

Diagnostyka genetyczna chłoniaków T-komórkowych pierwotnie wywodzących się ze skóry

Część I: Zastosowanie analizy rearanżacji genu receptora TCR w diagnostyce chłoniaków pierwotnie skórnych z komórek T

The genetic diagnostics of primary cutaneous T-cell lymphomas
Part I: Application of TCR gene rearrangement analysis in diagnostics
of cutaneous T-cell lymphomas

Małgorzata Sokołowska-Wojdyło¹, Bogusław Nedoszytko¹, Monika Zabłotna¹, Jolanta Gleń¹, Waldemar Placek²

¹Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Akademii Medycznej w Gdańsku, kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. n. med. Jadwiga Roszkiewicz

²Katedra i Klinika Dermatologii, Collegium Medicum w Bydgoszczy im. Ludwika Rydygiera Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. n. med. Waldemar Placek

Post Dermatol Alergol 2007; XXIV, 4: 151–156

Streszczenie

Ocena klonalności rearanżacji genów łańcucha γ receptora TCR należy już do standardu badań diagnostycznych w przypadku chłoniaków pierwotnie wywodzących się ze skóry z komórek T (ang. *cutaneous T-cell lymphoma* – CTCL). W pracy, która jest pierwszym z trzech artykułów poświęconych badaniom genetycznym chłoniaków, szczegółowo opisano proces rekombinacji somatycznej oraz zasady reakcji łańcuchowej polimerazy niezbędnej do prowadzenia analizy monoklonalności metodami molekularnymi.

Słowa kluczowe: CTCL, TCR, aberracje chromosomowe, klon, rozrost monoklonalny.

Abstract

T-cell receptor rearrangement has become a standard in diagnostics of cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). The process of somatic recombination and description of polymerase chain reaction method necessary in analysis of TCR genes monoclonality have been described in the 1st part of the trilogy consisting of genetic analysis of CTCL.

Key words: CTCL, TCR, chromosomal aberration, clone, monoclonality.

Pierwotnie skórne chłoniaki wywodzące się z komórek T (ang. *cutaneous T-cell lymphoma* – CTCL) to różnorodna grupa nowotworów o wciąż nie do końca poznanej etiopatogenezie [1–4]. W ciągu ostatnich lat zaobserwowano na świecie 3-krotny wzrost częstości zachorowań na CTCL [5, 6].

Diagnostyka CTCL, mimo dość jasnych kryteriów, jest wciąż trudna. Szczególnie dotyczy to wczesnych stadiów rozwoju chłoniaków, które klinicznie mogą przypominać choroby zapalne skóry, takie jak wyprysk, atopowe zapalenie skóry, łuszczycę, przytuszczycę, liszaj płaski oraz erytrodermię o różnym podłożu [7–16]. Zwłaszcza w przypadku tej ostatniej badanie histopatologiczne oraz analiza immunohistochemiczna w 50% przypadków są niejedno-

znaczne i do ustalenia rozpoznania konieczna jest powtórna biopsja skóry (często wielokrotna). Pomocne okazują się wówczas stosunkowo nowe metody diagnostyczne – analiza klonalności rearanżacji receptora TCR technikami molekularnymi oraz analiza cytogenetyczna.

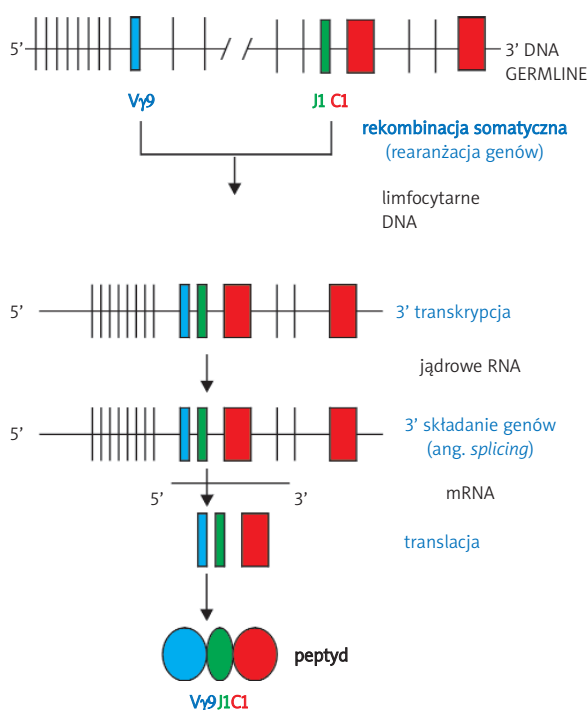
TCR i rearanżacje genów

Receptory TCR to glikoproteiny występujące na powierzchni limfocytów T, umożliwiające rozpoznawanie przez te komórki szerokiego spektrum antygenów. Średnia gęstość receptorów TCR na powierzchni limfocyta T wynosi 5×10^4 [17].

Adres do korespondencji: dr n. med. Małgorzata Sokołowska-Wojdyło, Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Akademii Medycznej w Gdańsku, ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk

Po raz pierwszy obecność cząsteczki tego receptora na powierzchni komórki T określono metodami immunologicznymi z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych. Cząsteczkę nazwano TCR $\alpha\beta$, ponieważ jest ona heterodimerem dwóch łańcuchów połączonych mostkiem dwusiarczkowym. Oprócz łańcuchów α i β istnieją też łańcuchy γ i δ . *Locus* δ odkryto w trakcie badań nad *locus* α , ponieważ *loci* genu δ są umiejscowione w obrębie *locus* genu α . Geny łańcucha α i δ receptora TCR znajdują się u człowieka na chromosomie 14q11, β na 7q34, a γ na 7p15. Proces kodowania białek TCR nie jest tak prosty, jak w większości przypadków, gdzie jeden gen koduje jedno białko. Geny kodujące łańcuchy receptora TCR są zbiorami wielu fragmentów genu (*loci*), z których dopiero po wielu przekształceniach powstaje właściwy gen. Budowa genów TCR warunkuje możliwość zaistnienia u człowieka wielkiej różnorodności białek TCR, co jest niezbędne ze względu na funkcję, jaką pełnią [18]. Podobnie jest w przypadku immunoglobulin, gdzie także wiele *loci* koduje białko składające się z domen warunkujących różnorodność przeciwciał, wykorzystując przy tym kilka mechanizmów, z których jeden to rekombinacja somatyczna, zwana też rearanżacją [19].

Rearanżacja to proces przegrupowań w obrębie *loci* określonego łańcucha TCR, prowadzący do wytworzenia funkcjonalnych genów TCR. W procesie tym wybrane



Ryc. 1. Proces rearanżacji i przegrupowań genów prowadzący do powstania funkcjonalnego białka na przykładzie łańcucha γ receptora TCR [22–23]

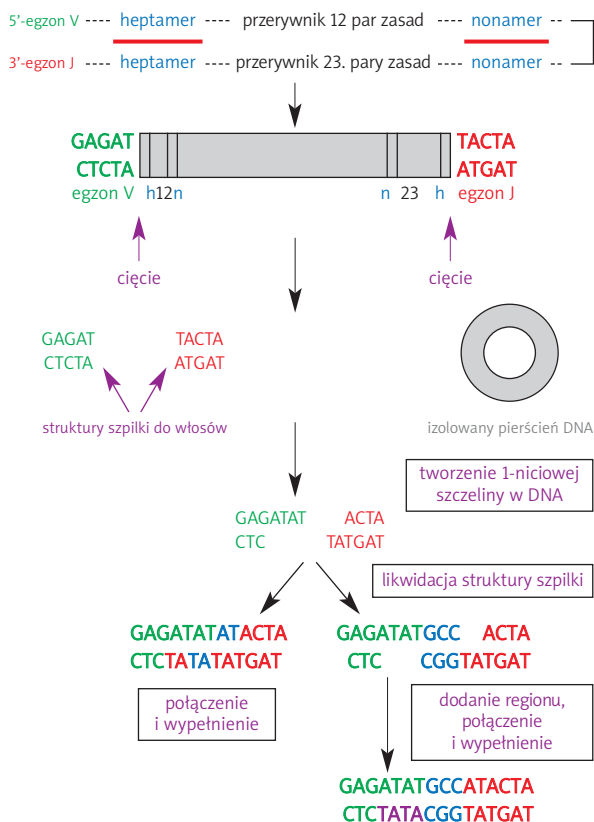
na drodze nieznanego mechanizmu segmenty V, J (TCR γ , TCR α) lub V, J i D (TCR β , TCR δ) znajdują się blisko siebie i powstanie przegrupowany łańcuch DNA, w którym usunięto segmenty znajdujące się między złączonymi odcinkami genu (ryc. 1.) [20–23].

Mechanizm rekombinacji somatycznej jest coraz lepiej poznany. Określono swoiste sekwencje zasad, działające jako sekwencje sygnałowe rekombinacji (ang. *recombination signal sequences* – RSS). Taka sekwencja sygnałowa znajduje się po stronie 3' *loci* segmentów V i D. Składa się ona z wysoce konserwatywnego heptameru CACAGTG lub jego analogu, przerywnika (ang. *spacer*) oraz wysoce konserwatywnego nonameru ACAAAAACC lub jego analogu. Od strony 5' wszystkich segmentów D i J linii zarodkowej (ang. *germline*) znajduje się odpowiadająca poprzedniej sekwencja sygnałowa, składająca się z nonameru i heptameru, przedzielonych zmiennym fragmentem (23 par zasad). Sekwencje heptamerów i nonamerów następujące po segmentach V lub D są komplementarne do tych, z którymi rekombinują, tzn. poprzedzających segmenty J lub D. Przerywniki (ang. *spacers*) o długości 12 i 23 par zasad odpowiadają 1 lub 2 obrotom spirali DNA [19–20].

Rekombinacja zachodzi pomiędzy sekwencjami długości 12 i 23 par zasad, ale nigdy między sekwencjami tej samej długości [20]. Proces rearanżacji jest kontrolowany przez 2 geny aktywujące rekombinację (ang. *recombination activating genes 1 and 2*) RAG-1 i RAG-2 [22]. U myszy unieczynnienie genów RAG-1 i RAG-2 (wyłączenie, ang. *knock-out*) prowadzi do braku dojrzałych limfocytów B i T. Zwierzęta te nie mogą syntetyzować Ig ani TCR. RAG-1 łączy się z sekwencją nonameru, następnie RAG-2 przyłącza się do kompleksu RAG-1-DNA w miejscu sąsiadującym z przerywnikiem zbudowanym z 12 par zasad. Później powstaje połączenie między wspomnianymi przerywnikami – prawdopodobnie w wyniku połączenia kompleksu RAG-1 i RAG-2 z sekwencją nonamer-przerywnik z 12 par zasad i RAG-2 z sekwencją nonamer-przerywnik z 23 par zasad.

Po połączeniu zachodzi kontrolowane cięcie endonukleazą między regionami kodującymi V-(D)-J i heptamerami. Kontrolowane jest ono przez sekwencję heptamerów, a inicjowane przez powstanie jednoniciowej szczeliny w obszarze granicznym między końcem 5' heptameru sygnałowego a regionem kodującym. Następnie białka RAG zamieniają tę szczelinę w przerwę obejmującą obie nici DNA, co prowadzi do powstania struktury *szpilki do włosów* (ang. *hairpin*) końca kodującego. Zakończenia szpilkowe likwiduje się w wyniku nadtrawienia przez endonukleazę szczeliny jednej z nici DNA w dowolnym miejscu. Ubytki w sekwencji uzupełnia się przez syntezę DNA (tu działa egzonukleaza), a następnie dochodzi do połączenia ze sobą 2 końców (dzięki działaniu ligazy) (ryc. 2.).

Dodatkowa zmienność łańcuchów TCR następuje w wyniku dodania nukleotydów (zmienność regionu N; N – ponieważ kodowany bez potrzeby wzorca) przy udziale końcowej transferazy deoksynukleotydydowej [19].

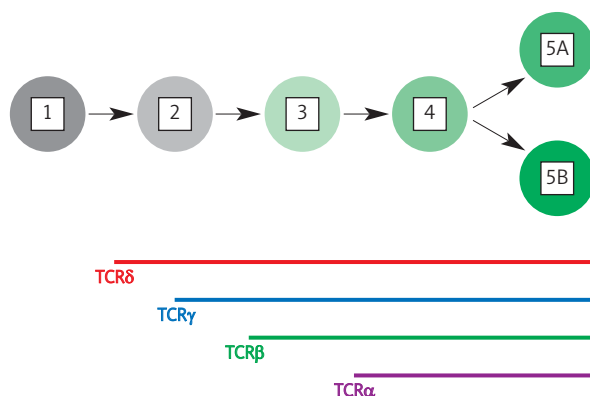


Ryc. 2. Schemat mechanizmu rekombinacji: (—) komplementarność heptamerów (h) i nonamerów (n)

Bez względu na rodzaj łańcuchów TCR, ulegających ekspresji na powierzchni komórki T, do rekombinacji somatycznej dochodzi kolejno w obrębie genów wszystkich łańcuchów – najpierw δ , następnie γ , β i α – w trakcie procesu dojrzewania limfocytu T (ryc. 3.).

Zainteresowano się szczególnie łańcuchem TCR γ ze względu na jego prostą budowę oraz fakt, że podlega on rekombinacji wcześniej w procesie dojrzewania limfocytów T. Daje to pewność, że badając klonalność rearanżacji TCR w CTCL, znajdzie się także klon nowotworowy, do powstania którego przyczyniły się mutacje we wczesnym okresie dojrzewania komórek T [23–30]. Liczba możliwych połączeń V–J wynosi w przypadku TCR γ tylko ok. 10^5 , podczas gdy łańcuch np. β ma ich ok. 10^{15} (tab. 1.) [31–32].

Na powierzchni limfocytu T dochodzi do ekspresji tylko jednej odmiany receptora TCR. Receptor TCR $\alpha\beta$ występuje na ponad 95% limfocytów krwi obwodowej i większości tymocytów, na których obserwuje się ekspresję TCR. Pozostałe limfocyty, z receptorami TCR $\gamma\delta$ na powierzchni, występują stosunkowo licznie w nabłonkach jelita, macicy i języka. Limfocyty z receptorem TCR $\gamma\delta$ na powierzchni stanowią niewielki odsetek limfocytów grasicy, narządów limfatycznych oraz skóry. Komórki T $\gamma\delta$ rozpoznają wiele antygenów bakteryjnych, autoantygenów, tj. białka szoku ter-



Ryc. 3. Schemat sekwencji kolejnych rearanżacji podczas procesu dojrzewania tymocytu: 1 – multipotencjalna komórka pnia HLA-DR, CD34; 2 – protymocyt HLA-DR, CD34, CD7, TdT+; 3 – pretymocyt CD7, CD2, TdT+; 4 – tymocyt CD7, CD2, CD4, CD8; 5A – limfocyt T helper CD2, CD3, CD4; 5B – limfocyt T cytotoxic/supresor CD2, CD3, CD8

micznego, czy też nieklasyczne antygeny HLA, np. CD1. Niemniej jednak funkcja komórek T $\gamma\delta$ nie jest poznana do końca. Mogą one stanowić pierwszą linię obrony, ograniczając szerzenie się zakażenia do czasu powstania odpowiedzi limfocytów T $\alpha\beta$ z klasyczną restrykcją HLA (TCR $\alpha\beta$ rozpoznaje przetworzony antygen jako fragmenty peptydów związanych z cząsteczkami HLA klasy I i klasy II) [19].

Zgodnie z mechanizmem rekombinacji somatycznej, istnieje wiele możliwych rearanżacji genów TCR, co stanowi podstawę mechanizmu rozpoznawania antygenów przez komórki T. Badając jednak rearanżację w obrębie nacieku nowotworowego z komórek T, tak jak jest np. w CTCL, czyli w zbiorze komórek, z których większość jest identyczna (klon), nie stwierdza się tak olbrzymiej różnorodności rearanżacji. Można znaleźć przewagę jednej rearanżacji genów TCR w zbiorze wszystkich komórek T, ponieważ pojawi się nowotworowy klon komórek T, czyli zbiór limfocytów T będących wynikiem podziału jednej komórki. Cechę tę nazywamy monoklonalnością. W przypadku CTCL monoklonalność (miara jednorodności rearanżacji genów TCR) zalicza się do kryteriów diagnostycznych choroby, zgodnie z obowiązującą klasyfikacją WHO-EORTC i EORTC [33–34].

Reakcja łańcuchowa polimerazy PCR podstawą oceny klonalności rearanżacji receptora TCR

Do analizy rearanżacji genów receptora TCR wykorzystuje się technikę łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *polymerase chain reaction* – PCR). Reakcja PCR to cyklicznie powtarzające się 3 procesy. W pierwszym wybrany fragment DNA denaturuje w temp. 92–96°C, w drugim do otrzymanego jednoniciowego łańcucha ssDNA przyłą-

Tab. 1. Budowa genów TCR. N region – kilka nukleotydów wprowadzonych podczas procesu rekombinacji somatycznej do genu między łączone segmenty V, J i D

TCR	Liczba segmentów w <i>germline</i>			Najczęstsza struktura genu po rearanżacji	Przybliżona liczba różnych genów po rearanżacji
	V	D	J		
α	ok. 100	0?	ok. 100	V-N-J	ok. 10 ⁷
β	ok. 40	2	13	V-N ₁ -D-N ₂ -J	ok. 10 ¹⁰
γ	ok. 10	0	5	V-N-J	ok. 10 ⁵
δ	ok. 10	3	3	V-N ₁ -D ₁ -N ₂ -D ₂ -N ₃ -D ₃ -N ₄ -J	ok. 10 ¹⁵

czają się startery, zgodnie z zasadą komplementarności w temp. 37–65°C. Etap trzeci to wydłużanie przyłączonych starterów przez dosyntetyzowanie dezoksyrybonukleotydów w temp. 70–73°C z udziałem Taq polimerazy DNA. Uzyskane produkty ponownie ulegają denaturacji (1. etap)

i kolejne etapy powtarzają się cyklicznie [35]. Przebieg reakcji ilustrują ryc. 4. i 5.

Liczba kopii DNA powstająca w kolejnych cyklach PCR wzrasta teoretycznie wykładniczo zgodnie ze wzorem:

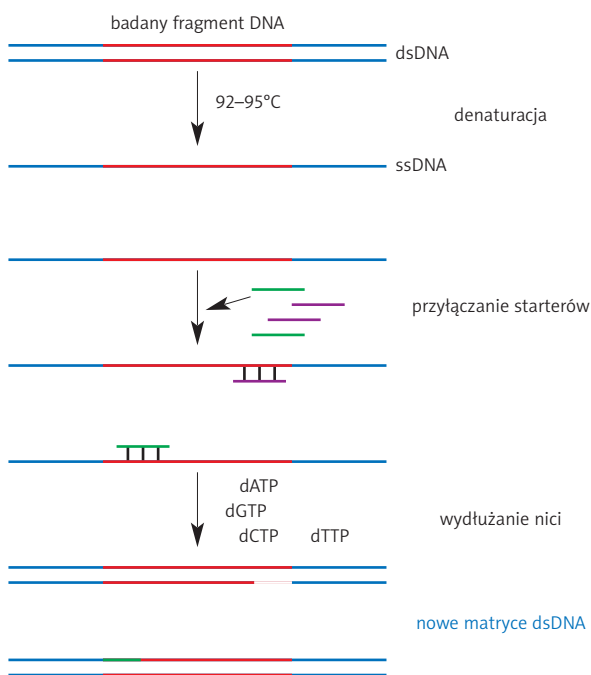
$$Y = (2^n - 2n) X,$$

gdzie: Y – liczba kopii DNA po PCR, n – liczba cykli, 2n – produkty pierwszorzędowego i drugorzędowego (o nieokreślonej długości) wydłużania primerów, X – początkowa liczba kopii matrycy.

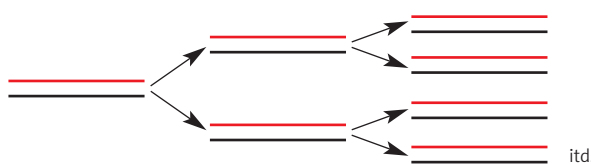
Produkty pierwszorzędowe powstają w wyniku syntezy DNA po denaturacji matrycy użytej do reakcji w cyklu 1, natomiast produkty drugorzędowe (o nieokreślonej długości) wskutek syntezy DNA po denaturacji produktów pierwszorzędowych i są amplifikowane liniowo podczas następných cykli [36]. W praktyce po ok. 40 cyklach PCR liczba kopii już nie wzrasta (faza *plateau*).

Produkty PCR analizuje się m.in. metodami elektroforetycznymi na żelu poliakrylamidowym (PAGE) [4, 37–38], denaturującym w gradiencie temperatur (TGGE) [39–40] lub w gradiencie czynnika chemicznego (DGGE, MDE) [26, 41], metodą analizy polimorfizmu konformacji jednoniciowych cząstek DNA (SSCP) [23, 41] lub sekwencjonowaniem [40, 42].

Wiadomo, że w przypadku rozrostów limfoproliferacyjnych z dojrzałych komórek T CD3+ rearanżacje *loci* genów TCRγ i TCRβ znajduje się odpowiednio w 100 i 96% przypadków. Tak jest też w przypadku chłoniaków pierwotnie wywodzących się ze skóry z komórek T (CTCL), będących obiektem badań [43].



Ryc. 4. Cykl łańcuchowej reakcji polimerazy PCR



Ryc. 5. Łańcuchowa reakcja polimerazy: po 1. cyklu z 1 kopii powstają 2 kopie, następnie 4, potem 8 itd.

Zastosowanie oceny monoklonalności rearanżacji genu receptora TCR w diagnostyce CTCL

Zgodnie z klasyfikacją WHO-EORTC chłoniaków pierwotnie wywodzących się ze skóry, monoklonalną rearanżację genu TCR stwierdza się powszechnie w nowotworowych komórkach Tαβ w skórze pacjentów z CTCL, a także w komórkach nowotworów wywodzących się z limfocytów Tγδ. W tym ostatnim przypadku TCRβ może

nie podlegać rearanżacji, ale nie ma to znaczenia w większości wykonywanych badań diagnostycznych, gdyż ocenie poddaje się najczęściej gen łańcucha γ receptora TCR.

W przypadku najczęściej występującej odmiany CTCL, jaką jest ziarniniak grzybiasty, monoklonalność genów receptora TCR w skórze pacjentów stwierdza się w ponad 90% przypadków. Podobnie jest w zespole Sezary'ego, w którym oprócz monoklonalności genu TCR w skórze, rozpoznaje się ją także we krwi obwodowej pacjentów. Badanie klonalności genów receptora TCR jest uznaną metodą pomocniczą w różnicowaniu erythrodermii o łagodnym i nowotworowym podłożu [33, 34, 44–47].

Monoklonalność TCR stwierdza się także w białaczce/chłoniaku z komórek T u dorosłych (ang. *adult T-cell leukemia/lymphoma* – ATLL). Metodami molekularnymi wykrywa się także geny wirusa HTLV-1 we wszystkich przypadkach odmiany CTCL. Odróżnia to klasyczne przypadki ATLL od zespołu Sezary'ego i zaawansowanych stadiów ziarniniaka grzybiastego [33].

W przypadku anaplastycznego wielkokomórkowego chłoniaka pierwotnie skórnoego z komórek T CD30+ (ang. *cutaneous anaplastic large cell lymphoma* – C-ALCL) monoklonalność TCR rozpoznaje się w prawie wszystkich przypadkach, a w *lymphomatoid papulosis* w ok. 60–70% [48–51]. W pozawęzłowym chłoniaku z komórek NK/T typu nosowego w większości przypadków odnotowuje się konfigurację *germline* genu TCR. Rearanżację monoklonalną stwierdza się niezmiernie rzadko w odmianie o fenotypie limfocytów T cytotoksycznych [33–34].

W rzadko spotykanych chłoniakach skóry powstających z małej/średniej wielkości pleomorficznych komórek T monoklonalność rearanżacji genu TCR pozwala na różnicowanie z chłoniakami rzekomymi z komórek T, które także mogą objawiać się litymi naciekami lub guzkami, szczególnie na twarzy, jak w typie CTCL [33].

Wysoka częstość rearanżacji genu TCR potwierdza przydatność tego badania w diagnostyce CTCL. Ocena klonalności metodami molekularnymi nie powinna jednak stanowić samodzielnego kryterium diagnostycznego. Opisuje się przypadki monoklonalności TCR u osób zdrowych i w dermatozach o łagodnym przebiegu, np. w liszaju twarżynowym i zanikowym [52]. Zmusza to klinicystów do całościowej oceny obrazu klinicznego, w tym badania histopatologicznego i immunohistochemicznego skóry, węzłów chłonnych, badania cytologicznego i immunofenotypowania krwi obwodowej oraz szpiku, a także, jeśli zachodzi taka potrzeba, wyników badań obrazowych narządów wewnętrznych przed postawieniem ostatecznego rozpoznania [53–56].

Piśmiennictwo

- Fortson JS, Schroeter AL, Esterly NB. Cutaneous T-cell lymphoma (parapsoriasis en plaque). An association with pityriasis lichenoides et varioliformis acuta in young children. *Arch Dermatol* 1990; 126: 1449-53.
- Golitz LE, Chu HD. Cutaneous T-cell lymphoma. In: *Current Issues in Dermatology*. Callen JP (ed.). GK Hall Medical Publishers Boston, Massachusetts 1984: 147-8.
- van Doorn R, Van Haselen CW, van Voorst Vader P, et al. Mycosis fungoides: disease evolution and prognosis of 309 Dutch patients. *Arch Dermatol* 2000; 136: 504-10.
- Gibson LE, Muller SA, Leiferman KM, Peters MS. Follicular mucinosis: clinical and histopathologic study. *J Am Acad Dermatol* 1989; 20: 441-6.
- Väkevälä L, Pukkala E, Ranki A. Increased risk of secondary cancers in patients with primary cutaneous T cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 62-5.
- Siegel RS, Pandolfino T, Guitart J, et al. Primary cutaneous T-cell lymphoma: review and current concepts. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2908-25.
- Nickoloff B. Light-microscopic assessment of 100 patients with patch/plaque-stage mycosis fungoides. *Am J Dermatopathol* 1988; 10: 469-77.
- McBride SR, Dahl MG, Slater DN, Sviland L. Vesicular mycosis fungoides. *Br J Dermatol* 1998; 138: 141-4.
- Bahadoran P, Wechsler J, Delfau-Larue MH, et al. Mycosis fungoides presenting as keratosis lichenoides chronica. *Br J Dermatol* 1998; 138: 1067-9.
- Sokołowska-Wojdyło M, Roszkiewicz J, Kobierska-Gulida G. Chłoniak pierwotnie skórny z komórek T CD30+ o obrazie klinicznym liszaja płaskiego u pacjentki z wieloletnim wywiadem łuszczycowym. *Przegl Dermatol* 2006; 4: 437-41.
- Berti E, Tomasini D, Vermeer MH, et al. Primary cutaneous CD8-positive epidermotropic cytotoxic T-cell lymphomas. A distinct clinicopathological entity with an aggressive clinical behavior. *Am J Pathol* 1999; 155: 483-92.
- Mielke V, Wolff HH, Winzer M, Sterry W. Localized and disseminated pagetoid reticulosis: diagnostic immunophenotypical findings. *Arch Dermatol* 1989; 125: 402-6.
- LeBoit PE. Granulomatous slack skin. *Dermatol Clin* 1994; 12: 375-89.
- van Vloten WA. Cutaneous T-cell Lymphomas: Common and Uncommon Types 6-9.09.2001 Rhodes, Greece, Medical Education in Dermatology, Regional Meeting, Syllabus, Editor "Medical Education" 2001: 51-60.
- Wieselthier JS, Koh HK. Sezary syndrome: diagnosis, prognosis, and critical review of treatment options. *J Am Acad Dermatol* 1990; 22: 381-401.
- Willemze R, Meijer CJLM. Classification of cutaneous lymphomas: crosstalk between pathologist and clinician. *Curr Diagn Pathol* 1998; 5: 23-33.
- Immunologia. Wyd. II. Jakóbisiak M (red.). PWN, Warszawa 1996: 10-116.
- Arden B, Clark SP, Kabelitz D, Mak TW. Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 1995; 42: 455-500.
- Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunologia. Wyd. 2. Żeromski J. (red. wyd. pol.). Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2000: 83-106.
- Gill JJ, Gulley ML. Immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangement. *Hematol Oncol Clin North Am* 1994; 8: 751-70.
- Wojdyło M. Zastosowanie PCR w diagnostyce chłoniaków skóry z komórek T. *Przegl Dermatol* 1997; 84: 409-17.
- Wood GS, Haeflner A, Dummer R, et al. Molecular biology techniques for the diagnosis of cutaneous T-cell lymphoma. *Dermatol Clin* 1994; 12: 231-41.
- Clendenning WE, Brecher G, Van Scott EJ. Mycosis fungoides. Relationship to malignant cutaneous reticulosis and the Sezary syndrome. *Arch Dermatol* 1964; 89: 785-92.

24. Bal J. Metody badania kwasów nukleinowych. W: *Badania molekularne i cytogenetyczne w medycynie*. Bal J (red.) Springer PWN, Warszawa 1998: 74-81.
25. Bluefarb SM. Is mycosis fungoides an entity? *AMA Arch Derm* 1955; 71: 293-302.
26. 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: 8536-40.
27. Kadin ME. Cutaneous gamma delta T-cell lymphoma – how and why should they be recognized? *Arch Dermatol* 2000; 136: 1052-4.
28. Kikuchi A, Naka W, Nishikawa T. Cutaneous T-cell lymphoma arising from parakeratosis variegata: long-term observation with monitoring of T-cell receptor gene rearrangements. *Dermatology* 1995; 190: 124-7.
29. Oishi M, John M, Honda M. Differences in IL-2 receptor levels between mycosis fungoides and cutaneous type adult T-cell leukemia/lymphoma in the early stages of the disease. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 710-5.
30. Ralfkiaer E, O'Connor NT, Crick J, et al. Genotypic analysis of cutaneous T-cell lymphomas. *J Invest Dermatol* 1987; 88: 762-5.
31. Bakels V, van Oostveen JW, Gordijn RL, et al. Diagnostic value of T-cell receptor beta gene rearrangement analysis on peripheral blood lymphocytes of patients with erythroderma. *J Invest Dermatol* 1991; 97: 782-6.
32. Liang G, Pardo RJ, Voigt W, et al. Studies of immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangement in cutaneous B and T cell lymphomas. *J Am Acad Dermatol* 1989; 21: 457-60.
33. Willemze R, Jaffe E, Burg G, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 2005; 105: 3768-85.
34. Willemze R, Kerl H, Sterry W, et al. EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: a proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Blood* 1997; 90: 354-71.
35. Willemze R, Meijer CJLM. Classification of cutaneous lymphomas: cross-talk between pathologist and clinician. *Curr Diagnost Pathol* 1998; 5: 23-33.
36. Kur J. Podstawy inżynierii genetycznej. Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej 1994: 151-68.
37. McCarthy KP, Sloane JP, Kabarowski JH, et al. A simplified method of detection of clonal rearrangements of the T-cell receptor gamma chain gene. *Diagn Mol Pathol* 1992; 1: 173-9.
38. Węgleński P. Identyfikacja zrekombinowanych genów. W: *Genetyka molekularna*. Węgleński P (red.) PWN, Warszawa 1995: 63-179.
39. Vonderheid EC, Bernengo MG, Burg G, et al. Update on erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma: report of the International Society for Cutaneous Lymphomas. *J Am Acad Dermatol* 2002; 46: 95-106.
40. Bakels V, van Oostveen JW, Preesman AH, et al. Differentiation between actinic reticuloid and cutaneous T cell lymphoma by T cell receptor gamma gene rearrangement analysis and immunophenotyping. *J Clin Pathol* 1998; 51: 154-8.
41. Gill JJ, Gulley ML. Immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangement. *Hematol Oncol Clin North Am* 1994; 8: 751-70.
42. Kneba M, Bolz I, Linke B, et al. Characterization of clone-specific rearranged T-cell receptor gamma chain genes in lymphomas and leukemias by the polymerase chain reaction and DNA sequencing. *Blood* 1994; 84: 574-81.
43. Vega F, Luthra R, Medeiros LJ, et al. Clonal heterogeneity in mycosis fungoides and its relationship to clinical course. *Blood* 2002; 100: 3369-73.
44. Bakels V, van Oostveen JW, Gordijn RL, et al. Diagnostic value of T-cell receptor beta gene rearrangement analysis on peripheral blood lymphocytes of patients with erythroderma. *J Invest Dermatol* 1991; 97: 782-6.
45. Liang G, Pardo RJ, Voigt W, et al. Studies of immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangement in cutaneous B and T cell lymphomas. *J Am Acad Dermatol* 1989; 21: 457.
46. Bachelez H, Bioul L, Flageul B, et al. Detection of clonal T-cell receptor gamma gene rearrangements with the use of the polymerase chain reaction in cutaneous lesions of mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Arch Dermatol* 1995; 131: 1027-31.
47. Lukowsky A, Audring H, Heiduk U, et al. Nachweis von monoklonalen T-Zellen mittels TCRγ-PCR bei Mycosis Fungoides (MF). *Hautarzt* 1998; 49: 641-5.
48. Beljaards RC, Meijer CJLM, van der Putte SCJ, et al. Primary cutaneous T-cell lymphomas: clinicopathologic features and prognostic parameters of 35 cases other than mycosis fungoides and CD30-positive large cell lymphoma. *J Pathol* 1994; 172: 53-60.
49. Bekkenk M, Geelen FAMJ, van Voorst Vader PC, et al. Primary and secondary cutaneous CD30-positive lymphoproliferative disorders: long term follow-up data of 219 patients and guidelines for diagnosis and treatment: a report from the Dutch Cutaneous Lymphoma Group. *Blood* 2000; 95: 3653-61.
50. Liu HL, Hoppe RT, Kohler S, et al. CD30+ cutaneous lymphoproliferative disorders: the Stanford experience in lymphomatoid papulosis and primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol* 2003; 49: 1049-58.
51. Willemze R, Beljaards RC. Spectrum of primary cutaneous CD30 (Ki-1)-positive lymphoproliferative disorders. A proposal for classification and guidelines for management and treatment. *J Am Acad Dermatol* 1993; 28: 973-80.
52. Lukowsky A, Mucbe M, Sterry W, Audring H. Detection of expanded T cell clones in skin biopsy samples of patients with lichen sclerosus et atrophicus by T cell receptor-gamma polymerase chain reaction assays. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 254-9.
53. Posnett DN, Sinha R, Kabak S, Russo C. Clonal populations of T cells in normal elderly humans: the T cell equivalent to "benign monoclonal gammopathy". *J Exp Med* 1994; 179: 609-18.
54. Kolowos W, Herrmann M, Ponner BB, et al. Detection of restricted junctional diversity of peripheral T cells in SLE patients by spectratyping. *Lupus* 1997; 6: 701-7.
55. Mucbe JM, Lukowsky A, Heim J, et al. Demonstration of frequent occurrence of clonal T cells in the peripheral blood but not in the skin of patients with small plaque parapsoriasis. *Blood* 1999; 94: 1409-17.
56. Lukowsky A, Mucbe JM, Sterry W, Audring H. Detection of expanded T cell clones in skin biopsy samples of patients with lichen sclerosus et atrophicus by T cell receptor-gamma polymerase chain reaction assays. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 254-9.