tener como objetivo la disponibilidad de al menos una diana de clonalidad detectable por PCR en cada neoplasia maligna linfoide. En las neoplasias malignas de linfocitos B maduros este objetivo podría verse obstaculizado por la presencia de hipermutaciones somáticas en los genes Ig, que se encuentran particularmente en neoplasias malignas de linfocitos B foliculares y post-foliculares. Por lo tanto, se decidió incluir dianas para PCR que tuvieran algún grado de complementariedad.

Se aplicaron varios criterios para la selección de dianas:

- 15 - genes *IGH*: no sólo se incluyeron como dianas para PCR transposiciones V_H-J_H completas sino también transposiciones D_H-J_H incompletas, debido a que las transposiciones D_H-J_H probablemente no son afectadas por hipermutaciones somáticas;
- genes *IGK* e *IGL*: ambos genes de la cadena ligera de Ig fueron incluidos como dianas para PCR, debido a que aumentaban la probabilidad de encontrar una transposición de genes Ig detectable por PCR en cada neoplasia maligna de linfocitos B maduros;
- 20 - genes *IGK*: no sólo se incluyeron las transposiciones V_k-J_k, sino también las transposiciones del elemento delecionante kappa (Kde), debido a que se producen en uno o ambos alelos en (virtualmente) todas las neoplasias malignas de linfocitos B con Ig λ ⁺ y en un tercio de las neoplasias malignas de linfocitos B con Ig κ ⁺ y debido a que las transposiciones de Kde probablemente no se ven afectadas por la hipermutación somática;
- 25 - genes *TCRB*: tanto las transposiciones V β -J β completas como las transposiciones D β -J β incompletas, debido a que las transposiciones de genes *TRCB* completas e incompletas se producen en todas las neoplasias malignas de linfocitos T maduros con TCR $\alpha\beta$ ⁺ y también en muchas neoplasias malignas de linfocitos T con TCR $\gamma\delta$ ⁺;
- 30 - genes *TCRG*: esta diana de clonalidad para PCR clásica es útil en todas las neoplasias malignas de linfocitos T de los linajes TCR $\gamma\delta$ y TCR $\alpha\beta$.
- genes *TCRD*: estos son una diana potencialmente útil en neoplasias malignas de linfocitos T inmaduros así como en neoplasias malignas de linfocitos T con TCR $\gamma\delta$ ⁺;
- 35 - gen *TCRA*: este gen no se incluyó como diana para PCR, debido a su alto grado de complejidad con los segmentos génicos ~50 V y 61 J. Además, todas las neoplasias malignas de linfocitos T con transposiciones de genes *TCRA* contienen transposiciones de genes *TCRB* y generalmente también tienen transposiciones de genes *TCRG*;
- segmentos génicos funcionales: la mayoría de linfoproliferaciones sospechosas se refieren a linfocitos maduros, que tienen por lo tanto transposiciones de genes Ig o TCR funcionales. Por consiguiente, el diseño del cebador para PCR tiene como objetivo la inclusión de (virtualmente) todos los segmentos génicos Ig/TCR funcionales.
- 40 - anomalías cromosómicas bien definidas: se incluyeron como dianas adicionales t(11;14) con *BCL1-IGH* y t(14;18) con *BCL2-IGH*, debido a que estas dos anomalías son detectables por PCR con frecuencias relativamente altas en linfomas, es decir, en 30% de linfoma de células del manto (MCL) y en 60 a 70% de linfomas de células foliculares (FCL), respectivamente.
- 45

Diseño de cebadores para PCR múltiple

La detección precisa de todos los segmentos génicos V, D y J en genes Ig y TCR transpuestos requerirían muchos cebadores diferentes (Tabla 2). Para algunos complejos de genes esto podría ser posible (por ejemplo, *TCRG* y *TCRD*), pero para otros locus esto es imposible en la práctica debido al alto número de segmentos génicos diferentes. Para resolver este problema, se pueden diseñar cebadores de familia, que reconocen la mayoría de todos los segmentos génicos de una familia particular (Tabla 2). Alternativamente, se pueden preparar cebadores de consenso, que reconocen secuencias conservadas que se presentan en muchos o todos los segmentos génicos implicados.

El diseño de cebadores de familia y cebadores de consenso mantiene el equilibrio entre un número limitado de cebadores y la homología máxima con todos los segmentos génicos relevantes. En este estudio, los inventores pretendieron la homología máxima con todos los segmentos génicos relevantes (particularmente segmentos génicos funcionales) con el fin de evitar la asociación subóptima de cebadores, que podría dar resultados negativos falsos. Además, los inventores tenían como objetivo el diseño de cebadores específicos de familia sin asociación cruzada con otras familias.

Con el fin de limitar el número de tubos para PCR por locus, llegó a ser importante por razones prácticas el uso de múltiples cebadores para PCR. En consecuencia, se elaboraron directrices especiales para garantizar las posibilidades máximas para el diseño de cebadores útiles en tubos para PCR múltiple. Para este propósito el Dr. W. Rychlick (Molecular Biology Insights, Cascade, CO, EE.UU.) proporcionó su programa informático OLIGO 6.2 especialmente adaptado y apoyó el desarrollo de las directrices para el diseño óptimo de cebadores.

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

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

Se utilizaron los siguientes parámetros para el diseño de cebadores con el programa OLIGO 6.2:

- la búsqueda de cebadores se debe realizar con rigor *moderado*;
- el valor de la eficacia del cebador (abreviadamente PE por la expresión inglesa "*primer efficiency*") debe ser preferiblemente ~400 (y >630, si el cebador se utiliza como cebador de consenso también para otros segmentos génicos);
- el dímero en 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 global menos importante;
- en vista de la PCR múltiple, se tuvieron en cuenta las siguientes directrices: habría que diseñar un cebador común en la mayoría de las regiones de consenso (es decir, alta PE en busca de consenso), mientras que los cebadores individuales (familia o miembro) han de ser diseñados en la mínima región de consenso (es decir, bajo valor de PE de dicho cebador para segmentos génicos que no deben ser abarcados) para evitar asociaciones cruzadas con otros segmentos génicos y con ello múltiples productos de PCR (no deseados).

Protocolo para PCR

Se elaboró un protocolo para PCR normalizado basándose en la experiencia ya existente de los anteriores estudios europeos de colaboración. Después de los ensayos y la aprobación iniciales, se aceptó el protocolo que se resume en la Tabla 3.

Técnicas para el análisis de productos de PCR obtenidos a partir de transposiciones de genes Ig/TCR

Los productos de PCR obtenidos de las transposiciones de genes Ig y TCR han de ser analizados para discriminar entre las células linfoides monoclonales con regiones de unión idénticas y las células linfoides policlonales con regiones de unión muy diversas.

Basándose en la experiencia combinada de los laboratorios participantes, se seleccionaron dos técnicas: análisis de heterodúplex (HD) y análisis por *GeneScanning* (GS). El análisis de HD utiliza productos de PCR bicatenarios y aprovecha la longitud y composición de las regiones de unión, mientras que en GS los productos de PCR monocatenarios se separan en un gel o polímero de alta resolución de acuerdo solo con su longitud (Figura 2).

Análisis de heterodúplex de productos de PCR

Productos de PCR obtenidos con cebadores *sin marcar* se desnaturalizan a alta temperatura (~95°C durante 5 minutos), seguido por una rápida renaturalización aleatoria a baja temperatura (preferiblemente a 4°C durante 1 hora). Esta formación de dúplex impuesta da como resultado muchos heterodúplex diferentes con diferente velocidad de migración en caso de linfoproliferaciones policlonales, pero da como resultado homodúplex con una rápida migración idéntica en caso de linfoproliferaciones monoclonales. La electroforesis de los homodúplex en un gel de poliácridamida al 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 barata

(véase la Tabla 4 para los detalles técnicos) y tiene un límite de detección de ~5%^{40, 41}. El límite de detección está influenciado por la frecuencia de linfocitos policlonales, debido a que la formación de muchos heterodúplex también consumirá una parte de los productos de PCR monoclonales⁴¹.

Análisis por GeneScanning de productos de PCR

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

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

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

Genes de control y tejidos embebidos en parafina

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

20 Para controlar la calidad y amplificabilidad del DNA de un material embebido en parafina, se desarrolló una PCR con un gen de control múltiple especial, dando como resultado una escala de cinco fragmentos (100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb y 600 pb). De 45 de los 90 casos anteriormente descritos se disponía de suficiente tejido embebido en parafina para la extracción de DNA. Estas muestras de DNA se analizaron en paralelo con las muestras de DNA obtenidas recientemente, utilizando el tubo múltiple de los genes de control así como los tubos múltiples de
25 Ig/TCR/*BCL1/BCL2* para diagnósticos de la clonalidad (véase Ejemplo 10).

Ejemplo 1. Transposiciones completas de genes *IGH*: V_H-J_H

Fundamento

La transposición funcional del gen *IGH*, en primer lugar D_H a J_H y posteriormente V a D_H-J_H, va seguida por la expresión de anticuerpos, el distintivo de los linfocitos B maduros. El gen *IGH* está situado en el cromosoma
30 14q32.3 en un área que abarca aproximadamente 1250 kilobases. Se han identificado de 46 a 52 segmentos V_H funcionales (dependiendo del haplotipo individual), que pueden agruparse de acuerdo con su homología en seis o siete subgrupos de V_H. Además se han descrito aproximadamente 30 segmentos V_H no funcionales. Además, se han encontrado consistentemente 27 segmentos D_H y seis segmentos J_H funcionales (Tabla 2 y Figura 3A)⁵⁶.

Los segmentos V_H contienen tres marcos (abreviadamente FR por la expresión inglesa “*framework*”) y dos regiones determinantes de la complementariedad (abreviadamente CDR por la expresión inglesa “*complementarity determining regions*”) (Figura 3B). Los FR se caracterizan por su similitud entre los diversos segmentos V_H mientras que las CDR son muy diferentes incluso dentro de la misma familia de V_H. Además, las CDR representan las secuencias diana preferidas para hipermutaciones somáticas en el curso de la reacción del centro germinal, que aumentan la variabilidad dentro de esas regiones. Aunque los FR están generalmente menos afectados por las mutaciones somáticas, dentro de estas regiones también pueden producirse sustituciones de nucleótidos, especialmente en los
40 linfocitos B bajo un proceso mutacional pesado.

Las regiones V-D-J_H muy variables pueden ser amplificadas por PCR para detectar poblaciones de linfocitos B clonales indicativos de la presencia de un trastorno maligno de linfocitos B. Los linfocitos B clonales se pueden discriminar de los linfocitos B policlonales (es decir, tejidos linfoides normales o reactivos) basados en el tamaño y composición idénticos de los productos de PCR clonales en comparación con los muchos productos de PCR policlonal diferentes con un intervalo de tamaños de aproximadamente 60 pb, dispuestos en una distribución gaussiana. Las estrategias basadas en PCR para la detección de poblaciones de linfocitos B clonales en cortes histológicos y suspensiones celulares han sido ya establecidas en los primeros años de la década de los noventa. Sin embargo, los protocolos de PCR iniciales usaron cebadores individuales de consenso para V_H que eran capaces
45 de unirse a una de las tres regiones de los marcos, principalmente FR3. Dichos cebadores de consenso no eran adecuados para amplificar todos los segmentos V_H con la misma eficacia conduciendo a la no detectabilidad de un número significativo de transposiciones clonales. Además, las mutaciones somáticas introducidas en el curso de la reacción del centro germinal no están restringidas a las CDR, sino que pueden producirse también en los FR, impidiendo con ello la asociación del cebador y en consecuencia conduciendo a la ausencia de productos de PCR
50 clonales a pesar de la presencia de una población de linfocitos B neoplásicos. Esto es especialmente cierto para linfomas foliculares, linfomas de linfocitos B grandes difusos y mielomas múltiples que contienen generalmente altos

números de mutaciones somáticas.

5 Para aumentar más la tasa de detección por PCR de *IGH*, se han realizado varios intentos de diseñar cebadores específicos de familias para superar las limitaciones de los cebadores de consenso. Sin embargo, estos cebadores específicos de familias se basan en gran parte en las secuencias de los cebadores de consenso previos. Aunque estas estrategias de PCR han ayudado a mejorar la tasa de detección, todavía se necesitan sistemas de cebadores que sean menos sensibles a las hipermutaciones somáticas, permitiendo de este modo la amplificación de (virtualmente) todas las transposiciones V-D-J_H posibles.

Diseño de cebadores

10 Se diseñaron tres conjuntos de cebadores para V_H con la ayuda del programa OLIGO-6.2 correspondientes a las tres regiones del marco V_H (FR1, FR2 y FR3) (Figura 3B). Cada conjunto de cebadores consistía en seis o siete oligonucleótidos capaces de asociarse a sus segmentos V_H correspondientes (V_{H1} a V_{H7}) sin desapareamientos para la mayoría de los segmentos V_H y uno o como máximo dos desapareamientos para algunos segmentos V_H raros. El diseño era tal que los desapareamientos estarían situados en el mismo extremo 5' del cebador. Estos conjuntos de cebadores para V_H se utilizaron junto con un único cebador de consenso para J_H, diseñado para asociarse al extremo 3' más homólogo de los seis segmentos J_H, aproximadamente 35 pb aguas abajo de la RSS de J_H. Esto garantiza que todos los segmentos J_H sean detectables con la misma eficacia de unión y que la unión del cebador no estará afectada fácilmente por la extensa delección de nucleótidos en el curso del proceso de transposición. Además, no se produjo asociación transversal entre los cebadores para V_H y el cebador para J_H como se evaluó por el programa OLIGO-6.2.

20 El cebador para J_H se diseñó también para ser usado para la amplificación de otras dianas de PCR, tales como transposiciones D_H-J_H incompletas así como t(11;14)(*BCL1-IGH*) y t(14;18)(*BCL2-IGH*). Esto permite la detección de diferentes productos de PCR mediante análisis por GS empleando el mismo cebador marcado para J_H.

Resultados de la fase de ensayo inicial

25 El ensayo inicial por PCR de V_H-J_H recientemente diseñado se realizó por aplicación por separado de cada cebador para V_H junto con el cebador para J_H en una PCR individual. Para este fin, se utilizó DNA extraído de líneas de linfocitos B así como muestras clonales de pacientes bien definidos. Además, se analizaron las transposiciones clonales para determinar la sensibilidad por dilución en serie en DNA extraído de amígdalas reactivas. Para cada posible transposición en *IGH* no había disponible muestras de control clonales, pero en la fase de ensayo inicial se han incluido todos los segmentos V_H principales y varios segmentos V_H raramente transpuestos.

30 Todos los pares de cebadores actuaron con alta eficacia y sensibilidad. Se detectaron las transposiciones V_H clonales esperadas y la sensibilidad fue al menos 1% (10⁻²). En el intervalo de tamaños esperado no se produjo fondo y la amplificación del DNA amigdalino dio la curva de distribución gaussiana esperada (Figuras 3C, D y E).

35 Basándose en estos resultados los inventores comenzaron la siguiente fase de ensayo inicial del cebador combinando los cebadores para V_H en tres conjuntos, cada uno específico para una de las tres regiones de marcos, que se utilizaron junto con el cebador para J_H común (Figura 3B). Los resultados fueron los mismos que los obtenidos con los pares de cebadores individuales, pero con una sensibilidad ligeramente inferior. Además, no se amplificaron productos no específicos en el intervalo de tamaños esperado, con la excepción de un producto de PCR de 340 pb que aparecía en la PCR múltiple de FR1. Este producto de PCR se generó con independencia de la fuente del DNA (linfoide y no linfoide) utilizada para la PCR, mientras que no se obtuvo producto de PCR cuando no se aplicó DNA molde. Además, este amplicón fue sólo detectable por análisis de heterodúplex, no por *GeneScanning*. Esto indica que el cebador para J_H marcado con un agente fluorescente no estaba implicado en la generación de este producto de PCR. El análisis de las secuencias de este producto de PCR reveló un fragmento de V_{H4} amplificado por el cebador para FR1 de V_{H4} junto con el cebador para FR1 de V_{H2} que actuó aparentemente como un cebador aguas abajo por unión a la secuencia de V_{H4} intrónica. Este problema podría resolverse diseñando un nuevo cebador para FR1 de V_{H2} que estuviera localizado 25 pb aguas arriba del sitio de unión al cebador anterior.

Resultados de la fase de ensayo general

50 Se aplicó la PCR de *IGH* a las 90 muestras de DNA definidas por transferencia de Southern, que procedían de casos bien caracterizados. Seis de los 11 laboratorios implicados en la fase de ensayo general realizaron análisis por GS de los productos de PCR y cinco realizaron análisis de HD. Además, se incluyeron como controles varias muestras policlonales así como monoclonales (DNA de la línea celular). 45 de estos casos presentaron productos de PCR dominantes después de análisis por GS y 40 casos después de la detección por HD, lo que indica la presencia de una población de linfocitos B monoclonales. Las transposiciones clonales fueron detectables con los tres grupos de cebadores para FR en 33 de los 45 casos clonales (GS) y en los 12 restantes con uno o dos de los tres conjuntos de cebadores para FR. Se llegó a la conclusión de que la mayoría de los resultados negativos eran causados por hipermutaciones somáticas en el sitio de unión del cebador, impidiendo la asociación del cebador y por tanto su amplificación.

La comparación de los resultados de PCR de V_H - J_H con los resultados por transferencia de Southern reveló un alto grado de concordancia. 85% (46 de 55) y 76% (42 de 55) de las muestras con genes V_H transpuestos por análisis de transferencia de Southern mostraron un producto de amplificación dominante por análisis por GS y análisis de HD, respectivamente. Viceversa, todas menos dos muestras que albergaban genes V_H de la línea germinal por transferencia de Southern presentaron un patrón policlonal por análisis por GS y por HD.

Conclusión

En conclusión, las tres PCR múltiples para la detección de transposiciones V_H - J_H clonales proporcionan un ensayo nuevo y fiable para identificar proliferaciones de linfocitos B clonales. El uso combinado de cebadores estandarizados en los tres FR diferentes ayuda a disminuir la tasa de resultados negativos falsos debido a la hipermutación somática en los sitios de unión a los cebadores de los segmentos génicos V_H implicados.

Ejemplo 2. Transposiciones incompletas de genes *IGH*: D_H - J_H

Fundamento

La formación de transposiciones V-D-J completas en el locus de *IGH* en el cromosoma 14q32.3 es un proceso secuencial que se produce en dos etapas: el acoplamiento de V_H está precedido generalmente por una transposición inicial entre los segmentos génicos D_H y J_H en linfocitos B precursores tempranos (revisado por ⁵⁷). Además de los muchos segmentos génicos V_H distintos y los seis segmentos génicos J_H funcionales (véase el Ejemplo 1), el locus de *IGH* humano contiene también 27 segmentos génicos D_H ⁵⁸. Basándose en la homología de secuencias, los 27 segmentos D_H se pueden agrupar en siete familias: D_H1 (anteriormente conocido como DM), D_H2 (DLR), D_H3 (DXP), D_H4 (DA), D_H5 (DK), D_H6 (DN) y D_H7 (DQ52); todas las familias comprenden al menos cuatro miembros, a excepción de la séptima que consiste en el único segmento D_H7 -27 justo aguas arriba de la región J_H (Figura 3A) ^{58, 59}.

La recombinación entre cualquiera de los segmentos D_H y J_H dará como resultado la formación de uniones D_H - J_H incompletas, que se pueden detectar fácilmente en linfocitos B precursores $CD10^+$ / $CD19^-$ derivados de la médula ósea ^{60, 61} y por lo tanto también en un subconjunto (20-25%) de leucemias linfoblásticas agudas de linfocitos B precursores, que muestran un genotipo inmaduro ⁶². La secuenciación reveló un predominio de los segmentos génicos D_H2 (D_H2 -2), D_H3 (D_H3 -9) y D_H7 -27 en las leucemias linfoblásticas agudas de linfocitos B precursores, que comprendía 36%, 33% y 19% de todos los segmentos identificados, respectivamente ⁶².

Sin embargo, también en neoplasias malignas de linfocitos B maduros se han documentado transposiciones D_H - J_H incompletas ^{61, 63}. Por otra parte, incluso en un subconjunto de mielomas múltiples negativos a IgH, que se pueden considerar como el tipo más maduro de neoplasia maligna del linaje B, se observaron uniones D_H - J_H ⁶⁴. Estas transposiciones D_H - J_H procedían del segundo alelo no codificante e implicaban segmentos de las familias D_H1 a D_H4 ⁶⁴. Basándose en la descripción de las uniones D_H - J_H en las leucemias linfoblásticas agudas de linfocitos B precursores y mielomas múltiples, se supone que están también presentes transposiciones D_H - J_H incompletas en otros tipos de leucemias de linfocitos B y linfomas. En neoplasias malignas de linfocitos T inmaduros se han identificado acoplamientos D_H - J_H como transposiciones entre linajes ³⁴; curiosamente, estos acoplamientos se produjeron casi exclusivamente en el subconjunto T-ALL no-TCR $\alpha\beta^+$ más inmaduro e implicaba principalmente los segmentos D_H6 -19 y D_H7 -27 más aguas abajo. Este último segmento se usa frecuentemente (hasta 40%) en linfocitos B fetales pero rara vez en linfocitos B adultos ^{65, 66}. Los linfocitos B maduros y precursores adultos humanos parece que utilizan principalmente segmentos de las familias D_H2 y D_H3 , como demuestran las secuencias de transposiciones V_H - D_H - J_H completas ⁶⁶.

Aunque las frecuencias exactas de los acoplamientos D_H - J_H incompletos en diferentes tipos de neoplasias malignas de linfocitos B maduros son en gran parte desconocidas, es evidente que serán al menos inferiores a las de las uniones V_H - J_H . Sin embargo, las transposiciones D_H - J_H todavía podrían representar una diana complementaria importante para la determinación de la clonalidad basada en PCR. Esta presunta contribución de transposiciones D_H - J_H como diana de PCR se basa en la suposición de que las transposiciones incompletas en el locus de *IGH* no contendrán hipermutaciones somáticas, debido a que no se produce la transcripción que comienza en los promotores en los segmentos génicos V_H , que se considera un requisito esencial previo a tener en cuenta para la hipermutación somática ^{67, 68}. Especialmente en aquellos tipos de proliferaciones del linaje B en los que son frecuentes las hipermutaciones somáticas, el análisis por PCR de un posible producto de recombinación D_H - J_H podría ser por tanto relevante y algunas veces incluso la única posibilidad para detectar el clon de linfocitos B.

Diseño de cebadores

Basándose en el alto grado de homología dentro de cada familia D_H , se diseñaron siete cebadores para D_H específicos de familia (Figura 4) en combinación con el cebador de consenso para J_H que también se utiliza para la detección de transposiciones V_H - J_H (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 tal manera que la asociación cruzada a otros segmentos de la familia D_H sería mínima o preferiblemente estaría ausente, dando como resultado distintas posiciones para los diferentes cebadores de familia con relación a los elementos de la RSS (Figura 4). Los tamaños de los productos de PCR esperados de las uniones D_H - J_H varían desde 110-130 pb (para uniones D_H7 - J_H) hasta 395-415 pb (para transposiciones D_H3 - J_H).

Es digno de mención, debido a la posición del segmento D_H7-27 próximo a los segmentos en la región J_H, que los productos de PCR de 211 pb (y también de 419, 1031, 1404, 1804 y 2420 pb en el caso de cebadores que se asocian a segmentos génicos J_H aguas abajo) se amplificaran a partir de alelos no transpuestos y se detectaran virtualmente en cada muestra como una escala de bandas en la línea germinal.

5 Resultados de la fase de ensayo inicial

Para el ensayo inicial de los cebadores individuales para D_H, se utilizaron muestras de leucemias linfoblásticas agudas de linfocitos B precursores o leucemias linfoblásticas agudas de linfocitos T precursores de alta carga tumoral con transposiciones D_H-J_H clonales bien definidas. Bajo condiciones estándar de PCR utilizando MgCl₂ 1,5 mM y tampón AmpliTaq de referencia, las siete combinaciones de cebadores parecían detectar las dianas D_H-J_H clonales con longitudes de producto dentro de los intervalos de tamaños esperados. La asociación cruzada de los cebadores para D_H a segmentos génicos transpuestos de otras familias de D_H era sólo muy débil o no se observaba en absoluto. Además, también se observaron en productos de PCR de DNA de MNC o amigdalino de control sano de los intervalos de tamaños correctos. No se observó asociación no específica de los cebadores para virtualmente todos los conjuntos de cebadores, usando DNA de control específico no molde; sólo en el caso del conjunto de cebadores para D_H2/J_H se observó en el DNA de células HeLa un (a veces débil) producto de 340-350 pb. Además la secuenciación reveló que este producto no específico era debido a un falso cebado del cebador para D_H2 a una secuencia de DNA aguas arriba del segmento J_H4. Sin embargo, como el tamaño de este producto no específico era tan diferente de los tamaños de cualquiera de los productos verdaderos de PCR de D_H-J_H, se decidió no diseñar un nuevo cebador para D_H2. En efecto, la banda no específica de 350 pb se puede emplear como un marcador interno para la amplificación con éxito de DNA y por tanto la calidad del DNA molde, siendo difícil o sólo ligeramente visible cuando está disponible suficiente molde de D_H-J_H clonal o policlonal (por ejemplo, en DNA amigdalino o DNA de muestras de leucemias particulares), pero siendo especialmente fuerte en muestras que contienen pocas células linfoides con transposiciones D_H-J_H.

Diluciones en serie de DNA de las muestras de referencia clonales en DNA amigdalino dieron generalmente como resultado sensibilidades de 5% o inferior (0,5-1% en el caso de las transposiciones D_H6-J_H) utilizando el análisis de HD; las sensibilidades en el análisis por GS fueron generalmente mejores en 1-2 etapas de dilución, es decir, 1% o inferior. La diana D_H7-J_H clonal sólo se pudo detectar con una sensibilidad de ~10%, que es producida más probablemente por el consumo del cebador en amplicones de PCR que implican los segmentos génicos D_H7 y J_H en la línea germinal no transpuestos.

Aunque la estrategia múltiple inicial, como sugería el diseño de cebador asistido por OLIGO 6.2, fue dividir los diversos cebadores para D_H en dos tubos, se decidió después de analizar varias propuestas múltiples combinar todos los cebadores en un tubo múltiple (tubo D del ensayo de clonalidad de *IGH*), excepto para el cebador para D_H7, que estaba incluido en un tubo separado (tubo E del ensayo de clonalidad de *IGH*). La razón para excluir el cebador para D_H7 era el complicado patrón en la línea germinal, debido a la fácil amplificación de alelos con segmentos D_H7 no transpuestos. Usando esta propuesta múltiple de dos tubos, eran todavía detectables todas las muestras de referencia clonales. En condiciones múltiples, los límites de detección para estas diversas dianas clonales fueron lógicamente menos óptimos en comparación con los ensayos sencillos, que variaban desde ~5% (D_H3, D_H4 y D_H6) hasta ~10% (D_H2 y D_H5). Para la muestra de referencia clonal D_H1 que estaba disponible, se observó una sensibilidad de ~20%; en una etapa posterior se encontró que la transposición D_H1-J_H de la línea celular KCA era detectable por debajo del 10% en el ensayo múltiple. Puesto que el tubo E sólo contiene el cebador para D_H7, la sensibilidad del 10% para este tubo era la misma que se ha mencionado antes. El mismo análisis múltiple realizado con 500 ng en lugar de 100 ng de DNA de las diluciones en serie, dio como resultado sensibilidades ligeramente mejores. El uso de diluciones en serie de DNA de MNC en lugar de DNA amigdalino no afectó claramente los límites de detección de los ensayos para recombinaciones D_H-J_H.

45 Resultados de la fase de ensayo general

[0091] Después del ensayo inicial en los tres laboratorios implicados en el diseño de cebadores, se evaluaron adicionalmente los ensayos de PCR múltiples desarrollados en D_H-J_H de *IGH* usando las 90 muestras definidas por transferencia de Southern. Cada muestra se analizó en paralelo en cuatro laboratorios por análisis de HD y en cinco laboratorios por análisis por GS; en otros dos laboratorios todas las muestras se analizaron por ambas técnicas. Juntando todos los resultados se obtuvo un total de seis análisis de HD y siete por GS por muestra y por tubo. A pesar de los resultados concordantes (>80% de los laboratorios con resultados idénticos) en la gran mayoría de las muestras, nueve mostraron discordancias entre laboratorios en el tubo D. Análisis posteriores revelaron que estas discordancias podrían explicarse por la presencia bien de un pequeño clon con productos clonales débiles o de productos de gran tamaño (~390 y mayores). En algunos casos los productos eran tan grandes, que sólo después de secuenciación se hizo evidente que se referían a transposiciones D_H-J_H verdaderas pero extendidas, bien desde segmentos génicos D_H aguas arriba (por ejemplo, D_H6-25-D_H1-26-J_H en NL-12) o J_H aguas abajo (por ejemplo, D_H6-25-J_H4-J_H5 en PT-14). En los tres casos (NL-17, micosis fungoide; FR-1, B-CLL, FR-5, FCL) en los que se encontraron productos clonales usando el tubo E, los resultados fueron totalmente concordantes entre laboratorios.

Al evaluar los resultados de los análisis de HD y por GS, parecía que estos eran comparables, aunque en general el número de laboratorios que mostraron resultados idénticos fue ligeramente mayor para los análisis de HD en

comparación con los realizados por GS (Figuras 4B y C).

- La comparación directa de los resultados de PCR múltiple de D_H-J_H con los datos de transferencia de Southern es virtualmente imposible, puesto que la hibridación con una única sonda (IGHJ6) en la región J_H no permite la discriminación entre las transposiciones V_H-J_H y D_H-J_H . En tres muestras fue evidente que la detección de productos clonales de los ensayos combinados de V_H-J_H y D_H-J_H no estaba de acuerdo con la configuración del locus de *IGH* en el análisis por transferencia de Southern. Notablemente, no se observaron productos de PCR con D_H-J_H clonales en las neoplasias malignas de linfocitos B pre-foliculares. Por el contrario, 11/16 muestras de B-CLL y 12/25 muestras de neoplasias malignas de linfocitos B (post-)foliculares contenían productos de PCR con D_H-J_H clonalmente transpuestos. En tres de los dieciocho casos de neoplasias malignas de linfocitos T se observaron transposiciones D_H-J_H clonales; estos casos se referían a T-LBL (ES-9) y micosis fungoide (NL-17) con transposiciones en *IGH* detectadas por transferencia de Southern y un caso de T-NHL/EATL (PT-4) sin transposiciones en *IGH* detectadas por transferencia de Southern, debido probablemente a la baja carga tumoral <15%. Los 15 casos positivos sólo mostraron productos de PCR con D_H-J_H policlonales, de acuerdo con los resultados de la transferencia de Southern. En la categoría D con diagnósticos difíciles, tres muestras (PT-12, GBS-10 y GBN-8) mostraron productos de PCR con D_H-J_H en *IGH* clonales, que estaban de acuerdo con los datos de la transferencia de Southern así como con los datos de PCR de *IGK* en dos de los tres casos; en otras dos muestras (PT-6 y GBS-9), ambos casos de B-NHL rico en linfocitos T, se encontraron productos clonales de D_H-J_H además de productos clonales de *IGK* y/o *IGL*, pero sin evidencia de clonalidad en el análisis por transferencia de Southern, lo que podría ser explicado mejor por el pequeño tamaño del clon de linfocitos B en estas muestras.
- Con el fin de determinar el valor adicional del análisis por PCR de D_H-J_H , los resultados se compararon con los del análisis por PCR de V_H-J_H . En cinco neoplasias malignas de linfocitos B (NL-4, PT-14, GBN-2, FR-7, NL-12) se encontraron productos clonales de PCR con D_H-J_H , mientras que sólo se observaron productos policlonales de PCR con V_H-J_H .

Conclusión

- [0095] En conclusión, basándose en las fases de ensayo inicial y general, el análisis por PCR de D_H-J_H parece ser un valor añadido para la determinación de la clonalidad. Aunque los resultados del análisis de HD podrían interpretarse un poco más fácilmente, no hay ninguna preferencia clara por el análisis de HD o por GS puesto que ambos son adecuados para analizar productos de PCR amplificados. Una dificultad potencial en el análisis por PCR de D_H-J_H 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 extendidas desde los segmentos génicos D_H aguas arriba o J_H aguas abajo, lo que implica que se recomiendan largas operaciones para el análisis por GS. Por último, la posición notable del segmento génico D_H7-27 en el locus de *IGH* provoca una escala de productos de amplificación en la línea germinal en el tubo E, siendo los productos clonales fácilmente reconocibles como bandas/picos mucho más pequeños.

35 Ejemplo 3. Transposiciones de genes *IGK*: V_k-J_k , V_k-Kde /intrónRSS- Kde

Fundamento

- El locus en la cadena ligera de *IGK* humano (en el cromosoma 2p11.2) contiene muchos segmentos génicos V_k distintos, agrupados en siete familias de genes V_k , así como cinco segmentos génicos J_k aguas arriba de la región C_k . Originalmente, los segmentos génicos V_k se designaron según la nomenclatura descrita por Zachau et al.⁶⁹. Una nomenclatura alternativa agrupa los segmentos génicos V_k en siete familias y se utiliza en la base de datos ImMunoGeneTics⁴⁶. Los inventores siguieron esta última nomenclatura. Las familias V_k1 , V_k2 y V_k3 son familias de múltiples miembros incluyendo segmentos tanto funcionales como pseudogénicos, mientras que las otras familias sólo contienen un solo segmento (V_k4 , V_k5 , V_k7) o unos cuantos segmentos (V_k6)⁷⁰. Notablemente, todos los segmentos génicos V_k están dispersos en dos grandes agrupaciones duplicadas, una inmediatamente aguas arriba y en la misma orientación que los segmentos J_k y la otra más alejada y en una orientación invertida (Figura 5A)⁷¹. Esto último implica que se requieren las llamadas transposiciones de inversión para formar uniones V_k-J_k que impliquen genes V_k de la agrupación alejada. Además de los segmentos V_k y J_k , 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 J_k-C_k , puede transponerse a los segmentos génicos V_k (V_k-Kde), pero también a una RSS aislada en el intrón J_k-C_k (intrónRSS- Kde)^{24, 72}. Ambos tipos de transposiciones conducen a la inactivación funcional del alelo de *IGK*, por delección del exón C_k (transposición intrónRSS- Kde) o la zona completa J_k-C_k (transposición V_k-Kde).

- Como la recombinación en *IGK* humano comienza en los linfocitos B precursores de la médula ósea, las transposiciones en *IGK* también se pueden detectar en leucemias agudas de linfocitos B precursores (30-45% de alelos, dependiendo de la edad). Aunque estén presentes uniones V_k-J_k , estas transposiciones en *IGK* se refieren principalmente a recombinaciones que implican Kde (25-35% de alelos). En la leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B precursores de la infancia predomina la recombinación V_k-Kde sobre la intrón- Kde , mientras que en la ALL en adultos las delecciones implican exclusivamente acoplamientos V_k-Kde ^{24, 73, 74}. En las leucemias de linfocitos B crónicas las transposiciones en *IGK* son incluso más frecuentes, siendo detectables en el 75% (casos Igk^+) o

incluso el 95% (casos $Ig\lambda^+$) de todos los alelos de *IGK*. Por definición, las transposiciones *Vk-Jk* funcionales se encuentran en al menos un alelo en leucemias de linfocitos B $Ig\kappa^+$; el segundo alelo no codificante está en configuración en la línea germinal o inactivado por la recombinación *Vk-Kde* (8% de alelos) o intrónRSS-*Kde* (8% de alelos). Las transposiciones *Kde* son frecuentes en leucemias de linfocitos B $Ig\lambda^+$ (~85% de alelos), con un ligero predominio de las recombinaciones intrónRSS-*Kde* sobre las transposiciones *Vk-Kde*. Esto implica que virtualmente todas las leucemias $Ig\lambda^+$ contienen una transposición *Kde*, mientras que son relativamente raros los acoplamientos *Vk-Jk* potencialmente funcionales^{24, 75}. Diversos estudios han demostrado que el uso del segmento génico *Vk* es casi idéntico entre varias poblaciones normales y malignas de linfocitos B y refleja ampliamente el número de segmentos génicos disponibles dentro de cada familia. Tanto en las transposiciones *Vk-Jk* como en las *Vk-Kde*, predominan los segmentos génicos *Vk* procedentes de las primeras cuatro familias (*Vk1* a *Vk4*). Parece que el uso de los genes *Vk2* es mayor en la leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B precursores que en las linfoproliferaciones de linfocitos B más maduros o linfocitos B normales. Notablemente, la agrupación *Vk* invertida alejada se utilizó rara vez en transposiciones *Vk-Jk*, mientras que los segmentos pseudogénicos *Vk* nunca estuvieron implicados, tampoco en los casos $Ig\lambda^{+76}$. Poco se sabe sobre el uso de los segmentos génicos *Jk*, pero los escasos datos muestran que *Jk1*, *Jk2* y *Jk4* son los segmentos génicos *Jk* más frecuentemente utilizados⁷⁵.

Las transposiciones *Vk-Jk* pueden ser una diana para PCR complementaria para aquellos tipos de proliferaciones de linfocitos B en los que las hipermutaciones somáticas pueden obstaculizar la amplificación de la diana V_H-J_H , pero las recombinaciones que implican *Kde* son probablemente incluso más valiosas. La delección de secuencias intercaladas en el intrón *Jk-Ck* da como resultado la eliminación del potenciador de *IGK*, que se piensa que es esencial para que se produzca el proceso de hipermutación somática. Se supone por tanto que las transposiciones que implican *Kde* están libres de hipermutaciones somáticas y por tanto deben ser amplificadas con bastante facilidad.

Diseño de cebadores

Utilizando el programa informático OLIGO 6.2, se diseñaron seis cebadores para *Vk* específicos de familia para reconocer los diferentes segmentos génicos *Vk* de las siete familias *Vk*; los segmentos génicos de la familia *Vk-6* estaban abarcados por el cebador de familia *Vk1* (Figura 5B). En el caso de las familias *Vk1*, *Vk2* y *Vk3* relativamente grandes, sólo se tomaron en consideración los segmentos génicos *Vk* funcionales, puesto que los segmentos pseudogénicos menos homólogos complicaban demasiado el diseño óptimo de los cebadores. Los cebadores para *Vk* específicos de familia se diseñaron para ser utilizados en combinación con un conjunto de dos cebadores para *Jk* (*Jk1-4*, que abarcan los cuatro primeros segmentos *Jk* y *Jk5* que abarca el quinto) o un cebador para *Kde* (Figura 5B). Para el análisis de transposiciones *Kde* se preparó un cebador directo adicional que reconocía una secuencia aguas arriba del intrónRSS. Con el fin de mostrar las mínimas asociaciones cruzadas a otros segmentos de la familia *Vk* y ser útiles todavía en reacciones múltiples, los diversos cebadores no se podrían diseñar en posiciones similares con relación a los elementos de las RSS (Figura 5B). Los tamaños de los productos de PCR esperados de las uniones *Vk-Jk* varían desde ~115-135 pb (para las uniones *Vk7-Jk*) hasta ~280-300 pb (transposiciones *Vk2-Jk*). Para las transposiciones *Kde*, los intervalos de tamaños de los productos son desde ~195-215 pb (*Vk7-Kde*) hasta ~360-380 pb (*Vk2-Kde*), mientras que los productos de intrónRSS-*Kde* son de ~275-295 pb.

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 transposiciones *Vk-Jk* o *Vk-Kde*/intrónRSS-*kde* clonales exactamente definidas. Las muestras de pacientes con uniones *Vk-Jk* implicaban en su mayoría leucemias crónicas de linfocitos B, que fueron seleccionadas, además, sobre la base de una alta carga tumoral para la detección fácil y sensible de la transposición implicada. Desafortunadamente, las muestras de referencia clonales no estaban disponibles para todas las dianas *Vk-Jk*; especialmente los tipos más raros de transposiciones que implicaban *Vk5*, *Vk7* y/o *Jk5* no estaban representadas en las series de muestras de referencia. Para estas dianas y también para las dianas para las que las muestras de referencia clonales estaban disponibles, se emplearon muestras de DNA agmudalino o de MNC de controles sanos, en las que se observaron realmente productos de PCR de los tamaños esperados correctos. La única excepción fue la combinación de cebadores para *Vk7/Jk5*; más probablemente las uniones *Vk7-Jk5* son tan raras en los linfocitos B normales, que estos productos de PCR eran difícilmente detectables o no lo eran en las amígdalas. Los productos transpuestos comprendidos en los intervalos de tamaño esperados podían ser detectados en todas las muestras de referencia clonales, en condiciones de PCR estándares utilizando $MgCl_2$ 1,5 mM y bien sea el tampón ABI de referencia o bien sea tampón ABI II. Sin embargo, en algunos casos se observó una débil amplificación de transposiciones *Vk-Jk* particulares con otros conjuntos de cebadores para la familia *Vk/Jk*, debido a la ligera asociación cruzada del cebador para *Vk3* a unos cuantos segmentos génicos *Vk1*. Además, en unas cuantas de las muestras de referencia clonales se observaron productos clonales de PCR claros adicionales, con otros conjuntos de cebadores para *Vk/Jk* o incluso *Vk/Kde* e intrónRSS/*Kde*; en la mayoría de las muestras esto podía explicarse por la configuración completa de los dos alelos de *IGK*. Esta aparición de múltiples productos de PCR clonales ilustra la complejidad de los patrones de las transposiciones en *IGK* en una muestra de células dada, causada principalmente por la aparición potencial de dos transposiciones clonales en un alelo (*Vk-Jk* e intrónRSS-*Kde*). Esta complejidad no impide, sino que apoya la discriminación entre policlonalidad y monoclonalidad.

No se observó asociación no específica de los cebadores para ninguno de los conjuntos de cebadores para *Vk-Jk* y

Vk-Kde/intrónRSS-Kde, cuando se utiliza el DNA de células HeLa como control específico que no es molde. Diluciones seriadas de DNA de las muestras de referencia clonales en el DNA amígdalino dieron como resultado en general sensibilidades de 5-10% para las transposiciones Vk-Jk y 1-10% para las transposiciones Vk-Kde, usando análisis de HD. En general, las sensibilidades en el análisis por GS fueron aproximadamente una mejor etapa de dilución. La diana solo ligeramente problemática era la diana intrónRSS-Kde que sólo podía ser detectada hasta la dilución seriada del 10% en la muestra del paciente empleada. Esto es causado probablemente por el hecho de que los transposiciones de intrónRSS-Kde son abundantes en DNA de linfocitos B agmídalinos tanto $Ig\kappa^+$ como $Ig\lambda^+$, que se utilizaron en los experimentos de dilución.

La estrategia múltiple que se eligió después de probar varios enfoques consistía en dos tubos de reacción de PCR múltiples diferentes. En el tubo con Vk-Jk (tubo A) todos los cebadores para Vk se combinaron con ambos cebadores para Jk, mientras que el tubo B contenía todos los cebadores para Vk más el cebador para intrónRSS en combinación con el cebador inverso para Kde (Figura 5B). Todas las muestras de referencia clonales antes mencionadas fueron detectables usando este método múltiple de dos tubos. Hay que destacar la observación de que en las muestras de amígdalas no clonales se detectó una banda aparentemente clonal predominante de ~150 pb usando el análisis de tubo A múltiple con Vk-Jk. La presencia de este producto, que se observa en el análisis de HD, pero especialmente en el análisis por GS, puede explicarse por la heterogeneidad limitada de regiones de unión Vk-Jk que conducen a una alta frecuencia de productos de un tamaño medio de ~150 pb. Además, en algunas muestras se observó en el tubo B algunas veces una banda débil no específica de 404 pb. Aunque las sensibilidades fueron por término medio ligeramente mejores en otros enfoques múltiples en los que los cebadores para Vk estaban más subdivididos en tubos múltiples, la viabilidad de tener sólo dos tubos para analizar todas las transposiciones en *IGK* pertinentes, finalmente, era el argumento más importante para la elección de la estrategia múltiple de dos tubos como se indica en la Figura 5B. Los límites de detección para las diversas dianas clonales en el enfoque múltiple de dos tubos fueron ~10% para la mayoría de los transposiciones Vk-Jk clonales (Vk1-Jk4, Vk2-Jk4, Vk3-Jk4) procedentes de muestras informativas con una alta carga tumoral; varias de las dianas Vk-Kde fueron detectables con una sensibilidad todavía razonable de ~10%, pero algunas otras muestras que contenían dianas Vk2-Kde, Vk5-Kde, y también intrónRSS-Kde mostraron límites de detección superiores a 10%. Incluso el uso de 500 ng de DNA diluido en serie en lugar de 100 ng difícilmente dio como resultado mejores sensibilidades, mientras que las diluciones seriadas de DNA de MNC tampoco afectaron a los límites de detección. Sin embargo, los límites de detección de diluciones seriadas en agua de DNA de referencia eran todos del orden de 0,5-1%, lo que muestra que es bueno el ensayo por PCR de *IGK* múltiple tal cual. Es importante tener en cuenta que las potenciales poblaciones de células clonales en los ganglios linfáticos o en la sangre periférica en la práctica tendrán que ser detectadas dentro de un fondo de células policlonales, que puede obstaculizar la detección de clonalidad sensible, especialmente en muestras con un fondo relativamente alto de linfocitos B policlonales.

Resultados de la fase de ensayo general

[0103] Después del ensayo inicial en los cuatro laboratorios implicados en el diseño de cebadores se evaluó adicionalmente el ensayo de PCR múltiple de *IGK* desarrollado utilizando 90 muestras definidas por transferencia de Southern. Cada muestra se analizó en paralelo por análisis de HD (cinco laboratorios) y por GS (dos laboratorios); en otros cuatro laboratorios todas las muestras fueron analizadas por ambas técnicas. Considerados en conjunto, estaban disponibles por muestra y por tubo ocho resultados de análisis de HD y cinco por GS. En la gran mayoría de las muestras >80% de los laboratorios produjo resultados idénticos, es decir, bandas/picos clonales o manchas/curvas policlonales en uno o ambos tubos. Sin embargo, en nueve muestras (~10%) se encontraron discordancias entre los laboratorios, que se mantenían después de análisis repetitivos de estas muestras. Un análisis más detallado reveló que en al menos seis casos los tamaños de aproximadamente 150 y 200 pb de los productos clonales en el tubo A no podían ser discriminados fácilmente de los productos policlonales de aproximadamente el mismo tamaño. Esta es una dificultad inherente especialmente en el análisis de Vk-Jk, que es causada por la heterogeneidad de unión relativamente limitada de estas transposiciones. En dos muestras los resultados del tubo B fueron sin embargo tan claros en todos los laboratorios con ambas técnicas que, de hecho, no hubo discrepancia. En una muestra (ES-8) un producto grande de alrededor de 500 pb parecía ser la razón de los resultados discrepantes entre laboratorios; más secuenciación reveló que la amplificación que comienza desde el segmento Jk aguas abajo causaba la producción de un producto de PCR extendido, Vk1-Jk3-Jk4.

Cuando se evaluaron los resultados del análisis de HD y por GS, pareció que estos eran bastante comparables, aunque en general el número de laboratorios que mostraron resultados idénticos fue ligeramente mayor por análisis de HD, en comparación con por GS (Figuras 5C y D). Notablemente, en una muestra (GBS-4) el análisis de HD reveló un producto claro en ambos tubos, mientras que el análisis por GS sólo mostró policlonalidad. La clonación del producto de HD mostró un producto de PCR, Vk3-Vk5 peculiar, que no se observó en ninguna de las otras muestras; la configuración Vk-Vk de este producto explicaba por qué no se detectó con los cebadores para Jk marcados en el análisis por GS.

La comparación de los resultados de PCR con los datos de transferencia de Southern (SB) no reveló discrepancias entre SB y PCR en las neoplasias malignas de linfocitos B pre-foliculares y las muestras de B-CLL; en línea con la presencia de bandas de *IGK* transpuestas en el análisis por SB, todas las muestras contenían productos de PCR de *IGK* clonales. Por el contrario, las 25 muestras de neoplasias malignas de linfocitos B (pos)foliculares carecían de

5 productos de PCR de *IGK* clonales en cuatro casos de linfoma de células grandes difusas (abreviadamente DLCL por la expresión inglesa *Diffuse Large-Cell Lymphoma*) (ES-5, PT-13, PT-14, FR-7) y una leucemia de células plasmáticas (abreviadamente PC por la expresión *Plasma Cell*) (NL-19) con ambas técnicas y en otro caso de DLCL (GBS-4, véase antes) con análisis por GS solo. En todos los casos, esto fue causado muy probablemente por
 10 hipermutación somática. Interesantemente, en un caso de linfoma centrofolicular (abreviadamente FCL por la expresión inglesa *Follicle Center Lymphoma*) (NL-4), se encontró un producto de PCR clonal, mientras que el análisis por SB reveló una banda en la línea germinal en el caso de los genes *IGK* y bandas clonales débiles por análisis de *IGH*. En todos los 18 casos de neoplasia maligna de linfocitos T y en todos los 15 casos reactivos (categoría C) se
 15 encontraron productos de PCR de *IGK* policlonales de acuerdo con los resultados de SB, con la excepción para un caso de T-NHL periféricos (FR-10). A continuación de los productos TCR I e *IGK* clonales esta muestra también mostró productos de PCR de *IGH* e *IGL* clonales, pero no transposiciones de Ig clonales en el análisis por SB, lo que refleja probablemente la presencia de un pequeño clon de linfocitos B adicional en esta muestra. Por último, en la categoría con diagnóstico difícil (D), dos muestras (GBS-10 y GBN-8) mostraron productos de PCR de *IGK* clonales, en línea con los datos de SB; sin embargo, en otras dos muestras (PT-6 y GBS-9), ambos casos de B-NHL ricas en
 20 linfocitos T, se encontraron productos de PCR de *IGK* clonales, así como productos de *IGH* y/o *IGL* clonales, pero sin pruebas de clonalidad en el análisis por SB. También esta discrepancia puede ser explicada probablemente por el pequeño tamaño del clon de linfocitos B en estas dos muestras de pacientes.

Para determinar el valor adicional de analizar el *locus* de *IGK*, los inventores compararon los resultados del análisis por PCR de *IGK* con los del análisis por PCR de *IGH*. En cinco (ES-2, NL-4, PT-8, GBN-2, ES-8) de las nueve
 25 muestras en las que no se encontraron productos de PCR de V_H-J_H clonales, se observaron fácilmente productos clonales en análisis de *IGK*. Cuando se tienen en cuenta tanto el análisis de V_H-J_H como de D_H-J_H , el análisis por PCR de *IGK* era todavía complementario al análisis por PCR de *IGH* en tres de estos casos en la detección de productos de PCR de Ig clonales.

Conclusión

25 En conclusión, basándose en las fases de ensayo inicial y general, así como en la prueba preliminar del uso de estos ensayos múltiples en series patológicamente bien definidas de linfoproliferaciones, los análisis por PCR del *locus* de *IGK* tienen un claro valor (adicional) para la detección de la clonalidad. No obstante, se debe tener cuidado con la interpretación de las bandas aparentemente clonales especialmente en el tubo A, debido a la heterogeneidad inherente de unión en *IGK* restringida. Puesto que este problema es especialmente evidente en el análisis por GS, el
 30 análisis de HD se prefiere ligeramente al análisis por GS, aunque debe advertirse que en algunos casos el análisis por GS puede facilitar la correcta interpretación de los resultados. Otro inconveniente potencial es el intervalo de tamaños relativamente grande de los productos de *IGK* transpuestos esperados, debido a las posiciones dispersas de los cebadores, y a las amplificaciones extendidas desde los segmentos génicos Jk aguas abajo. Esto implica que se recomienden operaciones largas para el análisis por GS. Por último, la complejidad inherente de transposiciones
 35 múltiples en el *locus* de *IGK* (transposiciones V_k-J_k y Kde en el mismo alelo), junto con un bajo nivel de asociación cruzada de los cebadores para V_k , puede dar como resultado en ocasiones patrones con múltiples bandas o picos, que se asemejan a la oligoclonalidad. Sin embargo, teniendo en cuenta estas consideraciones, el sistema de PCR múltiple de *IGK* de dos tubos puede ser valioso para el diagnóstico de la clonalidad basado en PCR.

Ejemplo 4. Transposiciones en los genes *IGL*

40 Fundamento

Las transposiciones en los genes *IGL* están presentes en 5 a 10% de las neoplasias malignas de linfocitos B Igk^+ y en todas las neoplasias malignas de linfocitos B $Ig\lambda^+$ ⁷⁵. Por lo tanto, las transposiciones $V\lambda-J\lambda$ representan potencialmente una diana de PCR atractiva adicional para los estudios de clonalidad para compensar resultados de PCR negativos falsos de V_H-J_H en *IGH*, causados principalmente por mutaciones somáticas. El *locus* de *IGL* abarca
 45 1 Mb en el cromosoma 22q11.2⁷⁷⁻⁷⁹. Hay 73 a 74 genes $V\lambda$ de más de 900 kb, entre los cuales 30-33 son funcionales (Figura 6A). Por homología de secuencias los genes $V\lambda$ se pueden agrupar en 11 familias y tres clanes. Los miembros de la misma familia tienden a estar agrupados en el cromosoma. Los genes $J\lambda$ y $C\lambda$ están organizados en tándem con un segmento $J\lambda$ que precede a un gen $C\lambda$. Típicamente hay 7 segmentos génicos $J-C\lambda$, de los cuales $J-C\lambda 1$, $J-C\lambda 2$, $J-C\lambda 3$ y $J-C\lambda 7$ son funcionales y codifican los cuatro isotipos $Ig\lambda$ (Figura 6A)^{80,81}. Sin embargo, existe una variación polimórfica en el número de segmentos génicos $J-C\lambda$, ya que algunos individuos pueden llevar hasta 11 de ellos, debido a una amplificación de la región $C\lambda 2-C\lambda 3$ ^{82,83}.

Varios estudios han demostrado que está sesgada la gama de genes *IGL* de linfocitos B tanto normales como malignos^{48,49,84,85}. Por lo tanto, más del 90% de los genes $V\lambda$ utilizados por los linfocitos B normales pertenecen a las familias $V\lambda 1$, $V\lambda 2$ y $V\lambda 3$, que comprenden 60% de los genes funcionales. Además, tres genes (2-14, 1-40, 2-8)
 55 representan alrededor de la mitad de la gama expresada. Mientras que los linfocitos B normales utilizan los segmentos génicos $J-C\lambda 1$, $J-C\lambda 2$ y $J-C\lambda 3$ en proporciones aproximadamente equivalentes, los linfocitos B neoplásicos tienden a usar predominantemente los segmentos génicos $J-C\lambda 2$ y $J-C\lambda 3$ ⁴⁹. En los linfocitos B tanto normales como malignos se utiliza muy raramente (1% el $J-C\lambda 7$). Sin embargo, este último hallazgo fue cuestionado por un estudio en una sola célula de los linfocitos normales que encontró que más de la mitad de las transposiciones
 60 empleaban los segmentos génicos $J-C\lambda 7$ ⁸⁶. Por el contrario, para ratones hay una cierta diversidad de unión debido

a la actividad de exonucleasa y la adición de nucleótidos N en transposiciones en los genes *IGL* humano^{82,85-87}. Sin embargo, es mucho menos extensa que la del locus de *IGH* y resulta un número de transposiciones del acoplamiento directo de los segmentos génicos $V\lambda$ y $J\lambda$ en la línea germinal. No obstante, el locus de *IGL* podría representar un locus complementario alternativo al de *IGH* para estudios de la clonalidad de linfocitos B.

5 Diseño de cebadores

Teniendo en cuenta la gama de $V\lambda$ sesgada, los inventores eligieron amplificar sólo transposiciones que utilizaran los segmentos génicos $V\lambda 1$, $V\lambda 2$ y $V\lambda 3$. Se diseñaron un único cebador de consenso que reconociera tanto los segmentos génicos $V\lambda 1$ como $V\lambda 2$, así como un cebador para $V\lambda 3$, en regiones de alta homología entre miembros de la misma familia (Figura 6B). Los experimentos iniciales mostraron que trabajaron bien tanto en ensayos múltiples como por separado. De hecho, se pudo observar una asociación cruzada del cebador para $V\lambda 3$ que se hibrida con algunos de los genes $V\lambda 1$ o $V\lambda 2$ (o viceversa) cuando se usaron separadamente cebadores para $V\lambda$; sin embargo no se observó en la PCR múltiple.

Se diseñó un único cebador de consenso para los segmentos génicos $J\lambda 1$, $J\lambda 2$ y $J\lambda 3$ que tenía un desapareamiento en su porción central en comparación con cada una de las secuencias de la línea germinal. En experimentos preliminares se encontró que da mejores resultados que una combinación de cebadores para $J\lambda 1$ y $J\lambda 2$ - $J\lambda 3$ perfectamente apareados. Puesto que un solo estudio informó del uso frecuente del gen $J\lambda 7$ en linfocitos B normales⁸⁶, los inventores también diseñaron un cebador específico para $J\lambda 7$. Cuando se analizaron varias muestras de linfocitos B policlonales, los inventores casi no pudieron detectar ninguna señal en el análisis de HD, en contraste con las amplificaciones realizadas en las mismas muestras utilizando los cebadores para $J\lambda 1$, $J\lambda 2$ - $J\lambda 3$ o cebadores de consenso para $J\lambda$. Del mismo modo, los inventores no pudieron detectar ninguna transposición con este cebador cuando analizaron una colección de tumores de linfocitos B monoclonales. Basándose en estos resultados, así como en otros informes de la bibliografía⁴⁹, llegaron a la conclusión de que la alta frecuencia no confirmada de transposiciones en $J\lambda 7$ (en un solo estudio)⁸⁶ había sido causada por un obstáculo técnico y, en consecuencia, decidieron no incluir el cebador para $J\lambda 7$. El ensayo de PCR para la detección de transposiciones en los genes *IGL* en el estudio de la clonalidad, se realiza por lo tanto en un solo tubo que contiene tres cebadores (Figura 6B). Se esperaba que este único tubo detectara la gran mayoría de los transposiciones.

Resultados de la fase de ensayo inicial

El ensayo inicial de un conjunto de muestras monoclonales y policlonales mostró que podían ser muy bien diferenciadas en el análisis de HD de los productos PCR por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (Figura 6C). Se observaron transposiciones en *IGL* clonales en la región homodúplex, con uno o algunas veces dos bandas más débiles en la región heterodúplex, mientras que aparecieron transposiciones policlonales como una mancha en la región heterodúplex (Figura 6C). No se observaron bandas no específicas. Debe señalarse que, debido al tamaño limitado de la región de unión, es extremadamente difícil distinguir transposiciones policlonales de monoclonales realizando un desplazamiento en un gel de poliacrilamida simple sin realizar una formación de heterodúplex. Junto a esta línea, el análisis de productos de PCR por GS demostró ser menos directo (Figura 6C). Mientras que las transposiciones monoclonales fueron claramente identificadas, el patrón de transposiciones policlonales tenía un aspecto oligoclonal debido a la diversidad de unión limitada. La interpretación fue más difícil, particularmente para distinguir los casos policlonales de aquellos casos con una población de linfocitos B clonales de menor importancia en un fondo de linfocitos B policlonales. Por lo tanto, los inventores recomendaron el análisis de HD como el método de elección para analizar transposiciones en los genes *IGL*.

La sensibilidad del ensayo, realizado en varios casos, demostró que era aproximadamente 5% (2,5% - 10%) cuando la dilución de DNA del tumor se hizo en PB-MNC y aproximadamente 10% (5% - 20%) cuando se diluyó en DNA de los ganglios linfáticos.

Resultados de la fase de ensayo general

Se evaluó el ensayo por PCR de *IGL* en un solo tubo en las serie de 90 proliferaciones linfoides definidas por transferencia de Southern. Este ensayo fue realizado por nueve laboratorios, cuatro HD solamente por análisis de, uno sólo por análisis por GS, y cuatro usando ambas técnicas. En 19 casos se detectaron transposiciones en genes *IGL* clonales. En 15 de ellos se obtuvo más de 70% de concordancia en los nueve laboratorios. En cuatro casos se obtuvo menos de 70% de concordancia, lo que podía ser explicado por transposiciones en genes *IGL* clonales de menor importancia en tres de ellos (ES-12, GB-10 y FR-10). Esta discordancia en el cuarto caso (PT-11) permanece sin explicación, particularmente debido a que no se detectaron transposiciones en genes *IGL* por transferencia de Southern. Como conclusión del ensayo inicial, la interpretación del análisis por GS era más difícil que la del análisis de HD, especialmente en el caso de poblaciones clonales de menor entidad. De estos 19 casos de genes *IGL* clonales, 17 fueron proliferaciones de linfocitos B (16 de linfocito B maduros y una de linfocitos B precursor). Un caso (ES-12) correspondía a la enfermedad de Hodgkin y otro (FR-10) a un T-NHL. Ambos tenían solamente una transposición en los genes *IGL* clonales de menor entidad, y FR-10 también mostraban una transposición en los genes *IGL* clonales.

La comparación con los datos de la transferencia de Southern mostró algunas discrepancias. Seis casos con

transposiciones en los genes *IGL* clonales por PCR parecían policlonales por análisis de transferencia de Southern. Tres de ellos (PT-6, ES-12, FR-10) correspondían a poblaciones clonales de menor entidad que pueden haber estado por debajo del nivel de sensibilidad de la técnica transferencia de Southern. En los otros tres casos (NL-19, ES-1, PT-11) puede haber desaparecido una banda clonalmente transpuesta por el patrón de transposición bastante complejo del locus de *IGL* en la transferencia de Southern^{26,49}. Por el contrario, el ensayo de PCR no detectó transposiciones clonales que fueron observadas por el análisis por transferencia de Southern en dos casos (GBS-6, FR-5). Sin embargo, estos eran linfomas foliculares en los que un alto grado de hipermutaciones somáticas puede haber impedido la asociación de cebadores para los genes *IGL*.

Conclusión

En conclusión, un ensayo de PCR de un solo tubo para la detección de transposiciones en los genes *IGL* que empleaba sólo tres cebadores (Figura 6B) permite detectar la gran mayoría de transposiciones en los genes *IGL* (las transposiciones de los genes $V\lambda 1$, $V\lambda 2$ y $V3$). El análisis de heterodúplex (HD) es el método analítico preferido, aunque se puede utilizar el análisis por *GeneScan* (GS), pero se recomienda máxima precaución para evitar la sobre-interpretación de clonalidad debido a la diversidad de unión limitada.

15 Ejemplo 5: Transposiciones en los genes *TCRB*: $V\beta$ - $J\beta$, $D\beta$ - $J\beta$

Fundamento

El análisis molecular de los genes *TCRB* es una herramienta importante para la determinación de la clonalidad en proliferaciones sospechosas de linfocitos T. Las transposiciones en genes *TCRB* se producen no sólo en casi todas las neoplasias malignas de linfocitos T maduros, sino también en aproximadamente el 80% de las leucemias linfoblásticas agudas de linfocitos T (T-ALL) negativas a CD3 y el 95% de las T-ALL positivas a CD3²⁸. Las transposiciones en *TCRB* no se limitan a neoplasias malignas de linaje T puesto que aproximadamente un tercio de precursor-B-ALL aloja los genes *TCRB* transpuestos³⁰. Su frecuencia es mucho menor (0 a 7%) en la proliferación de linfocitos B maduros²¹.

El locus de *TCRB* humano se encuentra en el brazo largo del cromosoma 7, en la banda 7q34 y abarca una región de 685 kb. Por el contrario, para los locus de *TCRG* y *TCRD* la agrupación de genes de la región V del locus *TCRB* es mucho más compleja (Figura 7A)¹. Contiene alrededor de 65 elementos génicos $V\beta$ para los que se utilizan dos nomenclaturas diferentes: una resumida por Arden et al.,⁵⁰ sigue la designación del gen de Wei et al.,⁸⁸ y agrupa los genes $V\beta$ en 34 familias. La nomenclatura alternativa propuesta por Rowen et al.,⁵¹ subdivide en 30 subgrupos el gen $V\beta$ y más tarde fue adoptada por IMGT, la base de datos internacional *ImMunoGenTics*, <http://imgt.cines.fr> (Iniciadora y coordinadora: Marie-Paule Lefranc, Montpellier, Francia). [Lefranc, 2003 # 212; Lefranc, 2003 # 219]. Las familias mayores, $V\beta 5$, $V\beta 6$, $V\beta 8$ y $V\beta 13$ (nomenclatura de Arden) alcanzan un tamaño de siete, nueve, cinco y ocho miembros, respectivamente. Doce familias $V\beta$ contienen sólo un único miembro. En general, las familias están claramente delimitadas unas de las otras⁵⁰. En este informe los inventores siguieron la nomenclatura de Arden⁵⁰.

39-47 de los elementos génicos $V\beta$ se califican como funcionales y pertenecen a 23 familias. 7-9 de los elementos $V\beta$ no funcionales tienen un marco de lectura abierto, pero contienen alteraciones en los sitios de empalme, señales de recombinación y/o elementos reguladores. 10-16 se clasifican como pseudogenes. Además, se ha informado de una agrupación de seis genes $V\beta$ huérfanos no funcionales que está localizada en el brazo corto del cromosoma 9 (9p21)^{89,90}. Dichos genes no se detectan en los transcritos^{50,51}. Todos menos uno de los genes $V\beta$ están situados 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 locus de la región $J\beta$ se clasifican en dos familias de acuerdo con su localización genómica, no con la similitud de secuencias^{51, 88, 91}.

Debido a la gran gama codificada por la línea germinal, la diversidad combinatoria de transposiciones en genes *TCRB* es extensa en comparación con las transposiciones en *TCRG* y *TCRD*. La gama principal de las moléculas $TCR\beta$ se extiende aún más por una adición por término de 3,6 (unión V-D) y 4,6 (unión D-J) nucleótidos y la delección de por término medio de 3,6 (V), 3,8 (5' de D), 3,7 (3' de D) y 4,1 (J) nucleótidos⁵¹. La región hipervariable completa resultante de la unión de los segmentos V, D y J comprende característicamente nueve o diez codones. La variación de tamaños es limitada, puesto que 7 a 12 residuos explican más del 80% de todas las transposiciones funcionales en contraste con la amplia gama de longitudes de la región CDR3 de *IGH*⁹².

Durante el desarrollo temprano de los linfocitos T la transposición en el gen *TCRB* consta de dos etapas consecutivas: transposición de $D\beta$ a $J\beta$ y transposición de $V\beta$ a D - $J\beta$ con un intervalo de uno a dos días entre estos dos procesos⁹³. El segmento génico $D\beta 1$ puede unirse a cualquiera de los segmentos génicos $J\beta 1$ o $J\beta 2$, pero el segmento génico $D\beta 2$ generalmente se une solamente a segmentos génicos $J\beta 2$ debido a su posición en el locus del gen *TCRB*^{28,51}. Debido a la presencia de dos agrupaciones D-J consecutivas en *TCRB*, también es posible que dos transposiciones sean detectables en un alelo: una transposición $D\beta 2$ - $J\beta 2$ incompleta en *TCRB*, además de una transposición completa o incompleta en la región $D\beta 1$ - $J\beta 1$ de *TCRB*¹.

En las transposiciones de los genes *TCRB*, se observa una distribución no aleatoria de uso del segmento génico. En

individuos sanos, algunas familias de V β predominan en la gama de linfocitos T de la sangre periférica (por ejemplo V β 1-V β 5), mientras que otras solo se utilizan raras veces (por ejemplo, V β 11, V β 16, V β 18, V β 23). Parece que los valores medios de la gama V β son estables durante el envejecimiento, aunque la desviación típica aumenta en los ancianos^{13,94}. También en el timo humano dominan algunos segmentos génicos V β : los siete genes V β más prevalentes (V β 3-1, V β 4-1, V β 5-1, V β 6-7, V β 7-2, V β 8-2, V β 13-2) cubre casi la mitad de toda la gama de *TCRB* funcional⁹⁵. La representación de segmentos J también está lejos de ser uniforme. La familia J β 2 se utiliza con más frecuencia que la familia J β 1 (72% frente a 28% de transposiciones de *TCRB*)⁹⁶. En particular, la proporción de J β 2.1 es mayor de lo esperado (24%) seguido por J β 2.2 (11%) y J β 2.3 y J β 2.5 (10% cada uno)⁹⁵.

Los patrones de las transposiciones en genes *TCRB* difieren entre las categorías de las neoplasias malignas de linfocitos T. Las transposiciones V β 3-J β 1 en *TCRB* completas y los alelos transpuestos incompletamente en la agrupación D β -J β 2 de *TCRB* se observan con mayor frecuencia en T-ALL TCR $\alpha\beta$ ⁺ en comparación con T-ALL CD3⁻T-ALL TCR $\gamma\delta$ ²⁸. En el grupo total de T-ALL la región D β -J β 1 de *TCRB* está implicada con relativa frecuencia en las transposiciones en contraste con las transposiciones de los genes *TCRB* de linaje cruzado en precursor B-ALL que implica exclusivamente la región D β -J β 2 de *TCRB*^{30,73}.

El desarrollo de anticuerpos monoclonales contra la mayoría de los dominios V β ha ayudado a identificar las expansiones de la familia V β ¹³. Sin embargo, el análisis de transposiciones de genes TCR es esencial para la determinación de la clonalidad en los trastornos linfoproliferantes de los linfocitos T. Como la gama codificada por la línea germinal restringida de los locus *TCRG* y *TCRD* facilita los métodos de PCR basados en DNA, se han establecido varios métodos de PCR para la detección de transposiciones de genes *TCRG* y *TCRD*⁹⁷⁻⁹⁹. No obstante, la diversidad de unión limitada de las transposiciones de *TCRG* conduce a una alta amplificación de fondo de transposiciones similares en linfocitos T normales (Ejemplo 6). Por otro lado el gen *TCRD* está suprimido en la mayoría de las neoplasias malignas de linfocitos T maduros²¹. Por lo tanto, son necesarias técnicas de PCR para *TCRB* basadas en DNA para la determinación de la clonalidad. Además, las transposiciones de *TCRB* son de gran interés para los estudios de seguimiento de los trastornos linfoproliferantes, debido a la extensa gama combinatoria de transposiciones de *TCRB* y a que la gran región hipervariable permite una detección altamente específica de células tumorales residuales clínicamente ocultas. Sin embargo, la gama codificada por la línea germinal extensa hace que los ensayos de PCR sean más difíciles. Algunos métodos de PCR publicados usan el procedimiento consumidor de tiempo de los métodos de múltiples tubos con un panel de cebadores específico de familias o sub-familias^{96,100}. El uso de cebadores de consenso altamente degenerados limita el número de transposiciones detectables que están teóricamente cubiertas por los cebadores, porque no hay una única secuencia común de identidad suficiente que permita una amplificación fiable de todas las transposiciones posibles^{42,101,102}. Algunos ensayos publicados utilizan una PCR anidada que requiere una reacción de PCR adicional^{42,102}. Otros ensayos se centran en el análisis de los transcritos V β -D β -J β -C β de *TCRB* para limitar el número de cebadores necesarios^{16,100,103}. Sin embargo, una desventaja importante de estos métodos basados en mRNA es la necesidad de material fresco o congelado y una etapa de transcripción inversa antes de la amplificación por PCR.

Los inventores trataron de superar estas limitaciones mediante la creación de una PCR de *TCRB* basado en DNA conveniente y completamente nueva. Los inventores diseñaron múltiples cebadores para V β y J β , que cubrían todos los segmentos génicos V β y J β funcionales y que eran apropiados para combinación en reacciones de PCR múltiples. Además, el ensayo es aplicable para análisis de HD y por GS y también detecta las transposiciones D β -J β en *TCRB* incompletas con el mismo conjunto de cebadores para J β . Con el fin de evitar problemas debidos a cebamiento cruzado los inventores decidieron diseñar todos los cebadores para V β y J β en la misma región conservada de cada segmento génico.

Diseño de cebadores

Inicialmente se diseñaron un total de 23 cebadores para V β , 2 para D β (D β 1 y D β 2) y 13 para J β (J β 1.1 a 1,6 y J β 2.1 a 2,7) estando todos los cebadores para V β y J β situados en la misma región conservada de cada segmento génico V β y J β de manera que podían despreciarse los efectos de la asociación cruzada en una reacción múltiple. Además, no podrían confundirse las transposiciones V-J en *TCRB* policlonales raras con un transposición clonal incluso si no producen un patrón de picos de gaussianos completamente policlonal, debido a que los productos de PCR de todas las transposiciones posibles se encuentran en el mismo intervalo de tamaños.

Para el diseño de cebadores, se tuvieron en cuenta siempre que fue posible los pseudogenes transponibles o genes de marco de lectura abierto con alteraciones en los sitios de empalme, señales de recombinación y/o elementos reguladores o cambios de aminoácidos conservados. Sin embargo, el objetivo principal era abarcar todos los genes V β funcionales. La eficacia de cebado de cada cebador para V β se comprobó para cada gen V β usando el programa informático OLIGO 6.2. Esto condujo a cebadores que no eran estrictamente específicos de la familia V β y algunos de los cuales abarcaban segmentos génicos V β de más de una familia (Figura 7B). Puesto que los 13 cebadores para J β se asociaban al mismo segmento de cada cebador para el gen J β , la dimerización hizo necesario dividir los cebadores para J en dos tubos. Inicialmente, se planeó utilizar los cebadores en cuatro conjuntos de reacciones múltiples de la siguiente manera: todos los 23 cebadores para V β en combinación con los seis cebadores para la familia J β 1 (240-285 pb), los 23 cebadores para V β con los siete cebadores para la familia J β 2 (240-285 pb), D β 1 (280-320 pb) con los seis cebadores para J β 1 y D β 1 (280-320 pb) más D β 2 (170-210 pb) con los siete cebadores para la familia J β 2.

Resultados de la fase de ensayo inicial

Se realizó un ensayo sencillo inicial de cada posible combinación de cebadores utilizando muestras con transposiciones en *TCRB* monoclonales conocidas y controles policlonales. Se generaron productos de PCR del intervalo de tamaños esperada con diferencias en la intensidad de los productos y perfil de las señales para las muestras policlonales dependiendo de la frecuencia de uso de los distintos segmentos génicos V β y J β . Sin embargo, cuando los cebadores se combinaron en una reacción múltiple se perdieron en particular algunas transposiciones en J β 2 y se observaron en los tubos B y D productos no específicos. Además, el cebado cruzado entre los cebadores para J β 1 y J β 2 dio como resultado problemas de interpretación. Como consecuencia tuvieron que ser rediseñados los cebadores para J β 2 y tuvieron que ser transpuestas las combinaciones de cebadores en los diferentes tubos: Los cebadores para J β , J β 2.2, 2.6 y 2.7, fueron ligeramente modificados y añadidos al tubo A. La localización de los cebadores para J β 2.1, 2.3, 2.4 y 2.5 fue desplazada 4 pb aguas abajo para evitar la dimerización de los cebadores y el cebado cruzado con los restantes cebadores para J β . Sólo persistieron bandas no específicas con intensidad variable fuera del intervalo de tamaños esperada en el tubo B (bandas <150 pb, 221 pb) y el tubo C (128 pb, 337 pb) utilizando DNA molde específico. Sin embargo, debido a que todos los productos de amplificación no específicos estaban fuera de los intervalos de tamaños de los productos específicos de *TCRB*, no afectaron a la interpretación y se consideró que no eran un problema. Sin embargo, utilizando controles molde no específicos fue visible en el tubo A por análisis por GS un débil pico específico adicional de 273 pb. Este producto está suprimido por completo cuando el DNA contiene suficientes en *TCRB* transposiciones clonales o policlonales, pero pueden aparecer en muestras que comprenden un número pequeño de células linfoides. En la fase de ensayo inicial se generaron productos de PCR V-D-J relativamente débiles. Por lo tanto, los inventores optimizaron las condiciones de PCR para transposiciones VDJ completas aumentando la concentración de MgCl₂ y la cantidad de polimerasa Taq. También resultó ser muy importante el uso de cebadores altamente purificados y la aplicación del tampón ABI II en lugar del tampón de referencia ABI. Para la detección de las transposiciones D β -J β incompletas, fue finalmente posible mezclar todos los cebadores para J β en un tubo sin pérdida de sensibilidad o información. En consecuencia, el número total de reacciones múltiple podría reducirse a tres tubos.

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

Tubo A:	23 cebadores para V β y 9 cebadores para J β : J β 1.1-1.6, 2.2, 2.6 y 2.7
Tubo B:	23 cebadores para V β y 4 cebadores para J β : J β 2.1, 2.3, 2.4 y 2.5
Tubo C:	Cebadores para D β 1, D β 2 y los 13 cebadores para J β .

Como los tubos A y C contienen los cebadores para J β 1 y J β 2, el marcado diferencial de los cebadores para J β 1 y J β 2 con diferentes colorantes (TET para los cebadores para J β 1.1-1.6 y FAM para los cebadores para J β 2.1-2.7) permite la discriminación por GS del uso de J β 1 o J β 2 en las reacciones de los tubos A y C (véase la Figura 13A).

El ensayo de sensibilidad se realizó por experimentos de dilución con varias líneas celulares y muestras de pacientes con genes *TCRB* clonalmente transpuestos en MNC. Los experimentos de dilución de PCR sencilla alcanzaron generalmente niveles de sensibilidad de al menos 0,1% a 1%. Como era de esperar, la sensibilidad disminuyó en los ensayos múltiples, debido probablemente a un aumento de la amplificación de fondo. Especialmente en el análisis por GS este fondo obstaculizaba la interpretación debido a la pequeña variación de la longitud relativa de los productos de PCR de *TCRB*. No obstante, en 40 de 46 controles positivos analizados se alcanzó una sensibilidad de al menos 1% a 10% utilizando análisis de heterodúplex o por *GeneScanning* (Tabla 6).

Resultados de la fase de ensayo general

Once grupos participaron en el análisis del DNA de una serie de 90 neoplasias malignas y trastornos linfoprolifantes reactivos definidos por transferencia de Southern utilizando el protocolo múltiple de *TCRB*. Cada muestra fue analizada por HD en dos laboratorios y en seis laboratorios utilizando el análisis por GS. Otros tres laboratorios utilizaron ambas técnicas para el análisis por PCR (Figuras 7C, D y E). Esta fase de ensayos, así como la experiencia del uso de estos ensayos de PCR de *TCRB* plantearon algunas cuestiones generales sobre el protocolo que se encontraba en parte ya descrito en la fase de ensayo inicial: 1. La variación de la longitud limitada de la productos de PCR de *TCRB* puede dificultar la detección por GS de señales clonales en un fondo policlonal. 2. Sólo bandas/picos dentro del intervalo de tamaños esperado representan transposiciones clonales en el gen *TCRB*. Especialmente para el tubo A se debe incluir un DNA de control no específico para definir el pico de 273 pb específico que puede presentarse en situaciones sin competencia. 3. Es extremadamente importante utilizar cebadores altamente purificados y tampón ABI II (y no tampón de referencia ABI) para obtener buenos resultados de PCR, así como el protocolo de preparación de productos de PCR recomendado para el análisis de HD. De los 90 casos definidos por transferencia de Southern presentados, 29 fueron positivos por SB para transposiciones monoclonales en *TCRB*. 25 de estas transposiciones clonales (86%) también fueron detectables por PCR de *TCRB*. 23 transposiciones fueron reveladas por análisis por GS y de HD, dos casos más sólo por HD. Uno de los casos negativo por GS y positivo por HD (FR-9) se interpretó como monoclonal en el análisis por GS por cuatro de los nueve laboratorios implicados en la fase de ensayo 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 negativo por GS y positivo por HD presentó 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 geles de agarosa y en el análisis de HD, pero no por GS. Después de la secuenciación de DNA de este fragmento se identificó un producto de amplificación D β 1-D β 2 de *TCRB* que explicaba el producto de PCR no marcado. Cuatro casos positivos por SB (NL-15, NL-16, GBN-2 y FR-6) nunca fueron detectados por análisis por GS ni por HD, todos ellos con una neoplasia maligna linfocitoide B subyacente. Las posibles explicaciones para este fallo son transposiciones atípicas (por ejemplo, transposiciones V β -D β incompletas)^{28,104}, variaciones de secuencias de los segmentos génicos V β transpuestos⁵¹ o una falta de sensibilidad para transposiciones particulares.

62 de las muestras se consideraron policlonales por 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 usando ambos métodos. Una muestra negativa por SB (ES-14) encontrada monoclonal por análisis de HD y por GS mostró una transposición D β 2 incompleta. Para cuatro muestras se obtuvieron resultados no uniformes: una muestra fue considerada como clonal por GS, pero sólo por el 50% de los laboratorios que analizaron los productos de PCR por HD (GBS-4). Se encontraron tres muestras que producían señales clonales débiles sólo por el análisis de HD (ES-6, GBS-9 y DE-2). Los subclones transpuestos de *TCRB* que eran demasiado pequeños para ser detectados por el análisis por SB sólo pueden ser observados por la metodología de la PCR más sensible. En las neoplasias malignas de linfocitos B, las transposiciones detectadas también pueden representar expansiones clonales u oligoclonales de linfocitos T residuales¹⁰⁵. En este caso, estos productos de PCR clonales débiles no deben considerarse como prueba de un trastorno de linfocitos T clonales. Esto resalta la importancia de la interpretación de los resultados de PCR en el contexto de otras pruebas diagnósticas y el cuadro clínico de los pacientes. La determinación de PCR óptima de transposiciones en *TCRB* se obtiene por el uso combinado de análisis de HD y por GS. La sensibilidad puede diferir entre los dos métodos de detección en función del tamaño del producto de PCR clonal en comparación con la distribución de los tamaños policlonal: por un lado el análisis de HD dispersa el fondo policlonal de los productos clonales y por otro lado los productos de PCR fuera del intervalo de tamaños principal permiten una detección más sensible por GS. También, el riesgo de resultados positivos falsos se reduce por el uso combinado de análisis de HD y por GS. Además, el análisis de HD permite la detección de algunas transposiciones D β 1-D β 2 en *TCRB* atípicas adicionales que no pueden ser detectadas por análisis por GS del producto de PCR puesto que ningún cebador marcado está implicado en la amplificación. Sin embargo, el análisis por GS es, en general, el método más informativo para las muestras con una alta carga tumoral debido a que se indica el tamaño exacto del producto de PCR monoclonal, que puede ser usado para fines de monitorización y los cebadores para J β marcados diferencialmente proporcionan información adicional sobre el uso de genes J β .

Conclusión

En conclusión, el sistema de PCR múltiple *TCRB* de tres tubos proporciona un ensayo nuevo y conveniente para la determinación de la clonalidad en proliferaciones de linfocitos T sospechosas con una tasa de detección sin precedentes de alta clonalidad.

Ejemplo 6: Transposiciones en genes *TCRG*

Fundamento

Las transposiciones en genes *TCRG* hace tiempo que se utilizan para la detección por PCR de DNA de clonalidad linfocitoide y representan el "prototipo" de dianas de gama restringido. Son dianas preferentes para análisis de la clonalidad, puesto que se transponen en una etapa temprana del desarrollo linfocitoide de linfocitos T, probablemente justo después de *TCRD*¹⁰⁶, en precursores del linaje tanto TCR $\alpha\beta$ como TCR $\gamma\delta$. Están transpuestas en más del 90% de T-ALL, T-LGL y T-PLL, en 50-75% de T-NHL periféricos y fungoides de micosis, pero no en verdaderas proliferaciones de células NK. También están transpuestas en una parte importante de las ALL de linaje B, pero mucho menos en B-NHL^{1,30,73}. A diferencia de varios otros locus de Ig/TCR, la estructura genómica completa es conocida desde hace muchos años. Contiene un número limitado de segmentos V γ y J γ . Es posible la amplificación de las principales combinaciones V γ -J γ con un número limitado de cuatro cebadores para V γ y tres para J γ .

El locus de *TCRG* humano en el cromosoma 7p,14 contiene 14 segmentos V γ , de los cuales sólo diez han mostrado haber experimentado transposición (Figura 8A). La gama V γ expresada incluye sólo seis genes V γ (V γ 2, V γ 3, V γ 4, V γ 5, V γ 8 y V γ 9) pero la transposición también ocurre con los segmentos ψ V γ 7, ψ V γ 10, $\gamma\psi$ V γ 11^{107, 108}. La transposición de ψ V γ B (también conocida como V γ 12)¹⁰⁷ es tan excepcional que raramente se utiliza en las estrategias de PCR para diagnóstico. Las transposiciones de segmentos V γ pueden subdividirse en las que pertenecen a la familia V γ 1 (V γ 1: V γ 2, V γ 3, V γ 4, V γ 5, ψ V γ 7 y V γ 8; homología global > 90% y las más altas entre V γ 2 y V γ 4 y entre V γ 3 y V γ 5) y las familias de un solo miembro V γ 9, ψ V γ 10, ψ V γ 11. El locus de *TCRG* contiene cinco segmentos J γ : J γ 1.1 (J γ P1), J γ 1.2 (J γ P), J γ 1.3 (J γ 1), J γ 2.1 (J γ P2), J γ 2.3 (J γ 2), de los cuales J γ 1.3 y J γ 2.3 son altamente homólogos, como lo son J γ 1.1 y J γ 2.1¹⁰⁹.

Mientras la gama de la línea germinal de *TCRG* restringida facilita la amplificación por PCR, la diversidad de unión limitada de las transposiciones en *TCRG* complica la distinción entre productos de PCR clonales y policlonales. El locus de *TCRG* no contiene segmentos D y demuestra adiciones de nucleótidos relativamente limitadas. Por lo tanto, la longitud de la unión VJ de *TCRG* varía en 20-30 pb, en comparación con aproximadamente 60 pb para *IGH* y *TCRD*. La capacidad de distinguir transposiciones en *TCRG* clonales de policlonales depende de la complejidad de

la gama policlonal. En general, las poblaciones clonales de menor entidad que utilizan transposiciones V γ -J γ frecuentes, tales como V γ fl-J γ 1.3/2.3, corren el riesgo de ser perdidas entre la gama policlonal, mientras que las combinaciones raras se detectarán con mayor sensibilidad. Sin embargo, los linfocitos T policlonales ocasionales que demostraron transposiciones V γ -J γ raras pueden ser confundidos con una transposición clonal, debido a la ausencia de un fondo policlonal para ese tipo de transposición. Otra posible fuente de positividad falsa resulta de la presencia de TCR $\gamma\delta$ que expresa linfocitos T que demuestra transposiciones en *TCRG* "canónicas", que no demuestren N adiciones de nucleótidos. La transposición en *TCRG* canónica humana más comúnmente reconocida implica los segmentos V γ 9-J γ 1.2 y se presenta en aproximadamente el 1% de los linfocitos T de la sangre^{110,111}. Por lo tanto, es extremadamente importante analizar los productos de PCR de *TCRG* utilizando técnicas electroforéticas de alta resolución o separar los productos de PCR por criterios distintos de los basados puramente en el tamaño, con el fin de reducir el riesgo de resultados positivos falsos. También es importante ser consciente del perfil de transposiciones canónicas y las situaciones en las que se presentan más comúnmente. Las transposiciones V γ 9-J γ 1.2 canónicas, por ejemplo, se encuentran predominantemente en la sangre periférica y aumentan en frecuencia con la edad, puesto que resultan de la acumulación de linfocitos T TCR $\gamma\delta$ ¹⁹.

A diferencia de *TCRD*, *TCRG* no está suprimido en las células de linaje TCR $\alpha\beta$. Puesto que las transposiciones en *TCRG* se presentan en precursores de linaje tanto TCR $\alpha\beta$ como TCR $\gamma\delta$, su identificación no se puede utilizar para la determinación del tipo de linaje de linfocitos T. Similarmente, las transposiciones en *TCRG* se presentan en 60% de las ALL de linaje B³⁰, lo que implica que no pueden ser utilizadas para la determinación del linaje de linfocitos B frente a T en proliferaciones inmaduras. Sin embargo, dichas transposiciones ocurren con mucha menos frecuencia en los trastornos linfoproliferantes de linfocitos B maduros, incluyendo la mayoría de los B-NHL, y por lo tanto podrían ser utilizadas en combinación con los datos clínicos e inmunofenotípicos, para determinar la participación del linaje en trastornos linfoproliferantes maduros.

La gama limitada de la línea germinal permite la determinación de la utilización de los segmento V γ y J γ , ya sea por transferencia de Southern o análisis por PCR. La identificación del uso de V γ y J γ no es de interés puramente académico, puesto que se requiere amplificación específica para el análisis de MRD¹¹².

Los inventores comenzaron a desarrollar un número mínimo de estrategias múltiples para *TCRG* que mantendrían la sensibilidad y la informatividad óptima, minimizarían el riesgo de resultados positivos falsos y permitirían la identificación sencilla de V γ y J γ , incluyendo un análisis de HD o estrategias por GS monofluorescentes. Los inventores decidieron incluir cebadores para V γ que detectaran todos los segmentos transponibles distintos de ψ V γ B (ψ V γ 12), dada su rareza. Con el fin de reducir el riesgo de identificar falsamente transposiciones canónicas como productos clonales, los inventores excluyeron el cebador para J γ 1.2, ya que está implicado raras veces en neoplasias linfoides y está generalmente, aunque no siempre, asociado con una transposición en *TCRG* en el otro alelo¹¹³.

Diseño de cebadores

Los inventores desarrollaron inicialmente 3 cebadores para V γ y 2 cebadores para J γ , para ser usados en dos reacciones múltiples, como sigue: un tubo con J γ 1.3/2.3 con V γ 9 específico (160-190 pb), V γ fl de consenso (200-230 pb) y V γ 10/11 de consenso (220-250 pb) y un segundo tubo con J γ 1.1/2.1 con V γ 9 específico (190-220 pb), V γ fl de consenso (230-260 pb) y V γ 10/11 de consenso (250-280 pb). El uso de V γ fue para ser identificado por tamaño de productos de PCR por análisis de HD. No se intentó distinguir entre J γ 1.3 y J γ 2.3 o J γ 1.1 y J γ 2.1.

Resultados de la fase de ensayo inicial

Mientras que todas las combinaciones V γ -J γ dieron los perfiles esperados en una sola amplificación por PCR, la amplificación múltiple condujo a la competencia de productos de PCR mayores, con la amplificación preferente de fragmentos más pequeños, y el fallo en detectar algunas transposiciones V γ fl y V γ 10/11. Esto se complicó aún más por la formación de dímeros de cebadores significativos entre el cebador de consenso para V γ 10/11 y los cebadores para V γ fl. La competencia entre los fragmentos de diferentes tamaños y la formación de dímeros de cebadores condujo tanto a una sensibilidad como a una informatividad insatisfactorias y, por tanto, esta estrategia fue abandonada.

Los inventores razonaron que la competencia se minimizaría separando los cebadores para V γ (V γ fl y V γ 9) más frecuente usados y combinándolos con los cebadores específicos para V γ 10 y V γ 11, respectivamente. Estas últimas transposiciones son raramente utilizadas y por lo tanto minimizan la competencia entre las gamas predominantes. Por tanto, el cebador de consenso para V γ 10/11 fue reemplazado por dos cebadores específicos para V γ que generaron productos de PCR de menor tamaño (Figura 8B). Mezclando J γ 1.3/2.3 y J γ 1.1/2.1 fue posible mantener un ensayo múltiple en dos tubos que permite la identificación aproximada basada en el tamaño del producto de uso de V γ por análisis de HD y el uso tanto de J γ como V γ por análisis por GS.

El conjunto aprobado de tubos múltiples de PCR para *TCRG* con cuatro cebadores para V γ y dos cebadores para J γ incluye (Figura 8B):

Tubo A: V γ fl + V γ 10 + J γ 1.1/2.1 + J γ 1.3/2.3
 Tubo B: V γ 9 + V γ 11 + J γ 1.1/2.1 + J γ 1.3/2.3

5 La posición y la secuencia de los cebadores se muestran en la Figura 8B. Estos cebadores dieron una amplificación satisfactoria en los formatos de PCR tanto sencillo como múltiple y permitieron la detección de todas las combinaciones V γ -J γ virtualmente conocidas. La competencia entre los fragmentos mayores de PCR ya no fue observada, aunque no puede excluirse que pueda ocurrir una cierta competencia entre transposiciones V γ 9 o V γ fl si estas están presentes en una población minoritaria. La sensibilidad de la detección varió entre 1% y 10%, en función de la complejidad de la gama policlonal y la posición de la transposición clonal con relación respecto al pico gaussiano policlonal¹¹⁴. La interpretación de las transposiciones ψ V γ 11 puede ser difícil, puesto que la gama normal está extremadamente restringida, y puesto que estas transposiciones primitivas frecuentemente están presentes en subclones.

10 Debido a que el segmento V γ 4 es aproximadamente 40 pb más largo que los otros miembros V γ fl y las transposiciones en V γ 4 son relativamente comunes en células linfoides, tanto fisiológicas como patológicas, la gama policlonal puede estar sesgada hacia los fragmentos de mayor tamaño, y las transposiciones clonales V γ 4-J γ 1.3/2.3 podían teóricamente ser confundidas con las transposiciones V γ fl-J γ 1.1/2.1. La proximidad de las diferentes gamas también hace mucho más fiable la identificación de V γ y J γ si se utilizan cebadores para J γ marcados de manera diferente. Por ejemplo, se analizó el uso de un J γ 1.1/2.1 marcado con TET y un J γ 1.3/2.3 marcado con FAM en un solo centro y mostró dar resultados satisfactorios (Figura 13B). Sin embargo, es posible estimar el uso de V γ y J γ siguiendo el análisis por GS basado solo el tamaño (Figuras 8C y D).

Resultados de la fase de ensayo general

25 Dada la limitada gama de *TCRG* de la línea germinal y la diversidad de unión restringida, los linfocitos T reactivos que han sido sometidos a transposiciones en *TCRG* utilizando un solo segmento V γ y J γ con secuencias CDR3 variables que tienen longitud uniforme, migrarán como una población clonal aparente por análisis por GS. La formación de HD dispersará más fácilmente estas transposiciones y por lo tanto evitará su interpretación errónea como prueba de clonalidad linfoide. Por el contrario, el análisis por GS proporciona una mejor resolución y sensibilidad en comparación con el análisis de HD. Por estas razones, la determinación óptima de las transposiciones en *TCRG* requiere tanto el análisis de HD como por GS. Si esto no es posible, el análisis de HD solo es probablemente preferible, puesto que podría estar asociado con un riesgo de resultados negativos falsos, mientras que el análisis por GS por sí solo aumentará el riesgo de resultados positivos falsos.

30 De las 18 transposiciones en *TCRG* detectadas por transferencia de Southern en los 90 casos, 16 fueron también detectadas por PCR. La transposición V γ fl-J γ 1.3/2.3 secundaria de menor entidad detectada por transferencia de Southern en el caso oligoclonal NL-1, sólo se detectó por PCR en una proporción de laboratorios que realizaron análisis por GS. En todos los laboratorios se encontró que una transposición V γ 9-J γ 1.3/2.3 importante detectada en GBS-6 era policlonal tanto por HD como por GS y, como tal, representa probablemente un resultado negativo falso.

35 La comparación de la identificación de alelos mostró que, para todos los alelos identificados por transferencia de Southern, la identificación de V γ y J γ por PCR basada en tamaños dio resultados concordantes. Se detectaron siete transposiciones por transferencia de Southern, pero no fue posible la identificación precisa de los alelos. Seis de éstas fueron debidas al uso de J γ 1.1/2.1, lo que sugiere que la PCR permite la detección preferible de este tipo de transposición.

40 Se consideraron que setenta y dos muestras eran policlonales por transferencia de Southern. Dieciséis (22%) de éstas demostraron un total de 24 transposiciones por PCR de *TCRG*. De éstas, 13 (81%) fueron proliferaciones linfoides B. Dieciséis de las 24 transposiciones clonales eran de menor entidad, siendo detectadas en la mayoría de los laboratorios sólo 15 por GS. Merece la pena señalar que, de estas transposiciones de menor entidad, nueve (39%) implicaban el segmento ψ V γ 10 y ocho (33%) el V γ 9. No se detectaron transposiciones ψ V γ 11. No se detectaron transposiciones ψ V γ 10 por análisis de transferencia de Southern. Por lo tanto, la PCR permitió la detección más sensible de las transposiciones ψ V γ 10 clonales de menor entidad, en particular por análisis por GS. Es probable que estas transposiciones representen linfocitos residuales T, predominantemente el linaje TCR $\alpha\beta$, con una gama restringida, que pueden o no pueden estar relacionados con la neoplasia maligna linfoide B subyacente. Estos picos secundarios no deben obviamente ser interpretados como una prueba de un trastorno de los linfocitos T clonales. Esto pone énfasis en la importancia de comprender la naturaleza de las transposiciones en *TCRG* antes de utilizar este locus como una diana de PCR en el establecimiento de diagnóstico de clonalidad linfoide. En consecuencia, también es extremadamente importante para interpretar los resultados de los genes *TCRG* en su contexto clínico.

55

Conclusión

En conclusión, los dos tubos múltiples con *TCRG* permiten la detección de la gran mayoría de las transposiciones en *TCRG* clonales. El riesgo potencial de resultados positivos falsos debido a la sobre-interpretación de picos clonales de menor entidad puede ser minimizado por el uso combinado de análisis de heterodúplex y por *GeneScanning* y por la interpretación de los resultados en su contexto clínico, particularmente cuando la clonalidad evidente implicaba los segmentos $\psi V\gamma 10$ y $\psi V\gamma 11$. Deben estudiarse de forma prospectiva los méritos relativos del análisis de *TCRG* en comparación con el de *TCRB* para la detección de trastornos linfoproliferantes clonales T. Es probable que representen estrategias complementarias.

Ejemplo 7. Transposiciones en genes *TCRD*: V δ -D δ -J δ , D δ -D δ , V δ -D δ y D δ -J δ

10 Fundamento

El locus de los genes *TCRD* humanos está localizado en el cromosoma 14q11.2 entre los segmentos génicos V α y J α . La parte principal del locus de *TCRD* (D δ -J δ -C δ) está flanqueada por elementos supresores TCRD, $\psi J\alpha$ y δ REC, de tal manera que la transposición de los elementos supresores entre sí o la transposición de los segmentos génicos V α a J α causa la delección del locus intermedio de los genes *TCRD* (Figura 9A). El locus de *TRCD* codificados en la línea germinal consiste en los segmentos génicos 8V δ , 4J δ y 3D δ , de los cuales al menos cinco de los ocho segmentos génicos V δ también puede transponerse a los segmentos génicos J α ¹¹⁵. En raros casos también se pueden utilizar otros segmentos génicos V α en transposiciones en genes *TCRD*. La nomenclatura de la *World Health Organization-International Union of Immunological Societies* (WHO-IUIS)¹¹⁶ para los segmentos génicos de TCR utiliza un sistema de numeración diferente para los genes V utilizados principal o exclusivamente en las cadenas de TCR δ de los que pueden ser utilizados en las cadenas de TCR α o TCR δ . Así, en las transposiciones de *TCRD* se utilizan casi exclusivamente *TCRDV101S1* (V δ 1), *TCRDV102S1* (V δ 2) y *TCRDV103S1* (V δ 3), mientras que pueden usarse *TCRADV6S1* (V δ 4), *TCRADV21S1* (V δ 5) y *TCRADV17S1* (V δ 6) bien sea en las cadenas de TCR δ o bien sea α . En las transposiciones en TCRD se usan muy raras veces *TCRADV28S1* (V δ 7) y *TCRADV14S1* (V δ 8).

La gama codificada por la línea germinal de los linfocitos T TCR $\gamma\delta^+$ es pequeña en comparación con la de los linfocitos T TCR $\alpha\beta^+$ y la gama combinatoria es aún más limitada debido a la recombinación preferente en la sangre periférica y los linfocitos T TCR $\gamma\delta^+$. En el nacimiento, la gama de linfocitos T TCR $\gamma\delta^+$ de la sangre del cordón umbilical es amplia, sin restricciones evidentes ni expresión preferida de combinaciones V γ /V δ particulares. Durante la infancia, sin embargo, se forma sorprendentemente la gama de linfocitos T TCR $\gamma\delta^+$ de la sangre periférica de modo que en adultos dominan claramente las células V γ 9/V δ 2¹¹⁷. Ciertos estudios han mostrado que las gamas de V δ 1 y V δ 2 se van restringiendo con la edad lo que conduce a la aparición de células V δ 1⁺ y V δ 2⁺ oligoclonales en la sangre y el intestino¹¹⁸. Los linfocitos T TCR $\gamma\delta^+$ se distribuyen uniformemente en todos los tejidos linfoides humanos, pero hay una expresión preferente de segmentos V δ particulares en localizaciones anatómicas específicas. Notablemente, la mayoría de los linfocitos T TCR $\gamma\delta$ intraepiteliales que están presentes en el intestino delgado y en el colon expresan V δ 1. Similarmente, V δ 1 es expresado por los linfocitos T TCR $\gamma\delta^+$ del bazo normal, pero los linfocitos T TCR $\gamma\delta^+$ en la piel expresan el gen V δ 2.

Aunque el pequeño número de segmentos génicos V, D y J disponible para la recombinación limita la diversidad combinatoria potencial, la diversidad de unión o de CDR3 es extensa debido a la adición de regiones N, regiones P y la delección aleatoria de nucleótidos por recombinasas. Esta diversidad se extiende también por la recombinación de hasta tres segmentos D δ y, por lo tanto, hasta cuatro regiones N dentro del locus de *TCRD* transpuesto. Esta diversidad en 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 por PCR y los eventos de recombinaciones en *TCRD* se han utilizado muy ampliamente como marcadores clonales, tanto en la leucemia linfoblástica aguda (ALL) de linfocitos T como B^{119,120}. El locus de *TCRD* es el primero de todos los locus de TCR para transponerse durante la ontogenia de linfocitos T. El primer evento es una transposición D δ 2-D δ 3, seguida por una transposición V δ 2-(D δ 1-D δ 2)-D δ 3, y finalmente la transposición V δ -D δ -J δ . Las transposiciones inmaduras (V δ 2-D δ 3 o D δ 2-D δ 3) se presentan en el 70% de precursor B-ALL (y por lo tanto el linaje no está restringido), mientras que hay un predominio de transposiciones maduras que comprenden D δ 2-J δ 1 incompleta y V δ 1, V δ 2, V δ 3 a J δ 1 completas encontradas en T-ALL^{23,121}. Por lo tanto, se pueden utilizar conjuntos de cebadores específicos para identificar diferentes tipos de transposiciones completas e incompletas que corresponden a diferentes tipos de ALL¹²².

Las T-ALL de TCR $\gamma\delta^+$ forman un subgrupo relativamente pequeño de ALL, lo que representa 10-15% de las T-ALL, pero aún así sólo constituye el 2% de todas las ALL. Las transposiciones V δ 1-J δ 1 predominan en las T-ALL de TCR $\gamma\delta^+$; curiosamente V δ 1 nunca se encuentra en combinación con segmentos J δ distintos de J δ 1^{15,20}. Otras recombinaciones se presentan en menos del 25% de los alelos. Además, las cadenas de V δ 1-J δ 1-C δ están casi siempre unidas por disulfuro a las familias de genes V γ I o V γ II recombinadas a J γ 2.3-C γ 2. Dicho uso de los genes está de acuerdo con el origen tímico inmaduro de estas células leucémicas.

La mayoría de los linfomas de linfocitos T expresan TCR $\alpha\beta$ mientras que la minoría expresa TCR $\gamma\delta$ y comprenden varias entidades distintas. Los linfomas de linfocitos T periféricos (abreviadamente PTCL por la expresión inglesa *Peripheral T Cell Lymphomas*) que expresan TCR $\gamma\delta$ comprenden 8-13% de todos los PTCL y se han documentado

recombinaciones V δ 1-J δ 1, así como otras V δ a J δ 1^{123,124}. El linfoma de linfocitos T $\gamma\delta$ hepatoesplénicos proceden de linfocitos T TCR $\gamma\delta$ esplénicos que normalmente expresan V δ 1. Es una entidad poco frecuente que exhibe características clínico-patológicas distintivas y el análisis de uso de genes ha indicado transposiciones V δ 1-J δ 1 clonales asociadas con estos linfomas¹²⁵. Por otra parte, el raro tipo de linfomas de linfocitos T TCR $\gamma\delta$ ⁺ cutáneos expresa V δ 2 y por lo tanto parece representar una expansión clonal de linfocitos T TCR $\gamma\delta$ ⁺ que normalmente residen en la piel¹²⁶. Otras proliferaciones de TCR $\gamma\delta$ clonales incluyen proliferaciones de linfocitos granulares grandes (LGL) CD3⁺ TCR $\gamma\delta$ ⁺ que comprenden aproximadamente 5% de todos LGL CD3⁺ y frecuentemente muestran transposiciones V δ 1-J δ 1¹²⁷.

El desarrollo de anticuerpos monoclonales para regiones de marco de TCR $\gamma\delta$ y más recientemente para segmentos génicos V δ específicos ha ayudado a identificar poblaciones de linfocitos T TCR $\gamma\delta$ ⁺ por análisis de citometría de flujo¹⁵, pero todavía se requieren estudios de clonalidad por PCR para identificar si estas poblaciones representan expansiones clonales o policlonales¹²⁸.

Diseño de cebadores

Los segmentos génicos de *TCRD*, que consisten en ocho segmentos génicos V δ , cuatro J δ y tres D δ , muestran poca o ninguna homología entre sí y por tanto se diseñaron cebadores específicos para cada segmento que no se asociaran cruzadamente con otros segmentos génicos. El uso de los segmentos génicos V δ 7 y V δ 8 se consideró demasiado raro para justificar la inclusión de cebadores para estos segmentos y por tanto, siguiendo las directrices generales para el diseño de cebadores, se diseñaron un total de 16 cebadores: para 6 segmentos génicos V δ , 4 segmentos génicos J δ y los extremos 5' y 3' de los 3 segmentos génicos D δ (Figura 9B). Todos los cebadores fueron diseñados para usar juntos múltiples en cualquier combinación, pero originalmente se planificó tener un tubo (A) con todos los cebadores para V y todos los cebadores para J que amplificarían toda las transposiciones V (D) J completas y un segundo tubo (B) con los cebadores para V δ 2, D δ 2-5', D δ 3-3' y J δ 1 para amplificar las transposiciones parciales importantes (V δ 2-D δ 3, D δ 2-D δ 3 y D δ 2-J δ 1). Juntos estos tubos deben amplificar 95% de las transposiciones conocidas. Los otros cebadores (para D δ 1-5', D δ 3-5', D δ 1-3' y D δ 2-3') podrían ser utilizados para amplificar otras transposiciones D8-J8, V δ -D δ o D δ -D δ , pero siempre se intentó que fueran opcionales.

Resultados de la fase de ensayo inicial

Se analizaron todas las combinaciones de pares de cebadores utilizando DNA policlona (amigdalino y MNC). La mayoría dieron productos del tamaño esperado, pero algunos (D δ 1-5', D δ 1-3' y D δ 2-3') dieron productos no visibles en combinación con cualquier otro cebador. Los transposiciones que implican estas regiones de cebadores son probablemente extremadamente raras por lo que estos, y D δ 3-5', fueron excluidos de los ensayos posteriores. Se analizaron inicialmente casos clonales para las seis principales transposiciones (V δ 1-J δ 1, V δ 2-J δ 1, V δ 3-J δ 1, D δ 2-D δ 3, V δ 2-D δ 3 y D δ 2-J δ 1) en PCR en un solo tubo y luego en tubos múltiples A y B (véase antes). Diluciones en serie de DNA clonal en DNA policlona (amigdalino o MNC) mostraron sensibilidades de detección de al menos 5% en todos los casos. Sin embargo, en los casos clonales con transposiciones bialélicas, que se detectaron claramente en las reacciones de PCR en un solo tubo, el segundo alelo, por lo general mayor, frecuentemente no se amplificaba en tubos múltiples. Además, se encontró, usando un conjunto diferente de casos clonales, que varias de las transposiciones V δ 2-J δ 1 no se amplificaban. Se identificó posteriormente un sitio polimórfico en la posición del cebador para V δ 2 original¹²⁹; la frecuencia de este polimorfismo en la población general no se conoce, y por tanto este cebador se volvió a diseñar para una nueva región del segmento génico V δ 2, se volvió a analizar y se encontró que se amplificaba en todos los casos. El problema con el fallo de amplificar el segundo alelo fue superado aumentando la concentración de MgCl₂ desde 1,5 mM hasta 2,0 mM.

Los inventores analizaron también la posibilidad de combinar los dos tubos en una sola reacción múltiple. Se analizaron doce casos clonales, que tenían un total de 21 transposiciones de genes entre ellos. Se usó un solo tubo múltiple que contenía 12 cebadores (6 para V δ , 4 para J δ , uno para D δ 2-5' y uno para D δ 3-3') con tampón de referencia ABI y MgCl₂ 2,0 mM para amplificar todos los casos. Todas las transposiciones de genes fueron detectadas realmente con una sensibilidad de 0,5-10% por análisis de HD cuando se diluyeron en DNA de MNC policlona (Tabla 7). El único problema con la combinación de todos los cebadores para *TCRD* en un único tubo fue la aparición de una banda no específica a aproximadamente 90 pb en todas las amplificaciones, la cual no estaba presente cuando se usaron los dos tubos múltiples separados. Puesto que la banda estaba fuera del intervalo de tamaños de los productos de *TCRD* y no interfería con la interpretación, no se consideró un problema.

Resultados de la fase de ensayo general

El ensayo de las 90 muestras definidas por transferencia de Southern en diez laboratorios planteó algunas cuestiones generales sobre el protocolo para *TCRD*:

La interpretación de algunos resultados de análisis por GS fue difícil. Debido al gran intervalo tamaño de los productos para el locus de *TCRD*, no hay una distribución gaussiana clásica para muestras policlonales (véase la Figura 9C) y esto, unido a la escasa utilización de *TCRD* en muchas muestras significó que en algunos casos fue difícil determinar si una muestra era policlona o clonal. El mismo problema no se planteó con el análisis de HD y por tanto la recomendación es que el análisis por GS sólo debe utilizarse para *TCRD*

con extremo cuidado y conocimiento de los problemas potenciales.

La banda no específica de 90 pb fue bastante intensa en algunos laboratorios, pero no tanto en otros. Parecía que era más débil cuando se usaba el tampón II en lugar de tampón de referencia (confirmado por un ensayo posterior) y era también sensible a la concentración de $MgCl_2$, siendo cada vez más intensa a medida que aumentaba la concentración de $MgCl_2$. Este producto ha sido ahora secuenciado y se encontró que era un gen no relacionado que utiliza los cebadores para Dδ2 y Jδ3.

Los resultados del ensayo general de las 90 muestras definidas por transferencia de Southern mostraron que la concordancia global de todos los grupos de PCR que se analizaron era muy alta (95%). De los 90 casos, seis fueron positivos por transferencia de Southern para transposiciones clonales de *TCRD*, cinco de las cuales resultaron ser clonales por PCR. El caso restante (DE-10, un T-ALL con alta carga tumoral) se encontró que era policlonal por todos los laboratorios. De los 84 casos negativos por transferencia de Southern, se encontró que 75 eran policlonales por PCR, se encontró que cuatro eran clonales y los cinco casos restantes mostraron discordancia entre los resultados por GS y por HD. De los casos clonales, dos (DE-2 y GBS-9) eran B-NHL rico en linfocitos T con carga tumoral presumiblemente baja, por lo que los resultados pueden reflejar el aumento de la sensibilidad de la PCR sobre la transferencia de Southern. Los otros dos casos clonales (GBS-15 y ES-7) tuvieron alta carga tumoral. De los cinco casos, que mostraron discrepancia entre los resultados por GS y por HD, uno (NL-1) fue un caso oligoclonal difícil, que causó problemas para varios otros diversos locus. Se encontró que los cuatro restantes eran policlonales por HD y clonales por GS. En tres de los casos (NL-13, NL-15 y NL-18) esto puede reflejar la mayor sensibilidad del análisis por GS sobre HD, pero el caso restante (PT-1, un ganglio linfático reactivo) puede ser atribuido a "pseudoclonalidad" en el análisis por GS, debido a la gama limitada del uso de *TCRD* en algunas muestras.

Conclusión

En conclusión, el protocolo recomendado para la detección de transposiciones en los genes *TCRD* es un ensayo en un solo tubo que contenga 12 cebadores para la detección de todas las principales transposiciones Vδ (D)Jδ, Vδ-Dδ, Dδ-Dδ y Dδ-Jδ usando el tampón II y $MgCl_2$ 2,0 mM para asegurar máximas 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 causados por el uso limitado de *TCRD* en algunas muestras. Sin embargo, el uso de *GeneScanning* multicolor (véase la Figura 13C) puede ser útil en el reconocimiento rápido de los diferentes tipos de transposiciones en genes *TCRD* completas e incompletas en los diferentes tipos de ALL. Teniendo en cuenta estas limitaciones, *TCRD* puede ser, no obstante, una diana valiosa para las leucemias de linfocitos T más inmaduros, así como proliferaciones de linfocitos T $TCR\gamma\delta^+$.

Ejemplo 8. t(11;14) con la transposición *BCL1-IGH*

Fundamento

La translocación t(11;14)(q13;q32) es característica del linfoma de células del manto (MCL), debido a que esta translocación recíproca citogenética fue observada en el 60-70% de los casos de MCL y sólo esporádicamente en otros NHL de linfocitos B¹³⁰. La región del punto de rotura fue clonada originalmente por Tsujimoto et al., (1983) y denominada la región *BCL1*¹³¹. Sin embargo, en solo algunos pocos casos con una translocación t(11;14) citogenética se identificó un punto de rotura genómico en la región *BCL1*. Usando la técnica de hibridación fluorescente in situ (abreviadamente FISH, por la expresión inglesa *Fluorescent in Situ Hybridization*) en fibra y en interfase con sondas que abarcan la región 11q13-*BCL1* de aproximadamente 750 kb, en casi todos los MCL (33 de 34) se observó un punto de rotura y todos los puntos de rotura estaban confinados en una región 5' de 360 kb del gen de la ciclina D1¹³²⁻¹³³. En casi la mitad de los casos de MCL (41%) los puntos de rotura estaban agrupados dentro de una región de 85 pb que se denominó la región principal de agrupación de translocaciones, *BCL1-MTC*^{130,134,135}. En la mayoría, si no en todos los casos de MCL, la rotura del locus de *IGH* localizado en 14q32 implica los genes J_H que se yuxtaponen el potenciador *IGH-E μ* a las secuencias del cromosoma 11q13 y, por consiguiente da como resultado la activación transcripcional del gen de la ciclina D1¹³⁶. La ciclina D1 junto con CDK4 fosforila (e inactiva) pRB y permite la progresión a través la fase G1 del ciclo celular. Debido a que la ciclina D1 es silenciosa en los linfocitos B y en el NHL de linfocitos B distinto del MCL, y la presencia de esta translocación está bien correlacionada con la expresión de la ciclina D1, este gen se considera la diana biológica relevante en el MCL¹³⁶. La expresión de la ciclina D1 y/o la presencia de t(11;14)(q13;q32) se utilizan como una herramienta adicional en el diagnóstico diferencial del NHL². La estrategia de detección del patrón de referencia para la presencia de t(11;14) que identificará casi todos los puntos de rotura es FISH en interfase utilizando sondas flanqueantes del punto de rotura en material fresco o congelado¹³³, así como en muestras de archivo¹³⁷. Sin embargo, una estrategia de detección basada en PCR para la t(11;14) podría ser útil, por ejemplo, para la monitorización de la enfermedad residual. Muchos grupos han desarrollado ensayos basados en PCR para detectar los puntos de rotura *BCL1/JH*, usando por lo general un cebador de consenso para J_H en combinación con los cebadores en la región *BCL1-MTC*, que estaban todos situados en una región de 392 pb^{54,55}. Las roturas dentro de la región *BCL1-MTC* pueden ocurrir hasta 2 kb aguas abajo de la región de MTC, pero la mayoría de los puntos de rotura están estrechamente agrupados dentro de un segmento de 85 pb, inmediatamente aguas abajo de cebador en 3' más documentado ("cebador B" en^{54,134}). Debido a que las roturas en esta región *BCL1-MTC* dan cuenta de sólo una parte de los

puntos de rotura en la región 11q13-*BCL1* en casos de MCL (41%), la estrategia basada en PCR para t(11;14) afecta importantemente a la capacidad de diagnóstico con una alta tasa de resultados negativos falsos en comparación con FISH.

5 También se ha documentado que t(11;14)(q13;q32) se ha observado en otras enfermedades proliferantes de linfocitos B, tales como mieloma múltiple (20%), SLVL (30%), B-PLL (33%) y B-CLL (8%)^{130,138,139}. Una razón de la presencia de la t(11;14) en B-CLL en algunos estudios podría ser debida a la clasificación incorrecta de B-CLL¹³⁰. En mieloma los puntos de rotura son bastante diferentes de los de MCL debido a que: (i) la frecuencia es mucho menor, (ii) la mayoría de las roturas implican sitios de recombinación de la clase interruptor; y (iii) aunque todos los casos analizados se encuentran en la misma región *BCL1* de 360 kb no parece que hubiera ninguna agrupación preferente dentro de la región *BCL1*-MTC. Por otro lado, en todos los casos con una rotura se activa el gen de la ciclina D1. Es de destacar, que en un subgrupo de mielomas múltiples con un gen *myeov* con rotura del interruptor de IGH, está implicado una región adicional en la región 11q13-*BCL1*¹³⁸.

Diseño de cebadores

15 Basándose en la localización del punto de rotura en 5' más alejado descrito y las secuencias de nucleótidos disponibles de la región *BCL1*-MTC (número de acceso en GenBank S77049), los inventores diseñaron un único cebador para *BCL1* (5'-GGATAAAGGCGAGGAGCATAA-3') en la región 5' de 472 pb de este punto de rotura usando el programa de diseño de cebadores OLIGO 6.2 relativo al cebador de consenso para J_H.

Resultados de la fase de ensayo inicial

20 Usando el cebador de consenso para J_H en combinación con el único cebador para *BCL1*-MTC en una pequeña serie de MCL (n = 5) previamente identificada como positiva con un *BCL1*/J_H-PCR interna (es decir, en los laboratorios de los inventores) usando un cebador de consenso para J_H18 (18 nt) y 5'-GCACTGTCTGGATGCACCGC-3' como cebador para *BCL1*-MTC, los inventores compararon inicialmente ambos ensayos en paralelo. En contraste con el análisis de las transposiciones del gen Ig/TCR por GS y/o HD, se identificaron los productos de PCR *BCL1*-J_H (así como para los productos *BCL2*-J_H) por electroforesis en gel de agarosa utilizando solamente tinción con bromuro de etidio. Los resultados en las cinco muestras positivas y las dos negativas fueron idénticos excepto que los productos de PCR fueron significativamente más débiles. Para evaluar si los inventores podían aumentar la sensibilidad de la PCR, determinaron el efecto de diferentes concentraciones de MgCl₂ y cebadores, y diferentes temperaturas en una máquina de PCR *Stratagene-Robocycler* (todas las otras PCR se realizaron en ABI-480 o ABI-9700). Lo más intrigante fue la variación debida a pequeños cambios en la concentración de MgCl₂. A 2,0 mM se hizo evidente un producto no específico débil de 550 pb, mientras que a 2,5 mM y superiores este producto no específico fue muy prominente en todos los DNA incluidos los controles de DNA que no son molde. A menores concentraciones (menores de 1,5 mM) no se observaron fragmentos no específicos, pero los productos específicos esperados fueron muy débiles. Las hibridaciones con una oligo-sonda para *BCL1*-MTC interna (5'-ACCGAATATGCAGTGCAGC-3') no mostró hibridación con este producto de 550 pb. Las PCR con cada uno de los cebadores por separado revelaron que el producto de 550 pb podía ser generado usando sólo el cebador de consenso para J_H. En algunos casos de MCL, además de los productos de PCR que variaban de 150-350 pb (Figura 10B), podían ser evidentes productos de PCR específicos mayores debido a la asociación del cebador de consenso para J_H a los segmentos J_H5 y J_H6 aguas abajo como se describe para *BCL2*/J_H¹⁴⁰. En la fase de ensayo inicial las condiciones de PCR más óptimas para la *BCL1*-MTC/J_H-PCR fueron: temperatura de asociación 60°C, MgCl₂ 2,0 mM y 10 pmol de cada cebador (para 35 ciclos de PCR en ABI-9700).

45 Para evaluar la especificidad de la PCR en una serie mayor de casos, la *BCL1*-MTC/J_H-PCR se realizó en tres laboratorios en DNA de 25 casos totales de MCL que todos fueron identificados previamente como positivos con *BCL1*/J_H-PCR interna, y de 18 controles negativos. Ninguno de los casos negativos reveló un producto de PCR, mientras que 22 de 25 casos positivos mostraron productos del tamaño esperado. En los tres casos que no revelaron un producto en gel de agarosa, se detectó por GS un producto que sugería que la sensibilidad era menor en comparación con la PCR interna.

50 La sensibilidad de la PCR se evaluó amplificando diluciones de DNA de un MCL en el DNA amigdalino normal. Se observó una sensibilidad entre 10⁻³ y 10⁻⁴ en gel de agarosa usando los cebadores de PCR desarrollados. Una PCR interna realizada en paralelo en las mismas muestras fue al menos 10 veces más sensible. Las hibridaciones con la oligo-sonda *BCL1*-MTC interna revelaron 10-100 veces mayor sensibilidad de ambas PCR. Las diluciones con DNA de una línea celular establecida JVM2 (disponible a través de DSMZ; <http://www.dsmz.de>) con un punto de rotura en *BCL1*-MTC/J_H⁵³ se utilizaron como el control positivo estándar de los laboratorios de los inventores. Como control negativo se podían utilizar tejido de amígdalas normal o células de sangre periférica, pero casi cualquier (NHL) de linfocitos B no MCL debe ser adecuado debido a la muy baja frecuencia de esta anomalía¹³⁰.

55 Resultados de la fase ensayo general

Para evaluar las variaciones entre laboratorios de la detección de puntos de rotura en la región *BCL1*-MTC, diez grupos participaron en el análisis de DNA de una serie de 90 linfoproliferaciones malignas y reactivas definidas histológicamente usando el protocolo *BCL1*-MTC/J_H-PCR. Todos los casos fueron definidos por su estatus en los

locus de Ig y TCR utilizando técnicas de hibridación de Southern. De los 90 casos, siete fueron caracterizados histológicamente como MCL. Los siete casos de MCL mostraron que tenían una transposición clonal en *IGH*, por hibridación de Southern. La determinación de las transposiciones dentro de la región *BCL1-MTC* en el cromosoma 11q13 ya sea por hibridación de Southern o por FISH no se realizó en todos los casos. En seis de los siete casos de MCL el producto de PCR se identificó en los diez laboratorios. En el caso de MCL, NL-15, en seis laboratorios se identificó el producto de PCR de 1,8 kb esperado. Este caso particular, llevaba un punto de rotura excepcional con un gran producto de PCR poco frecuente (que variaba normalmente desde 150 hasta 350 pb) y representaba por lo que sabían los inventores el punto de rotura en *BCL1-MTC* detectable más lejos del extremo 3'. En dos de los seis laboratorios se observó el producto de PCR, pero se consideró inicialmente como no específico debido a su tamaño poco común. En ES-4, caracterizado histológicamente como MCL en ninguno de los diez laboratorios pudo detectarse un producto de PCR lo que sugiere que este caso llevaba un punto de rotura fuera de *BCL1-MTC*. Cabe destacar que se seleccionaron los casos de MCL presentados a esta serie para la fase de ensayo general y por lo tanto era de esperar que llevaran roturas en la región *BCL1-MTC* con una incidencia superior a la normal. Es importante destacar que, a excepción de un solo caso (FR-1), en los otros 83 casos que no son MCL, incluyendo 16 casos que se caracterizaron histológicamente como B-CLL, no se detectó producto de *BCL1-MTC/JH-PCR* en ningún laboratorio. En el caso FR-1 caracterizado histológicamente como B-CLL, en tres de los diez laboratorios se identificó un producto que indicaba que el número de células con esta rotura era bajo. El estatus de *IGH* determinado por análisis de transferencia de Southern reveló que esta muestra estaba compuesta de 90% de linfocitos B clonales en buen acuerdo con el examen histológico. Los análisis de clonalidad de linfocitos B basados en PCR para *IGH* e *IGK* (sensibilidad de aproximadamente 1%) revelaron un único clon y el análisis por transferencia de Southern de *IGK* mostró solamente una única transposición principal en *IGK*. Además, el análisis por transferencia de Northern para la expresión de la ciclina D1 no mostró sobre-expresión. Todos estos datos sugerían que el número muy pequeño (menos de 1%) de células positivas a t(11;14) representa: (i) un subclon derivado de B-CLL, (ii) una segunda neoplasia maligna de linfocitos B independiente o (iii) linfocitos B normales como se ha descrito para linfocitos B positivos a t(14;18) en individuos normales¹⁴⁰. Sin embargo, con los datos disponibles de este paciente en la actualidad los inventores no pueden discriminar entre estas tres alternativas. En resumen, el análisis por los diez laboratorios ilustra la alta especificidad de la estrategia de *BCL1-MTC/JH-PCR*.

Para evaluar la presencia de posibles casos de resultados negativos falsos debido a la baja sensibilidad relativa de la PCR, en un laboratorio se llevó a cabo la PCR interna descrita anteriormente (con una sensibilidad alrededor de 10 veces mayor) sobre el DNA de los 90 casos y los productos de PCR de ambos ensayos también se hibridaron con una oligo-sonda *BCL1-MTC* interna que aumentó la sensibilidad en otras 10-100 veces. Este análisis no reveló productos de PCR en otros casos.

Conclusión

Los inventores llegaron a la conclusión de que también la sensibilidad de *BCL1-MTC/JH-PCR* (entre 10^{-3} y 10^{-4}) es suficientemente alta para la detección del punto de rotura de *BCL1-MTC/JH* en el material de diagnóstico. Los resultados de esta propuesta son muy alentadores y sugieren que la definición de la propuesta y las condiciones de reacción comunes puede minimizar resultados erróneos. Sin embargo, se debe recordar que como máximo se detectarán aproximadamente 50% de los puntos de rotura en t(11;14) en MCL y que para el diagnóstico se recomiendan herramientas de detección adicionales.

40 Ejemplo 9. t(14;18) con la transposición *BCL2-IGH*

Fundamento

La translocación t(14;18) es una de las anomalías citogenéticas recurrentes mejor caracterizadas en la enfermedad linfoproliferante de linfocitos B periféricos¹⁴¹. Es detectable en hasta 90% de los linfomas foliculares y 20% de los linfomas de linfocitos B de células grandes, dependiendo del ensayo de diagnóstico utilizado¹⁴². Como consecuencia de la translocación, el gen *BCL2* de 18q32 está colocado bajo el control de los fuertes potenciadores del locus de *IGH* que dan como resultado la desregulación de su patrón normal de expresión^{143, 144}. El *BCL2* está localizado en la membrana mitocondrial externa y su función normal es antagonizar la apoptosis y cuando está desregulado está íntimamente implicado en la patogénesis del tumor¹⁴⁵⁻¹⁴⁸. Como consecuencia de este papel en la patogénesis, la t(14;18) proporciona una diana ideal tanto para el diagnóstico como para el seguimiento molecular de la enfermedad residual.

El locus de *IGH* está situado en 14q32.3, estando las regiones V_H en el telómero y estando las regiones D_H , J_H y las regiones constantes más en el centrómero. La orientación transcripcional es desde el telómero al centrómero con potenciadores situados en 5' de las regiones V y entre cada una de las regiones constantes. La forma más común de la translocación implica el proceso de recombinación VDJ y uno de las seis regiones J_H de la línea germinal está totalmente opuesta a *BCL2*. La mayoría de las estrategias de detección basadas en PCR han utilizado un cebador para J_H de consenso que detectará la mayoría de las translocaciones^{149, 150}. Por el contrario, con el locus de *IGH*, el patrón de roturas en *BCL2* es más complicado. *BCL2* está situado 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 situado en la región no traducida en 3' del exón 3¹⁵¹. Como consecuencia de la translocación, el potenciador S_{μ} situado en 3' de las regiones J_H está colocado en estrecha proximidad al gen *BCL2* lo que conduce a su desregulación. Puesto que

se han investigado más translocaciones, se ha hecho evidente que hay un número de otras regiones de puntos de rotura que deben ser tenidas en cuenta para una estrategia eficaz de detección por PCR. Situada 4 kb aguas abajo de la MBR está otra región de punto de rotura, la sub-agrupación 3'MBR, que abarca una región de 3,8 kb¹⁵². La mcr está situado 20 kb en 3' de la MBR y abarca una región de 500 pb¹⁵³. Sin embargo, aunque análogo a la MBR, la mcr es más extensa de lo que se preveía inicialmente y se ha descrito una región de 10 kb aguas arriba de la mcr, la sub-agrupación 5'mcr^{154,155}. Además de estos puntos de rotura clásicos está descrito un número de variantes de translocaciones donde las roturas se producen en 5' de *BCL2*¹⁵⁶. Sin embargo, estas son raras y por lo tanto no pueden ser tenidas en cuenta usando una estrategia de detección basada en PCR.

No existe una única estrategia de detección como patrón de referencia para la t(14;18) y se ha usado generalmente una combinación de citogenética y transferencia de Southern^{157,158}. Las estrategias de detección por FISH en interfase ofrecen una alternativa aplicable que tienen potencial para recoger más translocaciones¹⁵⁹. Por el contrario, FISH en fibra basado en DNA ha sido muy informativa para definir variantes de translocaciones, pero no es adecuada para la aplicación habitual¹⁶⁰. Para los laboratorios de diagnóstico molecular, las estrategias de detección basadas en PCR ofrecen resultados rápidos, son de aplicación general y se pueden utilizar para el seguimiento de la enfermedad residual. Sin embargo, los cebadores usados habitualmente se han obtenido *ad hoc* y no han sido diseñados teniendo en cuenta la información reciente sobre la anatomía molecular de los puntos de rotura. Como consecuencia, cuando se compararon con los métodos de referencia las técnicas basadas en PCR sólo detectan hasta 60% de las translocaciones lo que perjudica mucho la capacidad de diagnóstico de PCR. LO que agrava de este alto porcentaje de resultados negativos falsos es el problema de resultados positivos falsos que surgen por la contaminación de otras muestras y los productos de PCR amplificados previamente.

Diseño de cebadores

Los inventores evaluaron inicialmente un sistema múltiple de dos tubos, un tubo diseñado para detectar puntos de rotura dentro de la MBR y un segundo tubo que usado para identificar puntos de rotura, fuera de esta región. La estrategia de la MBR contenía tres cebadores para MBR1, MBR2 y el cebador de consenso para J_H. La segunda reacción múltiple contenía cinco cebadores, para MCR1, MCR2, 5'mcr, 3'MBR1 y el cebador de consenso para J_H (Figura 11A) y fue diseñada para detectar los puntos de rotura dentro de las regiones mcr, 5'mcr y 3'MBR.

Resultados de la fase de ensayo inicial

La evaluación de estos cebadores se realizó en tres laboratorios sobre DNA procedente de un total de 124 casos de linfoma folicular que se sabe que lleva una translocación t(14;18). Se identificaron 109 casos (88%) con una fusión *BCL2-IGH*, 83/124 (67%) fueron positivos utilizando el ensayo múltiple MBR y 26/124 (21%) fueron positivos usando la estrategia múltiple no MBR. En 15/124 (12%) de los casos no hubo producto de PCR amplificable. Un examen más detallado de los casos identificados con la estrategia múltiple no MBR mostró que 11 (9%) tenían un punto de rotura dentro de mcr, cinco casos (4%) dentro de la 5'mcr y 10/124 (8%) dentro de la 3'MBR. .

Para investigar más a fondo el valor de este conjunto de cebadores para la detección de puntos de rotura dentro de las regiones de sub-agrupamientos 5'mcr y 3'MBR, se analizó en un laboratorio, por hibridación de Southern, una serie de 32 casos de linfomas foliculares positivos a t(14;18) que se sabe que eran la línea germinal en MBR y mcr. Cinco de los casos tenían puntos de rotura dentro de 5'mcr (260-490 pb) y se amplificaron usando tanto el cebador para 5'mcr en aislamiento como con la reacción múltiple. Ninguno de los restantes casos mostró un resultado positivo. De la serie de 32 casos, nueve ya se sabía que tenían puntos de rotura dentro de la región 3'MBR y el método múltiple pudo detectar 5/9 de estos casos.

Con el fin de mejorar la sensibilidad del ensayo dentro de esta región los inventores diseñaron otros tres cebadores que abarcaban la región de sub-agrupamientos de 3'MBR: 3'MBR2, 3'MBR3 y 3'MBR4 y combinándolos con 3'MBR1 y el cebador de consenso para J_H en una reacción múltiple adicional; el ensayo múltiple 3'MBR (Figura 11). Este nuevo método confirmó que ocho de los 32 casos fueron positivos, pero se perdió el noveno caso. Los cebadores se utilizaron luego individualmente y en este experimento 11 de los 32 casos fueron positivos. Los puntos de rotura estaban distribuidos como sigue: 2/11 casos tenían presente un punto de rotura 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 para 3'MBR3 y 3'MBR4 y los cuatro casos restantes se amplificaron usando el cebador para 3'MBR4 y estaban distribuidos 200-1000 pb hacia 3' de este cebador. En esta serie de casos hubo tres resultados negativos falsos utilizando el ensayo múltiple de 3'MBR. Uno de los casos fue un verdadero negativo falso donde se produjo la rotura en la parte central de la 3'MBR, en las proximidades de una secuencia de repetición Alu. La translocación se detectó usando el cebador para 3'MBR3 cuando se utilizó en el aislamiento y se generó un producto de 450 pb lo que sugería una sensibilidad reducida del ensayo múltiple. Los dos casos negativos falsos restantes generaron productos mayores de 1000 pb con el cebador para 3'MBR4, colocándolos en la región 3'MBR lejana no totalmente abarcada por este método. La mejora adicional de la sensibilidad del ensayo de 3'MBR se consiguió siguiendo la fase de ensayo general de este estudio. Sustituyendo el cebador para 3'MBR3 por un nuevo cebador aguas abajo, 5'-GGTGACAGCAAACATGAACA-3', (véase la Figura 11A) mejoró significativamente tanto la sensibilidad como la especificidad del ensayo de 3'MBR.

Basándose en lo anterior, el ensayo múltiple de 3'MBR se incorporó en la estrategia de diagnóstico de los

inventores. Por lo tanto, el análisis de los casos definidos por transferencia de Southern se llevó a cabo usando el sistema múltiple de tres tubos presentado en la Figura 11A.

Resultados de la fase de ensayo general

5 Las variaciones entre laboratorios caracterizan significativamente las estrategias de PCR para diagnóstico. Para evaluar esto, 11 grupos participaron en un amplio ejercicio de control de calidad externo. Se extrajo DNA de una serie de 90 neoplasias histológicamente definidas y se analizaron las linfoproliferantes reactivas utilizando el protocolo múltiple para t(14;18) (Figuras 11B, C y D). Todos los casos fueron definidos por su estatus en los locus de Ig y TCR utilizando técnicas de hibridación de Southern. La confirmación cariotípica de la t(14;18) no estaba disponible en esta serie. Por lo tanto, Los inventores adoptaron un método que requería más de 70% de concordancia entre los miembros de la red para la aceptación de la t(14;18). De los 90 casos, 11 fueron caracterizados histológicamente como linfoma folicular. Se demostró por hibridación de Southern que los 11 casos tenían una transposición clonal de *IGH*. La determinación de las transposiciones dentro del gen *BCL2* también se llevó a cabo por hibridación de Southern utilizando sondas específicas para MBR, MCR y 3'MBR en 10/11 casos. 4/10 casos mostraron una transposición dentro de la MBR que era concordante con el resultado de la PCR. Un solo caso, GBS-7, mostró que era positivo a un ensayo múltiple de mcr y dio un resultado no concluyente por transferencia de Southern con la sonda para mcr. Inmunofenotípicamente este caso demostró dos poblaciones clonales distintas, 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 la transferencia de Southern en comparación con la PCR. Por transferencia de Southern no hubo pruebas de una transposición en 3'MBR en ninguno de los casos restantes.

De los seis casos de FCL negativos por transferencia de Southern, un solo caso, ES-7, mostró una t(14,18), utilizando el ensayo múltiple de MBR. 5/11 casos de FCL no mostraron pruebas de t(14;18) por transferencia de Southern ni por PCR. Se detectó una t(14;18) en dos casos adicionales por PCR; FR-6, un caso de DLBCL mostró un punto de rotura en la MBR y fue identificado por los 11 laboratorios, siendo este hallazgo compatible con los estudios previos que habían detectado una t(14;18) en 20-40% de los casos de linfoma de linfocitos B grandes difusos (abreviadamente DLBCL por la expresión inglesa *Diffuse Large B-cell Lymphoma*)^{161,162}. Usando el ensayo múltiple de 3'MBR, 10/11 laboratorios informaron de un resultado positivo para la muestra ES-12, que era un caso de la enfermedad de Hodgkin, que contenía muy pocos linfocitos B. Es difícil de explicar este resultado en ausencia de una transposición en *IGH* por transferencia de Southern. La explicación más probable es la contaminación o el etiquetado incorrecto de la muestra en la fuente.

En general hubo una concordancia excelente en toda la red, aunque se encontraron pequeños números de resultados tanto positivos falsos como negativos falsos. Se identificaron globalmente 12 resultados positivos falsos, que representaban menos del 0,4% (12/3036) del número total de análisis. Estos fueron realizados por cinco laboratorios e implicaban seis de las muestras. La mayoría de los resultados positivos falsos (9/12) fueron encontrados en tres casos. Cinco resultados negativos falsos, que representaban una tasa de fallos de 6% (5/88), fueron reportados por tres laboratorios, ES-7 no fue detectado por dos laboratorios, otros tres grupos dentro de la red, comentaron que este caso había mostrado señales de amplificación débiles con el ensayo múltiple de MBR. Los tres casos de resultados negativos falsos restantes se informaron en aislamiento por laboratorios individuales. Los resultados de los diagnósticos que utilizan este método son muy alentadores y sugieren que la definición de enfoques y condiciones de reacción comunes puede minimizar resultados erróneos.

Conclusión

En conclusión, los inventores han diseñado y evaluado un ensayo múltiple de PCR sólido de tres tubo con el fin de maximizar la detección de la t(14;18). Esta estrategia puede amplificar a través de la región del punto de rotura en la mayoría de los casos de FCL con una translocación citogenéticamente definida. Aunque la sensibilidad de esta estrategia es menor que los métodos por PCR de una sola ronda convencional o anidada, todavía es perfectamente aceptable para los procedimientos de diagnóstico. La adopción generalizada de reactivos y metodologías estandarizados ha ayudado a minimizar los resultados imprecisos dentro de esta gran red multicentro. Sin embargo, es digno de mención en la fase de ensayo general de este estudio que es imposible detectar una t(14;18) en todos los casos. Esto está, sin duda influenciado por mecanismos moleculares adicionales capaces de desregular el gen *BCL2*^{163, 164}.

Ejemplo 10: Uso de DNA extraído de biopsias de tejidos embebidos en parafina y desarrollo del conjunto de cebadores para el gen de control

Fundamento

Se considera que el tejido fresco/congelado es el tipo de muestra ideal para la extracción de DNA para uso en el análisis de la clonalidad basado en PCR. Sin embargo, el material fresco/congelado no siempre está disponible en los laboratorios de diagnóstico y en muchos laboratorios de toda Europa, las muestras de tejidos embebidos en parafina constituyen la mayoría de las biopsias de diagnóstico presentadas para análisis. El DNA extraído de material embebido en parafina es a menudo de mala calidad y por tanto los protocolos de PCR necesitan ser

evaluados para uso con estos tipos de muestras antes de que puedan ser ampliamente utilizados en los laboratorios de diagnóstico.

La integridad del DNA extraído de muestras embebidas en parafina y su amplificación por PCR se ven afectadas por una serie de factores, tales como el espesor del tejido, el tipo de fijador, el tiempo fijación, la duración de la conservación antes del análisis, los procedimientos de extracción del DNA y la co-extracción de los inhibidores de PCR¹⁶⁵⁻¹⁷². El diez por ciento de formalina tamponada neutra (NBF al 10%) [la abreviatura NBF procede de la expresión inglesa *Neutral Buffered Formalin*] es el fijador más comúnmente utilizado, aunque los laboratorios utilizan también otros fijadores, incluyendo formalina no tamponada y Bouins. El uso de NBF al 10% permite la amplificación de fragmentos de DNA de una amplia gama de tamaños, mientras que Bouins parece ser el menos susceptible de uso en el análisis por PCR^{167,168,171,173}. La integridad de los fragmentos de DNA extraído de muestras embebidas en parafina depende también de la duración de tiempo en el que los bloques han sido conservados, obteniéndose generalmente los mejores resultados de bloques de menos de 2 años de conservación, mientras que los bloques más de 15 años de conservación tienden a producir fragmentos muy degradados¹⁷⁴.

Diseño de cebadores

Inicialmente se diseñaron cinco pares de cebadores de PCR para el gen de control para amplificar productos exactamente de 100, 200, 400, 600 y 1000 pb con el fin de determinar la calidad del DNA presentado para análisis. Los genes diana se seleccionaron sobre la base de tener grandes exones con marcos de lectura abiertos para reducir el riesgo de seleccionar regiones polimórficas y los cebadores se diseñaron para el uso múltiple en los protocolos estandarizados. Se seleccionaron los siguientes genes diana: gen de la tromboxano-sintasa humana (*TBXAS1*, Exón 9; número de acceso en GenBank D34621), gen activante de la recombinación humano (*RAG1*, Exón 2; número de acceso en GenBank M29474), gen de dedo de zinc humano de leucemia promielocítica (*PLZF*, Exón 1; número de acceso en GenBank AF060568) y el gen AF4 humano (Exón 3; número de acceso en GenBank Z83679 y el Exón 11; Número de acceso en GenBank Z83687).

Resultados de la fase de ensayo inicial

Los pares de cebadores se analizaron en reacciones separadas y posteriormente en reacciones múltiples utilizando DNA de alto peso molecular. Debido a la amplia gama de tamaños de los productos (100 a 1000 pb), fue necesario variar la relación de las concentraciones de cebadores para obtener bandas de iguales intensidades en las reacciones múltiples. Sin embargo, resultó extremadamente difícil poder amplificar todas las bandas de forma reproducible y se decidió que el producto de 1000 pb era probablemente innecesario, puesto que todos los protocolos de PCR de acuerdo con la invención dan productos de menos de 600 pb. Por lo tanto, se decidió excluir el producto de 1000 pb con el fin de mejorar la reproducibilidad del ensayo. Aumentando la concentración de $MgCl_2$ hasta 2 mM y añadiendo los cebadores en una relación 1:1:1:2, fue posible amplificar de forma reproducible cuatro bandas (las de 100, 200, 400 y 600 pb) de igual intensidad a partir de muestras de DNA de alto peso molecular. Sin embargo, para el DNA extraído de bloques de parafina, se pensó que un marcador de tamaño extra en 300 pb sería extremadamente informativo y que podría no ser necesario el marcador de 600 pb. Usando la secuencia génica para el marcador de 1000 pb (*PLZF*), se rediseñaron cebadores para generar un producto de 300 pb. Estos fueron analizados con éxito tanto en reacciones sencillas como múltiples combinando los cebadores de 100, 200, 300, 400 y 600 pb (véase la Figura 12A).

Por lo tanto dos conjuntos de cebadores están disponibles para determinar la calidad del DNA para la amplificación: Los cebadores de 100, 200, 300 y 400 pb utilizados en 2,5 pmoles de cada uno se pueden utilizar para determinar el DNA de tejidos embebidos en parafina. La adición de los cebadores de 600 pb en 5 pmol permite que este conjunto sea utilizado para comprobar la calidad de cualquier muestra de DNA para su uso con los cebadores y protocolos. Ambos conjuntos de cebadores se pueden utilizar con tampón ABI II y $MgCl_2$ 2,0 mM en condiciones de amplificación estandarizadas. Los productos pueden ser analizados en PAGE al 6% o en agarosa al 2% (véase la Figura 12B).

Resultados de la fase de ensayo general

Se recogieron cuarenta y cinco biopsias embebidas en parafina correspondientes a 30 de las neoplasias malignas de linfocitos B, a ocho de neoplasias malignas de linfocitos T y a siete de las linfoproliferaciones reactivas presentadas como muestras de tejidos frescos/congelados. El tiempo de conservación los bloques de parafina, así como los métodos de fijación e imbibición de las muestras variaban entre las redes nacionales. Las muestras ES se presentaron como secciones pre-cortadas, NL-14, 15 y 16 se presentaron como muestras de DNA y las biopsias restantes se presentaron como bloques de parafina. Cinco secciones (10 μ M cada una) se cortaron de los bloques de parafina y el DNA se extrajo utilizando el *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante para el aislamiento del DNA genómico del tejido embebido en parafina. Se eligió este método de extracción de DNA puesto que el kit se puede utilizar para extraer rápidamente DNA de buena calidad de sangre, tejido fresco/congelado y tejido embebido en parafina y por lo tanto permite el procesamiento paralelo de una variedad de tipos de muestras con control de calidad garantizado. Se han publicado numerosos protocolos para la extracción de DNA de tejido embebido en parafina para análisis por PCR^{171,172,175-177}. Muchos de ellos pretenden reducir la degradación del DNA y la co-extracción de inhibidores de PCR, pero muchos de estos métodos requieren

procedimientos de extracción prolongados y pueden ser inadecuados para su uso en el laboratorio de diagnóstico habitual^{166,178,179}.

5 La concentración y la integridad de la muestra de DNA se estimaron por espectrofotometría y por comparación del DNA de la muestra con patrones conocidos de electroforesis en gel de agarosa. A continuación, se analizaron la integridad y la amplificabilidad de muestras de DNA (100 ng) su utilizando los cebadores de PCR de genes de control (100-400 pb) y se determinó su clonalidad en todos los locus diana utilizando los protocolos de PCR.

10 En la reacción de PCR de genes de control de 24/45 casos, los productos amplificados tenían al menos 300 pb, mientras que en las 21 muestras restantes los productos amplificados tenían 200 pb o menos. No pudo demostrarse una clara correlación entre la calidad del DNA y el tiempo de conservación del bloque o el método de fijación. Por lo tanto, es probable que una combinación de factores sea responsable de la calidad del DNA en estas muestras.

15 Se evaluó la clonalidad de muestras de DNA usando 18 reacciones de PCR múltiples y se analizaron r tanto por HD como por GS. El número de muestras en parafina que presentan clonalidad y translocaciones en los nueve locus diana se compararon con los datos correspondientes de las muestras frescas/congeladas. En las muestras con productos de PCR de genes de control de hasta 200 pb, la detección global de clonalidad en los nueve locus diana fue 9/55 (16%). De las 46 transposiciones perdidas, 45 podrán explicarse por el hecho de que los productos de PCR clonales esperados tendrían un peso molecular mayor que el tamaño máximo amplificado por la muestra en la PCR del gen de control. La muestra restante (PT-9) se amplificó hasta 100 pb en la PCR del gen de control, pero no se detectó el producto clonal de *TCRG* de 81 pb esperado. En las muestras con productos de PCR del gen de control de al menos 300 pb, la detección global de la clonalidad en los nueve locus diana fue 42/55 (76%). De las 13 transposiciones perdidas, cinco podían ser explicadas de nuevo por el hecho de que los productos de PCR clonales esperados eran mayores que el tamaño máximo amplificado por la muestra en la PCR del gen de control. Las ocho transposiciones perdidas restantes no se pudieron explicar directamente por la calidad del DNA. Se detectó un resultado clonal positivo falso (GBN-9; *IGL*) en un ganglio linfático reactivo que puede representar pseudoclonalidad.

25 Se sabe que los inhibidores de PCR están presente en el DNA extraído de muestras de parafina. La dilución de la muestra de DNA puede reducir la concentración de estos inhibidores hasta niveles que permitan que se produzca la amplificación satisfactoria. Para investigar el efecto de la dilución de las muestras de DNA sobre la eficacia de la amplificación, se analizaron cuatro concentraciones diferentes de DNA en la reacción de PCR del gen de control: 5, 50, 100 y 500 ng. Los inventores observaron que la dilución de las muestras de DNA tiene un efecto significativo sobre el tamaño de los productos de PCR en la PCR del gen de control. Globalmente, 24/45 casos (53%) mostraron un aumento de la eficacia de la amplificación cuando se diluyeron desde 100 ng hasta 50 ng. La concentración óptima de DNA parece estar entre 50 y 100 ng mientras que el uso de 500 ng parece inhibir la amplificación de productos mayores (300 pb o más). Aunque el uso de 5 ng de DNA da resultados aceptables con la PCR del gen de control, esto puede dar lugar a resultados positivos falsos en ensayos de clonalidad basados en PCR debido a la escasa representación de DNA total de células linfoides^{180,181}. Más importante aún, 5 ng de DNA no tienen ninguna ventaja sobre una dilución hasta 50 ng de DNA.

40 Para determinar si el uso de 50 ng de DNA aumentaría también la detección de la clonalidad, todas las muestras se analizaron de nuevo en el locus V-J de *IGH* utilizando esta concentración de DNA. El número de transposiciones clonales detectado en los tres tubos con V-J de *IGH* utilizando 100 ng de DNA fue 12, en comparación con 23 usando las muestras frescas/congeladas correspondientes. La detección global de la clonalidad en este locus aumentó hasta 17 de 23 cuando se utilizaron 50 ng de DNA, detectándose productos clonales con 9 FR1, 6 FR2 y 4 FR3. Por lo tanto, la dilución del DNA puede aumentar la detección de los productos clonales, presumiblemente a causa de la dilución de los inhibidores de PCR. Lógicamente, la dilución de DNA sólo es probable que mejore tanto los resultados de la PCR del gen de control como la detección de la clonalidad, si están presentes inhibidores de la PCR, no si la muestra de DNA está altamente degradada. Por lo tanto, se recomienda que se analicen al menos dos diluciones de DNA usando la PCR del gen de control y que la dilución que dé el mejor resultado se utilice en el análisis de la clonalidad posterior.

50 Nueve transposiciones clonales permanecieron sin ser detectadas después del análisis inicial, lo que no podía explicarse por la calidad del DNA (*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-J_H* de *IGH* en GBS-6 y GBS-8). Estas muestras se volvieron a analizar utilizando 50 ng de DNA, pero sólo una muestra (GBS-8; *IGH*) mostró mejoras en la detección, lo que sugería que otros factores desconocidos podrían evitar la amplificación de dianas específicas en un pequeño número de casos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que en 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 otro locus. Esto demuestra que los ensayos de clonalidad en múltiples locus diana aumenta la probabilidad de detectar las poblaciones de linfocitos clonales.

55 Conclusión

En conclusión, los protocolos como los proporcionados en la presente memoria funcionan bien con DNA extraído de material embebido en parafina siempre que el DNA pueda amplificar productos de 300 pb o más en la PCR del gen de control. Se analizan preferiblemente dos concentraciones de DNA en la PCR del gen de control y la concentración más "amplificable" debe ser utilizada en ensayos adicionales, aunque con la condición de que las

concentraciones de DNA menores de 20 ng pueden contribuir a la detección de pseudoclonalidad debido a la baja representación de DNA diana linfoide^{180,181}. En general, los datos muestran que la determinación de la calidad del DNA usando PCR del gen de control proporciona una buena indicación de la idoneidad del DNA para el análisis de la clonalidad usando los protocolos proporcionados. También es importante tener en cuenta que la PCR del gen de control no dará ninguna indicación de la cantidad de DNA de células linfoides presente en la muestra y por lo tanto el DNA de buena calidad puede incluso producir resultados negativos en el análisis de la clonalidad. Para asegurar que los resultados monoclonales sean reproducibles (y evitar una pseudoclonalidad potencial), todos los ensayos de clonalidad, particularmente los que utilizan DNA extraído de parafina, se realizan preferentemente por duplicado y se analizan por HD y GS, siempre que sea posible.

10 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.
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.
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. p. 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.
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.
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.
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 β 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 β repertoire in healthy controls. *Cytometry* 2000; 40: 336-345.
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.
15. Langerak AW, Wolvers-Tettero ILM, van den Beemd MWM, van Wering ER, Ludwig W-D, Hählen 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.
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.
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, Hählen 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.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 30. Szczepanski T, Beishuizen A, Pongers-Willems 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.
- 20 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, Willems 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.
- 25 34. Szczepanski T, Pongers-Willems 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 ab lineage. *Blood* 1999; 93: 4079-4085.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 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 USA* 1990; 87: 8536-8540.
40. Bottaro M, Berti E, Biondi A, Migone N, Crosti L. Heteroduplex analysis of T-cell receptor gamma gene rearrangements for diagnosis and monitoring of cutaneous T-cell lymphomas. *Blood* 1994; 83: 3271-3278.
- 45 41. Langerak AW, Szczepanski T, van der Burg M, Wolvers-Tettero ILM, van Dongen JJM. Heteroduplex 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* 1995; 86: 3930-3937.
- 50 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* 2002; 15: 37-57.
- 55 45. Willems MJ, Seriu T, Hettlinger 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.
- 60 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.
- 65 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.
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.
- 10 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.
- 15 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.
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 CD 19 in normal human bone marrow. *Blood* 1997; 90: 736-744.
- 25 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.
- 30 62. Szczepanski T, Willemsse 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.
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.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 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.
- 50 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.
- 55 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, Willemsse 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.
- 60 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.
- 65 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.
- 5 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.
- 10 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.
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.
- 15 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.
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. Farmer 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.
- 25 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.
- 30 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.
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.
- 35 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.
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. Il-7 supports D-J but not V-DJ rearrangement of TCR-beta gene in fetal liver progenitor cells. *J Immunol* 1996; 156: 3233-3242.
- 40 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.
- 45 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.
- 50 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, Rohrlisch 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.
- 55 100. Gorski J, Yassai M, Zhu X, Kissella 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: 5109-5119.
- 60 101. 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.
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.
- 65

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.
- 5 105. 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.
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.
- 10 107. 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.
108. Zhang XM, Tonnelle 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.
- 15 109. 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.
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.
- 20 111. Porcelli S, Brenner MB, Band H. Biology of the human gamma delta T-cell receptor. *Immunol Rev* 1991; 120: 137-183.
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.
- 25 113. 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.
114. Delabesse E, Burtin ML, Millien 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.
- 30 115. 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.
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.
- 35 117. 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.
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.
- 40 119. 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.
- 45 121. 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.
- 50 122. 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.
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.
- 55 124. 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.
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.
- 60 126. 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.
- 65

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.
130. De Boer CJ, van Krieken JH, Schuurin 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.
132. Vaandrager JW, Kleiverda JK, Schuurin E, Kluin-Nelemans JC, Raap AK, Kluin PM. Cytogenetics on released DNA fibers. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1997; 81: 306-311.
133. Vaandrager JW, Schuurin 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.
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.
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, Schuurin 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, Schuurin 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, Schuurin E. Concurrent activation of a novel putative transforming gene, myeov, and cyclin D 1 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, Schuurin 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.
- 5 155. 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.
- 10 157. 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.
159. Vaandrager JW, Schuurung 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.
- 15 160. Vaandrager JW, Schuurung 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.
161. Jacobson JO, Wilkes BM, Kwiatkowski 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.
- 20 162. 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.
- 25 163. Vaandrager JW, Schuurung 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, Schuurung 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.
- 30 165. 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.
- 35 167. Camilleri-Broet S, Devez 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. Ets of fixative and fixation time. *Am J Clin Pathol* 1991; 95: 117-124.
- 40 169. 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.
- 45 171. 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.
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.
- 50 174. 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.
- 55 177. 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.
- 60 179. 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.
180. Hoeve MA, Krol AD, Philippo K, Derksen PW, Veenendaal RA, Schuurung 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.
- 65

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.

5

Tabla 1. Linaje B, T y NK de neoplasias malignas linfoides^a

Linaje	ALL		Leucemias linfocíticas crónicas	Linfomas no Hodgkin			Mieloma múltiple
	Niños	Adultos		Nodal	Extra nodal	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 - 10%	60 - 70%	0%
NK	< 1%	< 1%	1 - 2%	<2%	<2%	<2%	0%

a. Véase Van Dongen et al., 1991¹, Jaffe et al., 2001² y Van Dongen et al., 2002

Tabla 2. Número estimado de segmentos génicos V, D y J humanos no polimórficos que pueden estar implicados potencialmente en transposiciones de los genes Ig o TCR^a

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

a. Solamente están incluidos en esta tabla segmentos génicos no polimórficos con una RSS adecuada.
 b. Esta estimación no incluye los pseudogenes V_H (generalmente truncados) recientemente descubiertos, que están agrupados en tres clanes.
 c. Los seis segmentos génicos J_H son altamente homólogos en un tramo de ~20 nucleótidos, lo que es suficiente para el diseño de un cebador de consenso.
 d. Los segmentos J_k tienen alta homología, lo que permite el diseño de 2 a 3 cebadores de consenso para J_k.
 e. Cinco de los siete segmentos génicos J_λ tienen una RSS adecuada.

10

Tabla 3. Protocolo de PCR estandarizado

<i>Condiciones de reacción.</i>			
<ul style="list-style-type: none"> tampón: tampón ABI II o tampón ABI de referencia. volumen final 50 µL DNA 100 ng 10 pmol de cada cebador (no marcado o marcado con 6-FAM) (independientemente del número total de cebadores en cada tubo de PCR múltiple) dNTP: concentración final 200 µM MgCl₂: concentración final 1,5 mM (debe ser optimizada por diana) enzima Taq^a: 1U en la mayoría de los tubos; 2 U en tubos con muchos cebadores (>15) 			
<i>Condiciones de los ciclos</i>			
<ul style="list-style-type: none"> pre-activación 7 minutos a 95°C temperatura de asociación: 60°C 			
tiempos de los ciclos:		"clásico"	"más reciente"
		<i>Equipo de PCR</i>	<i>Equipo de PCR</i>
	-desnaturalización	45 segundos	30 segundos
	-asociación	≥45 segundos	≥30 segundos
	-extensión	1,30 minutos	≥30 segundos
	-extensión final	≥10 minutos	≥10 minutos
<ul style="list-style-type: none"> número de ciclos: 35 mantenimiento 15°C (o temperatura ambiente) 			
a. Se usó AmpliTaq de referencia (Applied Biosystems, Foster City, CA) en combinación con 1x tampón ABI II o 1x tampón de referencia ABI (Applied Biosystems), dependiendo de la diana.			

Tabla 4. Protocolo estandarizado para análisis de heterodúplex de los productos de PCR

<p><i>Preparación de los productos de PCR</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • tubo con 10-20 µL de producto de PCR • desnaturalización de producto de PCR: 5 minutos a 95°C • re-asociación de producto de PCR: 60 minutos a 4°C
<p><i>Condiciones de la electroforesis (geles de poliacrilamida no comerciales)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • gel: poliacrilamida no desnaturalizante al 6% (acrilamida: bisacrilamida 29:1) • tampón: 0,5 x TBE • tampón de carga: 5 µL de tampón de carga con azul de bromofenol no desnaturalizante enfriado con hielo • electroforesis: típicamente 2-3 horas a 110 V o una noche a 40-50 V^a
<p><i>Condiciones de la electroforesis (geles de poliacrilamida comerciales)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • gel: poliacrilamida no desnaturalizante (por ejemplo, BioRad PreCast Gel System o Amersham Pharmacia Biotech Gene Gel Excel Kit) • tampón: 1 x TBE • tampón de carga: tampón de carga con azul de bromofenol no desnaturalizante enfriado con hielo • electroforesis: 1,5 horas a 100 V
<p><i>Visualización</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • tinción: 5-10 minutos en 0,5 µg/mL de EtBr en H₂O • destinción/lavado: 2 x 5-10 minutos en H₂O • visualización: iluminación con luz UV • alternativa: tinción con plata usando el kit de tinción con plata de DNA de Amersham Pharmacia Biotech
<p>a. El voltaje y el tiempo de electroforesis dependen de los tamaños de los amplicones de PCR, del espesor del gel de poliacrilamida y del tipo de equipo de PCR y deben ser adaptados en consecuencia.</p>

5

Tabla 5. Protocolo estandarizado para GeneScanning (GS) de productos de PCR.

A. Secuenciadores basados en geles	
<i>Preparación del producto de PCR</i>	
1.	Dilución del productos de PCR: inicialmente 1:10 en formamida o H ₂ O (puede ser alterada si la señal fluorescente está fuera del intervalo óptimo; véanse las condiciones de electroforesis)
2.	Volumen de muestra: 2 µl de producto de PCR diluido
3.	Volumen del tampón de carga: 0,5 µL de tampón de carga con azul de dextrano + 0,5 µL de patrón interno TAMRA + 2 µL de formamida desionizada
4.	Desnaturalización del producto de PCR: 2 minutos a 95°C o temperatura superior
5.	Enfriamiento del producto de PCR a 4°C
<i>Condiciones de la electroforesis</i>	
6.	Gel: poliacrilamida desnaturalizante al 5%
7.	Tampón: 1 x TBE
8.	Electroforesis: 2-3,5 horas ^a (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)
B. Secuenciadores capilares (han de ser optimizados por secuenciador)	
<i>Preparación del producto de PCR</i>	
1.	1 µL de producto de PCR (el volumen de producto de PCR o los tiempos de muestreo se pueden alterar si la señal fluorescente está fuera del intervalo óptimo; véanse las condiciones de electroforesis)
2.	Volumen de muestra: 1 µL de producto de PCR + 9,5 µL de formamida (Hi-Di) + 0,5 µL de patrón interno para análisis de heterodúplex ROX-400
3.	Desnaturalización del producto de PCR: 2 minutos 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: 1 x tampón 3100 con EDTA
7.	Electroforesis: 45 minutos ^p
8.	Intensidad óptima de la señal fluorescente:

		- hasta 10.000 unidades fluorescentes
^a El tiempo de electroforesis depende de los tamaños del amplicón y de la plataforma empleada ^b Para capilares de 36 cm; el tiempo considerado depende del capilar usado.		

Tabla 6. Sensibilidad de detección de transposiciones en TCRB clonales

Tubo con TCRB	Par de cebadores implicados		Control clonal	Tamaño del producto de PCR	Sensibilidad de la detección		
	V	J			PCR sencilla ^a	PCR múltiple	
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/15	Jβ1.6	paciente	278 nt	<5%	5%	
	Vβ3/12a/13a/15	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%	
Vβ6a/11		Jβ2.5	paciente	258 nt		5%	
Vβ7		Jβ2.3	PEER	271 nt		<5%	
Vβ8a		Jβ2.1	paciente	293 nt	0,1%	1%	
Vβ31/2a/13a/15		Jβ2.1	paciente	258 nt	5%	10%	
Vβ3/12a/13a/15		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	Jβ1.1	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. No se realizó en cada caso el experimento de dilución para determinar la sensibilidad de la PCR sencilla.

Tabla 7. Sensibilidad de detección de transposiciones clonales en el gen *TCRD*

Transposición en <i>TCRD</i>	Muestra de control clonal		Sensibilidad de la detección por heterodúplex
	(tamaño aproximado)		
V δ 1-J δ 1	paciente	(200 nt)	5%
	paciente	(190 nt)	1-5%
	paciente	(200 nt)	5%
V δ 2-J δ 1	paciente	(200 nt)	5%
	paciente	(220 nt)	5%
	paciente	(210 nt)	5%
V δ 2-J δ 3	paciente	(220 nt)	5%
V δ 3-J δ 1	paciente	(270 nt)	5%
V δ 6-J δ 2	Loucy	(210 nt)	0,5%
	paciente	(210 nt)	10%
D δ 2-J δ 1	Loucy	(150 nt)	0,2%
	paciente	(160 nt)	0,5%
	paciente	(135 nt)	0,5%
D δ 2-J δ 3	paciente	(150 nt)	5%
D δ 2-D δ 3	NALM-16	(170 nt)	1%
	paciente	(200 nt)	1%
	paciente	(190 nt)	0,5%
	paciente	(170 nt)	0,5%
V δ 2-D δ 3	REH	(240 nt)	5-10%
	NALM-16	(230 nt)	1-5%
	paciente	(250 nt)	5%

Tabla 8. Concordancia entre los resultados de PCR múltiple y los resultados de análisis por transferencia de Southern (SB) (PCR/SB) en transposiciones en genes *Ig/TCR* por (sub)categoría de las muestras congeladas incluidas

5

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

a. Incluye análisis por PCR tanto de V_H-J_H como de D_H-J_H

b. C = transposiciones clonales; P = transposiciones policlonales

c. En una muestra, clonalidad solamente en *GeneScanning*

d. En una muestra, clonalidad solamente en análisis de heterodúplex

e. En una muestra, policlonalidad solamente en *GeneScanning*

f. En una muestra, policlonalidad solamente en análisis de heterodúplex

Tabla 9. Complementariedad de diferentes dianas de PCR múltiple de Ig para detección de la clonalidad en neoplasias malignas de linfocitos B definidas por transferencia de Southern

Tubos de PCR múltiple	Diagnóstico ^a			
	Centro pre-germinal B (n=8)	B-CLL (n=16)	Centro (pos-)germinal B (n=25)	Todas las neoplasias malignas de linfocitos B (n=49)
<i>IGH</i> V _H -J _H FR1	8/8 ^b (100 %)	14/16 ^c (88 %)	15/25 ^b (60 %)	37/49 (76 %)
<i>IGH</i> V _H -J _H FR2	8/8 (100 %)	15/16 (94 %)	14/25 ^b (56 %)	37/49 (76 %)
<i>IGH</i> V _H -J _H FR3	8/8 (100 %)	14/16 (88 %)	11/25 ^c (44 %)	33/49 (67 %)
<i>IGH</i> V _H -J _H 3FR	8/8 (100 %)	15/16 (94 %)	17/25 (68 %)	40/49 (82 %)
<i>IGH</i> D _H -J _H	0/8 (0 %)	11/16 (69 %)	11/25 (44 %)	22/49 (45 %)
<i>IGH</i> V _H -J _H + <i>IGH</i> D _H -J _H	8/8 (100 %)	15/16 (94 %)	22/25 (88 %)	45/49 (92 %)
<i>IGK</i>	8/8 (100 %)	16/16 (100 %)	21/25 ^d (84 %)	45/49 (92 %)
<i>IGL</i>	4/8 (50 %)	7/16 ^e (44 %)	4/25 ^f (16 %)	15/49 (31 %)
<i>IGH</i> V _H -J _H + <i>IGK</i>	8/8 (100 %)	16/16 (100 %)	21/25 (84%)	45/49 (92 %)
<i>IGH</i> V _H -J _H + <i>IGL</i>	8/8 (100 %)	15/16 (94 %)	17/25 (68 %)	40/49 (82 %)
<i>IGH</i> V _H -J _H + <i>IGH</i> D _H -J _H + <i>IGK</i>	8/8 (100 %)	16/16 (100 %)	24/25 (96 %)	48/49 (98 %)
<i>IGH</i> V _H -J _H + <i>IGH</i> D _H -J _H + <i>IGK</i> + <i>IGL</i>	8/8 (100 %)	16/16 (100 %)	24/25 (96 %)	48/49 (98 %)

a. Todas las muestras tienen transposiciones clonales de genes en al menos el locus de *IGH* determinadas por análisis de transferencia de Southern.
b. Dos casos mostraron productos clonales en *GeneScanning*, pero productos policlonales en análisis de heterodúplex.
c. Uno caso mostró productos clonales en *GeneScanning*, pero productos policlonales en análisis de heterodúplex.
d. Incluyendo el caso 25-NL-4 con transposiciones de genes clonales débiles en *IGH*, pero policlonales de genes en *IGK* en análisis por transferencia de Southern.
e. Incluyendo los casos 11-NL-19 y 12-ES-1 con transposiciones de genes clonales en *IGH* + *IGK*, pero policlonales en *IGL* por análisis por transferencia de Southern.

Tabla 10. Condiciones y muestras de control para análisis por PCR múltiple de las transposiciones de genes Ig/TCR y las translocaciones t(11;14) y t(14;18)

PCR múltiple	Tubos	Condiciones de PCR			Controles positivos (ejemplos)	
		Tampón	TaqGold (U)	MgCl ₂ (mM)	policlonal	monoclonal ^a
<i>IGH</i> V _H -J _H	A/B/C	Ref. / 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> D _H -J _H	D/E	Ref.	1	1,5	amígdala	D: KCA; ROS15 E: HSB-2, HPB-ALL
<i>IGK</i>	A/B	Ref. / II	1	1,5	amígdala	A: KCA; ROS15 B: ROS 15, 380
<i>IGL</i>	A	Ref. / II	1	2,5	amígdala	A: CLL-1; EB-4B; KCA
<i>TCRB</i>	A/B/C	II	2 (A,B) ^b 1 (C)	3,0 (A,B) 1,5 (C)	PB- MNC ^c	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 ^c	A: MOLT-3; RPMI-8402; Jurkat; PEER B: Jurkat; PEER
<i>TCRD</i>	A	II	1	2,0	PB- MNC ^c	A: PEER, REH
<i>BCL1-IGH</i>	A	II	1	2,0	NA ^c	A: JVM 2
<i>BCL2-IGH</i>	A/B/C	II	1	1,5	NA ^c	A: DoHH2; SU-DHL-6 B: K231 ^d C: OZ; SC1 ^d ; SU-DHL-16

a. La mayoría de los controles de la línea celular clonal se puede obtener en 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, Alemania)^{192,193}.

b. En la mayoría de los tubos múltiples solamente se necesita 1 U de TaqGold, pero se necesitan 2 U de TaqGold en los tubos A y B de *TCRB* porque contienen > 15 cebadores diferentes.

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

d. Las líneas celulares positivas a t(14;18) K231, OZ y SC1 fueron donadas amablemente por el Prof. Martin Dyer, University of Leicester, Leicester, GB.

Tabla 11. Intervalos de tamaños, bandas no específicas y método de detección en análisis de PCR múltiple de transposiciones de genes Ig/TCR y las anomalías cromosómicas t(11;14) y t(14;18)

PCR múltiple	Intervalo de tamaños (pb)	Bandas no específicas (pb)	Método de análisis preferido	Tiempo de operación en GeneScan: gel/capilar
<i>IGH</i> V _H -J _H	Tubo A: 310-360 Tubo B: 250-295 Tubo C: 100-170	Tubo A: ~85 Tubo B: - Tubo C: -	Análisis por GeneScanning y heterodúplex igualmente adecuados	3 - 3,5 horas/45 minutos
<i>IGH</i> D _H -J _H	Tubo D: 110-290 (D _H 1/2/4/5/6-J _H) +390-420 (D _H 3-J _H) Tubo E: 100-130	Tubo D: 350 ^a Tubo E: 211 ^b	Análisis de heterodúplex ligeramente preferido al <i>GeneScanning</i> (la variación de los tamaños de los productos obstaculiza el <i>GeneScanning</i>)	3 - 3,5 horas/45 minutos
<i>IGK</i>	Tubo A: 120-160 (Vκ1f/6/Vκ7-Jκ) +190-210 (Vκ3f-Jκ) +260-300 (Vκ2f/Vκ4/Vκ5-Jκ) Tubo B: 210-250 Vκ1f/6/Vκ7-Kde + 270-300 (Vκ3f/intrón-Kde) +350-390 (Vκ2f/Vκ4/Vκ5-Kde)	Tubo A: -4 Tubo B: ~404	Análisis de heterodúplex ligeramente preferido al <i>GeneScanning</i> (el pequeño tamaño de unión + la variación de tamaños de productos obstaculizan el <i>GeneScanning</i>)	3 - 3,5 horas/45 minutos
<i>IGL</i>	Tubo A: 140-165	Tubo A: -	Análisis de heterodúplex claramente preferido al <i>GeneScanning</i> (pequeños tamaños de unión obstaculiza el <i>GeneScanning</i>)	2 horas/45 minutos
<i>TCRB</i>	Tubo A: 240-285 Tubo B: 240-285 Tubo C: 170-210 (Dβ2) + 285-325 (Dβ1)	Tubo A: (273) ^c Tubo B: <150, 221 ^d Tubo C: 128, 337 ^d	Análisis de heterodúplex claramente preferido al <i>GeneScanning</i> (gama limitada, particularmente en caso de uso de ψVγ10 y ψVγ11)	2 horas/45 minutos
<i>TCRG</i>	Tubo A: 145-255 Tubo B: 80-220	Tubo A: - Tubo B: -	Análisis por GeneScanning y heterodúplex igualmente adecuados	2 horas/45 minutos

ES 2 442 791 T3

<i>TCRD</i>	Tubo A: 120-280	Tubo A: ~90	Análisis de heterodúplex claramente preferido al <i>GeneScanning</i> (baja cantidad de molde + variación de tamaños productos obstaculizan <i>GeneScanning</i>)	2 horas/45 minutos
<i>BCL1-IGH</i>	Tubo A: 150-2000	Tubo A: ~550 (débil)	agarosa	NA ^e
<i>BCL2-IGH</i>	Tubo A: variable Tubo B: variable Tubo C: variable	Tubo A: - Tubo B: - Tubo C: -	agarosa	NA ^e

- a. La banda no específica de 350 pb es el resultado de la asociación cruzada del cebador para D_H2 a una secuencia en la región aguas arriba de J_H4. En *GeneScanning* esta banda no específica no migra conjuntamente con los productos D-J (véase la Figura 5B).
- b. El producto de PCR de 211 pb representa la banda de fondo más pequeña procedente de la región D_H7-J_H1 de la línea germinal. Cuando la amplificación por PCR es muy eficaz, también podrían obtenerse productos de PCR más largos debido a la asociación del cebador con las transposiciones génicas J_H aguas abajo; por ejemplo, 419 pb (D_H7-J_H2), 1031 pb (D_H7-J_H3), 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 una banda no específica depende de la calidad del cebador.
- e. NA= no aplicable.

REIVINDICACIONES

1. Un conjunto de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos capaz de amplificar una translocación cromosómica t(14;18) en *BCL2-IGH*, que comprende al menos un cebador directo y al menos un cebador inverso, en donde dicho cebador directo se selecciona de los cebadores para MBR, los cebadores para 3'MBR y los cebadores para mcr mostrados en la Fig. 11A, y en donde dicho cebador inverso es el cebador de consenso para J_H mostrado en la Fig. 11A.
2. El conjunto de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde uno o más de los cebadores directos se seleccionan de los cebadores para MBR mostrados en la Fig. 11A.
3. El conjunto de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde uno o más de los cebadores directos se seleccionan de los cebadores para 3'MBR mostrados en la Fig. 11A.
4. El conjunto de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 1, en donde uno o más de los cebadores directos se seleccionan de los cebadores para mcr mostrados en la Fig. 11A.
5. Un ensayo de amplificación de ácidos nucleicos, preferiblemente un ensayo de PCR, más preferiblemente un ensayo de PCR múltiple, que usa al menos un conjunto de cebadores de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3 o 4.
6. El ensayo de amplificación de ácidos nucleicos de la reivindicación 5, caracterizado porque es un ensayo de PCR.
7. El ensayo de amplificación de ácidos nucleicos de la reivindicación 5 o 6, caracterizado porque es un ensayo de PCR múltiple, que comprende además uno o más de los conjuntos de cebadores elegidos del grupo que consiste en:
 - a. un conjunto de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos capaz de amplificar una transposición V_H-J_H en *IGH*, que comprende al menos un cebador directo y un cebador inverso, en donde dicho cebador directo se selecciona de cebadores de la familia V_H mostrada en la Fig. 3B, y en donde dicho cebador inverso es el cebador de consenso para J_H mostrado en la Fig. 3B.
 - b. un conjunto de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos capaz de amplificar una transposición D_H-J_H en *IGH*, que comprende al menos un cebador directo y un cebador inverso, en donde dicho cebador directo se selecciona los cebadores de la familia D_H mostrada en la Fig. 4A, y en donde dicho cebador inverso es el cebador de consenso para J_H mostrado en la Fig. 4A.
 - c. un conjunto de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos capaz de amplificar una transposición V_k-J_k en *IGK*, que comprende al menos un cebador directo y al menos un cebador inverso, en donde dicho cebador directo se selecciona de cebadores de la familia V_k mostrada en la Fig. 5B, y en donde dicho cebador inverso se selecciona de los cebadores para J_k mostrados en la Fig. 5B.
 - d. un conjunto de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos capaz de amplificar una transposición V_k/intrón-Kde en *IGK*, que comprende al menos un cebador directo y un cebador inverso, en donde dicho cebador directo se selecciona de los cebadores V_k o el cebador INTR mostrado en la Fig. 5B, y en donde dicho cebador inverso es el cebador para Kde mostrado en la Fig. 5B.
 - e. un conjunto de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos capaz de amplificar una transposición V_λ-J_λ en *IGL*, que comprende al menos un cebador directo y un cebador inverso, en donde dicho cebador directo se selecciona de los cebadores V_λ mostrados en la Fig. 6B, y en donde dicho cebador inverso es el cebador para J_λ mostrado en la Fig. 6B.
 - f. un conjunto de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos capaz de amplificar una transposición V_β-J_β en *TCRB*, que comprende al menos un cebador directo y al menos un cebador inverso, en donde dicho cebador directo se selecciona de cebadores de la familia V_β mostrados en la Fig. 7B y en donde dicho cebador inverso se selecciona de los cebadores para J_{βA} y J_{βB} mostrados en la Fig. 7B.
 - g. un conjunto de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos capaz de amplificar una transposición D_β-J_β en *TCRB*, que comprende al menos un cebador directo y al menos un cebador inverso, en donde dicho cebador directo se selecciona de cebadores de la familia D_β mostrados en la Fig. 7B y en donde dicho cebador inverso se selecciona de los cebadores para J_{βA} y J_{βB} mostrados en la Fig. 7B.
 - h. un conjunto de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos capaz de amplificar una transposición V_γ-J_γ en *TCRG*, que comprende al menos un cebador directo y al menos un cebador inverso, en donde dicho cebador directo se selecciona de cebadores de la familia V_γ mostrados en la Fig. 8B, y en donde dicho cebador inverso se selecciona de los cebadores para J_γ mostrados en la Fig. 8B.
 - i. un conjunto de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos capaz de amplificar una transposición V_δ-J_δ en *TCRD*, que comprende al menos un cebador directo y al menos un cebador inverso, en donde dicho cebador directo se selecciona de los cebadores V_δ mostrados en la Fig. 9B, y en donde dicho cebador inverso se selecciona de los cebadores para J_δ mostrados en la Fig. 9B.
 - j. un conjunto de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos capaz de amplificar una transposición D_δ-D_δ en *TCRD*, que comprende un cebador directo y un cebador inverso, en donde dicho cebador directo es el cebador D_{δ2} mostrado en la Fig. 9B, y en donde dicho cebador inverso es el cebador para D_{δ3} mostrado en la Fig. 9B.

- k. un conjunto de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos capaz de amplificar una transposición D δ -J δ en *TCRD*, que comprende un cebador directo y al menos un cebador inverso, en donde dicho cebador directo es el cebador para D δ 2 mostrado en la Fig. 9B, y en donde dicho cebador inverso se selecciona de los cebadores para J δ mostrados en la Fig. 9B.
- 5 l. un conjunto de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos capaz de amplificar una transposición V δ -D δ en *TCRD*, que comprende al menos un cebador directo y un cebador inverso, en donde dicho cebador directo se selecciona de los cebadores para V δ mostrados en la Fig. 9B, y en donde dicho cebador inverso es el cebador para D δ 3 mostrado en la Fig. 9B.
- 10 m. un conjunto de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos 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 para BCL1/MTC mostrado en la Fig. 10A, y en donde dicho cebador inverso es el cebador de consenso para J_H mostrado en la Fig. 10A.
- 15 n. un conjunto de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos 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.
- o. un conjunto de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos capaz de amplificar el gen de la proteína activante de 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.
- 20 p. un conjunto de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos capaz de amplificar la proteína 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.
- 25 q. un conjunto de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos 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, y
- r. un conjunto de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos 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.
- 30 8. Un método para detectar una translocación cromosómica t(14;18) en *BCL2-IGH*, que comprende usar uno o más conjuntos de cebadores de acuerdo con las reivindicaciones 1-4 en un ensayo de amplificación de ácidos nucleicos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-7.
- 35 9. Un método para detectar dos o más transposiciones, dos o más translocaciones o al menos una transposición y al menos una translocación, seleccionadas del grupo que consiste en una transposición V_H-J_H en *IGH*, una transposición D_H-J_H en *IGH*, una transposición V_k-J_k en *IGK*, una transposición V_k/intrón-Kde en *IGK*, una transposición V λ -J λ en *IGL*, una transposición V β -J β en *TCRB*, una transposición D β -J β en *TCRB*, una transposición V γ -J γ en *TCRG*, una transposición V δ -J δ en *TCRD*, una transposición D δ -D δ en *TCRD*, una transposición D δ -J δ en *TCRD*, una transposición V δ -D δ en *TCRD*, una translocación t(11;14)(*BCL1-IGH*) y una translocación t(14;18)(*BCL2-IGH*), usando un ensayo de amplificación de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicha transposición comprende al menos una translocación cromosómica t(14;18) en *BCL2-IGH*
- 40 10. Un método para determinar transposiciones clonales, que comprenden al menos una translocación cromosómica t(14;18) en *BCL2-IGH* usando al menos el conjunto de cebadores de acuerdo con la reivindicación y opcionalmente al menos un conjunto de cebadores como los definidos en la reivindicación 7a-7m.
- 45 11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, para la detección de una enfermedad mínima residual (MRD) o para la identificación de dianas para PCR que se han de usar para la detección de MRD por una PCR cuantitativa en tiempo real.
12. Un método de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en donde se detecta un ácido nucleico amplificado usando un análisis automático de fragmentos de PCR de alta resolución.
- 50 13. Un kit para la detección de al menos una translocación cromosómica t(14;18) en *BCL2-IGH* y opcionalmente una transposición seleccionada del grupo que consiste en: una transposición V_H-J_H en *IGH*, una transposición D_H-J_H en *IGH*, una transposición V_k-J_k en *IGK*, una transposición V_k/intrón-Kde en *IGK*, una transposición V λ -J λ en *IGL*, una transposición V β -J β en *TCRB*, una transposición D β -J β en *TCRB*, una transposición V γ -J γ en *TCRG*, una transposición V δ -J δ en *TCRD*, una transposición D δ -D δ en *TCRD*, una transposición D δ -J δ en *TCRD*, y una translocación t(11;14)(*BCL1-IGH*), que comprende usar al menos el conjunto de cebadores de acuerdo con la reivindicación 1, y opcionalmente al menos un conjunto de cebadores como los definidos en la reivindicación 7a-7m.
- 55 14. Un kit de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende además al menos un conjunto de cebadores como los definidos en la reivindicación 7n-7r.
- 60 15. Uso de un método de acuerdo con la reivindicación 11, para determinar la calidad de una muestra de DNA

extraída de una muestra biológica, preferiblemente una muestra biológica embebida en parafina.

5 16. El conjunto de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además cebadores directos que comprenden los cebadores V β , D β 1, D β 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
10 cebadores de la familia V $_k$ y los cebadores para INTR mostrados en la Fig. 5B, los cebadores para V λ mostrados en la Fig. 6B, los cebadores de la familia V $_y$ mostrados en la Fig. 8B, los cebadores para V δ y D δ 2 mostrados en la Fig. 9B, el cebador para BCL1/MTC mostrado en la Fig. 10A, y los cebadores para 3'MBR y mcr mostrados en la Fig. 11A y los cebadores inversos que comprenden los cebadores para J β A y J β B mostrados en la Fig. 7B, el cebador de consenso para J $_H$ mostrado en las Figuras 3B, 4A, 10A y la Fig. 11A, los cebadores para J $_k$ y K $_d$ e mostrados en la
15 Fig. 5B, el cebador para J λ mostrado en la Fig. 6B, los cebadores para J $_y$ mostrados en la Fig. 8B y los cebadores para J δ y D δ 3 mostrados en la Fig. 9B

17. El conjunto de cebadores para amplificación de ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 16, que comprende además los cebadores directos que comprenden a su vez los cebadores TBXAS1/X9U, RAG1/X2U, PLZF/X1U, AF4/X3U, AF4/X11U de la Fig. 12A y los cebadores inversos que
15 comprenden a su vez los cebadores TBXAS1/X9L, RAG1/X2L, PLZF/X1L, AF4/X3L, AF4/X11L de la Fig. 12A.

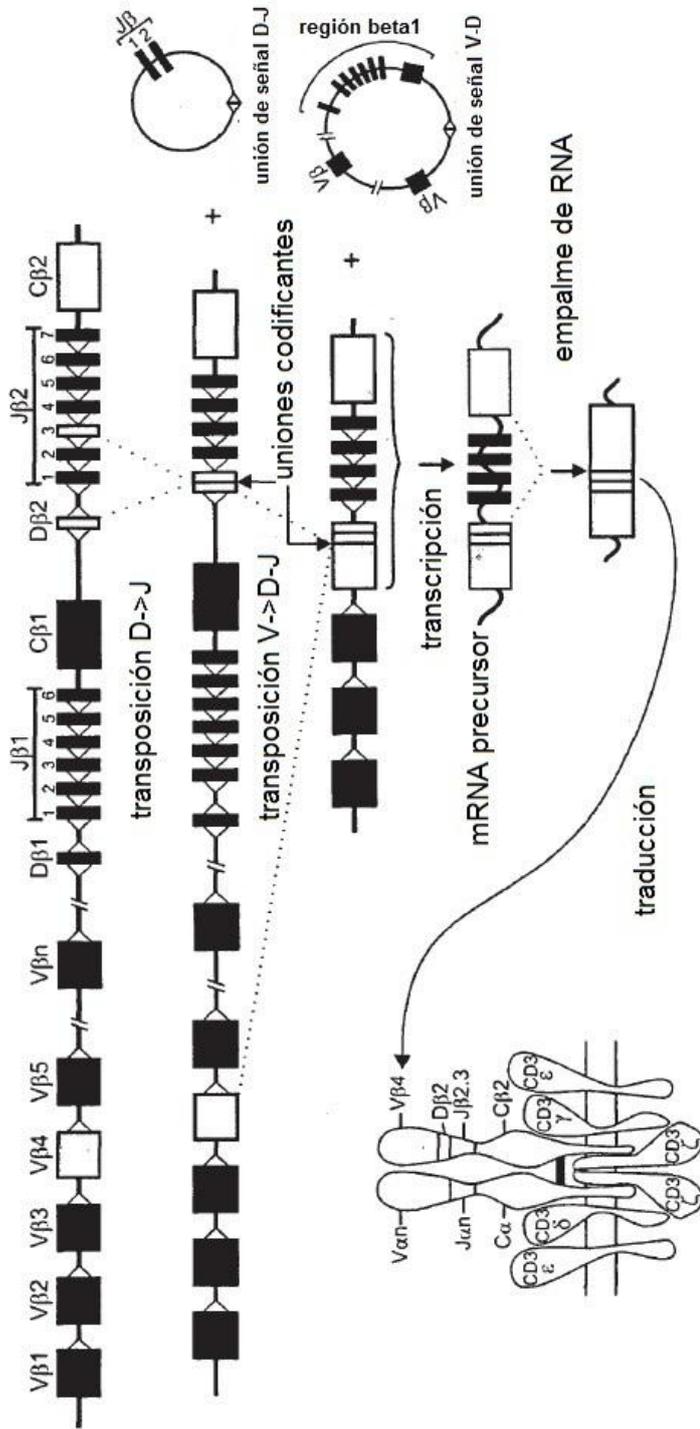


Fig. 1

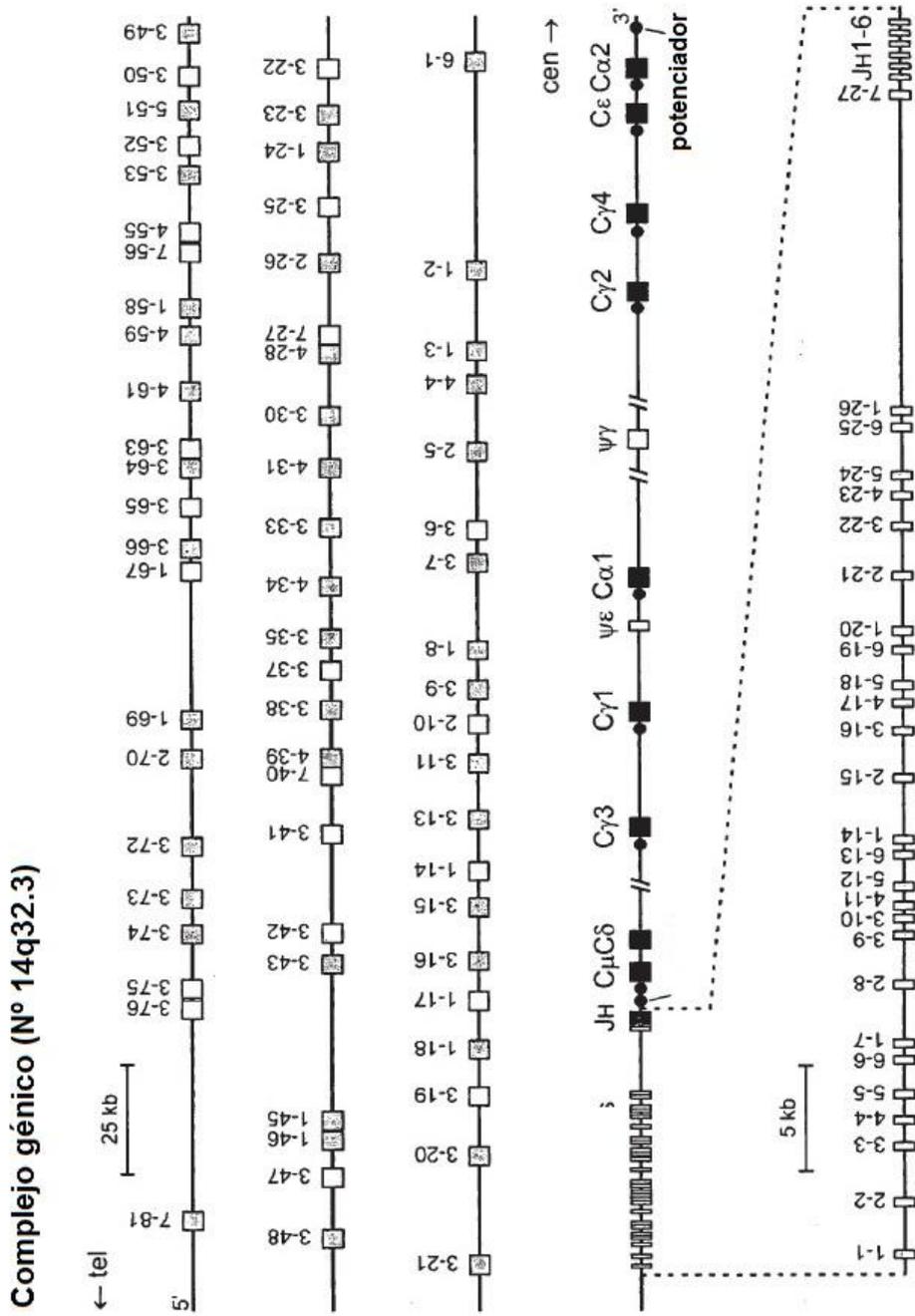


Fig. 3A

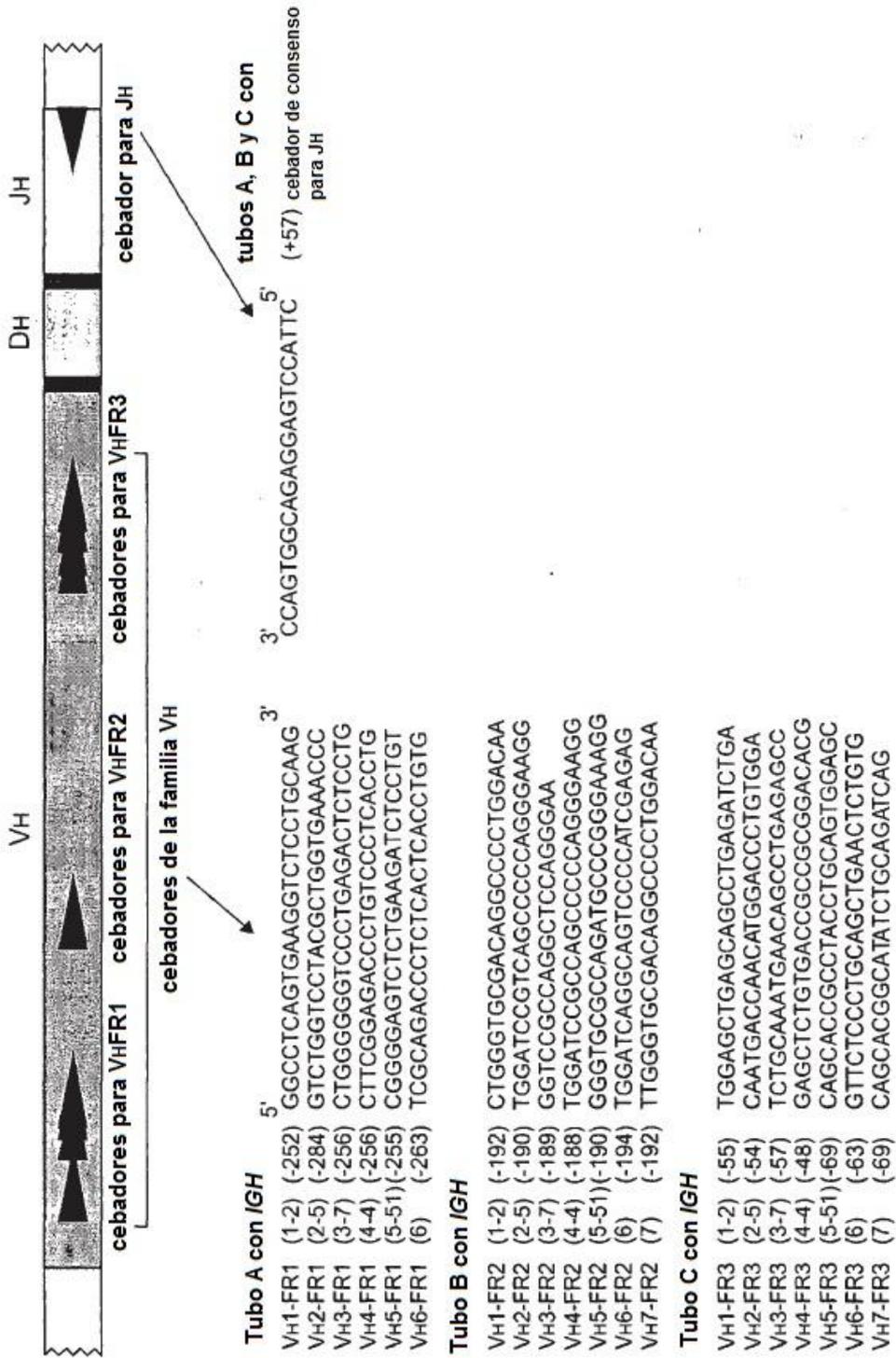


Fig. 3B

VH FR1-JH en tubo A con IGH

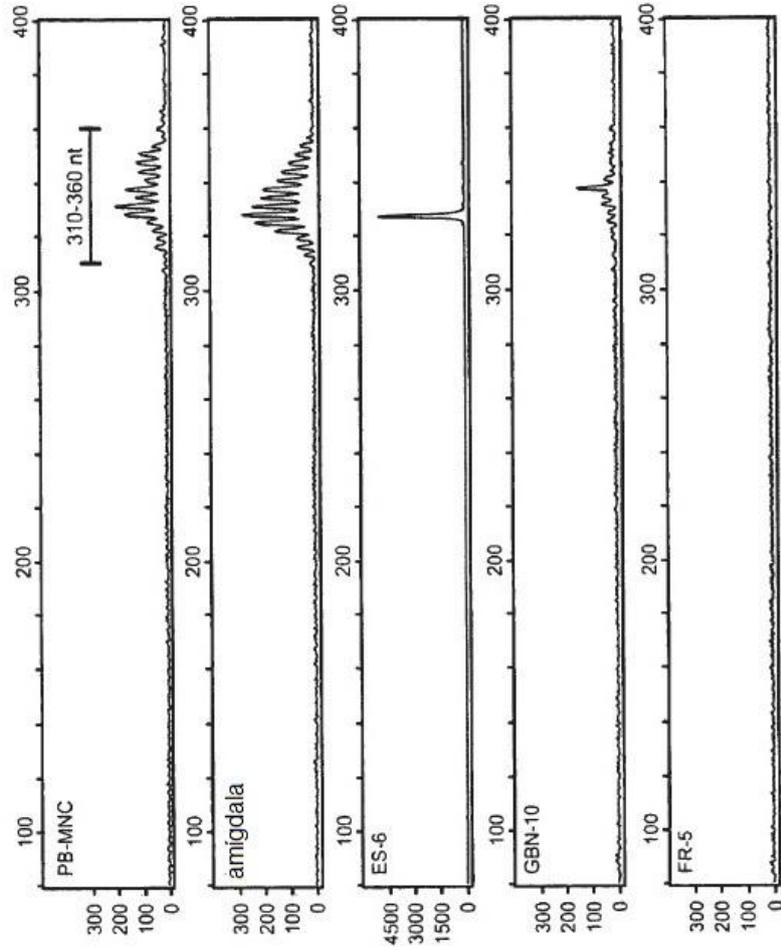
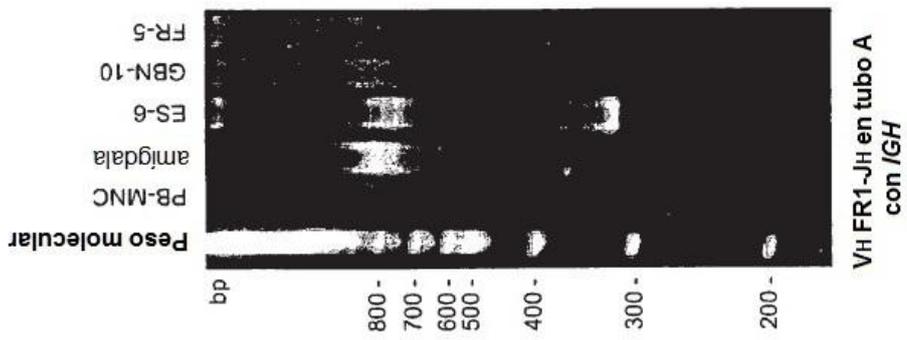


Fig. 3C

VH FR2-JH en tubo B con IGH

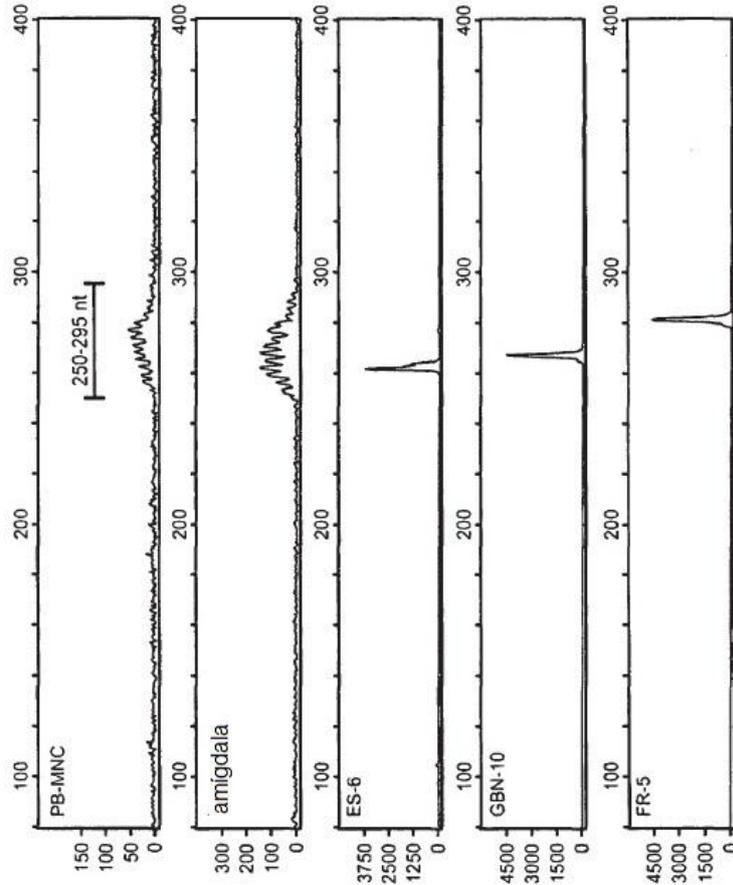
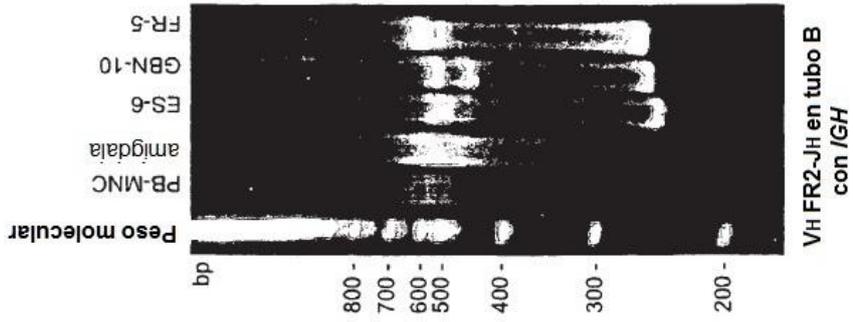


Fig. 3D

VH FR3-JH en tubo C con IGH

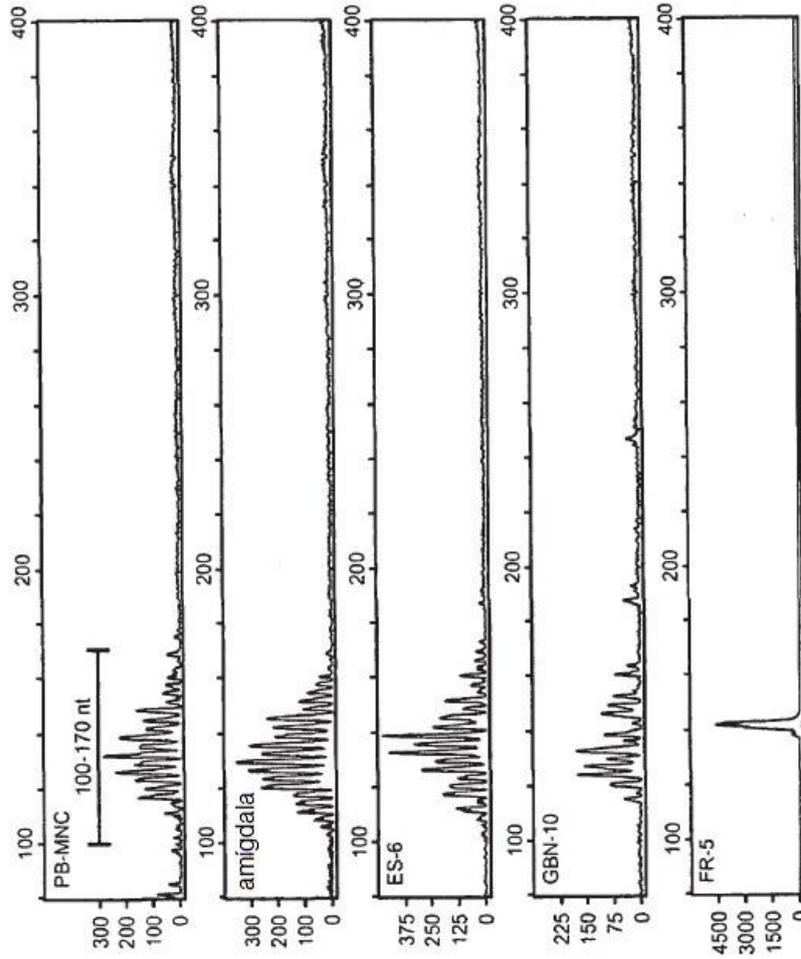
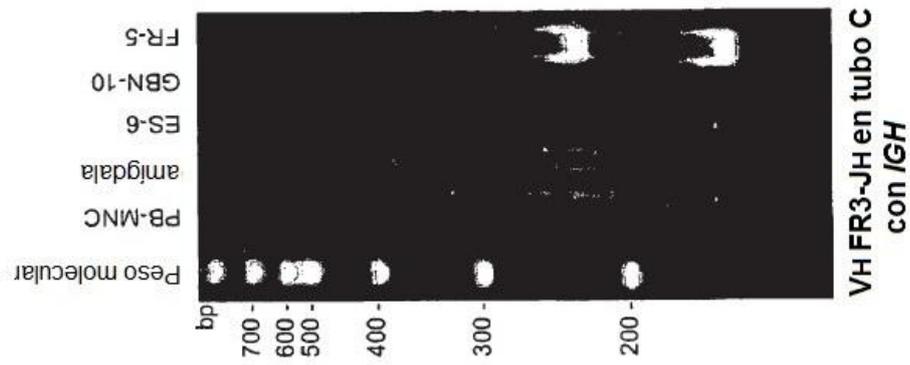


Fig. 3E

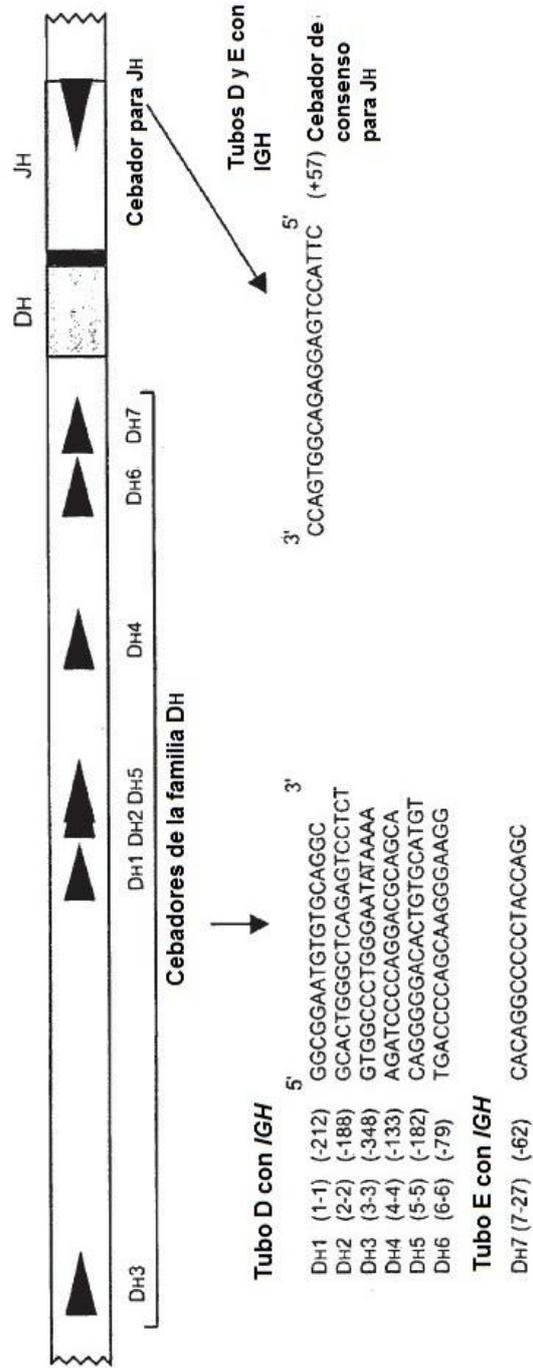


Fig. 4A

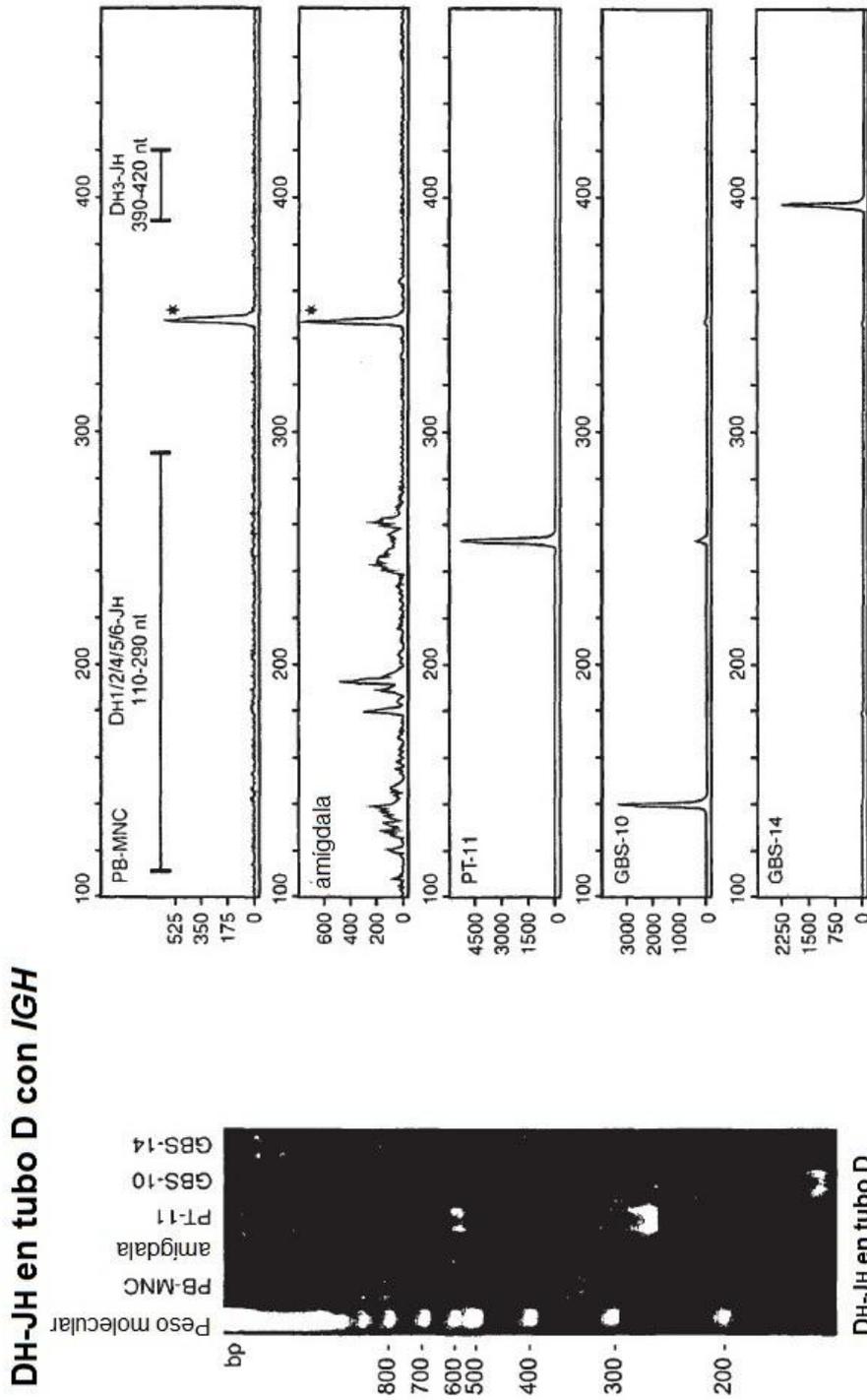


Fig. 4B

DH7-JH en tubo E con /GK

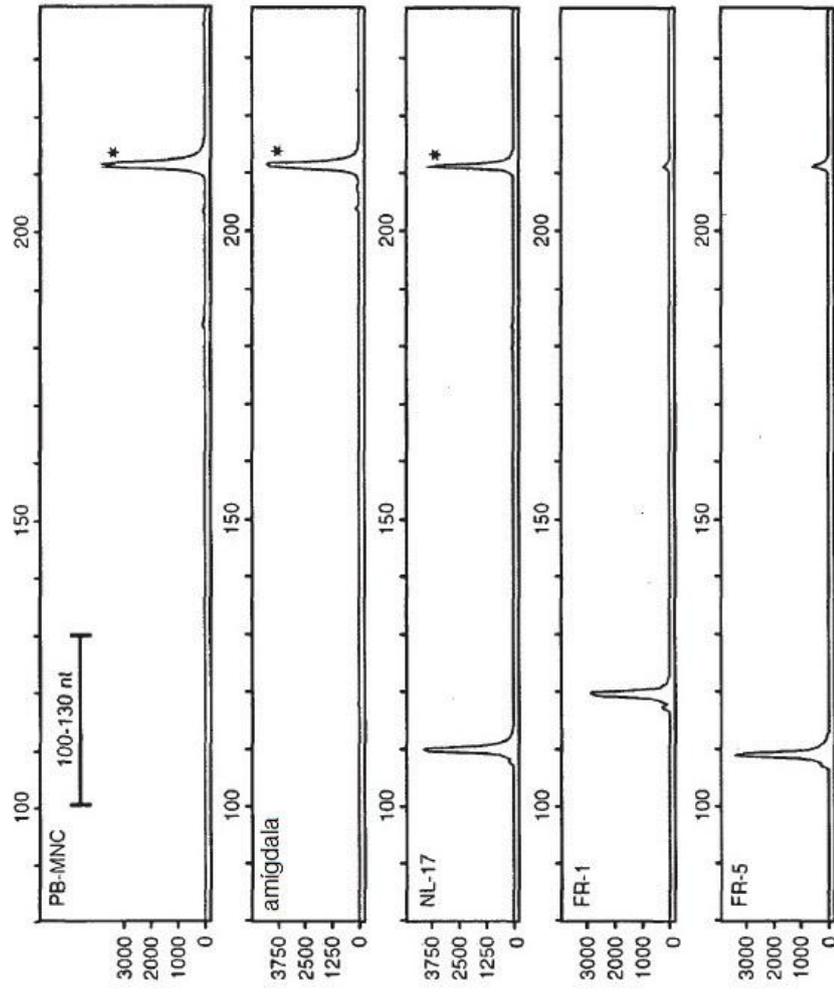
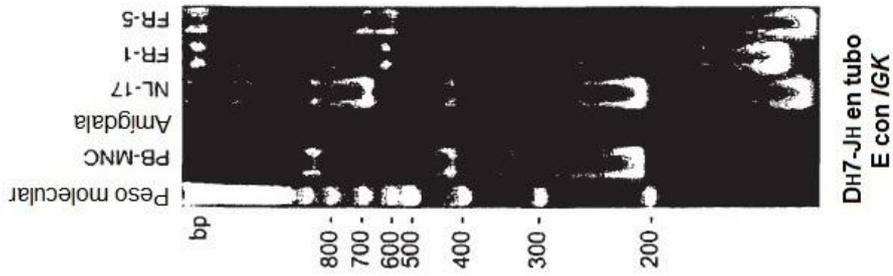


Fig. 4C

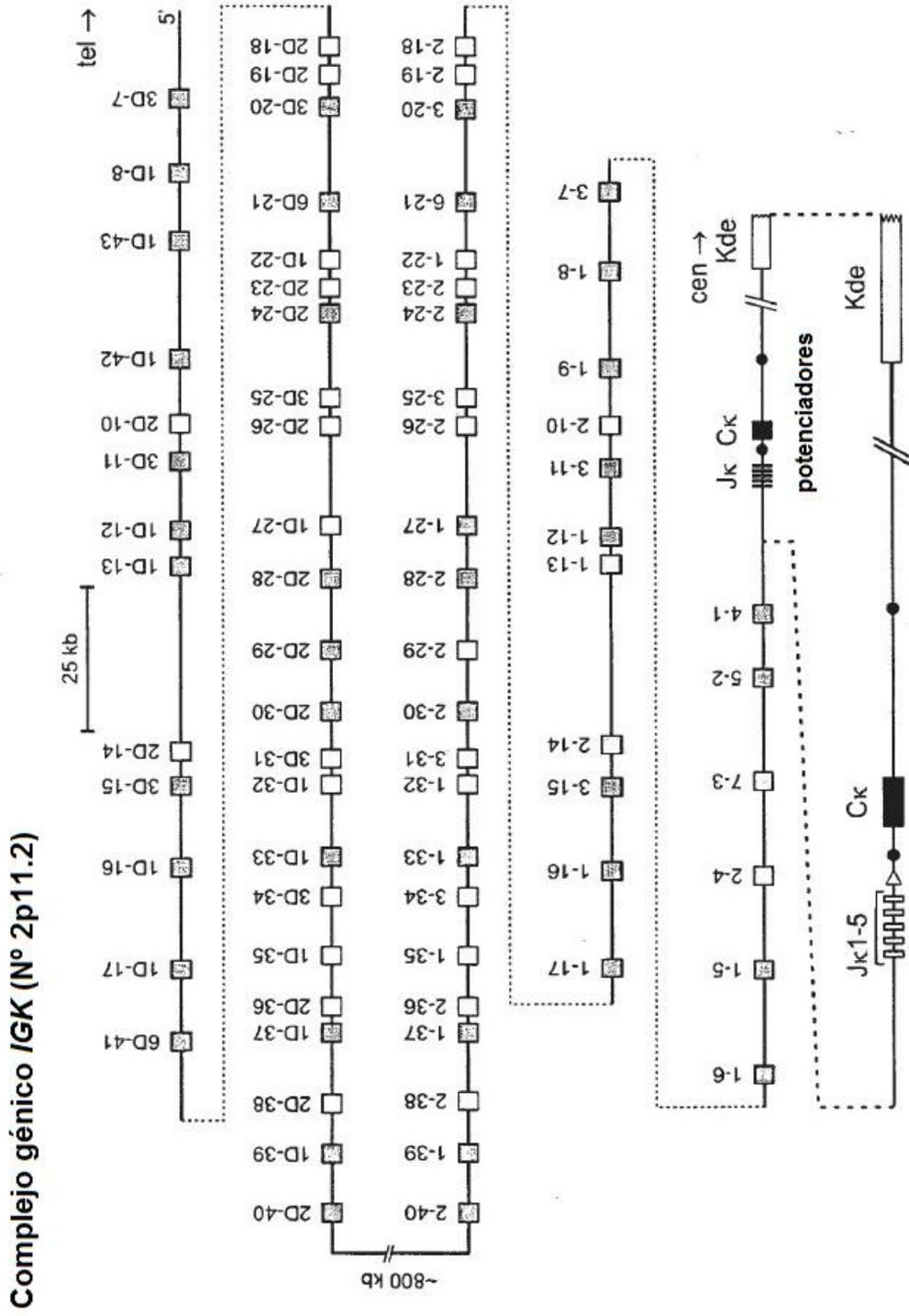


Fig. 5A

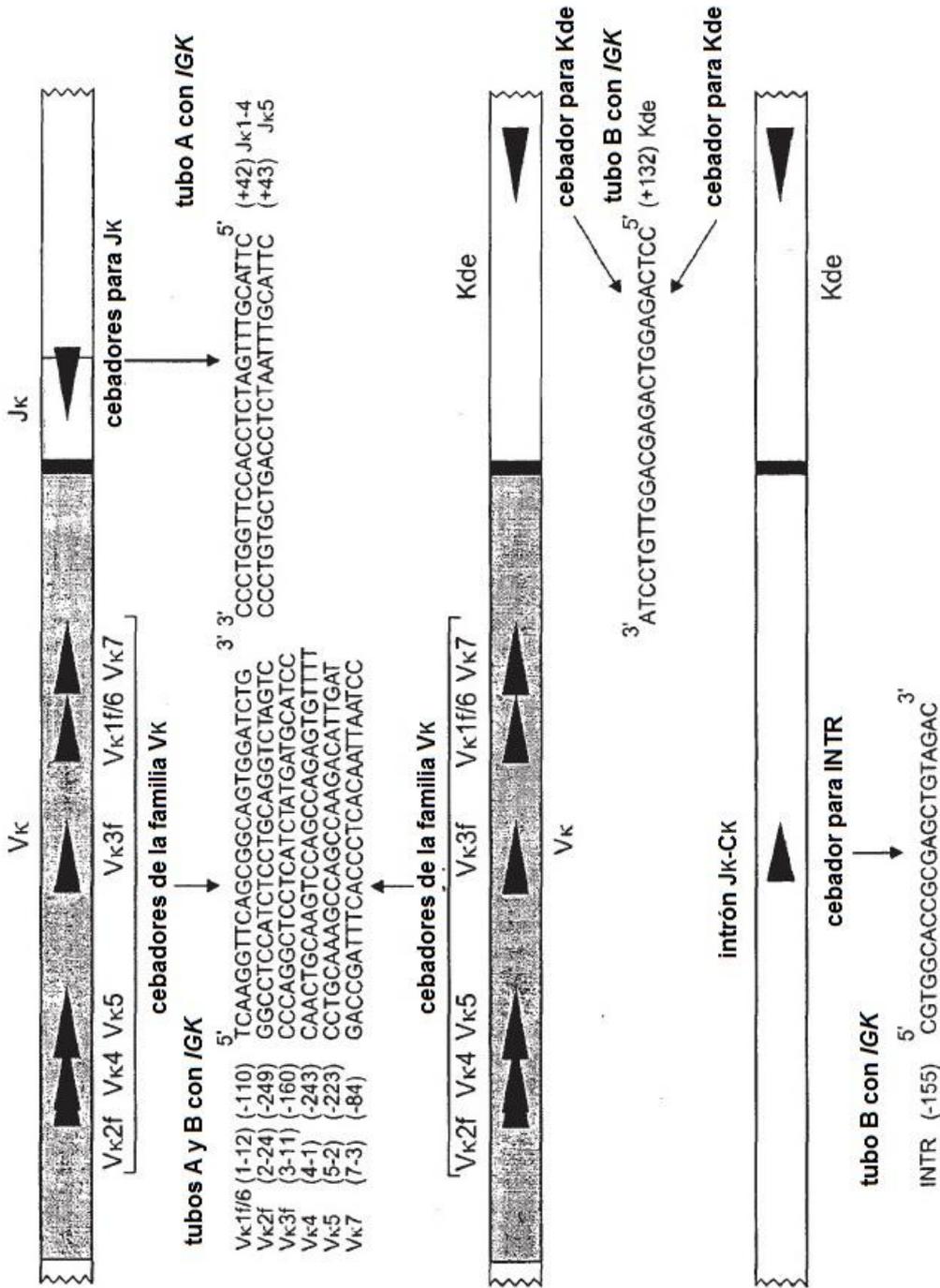


Fig. 5B

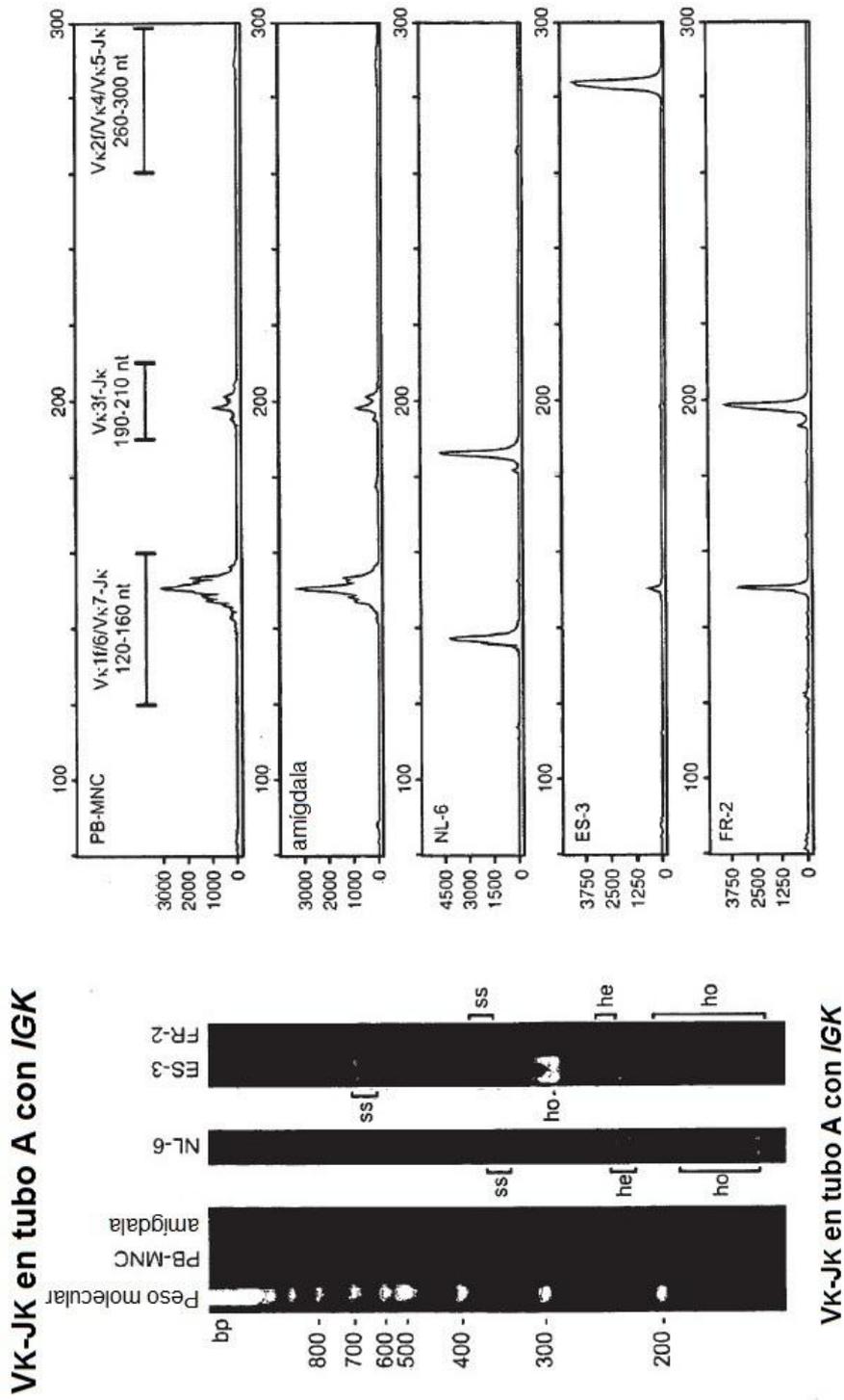
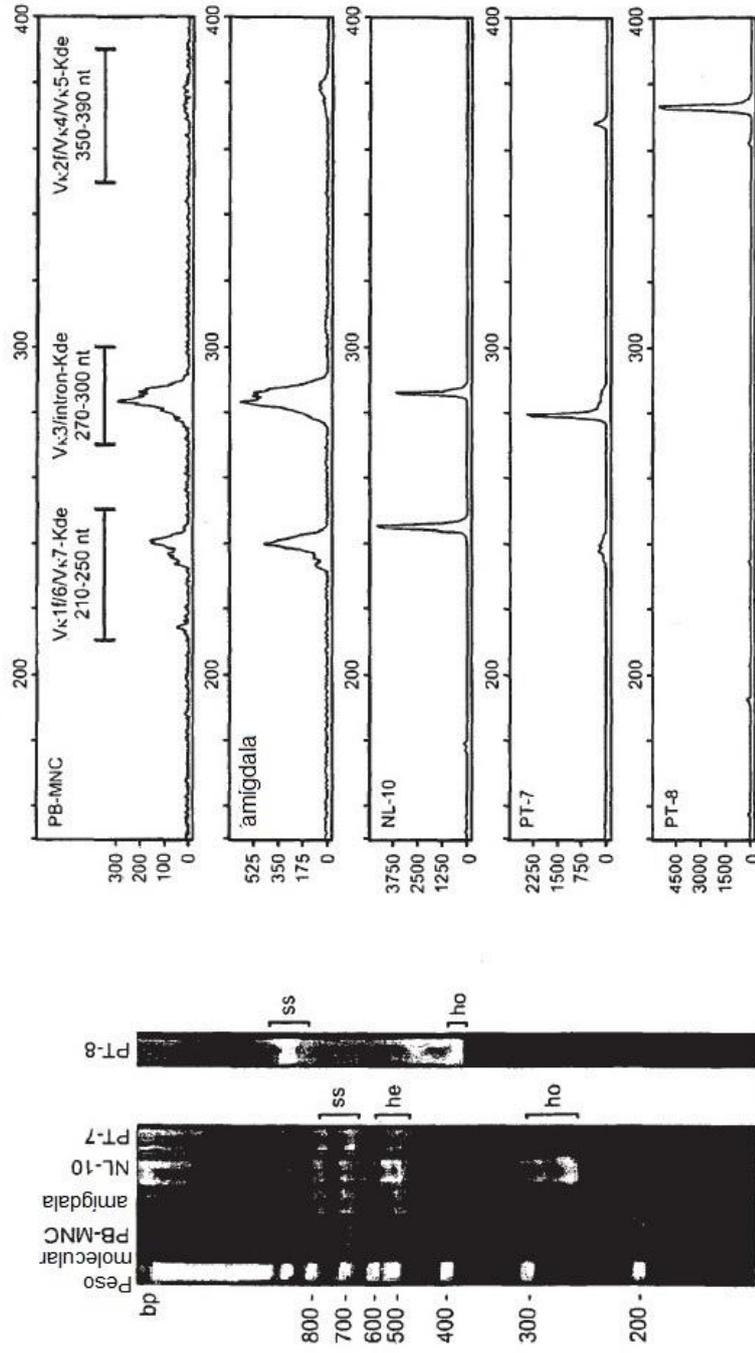


Fig. 5C

Vκ/intrón-Kde en tubo B con IGK



Vκ en tubo B con IGK

Fig. 5D

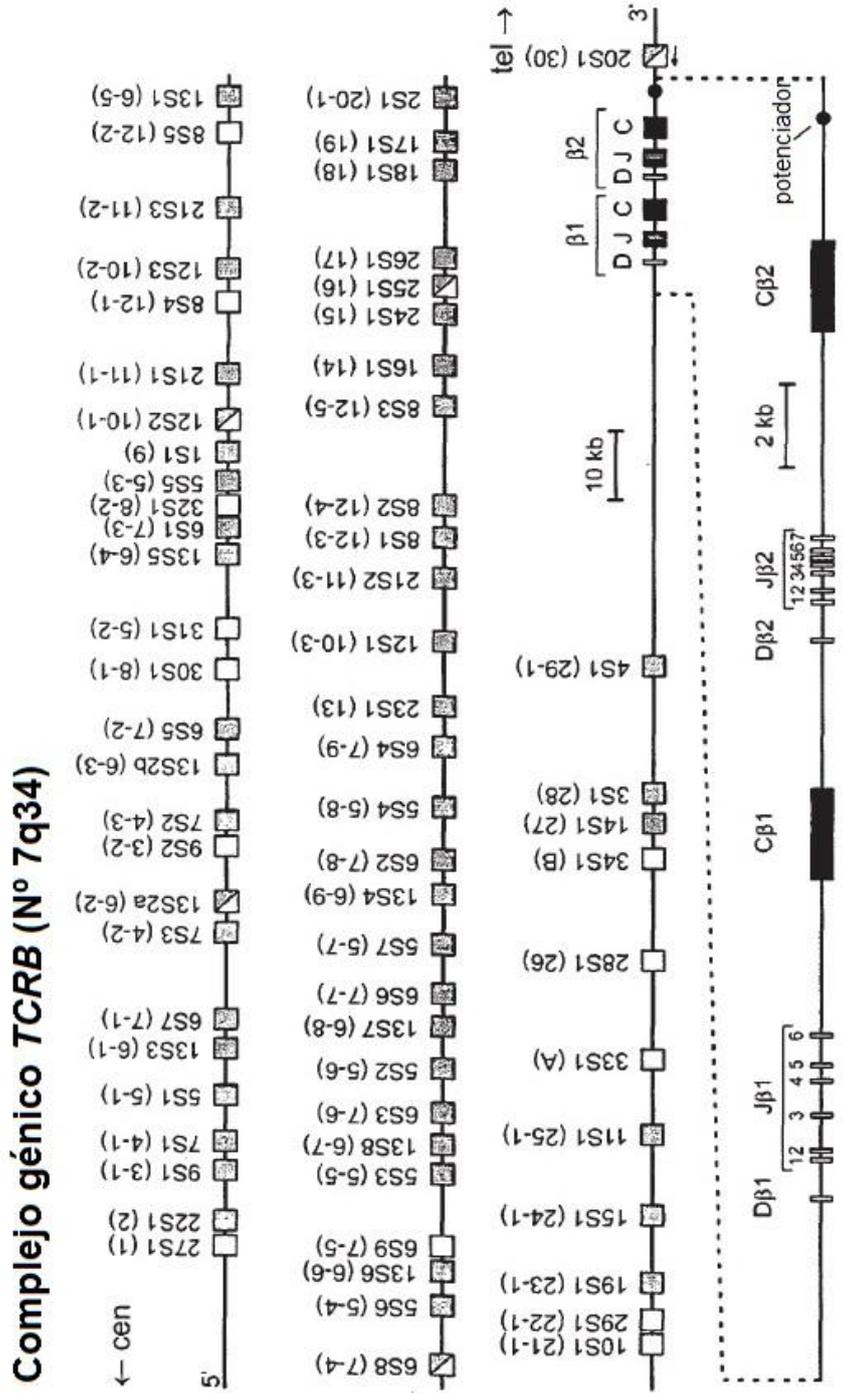


Fig. 7A

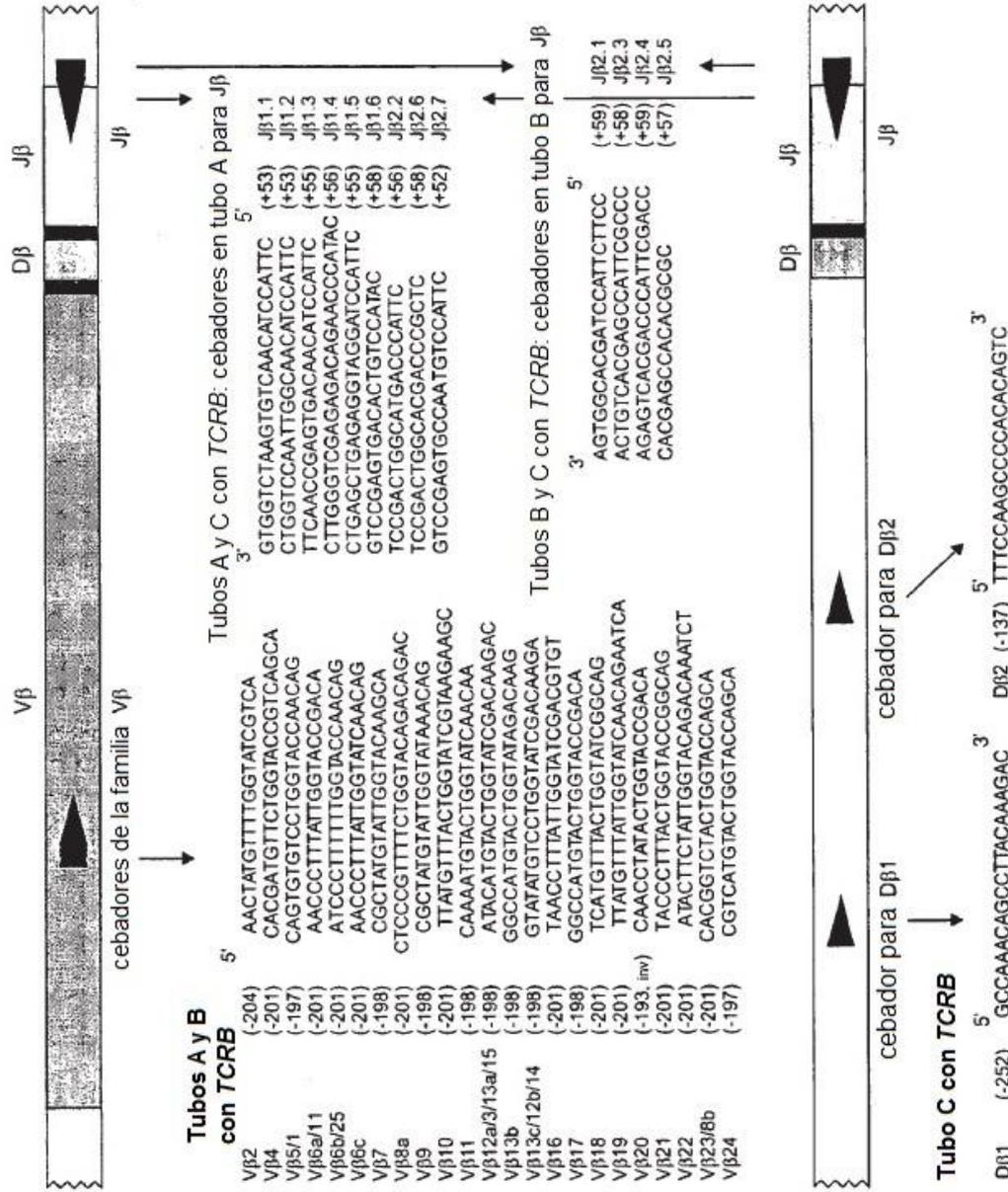


Fig. 7B

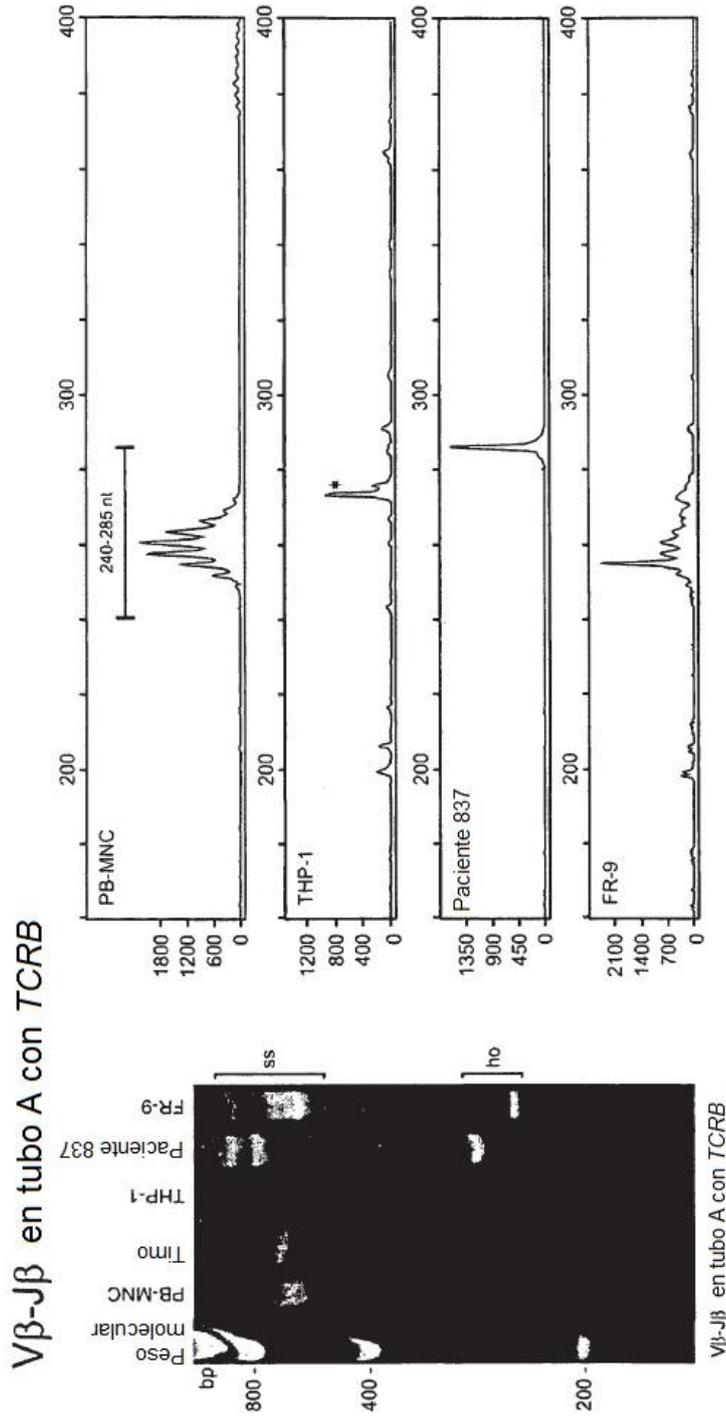


Fig. 7C

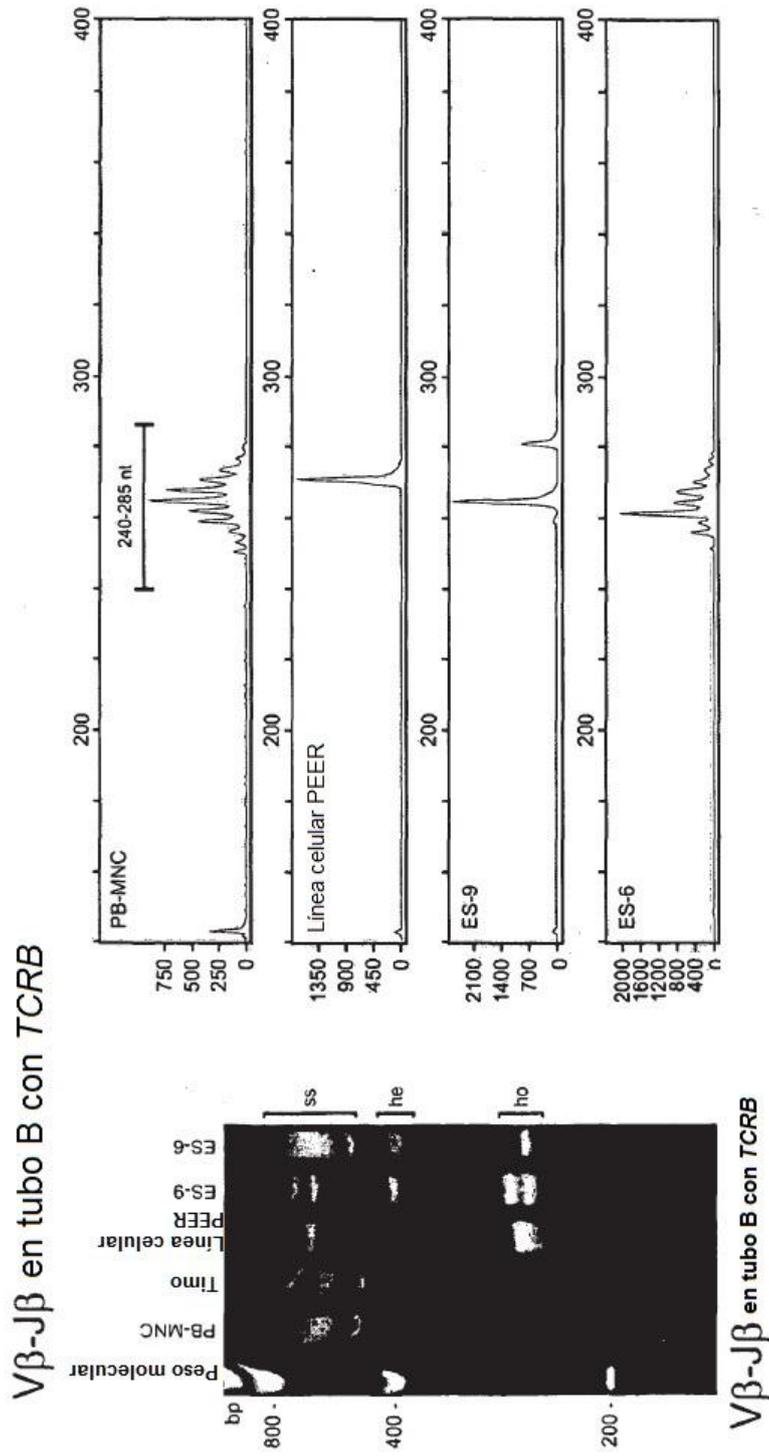


Fig. 7D

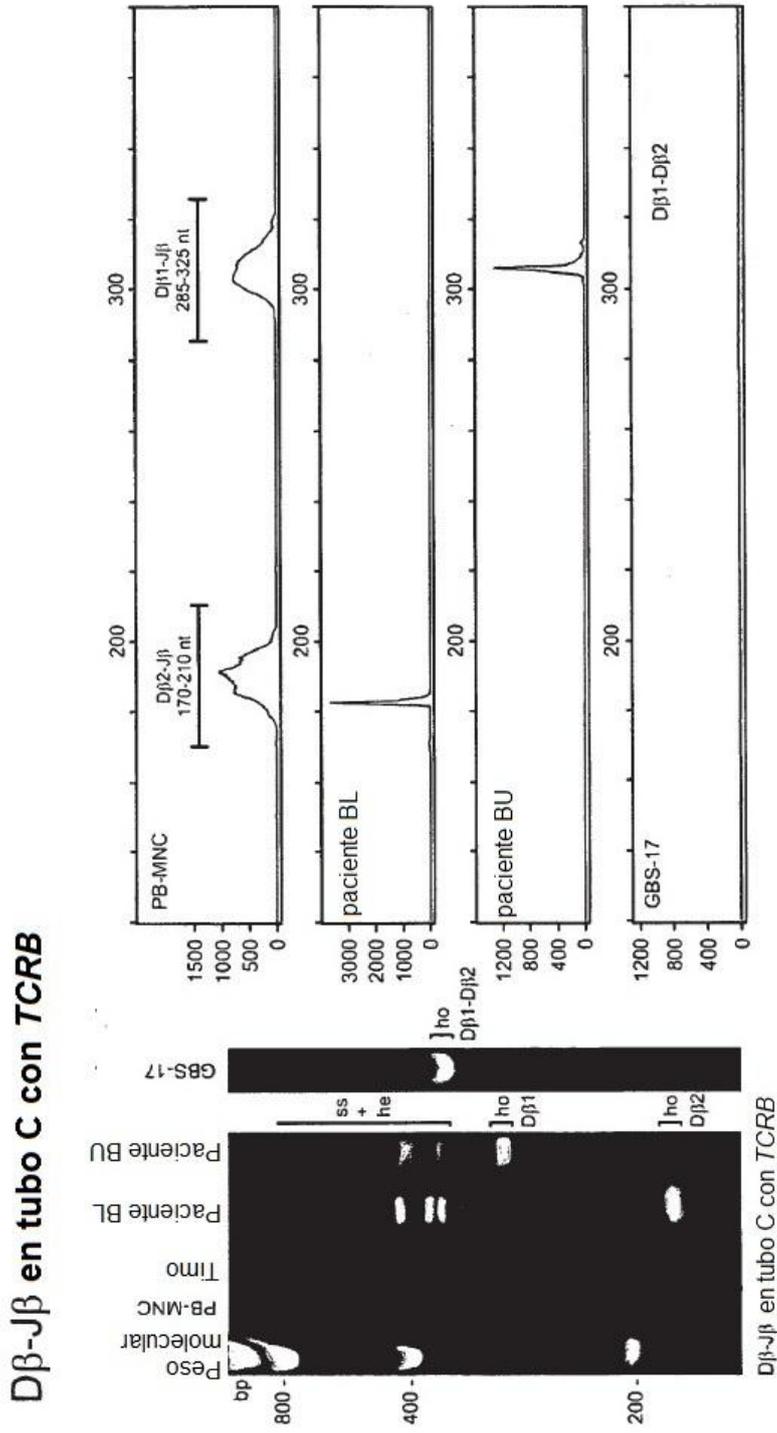


Fig. 7E

Complejo génico (N° 7p14)

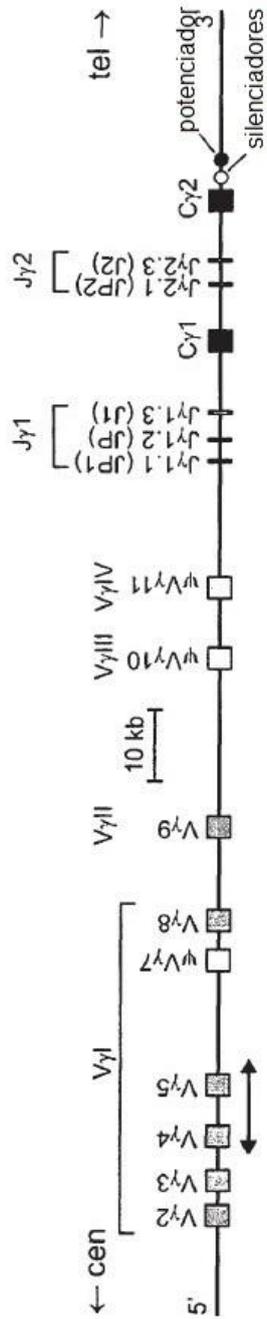


Fig. 8A

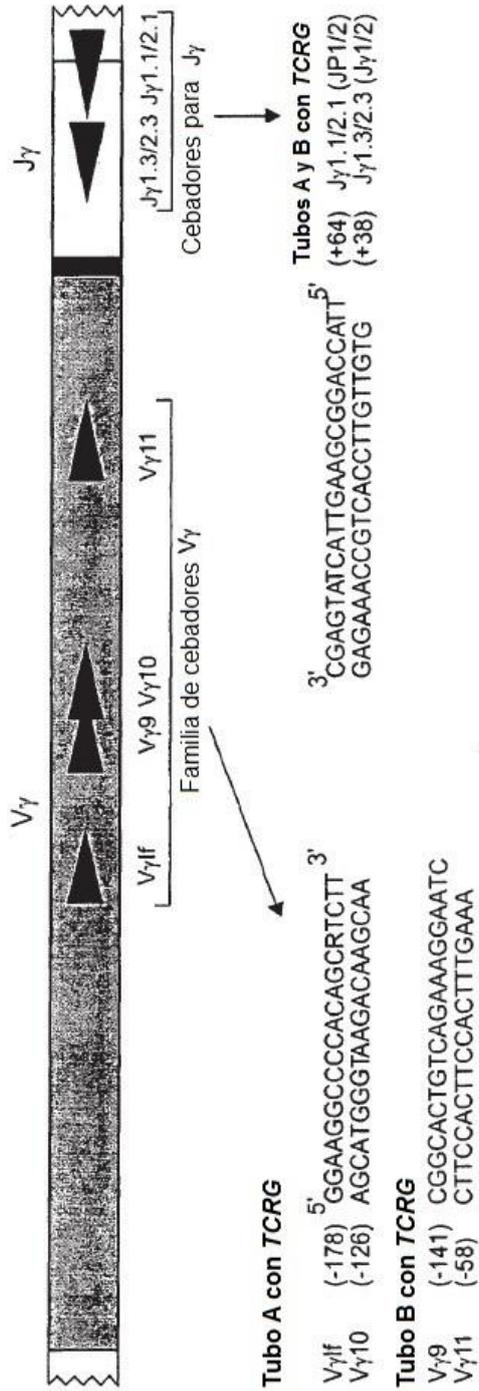


Fig. 8B

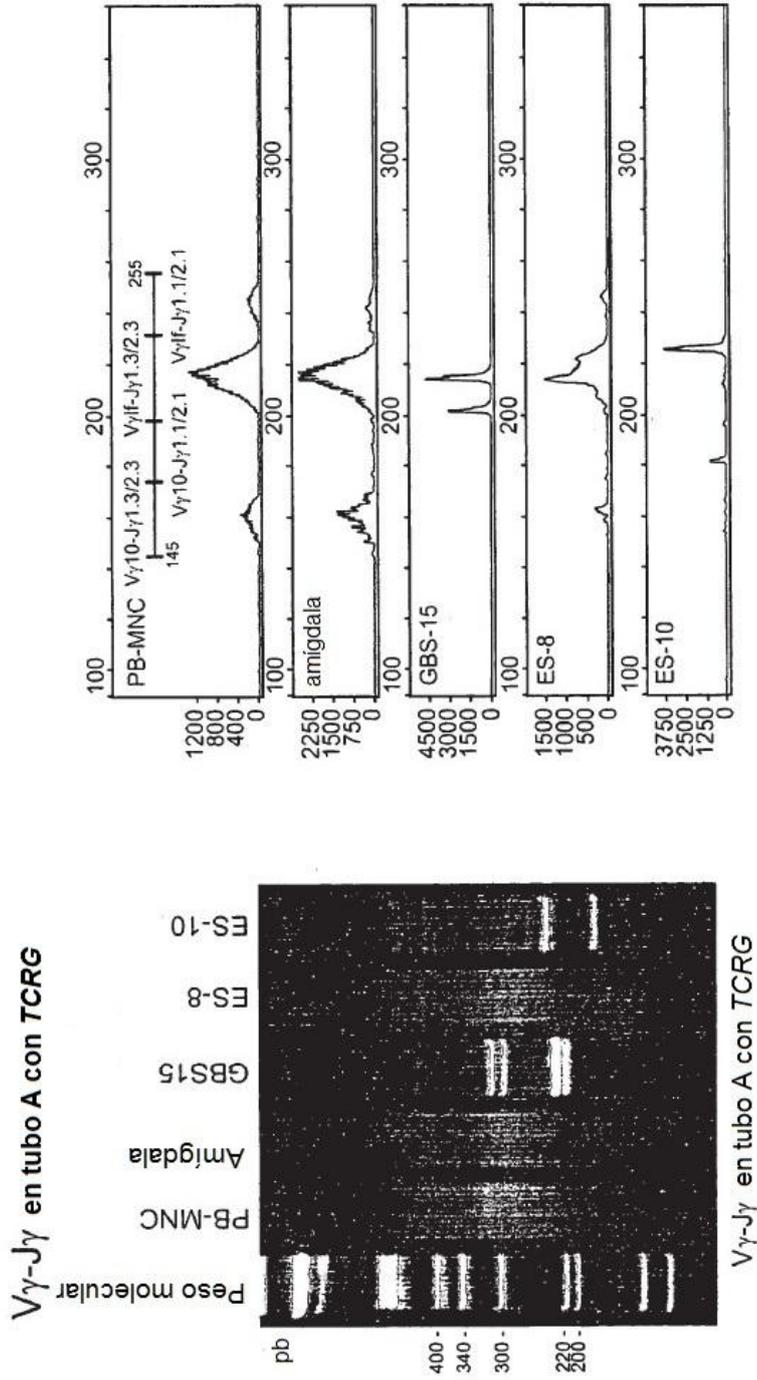


Fig. 8C

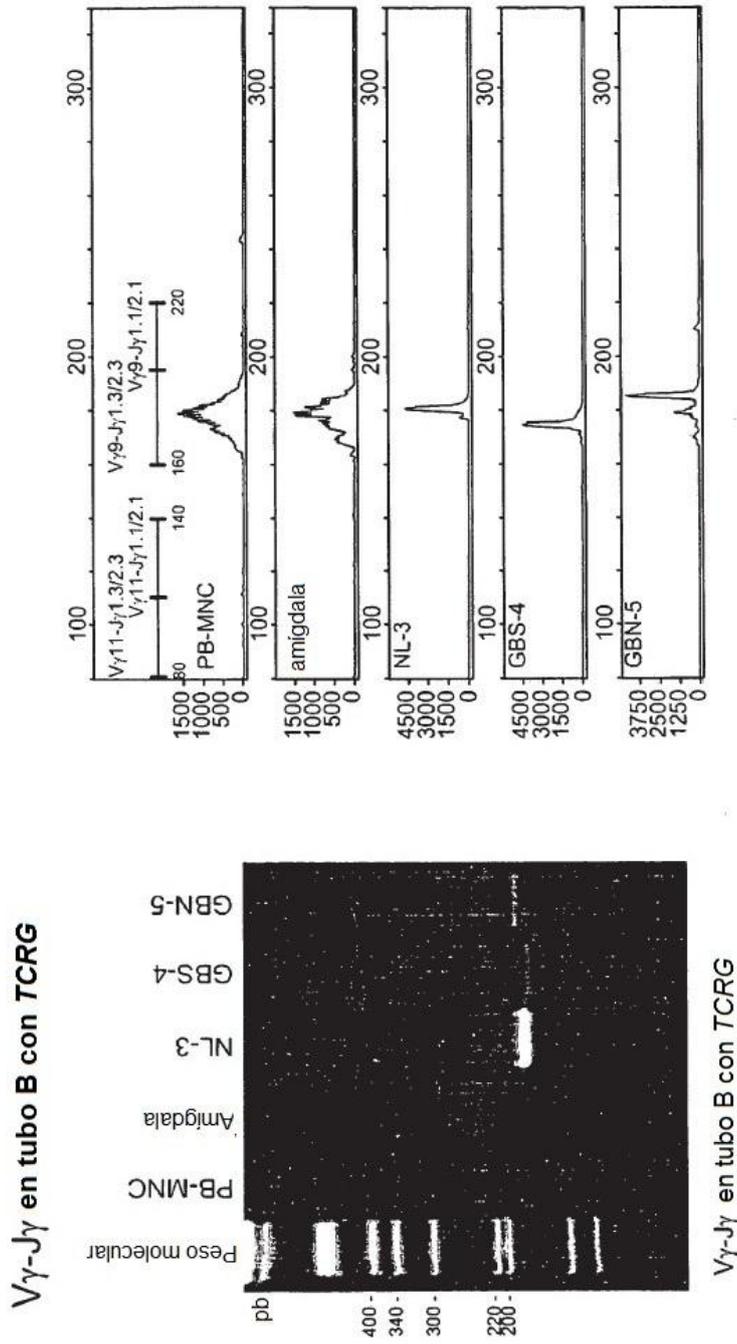


Fig. 8D

Complejo génico TCRD (N° 14q11.2)

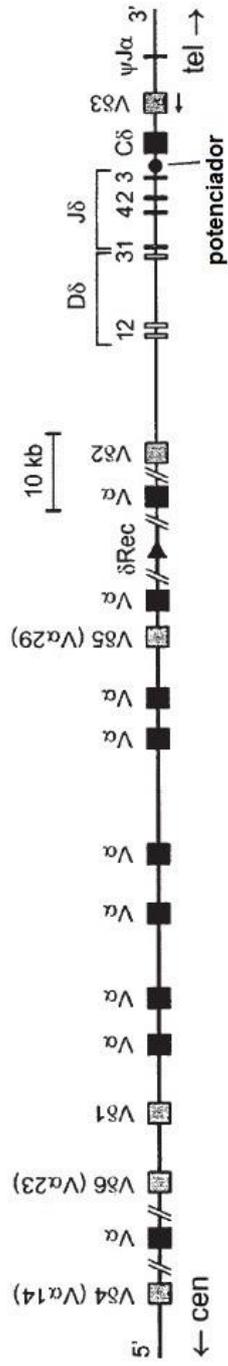


Fig. 9A

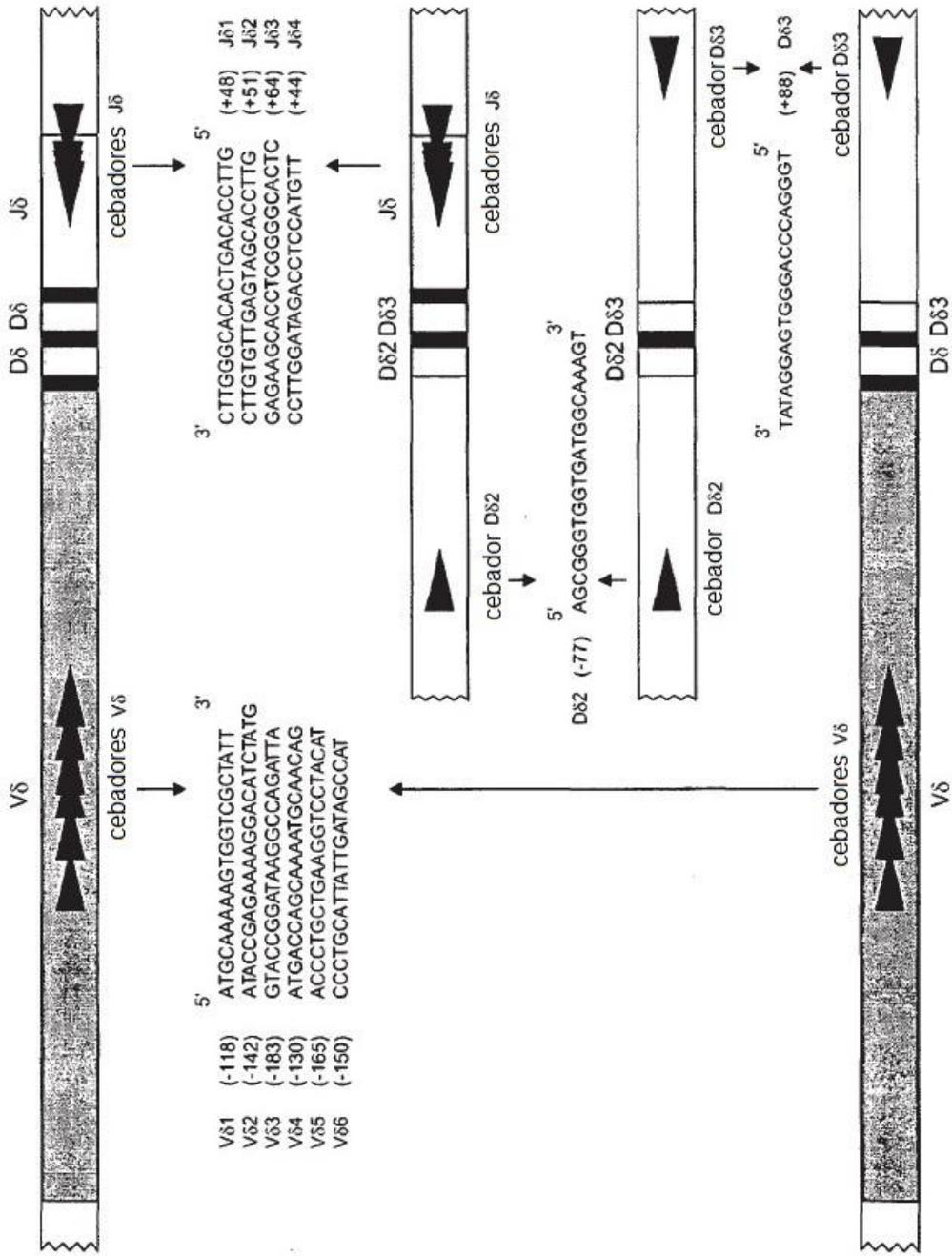


Fig. 9B

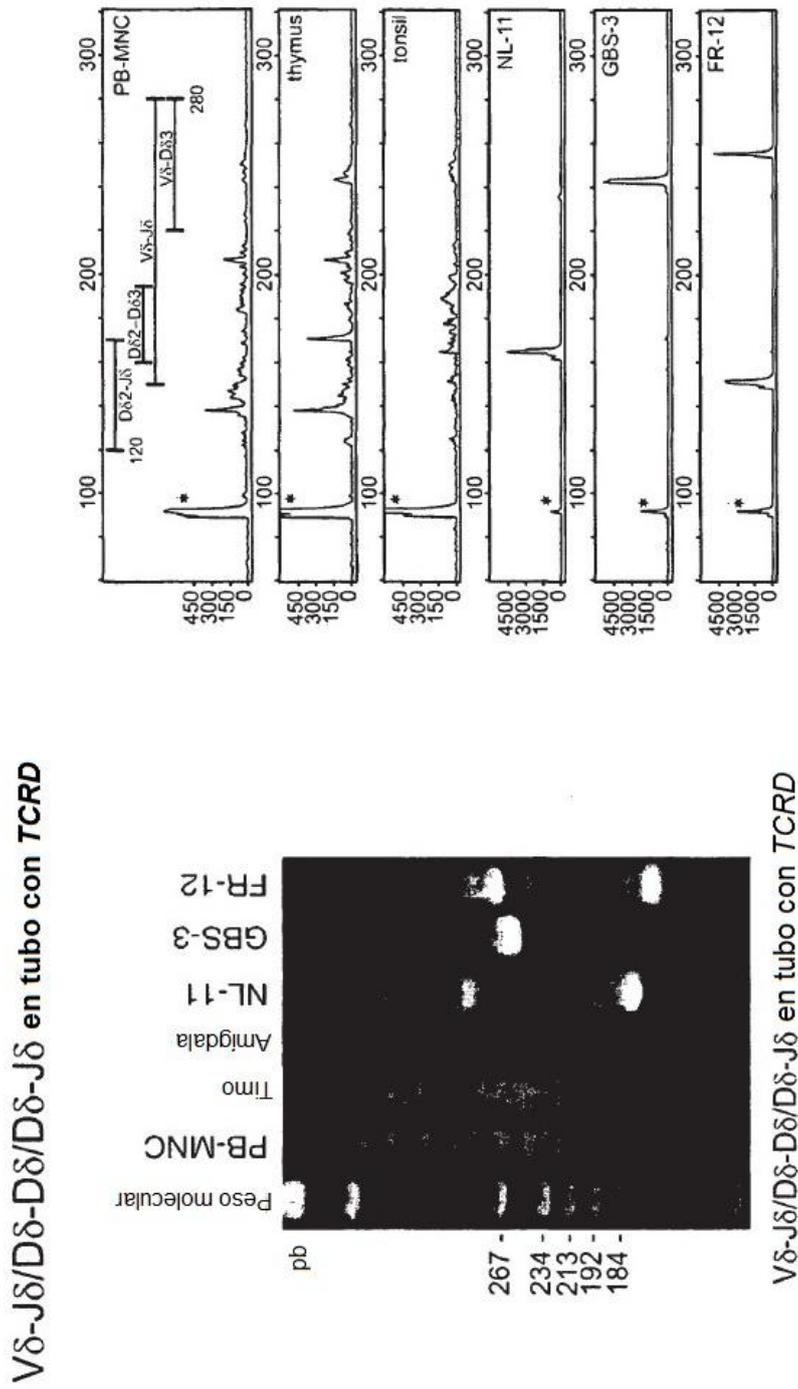


Fig. 9C

Locus de *BCL1* (N° 1q13)

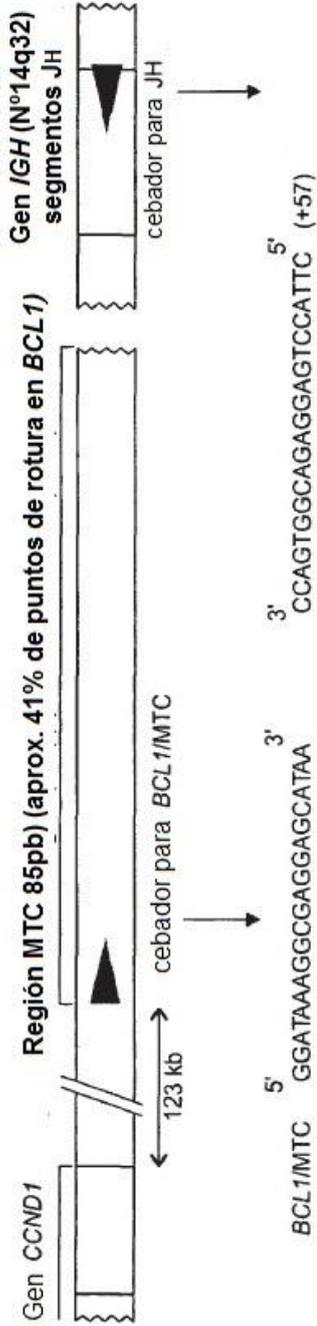


Fig. 10A

Tubo t(11;14) *BCL1* MTC-JH

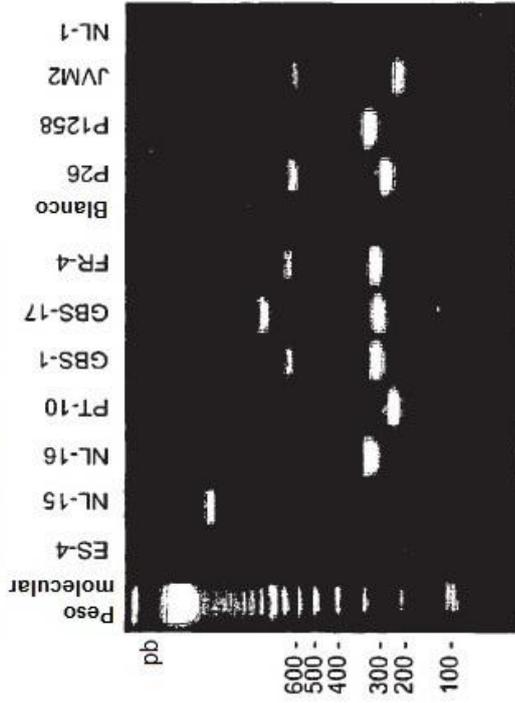


Fig. 10B

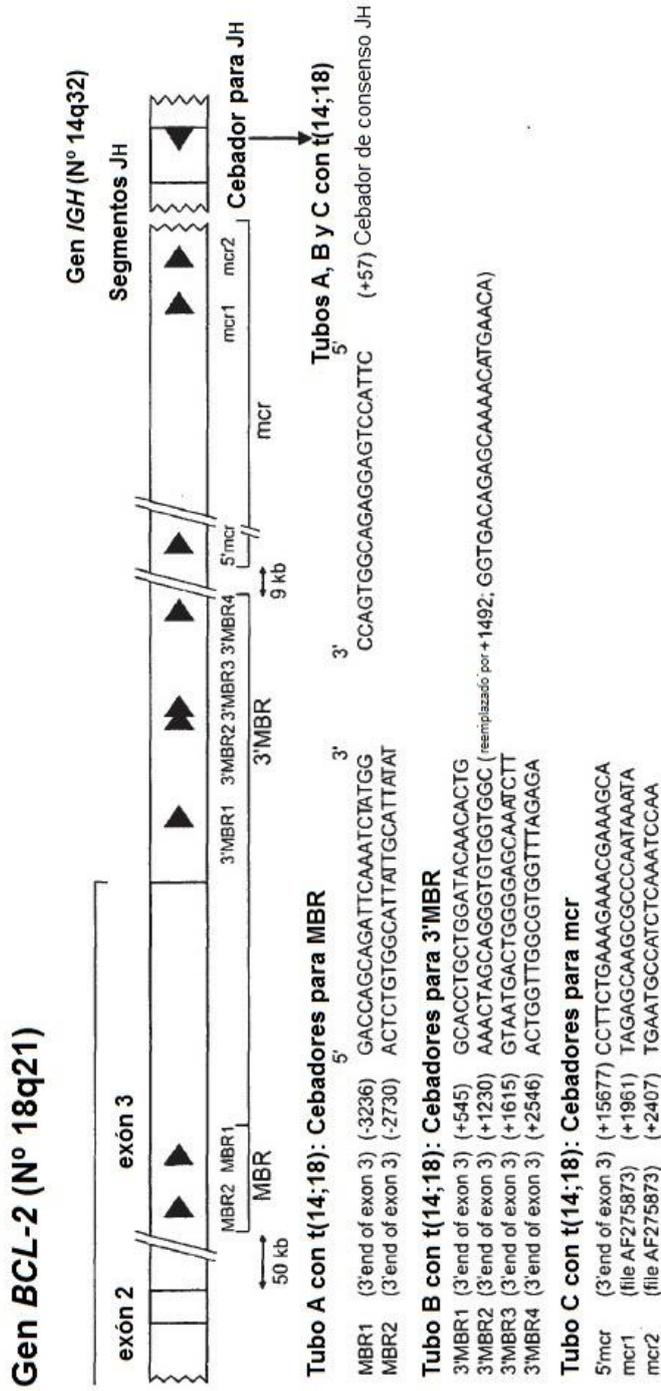


Fig. 11A

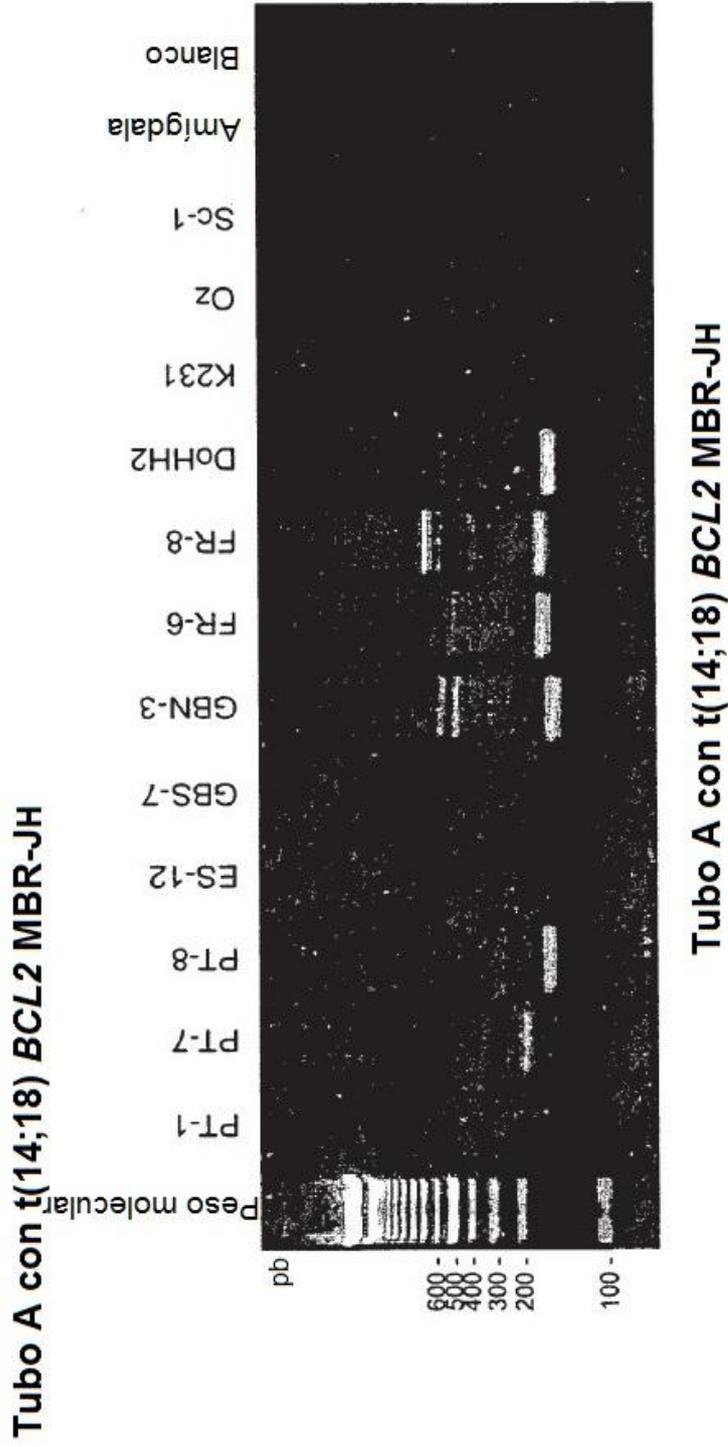


Fig. 11B

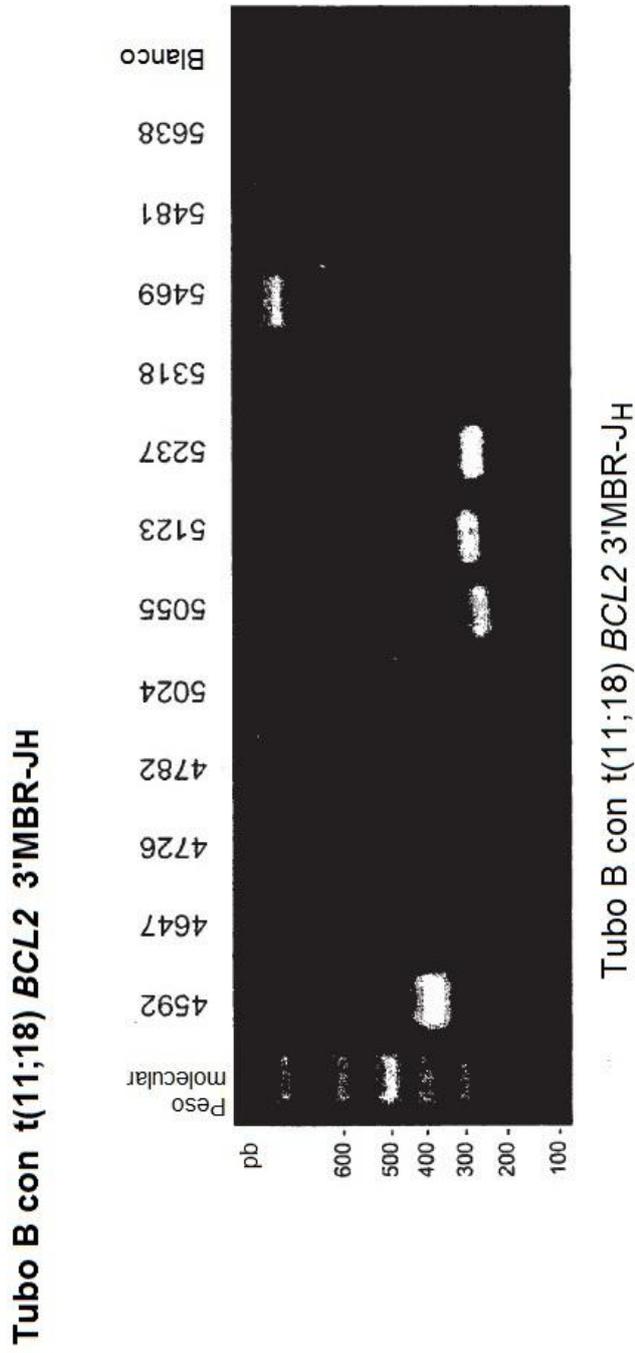


Fig. 11C

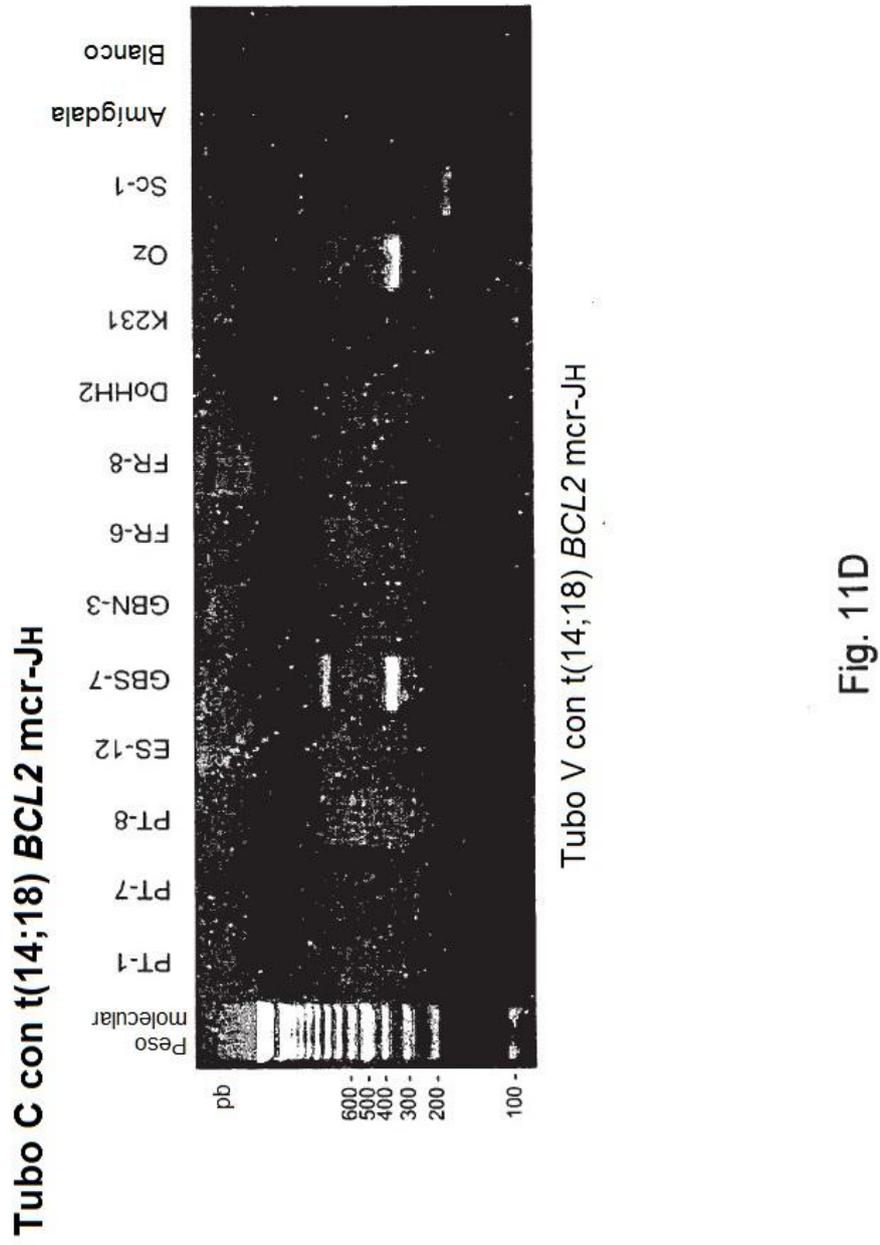


Fig. 11D

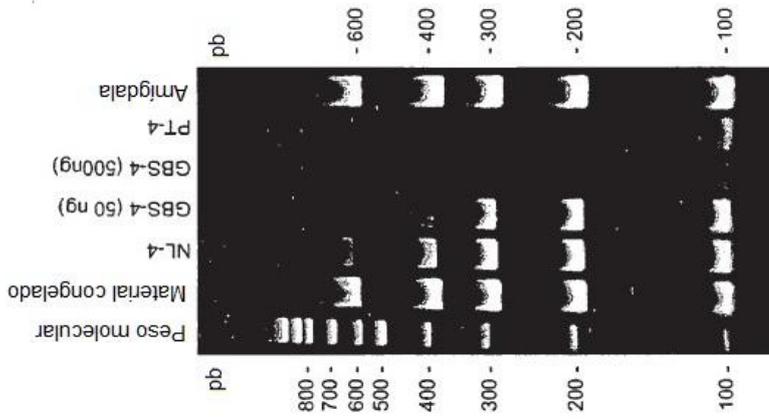


Fig. 12B

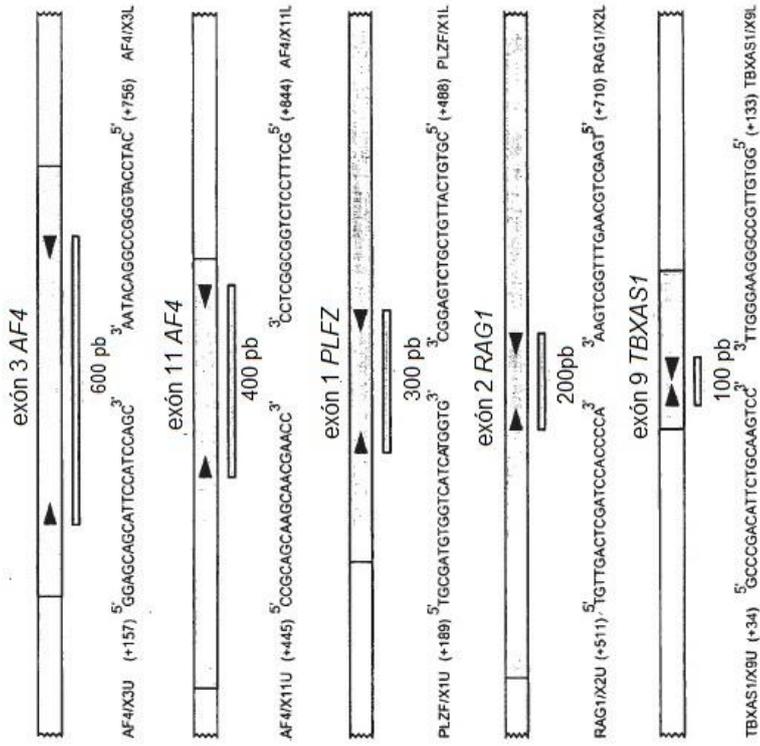


Fig. 12A

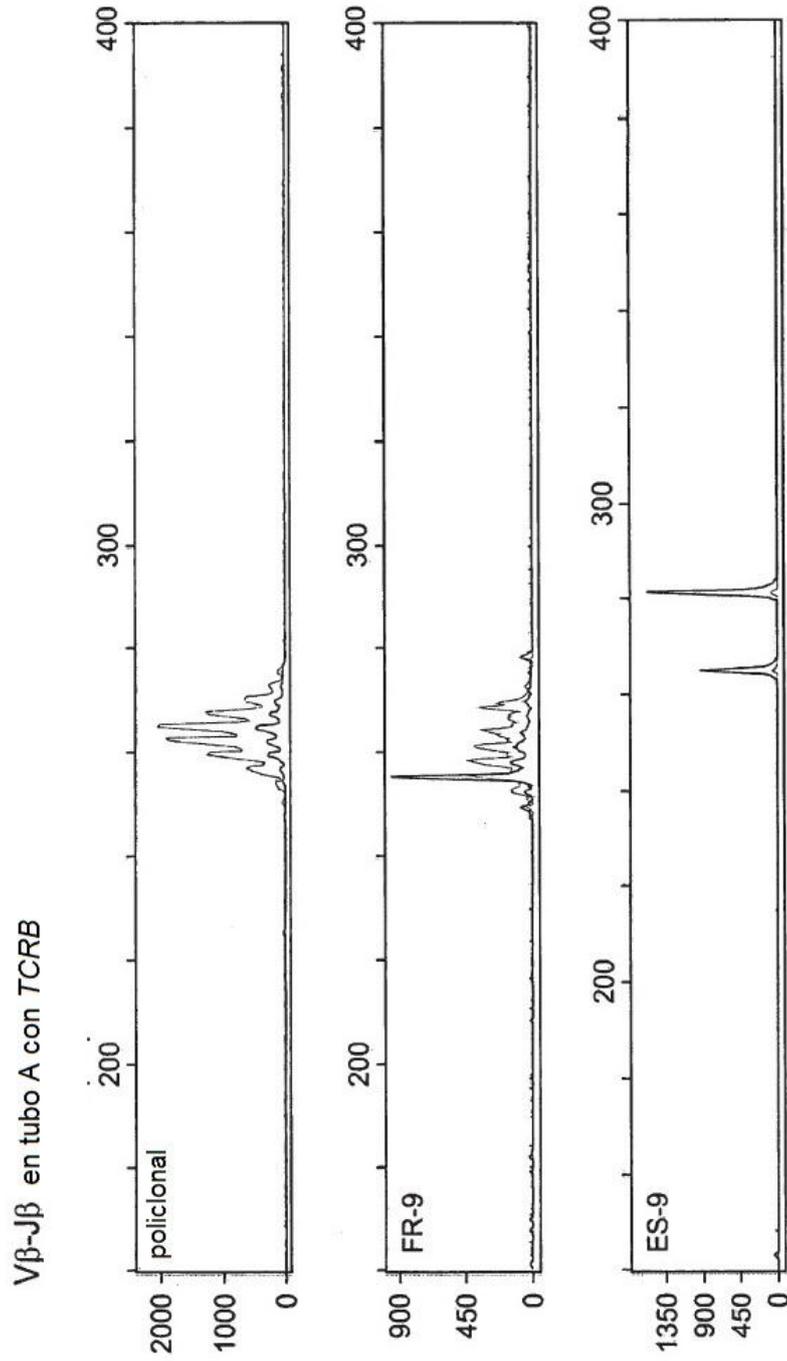


Fig. 13A

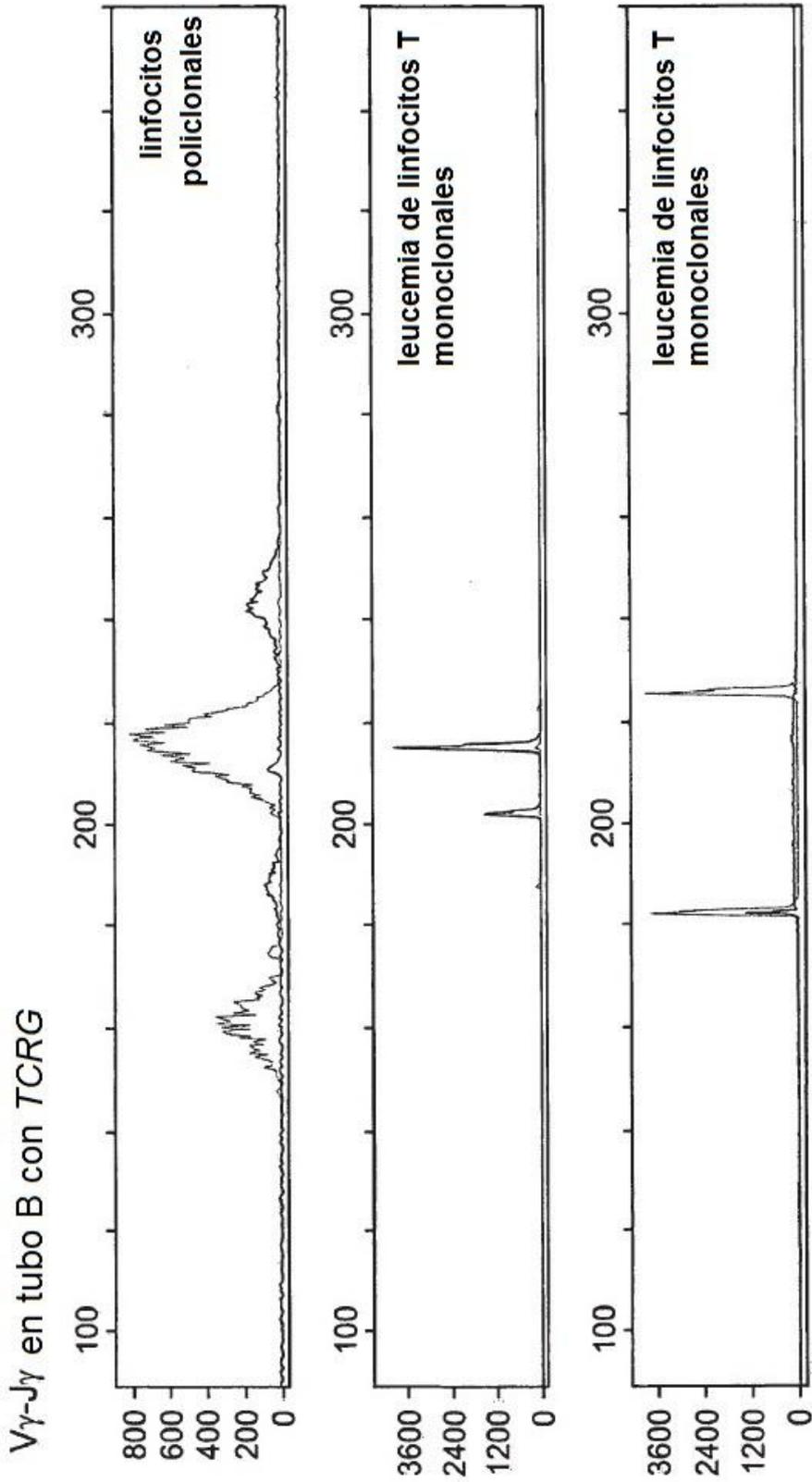


Fig. 13B

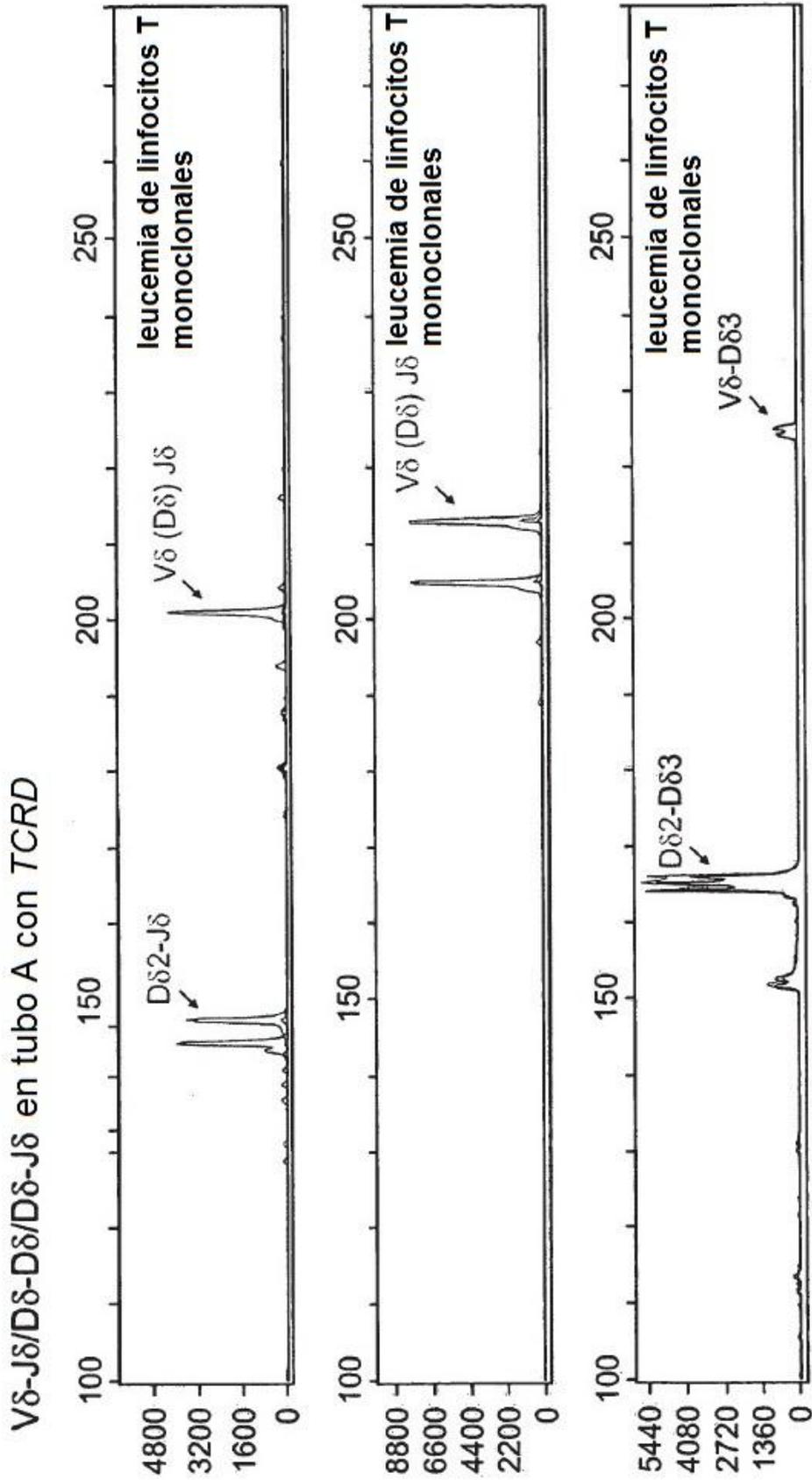


Fig. 13C