

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΝΙΚΑΙΑΣ

ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΕΛΕΤΗ TOLL-LIKE ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ
ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ**

ΑΡΒΑΝΙΤΗ ΕΛΕΝΗ

Βιολόγος

Συμβουλευτική Επιτροπή:

Κ. Λάμνησου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Β.Αλεπόρου-Μαρίνου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Π. Κόλλια, Επίκουρη Καθηγήτρια

Αθήνα

Ιούνιος 2011

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κλέα Λάμνησου (επιβλέπουσα)
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τομέα Γενετικής & Βιοτεχνολογίας,
Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών επιστημών, ΕΚΠΑ
Βασιλική Αλεπώρου-Μαρίνου
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τομέα Γενετικής & Βιοτεχνολογίας,
Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών επιστημών, ΕΚΠΑ
Παναγούλα Κόλλια
Επίκουρη Καθηγήτρια Τομέα Γενετικής & Βιοτεχνολογίας,
Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών επιστημών, ΕΚΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κλέα Λάμνησου
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τομέα Γενετικής & Βιοτεχνολογίας,
Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών επιστημών, ΕΚΠΑ
Βασιλική Αλεπώρου-Μαρίνου
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τομέα Γενετικής & Βιοτεχνολογίας,
Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών επιστημών, ΕΚΠΑ
Παναγούλα Κόλλια
Επίκουρη Καθηγήτρια Τομέα Γενετικής & Βιοτεχνολογίας,
Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών επιστημών, ΕΚΠΑ
Ιωάννης Τρουγκάκος
Επίκουρος Καθηγητής Τομέα Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής,
Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών επιστημών, ΕΚΠΑ
Ουρανία Τσιτσιλώνη
Επίκουρη Καθηγήτρια Τομέα Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου,
Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών επιστημών, ΕΚΠΑ
Παναγιώτης Παναγιωτίδης
Αναπληρωτής Καθηγητής Αιματολογίας,
Ιατρική σχολή, ΕΚΠΑ
Αθηνά-Νόρα Βύνιου
Επίκουρη Καθηγήτρια Αιματολογίας,
Ιατρική σχολή, ΕΚΠΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας του τμήματος Βιολογίας της σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών κας Κ.Λάμνησου. Ευχαριστώ θερμά την κα Κ.Λάμνησου, την κα Π.Κόλλια, Επίκουρη Καθηγήτρια του τμήματος Βιολογίας της σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών και την κα Β. Αλεπόρου-Μαρίνου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του τμήματος Βιολογίας της σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών, οι οποίες ως μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής παρακολούθησαν την εξέλιξη της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Διάγνωσης του Αιματολογικού Τμήματος του ΓΝ Νίκαιας «Άγιος Παντελεήμων» υπό την διεύθυνση του κου Νικόλαου Λαουτάρη αρχικά και της κας Ελένης Μανιουδάκη μετέπειτα. Εκφράζω ιδιαίτερες ευχαριστίες στους διευθυντές Ν.Λαουτάρη και Ε.Μανιουδάκη για την καθοδήγηση και την συνεχή υποστήριξή τους στην εκπόνηση της παρούσας μελέτης. Υλικό της μελέτης προέρχεται επίσης και από το αρχείο της Αιματολογικής Κλινικής και Μονάδας Μεταμόσχευσης Αιμοποιητικών Κυττάρων του ΠΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», που διευθύνει ο κ. Αχιλλέας Αναγνωστόπουλος. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον διευθυντή κ. Α. Αναγνωστόπουλο για την υποστήριξη στην πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης.

Η βασική εκπαίδευση, το πειραματικό μέρος και η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε υπό την καθοδήγηση της κας Χρυσούλας Μπέλεση, Βιοπαθολόγου, Διευθύντριας του Αιματολογικού Τμήματος του ΓΝ Νίκαιας «Άγιος Παντελεήμων» και του κ. Κώστα Σταματόπουλου, Αιματολόγου, Επιμελητή του Εργαστηρίου Μοριακής και Κυτταρικής Βιολογίας της Αιματολογικής Κλινικής και Μονάδας Μεταμόσχευσης Αιμοποιητικών Κυττάρων του ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου». Η συμβολή της κας Μπέλεση και του κ. Σταματόπουλου ήταν πολύτιμη για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Θα ήθελα να τους ευχαριστήσω ιδιαίτερα για την υποστήριξη και την καθοδήγησή τους καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μελέτης.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στην κα Φωτεινή Μαραντίδου, βιολόγο για την πολύτιμη βοήθεια και συμπαράσταση που μου παρείχε κατά τη διάρκεια όλων των σταδίων της παρούσας μελέτης.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό και τους συνεργάτες του Εργαστηρίου Μοριακής Διάγνωσης του Αιματολογικού Τμήματος του ΓΝ Νίκαιας «Άγιος Παντελεήμων»: την κα. Ευαγγελία Καλαγιάκου Βιοπαθολόγο, Επιμελήτρια Α, την κα. Ευγενία Τσάκου Μοριακή Βιολόγο, την κα. Μαρία Χατζούλη Βιολόγο, την κα.

Σοφία Μερκούρη και την κα. Σταυρούλα Βλαχάκου, βοηθούς Ιατρικών Εργαστηρίων και τους συνεργάτες του Εργαστηρίου Μοριακής και Κυτταρικής Βιολογίας της Αιματολογικής Κλινικής και Μονάδας Μεταμόσχευσης Αιμοποιητικών Κυττάρων του ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου»: την κα Ντούφα Σταυρούλα Μοριακή Βιολόγο, τον κ. Νικόλαο Παπακωνσταντίνου Μοριακό Βιολόγο και την κα Τασούλα Τουλουμενίδου Βιολόγο, για την πολύτιμη βοήθειά τους στη διεκπεραίωση της πειραματικής διαδικασίας της εργασίας αυτής

Αθήνα, Ιούνιος 2011

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Δομή και λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος	2
1.2 Φυσική ή μη ειδική ανοσία	2
1.3 Υποδοχείς της φυσικής ανοσίας	4
1.3.1 Υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like receptors- TLRs)	5
1.3.2 Δομή των TLRs	5
1.3.3 Προσδέτες των TLRs	7
1.3.4 Πρότυπο έκφρασης των TLRs	9
1.3.5 Σηματοδοτικό μονοπάτι των TLRs	10
1.3.5.1 Πρωτεϊνικοί προσαρμογείς	10
1.3.5.2 MyD88-εξαρτώμενο μονοπάτι	11
1.3.5.3 MyD88-εξαρτώμενη ενεργοποίηση των IRFs	13
1.3.5.4 TRIF-εξαρτώμενο μονοπάτι	14
1.3.5.5 Τελικά προϊόντα της ενεργοποίησης των TLRs	15
1.3.5.6 Αρνητική ρύθμιση της σηματοδότησης	15
1.3.5.7 Εκφραση των TLRs στα Β λεμφοκύτταρα	17
1.4 Επίκτητη ή ειδική ανοσία	19
1.5 Υποδοχείς ειδικής ανοσίας	20
1.5.1 Δομή ανοσοσφαιρινών	20
1.5.2 Γενετική οργάνωση των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών	22
1.5.3 Μηχανισμοί δημιουργίας ποικιλότητας των ανοσοσφαιρινών	24
1.6 Διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων	25
1.6.1 Διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων στο μυελό των οστών	25
1.6.2 Διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια	28
1.7 Σηματοδότηση μέσω του Β-κυτταρικού υποδοχέα	31
1.8 Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία	33
1.8.1 Γενικά	33
1.8.2 Ανάλυση των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών στη ΧΛΛ	36
1.8.3 Ο ρόλος του αντιγόνου στη ΧΛΛ	37
1.8.4 Μεταβίβαση σήματος μέσω του Β-κυτταρικού υποδοχέα	38
1.8.5 Υποδοχείς φυσικής ανοσίας και ΧΛΛ	39
2. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	42

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	
3.1 Ομάδα μελέτης	45
3.2 Υλικά και Μέθοδοι	45
3.2.1 Μελέτη κλωνικών αναδιατάξεων των γονιδίων της μεταβλητής περιοχής της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών	45
3.2.1.1 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από δείγμα περιφερικού αίματος	45
3.2.1.2 Απομόνωση RNA - Σύνθεση cDNA	45
3.2.1.3 Ενίσχυση κλωνικών αναδιατάξεων των γονιδίων IGHV-IGHD-IGHJ με RT-PCR	47
3.2.1.4 Καθαρισμός των προϊόντων RT-PCR	48
3.2.1.5 Ανάλυση της αλληλουχίας των προϊόντων RT-PCR	49
3.2.1.6 Ανάλυση της κατανομής των μεταλλάξεων στα γονίδια IGHV	51
3.2.2 Μελέτη γονιδιακής έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στην σηματοδοτική οδό των TLRs με τη χρήση των συστοιχιών PCR	53
3.2.2.1 Απομόνωση CD19 θετικών λεμφοκυττάρων από δείγμα περιφερικού αίματος	53
3.2.2.2 Απομόνωση ολικού RNA από CD19+ λεμφοκύτταρα	55
3.2.2.3 Σύνθεση cDNA	57
3.2.2.4 Συστοιχίες PCR (PCR Arrays)	59
3.2.2.4.1 Ποσοτική σε πραγματικό χρόνο PCR	59
3.2.2.4.2 Αξιολόγηση αποτελεσμάτων με τη μεθοδολογία του $2^{-\Delta\Delta Ct}$	61
3.2.2.4.3 Μελέτη σηματοδοτικής οδού των TLRs με τη χρήση των συστοιχιών PCR (PCR Arrays)	62
3.2.3 Ανοσοαποτύπωση κατά Western	68
3.2.4 Κυτταρομετρία ροής (Flow cytometry)	71
3.3 Στατιστική ανάλυση	71
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	74
4.1 Ανάλυση των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών	74
4.1.1 Ρεπερτόριο γονιδίων IGHV, IGHD και IGHJ	74
4.1.2 Ανάλυση των μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV	78
4.1.3 «Στερεότυπα» υποσύνολα	79

4.2	Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που συμμετέχουν στη σηματοδοτική οδό των TLRs	81
4.2.1	Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης στο σύνολο των ασθενών	81
4.2.2	Πρωτεϊνική έκφραση επιλεγμένων μορίων σηματοδοτικής οδού των TLRs στη ΧΛΛ	88
4.2.3	Συσχέτιση του προτύπου έκφρασης των TLRs με τα ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά του BcR	93
4.2.4	Συσχέτιση του προτύπου έκφρασης των TLRs με την έκφραση του CD38	97
4.2.5	Συσχέτιση του προτύπου έκφρασης των TLRs με την πρόοδο της νόσου και την ολική επιβίωση	98
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	103
5.1	Γενικά	103
5.2	Συγκριτική μελέτη της έκφρασης των TLR σε υποομάδες ασθενών με ΧΛΛ	105
5.3	Συμπεράσματα	107
6.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	109
7.	ABSTRACT	112
8.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	115
	ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ	125
	ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	150

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Δομή και λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος

Το ανοσοποιητικό σύστημα εξελίχθηκε για να προστατεύει τον οργανισμό από παθογόνους παράγοντες, τόσο εξωγενείς (παθογόνοι μικροοργανισμοί, τοξίνες, βλαβερές ουσίες) όσο και ενδογενείς (νεοπλασματικά κύτταρα, κύτταρα που αποπύπτουν). Κάθε συστατικό αυτών των παραγόντων ικανό να επάγει άνοση απάντηση καλείται αντιγόνο. Η αναγνώριση των αντιγόνων και η αδρανοποίησή τους αποτελεί την κύρια λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και βασίζεται σε ποικίλους μηχανισμούς που δρουν παράλληλα και συμπληρωματικά.

Σε κυτταρικό επίπεδο, η οργάνωση του ανοσοποιητικού συστήματος βασίζεται στη συντονισμένη δράση και αλληλεπίδραση διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών με διακριτούς ρόλους. Όλα τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο, το πολυδύναμο ή αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο που βρίσκεται στο μυελό των οστών και διαφοροποιείται υπό την επίδραση του μικροπεριβάλλοντος σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους.

Η οργάνωση του ανοσοποιητικού συστήματος αυξάνει την πιθανότητα επαφής των αντιγόνων με τα ανοσοδραστικά κύτταρα ώστε να εξασφαλίζεται άμεση άνοση απάντηση. Οι άνοσες απαντήσεις διακρίνονται σε δύο τύπους: i) απαντήσεις της φυσικής ή μη ειδικής ανοσίας στις οποίες κεντρικό ρόλο διαδραματίζουν τα φαγοκύτταρα (μονοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα) και ii) απαντήσεις της επίκτητης ή ειδικής ανοσίας που διεκπεραιώνονται από T και B λεμφοκύτταρα.

Μολονότι οι δύο τύποι ανοσίας έχουν διακριτές λειτουργίες και ουσιαστικές διαφορές ως προς τα κύτταρα και τα μόρια που χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση των αντιγόνων, την ειδικότητα, το χρόνο έναρξης και τη δυνατότητα άνοσης «μνήμης», υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ τους (δηλαδή, τα στοιχεία της φυσικής ανοσίας επηρεάζουν την επίκτητη ανοσία και αντιστρόφως).(1, 2)

1.2 Φυσική ή μη ειδική ανοσία

Η φυσική ή μη ειδική ανοσία είναι η πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού εναντίον παθογόνων και χαρακτηρίζεται από έλλειψη ειδικότητας. Τα κύτταρα της φυσικής ανοσίας αναγνωρίζουν και ανταποκρίνονται στα παθογόνα, αλλά αντίθετα από τα κύτταρα της επίκτητης ανοσίας δεν προσφέρουν μακράς διάρκειας ή προστατευτική

ανοσία στον ξενιστή. Τα κυριότερα κύτταρα που συμμετέχουν στη φυσική ανοσία είναι τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK-κύτταρα), τα σιτευτικά κύτταρα, τα ηωσινόφιλα, τα βασεόφιλα, τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα Β-λεμφοκύτταρα και τα γδ Τ-λεμφοκύτταρα. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο στη φυσική ανοσία παίζουν οι ανατομικοί-μηχανικοί φραγμοί (δέρμα, βλεννογόνοι, κροσσωτό επιθήλιο της αναπνευστικής οδού) που προστατεύουν τον οργανισμό από την είσοδο παθογόνων αλλά και ένα πλήθος εκκρινόμενων μορίων (γαλακτικό οξύ, λυσοζύμη, σύστημα συμπληρώματος) που προστατεύουν τον οργανισμό και συμμετέχουν στη φλεγμονώδη αντίδραση.

Οι κυριότερες λειτουργίες της φυσικής ανοσίας στα σπονδυλωτά περιλαμβάνουν:

- Επιστράτευση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στις περιοχές της μόλυνσης, μέσω της παραγωγής χυμικών παραγόντων, μεταξύ των οποίων χυμικοί μεσολαβητές που καλούνται κυτταροκίνες.
- Ενεργοποίηση του καταρράκτη του συμπληρώματος για την αναγνώριση βακτηρίων, την ενεργοποίηση κυττάρων και την προώθηση της απομάκρυνσης των νεκρών κυττάρων και των συμπλόκων αντισωμάτων.
- Αναγνώριση και απομάκρυνση ξένων ουσιών που εμφανίζονται σε όργανα, ιστούς, το αίμα και τη λέμφο, από ειδικά λευκοκύτταρα.
- Ενεργοποίηση της επίκτητης ανοσίας μέσω μιας διαδικασίας που καλείται παρουσίαση του αντιγόνου.

Μολονότι η φυσική ανοσία περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Elie Metchnikoff πριν από έναν αιώνα και πλέον, για καιρό είχε τεθεί στο περιθώριο, καθώς θεωρήθηκε ότι πρόκειται για μη ειδική απόκριση σε παθογόνα μετά από φαγοκυττάρωση και λειτουργεί κυρίως ως μηχανισμός αντιγονοπαρουσίασης στα κύτταρα που εμπλέκονται στην επίκτητη ανοσία.(3) Ωστόσο, το 1996, οι Hoffmann και συνεργάτες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη Toll στη *Drosophila* είναι απαραίτητη για την επαγωγή αποτελεσματικής ανοσολογικής απόκρισης στον *Aspergillus fumigatus*.(4) Αυτή η μελέτη οδήγησε στην αντίληψη ότι υπάρχουν ειδικοί μοριακοί μηχανισμοί αναγνώρισης παθογόνων που οδηγούν στην ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας.

1.3 Υποδοχείς της φυσικής ανοσίας

Οι στόχοι που αναγνωρίζονται από τα κύτταρα που συμμετέχουν στη φυσική ανοσία είναι συντηρημένα μοριακά μοτίβα των μικροοργανισμών. Η αναγνώρισή τους από τους μηχανισμούς της φυσικής ανοσίας βασίζεται στην ύπαρξη περιορισμένου ρεπερτορίου υποδοχέων, των οποίων η έκφραση και ειδικότητα προκαθορίζονται γενετικά. Αυτοί οι υποδοχείς καλούνται υποδοχείς αναγνώρισης μοτίβων (Pattern Recognition Receptors-PRRs).(5) Τα μοριακά μοτίβα που αναγνωρίζονται από τους PRRs καλούνταν αρχικά μοριακά μοτίβα σχετιζόμενα με παθογόνα (Pathogen Associated Molecular Patterns-PAMPs). Ωστόσο, είναι πιο δόκιμο να θεωρούνται ως σχετιζόμενα με μικροοργανισμούς μοριακά μοτίβα (MAMPs) δεδομένου ότι έχουν βρεθεί όχι μόνο σε παθογόνους αλλά και σε μη παθογόνους μικροοργανισμούς.(6) Τα MAMPs είναι απαραίτητα για την επιβίωση των μικροοργανισμών ενώ δεν παράγονται από τον ξενιστή, γεγονός που επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ εαυτού και μη αυτού από τους μηχανισμούς της φυσικής ανοσίας και αποτρέπει την εκδήλωση αυτοάνοσης απάντησης. Επιπλέον, αντιπροσωπεύουν οντογενετικά διατηρημένες κοινές δομές στις διάφορες τάξεις των παθογόνων. Με τον τρόπο αυτό οι μηχανισμοί της φυσικής ανοσίας αναγνωρίζουν όλο το εύρος των κοινών παθογόνων με τη χρήση περιορισμένου αριθμού υποδοχέων.

Υπάρχουν πολλοί PRRs, ορισμένοι από τους οποίους εντοπίζονται στο αίμα και στα υγρά των ιστών, άλλοι βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων της φυσικής ανοσίας και τέλος άλλοι εντοπίζονται ενδοκυττάρια στη μεμβράνη ενδοπλασματικών κυστιδίων. Η λεκτίνη που προσδένει μαννόζη (mannose binding lectin, MBP) και η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein, CRP) είναι διαλυτοί PRRs που προσδένονται στην επιφάνεια των μικροοργανισμών και επάγουν τον οψωνισμό τους. Στους κυτταρικούς PRRs ανήκουν οι υποδοχείς τύπου Toll (Toll-Like Receptors, TLRs), οι υποδοχείς τύπου NOD (NOD Like Receptors, NLRs), οι υποδοχείς-ρακοσυλλέκτες (Scavenger Receptors), οι λεκτίνες τύπου C και οι CARD ελικάσες.(7-9) Μεταξύ αυτών, οι TLRs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσική ανοσία, ενώ οι σχετιζόμενες σηματοδοτικές οδοί αποτελούν τον αρχαιότερο αμυντικό μηχανισμό, καθώς εντοπίζονται σε έντομα, φυτά και θηλαστικά.(6, 10)

1.3.1 Υποδοχείς τύπου Toll (TLRs)

Πρόκειται για διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που έλαβαν το όνομά τους από τη δομική ομολογία τους με την πρωτεΐνη Toll της *Drosophila Melanogaster*. Αρχικά είχε θεωρηθεί ότι ο ρόλος της πρωτεΐνης Toll περιορίζεται στη διαμόρφωση της πολικότητας του προσθιο-οπίσθιου άξονα στο πρώιμο έμβryo του εντόμου.(11) Αργότερα, διαπιστώθηκε ότι διαθέτει μια κυτταροπλασματική περιοχή ομόλογη με την αντίστοιχη περιοχή του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1 (Interleukin-1 Receptor, IL-1R)(12), κυτταροκίνης που παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσική και την προσαρμοστική ανοσία.(13, 14) Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι η Toll εμπλέκεται στους μηχανισμούς άμυνας της *Drosophila* εναντίον των μυκήτων.(4)

Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί 13 TLRs στα θηλαστικά (11 μέλη της οικογένειας στον άνθρωπο και 13 στον ποντικό) και η αναγνώριση αυτή στηρίχθηκε σε ομοιότητες στις εξωκυττάρια, διαμεμβρανικές και ενδοκυττάρια περιοχές τους. Οι TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10 και TLR11 εκφράζονται στην επιφάνεια του κυττάρου, ενώ οι TLR3, TLR7, TLR8 και TLR9 σε ενδοπλασματικά κυστίδια. Κάθε υποδοχέας αναγνωρίζει διαφορετικά MAMPs, τα οποία προέρχονται από ποικίλους μικροοργανισμούς, π.χ. βακτήρια, ιούς, πρωτόζωα και μύκητες.(6)

Η ανακάλυψη των TLRs συνέβαλε σημαντικά στην κατανόηση των μηχανισμών της φυσικής άνοσης αντίδρασης. Είναι πλέον σαφές ότι η φυσική ανοσία είναι πιο ειδική απ' ό,τι πιστευόταν αρχικά. Οι TLRs αναγνωρίζουν ευρεία ποικιλία μορίων από μικροβιακούς εισβολείς και διεγείρουν διαφορετικούς καταρράκτες μεταβίβασης σήματος, που με τη σειρά τους ενεργοποιούν και ρυθμίζουν την άνοση αντίδραση του ξενιστή.

1.3.2 Δομή των TLRs

Οι TLRs είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς τύπου 1 που αποτελούνται από τρεις διακριτές περιοχές, εξωκυττάρια, διαμεμβρανική και ενδοκυττάρια. Η εξωκυττάρια περιοχή περιλαμβάνει μια περιοχή με επαναλαμβανόμενα μοτίβα πλούσια σε λευκίνη (Leucine-Rich Repeats, LRRs) που οριοθετείται από δύο δομές καλύμματος που εντοπίζονται στο αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο της. Χαρακτηρίζεται από υψηλή μεταβλητότητα, είναι ιδιαίτερα γλυκοζυλιωμένη και, ειδικότερα η περιοχή των LRRs, εμπλέκεται στην αναγνώριση και δέσμευση του προσδέτη.

Τα περισσότερα δεδομένα για τη δομή της εξωκυττάριας περιοχής των LRR, προέρχονται από ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του TLR3.(15, 16) Ωστόσο

πρόσφατα έγινε εφικτός ο προσδιορισμός των κρυσταλλικών δομών των TLR1, TLR2, και TLR4, καθώς και των συμπλόκων με τους προσδέτες τους.(17, 18)

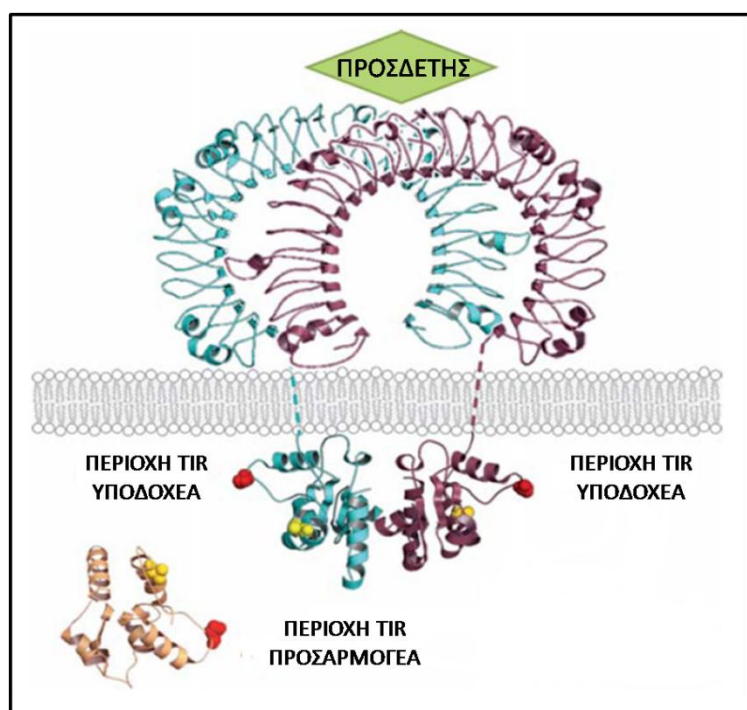
Η εξωκυττάρια περιοχή των TLRs περιέχει 16-28 επαναλαμβανόμενες περιοχές LRRs.(19) Κάθε επανάληψη διαθέτει συντηρημένες λευκίνες σ' ένα διατηρημένο μοτίβο LxxLxLxxNxL (όπου L = κατάλοιπο λευκίνης, βαλίνης, φαινυλαλανίνης, ισολευκίνης και N = κατάλοιπο κυστεΐνης, θρεονίνης, ασπαραγίνης, σερίνης) και ένα μεταβλητό τμήμα (20, 21). Ο αριθμός των επαναλήψεων ποικίλει πολύ μεταξύ των υποδοχέων (20 στους TLR1, 2, 6, και 10 έως 27 στους TLR7, 8, και 9). Η εξωκυττάρια περιοχή των TLRs σχηματίζει πεταλοειδή μορφή (Εικόνα 1) .(22) Τα μοτίβα των διατηρημένων λευκινών εντοπίζονται στην εσωτερική κοίλη επιφάνεια που σχηματίζεται από παράλληλα β-φύλλα, ενώ τα μεταβλητά μέρη εντοπίζονται στην κυρτή επιφάνεια του πετάλου και, κατά περίπτωση ,μπορούν να συγκροτούν α έλικες, έλικες 3_{10} , β στροφές και / ή βρόχους ανάλογα με το μήκος της περιοχής των LRRs.

Τα καλύμματα στο αμινοτελικό (N-τελικό) και το καρβοξυτελικό (C-τελικό) άκρο των LRR (LRRNT και LRRCT αντίστοιχα) περιέχουν ομαδοποιημένες κυστεΐνες που συγκροτούν δισουλφυδρικές γέφυρες.(19-21) Ο ρόλος τους πιθανότατα είναι να σταθεροποιούν την πρωτεΐνη, προστατεύοντας τον υδρόφοβο πυρήνα των LRRs [C-τελικό άκρο του υποδοχέα Toll της *Drosophila*-(23)], ενώ παράλληλα πιθανολογείται η συμμετοχή τους σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών [N-τελικό άκρο του TLR4 και MD-2-(24), Spatzle του *Drosophila* Toll].

Η διαμεμβρανική περιοχή αποτελείται από 22 μη-φορτισμένα αμινοξέα τα οποία συναρμολογούν μια α-έλικα που εκτείνεται στη μεμβράνη. Υπάρχουν κάποια συντηρημένα στοιχεία στην αλληλουχία της διαμεμβρανικής περιοχής, π.χ. ένα κατάλοιπο τρυπτοφάνης κοντά στην επιφάνεια της μεμβράνης και μια ομάδα από βασικά αμινοξέα.

Η ενδοκυττάρια περιοχή είναι ομόλογη με τηναντίστοιχη περιοχή του υποδοχέα της IL-1, καλείται περιοχή υποδοχέα Toll/Interleukin 1 (Toll/Interleukin 1 Receptor, TIR) και μεσολαβεί στις αλληλεπιδράσεις των υποδοχέων με τα καθοδικά σηματοδοτικά μόρια. Οι περιοχές TIR έχουν μήκος 135-160 αμινοξέων και αποτελούνται από ένα κεντρικό β-πτυχωτό φύλλο, που περιβάλλεται από α-έλικες και στις δύο πλευρές (Εικόνα 1).(25) Επιπλέον, κάθε περιοχή TIR περιέχει 3 συντηρημένες περιοχές που ονομάζονται Box1, Box 2, Box 3 και είναι απαραίτητες για την ενδοκυττάρια μεταβίβαση του σήματος.(26) Το Box1 διαθέτει μια αλληλουχία F/YDAF-Y που είναι χαρακτηριστική των TLRs, ενώ το Box2 περιέχει ένα βρόχο που καλείται «βρόχος BB» με τη χαρακτηριστική αλληλουχία G-LC-RD-PG και παίζει σημαντικό ρόλο στο διμερισμό των TIR και/ή την δέσμευση του προσαρμογέα.(27) Το Box 3 περιέχει

ορισμένα αμινοξέα σημαντικά για τη σηματοδότηση, τουλάχιστον στην περίπτωση του υποδοχέα της IL-1 και χαρακτηρίζεται από ένα διατηρημένο μοτίβο FW. Υπάρχει επίσης ένας ακόμα σημαντικός βρόχος για τη σηματοδότηση, που ονομάστηκε «βρόχος DD» ή περιοχή θανάτου (death domain, DD). Ένα πιθανό μοντέλο για τη δημιουργία μιας δομής TIR-TIR βασίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ του βρόχου DD μιας περιοχής TIR, με το βρόχο BB της άλλης.(28)



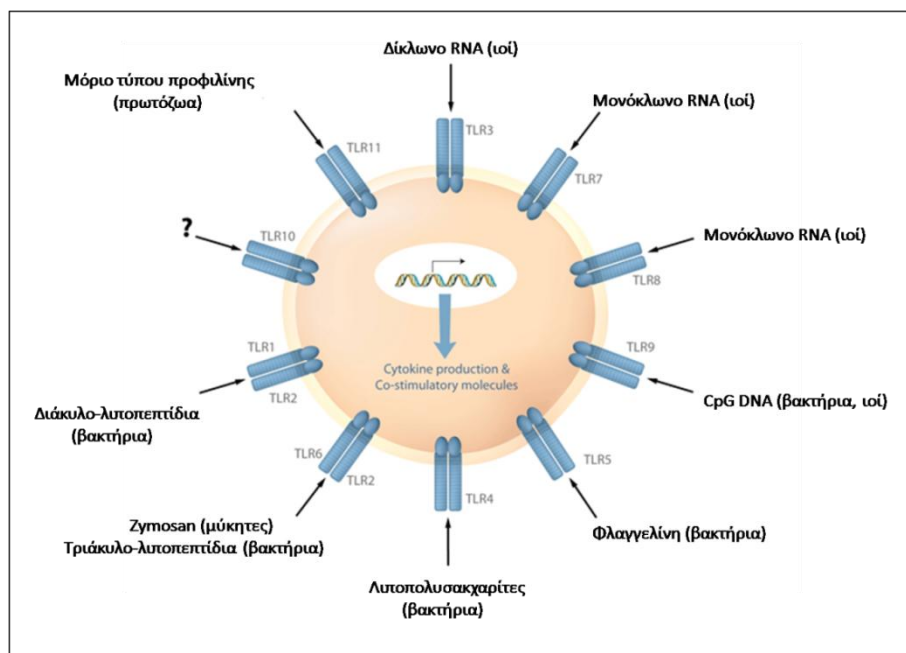
Εικόνα 1- Σχηματική απεικόνιση της δομής των υποδοχέων TLR. Βασίζεται στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα TLR3, και στην περιοχή TIR του υποδοχέα TLR2.(15)

1.3.3 Προσδέτες των TLRs

Κάθε μέλος της οικογένειας των TLRs αναγνωρίζει διαφορετικά MAMPs, ακόμη και αυτόλογα μόρια (self molecules).(6) Συγκεκριμένα, οι TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 και TLR11 εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια και αναγνωρίζουν κυρίως συστατικά μεμβρανών μικροβίων, π.χ. λιπίδια, πρωτεΐνες και λιποπρωτεΐνες, ενώ οι TLR3, TLR7, TLR8 και TLR9, εκφράζονται αποκλειστικά σ' ενδοκυττάρια κυστίδια, π.χ. το ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ), τα ενδοσώματα, τα λυσοσώματα και τα ενδολυσοσώματα και αναγνωρίζουν νουκλεϊνικά οξέα μικροβιακής προέλευσης.(1, 6) Επιπλέον, η ικανότητα κάποιων υποδοχέων να συγκροτούν ετεροδιμερή και να

σχηματίζουν σύμπλοκα με άλλες πρωτεΐνες αυξάνει το εύρος των παθογόνων που αναγνωρίζουν.

Πιο αναλυτικά, ο TLR2 αναγνωρίζει πεπτιδογλυκάνες, λιποπρωτεΐνες και λιποπεπτίδια των Gram-θετικών βακτηρίων και του μυκοπλάσματος. Σχηματίζει ετεροδιμερή με τους TLR1 και TLR6 ικανά να ανιχνεύουν μοριακές δομές, όπως διάκυλο- και τριάκυλο-λιποπεπτίδια, αντιστοίχως. Ακόμη, ο TLR2 ενώνεται με άλλους υποδοχείς όπως η δεκτίνη-1 (dectin-1) για την αναγνώριση των ζυμοζανών (συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος της ζύμης) ή το μόριο CD36, έναν υποδοχέα που αναγνωρίζει ορισμένους από τους προσδέτες του TLR2. Ο TLR3 εμπλέκεται στην αναγνώριση δίκλωνου RNA (dsRNA) που παράγεται κατά την ιική αντιγραφή. Ο TLR4 προσδένει τον βακτηριακό λιποπολυσακχαρίτη (LPS) που βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη Gram-αρνητικών βακτηρίων. Ο TLR5 αναγνωρίζει τις φλαγγελίνες (flagellins), πρωτεϊνικές υπομονάδες των μαστιγίων τόσο των Gram-θετικών όσο και των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Οι TLR7 και TLR8 είναι υπεύθυνοι την αναγνώριση ιικών μορίων. Αναγνωρίζουν μονόκλωνο RNA (ssRNA) αλλά και συνθετικά μόρια τύπου ιμιδαζοκινολίνης (imidazoquinoline-like) και ανάλογα γουανοσίνης. Τα παραπάνω μόρια παρουσιάζουν ομοιότητες με τα ριβονουκλεϊκά οξέα ενώ διαθέτουν και αντιική δράση. Ο TLR9 ανιχνεύει κυρίως μη μεθυλιωμένες νησίδες κυτοσίνης-γουανίνης (cytidine-phosphate-guanosine, CpG), μοτίβα που υπάρχουν στα βακτηριακά και ιικά νουκλεϊνικά οξέα, καθώς και στα αυτοαντιγόνα. Επιπροσθέτως, ο TLR9 αναγνωρίζει παθογόνα στοιχεία εκτός του DNA, π.χ. την αιμοζώϊνη του πλασμοδίου της ελονοσίας (*Plasmodium falciparum*). Ο προσδέτης του TLR10 δεν έχει αναγνωριστεί μέχρι στιγμής, ενώ ο TLR-11 αναγνωρίζει συστατικά ουροπαθογόνων βακτηρίων και ένα μόριο τύπου προφιλίνης (profilin-like) από το πρωτόζωο *Toxoplasma gondii*. Ωστόσο, η έκφραση του TLR11 στον άνθρωπο είναι αμφιλεγόμενη, καθώς στην κωδικοποιητική περιοχή του περιέχει ένα κωδικόνιο τερματισμού.(29)



Εικόνα 2 – Προσδέτες των TLRs

1.3.4 Πρότυπο έκφρασης των TLRs

Οι TLRs εκφράζονται στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (μακροφάγα, μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα, βασεόφιλα, δενδριτικά κύτταρα, σιτευτικά κύτταρα, Β-λεμφοκύτταρα, κύτταρα φυσικοί φονείς (NK), ρυθμιστικά Τ-λεμφοκύτταρα, Πίνακας 1) αλλά και στα επιθηλιακά κύτταρα της αναπνευστικής και γαστρεντερικής οδού, στα ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων.(30)

Πίνακας 1 - Πρότυπο έκφρασης των TLRs σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

TLRs	Τύπος κυττάρου
TLR1	Όλα τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος
TLR2	Μονοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, ουδετερόφιλα, Τ-κύτταρα
TLR3	Δενδριτικά και NK-κύτταρα
TLR4	Μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, ουδετερόφιλα και Τ-κύτταρα
TLR5	Μονοκύτταρα, ανώριμα δενδριτικά κύτταρα, NK-κύτταρα και ουδετερόφιλα
TLR6	Β-κύτταρα, μονοκύτταρα, NK-κύτταρα και ουδετερόφιλα
TLR7	Β-κύτταρα, πλασματοκυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα και ουδετερόφιλα
TLR8	Μονοκύτταρα, NK-κύτταρα, Τ-κύτταρα και ουδετερόφιλα
TLR9	πλασματοκυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα, Β-κύτταρα, μακροφάγα, NK-κύτταρα και ουδετερόφιλα
TLR10	Β-κύτταρα, πλασματοκυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα και ουδετερόφιλα
TLR11	Μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα

Η ενεργοποίησή τους έχει διαφορετικά αποτελέσματα σε κάθε κυτταρικό τύπο. Η ενεργοποίηση των TLRs στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (hematopoietic stem cell, HSC) φαίνεται να επηρεάζει τη διαφοροποίησή τους σε μονοκύτταρα και μακροφάγα. Στα μονοκύτταρα και μακροφάγα, η αναγνώριση του παθογόνου και η ενεργοποίηση των TLR ακολουθείται από φαγοκυττάρωση του παθογόνου. Στα ουδετερόφιλα, η ενεργοποίησή τους, αναστέλλει την απόπτωση και επιμηκύνει τη διάρκεια ζωής των κυττάρων. Τέλος, η ενεργοποίηση των TLRs στα B και T λεμφοκύτταρα οδηγεί σε πολλαπλασιασμό και διαφοροποίησή τους.(29)

Τα επίπεδα έκφρασης των TLRs σε κάθε κυτταρικό τύπο διαφέρουν και ρυθμίζονται από διάφορους παράγοντες όπως: (i) το είδος του ιστού: εκφράζονται στην πλειονότητα των ιστών και οργάνων αλλά σε βαθμό που ποικίλει, (ii) ο τύπος της υποκείμενης φλεγμονής: παρατηρείται αυξημένη έκφραση σε χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις, (iii) ο τύπος του TLR και του MAMP: η έκφραση κάθε τύπου TLR επάγεται από την παρουσία του αντίστοιχου MAMP, (iv) η παρουσία κυτταροκινών: η παρουσία IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-2, IL-15, TNF- α , GM-CSF και M-CSF επηρεάζουν την έκφραση των TLR και (v) η παρουσία αναστολέων του σηματοδοτικού μονοπατιού.

1.3.5 Σηματοδοτικό μονοπάτι των TLRs

1.3.5.1 Πρωτεΐνες προσαρμογείς

Η σύνδεση των TLRs με τους προσδέτες τους και η επακόλουθη ενεργοποίησή τους έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη της μετάδοσης ενός ενδοκυττάριου σήματος μέσω της δομής TIR-TIR και την ενεργοποίηση κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών που διαθέτουν επίσης μια περιοχή TIR. Τα μόρια αυτά, γνωστά ως πρωτεΐνες προσαρμογείς (adapters)(31, 32), προσδένονται στον ενεργοποιημένο υποδοχέα, μεσολαβώντας με αυτόν τον τρόπο στη μεταβίβαση του σήματος.

Μέχρι σήμερα, έχουν αναγνωρισθεί πέντε πρωτεΐνες προσαρμογείς:

1. MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88)
2. Mal (MyD88-adaptor like) ή TIRAP (TIR domain containing adapter)
3. TRIF (TIR domain-containing adapter inducing interferon- β) ή TICAM-1 (TIR-containing adapter molecule-1)
4. TRAM (TRIF-related adapter molecule) ή TICAM-2 (TIR-containing adapter molecule-2)
5. SARM (sterile α and HEAT-Armadillo motifs)

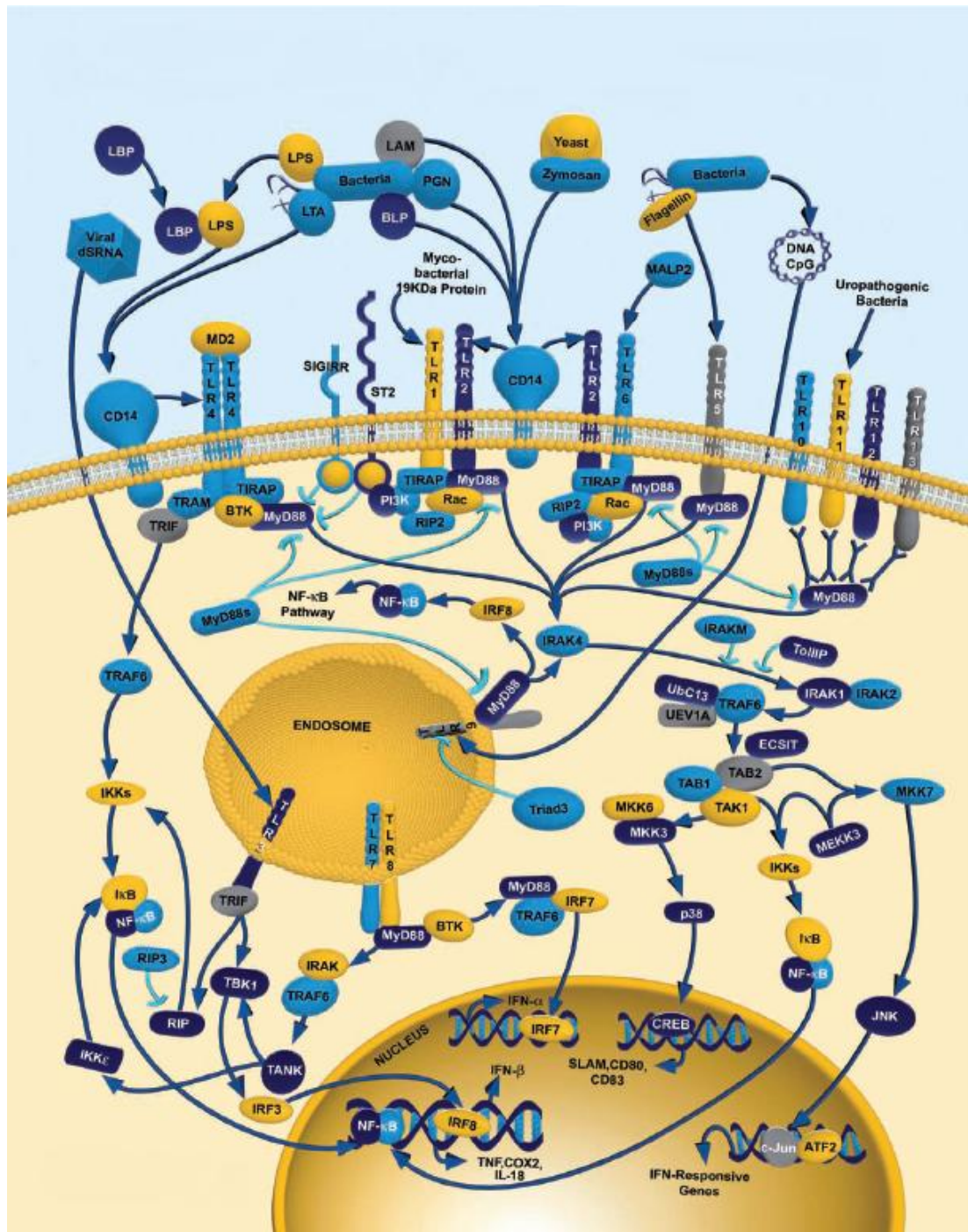
Οι πρώτες 4 πρωτεΐνες προσαρμογείς διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση των TLRs, καθώς η ενεργοποίησή τους καθορίζει στην πορεία του μονοπατιού καθοδικά του υποδοχέα. Οι MyD88 και TRIF θεωρούνται σηματοδοτικοί και επιστρατεύονται πρώτοι στο σηματοδοτικό μονοπάτι. Γι' αυτό το λόγο τα μονοπάτια που επάγονται από τους TLRs χαρακτηρίζονται είτε ως MyD88-εξαρτώμενα είτε ως TRIF-εξαρτώμενα. Οι Mal και TRAM συμμετέχουν στην προσέλκυση της MyD88 και της TRIF, αντιστοίχως, από τους TLRs και γι' αυτό το λόγο καλούνται και προσαρμογείς γεφύρωσης. Και τα δύο μονοπάτια έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NF-κΒ (Nuclear Factor-κΒ) των πρωτεϊνικών κινάσων που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (Mitogen-activated protein kinases, MAPKs), αλλά και ορισμένων παραγόντων που ρυθμίζονται από ιντερφερόνες (Interferon Regulatory Factors, IRFs). Αντίθετα, ο SARM φαίνεται ότι παίζει τον ρόλο του αρνητικού ρυθμιστή(33, 34) όσον αφορά στην ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NF-κΒ και IRF3 από τους υποδοχείς TLR3 και TLR4. Εκτός από τον SARM υπάρχουν αρκετές πρωτεΐνες του ξενιστή που στοχεύουν στους προσαρμογείς με στόχο την καταστολή της σηματοδότησης (παράγραφος 1.3.5.6).

1.3.5.2 MyD88-εξαρτώμενο μονοπάτι

Η πρωτεΐνη MyD88 παίζει κεντρικό ρόλο στην ενδοκυττάρια μεταβίβαση του σήματος καθώς αλληλεπιδρά με όλα τα μέλη της οικογένειας των TLRs, εκτός από τον TLR3.(35) Η πρωτεΐνη Mal εμπλέκεται στο μονοπάτι αυτό και δρα διασυνδέοντας τους υποδοχείς TLR4, TLR1/2, TLR2/6 με την πρωτεΐνη MyD88.(35, 36) Τα βασικά χαρακτηριστικά της δομής της MyD88 είναι η παρουσία ενός «βρόχου DD» ή μιας «περιοχής θανάτου» (Death domain DD) και μιας περιοχής TIR στο N-τελικό και το C-τελικό άκρο, αντιστοίχως. Αυτές οι δύο περιοχές συνδέονται με μια ενδιάμεση περιοχή που καλείται περιοχή «ID». Η προσέλκυση της MyD88 σε δεσμευμένους με προσδέτη TLRs έχει ως αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση με κινάσες που σχετίζονται με τον υποδοχέα ιντερλευκίνης-1 (interleukin-1 receptor-associated kinases, IRAKs) τις IRAK4, IRAK1, IRAK2. Πιο συγκεκριμένα, οι περιοχές «ID» και TIR της MyD88, είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση με την περιοχή DD της IRAK4.(37)

Η IRAK4 συνδέεται με την MyD88 με αποτέλεσμα το σχηματισμό του συμπλόκου TLR-MyD88-IRAK4. Στη συνέχεια, η IRAK4 αυτοφωσφορυλιώνεται και είναι υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των IRAK1 και IRAK2. Στη συνέχεια, η ενεργοποιημένη πλέον IRAK1 αυτοφωσφορυλιώνει κατάλοιπα του N-τελικού άκρου της και στη συνέχεια απομακρύνεται από το σύμπλοκο υποδοχέα-

προσαρμογέα. Η ενεργοποίηση των IRAKs οδηγεί στην αλληλεπίδρασή τους με τον TRAF6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6), που θεωρείται ότι συνδέει τα σύμπλοκα IL-1RI/TLR με την ενεργοποίηση του NF-κB και του καταρράκτη των MAPK.(38) Στη συνέχεια, οι TRAF6 και IRAK1 απομακρύνονται από το αρχικό σύμπλοκο των υποδοχέων μαζί και ο TRAF6 αλληλεπιδρά με τα μόρια Uev1A (ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1) και Ubc13 (ubiquitin-conjugating enzyme 13). Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα πολυουβικουιτινίωση της IRAK1, αποικοδόμησή της από το πρωτεάσωμα και διάσπαση του TRAF6 στα ολιγομερή του. Ακολουθεί η αλληλεπίδραση του TRAF6 μ' ένα προσχηματισμένο σύμπλοκο που αποτελείται από τις πρωτεΐνες TAK1 (Transforming growth factor (TGF)-β-Activated Kinase 1), TAB1, TAB2 και TAB3, (TAK1 binding proteins) με αποτέλεσμα ενεργοποίηση των πρωτεϊνών TAB2/TAB3 και TAK1 (Εικόνα 4). Επακόλουθο της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης TAK1 είναι η φωσφορυλίωση του αναστολέα του συμπλόκου των IKK κινασών [NF-κB+(IκB)+(IKKs)] και η ενεργοποίηση των IKKs. Οι IKKs με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν τον IκB, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με τις υπομονάδες του NF-κB, p50 και p65 (επίσης γνωστή ως RelA). Η πρωτεΐνη p50 είναι υπεύθυνη για τη συναρμολόγηση του συγκεκριμένου διμερούς με την IκBα, ενώ η p65 είναι αναγκαία για την ενεργοποίηση της έκφρασης των γονιδίων. Στην MyD88-εξαρτώμενη σηματοδότηση, η p65 διίσταται και μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου δεσμεύεται και επάγει τα γονίδια στόχους της, τα οποία είναι υπεύθυνα για φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Το σύμπλοκο της TAK1 συνδέεται και ενεργοποιεί παράλληλα τις κινάσες MAPK, μεταξύ των οποίων τις MKK6, MKK3 και MKK7. Αυτές με τη σειρά τους ενεργοποιούν τις πρωτεΐνες JNK (c-Jun N-terminal Kinase) και p38 με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα «πρωτεΐνη-ενεργοποίησης-1» (activation protein-1, AP-1), ο οποίος διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην επαγωγή γονιδίων που σχετίζονται με τη φλεγμονώδη αντίδραση.



Εικόνα 3 – Σηματοδότηση των υποδοχέων TLR

1.3.5.3 MyD88-εξαρτώμενη ενεργοποίηση των IRFs (Εναλλακτικό MyD88-εξαρτώμενο μονοπάτι)

Το MyD88-εξαρτώμενο μονοπάτι μπορεί να ενεργοποιήσει επίσης τους μεταγραφικούς παράγοντες IRFs.(6, 26, 35) Στα πλασμοκυτταροειδή δένδριτικά κύτταρα οι TLR7, TLR8 και TLR9 ενεργοποιούν τον IRF7 ο οποίος συνδέεται με τον

MyD88 και συμμετέχει στο σχηματισμό ενός συμπλόκου που αποτελείται από πολλές πρωτεΐνες μεταξύ των οποίων οι IRAK4, TRAF6, TRAF3, IRAK1 και IKKα.(35) Σε αυτό το σύμπλοκο ο IRF7 φωσφορυλιώνεται από την IRAK1 και/ή την IKKα, απομακρύνεται από το σύμπλοκο και μετατοπίζεται στον πυρήνα. Η μετατόπιση του παράγοντα IRF7 στον πυρήνα και η πρόσδεση του σε μοτίβα ISRE (IFN-Stimulated Response Element) επάγει την παραγωγή ιντερφερονών τύπου I.

Ένας άλλος μεταγραφικός παράγοντας της ίδιας οικογένειας που ενεργοποιείται μέσω του MyD88 είναι ο IRF5. Οι TLR4 και TLR9 ενεργοποιούν τον IRF5(6, 26, 35, 39), ο οποίος μεταναστεύει στον πυρήνα προσδένεται σε μοτίβα ISRE στις περιοχές υποκινητή γονιδίων που κωδικοποιούν κυτταροκίνες, προκαλώντας την παραγωγή IL-6, IL-12 και TNFα.

Τέλος, η ενεργοποίηση των TLR7, TLR8 και TLR9 σε μυελοειδή δένδριτικά κύτταρα, έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του IRF1.(40) Ο ενεργοποιημένος IRF1 μεταναστεύει στον πυρήνα όπου προσδένεται σε μοτίβα ISRE, επάγοντας την παραγωγή των IFNs.

1.3.5.4 TRIF - εξαρτώμενο μονοπάτι

Η πρωτεΐνη προσαρμογέας TRIF παίζει τον κύριο ρόλο στην ενδοκυττάρια μεταβίβαση σήματος στο TRIF-εξαρτώμενο μονοπάτι, αλληλεπιδρώντας με τους TLR3 και TLR4 είτε άμεσα είτε μέσω της πρωτεΐνης TRAM, η οποία συνδέει την πρωτεΐνη TRIF με τον TLR4.(6, 26, 30, 35)

Η πρωτεΐνη TRIF διαθέτει δυο περιοχές υπεύθυνες για την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ. Στο N-τελικό άκρο της υπάρχει ένα μοτίβο για πρόσδεση της πρωτεΐνης TRAF6. Ο ακριβής ρόλος της TRAF6 στην ενεργοποίηση του NF-κΒ μέσω του TRIF δεν έχει πλήρως διερευνηθεί, αν και πιθανολογείται ότι η δημιουργία του συμπλόκου TRIF-TRAF6 οδηγεί στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης TAK1 και τελικά στην ενεργοποίηση του NF-κΒ μέσω μιας οδού παραπλήσιας με το MyD88-εξαρτώμενο μονοπάτι.

Αντίθετα, στο C-τελικό της άκρο διαθέτει ένα μοτίβο υπεύθυνο για πρόσδεση της κινάσης RIP1 (Receptor-Interacting Protein-1) η οποία επίσης συμβάλλει στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ. Η TRIF σχηματίζει ένα σηματοδοτικό σύμπλοκο που αποτελείται από τις TRAF6, TRADD, Pellino-1 (PEL1) και RIP1, το οποίο οδηγεί στην ενεργοποίηση της TAK1, που με τη σειρά της ενεργοποιεί τις οδούς του NF-κΒ και των MAPK. Εναλλακτικά, η πρωτεΐνη TRIF αλληλεπιδρά με τις κινάσες TANK-1 (TRAF family member-Associated NF-κΒ Activator 1), TBK1 (TANK-Binding Kinase 1) και IKKε (Inducible IκΒ Kinase), οι

οποίες προκαλούν φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα IRF3. Ο φωσφορυλιωμένος και ενεργοποιημένος πλέον μεταγραφικός παράγοντας ομοδιμερίζεται και μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου προσδένεται σε στοιχεία ISRE, επάγοντας την παραγωγή IFN- α/β .(41) Κατ' αντίστοιχο τρόπο με τον IRF3, ο IRF7 ενεργοποιείται μετά τη φωσφορυλίωσή του από τις TBK1 και IKK ϵ (IKBKE) και επάγει την έκφραση γονιδίων, δεσμευόμενος στα δικά τους ISREs.(6, 26, 35) Επιπλέον, ο IRF5 ενεργοποιείται μέσω του TRIF-εξαρτώμενου μονοπατιού από τον TLR3 με αποτέλεσμα την επαγωγή της παραγωγής IL-6, IL-12, και TNF α .(39)

1.3.5.5 Τελικά προϊόντα της ενεργοποίησης των TLRs

Η ενεργοποίηση των TLRs επάγει την έκκριση μεγάλης ποικιλίας κυτταροκινών (π.χ. φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, χημειοκίνες, ιντερφερόνες τύπου I) καθώς και συνδεδεγμένων μορίων. Οι χυμικοί αυτοί διαμεσολαβητές συμβάλλουν στην ολοκλήρωση της φυσικής άνοσης απάντησης ενώ παράλληλα ρυθμίζουν την επίκτητη ανοσία.(42)

Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι κυτταροκίνες της φυσικής άνοσης ασκούν άμεση επαγωγική δράση στους δραστικούς μηχανισμούς της επίκτητης άνοσης, σε διάφορα επίπεδα. Για παράδειγμα, οι ιντερφερόνες τύπου I, ενεργοποιούν τα μόρια MHC τάξης I και, κατ' αυτόν τον τρόπο, αυξάνουν την ικανότητα παρουσίασης των ιικών πεπτιδίων στα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα. Η IL-1, ο TNF- α και οι χημειοκίνες προκαλούν μετακίνηση των ειδικών για το αντιγόνο T λεμφοκυττάρων, καθώς και άλλων ανοσοδραστικών κυττάρων, προς το σημείο της ιστικής βλάβης, είτε επάγοντας την έκφραση μορίων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα είτε διεγείροντας τη χημειοταξία. Τέλος, η IL-6 προάγει τη διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων προς πλασματοκύτταρα.

1.3.5.6 Αρνητική ρύθμιση της σηματοδότησης

Η ρύθμιση της σηματοδότησης των TLRs ασκείται σε διάφορα επίπεδα. Μέχρι στιγμής, έχουν αναγνωριστεί πολλοί αρνητικοί ρυθμιστές της σηματοδοτικής οδού των TLR, μεταξύ των οποίων ανταγωνιστές των υποδοχέων, προϊόντα που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα των προσαρμογέων ή και άλλων σχετιζόμενων πρωτεϊνών, λιγκάσες ουμπικουϊτίνης, deubiquitinases, ρυθμιστές της μεταγραφής και microRNAs. Η ρύθμιση μπορεί να ασκείται σε επίπεδο υποδοχέα ή προσαρμογέα (από ενδογενείς ή εξωγενείς παράγοντες) καθώς και σε μεταγενέστερα βήματα της ενδοκυττάριας μεταβίβασης σήματος. Ειδικότερα, σε επίπεδο

προσαρμογέα, η φωσφορυλίωση, η αποικοδόμηση και η αλληλεπίδραση με ανασταλτικά μόρια μπορεί να επηρεάσουν την λειτουργικότητα του εκάστοτε προσαρμογέα και της σηματοδότησης. Μεταξύ των ρυθμιστικών μηχανισμών περιλαμβάνονται επίσης η ρύθμιση των IRAKs και των TRAFs καθώς και η παρεμπόδιση του σχηματισμού των απαραίτητων συμπλόκων για την ενδοκυττάρια μεταβίβαση σήματος.(43, 44)

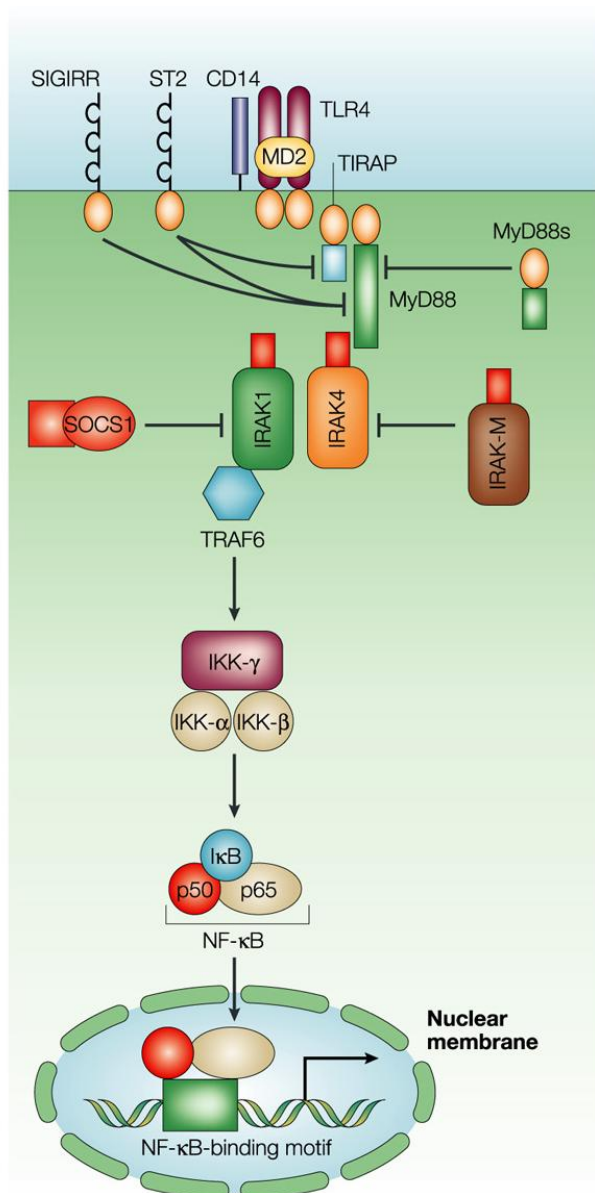
Οι κυριότεροι ρυθμιστές σε επίπεδο υποδοχέα είναι οι SIGIRR/TIR8, ST2L, Triad3A. Οι SIGIRR/TIR8 και ST2L εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και δρουν ως ανταγωνιστές των υποδοχέων. Πιο συγκεκριμένα, η SIGIRR/TIR8 παρεμποδίζει το σχηματισμό του συμπλόκου του υποδοχέα ενώ παράλληλα προωθεί την αποσύνδεση ενεργοποιημένων σηματοδοτικών μορίων και προσελκύει ανασταλτικά ενδοκυττάρια μόρια.(45) Η ST2L αλληλεπιδρά μέσω της περιοχής TIR με τις MyD88 και Mal και τις καθιστά απρόσιτες για σηματοδότηση. Η Triad3A εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και επάγει την πρωτεολυτική αποικοδόμηση ορισμένων TLRs (TLR3, 4, 5 και 9).(43, 44)

Σε επίπεδο προσαρμογέα, η φωσφορυλίωση των MyD88, TRIF και TRAM και η παρουσία προϊόντων που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα των γονιδίων των προσαρμογέων [όπως οι MyD88s(43), TAG(46)] έχουν ως αποτέλεσμα την καταστολή της σηματοδότησης. Επιπλέον, έχει αναφερθεί η αναστολή της σηματοδότησης λόγω αλληλεπίδρασης των προσαρμογέων με τα πρωτεϊνικά μόρια Fliih και TRAF1 καθώς και η επαγωγή της αποικοδόμησης των MyD88 και Mal από τις TGF- β 1 και SOCS-1.(43, 44) Κάποιες ιογενείς πρωτεΐνες αναστέλλουν τη σηματοδότηση των TLRs αλληλεπιδρώντας με τις πρωτεΐνες ή επάγοντας την αποικοδόμησή τους. Έτσι αποτρέπουν την ενεργοποίησή του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή και επιτρέπουν την επιβίωση του ιού (ιός vaccinia, ιός ηπατίτιδας C).(47)

Στη ρύθμιση των IRAKs κύριο ρόλο κατέχουν (i) η IRAK-M, που αναστέλλει την ενεργοποίηση της IRAK4, τη φωσφορυλίωση της IRAK1 και την αποδέσμευση της ενεργοποιημένης IRAK1 από τον MyD88 ώστε να επιτραπεί η δημιουργία συμπλόκου με τον TRAF6 και (ii) η TOLLIP που αλληλεπιδρά με την IRAK1 καταστέλλοντας την αυτοφωσφορυλίωση και ενεργοποίησή της. Επιπλέον, ρύθμιση των IRAKs επιτυγχάνεται με την παρουσία εναλλακτικών μεταγραφικών προϊόντων ή με απορρύθμιση σε επίπεδο είτε mRNA είτε πρωτεΐνης(43).

Αναφορικά με τη ρύθμιση των TRAFs, οι περισσότεροι ρυθμιστικοί μηχανισμοί στοχεύουν στην απομάκρυνση των μοτίβων ουβικουιτίνης του TRAF6 ή του TRAF3 με αποτέλεσμα την καταστολή των επακόλουθων σηματοδοτικών οδών.(43)

Τέλος, η αλληλεπίδραση διαφόρων μορίων με τα συστατικά της σηματοδότησης έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση του σχηματισμού απαραίτητων συμπλόκων, όπως έχει αναφερθεί στις περιπτώσεις των TRIM30a και PIASy.(48)



Εικόνα 4 – Αρνητική ρύθμιση της σηματοδότησης των TLRs.(26)

1.3.5.7 Έκφραση των TLRs στα Β λεμφοκύτταρα

Η έκφραση των TLRs στα Β λεμφοκύτταρα του ανθρώπου ποικίλει ανάλογα με το στάδιο διαφοροποίησής τους. Στα ανώριμα Β λεμφοκύτταρα είναι χαμηλή έως μηδενική, ενώ αλλάζει μετά την ενεργοποίηση του Β κυτταρικού υποδοχέα (B cell receptor, BcR). Η ενεργοποίηση του BcR προκαλεί αύξηση της έκφρασης των TLRs,

ιδίως των TLR9 και TLR10.(49) Τα B λεμφοκύτταρα μνήμης εκφράζουν τους TLR1, TLR2, TLR6, TLR7, TLR9 και TLR10. Οι TLRs μπορεί να ενεργοποιηθούν άμεσα στα B λεμφοκύτταρα μνήμης αλλά όχι στα ανώριμα B-λεμφοκύτταρα. Αυτό οδηγεί στην υπόθεση ότι οι TLRs δρουν καθοδικά του BcR και διαδραματίζουν διαφορετικό ρόλο στην πρωτογενή απάντηση και την άνοση μνήμη. Η διαφορετική έκφραση ρυθμίζεται από το επίπεδο ενεργοποίησης του BcR.(50)

Τα B λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται άμεσα από τους TLRs αλλά και έμμεσα μέσω των κυτταροκινών που απελευθερώνονται από δενδριτικά κύτταρα ενεργοποιημένα μέσω TLRs. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι εκτός από την ειδική πρόσδεση του αντιγόνου στον BcR και την αλληλεπίδραση με τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα, τα B λεμφοκύτταρα χρησιμοποιούν τη σηματοδότηση μέσω των TLRs ως τρίτο σήμα για την ενεργοποίησή τους.

Η ενεργοποίηση των TLRs στα B λεμφοκύτταρα φαίνεται ότι αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση τόσο για την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των B λεμφοκυττάρων όσο και για την παραγωγή αντισωμάτων. Επιπλέον, η ενεργοποίηση των ανώριμων T λεμφοκυττάρων και η διαφοροποίησή τους προϋποθέτει τη δράση κυτταροκινών που παράγονται από δενδριτικά κύτταρα διεγερμένα μέσω υποδοχέων φυσικής ανοσίας. Όλα τα παραπάνω ενισχύουν την άποψη ότι οι υποδοχείς της φυσικής ανοσίας ελέγχουν την επίκτητη ανοσία.(51, 52)

1.4 Επίκτητη ή ειδική ανοσία

Η επίκτητη ή ειδική ανοσία χαρακτηρίζεται από ειδικότητα και μνήμη. Οι μηχανισμοί της επίκτητης ανοσίας ενεργοποιούνται μετά την επαφή με το αντιγόνο και εξασφαλίζουν την εξουδετέρωσή του με μια διεργασία εξαιρετικά πολύπλοκη, η οποία έχει ως τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή ειδικών αντισωμάτων, καθώς και μεγάλου αριθμού ειδικών ενεργοποιημένων λεμφοκυττάρων. Τόσο τα αντισώματα, όσο και τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα εμφανίζουν εξειδίκευση εναντίον του βλαπτικού παράγοντα που προκάλεσε την παραγωγή τους. Η επίκτητη ανοσία διακρίνεται σε χυμική, στην οποία συμμετέχουν τα Β λεμφοκύτταρα και τα προϊόντα τους (αντισώματα), και κυτταρική, η οποία στηρίζεται στη δράση των Τ λεμφοκυττάρων.(1)

Η ειδική άνοση απάντηση χαρακτηρίζεται από τρεις φάσεις: φάση αναγνώρισης, φάση ενεργοποίησης και εκτελεστική φάση. Κατά τη φάση αναγνώρισης, κυρίαρχο ρόλο διαδραματίζουν οι ειδικοί επιφανειακοί υποδοχείς των λεμφοκυττάρων (BcR, και T-κυτταρικός υποδοχέας, TCR) οι οποίοι αναγνωρίζουν και συνδέονται σε ιδιαίτερες δομές των αντιγόνων (αντιγονικοί επίτοποι). Η φάση ενεργοποίησης ξεκινά μετά την αναγνώριση του αντιγόνου και καταλήγει στην εκτελεστική φάση, κατά την οποία τα δραστικά λεμφοκύτταρα και/ή τα αντισώματα που παράχθηκαν σε απάντηση προς ένα συγκεκριμένο αντιγόνο προκαλούν την εξουδετέρωσή του.

Υπάρχει σαφής αλληλεπίδραση των μηχανισμών της φυσικής και της επίκτητης ανοσίας με στόχο την επαγωγή της δράσης τους για την καταστροφή του ξένου εισβολέα. Τα φαγοκύτταρα δρουν αποφασιστικά σε μη ειδικές άνοσες απαντήσεις και συμμετέχουν στην ενεργοποίηση της ειδικής άνοσης απάντησης παρουσιάζοντας το αντιγόνο στα κύτταρα της ειδικής ανοσίας. Αντίστροφα, διάφοροι διαλυτοί παράγοντες που παράγονται από την επίκτητη ανοσία επαυξάνουν τη δράση της φυσικής ανοσίας. Ωστόσο, οι μηχανισμοί της επίκτητης ανοσίας εμφανίζουν ορισμένα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που τους διαχωρίζουν από τους αντίστοιχους της φυσικής ανοσίας. Πιο συγκεκριμένα, η επίκτητη ανοσία χαρακτηρίζεται από:

- (i) εξειδίκευση, καθώς εξασφαλίζει ειδική απάντηση όχι μόνο για κάθε αντιγόνο αλλά για καθέναν από τους αντιγονικούς επιτόπους που αυτό φέρει
- (ii) ποικιλομορφία, που επιτρέπει στο ανοσοποιητικό σύστημα ν' αντιδρά σε τεράστια ποικιλία αντιγόνων
- (iii) μνήμη, η οποία αφορά στη δημιουργία κυττάρων μνήμης που «θυμούνται» την προηγούμενη επαφή τους με το αντιγόνο και, σ' επόμενη έκθεση, εκδηλώνουν ταχεία άνοση απάντηση

(iv) ανοχή, ιδιότητα που αφορά στη διάκριση μεταξύ ξένου και ίδιου αντιγόνου και αποτρέπει τη δυνητική αντίδραση εναντίον κυττάρων και ιστών του ίδιου του οργανισμού.

1.5 Υποδοχείς επίκτητης ανοσίας

1.5.1 Δομή ανοσοσφαιρινών

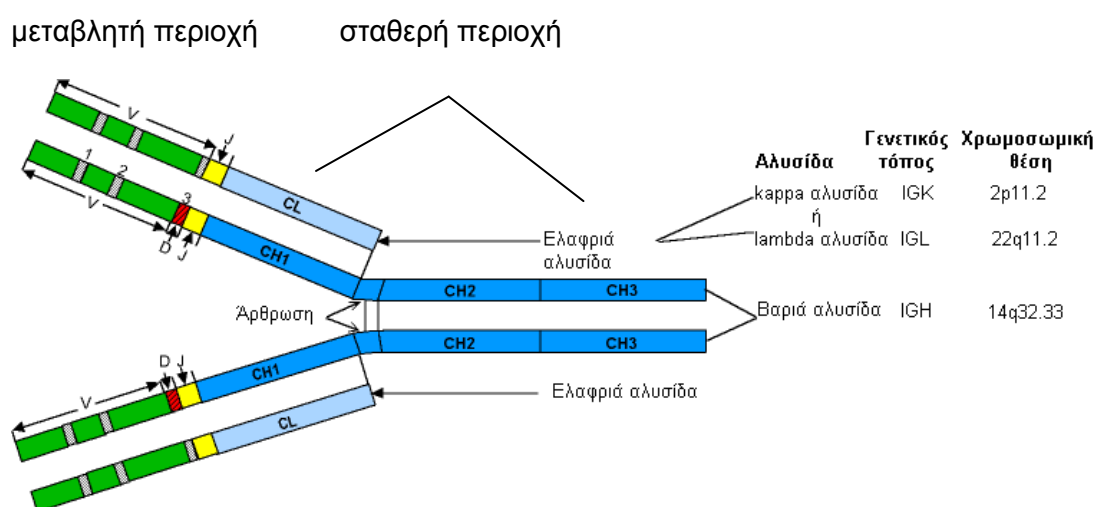
Οι ανοσοσφαιρίνες (IG) ή αντισώματα είναι γλυκοπρωτεΐνες του πλάσματος και παράγονται από τα πλασματοκύτταρα. Εκφράζονται στην επιφάνεια των Β λεμφοκυττάρων τα οποία, όταν διεγερθούν από το ειδικό κατά περίπτωση αντιγόνο, μετατρέπονται σε πλασματοκύτταρα που παράγουν και εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες της συγκεκριμένης ανοσοσφαιρίνης. Ο ανθρώπινος οργανισμός διαθέτει μια μεγάλη συλλογή διαφορετικών αντισωμάτων έτσι ώστε να μπορεί ν' αντιμετωπίσει ένα μεγάλο εύρος διαφορετικών αντιγόνων με τα οποία καθημερινά έρχεται σ' επαφή. Συγκεκριμένα, ο άνθρωπος μπορεί να διαθέτει έως και 10^{11} διαφορετικά μόρια αντισωμάτων.(53)

Τα αντισώματα επιτελούν δύο κύριες λειτουργίες. Πρώτον, αναγνωρίζουν και συνδέονται με το αντιγόνο που προκάλεσε την παραγωγή τους. Δεύτερον, προσελκύουν άλλα κύτταρα και μόρια τα οποία οδηγούν στην καταστροφή του παθογόνου. Οι δύο αυτές λειτουργίες συνδέονται με δύο διακριτά τμήματα του μορίου: η αναγνώριση του αντιγόνου επιτελείται από τη μεταβλητή περιοχή (variable, V), η οποία χαρακτηρίζεται από μεγάλη ποικιλομορφία, ενώ η περιοχή του αντισώματος που εξασφαλίζει τους δραστικούς μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος ονομάζεται σταθερή περιοχή (constant, C).

Κάθε μόριο ανοσοσφαιρίνης αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, δύο ταυτόσημες βαριές (heavy, H) και δύο ταυτόσημες ελαφριές (light, L) αλυσίδες. Οι δύο βαριές αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφυδρικούς δεσμούς και κάθε βαριά αλυσίδα συνδέεται με την ελαφριά αλυσίδα με έναν δισουλφυδικό δεσμό (Εικόνα 6). Με βάση το είδος της βαριάς αλυσίδας (μ, γ, δ, ε, α), οι ανοσοσφαιρίνες ταξινομούνται σε πέντε κύριες τάξεις ή ισοτύπους, οι οποίες καθορίζουν τη λειτουργική δραστηριότητα ενός μορίου αντισώματος. Αυτές είναι η ανοσοσφαιρίνη A (IgA), η ανοσοσφαιρίνη E (IgE), η ανοσοσφαιρίνη M (IgM), η ανοσοσφαιρίνη G (IgG) και η ανοσοσφαιρίνη D (IgD). Αντίθετα, υπάρχουν μόνο δύο τύποι ελαφριάς αλυσίδας, οι οποίες ορίζονται ως αλυσίδες λάμδα (λ) και κάππα (κ). Οι ανοσοσφαιρίνες IgG υποδιαιρούνται σε τέσσερις υποτάξεις (IgG₁, IgG₂, IgG₃,

IgG₄), ενώ οι IgA σε δύο (IgA₁, IgA₂). Όλες οι ανοσοσφαιρίνες που ανήκουν στην ίδια τάξη (π.χ. IgA₁ και IgA₂) έχουν αμινοξική ταυτότητα τουλάχιστον 90%. (1, 53)

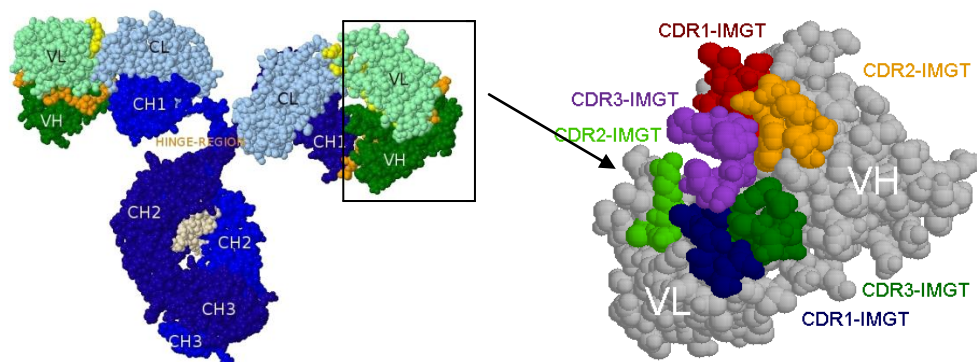
Σε κάθε βαριά και ελαφριά αλυσίδα υπάρχουν ενδοπεπτιδικοί διθειοφυδρικοί δεσμοί, που οδηγούν σε σχηματισμό σφαιρικών περιοχών μήκους 110 αμινοξέων. Η μεταβλητότητα της αλληλουχίας των αμινοξέων δεν κατανέμεται εξίσου σε όλο το μήκος των μεταβλητών περιοχών. Το N-τελικό άκρο των βαριών και ελαφριών αλυσίδων παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των διαφόρων τάξεων ανοσοσφαιρινών. Αντίθετα, το C-τελικό άκρο παραμένει σταθερό. (1, 53)



Εικόνα 5 - Σχηματική απεικόνιση του μορίου της ανοσοσφαιρίνης (IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system®; <http://imgt.cines.fr>).

Επιπλέον, στη μεταβλητή περιοχή τόσο των ελαφριών όσο και των βαριών αλυσίδων έχουν αναγνωριστεί τρεις περιοχές που παρουσιάζουν ακόμα μεγαλύτερη μεταβλητότητα και γι' αυτό καλούνται υπερμεταβλητές (hypervariable regions). Οι υπερμεταβλητές περιοχές εντοπίζονται σε τρεις θηλιές (loops) στο άκρο κάθε β-φύλλου και βρίσκονται κοντά η μια στην άλλη στην πτυχωμένη δομή της ανοσοσφαιρίνης. Οι υπερμεταβλητές θηλιές δημιουργούν έναν μοναδικό υπερμεταβλητό θύλακο (antigen binding pocket) στην κορυφή του αντισώματος, που αποτελεί το σημείο σύνδεσης του αντιγόνου και καθορίζει την ειδικότητα του αντισώματος. Για το λόγο αυτό, οι τρεις υπερμεταβλητές περιοχές ονομάζονται και περιοχές καθορισμού της συμπληρωματικότητας (complementarity determining regions, CDRs) των ελαφριών και των βαριών αλυσίδων: CDR1, CDR2 και CDR3. Τα τμήματα μεταξύ των υπερμεταβλητών περιοχών είναι λιγότερο μεταβλητά και

αναφέρονται ως περιοχές πλαισίου (framework regions, FRs): FR1, FR2, FR3 και FR4. Οι περιοχές πλαισίου σχηματίζουν το δομικό πλαίσιο της περιοχής με τις υπερμεταβλητές αλληλουχίες (Εικόνα 6).



Εικόνα 6 - Τρισδιάστατη δομή του μορίου της ανοσοσφαιρίνης. Οι υπερμεταβλητές περιοχές (CDRs) των βαριών και ελαφριών αλυσίδων δημιουργούν έναν μοναδικό υπερμεταβλητό θύλακο στην κορυφή του αντισώματος, που αποτελεί το σημείο σύνδεσης του αντιγόνου και καθορίζει την ειδικότητα του αντισώματος (IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system®; <http://imgt.cines.fr>).

Οι ανοσοσφαιρίνες αναγνωρίζουν διαφορετικό, κατά περίπτωση, αντιγόνο, με τελικό αποτέλεσμα, την ενεργοποίηση διαφορετικών εκτελεστικών αμυντικών μηχανισμών. Η τάξη ή ισότυπος της εκκρινόμενης ανοσοσφαιρίνης καθορίζει και το είδος των εκτελεστικών μηχανισμών που ενεργοποιούνται.

1.5.2 Γενετική οργάνωση των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών

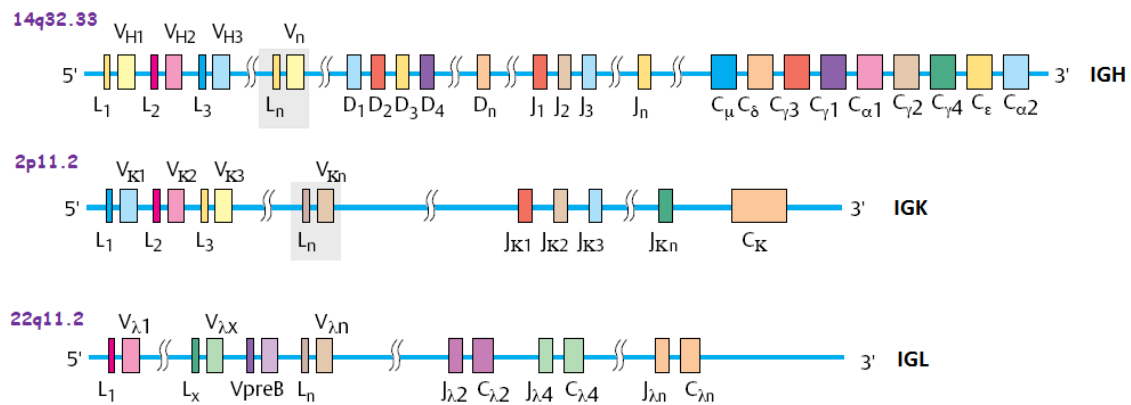
Στον άνθρωπο, οι πολυγονιδιακές οικογένειες που κωδικοποιούν τις βαριές αλυσίδες, τις κ ελαφριές και τις λ ελαφριές αλυσίδες εντοπίζονται στους γενετικούς τόπους IGH, IGK και IGL των χρωμοσωμάτων 14, 2 και 22, αντιστοίχως. Ο γενετικός τόπος IGH περιλαμβάνει γονίδια L (Leader: Οδηγό), V (Variable: Μεταβλητό), D (Diversity: Ποικιλότητα), J (Junctional: Συνδετικό) και C (Constant: Σταθερό) (Εικόνα 7). Οι μεταβλητές περιοχές των βαριών αλυσίδων σχηματίζονται από τη συμβολή των γονιδίων V, D και J. Η σταθερή περιοχή της αλυσίδας κωδικοποιείται από τα γονίδια C. Ο γενετικός τόπος των ελαφριών αλυσίδων δεν περιλαμβάνει γονίδια D (Εικόνα 7). Η μικρή αλληλουχία-οδηγός (L) πριν από κάθε γονίδιο V κατευθύνει τις

συντιθέμενες βαριές και ελαφριές αλυσίδες στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η αλληλουχία αυτή αφαιρείται από την αλυσίδα κατά την τελική επεξεργασία.

Ο γενετικός τόπος της βαριάς αλυσίδας (IGH) συνολικά περιλαμβάνει (ανάλογα με τον απλότυπο) 82-88 γονίδια IGHV, 27 γονίδια IGHD, 9 γονίδια IGHJ και 11 γονίδια IGHC. Ο γενετικός τόπος της κ ελαφριάς αλυσίδας (IGK) περιλαμβάνει 76 γονίδια IGKV, 5 γονίδια IGKJ κι ένα μοναδικό γονίδιο IGKC. Τα γονίδια IGKV οργανώνονται σε δύο συστοιχίες, οι οποίες βρίσκονται σε απόσταση 800 kb μεταξύ τους. Η απομακρυσμένη συστοιχία (distal cluster) βρίσκεται στο 5' άκρο του γενετικού τόπου, έχει μήκος 400 kb και αποτελείται από 36 γονίδια. Η εγγύς συστοιχία (proximal cluster) βρίσκεται στο 3' άκρο του γενετικού τόπου, έχει μήκος 600 kb και αποτελείται από 40 γονίδια. Ο γενετικός τόπος της λ ελαφριάς αλυσίδας (IGL) περιλαμβάνει 73-74 γονίδια IGLV, 7-11 γονίδια IGLJ και 7-11 γονίδια IGLC ανάλογα με τον απλότυπο. Τα γονίδια IGLJ είναι ισάριθμα με τα γονίδια IGLC επειδή οργανώνονται σε ομάδες γονιδίων.

Κάθε γενετικός τόπος περιλαμβάνει λειτουργικά γονίδια, γονίδια ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης και ψευδογονίδια. Ένα γονίδιο περιγράφεται ως λειτουργικό εάν η κωδικοποιητική περιοχή έχει ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, χωρίς κωδικόνιο(α) τερματισμού και δεν παρουσιάζει οποιαδήποτε ανωμαλία στις αλληλουχίες σηματοδότησης του ανασυνδυασμού (Recombination Signal Sequences, RSS) ή στις ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου.(53, 54) Αντίθετα, γονίδια με βλάβες στα RSS ή στις ρυθμιστικές περιοχές ή αλλαγές στην κωδικοποιητική περιοχή που οδηγούν σε αντικατάσταση συντηρημένων αμινοξέων περιγράφονται ως γονίδια ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF).(53, 54) Τέλος, γονίδια που φέρουν κωδικόνιο(α) τερματισμού και/ή μεταλλάξεις που οδηγούν σε αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης ή μεταλλάξεις στο κωδικόνιο έναρξης ονομάζονται ψευδογονίδια.(53, 54)

Επιπλέον, στους γενετικούς τόπους των ανοσοσφαιρινών υπάρχουν τρεις τύποι cis-ρυθμιστικών στοιχείων: (i) υποκινητές (promoters): μικρές αλληλουχίες ~200bp στο 5' άκρο του γονιδίου που προωθούν την έναρξη της μεταγραφής προς μια ορισμένη κατεύθυνση (ii) ενισχυτές (enhancers): αλληλουχίες σε μικρή απόσταση από το 5' ή 3' άκρο του γονιδίου που ενεργοποιούν τη μεταγραφή ανεξάρτητα από την κατεύθυνση (iii) αποσιωπητές (silencers): περιορίζουν τη μεταγραφή από απόσταση, λειτουργώντας και προς τις δύο κατευθύνσεις.(53)



Εικόνα 7 - Οργάνωση των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών. Οι ελαφριές αλυσίδες λ και κ κωδικοποιούνται από γονίδια V, J και C. Η βαριά αλυσίδα κωδικοποιείται από γονίδια V, D, J και C.

1.5.3 Μηχανισμοί δημιουργίας ποικιλότητας των ανοσοσφαιρινών

Η τεράστια δομική ετερογένεια των ανοσοσφαιρινών είναι απαραίτητη για την αναγνώριση των πολυάριθμων επιτόπων που υπάρχουν στη φύση. Καθημερινά, στον ανθρώπινο οργανισμό παράγονται 10^7 νέα B λεμφοκύτταρα το καθένα με διαφορετικό τύπο υποδοχέα (ανοσοσφαιρίνη) με μια και μοναδική αντιγονική ειδικότητα.(1) Συνολικά, τέσσερις κύριες διαδικασίες εμπλέκονται στη δημιουργία αυτής της τεράστιας ποικιλότητας:

(i) Συνδυαστική ποικιλότητα (combinatorial diversity). Αναφέρεται στην ποικιλομορφία που απορρέει από τον ανασυνδυασμό των γονιδίων της μεταβλητής περιοχής των βαριών και των ελαφριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών (ανασυνδυασμός V(D) J) και στο συνδυασμό της βαριάς αλυσίδας είτε με κ είτε με λ ελαφριά αλυσίδα. Ο ανασυνδυασμός V(D)J αρχίζει στο μυελό των οστών κατά την οντογένεση των B λεμφοκυττάρων στη φάση διαφοροποίησης που είναι ανεξάρτητη από την παρουσία αντιγόνου και συνεισφέρει σε πολύ μεγάλο βαθμό στη δημιουργία του τεράστιου ρεπερτορίου των ανοσοσφαιρινών. Μόνο από τη χρησιμοποίηση των διαθέσιμων λειτουργικών γονιδίων IGHV, IGHD, IGHJ και το συνδυασμό με ελαφριές αλυσίδες κ ή λ ο οργανισμός μπορεί να συνθέσει 6.5×10^6 διαφορετικές ανοσοσφαιρίνες.

(ii) Συνδετική ποικιλότητα (junctional diversity). Αναφέρεται στην ποικιλομορφία στις συμβολές των ανασυνδυασμένων γονιδίων. Σημαντικότατο ρόλο σε αυτή τη διεργασία κατέχουν η τελική δεοξυνουκλεοτιδική τρανσφεράση (Terminal deoxy Transferase, TdT) που καταλύει την τυχαία προσθήκη τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοσιδίων (κατά προτίμηση γουανίνης και κυτοσίνης) στα άκρα των

γονιδίων και εξωνουκλεάσες που αφαιρούν νουκλεοτίδια. Η συνδυετική ποικιλότητα συμβάλλει πολύ στην ποικιλότητα των αντιγονικών υποδοχέων, αυξάνοντας έως και κατά 10^{11} φορές τον αριθμό των πιθανών διαφορετικών ανοσοσφαιρινών.

(iii) Σωματική υπερμεταλλαξιγένεση (ΣΥΜ) (somatic hypermutation). Η ΣΥΜ έχει ως στόχο την αύξηση της συγγένειας της ανοσοσφαιρίνης για το αντιγόνο.(55-58) Ο όρος «υπερμεταλλαξιγένεση» χρησιμοποιείται για να επισημάνει την εξαιρετικά υψηλή συχνότητα εισαγωγής μεταλλάξεων, η οποία κυμαίνεται από 10^{-5} έως 10^{-3} /bp/κυτταρική γενιά και είναι σαφώς μεγαλύτερη από τη συχνότητα εισαγωγής μεταλλάξεων στο γονιδίωμα ενός φυσιολογικού κυττάρου (10^{-9} - 10^{-11}). Η ΣΥΜ συνεισφέρει καθοριστικά στην αύξηση της ποικιλότητας των αντισωμάτων με αποτέλεσμα ο οργανισμός να μπορεί να παράγει έως και 10^{12} διαφορετικά αντισώματα. Καθοριστικό ρόλο στη ΣΥΜ παίζει το ένζυμο δεαμινάση της κυτιδίνης (AID; Activation-Induced Deaminase)(59, 60) και οι επιρρεπείς σε λάθη πολυμεράσες (error-prone polymerases).(58)

(iv) Μεταστροφή ισοτύπου (MI) (class-switch recombination). Η διεργασία της μεταστροφής ισοτύπου συμβαίνει μετά την επιλογή των B λεμφοκυττάρων από το αντιγόνο.(61-63) Ο συνδυασμός μιας μεταβλητής περιοχής με διαφορετικές σταθερές περιοχές διασφαλίζει ότι τα αντισώματα μιας ορισμένης ειδικότητας μπορεί να εκφράζονται με διαφορετικούς ισοτύπους και, κατά συνέπεια, να έχουν διαφορετική εκτελεστική δράση, για την επίτευξη αποτελεσματικότερης απάντησης προς το αντιγόνο. Έτσι, η μεταστροφή ισοτύπου διαφοροποιεί περαιτέρω τα αντισώματα μιας συγκεκριμένης αντιγονικής ειδικότητας ώστε να επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες.

1.6 Διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων

1.6.1 Διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων στο μυελό των οστών

Τα B λεμφοκύτταρα προέρχονται από τη διαφοροποίηση των πολυδύναμων ή αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (pluripotent hematopoietic stem cells, PHSC) στο μυελό των οστών. Η διαφοροποίηση των PHSC σε B λεμφοκύτταρα εξελίσσεται σε ποικίλα στάδια, που καθορίζονται από τις αναδιατάξεις των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών και την έκφραση ανοσοσφαιρινών, μορίων προσκόλλησης και υποδοχέων αυξητικών παραγόντων στην επιφάνεια των B λεμφοκυττάρων.(63-68)

Οι αναδιατάξεις των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών γίνονται ιεραρχικά. Η πρώτη αναδιάταξη πραγματοποιείται μεταξύ των γονιδίων IGHD και IGHJ και στα δύο αλληλόμορφα του γενετικού τόπου της βαριάς αλυσίδας. Το γεγονός αυτό «δεσμεύει» τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα να διαφοροποιηθούν σε B

λεμφοκύτταρα. Σε αυτή τη φάση το κύτταρο καλείται πρώιμο προ-προ B κύτταρο (early pro B cell). Ακολουθεί ο ανασυνδυασμός ενός γονιδίου IGHV και του γενετικού συμπλόκου IGHD-J και το κύτταρο μετατρέπεται σε όψιμο προ-προ B κύτταρο (late pro B cell). Με την ολοκλήρωση του ανασυνδυασμού IGHV-D-J και την παραγωγή λειτουργικής βαριάς αλυσίδας το κύτταρο ονομάζεται προ-B λεμφοκύτταρο I (pre-B cell I) και εκφράζει στην επιφάνειά του βαριά αλυσίδα ισοτύπου μ σε συνδυασμό με τα προϊόντα των γονιδίων VpreB και λ5. Τα προϊόντα αυτών των γονιδίων αναφέρονται ως υποκατάστατες ελαφριές αλυσίδες (surrogate light chains, SLC) και είναι ομόλογα των κ και λ ελαφριών αλυσίδων. Σε αυτή τη φάση, το κύτταρο καλείται μεγάλο προ-B λεμφοκύτταρο II (large pre-B cell II) και ο επιφανειακός υποδοχέας του προ-B υποδοχέας (pre-BcR). Ο προ-B υποδοχέας είναι σύμπλοκο που περιλαμβάνει τη βαριά αλυσίδα, τις SLC και τους συνυποδοχείς (co-receptors) Igα και Igβ, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για τη λειτουργία του. Το σύμπλοκο αυτό δίνει σήμα στο εξελισσόμενο κύτταρο να αναπτυχθεί ταχύτερα και αποτρέπει περαιτέρω αναδιατάξεις των γονιδίων της βαριάς αλυσίδας. Κύτταρα που δεν εκφράζουν προ-BCR υποδοχέα πεθαίνουν με απόπτωση.

Τα κύτταρα που εκφράζουν προ-BCR υποδοχέα επιλέγονται θετικά, μετατρέπονται σε μικρά προ-B λεμφοκύτταρα I, διακόπτουν τον ανασυνδυασμό των γονιδίων IGH (αποκλεισμός αλληλομόρφου, allelic exclusion) και αρχίζουν τον ανασυνδυασμό των γονιδίων που κωδικοποιούν τις ελαφριές αλυσίδες. Πρώτα αναδιατάσσονται οι κ ελαφριές αλυσίδες και, εάν αποτύχουν, ακολουθούν οι λ. Μια επιτυχής αναδιάταξη οδηγεί στην παραγωγή κ αλυσίδας και στη δημιουργία μιας πλήρους IgMκ, ενώ αναστέλλονται οι περαιτέρω γονιδιακές αναδιατάξεις. Αν η προσπάθεια παραγωγής μιας κ ελαφριάς αλυσίδας αποτύχει, αναδιατάσσεται ο γενετικός τόπος της λ αλυσίδας. Όταν το κύτταρο αποκτήσει μια λειτουργική λ αλυσίδα εκφράζει στην επιφάνειά του πλήρη IgMλ.

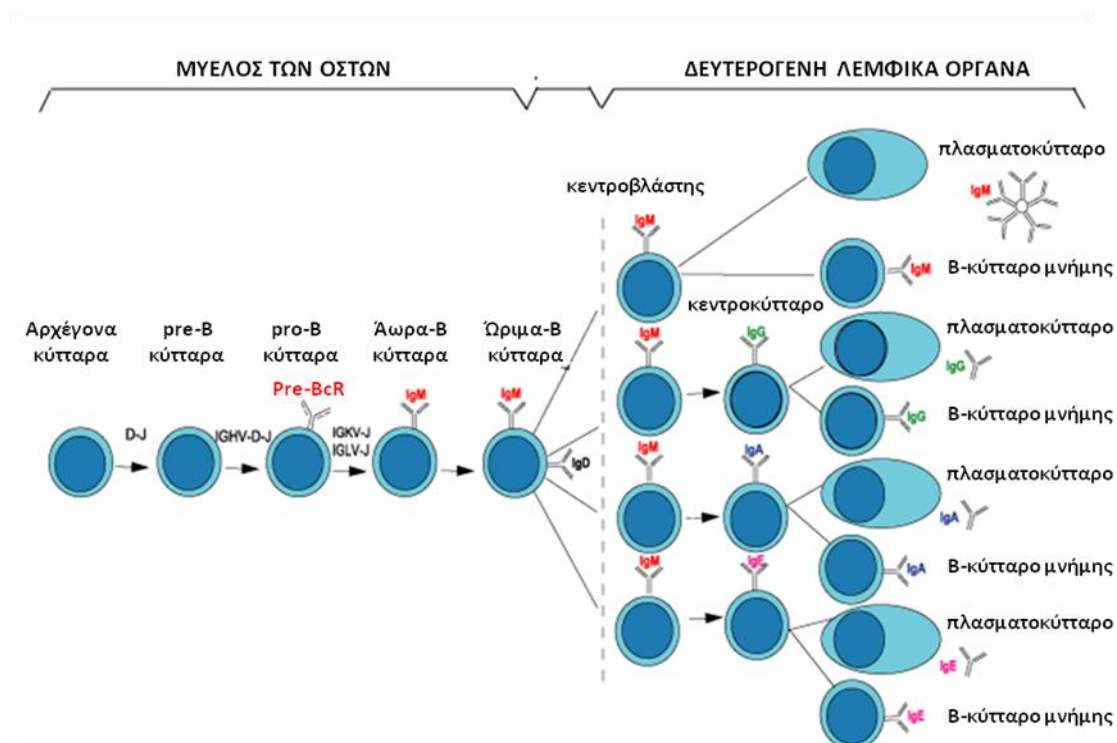
Η έκφραση επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης IgM μετατρέπει το κύτταρο σε ανώριμο B λεμφοκύτταρο (immature B cell) που αλληλεπιδρά με αντιγόνα του περιβάλλοντος. Όσα ανώριμα B λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν αυτοαντιγόνα στο μυελό των οστών εξαλείφονται ή καθίστανται ανεκτικά εναντίον αυτόλογων κυττάρων και ιστών. Όσα B-κύτταρα δεν αλληλεπιδρούν με κάποιο αυτοαντιγόνο εγκαταλείπουν το μυελό των οστών και πραγματοποιούν εναλλακτικό μάτισμα των mRNA των βαριών αλυσίδων προκειμένου να εκφράσουν στην επιφάνειά τους IgM και IgD. Έπειτα μεταναστεύουν στα δευτερογενή λεμφικά όργανα (λεμφαδένες, σπλήνας, λεμφικός ιστός των βλεννογόνων) και ονομάζονται πλέον ώριμα παρθένα B λεμφοκύτταρα.

Ορισμένα δυνητικά αυτοαντιδραστικά B κύτταρα δεν εξαφανίζονται νωρίς κατά την εξέλιξη. Τα B κύτταρα που εξαλείφονται στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών

αναγνωρίζουν κυρίως πολυδύναμα αντιγόνα ενώ η διαλογή για την ανοχή σε διαλυτά αντιγόνα, π.χ. πρωτεΐνες του ορού ή πρωτεΐνες συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων, εξασφαλίζεται στην περιφέρεια.

Η αυτοανοχή των B λεμφοκυττάρων επιτυγχάνεται με τους εξής μηχανισμούς:

- (i) Εξάλειψη κλώνων (clonal deletion): ανώριμα B λεμφοκύτταρα που αναγνωρίζουν πολυσθενή αντιγόνα μέσω της επιφανειακής IgM εξαλείφονται με απόπτωση.
- (ii) Ανεργία (anergy): ανώριμα B κύτταρα στο μυελό των οστών ή ώριμα B κύτταρα στην περιφέρεια τα οποία αναγνωρίζουν αυτόλογα αντιγόνα καθίσταται ανενεργά και χάνουν την επιφανειακή IgM. Τα κύτταρα αυτά εξακολουθούν να εκφράζουν φυσιολογικά επίπεδα IgD και να κυκλοφορούν ελεύθερα στην περιφέρεια.
- (iii) Διόρθωση υποδοχέα (receptor editing): ανώριμα αυτοαντιδραστικά B κύτταρα, τα οποία είναι προορισμένα να πεθάνουν, συνεχίζουν να εκφράζουν RAG-1 και RAG-2, επιτρέποντας τη συνέχιση της αναδιάταξης των γονιδίων της ελαφριάς αλυσίδας. Η αντικατάσταση της ελαφριάς αλυσίδας μπορεί ν' αλλάξει τον υποδοχέα που εμφανίζει αυτοαντιδραστικότητα μ' έναν άλλο μη αυτοαντιδραστικό. (69, 70)



Εικόνα 8 - Συνοπτική σχηματική απόδοση των σταδίων ανάπτυξης των B λεμφοκυττάρων. Τα συμβάντα κατά την ωρίμανση στο μυελό των οστών δεν απαιτούν αντιγόνο, ενώ η ενεργοποίηση και η διαφοροποίηση των ώριμων B κυττάρων στα περιφερικά λεμφικά όργανα απαιτεί αντιγόνο. (IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system®; <http://imgt.cines.fr>)

1.6.2 Διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια

Στα δευτερογενή λεμφικά όργανα τα ώριμα παρθένα B λεμφοκύτταρα έρχονται σ' επαφή με αντιγόνα και υφίστανται ένα δεύτερο κύκλο διαφοροποίησης. Για το λόγο αυτό, έχει επικρατήσει η άποψη ότι η διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων μπορεί να διακριθεί σε δύο φάσεις, ανεξάρτητη και εξαρτώμενη από το αντιγόνο. Ωστόσο, η διάκριση αυτή είναι συμβατική και αφορά μόνο στα εξωγενή αντιγόνα.

Τα ώριμα παρθένα B λεμφοκύτταρα αφήνουν την κυκλοφορία και εισέρχονται στο φλοιό των λεμφικών οργάνων μέσω των φλεβιδίων με υψηλό ενδοθήλιο. Εκεί τα B κύτταρα έρχονται σ' επαφή με διάφορα αντιγόνα μέσω της επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης. Η επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη παίζει διπλό ρόλο στην ενεργοποίηση των B λεμφοκυττάρων. Πρώτον, όπως όλοι οι αντιγονικοί υποδοχείς, όταν προσδέσει αντιγόνο μεταβιβάζει σήμα στο εσωτερικό του κυττάρου. Δεύτερον, αποδίδει το αντιγόνο σε ενδοκυττάρια δομές όπου αποδομείται σε μικρότερα τμήματα, τα οποία στη συνέχεια εκτίθενται στην επιφάνεια του B κυττάρου ως πεπτιδία δεσμευμένα σε μόρια του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης II. Το σύμπλοκο πεπτιδίου-MHC τάξης II αναγνωρίζεται από αντιγόνο-ειδικά δραστικά CD4 βοηθητικά T κύτταρα (Th).(71)

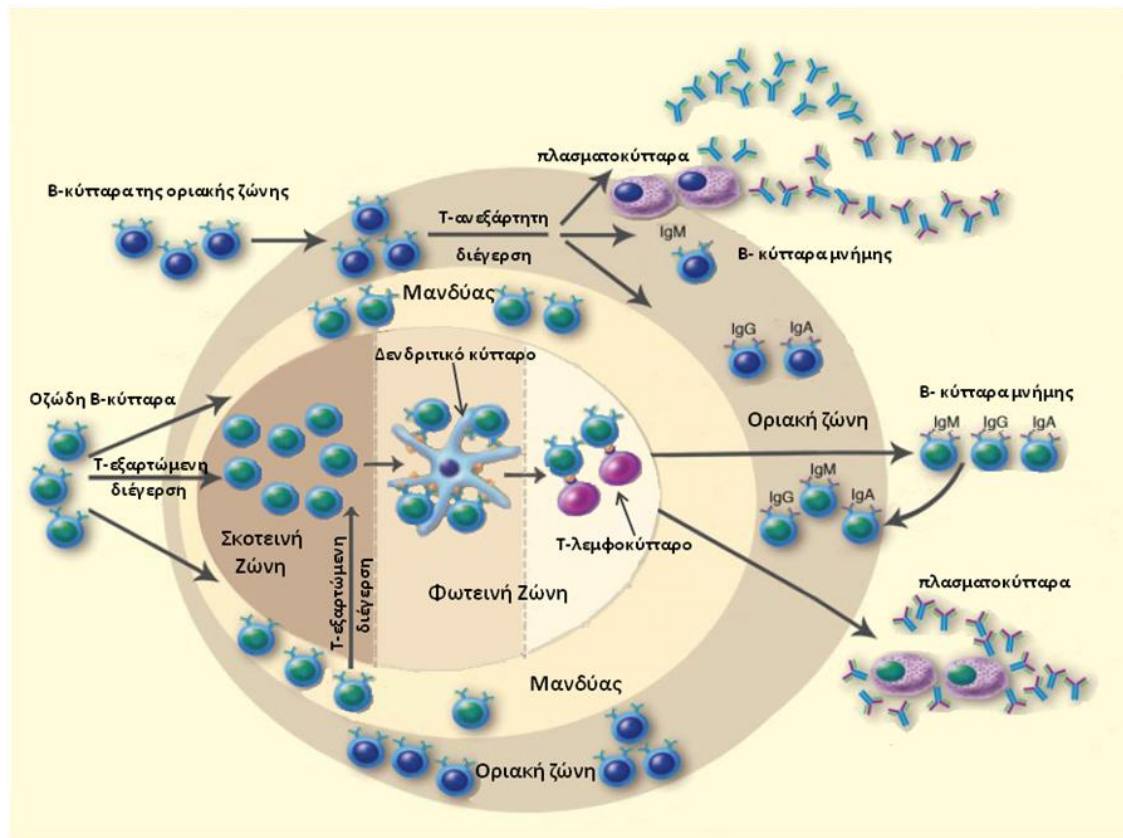
Μόλις τα βοηθητικά T κύτταρα αναγνωρίσουν το κατάλληλο σύμπλοκο πεπτιδίου-MHC τάξης II, συνθέτουν τόσο μεμβρανικά όσο και εκκρινόμενα ανοσοδραστικά μόρια. Το πιο σημαντικό αυτοδραστικό μόριο είναι ο συνδέτης του CD40 (CD40 ligand, CD40L) που συνδέεται με το CD40 στην επιφάνεια των B κυττάρων. Η δέσμευση του CD40 στον CD40L ενεργοποιεί τα B λεμφοκύτταρα.(72, 73) Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός αλλά και η διαφοροποίηση του B λεμφοκυττάρου σε πλασματοκύτταρο προωθείται και από διάφορες κυτταροκίνες, οι οποίες εκκρίνονται από τα T λεμφοκύτταρα και δρουν τοπικά έτσι ώστε να δράσουν μόνο στο αντιγονοειδικό B λεμφοκύτταρο στόχο. Σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία παίζει η IL-4 και ακολουθούν η IL-5 και η IL-6.

Μετά την αντιγονική διέγερση τα B κύτταρα που ενεργοποιούνται στις περιοχές των T κυττάρων ακολουθούν διαφορετική πορεία. Μερικά διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα, που εκκρίνουν IgM παρέχοντας έτσι μια πρώιμη πηγή κυκλοφορούντων αντισωμάτων, ενώ άλλα μεταναστεύουν στο κέντρο των λεμφοζιδίων όπου δημιουργούν τα βλαστικά κέντρα (germinal centers). Τα βλαστικά κέντρα είναι περιοχές γρήγορου πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των B λεμφοκυττάρων και σχηματίζονται περίπου μια εβδομάδα μετά την αντιγονική διέγερση. Στο βλαστικό κέντρο τα ώριμα B κύτταρα διαφοροποιούνται σε κεντροβλάστες (centroblasts). Οι κεντροβλάστες είναι μεγάλα κύτταρα που

διαιρούνται συχνά, ενώ δεν εκφράζουν επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη. Στις κεντροβλάστες τα αναδιαταγμένα γονίδια της μεταβλητής περιοχής της ανοσοσφαιρίνης συσσωρεύουν μεταλλάξεις με ρυθμό περίπου ένα ζεύγος βάσεων ανά 10^3 ανά κυτταρική διαίρεση. Ο γρήγορος πολλαπλασιασμός των Β λεμφοκυττάρων στο βλαστικό κέντρο, αυξάνει πολύ τον αριθμό των ειδικών για το αντιγόνο Β λεμφοκυττάρων. Τελικά, ο πολλαπλασιασμός σταματά και η κεντροβλάστη μετατρέπεται σε κεντροκύτταρο. Ανατομικά, στο βλαστικό κέντρο σχηματίζονται δυο περιοχές, η σκοτεινή ζώνη (dark zone) και η φωτεινή ζώνη (light zone). Η «σκοτεινή ζώνη» είναι η περιοχή όπου συμπιέζονται οι διαιρούμενες κεντροβλάστες, οι οποίες υπόκεινται στη διαδικασία της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης (somatic hypermutation), ενώ η φωτεινή περιοχή, περιέχει τα κεντροκύτταρα που φέρουν το μεταλλαγμένο υποδοχέα.(74-78) Τα κεντροκύτταρα εκφράζουν μεταλλαγμένη ανοσοσφαιρίνη επιφανείας που μπορεί να δεσμεύει το αντιγόνο καλύτερα, λιγότερο καλά ή καθόλου. Στη φωτεινή ζώνη υπάρχουν επίσης τα δενδριτικά κύτταρα των λεμφοζιδίων (follicular dendritic cells, FDC) και κύτταρα παρουσίασης αντιγόνου (antigen presenting cells, APCs) που παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιλογή των κεντροκυττάρων τα οποία δεσμεύουν το αντιγόνο με υψηλή συγγένεια. Τα κεντροκύτταρα δέχονται συνδεδεμένα σήματα από τα Τ λεμφοκύτταρα και τα FDCs. Αν η σωματική υπερμεταλλαξιγένεση έχει ελαττώσει τη συγγένεια της επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης για το αντιγόνο, τα κεντροκύτταρα θα πεθάνουν γρήγορα με απόπτωση, ενώ, αντίθετα, τα κεντροκύτταρα που εκφράζουν μεταλλαγμένη ανοσοσφαιρίνη που προσδένει ικανοποιητικά το αντιγόνο ενεργοποιούν την έκφραση του αντιαποπτωτικού γονιδίου bcl-2 και διασώζονται από την απόπτωση. Αμέσως μετά τη σωματική υπερμεταλλαξιγένεση, στη φωτεινή ζώνη του βλαστικού κέντρου συμβαίνει ακόμη μια διεργασία τροποποίησης των γονιδίων της βαριάς αλυσίδας, γνωστή ως μεταστροφή ισοτύπου.

Η μεταστροφή ισοτύπου είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του υποδοχέα CD40 του Β λεμφοκυττάρου με τον CD40L ενός Τ λεμφοκυττάρου παρουσία κυτταροκινών, όπως οι IFN γ , IL-4, και TGF β . Οι κυτταροκίνες επάγουν τη μεταστροφή ισοτύπου προκαλώντας αλλαγή στον ανασυνδυασμό θέσεων που βρίσκονται στο 5' άκρο κάθε IGHC γονιδίου.(79-81) Οι κυτταροκίνες κατευθύνουν τη διεργασία επιλεκτικά προκαλώντας μεταστροφή προς διαφορετικούς ισοτύπους (πχ. IFN γ : IgG3, IgG2a, IL-4: IgG1, IgE, TGF β : IgG2 β , IgA). Τα Β λεμφοκύτταρα με υποδοχείς υψηλής συγγένειας που επιλέγονται από το αντιγόνο εγκαταλείπουν το βλαστικό κέντρο και μετατρέπονται σε πλασματοκύτταρα ή σε Β-λεμφοκύτταρα μνήμης.

Η διαφοροποίηση σε πλασματοκύτταρα φαίνεται ότι καθορίζεται από την παρουσία μορίων CD23, διαλυτών ή δεσμευμένων στα FDCs. Τα πλασματοκύτταρα δεν εκφράζουν επιφανειακή Ig ούτε MHC τάξης II και παράγουν αντισώματα ανεξάρτητα από την επίδραση του αντιγόνου ή των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων. Έχουν πλούσιο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και το κυτταρόπλασμα τους περιέχει άφθονες ανοσοσφαιρίνες, που αποτελούν το 10-20% των συντιθέμενων πρωτεϊνών. Τα πλασματοκύτταρα είναι τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα. Έχουν χάσει την ικανότητα ν' αλλάζουν ισότυπο και να υφίστανται σωματική υπερμετάλλαξη. Ζουν τέσσερις εβδομάδες στο μυελό των οστών ή στη βασική μεμβράνη των επιθηλιακών επιφανειών, έτσι ώστε να περιορίζεται ο χρόνος της άνοσης απάντησης. Τα B-λεμφοκύτταρα μνήμης, αντίθετα από τα πλασματοκύτταρα, είναι κύτταρα σε ηρεμία, με μεγάλη διάρκεια ζωής, που δεν παράγουν αντισώματα. Ωστόσο, διαθέτουν υποδοχέα με υψηλή συγγένεια για το αντιγόνο και έχουν υποστεί μεταστροφή ισοτύπου. Τα κύτταρα αυτά, σε επόμενη επαφή με το αντιγόνο, μπορεί να διαφοροποιηθούν σε πλασματοκύτταρα και να εκδηλώσουν ταχύτερη και εντονότερη δευτερογενή άνοση απάντηση. Επιπλέον, τα B-λεμφοκύτταρα μνήμης δεν περιορίζονται στο σημείο της αλληλεπίδρασης με το αντιγόνο, αλλά κυκλοφορούν στην περιφέρεια. Η διαφοροποίηση σε B-λεμφοκύτταρα μνήμης επάγεται από την αλληλεπίδραση CD40L-CD40 και έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση του αντιαποπτωτικού γονιδίου Bcl-x_L.



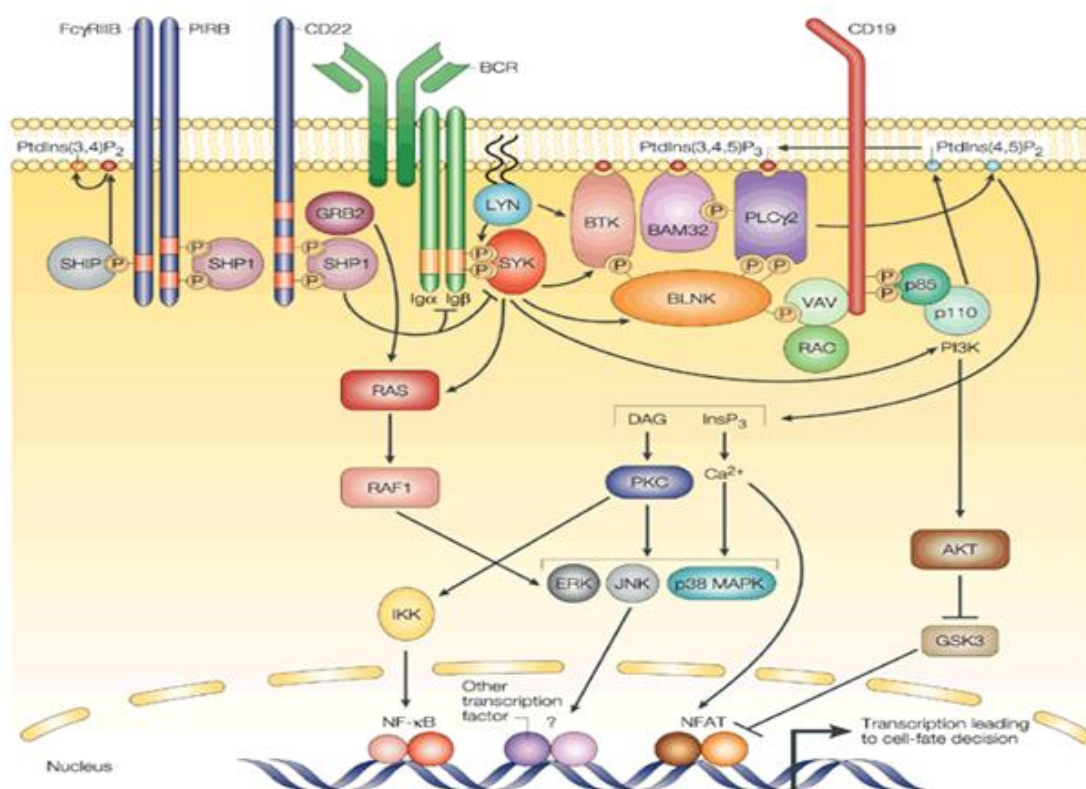
Εικόνα 9 - Σχηματική απεικόνιση του βλαστικού κέντρου.(82)

1.7 Σηματοδότηση μέσω του B κυτταρικού υποδοχέα

Ο B κυτταρικός υποδοχέας (BcR) είναι ένα διαμεμβρανικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο που αποτελείται από την επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη (sIg) και τα ετεροδιμερή Igα (CD79a) και Igβ (CD79b). Ο BcR συνδέεται με το αντιγόνο, ενεργοποιείται και μεταβιβάζει το σήμα στο εσωτερικό του κυττάρου. Οι sIg είναι υπεύθυνες για τη σύνδεση με το αντιγόνο, ενώ το ετεροδιμερές Igα/Igβ για τη μεταβίβαση του σήματος.(83)

Τα μόρια CD79a και CD79b αποτελούνται από ένα εξωκυττάριο, ένα διαμεμβρανικό κι ένα μακρύ κυτταροπλασματικό τμήμα. Κάθε μόριο CD79a και CD79b φέρει στο κυτταροπλασματικό τμήμα του μια αλληλουχία ενεργοποίησης που βασίζεται στην τυροσίνη (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif, ITAM).(84) Η ενεργοποίηση των B λεμφοκυττάρων μέσω του BcR πραγματοποιείται με φωσφορυλίωση των κυτταροπλασματικών ITAMs από τις κινάσες τυροσίνης Fyn, Lyn, Blk (μέλη της οικογένειας των κινασών Src).(85) Τα ενεργοποιημένα ένζυμα φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα τυροσίνης στην κυτταροπλασματική περιοχή του ετεροδιμερούς Igα/Igβ, δημιουργώντας περιοχές δέσμευσης για την κινάση τυροσίνης

Syk (Spleen tyrosine kinase), η οποία έτσι ενεργοποιείται. Στη συνέχεια, η Syk σε συνεργασία με την κινάση τυροσίνης BTK (Bruton tyrosine kinase) ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση $PLC\gamma_2$ (1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2, $PLC\gamma_2$). Η $PLC\gamma_2$ υδρολύει τη φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP_2), ένα μεμβρανικό φωσφολιπίδιο, που με τη σειρά της ενεργοποιεί την 1,4,5 τριφωσφορική ινοσιτόλη (inositol 1,4,5-trisphosphate, IP_3) και τη διακυλογλυκερόλη (diacylglycerol, DAG). Η DAG και τα ιόντα Ca^{2+} , που ελευθερώνονται από τη δράση της IP_3 , ενεργοποιούν συνεργικά την πρωτεϊνική κινάση C (Protein kinase C, PKC), η οποία με τη σειρά της επάγει πρόσθετες οδούς σηματοδότησης μέσω της ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο NF- κ B, και κινάσων MAPK, μεταξύ των οποίων οι κινάσες ERK, JNK και p38 MAPK. Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο του υποδοχέα παράγει επίσης μηνύματα που ενεργοποιούν το ενδοκυττάριο μονοπάτι Ras (Εικόνα 10).



Εικόνα 10 - Οδοί σηματοδότησης που ενεργοποιούνται από τον BCR

Το σήμα που μεταβιβάζεται μέσω του BcR ενισχύεται από το σύμπλοκο CD21/CD19/CD81. Το μόριο CD21 είναι υποδοχέας του συμπληρώματος, το CD19 συμμετέχει στην ενδοκυττάρια μεταβίβαση του σήματος, ενώ ο ρόλος του μορίου

CD81 δεν είναι ακόμα γνωστός. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του Β λεμφοκυττάρου παίζει το μόριο CD40 (μέλος της οικογένειας των TNF υποδοχέων) που συνδέεται με τον CD40L στην επιφάνεια των Τ βοηθητικών λεμφοκυττάρων. Όπως αναφέρθηκε στη παράγραφο 1.7.2, τα Β λεμφοκύτταρα αποδίδουν το συνδεδεμένο με τον BcR αντιγόνο σ' ενδοκυττάρια δομές όπου συμβαίνει αποικοδόμησή του σε μικρότερα τμήματα, τα οποία στη συνέχεια εκτίθενται στην επιφάνεια του Β λεμφοκυττάρου ως πεπτιδία δεσμευμένα σε μόρια MHC τάξης II. Το σύμπλοκο πεπτιδίου-MHC τάξης II αναγνωρίζεται από αντιγόνο-ειδικά CD4 βοηθητικά Τ κύτταρα μέσω του συμπλόκου CD40/CD40L. Μόλις τα βοηθητικά Τ κύτταρα αναγνωρίσουν το κατάλληλο σύμπλοκο πεπτιδίου-MHC τάξης II συνθέτουν τόσο μεμβρανικά όσο και εκκρινόμενα ανοσοδραστικά μόρια που τροποποιούν τη δράση των Β λεμφοκυττάρων. Το CD40 παρέχει το πιο ισχυρό σήμα ενεργοποίησης στα Β λεμφοκύτταρα.(86)

Ένα Β λεμφοκύτταρο δέχεται σήματα από τον BcR υποδοχέα καθόλη τη διαφοροποίησή του. Το αποτέλεσμα αυτής της διέγερσης εξαρτάται από το στάδιο που βρίσκεται το Β λεμφοκύτταρο και από την ένταση του σήματος. Σ' ένα ώριμο Β λεμφοκύτταρο μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα διαφοροποίηση, πολλαπλασιασμό, απόπτωση ή ανοσο-ανοχή.

1.8 Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία

1.8.1 Γενικά

Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ) είναι η πιο συχνή λευχαιμία στο Δυτικό ημισφαίριο. Χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση στο αίμα, το μυελό των οστών και τα δευτερογενή λεμφικά όργανα CD19⁺/CD5⁺/CD23⁺ Β λεμφοκυττάρων που φέρουν χαμηλά επίπεδα επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης. Προσβάλλει κυρίως ηλικιωμένους με διάμεση ηλικία διάγνωσης τα 65 έτη, ενώ εμφανίζεται με διπλάσια σχεδόν συχνότητα στους άνδρες. Παρά τον ομοιογενή φαινότυπο, η κλινική πορεία των ασθενών με ΧΛΛ ποικίλει: ορισμένοι ασθενείς να επιβιώνουν για πολλά χρόνια χωρίς θεραπεία και τελικά πεθαίνουν από άλλα αίτια, ενώ άλλοι παρουσιάζουν επιθετική νόσο με μικρή επιβίωση παρά τη θεραπεία.(87)

Η μεγάλη κλινική ετερογένεια οδήγησε στην αναζήτηση προγνωστικών παραγόντων για την πρώιμη διάγνωση των ασθενών με επιθετική νόσο με στόχο την έγκαιρη και πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση. Αρχικά αναπτύχθηκαν δύο κύρια κλινικά συστήματα σταδιοποίησης, κατά Rai και Binet (88, 89), τα οποία μολονότι

προσέφεραν πληροφορίες σχετικά με την επιβίωση δεν ήταν ικανά να προβλέψουν με ακρίβεια την εξέλιξη της νόσου σε ασθενείς που διαγιγνώσκονται σε πρώιμο στάδιο. Σύντομα αναζητήθηκαν προγνωστικοί παράγοντες για τον καθορισμό ομάδων ασθενών με καλή ή κακή πρόγνωση, γεγονός που θα βοηθούσε στην καλύτερη θεραπευτική αντιμετώπιση.(90-92)

Παράλληλα, τα τελευταία χρόνια, η καλύτερη κατανόηση της παθογένειας της νόσου οδήγησε στην εισαγωγή μιας σειράς «βιολογικών» δεικτών οι οποίοι επιτρέπουν να προβλεφθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια η έκβαση των ασθενών. Οι σημαντικότεροι σχετικοί δείκτες είναι το φορτίο των σωματικών μεταλλάξεων, ανοσοφαινοτυπικοί δείκτες όπως το CD38 και το ZAP-70 και γενετικοί δείκτες.

1. Φορτίο σωματικών μεταλλάξεων γονιδίων IGHV

Το φορτίο των σωματικών μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV αποτελεί σήμερα τον πιο σημαντικό προγνωστικό παράγοντα για τους ασθενείς με ΧΛΛ. Το 1999, δύο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες έδειξαν ότι το φορτίο των σωματικών μεταλλάξεων των κλωνοτυπικών γονιδίων IGHV της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών διακρίνει τους ασθενείς με ΧΛΛ σε δύο υποομάδες. Η πρώτη περιλαμβάνει ασθενείς που φέρουν γονίδια IGHV με νουκλεοτιδική ταυτότητα $\geq 98\%$ σε σχέση προς το αντίστοιχο μη αναδιαταγμένο γονίδιο (αμετάλλακτες αλληλουχίες IGHV), ενώ η δεύτερη ασθενείς των οποίων τα γονίδια IGHV έχουν νουκλεοτιδική ταυτότητα $< 98\%$ (μεταλλαγμένες αλληλουχίες IGHV).(93, 94) Το όριο του 2% αρχικά επιλέχθηκε ώστε ν' αποφευχθεί το ενδεχόμενο κάποιες από τις διαφορές ν' αντιστοιχούν σε άγνωστους πολυμορφισμούς του γενετικού τόπου IGH. Οι ασθενείς με αμετάλλακτες αλληλουχίες συνήθως έχουν κακή κλινική πορεία, ενώ, αντίθετα, οι ασθενείς με μεταλλαγμένες αλληλουχίες επιβιώνουν για πολλά χρόνια χωρίς θεραπεία και, συνήθως, πεθαίνουν από άλλα αίτια.

2. Ανοσοφαινοτυπικοί δείκτες

Από τους ανοσοφαινοτυπικούς δείκτες, σημαντικό ρόλο στην πρόγνωση της ΧΛΛ παίζουν το CD38 και το ZAP-70. Η υψηλή έκφραση του CD38 έχει συσχετισθεί με επιθετική κλινική πορεία.(95-99) Επιπλέον, η έκφραση του CD38 έχει συσχετισθεί με το «φορτίο» σωματικών μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV, παρότι αυτή η συσχέτιση δε φαίνεται απόλυτη. Χαμηλή έκφραση CD38 παρατηρείται συχνότερα σε ασθενείς με μεταλλαγμένα γονίδια IGHV, ενώ υψηλή CD38 έκφραση έχει συσχετισθεί με την παρουσία αμετάλλακτων γονιδίων IGHV.(95, 96)

Η ZAP-70 (zeta-associated protein of 70 kDa) είναι μια ενδοκυττάρια κινάση της τυροσίνης που εκφράζεται φυσιολογικά στα T κύτταρα και τα NK κύτταρα (Natural killers) και παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της T σηματοδότησης. Η ZAP-70 είναι ομόλογη της πρωτεΐνης Syk, κινάσης η οποία ελέγχει τη μεταβίβαση του σήματος

μέσω του υποδοχέα των B λεμφοκυττάρων. Η έκφραση της ZAP-70 από τα B λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ αρχικά θεωρήθηκε αποτέλεσμα της κακοήθους εξαλλαγής, αφού η συγκεκριμένη πρωτεΐνη δεν ήταν γνωστό να εκφράζεται από τα φυσιολογικά B λεμφοκύτταρα. Η επιβεβαίωση ωστόσο της έκφρασης της ZAP-70 σε φυσιολογικά B λεμφοκύτταρα(100-103) και πιο συγκεκριμένα σε υποπληθυσμούς B λεμφοκυττάρων των αμυγδαλών και του σπλήνα με φαινότυπο διεγερμένων λεμφοκυττάρων, ανέτρεψε τις προηγούμενες απόψεις. Σήμερα πιστεύεται ότι η έκφραση της ZAP-70 στα κύτταρα της ΧΛΛ προκαλεί αυξημένη μεταβίβαση του σήματος του B κυτταρικού υποδοχέα, γεγονός που πιθανόν συσχετίζεται με κακή πρόγνωση της νόσου σε περιπτώσεις ΧΛΛ που εκφράζουν ZAP-70.(104-110)

3. Γενετικοί δείκτες

Την τελευταία δεκαετία καταβλήθηκαν πολλές προσπάθειες για την αναγνώριση γενετικών δεικτών με προγνωστική σημασία στη ΧΛΛ. Η συχνότητα ανίχνευσης χρωμοσωμικών ανωμαλιών στα κλωνογενή κύτταρα κυμαίνεται από 30-50% με μεθόδους κλασσικής κυτταρογενετικής έως περίπου 80% με τη μέθοδο του φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (FISH).(111) Από τις πιο συχνές κυτταρογενετικές ανωμαλίες που παρατηρούνται στη ΧΛΛ είναι η έλλειψη στο χρωμόσωμα 13, που θεωρείται ως δείκτης καλής πρόγνωσης, και η τρισωμία του χρωμοσώματος 12, η οποία έχει συσχετιστεί με ενδιάμεση ή δυσμενή πρόγνωση.(112-114) Επιπλέον, ελλείψεις στις χρωμοσωμικές ζώνες 11q22-q23, όπου εντοπίζονται τα γονίδια RDX (radixin) και ATM (ataxia telangiectasia mutated) και, ιδίως, 17p (p53) καθορίζουν μια ομάδα ασθενών με ταχεία εξέλιξη της νόσου και μικρή επιβίωση. (112-114) Εξίσου δυσμενής είναι η πρόγνωση για ασθενείς με μεταλλάξεις του γονιδίου p53 χωρίς δομική ανωμαλία του χρωμοσώματος 17p.(112-114)

Ένας νέος προγνωστικός παράγοντας στη ΧΛΛ είναι το μοριακό προφίλ των microRNAs.(115) Μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση συγκεκριμένου συνδυασμού microRNAs (miR186, miR132, miR16-1, miR102, και miR29c) συνδέεται με καλύτερη πρόγνωση.(116) Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι δύο από αυτά τα microRNAs (miRN15a/miRN16-1) εντοπίζονται στην περιοχή 13q14.3(117), που αποτελεί ιδιαίτερα συχνό στόχο για ελλείψεις. Ωστόσο, η έκφραση αυτών των microRNAs φαίνεται ότι καταστέλλεται στις περισσότερες περιπτώσεις ΧΛΛ ανεξαρτήτως κυτταρογενετικού προφίλ, πιθανόν μέσω σημειακών μεταλλάξεων. Η καταστολή της έκφρασης των miRN15a και miRN16-1 φαίνεται ότι σχετίζεται με την υπερέκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης BCL-2, η οποία χαρακτηρίζει τα νεοπλασματικά κύτταρα της ΧΛΛ.

1.8.2 Ανάλυση των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών στη ΧΛΛ

Το ρεπερτόριο των γονιδίων IGHV στη ΧΛΛ χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερη επιλεκτικότητα και εμφανίζει σημαντικές διαφορές από το αντίστοιχο των φυσιολογικών Β λεμφοκυττάρων. Ορισμένα γονίδια, ιδίως τα IGHV1-69, IGHV4-34, IGHV3-7 και IGHV3-21, χρησιμοποιούνται με μεγάλη συχνότητα, παρά τις αποκλίσεις που παρατηρούνται στις διάφορες μελέτες.(118, 119) Το φαινόμενο αυτό αποτελεί ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της ΧΛΛ και δεν απαντά στο φυσιολογικό ρεπερτόριο.

Επιπλέον, ένα μοναδικό χαρακτηριστικό του ρεπερτορίου των αντιγονικών υποδοχέων στη ΧΛΛ είναι η ύπαρξη υποσυνόλων ασθενών με ταυτόσημους ή πολύ όμοιους BcRs (χρησιμοποίηση των ίδιων γονιδίων IGHV και IGKV/IGLV με μοναδικά, κοινά μοτίβα των CDR3s). Για να περιγράψουν το παραπάνω φαινόμενο, οι Chiorazzi και συνεργάτες χρησιμοποίησαν τον όρο «στερεότυποι υποδοχείς» και όρισαν κανόνες που προσδιορίζουν τη στερεοτυπία.(120) Η στερεοτυπία του BcR υποδοχέα είναι συχνό φαινόμενο στη ΧΛΛ.(120-126) Πρόσφατη μελέτη επί 2662 ασθενών έδειξε ότι σχεδόν το 30% των περιπτώσεων ΧΛΛ έφεραν στερεότυπους υποδοχείς.(126) Η συχνότητα του φαινομένου διαφέρει ανάλογα με το φορτίο των σωματικών μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV. Η στερεοτυπία ανέρχεται στο 40% σε αναδιατάξεις IGHV-IGHD-IGHJ με νουκλεοτιδική ταυτότητα 100%, ενώ είναι μόνο 10% σε περιπτώσεις με νουκλεοτιδική ταυτότητα μικρότερη του 98%.(122, 123)

Στερεότυποι υποδοχείς εντοπίζονται πιο συχνά σε ανασυνδυασμούς που χρησιμοποιούν γονίδια των υποομάδων IGHV1, IGHV3, και IGHV4. Η συχνότητα του φαινομένου είναι ακόμη μεγαλύτερη για συγκεκριμένα γονίδια IGHV (π.χ. IGHV1-69, IGHV1-2, IGHV1-3, IGHV3-21, IGHV3-48, IGHV4-39, IGHV4-34), ενώ, αντίθετα, πολύ μικρή (<5%) γι' άλλα γονίδια IGHV (π.χ. IGHV3-23, IGHV3-30, IGHV3-33).(122, 123)

Η στερεοτυπία του Β κυτταρικού υποδοχέα είναι μοναδικό χαρακτηριστικό της ΧΛΛ και «καταργεί» τη μαθηματική λογική, εφόσον η μαθηματική πιθανότητα να υπάρχουν δύο λεμφοκύτταρα με ίδια ανοσοσφαιρίνη είναι απειροελάχιστη (10^{-12}) ενώ η συχνότητα έκφρασης στερεότυπων υποδοχέων στη ΧΛΛ πλησιάζει το 30%.(126) Η στερεοτυπία των υποδοχέων BcR αφορά κυρίως τις περιοχές CDR3 των βαριών και ελαφριών αλυσίδων. Για παράδειγμα, σε πρόσφατη μελέτη φάνηκε ότι 2,7% των ασθενών φέρουν στερεότυπους υποδοχείς που ανήκουν στο υποσύνολο #1.(123) Το συγκεκριμένο υποσύνολο χαρακτηρίζεται από τη χρησιμοποίηση των γονιδίων IGHD6-19 και IGHJ4 με διαφορετικά γονίδια IGHV (IGHV1-2, IGHV1-3, IGHV1-18, IGHV1-8, IGHV5-a, IGHV7-4-1). Όλες οι περιπτώσεις εκφράζουν στερεότυπη κ

ελαφριά αλυσίδα (γονίδιο IGKV1-39/1D-39), ανεξαρτήτως του γονιδίουIGHV.(122, 123) Επισημαίνεται ιδιαίτερα το γεγονός ότι, μολονότι διαφορετικά, όλα τα γονίδια IGHV που εκφράζονται στο στερεότυπο υποσύνολο #1 είναι μέλη της ίδιας φυλογενετικής οικογένειας, δηλαδή οι αλληλουχίες τους είναι παρόμοιες.

Οι περιπτώσεις ΧΛΛ που εκφράζουν στερεότυπους BcRs μπορεί επίσης να μοιράζονται μοναδικά γενετικά και κλινικά χαρακτηριστικά, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι ιδιαιτερότητες της θέσης πρόσδεσης του αντιγόνου ενδέχεται να διαφοροποιούν την κλινική εικόνα και πιθανόν και την έκβαση των ασθενών. Στη μελέτη των Tobin και συνεργατών(124), για πρώτη φορά αναφέρθηκε πιθανή συσχέτιση της στερεοτυπίας σε επίπεδο BcR με την κλινική εικόνα σ' ένα υποσύνολο ασθενών με εντυπωσιακά παρόμοιους υποδοχείς IGHV3-21/IGLV3-21. Οι ασθενείς αυτοί σχετίζονταν με κακή πρόγνωση παρότι τα δύο τρίτα των ασθενών έφεραν μεταλλαγμένα γονίδια IGHV.(124) Ακολούθησε η μελέτη των Ghiotto και συνεργατών(127), οι οποίοι ανέφεραν πιθανή συσχέτιση της στερεοτυπίας σε επίπεδο BcR με την κλινική εικόνα σε σύνολο 5 ασθενών με στερεότυπους υποδοχείς IGHV4-39/IGKV1-39(1D-39). Το συγκεκριμένο υποσύνολο αναφέρθηκε ότι χαρακτηρίζεται από ιδιότυπη για τη ΧΛΛ αναλογία φύλου, με υπεροχή γυναικών (Γ:Α, 4:1), και από επιθετική κλινική πορεία. Μεταγενέστερες μελέτες επιβεβαίωσαν αυτά τα δεδομένα σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών και ανέδειξαν σημαντικές κλινικοβιολογικές συσχετίσεις και σε άλλα στερεότυπα υποσύνολα (IGHV4-34/IGK2-30 (στερεότυπο υποσύνολο #4)).(122, 123, 128, 129)

1.8.3 Ο ρόλος του αντιγόνου στη ΧΛΛ

Η αναγνώριση υποσυνόλων ασθενών με ΧΛΛ που φέρουν στερεότυπους υποδοχείς BcR και παράλληλα παρουσιάζουν παρόμοια κλινική πορεία αποτελεί ισχυρή ένδειξη για ενεργό συμμετοχή του BcR -μέσω επιλογής από αντιγόνο- σε κάποια φάση της λευχαιμογένεσης.(122, 123, 126, 130) Η συγκριτική μελέτη των BcR αλληλουχιών στη ΧΛΛ σε σχέση με αντισώματα γνωστής ειδικότητας έχει υποδείξει ως πιθανούς αντιγονικούς στόχους των ΧΛΛ υποδοχέων αυτοαντιγόνα, κοινά μικροβιακά αντιγόνα καθώς και απτίνες.(131-134) Παρόμοια αντιγονική ειδικότητα και περιορισμένη ποικιλότητα χαρακτηρίζουν επίσης δύο υποομάδες φυσιολογικών Β λεμφοκυττάρων, τα Β1 λεμφοκύτταρα και τα Β λεμφοκύτταρα της οριακής ζώνης.(135, 136) Μελέτες με ανασυνδυασμένα μονοκλωνικά αντισώματα από ασθενείς με στερεότυπους BcRs(131, 133) έδειξαν ότι τα ανασυνδυασμένα μονοκλωνικά αντισώματα προσδένονται σε κυτταροπλασματικά και πυρηνικά αυτοαντιγόνα καθώς και σε κοινά βακτηριακά αντιγόνα.

Αυτά τα αυτοαντιγόνα συνήθως είναι κυτταροσκελετικά συστατικά που εκτίθενται στην επιφάνεια των κυττάρων κατά την απόπτωση, σε τραυματισμούς ή στα πλαίσια φυσιολογικών καταβολικών διαδικασιών(137, 138), καθώς επίσης και μονόκλωνα μόρια DNA.(120, 139) Τα κύτταρα της ΧΛΛ βρέθηκε επίσης ότι δεσμεύουν νεοαντιγόνα (neoantigens), π.χ. μόρια (απτίνες) που γίνονται ανοσογόνα μετά από χημική τροποποίηση, π.χ. οξείδωση(133), και επίσης ξένα αντιγόνα, π.χ. συστατικά του βακτηριακού τοιχώματος.(137, 140) Επίσης, πρόσφατα, η ομάδα του Rosen(134) παρήγαγε μονοκλωνικά αντισώματα από ΧΛΛ κυτταρικές σειρές μετά μετασχηματισμό με EBV και διαπίστωσε αντιδραστικότητα εναντίον αντιγόνων με επιτόπους φωσφατιδυλοχολίνης (π.χ. πολυσακχαρίτες του *S. pneumoniae* και οξειδωμένα λιποσωμάτια LDL). Τα δεδομένα αυτά εγείρουν ερωτήματα για τη μοριακή βάση της ΧΛΛ και τονίζουν τη σημασία αναγνώρισης του/των αντιγονικών ερεθισμάτων που συμμετέχουν στη λευχαιμογένεση.

Σχεδόν το ~80% των αμετάλλακτων περιπτώσεων και το ~15% των μεταλλαγμένων περιπτώσεων ΧΛΛ βρέθηκε ότι αντιδρούν *in vitro* πολυαντιδραστικά με μια σειρά ιδίων και ξένων αντιγόνων. Τα περισσότερα ανασυνδυασμένα μονοκλωνικά αντισώματα που προερχόταν από μεταλλαγμένες περιπτώσεις δεν ήταν πολυαντιδραστικά αλλά μπορούσαν να γίνουν μετά από αφαίρεση των μεταλλάξεων τους.(137)

1.8.4 Μεταβίβαση σήματος μέσω του B κυτταρικού υποδοχέα

Στα φυσιολογικά B λεμφοκύτταρα, το αποτέλεσμα του σήματος που μεταβιβάζεται μέσω του BcR εξαρτάται από το στάδιο της ωρίμανσης και/ή ενεργοποίησης του B λεμφοκυττάρου. Έτσι, το ίδιο σήμα μπορεί να επιφέρει απόπτωση στα ανώριμα B λεμφοκύτταρα, ενώ, αντίθετα, να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των ώριμων λεμφοκυττάρων. Το επίπεδο της ενεργοποίησης του BcR ποικίλει ανάλογα με το σθένος του αντιγόνου, την πυκνότητα του αντιγονικού επιτόπου και την οργάνωσή του. Επίσης, για την έναρξη μιας άνοσης απάντησης, τα παρθένα B λεμφοκύτταρα απαιτούν μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιγόνου από τα B λεμφοκύτταρα μνήμης.

Τα νεοπλασματικά κύτταρα της ΧΛΛ ποικίλουν ως προς την ικανότητά τους να μεταβιβάζουν σήμα μετά την ενεργοποίηση του B κυτταρικού υποδοχέα.(141-143) Οι ασθενείς με αμετάλλακτες αλληλουχίες(144) και/ή έκφραση της πρωτεΐνης ZAP-70(145) μεταβιβάζουν σήμα μέσω της ανοσοσφαιρίνης επιφάνειας IgM. Η πρωτεΐνη ZAP-70 εμπλέκεται άμεσα σε αυτή τη διαδικασία αφού μετά την ενεργοποίηση του BcR συνδέεται στο σύμπλοκο του υποδοχέα και επάγει την ενεργοποίηση άλλων

μορίων της σηματοδοτικής οδού. Το γεγονός αυτό προάγει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των B κυττάρων και ίσως σχετίζεται με την επιθετική πορεία της νόσου στη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών (Εικόνα 14).(107) Αντίθετα, στις περισσότερες περιπτώσεις ΧΛΛ που φέρουν μεταλλαγμένες αλληλουχίες, είναι αδύνατη η μεταβίβαση σήματος μέσω της ανοσοσφαιρίνης IgM *in vitro*. Σε ποσοστό περίπου 50% αυτών των περιπτώσεων, μεταβίβαση σήματος μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε μέσω της ανοσοσφαιρίνης επιφάνειας IgD είτε μέσω του επικουρικού μορίου Igα (CD79α).(144) Σε αυτές τις περιπτώσεις, η μεταβίβαση του σήματος, έχει συσχετισθεί με την έκφραση του CD38.(144)

Πρόσφατα δεδομένα έδειξαν ότι ένα ποσοστό ασθενών με ΧΛΛ παρουσιάζει ιδιοσυστατική ενεργοποίηση ορισμένων μορίων που εμπλέκονται στο σηματοδοτικό μονοπάτι καθοδικά του BcR. Συγκεκριμένα, σε περιπτώσεις ΧΛΛ στις οποίες η μεταβίβαση σήματος μέσω της ανοσοσφαιρίνης επιφάνειας IgM δεν ήταν δυνατή, βρέθηκε συνεχής ενεργοποίηση της κινάσης ERK και αυξημένα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα NF-AT (nuclear factor of activated T cells), ενώ η κινάση AKT παρέμενε ανενεργός.(146) Στα ποντίκια, αυτή η κατάσταση χαρακτηρίζει τα ανεργικά B λεμφοκύτταρα και μπορεί να θεωρηθεί ως αποτέλεσμα διαρκούς αλληλεπίδρασης με αυτοαντιγόνα.(147) Όλα τα παραπάνω αποτελούν ισχυρή ένδειξη ότι σε κάποιες περιπτώσεις ΧΛΛ τα λευχαιμικά κύτταρα είναι ανεργικά, πιθανόν εξαιτίας παρατεταμένης έκθεσης σε αυτοαντιγόνα.

1.8.5 Υποδοχείς φυσικής ανοσίας και ΧΛΛ

Η παρατήρηση ότι τα B λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ μπορεί ν' αναγνωρίζουν κοινά βακτηριακά αντιγόνα(127, 148-150) οδήγησε στη ανάγκη μελέτης των υποδοχέων της φυσικής ανοσίας. Τα μέχρι τώρα δεδομένα σχετικά με το προφίλ έκφρασης των υποδοχέων της φυσικής ανοσίας στη ΧΛΛ είναι περιορισμένα και αφορούν κυρίως τους TLRs και τους NODs.

Αρχικά διαπιστώθηκε έκφραση των TLR7 και TLR9(151) ενώ αργότερα διαπιστώθηκε επιπλέον έκφραση των TLR1, TLR2, TLR6 και TLR10.(152) Επιπλέον, παρατηρήθηκε απουσία έκφρασης των TLR3 και TLR5 και χαμηλή έως μηδενική μεταγραφή των TLR4 και TLR8. Τέλος, διαπιστώθηκε έκφραση των NOD1 και NOD2.(152) Οι μέχρι τώρα μελέτες έχουν δείξει άμεση ενεργοποίηση των TLR7 και TLR9 από ειδικούς αγωνιστές. Η ενεργοποίηση αυτή οδηγεί σε παραγωγή κυτταροκινών και συνδιεγερτικών μορίων, ευαισθητοποιώντας τα νεοπλασματικά B

λεμφοκύτταρα στη δράση των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων και των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων.(151, 153)

Η ενεργοποίηση των TLRs οδηγεί στην ενεργοποίηση του NF-κΒ επάγοντας την έκφραση συνδιεγερτικών μορίων.(154-158) Παρόλ' αυτά οι επιπτώσεις από την ενεργοποίηση των TLRs στη ΧΑΛ είναι ακόμα ασαφείς, ιδίως αναφορικά με την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων. Σχετικά με τον TLR9 υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η διέγερση του TLR9 επάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε ασθενείς με αμετάλλακτα γονίδια IGHV, ενώ στην περίπτωση ασθενών με μεταλλαγμένα γονίδια IGHV τα κύτταρα οδηγούνται σε απόπτωση.(159) Η διαφορετική απόκριση αποδόθηκε σε αυξημένη σηματοδότηση της πρωτεϊνικής κινάσης Akt στις περιπτώσεις των κυττάρων που πολλαπλασιαζόταν μετά από διέγερση του TLR9.

Σχετικά με τον TLR7, τα αποτελέσματα επίσης δεν είναι σαφή .(153) Υπάρχει μεγάλη ετερογένεια στις απαντήσεις διαφορετικών ασθενών, γεγονός που συνάδει με την ετερογένεια της νόσου και υποδηλώνει την ανάγκη γι' ανάλυση μεγαλύτερης ομάδας ασθενών. Μια πρόσφατη μελέτη υπέδειξε ότι ο TLR7 επάγει την ενεργοποίηση του μονοπατιού του μονοξειδίου του αζώτου (NO) μέσω της σηματοδότησης του NF-κΒ με αποτέλεσμα ανοχή στην απόπτωση.(160)

2. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

2. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Οι ανοσοσφαιρίνες των νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων της ΧΛΛ εμφανίζουν μοναδικά χαρακτηριστικά, ενδεικτικά επιλογής από ιδιαίτερα αντιγόνα, με πιο αξιοσημείωτο τη στερεοτυπία της περιοχής VH CDR3 μεταξύ BCR διαφορετικών ασθενών. Η «στερεοτυπία» των BCR αποτελεί ισχυρή ένδειξη επιλογής από περιορισμένη ποικιλία αντιγόνων. Επίσης υποδηλώνει ότι οι λευχαιμικοί κλώνοι με «στερεότυπους» BCR πιθανόν προέρχονται από έναν πληθυσμό B λεμφοκυττάρων με ιδιότητες κυττάρων της έμφυτης ανοσίας, τα οποία εγγενώς εμφανίζουν περιορισμένη ποικιλότητα.

Πρόσφατα *in vitro* δεδομένα παρέχουν ενδείξεις για το ρόλο λοιμώξεων από κοινά παθογόνα (βακτήρια και ιούς) στη διέγερση των κλωνογενών κυττάρων της ΧΛΛ. Μάλιστα, οι σχετικές μελέτες επιβεβαιώνουν ότι η μοριακή στερεοτυπία του BCR συνοδεύεται από ειδική αναγνώριση διαφορετικών, κατά περίπτωση, παθογόνων μικροβίων. Εκτός από τις γενετικές μεταλλάξεις, η αλληλεπίδραση με το μικροπεριβάλλον φαίνεται να συμβάλει στην επιλογή και τον πολλαπλασιασμό του νεοπλασματικού κλώνου. Πολλά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η διέγερση μέσω του BCR επηρεάζει την επιβίωση και το θάνατο των λευχαιμικών κυττάρων.

Οι υποδοχείς της έμφυτης (TLR) ανοσίας αναγνωρίζουν στερεότυπα δομικά μοτίβα σε παθογόνους μικροοργανισμούς, ενεργοποιούν την έμφυτη ανοσία και επάγουν τους μηχανισμούς της προσαρμοστικής ανοσίας. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η ενεργοποίηση των TLR μπορεί να δράσει ως τρίτο σήμα για την ενεργοποίηση των ανώριμων B λεμφοκυττάρων σε συνδυασμό με την ειδική πρόσδεση του αντιγόνου στον υποδοχέα και την αλληλεπίδραση με τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα. Η σηματοδότηση μέσω των TLR εμπλέκεται στην παθογένεση αρκετών νοσημάτων του ανθρώπου, μεταξύ των οποίων το άσθμα και τα αυτοάνοσα νοσήματα. Αρκετές φορές, στην ανάπτυξη των αυτοάνοσων νοσημάτων εμπλέκονται ιογενείς λοιμώξεις (π.χ. αναφερόμενη συσχέτιση για λοίμωξη από τον ιό Epstein-Barr και ανάπτυξη συστηματικού ερυθηματώδους λύκου). Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι η αναγνώριση ιικών μοτίβων από τους TLR επάγει την παραγωγή κυτταροκινών που ενεργοποιούν αυτοαντιδραστικά λεμφοκύτταρα και οδηγούν στην ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων.

Πρόσφατα πραγματοποιήθηκαν διάφορες μελέτες με αντικείμενο την έκφραση και λειτουργικότητα των υποδοχέων έμφυτης ανοσίας στα κύτταρα της ΧΛΛ. Τα αποτελέσματα δεν είναι σαφή, γεγονός που οφείλεται κυρίως στο μικρό αριθμό των

δειγμάτων που αναλύθηκαν. Γενικότερα, φαίνεται ότι η ενεργοποίηση των TLR από τους αγωνιστές τους μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ανοσοενισχυτικός μηχανισμός στα κύτταρα της ΧΛΛ. Έτσι, τα κύτταρα γίνονται πιο επιρρεπή στην ανοσοχημειοθεραπεία. Ωστόσο, οι σχετικές κλινικές μελέτες βρίσκονται σε αρχική φάση και τ' αποτελέσματά τους είναι αμφιλεγόμενα.

Η διαφαινόμενη σχέση μεταξύ άλλο-αντιδραστικότητας (εναντίον παθογόνων μικροβίων), αυτοαντιδραστικότητας και ΧΛΛ υποδηλώνει την ανάγκη μελέτης όχι μόνο των υποδοχέων BCR αλλά επίσης και των υποδοχέων της έμφυτης ανοσίας για την εξαγωγή αξιόπιστων ενδείξεων αναφορικά με τη φύση των αντιγόνων που διεγείρουν τα κλωνογενή λευχαιμικά κύτταρα.

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι ο χαρακτηρισμός του ρεπερτορίου και του προτύπου έκφρασης των υποδοχέων TLR στα Β λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ καθώς επίσης και η ανίχνευση του επιπέδου έκφρασης μορίων που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι καθοδικά των υποδοχέων. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ομάδα 192 ασθενών με ΧΛΛ με σκοπό:

- τη συσχέτιση προτύπων έκφρασης TLR και BCR στη ΧΛΛ
- την αναζήτηση «στερεοτυπίας» ως προς το ρεπερτόριο των υποδοχέων TLR σε ασθενείς με «στερεότυπους» υποδοχείς BCR
- τη διερεύνηση πιθανής προγνωστικής σημασίας ειδικών προτύπων έκφρασης TLR στη ΧΛΛ.

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 Ομάδα Μελέτης

Η ομάδα μελέτης περιλάμβανε 192 ασθενείς με τυπική χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (CD5⁺, CD19⁺, CD20⁺, CD23⁺) οι οποίοι παρακολουθούνται στο Αιματολογικό Τμήμα του ΓΚΝ Νίκαιας Πειραιά «Άγ.Παντελεήμων» και την Αιματολογική Κλινική του ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου». Η διάγνωση έγινε σύμφωνα με τα κριτήρια του NCI (National Cancer Institute).(161) Εκατόν δέκα τρεις ασθενείς ήταν άνδρες και 79 γυναίκες με μέση ηλικία κατά τη διάγνωση τα 68 έτη (εύρος, 39-86 έτη). Εκατόν σαράντα εννέα από τους 165 ασθενείς με διαθέσιμα κλινικά στοιχεία ήταν σταδίου A, 12 σταδίου B και 4 σταδίου C κατά Binet. Είκοσι έξι από τους 169 ασθενείς εξέφραζαν IgG ανοσοσφαιρίνη και 143 IgM/IgMD. Με όριο θετικότητας το 7%, 57/177 ασθενείς με διαθέσιμα δεδομένα εξέφραζαν CD38.

3.2 Υλικά και μέθοδοι

3.2.1 Μελέτη κλωνικών αναδιατάξεων των γονιδίων της μεταβλητής περιοχής της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών

3.2.1.1 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από δείγμα περιφερικού αίματος

Η απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων από το αίμα έγινε μετά από διαχωρισμό με φυγοκέντρηση σε βαθμίδωση πυκνότητας, με χρήση του αντιδραστηρίου φικόλλη (Ficoll-Hypaque).

3.2.1.2 Απομόνωση RNA - Σύνθεση cDNA

Η απομόνωση του ολικού RNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του θειοκυανικού γουανιδινίου. Η σύνθεση του cDNA έγινε με αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription, RT) in vitro χρησιμοποιώντας ως εκκινητές εξανουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας (random hexamers, RH). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 40 μl (Πίνακας 1). Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ήταν η αντίστροφη μεταγραφάση SuperScript II (SS II, Invitrogen, Paisley, UK) με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα 5x (RT buffer), τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs) και αναστολέα RNAσών (RNAaseOUT, Invitrogen, Paisley, UK). Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν 2μg RNA. Το διάλυμα RNA, H₂O, RH, RNAaseOUT αρχικά

θερμάνθηκε στους 65°C για 5min με στόχο την αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών του RNA και στη συνέχεια μεταφέρθηκε στους 4°C για 5min. Στο αρχικό διάλυμα προστέθηκαν RT buffer, dNTPs και αντίστροφη μεταγραφή SS II.

Πίνακας 2. Αντιδραστήρια για την αντίδραση σύνθεσης cDNA

Αντιδραστήρια	Όγκοι
RNA	2μg
RT buffer (5X)	8μl
RNAaseOUT (40U/μl)	2μl
dNTPs(10mM)	4μl
RH (3μg/μl)	2μl
SS II RT(200U/μl)	2μl
ddH ₂ O	μέχρι τελικό όγκο 40μl
Τελικός όγκος	40μl

Συνθήκες αντίδρασης:

- Σύνθεση cDNA: 42°C, 60min
- Αδρανοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης: 94°C, 3min
- Προσθήκη 60μl H₂O για τελικό όγκο 100μl.

Το ενδεχόμενο ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων από αδυναμία ενίσχυσης του RNA αποκλείστηκε με ενίσχυση αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε μετάγραφα γονιδίων τα οποία εκφράζονται πάντοτε στον υπό ανάλυση ιστό (μετάγραφα “αναφοράς”). Στην παρούσα μελέτη, ως μετάγραφο “αναφοράς” χρησιμοποιήθηκε το mRNA του γονιδίου RARα (Retinoic Acid Receptor α) το οποίο κωδικοποιεί έναν από τους υποδοχείς του ρετινοϊκού οξέος. 5μl του προϊόντος cDNA ενισχύθηκαν με PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές (RAR6: 5'-GGTGCCTCCCTACGCCTTCT-3' και RAR8: 5'-GGCGCTGACCCCATAGTGGT-3') ειδικούς για τις αλληλουχίες του RARα μεταγράφου (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Αντιδραστήρια για την αντίδραση ενίσχυσης του γονιδίου RARα

Αντιδραστήρια	Όγκοι
cDNA	3μl
RBX10	5μl
MgCl ₂ (50mM)	1,5μl
dNTPs (10mM)	1μl
RAR6 (10pm/μl)	2,5μl
RAR8 (10pm/μl)	2,5μl
Taq πολυμεράση (5U/μl)	0,5μl
ddH ₂ O	34μl
Τελικός όγκος	50μl

Συνθήκες αντίδρασης:

- αρχική αποδιάταξη: 94°C, 5min
- κυρίως αντίδραση: διεξήχθη σε 40 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλάμβανε:
 - φάση αποδιάταξης: 94°C, 1min
 - φάση σύνδεσης εκκινητών: 53°C, 1min
 - φάση επέκτασης μορίων DNA: 72°C, 1min και 30sec
- τελική επέκταση συντεθειμένων μορίων DNA: 72°C, 10min

3.2.1.3 Ενίσχυση κλωνικών αναδιατάξεων των γονιδίων IGHV-IGHD-IGHJ με RT-PCR

Κλωνικές αναδιατάξεις της μεταβλητής περιοχής της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών ενισχύθηκαν με την τεχνική RT-PCR. Για την ενίσχυση των κλωνικών αναδιατάξεων χρησιμοποιήθηκε μείγμα συναινετικών εκκινητών (consensus primers) αντιπροσωπευτικών για καθεμία από τις έξι υποομάδες γονιδίων οδηγών IGHV (VHL1-6: Leader primers) ή εναλλακτικά, αντιπροσωπευτικών της περιοχής FR1 των γονιδίων IGHV (VH1-6: FR1 primers) σε συνδυασμό με εκκινητές αντιπροσωπευτικούς και των 6 γονιδίων IGHJ (JH1-6) (Πίνακες 4,5).

Πίνακας 4. Αντιδραστήρια για την αντίδραση ενίσχυσης των αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ

Αντιδραστήρια	Όγκοι
cDNA	5μl
RBX10	10μl
MgCl ₂ (1,5mM)	3μl
dNTPs (10mM)	2μl
Μείγμα εκκινητών VHL 1-6 ή VH 1-6 (10pm/μl έκαστος)	6μl
Μείγμα εκκινητών JH1-6 (10pm/μl έκαστος)	6μl
Taq πολυμεράση(5U/μl)	0,5μl
ddH ₂ O	67,5μl
Τελικός όγκος	100μl

Πίνακας 5. Αλληλουχίες εκκινητών για την ενίσχυση των αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ

Εκκινητής	Αλληλουχία
VHL1	5'-AAATCGATACCACCATGGACTGGACCTGGAGG-3'
VHL1b	5'-AAATCGATACCACCATGGACTGGACCTGGAG (C/A)-3'
VHL2a	5'-AAATCGATACCACCATGGACACACTTTGCT (A/C) AC-3'
VHL2b	5'-AAATCGATACCACCATGGACATACTTTGTTCCAC-3'
VHL3a	5'-AAATCGATACCACCATGGAGTTTGGGCTGAGC-3'
VHL3b	5'-AAATCGATACCACCATGGA(A/G)(C/T)T(G/T)(G/T)G(G/A)CT(G/C/T)(A/C/T)GC-3'
VHL4	5'-AAATCGATACCACCATGAAACACCTGTGGTTCTT-3'
VHL5	5'-AAATCGATACCACCATGGGGTCAACCGCCATC-3'
VHL6	5'-AAATCGATACCACCATGTCTGTCTCCTTCCTC-3'
VH1	5'-CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG-3'
VH2	5'-CAGGTCAACTTAAGGGAGTCTGG -3'
VH3	5'-GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG -3'
VH4	5'-CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGG-3'
VH5	5'-GAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGC-3'
VH6	5'-CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGG-3'
JH1-2	5'-TGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCC-3'
JH3	5'-TGAAGAGACGGTGACCATTTGTCCC-3'
JH4-5	5'-TGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCC-3'
JH6	5'-TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCC-3'

Συνθήκες αντίδρασης:

-αρχική αποδιάταξη: 94⁰C, 5min

-κυρίως αντίδραση: διεξήχθη σε 40 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλάμβανε:

 φάση αποδιάταξης: 94⁰C, 1min

 φάση σύνδεσης εκκινητών: 59⁰C, 1min

 φάση επέκτασης μορίων DNA: 72⁰C, 1 min

-τελική επέκταση συντεθειμένων μορίων DNA: 72⁰C, 10min

3.2.1.4 Καθαρισμός των προϊόντων RT-PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων PCR από 3% πηκτή αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης πραγματοποιήθηκε με το QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany).

3.2.1.5 Ανάλυση της αλληλουχίας των προϊόντων RT-PCR

Πραγματοποιήθηκε άμεση ανάλυση της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων και των δύο αλυσίδων των καθαρισμένων προϊόντων RT-PCR με τη μέθοδο τερματισμού των νεοσυνθετιμένων αλυσίδων DNA με διδεοξυριβονουκλεοτίδια (μέθοδος Sanger) σε αυτόματο αναλυτή (CEQ 8000 Genetic Analysis System της Beckman-Coulter). Για την ανάλυση του αντισυνθετικού (3'→5', antisense) κλώνου χρησιμοποιήθηκαν συναινετικά ολιγονουκλεοτίδια, συμπληρωματικά με τις αλληλουχίες των γονιδίων IGHJ, ενώ για την ανάλυση του κωδικού κλώνου χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί για την αλληλουχία εκκινητές, οι οποίοι σχεδιάστηκαν με βάση την αλληλουχία που προέκυψε από το πρώτο διάβασμα (αλληλουχία αντισυνθετικού κλώνου). Κάθε αντίδραση επαναλήφθηκε τουλάχιστον τρεις φορές σε προϊόντα PCR τριών ανεξάρτητων αντιδράσεων ενίσχυσης που είχαν πραγματοποιηθεί σε διαφορετικές ημέρες.

Η προετοιμασία των δειγμάτων για την αντίδραση ανάλυσης της αλληλουχίας των προϊόντων PCR έγινε με τη βοήθεια του Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit της Beckman Coulter. Το kit περιέχει το DTCS Quick Start Master Mix, το Sample Loading Solution, γλυκογόνο (20mg/ml) και το ευθυγραμμισμένο πλασμίδιο pUC18 (0,25μg/μl) με τον εκκινητή M13-47 (1,6pmol/μl) ως θετικό μάρτυρα για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης.

Διαδικασία

α. Αρχική αντίδραση

Η αρχική αντίδραση περιλάμβανε το καθαρισμένο προϊόν PCR, DTCS Quick Start Master Mix, κατάλληλο εκκινητή (primer) και ddH₂O (Πίνακας 6).

Πίνακας 6. Αντιδραστήρια για την αντίδραση ανάλυσης της αλληλουχίας προϊόντων PCR

Αντιδραστήρια	Όγκοι
DNA προϊόντων PCR	26-33ng
Εκκινητής	2μl
Quick Start master mix	8μl
ddH ₂ O	μέχρι τελικό όγκο 20μl
Τελικός όγκος	20μl

Συνθήκες αντίδρασης:

Η αντίδραση σύνθεσης διεξήχθη σε 30 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλάμβανε:

- φάση αποδιάταξης: 96°C, 20sec
- φάση σύνδεσης εκκινητών: 50°C, 20sec
- φάση επέκτασης μορίων DNA: 60°C, 4min

Παράλληλα για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης ενισχύθηκε σε ανεξάρτητη αντίδραση το ευθυγραμμισμένο πλασμίδιο pUC18. Η αρχική αντίδραση περιλάμβανε το DNA του pUC18, Quick Start Master Mix, κατάλληλο εκκινητή ο οποίος παρέχεται από το kit και ddH₂O (Πίνακας 7).

Πίνακας 7. Αντιδραστήρια για την αντίδραση ανάλυσης της αλληλουχίας του pUC18

Αντιδραστήρια	Όγκοι
pUC18 DNA(0,25μg/μl)	0,5μl
Εκκινητής (sequencing primer, 1,6pmol/μl)	2μl
Quick Start master mix	8μl
ddH ₂ O	9,5μl
Τελικός όγκος	20μl

Συνθήκες αντίδρασης:

- αρχική αποδιάταξη δευτεροταγών δομών: 96°C, 1min
- αντίδραση σύνθεσης: διεξήχθη σε 30 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλάμβανε:
 - φάση αποδιάταξης: 96°C, 20sec
 - φάση σύνδεσης εκκινητών: 50°C, 20sec
 - φάση επέκτασης μορίων DNA: 60°C, 4min

β. Καθαρισμός προϊόντος αρχικής αντίδρασης

1. Αμέσως μετά την ολοκλήρωση της αρχικής αντίδρασης σύνθεσης σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 5μl από το διάλυμα διακοπής της αντίδρασης (stop solution). Το stop solution περιέχει 2μl διαλύματος 3M οξικού νατρίου (pH 5,2), 2μl διαλύματος 100mM Na₂-EDTA (pH 8,0) και 1μl γλυκογόνο (20mg/ml) ανά αντίδραση.
2. Ακολούθησε προσθήκη 60μl αιθανόλης 95% από την κατάψυξη, ανάδευση και φυγοκέντρηση σε 14000rpm στους 4°C για 15min.
3. Προσεκτική αφαίρεση του υπερκείμενου με πιπέττα.
4. Πλύσιμο του ιζήματος με 200μl αιθανόλης 70% από την κατάψυξη, φυγοκέντρηση σε 14000rpm στους 4°C για 2min και προσεκτική αφαίρεση του υπερκείμενου με πιπέττα.

5. Επανάληψη του πλυσίματος και προσεκτική αφαίρεση του υπερκείμενου με πιπέττα.
6. Στέγνωμα του ιζήματος.
7. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 40μl Sample Loading Solution.
8. Ανάλυση της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων σε αυτόματο αναλυτή (CEQ 8000, Genetic Analysis System της Beckman-Coulter).

3.2.1.6 Ανάλυση της κατανομής των μεταλλάξεων στα γονίδια IGHV

Οι αλληλουχίες των γονιδίων που προέκυψαν μελετήθηκαν και συγκρίθηκαν με τη χρήση του αλγορίθμου του προγράμματος V-QUEST με τις πιο συγγενείς, μη αναδιαταγμένες αλληλουχίες των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών που έχουν καταχωρηθεί στη βάση δεδομένων ανοσογενετικής IMGT (international ImMunoGeneTics database, <http://imgt.cines.fr>). Υπολογίστηκε η νουκλεοτιδική ταυτότητα κάθε αναδιαταγμένου γονιδίου με το αντίστοιχο μη αναδιαταγμένο γονίδιο (germline gene).(161, 162)

1.Ονοματολογία

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ονοματολογίας της IMGT (ονοματολογία εγκεκριμένη από το HUGO, Human Genome Organization, 1999) για τα γονιδιακά τμήματα IGHV, IGHD και IGHJ. Το σύστημα ονοματολογίας IMGT/HUGO εκτός από το όνομα κάθε γονιδίου παρέχει και πληροφορίες για τον αριθμό των αλληλομόρφων και τη λειτουργικότητα του κάθε γονιδίου (ως λειτουργικά ορίζονται τα γονίδια με ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης χωρίς κωδικόνιο τερματισμού, που διαθέτουν λειτουργικά ρυθμιστικά στοιχεία, αλληλουχίες RSS ή αλληλουχίες συρραφής), όπως και τους αριθμούς πρόσβασης των αλληλουχιών αναφοράς (reference sequences) και τον κωδικό πρόσβασης ID στις βάσεις δεδομένων Genome Database GDB και NCBI LocusLink, όπου έχουν κατατεθεί οι αλληλουχίες όλων των γονιδίων IGH στον άνθρωπο.

2. Αρχές ταξινόμησης και ονοματολογίας

Το όνομα κάθε γονιδίου συντίθεται από τέσσερα μέρη:

- Γενετικός τύπος: ορίζεται ως IGH για τη βαριά και IGK/IGL για την κ/λ ελαφριά αλυσίδα των ανοσοσφαιρινών.
- Ομάδα: δηλώνει τον τύπο του γονιδίου (V, D, J ή C) π.χ. IGHV, IGKV, IGLV
- Υποομάδα: δηλώνει μια οικογένεια γονιδίων που ανήκουν στην ίδια ομάδα και έχουν ελάχιστη ταυτότητα 75%. (π.χ. IGHV1, IGKV3, IGLV4)

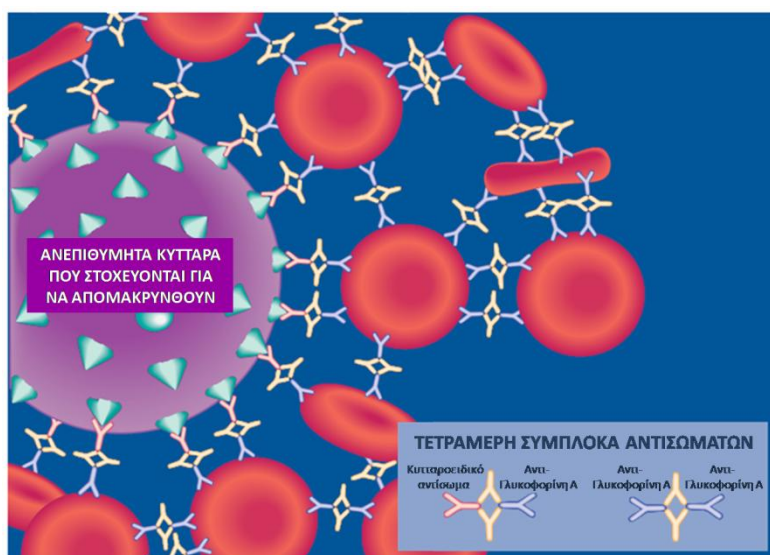
- Γονίδιο: ένας αριθμός προστίθεται για να ορίσει την αλληλουχία ενός γονιδίου (πχ.IGHV1-69)
- Αλληλόμορφο: για κάθε γονίδιο έχουν βρεθεί πολυμορφισμοί σε επίπεδο αλληλουχίας. Οι αλληλουχίες αυτές συγκρίνονται με την αλληλουχία αναφοράς.

3.2.2 Μελέτη γονιδιακής έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στην σηματοδοτική οδό των TLRs με τη χρήση των συστοιχιών PCR

3.2.2.1 Απομόνωση CD19⁺ λεμφοκυττάρων από δείγμα περιφερικού αίματος

Για την απομόνωση των CD19⁺ λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήθηκε το Human B-cell enrichment cocktail kit (*Rossette Sep. StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada*), σε δείγματα περιφερικού αίματος που είχαν ληφθεί με αντιπηκτικό EDTA. Το kit περιλαμβάνει μίγμα από μονοκλωνικά αντισώματα (anti-CD2, CD3, CD16, CD36, CD56, CD66b) και γλυκοφρίνης A που σχηματίζουν τετραμερή και συνδέουν τα μη επιθυμητά λευκοκύτταρα με τα ερυθροκύτταρα με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό ανοσο-ροζετών (Εικόνα 11).

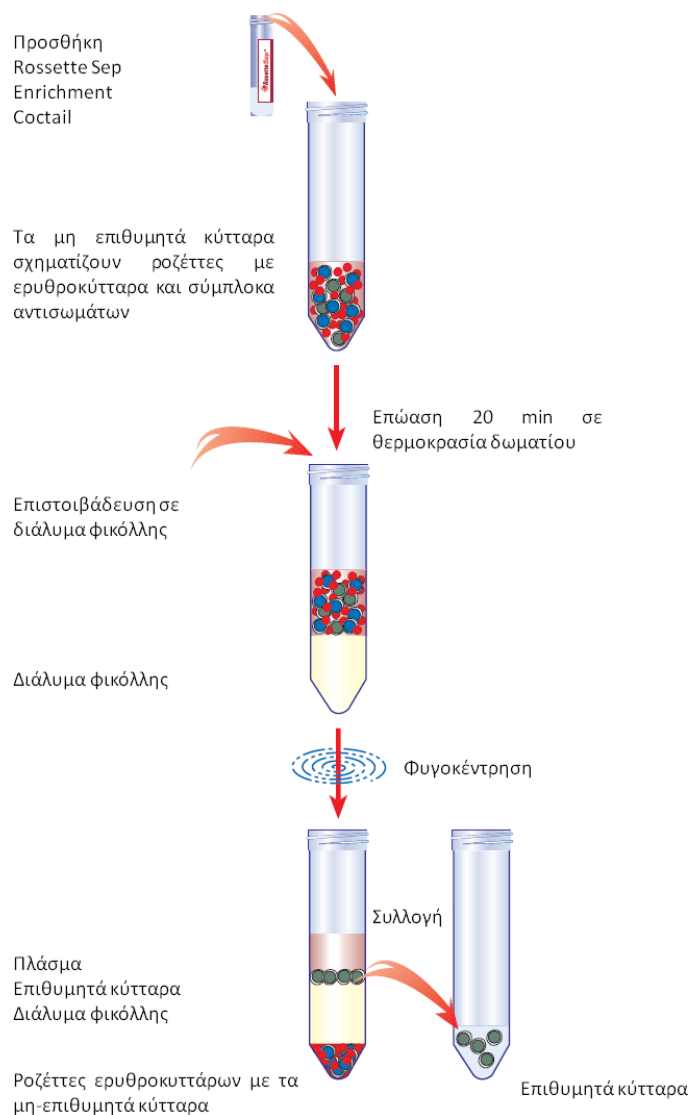
Οι ανοσο-ροζέττες στη συνέχεια καθιζάνουν μετά από φυγοκέντρηση σε βαθμίδωση πυκνότητας με τη χρήση Ficoll-Paque™ PLUS, ενώ τα B λεμφοκύτταρα (CD19⁺ κύτταρα) που δε συνδέονται με το μίγμα των αντισωμάτων, συλλέγονται από τη στοιβάδα μεταξύ του πλάσματος και της φικόλλης (Εικόνα 12). Έτσι επιτυγχάνεται αρνητική επιλογή των B λεμφοκυττάρων. Η συγκέντρωση των CD19⁺ λεμφοκυττάρων στο τελικό εναιώρημα προσδιορίζεται με κυτταρομετρητή ροής.



Εικόνα 11 - Σχηματική απεικόνιση αρνητικής επιλογής επιθυμητού πληθυσμού με τη μέθοδο σχηματισμού ροζετών. Τα μη επιθυμητά κύτταρα σχηματίζουν ροζέττες με τα ερυθροκύτταρα με τη βοήθεια συμπλόκων τετραμερών αντισωμάτων και καθιζάνουν.

Διαδικασία

1. Προσθήκη 50μl RosetteSep® Human B Cell Enrichment Cocktail για κάθε ml ολικού αίματος. Ήπια ανάδευση
2. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min
3. Προσθήκη ίσου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος [Phosphate buffered saline (PBS + 2% Fetal bovine serum (FBS))]. Ήπια ανάδευση
4. Επιστοιβάδευση σε Ficoll-Paque™ PLUS πυκνότητας 1.077 g/ml με ιδιαίτερη προσοχή ώστε να εξασφαλίζεται ότι δεν υπάρχει ανάμειξη του μέσου επιστοιβάδευσης με το δείγμα.
5. Φυγοκέντρηση σε 2400rpm επί 20min σε θερμοκρασία δωματίου. Συλλογή των επιθυμητών κυττάρων (στοιβάδα που βρίσκεται μεταξύ πλάσματος και Ficoll-Paque™ PLUS)
6. Προσθήκη 10ml διαλύματος PBS + 2% FBS. Φυγοκέντρηση του δείγματος μετά από ήπια ανακίνηση σε 2400rpm για 15min σε θερμοκρασία δωματίου
7. Απόρριψη υπερκείμενου
8. Επαναιώριση των κυττάρων και επανάληψη σταδίων 6 και 7
9. Απόρριψη υπερκείμενου και επαναιώριση των κυττάρων σε 1ml διαλύματος PBS.
10. Μέτρηση των κυττάρων σε αυτόματο αιματολογικό αναλυτή και των CD19+ λεμφοκυττάρων με κυτταρομετρητή ροής FACScan.
11. Μεταφορά 1×10^7 κυττάρων σε σωληνάριο erppendorf των 2 ml για απομόνωση RNA και $1,5 \times 10^7$ κυττάρων για απομόνωση πρωτεϊνών.



Εικόνα 12 - Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας απομόνωσης B λεμφοκυττάρων με το Human B-cell Enrichment Kit.

3.2.2.2 Απομόνωση ολικού RNA από CD19⁺ λεμφοκύτταρα

Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με το RNA easy mini kit της Qiagen (QIAGEN, Hilden, Germany). Η μεθοδολογία συνδυάζει την επιλεκτική δεσμευτική ικανότητα μιας μεμβράνης με διοξείδιο του πυριτίου με την ταχύτητα που παρέχει η μικροφυγοκέντρηση. Ένα σύστημα διαλυμάτων με υψηλή συγκέντρωση αλάτων επιτρέπει τη δέσμευση έως 100 µg RNA μεγέθους μεγαλύτερου των 200 βάσεων στη μεμβράνη των στηλών που χρησιμοποιούνται.

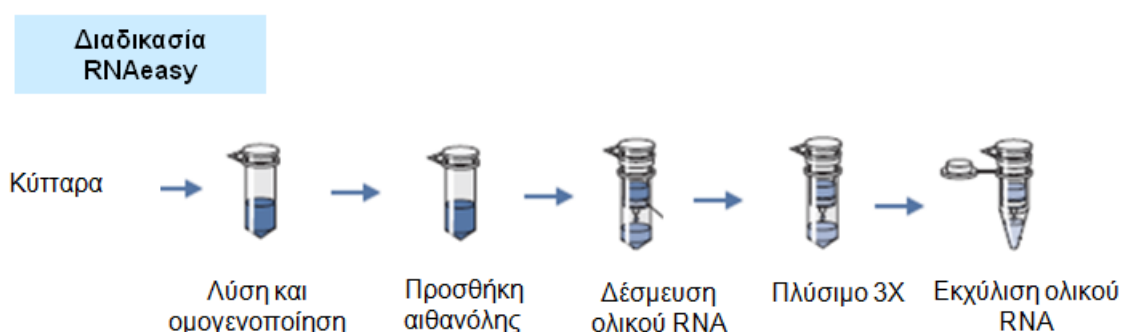
Μέσω της διαδικασίας απομονώνονται όλα τα μόρια RNA με μέγεθος μεγαλύτερο από 200 νουκλεοτίδια. Η διαδικασία εξασφαλίζει την εκχύλιση του mRNA καθώς τα περισσότερα RNAs με μέγεθος μικρότερο των 200 νουκλεοτιδίων (όπως τα 5.8S rRNA, 5S rRNA, και τα tRNAs, που μαζί συνιστούν 15–20% του ολικού RNA) αποκλείονται επιλεκτικά.

Στο kit περιλαμβάνονται το διάλυμα RLT, που χρησιμοποιείται για τη λύση των κυττάρων και περιέχει άλατα γουανιδίνης και τα διαλύματα RW1 και RPE που χρησιμοποιούνται για το πλύσιμο του δεσμευμένου στη μεμβράνη της στήλης RNA και περιέχουν αιθανόλη.

Διαδικασία

1. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1900rpm, 1×10^7 CD19⁺ λεμφοκυττάρων που απομονώθηκαν κατάλληλα όπως αναφέρεται στην Ενότητα 3.2.2.1. Αφαίρεση υπερκείμενου με μεγάλη προσοχή.
2. Επαναιώρηση των κυττάρων σε 600μl διαλύματος RLT, στο οποίο έχει προστεθεί β-μερκαπτοαιθανόλη (β-ME) (10 μl β-ME ανά 1 ml RLT διαλύματος) με στόχο την αδρανοποίηση των RNAsών. Η ομογενοποίηση γίνεται με τη χρήση σύριγγας και βελόνας καθώς το εναιώρημα διέρχεται τουλάχιστον 5 φορές από μια βελόνα διαμέτρου 21G που έχει προσαρμοστεί κατάλληλα σε σύριγγα απαλλαγμένη από RNάσες.
3. Προσθήκη ίσου όγκου αιθανόλης 70% στο ομογενοποιημένο εναιώρημα και καλή ανάμιξη με τη χρήση πιπέττας.
4. Μεταφορά 700μl του δείγματος στην στήλη. Φυγοκέντρηση για 15 sec στις 10.000 rpm στους 20°C. Απόρριψη του δείγματος που διαπερνά τη στήλη. Επανάληψη της διαδικασίας για τον υπόλοιπο όγκο του δείγματος.
5. Προσθήκη 350μl διαλύματος RW1 στη στήλη. Φυγοκέντρηση για 15 sec στις 10.000 rpm στους 20°C. Απόρριψη του δείγματος που διαπερνά τη στήλη.
6. Προετοιμασία του διαλύματος DNάσης (QIAGEN, Hilden, Germany). Για καθένα από τα δείγματα παρασκευάζεται ένα διάλυμα που περιέχει 10μl DNάσης και 70μl του διαλύματος RDD. Λόγω της ευαισθησίας της DNάσης στη φυσική αποδιάταξη η ανάμιξη πραγματοποιείται με ήπια ανάδευση με την πιπέττα. Τα 80μl του διαλύματος προστίθενται στη στήλη καθενός από τα δείγματα και ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση στους 20-30°C για 30 λεπτά, με στόχο την απομάκρυνση προσμίξεων από γενωμικό DNA (gDNA).
7. Προσθήκη 350μl διαλύματος RW1 στη στήλη. Φυγοκέντρηση για 15 sec στις 10.000 rpm στους 20°C. Απόρριψη του δείγματος που διαπερνά τη στήλη.

8. Προσθήκη 500 μl διαλύματος RPE στη στήλη. Φυγοκέντρωση για 15 sec στις 10.000 rpm στους 20°C. Απορρίψη του δείγματος που διαπερνά τη στήλη και προσεκτική απομάκρυνση αυτής ώστε να μην έρθει σε επαφή με την αιθανόλη του διαλύματος που απορρίπτεται.
9. Η στήλη τοποθετείται σε ένα νέο φιαλίδιο συλλογής και πραγματοποιείται φυγοκέντρωση για 1 min στις 13.000 rpm στους 20°C. Με αυτόν τον τρόπο απομακρύνεται πλήρως το διάλυμα RPE που ενδεχομένως παρέμενε στην στήλη μετά το προηγούμενο βήμα της διαδικασίας.
10. Η στήλη τοποθετείται σε σωληνάριο errendorff των 1,5ml. Προσθήκη 30μl H₂O απαλλαγμένου από RNάσες στη στήλη. Αναμονή για 5 min και φυγοκέντρωση για 1 min στις 10.000 rpm στους 20°C, για την εκχύλιση του RNA.
11. Ακολουθεί φωτομέτρηση του δείγματος στα 230nm, 260nm και 280nm για να διαπιστωθεί τόσο η ποιότητα όσο και η ποσότητα RNA.
12. Αποθήκευση εκχυλίσματος στους -80°C.



Εικόνα 13 - Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας απομόνωσης ολικού RNA με το RNAeasy kit.

3.2.2.3 Σύνθεση cDNA

Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιήθηκε με αντίστροφη μεταγραφή *in vitro* με τη χρήση του RT² First Strand Kit (SABiosciences, USA). Το kit περιλαμβάνει ρυθμιστικό διάλυμα για την απομάκρυνση του gDNA (GE: 5X gDNA elimination buffer), αντίστροφη μεταγραφάση (RE3: RT Enzyme mix 3), ρυθμιστικό διάλυμα της αντίστροφης μεταγραφάσης (BC3: 5X Reverse transcription buffer), μίγμα εκκινητών (P2: εκκινητές και εξωτερικό μάρτυρα που επιτρέπει τον εξωτερικό ποιοτικό έλεγχο της σύνθεσης cDNA) και ddH₂O απαλλαγμένο από RNάσες. Χρησιμοποιήθηκε 1μg

Πίνακας 9. Αντιδραστήρια για την αντίδραση ενίσχυσης του γονιδίου της β-αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης

Αντιδραστήρια	Όγκοι
cDNA	3μl
RBx10	5μl
MgCl ₂ (50mM)	2,5μl
dNTPs (10mM)	1,5μl
A2 (10pmol/μl)	3μl
A10 (10pmol/μl)	3μl
Taq πολυμεράση (5U/μl)	0,4μl
ddH ₂ O	31,6μl
Τελικός όγκος	50μl

Συνθήκες αντίδρασης:

- αρχική αποδιάταξη: 94⁰C, 5min
- κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 40 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
 - φάση αποδιάταξης: 94⁰C, 1min
 - φάση σύνδεσης εκκινητών: 55⁰C, 1min και 30sec
 - φάση επέκτασης μορίων DNA: 72⁰C, 2 min
- τελική επέκταση συντεθειμένων μορίων DNA: 72⁰C, 4min

3.2.2.4 Συστοιχίες PCR (PCR Arrays)

Η μέθοδος συνδυάζει τα πλεονεκτήματα της ποσοτικής σε πραγματικό χρόνο PCR με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I (Real Time Quantitative PCR, RQ-PCR) με τη δυνατότητα των μικροσυστοιχιών για ταυτόχρονη ανάλυση πολλών γονιδίων.

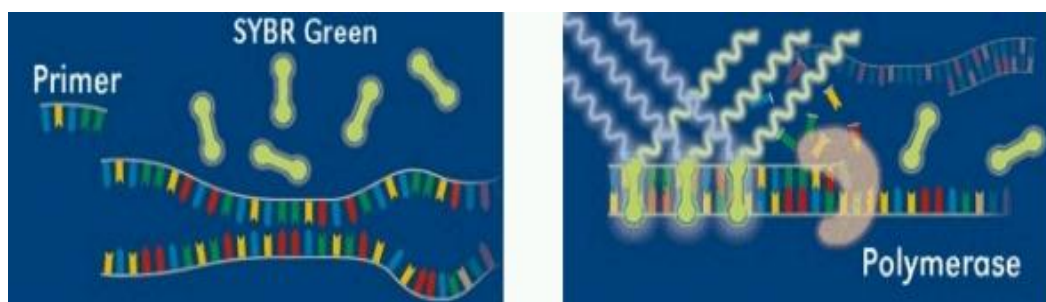
3.2.2.4.1 Ποσοτική σε πραγματικό χρόνο PCR

Η ποσοτική σε πραγματικό χρόνο PCR (RQ-PCR) είναι τεχνική ποσοτικού προσδιορισμού των προϊόντων PCR σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Βασίζεται στην ενεργότητα 5΄νουκλεάσης της Taq πολυμεράσης και στη σύνδεση του προϊόντος PCR με φθορισμόχρωμα σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Ανάλογα με το είδος του φθορίζοντος ανιχνευτή που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση έχουν αναπτυχθεί πολλά διαφορετικά πρωτόκολλα RQ-PCR. Σήμερα χρησιμοποιούνται κυρίως τρία πρωτόκολλα RQ-PCR: η ανάλυση με τη χρωστική SYBR Green I, η ανάλυση με ανιχνευτές υδρόλυσης και τέλος, η ανάλυση με ανιχνευτές υβριδισμού. Η αντίδραση

πραγματοποιείται σε ειδικό θερμοκυκλοποιητή που φέρει ανιχνευτή φθορισμού και συνδέεται με υπολογιστικό σύστημα με κατάλληλο πρόγραμμα.

Η ένταση φθορισμού προσδιορίζεται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης και είναι ανάλογη της ποσότητας του προϊόντος PCR σε κάθε κύκλο. Η ένταση αυξάνει εκθετικά κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης. Με βάση την ένταση του φθορισμού χωρίς ειδικότητα, το φθορισμό δηλαδή που προέρχεται από το περιβάλλον (background), καθορίζεται το διαχωριστικό σημείο ή ουδός (cut-off level) για τον ειδικό φθορισμό που προέρχεται αποκλειστικά από το προϊόν της αντίδρασης. Αυτό το όριο (ή γραμμή μετάπτωσης) χρησιμοποιείται για να υπολογιστεί ο κύκλος μετάπτωσης (Threshold Cycle, Ct) κάθε δείγματος, που είναι ο κύκλος της αντίδρασης PCR στον οποίο ο φθορισμός υπερβαίνει για πρώτη φορά τον ουδό μετάβασης. Ο κύκλος μετάπτωσης είναι αντιστρόφως ανάλογος προς το ποσό της αλληλουχίας-στόχου που περιέχεται στο δείγμα. Μεγαλύτερες τιμές Ct είναι ενδεικτικές μικρότερης έκφρασης του προς μελέτη γονιδίου, καθώς χρειάζεται μεγαλύτερη ενίσχυση έως ότου το προϊόν καταστεί ανιχνεύσιμο.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η χρωστική SYBR Green I που προσδένεται στη μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA κι ενισχύει πολύ το φθορισμό του (Εικόνα 14). Το σήμα φθορισμού αυξάνει σταδιακά κατά τη φάση επιμήκυνσης, γίνεται μέγιστο στο τέλος κάθε αντίστοιχης φάσης και μειώνεται ή εκλείπει κατά τη φάση της αποδιάταξης. Με δεδομένο ότι η τεχνική δεν είναι απόλυτα ειδική και ότι ταυτόχρονα μπορεί ν' ανιχνεύονται τόσο διμερή των εκκινητών όσο και μη ειδικά προϊόντα PCR, για την αξιολόγηση της έντασης φθορισμού ελέγχεται πάντα η καμπύλη τήξης (melting curve) του προϊόντος της αντίδρασης. Αξιολογούνται μόνο οι αντιδράσεις στις οποίες είναι ορατή μόνο μια κορυφή στην καμπύλη τήξης.



Εικόνα 14 - Ανάλυση RQ-PCR με την χρήση της χρωστικής SYBR Green I

Για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου χρησιμοποιούνται δύο κύριοι τύποι ποσοτικοποίησης: η «σχετική» και η «απόλυτη» ποσοτικοποίηση.(163) Η «απόλυτη» ποσοτικοποίηση βασίζεται στην κατασκευή

πρότυπης καμπύλης (standard curve) με υποδεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις γνωστών δειγμάτων, συνήθως πλασμιδιακού DNA που φέρει το γονίδιο που μας ενδιαφέρει.(163) Η θεωρητική κλίση (slope) της πρότυπης καμπύλης είναι -3,32 για μια αντίδραση PCR με τη μέγιστη αποδοτικότητα (efficiency). Στη «σχετική» ποσοτικοποίηση ενισχύεται παράλληλα με το γονίδιο στόχο (gene of interest, GOI) και ένα γονίδιο αναφοράς και το αποτέλεσμα εκφράζεται συγκριτικά με το γονίδιο αναφοράς. Ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιούνται γονίδια που εκφράζονται σταθερά σε όλα τα κύτταρα (φυσιολογικά και νεοπλασματικά), δεν επηρεάζονται από τυχόν θεραπευτική αγωγή και δε σχετίζονται με ψευδογονίδια. Ως καταλληλότερα γονίδια αναφοράς θεωρούνται τα ιδιοσυστατικά (housekeeping genes, HKG). Για τη «σχετική» ποσοτικοποίηση χρησιμοποιείται είτε η μέθοδος του $2^{-\Delta\Delta Ct}$ κατά την οποία αξιολογείται ο Ct του γονιδίου στόχου και του γονιδίου αναφοράς είτε δημιουργούνται δύο πρότυπες καμπύλες (μία για το γονίδιο αναφοράς και μία για το γονίδιο στόχο) και το αποτέλεσμα εκφράζεται ως αναλογία έκφρασης του γονιδίου στόχου προς το γονίδιο αναφοράς.(164) Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν πέντε γονίδια αναφοράς και για την ανάλυση των αποτελεσμάτων αξιοποιήθηκε ο αλγόριθμος του $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.2.2.4.2 Αξιολόγηση αποτελεσμάτων με τη μεθοδολογία του $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της RQ-PCR με τη μεθοδολογία του $2^{-\Delta\Delta Ct}$ χρησιμοποιείται ο Ct του γονιδίου στόχου και των γονιδίων αναφοράς.

Οι τιμές Ct που παρέχονται από τα όργανα της RQ-PCR εισάγονται σε ένα (λογιστικό) φύλλο εργασίας, όπως το Microsoft Excel, και αρχικά υπολογίζεται η μέση τιμή των Ct των γονιδίων αναφοράς. Ακολουθεί ο υπολογισμός του ΔCt από την εξίσωση: $\Delta Ct = (Ct \text{ κάθε γονιδίου}, Ct_{GOI}) - (\text{Μέση τιμή των } Ct \text{ των γονιδίων αναφοράς}, Ct_{AVG \text{ HKG}})$.

Η ποσοτικοποίηση των σχετικών αλλαγών στην έκφραση γονιδίων μεταξύ διαφορετικών ομάδων καθίσταται εφικτή με τον υπολογισμό της εξίσωσης του $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Για τον υπολογισμό αυτό μεταξύ λ.χ. δύο ομάδων ασθενών πρώτα υπολογίζεται η τιμή του $\Delta\Delta Ct$ ($\Delta\Delta Ct = \text{μέση τιμή } \Delta Ct \text{ του υπό μελέτη γονιδίου στην πρώτη ομάδα ασθενών} - \text{μέση τιμή } \Delta Ct \text{ του ίδιου γονιδίου στη δεύτερη ομάδα ασθενών}$) και στη συνέχεια το $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Από το $2^{-\Delta\Delta Ct}$ υπολογίζεται η διαφορά έκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου στις δύο υποομάδες. Συγκεκριμένα, εάν το $2^{-\Delta\Delta Ct}$ είναι >1 η διαφορά έκφρασης ισούται με το $2^{-\Delta\Delta Ct}$, ενώ αν είναι <1 ισούται με $-1/2^{-\Delta\Delta Ct}$. Στην παρούσα μελέτη, η διαφορά στην έκφραση ενός γονιδίου μεταξύ δύο υποομάδων θεωρήθηκε σημαντική μόνο όταν: i) η διαφορά επιπέδων έκφρασης ήταν >2 ή <-2 (ενδεικτική για

αύξηση ή μείωση της έκφρασης, αντιστοίχως), και ii) η διαφορά των τιμών ΔC_t ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$) με τη χρήση του t-test.

3.2.2.4.3 Μελέτη σηματοδοτικής οδού των TLRs με τη χρήση των συστοιχιών PCR (PCR Arrays)

Με τη μεθοδολογία των συστοιχιών δίδεται η δυνατότητα ταυτόχρονης ενίσχυσης και ελέγχου της έκφρασης πολλών γονιδίων που σχετίζονται με την υπό μελέτη σηματοδοτική οδό σε μια πλάκα 96 θέσεων. Αυτό είναι εφικτό με την τοποθέτηση ζεύγους εκκινητών ενός διαφορετικού γονιδίου σε καθένα από τα 96 πηγαδάκια της πλάκας. Έτσι, δίνεται η δυνατότητα ταυτόχρονης ενίσχυσης και ελέγχου της έκφρασης 84 γονιδίων που σχετίζονται με την σηματοδοτική οδό που μελετάται καθώς και 5 γονιδίων αναφοράς (housekeeping genes, HKG), ενώ παράλληλα πραγματοποιείται έλεγχος για την παρουσία πρόσμιξης από gDNA (Genomic DNA Control, GDC), την αποτελεσματικότητα της αντίστροφης μεταγραφής (Reverse transcription controls, RTC) και την ποιότητα της αντίδρασης PCR (Positive PCR controls, PPC) .

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο αναλυτής Chromo4 (BioRad) και το RT² Profiler™ PCR Array kit (PAHS-018A array, SABiosciences, USA) στο οποίο περιλαμβάνονται μέλη της οικογένειας των TLRs καθώς και σημαντικοί μεσολαβητές της σηματοδότησης μεταξύ των οποίων προσαρμογείς και πρωτεϊνικά μόρια που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς και τελεστές της TLR σηματοδότησης (Πίνακες 9,10). Μόρια που ανήκουν σε ενδοκυττάρια μονοπάτια μεταβίβασης του σήματος (NF- κ B, JNK/p38, NF/IL6, και IRF) και ενεργοποιούνται σε επόμενα βήματα της TLR σηματοδότησης συμπεριλαμβάνονται επίσης στην συστοιχία που χρησιμοποιήθηκε (Πίνακες 9,10). Ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τα γονίδια B2M (Beta 2 microglobulin), HPRT1 (Hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1), RPLT13A (Ribosomal protein L13a), GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) και ACTB (beta actin).

Πίνακας 10. Γονίδια που εμπλέκονται στη σηματοδοτική οδό των TLRs και ελέγχθηκαν στην παρούσα μελέτη

Ομάδες γονιδίων	Γονίδια
Υποδοχείς	CD180, SIGIRR, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10
Προσαρμογείς και μόρια που αλληλεπιδρούν με τους TLRs	BTK, CD14, HMGB1, HRAS, HSPA1A, HSPD1, LY86, LY96, MAPK8IP3, MYD88, PELI1, RIPK2, SARM1, TICAM2, TIRAP, TOLLIP, TICAM1, IRAK1, IRAK2, TRAF6
Τελεστές	CASP8, EIF2AK2, FADD, MAP3K7, TAB1, NR2C2, PPARA, PRKRA, ECSIT, UBE2N, UBE2V1
Γονίδια που εμπλέκονται σε ενδοκυττάρια μονοπάτια μεταβίβασης σήματος	<u>Μονοπάτι NF-κΒ:</u> CHUK, IKBKB, MAP3K1*, MAP4K4, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, NFKBIL1, NFRKB, REL, RELA, CLEC4E, PTGS2
	<u>Μονοπάτι JNK/p38:</u> ELK1, FOS, JUN, MAP2K3, MAP2K4, MAP3K1*, MAPK8
	<u>Μονοπάτι IRF:</u> CXCL10, IFNA1, IFNB1, IFNG, IRF1, IRF3, TBK
	IL1A, IL1B, IL2, IL6, IL8, IL10, IL12A, CCL2, CSF2, CSF3, LTA, TNF, TNFRSF1A, CD80, CD86
Κυτταροκίνες και συνδιεγερτικά μόρια	

* Γονίδια που ανήκουν σε περισσότερες από μια ομάδες

Πίνακας 11. Αναλυτική περιγραφή γονιδίων τα οποία ελέγχθηκαν στην παρούσα μελέτη

Συμβολισμός γονιδίου (HUGO)	Όνομα γονιδίου	Εναλλακτικοί συμβολισμοί
BTK	Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase	ATK, XLA, PSCTK1, AGMX1, IMD1
CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	MCH5, MACH, FLICE, Casp-8
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	MCP1, MCP-1, MCAF, SMC-CF, GDCF-2, HC11, MGC9434, SCYA2
CD14	CD14 molecule	-
CD180	CD180 molecule	RP105, Ly78,LY64
CD80	CD80 molecule	CD28LG, CD28LG1
CD86	CD86 molecule	CD28LG2
CHUK	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	TCF16, IKK1, IKK-alpha, IkbKA, NFKBIKA, IKKA
CLEC4E	C-type lectin domain family 4, member E	mincle, CLECSF9
CSF2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	GM-CSF
CSF3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	MGC45931, GCSF, G-CSF, C17orf33
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	IFI10, IP-10, crg-2, mob-1, C7, gIP-10, INP10, SCYB10
ECSIT	ECSIT homolog (Drosophila)	SITPEC
EIF2AK2	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	PKR, EIF2AK1, PRKR
ELK1	ELK1, member of ETS oncogene family	-
FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	MORT1, GIG3
FOS	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	c-fos, AP-1
HMGB1	High-mobility group box 1	HMG3, SBP-1, DKFZp686A04236, HMG1
HRAS	V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	HRAS1
HSPA1A	Heat shock 70kDa protein 1A	HSP70-1, HSPA1
HSPD1	Heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	GROEL, HSP60, SPG13
IFNA1	Interferon, alpha 1	IFNA@, IFL, IFN, IFN-ALPHA, IFNA13
IFNB1	Interferon, beta 1, fibroblast	IFB, IFF, IFNB
IFNG	Interferon, gamma	
IKBKB	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	IKK2, NFKBIKB, IKK-beta, IKKB
IL10	Interleukin 10	CSIF, TGIF, IL10A, IL-10
IL12A	Interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)	CLMF, IL-12A, p35, NFSK, NKSF1
IL1A	Interleukin 1, alpha	IL1F1, IL-1A, IL1

→συνέχεια

Πίνακας 11 (συνέχεια)

Συμβολισμός γονιδίου (HUGO)	Όνομα γονιδίου	Εναλλακτικοί συμβολισμοί
IL1B	Interleukin 1, beta	IL1F2, IL-1B
IL2	Interleukin 2	-
IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)	IL-6, BSF2, HGF, HSF, IFNB2
IL8	Interleukin 8	SCYB8, LUCT, LECT, MDNCF, TSG-1, CXCL8, IL-8, NAP-1, 3- 10C, MONAP, AMCF-I, LYNAP, NAF, b-ENAP, GCP-1, K60
IRAK1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1	IRAK, pelle
IRAK2	Interleukin-1 receptor-associated kinase 2	-
IRF1	Interferon regulatory factor 1	MAR
IRF3	Interferon regulatory factor 3	
JUN	Jun oncogene	c-Jun, AP-1
LTA	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)	TNFB
LY86	Lymphocyte antigen 86	MD-1, dJ80N2.1
LY96	Lymphocyte antigen 96	MD-2
MAP2K3	Mitogen-activated protein kinase kinase 3	MEK3, MKK3, MAPKK3, PRKMK3
MAP2K4	Mitogen-activated protein kinase kinase 4	MEK4, JNKK1, PRKMK4, MKK4, SERK1
MAP3K1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	MEKK, MAPKKK1, MEKK1
MAP3K7	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	MEKK7, TAK1
MAP4K4	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4	HGK, NIK, FLH21957
MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8	JNK, JNK1, SAPK1, PRKM8
MAPK8IP3	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3	KIAA1066, JSAP1, JIP3, syd
MYD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)	-
NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B- cells 1	KBF1, p105, NFKB-p50, p50, NF-kappaB
NFKB2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B- cells 2 (p49/p100)	LYT-10, p52
NFKBIA	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B- cells inhibitor, alpha	IKBA, MAD-3, IkappaBalpha, NFKBI
NFKBIL1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B- cells inhibitor-like 1	IKBL, NFKBIL
NFRKB	Nuclear factor related to kappaB binding protein	DKFZp547B2013, INO80G
NR2C2	Nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2	TR2R1, hTAK1, TR4
PELI1	Pellino homolog 1 (Drosophila)	-

→συνέχεια

Πίνακας 11 (συνέχεια)

Συμβολισμός γονιδίου (HUGO)	Όνομα γονιδίου	Εναλλακτικοί συμβολισμοί
PPARA	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	hPPAR, NR1C1, PPAR
PRKRA	Protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator	PACT, RAX, HSD14, DYT16
REL	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian)	I-Rel, c-Rel
RELA	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)	NFKB3, p65
RIPK2	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2	RICK, RIP2, CARDIAK, CARD3
SARM1	Sterile alpha and TIR motif containing 1	SARM, SAMD2, KIAA0524
SIGIRR	Single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain	TIR8
TAB1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 1	MAP3K7IP1
TBK1	TANK-binding kinase 1	NAK
TICAM1	Toll-like receptor adaptor molecule 1	TRIF, TICAM-1, MGC35334, PRVTIRB
TICAM2	Toll-like receptor adaptor molecule 2	TRAM, TICAM-2, TIRP
TIRAP	Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein	Mal, wyatt
TLR1	Toll-like receptor 1	rsc786, KIAA0012, CD281
TLR10	Toll-like receptor 10	CD290
TLR2	Toll-like receptor 2	TIL4, CD282
TLR3	Toll-like receptor 3	CD283
TLR4	Toll-like receptor 4	hToll, CD284
TLR5	Toll-like receptor 5	TIL3, SLEB1, FLJ10052, MGC126430, MGC126431
TLR6	Toll-like receptor 6	CD286
TLR7	Toll-like receptor 7	-
TLR8	Toll-like receptor 8	CD288
TLR9	Toll-like receptor 9	CD289
TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	TNFSF2, DIF, TNF-alpha, TNFA
TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	TNF-R, TNFAR, TNFR60, TNF-R-I, CD120a, TNF-R55, TNFR1
TOLLIP	Toll interacting protein	IL-1RAcPIP
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6	RNF85
UBE2N	Ubiquitin-conjugating enzyme E2N (UBC13 homolog, yeast)	UbcH-ben, UBC13, MGC8489
UBE2V1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	UEV-1, CROC-1, UEV1A, CROC1, UBE2V
B2M	Beta-2-microglobulin	-
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	HGPRT, HPRT
RPL13A	Ribosomal protein L13a	TSTA1

→συνέχεια

Πίνακας 11 (συνέχεια)

Συμβολισμός γονιδίου (HUGO)	Όνομα γονιδίου	Εναλλακτικοί συμβολισμοί
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPD
ACTB	Actin, beta	-

HUGO: Human Genome Organization

Το μίγμα της αντίδρασης περιλάμβανε cDNA, διάλυμα RT² SYBR[®] Green qPCR Master Mix (SABiosciences, USA) και ddH₂O (Πίνακας 11).

Πίνακας 12. Αντιδραστήρια για την παρασκευή του μίγματος της αντίδρασης

Αντιδραστήρια	Όγκοι
RT ² SYBR [®] Green qPCR Master Mix (περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα, HotStart DNA Taq πολυμεράση, νουκλεοτίδια και χρωστική SYBR Green I)	1275μl
ddH ₂ O	1173μl
cDNA	102μl
Τελικός όγκος	2550μl

25 μl από το μίγμα της αντίδρασης μοιράστηκαν σε καθεμία από τις θέσεις της πλάκας, η οποία σφραγίστηκε κατάλληλα πριν τοποθετηθεί στον θερμοκυκλοποιητή Chromo4.

Συνθήκες αντίδρασης:

- αρχική αποδιάταξη: 95⁰C, 10min
- κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 40 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
 - φάση αποδιάταξης: 95⁰C, 15sec
 - φάση σύνδεσης εκκινητών: 55⁰C, 40sec
 - φάση επέκτασης μορίων DNA: 72⁰C, 30 sec
- τελική επέκταση συντεθειμένων μορίων DNA: 72⁰C, 5min

Ακολουθεί ένα πρόγραμμα melting curve.

Συνθήκες melting curve

- 95⁰ C, 1min
- 65⁰ C, 2min (OPTICS OFF)
- Μετάβαση από τους 65⁰ C στους 95⁰ C κατά 2⁰ C/ min (OPTICS ON)

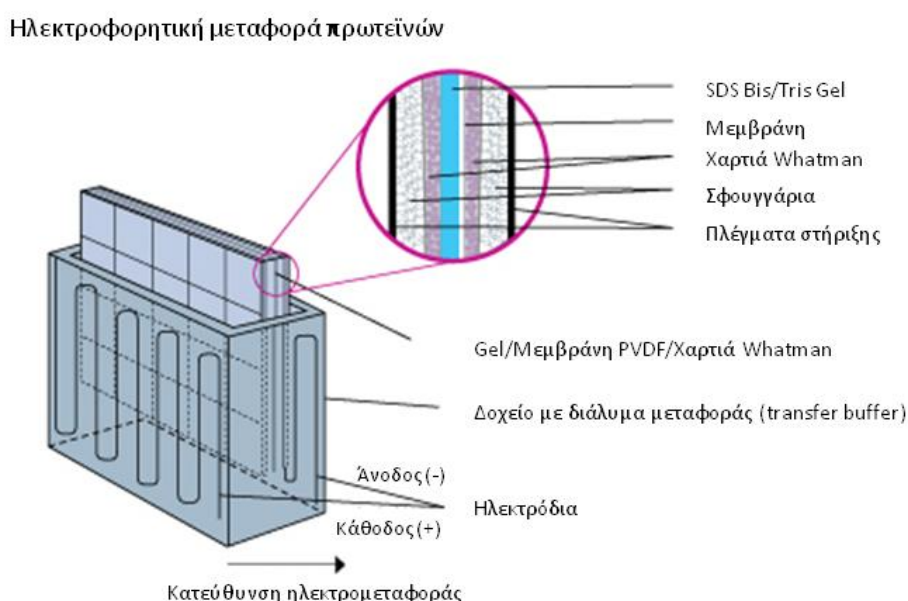
Για την αξιολόγηση της έκφρασης των εξεταζόμενων γονιδίων, αρχικά ελέγχθηκε η παρουσία πρόσμιξης gDNA και η αποτελεσματικότητα της αντίστροφης μεταγραφής και της αντίδρασης PCR σε κάθε δείγμα. Ο έλεγχος για την παρουσία πρόσμιξης από gDNA επιτεύχθηκε με την αναζήτηση αλληλουχιών επαναλαμβανόμενου gDNA. Όταν η διαφορά μεταξύ των τιμών Ct του GDC και της μέσης τιμής των Ct των HKG ($\Delta Ct = Ct_{GDC} - Ct_{AVG\ HKG}$) ήταν μεγαλύτερη από 10, το επίπεδο της πρόσμιξης από gDNA θεωρήθηκε αρκετά χαμηλό ώστε να μην επηρεάζει τα αποτελέσματα της γονιδιακής έκφρασης. Ο έλεγχος για την αποτελεσματικότητα της αντίστροφης μεταγραφής και την ποιότητα της αντίδρασης PCR πραγματοποιήθηκε σε 3 διαφορετικές θέσεις για το RTC και PPC αντιστοίχως. Έτσι ελέγχθηκε η παρουσία τυχόν προσμίξεων στα δείγματα RNA που θα μπορούσε να επηρεάζουν την αντίστροφη μεταγραφή ή την ενίσχυση των προϊόντων PCR, αντιστοίχως. Η μέση τιμή Ct των PPC θα πρέπει να κυμαίνεται σε τιμές 20 ± 2 κύκλους ανά αντίδραση και δεν πρέπει να διαφέρει περισσότερο από δύο κύκλους μεταξύ των διαφορετικών αντιδράσεων που θα συγκριθούν. Μεγαλύτερες διαφορές υποδηλώνουν την παρουσία διαφορετικών ποσοτήτων αναστολέων της αντίδρασης PCR. Διαφορές ανάμεσα στη μέση τιμή Ct των RTC και των PPC ($\Delta Ct = AVG\ Ct_{RTC} - AVG\ Ct_{PPC}$) μικρότερες του 5 υποδηλώνουν ότι δεν υπάρχει αναστολή της αντίστροφης μεταγραφής. Μόνο τα δείγματα που πληρούσαν τις παραπάνω προϋποθέσεις χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του $2^{-\Delta\Delta Ct}$ και αξιολογήθηκαν περαιτέρω για τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων που συμμετέχουν στην σηματοδοτική οδό των TLRs.

3.2.3 Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Κυτταρικές πρωτεΐνες εκχυλίσθηκαν από καθαρό πληθυσμό CD19⁺ λεμφοκυττάρων που απομονώθηκαν όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.2.2.1. Η λύση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός λυτικού διαλύματος που περιλάμβανε 0,5M Tris-HCl, 5M NaCl, 0,5M EDTA pH 7,4, 1% Triton X-100, 10% γλυκερόλη, 0,1% SDS, 0,5% sodium deoxycholate και ένα μίγμα από αναστολείς πρωτεασών στους οποίους συμπεριλήφθηκαν leupeptin (200mM) και PMSF (5μg/ml).

Είκοσι έως σαράντα μικρογραμμάρια πρωτεϊνικού εκχυλίσματος μεταφέρθηκαν σε πηκτή 10% NuPAGE Bis-Tris (Invitrogen, Paisley, UK) μετά από αποδιάταξη (στους 70°C για 10 λεπτά) υπό αναγωγικές συνθήκες. Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε επί 60 min σε τάση 200 V με κατάλληλη τοποθέτηση του

ρυθμιστικού διαλύματος NuPAGE MOPS (1x) στους θαλάμους της ηλεκτροφορητικής συσκευής Invitrogen XCell SureLock και προσθήκη 500μl διαλύματος antioxidant στον εσωτερικό θάλαμο της συσκευής. Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε PVDF μεμβράνες (Biorad, USA) πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου 25V για 2 ώρες με τη χρήση κατάλληλου διαλύματος μεταφοράς (Transfer buffer 1X) που περιείχε μεθανόλη (Εικόνα 15).



Εικόνα 15 - Σχηματική απεικόνιση διάταξης για την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών.

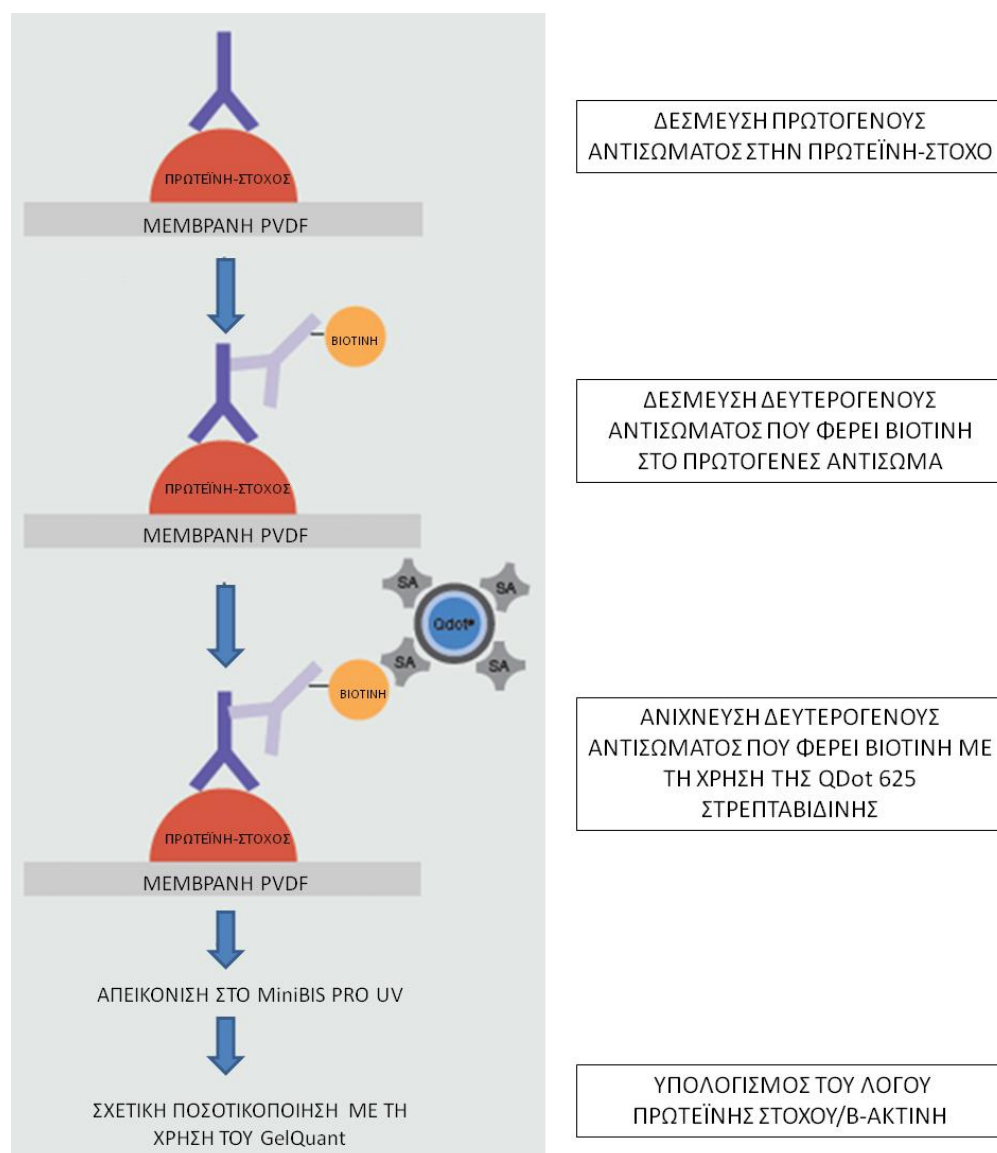
Τα επίπεδα έκφρασης των TLR1, TLR2, TLR8 και TLR9 προσδιορίστηκαν με τη χρήση κατάλληλων μονοκλωνικών αντισωμάτων (Πίνακας 12).

Πίνακας 13. Μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα Western

Αντίσωμα	Εταιρεία	Αραίωση
Goat anti-human TLR1	R&D Systems, USA	1:200
Goat anti-human TLR2	R&D Systems, USA	1:200
Mouse anti-human TLR8	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:200
Mouse anti-human TLR9	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:200
Mouse anti-human β-ακτίνη	Sigma-Aldrich, USA	1:5000

Για την ανοσοανίχνευση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το WesternDot™ 625 Western Blot Kit (Invitrogen, Paisley, UK). Η ανίχνευση στηρίζεται στην παρουσία ενός δευτερογενούς αντισώματος σε σύμπλοκο με βιοτίνη (goat anti-mouse ή rabbit anti-goat κατά περίπτωση ανάλογα με το πρωτογενές αντίσωμα) και στην

αλληλεπίδρασή του με το σύμπλοκο QdotR 625 στρεπταβιδίνης. Με δεδομένο ότι όταν ο νανοκρύσταλλος QdotR 625 διεγερθεί με υπεριώδη ακτινοβολία εκπέμπει σε μήκη κύματος του μπλε φωτός, η ανίχνευση των πρωτεϊνών έγινε δυνατή με τη χρήση του συστήματος ανίχνευσης MiniBIS Pro UV (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel) με το λογισμικό GelCapture σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Σε κάθε δείγμα, υπολογίζεται η επιφάνεια (εμβαδόν) της πρωτεϊνικής «ζώνης» που μας ενδιαφέρει και η αντίστοιχη επιφάνεια της «ζώνης» της β-ακτίνης με τη χρήση του προγράμματος GelQuant. Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως λόγος της επιφάνειας κάθε ζώνης προς την αντίστοιχη επιφάνεια της ζώνης της β-ακτίνης.



Εικόνα 16 - Σχηματική απεικόνιση ανοσοανίχνευσης πρωτεϊνών με τη χρήση του WesternDot™ 625 Western Blot Kit

3.2.4 Κυτταρομετρία ροής (Flow cytometry)

Προσδιορίστηκε με κυτταρομετρία ροής η έκφραση των TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR7, TLR8 και TLR9 σε CD19⁺ λεμφοκύτταρα με κατάλληλα μονοκλωνικά αντισώματα (Πίνακας 13). Για τον προσδιορισμό των TLR7, TLR8 και TLR9 πραγματοποιήθηκε ενδοκυτταρική χρώση με τη χρήση του BD Cytotfix/Cytoperm kit (BD Cytotfix/Cytoperm™ Plus Fixation Kit; BD, San Diego, CA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Σε όλες τις περιπτώσεις η ανάλυση πραγματοποιήθηκε μετά από τριπλή σήμανση με anti-CD19 και 7-Amino-actinomycin D (7-AAD) vital dye (Beckman Coulter; Brea, CA) (ώστε ν' αποκλειστούν τα νεκρά κύτταρα). Κατάλληλοι ιστοτυπικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν για καθέναν από τους TLRs που ελέγχθηκαν. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τον κυτταρομετρητή FACS CANTO (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) και με τη χρήση του προγράμματος BD FACS DIVA. Μόνο τα 7-AAD αρνητικά (ζωντανά κύτταρα) αναλύθηκαν για την έκφραση των TLRs.

Πίνακας 14- Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην κυτταρομετρία ροής

Αντίσωμα	Φθορισμόχρωμα	Εταιρεία
Mouse anti-human TLR1 (GD2.F4)	FITC	AbCam, UK
Mouse anti-human TLR2	Alexa Fluor® 488	Invitrogen, USA
Mouse anti-human TLR4 (HTA125)	PE	AbCam, UK
Mouse anti-human TLR6 (TLR6.127)	FITC	AbCam, UK
Rabbit anti-human TLR7	PE	AbCam, UK
Mouse anti-human TLR8 (303F1.14)	Alexa Fluor® 488	IMGENEX, CA
Mouse anti-human TLR9 (5G5)	FITC	AbCam, UK
Mouse anti-human CD80 (557226)	FITC	BD Pharmingen, USA
Mouse anti-human CD86 (555658)	PE	BD Pharmingen, USA

3.3 Στατιστική Ανάλυση

Για όλες τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 17.0 (Statistical Package for Social Sciences) για Windows. Για τις ποσοτικές μεταβλητές, προσδιορίστηκαν οι μέσες τιμές, οι διάμεσες, οι μέγιστες ή οι ελάχιστες τιμές και οι τιμές τυπικής απόκλισης. Η σημασία των διπαραμετρικών συσχετίσεων μεταξύ των παραγόντων εκτιμήθηκε με τη χρήση του χ^2 και του T-test. Για τη μελέτη της επιβίωσης χρησιμοποιήθηκαν οι καμπύλες επιβίωσης κατά Kaplan-Meier. Η επιβίωση χωρίς πρόοδο νόσου (PFS) μετρήθηκε από τη διάγνωση μέχρι την ημερομηνία εξέλιξης της νόσου, ενώ η συνολική επιβίωση (OS) από τη διάγνωση μέχρι το θάνατο ανεξάρτητα από την αιτία που τον προκάλεσε ή μέχρι την τελευταία

παρακολούθηση του ασθενούς. Στατιστικά σημαντικές διαφορές στην επιβίωση μεταξύ διαφορετικών ομάδων εκτιμήθηκαν με τη δοκιμασία Log-Rank test. Χρησιμοποιήθηκε η πολυπαραμετρική ανάλυση Cox, (Cox, propotional hazard multivariate regression analysis) για την τελική εκτίμηση της προγνωστικής σημασίας των διαφόρων παραγόντων που μελετήθηκαν. Όλες οι αναλύσεις έγιναν σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

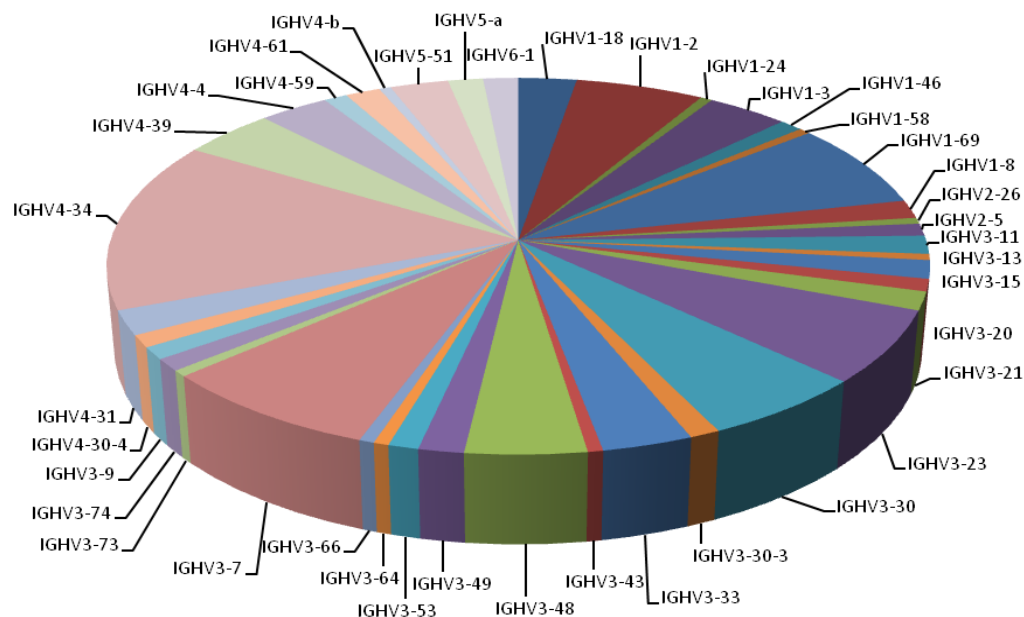
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Ανάλυση των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών

4.1.1 Ρεπερτόριο γονιδίων IGHV, IGHD και IGHJ

Κλωνικές αναδιατάξεις IGHV-IGHD-IGHJ ανιχνεύθηκαν σε 191 περιπτώσεις ΧΑΛ της παρούσας μελέτης. Αναγνωρίστηκαν γονίδια που ανήκουν σε έξι από τις επτά υποομάδες των γονιδίων IGHV. Επικράτησαν γονίδια της υποομάδας IGHV3 (79/191 περιπτώσεις, 41,4%) και ακολούθησαν τα γονίδια των υποομάδων IGHV4 (54/191 περιπτώσεις, 28,3%) και IGHV1 (44/191 περιπτώσεις, 23,0%). Στο σύνολο των αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ αναγνωρίστηκαν 40 διαφορετικά γονίδια IGHV. Τα συχνότερα γονίδια IGHV ήταν τα IGHV4-34, IGHV3-7, IGHV1-69, IGHV3-23, IGHV3-30, IGHV1-2, IGHV3-48 και IGHV4-39 σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Εικόνα 17, Πίνακας 15).(121, 123)

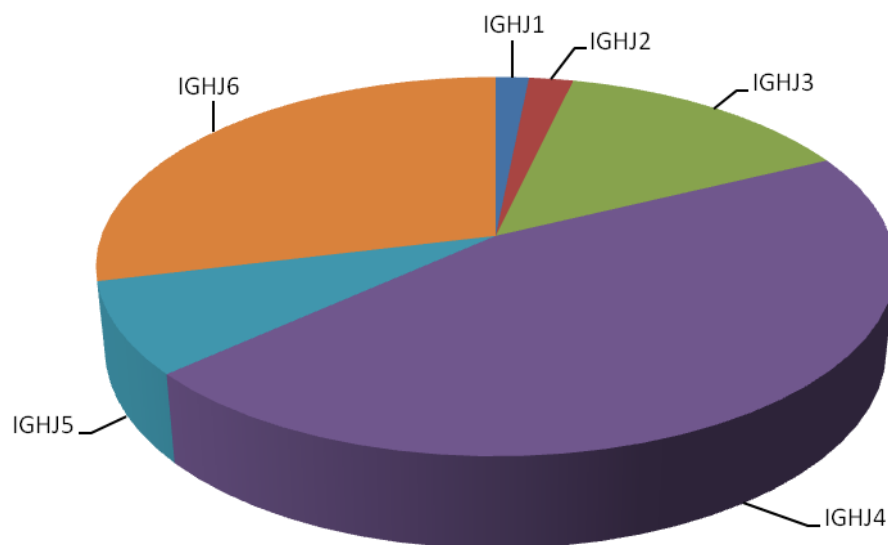


Εικόνα 17 - Σχηματική απεικόνιση της συχνότητας των γονιδίων IGHV στην παρούσα μελέτη.

Πίνακας 15 - Αριθμός περιπτώσεων και συχνότητα γονιδίων IGHV στην παρούσα μελέτη

Γονίδιο IGHV	Αριθμός αλληλουχιών	%
IGHV1-18	5	2,6
IGHV1-2	11	5,8
IGHV1-24	1	0,5
IGHV1-3	7	3,7
IGHV1-46	2	1,0
IGHV1-58	1	0,5
IGHV1-69	14	7,3
IGHV1-8	3	1,6
IGHV2-26	1	0,5
IGHV2-5	2	1,0
IGHV3-11	3	1,6
IGHV3-13	1	0,5
IGHV3-15	3	1,6
IGHV3-20	2	1,0
IGHV3-21	3	1,6
IGHV3-23	12	6,3
IGHV3-30	11	5,8
IGHV3-30-3	2	1,0
IGHV3-33	6	3,1
IGHV3-43	1	0,5
IGHV3-48	8	4,2
IGHV3-49	3	1,6
IGHV3-53	2	1,0
IGHV3-64	1	0,5
IGHV3-66	1	0,5
IGHV3-7	15	7,9
IGHV3-73	1	0,5
IGHV3-74	2	1,0
IGHV3-9	2	1,0
IGHV4-30-4	2	1,0
IGHV4-31	4	2,1
IGHV4-34	28	14,7
IGHV4-39	8	4,2
IGHV4-4	6	3,1
IGHV4-59	2	1,0
IGHV4-61	3	1,6
IGHV4-b	1	0,5
IGHV5-51	5	2,6
IGHV5-a	3	1,6
IGHV6-1	3	1,6
Σύνολο	191	100

Αναγνωρίστηκαν 6 διαφορετικά γονίδια IGHJ. Συχνότερο ήταν το γονίδιο IGHJ4 (87/191 περιπτώσεις, 45,5%) και ακολουθούσε το IGHJ6 (55/191 περιπτώσεις, 28,8%) (Εικόνα 18, Πίνακας 16).

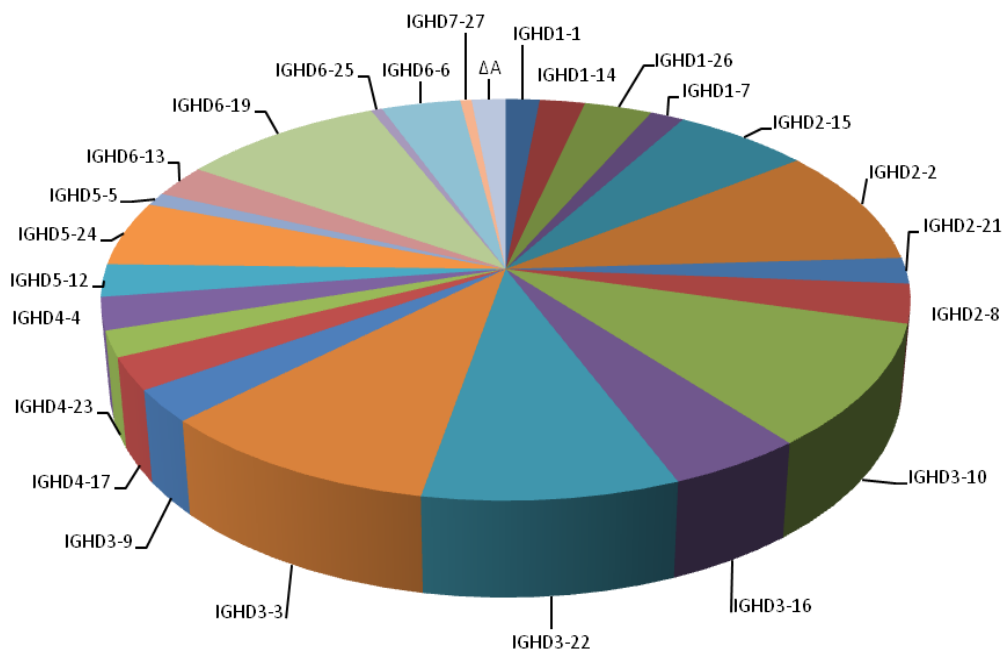


Εικόνα 18 - Σχηματική απεικόνιση της συχνότητας των γονιδίων IGHJ στην παρούσα μελέτη.

Πίνακας 16 - Ρεπερτόριο γονιδίων IGHJ στην παρούσα μελέτη

IGHJ γονίδιο	Αριθμός αλληλουχιών	%
IGHJ1	3	1,6
IGHJ2	4	2,1
IGHJ3	27	14,1
IGHJ4	87	45,5
IGHJ5	15	7,9
IGHJ6	55	28,8
Σύνολο	191	100

Στο σύνολο των αναδιατάξεων αναγνωρίστηκαν 24 διαφορετικά γονίδια IGHD που ανήκαν σε επτά υποομάδες. Σε τρεις από τις 191 αναδιατάξεις δεν αναγνωρίστηκε γονίδιο IGHD. Επικρατούσαν γονίδια της υποομάδας IGHD3 (69/191 περιπτώσεις, 36,1%) και ακολουθούσαν τα γονίδια της υποομάδας IGHD2 (40/191 περιπτώσεις, 20,9%). Τα πιο συχνά γονίδια ήταν τα IGHD3-3 και IGHD3-10 και ακολουθούσαν τα IGHD6-19, IGHD2-2, IGHD3-22 και IGHD2-15 (Εικόνα 19 , Πίνακας 17).



Εικόνα 19 - Σχηματική απεικόνιση της συχνότητας των γονιδίων IGHD στην παρούσα μελέτη, (ΔΑ= δεν αναγνωρίστηκαν).

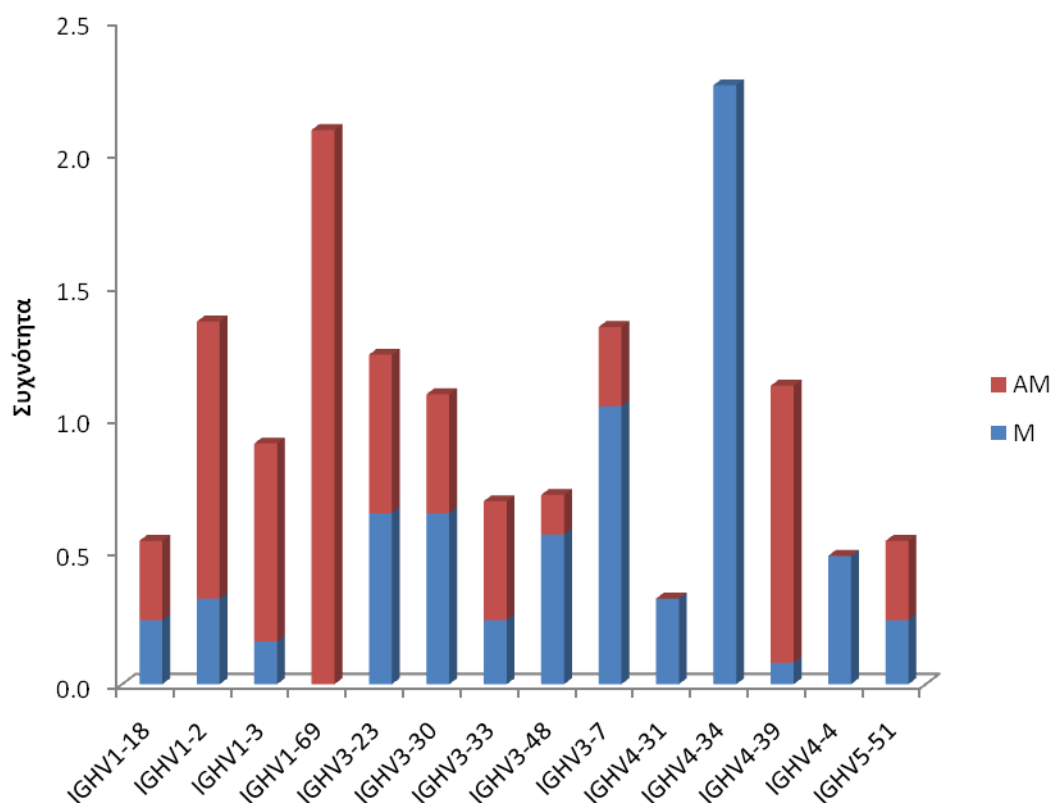
Πίνακας 17 - Ρεπερτόριο γονιδίων IGHD στην παρούσα μελέτη

IGHD γονίδιο	Αριθμός αλληλουχιών	%
IGHD1-1	3	1,6
IGHD1-14	4	2,1
IGHD1-26	6	3,1
IGHD1-7	3	1,6
IGHD2-15	12	6,3
IGHD2-2	18	9,4
IGHD2-21	4	2,1
IGHD2-8	6	3,1
IGHD3-10	19	9,9
IGHD3-16	9	4,7
IGHD3-22	17	8,9
IGHD3-3	19	9,9
IGHD3-9	5	2,6
IGHD4-17	5	2,6
IGHD4-23	4	2,1
IGHD4-4	5	2,6
IGHD5-12	5	2,6
IGHD5-24	10	5,2
IGHD5-5	2	1,0
IGHD6-13	5	2,6
IGHD6-19	18	9,4
IGHD6-25	1	0,5
IGHD6-6	7	3,7
IGHD7-27	1	0,5
ΔΑ	3	1,6
Σύνολο	191	100

*ΔΑ= δεν αναγνωρίστηκαν

4.1.2 Ανάλυση των μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV

Με όριο ομολογίας το 98%, οι αναδιατάξεις IGHV-IGHD-IGHJ που έφεραν γονίδια IGHV με νουκλεοτιδική ταυτότητα $\geq 98\%$ ως προς το αντίστοιχο μη αναδιαταγμένο γονίδιο (germline) θεωρήθηκαν αμετάλλακτες, ενώ οι αναδιατάξεις με νουκλεοτιδική ταυτότητα $< 98\%$ θεωρήθηκαν μεταλλαγμένες. Συνολικά, οι 124/191 (64,9%) αναδιατάξεις ήταν μεταλλαγμένες, ενώ οι 67/191 (35,1%) αμετάλλακτες. Πενήντα δύο από τις 67 αμετάλλακτες ακολουθίες είχαν 100% ομοιότητα προς το αντίστοιχο μη αναδιαταγμένο γονίδιο («πραγματικά αμετάλλακτες αλληλουχίες»). Παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στη συχνότητα χρησιμοποίησης των γονιδίων IGHV στις 2 υποομάδες. Συχνότερα γονίδια στην υποομάδα των μεταλλαγμένων ήταν τα IGHV4-34 και IGHV3-7, ενώ τα γονίδια IGHV1-69 και IGHV4-39 υπερίσχυσαν στην υποομάδα των αμετάλλακτων σε συμφωνία με όλες τις προηγούμενες μελέτες (Εικόνα 20, Πίνακας 18).(121, 123)



Εικόνα 20 - Σχηματική απεικόνιση των συχνότερων IGHV γονιδίων στις μεταλλαγμένες (M) και αμετάλλακτες (AM) αναδιατάξεις.

Πίνακας 18 - Αριθμός περιπτώσεων και συχνότητα γονιδίων IGHV στις μεταλλαγμένες, αμετάλλακτες και «πραγματικά» αμετάλλακτες αλληλουχίες

Γονίδιο IGHV	Μεταλλαγμένες αλληλουχίες Αριθμός (%)	Αμετάλλακτες αλληλουχίες Αριθμός (%)	Πραγματικά αμετάλλακτες αλληλουχίες Αριθμός (%)
IGHV1-18	3 (2,4%)	2 (3,0%)	1 (1,9%)
IGHV1-2	4 (3,2%)	7 (10,4%)	6 (11,5%)
IGHV1-24	0 (0,0%)	1 (1,5%)	0 (0,0%)
IGHV1-3	2 (1,6%)	5 (7,5%)	5 (9,6%)
IGHV1-46	1 (0,8%)	1 (1,5%)	1 (1,9%)
IGHV1-58	0 (0,0%)	1 (1,5%)	1 (1,9%)
IGHV1-69	0 (0,0%)	14 (20,9%)	11 (21,2%)
IGHV1-8	2 (1,6%)	1 (1,5%)	1 (1,9%)
IGHV2-26	1 (0,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
IGHV2-5	1 (0,8%)	1 (1,5%)	1 (1,9%)
IGHV3-11	1 (0,8%)	2 (3,0%)	2 (3,8%)
IGHV3-13	1 (0,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
IGHV3-15	3 (2,4%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
IGHV3-20	2 (1,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
IGHV3-21	2 (1,6%)	1 (1,5%)	0 (0,0%)
IGHV3-23	8 (6,5%)	4 (6,0%)	3 (5,8%)
IGHV3-30	8 (6,5%)	3 (4,5%)	3 (5,8%)
IGHV3-30-3	1 (0,8%)	1 (1,5%)	1 (1,9%)
IGHV3-33	3 (2,4%)	3 (4,5%)	3 (5,8%)
IGHV3-43	0 (0,0%)	1 (1,5%)	1 (1,9%)
IGHV3-48	7 (5,6%)	1 (1,5%)	1 (1,9%)
IGHV3-49	3 (2,4%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
IGHV3-53	2 (1,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
IGHV3-64	0 (0,0%)	1 (1,5%)	0 (0,0%)
IGHV3-66	1 (0,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
IGHV3-7	13 (10,5%)	2 (3,0%)	2 (3,8%)
IGHV3-73	1 (0,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
IGHV3-74	2 (1,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
IGHV3-9	1 (0,8%)	1 (1,5%)	1 (1,9%)
IGHV4-30-4	1 (0,8%)	1 (1,5%)	1 (1,9%)
IGHV4-31	4 (3,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
IGHV4-34	28 (22,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
IGHV4-39	1 (0,8%)	7 (10,4%)	5 (9,6%)
IGHV4-4	6 (4,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
IGHV4-59	2 (1,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
IGHV4-61	2 (1,6%)	1 (1,5%)	0 (0,0%)
IGHV4-b	1 (0,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
IGHV5-51	3 (2,4%)	2 (3,0%)	1 (1,9%)
IGHV5-a	0 (0,0%)	3 (4,5%)	1 (1,9%)
IGHV6-1	3 (2,4%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Σύνολο	124 (100%)	67 (100%)	52 (100%)

4.1.3 «Στερεότυπα υποσύνολα»

Με τη χρήση καθιερωμένων κριτηρίων (βλέπε παράγραφο 1.8.2), 30/191 περιπτώσεις εξέφραζαν στερεότυπους BcRs που ανήκαν σε επτά διαφορετικά

υποσύνολα. Σε αυτή την υποομάδα, από 10 περιπτώσεις εξέφραζαν IGHV1/5/7-IGKV1(D)-39 BcR (υποσύνολο #1) ή IGHV4-34/IGKV2-30 BcR (υποσύνολο #4), αντιστοίχως, ενώ 4 περιπτώσεις εξέφραζαν IGHV4-39/IGKV1(D)-39 BcR (υποσύνολο #8). Όλες οι περιπτώσεις που ανήκαν στα υποσύνολα #1 και #8 ήταν αμετάλλακτες, ενώ όλες οι περιπτώσεις του υποσυνόλου #4 ήταν μεταλλαγμένες.

Πίνακας 19 – Περιπτώσεις που ανήκουν σε υποσύνολα με «στερεότυπους» υποδοχείς

A/A	# ¹	IGHV/IGHD/IGHJ γονίδιο	%	Μήκος VH CDR3	VH CDR3 AA ²
P5588	1	IGHV1-2/IGHD5-5/IGHJ4	100,0	13	CARGGWGVVYFDYW
IT01-0298	1	IGHV1-3/IGHD6-19/IGHJ4	100,0	13	CAREQWLGPYYFDYW
IT01-0320	1	IGHV1-3/IGHD6-19/IGHJ4	100,0	13	CAREQWLATHFDYW
N5760	1	IGHV1-3/IGHD6-19/IGHJ4	100,0	13	CAREQWLVLHYFDYW
P1173	1	IGHV5-a/IGHD6-19/IGHJ4	99,6	13	CAREQWLGIKNFDYW
P2355	1	IGHV1-2/IGHD6-19/IGHJ4	100,0	13	CARAQWLVTNFDYW
P3506	1	IGHV1-2/IGHD6-19/IGHJ4	99,7	14	CARAQWLVLVSYFDYW
P3870	1	IGHV1-2/IGHD6-19/IGHJ4	100,0	13	CARGQWLVLQNFDYW
P5092	1	IGHV5-a/IGHD6-19/IGHJ4	100,0	13	CAREQWLVLHFYDW
P3073	1	IGHV1-3/IGHD6-19/IGHJ4	100,0	13	CAREQWLVRVNFYDW
P6090	2	IGHV3-21/ND/IGHJ6	96,2	9	CVTDRNGMDVW
P326	2	IGHV3-21/ND/IGHJ6	98,6	9	CAIDRNGMDVW
P2920	4	IGHV4-34/IGHD3-10/IGHJ6	93,5	20	CARGYGDSPTDKRYFYGLDVW
P3020	4	IGHV4-34/IGHD3-10/IGH6	90,0	20	CARGYGTSDDTRRYFYGMDVW
P6520	4	IGHV4-34/IGHD3-10/IGH6	94,4	20	CARGYPEVPTTRRYFYGMELW
P103	4	IGHV4-34/IGHD3-10/IGH6	95,9	20	CARGYPDTPVRRYFYGMDVW
P3916	4	IGHV4-34/IGHD3-10/IGH6	91,2	20	CARGYADSDVIRRYFYGMDVW
P1626	4	IGHV4-34/IGHD4-17/IGH6	94,8	18	CARSYGSTPTTRRYFYGMDVW
P1422	4	IGHV4-34/IGHD5-12/IGH6	91,9	20	CARGYADTPTFRRYFYGMDVW
P3551	4	IGHV4-34/IGHD5-12/IGH6	93,3	20	CARGWPEDAVTRRYFYGMEIW
P907	4	IGHV4-34/IGHD5-12/IGH6	93,2	20	CARGYGTSATTKRYFYGMDVW
IT01-0278	4	IGHV4-34/IGHD2-21/IGHJ6	93,2	20	CARSYGDSPSVRRYFYGLDVW
P2446	8	IGHV4-39/IGHD6-13/IGHJ5	99,7	19	CASLTGYSSSWYTPANWFDPW
P1050	8	IGHV4-39/IGHD6-13/IGHJ5	100,0	19	CAIQGYSSSWFSQVNWFDPW
P1615	8	IGHV4-39/IGHD6-13/IGHJ5	100,0	19	CASRRGYSSSWFNVVWFDPW
IT01-0252	8	IGHV4-39/IGHD6-19/IGHJ5	100,0	19	CATRQSYSSGWYGGVNWFDPW
P781	16	IGHV4-34/IGHD1-26/IGHJ6	95,0	24	CAGRFYCYGGCANNANFYFYGMDVW
P1082	16	IGHV4-34/IGHD2-15/IGHJ6	96,3	24	CAGRFYCSGAGCDSEGFYFYGLDVW
N4932	33	IGHV4-39/IGHD3-22/IGHJ4	100,0	17	CARILWYFYDSSGNGGDYW
N4969	262	IGHV3-30-3/IGHD2-2/IGHJ6	100,0	29	CAGRFYCSGAGCDSEGFYFYGLDVW

¹#: στερεότυπο υποσύνολο, ²AA: αμινοξική αλληλουχία

4.2 Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που συμμετέχουν στη σηματοδοτική οδό των TLRs

4.2.1 Ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων στο σύνολο των ασθενών

Αξιολογήθηκαν τελικά τα 83 από τα 84 γονίδια που μελετήθηκαν με την τεχνική των συστοιχιών PCR και χαρακτηρίζονταν από φυσιολογικές καμπύλες φθορισμού στην πλειονότητα των αντιδράσεων. Αντίθετα, η καμπύλη φθορισμού του γονιδίου PTGS2 δεν ήταν φυσιολογική στις περισσότερες αντιδράσεις και γι' αυτό το λόγο εξαιρέθηκε από περαιτέρω μελέτη.

Για την αξιολόγηση της έκφρασης των γονιδίων, ο ουδός ειδικού φθορισμού (threshold value) τέθηκε στο 0,01 για όλα τα πειράματα και στη συνέχεια προσδιορίστηκε η τιμή Ct για κάθε γονίδιο σε κάθε αντίδραση. Τιμές Ct > 35 είναι ενδεικτικές απουσίας έκφρασης και θεωρήθηκαν ίσες με 35 για μαθηματικούς λόγους σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τέσσερα από τα 5 γονίδια αναφοράς (B2M, RPL13A, GAPDH, ACTB) είχαν σταθερά επίπεδα mRNA μεταξύ των δειγμάτων και χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της μέσης τιμής Ct των γονιδίων αναφοράς, ενώ για το γονίδιο HPRT1 παρατηρήθηκε σημαντική διακύμανση μεταξύ των ασθενών και γι' αυτό αποκλείστηκε από την περαιτέρω ανάλυση.

Τα επίπεδα έκφρασης του κάθε γονιδίου καθορίστηκαν με βάση τον υπολογισμό του ΔCt . Χαρακτηρίστηκαν ως υψηλά (διάμεση τιμή $\Delta Ct \leq 6,6$), ενδιάμεσα (διάμεση τιμή $\Delta Ct > 6,6$ και $\leq 9,9$), χαμηλά (διάμεση τιμή $\Delta Ct > 9,9$ και $\leq 13,2$) και αρνητικά (διάμεση τιμή $\Delta Ct > 13,2$). Η διαφορά στην έκφραση ενός γονιδίου μεταξύ διαφορετικών υποομάδων βασίστηκε στον υπολογισμό του $2^{-\Delta\Delta Ct}$ όπως αναλυτικά αναφέρεται στη μεθοδολογία (παράγραφος 3.2.2.4.2). Η διαφορά αυτή θεωρήθηκε σημαντική μόνο όταν: i) η διαφορά επιπέδων έκφρασης ήταν >2 ή <-2 (ενδεικτική για αύξηση ή μείωση της έκφρασης, αντιστοίχως), και ii) η διαφορά των τιμών ΔCt ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$) με τη χρήση του t-test.

Αναλυτικά τα αποτελέσματα των πειραμάτων της PCR Arrays δίνονται στον πίνακα 20, ενώ συνοπτική γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων στο σύνολο των ασθενών δίνεται στην εικόνα 21.

Πίνακας 20 – Έκφραση των γονιδίων της σηματοδοτικής οδού των TLRs στο σύνολο των ασθενών

Γονίδιο	Μέση τιμή ΔCt	Διάμεση τιμή ΔCt	SD	Επίπεδο έκφρασης
Υποδοχείς				
CD180	4,82	4,80	1,24	ΥΨΗΛΟ
TLR7	6,09	6,01	0,92	ΥΨΗΛΟ
TLR1	8,85	8,91	0,98	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ
TLR6	6,99	6,94	0,91	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ
TLR10	7,33	7,11	1,27	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ
TLR2	10,78	10,70	1,68	ΧΑΜΗΛΟ
TLR4*	12,05	11,96	2,06	ΧΑΜΗΛΟ
TLR8*	12,27	12,73	2,43	ΧΑΜΗΛΟ
TLR9	10,63	10,51	1,27	ΧΑΜΗΛΟ
SIGIRR	13,58	13,42	1,31	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
TLR3	15,04	15,35	1,50	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
TLR5	14,82	15,11	1,61	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
Σηματοδοτικό σύμπλοκο				
HMGB1	6,03	5,97	0,98	ΥΨΗΛΟ
HRAS	6,34	6,30	0,91	ΥΨΗΛΟ
HSPA1A	4,81	5,01	1,67	ΥΨΗΛΟ
HSPD1	5,84	5,91	1,08	ΥΨΗΛΟ
LY86	4,02	3,87	1,22	ΥΨΗΛΟ
MAPK8IP3	4,98	4,91	1,13	ΥΨΗΛΟ
MYD88	5,28	5,36	1,10	ΥΨΗΛΟ
PELI1	3,17	3,04	1,20	ΥΨΗΛΟ
RIPK2	6,59	6,58	0,89	ΥΨΗΛΟ
TICAM1	6,00	6,00	0,87	ΥΨΗΛΟ
TRAF6	6,29	6,34	0,87	ΥΨΗΛΟ
BTK	6,97	6,98	1,19	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ
IRAK1	8,60	8,36	1,74	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ
IRAK2	8,17	8,16	1,23	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ
LY96	6,80	6,82	0,91	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ
SARM1	8,10	7,97	1,06	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ
TOLLIP	7,71	7,66	0,82	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ
TICAM2	10,36	10,24	1,15	ΧΑΜΗΛΟ
TIRAP	10,66	10,56	1,09	ΧΑΜΗΛΟ
CD14	14,06	14,20	1,48	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
Τελεστές				
EIF2AK2	6,09	6,22	1,34	ΥΨΗΛΟ
NR2C2	5,47	5,49	0,87	ΥΨΗΛΟ
PRKRA	6,12	6,04	0,82	ΥΨΗΛΟ
UBE2N	4,20	4,21	0,95	ΥΨΗΛΟ
CASP8	8,90	8,98	1,13	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ
FADD	7,86	7,85	0,96	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ

→συνέχεια

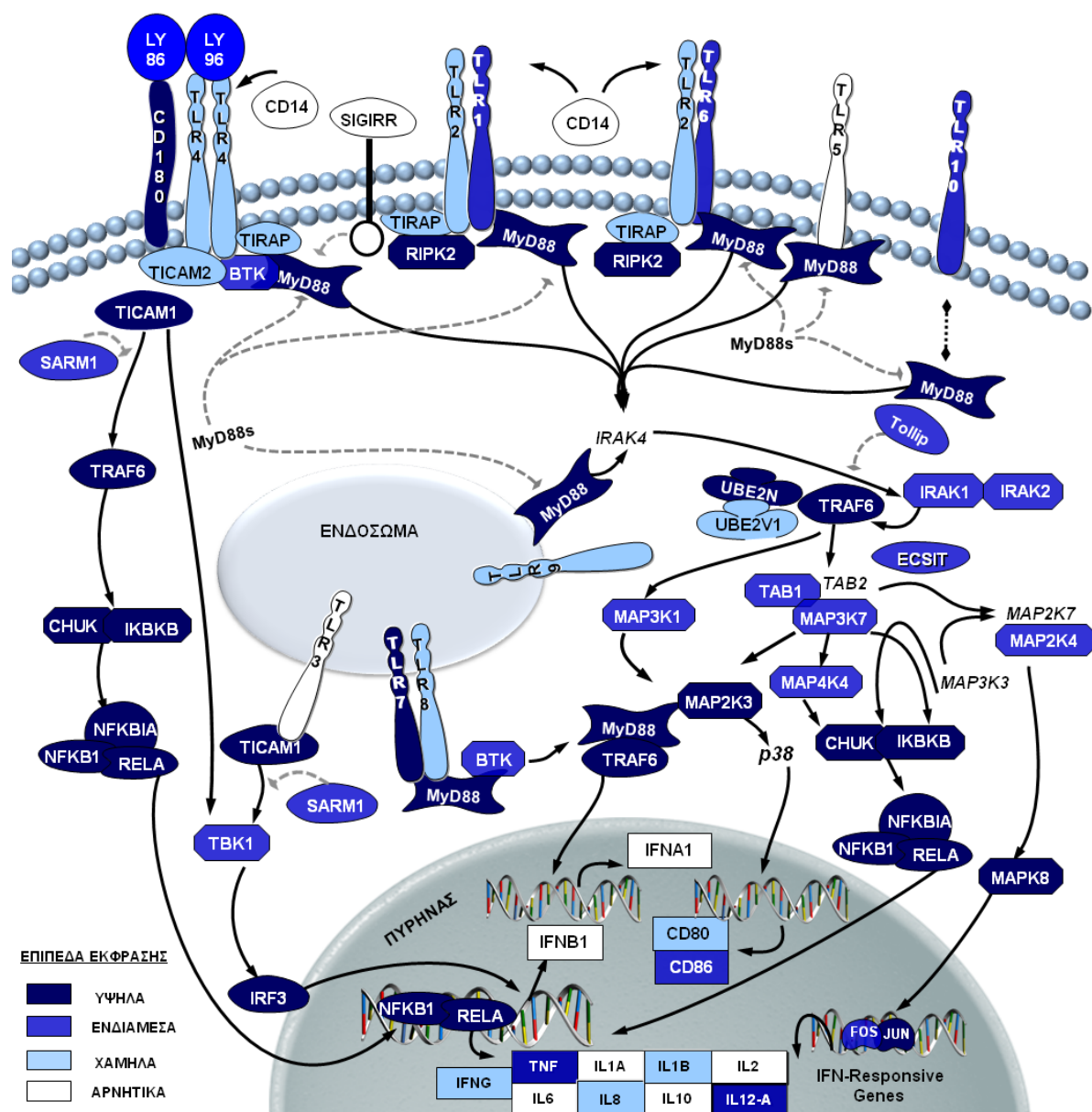
Πίνακας 20 (συνέχεια)

Γονίδιο	Μέση τιμή ΔCt	Διάμεση τιμή ΔCt	SD	Επίπεδο έκφρασης
Τελεστές				
MAP3K7	7,67	7,68	1,00	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ
PPARA	7,06	7,05	1,00	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ
TAB1	6,91	6,78	1,08	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ
ECSIT	6,67	6,65	0,74	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ
UBE2V1	11,78	11,55	1,40	ΧΑΜΗΛΟ
Μονοπάτια NF-κΒ /JNK/p38				
CHUK	6,41	6,36	1,15	ΥΨΗΛΟ
IKKBK	4,85	4,90	1,20	ΥΨΗΛΟ
JUN	4,65	4,74	1,86	ΥΨΗΛΟ
MAP2K3	5,95	5,93	0,96	ΥΨΗΛΟ
MAP3K1	2,51	2,40	1,05	ΥΨΗΛΟ
MAPK8	6,30	6,26	1,07	ΥΨΗΛΟ
NFKB1	4,86	4,89	1,01	ΥΨΗΛΟ
NFKBIA	2,97	2,99	1,08	ΥΨΗΛΟ
REL	4,24	4,22	1,00	ΥΨΗΛΟ
RELA	4,72	4,82	1,18	ΥΨΗΛΟ
ELK1	8,13	8,12	1,18	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ
FOS*	7,61	7,49	2,92	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ
MAP2K4	6,72	6,70	0,98	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ
MAP4K4*	7,66	7,10	2,09	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ
NFKB2	8,48	8,39	0,95	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ
NFKBIL1	8,91	9,55	2,37	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ
NFRKB	7,16	7,09	0,97	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ
CLEC4E	15,33	15,55	1,24	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
Κυτταροκίνες και συνδιεγερτικά μόρια				
CD86*	7,12	6,76	2,23	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ
LTA	7,69	7,66	1,26	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ
TNF	7,51	7,61	1,51	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ
IL12A	7,79	7,73	1,13	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ
CD80*	11,47	11,51	2,51	ΧΑΜΗΛΟ
IL1B*	12,49	12,71	2,22	ΧΑΜΗΛΟ
IL8*	11,43	11,16	2,79	ΧΑΜΗΛΟ
CCL2	15,03	15,24	1,38	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
CSF2	15,32	15,44	1,13	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
CSF3	15,44	15,56	1,01	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
IL10*	13,76	14,14	2,16	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
IL1A	14,28	14,43	1,40	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
IL2	15,05	15,19	1,39	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
IL6*	13,56	14,14	2,46	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
TNFRSF1A	14,41	14,59	1,29	ΑΡΝΗΤΙΚΟ

→συνέχεια

Πίνακας 20 (συνέχεια)

Γονίδιο	Μέση τιμή ΔCt	Διάμεση τιμή ΔCt	SD	Επίπεδο έκφρασης
Μονοπάτι IRF				
IRF1	6,06	6,10	1,35	ΥΨΗΛΟ
IRF3	4,52	4,39	1,07	ΥΨΗΛΟ
TBK1	7,29	7,37	0,80	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ
IFNG*	10,77	10,52	2,77	ΧΑΜΗΛΟ
CXCL10	14,72	14,89	1,57	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
IFNA1	15,24	15,44	1,35	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
IFNB1	14,51	14,68	1,38	ΑΡΝΗΤΙΚΟ



Εικόνα 21 - Σχηματική απεικόνιση επιπέδων έκφρασης μορίων της σηματοδοτικής οδού TLR στη ΧΑΛ. Για λόγους σαφήνειας, σε αυτή την εικόνα παρουσιάζονται μόνο τα κυριότερα μόρια που εμπλέκονται στη σηματοδότηση των TLRs. Λεπτομερή αποτελέσματα για τα επίπεδα έκφρασης των mRNA για όλα τα μόρια που αξιολογήθηκαν στα πλαίσια αυτής της μελέτης υπάρχουν στον πίνακα 20.

Αναλυτικά η έκφραση των 83 μορίων που αξιολογήθηκαν στην παρούσα σειρά έχει ως εξής:

I. Υποδοχείς

Συνολικά αναλύθηκαν 12 υποδοχείς (TLR1-TLR10 και οι σχετιζόμενοι με τους TLR CD180 και SIGIRR/TIR8) (Πίνακας 20, Εικόνα 21). Στην παρούσα ανάλυση, τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης mRNA καταγράφηκαν για τον TLR7 και τον CD180. Ενδιάμεση έκφραση καταγράφηκε για τους TLR1, TLR6 και TLR10, ενώ οι TLR2 και TLR9 χαρακτηρίζονταν από χαμηλή έκφραση. Οι TLR4 και TLR8 είχαν χαμηλή έως μη ανιχνεύσιμη έκφραση με σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ των θετικών περιπτώσεων. Οι περισσότεροι ασθενείς δεν εξέφραζαν TLR3 (174/192, 90,6%) και TLR5 (170/192, 88,5%). Σε 113/192 περιπτώσεις (58,8%) δεν εκφράζονταν ο αρνητικός ρυθμιστής της δράσης των TLRs, SIGIRR/TIR8. Στις ελάχιστες περιπτώσεις που εκφράζονταν οι TLR3, TLR5 και SIGIRR/TIR8, τα επίπεδα έκφρασης του mRNA ήταν πολύ χαμηλά.

II. Σύμπλοκο σηματοδότησης

Μετά την αναγνώριση των αντίστοιχων προσδετών τους, οι TLRs έρχονται σ' επαφή με μόρια προσαρμογείς, μεταξύ των οποίων οι MyD88, TIRAP, TICAM1, TICAM2 και SARM1 (Πίνακας 20, Εικόνα 21). Κάθε υποδοχέας αναγνωρίζει διαφορετικό προσδέτη και ενεργοποιεί συγκεκριμένο συνδυασμό προσαρμογέων. Στη συνέχεια, ακολουθεί αλληλεπίδραση με μέλη της οικογένειας των κινασών IRAK ώστε να σχηματιστεί το σύμπλοκο σηματοδότησης. Οι πρωτεΐνες IRAK διΐστανται στη συνέχεια από το σηματοδοτικό σύμπλοκο και αλληλεπιδρούν με την TRAF6.

Σχεδόν όλοι οι προσαρμογείς και τα μόρια που αλληλεπιδρούν με τους TLRs εκφράζονταν σε υψηλά επίπεδα. Πιο συγκεκριμένα, μεταξύ των προσαρμογέων, υψηλή έκφραση καταγράφηκε για τον MyD88, το κεντρικό σηματοδοτικό μόριο για όλους τους TLRs εκτός του TLR3, και τον TICAM1, που είναι υπεύθυνος για τη σηματοδότηση από τους TLR3 και TLR4. Η έκφραση του SARM1, ενός αρνητικού ρυθμιστή της TICAM1-εξαρτώμενης σηματοδότησης, ήταν ενδιάμεση. Τέλος, η έκφραση των προσαρμογέων TICAM2 και TIRAP, που απαιτούνται για τη μετάδοση του σήματος μέσω MyD88 και TICAM1, ήταν χαμηλή. Μεταξύ των μορίων που αλληλεπιδρούν με τους TLRs, υψηλή έκφραση καταγράφηκε για τα PELI1, LY86, HSPA1A, MAP8IP3, HSPD1, HMGB1, HRAS και RIPK2 (Πίνακας 20, Εικόνα 21). Η έκφραση του TOLLIP, που αναστέλλει την αυτοφωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των IRAK1 και TRAF6, ήταν ενδιάμεση. Επίσης ενδιάμεση ήταν και η έκφραση των LY96 και BTK. Υψηλή έκφραση καταγράφηκε για το TRAF6, ενώ η έκφραση των

IRAK1 και IRAK2 ήταν ενδιάμεση, με την έκφραση του IRAK1 να χαρακτηρίζεται επιπλέον από σημαντικές διακυμάνσεις. Όπως αναμενόταν, δεν παρατηρήθηκε έκφραση του CD14.

III. Τελεστές

Όλοι οι τελεστές που αξιολογήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης διαπιστώθηκε ότι εκφράζονται, μολονότι σε διαφορετικά επίπεδα. Οι UBE2N και UBE2V1, υπομονάδες του διμερούς συμπλόκου που εμπλέκεται στην αποδόμηση του TRAF6, εμφάνιζαν πολύ διαφορετική έκφραση (Πίνακας 20, Εικόνα 21). Πιο συγκεκριμένα τα επίπεδα του mRNA του UBE2N ήταν πολύ υψηλά (τα υψηλότερα που καταγράφηκαν μεταξύ των τελεστών της σηματοδοτικής οδού των TLRs), ενώ τα επίπεδα mRNA του UBE2V1 ήταν ομοιογενώς χαμηλά. Μεταξύ των υπολοίπων τελεστών, υψηλή έκφραση διαπιστώθηκε για τους NR2C2, PRKRA και EIF2AK2. Τα γονίδια CASP8, FADD, MAP3K7, TAB1, PPARA χαρακτηρίζονταν από ενδιάμεση έκφραση.

IV. Ενδοκυττάρια μονοπάτια των NF-κB και JNK/p38

Οι TLRs επάγουν την έκφραση κυταροκινών και συνδιεγερτικών μορίων μέσω της ενεργοποίησης των σηματοδοτικών οδών των NFκB και JNK/p38. Στην παρούσα μελέτη, υψηλή έκφραση καταγράφηκε για τα γονίδια που κωδικοποιούν το σύμπλοκο των IκB κινασών (IKK), το οποίο περιλαμβάνει την CHUK (επίσης γνωστή ως IKKα) και την IKBKB (επίσης γνωστή ως IKKβ) και τον αναστολέα του NF-κB, NFKBIA (επίσης γνωστός ως IKBα). Η έκφραση του NFKBIL1 (πρωτεΐνη τύπου IκB), που αναστέλλει την ενεργοποίηση του NF-κB από τις οδούς των TLR2 και TLR4, χαρακτηριζόταν από διακυμάνσεις. Μεταξύ των γονιδίων που κωδικοποιούν τις υπομονάδες του NF-κB και απελευθερώνονται μετά τη φωσφορυλίωση του NFKBIA από τις IKKs, υψηλή έκφραση καταγράφηκε για τα NFKB1 (p50), REL (c-rel) και RELA (p65), ενώ η έκφραση του NFKB2 (p52) ήταν ενδιάμεση (Πίνακας 20, Εικόνα 21).

Υψηλή έκφραση καταγράφηκε επίσης για την MAP3K1 κινάση, ενώ η MAP4K4, που θεωρείται ότι ενεργοποιεί την IKBKB, εμφάνιζε ετερογενή έκφραση.

Μεταξύ των μορίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι των JNK/p38, η υψηλότερη έκφραση καταγράφηκε για την MAP3K1, που επίσης εμπλέκεται στο μονοπάτι του NF-κB. Η έκφραση των MAP2K3 και MAPK8 ήταν υψηλή, ενώ της MAP2K4 ενδιάμεση (Πίνακας 20, Εικόνα 21). Σημαντικές διακυμάνσεις καταγράφηκαν για τους μεταγραφικούς παράγοντες JUN και FOS, όπου οι περισσότερες περιπτώσεις είχαν

υψηλή και ενδιάμεση έκφραση, αντιστοίχως. Η έκφραση του ELK1 ήταν ενδιάμεση, ενώ η CLEC4E δεν εκφραζόταν.

V. Μονοπάτι των IRFs

Οι TLRs μπορεί επίσης να επάγουν ιντερφερόνες τύπου I μέσω της ενεργοποίησης των παραγόντων ρύθμισης των ιντερφερονών (interferon regulatory factors - IRFs). Από τα μέλη του μονοπατιού των IRFs που αξιολογήθηκαν, η υψηλότερη έκφραση καταγράφηκε για τον IRF3, που ενεργοποιεί τη μεταγραφή των IFNs άλφα και βήτα καθώς και άλλων γονιδίων επαγόμενων από ιντερφερόνες γονιδίων. Υψηλή έκφραση καταγράφηκε επίσης για τον IRF1. Η έκφραση της IFNG παρουσίαζε διακυμάνσεις. Η TBK1 χαρακτηριζόταν από ενδιάμεση έκφραση, ενώ οι IFNA1, IFNB1 και CXCL10 δεν εκφράζονταν (Πίνακας 20, Εικόνα 21).

VI. Κυτταροκίνες και συνδιεγερτικά μόρια

Τα γονίδια LTA και TNF παρουσίαζαν ενδιάμεση έκφραση. Τα επίπεδα έκφρασης των IL8 και IL1B ήταν χαμηλά με σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ των ασθενών. Η πλειοψηφία των περιπτώσεων ήταν αρνητική για τις IL6 και IL10. Στις ελάχιστες περιπτώσεις που εκφράζονταν οι IL6 και IL10, τα επίπεδα έκφρασης του mRNA ήταν πολύ χαμηλά. Δεν καταγράφηκε έκφραση των γονιδίων στόχων TNFRSF1A, CCL2, CSF2, CSF3, IL1A και IL2. Η έκφραση των CD80 και CD86 ήταν χαμηλή και ενδιάμεση, αντίστοιχα, με σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ των ασθενών (Πίνακας 20, Εικόνα 21).

4.2.2 Πρωτεϊνική έκφραση επιλεγμένων μορίων σηματοδοτικής οδού των TLRs στη ΧΑΛ

Για να διαπιστώσουμε αν τα παρατηρούμενα πρότυπα έκφρασης σε επίπεδο mRNA αντικατοπτρίζουν την έκφραση λειτουργικών πρωτεϊνών, αναλύσαμε με κυτταρομετρία ροής (FACS) και/ή Western blot (WB) σε 30 και 59 περιπτώσεις ΧΑΛ με διαθέσιμο ικανοποιητικό αριθμό κυττάρων, αντίστοιχα, τους TLRs και τις πρωτεΐνες CD80 και CD86 (Πίνακες 21, 22).

Με όριο θετικότητας το 5% με την κυτταρομετρία ροής φάνηκε ότι, σε συμφωνία με τα επίπεδα των mRNAs τους, οι πρωτεΐνες TLR1, TLR7, TLR10 και CD86 εκφράζονταν σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις ΧΑΛ. Αντίθετα δεν διαπιστώθηκε έκφραση του CD80 σε καμία περίπτωση. Έκφραση του TLR9 καταγράφηκε σε 8/30 (26,6%) περιπτώσεις

που ελέχθησαν, ενώ μόλις 3/30 περιπτώσεις διέθεταν περισσότερα από 10% θετικά κύτταρα. Η πρωτεΐνη TLR6 εκφραζόταν σε 20/30 περιπτώσεις. Παρά τα υψηλά επίπεδα mRNA, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων (17/20) ο TLR6 εκφραζόταν από ένα μικρό ποσοστό νεοπλασματικών Β λεμφοκυττάρων (5-10%). Αντίθετα οι TLR2 και TLR8 εκφράζονταν από όλες σχεδόν τις περιπτώσεις παρά την χαμηλή έκφραση τους σε επίπεδο mRNA.

Πίνακας 21 – Ποσοστά % θετικών νεοπλασματικών Β κυττάρων στην κυτταρομετρία ροής

A/A	TLR1	TLR2	TLR4	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9	TLR10	CD80	CD86
P103	8,2	21,1	2,0	5,0	70,7	54,7	5,1	21,2	0,7	63,9
P1156	18,1	22,3	3,1	1,8	71,8	24,6	0,9	75,7	0,4	15,5
P1188	51,4	36,6	6,4	4,9	75,5	26,6	0,9	80,3	0,4	54,5
P1540	55,2	40,2	4,8	6,4	71,6	3,6	1,6	84,2	4,2	75,7
P1626	21,3	19,1	2,6	8,1	63,5	21,1	44,9	34,3	3,9	9,9
P1697	8,5	58,5	0,6	4,1	68,6	35,0	19,5	39,9	0,4	39,5
P2355	63,0	25,9	1,9	18,7	87,1	32,5	3,7	46,9	0,2	15,1
P3492	50,9	41,6	6,5	8,9	71,4	25,7	4,4	38,1	0,1	6,5
P3870	62,0	43,9	1,5	6,2	81,1	56,9	3,0	93,5	4,6	21,0
P427	19,9	28,5	2,9	4,1	65,6	45,7	3,0	48,1	2,7	22,4
P4383	41,2	37,7	3,7	5,7	60,9	20,3	2,5	76,8	0,5	18,1
P4557	37,3	12,1	2,4	7,1	54,6	25,2	1,8	69,4	0,6	44,9
P4699	85,4	43,9	2,8	10,1	93,7	30,7	0,9	97,7	2,0	51,1
P4712	21,6	31,7	2,4	6,2	62,8	35,4	4,0	42,7	3,1	18,0
P4994	28,5	21,2	0,6	6,0	59,6	92,4	2,3	18,3	1,0	39,1
P5017	27,7	34,6	2,7	4,4	66,7	23,9	1,1	53,1	0,1	13,5
P5092	24,8	45,0	2,1	4,7	64,6	33,8	3,9	53,3	0,2	15,8
P511	6,8	36,4	2,2	6,7	82,8	52,8	4,8	57,5	0,3	50,2
P5283	13,3	42,4	0,7	6,3	85,1	26,0	24,3	48,5	0,1	23,7
P571	67,3	56,9	3,0	13,8	92,0	45,8	1,9	82,1	0,1	23,9
P5949	36,0	37,2	4,0	4,6	86,0	34,9	2,2	75,3	0,1	19,1
P6124	37,2	32,3	3,1	5,6	83,6	57,0	1,2	54,5	0,1	34,7
P7317	5,6	17,2	3,0	4,9	77,7	16,1	3,1	19,8	0,5	13,7
P7395	56,0	34,6	6,3	5,8	80,5	50,0	6,9	70,7	0,1	5,3
P775	42,7	23,0	3,7	6,2	87,1	36,8	4,6	52,7	0,8	94,2
P781	29,7	32,0	2,3	5,7	92,5	67,7	3,9	46,0	2,6	52,2
P8762	46,0	30,8	1,8	3,4	75,3	63,3	2,1	70,6	0,2	27,5
P3551	39,6	42,0	2,1	3,5	70,9	62,3	2,7	33,6	2,8	45,3
P3916	12,7	15,3	2,2	7,0	71,2	45,6	2,4	26,2	2,8	42,0
P5610	44,3	36,4	2,8	6,0	86,8	98,6	4,5	44,5	2,1	60,5

Τα πρότυπα έκφρασης των TLR1, TLR2, TLR8 και TLR9 επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω με WB (Εικόνα). Πιο συγκεκριμένα, οι TLR1 και TLR2 ήταν θετικοί σε όλες τις περιπτώσεις που ελέγχθηκαν, ο TLR8 ήταν θετικός σε 43/59 περιπτώσεις (72,7%), ενώ ο TLR9 ήταν θετικός σε 18/59 (30,5%) περιπτώσεις, με χαμηλά επίπεδα έκφρασης σε όλες τις περιπτώσεις.

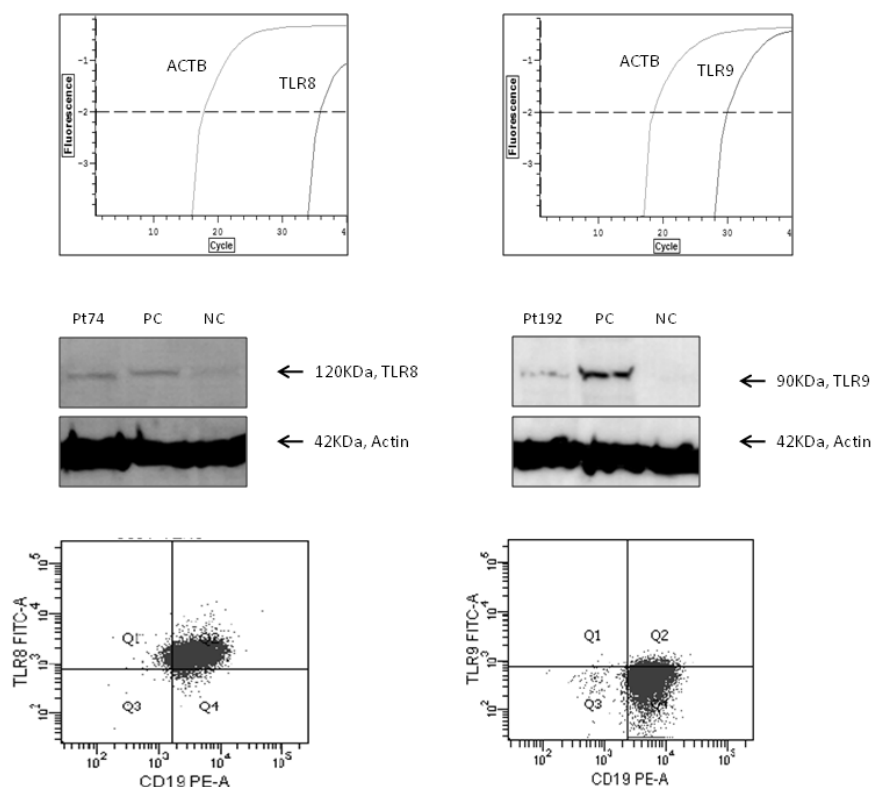
Πίνακας 22 – Αποτελέσματα πειραμάτων Western. (Λόγος προς τη β-ακτίνη).

A/A	TLR1	TLR2	TLR8	TLR9
N1713	0,193	0,313	0,000	0,000
N1777	0,192	0,132	0,000	0,000
N1887	0,074	0,185	0,108	0,000
N2687	0,422	0,310	0,081	0,000
N3517	0,215	0,128	0,148	0,131
N3527	0,065	0,156	0,097	0,000
N4617	0,168	0,170	0,000	0,000
N4691	0,156	0,062	0,138	0,113
N4707	0,060	0,114	0,137	0,000
N4969	0,206	0,254	0,118	0,000
N6015	0,275	0,179	0,000	0,062
N6084	0,187	0,240	0,119	0,123
P103	0,154	0,154	0,104	0,000
P1050	0,118	0,105	0,000	0,060
P1060	0,090	0,162	0,083	0,070
P1097	0,228	0,155	0,101	0,000
P1289	0,115	0,143	0,189	0,000
P1615	0,065	0,120	0,093	0,000
P1894	0,087	0,198	0,071	0,040
P2329	0,178	0,293	0,000	0,000
P2528	0,078	0,098	0,170	0,000
P2685	0,110	0,110	0,117	0,000
P2740	0,175	0,090	0,091	0,070
P280	0,090	0,080	0,167	0,000
P3020	0,084	0,122	0,000	0,000
P3021	0,092	0,430	0,112	0,000
P3073	0,120	0,070	0,082	0,000
P317	0,096	0,189	0,162	0,031
P325	0,101	0,079	0,198	0,039

→συνέχεια

Πίνακας 22 (συνέχεια)

A/A	TLR1	TLR2	TLR8	TLR9
P326	0,063	0,090	0,142	0,000
P3492	0,112	0,050	0,000	0,000
P3716	0,130	0,065	0,101	0,107
P3870	0,076	0,090	0,078	0,000
P3966	0,080	0,173	0,125	0,000
P4086	0,214	0,264	0,136	0,084
P427	0,087	0,142	0,089	0,000
P4383	0,080	0,096	0,080	0,000
P4438	0,088	0,149	0,000	0,020
P450	0,059	0,103	0,138	0,037
P4994	0,088	0,146	0,203	0,000
P5092	0,218	0,268	0,103	0,051
P5231	0,155	0,213	0,122	0,000
P5359	0,190	0,100	0,000	0,000
P571	0,120	0,082	0,000	0,000
P585	0,110	0,115	0,101	0,035
P5949	0,130	0,184	0,000	0,050
P5975	0,205	0,264	0,101	0,000
P6079	0,159	0,166	0,130	0,000
P6090	0,160	0,730	0,125	0,000
P611	0,120	0,351	0,000	0,000
P6124	0,115	0,202	0,067	0,000
P6237	0,099	0,110	0,167	0,000
P6832	0,145	0,384	0,000	0,000
P7057	0,060	0,150	0,000	0,000
P711	0,143	0,620	0,062	0,034
P7395	0,154	0,108	0,084	0,000
P8071	0,160	0,223	0,093	0,000
N6450	0,285	0,195	0,000	0,000
N6490	0,234	0,186	0,196	0,000



Εικόνα 22 - Έκφραση των TLR8 και TLR9 σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης στη ΧΜ. Διαγράμματα RQ-PCR (πάνω), απεικονίσεις Western blotting (μέσο) και αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής (κάτω) για δύο αντιπροσωπευτικές περιπτώσεις ασθενών. Συνολικά, τόσο τα επίπεδα mRNA όσο και τα επίπεδα πρωτεΐνης του TLR9 ήταν χαμηλά, ενώ τα πρωτεϊνικά επίπεδα του TLR8 ήταν σχετικά υψηλά παρά τα χαμηλά επίπεδα mRNA, υποδηλώνοντας πιθανή μετα-μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης του TLR8. ACTB: β-ακτίνη.

4.2.3 Συσχέτιση του προτύπου έκφρασης των TLRs με τα ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά του BcR

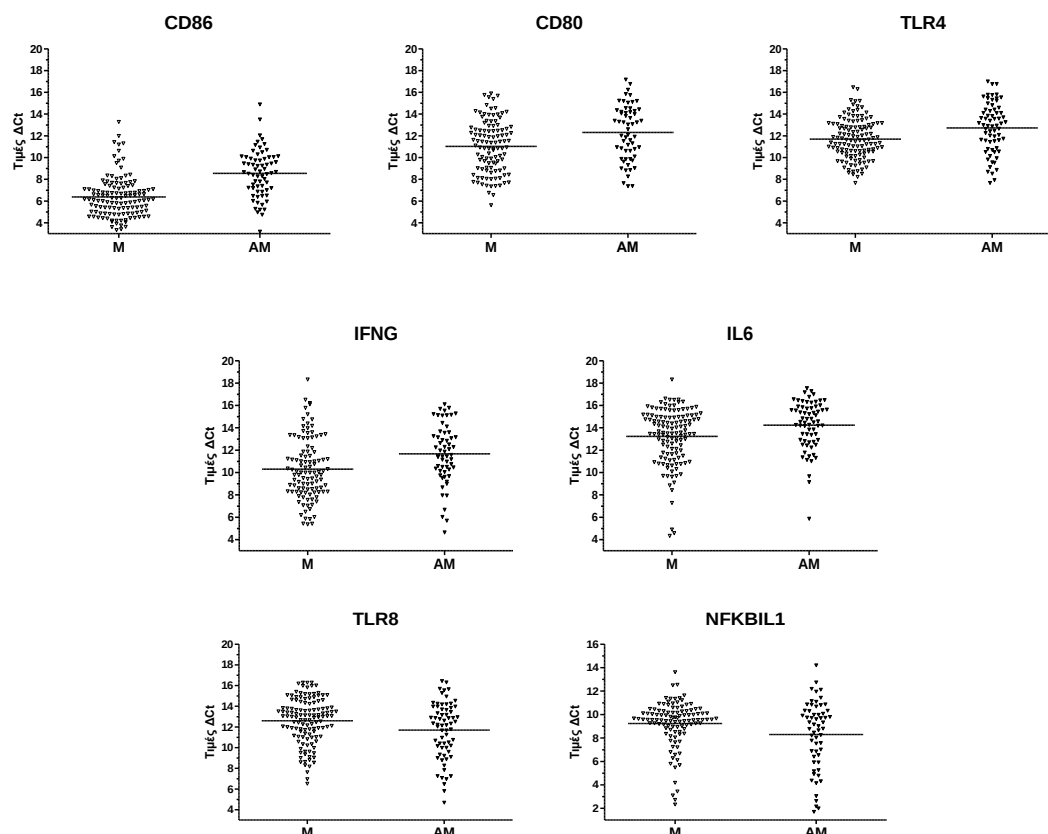
Ακολούθησε συγκριτική μελέτη του προτύπου έκφρασης των TLRs σε υποομάδες ασθενών που διακρίθηκαν με βάση τα ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά του BcR, όπως το status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV, το ρεπερτόριο των γονιδίων IGHV και η έκφραση στερεότυπων BcRs.

I. Status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV

Συγκριτική μελέτη του προτύπου έκφρασης σε υποομάδες ασθενών που φέρουν μεταλλαγμένα έναντι αυτών που φέρουν αμετάλλακτα γονίδια IGHV (124 και 67 περιπτώσεις, αντιστοίχως) απέδειξε αυξημένη έκφραση των CD80, CD86, IL6, IFNG και TLR4 και ελαττωμένη έκφραση των TLR8 και NFKBIL1 στη μεταλλαγμένη υποομάδα σε βαθμό στατιστικά σημαντικό για όλα τα προαναφερθέντα γονίδια (Εικόνα 23, Πίνακας 23). Η μεγαλύτερη διαφορά διαπιστώθηκε για το CD86. Διαφορές στην έκφραση της πρωτεΐνης CD86 διαπιστώθηκαν επίσης με κυτταρομετρία ροής: συγκεκριμένα, το μέσο ποσοστό θετικών κυττάρων στην υποομάδα με τα μεταλλαγμένα γονίδια IGHV ήταν 42% (εύρος, 9,9–94,2%) ενώ στην υποομάδα με τα αμετάλλακτα γονίδια IGHV ήταν 23% (εύρος, 5,3–51,1%, $p < 0,01$).

Πίνακας 23 - Γονίδια με στατιστικά σημαντικές διαφορές έκφρασης mRNA σε ασθενείς με μεταλλαγμένους (M) ή αμετάλλακτους (AM) υποδοχείς BcR.

Γονίδιο	M Μέση τιμή ΔC_t	AM Μέση τιμή ΔC_t	M vs AM $2^{-\Delta\Delta C_t}$	M vs AM FD	M vs AM p=
CD80	11,02	12,31	2,44	2,44	0,00172
CD86	6,37	8,54	4,50	4,50	<0,0001
IL6	13,23	14,23	2,00	2,00	0,00466
IFNG	10,30	11,67	2,58	2,58	0,00200
TLR4	11,69	12,73	2,05	2,05	0,00190
TLR8	12,60	11,70	0,54	-2,07	0,02150
NFKBIL1	9,24	8,30	0,52	-2,02	0,02895

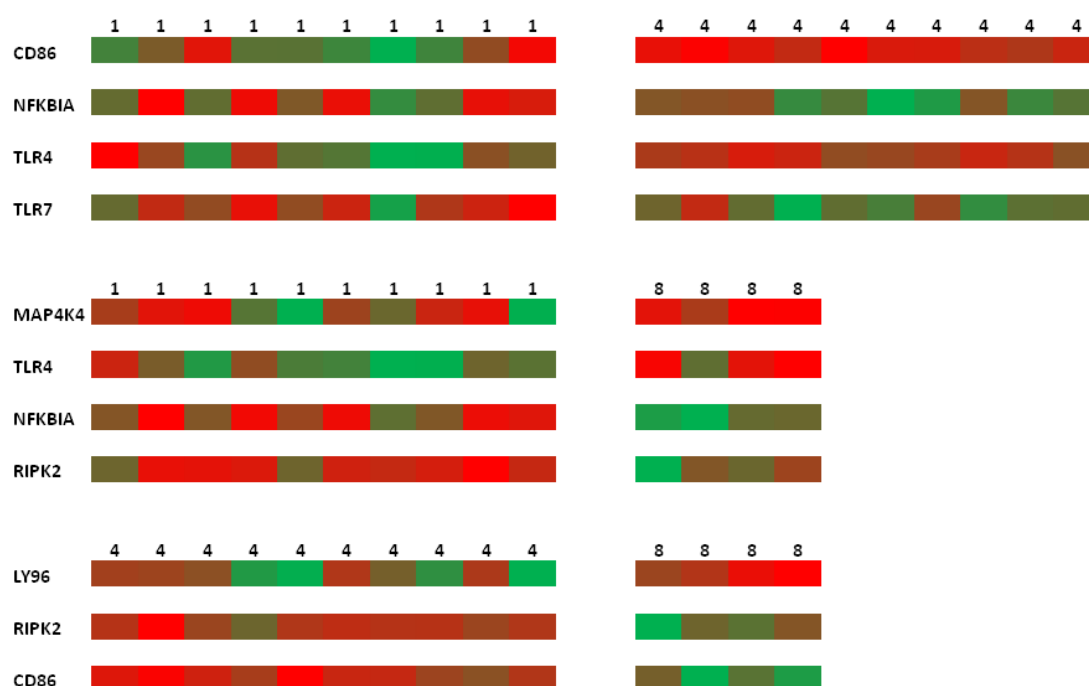


Εικόνα 23 - Διαφορετική έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το μονοπάτι των TLRs σε ασθενείς με ΧΛΛ που φέρουν μεταλλαγμένους (M) ή αμετάλλακτους (AM) υποδοχείς BcR. IL6: ιντερλευκίνη 6, IFNG: ιντερφερόνη-γ, NFKBIL1: Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 1. Σημείωση: Χαμηλότερες τιμές στον άξονα των Υ στην πραγματικότητα είναι ενδεικτικές υψηλότερων επιπέδων έκφρασης, λαμβάνοντας υπόψη ότι η τιμή κάθε δείγματος υπολογίζεται ως η διαφορά μεταξύ της τιμής Ct του γονιδίου που μας ενδιαφέρει και της μέσης τιμής Ct των ιδιοσυστατικών γονιδίων. Περισσότερες λεπτομέρειες δίνονται στην παράγραφο 3.2.2.4.2. Για την κατασκευή των γραφημάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, USA).

II. Ρεπερτόριο των γονιδίων IGHV και στερεοτυπία του BcR

Αναλύσαμε τα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης σε περιπτώσεις που εκφράζουν στερεότυπους BcRs και συγκεκριμένα περιπτώσεις που ανήκαν στο υποσύνολο #4 (μεταλλαγμένος BcR IGHV4-34/1GKV2-30, 10 περιπτώσεις), #1 (αμετάλλακτος BcR IGHV1/5/7-IGKV1(D)-39, 10 περιπτώσεις) και #8 (αμετάλλακτος BcR IGHV4-39/IGKV1(D)-39, 4 περιπτώσεις). Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) και συγκεκριμένα: (i) αυξημένη έκφραση των TLR7 και NFKB1A και ελαττωμένη έκφραση των CD86 και TLR4 στο υποσύνολο #1 έναντι του υποσυνόλου

#4, αντιστοίχως, (ii) αυξημένη έκφραση των MAP4K4 και TLR4 και ελαττωμένη έκφραση των NFKB1A και RIPK2 στο υποσύνολο #8 έναντι του υποσυνόλου #1, αντιστοίχως, και τέλος (iii) αυξημένη έκφραση του LY96 και ελαττωμένη έκφραση των RIPK2 και CD86 στο υποσύνολο #8 έναντι του υποσυνόλου #4, αντιστοίχως (Πίνακας 24, Εικόνα 24).



Εικόνα 24 - Διαφορετικά πρότυπα έκφρασης σε υποσύνολα με στερεότυπους BcRs. Κάθε στήλη αναφέρεται σε μια διαφορετική περίπτωση, ενώ κάθε κελί αναπαριστά γραφικά τα ακριβή αποτελέσματα (τιμές ΔC_t) για μια δεδομένη περίπτωση. Χρησιμοποιώντας έναν κώδικα 2 χρωμάτων (κόκκινο, πράσινο) τα κελιά διαμορφώθηκαν κατάλληλα ώστε: κόκκινο υψηλή έκφραση, πράσινο χαμηλή έκφραση. 1: υποσύνολο #1 (IGHV1/5/7-IGKV1(D)-39); 4: υποσύνολο #4 (IGHV4-34/IGKV2-30); 8: υποσύνολο #8 (IGHV4-39/IGKV1(D)-39).

Πίνακας 24 - Γονίδια που παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε περιπτώσεις που έφεραν στερεότυπους BcRs και ανήκαν στα υποσύνολα #1, #4 και #8.

Γονίδιο	Μέση τιμή ΔCt	Μέση τιμή ΔCt	2 ⁻ ΔΔCt	Διαφορά έκφρασης	t-test p
#1 vs #4	#1	#4	#1 vs #4	#1 vs #4	#1 vs #4
CD86	8,13	5,46	0,16	-6,35	0,002
TLR4	13,78	11,826	0,26	-3,89	0,025
TLR7	5,39	6,42	2,05	2,05	0,031
NFKB1A	2,63	3,60	1,96	2,06	0,024
#1 vs #8	#1	#8	#1 vs #8	#1 vs #8	#1 vs #8
NFKB1A	2,63	4,58	0,26	-3,88	0,008
RIPK2	6,34	8,17	0,28	-3,55	0,028
MAP4K4	8,59	6,46	4,37	4,37	0,031
TLR4	13,78	9,42	20,56	20,56	0,036
#4 vs #8	#4	#8	#4 vs #8	#4 vs #8	#4 vs #8
LY96	6,76	5,74	2,03	2,03	0,011
RIPK2	6,70	8,17	0,36	-2,76	0,038
CD86	5,46	7,89	0,19	-5,40	0,008

Για να διαπιστωθεί αν αυτά τα διακριτά, ειδικά για κάθε υποσύνολο (subset-biased) πρότυπα ήταν ανεξάρτητα της χρήσης του γονιδίου IGHV ή του status των μεταλλάξεων, επικεντρωθήκαμε στα επιμέρους υποσύνολα και πραγματοποιήσαμε συγκρίσεις μεταξύ των περιπτώσεων που ανήκαν σε κάποιο από τα προαναφερθέντα υποσύνολα και των περιπτώσεων που έφεραν τα ίδια γονίδια IGHV χωρίς να ανήκουν σε κάποια στερεότυπο υποσύνολο.

Πιο συγκεκριμένα συγκρίναμε το υποσύνολο #1 με: (i) την υποομάδα που έφερε αμετάλλακτους υποδοχείς BcR και (ii) τις περιπτώσεις που δεν ανήκουν στο υποσύνολο #1 ενώ εκφράζουν BcRs με τα γονίδια IGHV1/5/7-IGKV1(D)-39. Στην πρώτη σύγκριση παρατηρήθηκε υψηλότερη έκφραση του UBE2V1 ($p=0,011$) στο υποσύνολο #1, ενώ η δεύτερη σύγκριση υπέδειξε ότι το υποσύνολο #1 χαρακτηρίζονταν από υψηλότερη έκφραση του TLR8 ($p=0,0228$) και χαμηλότερη έκφραση της IFNG ($p=0,0061$).

Κατ' αντίστοιχο τρόπο συγκρίναμε το υποσύνολο #4 με: (i) την υποομάδα που έφερε μεταλλαγμένους υποδοχείς BcR και (ii) την υποομάδα που έφερε IGHV4-34 BcRs και δεν ανήκαν στο υποσύνολο #4. Το υποσύνολο #4 χαρακτηρίζονταν από υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του CD86 ($p<0,05$) και χαμηλότερα επίπεδα της IL10 ($p<0,05$) και στις δύο συγκρίσεις. Επιπλέον, το υποσύνολο #4 παρουσίαζε χαμηλότερη έκφραση της IFNG ($p<0,05$) συγκρινόμενο με την υποομάδα που έφερε μεταλλαγμένους

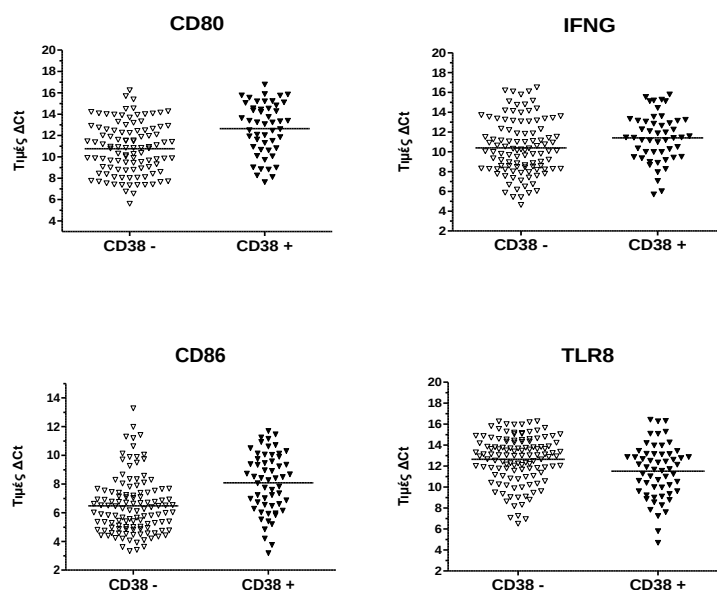
υποδοχείς BcR και χαμηλότερη έκφραση του NFKBIA ($p < 0,05$) συγκρινόμενο με την υποομάδα που έφερεIGHV4-34 BcRs εκτός υποσύνολου #4

Τέλος, η σύγκριση των περιπτώσεων που ανήκουν στο υποσύνολο #8 με εκείνες που δεν ανήκουν σε στερεότυπο υποσύνολο υπέδειξε υψηλότερη έκφραση του LY96 ($p = 0,0131$) και χαμηλότερη έκφραση των RIPK2 ($p = 0,0453$) και JUN ($p = 0,0272$) στις περιπτώσεις που ανήκουν στο στερεότυπο υποσύνολο #8.

4.2.4 Συσχέτιση του προτύπου έκφρασης των TLRs με την έκφραση του CD38

Στην συνέχεια αναζητήσαμε την παρουσία διαφορών στα πρότυπα έκφρασης μεταξύ υποομάδων ασθενών που διακρίθηκαν με βάση την έκφραση του CD38.

Με όριο θετικότητας το 7%, 57 από τις 177 περιπτώσεις με διαθέσιμα στοιχεία, χαρακτηρίστηκαν ως CD38 θετικές και 120 περιπτώσεις CD38 αρνητικές. Η σύγκριση μεταξύ αυτών των 2 υποομάδων υπέδειξε χαμηλότερη έκφραση των CD80 ($p < 0,0001$), CD86 ($p < 0,0001$) και IFNG ($p = 0,024$) και υψηλότερη έκφραση του TLR8 ($p = 0,005$) στην υποομάδα των CD38 θετικών περιπτώσεων (Πίνακας 25, Εικόνα 25).



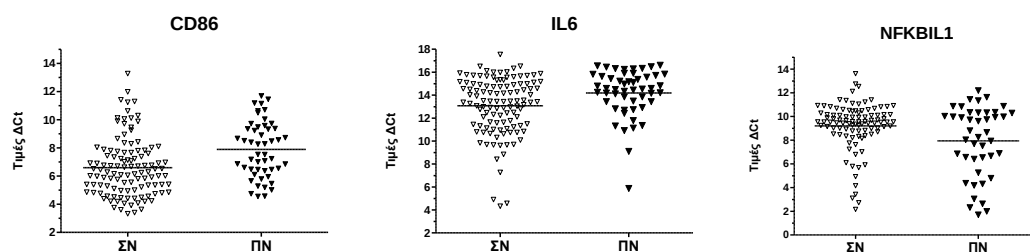
Εικόνα 25 - Διαφορετική έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το μονοπάτι των TLRs ανάλογα με την έκφραση του CD38. IFNG: ιντερφερόνη-γ.

Πίνακας 25 - Γονίδια που παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ CD38 αρνητικών (CD38 -) και CD38 θετικών (CD38 +) περιπτώσεων

Γονίδιο	CD38 - Μέση τιμή ΔCt	CD38 + Μέση τιμή ΔCt	2 ^{ΔΔCt}	Διαφορά έκφρασης	t-test p=
CD80	10,76	12,65	3,69	3,69	<0,0001
CD86	6,48	8,09	3,05	3,05	<0,0001
IFNG	10,40	11,40	2,00	2,00	0,02422
TLR8	12,65	11,52	0,46	-2,19	0,00522

4.2.5 Συσχέτιση του προτύπου έκφρασης των TLRs με την πρόοδο της νόσου και την ολική επιβίωση

Στην παρούσα μελέτη, με μέσο χρόνο παρακολούθησης των ασθενών 53 μήνες (εύρος 4-278 μήνες), πενήντα από τους 163 ασθενείς με διαθέσιμα κλινικά στοιχεία, παρουσίασαν πρόοδο της νόσου και 113 ασθενείς παρέμειναν σταθεροί. Ο μέσος χρόνος χωρίς πρόοδο της νόσου (progression free survival, PFS) ήταν 72 μήνες, ενώ η μέση επιβίωση (overall survival, OS) ήταν 202 μήνες (95% C.I.: 44,2-99,8 για PFS και 123-281 για την OS). Η σύγκριση μεταξύ των δύο υποομάδων ασθενών υπέδειξε υψηλότερη έκφραση του NFKBIL1 ($p=0,0148$) και χαμηλότερη έκφραση των CD86 ($p<0,0001$) και IL6 ($p=0,0039$) στους ασθενείς που παρουσίασαν πρόοδο κατά την πορεία της νόσου (Εικόνα 26, Πίνακας 26).



Εικόνα 26 - Διαφορετική έκφραση CD86, IL6 και NFKBIL1 στην υποομάδα των ασθενών με σταθερή πορεία νόσου (ΣΝ) έναντι αυτών που παρουσίασαν πρόοδο της νόσου (ΠΝ). IL6: ιντερλευκίνη 6, NFKBIL1: Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 1.

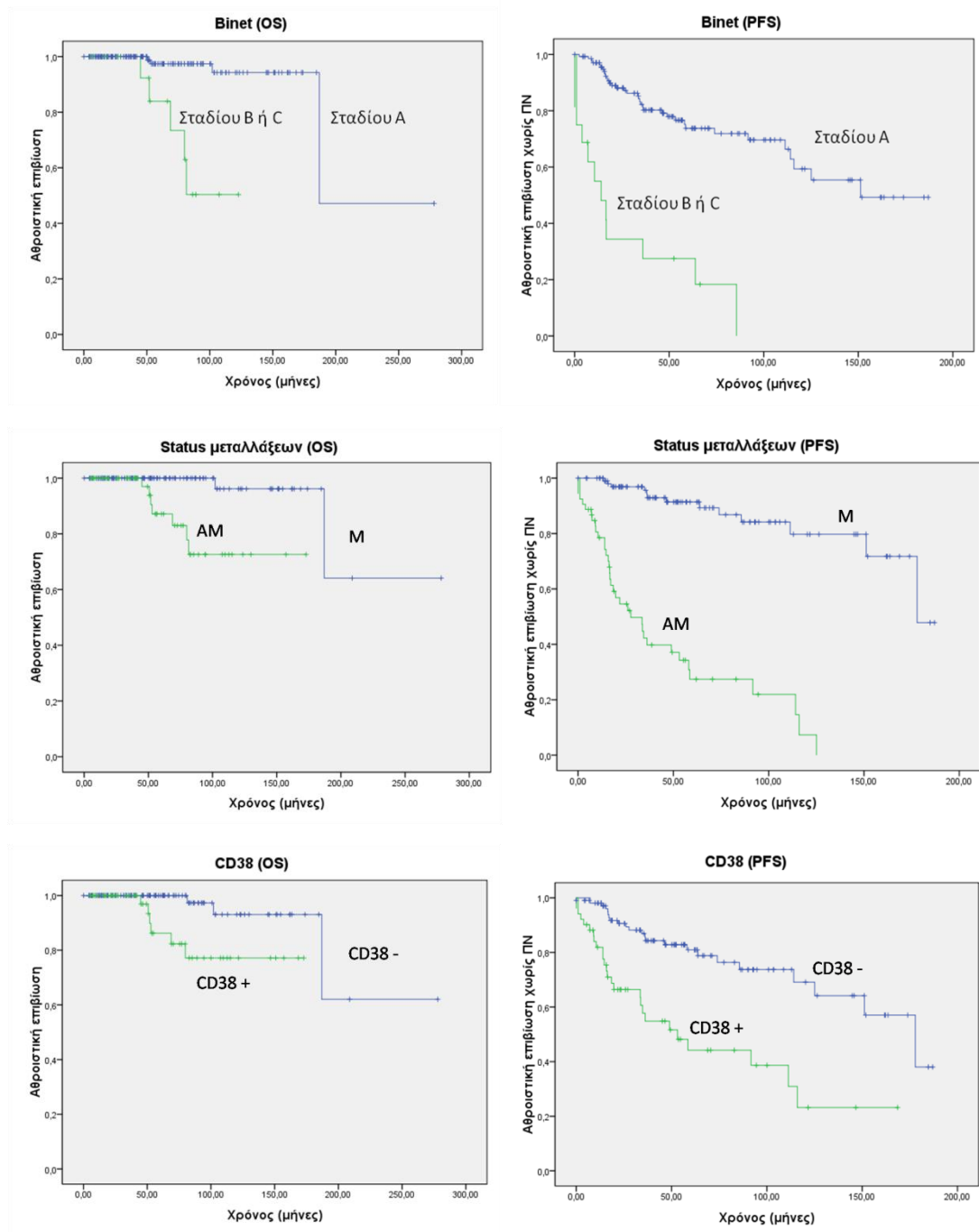
Πίνακας 26 - Γονίδια που παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην υποομάδα των ασθενών με σταθερή πορεία νόσου (ΣΝ) εναντίον αυτών που παρουσίασαν πρόοδο της νόσου (ΠΝ)

Γονίδιο	ΠΝ Μέση τιμή ΔCt	ΣΝ Μέση τιμή ΔCt	2 ⁻ ΔΔCt	Διαφορά έκφρασης	t-test p=
CD86	7,90	6,60	0,41	-2,46	0,0002
IL6	14,19	13,07	0,46	-2,17	0,0039
NFKBIL1	7,94	9,21	2,41	2,41	0,0148

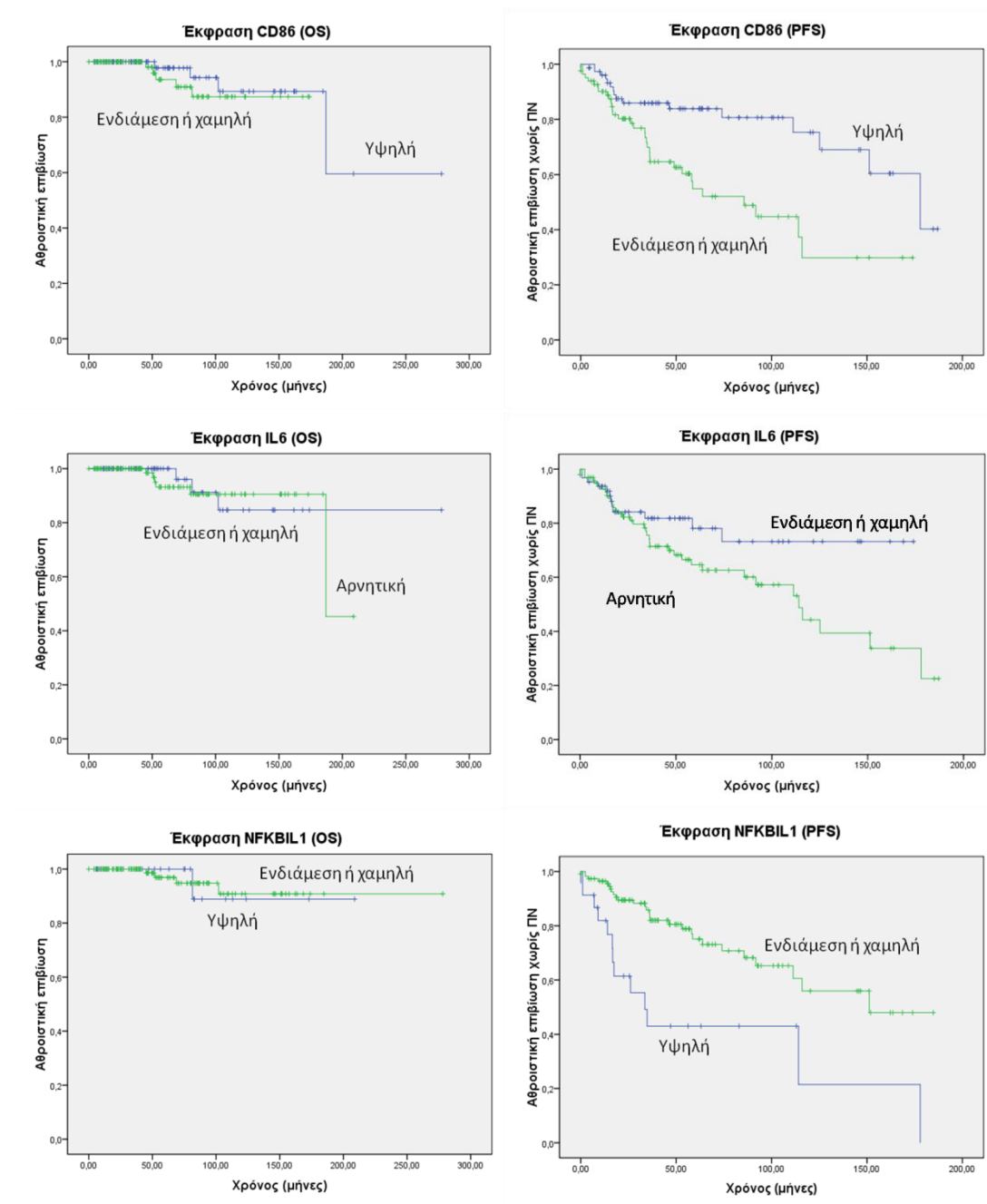
Γονίδια με σημαντικές διακυμάνσεις στα επίπεδα έκφρασης αξιολογήθηκαν περαιτέρω για πιθανές συσχετίσεις με την PFS ή την OS. Στη μονοπαραμετρική ανάλυση, σημαντικές παράμετροι ($p < 0,05$) τόσο για την PFS όσο και για την OS ήταν το στάδιο κατά Binet στη διάγνωση, το status των μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV και η έκφραση του CD38. Η αύξηση της έκφρασης του CD86, της IL6 και η μείωση της έκφρασης του NFKBIL1 εμφάνισαν θετική συσχέτιση μόνο με την PFS. Η πολυπαραμετρική ανάλυση (Cox proportional hazard regression analysis), που περιελάμβανε όλες τις παραμέτρους που παρουσίαζαν σημαντικές συσχετίσεις, υπέδειξε ότι μόνο το στάδιο της νόσου κατά τη διάγνωση και το status των μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV διατήρησαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση τόσο με την PFS όσο και με την OS.

Πίνακας 27 - Παράμετροι που παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην OS και την PFS στην υποομάδα των ασθενών με σταθερή πορεία νόσου (ΣΝ) έναντι αυτών που παρουσίασαν πρόοδο της νόσου (ΠΝ)

Παράμετρος	OS Log rank test	PFS Log rank test
Status μεταλλάξεων	<0,005	<0,005
CD38	0,006	<0,005
Binet	<0,005	<0,005
CD86	0,445	<0,005
IL6	0,819	0,052
NFKBIL1	0,959	<0,005



Εικόνα 27 - Καμπύλες επιβίωσης (OS) και επιβίωσης χωρίς πρόοδο νόσου (PFS) ανάλογα με το κλινικό στάδιο κατά τη διάγνωση (Binet), το status των μεταλλάξεων και την έκφραση του CD38, (M=μεταλλαγμένος, AM=αμετάλλακτος)



Εικόνα 28 - Καμπύλες επιβίωσης (OS) και επιβίωσης χωρίς πρόοδο νόσου (PFS) ανάλογα με την έκφραση των CD86, IL6 και NFKBIL1.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Γενικά

Πρόσφατα μοριακά, λειτουργικά και επιδημιολογικά δεδομένα προτείνουν ότι τόσο αυτοαντιγόνα όσο και εξωγενή αντιγόνα που εκφράζονται από κοινά παθογόνα πιθανόν εμπλέκονται στην ανοσο-παθογένεια της ΧΛΛ, επιλέγοντας και διεγείροντας τα πρόδρομα κύτταρα της ΧΛΛ (ή ακόμα και αυτά καθεαυτά τα ΧΛΛ κύτταρα) μέσω κατάλληλων αντιγονικών υποδοχέων.(165) Μέχρι σήμερα, ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στο ρόλο υποδοχέων ειδικής ανοσίας (BcRs), ενώ έχει σχετικά αγνοηθεί το ενδεχόμενο της αντιγονικής διέγερσης μέσω υποδοχέων της έμφυτης ανοσίας, όπως οι TLRs που χαρακτηρίζονται από συνδιεγερτική δράση στις άνοσες απαντήσεις ειδικού τύπου.

Η παρούσα μελέτη παρακινήθηκε από την υπόθεση ότι σε κάποιους ασθενείς τα λευχαιμικά κύτταρα πιθανόν ενεργοποιούνται από την αναγνώριση μικροβιακών αντιγόνων ή αυτοαντιγόνων. Με δεδομένη τη συνδιεγερτική δράση των TLR προς τους BcRs, επιχειρήσαμε μια εκτεταμένη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης της σηματοδοτικής οδού TLR σε 192 ασθενείς με ΧΛΛ, τη μεγαλύτερη σειρά διεθνώς. Το μέγεθος της ομάδας μελέτης σε συνδυασμό με την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων παρέχουν μεγάλη βεβαιότητα για την αξιοπιστία των συμπερασμάτων που προέκυψαν από την ανάλυση.

Η χρήση της τεχνολογίας των συστοιχιών PCR (PCR arrays) που εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη επέτρεψε τη συσσώρευση μεγάλου όγκου πληροφοριών που αφορούν όχι μόνο στην έκφραση των ίδιων των TLR αλλά και πολλών μορίων που συμμετέχουν στη σηματοδότηση. Η ανάλυση περιλάμβανε τους ίδιους τους TLRs, προσαρμογείς, τελεστές και αναστολείς της σηματοδοτικής οδού TLR, καθώς και διάφορα μέλη των σηματοδοτικών οδών NF-κB, JNK/p38, NF/IL6 και IRF που αλληλεπιδρούν με το μονοπάτι των υποδοχέων TLR.

Όπως προαναφέρθηκε, τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων TLR διαφέρουν στα διάφορα στάδια διαφοροποίησης των Β λεμφοκυττάρων. Η έκφρασή τους είναι χαμηλή έως μηδενική στ' ανώριμα Β λεμφοκύτταρα ενώ αυξάνεται στα Β λεμφοκύτταρα μνήμης. Αυτό συνδέεται με την ενεργοποίηση του BcR (25-26). Η υψηλή έκφραση των υποδοχέων TLR6, TLR7 και TLR10 καθώς και η έκφραση των υπολοίπων μελών της οικογένειας (εκτός των TLR3, TLR5) σε χαμηλότερα επίπεδα ενισχύει την άποψη ότι τα Β λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ είναι κύτταρα με εμπειρία αντιγόνου. Ωστόσο, η ικανότητα των υποδοχέων TLR ν' αλληλεπιδρούν με

διαφορετικούς προσδέτες και σε διαφορετικές θέσεις του κυττάρου δεν επιτρέπει, προς το παρόν, την εξαγωγή σαφών συμπερασμάτων σχετικά με τη φύση του αντιγόνου.

Οι TLR9 και TLR7 είναι τα πλέον μελετημένα μόρια της οικογένειας των TLR στη ΧΛΛ. Η διέγερση των ΧΛΛ κυττάρων με CpG ολιγονουκλεοτίδια, το φυσιολογικό προσδέτη του TLR9, έχει ως αποτέλεσμα αύξηση της έκφρασης των συνδिएεργητικών μορίων, πιθανότατα επάγοντας την ανοσογονικότητα των ΧΛΛ κυττάρων, ενώ έχει επίσης ποικίλες επιδράσεις στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση.(157, 166) Ωστόσο πολύ λίγα στοιχεία είναι γνωστά αναφορικά με τα επακριβή πρότυπα έκφρασης του TLR9 στη ΧΛΛ, καθώς οι περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται στο λειτουργικό αποτέλεσμα μετά από τη διέγερση.

Η παρούσα μελέτη, η πρώτη που εξέτασε την έκφραση του TLR9 στη ΧΛΛ με συστηματικό τρόπο, απέδειξε χαμηλά επίπεδα TLR9 mRNA και χαμηλά επίπεδα πρωτεΐνης στην πλειονότητα των περιπτώσεων. Αυτά τ' αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με μια προηγούμενη μελέτη, όπου αναφέρονται διακυμάνσεις στα επίπεδα έκφρασης mRNA και χαμηλά πρωτεϊνικά επίπεδα στις περισσότερες περιπτώσεις ΧΛΛ συγκριτικά με την κυτταρική σειρά Β λεμφώματος BJAB ή φυσιολογικά Β λεμφοκύτταρα. Μία πιθανή εξήγηση αυτού του ίσως απρόσμενου ευρήματος (λαμβάνοντας υπόψη ότι η διέγερση με CpG ολιγονουκλεοτίδια χρησιμοποιείται ευρύτατα για τη λήψη μεταφάσεων στην κλασική κυτταρογενετική ανάλυση) είναι ότι η αναγνώριση των CpG ολιγονουκλεοτιδίων μπορεί να πραγματοποιείται όχι μόνο μέσω του TLR9 αλλά και άλλων υποδοχέων που αναγνωρίζουν νουκλεϊνικά οξέα.(159) Συνεπώς, οι επιδράσεις των CpG ολιγονουκλεοτιδίων δεν πρέπει να αποδίδονται αποκλειστικά στη μεσολαβούμενη από τον TLR9 σηματοδότηση. Ένας επιπρόσθετος παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι η διακύμανση της έκφρασης του TLR9 υπό διαφορετικές συνθήκες και/ή σε κύτταρα διαφορετικής κατάστασης ενεργοποίησης.

Η υψηλότερη έκφραση μεταξύ των υποδοχέων καταγράφηκε για τον TLR7, σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία.(152) Αυτό ενισχύει την άποψη ότι η διέγερση μέσω του TLR7 μπορεί να είναι σημαντική για τη συμπεριφορά του νεοπλασματικού κλώνου. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν μελέτες χορήγησης αγωνιστών του TLR7, που υποδηλώνουν ότι ο συγκεκριμένος υποδοχέας ρυθμίζει αρκετές ανοσογονικές ιδιότητες των ΧΛΛ κυττάρων (153, 167)και πιθανότατα εμπλέκεται στην αντίσταση στην απόπτωση.(160) Υψηλή έκφραση καταγράφηκε επίσης για τον CD180, που φέρεται να προωθεί την ενεργοποίηση τόσο των ΧΛΛ κυττάρων όσο και των ενεργοποιημένων Β κύτταρων.(168)

Είναι ενδιαφέρον ότι για συγκεκριμένους TLRs (TLR2, TLR6 και TLR8), αναγνωρίστηκαν σημαντικές αναντιστοιχίες μεταξύ των επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης, καθώς ο υψηλός αριθμός mRNA μεταγράφων δεν αντιστοιχούσε πάντα σε ισχυρή πρωτεϊνική έκφραση και το αντίστροφο. Μολονότι πολλοί παράγοντες μπορεί να ευθύνονται γι' αυτές τις αναντιστοιχίες, μεταξύ των οποίων η κυτταρική ετερογένεια εντός των νεοπλασματικών κλώνων, η διαφορετική κατάσταση ενεργοποίησης των νεοπλασματικών κυττάρων, και η διαφορετική βιωσιμότητα των κυττάρων μεταξύ των δειγμάτων, αυτά τα αποτελέσματα μπορούν να αποτελούν ένδειξη μετα-μεταγραφικών μηχανισμών ρύθμισης που τροποποιούν την έκφραση των TLR στη ΧΛΛ, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες για άλλα αντιγόνα της κυτταρικής επιφάνειας (μεταξύ των οποίων η συνθετάση του νιτρικού οξέος και το CD71).(169, 170)

5.2 Συγκριτική μελέτη της έκφρασης των TLR σε υποομάδες ασθενών με ΧΛΛ

Η παρατηρούμενη μεταβλητότητα των μοτίβων έκφρασης για ορισμένους TLRs και μόρια καθοδικά αυτών μεταξύ διαφορετικών περιπτώσεων στη συγκεκριμένη μελέτη μας οδήγησαν στη διερεύνηση πιθανών συσχετίσεων με άλλα χαρακτηριστικά των ΧΛΛ κλώνων. Λαμβάνοντας υπόψη ότι κάθε TLR αναγνωρίζει διακριτά μοριακά μοτίβα παθογόνων, θα ήταν λογικό να θεωρηθεί ότι αυτή η μεταβλητότητα θα μπορούσε ν' αντικατοπτρίζει διαφορετικά πρότυπα και «ιστορικά» αντιγονικής διέγερσης. Σε αυτό το πλαίσιο προσέγγισης και υπό το φως των αυξανόμενων αποδείξεων για μια εκτεταμένη “στιχομουθία” μεταξύ των TLR- και BcR-μεσολαβούμενων σημάτων, αναζητήσαμε πιθανές διαφορές στη σηματοδοτική οδό TLR μεταξύ περιπτώσεων ΧΛΛ που διαθέτουν BcRs με διαφορετικά μοριακά χαρακτηριστικά. Αρχικά, συγκρίναμε περιπτώσεις με μεταλλαγμένους έναντι αμετάλλακτων BcR και διαπιστώσαμε μικρές διαφορές, σε συμφωνία με το ομοιογενές πρότυπο γονιδιακής έκφρασης της ΧΛΛ ανεξάρτητα από το status των γονιδιακών μεταλλάξεων. Μεταξύ των γονιδίων που χαρακτηρίζονται από διαφορές στην έκφραση, τα γονίδια που κωδικοποιούν τα μόρια CD80 και CD86, δύο συν-διεγερτικά μόρια που ανήκουν στην οικογένεια B7, χαρακτηρίζονταν από αύξηση της έκφρασης μεταξύ των μεταλλαγμένων περιπτώσεων. Η διαπίστωση αυτή είναι σύμφωνη με προηγούμενες αναφορές ότι η διέγερση των ΧΛΛ κυττάρων μέσω των TLRs και του CD40 επάγει την έκφραση των CD80 και CD86, αυξάνοντας την ανοσογονικότητά τους.(157, 171) Στο πλαίσιο αυτό, θα μπορούσε να υποστηριχθεί

ότι οι IGHV-μεταλλαγμένες περιπτώσεις που εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα των CD80 και CD86 είναι δυνητικά πιο ανοσογόνες και κατά συνέπεια πιο ευαίσθητες σε έλεγχο από το μικροπεριβάλλον, γεγονός που εξηγεί, τουλάχιστον εν μέρει, την πιο ήπια κλινική συμπεριφορά τους.

Διάφορες πρόσφατες μελέτες υποδηλώνουν ότι οι υποομάδες της ΧΛΛ που καθορίζονται από το status των μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV (δηλαδή IGHV μεταλλαγμένες ή IGHV-αμετάλλακτες) είναι ετερογενείς. Σε κάθε κατηγορία που καθορίζονται από το status των μεταλλάξεων, οι περιπτώσεις που ανήκουν σε υποσύνολα με διακριτούς «στερεότυπους» BcRs επίσης μοιράζονται ιδιαίτερες, γενετικές ανωμαλίες, προφίλ γονιδιακής έκφρασης και, πολύ πιθανόν, κλινική εικόνα και έκβαση.(172, 173) Έτσι, έχει διατυπωθεί η πρόταση ότι η κλινική συμπεριφορά της ΧΛΛ θα μπορούσε ν' αντικατοπτρίζει το προφίλ αντιδραστικότητας των λευχαιμικών κλώνων στην αντιγονική διέγερση.(174)

Με αυτό το σκεπτικό, επικεντρώσαμε τις συγκρίσεις μας σε περιπτώσεις που ανήκουν σε διαφορετικά υποσύνολα με «στερεότυπους» BcRs, με ιδιαίτερη έμφαση στα υποσύνολα #1 και #4, τα δύο μεγαλύτερα υποσύνολα στην αμετάλλακτη και μεταλλαγμένη κατηγορία, αντιστοίχως, για τα οποία υπάρχουν διαρκώς αυξανόμενες ενδείξεις ότι μπορεί να θεωρηθούν ως πρότυπα υποσύνολα «κακής» και «καλής» πρόγνωσης αντιστοίχως.

Η σύγκριση των δύο υποσυνόλων υποδηλώνει μια κατάσταση TLR7-ανοχής για τους ΧΛΛ κλώνους που ανήκουν στο υποσύνολο #4. Όπως αναφέρθηκε πρόσφατα, τα B κύτταρα της ΧΛΛ μπορεί να περάσουν σε κατάσταση ανοχής μετά διέγερση του TLR7, που χαρακτηρίζεται από μείωση της έκφρασης του TLR7 σε επίπεδο mRNA.(167) Η καταγραφή σημαντικής μείωσης της έκφρασης του TLR7 στο υποσύνολο 4 είναι σύμφωνη με αυτή τη θεώρηση. Τα κύτταρα που έχουν διεγερθεί μέσω TLR7 έχει επίσης αναφερθεί ότι παρουσιάζουν υψηλή έκφραση συν-διεγερτικών μορίων(167), γεγονός που βρίσκεται σε συμφωνία με την αύξηση της έκφρασης του CD86 στο υποσύνολο #4. Κατά τη σύγκριση των IGHV4-34 περιπτώσεων του «στερεότυπου» υποσυνόλου #4 με: (i) περιπτώσεις που χρησιμοποιούν IGHV4-34 BcRs και δεν ανήκουν στο «στερεότυπο» υποσύνολο #4 και (ii) περιπτώσεις με μεταλλαγμένους BcRs που χρησιμοποιούν άλλα IGHV γονίδια, διαπιστώσαμε ότι πρότυπα έκφρασης του υποσυνόλου #4 ήταν χαρακτηριστικά του υποσυνόλου (subset #4-biased). Σε αυτό το σημείο, αξίζει να υπογραμμίσουμε, ότι πρότυπα έκφρασης TLR χαρακτηριστικά «στερεότυπων» υποσυνόλων ανεξάρτητα από τη χρήση του IGHV γονιδίου ή το status των μεταλλάξεων, διατηρήθηκαν επίσης και κατά τη σύγκριση περιπτώσεων που ανήκουν στα υποσύνολα #1 και #8.

Τέλος, μεταβλητότητα της έκφρασης για συγκεκριμένους TLR και σχετιζόμενα με αυτούς μόρια παρατηρήθηκε μεταξύ διαφορετικών υποσυνόλων ασθενών με «στερεότυπους» BcRs, προτείνοντας ότι οι κλώνοι των ΧΛΛ κυττάρων με διακριτή αντίδραση στο αντιγόνο έχουν τη δυνατότητα ν' ανταποκρίνονται με διαφορετικό τρόπο και σε διαφορετικά μέλη της οικογένειας των TLR, γεγονός που υπαινίσσεται την παρουσία ιδιαίτερων προτύπων αναγνώρισης και επιλογής από αντίστοιχους προσδέτες.

5.3 Συμπεράσματα

Συνολικά, τα βασικά συμπεράσματα της παρούσας μελέτης συνοψίζονται ως εξής. Πρώτον, όλοι οι TLRs που εκφράζονται σε ενεργοποιημένα Β κύτταρα εκφράζονται επίσης και στη ΧΛΛ (με διακυμάνσεις ως προς τα επίπεδα έκφρασης), ενισχύοντας έτσι περαιτέρω την άποψη ότι τα ΧΛΛ Β κύτταρα έχουν εμπειρία σε αντιγόνο (έχουν έρθει σε επαφή με αντιγόνο). Δεύτερον, οι νεοπλασματικοί κλώνοι είναι ικανοί για TLR σηματοδότηση, δεδομένου ότι αρκετοί TLRs εκφράζονται σε συνδυασμό με τους αντίστοιχους διαμεσολαβητές της σηματοδότησής τους. Τέλος, η μεταβλητότητα της έκφρασης για συγκεκριμένους TLRs και σχετιζόμενα μόρια μεταξύ διαφορετικών υποσυνόλων ασθενών με «στερεότυπους» BcRs, υποδηλώνει ότι οι ΧΛΛ κλώνοι με διακριτική αντιδραστικότητα σε αντιγόνο είναι σε θέση ν' ανταποκρίνονται με ξεχωριστό τρόπο και σε διαφορετικά μέλη της οικογένειας των TLR, υποδηλώνοντας ιδιαίτερα πρότυπα αναγνώρισης και επιλογής από τους αντίστοιχους προσδέτες.

6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ) είναι η πιο συχνά εμφανιζόμενη λευχαιμία στο Δυτικό ημισφαίριο. Χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση CD19⁺/CD5⁺/CD23⁺ Β λεμφοκυττάρων που φέρουν χαμηλά επίπεδα επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης στο αίμα, το μυελό των οστών και τα δευτερογενή λεμφικά όργανα. Παρά τον ομοιογενή φαινότυπο, η κλινική πορεία των ασθενών με ΧΛΛ ποικίλει με ορισμένους ασθενείς να επιβιώνουν για πολλά χρόνια χωρίς θεραπεία και τελικά να πεθαίνουν από άλλα αίτια, ενώ άλλοι να παρουσιάζουν επιθετική νόσο με μικρή επιβίωση παρά τη θεραπεία.

Το φορτίο των σωματικών μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV αποτελεί σήμερα τον πιο σημαντικό προγνωστικό παράγοντα για τους ασθενείς με ΧΛΛ. Οι ασθενείς που φέρουν γονίδια IGHV με ποσοστό νουκλεοτιδικής ταυτότητας $\geq 98\%$ σε σχέση προς το αντίστοιχο μη αναδιαταγμένο γονίδιο (αμετάλλακτες αλληλουχίες IGHV) συνήθως έχουν κακή κλινική πορεία, ενώ, αντίθετα, οι ασθενείς των οποίων τα γονίδια IGHV έχουν νουκλεοτιδική ταυτότητα $< 98\%$ (μεταλλαγμένες αλληλουχίες IGHV) επιβιώνουν για πολλά χρόνια χωρίς θεραπεία και, συνήθως, πεθαίνουν από άλλα αίτια.

Μεταγενέστερες μελέτες των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών στη ΧΛΛ έδειξαν επιλεκτική χρησιμοποίηση γονιδίων των ανοσοσφαιρινών, και παρουσία υποσυνόλων ασθενών με στερεότυπες περιοχές VH CDR3. Η στερεοτυπία του Β κυτταρικού υποδοχέα (BcR) της ειδικής ανοσίας αποτελεί ισχυρή ένδειξη επιλογής από περιορισμένη ποικιλία αντιγόνων. Επίσης υποδηλώνει ότι οι λευχαιμικοί κλώνοι με «στερεότυπους» BcRs πιθανόν προέρχονται από έναν πληθυσμό Β λεμφοκυττάρων με ιδιότητες κυττάρων της μη ειδικής ή φυσικής ανοσίας, τα οποία εγγενώς εμφανίζουν περιορισμένη ποικιλότητα.

Σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της φυσικής ανοσίας διαδραματίζουν οι υποδοχείς TLRs. Ονομάστηκαν έτσι λόγω της ομοιότητας τους με τους υποδοχείς Toll της *Drosophila*. Είναι υποδοχείς αναγνώρισης μοριακών μοτίβων οι οποίοι αναγνωρίζουν στερεότυπα δομικά μοτίβα σε παθογόνους μικροοργανισμούς και αυτοαντιγόνα. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί 11 μέλη της οικογένειας TLR στον άνθρωπο.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανάλυση του ρεπερτορίου και του προτύπου έκφρασης και της λειτουργικότητας των TLRs στη ΧΛΛ. Με την τεχνική των συστοιχιών PCR (PCR arrays) καταγράφηκε η έκφραση 84 γονιδίων που κωδικοποιούν υποδοχείς, προσαρμογείς και τελεστές της σηματοδοτικής οδού TLR, καθώς και μέλη άλλων σηματοδοτικών οδών που αλληλεπιδρούν με την TLR σηματοδότηση.

Συνολικά αναλύθηκαν 192 ασθενείς και στο σύνολο τους διαπιστώθηκε υψηλή έκφραση για τους TLR7 και CD180, ενδιάμεση για τους TLR1, TLR6 και TLR10 και χαμηλή έκφραση για τους TLR2 και TLR9, ενώ δεν καταγράφηκε έκφραση για τους TLR3 και TLR5. Οι TLR4 και TLR8 χαρακτηρίζονταν από χαμηλή έως μη ανιχνεύσιμη έκφραση με σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ των θετικών περιπτώσεων. Οι περισσότεροι προσαρμοστές και τελεστές της TLR σηματοδότησης καθώς και τα μέλη των σηματοδοτικών οδών NF-κΒ, JNK/p38, NF/IL6 και IRF που μελετήθηκαν, χαρακτηρίζονταν από ενδιάμεση έως υψηλή έκφραση, ενώ η έκφραση των αναστολέων της σηματοδότησης ήταν γενικά πολύ χαμηλή έως μη ανιχνεύσιμη.

Στο πλαίσιο της προτεινόμενης συνδιεγερτικής δράσης προς τους BcRs αναζητήθηκαν διαφορές ως προς τα πρότυπα έκφρασης των γονιδίων της σηματοδοτικής οδού TLR σε υποομάδες με βάση τα μοριακά χαρακτηριστικά του BcR, όπως το ρεπερτόριο και η έκφραση μεταλλαγμένων/ αμετάλλακτων αλληλουχιών IGHV ή την έκφραση «στερεότυπων» BcRs. Η σύγκριση μεταξύ περιπτώσεων που φέρουν μεταλλαγμένα ή αμεταλλακτα γονίδια IGHV, έδειξε σημαντική αύξηση της έκφρασης CD80, CD86, IL6, IFN γ και TLR4 και μείωση της έκφρασης των TLR8 και NFKBIL1 μεταξύ των μεταλλαγμένων περιπτώσεων. Επιπλέον, σημαντικές διαφορές διαπιστώθηκαν μεταξύ περιπτώσεων που ανήκαν σε υποσύνολα με «στερεότυπους» υποδοχείς.

Συνολικά τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρέχουν ενδείξεις ότι η σηματοδοτική οδός των TLR είναι ενεργός στη ΧΛΛ, με σημαντικές ωστόσο διαφοροποιήσεις μεταξύ διαφορετικών υποομάδων ασθενών. Αυτό το γεγονός υποστηρίζει την άποψη ότι τα λευχαιμικά κύτταρα της ΧΛΛ είναι Β λεμφοκύτταρα με εμπειρία αντιγόνου. Καταδεικνύεται επίσης η σημασία των συνδιεγερτικών σημάτων στην τροποποίηση της απάντησης των κλωνοτυπικών BcR. Τέλος, επισημαίνεται ότι η «στερεοτυπία» σε επίπεδο BcR συνδέεται με ιδιαίτερα πρότυπα ενεργοποίησης της οδού TLR, καθώς οι κλώνοι των ΧΛΛ κυττάρων με διακριτή αντιδραστικότητα προς τα αντιγόνα μπορούν να αποκρίνονται διαφορετικά σε διαφορετικούς TLRs, γεγονός που υποδηλώνει ειδική κατά περίπτωση αναγνώριση και επιλογή από τους αντίστοιχους προσδέτες.

7. ABSTRACT

7. ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most frequently occurring leukemia in the Western Hemisphere. It is characterized by the accumulation in the blood, bone marrow and secondary lymph organs of CD19⁺/CD5⁺/CD23⁺ B lymphocytes bearing low levels of surface immunoglobulin. Despite the homogenous phenotype, the clinical course of patients with CLL varies among patients. Some patients survive for many years without need of any treatment and eventually die from other causes, while others have aggressive disease with short survival despite treatment.

Somatic hypermutation status of IGHV genes is currently the most important prognostic factor for patients with CLL. Patients carrying IGHV genes with nucleotide identity $\geq 98\%$ compared to the corresponding germline gene (unmutated IGHV sequences) usually have a poor clinical course, whereas, patients whose IGHV genes have nucleotide identity $<98\%$ (mutated IGHV sequences) survive for many years without treatment and usually die from other causes.

Subsequent studies of immunoglobulin genes in CLL showed selective use of immunoglobulin genes and the presence of subsets of patients with stereotype VH CDR3 regions. The stereotypy of the B cell receptor (BcR) is a strong indication of selection by a limited variety of antigens. Also, it implies that the B cells with stereotyped BcRs likely emanate from a population of B lymphocytes with attributes of innate immunity cells, which naturally present limited diversity.

Toll-like Receptors (TLRs) play an important role in innate immunity. Mammalian TLRs hold their name from the *Drosophila* Toll protein. TLRs are pattern recognition receptors (PRRs), which recognize pathogen associated molecular patterns (PAMPs) and self-antigens. Up-to-date, 11 members of the TLR family have been recognized in human.

The present study aimed at analyzing the repertoire, the profile of expression and the functionality of TLRs in CLL. The expression of 84 genes that encode receptors, adaptors and effectors of the TLR signaling pathway was investigated with PCR arrays. Overall, 192 patients were analyzed.

High expression was recorded for TLR7 and CD180, intermediate expression for TLR1, TLR6 and TLR10 and low expression for TLR2 and TLR9, while no expression was recorded for TLR3 and TLR5. TLR4 and TLR8 had low-to-undetectable expression, with significant variation between positive cases. The majority of adaptors, effectors of TLR signaling and members of the NF- κ B, JNK/p38, NF/IL6 and IRF pathways downstream of TLR signaling were characterized by intermediate-

to-high expression, while the expression of the negative regulators of signaling was low-to-undetectable.

Given that TLRs have a co-stimulatory effect on the BcR, we sought for differences in gene expression profiles among subgroups of cases defined by BcR molecular features, such as the repertoire and mutational status of the IGHV genes or the expression of stereotyped BcRs. Comparison of cases carrying mutated vs. unmutated IGHV genes revealed significant upregulation of CD80, CD86, IL6, IFN γ , TLR4 and downregulation of TLR8 and NFKBIL1 among mutated cases. Significant differences were also found in different subsets carrying stereotyped BcRs, with potential implications about the nature of the antigenic stimulation.

In conclusion, our data suggest that the TLR signaling pathway is functional in CLL, displaying important fluctuations in various subgroups of patients. This further supports the opinion that the leukemic CLL cells are antigen experienced. Moreover, it underlines the importance of co-stimulatory signals in modifying the response of clonotypic BcRs. Finally, it appears that BcR stereotypy corresponds to distinct activation patterns of the TLR signaling pathway, suggesting that CLL clones with distinctive antigen reactivity may also be able to respond to different TLRs, alluding to subset-biased recognition of and selection by the respective ligands.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

8 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. Immunology 6th Ed. New York: W H Freeman & Co, 2006.
2. Flajnik MF, Du Pasquier L. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? Trends Immunol. 2004;25(12):640-4.
3. Brown P. Cinderella goes to the ball. Nature. 2001;410(6832):1018-20.
4. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette Spatzle/Toll/Cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. Cell. 1996;86(6):973–83.
5. Medzhitov R, Janeway CJ. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. Cell. 1997;91(3):295-8.
6. Bauer S, Hartmann G, eds. Toll-like receptors (TLRs) and innate immunity. Handbook of experimental pharmacology: Springer-Verlag, 2008.
7. Lee MS, Kim YJ. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. Annu Rev Biochem. 2007;76:447–80.
8. Palm NW, Medzhitov R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. Immunol Rev. 2009;227(1):221–33.
9. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. Int Immunol. 2009;21(4):317–37.
10. Akira S. Toll receptor families: structure and function. Semin Immunol. 2004;16(1):1-2.
11. Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsalventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. Cell. 1988;52(2):269–79.
12. Gay NJ, Keith FJ. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. Nature. 1991;351(6325):355–6.
13. Dinarello CA. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. Faseb J. 1994;8(15):1314–25.
14. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood. 1996;87(6):2095–147.
15. Bell JK, Botos I, Hall PR, Askins J, Shiloach J, Segal DM, et al. The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102(31):10976–80.
16. Choe J, Kelker MS, Wilson IA. Crystal structure of human Toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. Science. 2005;309(5734):581–5.
17. Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik SG, et al. Crystal structure of the TLR1–TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. Cell. 2007;130(6):1071–82.
18. Kim HM, Park BS, Kim JI, Kim SE, Lee J, Oh SC, et al. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. Cell. 2007b;130(5):906–17.
19. Matsushima N, Tanaka T, Enkhbayar P, Mikami T, Taga M, Yamada K, et al. Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. BMC Genomics. 2007;8:124.
20. Kajava AV. Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. J Mol Biol. 1998;277(3):519–27.
21. Kobe B, Kajava AV. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. Curr Opin Struct Biol. 2001;11(6):725–32.
22. Gay NJ, Gangloff M. Structure and function of Toll receptors and their ligands. Annu Rev Biochem. 2007;76:141–65.

23. Schneider DS, Hudson KL, Lin TY, Anderson KV. Dominant and recessive mutations define functional domains of Toll, a transmembrane protein required for Dorsal Ventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* 1991;5(5):797–807.
24. Nishitani C, Mitsuzawa H, Sano H, Shimizu T, Matsushima N, Kuroki Y. Toll-like receptor 4 region Glu24-Lys47 is a site for MD-2 binding: Importance of CYS29 and CYS40. *J Biol Chem.* 2006;281(50):38322–9.
25. Xu Y, Tao X, Shen B, Horng T, Medzhitov R, Manley JL, et al. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature.* 2000;408(6808):111–5.
26. Akira S, Takeda K. Toll-like receptors signaling. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(7):499–511.
27. Slack JL, Schooley K, Bonnert TP, Mitcham JL, Qwarnstrom EE, Sims JE, et al. Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *J Biol Chem.* 2000;275(7):4670–8.
28. Gautam JK, Ashish, Comeau LD, Krueger JK, Smith MF Jr. Structural and functional evidence for the role of the TLR2 DD loop in TLR1/TLR2 heterodimerization and signaling. *J Biol Chem.* 2006;281(40):30132–42.
29. McGettrick AF, O'Neill LA. Toll-like receptors: key activators of leucocytes and regulator of haematopoiesis. *Br J Haematol.* 2007;139(2):185–93.
30. Pandey S, Agrawal DK. Immunobiology of Toll-like receptors: Emerging trends. *Immunology and Cell Biology.* 2006;84(4):333–41.
31. Jenkins KA, Mansell A. TIR-containing adaptors in Toll-like receptor signaling. *Cytokine.* 2010;49(3):237–44.
32. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol* 2007;7(5):353–64.
33. Carty M, Goodbody R, Schröder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie AG. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nature Immunology.* 2006;7(10):1074–81.
34. Dalod M. Studies of SARM1 Uncover Similarities Between Immune and Neuronal Responses to Danger. *Sci STKE.* 2007(417):73.
35. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11(5):373–84.
36. Kagan JC, Medzhitov R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell.* 2006;125(5):943–55.
37. Lasker MV, Nair SK. Intracellular TLR signaling: A structural perspective on human disease. *J Immunol.* 2006;177(1):11–6.
38. Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature.* 1996b;383(6599):443–6.
39. Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, Mizutani T, et al. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature.* 2005;434(7030):243–9.
40. Negishi H, Fujita Y, Yanai H, Sakaguchi S, Ouyang X, Shinohara M, et al. Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(41):15136–41.
41. Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K, et al. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol.* 2003;171(8):4304–10.
42. Kawai T, Akira S. Antiviral Signaling Through Pattern Recognition Receptors. *J Biochem.* 2007;141(12):137–45.
43. Miggin SM, O'Neill LA. New insights into the regulation of TLR signaling. *J Leukoc Biol.* 2006;80(2):220–6.

44. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(6):446–58.
45. Wald D, Qin J, Zhao Z, Qian Y, Naramura M, Tian L, et al. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol*. 2003;4(9):920-7.
46. Palsson-McDermott EM, Doyle SL, McGettrick AF, Hardy M, Husebye H, Banahan K, et al. TAG, a splice variant of the adaptor TRAM, negatively regulates the adaptor MyD88-independent TLR4 pathway. *Nat Immunol*. 2009;10(6):579-86.
47. Harte MT, Haga IR, Maloney G, Gray P, Reading PC, Bartlett NW, et al. The poxvirus protein A52R targets Toll-like receptor signaling complexes to suppress host defense. *J Exp Med*. 2003;197(3):343–51.
48. Shi M, Deng W, Bi E, Mao K, Ji Y, Lin G, et al. TRIM30 alpha negatively regulates TLR-mediated NF-kappa B activation by targeting TAB2 and TAB3 for degradation. *Nat Immunol* 2008;9(4):369-77.
49. Bourke E, Bosisio D, Golay J, Polentarutti N, Mantovani A. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood*. 2003;102(3):956-63.
50. Bernasconi NL, Onai N, Lanzavecchia A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up regulation of TLR9 by BCR triggering in naïve B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood*. 2003;101(11):4500-4.
51. Ruprecht CR, Lanzavecchia A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naïve B cells. *Eur J Immunol*. 2006;36(4):810-6.
52. Fillatreau S, Manz RA. Tolls for B cells. *Eur J Immunol*. 2006;36(4):798–801.
53. Lefranc MP, Lefranc G. The immunoglobulin FactsBook. London: Academic Press, 2001.
54. Lefranc MP. WHO-IUIS Nomenclature Subcommittee for Immunoglobulins and T cell receptors report August 2007, 13th International Congress of Immunology, Rio de Janeiro, Brazil. *Dev Comp Immunol*. 2008;32(5):461-3.
55. Papavasiliou FN, Schatz DG. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity. *Cell*. 2002;109(Suppl):S35-S44.
56. 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.
57. Odegard VH, Schatz DG. Targeting of somatic hypermutation. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(8):573-83.
58. Seki M, Gearhart PJ, Wood RD. DNA polymerases and somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *EMBO Reports*. 2005;6(12):1143-8.
59. Muramatsu M, Nagaoka H, Shinkura R, Begum NA, Honjo T. Discovery of activation-induced cytidine deaminase, the engraver of antibody memory. *Adv Immunol* 2007;94:1-36.
60. Dickerson SK, Market E, Besmer E, Papavasiliou FN. AID mediates hypermutation by deaminating single stranded DNA. *J Exp Med*. 2003;197(10):1291-6.
61. Kenter AL. Class switch recombination: an emerging mechanism. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;290:171-99.
62. Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:261-92.
63. Longerich S, Basu U, Alt F, Storb U. AID in somatic hypermutation and class switch recombination. *Curr Opin Immunol* 2006;18(2):164-74.
64. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. 2008;112(5):1570-80.
65. Pillai S, Cariappa A, et al. Positive selection and lineage commitment during peripheral B-lymphocyte development. *Immunological Reviews*. 2004;97:206-18.
66. Gu H, Kitamura D, Rajewsky K. B-cell development regulated by gene rearrangement - arrest of maturation by membrane-bound D μ protein and selection of DH element reading frames. *Cell*. 1991;65(1):47-54.

67. Kitamura D, Kubo A, Schaal S, Müller W, Melchers F, Rajewsky K. A critical role of λ 5 protein in B-cell development. *Cell*. 1992;69(5):823-31.
68. Carsetti R. The Development of B Cells in the Bone Marrow Is Controlled by the Balance Between Cell-autonomous Mechanisms and Signals from the Microenvironment. *J Exp Med*. 2000;191(1):5-8.
69. Gay D, Saunders T, Camper S, Weigert M. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J Exp Med*. 1993;177:999-1008.
70. Tiegs SL, Russell DM, Nemazee D. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med*. 1993;177(4):1009-20.
71. Parker DC. T cell-dependent B-cell activation. *Annu Rev Immunol* 1993;11:331-40.
72. Noelle RJ, Roy M, Shepherd DM, Stamenkovic I, Ledbetter JA, Aruffo A. A 39-kDa protein in activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(14):6550-4.
73. Banchereau J, Bazn F, Blanchard D, Brière F, Galizzi JP, van Kooten C, et al. The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:881-922.
74. Kelsoe G, Zheng B. Sites of B-cell activation in vivo. *Curr Opin Immunol*. 1993;5(3):418-22.
75. MacLennan IC, Liu YJ, Johnson GD. Maturation and dispersal of B-cell clones during T cell-dependent antibody responses. *Immunol Rev*. 1992;126:143-61.
76. Jacob J, Kelsoe G. In situ studies of the primary immune response to acetyl II. A common clonal origin for periarteriolar lymphoid sheath-associated foci and germinal centers. *J Exp Med*. 1992;176(3):679-87.
77. Jacob J, Kelsoe G, Rajewsky K, Weiss U. Intracloonal generation of antibody mutants in germinal centers. *Nature*. 1991;354(6352):389-92.
78. Berek C. The development of B cells and the B-cell repertoire in the microenvironment of the germinal center. *Immunol Rev*. 1992;126:5-19.
79. Aruffo A, Farrington M, Hollenbaugh D, Li X, Milatovich A, Nonoyama S, et al. The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell*. 1993;72(2):291-300.
80. Harriman W, Volk H, Defranoux N, Wabl M. Immunoglobulin class switch recombination. *Annu Rev Immunol* 1993;11:361-84.
81. Rothman P, Chen YY, Lutzker S, Li SC, Stewart V, Coffman R, et al. Structure and expression of germline immunoglobulin heavy-chain ϵ transcripts: interleukin-4 plus lipopolysaccharide-directed switching to C ϵ . *Mol Cell Biol*. 1990;10(4):1672-9.
82. Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood*. 2011;117(6):1781-91.
83. Niiri H, Clark EA. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(12):945-56.
84. Monroe JG. ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(4):283-9.
85. Kurosaki T, Takata M, Yamanashi Y, Inazu T, Taniguchi T, Yamamoto T, et al. Syk activation by the Src-family tyrosine kinase in the B cell receptor signaling. *J Exp Med*. 1994;179(5):1725-9.
86. Haxhinasto SA, Bishop GA. Synergistic B cell activation by CD40 and the B cell antigen receptor: role of B lymphocyte antigen receptor-mediated kinase activation and tumor necrosis factor receptor-associated factor regulation. *J Biol Chem*. 2004;279(4):2575-82.
87. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005;352(8):804-15.
88. Binet JL, Lepage M, Dighiero G, Charron D, D'Athis P, Vaugier G, et al. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance. *Cancer Immunol Immunother*. 1977;40(2):855-64.

89. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975;46(2):219-34.
90. Catovsky D, Fooks J, Richards S. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia: The importance of age, sex and response to treatment in survival. A report from the MRC CLL 1 trial. MRC Working Party on Leukaemia in Adults. *Br J Haematol* 1989;72(2):141-9.
91. Knauf WU, Langenmayer I, Ehlers B, Mohr B, Adorf D, Nerl CH, et al. Serum levels of soluble CD23, but not soluble CD25, predict disease progression in early stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1997;27(5-6):523-32.
92. Keating MJ, Lerner S, Kantarjian H, Freireich EJ, O'Brien S. The serum β 2-microglobulin (β 2m) level is more powerful than stage in predicting response and survival in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood*. 1995;86(Suppl 1):606a.
93. 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.
94. 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.
95. Krober A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Brückle E, Lichter P, et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;100(4):1410-6.
96. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*. 2002;99(3):1023-9.
97. Ibrahim S, Keating M, Do KA, O'Brien S, Huh YO, Jilani I, et al. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001;98(1):181-6.
98. Boonstra JG, van Lom K, Langerak AW, Graveland WJ, Valk PJ, Kraan J, et al. CD38 as a prognostic factor in B cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL): comparison of three approaches to analyze its expression. *Cytometry B Clin Cytom*. 2006;70(3):136-41.
99. Ghia P, Guida G, Stella S, Gottardi D, Geuna M, Strola G, et al. The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood*. 2003;101(4):1262-9.
100. Nolz JC, Tschumper RC, Pittner BT, Darce JR, Kay NE, Jelinek DF. ZAP-70 is expressed by a subset of normal human B-lymphocytes displaying an activated phenotype. *Leukemia*. 2005;19(6):1018-24.
101. Scielzo C, Camporeale A, Geuna M, Alessio M, Poggi A, Zocchi MR, et al. ZAP-70 is expressed by normal and malignant human B-cell subsets of different maturational stage. *Leukemia*. 2006;20(4):689-95.
102. Cutrona G, Colombo M, Matis S, Reverberi D, Dono M, Tarantino V, et al. B lymphocytes in humans express ZAP-70 when activated in vivo. *Eur J Immunol*. 2006;36(3):558-69.
103. Crespo M, Villamor N, Giné E, Muntañola A, Colomer D, Marafioti T, et al. ZAP-70 expression in normal pro/pre Bcells, mature B cells, and in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2006;12(3 Pt 1):726-34.
104. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2004;351(9):893-901.
105. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2003;348(18):1764-75.

106. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 2004;363(9403):105-11.
107. Kipps TJ. The B-cell receptor and ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20(3):415-24.
108. Munoz L, Lasa A, Carricondo MT, Hernández C, Ubeda J, Nomdedéu JF. Comparative analysis of ZAP-70 expression and Ig VH mutational status in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72(2):96-102.
109. Catherwood MA, Matthews C, Niblock R, Dobbin E, Morris TC, Alexander HD. ZAP-70 mRNA quantification in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J of Haematol*. 2006;76(4):294-8.
110. Laurenti L, Petlickovski A, Rumi C, Gobessi S, Piccioni P, Tarnani M, et al. Comparison of ZAP-70/Syk mRNA levels with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status and disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2005;90(11):1533-40.
111. Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, Kern W. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: A study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood*. 2006;108(9):3152-60.
112. AbdelSalam M, El Sissy A, Samra MA, Ibrahim S, El Markaby D, Gadallah F. The impact of trisomy 12, retinoblastoma gene and P53 in prognosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Hematology*. 2008;13(3):147-53.
113. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343(26):1910-6.
114. Méhes G. Chromosome abnormalities with prognostic impact in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Pathol Oncol Res*. 2005;11(4):205-10.
115. Nicoloso MS, Kipps TJ, Croce CM, Calin GA. MicroRNAs in the pathogeny of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2007;139(5):709-16.
116. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005;353(17):1793-801.
117. 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.
118. Kienle D, Benner A, Kröber A, Winkler D, Mertens D, Bühler A, et al. Distinct gene expression patterns in chronic lymphocytic leukemia defined by usage of specific VH genes. *Blood*. 2006;107(5):2090-3.
119. Stamatopoulos K, Belessi C, Hadzidimitriou A, Smilevska T, Kalagiakou E, Hatzi K, et al. Immunoglobulin light chain repertoire in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005;106(10):3575-83.
120. 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.
121. 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.
122. 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.
123. Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Tobin G, Boudjogra 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.

124. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Thörn I, Söderberg O, Hultdin M, et al. Somatically mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;99(6):2262-4.
125. 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.
126. 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.
127. Ghiotto F, Fais F, Albesiano E, Hashimoto S, Dono M, Ikematsu H, et al. Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 2004;113(7):1008–16.
128. Tobin G, Söderberg O, Thunberg U, Rosenquist R. V(H)3-21 gene usage in chronic lymphocytic leukemia--characterization of a new subgroup with distinct molecular features and poor survival. *Leuk Lymphoma*. 2004;45(2):221-8.
129. 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.
130. 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.
131. Chu C, CATERA R, Hatzi K, Yan XJ, Zhang L, Wang XB, et al. Chronic lymphocytic leukemia antibodies with a common stereotypic rearrangement recognize nonmuscle myosin heavy chain IIA. *Blood*. 2008;112(13):5122-9.
132. Ghia P, Chiorazzi N, Stamatopoulos K. Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation. *J Intern Med*. 2008;264(6):549-62.
133. CATERA R, Silverman G, Hatzi K, Seiler T, Didier S, Zhang L, et al. Chronic lymphocytic leukemia cells recognize conserved epitopes associated with apoptosis and oxidation. *Mol Med*. 2008;14(11-12):665-74.
134. Myhrinder AL, Hellqvist E, Sidorova E, Söderberg A, Baxendale H, Dahle C, et al. A new perspective: molecular motifs on oxidized LDL, apoptotic cells, and bacteria are targets for chronic lymphocytic leukemia antibodies. *Blood*. 2008;111(7):3838-48.
135. Martin F, Kearney JF. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(5):323-35.
136. Hardy RR. B-1 B cell development. *J Immunol* 2006;177(5):2749-54.
137. Herve M, Xu K, Ng YS, Wardemann H, Albesiano E, Messmer BT, et al. Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *J Clin Invest*. 2005;115(6):1636–43.
138. Chu C, CATERA R, Zhang L, et al. Elevated Binding of Chronic Lymphocytic Leukemia Antibody to a Subset of Apoptotic Cells with Exposed Non-Muscle Myosin Heavy Chain IIA Correlates with Poor Patient Outcome. *Blood*. 2009;114(330a).
139. 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.
140. Hatzi K, CATERA R, Ferrarini M, et al. B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells express antibodies reactive with antigenic epitopes expressed on the surface of common bacteria. *Blood*. 2006;108(12a).

141. Hivroz C, Grillot-Courvalin C, Brouet JC, Seligmann M. Heterogeneity of responsiveness of chronic lymphocytic leukemic B cells to B cell growth factor or interleukin 2. *Eur J Immunol* 1986;16(8):1001–4.
142. Lankester AC, van Schijndel GM, van der Schoot CE, van Oers MH, van Noesel CJ, van Lier RA. Antigen receptor nonresponsiveness in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 1995;86(3):1090–7.
143. Kipps TJ. Signal transduction pathways and mechanisms of apoptosis in CLL B-lymphocytes: their role in CLL pathogenesis. *Hematol Cell Ther*. 1997;39(Suppl. 1):S17–S27.
144. Lanham S, Hamblin T, Oscier D, Ibbotson R, Stevenson F, Packham G. Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003;101(3):1087–93.
145. Chen L, Widhopf G, Huynh L, Ibbotson R, Stevenson F, Packham G. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;100(13):4609–14.
146. 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.
147. Merrell KT, Benschop RJ, Gauld SB, Aviszus K, Decote-Ricardo D, Wysocki LJ, et al. Identification of anergic B cells within a wild-type repertoire. *Immunity*. 2006;25(6):953–62.
148. Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol*. 2003;21(841–894).
149. Hamblin T. Is chronic lymphocytic leukemia a response to infectious agents? *Leuk Res*. 2006;30(9):1063–4.
150. Lanemo Myhrinder A, Hellqvist E, Sidorova E, Söderberg A, Baxendale H, Dahle C, et al. A new perspective: molecular motifs on oxidized LDL, apoptotic cells, and bacteria are targets for chronic lymphocytic leukemia antibodies. *Blood*. 2008;111(7):3838–48.
151. Spaner DE, Masellis A. Toll-like receptor agonists in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2007;21(1):53–60.
152. Muzio M, Scielzo C, Bertilaccio M, Frenquelli M, Ghia P, Caligaris-Cappio F. Expression and function of toll like receptors in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol*. 2008;144(4):507–16.
153. Spaner DE, Shi Y, White D, Mena J, Hammond C, Tomic J, et al. Immunomodulatory effects of Toll-like receptor-7 activation on CLL cells. *Leukemia*. 2006;20(2):286–95.
154. Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect*. 2004;6(15):1382–7.
155. Lanzavecchia A, Sallusto F. Toll-like receptors and innate immunity in B-cell activation and antibody responses. *Curr Opin Immunol*. 2007;19(3):268–74.
156. Decker T, Schneller F, Kronschnabl M, Dechow T, Lipford GB, Wagner H, et al. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides induce functional high affinity IL-2 receptors on B-CLL cells: costimulation with IL-2 results in a highly immunogenic phenotype. *Exp Hematol*. 2000a;28(5):558–68.
157. Decker T, Schneller F, Sparwasser T, Tretter T, Lipford GB, Wagner H, et al. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2000b;95(3):999–1006.
158. Jahrsdorfer B, Hartmann G, Racila E, Jackson W, Muhlenhoff L, Meinhardt G, et al. CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens. *J Leukoc Biol*. 2001;69(1):81–8.
159. Longo P, Laurenti L, Gobessi S, Petlickovski A, Pelosi M, Chiusolo P, et al. The Akt signaling pathway determines the proliferative capacity of CLL-B cells from patients with progressive and stable disease. *Leukemia*. 2007;21(1):110–20.

160. Hammadi A, Billard C, Faussat AM, Kolb JP, 2008;19:138-45. Resistance in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells through engagement of Toll-like receptor 7 (TLR-7) and NF- κ B activation. *Nitric Oxide*. 2008;19(2):138-45.
161. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12):5446-56.
162. Brochet X, Lefranc MP, Giudicelli V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(Web Server issue):W503-W8.
163. Rutledge RG, Cote C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(16):e93.
164. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
165. Rosen A, Murray F, Evaldsson C, Rosenquist R. Antigens in chronic lymphocytic leukemia-Implications for cell origin and leukemogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2010;20(6):400-6.
166. Liang X, Moseman EA, Farrar MA, Bachanova V, Weisdorf DJ, Blazar BR, et al. Toll-like receptor 9 signaling by CpG-B oligodeoxynucleotides induces an apoptotic pathway in human chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2010;115(24):5041-52.
167. Shi Y, White D, He L, Miller RL, Spaner DE. Toll-like receptor-7 tolerizes malignant B cells and enhances killing by cytotoxic agents. *Cancer Res*. 2007;67(4):1823-31.
168. Porakishvili N, Kulikova N, Jewell AP, Youinou PY, Yong K, Nathwani A, et al. Differential expression of CD180 and IgM by B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells using mutated and unmutated immunoglobulin VH genes. *Br J Haematol* 2005;131(3):313-9.
169. Chiotoglou I, Smilevska T, Samara M, Likousi S, Belessi C, Athanasiadou I, et al. Predominantly post-transcriptional regulation of activation molecules in chronic lymphocytic leukemia: the case of transferrin receptors. *Blood Cells Mol Dis*. 2008;41(2):203-9.
170. Tiscornia AC, Cayota A, Landon AI, Brito C, Oppezio P, Vuillier F, et al. Post-transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase in chronic lymphocytic leukemia B cells in pro- and antiapoptotic culture conditions. *Leukemia*. 2004;18(1):48-56.
171. Van den Hove LE, Van Gool SW, Vandenberghe P, Bakkus M, Thielemans K, Boogaerts MA, et al. CD40 triggering of chronic lymphocytic leukemia B cells results in efficient alloantigen presentation and cytotoxic T lymphocyte induction by up-regulation of CD80 and CD86 costimulatory molecules. *Leukemia*. 1997;11(4):572-80.
172. Marincevic M, Mansouri M, Kanduri M, Isaksson A, Göransson H, Smedby KE, et al. Distinct gene expression profiles in subsets of chronic lymphocytic leukemia expressing stereotyped IGHV4-34 B-cell receptors. *Haematologica*. 2010;95(12):2072-9.
173. Marincevic M, Cahill N, Gunnarsson R, Isaksson A, Mansouri M, Göransson 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.
174. Chu CC, Catera R, Zhang L, Didier S, Agagnina BM, Damle RN, et al. Many chronic lymphocytic leukemia antibodies recognize apoptotic cells with exposed nonmuscle myosin heavy chain IIA: implications for patient outcome and cell of origin. *Blood*. 2010;115(19):3907-15.

TOLL-LIKE RECEPTOR SIGNALING PATHWAY IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA: DISTINCT GENE EXPRESSION PROFILES OF POTENTIAL PATHOGENETIC SIGNIFICANCE IN SPECIFIC SUBSETS OF PATIENTS

Eleni Arvaniti^{1,2}, Stavroula Ntoufa^{1,3}, Nikos Papakonstantinou³, Tasoula Touloumenidou³, Nikolaos Laoutaris², Achilles Anagnostopoulos³, Klea Lamnissou¹, Federico Caligaris-Cappio^{4,5,6,7}, Kostas Stamatopoulos^{3,8}, Paolo Ghia^{4,5,6,7}, Marta Muzio^{4,7}, Chrysoula Belessi²

¹School of Biology, University of Athens, Athens, Greece; ²Hematology Department, Nikea General Hospital, Pireaus, Greece; ³Hematology Department and HCT Unit, G. Papanicolaou Hospital, Thessaloniki, Greece; ⁴Division of Molecular Oncology, San Raffaele Scientific Institute, Milano, Italy; ⁵Department of Onco-Hematology, San Raffaele Scientific Institute, Milano, Italy; ⁶Università Vita-Salute San Raffaele, Milano, Italy; and ⁷MAGIC (Microenvironment and Genes in Cancers of the blood) Interdivisional Research Program, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano, Italy; ⁸Institute of Agrobiotechnology, Center for Research and Technology, Thessaloniki, Greece

EA and SN contributed equally to this manuscript.

Corresponding author:

Marta Muzio, Division of Molecular Oncology, San Raffaele Scientific Institute, via Olgettina 58, 20132, Milano, Italy. E-mail: muzio.marta@hsr.it

Funding:

This work was supported by the Program grant in Molecular Clinical Oncology-5 per mille number 9965 and Investigator grant (to FCC and PG), Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (Milano, Italy); PRIN, MIUR (Rome, Italy); Progetti Integrati Oncologia (PIO), Ministero della Salute (Rome, Italy); Cariplo Foundation (Milano, Italy); Leukemia Research Foundation (Illinois, US); U.S./European Alliance for the Therapy of CLL, CLL Global Research Foundation (Texas, US); Greek Ministry of Health (Athens, Greece); ENosAI project (code 09SYN-13-880), co-funded by the EU and the Hellenic General Secretariat for Research and Technology.

The online version of this article has a supplementary appendix.

Abstract

Background

Signaling through the B cell receptor (BcR) appears to be a major contributing factor in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia (CLL). Toll-like receptors (TLR) bridge the innate and adaptive immune response by acting as co-stimulatory signals for B-cells. The available data on TLR expression in CLL are limited and derive from small series of patients.

Design and Methods

We profiled the expression of TLR signaling pathway-associated genes in 192 CLL cases and explored potential associations with molecular features of the clonotypic BcRs.

Results

CLL cells express all TLRs expressed by normal activated B cells, with high expression of TLR7 and CD180, intermediate of TLR1, TLR6, TLR10 and low of TLR2 and TLR9. The vast majority of adaptors, effectors and members of the NFkB, JNK/p38, NF/IL6 and IRF pathways are intermediately-to-highly expressed, while inhibitors of TLR activity are generally low-to-undetectable, indicating that the TLR-signaling framework is competent in CLL. Significant differences were identified for selected genes between cases carrying mutated vs. unmutated IGHV genes or assigned to different subsets with stereotyped BcRs. The differentially expressed molecules include receptors, NFkB/MAPK signaling molecules and final targets of the cascade.

Conclusions

The observed variations are suggestive of distinctive activation patterns of the TLR signaling pathway in subgroups of CLL cases defined by BcR molecular features. Additionally, they indicate that different or concomitant signals acting through receptors other than the BcR can affect the behavior of the malignant clone.

Introduction

A role for antigen in the development of chronic lymphocytic leukemia (CLL) is strongly suggested by the biased immunoglobulin heavy variable (IGHV) gene repertoire of the malignant clones, the prognostic implications of IGHV gene mutational status and the identification of subsets of patients with quasi-identical, stereotyped B cell receptors (BcR) who can also exhibit restricted demographic, biological and clinical features.⁽¹⁻³⁾

The structural homology of BcR is pointing out to a selection pressure exerted by common antigenic elements or classes of structurally similar epitopes that may trigger and/or facilitate the onset and evolution at least of some CLL clones.⁽⁴⁾ The nature of the selecting antigens, the mechanistic aspects of their recognition by the clonotypic BcR and the functional impact of antigenic stimulation through the BcR remain largely unknown. Furthermore, the role of additional and concomitant ways of activating CLL cells through “non-specific” innate immune receptors⁽⁵⁾, should also be considered, as these receptors concur with the BcR stimulation to the full activation of B lymphoid cells.

The prototypic class of innate immune receptors includes the Toll-like receptors (TLRs)⁽⁶⁾ that recognize molecular structures which are specific and evolutionarily conserved between pathogens. The central feature of microbe recognition by TLRs is the triggering of signaling pathways important for the activation of antigen presenting cells (APCs), including B cells⁽⁷⁾. In this respect, given the role of APCs in the activation of T cells, TLRs may be considered as a “link” between innate and adaptive immunity.^(8, 9)

In recent years, the role of TLR in the physiology of B cells has received increasing attention as critical antigen-triggered B-cell differentiation steps have been shown to be influenced by TLR-dependent signals, acting in concert with or superimposed to signals originating from the BcR.⁽¹⁰⁾ The expression of TLR in normal naive and memory B cells has been mapped with naive B cells expressing low levels of TLR1, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 and TLR10, and memory B cells expressing high levels of TLR1, TLR6, TLR7, TLR9 and TLR10 along with low levels of TLR2, TLR4 and TLR8.⁽¹¹⁻¹⁴⁾

The stimulation of surface or endosomal TLRs leads to the activation of NF- κ B and the induction of activation-induced cytidine deaminase (AID), which, in combination with cytokines, induces class switch recombination to specific isotypes.⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ This depends on the correct intracellular trafficking and localization of the engaged TLRs and on the presence of other signals, such as those emanating from the BcR.^(10, 18-20)

The activation of B cells by TLR engagement may lead to a more efficient interaction with T cells and dendritic cells (DCs) due to the up-regulation of the co-stimulatory CD80 and MHCII molecules.^(21, 22) Finally, TLR-dependent signals may be implicated in the regulation of B cell immune responses, either by inducing TLR tolerance or by subverting the mechanisms that ensure the silencing of autoreactive B cells, thus promoting autoreactivity.⁽²³⁾

Several TLR agonists have been used in clinical trials of CLL patients as adjuvants to improve the efficacy of chemotherapy.⁽²⁴⁾ Still the available data on TLR expression in CLL are limited⁽²⁵⁻²⁷⁾ and have essentially shown that TLR7 and TLR9 are virtually always expressed. We recently reported that, in addition to TLR7 and TLR9, CLL cells can also express TLR1, TLR2, TLR6 and TLR10.⁽²⁷⁾ However, most studies, have analyzed small series of patients, thus precluding sound conclusions with regard to the exact TLR expression profile in CLL and preventing possible correlations with various clinicobiological features.

We performed a systematic gene expression profiling of the TLR signaling pathway in a series of 192 patients with CLL. As TLRs have a co-stimulatory effect on the BcR, we sought for differences in gene expression profiles among subgroups of cases defined by BcR molecular features, such as the repertoire and mutational status of the IGHV genes or the expression of stereotyped BcRs. Significant variations indicative of distinctive activation patterns of the TLR signaling pathway were identified, especially among cases assigned to subsets with stereotyped BcRs. These findings suggest that different or concomitant signals acting through receptors other than BcR can affect the behavior of the malignant clone with implications for future functional studies that may eventually define the role of TLR signalling in the pathogenesis and evolution of CLL.

Design and Methods

Patient group

Peripheral blood samples were collected from 192 patients with typical CLL, all meeting the recently revised diagnostic criteria of the National Cancer Institute Working Group.⁽²⁸⁾ Demographic, clinical and biological data for the patient cohort are given in Supplemental Table 1. Patients were mostly untreated (n=155) or off therapy for a median of 24 months before study inclusion (range, 6-192). The study was approved by the local Ethics Review Committee of each participating Institution.

Isolation of B cells

CD19 positive B cells were negatively selected from peripheral blood samples with the use of the Human B-cell enrichment cocktail kit (RosetteSep; StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) following the manufacturer's instructions. The desired cells were collected as a highly enriched population by centrifugation on a ficoll-hypaque gradient. The purity of the isolated cell populations (CD19⁺ cells) was assessed with the use of flow cytometry in the cell suspension and always found to exceed 97%.

RNA extraction and cDNA preparation

Total cellular RNA was isolated with the Qiagen RNeasy mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany). The isolation procedure included an additional incubation step with DNase (QIAGEN, Hilden, Germany) to ensure that the final product is devoid of genomic DNA (gDNA). One microgram RNA was reversed transcribed to cDNA using the RT² First Strand Kit (SABiosciences, USA).

PCR amplification and sequence analysis of IGHV-IGHD-IGHJ rearrangements

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) of IGHV-IGHD-IGHJ rearrangements was performed using IGHV leader primers along with appropriate IGHJ genes, as previously described.⁽²⁹⁾ Purified PCR amplicons were subjected to direct sequencing on both strands. Sequence data were analyzed using the IMGT® databases and the IMGT/V-QUEST tool (<http://www.imgt.org>).^(30, 31)

Gene expression profiling of the TLR signaling pathway

Gene expression profiling of the TLR signaling pathway in CLL was performed by real-time quantitative PCR on cDNA arrays using the RT² Profiler™ PCR Array kit (PAHS-018A array, SABiosciences). The method combines the advantages of Real-

Time Quantitative PCR (RQ-PCR) using SYBR Green I with the potential of analyzing the expression of multiple genes at once. Each RQ-PCR product was further validated by running a melting curve program immediately after the cycling program; only PCR products with one peak in temperatures above 80°C were further evaluated. In addition, the hot start polymerase used in all experiments ensured for accurate results by both preventing the amplification of primer dimers and other non-specific products and also providing high amplification efficiencies even for those genes that are more difficult to amplify.

The array consists of a panel of 96 primer sets used for the amplification of 84 genes relevant to the TLR pathway (Supplemental Table 2) plus five housekeeping genes (B2M, HPRT1, RPL13A, GAPDH and ACTB), a genomic DNA Control, three reverse transcription and three PCR quality controls. Only samples passing the PCR array run quality control, assessing the absence of genomic DNA contamination and proper amplification of the reverse transcription controls and the positive PCR controls, were further evaluated.

Data were obtained as threshold cycle (Ct) values. The threshold value was set to 0.01 for all experiments. According to the manufacturer's instructions, Ct values greater than 35 were indicative of no expression and further considered equal to 35 for mathematical reasons. If a gene showed an erratic curve in a particular run, the corresponding results were not further evaluated. Four of the five housekeeping genes (B2M, RPL13A, GAPDH and ACTB) had stable mRNA levels, evidenced by the lack of significant differences in Ct values across the samples, and their average Ct value was used for Δ Ct measurement; HPRT1 showed significant inter-patient variability and was excluded from the analysis. The Ct value consistency for the housekeeping genes indicates a proper normalization method and is used for Δ Ct measurement. The difference between the Ct value of each gene of interest (GOI) and the average Ct value of housekeeping genes in each sample (Delta Ct value, Δ Ct) was then measured. Based on Δ Ct value, which indicates the expression level for each TLR pathway-associated gene in relation to the reference (i.e. the average expression of the housekeeping genes), cases were assigned to four different expression levels: high (median Δ Ct value ≤ 6.6), intermediate (median Δ Ct value > 6.6 and ≤ 9.9), low (median Δ Ct value > 9.9 and ≤ 13.2) and negative (Δ Ct value > 13.2).

Fold differences (FD) in gene expression between different subgroups of patients were measured by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ algorithm.⁽³²⁾ The difference in expression of a certain gene between two subgroups was considered significant only if: (i) the fold difference in average $2^{-\Delta\Delta Ct}$ values was > 2 or < -2 (indicative of up-regulation or down-regulation,

respectively); and, (ii) the difference in ΔC_t values was found statistically significant ($p < 0.05$) by the t-test method.

Western blot analysis

Total cellular protein was isolated from purified B cells. Cells were washed twice with ice-cold PBS and lysed with lysis buffer (0.5M Tris-HCl, 5M NaCl, 0.5M EDTA pH 7.4, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate and a cocktail of protease inhibitors containing leupeptin and PMSF). Twenty to forty micrograms of protein were run on a 10% NuPAGE Bis-Tris gel (Invitrogen, Paisley, UK) under denaturing and reducing conditions. Proteins were transferred to PVDF membranes (BioRad, USA). Nonspecific binding of antibody to the membrane was blocked by one-hour incubation with WesternDot blocking buffer. Immunoblot analysis was performed using goat anti-TLR1 (1: 200 dilution, R&D Systems, Minneapolis, USA), goat anti TLR2 (1: 200 dilution, R&D Systems, Minneapolis, USA), mouse anti-TLR8 (1: 200 dilution, Santa Cruz Biotechnology, California, USA) and mouse anti-TLR9 (1: 200 dilution, Santa Cruz Biotechnology, California, USA). Mouse anti-actin (1:5000 dilution, Invitrogen, Paisley, UK) was used as a protein marker for the quantification of the protein bands and MagicMark™ XP as a protein standard for molecular weight estimation. The immunodetection of proteins was performed with the use of the WesternDot™ 625 Western Blot Kit (Invitrogen, Paisley, UK). The detection step relies on a biotinylated secondary antibody, goat anti-mouse or rabbit anti-goat respectively, and the interaction with a QdotR 625 streptavidin conjugate. Given that the QdotR 625 nanocrystal has a high extinction in the UV and blue wavelengths, the protein detection was performed with the use of MiniBIS Pro UV detection system (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel) according to the manufacturer's protocol. Ratios of TLR protein band intensity relative to β -actin band intensity were calculated for each sample with the use of the software QelQuant, provided with the UV detection system.

Flow cytometry

CD19⁺ cells were collected and washed twice in PBS. The cells were stained with anti-TLR1 (AbCam, Cambridge, UK), anti-TLR2 (Caltag; Buckingham, UK), anti-TLR4 (AbCam, Cambridge, UK) and anti-TLR6 (AbCam, Cambridge, UK) for 15 minutes. Intracellular staining was performed for TLR7 (AbCam, Cambridge, UK), TLR8 (Dendritics; Lyon, France) and TLR9 (AbCam, Cambridge, UK) using the BD Cytofix/Cytoperm kit (BD Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation Kit; BD, San Diego, CA) following the manufacturer's instructions. In all cases, the analysis was performed by

triple staining with anti-CD19 and 7-Amino-actinomycin D (7-AAD) vital dye (Beckman Coulter; Brea, CA) to exclude necrotic cells. Appropriate isotype controls were also used for each tested TLR. Details and concentrations of the reagents used in these experiments are given in Supplemental Table 3. Data were acquired on a BD FACS CANTO flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA). The analysis was performed using the BD FACS DIVA software. Only 7-AAD negative (viable cells) were analysed for TLR expression.

Statistical analysis

Descriptive statistics for discrete parameters included counts and frequency distributions. For quantitative variables, statistical measures included means, medians, standard deviation and min–max values. Significance of bivariate relationships between factors was assessed with the use of Chi-square and T-test tests. Progression-free survival (PFS) was measured from diagnosis to disease progression, and overall survival (OS) was measured from diagnosis to death or last follow-up. PFS and OS curves were plotted using the Kaplan-Meier method. Bivariate differences in survival distributions were studied with the use of Log-Rank test. Multivariate Cox regression models were implemented for the study of the simultaneous effect of factors on survival outcomes taking into account the relative effect of remaining parameters. Hazard ratios of outcomes under study were calculated for each parameter estimate as well as 95% confidence intervals. All analyses were performed at significance level of a 5% with the statistical package SPSS 17.0.

Results

IGHV gene repertoire and mutational status

IGHV-IGHD-IGHJ sequences were available for all cases of the study except one. Following the 98% cut-off value of identity to germline, 124/191 sequences (64.9%) were characterized as mutated, whereas the remainder (67/191 sequences, 35.1%) were characterized as unmutated; 52/67 unmutated sequences had 100% identity to germline. Detailed information on IGHV gene repertoire and mutational status is provided in Supplemental Table 4. Following previously described criteria, 30/191 cases expressed stereotyped BcRs assigned to seven different subsets (Supplemental Table 5). Within this group, 10 cases each expressed IGHV1/5/7-IGKV1(D)-39 BcRs (subset #1) or IGHV4-34/IGKV2-30 BcRs (subset #4), respectively, while 4 cases expressed IGHV4-39/IGKV1(D)-39 BcRs (subset #8). Subset #1 and #8 cases were uniformly unmutated, whereas subset #4 cases were uniformly mutated.

Gene expression profiling of the TLR signaling pathway: analysis at cohort level

Eighty-four genes relevant to the TLR signaling pathway were evaluated in the present study (Supplemental Table 2). The cDNA array included receptors, adaptors and proteins that interact with TLRs to form the signaling complex, plus effectors of TLR signaling pathway. Members of the NF- κ B, JNK/p38 and IRF signaling pathways which are activated by TLR signaling complex were also included. Finally, the array included cytokines and co-stimulatory molecules induced by TLRs through the activation of the NF- κ B and JNK/p38 signaling pathways.

Eighty-three of the 84 genes showed normal fluorescence curves in the great majority of runs. In contrast, the PTGS2 gene showed an erratic fluorescence curve in most runs and was not further analyzed. As detailed in Design and Methods, for each of the 83 TLR pathway-associated genes finally evaluated, cases were assigned to four different mRNA expression levels (high, intermediate, low, negative) based on Δ Ct values, which indicate the expression level for each gene of interest in relation to the reference (i.e. the average expression of four housekeeping genes, all with stable expression in all analyzed samples). A graphic summary of the results obtained at cohort level is given in Figure 1. Detailed results from the RQ-PCR experiments are listed in Table 1 and Supplemental Table 6.

Totally, 12 receptors were analyzed (TLR1-10, and the TLR-associated CD180 and SIGIRR). The highest mRNA expression levels were recorded for TLR7 and CD180.

Intermediate expression was found for TLR1, TLR6 and TLR10, while TLR2 and TLR9 were generally characterized by low expression. TLR4 and TLR8 had low-to-undetectable expression, with significant variation between the low positive cases. The great majority of cases were negative for TLR3, TLR5 and SIGIRR/TIR8 (Figure 1, Table 1 and Supplemental Table 6).

Almost all the adaptors and the TLR interacting proteins were highly expressed. In particular, among the adaptors, high expression was recorded for (i) MyD88, the central signaling molecule shared by all TLRs except TLR3, and (ii) TICAM1, which is responsible for mediating signaling from TLR3 and TLR4. The expression of the bridging adaptors TICAM2 and TIRAP, required for MyD88 and TICAM1 signaling, was low. The expression of TOLLIP, which inhibits subsequent events required for signaling was intermediate. Intermediate expression was also found for (i) the IL-1 receptor-associated kinase 1 & 2 (IRAK1, IRAK2) which interact with the adapters to form the signaling complex and (ii) TRAF6, which is associated with the IRAK family members to mediate signaling (Figure 1, Table 1 and Supplemental Table 6).

Several molecules that modulate the function of the TLR pathway (“effectors”) were found to be expressed in CLL, though variably. High to intermediate expression was recorded for all the genes involved in NF- κ B and JNK/p38 pathways except for CLEC4E, which is also not expressed by normal B lymphocytes. Significant variability was identified for MAP4K4 and the transcriptional factors JUN and FOS, (Figure 1, Table 1 and Supplemental Table 6).

Tumor necrosis factor (TNF) and lymphotoxin alpha (LTA, also known as TNF B) exhibited intermediate expression. Among interleukins (IL), low-to-undetectable mRNA levels were recorded for IL1B, IL6, IL8 and IL10 with significant variability among positive cases, while IL1A and IL2 were not expressed. The expression of CD80 and CD86 was low and intermediate, respectively, with significant inter-patient variability (Figure 1, Table 1 and Supplemental Table 6).

Since TLRs can also induce type I interferons through the activation of interferon regulatory factors (IRFs), we also evaluated the expression of several members of the IRF pathway and found high expression for IRF1 and IRF3. In addition, the expression of IFNG was low with significant variation between different CLL cases (Figure 1, Table 1 and Supplemental Table 6).

TLR protein expression in CLL

In order to determine whether the observed mRNA expression patterns reflect the actual proteins expressed, at least for selected TLR pathway-associated genes, flow cytometry (FACS) and/or Western blot (WB) analysis were carried out on the TLRs that were found to be expressed at the mRNA level (TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 and TLR10) plus the CD80 and CD86 molecules in 30 and 59 cases, respectively, with available material. Detailed results from these experiments are given in Supplemental Tables 7 and 8.

With a 5% cut-off value for positivity in FACS analysis, TLR1, TLR7, TLR10 and CD86 proteins were expressed in almost all CLL cases, in accordance to their mRNA levels, while CD80 was negative in all cases. TLR9 expression was detected in 8/30 (26.6%) cases tested; however, only 3/30 cases carried more than 10% positive cells. TLR6 protein was expressed in 20/30 cases. Despite high mRNA levels, in most of the cases (17/20) the TLR6 was expressed by a minority of CLL cells (5-10%). In contrast, TLR2 and TLR8 proteins were expressed by almost all cases despite low mRNA expression.

The FACS expression patterns of TLR1, TLR2, TLR8 and TLR9 were further confirmed by WB (Figure 2, Supplemental Table 8). In particular, TLR1 and TLR2 were positive in all cases tested, TLR8 was positive in 43/59 cases (72.7%), while TLR9 was positive in 18/59 (30.5%) cases. The ratio of TLR9 relative to β -actin protein band intensity was low in most positive cases.

Gene expression profiles in relation to BcR molecular features

Based on the fact that TLRs are considered to have a co-stimulatory effect on the BcR, we sought for differences in expression profiles for TLR signaling pathway-associated genes in subgroups of cases defined by BcR molecular features, such as the repertoire and mutational status of the IGHV genes or the expression of stereotyped BcRs. All comparisons were performed for the complete gene set profiled in the present study. However, in the following paragraphs, specific reference will be made only to those genes showing statistically different expression between the compared subgroups.

I. IGHV gene mutational status

Comparison in subgroups of cases carrying mutated vs. unmutated IGHV genes (124 and 67 cases, respectively) revealed significant upregulation of CD80, CD86, IL6, IFNG and TLR4 and downregulation of TLR8 and NFKBIL1 (an I κ B-like protein) in the mutated subgroup, with the greater difference recorded for CD86. Results from

this comparison are given graphically in Figure 3 and also detailed in Supplemental Table 9. Differences in CD86 protein expression were also found by FACS analysis: in particular, the median percentage of positive cells in the mutated and unmutated subgroups was 42% (range, 9.9 - 94.2%) and 18% (range, 5.3 - 51.1%), respectively ($p < 0.01$).

II. IGHV gene usage and BcR stereotypy

We analyzed the gene expression profiles of cases expressing stereotyped BcRs utilizing certain IGHV genes by comparing subset #4 (mutated IGHV4-34/1GKV2-30 BcR, 10 cases) vs. subset #1 (unmutated IGHV1/5/7-IGKV1(D)-39 BcR, 10 cases) vs. subset #8 (unmutated IGHV4-39/IGKV1(D)-39 BcR, 4 cases). Significant differences ($p < 0.05$) were identified concerning: (i) upregulation of TLR7 and NFKBIA (also known as I κ B α) and downregulation of CD86 and TLR4 in subset #1 vs subset #4 cases, respectively; (ii) upregulation of TLR4 and MAP4K4, which is considered to activate I κ BKB and, and downregulation of NFKBIA and RIPK2 (a component of TLR signaling complex) in subset #8 vs subset #1 cases, respectively; and, finally, (iii) upregulation of LY96 (associates with the extracellular domain of TLR4 and TLR2 and enhances their responses to the respective ligands) and downregulation of RIPK2 and CD86 in subset #8 vs subset #4 cases, respectively. These differences are shown graphically in Figure 4 and also listed in full in Supplemental Table 9.

In order to investigate whether these distinctive, “subset-biased” profiles were independent of IGHV gene usage or mutational status, we focused on subset #4, which we compared to: (i) all other mutated cases; and (ii) non-subset #4 cases with IGHV4-34 BcRs. In both comparisons, subset #4 cases expressed significantly higher levels of CD86 ($p < 0.05$) and, vice versa, significantly lower levels of IL10 ($p < 0.05$). Additionally, subset #4 cases exhibited significantly lower expression of IFNG ($p < 0.05$) compared to all other mutated cases and lower expression of NFKBIA ($p < 0.05$) compared to non-subset #4 IGHV4-34 cases.

Clinical correlations

With a median follow-up time of 53 months (range: 4-278 months), the median PFS and OS times in the entire cohort were 72 and 202 months, respectively (95% C.I.: 44.2-99.8 for PFS and 123-281 for OS). Genes with significant variation in expression level were further evaluated for possible correlations with PFS and OS. On univariate analysis, significant parameters ($p < 0.05$) for both PFS and OS were Binet clinical stage at diagnosis, IGHV gene mutational status and CD38 expression;

upregulation of CD86, IL6 and downregulation of NFKBIL1 were correlated only with longer PFS (Table 2). Multivariate Cox regression analysis (including all factors with significant associations) revealed that only clinical stage at diagnosis and IGHV mutational status retained statistical significance for both PFS and OS.

Discussion

Molecular, functional and epidemiological findings indicate that both auto and exogenous antigens expressed by common pathogens might be involved in the initiation and/or progression of CLL by selecting and stimulating leukemic B cells endowed with the appropriate antigen receptors.⁽⁴⁾ A large body of data has emphasized the role of adaptive immune receptors (BcRs), however, other possibilities have to be taken into account, including stimulation via innate immune receptors such as TLRs that have a co-stimulatory activity in adaptive immune responses. We here report a comprehensive gene expression profiling of the TLR signaling pathway in a series of 192 CLL patients showing that (i) CLL cells are molecularly competent for TLR signaling pathways with expression profiles indicative of antigen-activated B cells and (ii) also suggesting that TLR-mediated stimulation may be relevant to CLL development and evolution.

TLR9 along with TLR7 are the most studied members of the TLR family in CLL. Stimulation of CLL cells with CpG oligonucleotides, the natural ligand of TLR9, up-regulates the expression of co-stimulatory molecules, thereby potentially inducing the immunogenicity of CLL cells, and also has variable effects on proliferation and/or apoptosis.^(33, 34) Most studies have focused only on the functional outcome after stimulation and relatively little is known regarding the precise expression patterns of TLR9 in CLL. Our finding of low TLR9 mRNA and protein levels in most cases, with only a minority exhibiting intermediate levels, are in keeping with a previous study reporting variable mRNA expression levels and low protein levels in most CLL cases.⁽³⁵⁾ Therefore, the effects of CpG stimulation, widely used to obtain metaphases in classic cytogenetic analysis, should not be attributed exclusively to TLR9-mediated signaling. Further, the fluctuations of TLR9 expression by cells under different experimental conditions and/or in a different activation status must be taken into account.

The highest expression among the receptors was recorded for TLR7, in agreement with literature data.⁽²⁷⁾ This observation underlines the importance of stimulation via TLR7, as also shown by the treatment of CLL cells with TLR7 agonists, indicating that this receptor regulates a number of immunogenic properties^(36, 37) and is possibly

involved in apoptosis resistance.⁽³⁸⁾ High expression was also recorded for CD180, going along with previous reports that CD180 may promote the activation of both CLL and activated B cells.⁽³⁹⁾

Interestingly, significant discrepancies were identified between mRNA and protein levels for certain TLRs (TLR2, TLR6 and TLR8), as a high number of mRNA transcripts did not always correspond to strong protein expression and vice versa. Several factors could account for these discrepancies such as cellular intraclonal heterogeneity, differential activation status of malignant cells, different cell viability in different samples etc. Still these results might also be taken as evidence that post-transcriptional regulatory mechanisms might modulate TLR expression in CLL, in keeping with previous studies for other surface-membrane antigens (including nitric oxide synthase and CD71).^(40, 41)

The observed inter-patient variability regarding the expression patterns of some TLRs and downstream molecules prompted us to investigate potential associations with other features relating to molecular pathways that distinguish various subgroups of CLL patients. Given that each TLR recognizes distinct pathogen molecular patterns and that extensive “cross-talk” occurs between TLR- and BcR-mediated signals, it becomes reasonable to suggest that the observed variability might reflect distinctive antigen encounters. Along this line of reasoning, we explored potential differences in the TLR signaling pathway among CLL cases carrying BcRs with different molecular characteristics, in view of emerging evidence that the functional antigen reactivity profile endowed by the BcR likely underlies the biological behavior of the CLL clone, eventually determining clinical outcome.^(2, 4, 42)

First, we compared cases with mutated versus unmutated IG receptors and uncovered few differences, in keeping with the well established uniform gene expression profile of CLL regardless of IGHV gene mutational status.^(43, 44) That notwithstanding, among the few genes differentially expressed, the co-stimulatory molecules CD80 and CD86 were significantly up-regulated in mutated cases. This finding is in agreement with previous reports showing that stimulation of CLL cells through TLRs as well as CD40 induces CD80 and CD86 expression and increases cell immunogenicity.^(33, 45) A plausible interpretation is that mutated cases expressing higher levels of CD80 and CD86, being potentially more immunogenic, are more susceptible to microenvironmental control, which would explain at least in part, their more indolent clinical behavior.

CLL subgroups defined by IGHV gene mutational status are not homogeneous. Rather, within each mutational category, cases assigned to subsets expressing distinct stereotyped BcRs have been shown to share distinctive, subset-biased

genomic aberrations, gene expression profiles and, very likely, clinical presentation and outcome^(46, 47), leading to the concept that CLL clinical behavior might reflect the antigen reactivity profile of the leukemic clones.^(42, 48, 49) On this basis, we narrowed down our comparisons to cases assigned to different subsets with stereotyped BcRs with a special focus on subsets #1 and #4. This choice was partly guided by practical considerations: individually, each subset accounts for only a small fraction of a given CLL cohort and therefore sample availability is a limiting factor. At the same time, subsets #1 and #4 are the most populated subsets in the unmutated and mutated category, respectively, with increasing evidence that they may be considered as prototypes of “bad prognosis” and “good prognosis” subsets.

Comparison of the two subsets suggests a TLR7-tolerized state for CLL clones assigned to subset #4. As recently reported, CLL B cells can become TLR7-tolerized after exposure to TLR7 ligands with the tolerant state being recognized by the down-regulated TLR7 mRNA levels and the expression of high levels of co-stimulatory molecules.⁽³⁷⁾ Our finding of significant down-regulation of TLR7 and up-regulation of CD86 in subset #4 is in line with this scenario. Notably, we observed “subset #4-biased” profiles when we compared stereotyped subset #4 IGHV4-34 cases to: (i) cases utilizing “non-subset #4” IGHV4-34 BcRs; and, (ii) cases with mutated BcRs utilizing other IGHV genes. “Subset-biased” profiles of the TLR signaling pathway, independently of IGHV gene usage or mutational status, were also obtained when comparing unmutated cases belonging to subsets #1 and #8.

In conclusion, the main findings of our study can be summarized as follows. First, all the TLRs expressed in activated B cells were also expressed (though variably) in CLL, further supporting the notion that CLL B cells are antigen-experienced. Second, the TLR-signaling framework is competent in CLL cells, since several TLRs are expressed together with their cognate signaling mediators. Finally, variability of expression for specific TLR and related molecules was observed within different subsets of patients with stereotyped BcR. This latter finding suggests that CLL clones with distinctive antigen reactivity are able to respond in a distinct fashion also to different members of the TLR family, alluding to subset-biased recognition of and selection by the respective ligands.

Authorship and Disclosures

EA and SN performed research, analyzed data, and wrote the paper. NP and TT performed research NL, AA and FC-C provided samples and associated data. KL supervised research. KS, PG, MM and CB designed and supervised the research and wrote the paper.

References

1. Caligaris-Cappio F, Ghia P. Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease? *J Clin Oncol* 2008;26(27):4497-503.
2. Damle RN, Calissano C, Chiorazzi N. Chronic lymphocytic leukaemia: a disease of activated monoclonal B cells. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010;23(1):33-45.
3. 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.
4. Rosen A, Murray F, Evaldsson C, Rosenquist R. Antigens in chronic lymphocytic leukemia-Implications for cell origin and leukemogenesis. *Semin Cancer Biol* 2010;20(6):400-6.
5. Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*. 1997;91(3):295-8.
6. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:335-76.
7. Kawai T, Akira S. The role of pattern recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2001;11(5):373-84.
8. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001;2(8):675-80.
9. Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes and Infection*. 2004;6(15):1382-7.
10. Crampton SP, Voynova E, Bolland S. Innate pathways to B-cell activation and tolerance. *Ann NY Acad Sci*. 2010;1183:58-68.
11. Peng SL. Signaling in B cells via Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2005;17(3):230-6.
12. Bernasconi NL, Onai N, Lanzavecchia A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood*. 2003;101(11):4500-4.
13. Bourke E, Bosisio D, Golay J, Polentarutti N, Mantovani A. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood*. 2003;102(3):956-63.
14. Dasari P, Nicholson IC, Hodge G, Dandie GW, Zola H. Expression of toll-like receptors on B lymphocytes. *Cell Immunol*. 2005;236(1,2):140-5.
15. Pone EJ, Zan H, Zhang J, Al-Qahtani A, Xu Z, Casali P. Toll-like receptors and B-cell receptors synergize to induce immunoglobulin class-switch DNA recombination: relevance to microbial antibody responses. *Crit Rev Immunol* 2010;30(1):1-29.
16. Carmody RJ, Chen YH. Nuclear factor-kappa B: activation and regulation during toll-like receptor signaling. *Cell Mol Immunol*. 2007;4(1):31-41.
17. Park SR, Zan H, Pal Z, Zhang J, Al-Qahtani A, Pone EJ, et al. HoxC4 binds to the promoter of the cytidine deaminase AID gene to induce AID expression, class-switch DNA recombination and somatic hypermutation. *Nat Immunol*. 2009;10(5):540-50.
18. Chaturvedi A, Pierce SK. How location governs toll-like receptor signaling. *Traffic*. 2009;10(6):621-8.
19. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and toll-like receptors. *Nature*. 2002;416(6881):603-7.

20. Eckl-Dorna J, Batista FD. BCR-mediated uptake of antigen linked to TLR9-ligand stimulates B-cell proliferation and antigen-specific plasma cell formation. *Blood*. 2009;113(17):3969-77.
21. Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ. B cell autonomous TLR signaling and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2008;7(4):313-6.
22. Ruprecht CR, Lanzavecchia A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur J Immunol*. 2006;36(4):810-6.
23. Poovassery JS, Vanden Bush TJ, Bishop GA. Antigen receptor signals rescue B cells from TLR tolerance. *J Immunol*. 2009;183(5):2974-83.
24. Spaner DE, Masellis A. Toll-like receptor agonists in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2007;21(1):53-60.
25. Grandjeanette C, Kennel A, Faure GC, Béné MC FP. Expression of functional toll-like receptors by B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica*. 2007;92(9):1279-81.
26. Rozková D, Novotná L, Pytlík R, Hochová I, Kozák T, Bartůňková J, et al. Toll-like receptors on B-CLL cells: expression and functional consequences of their stimulation. *Int J Cancer*. 2010;126(5):1132-43.
27. Muzio M, Scielzo C, Bertilaccio MT, Frenquelli M, Ghia P, Caligaris-Cappio F. Expression and function of toll like receptors in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol*. 2009;144(4):507-16.
28. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12):5446-56.
29. 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.
30. Brochet X, Lefranc MP, Giudicelli V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(Web Server issue):W503-W8.
31. Lefranc MP, Giudicelli V, Ginestoux C, Jabado-Michaloud J, Folch G, Bellahcene F, et al. IMGT, the international ImMunoGeneTics information system. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(Database issue):D1006-12.
32. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
33. Decker T, Schneller F, Sparwasser T, Tretter T, Lipford GB, Wagner H, et al. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2000;95(3):999-1006.
34. Liang X, Moseman EA, Farrar MA, Bachanova V, Weisdorf DJ, Blazar BR, et al. Toll-like receptor 9 signaling by CpG-B oligodeoxynucleotides induces an apoptotic pathway in human chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2010;115(24):5041-52.
35. Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Petlickovski A, Pelosi M, Chiusolo P, et al. The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease. *Leukemia*. 2007;21(1):110-20.
36. Spaner DE, Shi Y, White D, Mena J, Hammond C, Tomic J, et al. Immunomodulatory effects of Toll-like receptor-7 activation on CLL cells. *Leukemia*. 2006;20(2):286-95.

37. Shi Y, White D, He L, Miller RL, Spaner DE. Toll-like receptor-7 tolerizes malignant B cells and enhances killing by cytotoxic agents. *Cancer Res* 2007;67(4):1823-31.
38. Hammadi A, Billard C, Faussat AM, Kolb JP. Resistance in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells through engagement of Toll-like receptor 7 (TLR-7) and NF- κ B activation. *Nitric Oxide*. 2008;19:138-45.
39. Porakishvili N, Kulikova N, Jewell AP, Youinou PY, Yong K, Nathwani A, et al. Differential expression of CD180 and IgM by B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells using mutated and unmutated immunoglobulin VH genes. *Br J Haematol*. 2005;131(3):313-9.
40. Tiscornia AC, Cayota A, Landon AI, Brito C, Oppezio P, Vuillier F, et al. Post-transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase in chronic lymphocytic leukemia B cells in pro- and antiapoptotic culture conditions. *Leukemia*. 2004;18(1):48-56.
41. Chiotoglou I, Smilevska T, Samara M, Likousi S, Belessi C, Athanasiadou I, et al. Predominantly post-transcriptional regulation of activation molecules in chronic lymphocytic leukemia: the case of transferrin receptors. *Blood Cells Mol Dis*. 2008;41(2):203-9.
42. Chu CC, CATERA R, Zhang L, Didier S, Agagnina BM, Damle RN, et al. Many chronic lymphocytic leukemia antibodies recognize apoptotic cells with exposed nonmuscle myosin heavy chain IIA: implications for patient outcome and cell of origin. *Blood*. 2010;115(19):3907-15.
43. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*. 2001;194(11):1625-38.
44. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2001;194(11):1639-47.
45. Van den Hove LE, Van Gool SW, Vandenberghe P, Bakkus M, Thielemans K, Boogaerts MA, et al. CD40 triggering of chronic lymphocytic leukemia B cells results in efficient alloantigen presentation and cytotoxic T lymphocyte induction by up-regulation of CD80 and CD86 costimulatory molecules. *Leukemia*. 1997;11(4):572-80.
46. Marincevic M, Mansouri M, Kanduri M, Isaksson A, Göransson H, Smedby KE, et al. Distinct gene expression profiles in subsets of chronic lymphocytic leukemia expressing stereotyped IGHV4-34 B-cell receptors. *Haematologica*. 2010;95(12):2072-9.
47. Marincevic M, Cahill N, Gunnarsson R, Isaksson A, Mansouri M, Göransson 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.
48. Ghia P, Chiorazzi N, Stamatopoulos K. Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation. *J Intern Med*. 2008;264(6):549-62.
49. Lanemo Myhrinder A, Hellqvist E, Sidorova E, Söderberg A, Baxendale H, Dahle C, et al. A new perspective: molecular motifs on oxidized LDL, apoptotic cells, and bacteria are targets for chronic lymphocytic leukemia antibodies. *Blood*. 2008;111(7):3838-48.

Table 1. mRNA expression levels for the 83 genes analyzed in the present study.

Gene	Expression Level	Gene	Expression Level
Receptors		NF-κB pathway /JNK/p38 pathway	
CD180	HIGH	CHUK	HIGH
TLR7	HIGH	IKBKB	HIGH
TLR1	INTERMEDIATE	JUN*	HIGH
TLR6	INTERMEDIATE	MAP2K3	HIGH
TLR10	INTERMEDIATE	MAP3K1	HIGH
TLR2	LOW	MAPK8	HIGH
TLR4*	LOW	NFKB1	HIGH
TLR8*	LOW	NFKBIA	HIGH
TLR9	LOW	REL	HIGH
SIGIRR	NEGATIVE	RELA	HIGH
TLR3	NEGATIVE	ELK1	INTERMEDIATE
TLR5	NEGATIVE	FOS*	INTERMEDIATE
Signaling complex		MAP2K4	INTERMEDIATE
HMGB1	HIGH	MAP4K4*	INTERMEDIATE
HRAS	HIGH	NFKB2	INTERMEDIATE
HSPA1A	HIGH	NFKBIL1	INTERMEDIATE
HSPD1	HIGH	NFRKB	INTERMEDIATE
LY86	HIGH	CLEC4E	NEGATIVE
MAPK8IP3	HIGH	Cytokines and costimulatory molecules	
MYD88	HIGH	CD86*	INTERMEDIATE
PELI1	HIGH	LTA	INTERMEDIATE
RIPK2	HIGH	TNF	INTERMEDIATE
TICAM1	HIGH	IL12A	INTERMEDIATE
TRAF6	HIGH	CD80*	LOW
BTK	INTERMEDIATE	IL1B*	LOW
IRAK1	INTERMEDIATE	IL8*	LOW
IRAK2	INTERMEDIATE	CCL2	NEGATIVE
LY96	INTERMEDIATE	CSF2	NEGATIVE
SARM1	INTERMEDIATE	CSF3	NEGATIVE
TOLLIP	INTERMEDIATE	IL10*	NEGATIVE
TICAM2	LOW	IL1A	NEGATIVE
TIRAP	LOW	IL2	NEGATIVE
CD14	NEGATIVE	IL6*	NEGATIVE
Effectors		TNFRSF1A	NEGATIVE
EIF2AK2	HIGH	IRF pathway	
NR2C2	HIGH	IRF1	HIGH
PRKRA	HIGH	IRF3	HIGH
UBE2N	HIGH	TBK1	INTERMEDIATE
CASP8	INTERMEDIATE	IFNG*	LOW
FADD	INTERMEDIATE	CXCL10	NEGATIVE
MAP3K7	INTERMEDIATE	IFNA1	NEGATIVE
PPARA	INTERMEDIATE	IFNB1	NEGATIVE
TAB1	INTERMEDIATE		
ECSIT	INTERMEDIATE		
UBE2V1	LOW		

*Cases with significant variation in this particular gene expression among different samples.

Gene names are those approved by the HUGO Nomenclature Committee. Additional information is given in Supplemental Table 2.

Table 2. Clinical correlations: results from univariate analysis.

Parameter	Overall survival Log Rank test	Progression-free survival Log Rank test
IGHV gene mutational status	<0.005	<0.005
CD38 positivity (cutoff: 7%)	0.006	<0.005
Binet stage (A vs. B+C)	<0.005	<0.005
Upregulation of CD86	0.445	<0.005
Upregulation of IL6	0.819	0.052
Downregulation of NFKBIL1	0.959	<0.005

Legend to figures

Figure 1. Expression patterns of the TLR signaling pathway in CLL. For clarity reasons, only the major molecules involved in TLR signaling are shown in the figure. Detailed results about the mRNA expression levels of all the molecules evaluated in this study can be found in Supplemental Table 6. Gene names are those approved by the HUGO Gene Nomenclature Committee.

Figure 2. TLR8 and TLR9 mRNA and protein expression in CLL. RQ-PCR (upper diagrams), Western blotting (middle diagrams) and flow cytometry results (lower diagrams) are shown for two representative cases. Overall, both mRNA and protein levels for TLR9 were low, whereas TLR8 protein levels were relatively high despite generally low mRNA levels, indicating possible post-transcriptional regulation of TLR8 expression. ACTB: β -actin.

Figure 3. Differential expression of TLR pathway-associated genes in CLL cases with mutated (M) or unmutated (UM) IG receptors. IL6: interleukin 6; IFNG: γ -interferon; NFKBIL1: Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 1. Note: lower values on the y axis in fact correspond to higher expression levels, given that Δ Ct of each sample is determined as the difference between the Ct value of the gene of interest and the average Ct value of the housekeeping genes; for additional details, see Patients and Methods. The graphs were created using the GraphPad Prism 5 software (La Jolla, CA, USA).

Figure 4. Differential expression profiles in subsets of CLL cases with stereotyped BcRs. Each column concerns a different case, while each cell depicts graphically the actual results (ΔC_t values) obtained for a given case. A 2-color scale formatting scheme was utilized for the conditional formatting of the cells, ranging from red (high) to green (low). 1: subset #1 (IGHV1/5/7-IGKV1(D)-39); 4: subset #4 (IGHV4-34/IGKV2-30); 8: subset #8 (IGHV4-39/IGKV1(D)-39); subset numbering follows Stamatopoulos et al²⁹.

Figure 1

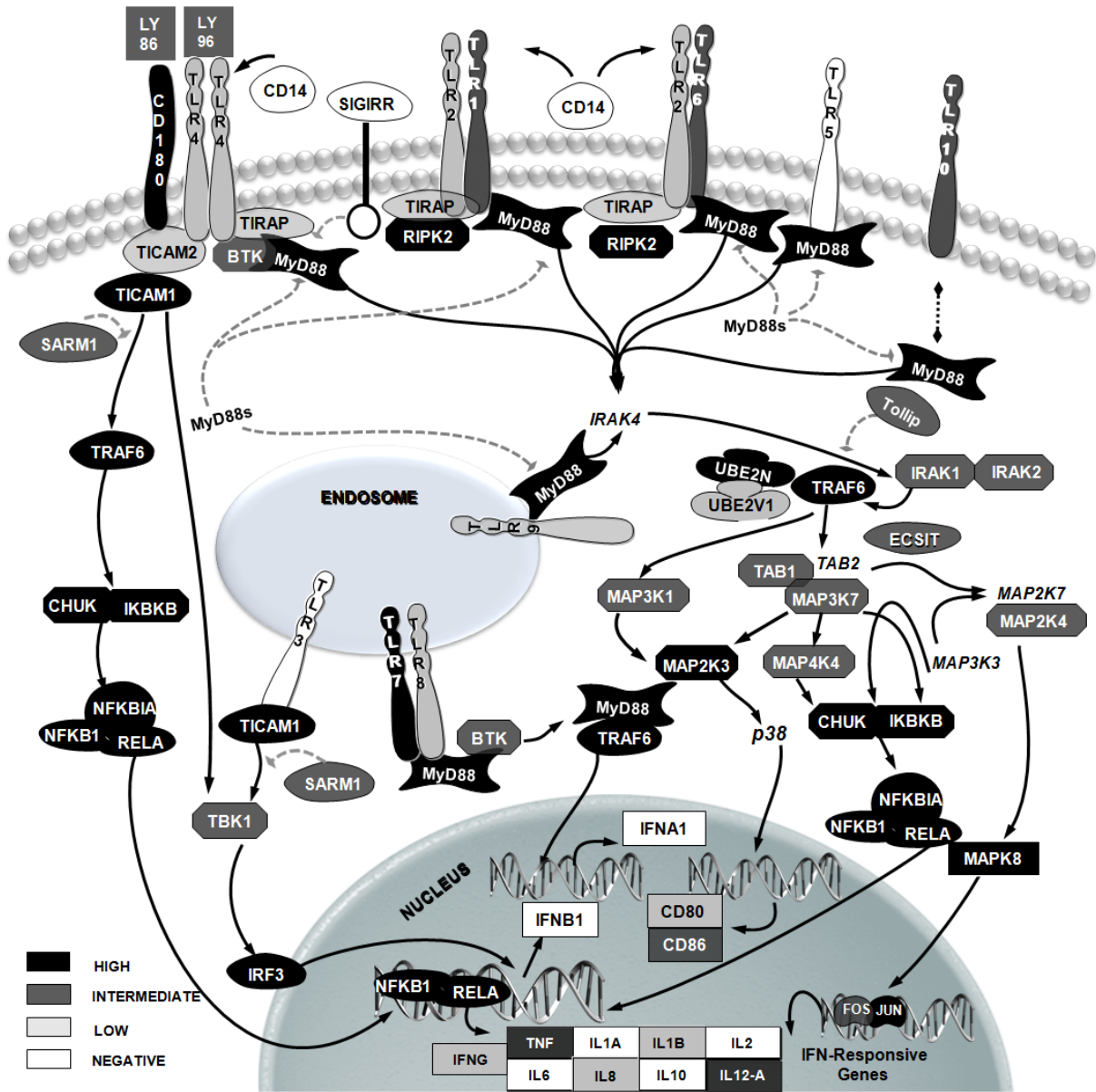


Figure 2

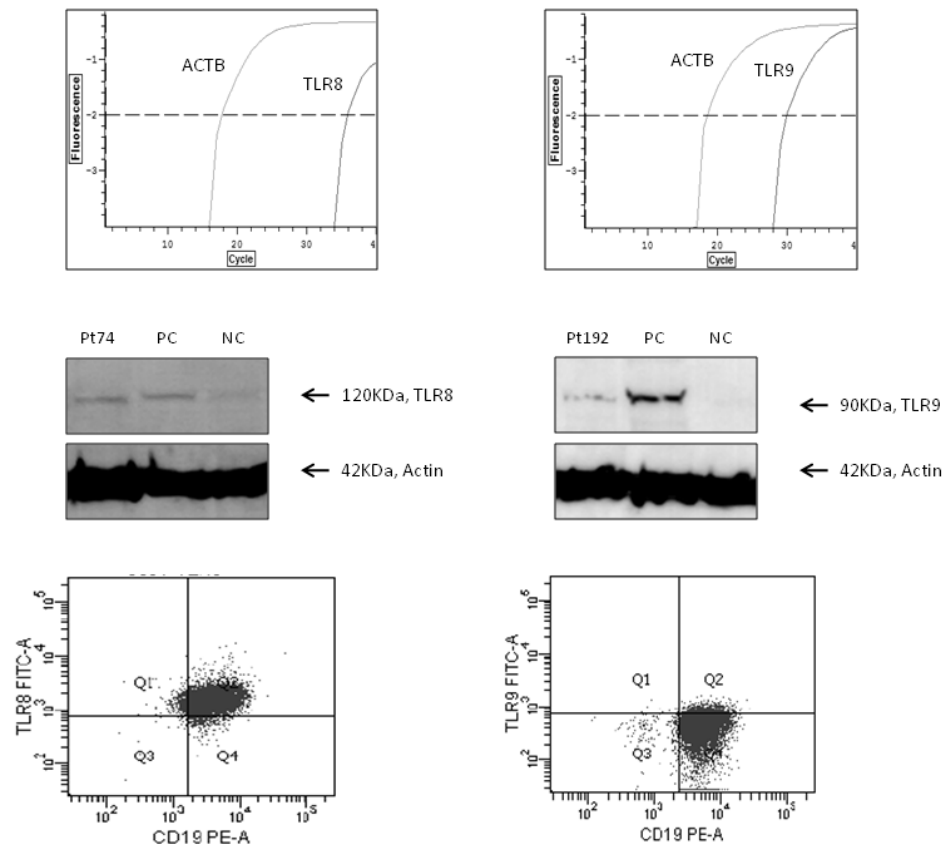


Figure 3

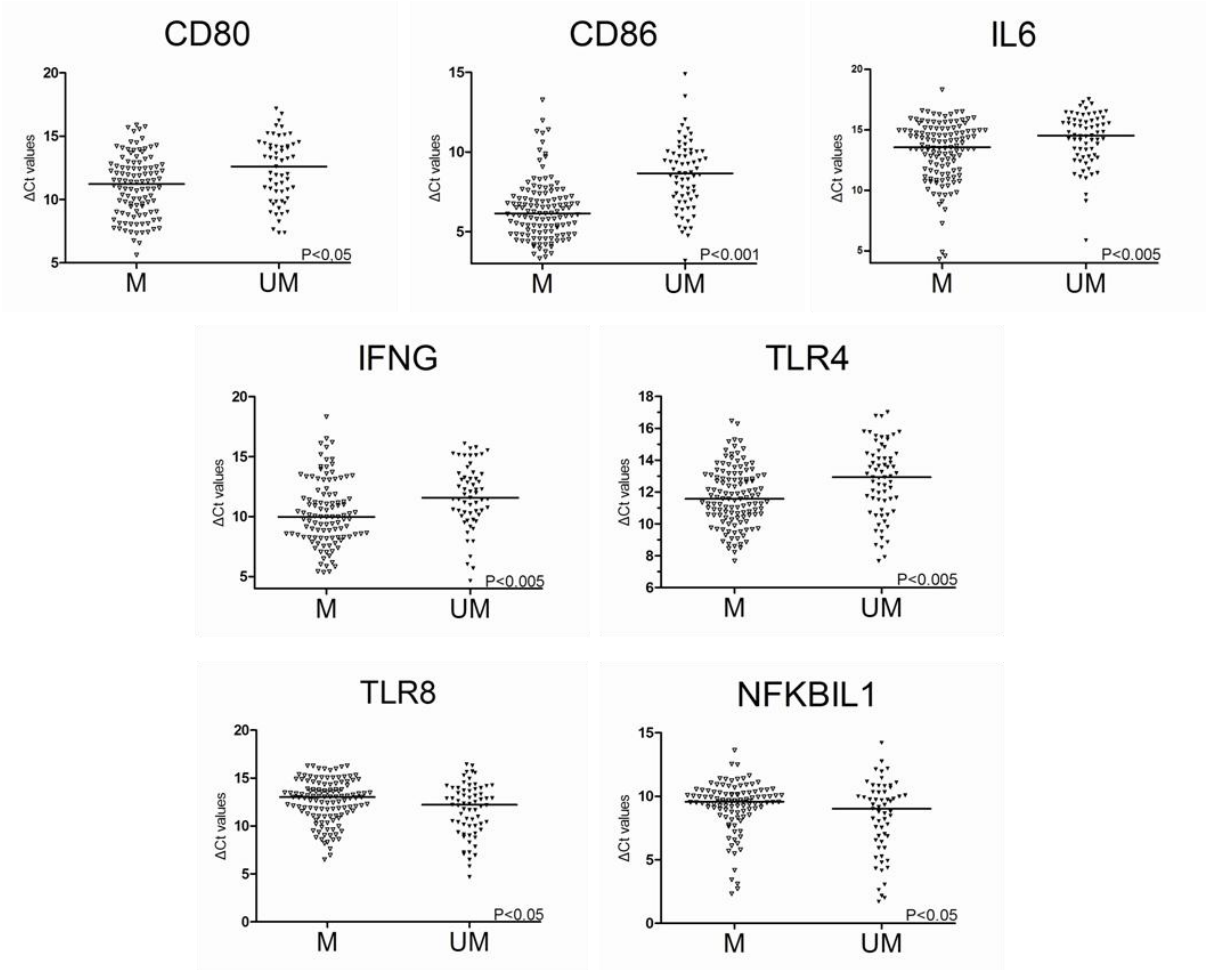
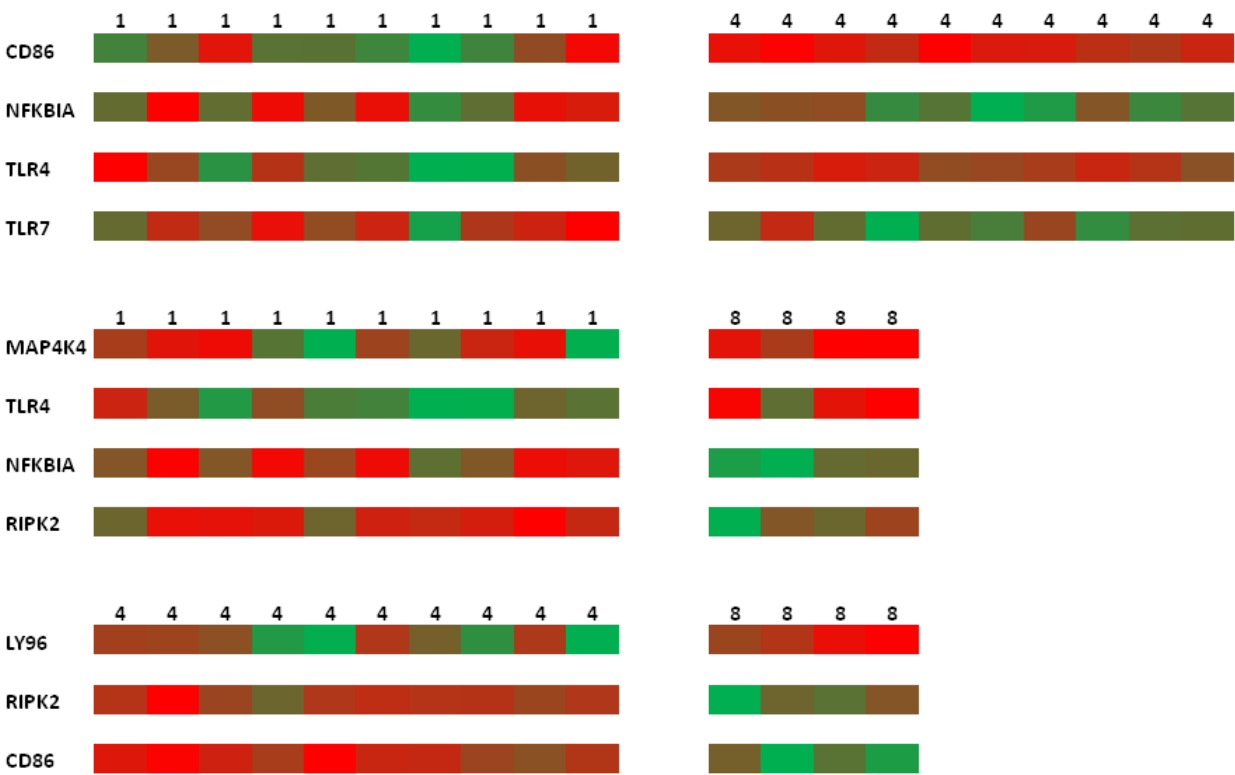


Figure 4



ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΑΡΒΑΝΙΤΗ ΕΛΕΝΗ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο: Αρβανίτη Ελένη

Ημερομηνία γέννησης: 30-03-1983

Τόπος γέννησης: Πειραιάς

Διεύθυνση κατοικίας: Θερμοπυλών 7, Αμφιάλη 187-57

Αριθμός τηλεφώνου: 210-4328096, 6932604452

E-mail: elena.arvaniti@gmail.com

ΣΠΟΥΔΕΣ-ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- 1997 - 2000: 2^ο Ενιαίο Λύκειο Κερατσινίου - Απόφοιτος Θετικής Κατεύθυνσης
- 2001 - 2006: Τμήμα Βιολογίας Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Αποφοίτηση με χαρακτηρισμό Λίαν Καλώς)
- 2004 - 2005: Διπλωματική εργασία στον τομέα Γενετικής και Βιοτεχνολογίας με θέμα: «Διερεύνηση πιθανής συσχέτισης του πολυμορφισμού -174G>C του υποκινητή του γονιδίου της ιντερλευκίνης-6 (IL-6 -174G>C) και του πολυμορφισμού -786T>C του γονιδίου της ενδοθηλιακής συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (eNOS -786T>C) με την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου στον Ελληνικό πληθυσμό».
- Σεπτέμβριος 2004 - Φεβρουάριος 2005: Εκπαίδευση και παρακολούθηση τεχνικών μοριακής βιολογίας και βιοτεχνολογίας στο Βιοιατρικό Ινστιτούτο "SERUM". Συμμετοχή στις εργασίες εργαστηρίου Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής.
- 2005 - 2006: Πρακτική άσκηση στο εργαστήριο Μοριακής Διάγνωσης του Αιματολογικού Τμήματος του Γ.Ν.Νίκαιας.
- 2007 - σήμερα: Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στον τομέα Γενετικής και Βιοτεχνολογίας με θέμα: «Μελέτη toll-like υποδοχέων (TLRs) σε ασθενείς με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία».

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 2006 - σήμερα: Επιστημονικός συνεργάτης του Εργαστηρίου Μοριακής Διάγνωσης του Αιματολογικού Τμήματος του Γ.Ν.Νίκαιας. Συμμετοχή και παρακολούθηση ερευνητικών και διαγνωστικών εργασιών.
- Σεπτέμβριος 2009 - Μάιος 2010: 8μηνη σύμβαση ιδιωτικού δικαίου στο τμήμα Αιμοδοσίας του Θριασίου νοσοκομείου Ελευσίνας. Ορολογικός έλεγχος για λοιμώδη νοσήματα, επιβεβαίωση λοίμωξης HCV, έλεγχος συμβατότητας.
- Φεβρουάριος 2011 – σήμερα: 12μηνη σύμβαση ιδιωτικού δικαίου ως επικουρικός βιολόγος στο Παθολογοανατομικό τμήμα του Ειδικού Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Πειραιά «Μεταξά». Εργαστήριο ανοσοϊστοχημείας.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

- Απομόνωση μονοπυρήνων από δείγματα περιφερικού αίματος και μυελού των οστών μετά από φυγοκέντρηση σε βαθμίδωση φικόλλης
- Απομόνωση λευκών από δείγματα περιφερικού αίματος και μυελού των οστών μετά από λύση των ερυθρών
- Απομόνωση CD19 θετικών λεμφοκυττάρων και κοκκιοκυττάρων από δείγματα περιφερικού αίματος ή μυελού των οστών, με τη μέθοδο σχηματισμού ροζετών διαχωρισμού (Αρνητική επιλογή)
- Απομόνωση DNA (στήλες, χρήση κεκορεσμένο διαλύματος NaCl)
- Απομόνωση RNA (μέθοδος θειοκυανικού γουανιδινίου, στήλες)
- Ποιοτικός και ποσοτικός χαρακτηρισμός DNA-RNA (φασματοσκοπία απορρόφησης και φθορισμού)
- Σύνθεση cDNA
- PCR (RT-PCR, RFLPs, Multiplex, nested, SSCP)
- Real-time PCR, PCR Arrays
- Ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα αγαρόζης, αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης και πολυακρυλαμίδης
- Καθαρισμός προϊόντος PCR
- Κλωνοποίηση προϊόντων PCR (πλασμιδιακοί φορείς / μετασχηματισμός βακτηρίων)
- Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (mini- / midipreps)
- Ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA
- Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (Αυτόματο sequencing)

- Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών από κυτταρικά εκχυλίσματα
- Ανοσοαποτύπωση κατά Western
- Τεχνικές ανίχνευσης σημειακών μεταλλάξεων (restriction enzyme techniques, allelic specific PCR)
- Ταυτοποίηση ομάδων αίματος κατά ABO και RhD
- Προσδιορισμός φαινοτύπου αίματος, έλεγχος για παρουσία μη αναμενόμενων αντισωμάτων (Panel αντισωμάτων)
- Έλεγχος συμβατότητας προς της μετάγγισης
- Άμεση-Έμμεση Coombs
- Ανίχνευση αντισωμάτων για ιούς ηπατίτιδας A, ηπατίτιδας B, ηπατίτιδας C, HIV1,2 και HTLVΙ,ΙΙ, με τη χρήση αυτόματου αναλυτή και εφαρμογή των αρχών της χημιοφωταύγειας ή της ELISA
- Ανοσοαποτύπωση σε ζώνες (INNO-LIA) ως επιβεβαιωτική δοκιμασία ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών του ιού της ηπατίτιδας C
- Δοκιμασία κροκίδωσης, ταχείας αντιδρασίνης πλάσματος (Rapid Plasma Reagin-RPR). Δοκιμασία για σύφιλη
- Τεχνικές ανοσοϊστοχημείας σε τομές παραφίνης
- Χρωμογόνος in Situ υβριδισμός (Chromogenic In Situ Hybridization-CISH)

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά (Άριστα) - Certificate of Proficiency in English University of Michigan (2004)

ΓΝΩΣΕΙΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟΥ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗ

- Πιστοποιημένη γνώση χρήσης Η/Υ σε περιβάλλον Windows και χειρισμός προγραμμάτων αυτοματισμού γραφείου και πλοήγησης στο Διαδίκτυο: Word, Excel, PowerPoint, Internet (ECDL Progress)
- Στατιστικά πακέτα: SPSS, GraphPad Prism
- Επεξεργασία εικόνας: Photoshop CS 2, ACDSee Pro 3
- Εργαλεία για την ανάλυση αλληλουχιών: BLAST (**Basic Local Alignment Search Tool**), **ClustalW**, **IMG**T (international ImMunoGeneTics information system)

ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

- «Toll-like υποδοχείς: Μαθήματα από φυσιολογικά και κακοήγη Β-κύτταρα». Παρουσίαση στο μεταπτυχιακό μάθημα Φυσιολογία-Ανοσολογία για υποψήφιους διδάκτορες. Μάρτιος 2009
- «Μοριακή βάση της αλληλεπίδρασης φυσικών και συνθετικών ενώσεων με τον υποδοχέα των οιστρογόνων». Παρουσίαση στο μεταπτυχιακό μάθημα Θέματα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας για υποψήφιους διδάκτορες. Φεβρουάριος 2009
- «Βακτηριακή διαφοροποίηση». Παρουσίαση στο μεταπτυχιακό μάθημα Θέματα Γενετικής για υποψήφιους διδάκτορες. Μάιος 2009
- «Αδρανοποίηση του Χ-χρωμοσώματος». Παρουσίαση στο προπτυχιακό μάθημα Μοριακή Βιολογία Ανάπτυξης. Ιανουάριος 2005
- «Μιτοχόνδρια, Ασθένειες, Γήρανση, Εξέλιξη». Παρουσίαση στο προπτυχιακό μάθημα Ειδικά Κεφάλαια Κυτταρικής Βιολογίας. Ιούνιος 2004
- «Εφαρμογές των ακτίνων Χ». Παρουσίαση στο προπτυχιακό μάθημα Φυσική. Μάιος 2002

ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 27^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών. Μάιος 2005, Ναύπλιο
- Πρόγραμμα «Κοινωνία και Υγεία» του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. «Συμβολή της μοριακής βιολογίας στην αντιμετώπιση του καρκίνου» Μηχανισμοί καρκινογένεσης Αιματολογικές νεοπλασίες - Συμβολή μοριακής βιολογίας στη διάγνωση και θεραπεία των λευχαιμιών. ΕΙΕ Νοέμβριος 2005, Αθήνα
- 57^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας. Δεκέμβριος 2005, Αθήνα
- 17^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο. ΕΑΕ Νοέμβριος 2006, Αθήνα
- Ημερίδα της Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας με θέμα: «Μεταβολισμός του σιδήρου και οι διαταραχές του». Μάρτιος 2007, Αθήνα
- Twelfth International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. September 2007, London
- 18^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο. ΕΑΕ Νοέμβριος 2007, Θεσσαλονίκη
- 2nd Educational Workshop on Immunoglobulin Gene Analysis in Chronic Lymphocytic Leukemia. October 2008, Paris
- 19^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο. ΕΑΕ Νοέμβριος 2008, Αθήνα

- Επιστημονικό συμπόσιο Α΄ Παιδιατρικής κλινικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης με θέμα : «Αθροιστικά λυσοσωμικά νοσήματα - Ο ρόλος του παιδιάτρου». Νοέμβριος 2008, Θεσσαλονίκη
- 1^ο Μετεκπαιδευτικό σεμινάριο Μοριακής Διαγνωστικής. Πανελλήνια Ένωση Βιοεπιστημόνων Φεβρουάριος 2009, Αθήνα
- Δημερίδα της Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας με θέμα: «Νεότερες εξελίξεις στην διαγνωστική προσέγγιση των αιματολογικών κακοηθειών. Από τη μορφολογία και τον ανοσοφαινότυπο στο γονότυπο». Μάιος 2009, Αθήνα
- 3rd Educational Workshop on Immunoglobulin Gene Analysis in Chronic Lymphocytic Leukemia. Σεπτέμβριος 2009, Θεσσαλονίκη
- Antigens and Lymphomas Meeting. Οκτώβριος 2010, Σαντορίνη
- Ημερίδα της Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας με θέμα: «Θεραπευτικές εξελίξεις στα λεμφώματα - Δύσκολα ερωτήματα, πρόσφατες απαντήσεις, νέες προκλήσεις». Οκτώβριος 2010, Σαντορίνη
- 21^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο. ΕΑΕ Νοέμβριος 2010, Θεσσαλονίκη
- Ημερίδα της Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας με θέμα: «Θρόμβωση και καρκίνος». Νοέμβριος 2010, Αθήνα
- 22^ο Πανελλήνιο συνέδριο AIDS. Νοέμβριος 2010, Αθήνα
- 17^ο Πανελλήνιο συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας. Απρίλιος 2011, Αθήνα

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

1. **Arvaniti H.**, Vasilakou M., Hatzipanagi D., Votteas V., Kasparian H., Pantazopoulos N., Peste K., Spyropoulou-Vlahou M., Stauropoulou-Gkioka A., Lamnisou K. Study for possible association of a polymorphism of interleukin-6 gene promoter and premature coronary artery disease in the Greek population. Αναρτημένη ανακοίνωση στο Συνέδριο European Human Genetics, Μάιος 2005, Πράγα.
2. **Αρβανίτη Ε.**, Βασιλάκου Μ., Χατζηπαναγή Δ., Βοτπέας Β., Κασπαριάν Ε., Πανταζόπουλος Ν., Πέστε Κ., Σπυροπούλου-Βλάχου Μ., Σταυροπούλου-Γκιόκα Α., Λάμνησου Κ. Μελέτη για πιθανή συσχέτιση του πολυμορφισμού -174G/C του υποκινητή του γονιδίου της ιντερλευκίνης-6 με την εκδήλωση στεφανιαίας νόσου στον Ελληνικό πληθυσμό. Ανακοίνωση στο 27^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών. Μάιος 2005, Ναύπλιο.

3. Καλαγιάκου Ε., **Αρβανίτη Ε.**, Σαμαρίδης Ε., Μπέλεση Χ., Μανιουδάκη Ε., Βαλλιανάτου Κ., Ράλλης Μ., Μαραντίδου Φ., Βλαχάκου Σ., Γλύκα Μ., Παράση Αικ., Λαουτάρης Ν. Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα και των υποδοχέων του στη Β-Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία. Προφορική ανακοίνωση, 17^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Νοέμβριος 2006, Αθήνα.
4. Δαγκλής Α., Τσάκου Ε., **Αρβανίτη Ε.**, Smilevska T., Σταυρογιάννη Ν, Βαδικόλια Χ., Κοκκίνη Γ., Γεωργόπουλος Χ., Λαουτάρης Ν., Αναγνωστόπουλος Α., Φάσσας Α., Μπέλεση Χ., Σταματόπουλος Κ. Ατελείς αναδιατάξεις IGHDJ. Προφορική ανακοίνωση, 17^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Νοέμβριος 2006, Αθήνα.
5. **Αρβανίτη Ε.**, Κοκκίνη Γ., Γούναρη Μ., Χατζηδημητρίου Α., Παπαδάκη Θ., Μανιουδάκη Ε., Χατζούλη Μ., Τσάκου Ε., Μαραντίδου Φ., Σταλικά Ε., Βλαχάκου Σ., Πατεράκης Γ., Σταματόπουλος Κ., Μπέλεση Χ., Φάσσας Α., Αναγνωστόπουλος Α., Λαουτάρης Ν. Ενδείξεις για κλωνική επαύξηση και επιλεκτική χρησιμοποίηση γονιδίων IGHV στην επιμένουσα πολυκλωνική Β Λεμφοκυττάρωση (ΕΠΒΛ). Προφορική ανακοίνωση, 18^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Νοέμβριος 2007, Θεσσαλονίκη.
6. Καλαγιάκου Ε., Μανιουδάκη Ε., Σαμαρίδης Ε., Βαλλιανάτου Κ., **Αρβανίτη Ε.**, Τσάκου Ε., Σταμπολίδου Α., Ερωτοκρίτου Γ., Κόδρος Δ., Μπέλεση Χ., Παράση Α., Λαουτάρης Ν. Συχνότητα ανίχνευσης κληρονομικών θρομβοφιλικών παραγόντων σε ασθενείς με αληθή πολυκυτταραιμία και ιδιοπαθή θρομβοκυττάρωση. Συσχέτιση με τη μετάλλαξη V617F του JAK-2 γονιδίου και τη συχνότητα ανάπτυξης θρόμβωσης. Προφορική ανακοίνωση, 18^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Νοέμβριος 2007, Θεσσαλονίκη.
7. Αγαθαγγελίδης Α., Δούκα Β., Αθανασιάδου Ι., Αθανασιάδου Α., Σταυρογιάννη Ν., Χατζηδημητρίου Α., Μπίκος Β., Σίδη Β., **Αρβανίτη Ε.**, Λαλαγιάννη Χ., Γκαϊτατζή Μ., Τσομπανάκου Α., Σακελλάρη Ι., Σαλούμ Ρ., Κολιούσκας Δ., Σκούρας Ζ., Μπέλεση Χ., Σταματόπουλος Κ., Φάσσας Α., Αναγνωστόπουλος Α. Πρότυπα αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ στη Β-Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (Β-ΟΛΛ). Προφορική ανακοίνωση, 18^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Νοέμβριος 2007, Θεσσαλονίκη.

8. **Αρβανίτη Ε.**, Κοκκίνη Γ., Πατεράκης Γ., Μανιουδάκη Ε., Παλέτα Α., Μερκούρη Σ., Παπαδάκη Θ., Αναγνωστόπουλος Α., Λαουτάρης Ν., Κόλλια Π., Σταματόπουλος Κ., Μπέλεση Χ. Επιλεκτικότητα ρεπερτορίου των γονιδίων IgK και ενδείξεις για κλωνική επαύξηση στην Επιμένουσα Β Πολυκλωνική Λεμφοκυττάρωση. Προφορική ανακοίνωση, 19^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Νοέμβριος 2008, Αθήνα.
9. Ντούφα Σ., **Αρβανίτη Ε.**, Τουλουμενίδου Τ., Σταυρογιάννη Ν., Ταχυνοπούλου Β., Βαδικόλια Χ., Νακόπουλος Θ., Λαουτάρης Ν., Αναγνωστόπουλος Α., Κόλλια Π., Μπέλεση Χ., Σταματόπουλος Κ. Ευρεία μοριακή ανάλυση υποδοχέων έμφυτης ανοσίας τύπου Toll (Toll-like Receptors, TLRs), συνδετών, προσαρμοστικών μορίων και τελεστών της σηματοδοτικής οδού TLR στη Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία. Προφορική ανακοίνωση, 19^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Νοέμβριος 2008, Αθήνα.
10. Χατζηδημητρίου Α., Δαρζέντας Ν., Murray F., Smilevska T., **Αρβανίτη Ε.**, Τσαυταρής Α., Λαουτάρης Ν., Αναγνωστόπουλος Α., Davi F., Ghia P., Rosenquist R., Σταματόπουλος Κ., Μπέλεση Χ. Ο ρόλος των ελαφριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών (IgK, IgL) στην αναγνώριση και απιλογή από αντιγόνο στη Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία. Προφορική ανακοίνωση, 19^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Νοέμβριος 2008, Αθήνα.
11. Hadzidimitriou A., Darzentas N., Murray F., Smilevska T., **Arvaniti E.**, Tresoldi C., Tsaftaris A., Laoutaris N., Anagnostopoulos A., Davi F., Ghia P., Rosenquist R., Stamatopoulos K., Belessi C. Evidence for the Significant Role of Immunoglobulin Light Chains in Antigen Recognition and Selection in Chronic Lymphocytic Leukemia. Προφορική ανακοίνωση, ASH 2008, San Diego, California
12. **Arvaniti E.**, Ntoufa S., Papakonstantinou N., Touloumenidou T., Laoutaris N., Anagnostopoulos A., Lamnisou K., Caligaris-Cappio F., Stamatopoulos K., Ghia P., Muzio M., Belessi C. Toll-like receptors signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia: Distinct gene expression profiles of potential pathogenetic significance in specific subsets of patients. Αναρτημένη ανακοίνωση, Antigens and lymphomas meeting, Οκτώβριος 2010, Σαντορίνη

13. **Arvaniti E.**, Ntoufa S., Papakonstantinou N., Touloumenidou T., Laoutaris N., Anagnostopoulos A., Lamnisou K., Caligaris-Cappio F., Stamatopoulos K., Ghia P., Muzio M., Belessi C. Toll-like receptors signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia: Distinct gene expression profiles of potential pathogenetic significance in specific subsets of patients. Προφορική ανακοίνωση ASH Δεκέμβριος 2010, Orlando, Florida

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

1. Hadzidimitriou A., Darzentas N., Murray F., Smilevska T., **Arvaniti E.**, Tresoldi C., Tsaftaris A., Laoutaris N., Anagnostopoulos A., Davi F., Ghia P., Rosenquist R., Stamatopoulos K., Belessi C. Evidence for the Significant Role of Immunoglobulin Light Chains in Antigen Recognition and Selection in Chronic Lymphocytic Leukemia. Blood 2009 Jan 8;113(2):403-11.
2. **Arvaniti E.**, Ntoufa S., Papakonstantinou N., Touloumenidou T., Laoutaris N., Anagnostopoulos A., Lamnissou K., Caligaris-Cappio F., Stamatopoulos K., Ghia P., Muzio M., Belessi C. Toll-like receptor signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia: Distinct gene expression profiles of potential pathogenetic significance in specific subsets of patients. (Manuscript in prepublication in Haematologica)

ΟΜΙΛΙΕΣ

Διάλεξη με θέμα: «Αναδιατάξεις γονιδίων ανοσοσφαιρινών - Εισαγωγή μεταλλάξεων στα γονίδια των ανοσοσφαιρινών» στα πλαίσια του εκπαιδευτικού προγράμματος του Αιματολογικού τμήματος Γ.Ν.Νίκαιας περιόδου 2006-2007.

ΜΕΛΟΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ-ΟΡΓΑΝΩΣΕΙΣ

Αντεπιστέλλον μέλος της Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας και μέλος των τμημάτων «Οξείων Λευχαιμιών και Μυελοϋπερπλαστικών Συνδρόμων», «Λεμφοϋπερπλαστικών Συνδρόμων», «Αιμοδοσίας» και «Εργαστηριακής Διάγνωσης και Ελέγχου ποιότητας».

