

Broj 3 • septembar 2023. № 3 • September 2023.



Trendovi u **molekularnoj biologiji**  
Trends in **Molecular Biology**



GODINA OD OTKRIĆA  
SEKUNDARNE STRUKTURE MOLEKULA DNK



Beograd • Belgrade • 2023.  
IMGGI • IMGGE

<b>70 godina od otkrića sekundarne strukture molekula DNK</b> .....	8
The 70 <sup>th</sup> anniversary of the discovery of DNA secondary structure	
Goran Brajušković	
<b>Varijabilnost mitohondrijskog genskog pula stanovnika Republike Srbije</b> .....	18
Mitochondrial gene pool variability of the residents of the Republic of Serbia	
Slobodan Davidović, Jelena M. Aleksić, Milena Stevanović i Nataša Kovačević Grujičić	
<b>Sekvenciranje dugih fragmenata – sledeći nivo genomskih istraživanja</b> .....	38
Long read sequencing – the next level in genomic research	
Dušanka Savić-Pavićević, Lana Radenković, Luka Velimirov, Nemanja Radovanović, Anastasija Ninković, Nemanja Garai, Miloš Brkušanin, Marko Panić, Jovan Pešović	
<b>Stereotipija B-ćelijskog receptora u hroničnoj limfocitnoj leukemiji</b> .....	58
B-cell receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia	
Teodora Karan-Đurašević	
<b>Sadašnjost i budućnost primene sekvenciranja nove generacije za retke bolesti</b> .....	78
Present and future of next-generation sequencing application for rare diseases	
Maja Stojiljković i Jovana Komazec	
<b>Uloga vazopresinskog sistema paraventrikularnog jedra u razvoju hipertenzije</b> .....	90
The role of paraventricular nucleus vasopressin system in development of hypertension	
Bojana Stevanović, Nina Japundžić-Žigon	
<b>Antioksidativni i antiinflamatorni efekti suplementacije orasima (<i>Juglans regia</i> L.) na srce u metaboličkom sindromu izazvanom ishranom bogatom fruktozom</b> .....	106
Antioxidative and antiinflammatory effects of walnut supplementation ( <i>Juglans regia</i> L.) on heart with fructose-rich diet-induced metabolic syndrome	
Maja Bubić, Maja Živković	
<b>PHACTR1 u kardiovaskularnim bolestima: od studija asocijacije na celokupnom genomu do funkcionalnih studija</b> .....	122
PHACTR1 in cardiovascular disease: from genome-wide association studies to functional studies	
Jovana Kuveljić, Tamara Djurić	
<b>Uloga ciljanih (epi)genetičkih modifikacija u potencijalnoj terapiji dijabetesa</b> .....	138
The role of targeted (epi)genetic modifications in potential diabetes therapy	
Marija Đorđević, Svetlana Dinić, Mirjana Mihailović, Aleksandra Uskoković, Nevena Grdović, Jelena Arambašić Jovanović, Melita Vidaković	
<b>Uticaj delecije gena <i>Mif</i> na razvoj gojaznosti i steatoze jetre kod miševa na režimu ishrane obogaćene fruktozom</b> .....	151
The effects of deletion of the <i>Mif</i> gene on the development of obesity and hepatic steatosis in mice on fructose enriched diet	
Ljupka Gligorovska i Ana Djordjevic	
<b>Varijante i transkripcija gena koji kodiraju komponente leptinskog signalnog puta, inflamacije i antioksidativne zaštite u patogenezi multiple skleroze</b> .....	168
Variants and transcription of genes of the leptin signaling pathway, inflammation and antioxidant protection in pathogenesis of multiple sclerosis	
Ivana Kolić, Ljiljana Stojković	
<b>Parkinsonova bolest – dokle se stiglo?</b> .....	184
Parkinson's disease – state of the art	
Jadranka Miletić Vukajlović, Dunja Drakulić	
<b>Značaj farmakogenetike u terapijskom pristupu akutnog ishemijskog moždanog udara rekombinovanim tkivnim aktivatorom plazminogena</b> .....	205
Importance of pharmacogenetics for ischemic stroke therapy with recombinant tissue plasminogen activator	
Marija Dušanović Pjević	
<b>Beta-adrenergički receptori i kinaze uključene u proces njihove nishodne regulacije u eksperimentalnom modelu kardiomiopatije izazvane doksorubicinom</b> .....	218
Beta-adrenergic receptors and kinases involved in the process of their downregulation in experimental model of cardiomyopathy induced by doxorubicin	
Marija Kosić, Zorica Nešić, Nina Žigon	
<b>Uticaj genetičkih faktora na efikasnost i toksičnost terapije metotreksatom kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom</b> .....	232
Genetic factors impacting the efficacy and toxicity of methotrexate therapy in rheumatoid arthritis patients	
Milka Grk	
<b>Ekstrakti briofita kao imunomodulatori</b> .....	245
Bryophyte extracts as immunomodulators	
Tanja Lunić, Bojan Božić, Biljana Božić Nedeljković	
<b>Struktura, funkcija i regulacija ekspresije gena za akvaporine pri suši kod biljaka</b> .....	256
Structure, function and regulation of aquaporin gene expression during drought in plants	
Marija Đurić	
<b>Identifikacija gena za arabinogalaktanske proteine (AGP) biljaka korišćenjem metoda mašinskog učenja</b> .....	269
Identification of AGP genes of plants using machine learning methods	
Danijela Paunović	

## **Predgovor**

Prošlo je 70 godina od otkrića sekundarne strukture molekula DNK. Od tog momenta molekularna biologija se razvija neverovatnom brzinom. „Trendovi u molekularnoj biologiji 3“ u svakom poglavlju pokazuju fascinantne domete koje dostiže molekularna biologija našeg vremena. I Nobelove nagrade se skoro svake godine dodeljuju za postignuća iz ove naučne discipline. A naši molekularni biolozi drže korak sa modernim trendovima. Jedan od autora ovog Zbornika govori : „Bez sumnje, ono što je otkriće elektrona bilo za 20. vek to su otkrića genomike za 21. vek.“ Autori „Trendova u molekularnoj biologiji 3“ ni najmanje ne sumnjaju u to.

Ove godine TMB3 prati i suplement, Knjiga apstrakata Drugog kongresa molekularnih biologa Srbije (CoMBoS2). Pod pokroviteljstvom Srpskog društva za molekularnu biologiju, Beograd je bio 2023. godine mesto susretanja molekularnih biologa Srbije, regiona i Evrope. Doprinos Kongresu, koji su obeležila inspirativna predavanja i inovativne naučne ideje, dali su svi molekularni biolozi Srbije. Formula uspešnosti i ovde je bila aktuelna:

**„Svi za jednog, jedan za svi!“**

**Sonja Pavlović**

## Iz recenzija Tematskog zbornika *Trendovi u molekularnoj biologiji*

Treći broj *Trendova u molekularnoj biologiji* predstavlja nastavak dobre prakse prikazivanja najboljih naučnih radova mladih istraživača Republike Srbije u oblasti molekularne biologije, kao i najznačajnijih otkrića i metodoloških pomaka u ovoj oblasti. Osim ovog glavnog cilja, *Trendovi* ne zaboravljaju značajne godišnjice i podsećanja na najznačajnija dostignuća i prekretnice u razvoju molekularne biologije. Tako je u ovom trećem broju prikazan jedan od temeljnih radova u ovoj oblasti – 70 godina od otkrića sekundarne strukture DNK. Radovi koji su obeležili prošlu godinu i koji su ovde prikazani odnose se na proučavanje genoma starih humanih populacija i evolucije (Nobelova nagrada za fiziologiju i medicinu 2022), a metodološki pomak je sekvenciranje dugih fragmenata DNK.

*Trendovi u molekularnoj biologiji* 3 svojim sadržajem u potpunosti su opravdali naziv koji nose – prikazani radovi su tematski aktuelni, inspirativni i veoma značajni u naučnom i širem društvenom smislu. Ova publikacija predstavlja svojevrsni presek stanja u molekularnoj biologiji u Srbiji i deo je napora da se prate trendovi i drži korak sa molekularnom biologijom u svetu. Zbog značaja koji ima, nadam se da će se trend objavljivanja *Trendova* nastaviti i narednih godina.

**Dr Svetlana Radović, redovni profesor,  
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu**

Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji 3“ je treći broj u nizu izdanja koje ima za cilj da prikaže naučne rezultate iz oblasti molekularne biologije koje su ostvarili naučnici iz Srbije u prethodnoj godini. Sačinjen je od 18 poglavlja, od kojih 12 predstavljaju revijske radove proizašle iz doktorskih disertacija mladih doktora nauka u kojima je prikazan njihov doprinos određenoj naučnoj oblasti molekularne biologije koja je povezana sa temom njihove disertacije. Preostalih 6 poglavlja su prikazi aktuelnih tema iz molekularne biologije u kojima su naši naučnici dali svoj značajni doprinos. Uvodno poglavlje je posvećeno jubileju, sedamdesetogodišnjici od otkrića strukture molekula DNK, momentu kad je molekularna biologija krupim koracima krenula ka budućnosti, u kojoj je uz ITK tehnologije postala vodeća nauka.

Veliki broj poglavlja iz Zbornika (12) je posvećen istraživanjima iz oblasti biomedicine. To je, očigledno, najznačajnija tema za naše istraživače koji se bave molekularnom biologijom. Tu su i 3 poglavlja iz oblasti farmakogenomike, koja predstavlja najnoviji trend u medicini – personalizovana (precizna) medicina. Ova 3 rada svedoče o tome da naši naučnici prate najnovija stremljenja u medicini. Posebno treba istaći doprinos mladih istraživača iz grupe medicinskih fakulteta ovom izdanju. Čak četvoro istraživača sa Medicinskog fakulteta i jedan sa Stomatološkog fakulteta su priložili poglavlja nastala iz njihovih doktorskih disertacija. Ovo pokazuje da medicina u Srbiji prati svetske trendove. Ovaj broj Tematskog zbornika svedoči i o tome da su značajna postignuća molekularnih biologa u Srbiji donela napredak našoj medicini. Prva dva broja Tematskog zbornika „Trendovi u molekularnoj biologiji 1 i 2“ su doživela veliko interesovanje. Imala su i svoju promociju na Sajmu knjiga. Interesovanje autora da objave svoje rezultate u tematskom zborniku „Trendovi u molekularnoj biologiji 3“ govori da je ovaj tip publikacije nedostajao našoj naučnoj zajednici.

**Dr Vesna Škodrić Trifunović, redovni profesor,  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu**

Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji 3“ sadrži prikaze nekih od najznačajnijih tema u molekularnoj biologiji, počev od ovogodišnjeg jubileja - 70 godina od otkrića sekundarne strukture molekula DNK, preko odabira aktuelnosti koje su obeležile prethodnu godinu u svetu, do naučnih rezultata iz ove oblasti koje su ostvarili istraživači iz Srbije. U okviru Aktuelnih tema, sumirani su rezultati istraživanja iz oblasti fiziologije i medicine za koje je u 2022. godini dodeljena Nobelova nagrada, a odnose se na genomiku starih humanih populacija i evoluciju. Takođe, dat je i prikaz metode sekvenciranja dugih fragmenata, koja je po časopisu *Nature Methods* odabrana za metodu 2022. godine. Preostale teme su iz oblasti kojima se bave istraživači iz Srbije, a koje uključuju istraživanja iz biomedicine, farmakogenomike, kao i molekularne biologije biljaka. Važno je istaći da su mladi doktori nauka aktivno učestvovali u izradi ovog Zbornika, tako da 12 poglavlja u okviru navedenih oblasti predstavljaju revijske radove proizašle iz njihovih doktorskih disertacija odbranih u prethodnoj godini.

Značajno je da se ovaj Tematski zbornik objavljuje već treću godinu za redom, kao i to da su u njegovoj realizaciji ove godine učestvovali istraživači iz različitih naučnih instituta (3) i fakulteta (3) Univerziteta u Beogradu. Ove činjenice ohrabruju, ukazujući da u našoj zemlji postoji kontinuitet u istraživanjima u molekularnoj biologiji koja su aktuelna u svetu, uz to da su dobijeni rezultati iz ove oblasti dostupni i široj javnosti na maternjem jeziku. „Trendovi u molekularnoj biologiji 3“ je tematski zbornik u kome su objedinjeni rezultati fundamentalnih i primenjenih istraživanja u molekularnoj biologiji ostvarenih u našoj zemlji, iz tematskih oblasti koje su prepoznate i aktuelne u svetu.

**Dr Gordana Nikčević, naučni savetnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo  
Univerzitet u Beogradu**

# Stereotipija B-ćelijskog receptora u hroničnoj limfocitnoj leukemiji

Teodora Karan-Đurašević

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerzitet u Beogradu, Beograd

Kontakt: dora\_karan@yahoo.com

## APSTRAKT

Opsežne imunogenetičke studije sprovedene tokom proteklih nekoliko decenija u oblasti hronične limfocitne leukemije (HLL) su identifikovale grupe pacijenata koji ekspimiraju visoko homologne, skoro identične imunoglobulinske molekule koji ulaze u sastav B-ćelijskog receptora (BĆR IG). Ovaj fenomen, nazvan „BĆR stereotipija“, obuhvata oko 30% HLL i predstavlja najvažniju potvrdu uloge antigenske stimulacije u patogenezi i evoluciji bolesti. Na osnovu sekvence CDR3 regiona teških lanaca IG definisani su stereotipni subsetovi koji ispoljavaju konzistentne subset-specifične biološke i kliničke karakteristike. Neki od najzastupljenijih subsetova imaju i jasan prognostički značaj, tako da se čak mogu smatrati različitim varijantama bolesti. Subklasifikacija HLL bazirana na BĆR stereotipiji je omogućila kompartmentalizovan pristup u istraživanju ove bolesti, i otvorila mogućnost za precizniju stratifikaciju pacijenata, kao i uspešniju prognostiku i lečenje, uprkos izrazitoj kliničkoj heterogenosti HLL.

**Ključne reči:** hronična limfocitna leukemija, B-ćelijski receptor, stereotipija

## B-cell receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia

Teodora Karan-Djurasevic

Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Belgrade

Correspondence: dora\_karan@yahoo.com

### ABSTRACT

During the past several decades, extensive immunogenetic research of chronic lymphocytic leukemia (CLL) led to the identification of groups of patients expressing highly homologous, almost identical B-cell receptor immunoglobulin molecules (BCR IG). This phenomenon, termed „BCR stereotypy“, accounts for around 30% of all CLL and represents the strongest evidence for the role of antigenic stimulation in CLL pathogenesis and evolution. Based on the sequence of CDR3 region within IG heavy chains multiple stereotyped subsets have been defined, which display consistent subset-specific biological and clinical characteristics. Some of the most frequent subsets also exert strong prognostic significance and can be considered to be distinct disease variants. Stereotypy-based CLL subclassification enabled compartmentalized approach in the research of this disease, and offered the possibility of refining stratification of patients that can improve prognostication and clinical decision-making despite extreme heterogeneity of CLL.

**Key words:** chronic lymphocytic leukemia, B-cell receptor, stereotypy



## UVOD

Hronična limfocitna leukemija (HLL) je najčešći tip leukemije adultnog doba u Zapadnom svetu i karakteriše se klonskom ekspanzijom i akumulacijom zrelih CD5-pozitivnih B limfocita u krvi, kostnoj srži i sekundarnim limfnim organima. Najčešće se javlja u starijoj populaciji (medijana starosti je 72 godine pri postavljanju dijagnoze), i to predominantno kod muškaraca [1]. HLL se odlikuje izrazito heterogenim kliničkim tokom i prognozom. Većina pacijenata ima indolentnu, sporo progredirajuću bolest koja, u ekstremnim slučajevima, može da perzistira kao stabilna limfocitoza i nekoliko decenija bez pojave kliničkih simptoma. Sa druge strane, kod nekih pacijenata se razvija veoma agresivna forma HLL, gde se progresija bolesti i potreba za lečenjem javljaju ubrzo nakon postavljanja dijagnoze.

Intenzivna istraživanja HLL u poslednjih 30 godina su ukazala na to da je njena klinička heterogenost rezultat kompleksnosti mehanizama uključenih u patobiologiju HLL ćelija. HLL se danas smatra prototipom kancera čiji su inicijacija i progresija rezultat kombinovanog efekta intrinzičnih genetičkih abnormalnosti malignih B limfocita i ekstrinzičnih faktora iz tkivne mikrosredine, uključujući i antigene [2]. Tipičan neselektovani HLL genom obuhvata oko 2000 genetičkih promena u koje spadaju hromozomske aberacije, mutacije protein-kodirajućih gena i nekodirajućih RNK, i epigenetičke modifikacije [3-6]. Najčešće hromozomske aberacije u HLL su delecija 13q14, trizomija 12q, delecija 11q22-q23 i delecija 17p13, prisutne kod oko 80% pacijenata [1, 3]. Geni lokalizovani u okviru minimalno deletiranog/amplifikovanog regiona u ovim aberacijama su miR-15a i miR16-1 (del13q), *CDK4*, *GLI* i *MDM2* (trizomija 12), *ATM* i *BIRC3* (del11q) i *TP53* (del17p), i uključeni su u regulaciju apoptoze i reparacije DNK [7-14]. Pored hromozomskih aberacija, u HLL je identifikovano više od 40 rekurentno mutiranih gena. Ove rekurentne mutacije nisu homogeno rasprostranjene po genomu, već pogađaju gene integrisane u relativno mali broj signalnih puteva i ćelijskih procesa. Tu spadaju signalni putevi koji se pokreću medijatorima iz mikrosredine kao što su NOTCH (*NOTCH1*, *FBXW7*), TLR (*MYD88*), MAPK/ERK (*MAP2K1*, *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*) i NF- $\kappa$ B (*BIRC3*, *NFKBIE*, *TRAF3*), kao i unutarćelijski programi uključeni u kontrolu ćelijskog ciklusa i odgovor na oštećenja DNK (*TP53*, *ATM*, *POT1*, *SAMHD1*), hromatinske modifikacije (*HIST1H1E*, *CHD2*, *ZMYM3*), transkripciju (*EGR2*, *IRF4*, *BCOR*, *MED12*), obradu, transport i ribozomalno procesovanje RNK (*SF3B1*, *XPO1*, *RPS15*) [4, 5, 15].

Iako su signalni putevi kojima se vrši transdukcija signala sa B-ćelijskog receptora (B $\kappa$ R) retko pogođeni somatskim mutacijama, ovi putevi su konstitutivno aktivni u HLL B limfocitima. Velika ekspanzija istraživanja na polju imunogenetike HLL, koja se dogodila u poslednjih nekoliko decenija, dovela je do revolucionarnih otkrića koja su ukazala na centralnu ulogu klon-specifičnog B $\kappa$ R u patogenezi i evoluciji ove bolesti [16-18]. Naime, brojni dokazi upućuju na to da je prepoznavanje određenih egzogenih ili autoantigena, praćeno selekcijom specifičnog B-ćelijskog kлона, ključan događaj u patofiziologiji HLL [17]. Sa kliničke tačke gledišta, to je potvrđeno velikom terapijskom efikasnošću inhibitora B $\kappa$ R-signalizacije, odnosno malih molekula antagonista kinaza asociiranih sa B $\kappa$ R (ibrutinib, idelalizib) [19-21].

## STRUKTURA B-ĆELIJSKOG RECEPTORA I RAZVIĆE B LIMFOCITA

### Diverzitet imunoglobulina

B-ćelijski receptor se eksprimira na površini B limfocita i sastoji se od molekula imunoglobulina (IG), koji predstavlja antigen-vezujuću komponentu B $\kappa$ R, u kompleksu sa CD79A/79B heterodimerom, odgovornim za signalnu transdukciju. Signalizacija preko B $\kappa$ R ima esencijalnu ulogu u preživljavanju, proliferaciji i diferencijaciji normalnih B limfocita, a implicirana je i u patogenezi nekih maligniteta zrelih B ćelija, uključujući i HLL.

Imunoglobulinski molekuli (antitela) su heterodimeri sastavljeni od dva identična teška (H) lanca i dva identična laka (L) lanca ( $\kappa$  ili  $\lambda$ ), povezana disulfidnim mostovima. Oba tipa lanaca sadrže N-terminalni varijabilni (V) region i C-terminalni konstantni (C) region (Slika 1a). Jukstapozicijom varijabilnih regiona H i L lanaca (VH i VL, respektivno) se formira antigen-vezujuće mesto, od čije strukture zavisi specifičnost i afinitet IG molekula za antigen. Konstantni regioni nisu uključeni u prepoznavanje antigena. Konstantni region H lanca (CH) definiše izotip imunoglobulina (IgA, IgD, IgE, IgG i IgM) i učestvuje u efektorskim funkcijama antitela tokom imunog odgovora. Pored toga, CH region ukotvljava membranski vezane IG u plazma membranu B ćelija. Varijabilni region svakog IG lanca se sastoji od četiri relativno konzervisana „framework” regiona (FR1, FR2, FR3 i FR4) i tri hipervarijabilna „complementarity-determining” regiona (CDR1, CDR2 i CDR3) (Slika 1b). FR regioni su odgovorni za održavanje arhitekture IG molekula, dok CDR regioni H i L lanca formiraju površinu koja direktno interaguje sa antigenom. CDR3 region H lanca (VH CDR3) ispoljava najveću varijabilnost i predstavlja ključnu determinantu specifičnosti IG za antigen [22].

Imunoglobulinski molekuli su kodirani velikim brojem tandemski aranžiranih gena koji konstituišu *IGH* genski lokus (teški lanci), *IGK* i *IGL* genski lokus ( $\kappa$  i  $\lambda$  laki lanci). Humani *IGH* lokus, lociran na hromozomu 14q32.33, sastoji se od četiri vrste gena: *V* („variable”), *D* („diversity”), *J* („joining”) i *C* („constant”), u 5'-3' smeru. U humanom genomu prisutno je 38-46 funkcionalnih *IGHV* gena, grupisanih u 6-7 familija na osnovu homologije, 23 funkcionalna *IGHD* gena, 6 funkcionalnih *IGHJ* gena i 9 funkcionalnih *IGHC* gena (Slika 2). Lokusi za lake lance ne sadrže *D* gene. Humani *IGK* lokus (hromozom 2p11.2) sadrži klaster od 34-38 funkcionalnih *IGKV* gena koji su svrstani u 5 familija, 5 *IGKJ* gena i jedan *IGKC* gen. Humani *IGL* lokus (hromozom 22q11.2) se sastoji od 29-33 funkcionalna *IGLV* gena, grupisana u 10 familija, i 4-5 funkcionalnih *IGLJ-IGLC* tandema [24]. Identifikovane su alelske varijante mnogih *IG* gena, a naročito gena koji pripadaju *IGH* lokusu. Treba naglasiti da je ukupan broj gena u sva 3 lokusa mnogo veći od navedenog, zahvaljujući prisustvu pseudogena i ORF-ova („open reading frame”). Pored toga, broj funkcionalnih gena u lokusu zavisi od haplotipa, s obzirom da neki geni mogu biti deletirani ili insertovani.

Varijabilni region IG molekula se formira tokom diferencijacije B limfocita putem somatskih rekombinacija između *V*, *D* i *J* gena (teški lanac), odnosno *V* i *J* gena (laki lanac). Na *IGH* lokusu, koji se rearanžira pre *IGL* lokusa, prvi rekombinacioni događaj dovodi do spajanja jednog od *IGHD* gena sa jednim od *IGHJ* gena, a region između rearanžiranih gena biva deletiran. Dobijeni *IGHD-IGHJ* rearanžman se zatim rekombinuje sa jednim od *IGHV* gena, formirajući tako kompletan *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžman koji će biti fuzionisan sa *IGHC* genom ( $C\mu$  ili  $C\delta$ ) tokom RNK splajsinga, i eksprimiran na površini ćelije kao IgM ili IgD. Produktivno rearanžiranje jednog *IGH* lokusa inhibira rearanžiranje *IGH* lokusa na drugom hromozomu (alelsko isključivanje), čime se se obezbeđuje monospecifičnost B limfocita [26]. Međutim, ako je rearanžman jednog alela neproduktivan, biće rekombinovan drugi alel, a u slučaju da rekombinacijom opet nastane neproduktivan rearanžman, ćelija će umreti apoptozom. Slični rekombinacioni procesi događaju se između *V* i *J* gena na lokusima za lake lance. *IGK* lokus se rearanžira pre *IGL* lokusa; uspešna rekombinacija jednog *IGK* alela inhibira rearanžiranje drugog (alelsko isključivanje), kao i rearanžiranje *IGL* lokusa (izotipsko isključivanje). U slučaju neproduktivnog rearanžiranja jednog *IGK* lokusa dolazi do rekombinovanja drugog *IGK* alela a, ako je i ta rekombinacija neuspešna, rearanžira se *IGL* lokus. I ponovo, ako ni jedan od pokušaja rekombinovanja ne dovede do nastanka produktivnog rearanžmana, ćelija će biti podvrgnuta apoptozi.

Imajući u vidu broj gena na *IG* lokusima koji mogu da učestvuju u rekombinaciji, kao i nasumično sparivanje teških i lakih lanaca, jasno je da B limfociti mogu da produkuju ogroman broj različitih antitela („combinatorial diversity”). Međutim, realan broj kombinacija je manji od teoretskih oko  $1,6 \times 10^6$ , s obzirom na to da se svi geni ne rekombinuju istom frekvencijom, kao i na to da nisu svi *IGH-IGL* parovi funkcionalni. Pored

toga, pokazano je da  $V(D)J$  rekombinacije nisu stohastički proces, već su determinisane genetičkim faktorima i precizno regulisane tokom ontogenije [27].

Diverzitet primarnog IG repertoara (repertoar naivnih B ćelija) se dalje povećava mehanizmom nazvanim „junctional diversity“. Naime, proces somatskih rekombinacija, katalizovan grupom enzima zajednički nazvanim  $V(D)J$  rekombinaze, iako veoma precizan, uvodi varijabilnost na mestima spojeva  $V$ ,  $(D)$  i  $J$  gena. Rekombinacija je omogućena prisustvom konzervisanih rekombinacionih signalnih sekvenci (RSS) lociranih na 3' kraju  $V$  gena, 5' kraju  $J$  gena i oba kraja  $D$  gena. RS sekvence, koje prepoznaju enzimi kodirani genima  $RAG1$  i  $RAG2$  („recombination activating gene“), osiguravaju da  $V$  geni lakih lanaca mogu biti rekombinovani isključivo sa  $J$  genima, dok na  $IGH$  lokusu  $IGHV$  geni mogu da se rearanžiraju samo sa  $IGHD$  genima, a  $IGHD$  samo sa  $IGHJ$  genima. Tokom ovog procesa dešava se „trimovanje“ krajeva gena koji se rekombinuju delovanjem egzonukleaza, adicija kratkih palindromskih sekvenci, kao i insercija nasumičnih nukleotida (katalizovana terminalnom deoksinukleotidil transferazom, TdT) [28]. Nasumičnom delecijom i adicijom nukleotida tokom  $IGHV$ - $IGHD$  i  $IGHD$ - $IGHJ$  ligacije formiraju se dva N regiona ( $N1$  i  $N2$ ) koji predstavljaju izvor ekstremne varijabilnosti  $VH$  CDR3, lociranog na mestu  $VDJ$  spajanja („ $IGHV$ - $IGHD$ - $IGHJ$  junction“) (Slika 1b). Diverzitet  $VH$  CDR3, kako po pitanju dužine, tako i po pitanju amino-kiselinske sekvence, rezultira u produkciji mnogo šireg IG repertoara (do  $10^{11}$  različitih IG) nego što bi bilo moguće samo na osnovu kombinovanja različitih „germline“ gena.

Diverzifikacija antitela se nastavlja nakon susreta sa antigenom (sekundarni IG repertoar) putem somatskih hipermutacija i „class-switch“ rekombinacija, čime nastaju B limfociti sa ogromnim opsegom antigenskih specifičnosti (vidi sledeći odeljak).

### Diferencijacija B limfocita

Diferencijacija B limfocita je višestepeni proces podeljen u dve faze: antigen-nezavisnu fazu, koja se odvija u kostnoj srži (i fetalnoj jetri), i antigen-zavisnu fazu u sekundarnim limfnim organima.

Prvi stadijum u diferencijaciji B limfocita u kostnoj srži predstavlja rana pro-B ćelija, koju definiše početak  $IGHD$ - $IGHJ$  rekombinacija. Spajanje  $IGHV$  gena sa  $IGHD$ - $IGHJ$  rearanžmanom dešava se u stadijumu kasne pro-B ćelije, i dovodi do transkripcije i sinteze  $\mu$  teškog lanca, koji sadrži  $IGHV$ - $IGHD$ - $IGHJ$  kompleks vezan za  $C\mu$ .  $\mu$  teški lanac je pretežno citoplazmatski, ali može biti i asociiran sa surogat lakim lancima i, u kompleksu sa  $CD79A/CD79B$ , prolazno eksprimiran na površini ćelije kao pre-B $\zeta$ R. Nakon toga nastupa sledeći stadijum diferencijacije, tzv. stadijum male pre B-ćelije, u kome se dešavaju rearanžmani lokusa za lake lance, čime je omogućeno sparivanje prethodno sintetisanih  $\mu$  teških lanaca sa IGK ili IGL, odnosno formiranje IgM. Ekspresija površinski-vezanog IgM kao integralnog dela B $\zeta$ R definiše stadijum nezrele B ćelije. U ovoj fazi se eliminišu autoreaktivni B klonovi, ili se njihova specifičnost menja putem editovanja receptora ili zamene  $IGHV$  [29]. Nezreli B limfociti migriraju u slezinu gde postaju nezrele naivne B ćelije. Kao rezultat alternativnog splajsinga IGH transkripata, koji dovodi do fuzije  $IGHV$ - $IGHD$ - $IGHJ$  gena sa  $C\mu$  ili  $C\delta$ , ove ćelije koeksprimiraju membranski-vezane IgM i Ig D sa istom antigenskom specifičnošću.

Naivni B limfociti su smešteni u sekundarnim limfnim organima (slezini, limfnim čvorovima i mukozalnim limfnim tkivima) gde dolazi do njihovog susreta sa različitim antigenima. Vezivanje B $\zeta$ R za određeni antigen pokreće signalnu kaskadu koja aktivira B ćeliju, što dovodi do proliferacije antigen-specifičnog klona i, na kraju, do diferencijacije u plazma ćelije, koje sekretuju specifična antitela, i memorijske ćelije. U zavisnosti od učešća T limfocita u aktivaciji B ćelija, razlikuju se dva tipa odgovora na antigensku stimulaciju. Bakterijski polisaharidi i lipopolisaharidi mogu direktno da aktiviraju B limfocite (T-nezavisan odgovor), što

dovodi do brze produkcije IgM. Nasuprot tome, odgovor na proteinske antigene je T-zavisan i zahteva interakciju B ćelija sa CD4+ T ćelijama i antigen-prezentujućim ćelijama. Nakon aktivacije posredovane T ćelijama, proliferišući B limfociti migriraju dublje u limfni čvorić, formirajući strukturu pod nazivom „germinalni centar“. U visoko specijalizovanoj mikrosredini germinalnih centara B ćelije počinju da proliferišu velikom brzinom, pri čemu podležu somatskim hipermutacijama i „class-switch“ rekombinacijama.

Proces somatskih hipermutacija (SHM), posredovan enzimom AID („activation-induced“ citidin deaminaza), uvodi tačkaste mutacije u rearanžirane IG lokuse i to stopom koja je  $10^6$  puta veća od stope spontanih mutacija drugih gena. SHM se uvode u varijabilne regione H i L lanaca, dok konstantni regioni nisu zahvaćeni. SHM preferencijalno ciljaju specifična „vruća mesta“ (RGYW ili njemu inverzni WRCY motiv), tranzicije su češće od transverzija, i akumuliraju se kako u FR tako i u CDR regionima [30]. Mutacije koje dovode do amino-kiselinske zamene („missense“ mutacije) su koncentrisane u CDR regionima, s obzirom da one menjaju afinitet IG za antigen. S druge strane, one su retke u FR regionima jer bi tako mogle da naruše osnovnu arhitekturu IG molekula, i tu preovlađuju „silent“ mutacije. Proces SHM može da dovede i do uvođenja malih insercija i delecija, ali je ovo redak događaj i njegov mehanizam je drugačiji od SHM posredovanih AID enzimom.

Akumulacijom SHM nastaje klonalno potomstvo aktivirane B ćelije sa diverzifikovanim IG repertoarom i, stoga, različitim afinitetom za antigen. Ove ćelije zatim podležu selekciji antigenom: B ćelije koje efikasno prepoznaju antigen prezentovan od strane folikularnih dendritičnih ćelija primaju signale za preživljavanje, putem aktivacije BĆR i kostimulacije T ćelijama, i nastavljaju da proliferišu, dok B ćelije koje ne vezuju antigen ili ga vezuju niskim afinitetom umiru apoptozom. Višestruke runde proliferacije, SHM i selekcije dovode do tzv. „afinitetnog sazrevanja“, odnosno produkcije B limfocita sa sve većom specifičnošću i afinitetom za antigen. Uporedo sa afinitetnim sazrevanjem, odvijaju se „class-switch“ rekombinacije (takođe posredovane AID) koje dovode do fuzije *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana sa nizvodnim C genom, što omogućava sintezu drugih IG izotipova osim IgM i IgD, ali sa istom antigenskom specifičnošću [31]. Selektovane B ćelije na kraju ovog procesa napuštaju germinalni centar i završavaju svoju diferencijaciju u visoko specifične plazma ćelije i memorijske ćelije sa određenim efektorskim funkcijama.

SHM i „class-switch“ rekombinacije dalje povećavaju varijabilnost IG molekula i, u kombinaciji sa prethodno opisanim mehanizmima „combinatorial“ i „junctional“ diverziteta, omogućavaju produkciju do  $10^{12}$  različitih antitela [24]. Potencijal B limfocita da proizvedu tako ogroman repertoar IG ima, međutim, visoku cenu, s obzirom da na putu diferencijacije dolazi do gubitka velikog broja ćelija. Naime, mehanizmi kojima se kreira diverzitet IG mogu dovesti do formiranja neproaktivnih rearanžmana, usled rekombinacije nefunkcionalnih pseudogena, „out-of-frame“ fuzija, nastanka stop kodona na mestima spajanja rekombinovanih gena, kao i uvođenjem stop kodona i „frameshift“ mutacija tokom SHM. Pored toga, „missense“ mutacije indukovane procesom SHM mogu da poremete strukturu IG molekula ili da smanje njegov afinitet za antigen. Kao što je već napomenuto, B limfociti koji ne uspeju da formiraju produktivni rearanžman H i L lanaca, te ne mogu da produkuju funkcionalna antitela, umiru apoptozom.

## IMUNOGENETIKA HLL – RETROSPEKTIVA

Uloga BĆR u patogenezi HLL je dospela u prvi plan zahvaljujući studijama iz 1990-tih godina u kojima su otkrivene restrikcije u genskom repertoaru *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana HLL B limfocita, odnosno preovlađivanje određenih *IGHV* genskih familija (*IGHV1*>*IGHV3*> *IGHV4*) i *IGHV* gena (npr. *IGHV1-69*, *IGHV3-7*, *IGHV4-34*), što je ukazalo na selekciju B progenitora koji ekspimiraju određeni BĆR [32-35]. Rezultati ovih pionirskih studija

su inspirisali dalja istraživanja na polju imunogenetičke karakterizacije HLL, i ubrzo je otkriveno da veliki broj HLL pacijenata eksprimira klon-specifični BĆR IG sa somatskim hipermutacijama, čime je opovrgnuto dotadašnje shvatanje da je HLL malignitet antigen-naivnih B ćelija, i prvi put ukazano na učešće antigena u razvoju ove bolesti. Pokazano je da se patern SHM razlikuje kako kvantitativno (broj), tako i kvalitativno (tip i distribucija) u zavisnosti od *IGHV* gena u klon-specifičnom *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmanu. Pored toga, odnos između broja „missense“ i „silent“ SHM (visok u CDR regionima, a nizak u FR regionima) ukazao je na potrebu za održanjem funkcionalnosti BĆR IG, odnosno na selekciju antigenom [35].

Sledeća velika prekretnica u izučavanju HLL dogodila se 1999. godine kada su dve istraživačke grupe, nezavisno jedna od druge, došle do otkrića da se HLL pacijenti mogu podeliti u dve grupe sa različitim kliničkim tokom i ishodom bolesti u zavisnosti od prisustva SHM u *IGHV* genu klon-specifičnog BĆR IG. Pacijenti sa značajnim SHM opterećenjem (<98% identičnosti između rearanžiranog i odgovarajućeg „germline“ *IGHV* gena; „mutirana HLL“, M-HLL) imaju blaži tok bolesti i povoljnu prognozu, nasuprot pacijentima sa visokim stepenom identičnosti (>98%; „nemutirana HLL“, N-HLL) koji imaju agresivnu formu bolesti i lošiju prognozu [36, 37]. *IGHV* mutacioni status je do danas ostao najpouzdaniji prognostički marker u HLL, nezavisan od kliničkog stadijuma i drugih biomarkera [38, 39]. Što je još važnije, to je i najstabilniji marker, koji se može odrediti u bilo kom trenutku bolesti, čime se razlikuje od drugih prognostičkih i prediktivnih markera (uključujući i hromozomske aberacije) koji se menjaju tokom evolucije HLL [15, 40]. Ipak, treba naglasiti da binarna podela na M-HLL i N-HLL ne odslikava u potpunosti kliničku heterogenost HLL, s obzirom da neki M-HLL pacijenti imaju stabilnu bolest bez potrebe za lečenjem, dok kod drugih ona ipak progredira u agresivnu formu [41]. U novije vreme se pokazalo da je *IGHV* SHM status ujedno i značajan prediktivni marker. Naime, N-HLL pacijenti mnogo bolje odgovaraju na nove ciljane terapije (BĆR i Bcl2 inhibitori) nego na hemoimunoterapiju koja je efikasna kod M-HLL pacijenata bez visoko rizičnih genetičkih lezija (*TP53* i/ili *ATM* aberacije) [1, 42-45]. Zato se danas određivanje ovog biomarkera smatra esencijalnim za donošenje odluke o prvoj liniji terapije za sve HLL pacijente, kako u svakodnevnoj kliničkoj praksi, tako i u kliničkim studijama [1].

Veliki interes za *IGHV* mutacioni status, i sa biološkog i sa kliničkog stanovišta, doveo je do nagle akumulacije podataka o velikom broju HLL-specifičnih BĆR IG i pokrenuo detaljnije analize njihove molekularne konfiguracije. Nekoliko godina nakon otkrića prognostičkog značaja *IGHV* SHM statusa primećeno je da oko 50% HLL *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana koji sadrže *IGHV3-21* gen imaju skoro identičan VH CDR3. Štaviše, kod ovih pacijenata je detektovana i restrikcija u lakom lancu IG, pošto je on uvek bio kodiran *IGLV3-21* genom [46, 47]. Imajući u vidu da je verovatnoća da dva različita B-ćelijska klona ekspimiraju identičan BĆR IG praktično zanemarljiva (oko  $10^{-12}$ ), bilo je jasno da nije u pitanju slučajnost, već da je verovatno reč o selekciji datih B ćelija nekim zajedničkim antigenskim epitopom. Ubrzo zatim, nekoliko studija je pokazalo da restrikcije u *IGHV* repertoaru i VH CDR3 amino-kiselinskoj kompoziciji nisu ograničene samo na slučajeve sa *IGHV3-21* genom, već da su odlika značajne frakcije HLL [48-52]. Ovi visoko homologni BĆR IG prisutni kod nesrodnih i na druge načine nepovezanih HLL pacijenata su nazvani „stereotipnim BĆR“ [50].

## **STEREOTIPIJA B-ĆELIJSKIH RECEPTORA – KLASIFIKACIJA U STEREOTIPNE SUBSETOVE**

Od otkrića BĆR stereotipije 2004. godine počelo je intenzivno proučavanje ovog fenomena. Kako su studije postepeno obuhvatale sve veće kohorte HLL pacijenata, progresivno je rastao i broj identifikovanih različitih grupa pacijenata sa karakterističnim prototipskim BĆR IG (tzv. „stereotipni subsetovi“), kao i ukupna frekvencija stereotipije [48-59] (Slika 3). Ova istraživanja su otvorila niz novih pitanja: 1) da li je stereotipija prisutna samo u frakciji HLL, ili će obuhvatiti sve pacijente ukoliko se ispita dovoljno veliki broj slučajeva; 2)

koliko ima stereotipnih subsetova i koja je njihova učestalost; 3) da li je BČR stereotipija karakteristična samo za HLL ili postoji i kod drugih B-ćelijskih maligniteta, i koji je njen biološki i klinički značaj.

Polazna tačka u definisanju stereotipnih subsetova bili su *IGHV* gen i kompozicija VH CDR3, s obzirom na njihovu ulogu u vezivanju antigena, a time i selekciji B ćelija. VH CDR3 je ključan za oblikovanje antigenvezujućeg mesta, tako da IG sa sličnom VH CDR3 amino-kiselinskom sekvencom imaju sličnu 3D strukturu i specifičnost za antigen [22]. Zato je prvobitni set kriterijuma za klasifikovanje BČR IG u isti stereotipni subset podrazumevao: 1) prisustvo istih *IGHV*, *IGHD* i *IGHJ* gena; 2) upotrebu istog okvira čitanja *IGHD* gena, i 3) identičnost VH CDR3 amino-kiselinske sekvence  $\geq 60\%$  [48, 50]. Ovaj inicijalni pristup je uskoro modifikovan, jer je uočeno da su u nekim slučajevima IG sa različitim *IGHV* genima imali isti VH CDR3 i IGL partnere. *IGHV* geni su, u ovim slučajevima, uvek pripadali istom filogenetskom klanu i imali su homologne primarne sekvence s obzirom da potiču od zajedničkog ancestralnog gena [60, 61]. Tako je pokazano da sekvence *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana mogu da klasteruju zajedno, odnosno da se svrstaju u isti subset, ako sadrže različiti *IGHV* gen ali iz istog klana, iste *IGHD* i *IGHJ* gene, i ako imaju zajedničke amino-kiselinske motive u VH CDR3. Tipičan primer je subset #1 koji se karakteriše prisustvom *IGHD6-19* i *IGHJ4* gena u kombinaciji sa više različitih *IGHV* gena (*IGHV1-2*, *IGHV1-3*, *IGHV1-8*, *IGHV1-18*, *IGHV5-10-1*, *IGHV5-51*, *IGHV7-4-1*) koji svi pripadaju filogenetskom klanu I [50, 53]. Slično je i sa subsetovima #12 (*IGHV1-2* i *IGHV1-46*), #59 (*IGHV1-58* i *IGHV1-69*) i #77 (*IGHV4-4* i *IGHV4-59*) [53, 54].

Sa porastom broja sekvenciranih HLL *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana pojavila se potreba za njihovom automatizovanom analizom, i ubrzo su razvijeni specijalizovani bioinformatički alati koji su omogućili identifikaciju i klasterovanje sličnih VH CDR3 sekvenci [56]. To je dovelo do uspostavljanja novog seta kriterijuma za definisanje subsetova koji se i danas koristi, a podrazumeva da je za klasifikovanje rearanžmana u isti subset neophodno: 1) prisustvo *IGHV* gena koji pripadaju istom filogenetskom klanu (I, II ili III); 2) identična dužina VH CDR3 i prisustvo definisanih amino-kiselinskih motiva (identičnih amino-kiselina na kritičnim pozicijama u VH CDR3), i 3) najmanje 50% identičnosti i 70% sličnosti amino-kiselinske sekvence VH CDR3 [56, 57]. Ovaj pristup je prvi put primenjen u studiji iz 2012. godine koja je obuhvatila do tada najveći broj HLL pacijenata, preko 7000 [57]. Na osnovu jedinstvenih VH CDR3 motiva, u ovoj studiji je identifikovano više stotina stereotipnih subsetova i oko 30% svih analiziranih *IGHV-IGHD-IGHJ* rearanžmana je klasifikovano u stereotipnu frakciju HLL. Većina identifikovanih subsetova je sadržala samo po nekoliko slučajeva („minor“ subsetovi), dok je u 19 subsetova klasterovalo po više od 20 *IGHV-IGHD-IGHJ* sekvenci i oni su nazvani „major“ stereotipnim subsetovima. „Major“ subsetovi su u ovoj studiji obuhvatili 41% svih stereotipnih rearanžmana i 12,4% celokupne HLL kohorte. Slična metrika se zadržala i u studiji iz 2017. godine, sprovedenoj na oko 20000 pacijenata, dok je donekle promenjena u najnovijoj studiji iz 2021. godine koja je obuhvatila oko 30000 slučajeva i u kojoj je čak 41% rearanžmana klasifikovano u stereotipne subsetove [58, 59]. U ovoj, do sada najvećoj studiji, identifikovano je 10 novih „major“ subsetova, dok je 19 subsetova prethodno označenih kao „major“ zadržalo svoje relativne frekvencije; svi „major“ subsetovi su sadržali po minimum 60 slučajeva (0,2% kohorte). Na nivou celokupne kohorte „major“ subsetovi su bili zastupljeni sa 13%, „minor“ sa 28%, dok je ostatak predstavljao heterogenu (nestereotipnu) frakciju (59%) (Slika 4). Poređenje svih navedenih studija je pokazalo da, iako je sa porastom broja ispitivanih HLL pacijenata rastao i broj subsetova, frekvencija stereotipije se nije povećavala proporcionalno veličini kohorte, već je dostigla plato od oko 30% pri kritičnoj veličini od oko 2500 slučajeva (Slika 3).

Analizirani su i odnosi između BČR stereotipije i drugih imunogenetičkih karakteristika HLL, kao što su *IGHV* genski repertoar i SHM status. Tako je pokazano da se *IGHV* repertoar stereotipne i heterogene frakcije HLL značajno razlikuju; rearanžmani sa *IGHV1-69* i *IGHV3-21* genom su češći u stereotipnoj HLL, rearanžmani sa *IGHV3-23* u heterogenoj HLL, dok su rearanžmani sa *IGHV4-34* genom zastupljeni sa sličnom

učestalošću u ove dve frakcije [59]. Pored toga, primećeno da je udeo stereotipnih BĆR IG veći u N-HLL nego u M-HLL, kao i da postoje značajne razlike u *IGHV* repertoaru i kompoziciji VH CDR3 stereotipnih subsetova u ove dve pogrupe HLL. Na primer, rearanžirani klasifikovani u subsetove #3, #5, #6, #7 i #8 sadrže nemutirane *IGHV* gene (*IGHV1-69*, *IGHV1-2*, *IGHV4-39*) i VH CDR3 sa dugačkim subset-specifičnim amino-kiselinskim motivima [41, 53, 57, 59]. S druge strane, stereotipni subsetovi u okviru M-HLL uglavnom sadrže gene iz *IGHV4* familije (*IGHV4-34*, *IGHV4-59*, *IGHV4-4*), a VH CDR3 motivi su definisani pomoću samo nekoliko amino-kiselinskih ostataka. Pored toga, SHM profili ovih subsetova se značajno razlikuju, čak i među subsetovima sa istim *IGHV* genom [53, 57, 59]. To je naročito upadljivo u slučaju subsetova #4, #16, #29 i #201 koji svi sadrže mutirani *IGHV4-34* a imaju različit spektar rekurentnih i subset-specifičnih SHM, što je verovatno odraz različitog tipa antigenske stimulacije [58].

Kristalografske analize i *in silico* modelovanje klonotipskih BĆR IG pokazali su visok stepen sličnosti 3D strukture BĆR IG koji pripadaju istom stereotipnom subsetu, što je još jedna potvrda da je klasterovanje na osnovu homologije primarne sekvence IG opravdano [62-64]. Ove analize su ukazale i na sposobnost homotipskih interakcija BĆR koji pripadaju određenim subsetovima. Na primer, specifični amino-kiselinski motiv u VH CDR3 subseta #4 omogućava homotipsko prepoznavanje receptora, što dovodi do njihovog kros-linkovanja na površini B limfocita i pokretanja unutarćelijske signalne kaskade (autonomna BĆR signalizacija) [63]. Homotipske interakcije su primećene i u subsetu #2, ali se u ovom slučaju ostvaruju putem lakih lanaca IG, a za kontakt je ključna jedna point mutacija u *IGLV3-21* genu [65].

U cilju ispitivanja tzv. „veza višeg reda“ između stereotipnih subsetova, u najnovijim studijama je razvijen novi bioinformatički pristup kako bi se identifikovali klasteri sličnih subsetova [59, 66]. To je podrazumevalo relaksiranje kriterijuma za definisanje subsetova, tako da su u isti klaster subsetova klasifikovani oni sa *IGHV* genima iz istog filogenetskog klana, ali je bilo dozvoljeno da se dužina VH CDR3 i karakteristični amino-kiselinski motiv razlikuju do dva amino-kiselinska ostatka. Na taj način je otkriveno da 156 različitih „minor“ subsetova ispoljava visok stepen sličnosti sa 21 od ukupno 29 „major“ subsetova. Ovi „minor“ subsetovi su nazvani „satelitskim subsetovima“ i činili su oko 3% celokupne ispitivane HLL kohorte, odnosno 7,5% stereotipne frakcije [59] (Slika 4).

Karakterističan primer „major“ subseta i njegovog satelita su subset #1 i subset #99 koji sadrže *IGHV* gene iz filogenetskog klana I (familije *IGHV1/5/7*) i imaju slične VH CDR3 koji se razlikuju samo u dužini (13 amino-kiselina u subsetu #1 i 14 amino-kiselina u subsetu #9) [59]. Drugi primer je subset #2, najveći stereotipni subset (oko 2,5% HLL), definisan prisustvom *IGHV3-21/IGLV3-21* genskog para, kratkim VH CDR3 (9 amino-kiselina) i amino-kiselinom Asp ili Glu na poziciji 3 u okviru VH CDR3. Ovaj karakterističan amino-kiselinski ostatak je prisutan u 8 satelitskih subsetova koji svi sadrže gene iz familije *IGHV3* i imaju VH CDR3 dugačke 7-11 amino-kiselina. Najveći od satelita je subset #169, koji inače spada u „major“ subsetove i čini 0,2% HLL, a sličan je subsetu #2 jer: 1) sadrži gen *IGHV3-48* koji je 97% identičan genu *IGHV3-21*; 2) sadrži L lanac kodiran *IGLV3-21* genom; 3) dužina VH CDR3 je 9 amino-kiselina, i 4) sadrži iste rekurentne SHM kao subset #2 [66]. Koklasterovanje subsetova #2 i #169 je podržano i drugim sličnostima, kao što je visoka frekvencija *SF3B1* mutacija (45% u subsetu #2 i 43% u subsetu #169) u odnosu na generalnu HLL populaciju (5-8%), homotipske interakcije BĆR, visok nivo intraklonalne diverzifikacije i agresivni tok bolesti [59, 63, 66-69].

Na kraju, treba naglasiti da BĆR stereotipija nije ekskluzivitet HLL, već je detektovana i u drugim B-ćelijskim limfomima, kao što su limfom „mantle“ ćelija i splenični limfom marginalne zone, ali sa značajno manjom frekvencijom. Poređenje HLL stereotipova sa stereotipovima identifikovanim u navedenim limfomima je pokazalo da među njima postoje fundamentalne razlike u dužini i amino-kiselinskoj sekvenci VH CDR3, što ukazuje na to da su u patogenezu ovih bolesti uključeni različiti imunološki mehanizmi [70, 71].

## BIOLOŠKE KARAKTERISTIKE STEREOTIPNIH SUBSETOVA

Brojna istraživanja su pokazala da se stereotipija u HLL ne odnosi samo na klon-specifični BĆR IG, već da slučajevi klasifikovani u isti stereotipni subset imaju i slične genetičke, epigenetičke i transkriptomске profile, kao i da pokazuju sličan tip odgovora na stimulaciju BĆR i drugih receptora na površini B limfocita [58, 67-69, 72-81]. To implicira da je ekspresija stereotipnih BĆR na neki način spregnuta sa akvizicijom određenih bioloških karakteristika, verovatno kroz različite interakcije sa mikrosredinom i to u subset-specifičnom maniru [67]. Kao rezultat ovih mehanizama, nasuprot velikoj heterogenosti HLL u celini stoji izrazita homogenost stereotipnih subsetova, što naglašava potrebu za kompartmentalizovanim pristupom u istraživanju HLL.

U ovom odeljku će biti prikazane osnovne karakteristike četiri paradigmatična „major“ stereotipna subeta (#1, #2, #4 i #8) (Tabela 1).

### Subset #1

Stereotipni subset #1 (*Klan I IGHV/IGKV1(D)-39*) obuhvata 2-2,5% HLL i odlikuje se karakterističnim ekspresionim profilom određenih gena uključenih u regulaciju apoptoze, proliferacije, oksidativnih procesa i BĆR signalnu transdukciju [57, 59]. To je uzrok rezistencije ćelija subeta #1 na apoptozu, kao i značajno veće stope proliferacije nakon stimulacije BĆR u odnosu na druge subsetove [82]. Pored toga, ćelije subeta #1 se odlikuju i subset-specifičnom indukcijom ekspresije kostimulatornih molekula (CD25 i CD86) nakon stimulacije TLR7 receptora [77, 80]. Diferencijalna genska ekspresija u odnosu na druge subsetove se odnosi i na različite miRNA. Na primer, zapažena je značajno snižena ekspresija miRNA-101, koja spada u tzv. „epi-miRNA“, grupu miRNA koje regulišu ekspresiju komponenti epigenetičke mašinerije [76]. miRNA-101 reguliše EZH2, enzimatiku subjedinicu PRC2 kompleksa koji dovodi do represije transkripcije putem metilacije histona H3. Niska ekspresija miRNA-101 u HLL ćelijama subeta #1 dovodi do overekspresije EZH2, što je povezano sa višom stopom proliferacije [76]. Subset 1# se karakteriše i većom zastupljenošću *NOTCH1* mutacija u odnosu na generalnu HLL populaciju (22% vs. 5-10%), kao i *NFKBIE* mutacija (15% vs. 7%) koje dovode do konstitutivne aktivacije NF-κB signalnog puta [2, 59, 67, 83].

### Subset #2

Subset #2 (*IGHV3-21/IGLV3-21*), najveći stereotipni subset, obuhvata 2,5-3% generalne HLL populacije i oko 5,5% HLL koja zahteva lečenje [57, 59, 84-86]. Oko 40% slučajeva koji se klasifikuju u subset #2 pripada N-HLL, dok su 60% M-HLL pacijenti, koji imaju karakterističan patern rekurentnih SHM [47, 53, 54, 57, 87, 88]. Izrazito agresivan klinički tok bolesti, bez obzira na SHM status, je dugo bio enigma, s obzirom da su aberacije gena *TP53* (mutacije i/ili delecije) retke u subsetu #2. Pored toga, nepovoljna prognoza nije mogla biti objašnjena ni najčešćim citogenetičkim aberacijama u ovom subsetu, a to su del11q22-q23 i del13q14 [73, 85, 89]. Zato je veoma značajno bilo otkriće da su mutacije u kodirajućem regionu gena *SF3B1*, koji kodira kritičnu komponentu splajsozoma, mnogo češće u subsetu #2 (45-50%) nego u generalnoj HLL populaciji na dijagnozi, kao i u drugim agresivnim subsetovima (5-10%) [15, 59, 67-69, 90]. Iako uloga poremećene funkcije splajsozoma u patogenezi HLL nije u potpunosti rasvetljena, primer subeta #2 je inspirisao mnoga istraživanja čiji je cilj razvijanje terapija usmerenih na rekurentne *SF3B1* mutacije [91].

### Subset #4

Subset #4 (*IGHV4-34/IGKV2-30*) je najveći stereotipni subset u M-HLL, i obuhvata oko 1% svih HLL pacijenata [57, 59]. Klonovi koji pripadaju subsetu #4 su genetički prilično monotoni, s obzirom da su rekurentne



mutacije najčešće mutiranih gena izuzetno retke, a od hromozomskih aberacija je najčešća del13q, generalno asocirana sa povoljnom prognozom [59, 67, 72, 73, 85]. Nasuprot tome, imunogenetički gledano subset #4 je izuzetno interesantan, s obzirom na sledeće karakteristike: 1) BCR IG su IgG izotipa, što je u HLL retko (najčešće su IgM); 2) *IGHV4-34/IGKV2-30* je redak genski par; 3) VH CDR3 je dugačak i pozitivno naelektrisan, što podseća na patogena anti-DNK antitela; 4) patern SHM je karakterističan za editovane auto-reaktivne BCR IG, i 5) prisutna je intenzivna intraklonalna diverzifikacija u smislu konstantnog uvođenja SHM, što ukazuje na kontinuiranu interakciju sa antigenom [53, 54, 87, 92-97]. Na osnovu svih navedenih karakteristika, a imajući u vidu i indolentan tok bolesti kod pacijenata koji pripadaju subsetu #4, pretpostavljeno je da se ćelije ovog submeta nalaze u stanju anergije u kome imaju usporen odgovor na stimulišuće (auto)antigene [54, 87, 94, 96, 97]. Ova hipoteza se ispostavila ispravnom kada je pokazano da ćelije submeta #4 ispoljavaju konstitutivnu aktivaciju ERK1/2 signalnog puta i nakon BCR kros-linkovanja ne oslobađaju  $Ca^{2+}$  i ne aktiviraju MAP signalnu kaskadu, što su sve osobine B-ćelijske anergije [79, 98].

### Subset #8

Subset #8 (*IGHV4-39/IGKV1(D)-39*) pripada N-HLL podtipu i eksprimira BCR IG gama izotipa [49, 59, 92]. Genetički profil ovog submeta se karakteriše visokom frekvencijom trizomije 12 (60%) i *NOTCH1* mutacija (34-62%) [67-69]. Interesantna odlika submeta #8 je njegova antigenska reaktivnost. Naime, testiranjem različitih (auto)antigena je pokazano da monoklonska antitela (mAb) submeta #8 ispoljavaju široku polireaktivnost, što je u suprotnosti sa mAb drugih agresivnih subsetova (#1 i #2), čija je reaktivnost mnogo restriktivnija [78]. Takođe je pokazano da promiskuitetna antigen-vezujuća specifičnost dovodi do snažne aktivacije primarnih B ćelija submeta #8 nakon stimulacije antigenima [78]. Na osnovu navedenih rezultata je pretpostavljeno da sposobnost ovih ćelija da odgovaraju na širok spektar stimulusa iz mikrosredine indukuje njihovu konstantnu aktivaciju dovodeći do progresivne selekcije sve agresivnijih klonova, što bi moglo biti objašnjenje za brzo napredovanje bolesti, kao i za povećan rizik od Rihterove transformacije (transformacija HLL u agresivni limfom, najčešće difuzni B krupnoćelijski limfom) u ovom subsetu [99].

## KLINIČKI ZNAČAJ STEREOTIPIJE B-ĆELIJSKIH RECEPTORA

Pored homogenosti po pitanju bioloških karakteristika, mnoge studije su pokazale da stereotipni subsetovi ispoljavaju konzistentne subset-specifične kliničke karakteristike, kao što su starost i pol pacijenata klasifikovanih u određeni subset, tumorsko opterećenje na dijagnozi, evolucija i ishod bolesti. U fokusu ovih studija su bili prvenstveno subsetovi #1, #2 i #4 s obzirom da su najbrojniji (#1 je najveći u N-HLL, #4 u M-HLL, a #2 je najveći u celokupnoj HLL i sadrži i M-HLL i N-HLL pacijente) i, stoga, najbolje okarakterisani u biološkom i kliničkom smislu [58, 85, 86, 99] (Tabela 1). Rezultati ovih istraživanja ne samo što su ukazali na prognostički značaj BCR stereotipije, već i na njen potencijal za mnogo precizniju subklasifikaciju HLL nego što je to binarna podela na M-HLL i N-HLL na osnovu *IGHV* SHM statusa. Ilustrativan primer za ovo su subsetovi #4, #16, #29 i #201, koji svi ekspimiraju somatski hipermutiran *IGHV4-34*, ali imaju značajno različit klinički tok [58].

Poređenjem kliniko-bioloških karakteristika stereotipnih subsetova se došlo do zaključka da se neki od njih (subset #1, #2, #4, #8) mogu posmatrati kao različiti homogeni entiteti u okviru heterogene HLL. Na primer, pacijenti klasifikovani u subset #4 su značajno mlađi od pacijenata subsetova #1 i #2 (medijana starosti na dijagnozi je 55 vs. 65 godina) [85]. Što se tiče tumorskog opterećenja, >50% pacijenata u subsetu #2 se dijagnostikuje u uznapredovalim kliničkim stadijumima Bine B i C, iako većina pripada M-HLL podtipu, dok je frekvencija Bine B i C stadijuma na dijagnozi u subsetu #4 samo 7% [85]. Subset #4 je asociran sa veoma

indolentnim kliničkim tokom i medijalnim vremenom do prve terapije (eng. „time to first treatment“, TTFT) od 11 godina, što je odraz još sporijeg napredovanja bolesti nego kod pacijenata sa del13q14 (medijana TTFT je 6,7 godina) koji se smatraju prototipom indolentne HLL. Nasuprot tome, subsetovi #1 i #2 su asocirani sa izuzetno agresivnom formom bolesti (medijana TTFT je 1,6 i 1,9 godina, respektivno), i prognoza je slična kao u HLL sa aberacijama gena *TP53*. Treba naglasiti da su navedene asocijacije sa TTFT nezavisne od citogenetičkih aberacija, kao i od Bine stadijuma na dijagnozi [85].

Sa kliničkog stanovišta, posebno je interesantan slučaj stereotipnog subseta #2. Naime, ekspresija B $\bar{C}$ R IG sa genom *IGHV3-21* je dugo vremena smatrana nepovoljnim prognostičkim markerom u HLL, ali je bilo nejasno da li je loša prognoza povezana sa *IGHV3-21* genom *per se*, ili uzrok leži u tome što većina ovih slučajeva pripada subsetu #2 [51, 100, 101]. Tek nakon opsežnijih istraživanja na većim kohortama je pokazano da je pripadnost subsetu #2 nezavisan prognostički marker povezan sa agresivnom bolešću, odnosno kraćim TTFT, TTNT (eng. „time to next treatment“, vreme do sledeće terapije), PFS (eng. „progression-free survival“, vreme bez progresije bolesti) i OS (eng. „overall survival“, ukupno preživljavanje), i to bez obzira na SHM status. S druge strane, kod pacijenata koji eksprimiraju B $\bar{C}$ R IG sa *IGHV3-21* genom ali ne pripadaju subsetu #2 tok bolesti jasno zavisi od SHM statusa, kao i u ostatku HLL [84, 86]. Pripadnost subsetu #2 se pokazala kao nepovoljan prognostički marker i kada su analizirani samo pacijenti u ranom kliničkom stadijumu bolesti (Bine A). S obzirom da se danas kod najvećeg broj pacijenata dijagnoza postavlja upravo u ranoj fazi, kada su bez simptoma i u tzv. „posmatraj i čekaj“ režimu praćenja, grupa ERIC („European Research Initiative on CLL“) je predložila da se uz analizu *IGHV* SHM statusa u kliničku praksu uvede i testiranje *IGH* sekvenci pacijenata na pripadnost subsetu #2 [102].

Subset #8 je asociran sa agresivnom formom HLL, rekurentnim infekcijama, pojavom sekundarnih maligniteta, a karakteriše se i najvećim rizikom od Rihterove transformacije nezavisno od drugih prognostičkih faktora [99]. Zanimljivo je i da ovaj subset obuhvata pretežno žene, što je u suprotnosti sa predominacijom muškaraca u generalnoj HLL populaciji [49].

Nedavno otkriće satelitskih subsetova se u budućnosti takođe može ispostaviti klinički relevantnim, na šta ukazuju primeri subseta #2 i njegovog satelita #169, kao i subseta #1 i njegovog satelita #99; subsetovi u svakom od navedenih parova imaju sličan TTFT i OS [59, 66].

## ZAKLJUČAK

Otkriće stereotipije B-ćelijskih receptora je unelo suštinske promene u razumevanje ontogenije i evolucije HLL. Dok se ranije HLL smatrala leukemijom naivnih B ćelija, danas je jasno da je njena patogeneza rezultat složenih interakcija B limfocita sa mikrosredinom, a B $\bar{C}$ R stereotipija predstavlja krunski dokaz da u tom procesu ključnu ulogu ima prepoznavanje određenih antigena. Prognostički značaj stereotipije je višestruko dokumentovan za nekoliko najvećih subsetova, i otvara mogućnost preciznije stratifikacije pacijenata kako bi se prevazišla velika klinička heterogenost HLL. Pored toga, pojavila se i ideja da se B $\bar{C}$ R stereotipija iskoristi za razvoj novih terapijskih strategija. Naime, u najnovijim studijama je ispitivana imunogenost VH CDR3 regiona subsetova #1 i #2 *in vivo*. Pokazano je da imunizacija E $\mu$ -TCL1 miševa stereotipnim VH CDR3 peptidima pre transplantacije odgovarajućih HLL ćelija dovodi do sporijeg razvoja bolesti i dužeg preživljavanja, što ukazuje na mogućnost da se stereotipne VH CDR3 sekvence iskoriste za dizajniranje subset-specifičnih vakcina [103, 104].

Iako B $\bar{C}$ R stereotipija ima potencijal da postane veoma značajan prognostički i prediktivni marker u HLL, treba imati u vidu da je to relevantno samo za trećinu ukupnog broja pacijenata. Ipak, dalja istraživa-

nja stereotipije će doprineti ne samo boljoj karakterizaciji stereotipnih subsetova, već i boljem razumevanju biologije nestereotipne frakcije HLL.

## ZAHVALNICA

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, broj ugovora - 451-03-47/2023-01/200042.

## REFERENCE

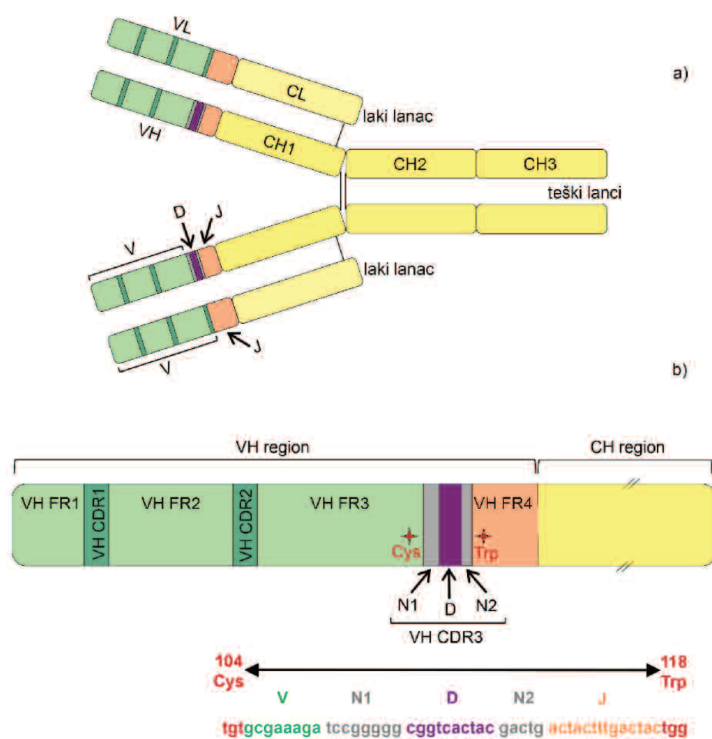
1. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol.* 2019;94(11):1266-87.
2. Sutton LA, Rosenquist R. The complex interplay between cell-intrinsic and cell-extrinsic factors driving the evolution of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Cancer Biol.* 2015;34:22-35.
3. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2000;343(26):1910-6.
4. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature.* 2015;526(7574):525-30.
5. Puente XS, Bea S, Valdes-Mas R, Villamor N, Gutierrez-Abril J, Martin-Subero JI, et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature.* 2015;526(7574):519-24.
6. Mansouri L, Wierzbinska JA, Plass C, Rosenquist R. Epigenetic deregulation in chronic lymphocytic leukemia: Clinical and biological impact. *Semin Cancer Biol.* 2018;51:1-11.
7. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(24):15524-9.
8. Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell.* 2010;17(1):28-40.
9. Seiffert M, Dietrich S, Jethwa A, Glimm H, Lichter P, Zenz T. Exploiting biological diversity and genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2012;53(6):1023-31.
10. Rossi D, Fangazio M, Rasi S, Vaisitti T, Monti S, Cresta S, et al. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2012;119(12):2854-62.
11. Rose-Zerilli MJ, Forster J, Parker H, Parker A, Rodriguez AE, Chaplin T, et al. ATM mutation rather than BIRC3 deletion and/or mutation predicts reduced survival in 11q-deleted chronic lymphocytic leukemia: data from the UK LRF CLL4 trial. *Haematologica.* 2014;99(4):736-42.
12. Alhourani E, Othman MA, Melo JB, Carreira IM, Grygalewicz B, Vujic D, et al. BIRC3 alterations in chronic and B-cell acute lymphocytic leukemia patients. *Oncol Lett.* 2016;11(5):3240-6.
13. Zenz T, Habe S, Denzel T, Mohr J, Winkler D, Buhler A, et al. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood.* 2009;114(13):2589-97.
14. Malcikova J, Swardova J, Rocnova L, Tichy B, Kuglik P, Vranova V, et al. Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood.* 2009;114(26):5307-14.
15. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Rossi D, Minga E, Villamor N, et al. Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2015;29(2):329-36.
16. Niemann CU, Wiestner A. B-cell receptor signaling as a driver of lymphoma development and evolution. *Semin Cancer Biol.* 2013;23(6):410-21.
17. Stevenson FK, Forconi F, Packham G. The meaning and relevance of B-cell receptor structure and function in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol.* 2014;51(3):158-67.

18. Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:841-94.
19. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2013;369(1):32-42.
20. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2014;370(11):997-1007.
21. Skanland SS, Karlsen L, Tasken K. B cell signalling pathways-New targets for precision medicine in chronic lymphocytic leukaemia. *Scand J Immunol.* 2020;92(5):e12931.
22. Xu JL, Davis MM. Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. *Immunity.* 2000;13(1):37-45.
23. Lefranc MP, Pommie C, Ruiz M, Giudicelli V, Foulquier E, Truong L, et al. IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Dev Comp Immunol.* 2003;27(1):55-77.
24. Lefranc M-P, G. L. *The immunoglobulin FactsBook.* London, UK: Academic Press; 2001.
25. Lefranc MP. Nomenclature of the human immunoglobulin heavy (IGH) genes. *Exp Clin Immunogenet.* 2001;18(2):100-16.
26. Brady BL, Steinel NC, Bassing CH. Antigen receptor allelic exclusion: an update and reappraisal. *J Immunol.* 2010;185(7):3801-8.
27. Glanville J, Kuo TC, von Budingen HC, Guey L, Berka J, Sundar PD, et al. Naive antibody gene-segment frequencies are heritable and unaltered by chronic lymphocyte ablation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(50):20066-71.
28. Schatz DG, Spanopoulou E. Biochemistry of V(D)J recombination. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005;290:49-85.
29. Luning Prak ET, Monestier M, Eisenberg RA. B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1217:96-121.
30. Peled JU, Kuang FL, Iglesias-Ussel MD, Roa S, Kalis SL, Goodman MF, et al. The biochemistry of somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:481-511.
31. Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:261-92.
32. Schroeder HW, Jr., Dighiero G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol Today.* 1994;15(6):288-94.
33. Hashimoto S, Dono M, Wakai M, Allen SL, Lichtman SM, Schulman P, et al. Somatic diversification and selection of immunoglobulin heavy and light chain variable region genes in IgG+ CD5+ chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Exp Med.* 1995;181(4):1507-17.
34. Johnson TA, Rassenti LZ, Kipps TJ. Ig VH1 genes expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia exhibit distinctive molecular features. *J Immunol.* 1997;158(1):235-46.
35. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, Allen SL, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest.* 1998;102(8):1515-25.
36. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1999;94(6):1840-7.
37. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1999;94(6):1848-54.
38. Karan-Djurasevic T, Pavlovic S. Somatic Hypermutational Status and Gene Repertoire of Immunoglobulin Rearrangements in Chronic Lymphocytic Leukemia. In: Isvoranu G, editor. *Lymphocyte Updates – Cancer, Autoimmunity and Infection.* In Tech, Rijeka; 2017. p. 49-78.
39. Lee J, Wang YL. Prognostic and Predictive Molecular Biomarkers in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Mol Diagn.* 2020;22(9):1114-25.
40. Sutton LA, Rosenquist R. Deciphering the molecular landscape in chronic lymphocytic leukemia: time frame of disease evolution. *Haematologica.* 2015;100(1):7-16.
41. Vardi A, Agathangelidis A, Sutton LA, Ghia P, Rosenquist R, Stamatopoulos K. Immunogenetic studies of chronic lymphocytic leukemia: revelations and speculations about ontogeny and clinical evolution. *Cancer Res.* 2014;74(16):4211-6.
42. Shanafelt TD, Wang XV, Kay NE, Hanson CA, O'Brien S, Barrientos J, et al. Ibrutinib-Rituximab or Chemoimmunotherapy for Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 2019;381(5):432-43.
43. Fischer K, Al-Sawaf O, Bahlo J, Fink AM, Tandon M, Dixon M, et al. Venetoclax and Obinutuzumab in Patients with CLL and Coexisting Conditions. *N Engl J Med.* 2019;380(23):2225-36.

44. Fischer K, Bahlo J, Fink AM, Goede V, Herling CD, Cramer P, et al. Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood*. 2016;127(2):208-15.
45. Burger JA, Barr PM, Robak T, Owen C, Ghia P, Tedeschi A, et al. Long-term efficacy and safety of first-line ibrutinib treatment for patients with CLL/SLL: 5 years of follow-up from the phase 3 RESONATE-2 study. *Leukemia*. 2020;34(3):787-98.
46. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Thorn I, Soderberg O, Hultdin M, et al. Somatic mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;99(6):2262-4.
47. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Eriksson I, Soderberg O, Karlsson K, et al. Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted Vlambda2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood*. 2003;101(12):4952-7.
48. Tobin G, Thunberg U, Karlsson K, Murray F, Laurell A, Willander K, et al. Subsets with restricted immunoglobulin gene rearrangement features indicate a role for antigen selection in the development of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2004;104(9):2879-85.
49. Ghiotto F, Fais F, Valetto A, Albesiano E, Hashimoto S, Dono M, et al. Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2004;113(7):1008-16.
50. Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, Ghiotto F, Allen SL, Kolitz J, et al. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2004;200(4):519-25.
51. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Stella S, Guida G, et al. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood*. 2005;105(4):1678-85.
52. Widhopf GF, 2nd, Rassenti LZ, Toy TL, Gribben JG, Wierda WG, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells of more than 1% of patients express virtually identical immunoglobulins. *Blood*. 2004;104(8):2499-504.
53. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Boudjograh M, Guida G, Smilevska T, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood*. 2007;109(1):259-70.
54. Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Tobin G, Boudjograh M, Scielzo C, et al. Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood*. 2008;111(3):1524-33.
55. Bomben R, Dal Bo M, Capello D, Forconi F, Maffei R, Laurenti L, et al. Molecular and clinical features of chronic lymphocytic leukaemia with stereotyped B cell receptors: results from an Italian multicentre study. *Br J Haematol*. 2009;144(4):492-506.
56. Darzentas N, Hadzidimitriou A, Murray F, Hatzi K, Josefsson P, Laoutaris N, et al. A different ontogenesis for chronic lymphocytic leukemia cases carrying stereotyped antigen receptors: molecular and computational evidence. *Leukemia*. 2010;24(1):125-32.
57. Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Brochet X, Murray F, Yan XJ, et al. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood*. 2012;119(19):4467-75.
58. Xochelli A, Baliakas P, Kavakiotis I, Agathangelidis A, Sutton LA, Minga E, et al. Chronic Lymphocytic Leukemia with Mutated IGHV4-34 Receptors: Shared and Distinct Immunogenetic Features and Clinical Outcomes. *Clin Cancer Res*. 2017;23(17):5292-301.
59. Agathangelidis A, Chatzidimitriou A, Gemenetzi K, Giudicelli V, Karypidou M, Plevova K, et al. Higher-order connections between stereotyped subsets: implications for improved patient classification in CLL. *Blood*. 2021;137(10):1365-76.
60. Kirkham PM, Mortari F, Newton JA, Schroeder HW, Jr. Immunoglobulin VH clan and family identity predicts variable domain structure and may influence antigen binding. *EMBO J*. 1992;11(2):603-9.
61. Watson CT, Breden F. The immunoglobulin heavy chain locus: genetic variation, missing data, and implications for human disease. *Genes Immun*. 2012;13(5):363-73.
62. Marcatili P, Ghiotto F, Tenca C, Chailyan A, Mazzarello AN, Yan XJ, et al. Igs expressed by chronic lymphocytic leukemia B cells show limited binding-site structure variability. *J Immunol*. 2013;190(11):5771-8.
63. Minici C, Gounari M, Ubelhart R, Scarfo L, Duhren-von Minden M, Schneider D, et al. Distinct homotypic B-cell receptor interactions shape the outcome of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Commun*. 2017;8:15746.
64. Polychronidou E, Kalamaras I, Agathangelidis A, Sutton LA, Yan XJ, Bikos V, et al. Automated shape-based clustering of 3D immunoglobulin protein structures in chronic lymphocytic leukemia. *BMC Bioinformatics*. 2018;19(Suppl 14):414.
65. Maity PC, Bilal M, Koning MT, Young M, van Bergen CAM, Renna V, et al. IGLV3-21\*01 is an inherited risk factor for CLL through the acquisition of a single-point mutation enabling autonomous BCR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(8):4320-7.
66. Gemenetzi K, Psomopoulos F, Carriles AA, Gounari M, Minici C, Plevova K, et al. Higher-order immunoglobulin repertoire restrictions in CLL: the illustrative case of stereotyped subsets 2 and 169. *Blood*. 2021;137(14):1895-904.

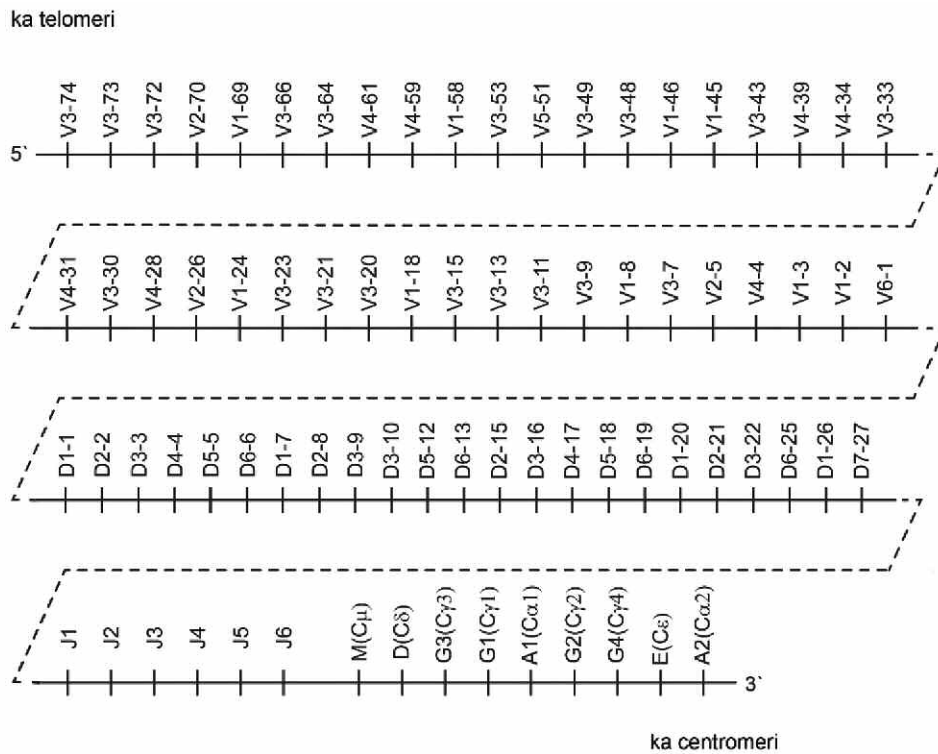
67. Sutton LA, Young E, Baliakas P, Hadzidimitriou A, Moysiadis T, Plevova K, et al. Different spectra of recurrent gene mutations in subsets of chronic lymphocytic leukemia harboring stereotyped B-cell receptors. *Haematologica*. 2016;101(8):959-67.
68. Strefford JC, Sutton LA, Baliakas P, Agathangelidis A, Malcikova J, Plevova K, et al. Distinct patterns of novel gene mutations in poor-prognostic stereotyped subsets of chronic lymphocytic leukemia: the case of SF3B1 and subset #2. *Leukemia*. 2013;27(11):2196-9.
69. Rossi D, Spina V, Bomben R, Rasi S, Dal-Bo M, Brusca A, et al. Association between molecular lesions and specific B-cell receptor subsets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;121(24):4902-5.
70. Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Darzentas N, Murray F, Delfau-Larue MH, Pedersen LB, et al. Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. *Blood*. 2011;118(11):3088-95.
71. Bikos V, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Davis Z, Hockley S, Traverse-Glehen A, et al. Over 30% of patients with splenic marginal zone lymphoma express the same immunoglobulin heavy variable gene: ontogenetic implications. *Leukemia*. 2012;26(7):1638-46.
72. Athanasiadou A, Stamatopoulos K, Gaitatzi M, Stavroyianni N, Fassas A, Anagnostopoulos A. Recurrent cytogenetic findings in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia expressing IgG-switched stereotyped immunoglobulins. *Haematologica*. 2008;93(3):473-4.
73. Marincevic M, Cahill N, Gunnarsson R, Isaksson A, Mansouri M, Goransson H, et al. High-density screening reveals a different spectrum of genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia patients with 'stereotyped' IGHV3-21 and IGHV4-34 B-cell receptors. *Haematologica*. 2010;95(9):1519-25.
74. Malek SN. The biology and clinical significance of acquired genomic copy number aberrations and recurrent gene mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene*. 2013;32(23):2805-17.
75. Kanduri M, Marincevic M, Halldorsdottir AM, Mansouri L, Junevik K, Ntoufa S, et al. Distinct transcriptional control in major immunogenetic subsets of chronic lymphocytic leukemia exhibiting subset-biased global DNA methylation profiles. *Epigenetics*. 2012;7(12):1435-42.
76. Papakonstantinou N, Ntoufa S, Chartomatsidou E, Papadopoulos G, Hatzigeorgiou A, Anagnostopoulos A, et al. Differential microRNA profiles and their functional implications in different immunogenetic subsets of chronic lymphocytic leukemia. *Mol Med*. 2013;19(1):115-23.
77. Ntoufa S, Vardi A, Papakonstantinou N, Anagnostopoulos A, Aleporou-Marinou V, Belessi C, et al. Distinct innate immunity pathways to activation and tolerance in subgroups of chronic lymphocytic leukemia with distinct immunoglobulin receptors. *Mol Med*. 2012;18(1):1281-91.
78. Gounari M, Ntoufa S, Apollonio B, Papakonstantinou N, Ponzoni M, Chu CC, et al. Excessive antigen reactivity may underlie the clinical aggressiveness of chronic lymphocytic leukemia stereotyped subset #8. *Blood*. 2015;125(23):3580-7.
79. Ntoufa S, Papakonstantinou N, Apollonio B, Gounari M, Galigalidou C, Fonte E, et al. B Cell Anergy Modulated by TLR1/2 and the miR-17 approximately 92 Cluster Underlies the Indolent Clinical Course of Chronic Lymphocytic Leukemia Stereotyped Subset #4. *J Immunol*. 2016;196(10):4410-7.
80. Arvaniti E, Ntoufa S, Papakonstantinou N, Touloumenidou T, Laoutaris N, Anagnostopoulos A, et al. Toll-like receptor signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia: distinct gene expression profiles of potential pathogenic significance in specific subsets of patients. *Haematologica*. 2011;96(11):1644-52.
81. Lionetti M, Fabris S, Cutrona G, Agnelli L, Ciardullo C, Matis S, et al. High-throughput sequencing for the identification of NOTCH1 mutations in early stage chronic lymphocytic leukaemia: biological and clinical implications. *Br J Haematol*. 2014;165(5):629-39.
82. Del Giudice I, Chiaretti S, Santangelo S, Tavolaro S, Peragine N, Marinelli M, et al. Stereotyped subset #1 chronic lymphocytic leukemia: a direct link between B-cell receptor structure, function, and patients' prognosis. *Am J Hematol*. 2014;89(1):74-82.
83. Mansouri L, Sutton LA, Ljungstrom V, Bondza S, Arngarden L, Bhoi S, et al. Functional loss of I kappa B epsilon leads to NF-kappa B deregulation in aggressive chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2015;212(6):833-43.
84. Baliakas P, Agathangelidis A, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Minga E, Tsanousa A, et al. Not all IGHV3-21 chronic lymphocytic leukemias are equal: prognostic considerations. *Blood*. 2015;125(5):856-9.
85. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Minga E, Agathangelidis A, Nichelatti M, et al. Clinical effect of stereotyped B-cell receptor immunoglobulins in chronic lymphocytic leukaemia: a retrospective multicentre study. *Lancet Haematol*. 2014;1(2):e74-84.
86. Jaramillo S, Agathangelidis A, Schneider C, Bahlo J, Robrecht S, Tausch E, et al. Prognostic impact of prevalent chronic lymphocytic leukemia stereotyped subsets: analysis within prospective clinical trials of the German CLL Study Group (GCLLSG). *Haematologica*. 2020;105(11):2598-607.

87. Hadzidimitriou A, Darzentas N, Murray F, Smilevska T, Arvaniti E, Tresoldi C, et al. Evidence for the significant role of immunoglobulin light chains in antigen recognition and selection in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009;113(2):403-11.
88. Belessi CJ, Davi FB, Stamatopoulos KE, Degano M, Andreou TM, Moreno C, et al. IGHV gene insertions and deletions in chronic lymphocytic leukemia: "CLL-biased" deletions in a subset of cases with stereotyped receptors. *Eur J Immunol*. 2006;36(7):1963-74.
89. Malcikova J, Stalika E, Davis Z, Plevova K, Trbusek M, Mansouri L, et al. The frequency of TP53 gene defects differs between chronic lymphocytic leukaemia subgroups harbouring distinct antigen receptors. *Br J Haematol*. 2014;166(4):621-5.
90. Rossi D, Brusca A, Spina V, Rasi S, Khiabani H, Messina M, et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood*. 2011;118(26):6904-8.
91. Putowski M, Giannopoulos K. Perspectives on Precision Medicine in Chronic Lymphocytic Leukemia: Targeting Recurrent Mutations-NOTCH1, SF3B1, MYD88, BIRC3. *J Clin Med*. 2021;10(16).
92. Vardi A, Agathangelidis A, Sutton LA, Chatzouli M, Scarfo L, Mansouri L, et al. IgG-switched CLL has a distinct immunogenetic signature from the common MD variant: ontogenetic implications. *Clin Cancer Res*. 2014;20(2):323-30.
93. Jang YJ, Stollar BD. Anti-DNA antibodies: aspects of structure and pathogenicity. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60(2):309-20.
94. Sutton LA, Kostareli E, Hadzidimitriou A, Darzentas N, Tsaftaris A, Anagnostopoulos A, et al. Extensive intraclonal diversification in a subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with stereotyped IGHV4-34 receptors: implications for ongoing interactions with antigen. *Blood*. 2009;114(20):4460-8.
95. Kostareli E, Sutton LA, Hadzidimitriou A, Darzentas N, Kouvatsi A, Tsaftaris A, et al. Intraclonal diversification of immunoglobulin light chains in a subset of chronic lymphocytic leukemia alludes to antigen-driven clonal evolution. *Leukemia*. 2010;24(7):1317-24.
96. Sutton LA, Kostareli E, Stalika E, Tsaftaris A, Anagnostopoulos A, Darzentas N, et al. Temporal dynamics of clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia with stereotyped IGHV4-34/IGKV2-30 antigen receptors: longitudinal immunogenetic evidence. *Mol Med*. 2013;19(1):230-6.
97. Sutton LA, Papadopoulos G, Hadzidimitriou A, Papadopoulos S, Kostareli E, Rosenquist R, et al. An entity evolving into a community: defining the common ancestor and evolutionary trajectory of chronic lymphocytic leukemia stereotyped subset #4. *Mol Med*. 2015;20(1):720-8.
98. Muzio M, Apollonio B, Scielzo C, Frenquelli M, Vandoni I, Boussiotis V, et al. Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood*. 2008;112(1):188-95.
99. Rossi D, Spina V, Cerri M, Rasi S, Deambrogi C, De Paoli L, et al. Stereotyped B-cell receptor is an independent risk factor of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Clin Cancer Res*. 2009;15(13):4415-22.
100. Thorselius M, Krober A, Murray F, Thunberg U, Tobin G, Buhler A, et al. Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in VH3-21-using chronic lymphocytic leukemia patients independent of geographic origin and mutational status. *Blood*. 2006;107(7):2889-94.
101. Ghia EM, Jain S, Widhopf GF, 2nd, Rassenti LZ, Keating MJ, Wierda WG, et al. Use of IGHV3-21 in chronic lymphocytic leukemia is associated with high-risk disease and reflects antigen-driven, post-germinal center leukemogenic selection. *Blood*. 2008;111(10):5101-8.
102. Baliakas P, Moysiadis T, Hadzidimitriou A, Xochelli A, Jeromin S, Agathangelidis A, et al. Tailored approaches grounded on immunogenetic features for refined prognostication in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2019;104(2):360-9.
103. Rovida A, Maccalli C, Scarfo L, Dellabona P, Stamatopoulos K, Ghia P. Exploiting B-cell Receptor Stereotypy to Design Tailored Immunotherapy in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res*. 2021;27(3):729-39.
104. Seiffert M. Antibody Peptides as Cancer Vaccine-Turning Weapons to Targets. *Clin Cancer Res*. 2021;27(3):659-61.

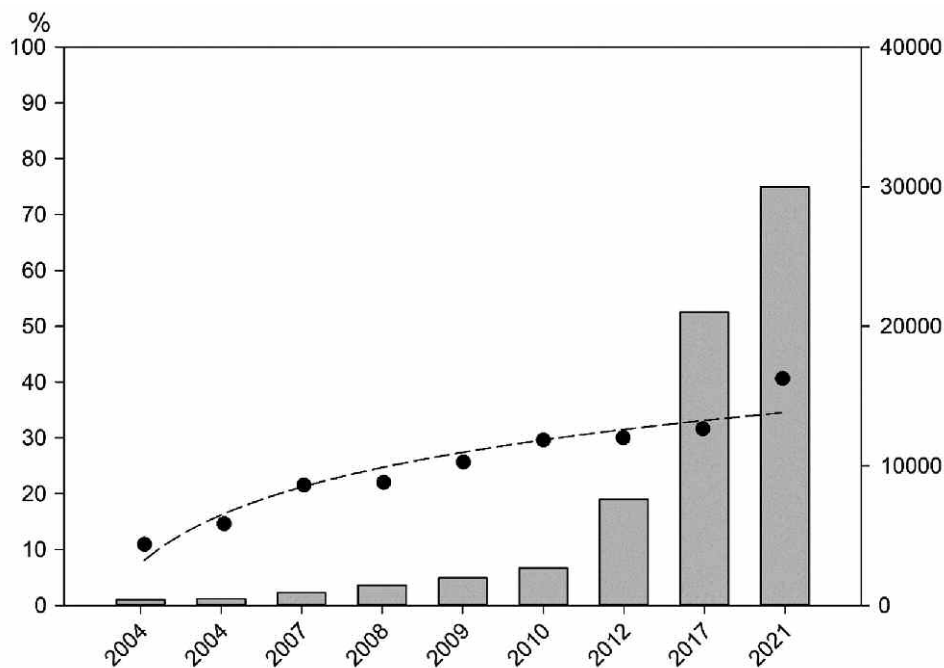


**Slika 1. Shematski prikaz imunoglobulinskog molekula. (a)** IG molekul se sastoji od dva identična teška (H) lanca i dva identična laka (L) lanca. H i L lanci sadrže varijabilni region (VH i VL, respektivno) i konstantni region (CH i CL, respektivno). VH region je kodiran rearanžiranim *IGHV*, *IGHD* i *IGJ* genima, a VL region rearanžiranim *IGK(L)V* i *IGK(L)J* genima. **(b)** VH region sadrži 4 FR regiona (VH FR1-4) i 3 hipervarijabilna CDR regiona (VH CDR1-3). VH FR1-3, VH CDR1 i VH CDR2 su u potpunosti kodirani *IGHV* genom, a VH FR4 *IGJ* genom. VH CDR3 je pozicioniran na mestu spajanja *IGHV*, *IGHD* i *IGJ* gena („*IGHV-IGHD-IGJ* junction“), i obuhvata amino-kiseline koje se nalaze između konzervisanog cisteina (kodon104) u VH FR3 i konzervisanog triptofana (kodon 118) u VH FR4 [23]. N1 i N2 regiona se formiraju nasumičnom adicijom i delecijom nukleotida tokom *IGHV-IGHD* i *IGHD-IGJ* rekombinacije. (Preuzeto iz [38])

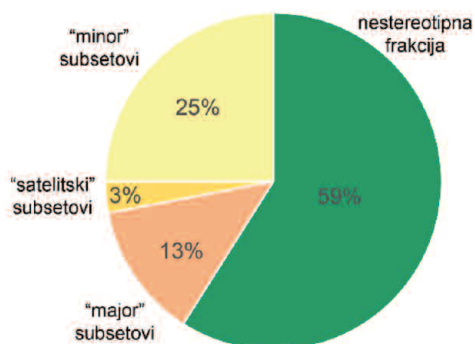




**Slika 2. Shematski prikaz humanog *IGH* lokusa.** Humani *IGH* lokus sadrži 38-46 funkcionalnih *IGHV* gena, 23 funkcionalna *IGHD* gena, 6 funkcionalnih *IGHJ* gena i 9 funkcionalnih *IGHC* gena. Nomenklatura *IGHV* gena: prvi broj u nazivu gena označava pripadnost određenoj *IGHV* porodici, sledi povlaka a zatim broj koji označava poziciju datog gena u lokusu, u 3'-5' smeru. *IGHD* i *IGHJ* geni se numerišu u suprotnom smeru (5'-3') [25]. Prikazani su samo funkcionalni geni; rastojanja između gena nisu u razmeri. (Preuzeto iz [38])



**Slika 3. Frekvencija BCR stereotipije.** U studijama sprovedenim u periodu od 2004. do 2021. godine detektovan je porast relativne frekvencije BCR stereotipije sa povećanjem analiziranih HLL kohorti. Frekvencija je dostigla plato od oko 30% pri kritičnoj veličini kohorte od oko 25000 pacijenata [48, 50, 53-59]. Leva ordinata – relativna frekvencija stereotipne frakcije u datoj studiji; desna ordinata - broj HLL pacijenata analiziranih u datoj studiji.



**Slika 4. Arhitektura BCR stereotipije u HLL.** Oko 41% HLL pacijenata ekspirira stereotipne BCR IG, dok preostalih 59% (heterogeni BCR IG) ne može biti klasifikovano ni u jedan stereotipni subset. Stereotipna frakcija HLL se sastoji od 29 „majeor“ subsetova, koji obuhvataju oko 13% HLL, i velikog broja „minor“ subsetova (28% HLL). U „minor“ subsetove spada 156 „satelitskih subsetova“ (3% HLL) koji imaju veliku imunogenetičku sličnost sa 21 od 29 „majeor“ subsetova. Prikazani su rezultati studije Agatangelidisa i saradnika koja je obuhvatila 29856 HLL pacijenata [59].

subset	IGHV	IGHD	IGHJ	dužina VH CDR3*	VH CDR3 amino-kiselinska sekvenca**	IGKV/IGLV	IGHV SHM status	genomika	klinički tok
#1	IGHV1/5/7 (Klan I)	najčešće IGHD6-19	IGHJ4	13	ARxQWLxxxxFDY	IGKV1(D)-39	uglavnom N-HLL	del11q, NOTCH1 mut NFKBIE mut	agresivan
#2	IGHV3-21	bez IGHD različiti IGHD	IGHJ6	9	Ax(DE)xxxMDV	IGLV3-21	uglavnom M-HLL	del11q, del13q SF3B1 mut	agresivan varijacije unutar subeta
#4	IGHV4-34	najčešće IGHD5-18	IGHJ6	20	[AV]RGxxxxxxx[RK]RYYYYGMDV	IGKV2-30	M-HLL	del13q	indolentan
#8	IGHV4-39	IGHD6-13	IGHJ5	19	A(RST)xxxYSSSWYxxxNWFDP	IGKV1(D)-39	U-HLL	trizomija 12 NOTCH1 mut	agresivan Rihterova transformacija

**Tabela 1. (Imuno)genetičke i kliničke karakteristike najvećih „majeor“ stereotipnih subsetova u HLL.** \* broj amino-kiselina u VH CDR3; \*\* x predstavlja bilo koju amino-kiselinu na datoj poziciji; uglaste zagrade predstavljaju jednu amino-kiselinsku poziciju, i bilo koja od amino-kiselina u zagradi može da se nađe na toj poziciji.



“Trendovi u molekularnoj biologiji 3”  
su podržani od  
**Ministarstva nauke, tehnološkog  
razvoja i inovacija Republike Srbije**

## **IMPRESUM**

### **Trendovi u molekularnoj biologiji, 2023.**

Izdavač

**Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,  
Univerzitet u Beogradu**

Urednik

Dr **Sonja Pavlović**, naučni savetnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo  
Univerzitet u Beogradu

Uređivački odbor

Dr **Ivana Strahinić**, naučni savetnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo  
Univerzitet u Beogradu

Prof. dr **Ivana Novaković**, redovni profesor,  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr **Duška Savić Pavićević**, redovni profesor,  
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Ana Đorđević**, naučni savetnik,  
Univerzitet u Beogradu Institut za biološka istraživanja  
„Siniša Stanković“

Recenzenti

Dr **Svetlana Radović**, redovni profesor,  
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Vesna Škodrić Trifunović**, redovni profesor,  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Gordana Nikčević**, naučni savetnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo  
Univerzitet u Beogradu

Štampa

**Curent Print**, Beograd

Periodičnost izlaženja publikacije

**Godišnje**

Tiraž

**100 primeraka**

# t tmb

Trendovi u molekularnoj biologiji  
Trends in Molecular Biology

## Autori

Aleksandra Uskoković.....	138
Ana Djordjevic .....	151
Anastasija Ninković .....	38
Biljana Božić Nedeljković .....	245
Bojan Božić.....	245
Bojana Stevanović .....	90
Danijela Paunović.....	269
Dunja Drakulić .....	184
Dušanka Savić-Pavičević.....	38
Goran Brajušković.....	8
Ivana Kolić .....	168
Jadranka Miletić Vukajlović.....	184
Jelena Arambašić Jovanović .....	138
Jelena M. Aleksić.....	18
Jovan Pešović .....	38
Jovana Komazec.....	78
Jovana Kuveljić .....	122
Lana Radenković .....	38
Ljiljana Stojković .....	168
Ljupka Gligorovska .....	151
Luka Velimirov .....	38
Maja Bubić.....	106
Maja Stojiljković.....	78
Maja Živković .....	106
Marija Đorđević .....	138
Marija Đurić .....	256
Marija Dušanović Pjević .....	205
Marija Kosić.....	218
Marko Panić.....	38
Melita Vidaković.....	138
Milena Stevanović.....	18
Milka Grk.....	232
Miloš Brkušanin.....	38
Mirjana Mihailović .....	138
Nataša Kovačević Grujičić .....	18
Nemanja Garai.....	38
Nemanja Radovanović .....	38
Nevena Grdović.....	138
Nina Japundžić-Žigon .....	90
Nina Žigon.....	218
Slobodan Davidović.....	18
Svetlana Dinić .....	138
Tamara Djurić .....	122
Tanja Lunić .....	245
Teodora Karan-Đurašević .....	58
Zorica Nešić .....	218

CIP - Каталогизacija y publikaciji  
Народна библиотека Србије, Београд

577.2

**TRENDOVI u molekularnoj biologiji** = Trends in  
Molecular Biology. - 2021, br. 1 (sep.)- . - Beograd :  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,  
2021- (Beograd : Curent Print). - 28 cm

Godišnje. - Tekst na srp. i engl. jeziku.  
ISSN 2787-2947 = Trendovi u molekularnoj biologiji  
COBISS.SR-ID 45105929