

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΝΙΚΑΙΑΣ

ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ
ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΤΩΝ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΕΣ**

ΧΑΤΖΟΥΛΗ ΜΑΡΙΑ

Βιολόγος

Συμβουλευτική Επιτροπή:

Π. Κόλλια, Επίκουρη Καθηγήτρια

Β.Αλεπόρου-Μαρίνου, Αν.Καθηγήτρια

Ι.Παπασιδέρη, Αν.Καθηγήτρια

Αθήνα 2014

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Παναγούλα Κόλλια (επιβλέπουσα)

Επίκουρη Καθηγήτρια Τομέα Γενετικής & Βιοτεχνολογίας,

Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών επιστημών, ΕΚΠΑ

Βασιλική Αλεπόρου-Μαρίνου

Αν.Καθηγήτρια Τομέα Γενετικής & Βιοτεχνολογίας,

Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών επιστημών, ΕΚΠΑ

Ισιδώρα Παπασιδέρη

Αν.Καθηγήτρια Τομέα Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής,

Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών επιστημών, ΕΚΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Παναγούλα Κόλλια (επιβλέπουσα)

Επίκουρη Καθηγήτρια Τομέα Γενετικής & Βιοτεχνολογίας,

Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών επιστημών, ΕΚΠΑ

Βασιλική Αλεπόρου-Μαρίνου

Αν.Καθηγήτρια Τομέα Γενετικής & Βιοτεχνολογίας,

Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών επιστημών, ΕΚΠΑ

Ισιδώρα Παπασιδέρη

Αν.Καθηγήτρια Τομέα Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής,

Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών επιστημών, ΕΚΠΑ

Κλεονίκη Λάμνησου

Αν.Καθηγήτρια Τομέα Γενετικής & Βιοτεχνολογίας,

Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών επιστημών, ΕΚΠΑ

Ιωάννης Π. Τρουγκάκος

Επίκουρος Καθηγητής Τομέα Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής

Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών επιστημών, ΕΚΠΑ

Ευάγγελος Τέρπος

Επίκουρος Καθηγητής Θεραπευτικής-Αιματολογίας

Τμήμα Ιατρικής, Σχολής Επιστημών Υγείας, ΕΚΠΑ

Μιλτιάδης Τύπας

Καθηγητής Γενετικής – Μικροβιακής Γενετικής

Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών επιστημών, ΕΚΠΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε υπό την επίβλεψη της κας Παναγούλας Κόλλια Επίκουρης Καθηγήτριας του Τμήματος Βιολογίας, της Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ). Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Κόλλια για την καθοδήγηση και την πολύπλευρη συμπαράσταση που μου παρείχε σε όλες τις φάσεις εκπόνησης της διατριβής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Βασιλική Αλεπόρου-Μαρίνου και την κα Ισιδώρα Παपाσιδέρη, Αν.Καθηγήτριες του Τμήματος Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του ΕΚΠΑ, για την υποστήριξη τους ως μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Το εργαστηριακό μέρος της διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Διάγνωσης του Αιματολογικού Τμήματος του ΓΝ Νίκαιας «Άγιος Παντελεήμων», υπό την διεύθυνση του κ. Νικόλαου Λαουτάρη αρχικά και της κας Ελένης Μανιουδάκη μετέπειτα. Εκφράζω ιδιαίτερες ευχαριστίες στους διευθυντές Ν. Λαουτάρη και Ε. Μανιουδάκη για την καθοδήγηση και τη 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 τον ευχαριστήσω θερμά 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» αρχικά και Διευθυντή του Ινστιτούτου Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών του Εθνικού Κέντρου Ερευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης μετέπειτα. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κα Μπέλεση και τον κ. Σταματόπουλο για την συνεχή καθοδήγηση, την υποστήριξη, τη συμβολή τους στην απόκτηση γνώσεων και εμπειρίας, τις

υποδείξεις και τις διορθώσεις καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μελέτης. Παράλληλα, αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω θερμά την κα Ντούφα Σταυρούλα, 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 και την κα Ελένη Αρβανίτη, Βιολόγους, την κα Σοφία Μερκούρη και την κα Σταυρούλα Βλαχάκου, βοηθούς Ιατρικών Εργαστηρίων καθώς και τους συνεργάτες του Εργαστηρίου Μοριακής και Κυτταρικής Βιολογίας της Αιματολογικής Κλινικής και Μονάδας Μεταμόσχευσης Αιμοποιητικών Κυττάρων του ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου» και ιδιαίτερα την κα Ευαγγελία Σταλικά, Βιολόγο και την κα Ελισάβετ Χαρτοματσίδου προπτυχιακή φοιτήτρια για την πολύτιμη βοήθειά τους στη διεκπεραίωση της πειραματικής διαδικασίας της εργασίας αυτής.

Αθήνα, Ιούνιος 2014

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νεοπλασματική εκτροπή είναι το αποτέλεσμα της διαταραχής των ρυθμιστικών μηχανισμών που διέπουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Μεταξύ των κακοηθειών του αιμοποιητικού ιστού, η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ) θεωρείται νόσος-υπόδειγμα για τη μελέτη του ρόλου των διαταραχών του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης στη νεοπλασματική εκτροπή και χαρακτηρίζεται από μεγάλη κλινική ετερογένεια παρά τον ομοιογενή κλινικό και εργαστηριακό φαινότυπο των ασθενών κατά τη διάγνωση.

Πολλά δεδομένα υποδεικνύουν πως το μικροπεριβάλλον διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη της ΧΛΛ. Κεντρικό ρόλο στη λευχαιμογένεση διαδραματίζει ο B κυτταρικός υποδοχέας (B cell receptor, BcR). Ο BcR ρυθμίζει όλες σχεδόν τις λειτουργίες των φυσιολογικών B λεμφοκυττάρων, συναρμολογείται από την επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη IgH και τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες Igα (CD79a) και Igβ (CD79b). Η επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη κωδικοποιείται αρχικά από τα γονίδια IGHV, IGHD και IGHJ της μεταβλητής περιοχής των βαριών αλυσίδων που αναδιατάσσονται με ιεραρχικό τρόπο κατά την ωρίμανση των B λεμφοκυττάρων. Η αναδιάταξη των ανασυνδυασμένων γονιδίων IGHV-IGHD-IGHJ με τη σταθερή περιοχή τη IGHM ακολουθείται από την αναδιάταξη των ελαφριών αλυσίδων και καταλήγει στην έκφραση της ανοσοσφαιρίνης IgM στην επιφάνεια των B λεμφοκυττάρων. Η αναγνώριση και η πρόσδεση του αντιγόνου στη μεταβλητή περιοχή της ανοσοσφαιρίνης ενεργοποιεί τα B λεμφοκύτταρα που διαφοροποιούνται στα βλαστικά κέντρα μέσω της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης (SYM). Το τελικό αποτέλεσμα της SYM είναι η εισαγωγή μεταλλάξεων στην μεταβλητή περιοχή των ανοσοσφαιρινών και η δημιουργία ανοσοσφαιρινών με υψηλότερη συγγένεια για το αντιγόνο.

Η αντιγονική διέγερση μέσω του BcR διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη της ΧΛΛ. Το φορτίο των σωματικών μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV αποτελεί σήμερα τον πιο σημαντικό προγνωστικό παράγοντα στους ασθενείς με ΧΛΛ. Το ποσοστό νουκλεοτιδικής ταυτότητας 98% του αναδιαταγμένου γονιδίου IGHV του νεοπλασματικού κλώνου με το αντίστοιχο μη αναδιαταγμένο γονίδιο IGHV

χρησιμοποιείται ευρέως για την κατάταξη των αναδιατάξεων στη ΧΛΛ σε μεταλλαγμένες και αμετάλλακτες. Το όριο ομολογίας 98% αν και δεν έχει βιολογική σημασία, επιλέχθηκε αρχικά ώστε ν' αποφευχθεί το ενδεχόμενο κάποιες από τις διαφορές ν' αντιστοιχούν σε άγνωστους πολυμορφισμούς του γενετικού τόπου IGH. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση των νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων με το μικροπεριβάλλον μέσω του B κυτταρικού υποδοχέα (BcR) αλλά και των υποδοχέων της έμφυτης ανοσίας (TLRs) παίζει σημαντικό ρόλο στη νεοπλασματική εκτροπή. Η συνεργασία προσαρμοστικής και έμφυτης ανοσίας αποτελεί ιδιότητα των φυσιολογικών αλλά και των αυτοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων. Τα δεδομένα από τη συνδιέγερση BcR/TLR στη ΧΛΛ είναι πολύ περιορισμένα επειδή οι περισσότερες μελέτες αφορούν μεμονωμένη *in vitro* διέγερση είτε του BcR είτε των TLRs.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν: (i) τα ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά του BcR στη ΧΛΛ και διερευνήθηκε πιθανή συσχέτισή τους με την κλινική επιθετικότητα της νόσου, και (ii) ο αντίκτυπος της *in vitro* διέγερσης του BcR, των TLR7 και TLR9 μεμονωμένα ή σε συνδυασμό (BcR/TLR7 και BcR/TLR9) στην επιβίωση και την απόπτωση των νεοπλασματικών κυττάρων της ΧΛΛ.

Αρχικά αναλύθηκαν οι κλωνικές αναδιατάξεις των γονιδίων IGHV-IGHD-IGHJ σε 799 ασθενείς με ΧΛΛ. Μελετήθηκε το ρεπερτόριο και το φορτίο των μεταλλάξεων των γονιδίων IGH, καθώς και τα μοριακά χαρακτηριστικά των μεταλλάξεων. Οι αναδιατάξεις IGHV-IGHD-IGHJ αρχικά διακρίθηκαν σε αμετάλλακτες (A) και μεταλλαγμένες (M) με βάση το γενικά αποδεκτό όριο ομολογίας 98% του γονιδίου IGHV σε σχέση με το αντίστοιχο μη αναδιαταγμένο γονίδιο IGHV. Στη συνέχεια, οι αναδιατάξεις διακρίθηκαν περαιτέρω σε διαδοχικά υποσύνολα που διέφεραν μεταξύ τους κατά 1% ως προς την νουκλεοτιδική ταυτότητά τους με το αντίστοιχο μη αναδιαταγμένο γονίδιο IGHV και διερευνήθηκε η πιθανή προγνωστική αξία αυτών των υποσυνόλων στο χρόνο έναρξης θεραπείας και την ολική επιβίωση των ασθενών. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επιβεβαίωσαν προηγούμενες μελέτες αναφορικά με την επιλεκτικότητα του ρεπερτορίου και έδειξαν ότι η εισαγωγή των μεταλλάξεων σε όλες τις υποομάδες με ομολογία <100% πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του κλασσικού μηχανισμού σωματικής

υπερμεταλλαξιγένεσης. Επιπλέον, έδειξαν ότι το όριο 98% υπερτερεί ως προς την προγνωστική σημασία για τους ασθενείς με ΧΛΛ.

Στη συνέχεια μελετήθηκαν τα αποτελέσματα της *in vitro* διέγερσης των BcR, TLR7 και TLR9 με αντι-IgM, Imiquimod και CpG, αντιστοίχως, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό, σε 21 ασθενείς με ΧΛΛ (11 M-ΧΛΛ, 10 A-ΧΛΛ). Τα αποτελέσματα της διέγερσης εκτιμήθηκαν με προσδιορισμό της pERK, ενώ η επαγωγή της απόπτωσης με προσδιορισμό της κασπάσης 8 και της PARP. Αυξημένα επίπεδα pERK παρατηρήθηκαν μετά από μεμονωμένη διέγερση των BcR, TLR7 και TLR9 στην A-ΧΛΛ, ενώ στη M-ΧΛΛ μόνο με συνδιέγερση BcR/TLR. Αντίθετα, η μεμονωμένη διέγερση των TLR7 και TLR9 αλλά και η συνδιέγερση BcR/TLR βρέθηκαν να προκαλούν επαγωγή της απόπτωσης κυρίως στη M-ΧΛΛ. Η διαφορετική ανταπόκριση των νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων στη M-ΧΛΛ έναντι της A-ΧΛΛ πιθανότατα υποδεικνύει διαφορετικό λειτουργικό αποτέλεσμα, που αντικατοπτρίζεται τελικά στη συμπεριφορά του λευχαιμικού κλώνου και τροποποιεί το ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την απόπτωση.

ABSTRACT

ABSTRACT

Deregulation of intracellular signaling events controlling proliferation and apoptosis promotes neoplastic aberration. Chronic lymphocytic leukemia (CLL), a malignancy of lymphoid cells, constitutes a model disease for the study of disorders of cell cycle and apoptosis. CLL is a clinically heterogeneous disease despite the homogenous phenotype of patients at diagnosis.

Mounting evidence suggests that the development and evolution of CLL are dependent upon stimuli originating from the microenvironment. A critical role is played by antigenic stimulation through the B cell receptor (BcR). The BcR comprises 2 types of components: the recognition unit constituted by a membrane immunoglobulin (IG), and the signal transmission unit comprising the coreceptors CD79a and CD79b. Developing normal B cells generate a vast repertoire of antibody specificities through somatic recombination of distinct variable (V), diversity (D) (heavy chain only), and joining (J) genes to form the variable domain exons of IG. Rearrangement of IGHV-IGHD-IGHJ genes encodes for the variable domain of IG and followed by rearrangement with constant region IGHM gene. At the next step lymphocytes rearrange light chains. At the end of this procedure the lymphocytes express IGM in their surface. Lymphocytes activated upon antigen encounter, are further diversified by introduction of somatic hypermutation. Somatic hypermutation (SHM) of IG variable genes forms a second round of diversification which increases antibody specificity.

Antigenic stimulation through the BcR seems to play a critical role at the evolution of CLL. In recent years, the mutational status of IGHV genes has been established as one of the most important molecular genetic markers in defining prognostic subgroups of chronic lymphocytic leukemia (CLL). The 98% homology to the closest germline IGHV gene was firstly chosen as a shortcut to exclude potential polymorphic variants and has been used by the majority of studies to make the clinically relevant distinction between “mutated” and “unmutated” CLL cases.

Recent studies revealed that CLL cells may also interact with their microenvironment via receptors of both adaptive (B-cell receptor, BcR) and innate immunity (e.g. Toll-like receptors, TLRs) and that this interaction plays a prominent role in CLL

development and evolution. Synergism between innate and adaptive immunity is a well-known phenomenon in both normal and autoreactive lymphocytes. Emerging data from concomitant BcR/TLR stimulation in CLL are limited since most studies have examined the effects of immune stimulation only after single BcR or TLR triggering.

On these grounds, we here investigated (i) the molecular features of the BcR in CLL and possible correlations with the aggressiveness of the disease and (ii) the impact of in vitro single (BcR, TLR7 and TLR9) or concomitant (BcR/TLR7 και BcR/TLR9) stimulation on the proliferation and apoptosis of CLL cells.

We examined productive IGHV-IGHD-IGHJ rearrangements from 799 CLL cases, focusing on IGH gene repertoire, mutational status and somatic mutation characteristics of the IGHV genes. Initially, following the 98% identity cutoff value with the closest germ line IGHV gene, sequences were subdivided into unmutated (U) and mutated (M) categories. Sequences were further subdivided in subgroups with 1% difference identity with germ line genes and survival curves for subgroups of patients with varying degrees of sequence identity were prepared. In keeping with previous studies, the IGHV gene repertoire was remarkably biased. In addition, SHM analysis, performed for all CLL sequences in this cohort with less than 100% identity to germ line, showed that SHM patterns were typical of a canonical SHM process. Furthermore, the 98% sequence identity cut off value, although arbitrary, has the most prognostic value.

To explore whether specific types of BcR/TLR collaboration exist in CLL, we studied the effect of single vs. concomitant BcR and/or TLR stimulation on CLL cells from 11 M-CLL and 10 U-CLL cases stimulated with anti-IgM, Imiquimod and CpG ODN for BcR, TLR7 and TLR9 respectively, alone or in combination. Results were estimated by determining pERK levels while the induction of apoptosis determining the active isoform of caspase 8 and the cleaved fragment of PARP. Pronounced pERK induction was seen by single stimulation in U-CLL, whereas BcR/TLR synergism was required in M-CLL. An opposite pattern was observed regarding induction of apoptosis, with M-CLL responding even to single stimulation, contrasting U-CLL that showed minimal response. Differential responses of CLL cells depending on the mutational status of

the BcR, probably indicates different operating result, ultimately reflected in the behavior of the leukemic clone and modifies the rate of cell proliferation and apoptosis.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ABSTRACT

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Κυτταρικός κύκλος και απόπτωση	2
1.1.1 Γενικά	2
1.1.2 Ενδοκυττάρια μεταβίβαση σήματος	3
1.1.3 Κυτταρικός πολλαπλασιασμός	4
1.1.4 Ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού	5
1.1.5 Απόπτωση	6
1.1.6 Μηχανισμοί ελέγχου της απόπτωσης	7
1.1.7 Διαταραχές του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης	9
1.2 Νεοπλάσματα του αιμοποιητικού ιστού	14
1.3 Διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων	17
1.3.1 Ανοσοσφαιρίνες	18
1.3.2 Διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων στο μυελό των οστών	22
1.3.3 Διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων στα δευτερογενή λεμφικά όργανα	25
1.3.4 Μηχανισμοί δημιουργίας ποικιλότητας των ανοσοσφαιρινών	29
1.3.5 Σηματοδότηση μέσω του Β κυτταρικού υποδοχέα	31
1.3.6 Σηματοδότηση Β λεμφοκυττάρων μέσω υποδοχέων συμπληρώματος, CD40 και υποδοχέων έμφυτης ανοσίας	34
1.3.7 Σύγχρονη διέγερση BcR/TLR	37

1.4 Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία	39
1.4.1 Γενικά	39
1.4.2 Ανοσοπαθогένεση της ΧΛΛ	45
1.4.2.1 Ο ρόλος του BcR στη ΧΛΛ	45
1.4.2.2 Ο ρόλος του αντιγόνου στη ΧΛΛ	47
1.4.2.3 Σηματοδότηση μέσω του BcR στη ΧΛΛ	48
1.4.2.4 Σηματοδότηση μέσω των TLRs στη ΧΛΛ	51
1.4.2.5 Συνδιέγερση BCR-TLR στη ΧΛΛ	53
2. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	55
3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	60
3.1 Μελέτη κλωνικών αναδιατάξεων των γονιδίων της μεταβλητής περιοχής της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών στη ΧΛΛ	61
3.1.1 Ομάδα Μελέτης	61
3.1.2 Μεθοδολογία	62
3.1.2.1 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από δείγμα αίματος ασθενών με ΧΛΛ	62
3.1.2.2 Απομόνωση RNA- Σύνθεση cDNA	62
3.1.2.3 Ενίσχυση κλωνικών αναδιατάξεων των γονιδίων IGHV-IGHD-IGHJ	64
3.1.2.4 Καθαρισμός των προϊόντων RT-PCR	65
3.1.2.5 Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων RT-PCR	65
3.1.2.6 Σύγκριση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με βάσεις δεδομένων	68
3.1.2.7 Ανάλυση των μοριακών χαρακτηριστικών των αναδιατάξεων IGHV-IGHD-GHJ	69
3.2 Διέγερση των κυττάρων της ΧΛΛ μέσω των υποδοχέων BcR, TLR7 και TLR9	71

3.2.1	Ομάδα Μελέτης	71
3.2.2	Μεθοδολογία	72
3.2.2.1	Απομόνωση CD19+ κυττάρων από δείγμα αίματος ασθενών με ΧΛΛ	72
3.2.2.2	Διέγερση των υποδοχέων BcR, TLR7 και TLR9 σε CD19+ κύτταρα	74
3.2.2.3	Συλλογή κυττάρων	75
3.2.2.4	Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών	76
3.2.2.5	Αναζήτηση pERK, caspase 8 και PARP με την τεχνική της ανοσοανίχνευσης Western	77
3.3	Στατιστική Ανάλυση	82
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	83
4.1	Ανάλυση κλωνικών αναδιατάξεων των γονιδίων της μεταβλητής περιοχής της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών στη ΧΛΛ	84
4.1.1	Ρεπερτόριο γονιδίων IGHV, IGHD και IGHJ	84
4.1.2	Ανάλυση σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης στις αναδιατάξεις IGHV-IGHD-IGHJ	88
4.1.3	Ανάλυση σημειακών μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV	92
4.1.4	Ανάλυση αμινοξικών αντικαταστάσεων στα γονίδια IGHV	101
4.1.5	Ανάλυση των μοριακών χαρακτηριστικών της περιοχής VH CDR3	104
4.1.6	«Στερεότυπα υποσύνολα»	106
4.1.7	Συσχέτιση του φορτίου των μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV με το χρόνο έναρξης θεραπείας και την ολική επιβίωση	107
4.2	Διέγερση των κυττάρων της ΧΛΛ μέσω των υποδοχέων BcR, TLR7 και TLR9	112
4.2.1	Ανάλυση των επιπέδων pERK στα κύτταρα της ΧΛΛ μετά από διέγερση των υποδοχέων BcR, TLR7 ή TLR9 μεμονωμένα ή σε συνδυασμό	113
4.2.1.1	Μελέτη επιπέδων pERK απουσία προσδέτη	113

4.2.1.2	Διέγερση των κυττάρων της ΧΛΛ μέσω BcR, TLR7 ή TLR9	114
4.2.1.3	Συνδιέγερση των κυττάρων της ΧΛΛ μέσω BcR +TLR7 ή μέσω BcR + TLR9	116
4.2.2	Επαγωγή της απόπτωσης στα κύτταρα της ΧΛΛ μετά από διέγερση των υποδοχέων BcR, TLR7 ή TLR9 μεμονωμένα ή σε συνδυασμό	118
4.2.2.1	Επαγωγή της απόπτωσης απουσία προσδέτη	118
4.2.2.2	Επαγωγή της απόπτωσης μετά από διέγερση των κυττάρων της ΧΛΛ μέσω BcR, TLR7 ή TLR9	119
4.2.2.3	Επαγωγή της απόπτωσης μετά από συνδιέγερση των κυττάρων της ΧΛΛ μέσω BcR+TLR7 ή μέσω BcR+TLR9	120
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	124
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	137
7.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	156

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Κυτταρικός κύκλος και απόπτωση

1.1.1 Γενικά

Στους πολυκύτταρους ενήλικους οργανισμούς, ο πολλαπλασιασμός, η επιβίωση και ο θάνατος των κυττάρων ελέγχονται με ακριβείς ρυθμιστικούς μηχανισμούς έτσι ώστε ο αριθμός των κυττάρων σ' ένα φυσιολογικό ιστό να διατηρείται σταθερός και οι ιστοί ούτε ν' αυξάνουν υπέρμετρα ούτε να συρρικνώνονται. Κάθε κύτταρο δέχεται συνεχώς σήματα από το περιβάλλον του και προσαρμόζει ανάλογα τη λειτουργία του. Αυτή η επικοινωνία διασφαλίζει ότι νέα κύτταρα θα παράγονται μόνο όταν και όπου χρειάζονται.

Τα κύτταρα απαντούν στα σήματα που δέχονται με τρεις διαφορετικούς μηχανισμούς: (i) από γειτονικά κύτταρα μέσω μορίων κυτταρικής προσκόλλησης (παρακρινής μηχανισμός), (ii) από κύτταρα που βρίσκονται μακριά, είτε μέσω διαλυτών μορίων που εισέρχονται στο εσωτερικό του κυττάρου (π.χ. ορμόνες) και τροποποιούν τη λειτουργία του, είτε μέσω μορίων που προσδένονται σε ειδικούς υποδοχείς στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και μεταφέρουν το μήνυμα στο εσωτερικό του κυττάρου (ενδοκρινής μηχανισμός) και (iii) από το εσωτερικό του κυττάρου (αυτοκρινής μηχανισμός).

Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά, τα νεοπλασματικά κύτταρα δεν υπακούουν στους κανόνες του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης των κυττάρων. Ο καρκίνος είναι αποτέλεσμα σωματικών γονιδιακών μεταλλάξεων σε μεμονωμένα κύτταρα του σώματος που αποδεσμεύουν το κύτταρο από τους συνήθεις μηχανισμούς ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και αφορούν σε γονίδια που ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Ένα κύτταρο μεταλλάσσεται με μια σειρά τυχαίων συμβάντων και αποκτά την ικανότητα να πολλαπλασιάζεται χωρίς τους φυσιολογικούς περιορισμούς^{1,2}. Τα νεοπλασματικά κύτταρα παρουσιάζουν αυτοδυναμία σε σήματα ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αντίσταση σε σήματα που αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επάγουν την απόπτωση με τελικό αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αναστολή της απόπτωσης. Ο

λανθασμένος έλεγχος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και/ή της απόπτωσης δεν είναι η μοναδική διαταραχή των νεοπλασματικών κυττάρων, αποτελεί ωστόσο ένα θεμελιώδες χαρακτηριστικό τους.

1.1.2 Ενδοκυττάρια μεταβίβαση σήματος

Τα κύτταρα αντιδρούν στα ερεθίσματα που δέχονται από το περιβάλλον, ενεργοποιώντας διαδοχικά έναν καταρράκτη ενδοκυττάρων μορίων που καταλήγει στην ενεργοποίηση μεταγραφικών και άλλων παραγόντων στον πυρήνα του κυττάρου. Κλασσικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό είναι το μονοπάτι των πρωτεϊνικών κινάσων που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (Mitogen activated protein kinase, MAP κινάσες) και το μονοπάτι της κινάσης της 3'-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K).

Οι κινάσες MAP περιλαμβάνουν την οικογένεια των ρυθμιζόμενων από εξωκυττάρια μηνύματα κινάσων (extracellular signal-regulated kinase, ERK), την οικογένεια των c-Jun αμινο-τελικών κινάσων (c-JUN NH2-terminal kinase, JNK) και την p38. Στο μονοπάτι της PI3K, εκτός από την PI3K, βασικό ρόλο διαδραματίζουν η πρωτεΐνη AKT (πρωτεϊνική κινάση B) και η εξαρτώμενη από το φωσφοϊνοσιτίδιο πρωτεϊνική κινάση 1 (phosphoinositide-dependent protein kinase 1, PDK1).

Οι κινάσες MAP, η AKT και η PDK1 ενεργοποιούνται από μιτογόνα, παράγοντες διαφοροποίησης ή stress και συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, τη διαφοροποίηση των κυττάρων και την απόπτωση³. Αυξημένη έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο μονοπάτι των κινάσων MAP και της PI3K έχει καταγραφεί σε διάφορες κακοήθειες και συσχετίζεται με τη νεοπλασματική εκτροπή αλλά και την ικανότητα μετάστασης των νεοπλασματικών κυττάρων^{4,5,6,7,8}. Έχουν μελετηθεί ιδιαίτερα στις κακοήθειες του αιμοποιητικού ιστού (π.χ. οξείες και χρόνιες λευχαιμίες, πολλαπλούν μυέλωμα) και έχουν συσχετιστεί με την παθογένεια αλλά και την εξέλιξη αυτών των νοσημάτων^{4,9,10,11,12}.

1.1.3 Κυτταρικός πολλαπλασιασμός

Το φυσιολογικό κύτταρο απαντά στα μηνύματα για κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενεργοποιώντας ένα σύνολο διαδικασιών που στόχο έχουν την παραγωγή ενός ακριβούς αντιγράφου του εαυτού του. Το κύτταρο αναπαράγεται διπλασιάζοντας αρχικά το περιεχόμενο του και στη συνέχεια διαιρείται στα δύο. Αυτός ο κύκλος διπλασιασμού και διαίρεσης είναι γνωστός ως κυτταρικός κύκλος. Ο κυτταρικός κύκλος είναι μια αυστηρά ελεγχόμενη διεργασία με θετικούς και αρνητικούς ρυθμιστές που στόχο έχει τον ακριβή διπλασιασμό του γενετικού υλικού και την ισότιμη διαίρεση του κυττάρου σε δύο κύτταρα-απογόνους¹³.

Ο κυτταρικός κύκλος των ευκαρυωτικών κυττάρων διαιρείται σε τέσσερα στάδια ή φάσεις: G1, S, G2 και M. Η φάση G1 (G=gap) είναι το μεσοδιάστημα ανάμεσα στο τέλος της φάσης M και την αρχή της φάσης S, κατά την οποία το κύτταρο προετοιμάζεται για την αντιγραφή του DNA. Κατά τη διάρκεια της φάσης S (S=synthesis), το κύτταρο αντιγράφει το DNA του πυρήνα του, απαραίτητη προϋπόθεση για να συμβεί η κυτταρική διαίρεση. Η φάση G2 είναι το μεσοδιάστημα ανάμεσα στο τέλος της φάσης S και την αρχή της φάσης M, κατά την οποία το κύτταρο προετοιμάζεται για την κυτταρική διαίρεση. Μαζί, οι φάσεις G1 και G2 προσφέρουν επιπρόσθετο χρόνο στο κύτταρο ν' αυξήσει και να διπλασιάσει τα κυτταροπλασματικά οργανίδια του. Κατά τη φάση M (M=mitosis) πραγματοποιείται η διαίρεση αρχικά του πυρήνα και στη συνέχεια του κυττάρου. Κύτταρα που δεν πολλαπλασιάζονται μπορεί να απομακρυνθούν οριστικά από τον κυτταρικό κύκλο με τελική διαφοροποίηση και να εισέλθουν στη φάση ηρεμίας (G0) ή να παραμείνουν για ένα διάστημα ήρεμα στη φάση G0 και στη συνέχεια να εισέλθουν στον κυτταρικό κύκλο.

Η σωστή εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου διασφαλίζεται από το σύστημα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Το σύστημα ελέγχου καθορίζει τη μετάβαση από τη μια φάση του κυτταρικού κύκλου στην αμέσως επόμενη διασφαλίζοντας την ολοκλήρωση του προηγούμενου σταδίου πριν ξεκινήσει το επόμενο. Το σύστημα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου παίζει κεντρικό ρόλο στη διατήρηση σταθερού αριθμού των κυττάρων στους ιστούς του σώματος. Όταν το σύστημα δυσλειτουργεί,

μπορεί ν' αναπτυχθεί καρκίνος.

1.1.4 Ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Ο κυτταρικός κύκλος ελέγχεται από τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος, που είναι γνωστά ως σημεία ελέγχου των φάσεων του κυτταρικού κύκλου (checkpoints). Τα σημεία ελέγχου, εξασφαλίζουν την επιτυχή ολοκλήρωση κάθε φάσης, πριν πραγματοποιηθεί η είσοδος στην επόμενη^{14,15,16,17}. Τα κυριότερα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου είναι κατά τη μετάβαση από τη φάση G₁ στη φάση S και από τη φάση G₂ στη φάση M.

Πρωτεύοντα ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου παίζουν οι κυκλίνες, οι κινάσες που εξαρτώνται από τις κυκλίνες (cyclin-dependent kinases, CDKs) και οι αναστολείς των συμπλόκων κυκλίνης-CDK. Οι κυκλίνες διακρίνονται σε 4 οικογένειες (D, E, A και B) με κάθε οικογένεια να έχει την ευθύνη ελέγχου διαφορετικής φάσης του κυτταρικού κύκλου¹⁸. Η συγκέντρωση των κυκλινών κυμαίνεται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου σε αντίθεση με τις CDKs που εκφράζονται σε σταθερή συγκέντρωση. Οι CDKs ενεργοποιούνται από τις κυκλίνες και σχηματίζουν ετεροδιμερή αποτελούμενα από μια ρυθμιστική (κυκλίνη) και μια καταλυτική υπομονάδα (κινάση)¹⁹. Οι CDKs ενεργοποιούνται περαιτέρω με φωσφορυλίωση. Διαφορετικά σύμπλοκα κυκλινών-CDKs πυροδοτούν διαφορετικά βήματα του κυτταρικού κύκλου. Το μιτωτικό σύμπλοκο κυκλίνης-CDKs, (M-Phase promoting factor, MPF), ωθεί το κύτταρο στη μίτωση. Αντιστοίχως, τα σύμπλοκα της S φάσης ωθούν το κύτταρο στην S φάση. Το σύστημα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου μπορεί να σταματήσει τον κύκλο στα ειδικά σημεία ελέγχου αναστέλλοντας τη συναρμολόγηση του συμπλόκου κυκλίνης-CDK ή τη δράση ενός ή περισσότερων συμπλόκων κυκλίνης-CDK. Οι αναστολείς των συμπλόκων κυκλίνης-CDK διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: οικογένεια των αναστολέων CIP/KIP (πρωτεΐνες p21, p27, p57), οι οποίοι είναι γενικοί αναστολείς των συμπλόκων κυκλίνης-CDKs²⁰ και οικογένεια των πρωτεϊνών INK4 (πρωτεΐνες p15, p16, p18, p19), οι οποίοι είναι ειδικοί αναστολείς των CDKs4/6 και του συμπλόκου τους με την κυκλίνη D^{21,22}. Η αδρανοποίηση των αναστολέων επάγει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Τυπικό παράδειγμα αποτελεί η έναρξη του κυτταρικού κύκλου μετά από αδρανοποίηση της

p27 από τις ενεργοποιημένες κινάσες MAP.

Επιπλέον, τα φυσιολογικά κύτταρα έχουν δυνατότητα για περιορισμένο αριθμό μιτώσεων και συγκεκριμένη διάρκεια ζωής ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση ή μη των συμπλόκων κυκλίνης-CDKs. Αντίθετα τα νεοπλασματικά κύτταρα έχουν δυνατότητα γι' απεριόριστο αριθμό μιτώσεων. Αυτή η διαφορά έχει αποδοθεί εν μέρει σε μηχανισμούς που εμπλέκουν τα τελομερή. Τα τελομερή είναι εξειδικευμένες δομές νουκλεοπρωτεΐνης, εντοπίζονται στα άκρα των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων και αποτελούνται από βραχείες, επαναλαμβανόμενες ακολουθίες DNA και μια πλειάδα σχετιζομένων πρωτεϊνών. Κατά το διπλασιασμό του DNA η DNA πολυμεράση αδυνατεί ν' αντιγράψει όλες τις βάσεις των τελομερών. Έτσι σε κάθε κυτταρική διαίρεση τα τελομερή βραχύνονται. Η τελομεράση είναι μια ειδική ριβονουκλεοπρωτεΐνη που καταλύει την προσθήκη των εξανουκλεοτιδικών αλληλουχιών TTAGGG στα άκρα των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων, αντிரροπώντας τη φθορά που υπόκεινται τα τελομερή μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση. Τα φυσιολογικά κύτταρα έχουν χαμηλή ή και μηδενική ενεργότητα τελομεράσης, αντίθετα από τα περισσότερα νεοπλασματικά κύτταρα που παρουσιάζουν αυξημένη ενεργότητα, υποδηλώνοντας τη σημασία του ενζύμου στην καρκινογένεση²³.

1.1.5 Απόπτωση

Η απόπτωση είναι φυσιολογική διαδικασία αναγκαία για την ανάπτυξη των οργάνων, την ομοιοστάση των ιστών και την απομάκρυνση των ελαττωματικών ή πιθανώς βλαβερών κυττάρων στους πολυκύτταρους οργανισμούς. Επάγεται από ένα αυστηρά ρυθμιζόμενο ενδοκυττάριο πρόγραμμα, με βάση το οποίο τα κύτταρα που προορίζονται να πεθάνουν ενεργοποιούν ένζυμα που αποδοθούν το DNA τους καθώς και τις πυρηνικές και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες τους.

Ερεθίσματα για την επαγωγή της απόπτωσης είναι η παρουσία μεσολαβητών που ανταγωνίζονται την κυτταρική επιβίωση² (προαποπτωτικοί παράγοντες ή σήματα θανάτου) σε συνδυασμό με τη στέρηση ορισμένων παραγόντων επιβίωσης (αυξητικοί παράγοντες, ορμόνες, παρακρινή σήματα κ.α.) λόγω μειωμένης παραγωγής ή υπερκατανάλωσής τους. Ανεξάρτητα από το αίτιο, η αποπτωτική οδός

ακολουθεί τρία στάδια: ενεργοποίηση, εκτέλεση και κατακερματισμός του κυττάρου. Η απόπτωση επάγεται από δύο διακριτά αλλά συγκλίνοντα μονοπάτια, το εξωγενές (*extrinsic pathway*) το οποίο ενεργοποιείται μέσω υποδοχέων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και το ενδογενές ή μιτοχονδριακό (*intrinsic pathway*)^{24,25}. Και τα δύο μονοπάτια συγκλίνουν στην ενεργοποίηση των κασπάσων. Οι κασπάσες είναι μια εξελικτικά συντηρημένη οικογένεια κυτταροπλασματικών πρωτεασών που εκφράζονται ως ανενεργά προένζυμα και ενεργοποιούνται με πρωτεολυτική διάσπαση μετά από ένα ερέθισμα που σχετίζεται με τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Τα ένζυμα αυτά συμμετέχουν σε μια αλυσιδωτή αντίδραση, που πυροδοτείται από προαποπτωτικά σήματα και οδηγεί στην κατάτμηση του DNA και τη διάλυση του κυττάρου²⁶. Οι κασπάσες λειτουργούν είτε ως εναρκτήριες (initiators), είτε ως τελεστές (effectors) της διαδικασίας διάλυσης του κυττάρου. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 14 κασπάσες. Σημαντικό ρόλο στην απόπτωση διαδραματίζουν οι κασπάσες 3, 6, 7, 8 και 9. Ειδικότερα, η **κασπάση 3** είναι κασπάση-τελεστής υπεύθυνη για τη μερική ή ολική πρωτεόλυση πολλών πυρηνικών πρωτεϊνών όπως η πολυμεράση της πολύ-ADP ριβόζης (Poly ADP ribose polymerase, (PARP))²⁷. Η PARP είναι ένα μεταλλοένζυμο που εμπλέκεται στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA και τη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος. Η κατάτμηση (πρωτεόλυση) της πρωτεΐνης PARP αποτελεί χαρακτηριστικό δείκτη κυττάρων στα οποία έχει ενεργοποιηθεί ο αποπτωτικός μηχανισμός²⁸. Η **κασπάση 8** ενεργοποιείται από το εξωγενές μονοπάτι με τη βοήθεια των μορίων FAS (CD95 ή APO-1) και TNFR1²⁹. Προκαλεί ενεργοποίηση των κασπάσων 1, 3, 6 και 7. Τέλος η **κασπάση 9** ενεργοποιείται από το ενδογενές μονοπάτι μετά από απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια. Το κυτόχρωμα C σχηματίζει σύμπλοκο με την προκασπάση 9 και την πρωτεΐνη APAF-1 (Apoptotic protease activating factor 1/APAF-1). Η κασπάση 9 ενεργοποιεί τις κασπάσες 3 και 7^{30,31}.

1.1.6 Μηχανισμοί ελέγχου της απόπτωσης

Ανάλογα με το ερέθισμα, η απόπτωση επάγεται από δύο μονοπάτια, εξωγενές και ενδογενές, τα οποία τελικά συγκλίνουν στην ενεργοποίηση των κασπάσων. Η

εξωγενής οδός χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό συμπλόκων μεταξύ του προσδέτη FAS (FAS Ligand, [FasL] ή TNF-α) και του μεμβρανικού υποδοχέα (FASR ή TNFR I). Το σύμπλοκο αυτό (FAS/FasL ή TNF-α/TNFR I) ενεργοποιεί μια οδό ενδοκυττάριας μεταβίβασης σήματος από την εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης προς το κυτταρόπλασμα, η οποία περιλαμβάνει την πρωτεΐνη FADD (Fas Associated Death Domain) και καταλήγει σε ενεργοποίηση της προκασπάσης 8³². Η πρωτεΐνη FADD ενεργοποιεί την προκασπάση 8 διαμέσου ενός συστήματος πρωτεϊνών που καλείται σύμπλοκο πρόκλησης θανάτου (death-inducing signaling complex, DISC). Η εξωγενής οδός αναστέλλεται από μια ομάδα πρωτεϊνών που ονομάζονται πρωτεΐνες FLIP (Fas-associated death domain like interleukin 1 beta converting enzyme inhibitory protein) και συνδέονται με την προκασπάση 8, αλλά αδυνατούν να οδηγήσουν σε ενεργοποίησή της.

Η **ενδογενής οδός** χαρακτηρίζεται από βλάβη του μιτοχονδρίου, που εκδηλώνεται με αύξηση της έκφρασης των προαποπρωτικών μορίων BAX, BAD και BAK έναντι των αντιαποπρωτικών BCL-2 και BCL-X και επαγωγή της εκπόλωσης της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η εκπόλωση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, που μαζί με τον παράγοντα 1 που ενεργοποιεί την απόπτωση (Apoptosis protease activating factor 1, APAF 1), την προκασπάση 9 και το dATP σχηματίζουν το αποπτοσωμάτιο (apoptosome) που καταλύει τη μετατροπή της προκασπάσης 9 σε κασπάση 9³³.

Η κινητοποίηση τόσο της εξωγενούς όσο και της ενδογενούς οδού της απόπτωσης καταλήγει στην ενεργοποίηση της κασπάσης 3, γεγονός που σηματοδοτεί την έκφραση φωσφατιδυλσερίνης στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης του κυττάρου και την έναρξη του σταδίου της εκτέλεσης. Κατά το στάδιο της εκτέλεσης, η ενεργοποιημένη κασπάση 3 διασπά τον αναστολέα της ενεργοποιούμενης από κασπάσες δεοξυριβονουκλεάσης (Inhibitor of Caspase Activated Deoxyribonuclease, ICAD) με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της δεοξυριβονουκλεάσης και τον κατακερματισμό του DNA³⁴. Η ενεργοποιημένη κασπάση 3 είναι κασπάση-τελεστής που αναγνωρίζει και πρωτεολύει μεγάλο αριθμό ενδοκυττάρων υποστρωμάτων-στόχων όπως η πρωτεΐνη PARP, ο αναστολέας ICAD, πυρηνικές λαμίνες και η πηκτολυματίνη.

Στο τελικό στάδιο του κατακερματισμού, ο διασπασμένος πυρήνας και το

κυτταρόπλασμα συρρικνώνονται και δημιουργούνται μικρά μεμβρανικά κυστίδια (αποπτωτικά σωμάτια), τα οποία απελευθερώνονται και υπόκεινται σε φαγοκυττάρωση από τα περιβάλλοντα επιθηλιακά κύτταρα, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των βλεννογόνων, ή από τα μακροφάγα. Κατά τη διαδικασία αυτή η κυτταρική μεμβράνη παραμένει αρχικά ακέραιη, ενώ τελικά διασπάται κατά τέτοιον τρόπο ώστε να μην προκαλείται φλεγμονώδης αντίδραση ή βλάβη των διπλανών ιστών³⁵.

Για έναν πολυκύτταρο οργανισμό, η απόπτωση είναι ένας φυσιολογικός μηχανισμός που εξασφαλίζει την απομάκρυνση γερασμένων κυττάρων ή κυττάρων που έχουν υποστεί ανεπανόρθωτη βλάβη. Αντίθετα, τα νεοπλασματικά κύτταρα παρουσιάζουν αντίσταση σε σήματα που επάγουν την απόπτωση, με τελικό αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό κυττάρων με βλάβες στο DNA τους, είτε την επιβίωση κυττάρων που κανονικά έπρεπε να καταστραφούν.

1.1.7 Διαταραχές του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης

Ο αριθμός των κυττάρων ενός ιστού ρυθμίζεται από ένα συνδυασμό ενδοκυττάρων προγραμμάτων και διακυττάρων αλληλεπιδράσεων ο οποίος ελέγχει τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και το θάνατο των κυττάρων. Τα φυσιολογικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται μόνο όταν η ισορροπία μεταξύ διεγερτικών και κατασταλτικών ερεθισμάτων ευνοεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Παράλληλα, πολλά φυσιολογικά κύτταρα πεθαίνουν ενεργοποιώντας τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Κανονικά, ο κυτταρικός θάνατος αντirroπεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό έτσι ώστε ο αριθμός των κυττάρων σ' ένα φυσιολογικό ιστό να διατηρείται σταθερός.

Αντίθετα, η νεοπλασματική εκτροπή είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων που αποδεσμεύουν το κύτταρο από τους συνήθεις μηχανισμούς ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης. Τα γονίδια που ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό διακρίνονται σε **πρωτοογκογονίδια** που προάγουν τον πολλαπλασιασμό και **ογκοκατασταλτικά** γονίδια που τον αναστέλλουν. Αντιστοίχως, τα γονίδια που ελέγχουν τον κυτταρικό θάνατο διακρίνονται σε

αποπτωτικά που προάγουν τον θάνατο του κυττάρου και σε **αντιαποπτωτικά** γονίδια που αναστέλλουν την απόπτωση.

Οι μεταλλάξεις που ευθύνονται για τις διαταραχές του ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα καρκινικά κύτταρα αφορούν σε γονίδια που επάγουν και γονίδια που αναστέλλουν την πρόοδο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα σημεία ελέγχου.

Μια μετάλλαξη σ' ένα γονίδιο που **επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό**, προκαλεί υπέρμετρη αύξηση της παραγωγής ή της δράσης της αντίστοιχης πρωτεΐνης και οδηγεί σε υπέρμετρο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Το μεταλλαγμένο γονίδιο καλείται ογκογονίδιο (oncogene), δηλαδή γονίδιο που προάγει τον καρκίνο, ενώ το φυσιολογικό ομόλογό του πρωτοογκογονίδιο (protooncogene). Τα πρωτοογκογονίδια κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες (π.χ. c-SIS), υποδοχείς αυξητικών παραγόντων (π.χ. FML), ενδοκυττάριους μεταβιβαστές σήματος (π.χ. RAS) ή μεταγραφικούς παράγοντες (π.χ. c-MYC). Η μετατροπή των πρωτοογκογονιδίων σε ογκογονίδια είναι αποτέλεσμα πολλών διαφορετικών μηχανισμών όπως:

(i) **Σημειακές μεταλλάξεις**. Τυπικό παράδειγμα ενεργοποίησης από σημειακή μετάλλαξη είναι τα γονίδια της οικογένειας *RAS*. Κάθε μετάλλαξη που οδηγεί σε αντικατάσταση μιας βάσης και καταλήγει σε αντικατάσταση αμινοξέος σε επίπεδο πρωτεΐνης, μπορεί να μετατρέψει ένα πρωτοογκογονίδιο *RAS* σε ενεργό ογκογονίδιο. Μεταλλάξεις που προκαλούν ενεργοποίηση του γονιδίου *RAS* έχουν βρεθεί στο 30% περίπου των πασχόντων από καρκίνο, αλλά η συχνότητά τους ποικίλλει σημαντικά, ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου.

(ii) **Αμοιβαίες χρωμοσωμικές μεταθέσεις** (translocations). Συνίστανται σε ανταλλαγή γενετικού υλικού ανάμεσα σε δύο χρωμοσώματα. Όταν τα σημεία ρήξης των χρωμοσωμάτων εντοπίζονται σε γενετικούς τόπους πρωτοογκογονιδίων, το αποτέλεσμα μπορεί να είναι: α) παραγωγή χιμαιρικών (υβριδικών) προϊόντων (π.χ. *BCR/ABL*, *PML/RARα*) ή β) υπερέκφραση μιας ογκοπρωτεΐνης (π.χ. *BCL-2* στη μετάθεση *IGH/BCL-2*) με καρκινογόνο δράση και στις δύο περιπτώσεις. Χρωμοσωμικές μεταθέσεις παρατηρούνται με αυξημένη συχνότητα σε αιματολογικές κακοήθειες και έχουν συσχετιστεί άμεσα με τη νεοπλασματική

εκτροπή (π.χ. *BCR/ABL* και χρόνια μυελογενής λευχαιμία, ή *PML/RARα* και οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία).

(iii) **Γονιδιακή επαύξηση** (amplification). Αντιγραφή του γονιδίου με αποτέλεσμα να υπάρχουν πολλά αντίγραφα ενός γονιδίου στο ίδιο κύτταρο, που οδηγούν στην παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Τυπικό παράδειγμα είναι το γονίδιο *MYC* το οποίο υφίσταται γονιδιακή επαύξηση στο 30% των περιπτώσεων νευροβλαστώματος.

(iv) **Ενσωμάτωση ρετροϊού στο γονιδίωμα του ξενιστή** κοντά στο γενετικό τόπο ενός πρωτοογκογονιδίου. Οδηγεί σε υπερέκφραση του πρωτοογκογονιδίου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ενεργοποίηση του *c-MYC*. Η μεταγραφή του *c-MYC* υπό τη ρύθμιση του ιού είναι υπέρμετρη με αποτέλεσμα καρκινογόνο δράση.

(v) **Ενσωμάτωση πρωτοογκογονιδίου σε ρετροϊό**. Όταν ο ρετροϊός μολύνει ένα ζωικό κύτταρο μπορεί να αποσπάσει από το κύτταρο ένα πρωτοογκογονίδιο και να το ενσωματώσει στο γενετικό υλικό του. Μερικές φορές η διαδικασία αυτή ενεργοποιεί το πρωτοογκογονίδιο. Μια νέα μόλυνση από τον ρετροϊό μπορεί να προκαλέσει νεοπλασία στον ξενιστή.

Αντίστροφα, μια μετάλλαξη που **αδρανοποιεί ένα γονίδιο που καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό** μπορεί να απελευθερώσει ένα κύτταρο από τους φυσιολογικούς περιορισμούς του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και έτσι να το οδηγήσει σε υπέρμετρο πολλαπλασιασμό. Τα γονίδια που καταστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό συμμετέχουν επίσης στη διαφοροποίηση και την επιδιόρθωση του DNA και καλούνται ογκοκατασταλτικά (tumor suppressor genes).

Το γονίδιο *TP53* αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα ογκοκατασταλτικού γονιδίου. Ενεργοποιείται από βλάβες του DNA. Όταν η βλάβη είναι περιορισμένη σταματά το κύτταρο στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου έτσι ώστε να δοθεί ο απαιτούμενος χρόνος για επιδιόρθωση των βλαβών. Όταν η βλάβη είναι εκτεταμένη ενεργοποιεί τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Μεταλλάξεις του *TP53* ανιχνεύονται στο 50% των ανθρώπινων καρκίνων. Η λειτουργική αδρανοποίηση της αντίστοιχης πρωτεΐνης, p53, συνεπάγεται απομάκρυνση αυτού του σημαντικού «αισθητήρα» βλαβών του DNA με αποτέλεσμα είτε τον πολλαπλασιασμό κυττάρων

με βλάβες στο DNA, είτε την επιβίωση των κυττάρων που κανονικά έπρεπε να καταστραφούν.

Για να χαθεί ο έλεγχος του πολλαπλασιασμού πρέπει να αδρανοποιηθούν και τα δύο ομόλογα ογκοκατασταλτικά γονίδια, αφού για τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου επαρκεί συνήθως ένα αντίγραφο του γονιδίου. Αντίθετα, στην περίπτωση του πρωτοογκογονιδίου για να προκύψει ένα ανάλογο αποτέλεσμα αρκεί να μεταλλαχθεί ένα αντίγραφο.

Ο έλεγχος του κυτταρικού θανάτου πραγματοποιείται από τα **αποπτωτικά γονίδια** που προάγουν τον θάνατο του κυττάρου και τα **αντιαποπτωτικά γονίδια** που αναστέλλουν την απόπτωση. Τα γονίδια που ελέγχουν την απόπτωση ανήκουν στην οικογένεια BCL-2. Μερικές από τις πρωτεΐνες της οικογένειας, π.χ. BCL-2, BCL-xL, MCL-1, α1/BFL-1 και NR-13, προφυλάσσουν το κύτταρο από την απόπτωση (αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες). Άλλες, π.χ. BAX, BAD, BAK και BCL-xS προάγουν την απόπτωση (προαποπτωτικές πρωτεΐνες)³⁶. Οι προαποπτωτικές και αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας BCL-2 μπορούν να ετεροδιμερίζονται και έτσι να αντιρροπούν η μια τη δράση της άλλης. Αυτό υποδηλώνει ότι η σχετική συγκέντρωσή τους μπορεί να λειτουργεί σαν ένας ροοστάτης για τον έλεγχο του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου^{37,38}.

Τα τελευταία χρόνια ποικίλα δεδομένα που προήλθαν από τη μοριακή και λειτουργική ανάλυση των νεοπλασματικών κυττάρων αποκάλυψαν επιπρόσθετους μηχανισμούς ελέγχου της έκφρασης των ογκογονιδίων και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων από τα microRNAs (miRNA) και το βαθμό μεθυλίωσης του DNA.

Τα **miRNA** είναι μεγάλη ομάδα μικρών μορίων RNA (μήκους 19-25 νουκλεοτιδίων), τα οποία ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση των γονιδίων. Σε φυσιολογικά κύτταρα προκαλούν είτε αποδόμηση του mRNA είτε καταστολή της μετάφρασης. Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι αλλαγές στην έκφρασή τους εμπλέκονται στην παθογένεια του καρκίνου^{39,40,41}. Συγκεκριμένα, μελέτες σε ασθενείς με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ) προσέφεραν τις πρώτες ενδείξεις για την πιθανή συσχέτιση των miRNAs με τη νεοπλασματική εκτροπή. Οι σχετικές μελέτες έδειξαν ότι το προφίλ έκφρασης των miRNAs στα νεοπλασματικά κύτταρα της ΧΛΛ ήταν διαφορετικό από το αντίστοιχο των φυσιολογικών Β λεμφοκυττάρων ΧΛΛ⁴², ενώ η έκφραση συγκεκριμένων miRNAs συσχετίστηκε με προγνωστικούς δείκτες και την

πρόοδο της νόσου⁴³.

Όσον αφορά τη **μεθυλίωση του DNA**, η καλύτερα μελετημένη επιγενετική τροποποίηση στον άνθρωπο είναι η μεθυλίωση της κυτοσίνης του DNA, δηλαδή η ομοιοπολική προσθήκη μιας μεθυλομάδας στην 5' θέση της κυτοσίνης⁴⁴. Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από μαζική απώλεια της μεθυλίωσης του DNA (20-60% λιγότερες 5-μεθυλοκυτοσίνες). Μαζική απομεθυλίωση συμβαίνει κυρίως σ' επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, προκαλώντας χρωμοσωμική αστάθεια, μεταθέσεις και αποδιοργάνωση γονιδίων, ενώ υπομεθυλίωση σε συγκεκριμένους υποκινητές μπορεί να ενεργοποιήσει ογκογονίδια σε ορισμένους γενετικούς τόπους. Παράλληλα, συχνά παρατηρείται και το αντίθετο φαινόμενο, δηλαδή υπερμεθυλίωση σε νησίδες CpG διαφόρων γονιδίων. Αντίθετα από τη μαζική απομεθυλίωση του DNA, η υπερμεθυλίωση παρατηρείται κυρίως σε νησίδες CpG. Η υπερμεθυλίωση υποκινητών προκαλεί μεταγραφική απενεργοποίηση γονιδίων που εμπλέκονται στις κυριότερες κυτταρικές διεργασίες. Διαταραχές της μεθυλίωσης έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη νεοπλασιών.

Συμπερασματικά, οι διαταραχές του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης απορρυθμίζουν το κύτταρο από τους φυσιολογικούς μηχανισμούς ελέγχου και μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη κακοήθειας. Η νεοπλασματική εκτροπή είναι πολύπλοκη διαδικασία η οποία προκύπτει από διαδοχικές βλάβες που συμβαίνουν συνήθως μέσα σε χρονική περίοδο πολλών ετών. Ένας αρχικός πληθυσμός μεταλλαγμένων κυττάρων αυξάνει και παράλληλα εξελίσσεται με βραδύ ρυθμό: νέες τυχαίες μεταλλάξεις συμβαίνουν στα κύτταρά του και μερικές από αυτές ευνοούνται από τη φυσική επιλογή. Τελικά, προκύπτουν κύτταρα που διαθέτουν όλες τις αλλαγές που απαιτούνται για την ανάπτυξη ενός έκδηλου καρκίνου. Τυπικά, ο καρκίνος είναι νόσημα των ηλικιωμένων, επειδή για να μπορέσει μια ξεχωριστή σειρά κυττάρων να συσσωρεύσει μεγάλο αριθμό σωματικών μεταλλάξεων χρειάζεται πολύς χρόνος. Άτομα που έχουν κληρονομήσει μια μετάλλαξη της γαμετικής σειράς, σ' ένα ογκογονίδιο ή ογκοκατασταλτικό γονίδιο, απαιτούν μικρότερο αριθμό επιπρόσθετων μεταλλάξεων για την ανάπτυξη νεοπλασίας, άρα το νόσημα εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα και σε νεότερη ηλικία. Τελικά, το είδος του κυττάρου που έχει υποστεί τις γενετικές βλάβες σε

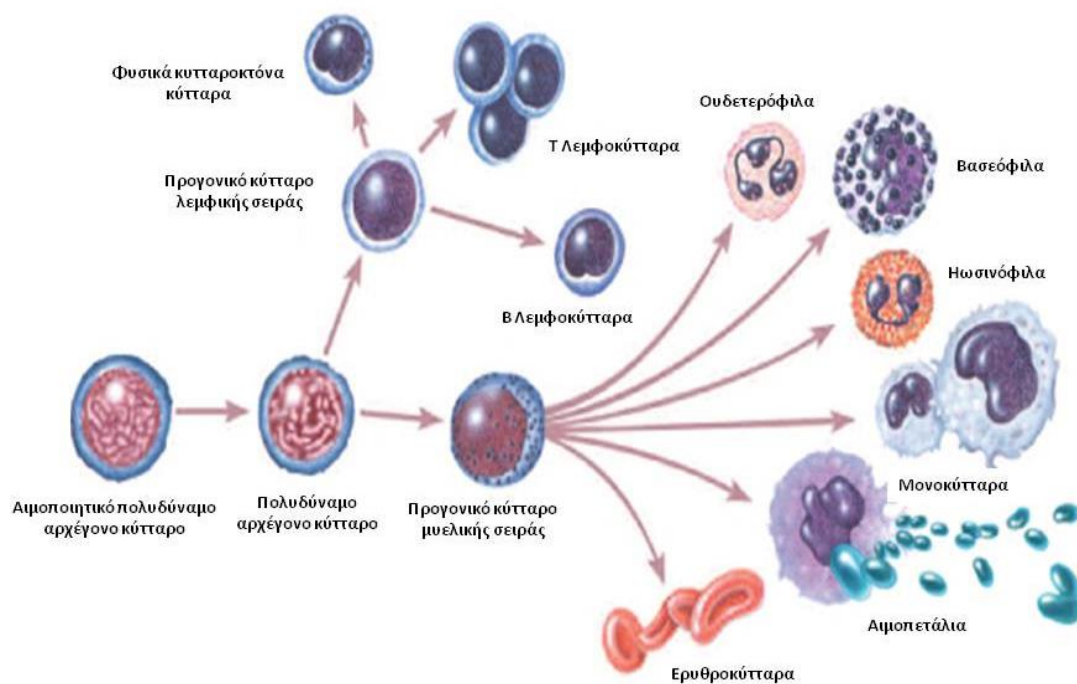
συνδυασμό με το είδος των γονιδίων που έχουν υποστεί βλάβη καθορίζει τον τελικό φαινότυπο της κακοήθειας.

1.2 Νεοπλάσματα του αιμοποιητικού ιστού

Το αίμα είναι εξαιρετικά εξειδικευμένος ιστός, ο οποίος απαρτίζεται από έμμορφα στοιχεία και πλάσμα. Στα έμμορφα στοιχεία συμπεριλαμβάνονται τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια⁴⁵. Τα κύτταρα του αίματος επιτελούν σημαντικές λειτουργίες: τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά του οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς, τα λευκά αιμοσφαίρια παίζουν πρωτεύοντα ρόλο στην άμυνα του οργανισμού και τα αιμοπετάλια συμμετέχουν στον έλεγχο της αιμορραγίας με το σχηματισμό θρόμβου στο σημείο ρήξης του αγγείου. Ειδικότερα, τα λευκά αιμοσφαίρια δεν αποτελούν ενιαίο πληθυσμό αλλά διακρίνονται σε (i) κοκκιοκύτταρα, που περιλαμβάνουν τα ουδετερόφιλα, τα βασεόφιλα και τα ηωσινόφιλα, (ii) λεμφοκύτταρα στα οποία ανήκουν τα Β λεμφοκύτταρα, τα Τ λεμφοκύτταρα και τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (NK) και (iii) μεγάλα μονοπύρρηνα ή μακροφάγα. Κάθε λευκοκυτταρικός πληθυσμός επιτελεί συγκεκριμένη λειτουργία. Τα κοκκιοκύτταρα και τα μεγάλα μονοπύρρηνα αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού και είναι υπεύθυνα κυρίως για την έμφυτη ή φυσική άνοση απάντηση, ενώ τα λεμφοκύτταρα επιτελούν πιο εξειδικευμένες λειτουργίες και είναι υπεύθυνα για την ειδική ή επίκτητη άνοση απάντηση. Συγκεκριμένα, τα Β και Τ λεμφοκύτταρα είναι υπεύθυνα για τη χυμική και κυτταρική άνοση απάντηση, αντιστοίχως. Οι λειτουργίες των Β και Τ λεμφοκυττάρων επιτελούνται μέσω ειδικών υποδοχέων υψηλής συγγένειας που εκφράζουν στην επιφάνειά τους και ονομάζονται Β και Τ κυτταρικός υποδοχέας (B cell Receptor, BcR και T cell Receptor, TcR), αντιστοίχως. Η εύρυθμη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος εξαρτάται από τη συντονισμένη δράση και αλληλεπίδραση όλων αυτών των κυτταρικών πληθυσμών.

Όλα τα κύτταρα του αίματος προέρχονται από το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο (stem cell, SC) και παράγονται στο μυελό των οστών εκτός από τα Τ λεμφοκύτταρα που ωριμάζουν στο θύμο αδέν. Το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο βρίσκεται στο μυελό των οστών και εμφανίζει δύο μοναδικά χαρακτηριστικά:συνεχής

αυτοανανέωση και ικανότητα παραγωγής όλων των διαφορετικών κυττάρων του αίματος. Οι δύο λειτουργίες, του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης, εξελίσσονται παράλληλα. Τα κύτταρα του αίματος παράγονται με απόλυτα ελεγχόμενο τρόπο, σύμφωνα με τις ανάγκες του οργανισμού. Αυτή η διεργασία καλείται αιμοποίηση. Ανάλογα με τα ερεθίσματα που δέχεται, το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο πρώτα διαφοροποιείται σε πολυδύναμο δεσμευμένο για τη μυελική ή λεμφική σειρά κύτταρο⁴⁵ (Εικόνα 1). Από το δεσμευμένο για τη μυελική σειρά κύτταρο θα προκύψουν τελικά τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα αιμοπετάλια, τα ουδετερόφιλα, τα βασεόφιλα, τα ηωσινόφιλα και τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, ενώ από το δεσμευμένο για τη λεμφική σειρά κύτταρο τα Τ λεμφοκύτταρα, τα Β λεμφοκύτταρα και τα ΝΚ κύτταρα.



Εικόνα 1. Διαφοροποίηση των αρχέγονων πολυδύναμων αιμοποιητικών κυττάρων στο μυελό των οστών. <http://stemcells.nih.gov/StemCells/Templates/StemCellContentPage.aspx?> T. Winslow, L. Kibiuk, 2001 (τροποποιημένη).

Νεοπλασματική εκτροπή μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε στάδιο της διαφοροποίησης των κυττάρων του αίματος. Ανάλογα με τη φύση του κυττάρου που έχει υποστεί νεοπλασματική εκτροπή, η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (world health organization, WHO) διακρίνει τα νεοπλάσματα του αιμοποιητικού ιστού σε (i) νεοπλάσματα της μυελικής και (ii) νεοπλάσματα της λεμφικής σειράς. Στη συνέχεια, τα νοσήματα ταξινομούνται με βάση το στάδιο διαφοροποίησης του κυττάρου που

υπέστη τη νεοπλασματική εκτροπή αλλά και τη δυνατότητα αποδοτικής ή μη αιμοποίησης του νεοπλασματικού κλώνου. Τελικά, σύμφωνα με την ταξινόμηση της WHO το κάθε νόσημα ορίζεται από ένα συνδυασμό μορφολογικών, ανοσοφαινοτυπικών, γενετικών και κλινικών χαρακτηριστικών⁴⁶. Ειδικότερα:

(i) Τα νεοπλάσματα της **μυελικής σειράς** διακρίνονται σε τέσσερις κύριες κατηγορίες: α) Χρόνια μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα τα οποία χαρακτηρίζονται από υπέρμετρη αποδοτική αιμοποίηση στο μυελό των οστών που οδηγεί σε αύξηση των περισσότερων κυτταρικών σειρών στο αίμα και το μυελό (π.χ. χρόνια μυελογενής λευχαιμία, Φιλαδέλφεια αρνητικά μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα) β) Μυελοδυσπλαστικά νεοπλάσματα τα οποία χαρακτηρίζονται από μη αποδοτική υπερπλασία στο μυελό των οστών που οδηγεί σε μη αποδοτική αιμοποίηση και δυσπλασία με τελικό αποτέλεσμα την κυτταροπενία (π.χ. ανθεκτική αναιμία με ή χωρίς δακτυλιοειδείς σιδηροβλάστες) γ) Μυελοδυσπλαστικά/Μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα με χαρακτηριστικά ενδιάμεσα των δύο προηγούμενων κατηγοριών (αυξημένη αιμοποίηση και δυσπλασία) και δ) Οξείες μυελογενείς λευχαιμίες που χαρακτηρίζονται από κλωνική υπερπλασία των μυελοβλαστών στο μυελό των οστών και αναστολή της ωρίμανσης της μυελικής σειράς.

(ii) Τα νεοπλάσματα της **λεμφικής σειράς** διακρίνονται ανάλογα με τον τύπο του λεμφοκυττάρου που υπέστη τη νεοπλασματική εκτροπή σε νεοπλάσματα από Β, Τ ή ΝΚ λεμφοκύτταρα, ενώ ανάλογα με το στάδιο ωρίμανσης του νεοπλασματικού λεμφοκυττάρου σε νεοπλάσματα από λεμφοκύτταρα σε πρώιμα στάδια διαφοροποίησης (π.χ. οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία) ή πιο ώριμα στάδια διαφοροποίησης (π.χ. χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ) και λεμφώματα).

Η ΧΛΛ είναι η πιο συχνή λευχαιμία στο Δυτικό ημισφαίριο με επίπτωση 4,3 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα ανά έτος στην Αμερική⁴⁷. Παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον με δεδομένο ότι παρά τον ομοιογενή κλινικοεργαστηριακό φαινότυπο των ασθενών κατά τη διάγνωση, η κλινική πορεία των ασθενών ποικίλει πολύ καθώς ορισμένοι ασθενείς επιβιώνουν για πολλά χρόνια χωρίς θεραπεία, ενώ άλλοι παρουσιάζουν επιθετική νόσο με μικρή επιβίωση παρά τη θεραπεία. Η παθογένεια της ΧΛΛ απετέλεσε αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης τα τελευταία χρόνια και σήμερα θεωρείται νόσος πρότυπο για τη μελέτη των διαταραχών του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης στη νεοπλασματική εκτροπή. Είναι γενικά αποδεκτό ότι

τόσο η έναρξη όσο και η εξέλιξη της ΧΛΛ συνδέονται άμεσα με αλληλεπιδράσεις μεταξύ εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων μηχανισμών που επηρεάζουν το ρυθμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης των νεοπλασματικών κυττάρων^{48,49}. Οι εξωκυτταριοί μηχανισμοί σχετίζονται με αλληλεπιδράσεις των προγονικών αλλά και των κλωνογενών κυττάρων της ΧΛΛ με το μικροπεριβάλλον μέσω υποδοχέων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, κυρίως του Β κυτταρικού υποδοχέα (B-cell receptor, BcR). Οι ενδοκυτταριοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση ογκογονιδίων (π.χ. *NOTCH1*)^{50,51,52} ή την καταστολή ογκοκατασταλτικών γονιδίων (π.χ. *TP53* and *ATM*) που επηρεάζουν τη δυναμική του νεοπλασματικού κυττάρου^{53,54,55,56}.

Με δεδομένο ότι η συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή έχει επικεντρωθεί στη μελέτη των διαταραχών του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης στη ΧΛΛ, που είναι νεόπλασμα των Β λεμφοκυττάρων, θα ακολουθήσει μια εισαγωγή στη διαφοροποίηση των φυσιολογικών Β λεμφοκυττάρων και στη δομή του BcR ώστε να γίνουν κατανοητά τα δεδομένα που έχουν προκύψει από τη μελέτη των μοριακών χαρακτηριστικών του BcR και τη σηματοδότηση μέσω BcR στα νεοπλασματικά κύτταρα της ΧΛΛ.

1.3 Διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων

Τα Β λεμφοκύτταρα, όπως όλα τα κύτταρα του αίματος, προέρχονται από το αρχέγονο πολυδύναμο αιμοποιητικό κύτταρο. Παράγονται στο μυελό των οστών υπό την επίδραση του μικροπεριβάλλοντος. Η ανάπτυξη των Β λεμφοκυττάρων εξελίσσεται σε πολλά στάδια και διακρίνεται σε δύο φάσεις. Στην πρώτη φάση, το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο διαφοροποιείται στον κοινό λεμφοειδή πρόγονο (common lymphoid progenitor-CLP), που μπορεί να διαφοροποιηθεί σε Β, Τ λεμφοκύτταρα ή ΝΚ κύτταρα και με τα κατάλληλα ερεθίσματα καταλήγει στη δημιουργία του παρθένου Β λεμφοκυττάρου (naïve B cell) που μεταναστεύει στα δευτερογενή λεμφικά όργανα για περαιτέρω διαφοροποίηση υπό την επίδραση του αντιγόνου (δεύτερη φάση διαφοροποίησης). Το κρίσιμο σημείο για τη δέσμευση ενός αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου στη Β λεμφική σειρά είναι η αναδιάταξη των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών που καλείται ανασυνδυασμός V(D)J. Ο ανασυνδυασμός V(D)J καταλήγει στην έκφραση της ανοσοσφαιρίνης IgM στην

επιφάνεια των Β λεμφοκυττάρων. Η ανοσοσφαιρίνη IgM σε συνδυασμό με τις διαμεμβρανικές αλυσίδες Igα (CD79a) και Igβ (CD79b) σχηματίζουν τον Β κυτταρικό υποδοχέα (BCR), το σημαντικότερο υποδοχέα των Β λεμφοκυττάρων που ρυθμίζει όλες σχεδόν τις λειτουργίες των φυσιολογικών Β λεμφοκυττάρων. Όταν τα Β λεμφοκύτταρα διεγερθούν από το ειδικό κατά περίπτωση αντιγόνο μέσω του BCR μετατρέπονται σε πλασματοκύτταρα που παράγουν και εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες της συγκεκριμένης ανοσοσφαιρίνης. Ο άνθρωπος διαθέτει μεγάλη συλλογή διαφορετικών ανοσοσφαιρινών (αντισωμάτων) έτσι ώστε να μπορεί ν' αντιμετωπίσει μεγάλο εύρος διαφορετικών αντιγόνων με τα οποία καθημερινά έρχεται σ' επαφή. Συγκεκριμένα, ο άνθρωπος μπορεί να διαθέτει έως και 10^{11} διαφορετικά μόρια αντισωμάτων.

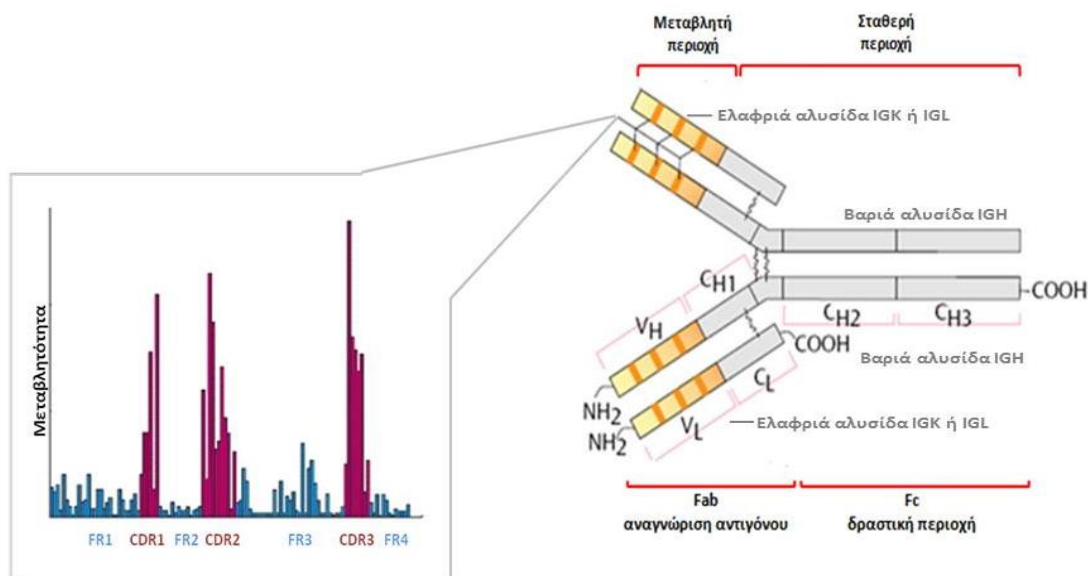
1.3.1 Ανοσοσφαιρίνες

Οι ανοσοσφαιρίνες (IG) ή αντισώματα ανήκουν στην οικογένεια των γλυκοπρωτεϊνών του πλάσματος και παράγονται από τα πλασματοκύτταρα. Αποτελούνται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, δύο πανομοιότυπες βαριές (heavy, H) και δύο πανομοιότυπες ελαφριές (light, L) αλυσίδες. Οι δύο βαριές αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφυδρικούς δεσμούς και κάθε βαριά αλυσίδα συνδέεται με μια ελαφριά αλυσίδα επίσης μ' έναν δισουλφυδρικό δεσμό. Υπάρχουν δύο τύποι ελαφριών αλυσίδων κ και λ και πέντε τύποι βαριών αλυσίδων (μ, γ, δ, ε, α)^{57,58}. Με βάση το είδος της βαριάς αλυσίδας οι ανοσοσφαιρίνες ταξινομούνται σε πέντε τάξεις ή ισότυπους (isotypes) (IgM, IgG, IgD, IgE, IgA). Μικρές διαφορές στις ακολουθίες αμινοξέων των αλυσίδων α και γ οδήγησε σε περαιτέρω κατάταξη των βαριών αλυσίδων σε υποτάξεις. Στον άνθρωπο υπάρχουν δύο υποτάξεις α βαριών αλυσίδων (α1 και α2) και τέσσερις υποτάξεις γ (γ1, γ2, γ3 και γ4)⁵⁹. Όλες οι ανοσοσφαιρίνες που ανήκουν στην ίδια τάξη έχουν αμινοξική ταυτότητα τουλάχιστον 90%⁶⁰.

Το αμινοτελικό άκρο των βαριών και ελαφριών αλυσίδων παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των διαφόρων τάξεων ανοσοσφαιρινών και καλείται μεταβλητή (variable, V) περιοχή. Αντίθετα, το καρβοξυτελικό άκρο παραμένει σταθερό και καλείται σταθερή (Constant, C) περιοχή. Αυτός ο δομικός διαχωρισμός

αντικατοπτρίζει τις διαφορετικές λειτουργίες κάθε άκρου, καθώς η μεταβλητή περιοχή είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και σύνδεση του αντιγόνου ενώ η σταθερή περιοχή είναι επιφορτισμένη με την ενεργοποίηση διαφορετικών εκτελεστικών μηχανισμών με σκοπό την αντιμετώπιση του «εισβολέα» (Εικόνα 2). Ο ισότυπος της εκκρινόμενης ανοσοσφαιρίνης καθορίζει το είδος των εκτελεστικών μηχανισμών που θα ενεργοποιηθούν. Οι ισότυποι αφορούν σε διαφορές των περιοχών C των βαριών αλυσίδων και παρατηρούνται σε όλα τα άτομα ενός είδους, ενώ δε σχετίζονται με την ειδικότητα του αντισώματος.

Η αναγνώριση και η πρόσδεση του αντιγόνου επιτελούνται από τη μεταβλητή περιοχή της ανοσοσφαιρίνης. Μέσα στη μεταβλητή περιοχή των ελαφριών και των βαριών αλυσίδων αναγνωρίζονται υποπεριοχές που είναι εξαιρετικά μεταβλητές (υπερμεταβλητές, *hypervariable regions*) και καθορίζουν την ειδικότητα του αντισώματος, σχηματίζοντας μια θέση σύνδεσης συμπληρωματική με το αντιγόνο. Γι' αυτό το λόγο, οι υπερμεταβλητές περιοχές ονομάζονται και περιοχές καθορισμού της συμπληρωματικότητας (*complementarity determining regions*, CDRs) των βαριών και ελαφριών αλυσίδων. Σε κάθε αλυσίδα υπάρχουν 3 υπερμεταβλητές περιοχές που ονομάζονται CDR1, CDR2 και CDR3, αντιστοίχως. Τα τμήματα μεταξύ των περιοχών CDR είναι πιο συντηρημένα και αναφέρονται ως περιοχές πλαισίου (*framework regions*, FRs) και σχηματίζουν το δομικό πλαίσιο της περιοχής με τις υπερμεταβλητές αλληλουχίες^{57,61}. Υπάρχουν 4 περιοχές πλαισίου σε κάθε αλυσίδα, οι FR1, FR2, FR3 και FR4 (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Δομικός και λειτουργικός διαχωρισμός του μορίου της ανοσοσφαιρίνης. Αριστερά ο διαχωρισμός της μεταβλητής περιοχής κάθε αλυσίδας σε περιοχές υψηλής μεταβλητότητας (CDRs) και περιοχές πλαισίου (FRs). (IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system®; <http://imgt.cines.fr>).

Ένα μοναδικό χαρακτηριστικό των αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών είναι ότι δεν κωδικοποιούνται από ένα ξεχωριστό γονίδιο αλλά από συνδυασμό γονιδίων που αναδιατάσσονται με ιεραρχικό τρόπο κατά την ωρίμανση των Β λεμφοκυττάρων. Αυτό είναι εφικτό χάρη στην ιδιαίτερη οργάνωση των γενετικών τόπων των ανοσοσφαιρινών όπου τα γονίδια κατατάσσονται σε ομάδες. Οι γενετικοί τόποι των ελαφριών αλυσίδων (IGK και IGL, για την κ και λ ελαφριά αλυσίδα, αντιστοίχως) περιλαμβάνουν τρεις ομάδες γονιδίων: V (Variable: μεταβλητό), J (Junctional: συνδετικό) και C (Constant: σταθερό). Ο γενετικός τόπος της βαριάς αλυσίδας (IGH) περιλαμβάνει επιπλέον την ομάδα γονιδίων D (Diversity: ποικιλότητας) μεταξύ των ομάδων V και J. Ο σχηματισμός της πλήρους γονιδιακής αλληλουχίας που κωδικοποιεί μια βαριά ή ελαφριά αλυσίδα προϋποθέτει τον ανασυνδυασμό ενός γονιδίου από κάθε ομάδα. Οι γενετικοί τόποι των βαριών αλυσίδων, των κ και των λ ελαφριών αλυσίδων βρίσκονται στα χρωμοσώματα 14, 2 και 22, αντιστοίχως. Εκτός από τις ομάδες γονιδίων, οι γενετικοί τόποι των ανοσοσφαιρινών περιλαμβάνουν και πλήθος ρυθμιστικών αλληλουχιών⁶² όπως: (i) αλληλουχίες-οδηγοί (leader sequences, L) πριν από κάθε γονίδιο V⁵⁹, (ii) **υποκινητές** (promoters), μικρές αλληλουχίες στο 5' άκρο του γονιδίου που προωθούν την έναρξη της μεταγραφής προς μια ορισμένη κατεύθυνση, (iii) **ενισχυτές** (enhancers), αλληλουχίες σε μικρή

απόσταση από το 5' ή 3' άκρο του γονιδίου που ενεργοποιούν τη μεταγραφή ανεξάρτητα από την κατεύθυνση και (iv) **αποσιωπητές** (silencers) που περιορίζουν τη μεταγραφή από απόσταση, λειτουργώντας και προς τις δύο κατευθύνσεις.

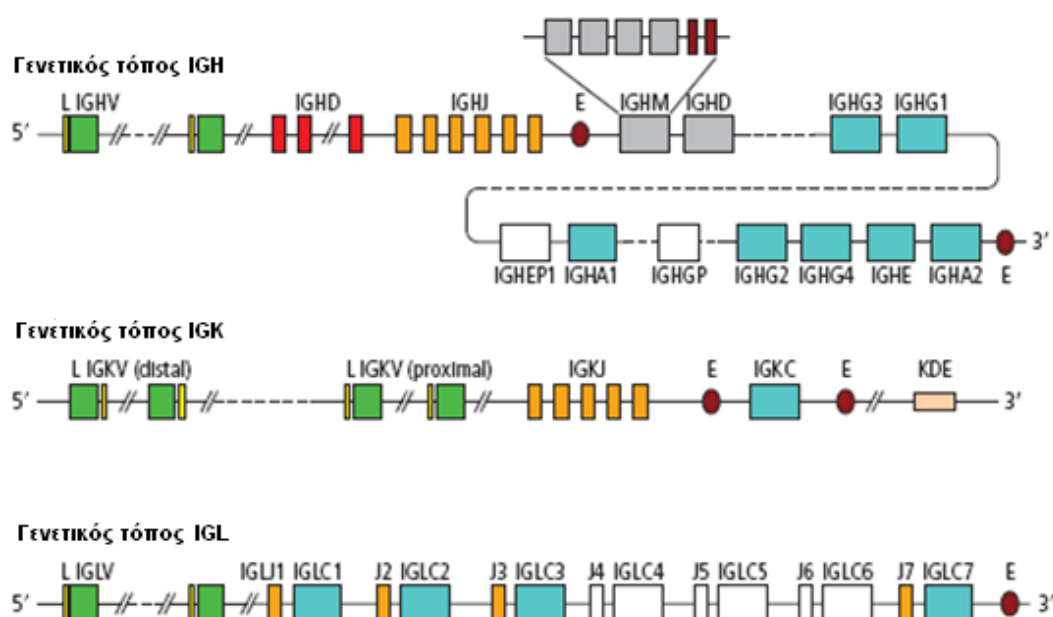
Η μεταβλητή περιοχή των ελαφριών αλυσίδων σχηματίζεται από την αναδιάταξη των γονιδίων V και J, ενώ η σταθερή περιοχή της αλυσίδας κωδικοποιείται από ένα γονίδιο C. Αντιστοίχως, η μεταβλητή περιοχή των βαριών αλυσίδων σχηματίζεται από την αναδιάταξη γονιδίων V, D και J. Η διαδικασία του ανασυνδυασμού είναι ιεραρχική και περιλαμβάνει τα εξής στάδια: αρχικά, ένα γονίδιο D αναδιατάσσεται μ' ένα γονίδιο J και στη συνέχεια πραγματοποιείται η αναδιάταξη του συμπλόκου D-J με ένα γονίδιο V. Κομβικό ρόλο στην αναδιάταξη των γονιδίων παίζει το ετεροδιμερές σύμπλοκο των πρωτεϊνών RAG1/RAG2⁶³.

Ο γενετικός τύπος της IGH συνολικά περιλαμβάνει (ανάλογα με τον απλότυπο) 123 - 129 γονίδια IGHV, 27 γονίδια IGHD, 9 γονίδια IGHJ και 11 γονίδια IGHC ⁶²(Εικόνα 3). Από τα γονίδια IGHV, 82-88 γονίδια ανήκουν σε επτά υποομάδες (IGHV1-7), ενώ 41 είναι ψευδογονίδια, τα οποία δεν κατατάσσονται σε υποομάδες. Επιπλέον, έχουν βρεθεί εννιά γονίδια IGHV τα οποία δεν έχουν χαρτογραφηθεί και αναφέρονται ως πολυμορφισμοί ενθέσεων και ελλείψεων. Η υποομάδα IGHV3 είναι η μεγαλύτερη, αποτελούμενη από 21 λειτουργικά γονίδια, και ακολουθούν οι υποομάδες IGHV4 και IGHV1 με 10 και 9 λειτουργικά γονίδια, αντιστοίχως. Οι υπόλοιπες υποομάδες IGHV (IGHV2, IGHV5, IGHV6, IGHV7) περιλαμβάνουν συνολικά μόνο 7 λειτουργικά γονίδια (3/2/1/1 γονίδια, αντιστοίχως). Με βάση την ομοιότητα στην ακολουθία των νουκλεοτιδίων, οι υποομάδες IGHV ανήκουν σε ευρύτερες κατηγορίες, γνωστές ως γενιές (clans). Η γενιά I περιλαμβάνει τα γονίδια των υποομάδων IGHV1, IGHV5 και IGHV7, η γενιά II τα γονίδια των υποομάδων IGHV2, IGHV4 και IGHV6, ενώ η γενιά III μόνο τα γονίδια της υποομάδας IGHV3. Τα 27 γονίδια IGHD κατατάσσονται σε 7 υποομάδες (IGHD1-7). Είκοσι τρία από τα 27 γονίδια IGHD και 6 από τα 9 γονίδια IGHJ είναι λειτουργικά, ενώ τα υπόλοιπα είναι ψευδογονίδια.

Ο γενετικός τύπος IGK αποτελείται συνολικά από 82 γονίδια ανά απλοειδές γονιδίωμα, 76 από τα οποία ανήκουν στην ομάδα των γονιδίων IGKV και κατατάσσονται σε 7 υποομάδες (IGKV1- 7). Από αυτά λειτουργικά είναι 31-35. Στην ομάδα των γονιδίων IGKJ ανήκουν 5 γονίδια. Επίσης, υπάρχει ένα μοναδικό γονίδιο IGKC. Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του γενετικού τύπου IGK είναι η οργάνωση των

γονιδίων IGKV σε δύο συστοιχίες, οι οποίες απέχουν μεταξύ τους κατά 800 kb. 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^{62,64} (Εικόνα 3).

Ο γενετικός τόπος IGL περιλαμβάνει συνολικά 87-96 γονίδια ανάλογα με τον απλότυπο^{62,65}, 73-74 γονίδια IGLV, 7-11 γονίδια IGLJ και 7-11 γονίδια IGLC. Τα 56-57 λειτουργικά γονίδια κατατάσσονται σε 11 υποομάδες, ενώ 17 ψευδογονίδια εμφανίζουν μεγάλη απόκλιση και δε μπορεί να καταταγούν σε κάποια υποομάδα. Τα γονίδια IGLJ είναι ισάριθμα με τα γονίδια IGLC επειδή οργανώνονται σε συστοιχίες γονιδίων όπου κάθε γονίδιο IGLJ ακολουθείται από ένα γονίδιο IGLC (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Γενετική οργάνωση των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών. Η βαριά αλυσίδα κωδικοποιείται από γονίδια IGHV, IGHD, IGHI και IGHC. Οι ελαφριές αλυσίδες IGK και IGL κωδικοποιούνται από γονίδια IGKV, IGKJ, IGKC και IGLV, IGLJ, IGLC, αντιστοίχως. (IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system®; <http://imgt.cines.fr>).

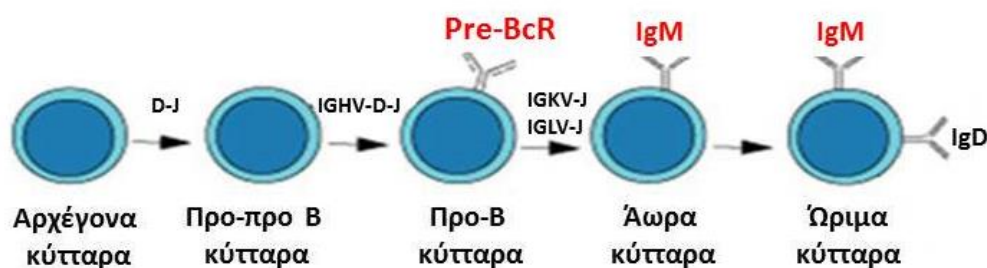
*distal: απομακρυσμένη, proximal:εγγύς, E:ενισχυτές (enhancers), L: αλληλουχίες οδηγού (Leader sequences)

1.3.2 Διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων στο μυελό των οστών

Η διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων σε Β λεμφοκύτταρα εξελίσσεται σε πολλά στάδια και χαρακτηρίζεται από τις αναδιατάξεις των γονιδίων

των ανοσοσφαιρινών και την έκφραση ανοσοσφαιρινών, προσδετικών μορίων και υποδοχέων αυξητικών παραγόντων στην επιφάνεια των αναπτυσσόμενων Β λεμφοκυττάρων^{66,67}. Η διεργασία των αναδιατάξεων των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών ονομάζεται ανασυνδυασμός V(D)J και έχει ιεραρχικό χαρακτήρα (Εικόνα 4).

ΜΥΕΛΟΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ



Εικόνα 4. Ωρίμανση των Β λεμφοκυττάρων στο μυελό των οστών όπου πραγματοποιείται ο ανασυνδυασμός της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας (IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system®; <http://imgt.cines.fr>).

Η πρώτη αναδιάταξη γίνεται και στα δύο αλληλόμορφα της βαριάς αλυσίδας μεταξύ γονιδίων D και J. Αυτή η αναδιάταξη «δεσμεύει» τα αρχέγονα κύτταρα να διαφοροποιηθούν σε Β λεμφοκύτταρα. Σε αυτή τη φάση το κύτταρο καλείται πρώιμο προ-προ Β κύτταρο (early pro B cell). Ακολουθεί ο ανασυνδυασμός ενός γονιδίου V και του γενετικού συμπλόκου DJ και το κύτταρο μετατρέπεται σε όψιμο προ-προ Β κύτταρο (late pro B cell). Μόλις ολοκληρωθεί ο ανασυνδυασμός V(D)J, το κύτταρο εκφράζει στην επιφάνειά του το δείκτη CD19. Στη φάση αυτή το κύτταρο καλείται μεγάλο προ-B λεμφοκύτταρο (pre-B cell) κι εκφράζει στην επιφάνειά του τον προ-B υποδοχέα (pre-BcR: pre B cell receptor), ο οποίος αποτελείται από τη βαριά αλυσίδα, μια υποκατάστατη ελαφριά αλυσίδα (surrogate light chain, SLC) προϊόν των γονιδίων VpreB και λ5, και τους συνυποδοχείς (co-receptors) Igα και Igβ οι οποίοι είναι απαραίτητοι για τη λειτουργία του BcR. Κύτταρα που δεν εκφράζουν υποδοχέα προ-BcR πεθαίνουν με απόπτωση. Τα κύτταρα που εκφράζουν υποδοχέα προ-BcR επιλέγονται θετικά, μετατρέπονται σε μικρά προ-B λεμφοκύτταρα, διακόπτουν τον ανασυνδυασμό των γονιδίων IGH του άλλου αλληλομόρφου

(αποκλεισμός αλληλομόρφου, allelic exclusion) και αρχίζουν τον ανασυνδυασμό των γονιδίων που κωδικοποιούν τις ελαφριές αλυσίδες. Επιτυχής αναδιάταξη οδηγεί στην παραγωγή κ αλυσίδας και στη δημιουργία μιας πλήρους IgMκ, ενώ αναστέλλονται οι περαιτέρω γονιδιακές αναδιατάξεις. Αν η προσπάθεια παραγωγής κ ελαφριάς αλυσίδας αποτύχει, αναδιατάσσεται ο γενετικός τόπος της λ αλυσίδας. Όταν το κύτταρο αποκτήσει λειτουργική λ αλυσίδα θα εκφράσει 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 μικροπεριβάλλοντος. Στο στάδιο αυτό, τα B λεμφοκύτταρα ελέγχονται για το ενδεχόμενο αυτοαντιδραστικότητας (self-reactivity) πριν την έξοδό τους στην περιφέρεια⁶⁸. Όσα ανώριμα B λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν αυτοαντιγόνα στο μυελό των οστών εξαλείφονται ή εμφανίζουν ανοχή έναντι αυτόλογων κυττάρων και ιστών. Οι μηχανισμοί ελέγχου της αυτοαντιδραστικότητας σε αυτό το στάδιο περιλαμβάνουν:

1. **εξάλειψη κλώνων** (clonal deletion): τα B λεμφοκύτταρα που αναγνωρίζουν πολυσθενή αντιγόνα μέσω της επιφανειακής IgM υφίστανται εξάλειψη με απόπτωση.
2. **ανεργία** (anergy): τα B λεμφοκύτταρα που αναγνωρίζουν χαμηλού σθένους αντιγόνα (πχ. διαλυτά) γίνονται ανεργικά, χάνουν την επιφανειακή IgM (διατηρούν, ωστόσο, IgM στο κυτταρόπλασμα), ενώ στην επιφάνεια εκφράζουν υψηλά επίπεδα IgD.
3. **διόρθωση υποδοχέα** (receptor editing): πολύ συχνά η πρόσδεση της IgM στον αντίστοιχο προσδέτη ενεργοποιεί το αυτοαντιδραστικό ανώριμο B κύτταρο να επανεκφράσει τις πρωτεΐνες ανασυνδυασμού RAG1 και RAG2 με αποτέλεσμα περαιτέρω ανασυνδυασμό των γονιδίων των ελαφριών αλυσίδων. Η διαδικασία αυτή μπορεί να προκαλέσει αντικατάσταση μιας ελαφριάς αλυσίδας από μια νέα ελαφριά αλυσίδα, γεγονός που δημιουργεί μια νέα αντιγονική ειδικότητα^{69,70}.

Όσα B λεμφοκύτταρα δεν αλληλεπιδρούν με κάποιο αυτοαντιγόνο εγκαταλείπουν το μυελό, μεταναστεύουν στα δευτερογενή λεμφικά όργανα (λεμφαδένες, σπλήνας, λεμφικός ιστός των βλεννογόνων) και ονομάζονται ώριμα παρθένα B λεμφοκύτταρα.

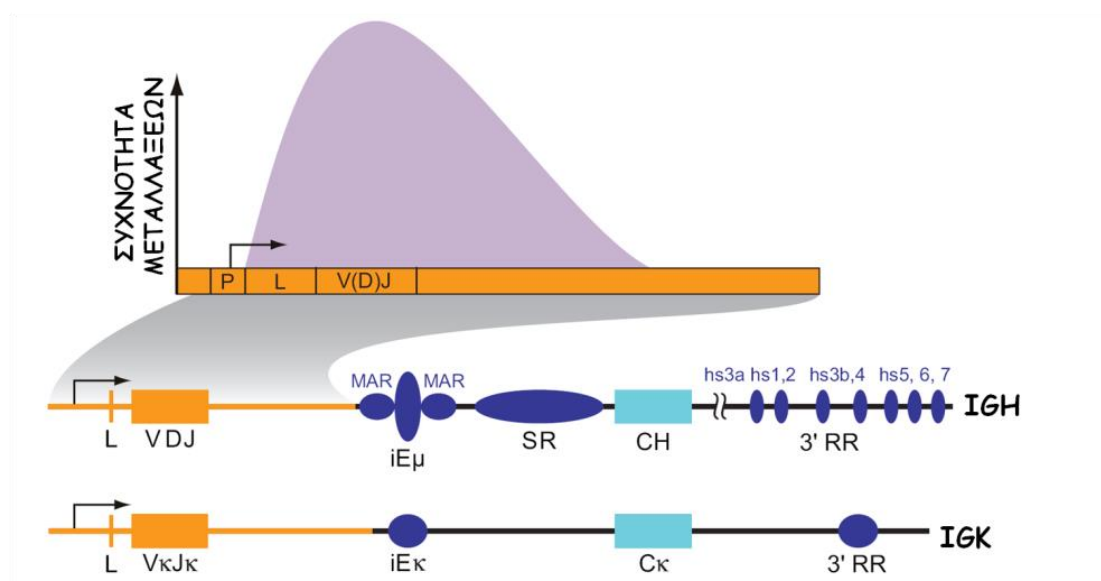
1.3.3 Διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων στα δευτερογενή λεμφικά όργανα

Τα παρθένα Β λεμφοκύτταρα εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και μέσω αυτής στα δευτερογενή λεμφικά όργανα. Τα δευτερογενή λεμφικά όργανα περιλαμβάνουν το σπλήνα, τους λεμφαδένες, το λεμφικό ιστό που σχετίζεται με τους βλεννογόνους (αμυγδαλές και πλάκες του Peyer στο έντερο) και το διάχυτο λεμφικό ιστό στο σώμα. Στα δευτερογενή λεμφικά όργανα τα ώριμα παρθένα Β λεμφοκύτταρα έρχονται σ' επαφή με αντιγόνα και υφίστανται ένα δεύτερο κύκλο διαφοροποίησης. Τα Β λεμφοκύτταρα λαμβάνουν σήματα από το μικροπεριβάλλον κυρίως μέσω του BcR αλλά και άλλων υποδοχέων, π.χ. υποδοχέων έμφυτης ανοσίας (π.χ. υποδοχείς τύπου Toll, Toll Like Receptors, TLRs), CD40, υποδοχέων κυτταροκινών και συμπληρώματος και απαντούν σε αυτά τροποποιώντας τις λειτουργίες τους.

Όταν τα ώριμα παρθένα Β λεμφοκύτταρα έρθουν σε επαφή με το αντιγόνο και ενεργοποιηθούν από τα Τ λεμφοκύτταρα αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται. Σε αυτή τη φάση, τα Β λεμφοκύτταρα πραγματοποιούν εκτεταμένες αλληλεπιδράσεις με τα διπλανά Τ λεμφοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα. Τα διαιρούμενα Β λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν στο κέντρο των λεμφοζιδίων όπου δημιουργούν το βλαστικό κέντρο (germinal center) (Εικόνα 5).

σωματική υπερμεταλλαξιγένεση (SYM) (somatic hypermutation, SHM) και εναλλαγή ισотύπου (MI) (class-switch recombination, CSR).

Η SYM είναι η διεργασία εισαγωγής μεταλλάξεων στα γονίδια των ανοσοσφαιρινών που ακολουθεί την επαφή με το αντιγόνο^{72,73,74,75} και σκοπό έχει ν' αυξήσει τη συγγένεια της ανοσοσφαιρίνης για το αντιγόνο. Αφορά κυρίως την περιοχή πρόσδεσης με το αντιγόνο [μεταβλητή περιοχή]. Ο όρος «υπερμεταλλαξιγένεση» αντικατοπτρίζει 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} /bp/κυτταρική γενιά). Τα Β λεμφοκύτταρα των οποίων ο υποδοχέας έχει αποκτήσει μεγαλύτερη συγγένεια με το αντιγόνο επιλέγονται για πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση (ωρίμανση συγγένειας). Το τελικό αποτέλεσμα της SYM είναι η αύξηση της ποικιλομορφίας των ανοσοσφαιρινών και η δημιουργία ανοσοσφαιρινών με υψηλότερη συγγένεια για το αντιγόνο^{76,71} (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Πάνω: Συχνότητα εισαγωγής μεταλλάξεων από τη διεργασία της SYM κατά μήκος των γενετικών τόπων IGH και IGK. Κάτω: Οργάνωση γενετικών τόπων IGH και IGK. P: υποκινητής (promoter), L: αλληλουχία οδηγός (leader sequence) iE: εσωτερικός ενισχυτής (intronic enhancer), SR: αλληλουχία για εναλλαγή ισотύπου (switch region), 3' RR: 3' ρυθμιστική περιοχή (regulatory region) MARs: περιοχές πρόσδεσης (matrix attachment regions), hs: αλληλουχίες ευαίσθητες στη DNAάση I (DNase I-hypersensitive site). Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kubly J. Immunology 6th Ed. New York: W.H Freeman & Co, 2006

Η ΣΥΜ εισάγει κυρίως σημειακές αντικαταστάσεις βάσεων και σπάνια προκαλεί ενθέσεις ή απαλοιφές (insertions/deletions) τμημάτων DNA. Η εισαγωγή μεταλλάξεων ακολουθεί ορισμένους κανόνες. Παρατηρείται αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων αντικατάστασης (replacement mutations, R) στις περιοχές CDRs ενώ στις περιοχές FRs κυριαρχούν οι «σιωπηρές» μεταλλάξεις (silent mutations, S)⁷⁴. Επιπλέον, ο μηχανισμός της ΣΥΜ φαίνεται ότι στοχεύει επιλεκτικά νουκλεοτίδια G και C έναντι των A και T και πουρίνες έναντι των πυριμιδινών. Επίσης, χαρακτηρίζεται από επικράτηση μεταβάσεων (transitions) σε σχέση με τις μεταπτώσεις (transversions). Τέλος, η ΣΥΜ στοχεύει συχνότερα συγκεκριμένες περιοχές που ονομάζονται «επίκεντρα» (“hotspots”) για εισαγωγή μεταλλάξεων και συχνά ακολουθούν μοτίβα τεσσάρων νουκλεοτιδίων, όπως τα RGYW, WYGR (R: πουρίνη, Y: πυριμιδίνη, W: A ή T)^{77,78}.

Καθοριστικό ρόλο στη ΣΥΜ παίζει το ένζυμο δεαμινάση της κυτιδίνης (AID; activation-induced deaminase) και οι επιρρεπείς σε λάθη πολυμεράσες (error-prone polymerases). Η AID εκφράζεται μόνο στα ενεργοποιημένα Β λεμφοκύτταρα, ιδίως στα Β λεμφοκύτταρα του βλαστικού κέντρου. Αποτελείται από 198 αμινοξέα και περιέχει ένα μοναδικό μοτίβο δεαμινάσης της κυτιδίνης στις θέσεις 55-94. Μέσω του ενεργού κέντρου της, η AID μπορεί να μετατρέψει την κυτοσίνη (C) σε ουρακίλη (U)^{76,71,79,80}. Παρότι έχουν προταθεί πολλά μοντέλα, ο ακριβής μηχανισμός της ΣΥΜ παραμένει άγνωστος. Πρόσφατα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η ΣΥΜ περιλαμβάνει δύο φάσεις, από τις οποίες η πρώτη εξαρτάται από τη δράση της AID ενώ η δεύτερη από τη δράση των επιρρεπών σε λάθη επιδιορθωτικών μηχανισμών. Στην πρώτη φάση παρατηρούνται κυρίως μεταλλάξεις σε ζεύγη G-C, ενώ στη δεύτερη συμβαίνουν μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο και οφείλονται στο μηχανισμό επιδιόρθωσης των αταίριαστων ζευγών βάσεων (mismatch-repair, MMR)⁸¹. Ειδικότερα, στην πρώτη φάση η AID απαμινώνει τις C στο DNA-στόχο και δημιουργεί αταίριαστα (αντικανονικά) ζεύγη βάσεων U-G τα οποία κατά την αντιγραφή θα δώσουν ζεύγη A-T⁷⁹. Έτσι, προκύπτουν C-T ή, στο συμπληρωματικό κλώνο, G-A μεταβάσεις. Παράλληλα, τα αντικανονικά ζεύγη U-G που δημιουργεί η AID μπορεί ν’ απαλοιφθούν και να επιδιορθωθούν μέσω της οδού εκτομής βάσεων⁸². Στην εκτομή των βάσεων συμμετέχουν τα ένζυμα N-γλυκοζυλάση της ουρακίλης (UNG), απουρινική / απυριμιδινική ενδονουκλεάση (AP) και DNA πολυμεράση β. Η

UNG υδρολύει μια βάση U στο DNA, δημιουργώντας μια θέση AP. Έπειτα η AP δημιουργεί μια μονόκλωνη εντομή στη θέση αυτή, η οποία προκαλεί την επιδιόρθωση του DNA μέσω της DNA πολυμεράσης β. Η διαδικασία αυτή συχνά εισάγει μεταλλάξεις στη θέση που βρισκόταν η απαμινωμένη κυτοσίνη. Αυτή η οδός ΣΥΜ αναφέρεται ως σύντομη επιδιόρθωση (short-patch base-pair excision repair, S-BER). Τέλος, υπάρχει και η οδός της εκτεταμένης επιδιόρθωσης (long-patch base-pair excision repair, L-BER) κατά την οποία συμβαίνει η επιδιόρθωση των αντικανονικών ζευγών με τη δράση της PCNA και των επιρρεπών σε λάθη πολυμερασών^{83,84}. Κατά τη φάση αυτή μπορεί να εισαχθούν μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο.

Τα κεντροκύτταρα στη συνέχεια ελέγχονται και αν η ΣΥΜ έχει ελαττώσει τη συγγένεια της επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης για το αντιγόνο, θα πεθάνουν με απόπτωση. Αντίθετα, τα κεντροκύτταρα που εκφράζουν μεταλλαγμένη ανοσοσφαιρίνη η οποία προσδένει ικανοποιητικά το αντιγόνο ενεργοποιούν την έκφραση του αντιαποπτωτικού γονιδίου BCL-2 και διασώζονται από την απόπτωση. Στο επόμενο στάδιο, στη φωτεινή ζώνη του βλαστικού κέντρου συμβαίνει μια διεργασία τροποποίησης των γονιδίων της βαριάς αλυσίδας, γνωστή ως εναλλαγή ισοτύπου (class switch) κατά την οποία ένα ενεργοποιημένο Β λεμφοκύτταρο αλλάζει τη σταθερή περιοχή της ανοσοσφαιρίνης του. Ο συνδυασμός μιας μεταβλητής περιοχής με διαφορετικές σταθερές περιοχές διασφαλίζει ότι τα αντισώματα μιας ορισμένης ειδικότητας μπορεί να έχουν διαφορετική δράση, για την επίτευξη αποτελεσματικότερης απάντησης προς το αντιγόνο. Η εναλλαγή ισοτύπου διαφοροποιεί περαιτέρω τα αντισώματα μιας συγκεκριμένης αντιγονικής ειδικότητας ώστε να επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες.

Τελικά, τα Β λεμφοκύτταρα με υποδοχείς υψηλής συγγένειας που επιλέγονται από το αντιγόνο αφήνουν το βλαστικό κέντρο και μετατρέπονται σε πλασματοκύτταρα ή Β λεμφοκύτταρα μνήμης (Εικόνα 5).

1.3.4 Μηχανισμοί δημιουργίας ποικιλότητας των ανοσοσφαιρινών

Το πλέον εντυπωσιακό χαρακτηριστικό του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η ικανότητα αναγνώρισης εκατομμυρίων διαφορετικών παθογόνων μέσω των

υψηλής ειδικότητας αντιγονικών υποδοχέων των Β λεμφοκυττάρων καθώς και των αντίστοιχων υποδοχέων στα Τ λεμφοκύτταρα. Ο άνθρωπος έχει την ικανότητα αναγνώρισης 10^{11} διαφορετικών επιτόπων, δηλαδή διαθέτει αντίστοιχο αριθμό διακριτών κλώνων Β λεμφοκυττάρων, καθένα μ' έναν αντιγονικό υποδοχέα μοναδικής ειδικότητας. Η τεράστια δομική ετερογένεια των ανοσοσφαιρινών είναι απαραίτητη για την αναγνώριση των πολυάριθμων επιτόπων που υπάρχουν στη φύση. Για τη δημιουργία αυτής της τεράστιας ποικιλότητας υπεύθυνοι είναι τέσσερις ειδικοί μηχανισμοί:

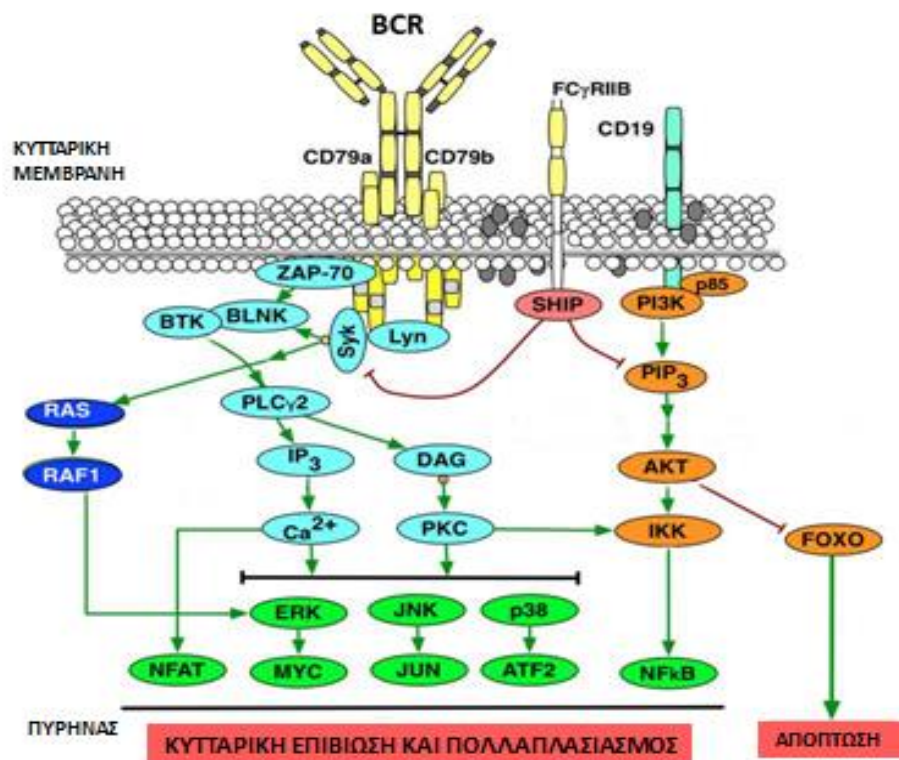
- (i) **Συνδυαστική ποικιλότητα** (combinatorial diversity): αναφέρεται στη σύνδεση των βαριών αλυσίδων με τις ελαφριές για το σχηματισμό του μορίου της ανοσοσφαιρίνης. Μόνο από τη χρησιμοποίηση των διαθέσιμων λειτουργικών γονιδίων IGHV, IGHD, IGHJ και το συνδυασμό με ελαφριές αλυσίδες κ ή λ ο οργανισμός μπορεί να συνθέσει μέχρι $6,5 \times 10^6$ διαφορετικές ανοσοσφαιρίνες.
- (ii) **Συνδετική ποικιλότητα** (junctional diversity): αναφέρεται στη δημιουργία ποικιλομορφίας στα σημεία ένωσης 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 στα άκρα των γονιδίων και εξωνουκλεάσες που αφαιρούν νουκλεοτίδια. Η συνδετική ποικιλότητα συμβάλλει πολύ στην διαφορετικότητα των αντιγονικών υποδοχέων, αυξάνοντας έως και κατά 10^{11} φορές τον αριθμό των πιθανών διαφορετικών ανοσοσφαιρινών.
- (iii) **Σωματική υπερμεταλλαξιγένεση** (SYM, somatic hypermutation): αναφέρεται στην εισαγωγή μεταλλάξεων στα γονίδια των ανοσοσφαιρινών που ακολουθεί την επαφή με το αντιγόνο και σκοπό έχει να αυξήσει τη συγγένεια του μορίου της ανοσοσφαιρίνης για το αντιγόνο⁸⁵. Η SYM συμβάλλει ουσιαστικά στην αύξηση της ποικιλότητας των αντισωμάτων, με αποτέλεσμα ο οργανισμός να μπορεί να παράγει έως και 10^{12} διαφορετικά αντισώματα.
- (iv) **Εναλλαγή ισοτύπου** (class-switch recombination): συμβαίνει μετά την επιλογή των Β λεμφοκυττάρων από το αντιγόνο^{86,87,88}. 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.

1.3.5 Σηματοδότηση μέσω του B κυτταρικού υποδοχέα

Ο BcR ρυθμίζει όλες σχεδόν τις λειτουργίες των φυσιολογικών B λεμφοκυττάρων. Όπως προαναφέρθηκε, συναρμολογείται από την επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη IgM (ή IgD) και τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες Igα (CD79a) και Igβ (CD79b). Οι πρωτεΐνες Igα και Igβ (33 KDa και 39 KDa αντιστοίχως) ανήκουν στην υπερικογένεια των ανοσοσφαιρινών και συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφυδρυνικό δεσμό. Τα ενδοκυττάρια τμήματα των Igα και Igβ φέρουν μοτίβα ενεργοποίησης ανοσοϋποδοχέων μέσω τυροσινών (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs, ITAMs)⁸⁹. Όταν ο BcR συνδεθεί με το αντιγόνο, ενεργοποιείται και μεταβιβάζει το σήμα στο εσωτερικό του κυττάρου. Η επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη (surface immunoglobulin, sIg) είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση με το αντιγόνο, ενώ το ετεροδιμερές Igα/ Igβ για τη μεταβίβαση του σήματος⁹⁰ (Εικόνα 7).

Η διέγερση του BcR έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση του ετεροδιμερούς Igα/Igβ στα μοτίβα ITAMs. Τα μοτίβα ITAMs περιέχουν κατάλοιπα τυροσίνης τα οποία φωσφορυλιώνονται από κινάσες της οικογένειας SRC, όπως οι FYN, BLK, HCK, FGR και LYN. Στα φυσιολογικά B λεμφοκύτταρα, η πρωτεΐνη LYN⁹¹ φαίνεται ότι παίζει το σημαντικότερο ρόλο στη φωσφορυλίωση των ITAMs μέσω της τυροσίνης (Tyr) 507. Αυτό οδηγεί στην επιστράτευση της πρωτεϊνικής κινάσης SYK στις φωσφορυλιωμένες ITAMs. Η πρωτεΐνη SYK ενεργοποιείται μέσω μιας πολύπλοκης διαδικασίας που περιλαμβάνει είτε τη φωσφορυλίωσή της από πρωτεϊνικές κινάσες της οικογένειας SRC είτε αυτοφωσφορυλίωση. Μόλις ενεργοποιηθεί, η SYK μεταδίδει το σήμα μέσω φωσφορυλίωσης σηματοδοτικών μορίων καθοδικά του BcR υποδοχέα σε διάφορες πρωτεΐνες προσαρμογείς. Αυτός ο καταρράκτης αντιδράσεων έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση δύο κρίσιμων σηματοδοτικών μορίων, της 3-κινάσης της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) και της φωσφολιπάσης Cγ2 (phospholipase Cγ2, PLCγ2)⁹² (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση της σηματοδότησης μέσω του BcR στα B λεμφοκύτταρα. Blood Cancer Research Fund . UC San Diego, Moores Cancer Center. Choi MY, Kipps TJ.

Η PI3K οδηγεί στη δημιουργία της 3,4,5-τριφωσφορικής ινοσιτόλης (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate, PIP₃), μόριο υπεύθυνο για την επιστράτευση της κινάσης AKT στην κυτταρική μεμβράνη και την περαιτέρω ενεργοποίησή της. Το ενεργοποιημένο μονοπάτι της PI3K/AKT προάγει την επιβίωση των B λεμφοκυττάρων επάγοντας την έκφραση διαφόρων αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών, π.χ. MCL-1 (myeloid cell leukemia-1) και XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), και απενεργοποιώντας προαποπτωτικές πρωτεΐνες, π.χ. BAD (Bcl2 antagonist of cell death) και κασπάσες^{93,94}.

Η ενεργοποίηση της PLCγ2 οδηγεί σε απελευθέρωση ενδοκυττάριου Ca²⁺ και ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC). Αρχικά η PLCγ2 διασπά τη φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (Phoshatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP₂) σε διακυλογλυκερόλη (DAG), λιπόφιλο μόριο που παραμένει συνδεδεμένο με τη μεμβράνη, και στην υδατοδιαλυτή τριφωσφορική ινοσιτόλη (inositol 1,4,5-triphosphate, IP₃) που διαχέεται στο κυτταρόπλασμα. Η DAG και τα ιόντα Ca²⁺, που ελευθερώνονται από τη δράση της IP₃ ενεργοποιούν την PKC, η οποία με τη σειρά

της ενεργοποιεί τις κινάσες MAP (mitogen-activated protein kinases), όπως οι ERK (extracellular signal-regulated kinase), JNK (c-JUN NH2-terminal kinase) και p38, καθώς και μεταγραφικούς παράγοντες, μεταξύ άλλων τους NF-κB (nuclear factor-κB) και NF-AT (nuclear factor of activated T cells). Ο βαθμός ενεργοποίησης αυτών των σηματοδοτικών μορίων τελικά καθορίζει τη μοίρα του Β λεμφοκυττάρου⁹².

Η ενεργοποίηση του NF-κB ευνοεί την επιβίωση του Β λεμφοκυττάρου επάγοντας την έκφραση πολλών αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών, π.χ. BCL-2 (B-cell leukemia/lymphoma 2) και BCL-XL^{95,96}. Ο ρόλος των τριών κινάσων MAP είναι πιο περίπλοκος καθώς η ενεργοποίησή τους έχει συσχετιστεί με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη, την διαφοροποίηση, την επιβίωση και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο του Β λεμφοκυττάρου. Το μονοπάτι της p38 ενεργοποιείται κυρίως από stress και κυταροκίνες διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις, ενώ η ενεργοποίησή του οδηγεί στην επαγωγή αντιαποπτωτικών σημάτων. Το μονοπάτι της JNK ενεργοποιείται κυρίως από stress και αυξητικούς παράγοντες συμμετέχοντας στη ρύθμιση της απόπτωσης, την παραγωγή κυταροκινών και τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Στόχοι της p38 και της JNK αποτελούν μεταγραφικοί παράγοντες στον πυρήνα των κυττάρων, π.χ. AP-1 (activator protein 1), AP-2 (activator protein 2) και ELK-1, μέσω των οποίων επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων, την πρωτεϊνσύνθεση και λειτουργίες όπως ο κυτταρικός κύκλος, η απόπτωση και η διαφοροποίηση^{97,98,99}.

Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στα Β λεμφοκύτταρα διαδραματίζει το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAP κινάσων ERK1 και ERK2 που ενεργοποιείται κυρίως από τον BcR. Οι ERK 1 και 2 είναι πρωτεΐνες μοριακού βάρους 44kDa και 42kDa που λειτουργούν ως διμερή και συγκροτούνται από μια καταλυτική περιοχή κινάσης με μια μοναδική ένθετη αλληλουχία. Ενεργοποιούνται με διπλή φωσφορυλίωση στα ρυθμιστικά κατάλοιπα τυροσίνης (Tyr) και θρεονίνης (Thr)^{100,101} που βρίσκονται στην αλληλουχία T-X-Y στον βρόχο ενεργοποίησης¹⁰¹. Η ενεργοποίηση των ERK 1 και 2 είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων αφού προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό φωσφορυλιώνοντας στόχους όπως η πρωτεΐνη c-MYC, η προαποπτωτική πρωτεΐνη BIM και η κυκλίνη D3 που απαιτείται για την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό του προ-B λεμφοκυττάρου¹⁰². Οι ERK 1 και 2 παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο και στην ενδοκυττάρια μεταβίβαση του σήματος

μετά από διέγερση του BcR στα ώριμα B λεμφοκύτταρα. Στους μεταγραφικούς παράγοντες που αποτελούν υποστρώματα των ERKs περιλαμβάνονται οι NF-κB, c-FOS και ELK-1. Η φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση αυτών των μεταγραφικών παραγόντων οδηγεί σε εναλλακτική μεταγραφή γονιδίων και τροποποίηση βασικών λειτουργιών των B λεμφοκυττάρων.

Παρότι τα B λεμφοκύτταρα δέχονται σήματα από τον υποδοχέα BcR σε όλα τα στάδια της διαφοροποίησής τους, το αποτέλεσμα αυτής της διέγερσης ποικίλει και εξαρτάται τόσο από το στάδιο ωρίμανσης που βρίσκεται το B λεμφοκύτταρο όσο και από την ένταση του σήματος. Ο βαθμός ενεργοποίησης των σηματοδοτικών μορίων διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στα φυσιολογικά B λεμφοκύτταρα και τελικά καθορίζει το πεπρωμένο του B λεμφοκυττάρου⁹². Ωστόσο, για μια ολοκληρωμένη άνοση απάντηση είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση όλων των παραπάνω κλάδων της σηματοδότησης^{103,104} και σ' ένα ώριμο B λεμφοκύτταρο μπορεί να οδηγήσει σε διαφοροποίηση, πολλαπλασιασμό, απόπτωση ή ανοσοανοχή (immune tolerance).

1.3.6 Σηματοδότηση B λεμφοκυττάρων μέσω υποδοχέων συμπληρώματος, CD40 και υποδοχέων έμφυτης ανοσίας

Εκτός από τον BcR, τα B λεμφοκύτταρα εκφράζουν επίσης τον υποδοχέα συμπληρώματος **CR2** (complement receptor 2), ο οποίος αναγνωρίζει το C3d κλάσμα του συμπληρώματος, την πρωτεΐνη **CD40** που συνδέεται με τον προσδέτη CD40 (CD40 Ligand, CD40L) στην επιφάνεια των T βοηθητικών λεμφοκυττάρων (CD4+ λεμφοκύτταρα) και **υποδοχείς έμφυτης ανοσίας τύπου Toll** (Toll like receptors, TLRs). Τα B λεμφοκύτταρα δέχονται ερεθίσματα από όλους αυτούς τους υποδοχείς και τροποποιούν κατάλληλα τη λειτουργία τους.

Ο υποδοχέας του συμπληρώματος **CR2**^{105,106} συνδέεται με το C3d και στη συνέχεια σχηματίζει σύμπλοκο με το CD19 και CD81 στην επιφάνεια του B λεμφοκυττάρου που έχει διεγερθεί από αντιγόνο. Το αντιγόνο συνδέεται αφενός με το C3d αφετέρου με την IgM και γεφυρώνει το σύμπλοκο CR2-CD19-CD81 με τον BcR, το οποίο λειτουργεί ως παράγοντας συνδιέγερσης ενεργοποιώντας περαιτέρω τον BcR.

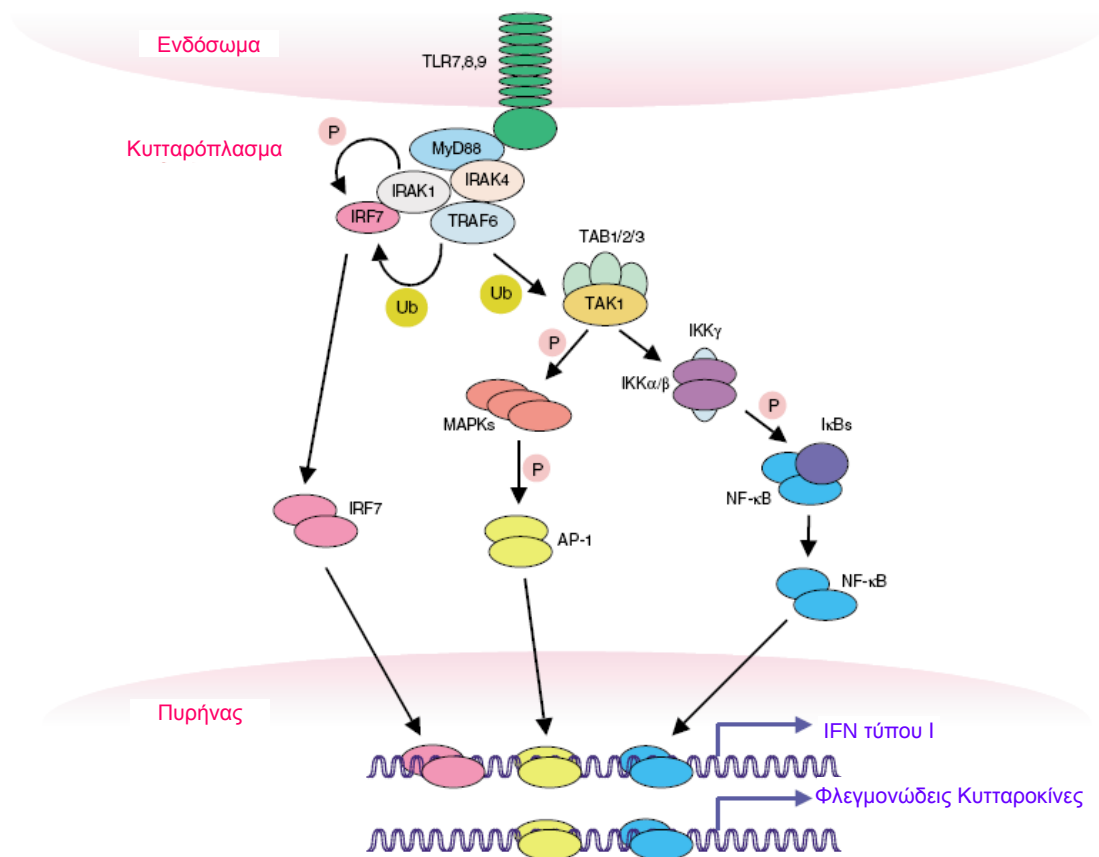
Επιπλέον, σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των Β λεμφοκυττάρων παίζει η πρωτεΐνη **CD40** (μέλος της οικογένειας των TNF υποδοχέων) που συνδέεται με τον προσδέτη CD40L στην επιφάνεια των CD4⁺ Τ λεμφοκυττάρων. Τα Β λεμφοκύτταρα μπορούν έτσι ν' αλληλεπιδρούν και να δέχονται ερεθίσματα από τα CD4⁺ Τ λεμφοκύτταρα. Αρχικά το συνδεδεμένο με τον BcR αντιγόνο μεταφέρεται ενδοκυττάρια όπου αποδομείται σε μικρότερα πεπτίδια τα οποία επανεκφράζονται στην επιφάνεια του Β λεμφοκυττάρου δεσμευμένα με μόρια MHC τάξης II. Όταν το σύμπλοκο πεπτιδίου-MHC τάξης II αναγνωριστεί από τα CD4⁺ Τ λεμφοκύτταρα αυτά αφενός παράγουν IL-4 που εκκρίνεται και διεγείρει άμεσα τα Β λεμφοκύτταρα αφετέρου εκφράζουν στην επιφάνειά τους τον προσδέτη CD40L ο οποίος συνδέεται με το CD40 στην επιφάνεια του Β λεμφοκυττάρου ενεργοποιώντας το περαιτέρω¹⁰⁷.

Τα Β λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται επίσης μέσω των υποδοχέων έμφυτης ανοσίας **TLRs**. Οι TLRs αναγνωρίζουν εξελικτικά διατηρημένα μοριακά μοτίβα κοινών παθογόνων (Pathogen Associated Molecular Patterns, **PAMPs**) μέσω εξελικτικά διατηρημένων υποδοχέων που ονομάζονται υποδοχείς αναγνώρισης μοριακών μοτίβων^{108,109} (Pattern Recognition Receptors, **PRRs**). Στον άνθρωπο μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί 11 TLRs (TLRs1-11). Τα μέλη της οικογένειας ομοδιμερίζονται ή ετεροδιμερίζονται κι αναγνωρίζουν διαφορετικά μοριακά μοτίβα κοινών παθογόνων, προσδίδοντας έτσι κάποια ειδικότητα στην έμφυτη ανοσία.

Η έκφραση των **TLRs** διαφέρει ανάλογα με το στάδιο διαφοροποίησης των Β λεμφοκυττάρων^{110,111,112}. Συγκεκριμένα, ενώ οι TLR1, -2, -4 εμφανίζουν παρόμοια επίπεδα έκφρασης στα παρθένα και στα Β λεμφοκύτταρα μνήμης, οι TLR6, -7, -9 και -10 δεν εκφράζονται καθόλου στα παρθένα Β λεμφοκύτταρα ενώ εκφράζονται σταθερά στα Β λεμφοκύτταρα μνήμης.

Φαίνεται ότι οι TLRs δρουν καθοδικά του Β κυτταρικού υποδοχέα και διαδραματίζουν διαφορετικούς ρόλους στην πρωτογενή απάντηση και την άνοση μνήμη¹¹¹. Η διαφορετική έκφραση ρυθμίζεται από το επίπεδο ενεργοποίησης του Β κυτταρικού υποδοχέα. Μετά την αναγνώριση των παθογόνων από τους TLRs η σηματοδότηση ξεκινά μέσω αλληλεπίδρασης της περιοχής TIR (Toll-IL-1 receptor) των TLRs με την περιοχή TIR κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών που είναι γνωστές ως πρωτεΐνες προσαρμογείς (adapters) με κυριότερο εκπρόσωπο την MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88) και καταλήγει στη φωσφορυλίωση της

TAK1. Με τη σειρά της, η τελευταία φωσφορυλιώνει δύο μέλη της οικογένειας των MAP κινασών, τις MKK3 και MKK6, οι οποίες ενεργοποιούν τις JNK and p38, ενώ μέσω των MEK1 και MEK2, ενεργοποιείται και η ERK¹¹³. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια καταλήγουν στην ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και AP-1 οι οποίοι προάγουν την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως οι TNFα, IL-6, IL-1b και IL-12 και την έκφραση συνδιεγερτικών μορίων (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Σηματοδότηση μέσω των ενδοσωμικών TLR. Cell death and Differentiation. Nature Review. 2006;13:816-825

Επιπλέον, επισημαίνεται ότι εκτός από την άμεση ενεργοποίηση των Β λεμφοκυττάρων μέσω των υποδοχέων TLRs που εκφράζουν, τα Β λεμφοκύτταρα μπορεί να διεγερθούν και έμμεσα, μέσω κυτταροκινών που απελευθερώνονται από τα δενδριτικά κύτταρα που έχουν ενεργοποιηθεί από τους TLRs.

Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η ενεργοποίηση των TLR αποτελεί το **τρίτο σήμα** για την ενεργοποίηση των ανώριμων Β λεμφοκυττάρων, σε συνδυασμό με την

ειδική πρόσδεση του αντιγόνου στον υποδοχέα (**πρώτο σήμα**) και την αλληλεπίδραση με τα βοηθητικά CD4+ T λεμφοκύτταρα (**δεύτερο σήμα**).

Το τρίτο σήμα φαίνεται ότι αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση τόσο για την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των B λεμφοκυττάρων όσο και για την παραγωγή των αντισωμάτων. Επιπλέον, είναι ένα επιπρόσθετο σημείο ελέγχου κατά της αυτοανοσίας¹¹⁴. Η παρατήρηση αυτή, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η ενεργοποίηση των ανώριμων T λεμφοκυττάρων και η διαφοροποίησή τους προϋποθέτει αλληλεπίδραση με κυτταροκίνες που παράγονται από δενδριτικά κύτταρα διεγερμένα από υποδοχείς έμφυτης ανοσίας, ενισχύει την άποψη ότι οι υποδοχείς της έμφυτης ανοσίας ελέγχουν ως ένα βαθμό και την επίκτητη ανοσία. Ωστόσο, άλλες μελέτες έδειξαν ότι η σηματοδότηση μέσω υποδοχέων έμφυτης ανοσίας ενώ ενισχύει την απάντηση των B λεμφοκυττάρων δεν είναι απαραίτητη για την ειδική άνοση απάντηση^{115,116}.

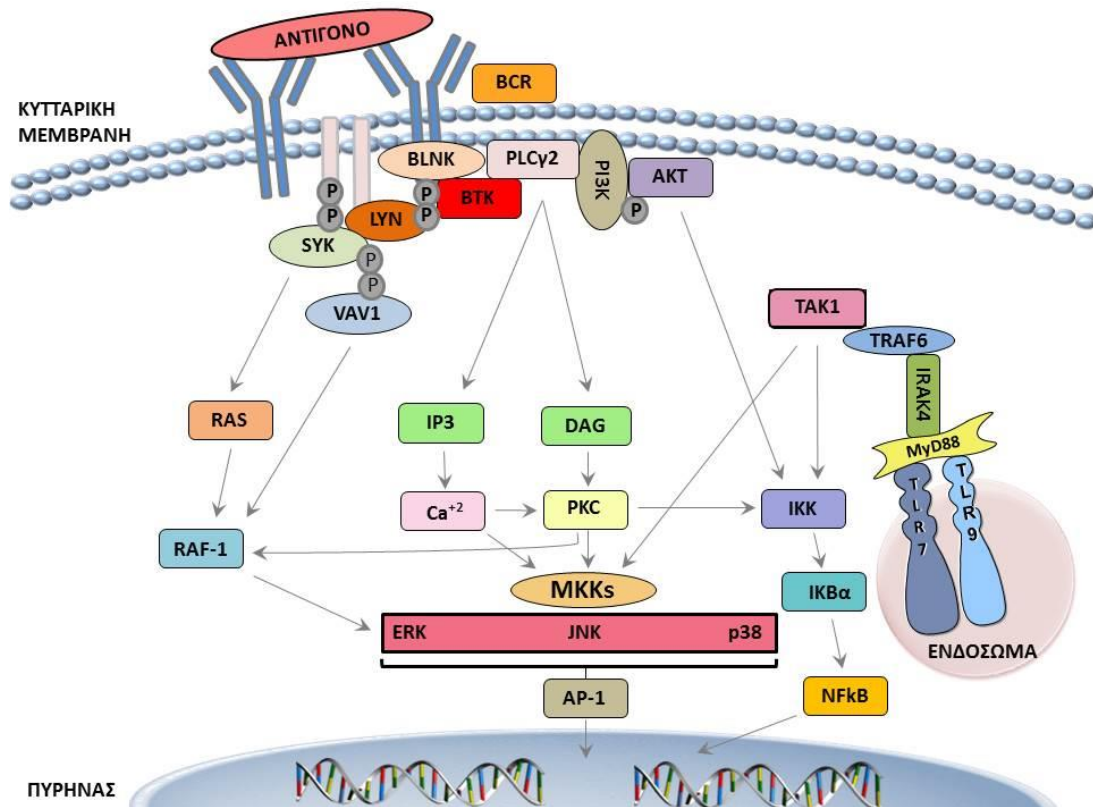
1.3.7 Σύγχρονη διέγερση BcR/TLR

Η συνεργασία μεταξύ προσαρμοστικής και έμφυτης ανοσίας μέσω των υποδοχέων BcR και TLR αποτελεί ιδιότητα όχι μόνο των φυσιολογικών αλλά και των αυτοαντιδραστικών κυττάρων¹¹⁷. Στα φυσιολογικά κύτταρα το λειτουργικό αποτέλεσμα εξαρτάται από το αναπτυξιακό στάδιο και διαφοροποιείται μεταξύ των διαφορετικών τύπων κυττάρων¹¹⁸.

Δύο ανεξάρτητες μελέτες έδειξαν ότι η ταυτόχρονη σηματοδότηση μέσω BcR/TLR μπορεί να επάγει αυτοανοσία. Συγκεκριμένα, στις μελέτες αυτές βρέθηκε ότι σύμπλοκα αντιγόνου-DNA και αντιγόνου-RNA μπορεί να οδηγήσουν στην παραγωγή αυτοαντισωμάτων ενεργοποιώντας το B λεμφοκύτταρο μέσω του αυτοαντιδραστικού BcR και του TLR9 ή TLR7, αντιστοίχως^{119,120,121}. Πρόσφατα δεδομένα τεκμηριώνουν τα παραπάνω συμπεράσματα αφού η διέγερση μέσω BcR μπορεί να εμποδίσει ή και να αντιστρέψει την επαγόμενη από τον TLR7 ανοχή¹²¹. Από την άλλη πλευρά, η διέγερση του TLR9 με CpG ολιγονουκλεοτίδια δρα συνεργικά με τον BcR ενεργοποιώντας το ενδοκυττάριο μονοπάτι των MAP κινασών και αυξάνοντας έτσι τη φωσφορυλίωση πολλών πρωτεϊνών¹²².

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της ενεργοποίησης των υποδοχέων έμφυτης

ανοσίας στα Β λεμφοκύτταρα ποικίλουν και εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, όπως η φύση του αντιγόνου, η διάρκεια και η θέση της αλληλεπίδρασης (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση της ενδοκυττάριας μεταβίβασης του σήματος με σύγχρονη διέγερση του BcR και των TLR7 ή TLR 9 στα Β λεμφοκύτταρα.

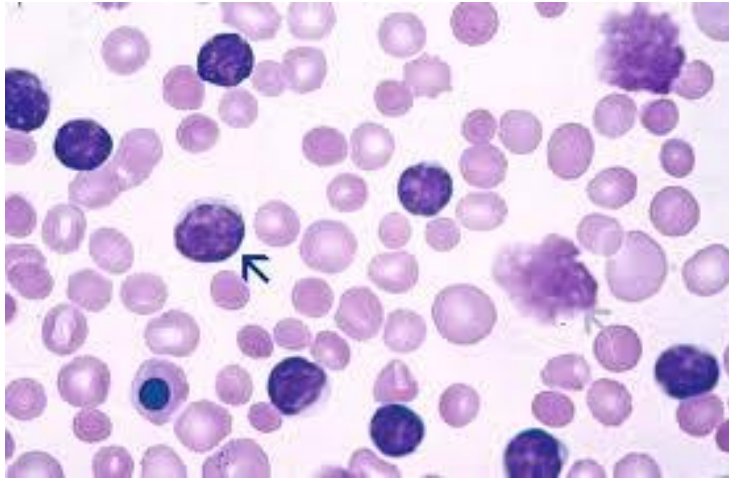
1.4 Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία

1.4.1 Γενικά

Η ΧΛΛ είναι η πιο συχνή λευχαιμία στο Δυτικό κόσμο. Προσβάλλει συχνότερα άντρες παρά γυναίκες (Α/Γ=2/1) και η μέση ηλικία διάγνωσης είναι τα 65 έτη (εύρος 60-80 έτη)¹²³. Επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι η νόσος είναι πιο συχνή στους Καυκάσιους ενώ εμφανίζεται σπάνια στην Ινδία, την Κίνα και την Ιαπωνία¹²⁴. Παρατηρείται γενετική προδιάθεση με το 10% των ασθενών να έχουν έναν τουλάχιστον συγγενή πρώτου ή δευτέρου βαθμού με ΧΛΛ^{125,126}. Χαρακτηριστικό της οικογενούς μορφής της ΧΛΛ είναι η εκδήλωσή της σε νεότερη ηλικία στην επόμενη γενιά, με πιο βαριά κλινική εικόνα¹²⁷.

Η ΧΛΛ χαρακτηρίζεται από *in vivo* συσσώρευση CD5+ μονοκλωνικών Β λεμφοκυττάρων στο αίμα, το μυελό των οστών, τους λεμφικούς ιστούς και το σπλήνα. Η έναρξη της νόσου είναι αθόρυβη και, σε πολλές περιπτώσεις, η διάγνωσή της τεκμηριώνεται μετά από γενική εξέταση αίματος ρουτίνας, που αναδεικνύει λεμφοκυττάρωση με πάνω από $5 \times 10^9/L$ λεμφοκύτταρα.

Το επίχρισμα του περιφερικού αίματος των ασθενών με ΧΛΛ αναδεικνύει την παρουσία μικρών ώριμων λεμφοκυττάρων με φυσιολογική συνήθως μορφολογία (λίγο κυτταρόπλασμα και στρογγυλός πυρήνας). Η σχέση πυρήνα/κυτταροπλάσματος είναι υψηλή, η χρωματίνη του πυρήνα συμπαγής, δεν υπάρχουν πυρήνια, ενώ το κυτταρόπλασμα είναι ομοιογενές, ελαφρά βασεόφιλο και δεν περιέχει κοκκία (Εικόνα 10). Τα λευχαιμικά λεμφοκύτταρα είναι ιδιαίτερα εύθραυστα *in vitro* με αποτέλεσμα να παρατηρείται ένας σχετικά μεγάλος αριθμός θραυσμένων κυττάρων στα επιχρίσματα αίματος, που αναφέρονται ως πυρηνικές σκιές (Gumprecht shadows) (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Επίχρισμα αίματος ασθενούς με ΧΛΛ. Διακρίνονται μικρά λεμφοκύτταρα με στρογγυλό πυρήνα, πυκνή χρωματίνη και λιγοστό κυτταρόπλασμα (μπλε βέλος) και πυρηνικές σκιές (γκρι βέλος).

Τα νεοπλασματικά κύτταρα εκφράζουν CD19, CD5 και CD23, ενώ σε σύγκριση με τα φυσιολογικά Β λεμφοκύτταρα έχουν χαμηλά επίπεδα της επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης (surface immunoglobulin, sIg), CD20 και CD79b^{128,129,130}. Εκφράζουν σταθερά CD27, δείκτη χαρακτηριστικό για τα κύτταρα μνήμης. Ο ανοσοφαινότυπος των κυττάρων της ΧΛΛ είναι συμβατός με ανοσοφαινότυπο ενεργοποιημένων Β λεμφοκυττάρων με εμπειρία αντιγόνου. Στη κλινική πρακτική, ο ανοσοφαινότυπος χρησιμοποιείται πρωταρχικά για τη διάγνωση της ΧΛΛ¹³¹.

Παρά τον ομοιογενή φαινότυπο, η κλινική πορεία των ασθενών με ΧΛΛ ποικίλει καθώς ορισμένοι ασθενείς επιβιώνουν για πολλά χρόνια χωρίς θεραπεία ενώ άλλοι παρουσιάζουν επιθετική νόσο χωρίς ανταπόκριση σε οποιαδήποτε θεραπεία¹³². Η μεγάλη κλινική ετερογένεια οδήγησε στην αναζήτηση προγνωστικών δεικτών με στόχο την έγκαιρη και πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση. Αρχικά αναπτύχθηκαν δύο κύρια κλινικά συστήματα σταδιοποίησης, κατά Rai και Binet^{133,134}. Και τα δύο συστήματα βασίζονται στην ύπαρξη ή μη λεμφοκυττάρωσης, αναιμίας, θρομβοπενίας, λεμφαδενοπάθειας, ηπατομεγαλίας ή σπληνομεγαλίας. Αυτά τα συστήματα κλινικής σταδιοποίησης συμβάλλουν σημαντικά στην έγκαιρη διάγνωση και αντιμετώπιση ασθενών με προχωρημένη νόσο αλλά δε μπορούν να προβλέψουν την πορεία των ασθενών που διαγιγνώσκονται σε αρχικά στάδια της νόσου. Για το σκοπό αυτό αναζητήθηκαν στη συνέχεια επιπρόσθετοι δείκτες με προγνωστική σημασία, όπως ο χρόνος διπλασιασμού του αριθμού των

λεμφοκυττάρων στα αίμα, τα επίπεδα της β2 μικροσφαιρίνης και του διαλυτού CD23 στον ορό, τα επίπεδα της κινάσης της θυμιδίνης στον ορό, τα ιστολογικά ευρήματα από την εξέταση της οστεομυελικής βιοψίας, ειδικοί ανοσοφαινοτυπικοί δείκτες, κυτταρογενετικοί δείκτες και τα ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά του BcR. Τα τελευταία χρόνια αξιολογούνται επιπλέον σε επίπεδο κλινικών μελετών, τα δεδομένα από μελέτες γονιδιακής έκφρασης, έκφρασης των microRNAs και μεθυλίωσης του DNA του νεοπλασματικού κλώνου.

Οι σχετικές μελέτες έδειξαν ότι η κλινική ετερογένεια της νόσου είναι συνυφασμένη με ετερογένεια σε γενετικό, βιολογικό και ανοσοφαινοτυπικό επίπεδο και συνέβαλαν σημαντικά στην καλύτερη κατανόηση της παθογένειας της νόσου¹³². Πολλοί από τους βιολογικούς δείκτες χρησιμοποιούνται σήμερα ευρέως στην κλινική πρακτική για την κατάταξη των ασθενών σε ομάδες με καλή ή κακή πρόγνωση και συμβάλλουν καθοριστικά στην επιλογή του κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος σε κάθε περίπτωση^{135,136,137}. Οι πιο διαδεδομένοι δείκτες στην κλινική πρακτική είναι: (i) ανοσοφαινοτυπικοί, (ii) κυτταρογενετικοί και (iii) τα ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά του BcR^{132,138,139}.

Από τους **ανοσοφαινοτυπικούς δείκτες**, σημαντικό ρόλο στην πρόγνωση της ΧΛΛ παίζει η έκφραση του CD38 και της ZAP-70 (zeta-associated protein of 70 kDa). Ο δείκτης CD38 είναι διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου II που εκφράζεται φυσιολογικά κατά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Μολονότι η αυξημένη έκφραση του CD38 αποτελεί αρνητικό προγνωστικό παράγοντα στη ΧΛΛ, υπάρχουν πολλές διαφωνίες σχετικά με το ποιο πρέπει να είναι το όριο θετικότητας του CD38 με προγνωστική αξία. Επιπλέον, ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση του CD38 μπορεί να μεταβάλλεται με την πάροδο του χρόνου^{140,141}.

Η ZAP-70 εκφράζεται φυσιολογικά στα T λεμφοκύτταρα διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην έναρξη της σηματοδότησης μέσω του T κυτταρικού υποδοχέα (T cell receptor, TCR). Είναι ομόλογη της κινάσης SYK (spleen tyrosine kinase) που ελέγχει τη μεταβίβαση του σήματος μέσω του υποδοχέα BcR στα B λεμφοκύτταρα. Η έκφραση της στα B λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ αρχικά θεωρήθηκε αποτέλεσμα της κακοήθους εξαλλαγής, με δεδομένο ότι δεν είχε ανιχνευθεί σε φυσιολογικά B λεμφοκύτταρα. Νεότερες μελέτες ωστόσο ανέτρεψαν τις προηγούμενες απόψεις και έδειξαν ότι η ZAP-70 εκφράζεται και στα ενεργοποιημένα φυσιολογικά B

λεμφοκύτταρα^{142,143,144,145}. Η έκφρασή της ZAP-70 στη ΧΛΛ έχει συσχετιστεί με δυσμενή πρόγνωση. Σχετικές μελέτες έχουν δείξει ότι η ZAP-70 προκαλεί αυξημένη μεταβίβαση του σήματος μέσω του BcR στα κύτταρα της ΧΛΛ, γεγονός που πιθανόν εξηγεί την αυξημένη επιθετικότητα της νόσου σε αυτές τις περιπτώσεις ΧΛΛ^{146,147,148,149,138,150,43}.

Από τους **κυτταρογενετικούς δείκτες** αξιολογούνται ιδιαίτερα σε κλινικό επίπεδο η τρισωμία του χρωμοσώματος 12, καθώς και οι ελλείψεις στις χρωμοσωμικές ζώνες 11q22-q23, 13q14.3 και 17p13.1. Επισημαίνεται ότι χρωμοσωμικές ανωμαλίες στα κλωνικά κύτταρα της ΧΛΛ ανιχνεύονται σε ποσοστό 30-50% με μεθόδους κλασσικής κυτταρογενετικής και έως περίπου 80% με τη μέθοδο του φθορίζοντος υβριδισμού *in situ* (fluorescent *in situ* hybridization, FISH)¹⁴⁷. Η συχνότητα χρωμοσωμικών ανωμαλιών αυξάνει με την πρόοδο της νόσου. Δεν υπάρχει κάποια συγκεκριμένη κυτταρογενετική βλάβη που να θεωρείται ειδική για τη ΧΛΛ. Συχνότερη είναι η έλλειψη στο χρωμόσωμα 13q14 που παρατηρείται σε >50% των ασθενών με ΧΛΛ και περιλαμβάνει το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (RB1), γονίδιο ελεγκτή του κυτταρικού κύκλου και τα micro-RNAs *miR-15a* και *miR-16*. Προδιαγράφει καλή πρόγνωση και σχετίζεται με το μεταλλαγμένο τύπο ΧΛΛ. Άλλες χρωμοσωμικές βλάβες με προγνωστική αξία είναι η τρισωμία του χρωμοσώματος 12 που έχει συσχετιστεί μ' ενδιάμεση ή δυσμενή πρόγνωση και οι ελλείψεις στις χρωμοσωμικές ζώνες 11q22-q23, όπου εντοπίζονται τα γονίδια RDX (radixin) και ATM (ataxia telangiectasia mutated) και, ιδίως, στο 17p13.1 όπου εντοπίζεται το ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53 που καθορίζουν μια ομάδα ασθενών με επιθετική πορεία της νόσου και μικρή επιβίωση. Εξίσου δυσμενής είναι η πρόγνωση για ασθενείς με μεταλλάξεις του γονιδίου TP53 χωρίς δομική ανωμαλία του χρωμοσώματος 17p^{149,148}.

Η ανάλυση των μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV των ανοσοσφαιρινών αποκάλυψε δύο ομάδες ασθενών, με ή χωρίς σωματικές μεταλλάξεις, που παρουσιάζουν διαφορετική κλινική πορεία και πρόγνωση. Τα γονίδια IGHV με διαφορές >2% από το αντίστοιχο μη αναδιαταγμένο γονίδιο IGHV θεωρούνται μεταλλαγμένα ενώ τα γονίδια IGHV με διαφορές ≤2% σε σχέση με το αντίστοιχο μη αναδιαταγμένο γονίδιο θεωρούνται ως αμετάλλακτα^{140,151}. Το όριο του 2% αρχικά επιλέχθηκε ώστε ν' αποφευχθεί το ενδεχόμενο κάποιες από τις διαφορές ν' αντιστοιχούν σε

άγνωστους πολυμορφισμούς του γενετικού τύπου IGH. Οι ασθενείς στους οποίους τα γονίδια IGHV των νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων είναι μεταλλαγμένα (μεταλλαγμένα ΧΛΛ, Μ-ΧΛΛ) έχουν πιο ήπια εξέλιξη και μεγαλύτερη ολική επιβίωση, ενώ οι ασθενείς που φέρουν αμετάλλακτα γονίδια IGHV (αμετάλλακτη ΧΛΛ, Α-ΧΛΛ) έχουν πιο δυσμενή εξέλιξη^{140,151}.

Εκτός από το διαφορετικό φορτίο μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV, οι BcR των ασθενών με ΧΛΛ χαρακτηρίζονται από επιλεκτική χρησιμοποίηση συνδυασμών συγκεκριμένων γονιδίων IGHV και IGK/IGL με μοναδικά, κοινά μοτίβα VH CDR3 και CDR3 ελαφριών αλυσίδων που οδηγεί στην ύπαρξη υποσυνόλων ασθενών με σχεδόν ταυτόσημους ή πολύ όμοιους Β κυτταρικούς υποδοχείς^{152,153,154,155}. Αυτό είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον καθώς η πιθανότητα δύο διαφορετικά Β λεμφοκύτταρα να εκφράζουν κατά τύχη σχεδόν ταυτόσημους υποδοχείς είναι μηδαμινή (10^{-12})¹⁵⁶. Το φαινόμενο αυτό περιγράφεται με τον όρο **στερεοτυπία** του BcR.

Η στερεοτυπία παρατηρείται στο 30% περίπου των ασθενών με ΧΛΛ^{157,158}. Η έκφραση στερεότυπων BcR είναι πολύ συχνότερη σε ασθενείς με αμετάλλακτα γονίδια (>40%) σε σύγκριση προς τους ασθενείς με μεταλλαγμένα γονίδια IGHV (~15%)^{154,155}. Οι ασθενείς με ΧΛΛ που ανήκουν σε στερεότυπα υποσύνολα φαίνεται ότι μοιράζονται κοινά κλινικά χαρακτηριστικά και συγκεκριμένα στερεότυπα υποσύνολα σχετίζονται με ιδιαίτερη πρόγνωση^{155,159}. Χαρακτηριστικά, οι ασθενείς που ανήκουν στο στερεότυπο υποσύνολο #2 (IGHV3-21/IGLV3-21) παρουσιάζουν κακή κλινική πορεία παρότι συχνά φέρουν μεταλλαγμένες αλληλουχίες IGHV¹⁶⁰. Επίσης, οι ασθενείς του στερεότυπου #8 έχουν ιδιαίτερα επιθετική πορεία και αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης συνδρόμου Richter¹⁶¹. Η στερεοτυπία σε επίπεδο Β κυτταρικού υποδοχέα αποτελεί ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της ΧΛΛ και μπορεί να θεωρηθεί ως ισχυρότατη ένδειξη για την αναγνώριση κοινού επιτόπου από τα κύτταρα της ΧΛΛ.

Από τους νεότερους δείκτες, σημαντικές πληροφορίες για τη παθογένεια της νόσου προσέφεραν μελέτες που αφορούν στο **πρότυπο γονιδιακής έκφρασης** του νεοπλασματικού κλώνου, την έκφραση των **microRNAs** αλλά και το βαθμό **μεθυλίωσης του DNA**. Συγκεκριμένα, μελέτες **γονιδιακής έκφρασης** έδειξαν ότι όλοι οι ασθενείς με ΧΛΛ εμφανίζουν γενικά κοινό πρότυπο γονιδιακής έκφρασης, παρόμοιο με το αντίστοιχο των Β λεμφοκυττάρων μνήμης^{162,163}. Οι ίδιες μελέτες

έδειξαν ότι τα διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια εμπλέκονται κυρίως στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Περαιτέρω έρευνες σε επιλεγμένο αριθμό γονιδίων ανέφεραν διακριτά πρότυπα έκφρασης σε υποομάδες ΧΛΛ που καθορίζονται με βάση τα ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά του BcR. Για παράδειγμα, περιπτώσεις ΧΛΛ με μεταλλαγμένους υποδοχείς που χρησιμοποιούν το γονίδιο IGHV4-34 αλλά ανήκουν σε διαφορετικά στερεότυπα υποσύνολα (υποσύνολα #4 και #16) βρέθηκαν να εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα γονιδιακής έκφρασης¹⁶⁴. Τα διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια μεταξύ των δύο υποσυνόλων εμπλέκονταν κυρίως σε διεργασίες όπως ο κυτταρικός κύκλος, ο πολλαπλασιασμός και η άνοση απάντηση και είχαν μειωμένη έκφραση στο στερεότυπο υποσύνολο #4, γεγονός που συνάδει με τη χαμηλή ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων του συγκεκριμένου στερεότυπου υποσυνόλου¹⁶⁴. Στο ίδιο πλαίσιο, διαφορετικά πρότυπα έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι των TLRs έχουν καταγραφεί μεταξύ ασθενών που ανήκουν σε διακριτά στερεότυπα υποσύνολα ανεξάρτητα από το φορτίο των μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV¹⁶⁵.

Το πρότυπο έκφρασης των miRNAs στα κύτταρα της ΧΛΛ είναι διαφορετικό από το αντίστοιχο των φυσιολογικών Β-λεμφοκυττάρων⁴², ενώ η έκφραση συγκεκριμένων miRNAs συσχετίστηκε με προγνωστικούς δείκτες και την πρόοδο της νόσου⁴³. Σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της ΧΛΛ φαίνεται ότι παίζουν τα miR-15a/16-1 που λειτουργούν ως ογκοκατασταλτικά γονίδια στοχεύοντας το αντιαποπτωτικό γονίδιο BCL-2⁴³. Επίσης, τα miR-29a, miR-29b, miR-181a και miR-181b στοχεύουν απευθείας το ογκογονίδιο TCL1 που ενεργοποιεί την AKT και ρυθμίζει διάφορα μονοπάτια (π.χ. τα μονοπάτια των NF-κΒ και κυκλίνης D1) που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τον κυτταρικό θάνατο¹⁶⁶. Επιπλέον, η έκφραση του miR-34a ρυθμίζεται θετικά από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53 που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17p. Ασθενείς με μεταλλάξεις στο TP53 ή έλλειψη 17p, παρουσιάζουν χαμηλή έκφραση του miR-34a και ανθεκτικότητα στη θεραπεία με φλουνταραμπίνη, βασικό φάρμακο για τη θεραπεία της ΧΛΛ^{167,168,169}.

Τέλος, μελέτες **μεθυλίωσης του DNA** αποκάλυψαν μαζική απώλεια της μεθυλίωσης στα νεοπλασματικά λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ σε σύγκριση με τα φυσιολογικά Β λεμφοκύτταρα που αφορούσε κυρίως σε μεγάλες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (δορυφορικό DNA, κεντρομεριδιακές επαναλήψεις, rDNA)^{170,171}. Επίσης, έδειξαν

υπομεθυλίωση σε σημαντικά γονίδια, η οποία συσχετίστηκε με αυξημένη έκφρασή τους. Συγκεκριμένα, η υπομεθυλίωση αφορούσε στο ογκογονίδιο MYC, το αντιαποπτωτικό γονίδιο BCL-2, το γονίδιο ανάπτυξης πολλαπλής αντοχής σε φάρμακα (multiple drug resistance gene, MDR1) αλλά και το γονίδιο της πρωτεΐνης 1A της Τ-λευχαιμίας/λεμφώματος (T-cell leukemia/lymphoma protein 1A, TCL1A), το οποίο κωδικοποιεί έναν ενεργοποιητή του NF-κΒ^{170,171}. Άλλες μελέτες ανέφεραν υπερμεθυλίωση νησιδίων CpG σε υποκινητές διαφόρων γονιδίων που είχε ως αποτέλεσμα την αποσιώπηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, π.χ. γονιδίων που εμπλέκονται στην απόπτωση (DAPK1, WIF1, ID4, και SFRPs), ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου [CDKN2A (p16INK4) και CDKN2B (p15INK4)] και το γονίδιο επιδιόρθωσης MLH1 του οποίου η αποσιώπηση σχετίζεται με την εξέλιξη της ΧΛΛ σε σύνδρομο Richter¹⁷².

1.4.2 Ανοσοπαθγένεση της ΧΛΛ

Σήμερα, η επικρατούσα άποψη σχετικά με την παθογένεια της ΧΛΛ είναι ότι προέρχεται από νεοπλασματική εκτροπή διαφοροποιημένων Β λεμφοκυττάρων με εμπειρία αντιγόνου^{173,174}. Τα κύτταρα της ΧΛΛ λαμβάνουν συνεχώς σήματα από το μικροπεριβάλλον κυρίως μέσω του BcR αλλά και μέσω άλλων υποδοχέων, π.χ. υποδοχέων έμφυτης ανοσίας (π.χ. TLRs), CD40, υποδοχέων κυτταροκινών και συμπληρώματος. Η αλληλεπίδραση αυτή φαίνεται να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου⁴⁹.

1.4.2.1 Ο ρόλος του BcR στη ΧΛΛ

Κεντρικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των κυττάρων της ΧΛΛ με το μικροπεριβάλλον παίζει ο BcR⁴⁹. Τα μοριακά δεδομένα που υποστηρίζουν αυτή την άποψη είναι τα εξής: i) επιλεκτικότητα του ρεπερτορίου των γονιδίων IGHV στη ΧΛΛ^{175,154,155,157,176,177,178} ii) διαφορετική πορεία των ασθενών που φέρουν γονίδια IGHV με διαφορετικό φορτίο μεταλλάξεων (Μ-ΧΛΛ έναντι Α-ΧΛΛ)^{140,151} iii) ύπαρξη υποσυνόλων ασθενών με σχεδόν πανομοιότυπους “στερεότυπους” BcR^{154,155,176,178} iv) διαφορεικό status σηματοδότησης μέσω του BcR^{179,180} και (iv) κλινική αποτελεσματικότητα των αναστολέων της σηματοδότησης μέσω BcR^{181,182}.

Το ρεπερτόριο των γονιδίων IGHV στη ΧΛΛ διαφέρει πολύ από το αντίστοιχο ρεπερτόριο των φυσιολογικών CD5⁺ Β λεμφοκυττάρων του αίματος. Συγκεκριμένα, στη ΧΛΛ παρατηρείται επιλεκτική χρησιμοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων IGHV και διαπιστώνονται επιλεκτικοί συνδυασμοί γονιδίων IGHV, IGHD και IGHJ. Στη ΧΛΛ χρησιμοποιούνται κυρίως γονίδια των υποομάδων IGHV1, IGHV3 και IGHV4. Συχνότερα γονίδια είναι τα IGHV1-69, IGHV3-7, IGHV3-23 και IGHV4-34, μολονότι η σχετική συχνότητά τους ποικίλει στις διάφορες μελέτες^{175,154,155}. Η επιλεκτικότητα ως προς την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων IGHV υποδεικνύει ότι στην παθογένεια της νόσου εμπλέκεται περιορισμένος αριθμός αντιγόνων που ενεργοποιεί λεμφοκύτταρα τα οποία εκφράζουν τους συγκεκριμένους υποδοχείς.

Η προγνωστική αξία του φορτίου μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV^{140,151} στα νεοπλασματικά λεμφοκύτταρα καθώς και η παρουσία υποσυνόλων ασθενών με «στερεότυπους» BcR μπορεί να θεωρηθεί ως ισχυρότατη ένδειξη για την αναγνώριση κοινού επιτόπου και στηρίζει την υπόθεση ότι η ανάπτυξη της ΧΛΛ ίσως αφορά σε κλώνους Β λεμφοκυττάρων με καθορισμένη δομή του BcR. Επίσης υποδηλώνει ότι οι λευχαιμικοί κλώνοι με «στερεότυπους» BcR πιθανόν προέρχονται από έναν πληθυσμό Β λεμφοκυττάρων τα οποία χαρακτηρίζονται από εγγενώς περιορισμένη ετερογένεια^{183,152,153,154,155,158,157}.

Τα κύτταρα της ΧΛΛ παρουσιάζουν ετερογένεια ως προς την ικανότητα μετάδοσης του σήματος μέσω του BcR. Η σηματοδότηση μέσω του BcR είναι φυσιολογική τουλάχιστον όσον αφορά στην ενεργοποίηση των αρχικών μορίων καθοδικά του BcR, όπως η SYK, η PLCγ2, και την απελευθέρωση ενδοκυττάρου Ca²⁺ (μισές περίπου περιπτώσεις ΧΛΛ)^{184,185,186}. Οι περιπτώσεις ΧΛΛ που συνήθως απαντούν στη διέγερση του BcR φέρουν αμετάλλακτες αλληλουχίες IGHV και εκφράζουν ZAP-70 και/ή CD38^{187,188}, ενώ οι περιπτώσεις που φέρουν μεταλλαγμένες αλληλουχίες IGHV και δεν εκφράζουν ZAP70 και/ή CD38 δεν απαντούν συνήθως στη διέγερση μέσω της επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης^{179,187}. Η πρωτεΐνη ZAP-70 εμπλέκεται άμεσα σε αυτή τη διαδικασία, αφού μετά την ενεργοποίηση του BcR επιστρατεύεται στο σύμπλοκο του υποδοχέα και επάγει την ενεργοποίηση άλλων μορίων της σηματοδοτικής οδού. Το γεγονός αυτό προάγει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των Β κυττάρων και ίσως σχετίζεται με την επιθετική πορεία της νόσου στη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών¹⁴³. Αντίθετα, στους ασθενείς που φέρουν

μεταλλαγμένα γονίδια IGHV και/ή δεν εκφράζουν ZAP-70 ή CD38 η μεταβίβαση σήματος μέσω της ανοσοσφαιρίνης IgM *in vitro* είναι αδύνατη. Ωστόσο, 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)¹⁷⁹. Επιπλέον, σε αυτές τις περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί έκφραση του CD38¹⁸⁸.

Τέλος, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα κλωνογενή κύτταρα της ΧΛΛ παρουσιάζουν ευαισθησία σε αναστολείς που στοχεύουν συγκεκριμένες κινάσες του σηματοδοτικού καταρράκτη ο οποίος πυροδοτείται μέσω του Β κυτταρικού υποδοχέα όπως οι LYN, SYK, PI3K, και BTK^{189,181,182}. Οι αναστολείς αυτοί (π.χ. idelalisib, ibrutinib) έχουν αποδώσει εντυπωσιακά θεραπευτικά αποτελέσματα σε ασθενείς με επιθετική κλινική πορεία που παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στα συμβατικά θεραπευτικά πρωτόκολλα¹⁸¹.

1.4.2.2 Ο ρόλος του αντιγόνου στη ΧΛΛ

Τα ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά του BcR των νεοπλασματικών Β λεμφοκυττάρων της ΧΛΛ που υποδεικνύουν σημαντικό ρόλο του αντιγόνου στην παθογένεια της ΧΛΛ υποκίνησαν περαιτέρω *in vitro* μελέτες με στόχο την ανακάλυψη συγκεκριμένων αντιγόνων που πιθανότατα εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου.

Μελέτες από τα τέλη της δεκαετίας του 1980 έδειξαν ότι τα κλωνοειδικά μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs) ασθενών με ΧΛΛ είναι πολυαντιδραστικά και αναγνωρίζουν το Fc κλάσμα της IgG, μονόκλωνο DNA (ssDNA), δίκλωνο DNA (dsDNA), ιστόνες, ή συστατικά του κυτταροσκελετού^{190,191}. Μετέπειτα μελέτες έδειξαν ότι τα κύτταρα της ΧΛΛ αλληλεπιδρούν με νεοαντιγόνα, δηλαδή μόρια που γίνονται ανοσογόνα μετά από χημικές τροποποιήσεις (π.χ. οξείδωση) ή εμφανίζονται στην επιφάνεια των κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβη, καθώς και ξένα παθογόνα, π.χ. συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων^{192,193}. Ειδικότερα, το 80% περίπου των ανασυνδυασμένων κλωνοειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων από αμετάλλακτες ΧΛΛ και το 15% των μεταλλαγμένων ΧΛΛ φάνηκε ότι αλληλεπιδρούν πολυαντιδραστικά *in vitro* με σειρά αυτοαντιγόνων και ξένων

αντιγόνων. Επιπλέον, τα μονοκλωνικά αντισώματα των αμετάλλακτων ΧΛΛ αλληλεπιδρούν με μεγαλύτερο εύρος παθογόνων¹⁹⁴. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ανασυνδυασμένα μονοκλωνικά αντισώματα που προέρχονταν από μεταλλαγμένες περιπτώσεις ΧΛΛ απέκτησαν πολυαντιδραστικότητα όταν απομακρύνθηκαν οι μεταλλάξεις¹⁹².

Συμπερασματικά, η επικρατούσα άποψη είναι ότι τα κύτταρα της ΧΛΛ πιθανότατα προέρχονται από έναν πληθυσμό αυτο-/πολυ-αντιδραστικών λεμφοκυττάρων τα οποία είτε διατηρούν (αμετάλλακτη ΧΛΛ) είτε χάνουν (μεταλλαγμένη ΧΛΛ) την πολυαντιδραστικότητά τους εξαιτίας της ΣΥΜ. Η παρατεταμένη αλληλεπίδραση πολυαντιδραστικών Β λεμφοκυττάρων με ιούς, κοινά βακτήρια ή αυτοαντιγόνα θα μπορούσε να οδηγήσει σε χρόνια διέγερση με αποτέλεσμα αυξημένο ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού και άρα αυξημένη πιθανότητα δημιουργίας επικίνδυνων μεταλλάξεων στο DNA που μπορεί να οδηγήσει τελικά στη λευχαιμογένεση.

1.4.2.3 Σηματοδότηση μέσω του BcR στη ΧΛΛ

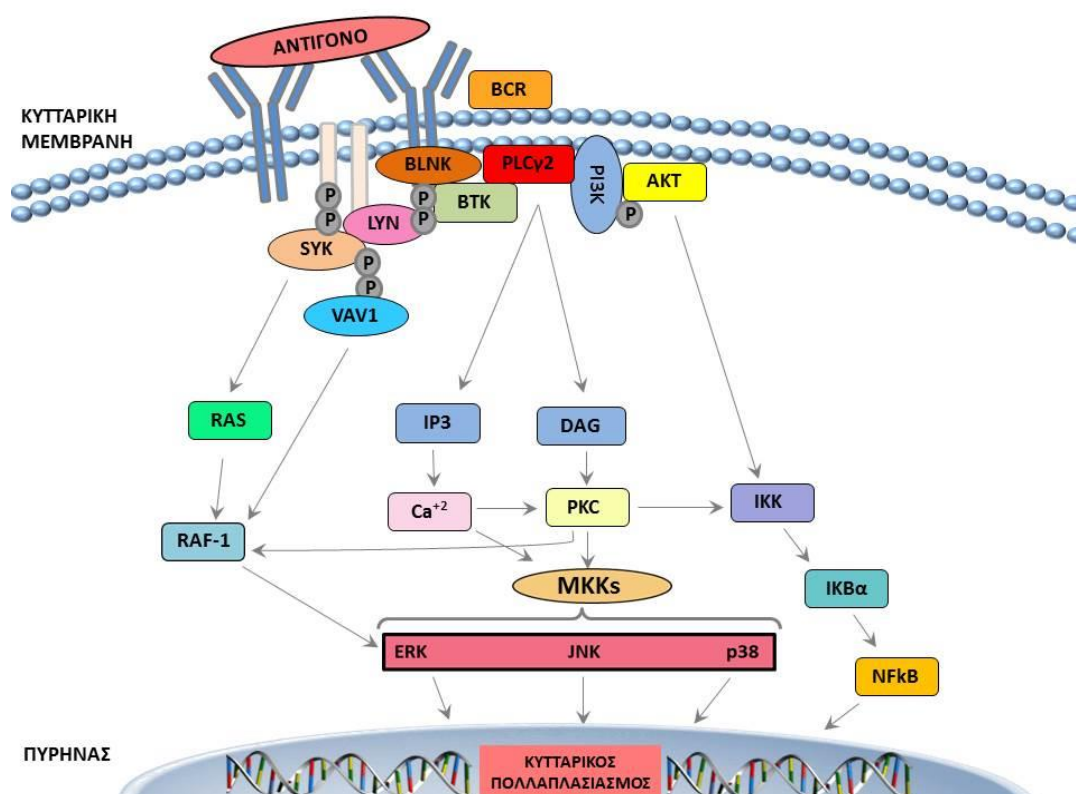
Διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν μελετήσει τα αποτελέσματα της διέγερσης του BcR *in vitro* χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης IgM. Τα αποτελέσματα έδειξαν μεγάλη ετερογένεια ως προς τη λειτουργική απάντηση των λευχαιμικών κυττάρων μετά τη διέγερση^{189,92,195}. Η διέγερση μέσω του BcR φαίνεται να επηρεάζεται από διάφορες παραμέτρους όπως η φύση, η ένταση και η διάρκεια της διέγερσης. Επίσης, τα επίπεδα της επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης φαίνεται να διαδραματίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο^{180,195}.

Η λεπτομερέστερη μελέτη της σηματοδοτικής οδού καθοδικά του BcR ανέδειξε φωσφορυλίωση των κινασών AKT και ERK σε όλες τις περιπτώσεις Α-ΧΛΛ και στο 75% των περιπτώσεων Μ-ΧΛΛ, υποδηλώνοντας ότι το μονοπάτι είναι ενεργό¹⁹⁶. Επιπλέον, η συγκεκριμένη μελέτη έδειξε ότι η κινάση JNK δεν ήταν ενεργός στις περισσότερες περιπτώσεις ΧΛΛ, ενώ ο NF-κΒ ήταν ενεργοποιημένος στις μισές σχεδόν περιπτώσεις, ένδειξη ότι τα κύτταρα της ΧΛΛ δεν απαντούν πλήρως στην ενεργοποίηση του BcR¹⁹⁶.

Μεταγενέστερη μελέτη έδειξε ιδιοστατική ενεργοποίηση μορίων που εμπλέκονται

στο σηματοδοτικό μονοπάτι καθοδικά του BcR τουλάχιστον σε μερικές περιπτώσεις ΧΛΛ. Συγκεκριμένα, σε περιπτώσεις ΧΛΛ στις οποίες η μεταβίβαση σήματος μέσω της ανοσοσφαιρίνης επιφάνειας IgM *in vitro* δεν ήταν δυνατή, διαπιστώθηκε συνεχής ενεργοποίηση της κινάσης ERK και του μεταγραφικού παράγοντα NF-AT και απουσία ενεργοποίησης της κινάσης AKT¹⁹⁵. Στα ποντίκια, αυτή η κατάσταση είναι χαρακτηριστική των ανεργικών Β λεμφοκυττάρων και μπορεί να θεωρηθεί ως αποτέλεσμα διαρκούς αλληλεπίδρασης με αυτοαντιγόνα¹⁹⁷. Όλα τα παραπάνω οδηγούν στην υπόθεση ότι σε μερικές τουλάχιστον περιπτώσεις ΧΛΛ τα λευχαιμικά κύτταρα είναι ανεργικά, πιθανότατα εξαιτίας συνεχούς διέγερσης *in vivo* που καθιστούν την κυτταρική μεμβράνη ανθεκτική σε περαιτέρω διέγερση.

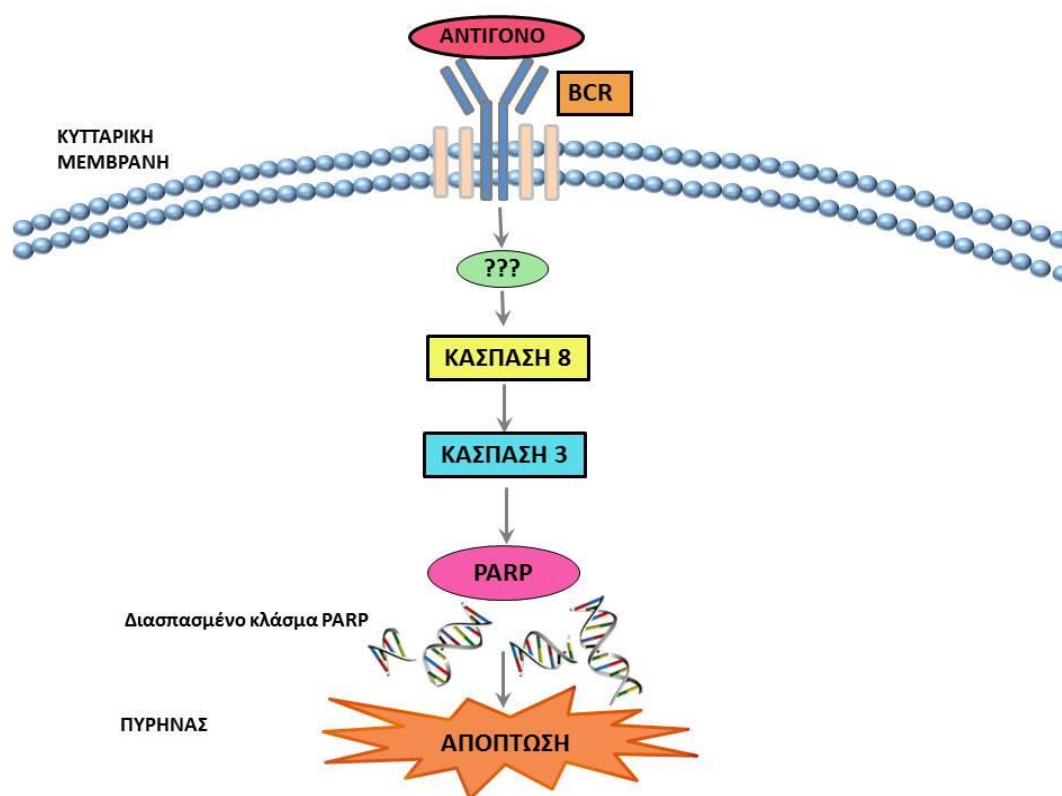
Τα τελευταία χρόνια έχει μελετηθεί ιδιαίτερα ο ρόλος της **κινάσης ERK** στην παθογένεια αλλά και την πορεία της ΧΛΛ. Ενεργοποίηση της ERK παρατηρείται στις περισσότερες περιπτώσεις ΧΛΛ, ωστόσο με σημαντική ετερογένεια^{198,196,199,200,201,202}. Η ετερογένεια αυτή φαίνεται ότι σχετίζεται τουλάχιστον εν μέρει με το φορτίο των μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV του νεοπλασματικού κυττάρου. Οι σχετικές μελέτες έδειξαν ότι η *in vitro* ενεργοποίηση των νεοπλασματικών κυττάρων της ΧΛΛ με anti-IgM οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης ERK και οι ασθενείς με διαφορετικό φορτίο μεταλλάξεων απαντούν με διαφορετικό τρόπο. Στις συγκεκριμένες μελέτες, αυξημένα επίπεδα φωσφορυλιωμένης ERK βρέθηκαν στην Α-ΧΛΛ, ενισχύοντας την υπόθεση ότι σήματα επιβίωσης και πολλαπλασιασμού μεταδίδονται καλύτερα στη συγκεκριμένη υποκατηγορία ΧΛΛ^{198,196}. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η ενεργοποιημένη κινάση ERK επάγει την έκφραση της ογκοπρωτεΐνης MYC ρυθμίζοντας τον αντιγονοεξαρτώμενο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαδραματίζοντας ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη της ΧΛΛ²⁰⁰ (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση της ενεργοποίησης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω του BcR υποδοχέα.

Ο BcR δε λαμβάνει μόνο μηνύματα που επηρεάζουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αλλά επίσης διαχειρίζεται και μηνύματα που σχετίζονται με τη βιωσιμότητα των κυττάρων και την απόπτωση. Δεν υπάρχουν σαφή δεδομένα για τον ακριβή μηχανισμό ενεργοποίησης της απόπτωσης από τον BcR, ωστόσο φαίνεται ότι η διέγερση του BcR καταλήγει στην ενεργοποίηση της κασπάσης 8 που ενεργοποιεί με τη σειρά της άλλες κασπάσες όπως η κασπάση 3²⁰³. Η κασπάση 3 καταλύει τη διάσπαση ενδοκυττάρων υποστρωμάτων, μεταξύ άλλων η πολυ-ADP ριβόζη- πολυμεράση (PARP), ένζυμο που εμπλέκεται στη ρύθμιση της επιδιόρθωσης βλαβών του DNA με τελικό αποτέλεσμα την απόπτωση του κυττάρου. Αυτή η Fas-ανεξάρτητη ενεργοποίηση της κασπάσης 8 φαίνεται ότι διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης στα κύτταρα της ΧΛΛ²⁰⁴. Πειραματικά δεδομένα στηρίζουν την άποψη ότι τα κύτταρα της ΧΛΛ ενεργοποιούν το εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης μέσω της ενεργοποίησης των κασπασών με κάποιο εναλλακτικό μονοπάτι που διαφέρει από το κλασικό μέσω Fas Fas-ligand²⁰⁵. Παρότι

τα γονίδια Fas και Fas ligand κατέχουν κεντρικό ρόλο στην απόπτωση των κυττάρων κωδικοποιώντας τις πρωτεΐνες Fas και Fas ligand, τα κύτταρα της ΧΛΛ φαίνεται να μην ενεργοποιούν το συγκεκριμένο μονοπάτι, εμφανίζοντας αντίσταση (ανθεκτικότητα) έναντι της σηματοδότησης Fas η οποία επάγει απόπτωση, παρότι εκφράζουν μόρια Fas και DISC²⁰⁵ (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση της επαγωγής της απόπτωσης μέσω του BcR υποδοχέα.

1.4.2.4 Σηματοδότηση μέσω των TLRs στη ΧΛΛ

Το πρότυπο έκφρασης των TLRs στη ΧΛΛ προσομοιάζει με το αντίστοιχο πρότυπο των φυσιολογικών Β λεμφοκυττάρων μνήμης με εμπειρία αντιγόνου^{165,206,207,208}. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα της ΧΛΛ εκφράζουν TLR1, TLR2, TLR6, TLR7, TLR9 και TLR10. Οι υποδοχείς TLRs είναι λειτουργικοί στη ΧΛΛ αφού η ενεργοποίησή τους μπορεί να επάγει, κατά περίπτωση, την έκφραση συνδιεγερτικών μορίων (π.χ. CD80, CD86, CD25), τον πολλαπλασιασμό ή την απόπτωση των κυττάρων της ΧΛΛ^{165,206-209,117,210-214}.

Μελέτες σηματοδότησης δείχνουν ότι η ενεργοποίηση των κυττάρων της ΧΛΛ από τους TLRs επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης του NF-κΒ και των MAP

κινασών^{215,211,208}. Μετά την αναγνώριση των παθογόνων, οι TLR επάγουν σηματοδοτικά μονοπάτια που φωσφορυλιώνουν την TAK1 και καταλήγουν στην ενεργοποίηση του NF-κΒ και των MAP κινασών. Με τη σειρά τους, οι MAP κινάσες ενεργοποιούν τον AP-1 και, τελικά, οι ενεργοποιημένοι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κΒ και AP-1 προάγουν την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως οι TNFα, IL-6, IL-1b και IL-12 και την έκφραση συνδιεγερτικών μορίων. Το γεγονός αυτό ευαισθητοποιεί τα νεοπλασματικά Β λεμφοκύτταρα στη δράση των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων αλλά και των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων^{216,215}.

Οι TLR1/2 και TLR2/6 φαίνεται ότι επάγουν την έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων προστατεύοντας τα κύτταρα από την απόπτωση²⁰⁸. Ο TLR7 βρέθηκε ότι επάγει αποτελεσματικά την έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων, με μεγάλη ωστόσο ετερογένεια^{215,217}. Η διέγερση των κυττάρων της ΧΛΛ μέσω του TLR7 φαίνεται να έχει αντιαποπτωτική δράση²¹⁸. Οι μελέτες για τον TLR9 παρουσιάζουν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Η μελέτη των Decker και συνεργατών έδειξε ότι η διέγερση μέσω του TLR9 οδηγεί σε πολλαπλασιασμό των κυττάρων της ΧΛΛ, ενώ η μελέτη των Jahrsdorfer και συνεργατών κατέληξε σε αντίθετα αποτελέσματα, αποδεικνύοντας ότι η διέγερση μέσω του TLR9 επάγει την απόπτωση των κυττάρων^{210,219}.

Η μελέτη των Longo και συνεργατών που ακολούθησε προσέφερε μια πιθανή εξήγηση για την πλειοτρόπο δράση του TLR9 στη ΧΛΛ καθώς έδειξε ότι η διέγερση του TLR9 επάγει πολλαπλασιασμό κυρίως στους ασθενείς που φέρουν αμετάλλακτες αλληλουχίες IGHV, ενώ επάγει απόπτωση σε ασθενείς που φέρουν μεταλλαγμένες αλληλουχίες IGHV²⁰¹. Στη συγκεκριμένη μελέτη, η διαφορετική απάντηση οφειλόταν στη διαφορετική σε κάθε περίπτωση ενεργότητα της κινάσης AKT. Επιπλέον, πρόσφατη μελέτη έδειξε σημαντικές διαφορές στην απάντηση μετά από διέγερση επιλεγμένων TLR μεταξύ περιπτώσεων που έφεραν μεταλλαγμένες έναντι αμετάλλακτων αλληλουχιών IGHV (M-ΧΛΛ έναντι A-ΧΛΛ) μόνο για τους TLR7 και TLR9. Συγκεκριμένα, το ποσοστό των CD25 θετικών κυττάρων αυξήθηκε περισσότερο στην A-ΧΛΛ μετά από διέγερση του TLR7 με Imiquimod (Im). Αντίθετα, το ποσοστό των CD86 θετικών κυττάρων ήταν μεγαλύτερο στην M-ΧΛΛ μετά από διέγερση του TLR9 με CpG²⁰⁶.

1.4.2.5 Συνδιέγερση BCR-TLR στη ΧΛΛ

Συνεργασία μεταξύ προσαρμοστικής και έμφυτης ανοσίας μέσω των υποδοχέων BcR και TLR συμβαίνει τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα αυτοαντιδραστικά κύτταρα¹¹⁷. Τα δεδομένα για τη συνδιέγερση BcR/TLR στη ΧΛΛ είναι πολύ περιορισμένα, καθώς οι περισσότερες μελέτες σηματοδότησης αφορούν σε μεμονωμένη *in vitro* διέγερση είτε του BcR είτε των TLRs.

Όλες οι μελέτες αναδεικνύουν σημαντική ετερογένεια στην απάντηση των νεοπλασματικών κυττάρων της ΧΛΛ μετά από διέγερση του BcR^{189,92,195}, που επηρεάζεται από διάφορες παραμέτρους όπως η φύση, τα επίπεδα της ανοσοσφαιρίνης επιφανείας αλλά και η διάρκεια της διέγερσης. Ωστόσο, το γεγονός ότι σημαντική ετερογένεια έχει παρατηρηθεί και σε περιπτώσεις με παρόμοια επίπεδα επιφανειακής IgM υποδηλώνει ότι τα κύτταρα της ΧΛΛ επικοινωνούν με το μικροπεριβάλλον και με άλλους υποδοχείς εκτός του BcR, όπως οι TLRs.

Επιπλέον, μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια έδειξαν ότι σύμπλοκα DNA-IgG, μπορεί να ενεργοποιήσουν αυτοαντιδραστικά B λεμφοκύτταρα σε παραγωγή αντισωμάτων κατά της IgG, υποδηλώνοντας ότι η ενεργοποίηση μέσω των TLRs μπορεί να κατευθύνει τη σύνθεση αυτοαντισωμάτων σε ορισμένα συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα¹¹⁹. Κατ' αναλογία, μπορεί ίσως να συμβάλλει στην ενεργοποίηση και τον αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων στη ΧΛΛ. Ένας τέτοιος μηχανισμός θα μπορούσε να σχετίζεται με την αυξημένη σηματοδότηση μέσω TLR9 των περιπτώσεων ΧΛΛ με επιθετική νόσο. Γνωρίζουμε ότι η διέγερση του TLR9 επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό κυρίως σε ασθενείς που φέρουν αμετάλλακτες αλληλουχίες IGHV, ενώ επάγει την απόπτωση σε ασθενείς που φέρουν μεταλλαγμένες αλληλουχίες IGHV²⁰¹. Τελικά, η έκβαση των ασθενών με ΧΛΛ θα μπορούσε να είναι η συνισταμένη της σύγχρονης ενεργοποίησης των νεοπλασματικών κυττάρων μέσω BcR και TLR. Η διπλή ενεργοποίηση πιθανόν καθορίζει το ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή απόπτωσης των νεοπλασματικών κυττάρων, διαμορφώνοντας έτσι την κλινική πορεία του ασθενούς.

Σε μοριακό επίπεδο, σημαντικό ρόλο στην ενδοκυττάρια μεταβίβαση του σήματος φαίνεται ότι παίζει η φωσφορυλίωση των κινασών ERK1/2. Οι κινάσες ERK1/2

ενεργοποιούνται τόσο μέσω του BcR όσο και μέσω της διέγερσης των ενδοκυττάρων TLR7 και TLR9 (Εικόνα 9). Η κινάση ERK διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην επιβίωση και λειτουργικότητα των Β λεμφοκυττάρων, ελέγχοντας πολλές κυτταρικές λειτουργίες μέσω της ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων.

2. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

2. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Όλα τα κύτταρα του αίματος προέρχονται από το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο που βρίσκεται στο μυελό των οστών και διαφοροποιείται ανάλογα με τα ερεθίσματα που δέχεται από το μικροπεριβάλλον. Νεοπλασματική εκτροπή μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε στάδιο της διαφοροποίησης και ο φαινότυπος της αιματολογικής κακοήθειας που θα προκύψει καθορίζεται από τη φύση και το στάδιο διαφοροποίησης του κυττάρου που εκτρέπεται. Τα νεοπλάσματα του αίματος διακρίνονται αδρά σε νεοπλάσματα της μυελικής ή της λεμφικής σειράς. Μεταξύ των τελευταίων, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ). Το ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη ΧΛΛ απορρέει από το γεγονός ότι αποτελεί τη συχνότερη λευχαιμία στο Δυτικό ημισφαίριο αλλά και από τη μεγάλη κλινική ετερογένεια της νόσου παρά τον ομοιογενή κλινικό και εργαστηριακό φαινότυπο των ασθενών κατά τη διάγνωση.

Η ΧΛΛ σήμερα θεωρείται νόσος-υπόδειγμα για τη μελέτη του ρόλου των διαταραχών του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης στη νεοπλασματική εκτροπή. Είναι γενικά αποδεκτό ότι τόσο η έναρξη όσο και η εξέλιξη της ΧΛΛ συνδέονται άμεσα με αλληλεπιδράσεις μεταξύ εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων μηχανισμών που επηρεάζουν το ρυθμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης των νεοπλασματικών κυττάρων. Μεταξύ αυτών, σημαντικό ρόλο φαίνεται ότι παίζουν οι αλληλεπιδράσεις των προγονικών αλλά και των κλωνογενών κυττάρων της ΧΛΛ με το μικροπεριβάλλον μέσω υποδοχέων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, κυρίως του Β κυτταρικού υποδοχέα (B cell receptor, BcR) αλλά και υποδοχέων έμφυτης ανοσίας, όπως οι υποδοχείς τύπου Toll (TLRs).

Οι σχετικές μελέτες έδειξαν ότι το ρεπερτόριο των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών των νεοπλασματικών κυττάρων της ΧΛΛ χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερη επιλεκτικότητα. Επίσης, το φορτίο των σωματικών μεταλλάξεων των γονιδίων της μεταβλητής περιοχής της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών (IGHV) αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς βιολογικούς δείκτες για τον καθορισμό της πρόγνωσης και τον ορθολογικό σχεδιασμό της θεραπευτικής αγωγής, ακόμα και σε ασθενείς πρώιμων σταδίων. Επιπλέον, τα γονίδια της μεταβλητής περιοχής των

ανοσοσφαιρινών εμφανίζουν μοναδικά χαρακτηριστικά, ενδεικτικά επιλογής από ιδιαίτερα αντιγόνα, με πιο αξιοσημείωτο τη στερεοτυπία της περιοχής VH CDR3 μεταξύ BcR διαφορετικών ασθενών. Η «στερεοτυπία» του BcR αποτελεί ισχυρή ένδειξη επιλογής από περιορισμένη ποικιλία αντιγόνων.

Πρόσφατα *in vitro* δεδομένα παρέχουν ενδείξεις για το ρόλο λοιμώξεων από κοινά παθογόνα (βακτήρια και ιούς) στη διέγερση των κλωνογενών κυττάρων της ΧΛΛ. Οι σχετικές μελέτες επιβεβαιώνουν ότι η μοριακή στερεοτυπία του BcR συνοδεύεται από ειδική αναγνώριση διαφορετικών, κατά περίπτωση, παθογόνων μικροβίων και αυτοαντιγόνων.

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. Σχετικές μελέτες έχουν δείξει ότι τουλάχιστον οι μισές περιπτώσεις ΧΛΛ απαντούν στη διέγερση μέσω της IgM, τουλάχιστον όσον αφορά σε συμβάντα κοντά στη μεμβράνη, όπως η φωσφορυλίωση της Syk, της PLCγ2 και η απελευθέρωση ενδοκυττάρου Ca^{2+} .

Η διαφανόμενη σχέση μεταξύ αντιγονικής διέγερσης από κοινά μικρόβια και ΧΛΛ υποδηλώνει την ανάγκη μελέτης όχι μόνο των υποδοχέων BcR αλλά και των υποδοχέων της έμφυτης ανοσίας για την εξαγωγή αξιόπιστων ενδείξεων αναφορικά με τη φύση και τον ακριβή ρόλο των αντιγόνων που διεγείρουν τα κλωνογενή λευχαιμικά κύτταρα. Από τα μέχρι τώρα δεδομένα έχει διαπιστωθεί έκφραση των TLR7, TLR9, TLR1, TLR2, TLR6 και TLR10, από τα νεοπλασματικά B λεμφοκύτταρα ενώ οι μέχρι τώρα μελέτες έχουν δείξει άμεση ενεργοποίηση των TLR7 και TLR9 από ειδικούς αγωνιστές.

Η συνεργασία μεταξύ προσαρμοστικής και έμφυτης ανοσίας μέσω των υποδοχέων BcR και των υποδοχέων TLR αποτελεί ιδιότητα των φυσιολογικών αλλά και των αυτοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων. Τα δεδομένα από τη συνδιέγερση BcR/TLR στη ΧΛΛ είναι πολύ περιορισμένα δεδομένου ότι οι περισσότερες μελέτες αφορούν μεμονωμένη *in vitro* διέγερση είτε του BcR είτε των TLRs.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν

- i. τα ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά του BcR στη ΧΛΛ και διερευνήθηκε πιθανή συσχέτισή τους με την κλινική επιθετικότητα της νόσου, και

- ii. ο αντίκτυπος της *in vitro* διέγερσης του BcR, των TLR7 και TLR9 μεμονωμένα ή σε συνδυασμό (BcR/TLR7 και BcR/TLR9) στην επιβίωση και την απόπτωση των νεοπλασματικών κυττάρων της ΧΛΛ.

Στο **πρώτο μέρος** μελετήθηκαν 799 ασθενείς με ΧΛΛ και μέσο χρόνο παρακολούθησης τους 70 μήνες. Με δεδομένο ότι το γενικά αποδεκτό όριο ομολογίας 98% ως προς το μη αναδιαταγμένο γονίδιο IGHV που εφαρμόζεται για την κατάταξη των ασθενών σε M-ΧΛΛ ή A-ΧΛΛ δεν έχει βιολογική σημασία διερευνήθηκαν:

- i. η πιθανή σημασία του περαιτέρω διαχωρισμού των ασθενών κάθε υποομάδας (M-ΧΛΛ ή A-ΧΛΛ) με βάση το φορτίο των μεταλλάξεων
- ii. τα ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά των μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV (μεταλλάξεις αντικατάστασης προς σιωπηρές, στόχευση πουρινών έναντι πυριμιδινών, μεταβάσεις έναντι μεταπτώσεων, συντηρητικές έναντι μη συντηρητικών αντικαταστάσεων αμινοξέων) στο σύνολο των ασθενών και στις διαφορετικές υπο-υποομάδες.

Για το σκοπό αυτό αναλύθηκαν οι κλωνικές αναδιατάξεις των γονιδίων IGHV-IGHD-IGHJ και προσδιορίστηκε το φορτίο των μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV. Οι αναδιατάξεις IGHV-IGHD-IGHJ αρχικά διακρίθηκαν σε αμετάλλακτες και μεταλλαγμένες με βάση το γενικά αποδεκτό όριο ομολογίας 98% του γονιδίου IGHV σε σχέση με το αντίστοιχο μη αναδιαταγμένο γονίδιο IGHV. Στη συνέχεια, οι αμετάλλακτες αναδιατάξεις διακρίθηκαν περαιτέρω σε «πραγματικά αμετάλλακτες» με ομολογία 100% και «ελάχιστα μεταλλαγμένες» με ομολογία 98-99,9%, ενώ οι μεταλλαγμένες αναδιατάξεις με ομολογία <98% διακρίθηκαν σε «οριακά μεταλλαγμένες» με ομολογία 96-97,9% και «πολύ μεταλλαγμένες» με ομολογία <96%. Ακολούθησε μελέτη των ιδιαίτερων μοριακών χαρακτηριστικών των μεταλλάξεων και διερεύνηση της πιθανής προγνωστικής αξίας της περαιτέρω διάκρισης των ασθενών με A-ΧΛΛ ή M-ΧΛΛ σε υπο-υποομάδες όσον αφορά στο χρόνο έναρξης θεραπείας και την ολική επιβίωση των ασθενών.

Στο **δεύτερο μέρος** της παρούσας διατριβής μελετήθηκε η λειτουργικότητα των BcR, TLR7 και TLR9 σε 21 ασθενείς με ΧΛΛ (11 M-ΧΛΛ, 10 A-ΧΛΛ), των οποίων τα νεοπλασματικά κύτταρα διεγέρθηκαν *in vitro* με κατάλληλους προσδέτες για

ενεργοποίηση μέσω των BcR, TLR7 και TLR9, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό. Στόχος της διέγερσης ήταν η διερεύνηση:

- i) του αντίκτυπου της διέγερσης μέσω των BcR, TLR7 και TLR9 στην επιβίωση και την απόπτωση των νεοπλασματικών κυττάρων της ΧΛΛ.
- ii) της πιθανής συνεργασίας BcR και συγκεκριμένων TLR στη ΧΛΛ

Τα αποτελέσματα της ενεργοποίησης των κυττάρων μέσω των BcR, TLR7 και TLR9 μεμονωμένα ή σε συνδυασμό εκτιμήθηκαν με προσδιορισμό των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης ERK (pERK). Η επιλογή της pERK βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες που ανέδειξαν το σημαντικό ρόλο της pERK στην ενδοκυττάρια μεταβίβαση του σήματος στα κύτταρα της ΧΛΛ. Η επαγωγή της απόπτωσης μετά τη διέγερση των κυττάρων της ΧΛΛ μέσω των BcR, TLR7 και TLR9 μεμονωμένα ή σε συνδυασμό εκτιμήθηκε με προσδιορισμό της κασπάσης 8 και της PARP.

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 Μελέτη κλωνικών αναδιατάξεων των γονιδίων της μεταβλητής περιοχής της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών στη ΧΛΛ

3.1.1 Ομάδα Μελέτης

Η ομάδα μελέτης περιλάμβανε 799 ασθενείς με τυπική χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία οι οποίοι παρακολουθούνται στο Αιματολογικό Τμήμα του ΓΚΝ Νίκαιας Πειραιά «Άγ.Παντελεήμων» και την Αιματολογική Κλινική του ΓΝΘ «Γ.Παπανικολάου». Η διάγνωση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα κριτήρια του NCI (National Cancer Institute)¹²⁸. Η διάμεση ηλικία κατά τη διάγνωση ήταν 64 έτη (εύρος 26-90 έτη) ενώ ο μέσος χρόνος παρακολούθησης ήταν 70 μήνες (εύρος 1-372 μήνες). Αναλυτικά τα δημογραφικά βιολογικά και κλινικά δεδομένα των ασθενών αναφέρονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Δημογραφικά, κλινικά και βιολογικά δεδομένα για το σύνολο των ασθενών

Παράμετρος	Αριθμός ασθενών
Φύλο	
Άνδρες	522
Γυναίκες	277
Στάδιο Binet κατά τη διάγνωση	
A	621
B	111
C	67
Έκφραση CD38¹	
Θετική	244
Αρνητική	437
Έκφραση ZAP- 70²	
Θετική	116
Αρνητική	279
Έκφραση επιφανειακής Ig	
MD	555
G	95
Έκφραση ελαφριάς αλυσίδας	
κ	460
λ	256
Πρόοδος Νόσου	
Προοδευτική	365
Σταθερή	406
Παρούσα κατάσταση	
Ζώντες	590
Θανόντες	203

1:CD38 όριο θετικότητας >7%, 2: ZAP-70 όριο θετικότητας >20%

3.1.2 Μεθοδολογία

3.1.2.1 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων από δείγμα αίματος ασθενών με ΧΛΛ

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

3.1.2.2 Απομόνωση RNA- Σύνθεση cDNA

Η απομόνωση ολικού κυτταρικού RNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του θειοκυανικού γουανιδινίου. Για τη σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (Complementary DNA, cDNA) χρησιμοποιήθηκε η αντίστροφη μεταγραφάση SuperScript® II RT (SS II, Invitrogen, Paisley, UK) με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα 5x (RT buffer), τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs, Invitrogen, Paisley, UK) και αναστολέας RNAασών (RNAaseOUT, Invitrogen, Paisley, UK). Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε 1μg ολικού κυτταρικού RNA διαλυμένο σε H₂O ελεύθερο από RNάσες (RNase free H₂O) και εξανουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας (random hexamers, RH) ως εκκινητές (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Αντιδραστήρια για την αντίδραση σύνθεσης cDNA

Αντιδραστήρια	Όγκοι
RNA	1μg
RT buffer (5X)	4μl
Αναστολέας RNAασών (40U/μl)	1μl
dNTPs (10mM)	1μl
RH (3μg/μl)	1μl
SS II RT(200U/μl)	1μl
RNase free H ₂ O	μέχρι τελικό όγκο 20μl
Τελικός όγκος	20μl

Διαδικασία

- Προσθήκη σε σωληνάριο erpendorf κατάλληλου όγκου διαλύματος RNA (1μg), 1μl RNAaseOUT, 1μl RH και RNase free H₂O μέχρι τελικό όγκο 14μl
- Τοποθέτηση δειγμάτων στο θερμοκυκλοποιητή σε θερμοκρασία 65°C για 10 λεπτά

- Άμεση τοποθέτηση στον πάγο για 5 λεπτά
- Προσθήκη 4 μl RT Buffer (5X), 1 μl dNTPs (10mM) και 1 μl SS II RT
- Τοποθέτηση δειγμάτων στο θερμοκυκλοποιητή
Συνθήκες αντίδρασης:
 - Σύνθεση cDNA: 42⁰C, για 60 λεπτά
 - Αδρανοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης: 94⁰C, για 3 λεπτά
- Αραίωση του cDNA με προσθήκη 30 μl αποστειρωμένου H₂O ελεύθερου από RNάσες

Η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης σύνθεσης cDNA ελέγχθηκε με την ενίσχυση αλληλουχιών του γονιδίου RARα (Retinoic Acid Receptor alpha) το οποίο κωδικοποιεί έναν από τους υποδοχείς του ρετινοϊκού οξέος και εκφράζεται πάντοτε στα κύτταρα του αίματος (μετάγραφα “αναφοράς”). Το γονίδιο RARα ενισχύθηκε με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR). Χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα 5 μl του διαλύματος cDNA και τα ολιγονουκλεοτίδια RAR6 (5'-GGTGCCTCCCTACGCCTTCT-3') και RAR8 (5'-GGCGCTGACCCCATAGTGGT-3') ως εκκινητές (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Αντιδραστήρια για την αντίδραση ενίσχυσης του γονιδίου RARα

Αντιδραστήρια	Όγκοι
cDNA	5μl
RBX10 (ρυθμιστικό διάλυμα)	10μl
MgCl ₂ (50mM)	3μl
dNTPs (10mM)	2μl
RAR6 (10pm/μl)	5μl
RAR8 (10pm/μl)	5μl
Taq πολυμεράση (5 units/μl)	0,5μl
ddH ₂ O	69,5μl
Τελικός όγκος	100μl

Διαδικασία

- Προσθήκη όλων των αντιδραστηρίων που αναφέρονται στον Πίνακα 3 σε σωληνάριο erpendorf
- Τοποθέτηση δειγμάτων στο θερμοκυκλοποιητή
Συνθήκες αντίδρασης:
 - αρχική αποδιάταξη: 94⁰C για 5 λεπτά
 - κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 40 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
 - αποδιάταξη: 94⁰C για 1 λεπτό
 - σύνδεση εκκινητών: 53⁰C για 1 λεπτό

- επέκταση μορίων DNA: 72°C για 1 λεπτό και 30 δευτερόλεπτα
- τελική επέκταση συντεθειμένων μορίων DNA: 72°C για 10 λεπτά

3.1.2.3 Ενίσχυση κλωνικών αναδιατάξεων των γονιδίων IGHV-IGHD-IGHJ

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 καθεμιάς από τις έξι υποομάδες γονιδίων οδηγών IGHV (VHL1-6: Leader primers) σε συνδυασμό με εκκινητές αντιπροσωπευτικούς και των 6 γονιδίων IGHJ (JH1-6)^{155,154} (Πίνακας 4).

Πίνακας 4. Αλληλουχίες εκκινητών για την ενίσχυση των αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ

Εκκινητής	Αλληλουχία
VHL1a	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'-AATCGATACCACCATGGA(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'-AAATCGATACCACCATGTCTGTCTCCTCCTC-3'
JH1-2	5'-TGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCC-3'
JH3	5'-TGAAGAGACGGTGACCATTGTCCC-3'
JH4-5	5'-TGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCC-3'
JH6	5'-TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCC-3'

Πίνακας 5. Αντιδραστήρια για την αντίδραση ενίσχυσης των αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ

Αντιδραστήρια	Όγκοι
Υπόστρωμα	cDNA:5μl
RBX10	10μl
MgCl ₂ (1,5mM)	3μl
dNTPs(10mM)	2μl
Μείγμα εκκινητών VHLeader1-6 (10pm/μl έκαστος)	6μl
Μείγμα εκκινητών JH1-6 (10pm/μl έκαστος)	6μl
Taq πολυμεράση (5 units/μl)	0,5μl
ddH ₂ O	67,5μl
Τελικός όγκος	100μl

Διαδικασία

- Προσθήκη όλων των αντιδραστηρίων που αναφέρονται στον Πίνακα 5 σε σωληνάριο erpendorf
- Τοποθέτηση δειγμάτων στο θερμοκυκλοποιητή
Συνθήκες αντίδρασης:
 - αρχική αποδιάταξη: 94°C για 5 λεπτά
 - κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 40 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
 - αποδιάταξη: 94°C για 1 λεπτό
 - σύνδεση εκκινητών: 59°C για 1 λεπτό
 - επέκταση μορίων DNA: 72°C για 1 λεπτό
 - τελική επέκταση συντεθειμένων μορίων DNA: 72°C για 10 λεπτά

3.1.2.4 Καθαρισμός των προϊόντων RT-PCR

Τα προϊόντα RT-PCR υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης, περιεκτικότητας 3%. Η ζώνη που αντιστοιχούσε στη μονοκλωνική αναδιάταξη IGHV-IGHD-IGHJ αφαιρέθηκε από την πηκτή και ο καθαρισμός του προϊόντος PCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN Hilden, Germany), σύμφωνα με το προτεινόμενο από την εταιρεία πρωτόκολλο.

3.1.2.5 Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων RT-PCR

Πραγματοποιήθηκε άμεση ανάλυση της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων των προϊόντων RT-PCR με τη μέθοδο τερματισμού των νεοσυντεθειμένων αλυσίδων DNA με διδεοξυριβονουκλεοτίδια (μέθοδος Sanger). Η παρουσία σημασμένων διδεοξυριβονουκλεοτιδίων στο μείγμα της αντίδρασης οδηγεί σε τυχαία ενσωμάτωση τους στο ελεύθερο άκρο του νεοσυντιθέμενου κλώνου κατά την αντίδραση σύνθεσης DNA με αποτέλεσμα τη διακοπή της σύνθεσης της συγκεκριμένης αλυσίδας. Το τελικό αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η παραγωγή πολλών αντιγράφων DNA, τα οποία διαφέρουν σε μήκος κατά ένα νουκλεοτίδιο, με δεδομένο ότι η ενσωμάτωση του διδεοξυριβονουκλεοτιδίου συμβαίνει σε κάθε πιθανή θέση του νεοσυντιθέμενου κλώνου. Στη συνέχεια, το μείγμα της αντίδρασης υποβάλλεται σε τριχοειδική ηλεκτροφόρηση και τα κλάσματα DNA διαχωρίζονται με βάση το μήκος, καθιστώντας δυνατό τον

καθορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του αρχικού μορίου με βάση την κινητικότητα των αντιγράφων DNA στην ηλεκτροφόρηση.

Χρησιμοποιήθηκε ειδικός αναλυτής (CEQ 8000 Genetic Analysis System, Beckman-Coulter) καθώς και αντιδραστήρια της ίδιας εταιρίας (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. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των προϊόντων PCR προσδιορίστηκε και στους δύο κλώνους του προϊόντος. Για την ανάλυση του αντισυνθετικού (3'→5', antisense) κλώνου χρησιμοποιήθηκαν συναινετικά ολιγονουκλεοτίδια, συμπληρωματικά με τις αλληλουχίες των γονιδίων IGHI, 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 antisense κλώνου). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων RT-PCR και του πλασμιδίου pUC18 αναφέρονται στους Πίνακες 6,7.

Πρωτόκολλο αντίδρασης

α. Αρχική αντίδραση

Πίνακας 6. Αντιδραστήρια για την ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων RT-PCR

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

Διαδικασία

- Προσθήκη όλων των αντιδραστηρίων που αναφέρονται στον Πίνακα 6 σε σωληνάριο erpendorf
- Τοποθέτηση δειγμάτων στο θερμοκυκλοποιητή
Συνθήκες αντίδρασης:

Η αντίδραση σύνθεσης διεξήχθη σε 40 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλάμβανε:

- ο φάση αποδιάταξης: 96°C για 20 δευτερόλεπτα
- ο φάση σύνδεσης εκκινητών: 50°C για 20 δευτερόλεπτα
- ο φάση επέκτασης μορίων DNA: 60°C για 4 λεπτά

Παράλληλα για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης ενισχύθηκε σε ανεξάρτητη αντίδραση το ευθυγραμμισμένο πλασμίδιο pUC18.

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

Αντιδραστήρια	Όγκοι
pUC18 (0,25μg/μl)	0,5μl
Εκκινητής M13-47 (1,6pmol/μl)	2μl
Quick Start master mix	8μl
ddH ₂ O	9,5μl
Τελικός όγκος	20μl

Διαδικασία

- ο Προσθήκη όλων των αντιδραστηρίων που αναφέρονται στον Πίνακα 7 σε σωληνάριο erpendorf
- ο Τοποθέτηση δειγμάτων στο θερμοκυκλοποιητή
Συνθήκες αντίδρασης:
 - ο αρχική αποδιάταξη: 96°C για 1 λεπτό
 - ο κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 30 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
 - αποδιάταξη: 96°C για 20 δευτερόλεπτα
 - σύνδεση εκκινητών: 50°C για 20 δευτερόλεπτα
 - επέκταση μορίων DNA: 60°C για 4 λεπτά

β. Καθαρισμός και τριχοειδική ηλεκτροφόρηση προϊόντος αρχικής αντίδρασης

Διαδικασία

- ο Προσθήκη 2μl διαλύματος 100mM Na₂-EDTA (pH 8,0), 2μl διαλύματος 3M οξεικού νατρίου (pH 5,2) και 1μl γλυκογόνου (20mg/ml) σε κάθε δείγμα αμέσως μετά την ολοκλήρωση της αρχικής αντίδρασης σύνθεσης, με στόχο τη διακοπή της.
- ο Προσθήκη 60μl αιθανόλης 95% από την κατάψυξη, ανάδευση και φυγοκέντρηση σε 14000rpm στους 4°C για 15 λεπτά. Προσεκτική αφαίρεση του υπερκείμενου με πιπέτα.
- ο Προσθήκη 200μl αιθανόλης 70% από την κατάψυξη, φυγοκέντρηση σε 14000rpm στους 4°C για 4 λεπτά, και προσεκτική αφαίρεση του υπερκείμενου με πιπέτα.
- ο Επανάληψη του πλυσίματος και προσεκτική αφαίρεση του υπερκείμενου με πιπέτα.

- ο Στέγνωμα του ιζήματος.
- ο Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 40μl Sample Loading Solution.
- ο Ανάλυση της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων σε αυτόματο αναλυτή (CEQ 8000 Genetic Analysis System της Beckman-Coulter).

3.1.2.6 Σύγκριση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με βάσεις δεδομένων

Οι αλληλουχίες των γονιδίων 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>.) Καταγράφηκαν τα γονίδια IGHV, IGHD και IGHJ που αναγνωρίστηκαν σε κάθε αναδιάταξη και υπολογίστηκε η νουκλεοτιδική ταυτότητα κάθε αναδιαταγμένου γονιδίου IGHV με το αντίστοιχο μη αναδιαταγμένο γονίδιο (germline gene)^{220,221}.

Ονοματολογία

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ονοματολογίας της IMGT (ονοματολογία εγκεκριμένη από το HUGO, Human Genome Organization, 1999) για τα γονίδια 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.

Αρχές ταξινόμησης και ονοματολογίας

Το όνομα κάθε γονιδίου συντίθεται από τέσσερα μέρη:

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

3.1.2.7 Ανάλυση των μοριακών χαρακτηριστικών των αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ

Οι πληροφορίες από την ανάλυση όλων των αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ ομαδοποιήθηκαν με την χρήση ειδικών αλγορίθμων. Προσδιορίστηκε η συχνότητα αναδιάταξης των γονιδίων της μεταβλητής περιοχής της βαριάς αλυσίδας καθώς και το ποσοστό ταυτότητας των αναδιαταγμένων γονιδίων με τα πιο συγγενή, μη αναδιαταγμένα γονίδια. Κάθε νουκλεοτιδική αλλαγή κατατάσσεται ως σιωπηρή μετάλλαξη (silent mutation, S) ή ως μετάλλαξη αντικατάστασης (replacement mutation, R) ανάλογα με το αν οδηγεί σε διατήρηση ή αλλαγή του αμινοξέος, αντιστοίχως. Σε όλες τις μεταλλάξεις αντικατάστασης, μελετήθηκαν οι φυσικοχημικές ιδιότητες του αμινοξέος που κωδικοποιούσε η μεταλλαγμένη αλληλουχία και του αμινοξέος που κωδικοποιούσε η μη αναδιαταγμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία. Αξιολογήθηκε (i) η υδροφοβία, (ii) ο όγκος και (iii) τα ιδιαίτερα χημικά χαρακτηριστικά κάθε αμινοξέος σύμφωνα με το IMGT²²². Τα αμινοξέα ταξινομήθηκαν ανάλογα με (i) το βαθμό υδροφοβίας, σε 3 ομάδες (υδρόφιλα, υδρόφοβα και ουδέτερα), (ii) το μέγεθος τους σε Angstrom σε 5 ομάδες (60-90, 108-117, 138-154, 162-174 και 189-228 Angstrom), και (iii) τα χημικά χαρακτηριστικά τους (πολικά, μη πολικά, φορτισμένα, μη φορτισμένα, αλειφατικά, με θειούχες ομάδες, με υδροξυλομάδες, βασικά, όξινα και αμίδια των όξινων αμινοξέων) σε 11 ομάδες (Εικόνα 13). Όταν το αμινοξύ που κωδικοποιούσε η μεταλλαγμένη αλληλουχία και το αμινοξύ που κωδικοποιούσε η μη αναδιαταγμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία είχαν παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες ή διέφεραν σε ένα μόνο από τα τρία χαρακτηριστικά, η αντικατάσταση θεωρείτο συντηρημένη

(conservative), ενώ αν διέφεραν σε δύο ή τρία χαρακτηριστικά θεωρείτο μη συντηρημένη (nonconservative).

AMINOΞEA

Ταξινόμηση κατ' όγκον		Κλίμακα Υδροφοβίας κατά Kyte-Doolittle					
	Σε Å	Υδρόφοβα		Ουδέτερα		Υδρόφιλα	
Πολύ μεγάλα	189-228	F	W	Y			
Μεγάλα	162-174	I	L	M		K	R
Μεσαία	138-154	V				H	
Μικρά	108-117		C	P	T		E
							Q
Πολύ μικρά	60-90	A		G	S		D
							N

Αλειφατικά

με Θειούχες ομάδες

με Υδροξυ ομάδες

Βασικά

Όξινα

Αμιδια

μη φορτισμένα
φορτισμένα
μη φορτισμένα

ΜΗ ΠΟΛΙΚΑ
ΠΟΛΙΚΑ

Εικόνα 13. Ταξινόμηση των 20 αμινοξέων κατά IMGT με βάση την υδροφοβία, τον όγκο και τα ιδιαίτερα χημικά χαρακτηριστικά κάθε αμινοξέος G: Γλυκίνη, A: Αλανίνη, V: Βαλίνη, I: Ισολευκίνη, L: Λευκίνη, S: Σερίνη, T: Θρεονίνη, P: Προλίνη, D: Ασπαρτικό οξύ, E: Γλουταμικό οξύ, K: Λυσίνη, R: Αργινίνη, N: Ασπαραγίνη, Q: Γλουταμίνη, C: Κυστεΐνη, M: Μεθειονίνη, W: Τρυπτοφάνη, F: Φαινυλαλανίνη, Y: Τυροσίνη, H: Ιστιδίνη. Τροποποιημένο από Pommié, C. et al., J. Mol. Recognit., 17, 17-32 (2004).

Με βάση τα συγκεκριμένα δεδομένα, κατασκευάστηκαν πίνακες κατανομής των μεταλλάξεων για το σύνολο των αναδιατάξεων αλλά και για υποσύνολα αναδιατάξεων με συγκεκριμένα μοριακά χαρακτηριστικά, όπως: γονίδιο και μεταλλακτικό φορτίο του γονιδίου IGHV. Επιπλέον, υπολογίστηκε ο λόγος των μεταλλάξεων αντικατάστασης προς τις σιωπηρές μεταλλάξεις (R/S ratios) με δεδομένο ότι αποτελεί μια επιπλέον ένδειξη για την «πίεση» που ασκείται μέσω της αντιγονικής επιλογής σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδίου IGHV. Ο λόγος R/S υπολογίστηκε για κάθε γονίδιο IGHV αλλά και για συγκεκριμένες υποπεριοχές του γονιδίου (π.χ. VH FR1, VH CDR2).

Με δεδομένο ότι το μήκος των περιοχών VH FRs και VH CDRs διαφέρει, για τον αντικειμενικό υπολογισμό των λόγων R/S, η κάθε μετάλλαξη «κανονικοποιήθηκε»

διαιρούμενη δια του αριθμού αμινοξικών καταλοίπων της περιοχής στην οποία εντοπίζεται (π.χ. μια μετάλλαξη στην περιοχή VH CDR2 μήκους οκτώ αμινοξέων έχει «βαρύτητα» ίση με $1/8=0,13$ ενώ αντίθετα, στην περιοχή VH FR1 μήκους 26 αμινοξέων η «βαρύτητα» μιας μετάλλαξης είναι $1/26=0,04$).

3.2 Διέγερση των κυττάρων της ΧΛΛ μέσω των υποδοχέων BcR, TLR7 και TLR9

3.2.1 Ομάδα Μελέτης

Μελετήθηκαν συνολικά 21 ασθενείς με ΧΛΛ, 11 από τους οποίους έφεραν μεταλλαγμένα γονίδια IGHV (ομολογία προς το συγγενέστερο μη αναδιαταγμένο γονίδιο IGHV < 98%) και 10 αμετάλλακτα γονίδια IGHV. Οι ασθενείς είτε δεν είχαν πάρει ποτέ θεραπεία, είτε είχαν σταματήσει τη θεραπεία τουλάχιστον πριν από 6 μήνες. Τα δημογραφικά, κλινικά και βιολογικά δεδομένα για το σύνολο των ασθενών φαίνονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8. Δημογραφικά, κλινικά και βιολογικά δεδομένα για το σύνολο των ασθενών

Παράμετρος	Αριθμός
Στάδιο Binet κατά τη διάγνωση	
A	18
B	2
C	1
Έκφραση CD38¹	
Θετική	7
Αρνητική	14
Έκφραση επιφανειακής Ig	
MD	21
G	0
Status μεταλλάξεων γονιδίων IGHV	
Μεταλλαγμένα	11
Αμετάλλακτα	10
Πρόοδος Νόσου	
Προοδευτική	7
Σταθερή	14

1: όριο θετικότητας >7%

3.2.2 Μεθοδολογία

Αρχικά απομονώθηκαν CD19⁺ κύτταρα από δείγματα αίματος και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες υγρής καλλιέργειας με τους κατάλληλους προσδέτες. Στη συγκεκριμένη μελέτη προτιμήθηκε η αρνητική έναντι της θετικής επιλογής με αντί-CD19 αντισώματα ώστε ν' αποφευχθεί το ενδεχόμενο ενεργοποίησης των Β λεμφοκυττάρων μέσω του συν-υποδοχέα CD19. Τα κύτταρα διεγέρθηκαν με κατάλληλους προσδέτες και τα αποτελέσματα της ενεργοποίησης των κυττάρων μέσω των BcR, TLR7 και TLR9 μεμονωμένα ή σε συνδυασμό εκτιμήθηκαν με προσδιορισμό των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης ERK (pERK). Η επιλογή της pERK βασίσθηκε σε προηγούμενες μελέτες που ανέδειξαν το σημαντικό ρόλο της pERK στην ενδοκυττάρια μεταβίβαση του σήματος στα κύτταρα της ΧΛΛ^{198,196,199,200,201,202}. Η επαγωγή της απόπτωσης μετά τη διέγερση των κυττάρων της ΧΛΛ μέσω των BcR, TLR7 και TLR9 μεμονωμένα ή σε συνδυασμό εκτιμήθηκε με προσδιορισμό των δύο ισομορφών της κασπάσης 8 (ενεργός και ανενεργός ισομορφή), μιας σημαντικής εναρκτήριας κασπάσης στην επαγόμενη από υποδοχέα απόπτωση, και της PARP [ολική πρωτεΐνη και το προϊόν πρωτεολυτικής πέψης αυτής, (cleaved PARP fragment)], μιας πυρηνικής πρωτεΐνης σημαντικής για την επιδιόρθωση του DNA και την προστασία της ακεραιότητας του γονιδιώματος, με την τεχνική της ανοσοανίχνευσης Western και τη χρήση κατάλληλων μονοκλωνικών αντισωμάτων.

3.2.2.1 Απομόνωση CD19+ κυττάρων από δείγμα αίματος ασθενών με ΧΛΛ

Χρησιμοποιήθηκε το Human B-cell enrichment cocktail kit (Rossette Sep, StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada). Το kit περιλαμβάνει μείγμα μονοκλωνικών αντισωμάτων (αντι-CD2, CD3, CD16, CD36, CD56, CD66b) και γλυκοφορίνης A που σχηματίζουν τετραμερή και συνδέουν τα μη επιθυμητά λευκοκύτταρα με τα ερυθροκύτταρα με τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό ανοσοροζетών που καθιζάνουν (Εικόνα 14). Οι ανοσοροζетές στη συνέχεια καθιζάνουν μετά από φυγοκέντρηση σε βαθμίδωση πυκνότητας με τη χρήση φικόλλης (Ficoll-Paque™ PLUS) και τα CD19⁺ κύτταρα συλλέγονται από τη στοιβάδα μεταξύ πλάσματος και

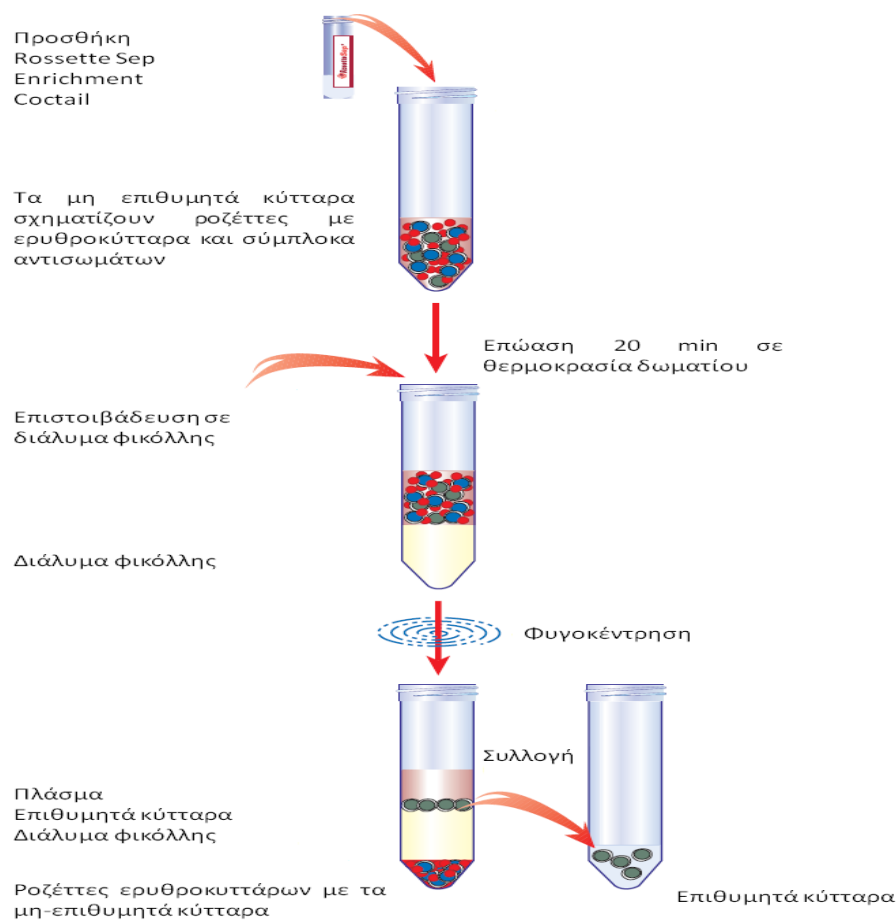
φικόλλης (Εικόνα 15). Η συγκέντρωση των CD19⁺ κυττάρων στο τελικό εναιώρημα προσδιορίζεται με κυτταρομετρητή ροής.



Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση αρνητικής επιλογής επιθυμητού πληθυσμού με τη μέθοδο σχηματισμού ανοσοροζετών. Η πρόσδεση των μονοκλωνικών αντισωμάτων στην επιφάνεια των ανεπιθύμητων λευκοκυττάρων έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ροζετών με τα ερυθροκύτταρα.

Διαδικασία

- Προσθήκη 50μl RosetteSep® Human B Cell Enrichment Cocktail για κάθε ml ολικού αίματος. Ήπια ανάδευση.
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά.
- Προσθήκη ίσου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος [Phosphate buffered saline (PBS) + 2% Fetal calf serum (FCS)]. Ήπια ανάδευση.
- Επιστοιβάδευση σε φικόλλη πυκνότητας 1,077 g/ml με ιδιαίτερη προσοχή ώστε να εξασφαλίζεται ότι δεν υπάρχει ανάμειξη του μέσου επιστοιβάδευσης με το δείγμα.
- Φυγοκέντρηση σε 2400rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Συλλογή στοιβάδας επιθυμητών κυττάρων που βρίσκονται μεταξύ πλάσματος και φικόλλης (Εικόνα 15).
- Προσθήκη 10ml διαλύματος PBS + 2% FBS. Φυγοκέντρηση του δείγματος μετά από ήπια ανακίνηση σε 2400rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απόρριψη υπερκείμενου.
- Επαναιώριση των κυττάρων και επανάληψη δύο προηγούμενων σταδίων.
- Απόρριψη υπερκείμενου και επαναιώριση των κυττάρων σε 1ml PBS.
- Μέτρηση των κυττάρων σε αυτόματο αιματολογικό αναλυτή
- Μέτρηση των CD19⁺ κυττάρων με κυτταρομετρητή ροής BD FACS CANTO. Η ανάλυση βασίστηκε στο λογισμικό BD FACS DIVA (BD, Franklin Lakes, NJ USA).



Εικόνα 15. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας απομόνωσης CD19+ κυττάρων με το Human B-cell Enrichment kit.

3.2.2.2 Διέγερση των υποδοχέων BcR, TLR7 και TLR9 σε CD19+ κύτταρα

Τα CD19+ κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε υγρή καλλιέργεια στους 37⁰C σε ατμόσφαιρα CO₂ 5% με καταλλήλους προσδέτες (ligands) και για συγκεκριμένα χρονικά στιγμιότυπα (Πίνακας 9). Ο BcR διεγέρθηκε με πολυκλωνικό αντι-IgM Fc αντίσωμα σε συγκέντρωση 20 μg/ml, (Thermo Scientific, Massachusetts, USA), ο TLR7 με συνθετικό μόριο, τύπου ιμιδαζοκινολίνης, Imiquimod - R837 (Im), σε συγκέντρωση 0,1 μg/ml (Invivogen), και ο TLR9 με συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που περιέχουν μη μεθυλιωμένες νησίδες κυτοσίνης γουανίνης, CpG-ODN 2006 (stimulatory CpG-ODN type B, human-specific) σε συγκέντρωση 2,5 μg/ml, (Invivogen). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε ανεξάρτητες καλλιέργειες για 15, 50 και 60 λεπτά για τα πειράματα ενεργοποίησης και 48 ώρες για τα πειράματα επαγωγής της απόπτωσης. Σε κάθε περίπτωση τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν (i) χωρίς διεγέρτη, (ii) παρουσία

αντι-IgM, CpG ή Im μεμονωμένα και (iii) με σύγχρονη παρουσία αντι-IgM και CpG ή αντι-IgM και Im (Πίνακας 9).

Πίνακας 9. Τύπος και διάρκεια διέγερσης

Προσδέτης	Διάρκεια διέγερσης			
	15λεπτά	50λεπτά	60λεπτά	48ώρες
Χωρίς προσδέτη	+	+	+	+
Αντι-IgM	+	+		+
CpG		+	+	+
Imiquimod		+	+	+
Αντι-IgM και CpG		+		+
Αντι-IgM και Imiquimod		+		+

Διαδικασία

- Επαναδιάλυση των CD19+ κυττάρων σε θρεπτικό υλικό RPMI Complete (RPMI 1640 με 2 mmol/l L-glutamine, 10% FCS και 15 µg/ml gentamicin) σε τελική συγκέντρωση 3×10^6 κύτταρα ανά ml θρεπτικού υλικού.
- Μεταφορά 2 ml κυτταρικού εναιωρήματος σε κάθε πηγαδάκι σε πλάκα με 24 πηγαδάκια.
- Προσθήκη κατάλληλου προσδέτη (ή συνδυασμού προσδετών) σε κάθε πηγαδάκι.
- Τοποθέτηση σε κλίβανο στους 37°C σε ατμόσφαιρα CO₂ 5%. Επώαση για 15, 50 και 60 λεπτά για τα πειράματα ενεργοποίησης των κυττάρων και για 48 ώρες για τη μελέτη της απόπτωσης (Πίνακας 9).

3.2.2.3 Συλλογή κυττάρων

Στο τέλος κάθε επώασης ακολούθησε η λήψη του κυτταρικού εκχυλίσματος (harvesting). Κυτταρικό εκχύλισμα παραλήφθηκε επίσης από CD19+ κύτταρα πριν από κάθε καλλιέργεια από κάθε περίπτωση ΧΛΛ. Ολικές κυτταρικές πρωτεΐνες απομονώθηκαν από τα CD19+ κύτταρα χρησιμοποιώντας διάλυμα λύσης που περιείχε 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 μίγμα αναστολέων πρωτεασών που συμπεριλάμβανε Leupeptin (200mM) και PMSF (5µg/ml) καθώς και φωσφατάσες (Na₃VO₄) (1mM) (Πίνακας 10). Οι αναστολείς πρωτεασών, PMSF και Leupeptin, καθώς και ο αναστολέας των φωσφατασών Na₃VO₄ προστίθεντο στο διάλυμα λύσης αμέσως πριν από τη χρήση του.

Πίνακας 10. Σύσταση του διαλύματος λύσης των κυττάρων (Lysis Buffer)

Αντιδραστήριο	Όγκος
Tris(1M , pH=7,4)	1 ml
NaCl (5M)	1 ml
EDTA (0,5M , pH=8)	100 μ l
NaF (200mM)	250 μ l (τελική συγκέντρωση:1mM)
1% Triton X-100	500 μ l
Glycerol	5 ml (τελική συγκέντρωση: 10%)
10% SDS	500 μ l (τελική συγκέντρωση: 0,1%)
Sodium deoxycholate	0,25 gr
ddH ₂ O	Έως τελικό όγκο 50ml
Τελικός όγκος	50 ml

Διαδικασία

- Συλλογή της κυτταροκαλλιέργειας σε σωληνάριο erpendorf
- Φυγοκέντρηση στις 5000 rpm στους 4⁰C για 5 λεπτά
- Απομάκρυνση υπερκειμένου
- Προσθήκη 1000 μ l PBS (1X) και φυγοκέντρηση στις 5000 rpm στους 4⁰C για 5 λεπτά
- Απομάκρυνση υπερκειμένου
- Προσθήκη 1000 μ l PBS (1X) και φυγοκέντρηση στις 5000 rpm στους 4⁰C για 5 λεπτά
- Απομάκρυνση όλης της ποσότητας του PBS
- Τοποθέτηση των δειγμάτων στον πάγο
- Επαναδιάλυση του ιζήματος σε διάλυμα λύσης σε συγκέντρωση 20 μ l ανά 3X10⁶ κύτταρα
- Επώαση στον πάγο για 15 λεπτά
- Φυγοκέντρηση διαλυμένων κυττάρων στις 14000 rpm στους 4⁰C για 15 λεπτά
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε παγωμένα σωληνάρια erpendorfs
- Αποθήκευση πρωτεϊνών στους -80⁰C

3.2.2.4 Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών

Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών έγινε με τη χρήση της μεθόδου Bradford (Coomassie Plus Bradford Assay Kit, Pierce Biotechnology, Rockford, USA). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η αλβουμίνη σε οκτώ διαφορετικές συγκεντρώσεις (εύρος 2.000-25 μ g/ml). Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο (DU 730 UV/Vis Spectrophotometer, Beckman Coulter International SA, Nyon, Switzerland), στα 595nm.

3.2.2.5 Αναζήτηση pERK, caspase 8 και PARP με την τεχνική της ανοσοανίχνευσης Western

Η τεχνική περιλαμβάνει ηλεκτροφόρηση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος για διαχωρισμό των πρωτεϊνών, μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF, σύνδεση της ζητούμενης πρωτεΐνης με κατάλληλο αντίσωμα και ανίχνευση του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος με τεχνική ενισχυμένης χημειοφωταύγειας.

A. SDS-Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Τριάντα μικρογραμμάρια πρωτεϊνικού εκχυλίσματος αναμίχθηκαν με 10μl NuPAGE LDS sample buffer (Invitrogen, Paisley, UK) και 4μl NuPAGE Reducing buffer (Invitrogen, Paisley, UK) σε τελικό όγκο 40μl (αναγωγικές συνθήκες), ακολούθησε αποδιάταξη στους 70°C για 10 λεπτά και μεταφορά σε πηκτή 10% NuPAGE Bis-Tris (Invitrogen, Paisley, UK). Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε σε τάση 180 V (αναμενόμενη ένταση ηλεκτρικού ρεύματος: 120-125 mA αρχικά, 60-80 mA τελικά) για 110 λεπτά με κατάλληλη τοποθέτηση του ρυθμιστικού διαλύματος NuPAGE MOPS (1X) (Invitrogen, Paisley, UK) στους θαλάμους της ηλεκτροφορητικής συσκευής XCell SureLock (Invitrogen, Paisley, UK) και προσθήκη 500μl διαλύματος Antioxidant (Invitrogen, Paisley, UK) στον εσωτερικό θάλαμο της συσκευής. Σε κάθε μεμβράνη, χρησιμοποιήθηκε ένας δείκτης μεγεθών που αποδίδει χαρακτηριστικές έγχρωμες ζώνες για διαφορετικά μοριακά βάρη κατά την ηλεκτροφόρηση (SeeBlue 2 Plus Prestained standard), όπως επίσης κι ένας δείκτης με δυνατότητα να φθορίζει μετά από έκθεση σε υπεριώδη (UV) ακτινοβολία (MagicMark™ XP).

B. Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης έγινε μεταφορά και καθήλωση των ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένων μορίων σε μεμβράνη PVDF (BioRad, USA) με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Η καθήλωση πραγματοποιείται με υγρή μεταφορά (wet transfer), παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς (transfer buffer), με εφαρμογή τάσης 40 V για δύο ώρες (Πίνακας 11, Εικόνα 16).

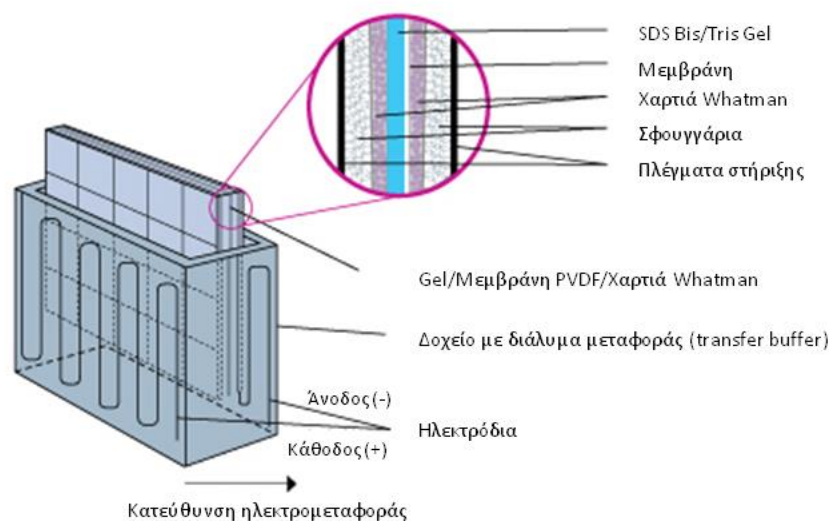
Πίνακας 11. Σύσταση διαλύματος μεταφοράς

Αντιδραστήρια	Όγκοι
NuPAGE Transfer Buffer 20X	50 ml
NuPAGE Antioxidant	1 ml
Μεθανόλη	100 ml
dH ₂ O	έως τελικό όγκο 1000 ml
Τελικός όγκος	1000 ml

Διαδικασία

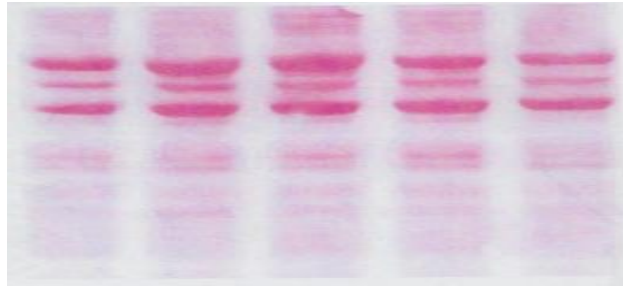
- Προετοιμασία διαλύματος μεταφοράς.
- Τοποθέτηση της μεμβράνης PVDF σε δοχείο με μεθανόλη για 10 λεπτά.
- Πλύσιμο με dH₂O και στη συνέχεια με το διάλυμα μεταφοράς.
- Τοποθέτηση της μεμβράνης PVDF, 2 χαρτιών Whatman και 4 σφουγγαριών σε διάλυμα μεταφοράς.
- Προσθήκη διαλύματος μεταφοράς μόνο στον εσωτερικό θάλαμο.
- Εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου 40 V για 2-2,5 ώρες.

Ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών



Εικόνα 16. Σχηματική απεικόνιση διάταξης για την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών.

Η επιτυχία ή μη της ηλεκτρομεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη, ελέγχθηκε με χρώση της μεμβράνης PVDF με χρωστική Ponceau S, που χρωματίζει όλες τις πρωτεΐνες (Εικόνα 17). Στη συνέχεια η μεμβράνη αποχρωματίσθηκε με πλύση με dH₂O και στη συνέχεια με PBS Tween.



Εικόνα 17. Έλεγχος επιτυχούς ηλεκτρομεταφοράς των πρωτεϊνών με χρώση Ponceau S.

Γ. Ανοσοανίχνευση

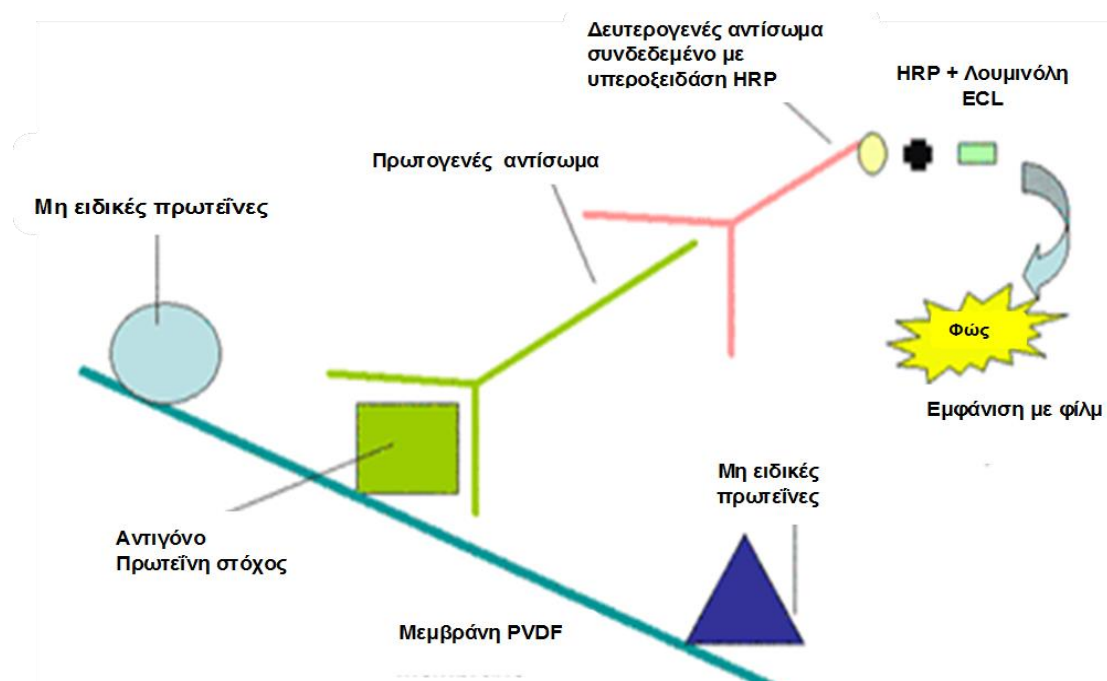
Η ανοσοανίχνευση βασίζεται στη σύνδεση της ζητούμενης πρωτεΐνης με κατάλληλο αντίσωμα και την ανίχνευση του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος με τεχνική ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Η τεχνική βασίζεται στη δράση της υπεροξειδάσης (Horseradish peroxidase, HRP), η οποία σε αλκαλικό περιβάλλον παρουσία H_2O_2 και χημικών ενισχυτών όπως οι φαινόλες προκαλεί οξείδωση της λουμινόλης. Η οξειδωμένη λουμινόλη μεταπίπτει σταδιακά σε πιο σταθερή ενεργειακά κατάσταση με ταυτόχρονη εκπομπή φωτονίων. Η ανίχνευση επιτυγχάνεται με έκθεση της μεμβράνης σε φιλμ ευαίσθητο στο φως (Εικόνα 18). Το είδος και οι συγκεντρώσεις των μονοκλωνικών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ελέγχου της ενεργοποίησης και της απόπτωσης των CD19+ κυττάρων αναφέρονται στον Πίνακα 12.

Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση των κυττάρων της ΧΛΛ μετά τη διέγερση των BcR, TLR7 και TLR9, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό, εκτιμήθηκε με προσδιορισμό των επιπέδων του αθροίσματος της φωσφορυλιωμένης ERK1 και ERK2 (pERK) με μονοκλωνικό αντίσωμα που ανιχνεύει και τις δύο φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες ως ζώνες μεγέθους 44kD και 42kD αντιστοίχως (Πίνακας 12). Σε επιλεγμένες περιπτώσεις προσδιορίστηκαν και τα επίπεδα της ολικής ERK. Η επαγωγή της απόπτωσης εκτιμήθηκε με την χρησιμοποίηση (i) μονοκλωνικού αντισώματος που ανιχνεύει την ενεργό (18kD) και ανενεργό (55kD) ισομορφή της κασπάσης 8 και (ii) μονοκλωνικού αντισώματος που ανιχνεύει την ολική πρωτεΐνη PARP (116kD) αλλά και το προϊόν πρωτεολυτικής πέψης της PARP (89kD) (Πίνακας 12). Σε κάθε περίπτωση, τα επίπεδα της πρωτεΐνης εκφράστηκαν σε σχέση με τα επίπεδα της ακτίνης στο ίδιο δείγμα. Για το σκοπό αυτό, μετά τον πρώτο προσδιορισμό της

πρωτεΐνης ακολούθησε αποχρωματισμός (stripping) της μεμβράνης και ανοσοανίχνευση της ακτίνης.

Πίνακας 12. Κατάλογος μονοκλωνικών αντισωμάτων

Μονοκλωνικό αντίσωμα	Εταιρεία	Αραίωση
Mouse anti-human pERK	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:500
Mouse anti-human ERK	Invitrogen, Paisley, UK	1:5000
Mouse anti-human β-ακτίνη	Sigma-Aldrich, USA	1:5000
Mouse anti-human PARP	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:500
Mouse anti-caspase 8	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:500
anti- Mouse HRP	Thermo	1:5000



Εικόνα 18. Σχηματική απεικόνιση τεχνικής ανοσοανίχνευσης με χημειοφωταύγεια.

Διαδικασία

1. Ανοσοαντίδραση

- Δέσμευση μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων, με επώαση της μεμβράνης σε 5% αποβουτυρωμένο γάλα, διαλυμένο σε PBS με

περιεκτικότητα 0,001% Tween (PBS-Tween) για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

- Επώαση πρωτογενούς μονοκλωνικού αντισώματος σε γάλα για 16 ώρες (overnight) στους 4°C. Το είδος και οι συγκεντρώσεις των μονοκλωνικών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ελέγχου της ενεργοποίησης και της απόπτωσης των CD19+ κυττάρων αναφέρονται στον Πίνακα 12.
- Πλύσιμο της μεμβράνης με 8ml PBS-Tween για 5 λεπτά.
- Επανάληψη του προηγούμενου βήματος για άλλες δύο φορές.
- Επώαση με το διαλυμένο σε γάλα δευτερογενές μονοκλωνικό IgG αντίσωμα, το οποίο είναι συνδεδεμένο με υπεροξειδάση (anti-mouse HRP Pierce, Rockford, IL 1:10000) για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πλύσιμο της μεμβράνης με 8ml PBS-Tween για 5 λεπτά.
- Επανάληψη του προηγούμενου βήματος για άλλες δύο φορές.

2. Ανίχνευση του σήματος

- Ανάμειξη ίσων όγκων 1:1 διαλυμάτων SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate Thermo (stable peroxide solution & Luminol/Enhancer)
- Επώαση της μεμβράνης στο διάλυμα για 5 λεπτά.
- Στέγνωμα με χαρτί Whatman
- Τοποθέτηση στην κασέτα. Έκθεση σε film ευαίσθητο στο φως ανάλογα με την ένταση του σήματος: 13 λεπτά για την pERK, 5 λεπτά για την PARP και τη κασπάση 8 και 1 λεπτό για την ακτίνη.
- Εμφάνιση του αποτελέσματος της αντίδρασης χημειοφωταύγειας σε φιλμ αυτοραδιογραφίας x-ray KODAK σε σκοτεινό θάλαμο, με χρήση κατάλληλου εμφανιστικού υγρού (developer) και μονιμοποιητή (fixer) (AGFA). Οι πρωτεϊνικές ζώνες αποτυπώνονται στο φωτογραφικό φιλμ ως ζώνες αμαύρωσης στα σημεία που έχουν ηλεκτροφορηθεί.

3. Αποχρωματισμός μεμβράνης (Stripping)

- Πλύσιμο μεμβράνης με PBS Tween για 5 λεπτά
- Επανάληψη προηγούμενου σταδίου
- Επώαση με stripping buffer για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
- Πλύσιμο μεμβράνης με PBS Tween για 5 λεπτά
- Επανάληψη προηγούμενου σταδίου
- Επαναχρησιμοποίηση της μεμβράνης για τον ανοσοπροσδιορισμό επόμενης πρωτεΐνης

Δ. Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Image J (<http://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots->

[with-image-j/](#)). Αρχικά έγινε σάρωση των φιλμ και ακολούθησε επεξεργασία της ψηφιοποιημένης εικόνας με το παραπάνω πρόγραμμα. 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 Image J. Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως λόγος του εμβαδού της επιφάνειας κάθε ζώνης προς το εμβαδό της αντίστοιχης επιφάνειας της ζώνης της β-ακτίνης. Προκειμένου να εξακριβωθεί αν τα δείγματα που μελετήθηκαν ανταποκρίθηκαν σε μια δεδομένη διέγερση χρησιμοποιήθηκε ως όριο (cut off) η αύξηση πάνω από $\times 1,2$ στο επίπεδο έκφρασης της πρωτεΐνης σε σύγκριση με το αντίστοιχο μη διεγερμένο κοντρόλ ελέγχου²⁰⁰.

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 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. Ο χρόνος μέχρι την έναρξη της θεραπείας (time to treatment, TTT) μετρήθηκε από τη διάγνωση μέχρι την ημερομηνία έναρξης της πρώτης θεραπείας, 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, proportional hazard multivariate regression analysis) για την τελική εκτίμηση της προγνωστικής σημασίας των διαφόρων παραγόντων που μελετήθηκαν. Όλες οι αναλύσεις έγιναν σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

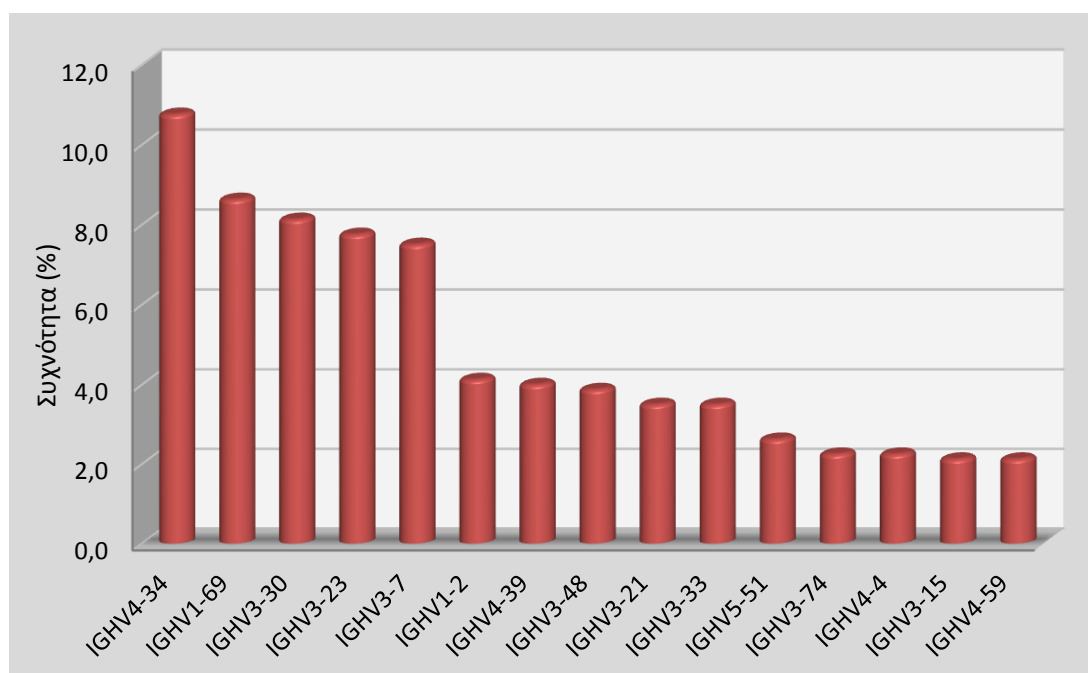
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Ανάλυση κλωνικών αναδιατάξεων των γονιδίων της μεταβλητής περιοχής της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών στη ΧΛΛ

4.1.1 Ρεπερτόριο γονιδίων IGHV, IGHD και IGHJ

Κλωνικές αναδιατάξεις IGHV-IGHD-IGHJ ανιχνεύθηκαν και στους 799 ασθενείς με ΧΛΛ της παρούσας μελέτης. Όλες οι αναδιατάξεις ήταν εντός πλαισίου ανάγνωσης. Αναγνωρίστηκαν γονίδια και των επτά υποομάδων IGHV. Σε επίπεδο υποομάδων, συχνότερα αναδιατάσσονταν τα γονίδια της υποομάδας IGHV3. Συγκεκριμένα, γονίδια της υποομάδας IGHV3 ανιχνεύθηκαν σε 404/799 αναδιατάξεις (50,6%) και ακολουθούσαν τα γονίδια των υποομάδων IGHV4 (184/799 αναδιατάξεις, 23%) και IGHV1 (154/799 αναδιατάξεις, 19,3%). Στο σύνολο των αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ αναγνωρίστηκαν 42 διαφορετικά γονίδια IGHV. Η ανάλυση ρεπερτορίου ανέδειξε ισχυρή επιλεκτικότητα στη χρήση συγκεκριμένων γονιδίων IGHV, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες^{175,154}. Συχνότερα ήταν τα γονίδια IGHV4-34, IGHV1-69, IGHV3-30, IGHV3-23, IGHV3-7, IGHV1-2, IGHV4-39 και IGHV3-48 (Εικόνα 19, Πίνακας 13).



Εικόνα 19. Σχηματική απεικόνιση των συχνότερων γονιδίων IGHV στην παρούσα σειρά.

Πίνακας 13. Αριθμός αναδιατάξεων και συχνότητα γονιδίων IGHV στην παρούσα σειρά.

Γονίδιο IGHV	Αριθμός αναδιατάξεων	Συχνότητα (%)
IGHV1-18	12	1,5
IGHV1-2	33	4,1
IGHV1-24	1	0,1
IGHV1-3	13	1,6
IGHV1-46	11	1,4
IGHV1-58	3	0,4
IGHV1-69	69	8,6
IGHV1-8	12	1,5
IGHV2-26	2	0,3
IGHV2-5	12	1,5
IGHV3-11	14	1,8
IGHV3-13	3	0,4
IGHV3-15	17	2,1
IGHV3-20	4	0,5
IGHV3-21	28	3,5
IGHV3-23	62	7,8
IGHV3-30	67	8,4
IGHV3-30-3	15	1,9
IGHV3-33	26	3,3
IGHV3-43	4	0,5
IGHV3-48	31	3,9
IGHV3-49	11	1,4
IGHV3-53	10	1,3
IGHV3-64	6	0,8
IGHV3-66	6	0,8
IGHV3-7	60	7,5
IGHV3-72	8	1,0
IGHV3-73	5	0,6
IGHV3-74	18	2,3
IGHV3-9	9	1,1
IGHV4-30-4	5	0,6
IGHV4-31	5	0,6
IGHV4-34	86	10,8
IGHV4-39	32	4,0
IGHV4-4	18	2,3
IGHV4-59	16	2,0
IGHV4-61	12	1,5
IGHV4-b	10	1,3
IGHV5-51	21	2,6
IGHV5-a	9	1,1
IGHV6-1	11	1,4
IGHV7-4-1	2	0,3
ΣΥΝΟΛΟ	799	100

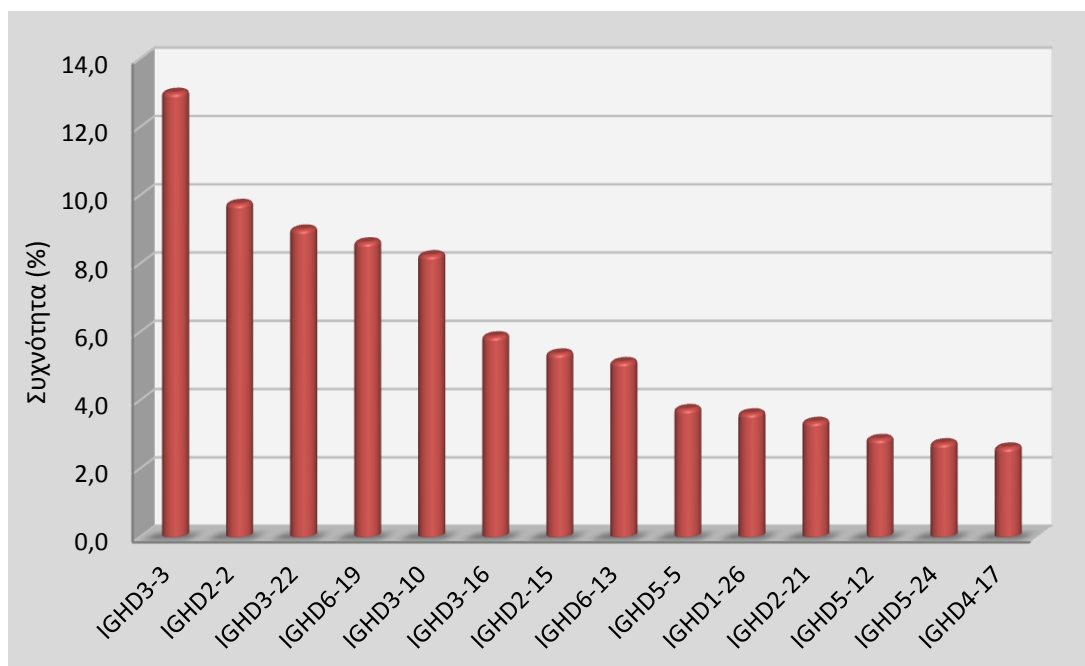
Αναγνωρίστηκαν 26 διαφορετικά γονίδια IGHD που ανήκαν σε 7 υποομάδες. Τα γονίδια της υποομάδας IGHD3 αναδιατάσσονταν συχνότερα (305/799 αναδιατάξεις, 38,2%) ακολουθούμενα από τα γονίδια της υποομάδας IGHD2 (167/799

αναδιατάξεις, 20,9%). Σε 14 από τις 799 αναδιατάξεις δεν αναγνωρίστηκε γονίδιο IGHD. Επιλεκτικότητα παρατηρήθηκε και σε επίπεδο μεμονωμένων γονιδίων IGHD. Συγκεκριμένα, συχνότερα ήταν τα γονίδια IGHD3-3, IGHD2-2, IGHD3-22, IGHD6-19, IGHD3-10 και IGHD3-16 (Εικόνα 20, Πίνακας 14).

Πίνακας 14. Αριθμός αναδιατάξεων και συχνότητα γονιδίων IGHD στην παρούσα σειρά.

Γονίδιο IGHD	Αριθμός αναδιατάξεων	Συχνότητα (%)
IGHD1-1	10	1,3
IGHD1-14	6	0,8
IGHD1-20	1	0,1
IGHD1-26	29	3,6
IGHD1-7	8	1,0
IGHD2-15	43	5,4
IGHD2-2	78	9,8
IGHD2-21	27	3,4
IGHD2-8	19	2,4
IGHD3-10	66	8,3
IGHD3-16	47	5,9
IGHD3-22	72	9,0
IGHD3-3	104	13,0
IGHD3-9	16	2,0
IGHD4-17	21	2,6
IGHD4-23	14	1,8
IGHD4-4	8	1,0
IGHD5-12	23	2,9
IGHD5-18	7	0,9
IGHD5-24	22	2,8
IGHD5-5	30	3,8
IGHD6-13	41	5,1
IGHD6-19	69	8,6
IGHD6-6	18	2,3
IGHD6-25	2	0,3
IGHD7-27	4	0,5
ΔΑ	14	1,8
ΣΥΝΟΛΟ	799	100

*ΔΑ= δεν αναγνωρίστηκαν

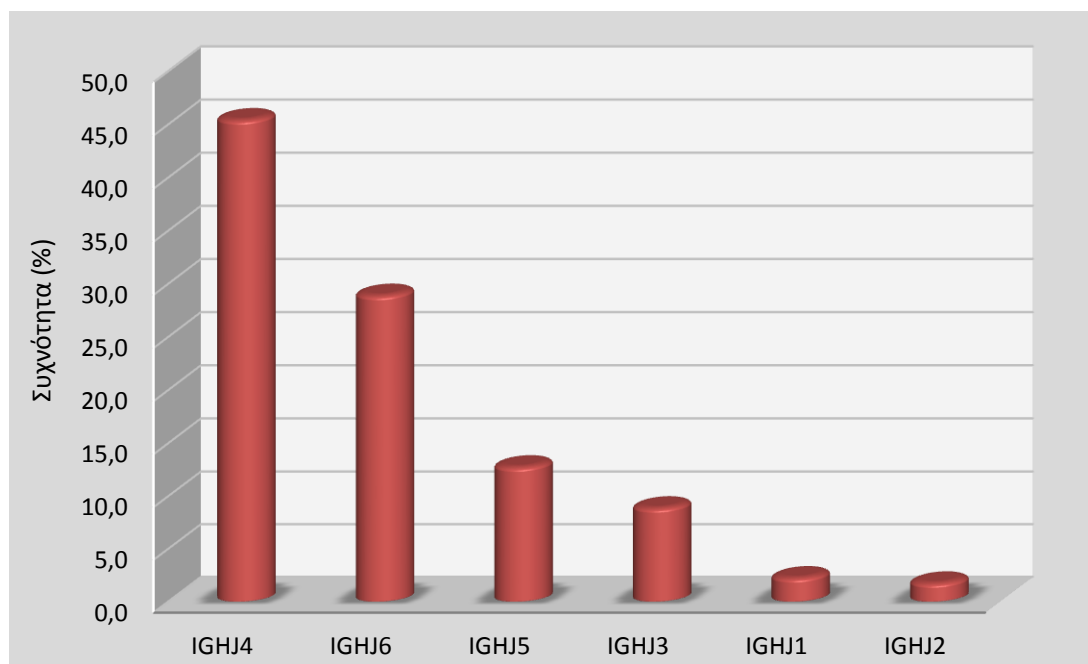


Εικόνα 20. Σχηματική απεικόνιση των συχνότερων γονιδίων IGHD στην παρούσα μελέτη.

Στο σύνολο των αναδιατάξεων αναγνωρίστηκαν και τα 6 γονίδια IGHI. Τα συχνότερα γονίδια IGHI ήταν το IGHI4 που αναγνωρίστηκε σε 363/799 αναδιατάξεις (45,4%) και το IGHI6 (231/799 αναδιατάξεις, 28,9%) (Εικόνα 21, Πίνακας 15).

Πίνακας 15. Αριθμός αναδιατάξεων και συχνότητα γονιδίων IGHI στην παρούσα σειρά.

Γονίδιο IGHI	Αριθμός αναδιατάξεων	Συχνότητα (%)
IGHI1	18	2,3
IGHI2	14	1,8
IGHI3	71	8,9
IGHI4	363	45,4
IGHI5	102	12,8
IGHI6	231	28,9
ΣΥΝΟΛΟ	799	100



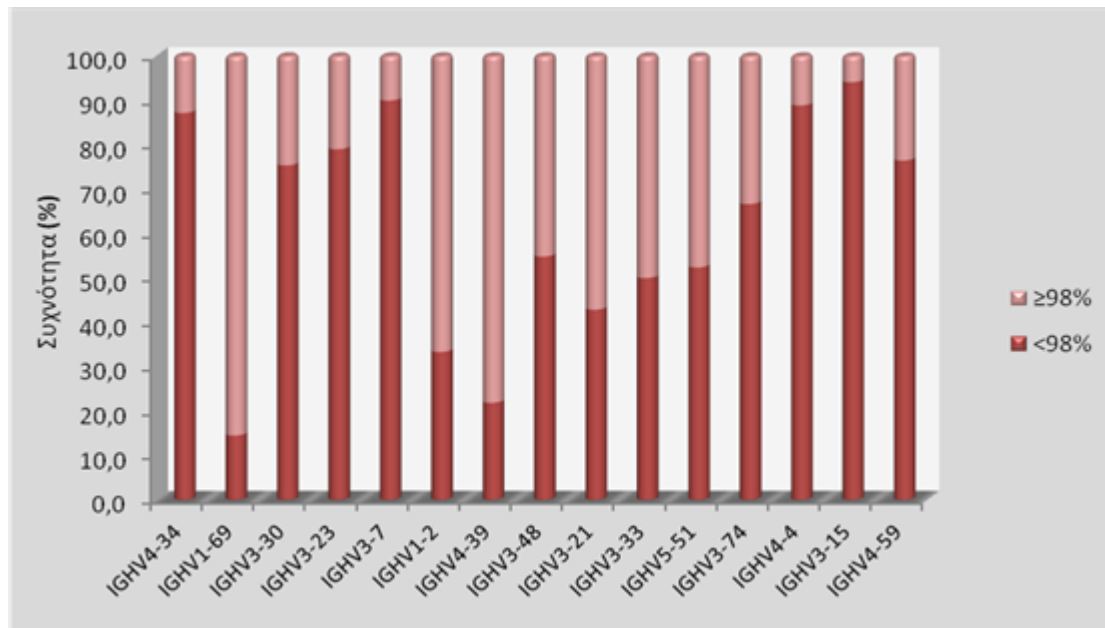
Εικόνα 21. Σχηματική απεικόνιση της συχνότητας των γονιδίων IGHJ στην παρούσα σειρά.

4.1.2 Ανάλυση σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης στις αναδιατάξεις IGHV-IGHD-IGHJ

Οι αναδιατάξεις IGHV-IGHD-IGHJ αρχικά διακρίθηκαν σε αμετάλλακτες (ποσοστό νουκλεοτιδικής ταυτότητας $\geq 98\%$) και μεταλλαγμένες (ποσοστό νουκλεοτιδικής ταυτότητας $< 98\%$) με βάση το γενικά αποδεκτό όριο ομολογίας 98% του γονιδίου IGHV σε σχέση με το αντίστοιχο μη αναδιαταγμένο γονίδιο IGHV (germline gene). Συνολικά, 317/799 (39,7%) αλληλουχίες ήταν αμετάλλακτες και 482/799 (60,3%) μεταλλαγμένες. Παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στη συχνότητα των γονιδίων IGHV στις 2 υποομάδες. Συχνότερα γονίδια στην υποομάδα των μεταλλαγμένων ήταν τα IGHV4-34, IGHV3-7, IGHV3-23 και IGHV3-30, ενώ τα γονίδια IGHV1-69, IGHV4-39, IGHV1-2 και IGHV3-21 υπερίσχυαν στην υποομάδα των αμετάλλακτων σε συμφωνία με όλες τις προηγούμενες μελέτες^{175,154} (Πίνακας 16). Αξιοσημείωτες διαφορές παρατηρήθηκαν ως προς το φορτίο μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV σε υποομάδες αναδιατάξεων που χαρακτηρίζονται από χρησιμοποίηση του ίδιου γονιδίου IGHV. Ειδικότερα, τα γονίδια IGHV1-69, IGHV4-39 και IGHV1-2 ήταν αμετάλλακτα στις περισσότερες αναδιατάξεις IGHV-IGHD-IGHJ, ενώ τα γονίδια IGHV4-34, IGHV3-15 και IGHV3-7 μεταλλαγμένα (Εικόνα 22).

Πίνακας 16. Αριθμός αναδιατάξεων (N) και συχνότητα (%)γονιδίων IGHV στις μεταλλαγμένες (<98%) και αμετάλλακτες (≥98%) αναδιατάξεις.

Γονίδιο IGHV	≥98%		<98%	
	N	(%)	N	(%)
IGHV1-18	5	1,6	7	1,5
IGHV1-2	22	6,9	11	2,3
IGHV1-24	1	0,3	0	0,0
IGHV1-3	9	2,8	4	0,8
IGHV1-46	7	2,2	4	0,8
IGHV1-58	3	0,9	0	0,0
IGHV1-69	58	18,3	11	2,3
IGHV1-8	3	0,9	9	1,9
IGHV2-26	2	0,6	0	0,0
IGHV2-5	3	0,9	9	1,9
IGHV3-11	12	3,8	2	0,4
IGHV3-13	1	0,3	2	0,4
IGHV3-15	1	0,3	16	3,3
IGHV3-20	2	0,6	2	0,4
IGHV3-21	19	6,0	9	1,9
IGHV3-23	14	4,4	48	10,0
IGHV3-30	17	5,4	50	10,4
IGHV3-30-3	8	2,5	7	1,5
IGHV3-33	13	4,1	13	2,7
IGHV3-43	2	0,6	2	0,4
IGHV3-48	14	4,4	17	3,5
IGHV3-49	3	0,9	8	1,7
IGHV3-53	1	0,3	9	1,9
IGHV3-64	5	1,6	1	0,2
IGHV3-66	2	0,6	4	0,8
IGHV3-7	6	1,9	54	11,2
IGHV3-72	2	0,6	6	1,2
IGHV3-73	0	0,0	5	1,0
IGHV3-74	6	1,9	12	2,5
IGHV3-9	6	1,9	3	0,6
IGHV4-30-4	1	0,3	4	0,8
IGHV4-31	0	0,0	5	1,0
IGHV4-34	11	3,5	75	15,6
IGHV4-39	25	7,9	7	1,5
IGHV4-4	2	0,6	16	3,3
IGHV4-59	4	1,3	12	2,5
IGHV4-61	3	0,9	9	1,9
IGHV4-b	5	1,6	5	1,0
IGHV5-51	10	3,2	11	2,3
IGHV5-a	7	2,2	2	0,4
IGHV6-1	1	0,3	10	2,1
IGHV7-4-1	1	0,3	1	0,2
ΣΥΝΟΛΟ	317	100	482	100

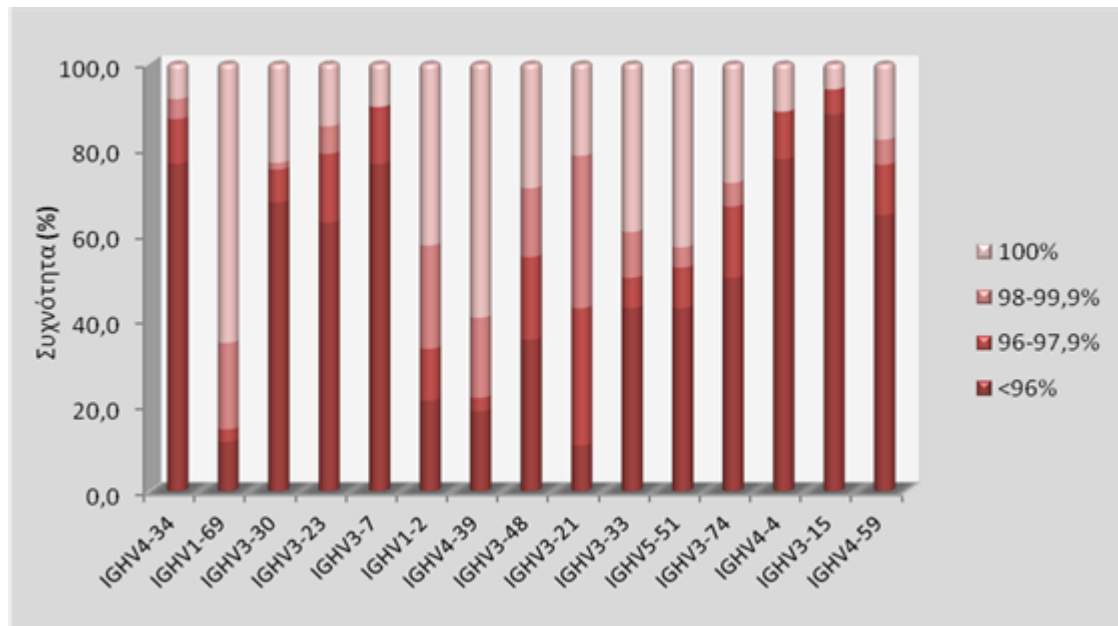


Εικόνα 22. Κατανομή των 15 συχνότερων γονιδίων IGHV στις μεταλλαγμένες (<98%) και αμετάλλακτες (≥98%) αναδιατάξεις.

Στη συνέχεια, οι αναδιατάξεις με ομολογία $\geq 98\%$ διακρίθηκαν περαιτέρω σε «πραγματικά αμετάλλακτες» με ομολογία 100% (232/799, 29%) και «ελάχιστα μεταλλαγμένες» με ομολογία 98-99,9% (85/799, 10,6%), ενώ οι αναδιατάξεις με ομολογία <98% διακρίθηκαν σε «οριακά μεταλλαγμένες» με ομολογία 96-97,9% (84/799, 10,5%) και «πολύ μεταλλαγμένες» με ομολογία <96% (398/799, 49,8%). Η κατανομή των γονιδίων IGHV στις δύο πρώτες υποομάδες (πραγματικά αμετάλλακτες και ελάχιστα μεταλλαγμένες) ήταν γενικά παρόμοια, με συχνότερα γονίδια τα IGHV1-69, IGHV4-39 και IGHV1-2 και στις δύο υποομάδες. Μοναδική εξαίρεση παρουσίασε το γονίδιο IGHV3-21, που ήταν συχνό στην υποομάδα με τις ελάχιστα μεταλλαγμένες και λιγότερο συχνό στις πραγματικά αμετάλλακτες (13/85 (15,3%) και 6/232 (2,6%) αναδιατάξεις, αντιστοίχως, $p < 0,0001$) (Πίνακας 17). Παρόμοια κατανομή παρουσίασαν επίσης τα γονίδια IGHV στις δύο υποομάδες με οριακά και πολύ μεταλλαγμένες αναδιατάξεις, με συχνότερα τα γονίδια IGHV4-34, IGHV3-7 και IGHV3-23 και στις δύο υποομάδες. Μοναδική εξαίρεση και σε αυτή τη σύγκριση παρουσίασε το γονίδιο IGHV3-21 που ήταν συχνό στην υποομάδα με οριακά μεταλλαγμένες και σπάνιο στις πολύ μεταλλαγμένες (7/84 (8,3%) και 2/398 (0,5%) αναδιατάξεις, αντιστοίχως, $p < 0,0001$) (Πίνακας 17, Εικόνα 23).

Πίνακας 17. Αριθμός περιπτώσεων και συχνότητα των γονιδίων IGHV στις 4 υποομάδες αναδιατάξεων με διαφορετικό φορτίο μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV(<96%, 96-97,9%, 98-99,9%, 100%)

Γονίδιο IGHV	<96%		96-97,9%		98-99,9%		100%	
	N	%	N	%	N	%	N	%
IGHV1-18	4	1,0	3	3,6	3	3,5	2	0,9
IGHV1-2	7	1,8	4	4,8	8	9,4	14	6,0
IGHV1-24	0	0,0	0	0,0	1	1,2	0	0,0
IGHV1-3	4	1,0	0	0,0	0	0,0	9	3,9
IGHV1-46	4	1,0	0	0,0	1	1,2	6	2,6
IGHV1-58	0	0,0	0	0,0	1	1,2	2	0,9
IGHV1-69	10	2,5	1	1,2	14	16,5	44	19,0
IGHV1-8	9	2,3	0	0,0	1	1,2	2	0,9
IGHV2-26	0	0,0	0	0,0	1	1,2	1	0,4
IGHV2-5	8	2,0	1	1,2	1	1,2	2	0,9
IGHV3-11	1	0,3	1	1,2	0	0,0	12	5,2
IGHV3-13	2	0,5	0	0,0	0	0,0	1	0,4
IGHV3-15	15	3,8	1	1,2	0	0,0	1	0,4
IGHV3-20	2	0,5	0	0,0	0	0,0	2	0,9
IGHV3-21	2	0,5	7	8,3	13	15,3	6	2,6
IGHV3-23	40	10,1	8	9,5	5	5,9	9	3,9
IGHV3-30	46	11,6	4	4,8	2	2,4	15	6,5
IGHV3-30-3	6	1,5	1	1,2	0	0,0	8	3,4
IGHV3-33	10	2,5	3	3,6	3	3,5	10	4,3
IGHV3-43	0	0,0	2	2,4	1	1,2	1	0,4
IGHV3-48	10	2,5	7	8,3	6	7,1	8	3,4
IGHV3-49	6	1,5	2	2,4	2	2,4	1	0,4
IGHV3-53	6	1,5	3	3,6	0	0,0	1	0,4
IGHV3-64	1	0,3	0	0,0	3	3,5	2	0,9
IGHV3-66	4	1,0	0	0,0	1	1,2	1	0,4
IGHV3-7	47	11,8	7	8,3	0	0,0	6	2,6
IGHV3-72	5	1,3	1	1,2	2	2,4	0	0,0
IGHV3-73	5	1,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0
IGHV3-74	9	2,3	3	3,6	1	1,2	5	2,2
IGHV3-9	2	0,5	1	1,2	0	0,0	6	2,6
IGHV4-30-4	4	1,0	0	0,0	0	0,0	1	0,4
IGHV4-31	5	1,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0
IGHV4-34	66	16,6	9	10,7	4	4,7	7	3,0
IGHV4-39	5	1,3	2	2,4	5	5,9	20	8,6
IGHV4-4	14	3,5	2	2,4	0	0,0	2	0,9
IGHV4-59	10	2,5	2	2,4	0	0,0	4	1,7
IGHV4-61	7	1,8	2	2,4	1	1,2	2	0,9
IGHV4-b	3	0,8	2	2,4	0	0,0	5	2,2
IGHV5-51	9	2,3	2	2,4	1	1,2	9	3,9
IGHV5-a	2	0,5	0	0,0	3	3,5	4	1,7
IGHV6-1	8	2,0	2	2,4	1	1,2	0	0,0
IGHV7-4-1	0	0,0	1	1,2	0	0,0	1	0,4
ΣΥΝΟΛΟ	398	100	84	100	85	100	232	100



Εικόνα 23. Κατανομή των 15 συχνότερων γονιδίων IGHV στις 4 υποομάδες με διαφορετικό φορτίο μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV(<96%, 96-97,9%, 98-99,9%, 100%).

4.1.3 Ανάλυση σημειακών μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV

Ανάλυση των σημειακών μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV πραγματοποιήθηκε στις 567 αναδιατάξεις με ομολογία <100%. Υπολογίστηκε ο συνολικός αριθμός των μεταλλάξεων, ο τύπος των μεταλλάξεων [σιωπηρές μεταλλάξεις (S) ή μεταλλάξεις αντικατάστασης (R)] αλλά και ο λόγος των μεταλλάξεων αντικατάστασης προς τις σιωπηρές μεταλλάξεις (R/S ratio). Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο σύνολο των γονιδίων IGHV αλλά και σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδίου (π.χ. VH FR1, VH CDR2). Με δεδομένο ότι το μήκος των περιοχών VH FRs και VH CDRs διαφέρει σημαντικά, για τον αντικειμενικό υπολογισμό των λόγων R/S, η κάθε μετάλλαξη «κανονικοποιήθηκε» διαιρούμενη δια του αριθμού των αμινοξικών καταλοίπων της περιοχής στην οποία εντοπίζεται, όπως αναφέρεται αναλυτικά στη μεθοδολογία.

Συνολικά μελετήθηκαν 227971 νουκλεοτίδια σε 567 αναδιατάξεις και αναγνωρίστηκαν 9220 μεταλλάξεις. Η μοριακή μελέτη των μεταλλάξεων ήταν συμβατή με κλασσικό μηχανισμό σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης. Παρατηρήθηκε αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων αντικατάστασης (R) προς σιωπηρές (S). Συγκεκριμένα, αναγνωρίστηκαν 6512 μεταλλάξεις R και 2708 μεταλλάξεις S, ενώ ο λόγος R/S ήταν 2,4. Παρατηρήθηκε αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων R προς S στις

περιοχές VH CDRs σε σύγκριση με τις περιοχές VH FRs (Παράρτημα 1Π₁). Μετά την «κανονικοποίηση» ως προς το μήκος κάθε περιοχής, η μέση τιμή R/S ήταν 4,4 και 1,9 για τις περιοχές VH CDRs και VH FRs, αντιστοίχως (Πίνακας 18).

Πίνακας 18. «Κανονικοποιημένη» κατανομή των μεταλλάξεων αντικατάστασης (R) προς σιωπηρές (S) στις περιοχές VH FRs και VH CDRs.

	VH FR1	VH FR2	VH FR3	VH FRs	VH CDR1	VH CDR2	VH CDRs
R	30,2	43,8	78,4	152,4	139,4	162,6	302,1
S	18,2	23,0	39,7	80,9	32,8	35,6	68,4
R/S	1,7	1,9	2,0	1,9	4,3	4,6	4,4

Οι πουρίνες (A, G) στοχεύονταν συχνότερα από τις πυριμιδίνες (C, T) (πουρίνες/πυριμιδίνες=1,6). Ο λόγος στόχευσης A:G:C:T ήταν 2436:3171:2477:1136 (Παράρτημα 1Π₂). Μετά την «κανονικοποίηση», παρατηρήθηκε αυξημένη στόχευση των μεταλλάξεων σε πουρίνες έναντι πυριμιδινών τόσο στις περιοχές VH CDRs όσο και στις VH FRs με μοναδική εξαίρεση την περιοχή VH FR1 στην οποία παρατηρήθηκε παρόμοια στόχευση πουρινών και πυριμιδινών (Πίνακας 19).

Πίνακας 19. «Κανονικοποιημένη» στόχευση μεταλλάξεων σε πουρίνες, πυριμιδίνες στις περιοχές VH FRs και VH CDRs.

	VH FR1	VH FR2	VH FR3	VH FRs	VH CDR1	VH CDR2	VH CDRs
A	8,0	14,4	35,0	57,4	31,1	74,0	105,1
G	17,2	30,7	37,4	85,4	61,9	60,5	122,4
C	15,0	15,5	35,6	66,1	53,0	28,1	81,1
T	8,1	6,2	10,1	24,4	26,2	35,8	61,9
Π	25,2	45,1	72,5	142,8	93,0	134,4	227,4
π	23,1	21,7	45,7	90,5	79,2	63,8	143,0
Π/π	1,1	2,1	1,6	1,6	1,2	2,1	1,6

A:Αδενίνη, G: Γουανίνη, C: Κυτοσίνη, T: Θυμίνη, Π: πουρίνες, π: πυριμιδίνες

Οι μεταβάσεις (μετατροπή μιας πουρίνης σε πουρίνη ή μιας πυριμιδίνης σε πυριμιδίνη) ήταν συχνότερες από τις μεταπτώσεις (μετατροπή μιας πουρίνης σε πυριμιδίνη και το αντίστροφο). Συνολικά αναγνωρίστηκαν 5255 μεταβάσεις και 3965 μεταπτώσεις (μεταβάσεις/μεταπτώσεις:1,3) (Παράρτημα 1Π₃). Μετά την «κανονικοποίηση», οι μεταβάσεις ήταν συχνότερες από τις μεταπτώσεις τόσο στις περιοχές VH CDRs όσο και στις VH FRs, με εξαίρεση τις περιοχές VH FR1 και VHCDR2

στις οποίες παρατηρήθηκε παρόμοιος αριθμός μεταβάσεων και μεταπτώσεων (Πίνακας 20).

Πίνακας 20. «Κανονικοποιημένη» κατανομή των μεταβάσεων έναντι των μεταπτώσεων στις περιοχές VH FRs και VH CDRs.

	VH FR1	VH FR2	VH FR3	VH FRs	VH CDR1	VH CDR2	VH CDRs
a>g	4,5	9,1	20,3	33,9	15,1	41,1	56,2
g>a	9,6	16,0	18,3	44,0	39,2	29,9	69,1
c>t	7,5	11,4	24,2	43,1	34,2	14,8	49,0
t>c	3,0	4,1	6,2	13,3	15,1	17,8	32,9
a>c	2,0	2,9	6,6	11,5	7,3	17,0	24,4
c>a	2,8	0,8	3,9	7,5	7,2	4,3	11,5
a>t	1,5	2,3	8,2	12,1	8,6	15,9	24,5
t>a	1,3	0,7	2,1	4,1	6,8	11,3	18,2
g>c	6,1	11,6	14,2	32,0	18,0	23,5	41,5
c>g	4,8	3,3	7,4	15,5	11,6	9,0	20,6
g>t	1,5	3,1	4,9	9,5	4,7	7,0	11,7
t>g	3,8	1,4	1,8	7,0	4,2	6,6	10,8
Mβ	24,6	40,6	69,1	134,3	103,7	103,6	207,3
Mπ	23,8	26,2	49,1	99,0	68,5	94,6	163,2
Mβ/Mπ	1,0	1,5	1,4	1,4	1,5	1,1	1,3

a: Αδενίνη, g: Γουανίνη, c: Κυτοσίνη, t: Θυμίνη, Mβ=μεταβάσεις, Mπ=μεταπτώσεις

Στο επόμενο στάδιο, μελετήθηκαν οι μεταλλάξεις των γονιδίων IGHV ξεχωριστά σε καθεμία από τις τρεις υποομάδες με διαφορετικό φορτίο μεταλλάξεων (ελάχιστα, οριακά και πολύ μεταλλαγμένες). Παρατηρήθηκε παρόμοια στόχευση των μεταλλάξεων στις 3 υποομάδες. Ειδικότερα, ο λόγος R/S ήταν 2,4/ 2,2 και 2,5 στις 3 υποομάδες, αντιστοίχως) (Παράρτημα 1Π₄). Παρομοίως, καταγράφηκε αυξημένος λόγος R/S στις περιοχές VH CDRs σε σύγκριση με τις VH FRs και στις 3 υποομάδες (Πίνακας 21).

Οι πουρίνες στοχεύονταν συχνότερα από τις πυριμιδίνες και στις 3 υποομάδες (λόγος πουρινών/πυριμιδινών: 1,5/1,7/1,5, αντιστοίχως), ενώ παρατηρήθηκε αυξημένη στόχευση των μεταλλάξεων σε πουρίνες τόσο στις περιοχές VH CDRs όσο και στις VH FRs, με εξαίρεση την περιοχή VH FR1 (για τις τρεις υποομάδες) και την περιοχή VH CDR1 (για τις υποομάδες με ομολογία <96% και 98-99,9% μόνο), στις οποίες παρατηρήθηκε σχεδόν ίση στόχευση πουρινών και πυριμιδινών (Παράρτημα 1Π₅, Πίνακας 22).

Πίνακας 21. «Κανονικοποιημένη» κατανομή των μεταλλάξεων αντικατάστασης (R) προς σιωπηρές (S) στις περιοχές VH FRs και VH CDRs στις 3 υποομάδες με διαφορετικό φορτίο μεταλλάξεων (<96%, 96-97,9% και 98-99,9%).

	%	VH FR1	VH FR2	VH FR3	VH FRs	VH CDR1	VH CDR2	VH CDRs
R	<96	26,6	39,2	71,9	137,6	124,1	144,2	268,3
	96-97,9	2,6	3,1	5,3	11,0	13,2	14,0	27,2
	98-99,9	1,0	1,5	1,3	3,8	2,2	4,0	6,2
S	<96	16,0	20,7	35,9	72,5	28,8	31,3	60,1
	96-97,9	1,6	1,9	3,1	6,5	3,2	4,2	7,4
	98-99,9	0,6	0,5	0,8	1,8	0,7	0,5	1,2
R/S	<96	1,7	1,9	2,0	1,9	4,3	4,6	4,5
	96-97,9	1,6	1,7	1,7	1,7	4,1	3,4	3,7
	98-99,9	1,7	3,1	1,7	2,1	3,0	7,8	5,0

Πίνακας 22. «Κανονικοποιημένη» στόχευση μεταλλάξεων σε πουρίνες, πυριμιδίνες στις περιοχές VH FRs και VH CDRs στις 3 υποομάδες με διαφορετικό φορτίο μεταλλάξεων (<96%, 96-97,9% και 98-99,9%).

	%	VH FR1	VH FR2	VH FR3	VH FRs	VH CDR1	VH CDR2	VH CDRs
A	<96	7,2	13,4	31,9	52,4	27,6	65,5	93,1
	96-97,9	0,7	0,9	2,5	4,1	3,4	6,9	10,3
	98-99,9	0,2	0,1	0,7	0,9	0,1	1,6	1,7
G	<96	15,2	27,1	34,2	76,4	53,3	53,0	106,3
	96-97,9	1,4	2,6	2,6	6,6	7,3	5,9	13,2
	98-99,9	0,7	1,1	0,6	2,4	1,3	1,6	2,9
C	<96	12,9	13,9	32,2	58,9	47,8	25,6	73,4
	96-97,9	1,5	1,2	2,8	5,5	4,2	1,7	5,9
	98-99,9	0,6	0,5	0,6	1,7	1,1	0,8	1,9
T	<96	7,4	5,6	9,5	22,5	24,2	31,3	55,6
	96-97,9	0,6	0,3	0,4	1,3	1,6	3,8	5,3
	98-99,9	0,2	0,3	0,2	0,6	0,4	0,7	1,0
Π	<96	22,3	40,4	66,0	128,8	80,9	118,6	199,4
	96-97,9	2,1	3,5	5,2	10,7	10,7	12,7	23,4
	98-99,9	0,8	1,2	1,3	3,3	1,4	3,1	4,6
π	<96	20,2	19,4	41,7	81,4	72,0	56,9	128,9
	96-97,9	2,1	1,5	3,2	6,8	5,8	5,5	11,2
	98-99,9	0,8	0,8	0,8	2,3	1,4	1,4	2,9
Π/π	<96	1,1	2,1	1,6	1,6	1,1	2,1	1,5
	96-97,9	1,0	2,3	1,6	1,6	1,9	2,3	2,1
	98-99,9	1,1	1,5	1,6	1,4	1,0	2,2	1,6

A: Αδερίνη, G: Γουανίνη, C: Κυτοσίνη, T: Θυμίνη, Π: πουρίνες, π: πυριμιδίνες

Οι μεταβάσεις ήταν συχνότερες από τις μεταπτώσεις και στις 3 υποομάδες (μεταβάσεις/μεταπτώσεις: 1,3/1,3/1,1 αντιστοίχως), ενώ παρατηρήθηκε αυξημένη

συχνότητα μεταβάσεων τόσο στις περιοχές VH CDRs όσο και στις VH FRs με εξαίρεση την περιοχή VH FR1 και την περιοχή VH CDR2 (για τις υποομάδες με ομολογία <96% και 98-99,9% μόνο) στην οποία παρατηρήθηκε ίσος ή και μικρότερος αριθμός μεταβάσεων συγκριτικά με τις μεταπτώσεις (Παράρτημα 1Π₆, Πίνακες 23,24).

Πίνακας 23. «Κανονικοποιημένη» κατανομή των μεταβάσεων και των μεταπτώσεων στις περιοχές VH FRs και VH CDRs στις 3 υποομάδες με διαφορετικό «φορτίο» μεταλλάξεων <96%, 96-97,9% και 98-99,9%).

	%	VH FR1	VH FR2	VH FR3	VH FRs	VH CDR1	VH CDR2	VH CDRs
Μβ	<96	22,0	36,6	62,9	121,5	92,3	90,7	183,0
	96-97,9	2,0	2,9	5,0	10,0	9,0	10,7	19,7
	98-99,9	0,6	1,1	1,1	2,8	2,4	2,2	4,6
Μπ	<96	20,6	23,3	44,8	88,6	60,6	84,8	145,4
	96-97,9	2,2	2,0	3,3	7,5	7,4	7,5	15,0
	98-99,9	1,0	0,9	1,0	2,9	0,5	2,3	2,8
Μβ/Μπ	<96	1,1	1,6	1,4	1,4	1,5	1,1	1,3
	96-97,9	0,9	1,4	1,5	1,3	1,2	1,4	1,3
	98-99,9	0,6	1,2	1,1	1,0	5,0	0,9	1,6

Μβ=μεταβάσεις, Μπ=μεταπτώσεις

Πίνακας 24. «Κανονικοποιημένη» κατανομή όλων των τύπων νουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων στις περιοχές VH FRs και VH CDRs στις 3 υποομάδες με διαφορετικό «φορτίο» μεταλλάξεων (<96%, 96-97,9% και 98-99,9%).

	%	VH FR1	VH FR2	VH FR3	VH FRs	VH CDR1	VH CDR2	VH CDRs
a>g	<96	4,0	8,6	18,3	30,9	13,2	35,5	48,7
	96-97,9	0,5	0,5	1,5	2,5	1,8	4,6	6,4
	98-99,9	0,1	0,0	0,5	0,5	0,1	1,0	1,2
g>a	<96	8,8	14,3	16,8	39,9	34,6	26,4	61,0
	96-97,9	0,6	1,2	1,3	3,1	3,7	3,1	6,8
	98-99,9	0,2	0,5	0,2	0,9	1,0	0,4	1,4
c>t	<96	6,5	10,2	21,9	38,6	30,2	13,1	43,4
	96-97,9	0,7	0,9	2,0	3,6	2,9	1,3	4,2
	98-99,9	0,3	0,3	0,3	0,9	1,1	0,4	1,5
t>c	<96	2,8	3,5	5,9	12,2	14,3	15,7	30,0
	96-97,9	0,2	0,3	0,3	0,7	0,6	1,7	2,3
	98-99,9	0,0	0,3	0,1	0,4	0,2	0,4	0,6
a>c	<96	1,8	2,8	6,1	10,6	6,5	15,9	22,3
	96-97,9	0,2	0,2	0,3	0,6	0,8	0,9	1,8
	98-99,9	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0	0,3	0,3
c>a	<96	2,3	0,7	3,6	6,6	7,1	4,0	11,1
	96-97,9	0,3	0,1	0,3	0,7	0,1	0,3	0,4
	98-99,9	0,2	0,0	0,1	0,3	0,0	0,0	0,0
a>t	<96	1,4	2,0	7,4	10,9	7,9	14,2	22,1
	96-97,9	0,0	0,2	0,7	0,9	0,7	1,4	2,2
	98-99,9	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0	0,3	0,3
t>a	<96	1,2	0,7	2,0	3,8	6,4	10,0	16,4
	96-97,9	0,1	0,0	0,1	0,2	0,5	1,0	1,5
	98-99,9	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,3	0,3
g>c	<96	5,2	10,0	12,8	28,0	14,2	20,5	34,7
	96-97,9	0,6	1,2	1,1	2,9	3,5	2,1	5,6
	98-99,9	0,4	0,4	0,3	1,1	0,4	0,9	1,3
c>g	<96	4,1	2,9	6,7	13,7	10,4	8,5	18,9
	96-97,9	0,5	0,2	0,5	1,2	1,2	0,1	1,3
	98-99,9	0,1	0,2	0,2	0,5	0,0	0,4	0,4
g>t	<96	1,2	2,7	4,6	8,5	4,6	6,1	10,7
	96-97,9	0,2	0,2	0,2	0,6	0,1	0,7	0,8
	98-99,9	0,1	0,2	0,1	0,4	0,0	0,3	0,3
t>g	<96	3,4	1,4	1,7	6,5	3,6	5,6	9,2
	96-97,9	0,4	0,0	0,0	0,4	0,5	1,0	1,5
	98-99,9	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1

a: Αδενίνη, g: Γουανίνη, c: Κυτοσίνη, t: Θυμίνη

Με δεδομένη την επιλεκτικότητα του ρεπερτορίου των γονιδίων IGHV, στη συνέχεια επικεντρωθήκαμε σε υποομάδες αναδιατάξεων με ομολογία <100% που χρησιμοποιούν το ίδιο γονίδιο IGHV. Συχνότερα γονίδια ήταν τα IGHV4-34, IGHV3-7, IGHV3-23, IGHV3-30, IGHV1-69 και IGHV3-21. Σε κάθε ομάδα γονιδίων, η εισαγωγή των μεταλλάξεων ήταν συμβατή με κλασσική σωματική υπερμεταλλαξιγένεση και δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά το λόγο R/S ούτε στο σύνολο της αλληλουχίας ούτε στις περιοχές VH FRs και VH CDRs (Παράρτημα 1Π₇, πίνακας 25).

Πίνακας 25. «Κανονικοποιημένη» κατανομή των μεταλλάξεων αντικατάστασης (R) προς σιωπηρές (S) στις περιοχές VH FRs και VH CDRs σε υποομάδες που χρησιμοποιούν το ίδιο γονίδιο IGHV.

	Γονίδιο	VH FR1	VH FR2	VH FR3	VH FRs	VH CDR1	VH CDR2	VH CDRs
R	IGHV4-34	4,4	8,1	10,4	22,8	17,5	16,5	34,0
	IGHV3-7	3,6	4,1	9,2	17,0	19,4	17,4	36,9
	IGHV3-23	3,3	7,0	7,3	17,5	12,4	23,4	35,8
	IGHV3-30	3,7	3,1	10,5	17,3	16,7	21,2	37,9
	IGHV1-69	0,7	0,4	1,7	2,8	4,0	3,1	7,1
	IGHV3-21	0,8	0,0	0,9	1,7	2,3	4,7	7,0
S	IGHV4-34	3,1	4,3	6,8	14,2	3,8	4,0	7,9
	IGHV3-7	2,4	2,7	4,2	9,3	3,5	2,7	6,2
	IGHV3-23	2,4	2,6	3,9	9,0	4,0	4,7	8,6
	IGHV3-30	1,6	2,0	4,3	8,0	3,8	5,2	9,0
	IGHV1-69	0,5	0,7	0,9	2,1	0,8	0,9	1,8
	IGHV3-21	0,4	0,3	0,5	1,2	1,0	0,9	1,9
R/S	IGHV4-34	1,4	1,9	1,5	1,6	4,6	4,1	4,3
	IGHV3-7	1,5	1,5	2,2	1,8	5,6	6,4	5,9
	IGHV3-23	1,3	2,6	1,9	2,0	3,1	5,0	4,1
	IGHV3-30	2,3	1,5	2,4	2,2	4,3	4,1	4,2
	IGHV1-69	1,4	0,6	1,8	1,4	4,7	3,4	4,0
	IGHV3-21	2,2	0,0	1,7	1,4	2,4	5,1	3,7

Παρότι παρατηρήθηκε ετερογένεια στη συχνότητα στόχευσης πουργινών έναντι πυριμιδινών μεταξύ των διαφορετικών γονιδίων IGHV, ιδίως όσον αφορά στις περιοχές VH FR1 και VH CDR1 (Πίνακας 26, Παράρτημα 1Π₈), η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Πίνακας 26. «Κανονικοποιημένη» στόχευση μεταλλάξεων σε πουρίνες, πυριμιδίνες στις περιοχές VH FRs και VH CDRs σε υποομάδες που χρησιμοποιούν το ίδιο γονίδιο IGHV.

	Γονίδιο	VH FR1	VH FR2	VH FR3	VH FRs	VH CDR1	VH CDR2	VH CDRs
Π	IGHV4-34	4,2	8,3	10,4	23,0	14,3	1,3	15,6
	IGHV3-7	2,7	4,3	7,9	14,9	12,5	1,7	14,1
	IGHV3-23	2,7	5,8	7,1	15,7	8,2	2,1	10,2
	IGHV3-30	2,9	3,7	9,5	16,1	10,1	2,0	12,1
	IGHV1-69	0,7	0,7	1,5	2,9	2,3	0,1	2,4
	IGHV3-21	0,7	0,1	1,1	1,9	2,0	0,4	2,5
π	IGHV4-34	3,3	4,1	6,7	14,1	7,1	0,7	7,8
	IGHV3-7	3,3	2,6	5,5	11,4	10,4	0,4	10,8
	IGHV3-23	3,0	3,8	4,1	10,8	8,2	0,8	8,9
	IGHV3-30	2,5	1,4	5,3	9,2	10,4	0,7	11,1
	IGHV1-69	0,4	0,4	1,2	2,0	2,5	0,3	2,8
	IGHV3-21	0,5	0,2	0,3	1,0	1,2	0,1	1,3
Π/π	IGHV4-34	1,3	2,0	1,6	1,6	2,0	1,8	2,0
	IGHV3-7	0,8	1,7	1,4	1,3	1,2	4,7	1,3
	IGHV3-23	0,9	1,5	1,8	1,4	1,0	2,7	1,2
	IGHV3-30	1,2	2,6	1,8	1,7	1,0	3,0	1,1
	IGHV1-69	1,6	1,6	1,3	1,4	0,9	0,5	0,9
	IGHV3-21	1,4	0,7	3,2	1,9	1,7	3,3	1,9

Π: πουρίνες, π: πυριμιδίνες

Παρομοίως, παρατηρήθηκε μικρού βαθμού ετερογένεια στη συχνότητα μεταβάσεων έναντι μεταπτώσεων μεταξύ των διαφορετικών γονιδίων IGHV, ιδίως στις περιοχές VH FR1 και VH CDR2 (Πίνακας 27, Παράρτημα 1Π_{9&10}).

Πίνακας 27. «Κανονικοποιημένη» κατανομή των μεταβάσεων και των μεταπτώσεων στις περιοχές VH FRs και VH CDRs σε υποομάδες που χρησιμοποιούν το ίδιο γονίδιο IGHV.

	Γονίδιο	VH FR1	VH FR2	VH FR3	VH FRs	VH CDR1	VH CDR2	VH CDRs
Μβ	IGHV4-34	3,7	8,3	9,7	21,7	14,6	11,6	26,2
	IGHV3-7	2,7	4,3	8,2	15,2	13,2	7,9	21,1
	IGHV3-23	2,8	5,4	6,6	14,8	10,1	16,0	26,1
	IGHV3-30	2,6	3,4	8,2	14,1	10,8	12,0	22,8
	IGHV1-69	0,7	0,8	1,7	3,1	3,0	2,5	5,5
	IGHV3-21	0,4	0,2	0,8	1,4	1,8	2,3	4,1
Μπ	IGHV4-34	3,8	4,1	7,4	15,4	6,7	9,0	15,7
	IGHV3-7	3,3	2,5	5,3	11,1	9,7	12,2	21,9
	IGHV3-23	3,0	4,2	4,5	11,7	6,2	12,1	18,3
	IGHV3-30	2,8	1,8	6,6	11,2	9,7	14,4	24,2
	IGHV1-69	0,5	0,3	1,0	1,8	1,8	1,6	3,4
	IGHV3-21	0,7	0,1	0,6	1,4	1,4	3,3	4,7
Μβ/Μπ	IGHV4-34	1,0	2,0	1,3	1,4	2,2	1,3	1,7
	IGHV3-7	0,8	1,7	1,6	1,4	1,4	0,6	1,0
	IGHV3-23	0,9	1,3	1,5	1,3	1,6	1,3	1,4
	IGHV3-30	0,9	1,9	1,2	1,3	1,1	0,8	0,9
	IGHV1-69	1,4	2,6	1,7	1,8	1,7	1,6	1,6
	IGHV3-21	0,6	1,5	1,3	1,0	1,3	0,7	0,9

Μβ=μεταβάσεις, Μπ=μεταπτώσεις

4.1.4 Ανάλυση αμινοξικών αντικαταστάσεων στα γονίδια IGHV

Σε όλες τις μεταλλάξεις αντικατάστασης, μελετήθηκαν οι φυσικοχημικές ιδιότητες του αμινοξέος που κωδικοποιούσε η μεταλλαγμένη αλληλουχία και του αμινοξέος που κωδικοποιούσε η μη αναδιαταγμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία. Αξιολογήθηκε η υδροφοβία, ο όγκος και τα ιδιαίτερα χημικά χαρακτηριστικά κάθε αμινοξέος σύμφωνα με το IMGT, όπως περιγράφεται αναλυτικά στη Μεθοδολογία. Οι αλλαγές θεωρήθηκαν συντηρημένες (conservative) όταν το αμινοξύ που κωδικοποιούσε η μεταλλαγμένη αλληλουχία και το αμινοξύ που κωδικοποιούσε η μη αναδιαταγμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία είχαν ίδιες φυσικοχημικές ιδιότητες ή διέφεραν σε ένα μόνο από τα τρία χαρακτηριστικά, ενώ αν διέφεραν σε δύο ή τρία χαρακτηριστικά θεωρήθηκαν μη συντηρημένες (nonconservative). Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο σύνολο των γονιδίων IGHV αλλά και σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδίου (π.χ. VH FR1, VH CDR2) και εφαρμόστηκαν οι ίδιοι κανόνες «κανονικοποίησης» όπως και στις σημειακές μεταλλάξεις. Συνολικά αναλύθηκαν 567 αναδιατάξεις με ομολογία <100%. Αναγνωρίστηκαν 3525 μη συντηρημένες και 1851 συντηρημένες αντικαταστάσεις αμινοξέων. Καταγράφηκε αυξημένη συχνότητα μη συντηρημένων αντικαταστάσεων στις περιοχές VH CDRs σε σχέση με τις VH FRs. Ειδικότερα, ο λόγος των «κανονικοποιημένων» μη συντηρημένων/συντηρημένων αντικαταστάσεων ήταν 1,7 για τα VH FRs και 2,5 για τα VH CDRs ($p < 0,001$) (Παράρτημα 1Π₁₁, Πίνακας 28).

Πίνακας 28. «Κανονικοποιημένη» κατανομή των μη συντηρημένων έναντι των συντηρημένων αμινοξικών αντικαταστάσεων στις περιοχές VH FRs και VH CDRs.

	VH FR1	VH FR2	VH FR3	VH FRs	VH CDR1	VH CDR2	VH CDRs
μΣ	17,6	23,2	40,4	81,1	83,0	86,1	169,1
Σ	9,1	14,5	25,4	49,0	24,4	43,2	67,5
μΣ/Σ	1,9	1,6	1,6	1,7	3,4	2,0	2,5

μΣ: μη συντηρημένες, Σ: συντηρημένες

Δεν καταγράφηκε σημαντική διαφορά στη διακύμανση των μη συντηρημένων και συντηρημένων αμινοξικών αντικαταστάσεων στις τρεις υποομάδες με διαφορετικό φορτίο μεταλλάξεων (ελάχιστα, οριακά και πολύ μεταλλαγμένες) τόσο στο σύνολο όσο και στις περιοχές VH FRs και VH CDRs. Μοναδική εξαίρεση η περιοχή VH FR2 (στην υποομάδα με ομολογία 96-97,9% μόνο) και η περιοχή VH FR3 (στην

υποομάδα με ομολογία 98-99,9% μόνο) στις οποίες παρατηρήθηκε οριακά μικρότερη συχνότητα των μη συντηρημένων αμινοξικών αντικαταστάσεων (Παράρτημα 1Π₁₂, Πίνακας 29).

Πίνακας 29. «Κανονικοποιημένη» κατανομή των μη συντηρημένων έναντι των συντηρημένων αμινοξικών αντικαταστάσεων στις περιοχές VH FRs και VH CDRs στις 3 υποομάδες με διαφορετικό φορτίο μεταλλάξεων (<96%, 96-97,9% και 98-99,9%).

		VH FR1	VH FR2	VH FR3	VH FRs	VH CDR1	VH CDR2	VH CDRs
μΣ	<96	15,6	20,8	36,3	72,7	73,7	76,4	150,1
	96-97,9	1,5	1,3	3,5	6,3	7,8	7,4	15,2
	98-99,9	0,5	1,1	0,6	2,2	1,6	2,2	3,8
Σ	<96	7,8	12,5	23,1	43,4	20,0	36,3	56,3
	96-97,9	1,0	1,6	1,6	4,2	4,0	5,0	8,9
	98-99,9	0,4	0,4	0,7	1,5	0,4	2,0	2,3
μΣ/Σ	<96	2,0	1,7	1,6	1,7	3,7	2,1	2,7
	96-97,9	1,6	0,8	2,2	1,5	2,0	1,5	1,7
	98-99,9	1,2	3,0	0,9	1,5	4,3	1,1	1,6

μΣ: μη συντηρημένες, Σ:συντηρημένες

Τέλος, η σύγκριση μη συντηρημένων και συντηρημένων αμινοξικών αντικαταστάσεων σε υποομάδες που χρησιμοποιούν το ίδιο γονίδιο IGHV δεν ανάδειξε σημαντικές διαφορές ούτε στο σύνολο ούτε στις περιοχές VH FRs και VH CDRs. Αξιοσημείωτη εξαίρεση σε αυτή τη σύγκριση η περιοχή VH CDR1 του γονιδίου IGHV4-34, στην οποία καταγράφηκαν αναλογικά πολύ περισσότερες μη συντηρημένες αντικαταστάσεις συγκριτικά με όλες τις άλλες περιοχές και όλα τα γονίδια IGHV (μη συντηρημένες/συντηρημένες: 14,1, $p < 0,001$). Επίσης, το γονίδιο IGHV3-21 που εμφάνισε ίση σχεδόν συχνότητα μη συντηρημένων και συντηρημένων αμινοξικών αντικαταστάσεων σε όλο το μήκος του εκτός από την περιοχή VH FR3 (Παράρτημα 1Π₁₃, Πίνακας 30).

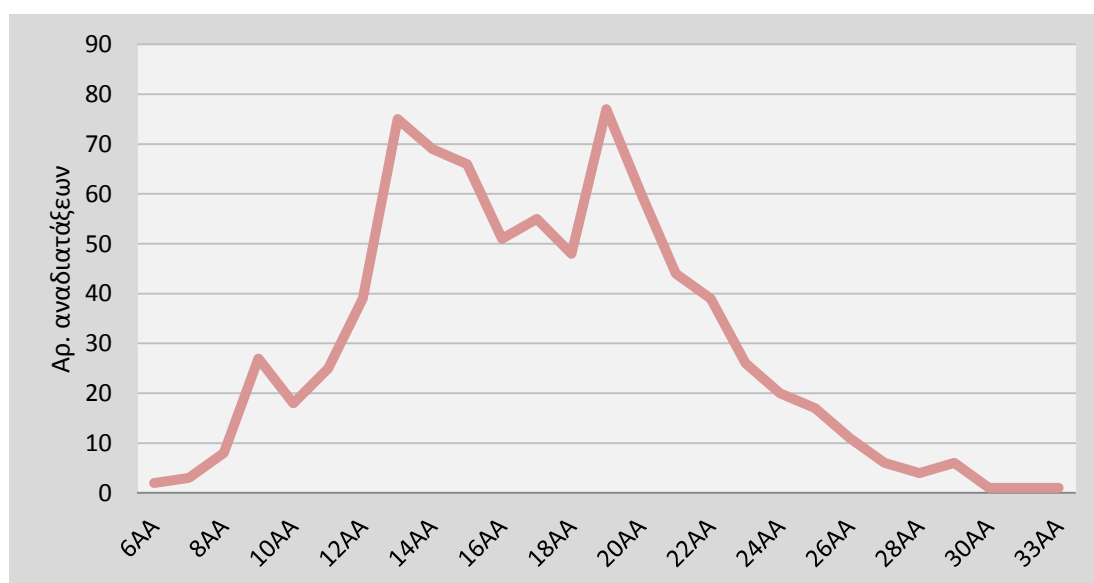
Πίνακας 30. «Κανονικοποιημένη» κατανομή των μη συντηρημένων έναντι των συντηρημένων αμινοξικών αντικαταστάσεων στις περιοχές VH FRs και VH CDRs σε υποομάδες που χρησιμοποιούν το ίδιο γονίδιο IGHV.

		VH FR1	VH FR2	VH FR3	VH FRs	VH CDR1	VH CDR2	VH CDRs
μΣ	IGHV4-34	2,6	3,9	5,4	11,9	13,6	8,2	21,8
	IGHV3-7	2,1	1,8	4,5	8,4	10,7	8,3	19,0
	IGHV3-23	1,6	4,3	3,9	9,8	7,7	10,9	18,6
	IGHV3-30	2,4	1,8	5,5	9,8	10,3	13,1	23,5
	IGHV1-69	0,4	0,3	0,8	1,5	2,8	2,0	4,7
	IGHV3-21	0,3	0	0,5	0,8	0,7	1,7	2,4
Σ	IGHV4-34	1,0	2,9	3,2	7,1	1,0	5,9	6,8
	IGHV3-7	1,1	1,6	3,2	5,9	2,4	6,0	8,4
	IGHV3-23	1,2	1,3	2,5	4,9	2,0	6,2	8,3
	IGHV3-30	1,2	1,1	2,9	5,2	2,5	3,0	5,5
	IGHV1-69	0,2	0,1	0,5	0,9	0,5	0,4	0,9
	IGHV3-21	0,4	0	0,3	0,8	1,0	2,2	3,2
μΣ/Σ	IGHV4-34	2,7	1,3	1,7	1,7	14,1	1,4	3,2
	IGHV3-7	1,9	1,1	1,4	1,4	4,5	1,4	2,3
	IGHV3-23	1,4	3,4	1,5	2,0	3,8	1,8	2,2
	IGHV3-30	2,0	1,7	1,9	1,9	4,1	4,4	4,3
	IGHV1-69	2,0	2,5	1,5	1,8	5,8	5,0	5,4
	IGHV3-21	0,6	0,0	1,5	1,0	0,8	0,8	0,8

μΣ: μη συντηρημένες, Σ: συντηρημένες

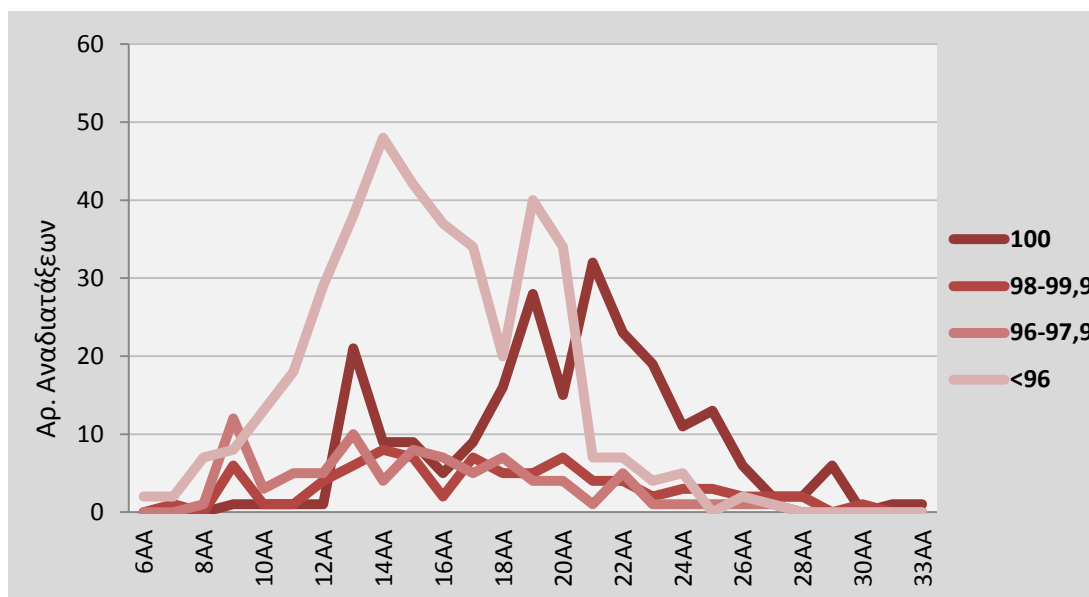
4.1.5 Ανάλυση των μοριακών χαρακτηριστικών της περιοχής VH CDR3

Το μήκος της περιοχής VH CDR3 κυμαινόταν από 6 έως 33 κατάλοιπα αμινοξέων με διάμεσο μήκος τα 17 αμινοξέα (Εικόνα 24). Όλες οι συμβολές ήταν εντός αναγνωστικού πλαισίου (in frame) και χαρακτηρίζονταν από την παρουσία των απαραίτητων για τη λειτουργικότητα του μορίου της ανοσοσφαιρίνης αμινοξέων που ορίζουν τα όρια της περιοχής VH CDR3, κυστεΐνη και φαινυλαλανίνη στις θέσεις 104 και 118 της αναδιάταξης, αντιστοίχως.



Εικόνα 24. Σχηματική απεικόνιση της κατανομής των αναδιατάξεων ανάλογα με το μήκος της περιοχής VH CDR3 (AA: κατάλοιπα αμινοξέων).

Οι αναδιατάξεις με πραγματικά αμετάλλακτα γονίδια IGHV είχαν μεγαλύτερο μήκος VH CDR3 (διάμεση τιμή 21, εύρος 9-33 αμινοξέα) συγκριτικά με όλες τις υπόλοιπες αναδιατάξεις ($p < 0,001$ για όλες τις συγκρίσεις). Οι αναδιατάξεις με ελάχιστα μεταλλαγμένα γονίδια IGHV έφεραν ενδιάμεσο μήκος VH CDR3 (διάμεση τιμή 17 αμινοξέα, εύρος 7-30), ενώ οι αναδιατάξεις με οριακά μεταλλαγμένα ή πολύ μεταλλαγμένα γονίδια IGHV μικρότερο συγκριτικά μήκος VH CDR3 (διάμεση τιμή 15 και για τις δύο ομάδες, εύρος 8-27 και 6-27, αντιστοίχως (Εικόνα 25)).

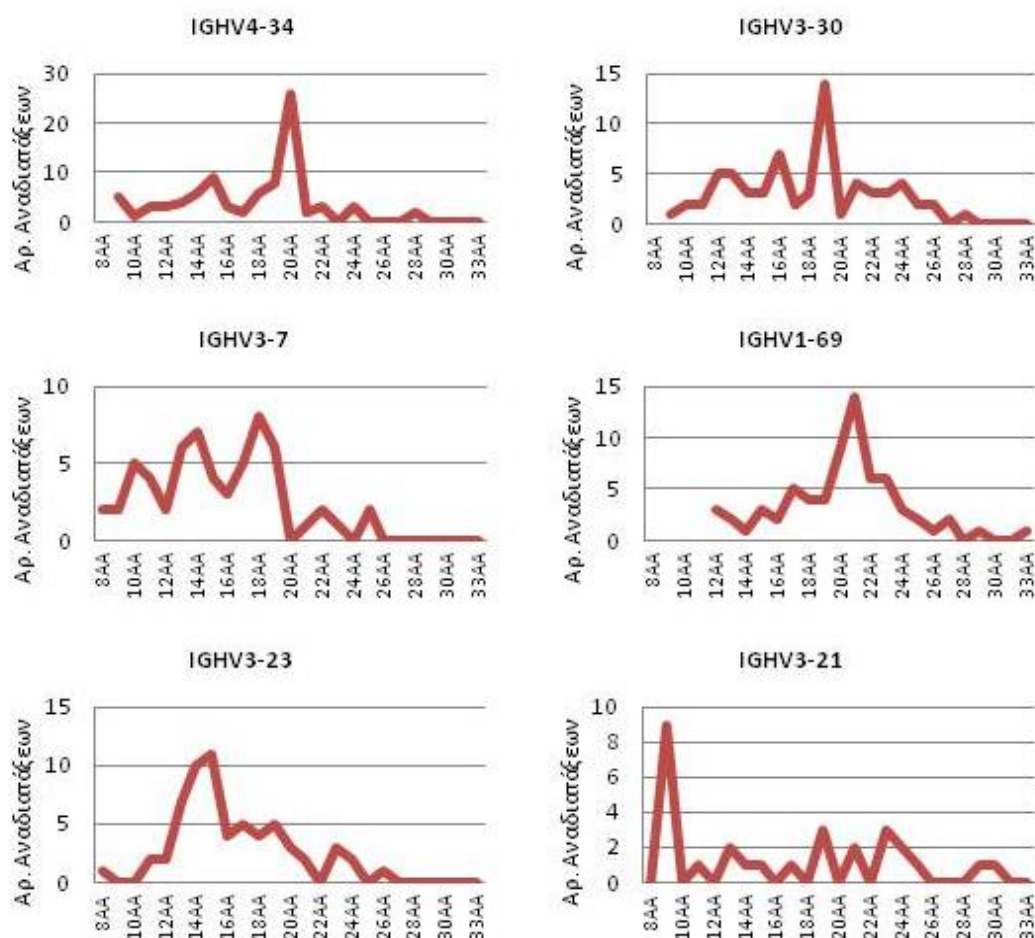


Εικόνα 25. Σχηματική απεικόνιση της κατανομής των αναδιατάξεων ανάλογα με το μήκος της περιοχής VHCDR3 στις υποομάδες με διαφορετικό φορτίο μεταλλάξεων (AA: κατάλοιπα αμινοξέων).

Η σύγκριση του μήκους της περιοχής VH CDR3 στις υποομάδες που χρησιμοποιούνται επικρατέστερα γονίδια IGHV ανάδειξε σημαντικές διαφορές. Μεγαλύτερο διάμεσο μήκος καταγράφηκε σε αναδιατάξεις του γονιδίου IGHV1-69 (21 αμινοξικά κατάλοιπα), ενώ μικρότερο σε αναδιατάξεις των γονιδίων IGHV3-7, IGHV3-21 και IGHV3-23 (15 αμινοξικά κατάλοιπα) (Εικόνα 26, Πίνακας 31).

Πίνακας 31. Διάμεσο μήκος και εύρος σε αμινοξικά κατάλοιπα της περιοχής VH CDR3 στις αναδιατάξεις των συχνότερα χρησιμοποιούμενων γονιδίων IGHV.

Γονίδιο	Διάμεσο μήκος VH CDR3 (AA)	Εύρος τιμών (AA)
IGHV4-34	19	9-28
IGHV3-7	15	8-25
IGHV3-23	15	8-26
IGHV3-30	19	9-28
IGHV1-69	21	12-33
IGHV3-21	15	9-30



Εικόνα 26. Σχηματική απεικόνιση της κατανομής των αναδιαιτάξεων των γονιδίων IGHV4-34, IGHV3-7, IGHV3-23, IGHV3-30, IGHV1-69, και IGHV3-21 ανάλογα με το μήκος της περιοχής VH CDR3 σε αμινοξικά κατάλοιπα (AA).

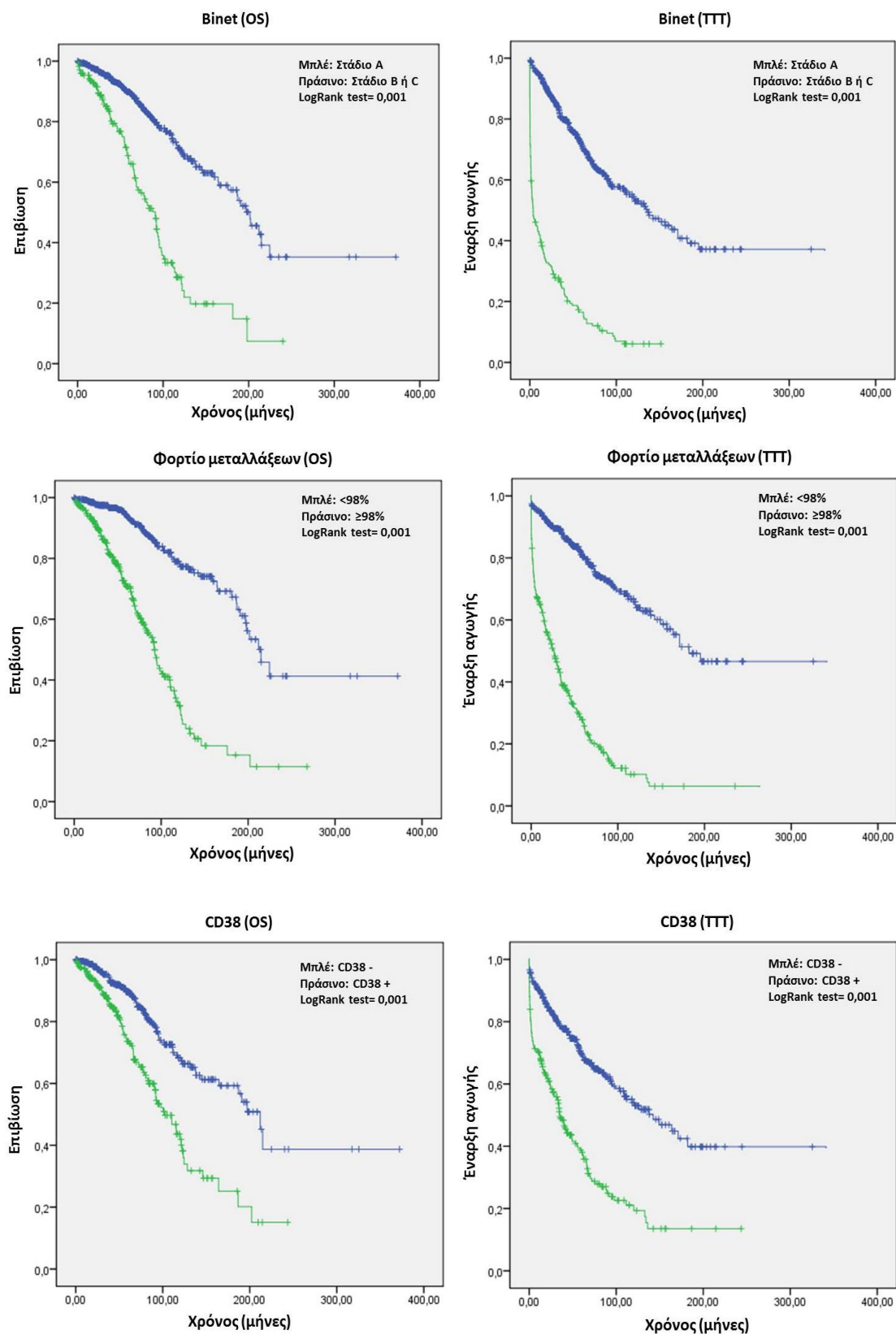
4.1.6 «Στερεότυπα υποσύνολα»

Όλες οι αναδιαιτάξεις εξετάστηκαν για την ύπαρξη στερεότυπων BcR με κοινά μοτίβα στην περιοχή VH CDR3 σύμφωνα με τα καθιερωμένα κριτήρια^{183,152,153,154,155,157,158}. Συνολικά 96/799 αναδιαιτάξεις εξέφραζαν στερεότυπους BcRs που ανήκαν σε 29 διαφορετικά υποσύνολα. Σε αυτή την υποομάδα, 23 περιπτώσεις ανήκαν στο στερεότυπο υποσύνολο #1, 20 στο υποσύνολο #4, 10 περιπτώσεις στο #2, 7 περιπτώσεις στο #6 και 5 περιπτώσεις στο #8 (Πίνακας παραρτήματος 2). Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, όλες οι περιπτώσεις που ανήκαν στα υποσύνολα #1 και #8 ήταν αμετάλλακτες, ενώ όλες οι περιπτώσεις του υποσυνόλου #4 ήταν μεταλλαγμένες.

4.1.7 Συσχέτιση του φορτίου των μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV με το χρόνο έναρξης θεραπείας και την ολική επιβίωση

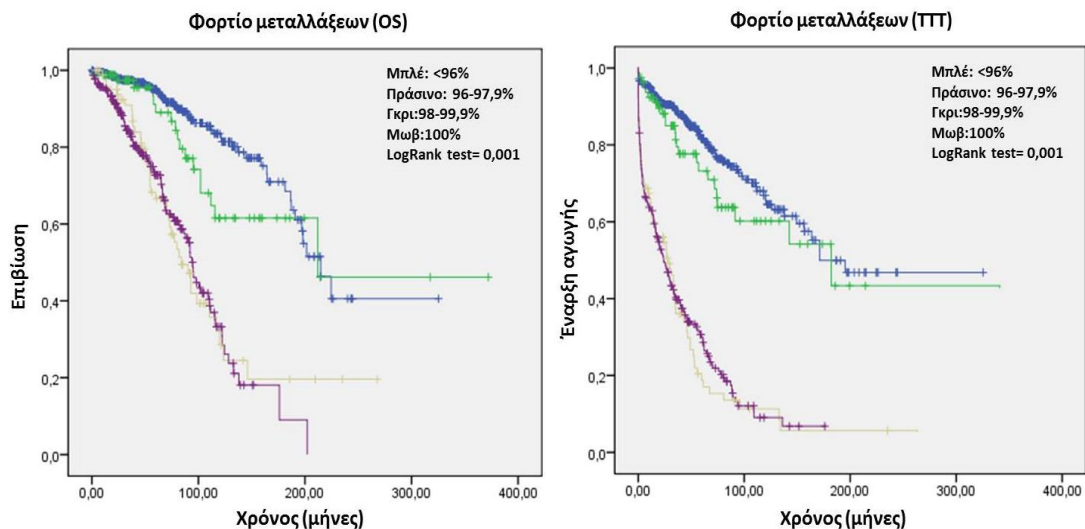
Στην παρούσα μελέτη, με μέσο χρόνο παρακολούθησης 70 μήνες (εύρος 1-372 μήνες), ο μέσος χρόνος έναρξης θεραπείας (time to first treatment, TTT) ήταν 134 μήνες, ενώ η μέση επιβίωση (overall survival, OS) 191 μήνες (95% C.I.: 116-153 για TTT και 171-212 για την OS). Τριακόσιοι εξήντα πέντε ασθενείς από τους 771 (47,3%) με διαθέσιμα δεδομένα είχαν αρχίσει θεραπεία στο τέλος της μελέτης, ενώ 203/793 (25,6%) είχαν πεθάνει.

Αρχικά μελετήθηκε η OS και η TTT σε σχέση με (i) το κλινικό στάδιο κατά τη διάγνωση (Binet A έναντι Binet B και C), (ii) το φορτίο των μεταλλάξεων (με όριο ομολογίας το 98%) και (iii) την έκφραση του CD38 (με όριο θετικότητας το 7%). Στη μονοπαραμετρική ανάλυση όλες οι παράμετροι αναδείχθηκαν στατιστικά σημαντικές για την OS και την TTT, ενώ στην πολυπαραμετρική ανάλυση (Cox proportional hazard regression analysis) παρέμειναν στατιστικά σημαντικές το στάδιο της νόσου κατά τη διάγνωση και το φορτίο των μεταλλάξεων σε συμφωνία με τις προηγούμενες μελέτες (Εικόνα 27).



Εικόνα 27. Καμπύλες ολικής επιβίωσης (OS) και έναρξης αγωγής (TTT) ανάλογα με το κλινικό στάδιο κατά τη διάγνωση, το φορτίο των μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV και την έκφραση του CD38.

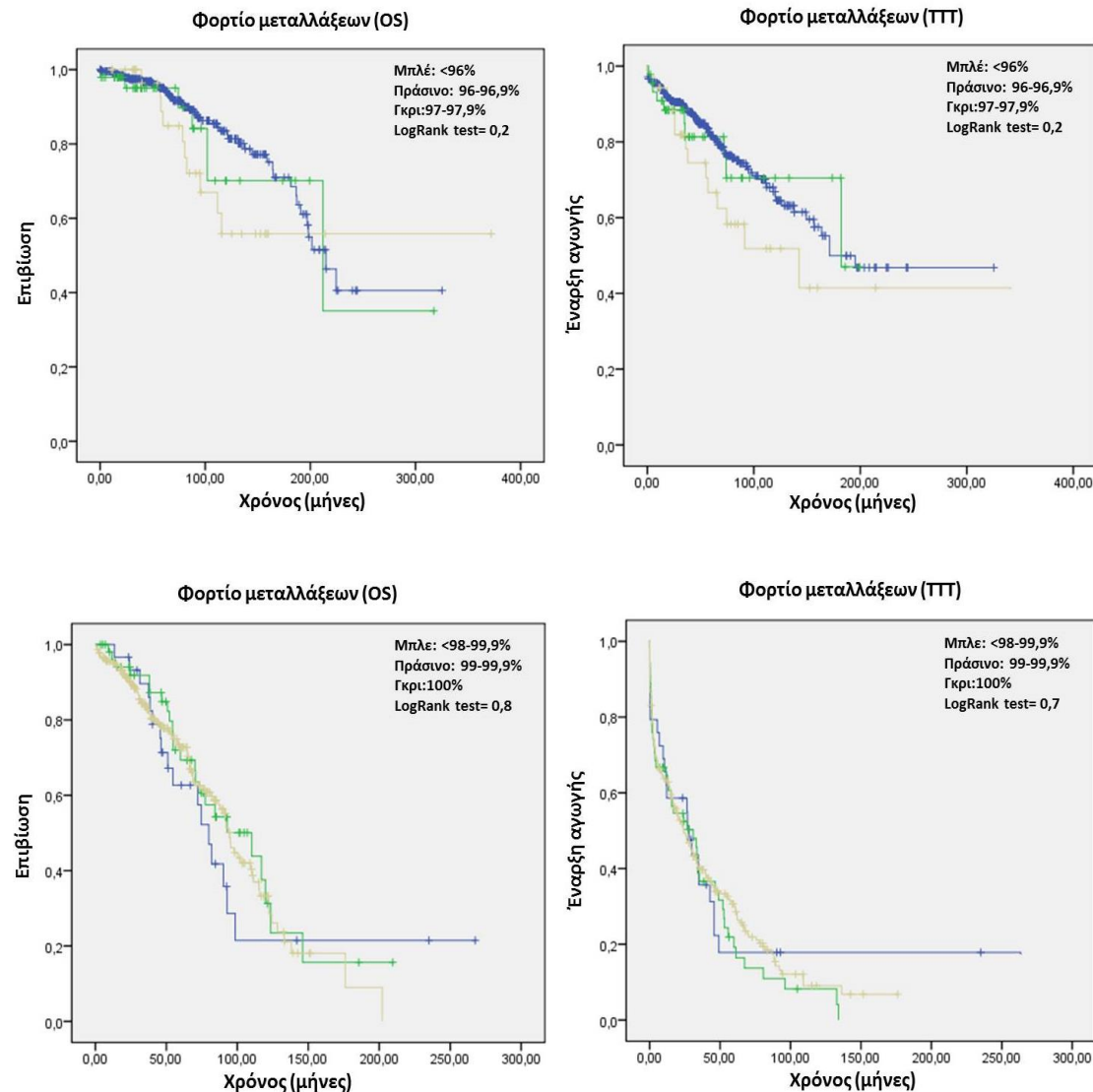
Στη συνέχεια, οι ασθενείς με ομολογία γονιδίων IGHV $\geq 98\%$ διακρίθηκαν περαιτέρω σε δύο υποομάδες με ομολογία 100% και 98-99,9%, αντιστοίχως, και οι ασθενείς με ομολογία γονιδίων IGHV $<98\%$ σε άλλες δύο με ομολογία $<96\%$ έναντι 96-97,9%, αντιστοίχως. Η μέση επιβίωση και ο μέσος χρόνος για έναρξη θεραπευτικής αγωγής ήταν παρόμοια τόσο μεταξύ των υποομάδων με ομολογία $\geq 98\%$, όσο και μεταξύ των υποομάδων με ομολογία $<98\%$. Ειδικότερα, η μέση τιμή για OS και TTT μεταξύ των υποομάδων με ομολογία $\geq 98\%$, ήταν 97/113 μήνες, αντιστοίχως, για OS και 43/45 μήνες για TTT, αντιστοίχως, ενώ μεταξύ των υποομάδων με ομολογία $<98\%$, μέση επιβίωση 224/235 μήνες, αντιστοίχως, για OS και μέσος χρόνος για TTT 202/193 μήνες, αντιστοίχως (Εικόνα 28).



Εικόνα 28. Καμπύλες ολικής επιβίωσης (OS) και έναρξης αγωγής (TTT) στις υποομάδες με ομολογία γονιδίων IGHV 100%, 98-99,9%, 96-97,9 και $<96\%$.

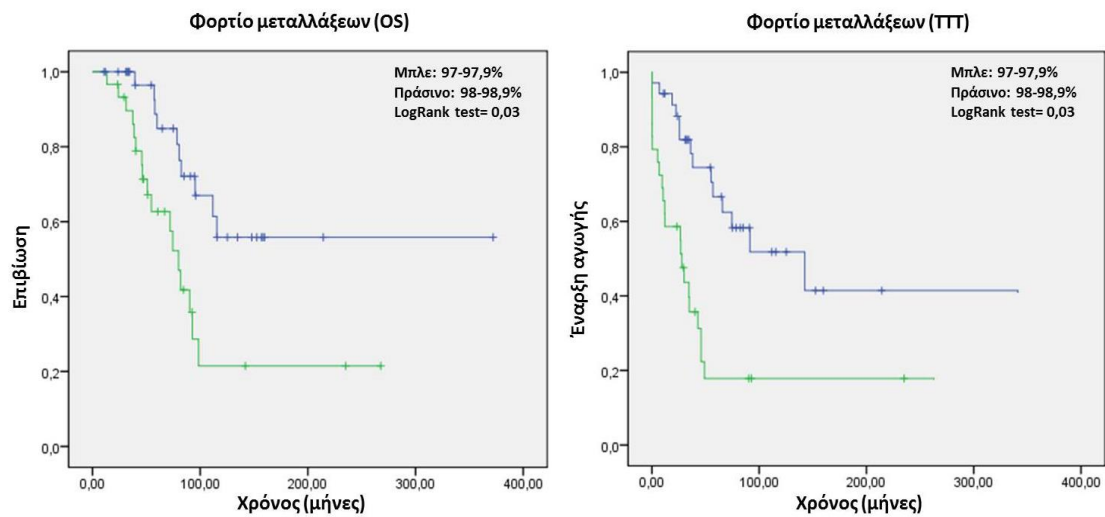
Τέλος, οι ασθενείς με ομολογία γονιδίων IGHV $\geq 98\%$ διακρίθηκαν σε τρεις υποομάδες με διαφορά ομολογίας γονιδίων IGHV 1% μεταξύ των υποομάδων (100% έναντι 99-99,9% έναντι 98-98,9%). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην OS και TTT μεταξύ των ομάδων: μέση επιβίωση 97/103/107 μήνες, αντιστοίχως, και μέσος χρόνος για έναρξη θεραπευτικής αγωγής 43/36/64 μήνες, αντιστοίχως. Παρομοίως, οι ασθενείς με ομολογία γονιδίων IGHV $<98\%$ διακρίθηκαν σε τρεις υποομάδες με διαφορά ομολογίας 1% μεταξύ των υποομάδων ($<96\%$ έναντι 96-96,9% έναντι 97-97,9%). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην OS και TTT μεταξύ των ομάδων: μέση επιβίωση 224/209/244 μήνες,

αντιστοίχως και μέσος χρόνος για έναρξη θεραπευτικής αγωγής 202/148/178 μήνες, αντιστοίχως (Εικόνα 29).



Εικόνα 29. Καμπύλες ολικής επιβίωσης (OS) και έναρξης αγωγής (TTT) στις υποομάδες με ομολογία γονιδίων IGTV 100%, 99-99,9%, 98-98,9%, 97-97,9%, 96-96,9% και <96%.

Αντίθετα, η σύγκριση της OS και της TTT στις υποομάδες με ομολογία 97-97,9% έναντι 98-98,9% ανέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά τόσο στην OS όσο στην TTT (LongRank test 0,03) (Εικόνα 30) .



Εικόνα 30. Καμπύλες ολικής επιβίωσης (OS) και έναρξης αγωγής (TTP) στις υποομάδες με ομολογία γονιδίων IGHV 97-97,9% και 98-98,9%.

4.2 Διέγερση των κυττάρων της ΧΛΛ μέσω των υποδοχέων BcR, TLR7 και TLR9

Με δεδομένη τη διαφορετική κλινική πορεία που παρουσιάζουν οι ασθενείς με ΧΛΛ ανάλογα με τον αριθμό των μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών, στη συνέχεια μελετήσαμε τα αποτελέσματα της διέγερσης του υποδοχέα BcR στις δύο διαφορετικές υποομάδες ΧΛΛ και συγκεκριμένα σε 11 ασθενείς Μ-ΧΛΛ και 10 ασθενείς Α-ΧΛΛ. Επιπλέον, με δεδομένο ότι *in vivo* τόσο τα φυσιολογικά Β λεμφοκύτταρα όσο και τα κύτταρα της ΧΛΛ εκτός από τον BcR δέχονται ταυτόχρονα ερεθίσματα και από τους υποδοχείς της έμφυτης ανοσίας TLRs, μελετήσαμε τα αποτελέσματα της συνδιέγερσης BcR / TLR. Από το σύνολο των TLR υποδοχέων επιλέξαμε στην παρούσα μελέτη τους TLR7 και TLR9, οι οποίοι είναι λειτουργικοί στα κύτταρα της ΧΛΛ και επιπλέον εκφράζονται διαφορετικά στη Μ-ΧΛΛ έναντι της Α-ΧΛΛ^{165,207,208,206}.

Η διέγερση των κυττάρων της ΧΛΛ μέσω του BcR αλλά και των TLR7/TLR9 οδηγεί στην ενεργοποίηση των MAP κινασών, όπως η ERK, η JNK και η p38 διαδραματίζοντας με αυτό τον τρόπο σημαντικό ρόλο στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της ΧΛΛ. Στην παρούσα μελέτη, η διέγερση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες υγρής καλλιέργειας με τη χρήση αντι-IgM, Im και CpG για τους BcR, TLR7 και TLR9, αντιστοίχως, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό όπως αναλυτικά αναφέρεται στη μεθοδολογία. Ως αρνητικός μάρτυρας ελέγχου (κοντρόλ), χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση κύτταρα ΧΛΛ καλλιεργημένα υπό τις ίδιες συνθήκες απουσία οποιουδήποτε προσδέτη.

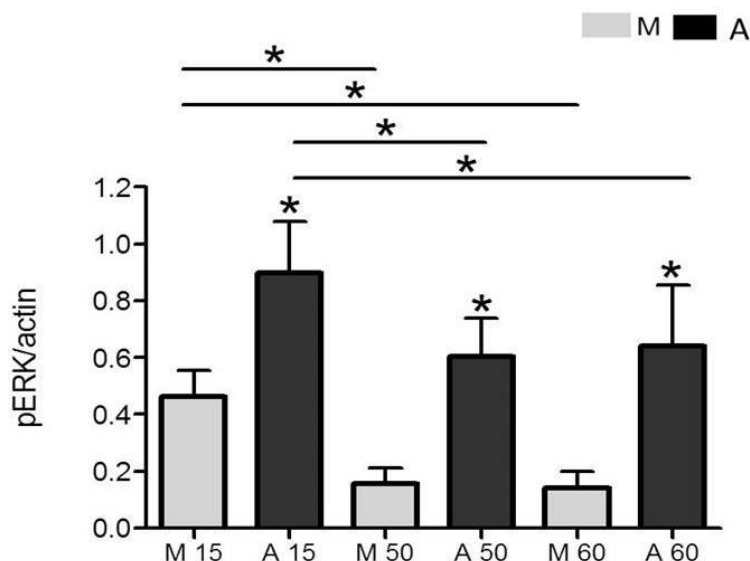
Τα αποτελέσματα της ενεργοποίησης των κυττάρων της ΧΛΛ μέσω διέγερσης των BcR, TLR7 και TLR9, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό, εκτιμήθηκαν με προσδιορισμό των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης ERK (pERK), ενώ η επαγωγή της απόπτωσης εκτιμήθηκε με τον προσδιορισμό των επιπέδων της κασπάσης 8 (ενεργός και ανενεργός ισομορφή) και της PARP (ολική πρωτεΐνη PARP και το προϊόν πρωτεολυτικής πέψης) με την τεχνική της ανοσοανίχνευσης Western και τη χρήση κατάλληλων μονοκλωνικών αντισωμάτων, όπως αναλυτικά αναφέρεται στη μεθοδολογία.

4.2.1 Ανάλυση των επιπέδων pERK στα κύτταρα της ΧΛΛ μετά από διέγερση των υποδοχέων BcR, TLR7 ή TLR9 μεμονωμένα ή σε συνδυασμό

4.2.1.1 Μελέτη επιπέδων pERK απουσία προσδέτη

Αρχικά, μελετήθηκε η εγγενής έκφραση της p-ERK πριν από οποιοδήποτε καλλιέργεια των κυττάρων στο σύνολο των ασθενών. Φωσφορυλιωμένη ERK ανιχνεύθηκε και στα 21 δείγματα ασθενών με ΧΛΛ, ωστόσο, με μεγάλη διακύμανση. Τα κύτταρα της Α-ΧΛΛ παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα pERK σε σχέση με τα κύτταρα της Μ-ΧΛΛ, ωστόσο η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,14$), σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες^{223,224}.

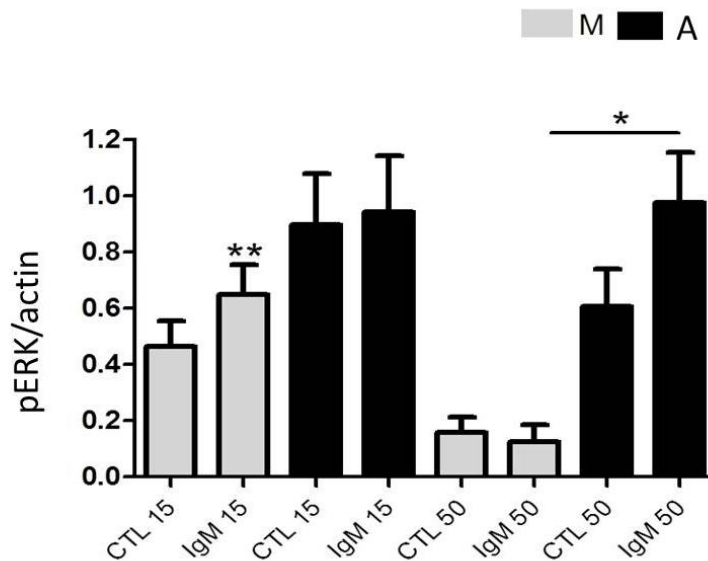
Στη συνέχεια, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν *in vitro* για 15, 50 και 60 λεπτά απουσία οποιοδήποτε προσδέτη. Γενικά, παρατηρήθηκε σταδιακή πτώση των επιπέδων της pERK κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας χωρίς προσδέτη με μεγάλη ετερογένεια στο βαθμό μείωσης μεταξύ διαφορετικών ασθενών. Μετά από 15 λεπτά καλλιέργειας, τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης ERK διέφεραν έως και κατά 2 λογάριθμους μεταξύ των διαφορετικών ασθενών με ΧΛΛ. Ορισμένοι ασθενείς παρουσίασαν πολύ χαμηλά επίπεδα pERK (Πίνακας 32). Η διαχρονική μείωση των επιπέδων της pERK ήταν ιδιαίτερα σημαντική στα κύτταρα της Μ-ΧΛΛ συγκριτικά με την Α-ΧΛΛ ($p<0,05$). Σε όλα τα χρονικά στιγμιότυπα παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα pERK σε βαθμό στατιστικά σημαντικό στα κύτταρα της Α-ΧΛΛ σε σχέση με τη Μ-ΧΛΛ ($p<0,05$) (Εικόνα 31, Πίνακας 32).



Εικόνα 31. Επίπεδα pERK μετά από καλλιέργεια των κυττάρων της ΧΛΛ *in vitro* για 15, 50 και 60 λεπτά απουσία οποιουδήποτε προσδέτη. Το γράφημα αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση της p-ERK σε αναλογία προς την ακτίνη για τα κύτταρα της Μ-ΧΛΛ και Α-ΧΛΛ. Το αστεράκι πάνω από τις στήλες υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά της Μ-ΧΛΛ συγκριτικά με την Α-ΧΛΛ, ενώ οι γραμμές με το αστεράκι τη στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά στα διαφορετικά χρονικά στιγμιότυπα της κάθε υποομάδας (Μ-ΧΛΛ ή Α-ΧΛΛ). * $p < 0,05$. Μ: Μεταλλαγμένη ΧΛΛ, Α: Αμετάλλακτη ΧΛΛ.

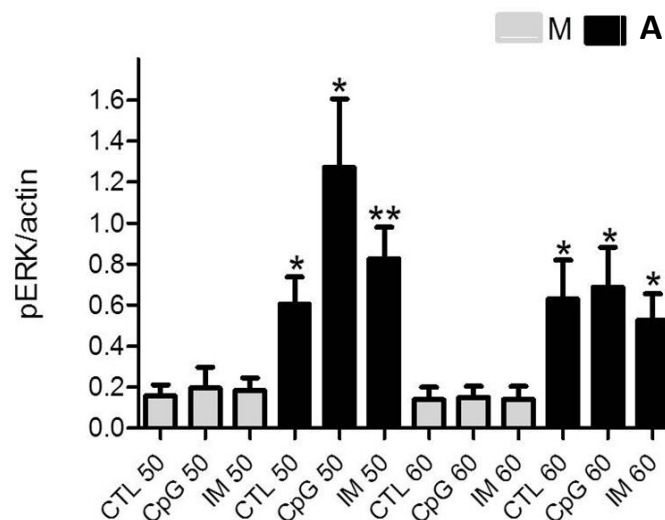
4.2.1.2 Διέγερση των κυττάρων της ΧΛΛ μέσω BcR, TLR7 ή TLR9

Η διέγερση του υποδοχέα BcR με αντι-IgM οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της pERK μετά από 15 λεπτά καλλιέργειας σε 16/21 ασθενείς (76,2%), με μεγάλη ετερογένεια απαντήσεων. Η μέγιστη τιμή παρατηρήθηκε μετά από 15 λεπτά καλλιέργειας και στη συνέχεια παρατηρήθηκε σταδιακή πτώση των επιπέδων pERK ιδίως στα κύτταρα της Μ-ΧΛΛ ($p < 0,05$ Εικόνα, Πίνακας). Συγκριτικά με το αδιέγερτο κοντρόλ, η απάντηση των κυττάρων της Α-ΧΛΛ ήταν πιο έντονη μετά από 50 λεπτά καλλιέργειας. Αντίθετα, τα κύτταρα της Μ-ΧΛΛ αντιδρούσαν άμεσα στα 15 λεπτά καλλιέργειας, αλλά η διάρκεια της απάντησης ήταν παροδική και πρακτικά εξαφανίζονταν μετά από 50 λεπτά καλλιέργειας (Εικόνα 32, Πίνακας 32). Παρότι σε όλα τα χρονικά στιγμιότυπα τα επίπεδα pERK ήταν υψηλότερα στην Α-ΧΛΛ έναντι της Μ-ΧΛΛ, η διαφορά αυτή ήταν ιδιαίτερα σημαντική μετά από παρατεταμένη έκθεση (50 λεπτά) σε αντί-IgM ($p < 0,005$ Εικόνα 32, Πίνακας 32).



Εικόνα 32. Επίπεδα pERK μετά από καλλιέργεια των κυττάρων της ΧΛΛ *in vitro* για 15 και 50 λεπτά απουσία οποιουδήποτε προσδέτη (αδιέγερτο κοντρόλ, CTL) και μετά από διέγερση του BcR με αντι-IgM. Τα γράφημα αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση της p-ERK σε αναλογία προς την ακτίνη για τα αδιεγέρτα και διεγερμένα με αντί-IgM κύτταρα της M-ΧΛΛ και Α-ΧΛΛ. Η γραμμή με το αστεράκι υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά της M-ΧΛΛ συγκριτικά με την Α-ΧΛΛ, ενώ το αστεράκι πάνω από τις στήλες υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το αδιέγερτο κοντρόλ στα διαφορετικά χρονικά στιγμιότυπα της κάθε υποομάδας (M-ΧΛΛ ή Α-ΧΛΛ). * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$. CTL: Αδιέγερτο κοντρόλ, IgM: αντι-IgM, M: Μεταλλαγμένη ΧΛΛ, Α: Αμετάλλακτη ΧΛΛ.

Η διέγερση των TLR7 και TLR9 με Im και CpG, αντιστοίχως, στα κύτταρα της ΧΛΛ είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της pERK σχεδόν αποκλειστικά στους ασθενείς με Α-ΧΛΛ. Αντίθετα, τα επίπεδα της pERK παρέμειναν σταθερά στα κύτταρα της Μ-ΧΛΛ (Εικόνα 33, Πίνακας 32). Παρότι παρατηρήθηκαν σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ διαφορετικών ασθενών με Α-ΧΛΛ, η διέγερση του TLR9 με CpG φαίνεται να επάγει την έκφραση της pERK περισσότερο από τη διέγερση του TLR7 με Im. Η μέγιστη ανταπόκριση παρατηρήθηκε στα 50 λεπτά, ενώ η παρατεταμένη διέγερση έως 60 λεπτά είχε ως αποτέλεσμα τη σταδιακή μείωση των επιπέδων της pERK και με τις δύο διεγέρσεις, με σημαντικές ωστόσο διακυμάνσεις στο επίπεδο μείωσης μεταξύ διαφορετικών ασθενών με ΧΛΛ (Εικόνα 33, Πίνακας 32).



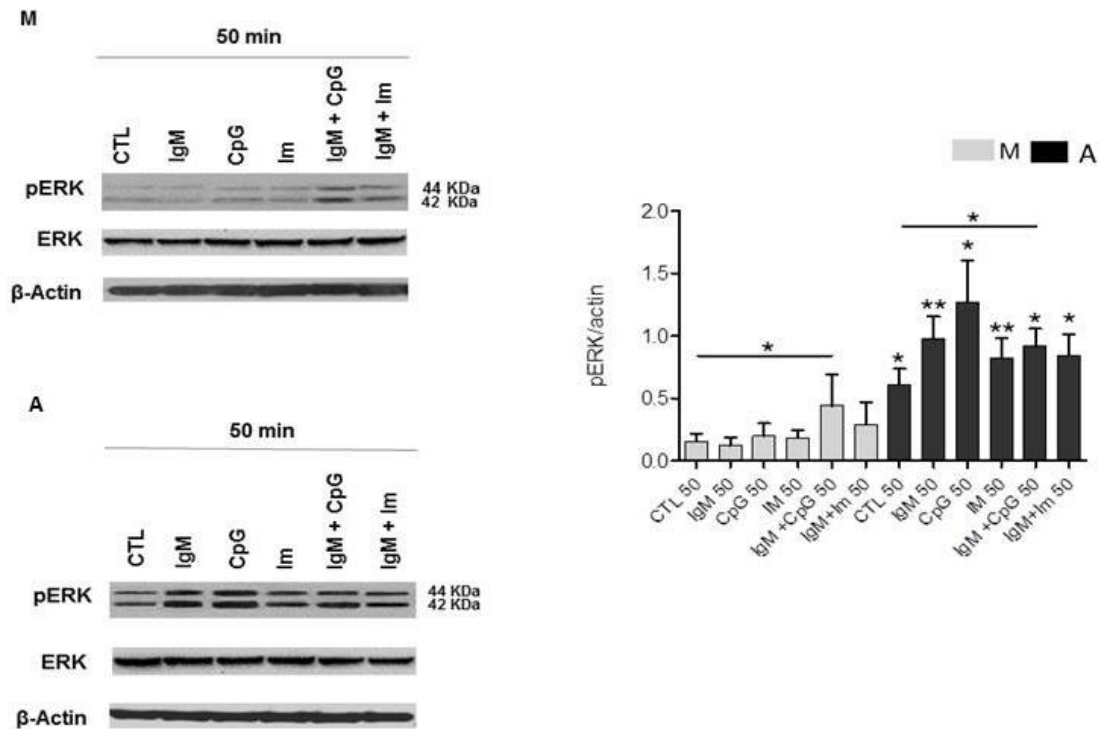
Εικόνα 33. Επίπεδα pERK μετά από καλλιέργεια των κυττάρων της ΧΛΛ *in vitro* για 50 και 60 λεπτά απουσία οποιουδήποτε προσδέτη (αδιέγερτο κοντρόλ, CTL) και μετά από διέγερση του TLR7 με IM και του TLR9 με CpG. Τα γράφημα αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση της p-ERK σε αναλογία προς την ακτίνη για τα αδιεγέρτα και διεγερμένα με IM και CpG κύτταρα της M-ΧΛΛ και A-ΧΛΛ. Το αστεράκι πάνω από τις στήλες υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά της M-ΧΛΛ συγκριτικά με την A-ΧΛΛ. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$. CTL: Αδιέγερτο κοντρόλ, IM:Imiquimod, CpG: CpG ODN, M: Μεταλλαγμένη ΧΛΛ, A: Αμετάλλακτη ΧΛΛ.

4.2.1.3 Συνδιέγερση των κυττάρων της ΧΛΛ μέσω BcR +TLR7 ή μέσω BcR + TLR9

Η συνδιέγερση των κυττάρων της ΧΛΛ με αντί-IgM+Im ή αντί-IgM+CpG αύξησε τα επίπεδα της pERK στα κύτταρα και των δύο υποομάδων ΧΛΛ (M-ΧΛΛ και A-ΧΛΛ). Ωστόσο, μόνο ο συνδυασμός αντί-IgM+CpG οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση σε σύγκριση με το αδιέγερτο κοντρόλ και στις δύο υποομάδες ΧΛΛ ($p < 0,05$ και για τα δύο), ενώ η συνδιέγερση αντί-IgM+Im αύξησε τα επίπεδα της pERK σε μικρότερο βαθμό (Πίνακας 32).

Στη συνέχεια συγκρίναμε τα επίπεδα της pERK μετά από μεμονωμένη διέγερση μέσω του BcR, του TLR7 ή του TLR9 με τα επίπεδα της pERK μετά από σύγχρονη διέγερση του BcR με τον TLR7 ή του BcR με τον TLR9. Η σύγκριση αυτή ανέδειξε σημαντικές διαφορετικές μεταξύ διαφορετικών ασθενών: μερικοί ασθενείς παρουσίαζαν αυξημένα και άλλους μειωμένα επίπεδα pERK μετά τη συνδιέγερση σε σύγκριση με τα επίπεδα της pERK μετά από μεμονωμένη διέγερση του ενός υποδοχέα.

Όταν επικεντρώσαμε τη μελέτη μας στις δύο υποομάδες ΧΛΛ (Μ-ΧΛΛ και Α-ΧΛΛ) παρατηρήσαμε διαφορετικά πρότυπα απάντησης. Ειδικότερα, στη Μ-ΧΛΛ, η συνδιέγερση με αντι-IgM+CpG αύξησε πολύ τα επίπεδα της p-ERK συγκριτικά με τη μεμονωμένη διέγερση με αντι-IgM ή CpG. Αντίθετα, στην Α-ΧΛΛ, τα επίπεδα της p-ERK μετά από διπλή διέγερση δεν διέφεραν πολύ από εκείνα που καταγράφηκαν μετά από μεμονωμένη διέγερση με αντι-IgM ή CpG (Εικόνα 34, Πίνακας 32).



Εικόνα 34. Έκφραση pERK μετά από καλλιέργεια των κυττάρων της ΧΛΛ *in vitro* για 50 λεπτά απουσία οποιουδήποτε προσδέτη (αδιέγερτο κοντρόλ, CTL), μετά από διέγερση με αντι-IgM, Im και CpG μεμονωμένα ή σε συνδυασμό (αντι-IgM+Im και αντι-IgM+CpG). **Αριστερά:** Αποτελέσματα ανοσοανίχνευσης Western για pERK (42kD και 44kD) και ακτίνη σε μια αντιπροσωπευτική περίπτωση Μ-ΧΛΛ (πάνω) και μια αντιπροσωπευτική περίπτωση Α-ΧΛΛ (κάτω). **Δεξιά:** Τα γράφημα αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση της pERK σε αναλογία προς την ακτίνη για τα αδιέγερτα κύτταρα, τα διεγερμένα με αντι-IgM, Im, CpG, αντι-IgM+Im και αντι-IgM+CpG κύτταρα της Μ-ΧΛΛ και Α-ΧΛΛ. Το αστεράκι πάνω από τις στήλες υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά της Μ-ΧΛΛ συγκριτικά με την Α-ΧΛΛ ενώ η γραμμή με το αστεράκι στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το αδιέγερτο κοντρόλ. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$. CTL: Αδιέγερτο κοντρόλ, IgM: αντι-IgM, Im: Imiquimod, CpG: CpG ODN, M: Μεταλλαγμένη ΧΛΛ, A: Αμετάλλακτη ΧΛΛ.

Πίνακας 32. Επίπεδα pERK σε αναλογία προς την ακτίνη (i) πριν από οποιαδήποτε καλλιέργεια των κυττάρων (επίπεδα αναφοράς, basal level), (ii) μετά από καλλιέργεια των κυττάρων της ΧΛΛ *in vitro* για 15, 50 και 60 λεπτά απουσία οποιουδήποτε προσδέτη (CTL) και (iii) μετά από διέγερση του BcR με αντι-IgM, του TLR7 με Imiquimod (Im) και του TLR9 με CpG μεμονωμένα ή σε συνδυασμό. Καταγράφονται η μέση και η διάμεση τιμή, το ανώτερο και κατώτερο όριο καθώς και ο βαθμός στατιστικής σημασίας (p) για κάθε σύγκριση

ΣΥΝΟΛΟ	Basal level	CTL (15)	IgM (15)	CTL (50)	IgM (50)	CpG (50)	Im (50)	IgM+CpG (50)	IgM+Im (50)	CTL (60)	CpG (60)	Im (60)
Διάμεση τιμή	0,458	0,630	0,724	0,270	0,462	0,685	0,552	0,890	0,737	0,239	0,222	0,205
Μέση τιμή	0,509	0,668	0,787	0,408	0,665	0,881	0,592	0,745	0,643	0,425	0,432	0,343
↓ τιμή	0,098	0,065	0,019	0,024	0,039	0,024	0,053	0,014	0,025	0,000	0,000	0,000
↑ τιμή	1,220	1,746	1,995	1,291	1,647	3,120	1,613	1,548	1,667	1,835	1,782	0,949
p			0,011 ^a	0,007 ^b	0,035 ^a	0,053 ^a	0,052 ^a	0,011 ^a	0,04 ^a	0,004 ^b	0,173 ^a	0,082 ^a

M-ΧΛΛ	Basal level	CTL (15)	IgM (15)	CTL (50)	IgM (50)	CpG (50)	Im (50)	IgM+CpG (50)	IgM+Im (50)	CTL (60)	CpG (60)	Im (60)
Διάμεση τιμή	0,345	0,566	0,694	0,09	0,075	0,135	0,165	0,439	0,212	0,059	0,092	0,036
Μέση τιμή	0,391	0,462	0,647	0,156	0,123	0,196	0,183	0,442	0,29	0,14	0,149	0,141
↓ τιμή	0,098	0,065	0,019	0,024	0,039	0,024	0,053	0,014	0,025	0,000	0,000	0,000
↑ τιμή	0,736	0,974	1,120	0,424	0,304	0,490	0,350	0,890	0,737	0,440	0,258	0,268
p			0,002 ^a	0,050 ^b	0,298 ^a	0,225 ^a	0,086 ^a	0,050 ^a	0,239 ^a	0,030 ^b	0,394 ^a	0,119 ^a

A-ΧΛΛ	Basal level	CTL (15)	IgM (15)	CTL (50)	IgM (50)	CpG (50)	Im (50)	IgM+CpG (50)	IgM+Im (50)	CTL (60)	CpG (60)	Im (60)
Διάμεση τιμή	0,661	0,731	0,875	0,436	1,153	1,053	0,75	0,945	0,851	0,503	0,644	0,689
Μέση τιμή	0,614	0,895	0,940	0,603	0,975	1,273	0,826	0,918	0,845	0,641	0,686	0,524
↓ τιμή	0,163	0,280	0,153	0,196	0,380	0,551	0,353	0,466	0,334	0,000	0,000	0,000
↑ τιμή	0,120	1,746	1,995	1,291	1,647	3,120	1,613	1,548	1,667	1,835	1,782	0,949
p			0,533 ^a	0,050 ^b	0,050 ^a	0,065 ^a	0,095 ^a	0,018 ^a	0,141 ^a	0,021 ^b	0,352 ^a	0,401 ^a

T-TEST M vs A	0,14	0,054	0,216	0,011	0,002	0,018	0,005	0,160	0,051	0,050	0,024	0,021
---------------	------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

^a **T-TEST κατά ζεύγη:** σύγκριση επιπέδων pERK μετά από διέγερση με τα επίπεδα pERK του κοντρόλ (κύτταρα της ίδιας περίπτωσης ΧΛΛ καλλιεργημένα κάτω από τις ίδιες συνθήκες χωρίς προσδέτη).

^b **T-TEST κατά ζεύγη:** σύγκριση επιπέδων pERK χωρίς προσδέτη μετά από 50 ή 60 λεπτά καλλιέργειας με τα επίπεδα pERK της ίδιας περίπτωσης ΧΛΛ μετά από 15 λεπτά καλλιέργεια

Basal level: Επίπεδα αναφοράς πριν από οποιαδήποτε καλλιέργεια, CTL: Αδιέγερτο κοντρόλ, IgM: αντί-IgM, Im: Imiquimod, CpG: CpG ODN, M-ΧΛΛ: μεταλλαγμένη, A-ΧΛΛ: αμετάλλακτη, ↑ τιμή: ανώτερη τιμή, ↓ τιμή: κατώτερη τιμή

4.2.2 Επαγωγή της απόπτωσης στα κύτταρα της ΧΛΛ μετά από διέγερση των υποδοχέων BcR, TLR7 ή TLR9, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό

4.2.2.1 Επαγωγή της απόπτωσης απουσία προσδέτη

Η επαγωγή της απόπτωσης μελετήθηκε σε 18 ασθενείς με ΧΛΛ (9 M-ΧΛΛ, 9 A-ΧΛΛ) μετά από διέγερση του BcR και/ή των TLR7 και TLR9. Το αποτέλεσμα εκτιμήθηκε μετά από 48 ώρες καλλιέργειας των κυττάρων *in vitro* με τη χρήση κατάλληλων μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της κασπάσης 8 και της PARP, όπως αναφέρεται

αναλυτικά στη μεθοδολογία. Προσδιορίστηκε (i) η ενεργός και ανενεργός κασπάση 8 και υπολογίστηκε το ποσοστό της ενεργούς κασπάσης 8 και (ii) η ολική πρωτεΐνη και το διασπασμένο κλάσμα της PARP και υπολογίστηκε το ποσοστό του διασπασμένου κλάσματος.

Αρχικά, μελετήθηκε η κασπάση 8 και η PARP σε κύτταρα ΧΛΛ μετά από 48 ώρες καλλιέργειας χωρίς καμία διέγερση. Η ενεργός ισομορφή της κασπάσης 8 ανιχνεύθηκε σε όλους σχεδόν τους ασθενείς (16/18, 89%, διάμεση τιμή ποσοστού ενεργού μορφής= 50,4%, μέση τιμή= 48,5%). Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ Μ-ΧΛΛ σε σχέση με την Α-ΧΛΛ όσον αφορά την παρουσία της ενεργού ισομορφής της κασπάσης 8 με την Α-ΧΛΛ να εμφανίζει χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τη Μ-ΧΛΛ (Εικόνα 35, Πίνακας 33). Το διασπασμένο κλάσμα της PARP ανιχνεύθηκε στα αδιέγερτα κύτταρα της ΧΛΛ μόνο σε 6/18 ασθενείς (33,3%). Το ποσοστό του διασπασμένου κλάσματος της PARP ήταν χαμηλό, με εύρος 0-25% και σχετικά υψηλότερες τιμές στην Α-ΧΛΛ συγκριτικά με τη Μ-ΧΛΛ (Εικόνα 36, Πίνακας 34).

4.2.2.2 Επαγωγή της απόπτωσης μετά από διέγερση των κυττάρων της ΧΛΛ μέσω BcR, TLR7 ή TLR9

Η διέγερση των κυττάρων της ΧΛΛ με αντί-IgM για 48 ώρες δεν είχε σημαντική επίδραση στα επίπεδα της ενεργού ισομορφής της κασπάσης 8 και του διασπασμένου κλάσματος της PARP. Παρομοίως, συγκρίνοντας τις δύο υποομάδες ασθενών δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στα επίπεδα της ενεργού ισομορφής της κασπάσης 8 μεταξύ Μ-ΧΛΛ και Α-ΧΛΛ (Πίνακας 33, Εικόνα 35). Όσον αφορά το διασπασμένο κλάσμα της PARP, παρότι εμφάνισε συγκριτικά υψηλότερα επίπεδα στην Α-ΧΛΛ σε σχέση με την Μ-ΧΛΛ (10,7% έναντι 3,1%), η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Πίνακας 34, Εικόνα 36).

Η διέγερση των κυττάρων μέσω των TLR7 και TLR9 προκάλεσε επαγωγή της απόπτωσης σε συγκριτικά μεγαλύτερο βαθμό στη Μ-ΧΛΛ έναντι της Α-ΧΛΛ. Ειδικότερα, η διέγερση των κυττάρων με Im ή CpG οδήγησε σε σημαντική αύξηση του διασπασμένου κλάσματος της PARP στη Μ-ΧΛΛ (Im: 37,9%, CpG: 36,2%, κοντρόλ: 2,7%), ενώ δεν παρατηρήθηκε αύξηση στους ασθενείς με Α-ΧΛΛ (Im: 10,7%, CpG: 1,8%, κοντρόλ: 6,5%) (Εικόνα 36, Πίνακας 34). Αντίθετα, τα επίπεδα της

ενεργού ισομορφής της κασπάσης 8 φαίνεται να επηρεάζονται σε μικρότερο βαθμό και στις δύο υποομάδες (Εικόνα 35, Πίνακας 33).

Πίνακας 33. Ποσοστό (%) ενεργού ισομορφής της κασπάσης 8 μετά από καλλιέργεια των κυττάρων της ΧΛΛ *in vitro* για 48 ώρες απουσία οποιουδήποτε προσδέτη και μετά από διέγερση του BcR με αντι-IgM, του TLR7 με Imiquimod (Im) και του TLR9 με CpG μεμονωμένα ή σε συνδυασμό. Καταγράφονται η μέση και η διάμεση τιμή, το ανώτερο και κατώτερο όριο καθώς και ο βαθμός στατιστικής σημασίας (p) για κάθε σύγκριση

ΣΥΝΟΛΟ	CTL (48)	IgM (48)	CpG (48)	Im (48)	IgM+CpG (48)	IgM+Im (48)
Διάμεση τιμή	50,42	61,00	66,89	62,42	59,92	94,52
Μέση τιμή	48,53	57,23	58,03	53,11	65,52	71,23
↓ τιμή	0,00	0,00	0,00	0,00	4,57	2,55
↑ τιμή	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
p ^a		0,785	0,297	0,968	0,199	0,957

M-ΧΛΛ	CTL (48)	IgM (48)	CpG (48)	Im (48)	IgM+CpG (48)	IgM+Im (48)
Διάμεση τιμή	54,41	64,01	90,61	100,00	100,00	100,00
Μέση τιμή	70,78	57,00	82,11	71,45	86,82	98,90
↓ τιμή	49,84	0,00	43,94	0,70	29,02	94,52
↑ τιμή	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
p ^a		0,709	0,520	0,474	0,362	0,057

A-ΧΛΛ	CTL (48)	IgM (48)	CpG (48)	Im (48)	IgM+CpG (48)	IgM+Im (48)
Διάμεση τιμή	21,19	56,09	48,30	59,34	55,98	34,44
Μέση τιμή	34,63	57,38	39,97	40,00	47,26	36,63
↓ τιμή	0,00	20,18	0,00	0,00	4,57	2,55
↑ τιμή	100,00	100,00	68,54	70,76	71,46	75,11
p ^a		0,111	0,508	0,957	0,578	0,418

T-TEST M vs A	0,05	0,988	0,011	0,218	0,021	0,040
---------------	------	-------	-------	-------	-------	-------

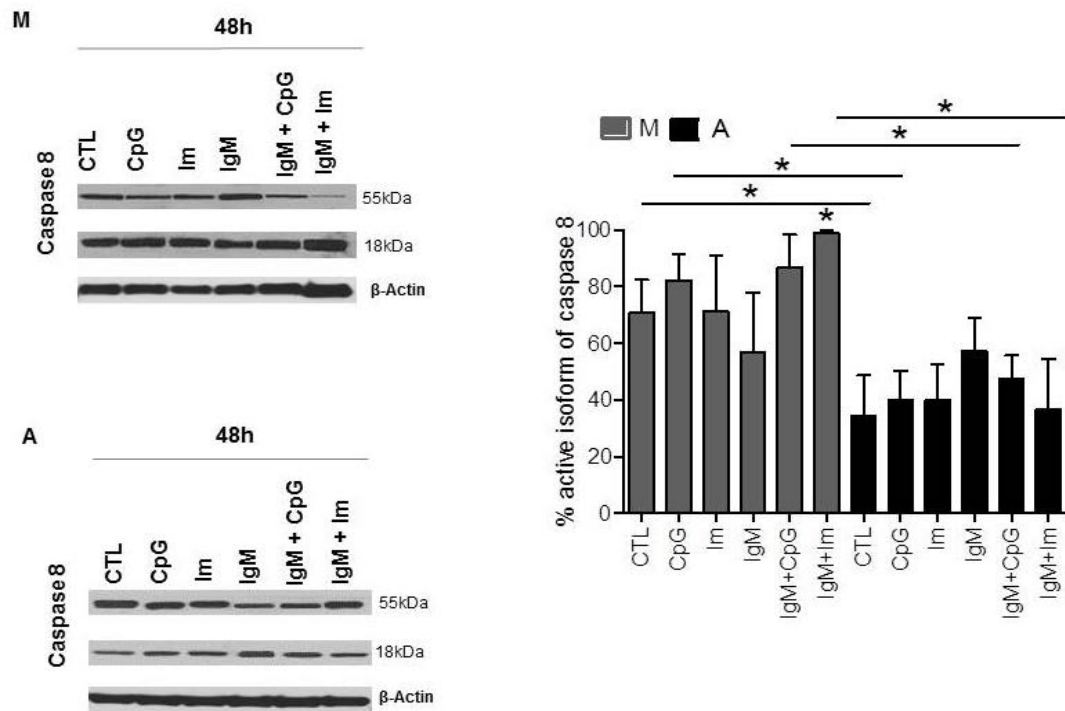
^a**T-TEST κατά ζεύγη:** σύγκριση ποσοστού ενεργού ισομορφής της κασπάσης 8 μετά από διέγερση με τα επίπεδα του κοντρόλ (κύτταρα της ίδιας περίπτωσης ΧΛΛ καλλιεργημένα κάτω από τις ίδιες συνθήκες χωρίς προσδέτη).

CTL: Αδιέγερτο κοντρόλ, IgM: αντί-IgM, Im:Imiquimod, CpG: CpG ODN, M-ΧΛΛ:μεταλλαγμένη, A-ΧΛΛ: αμετάλλακτη, ↑τιμή: ανώτερη τιμή, ↓τιμή: κατώτερη τιμή

4.2.2.3 Επαγωγή της απόπτωσης μετά από συνδιέγερση των κυττάρων της ΧΛΛ μέσω BcR+TLR7 ή μέσω BcR+TLR9

Η συνδιέγερση των κυττάρων της ΧΛΛ μέσω BcR+TLR7 ή μέσω BcR+TLR9 προκάλεσε αυξημένη επαγωγή της απόπτωσης συγκρινόμενη με το αδιέγερτο κοντρόλ ή με τη μεμονωμένη διέγερση των υποδοχέων BcR, TLR, με σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ διαφορετικών ασθενών με ΧΛΛ. Ειδικότερα, η αύξηση των επιπέδων της ενεργού ισομορφής της κασπάσης 8 και του διασπασμένου κλάσματος του PARP ήταν μεγαλύτερη στην υποομάδα των ασθενών με M-ΧΛΛ έναντι της υποομάδας με

A-ΧΛΛ, ιδίως μετά από διέγερση μέσω BcR+TLR7 (Εικόνες 35,36 , Πίνακας 33).



Εικόνα 35. Έκφραση ενεργού και ανενεργού μορφής της κασπάσης 8 μετά από καλλιέργεια των κυττάρων της ΧΛΛ *in vitro* για 48 ώρες απουσία οποιουδήποτε προσδέτη (αδιέγερτο κοντρόλ, CTL), μετά από διέγερση με αντι-IgM, Im και CpG μεμονωμένα ή σε συνδυασμό (αντι-IgM+Im και αντι-IgM+CpG). **Αριστερά:** Αποτελέσματα ανοσοανίχνευσης Western για την ανενεργό και ενεργό ισομορφή της κασπάσης 8 και την ακτίνη σε μια αντιπροσωπευτική περίπτωση M-ΧΛΛ (πάνω) και μια αντιπροσωπευτική περίπτωση A-ΧΛΛ (κάτω). **Δεξιά:** Το γράφημα αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση του ποσοστού της ενεργούς ισομορφής της κασπάσης 8 για τα αδιέγερτα κύτταρα, τα διεγερμένα με αντι-IgM, Im, CpG, αντι-IgM+Im και αντι-IgM+CpG κύτταρα της M-ΧΛΛ και A-ΧΛΛ. Η γραμμή με το αστεράκι πάνω από τις στήλες υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά της M-ΧΛΛ συγκριτικά με την A-ΧΛΛ ενώ το αστεράκι πάνω από τις στήλες στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το αδιέγερτο κοντρόλ. * $p < 0,05$. CTL: Αδιέγερτο κοντρόλ, IgM: αντί-IgM, Im: Imiquimod, CpG: CpG ODN, M: Μεταλλαγμένη ΧΛΛ, A: Αμετάλλακτη ΧΛΛ.

Πίνακας 34. Ποσοστό (%) διασπασμένου κλάσματος PARP μετά από καλλιέργεια των κυττάρων της ΧΛΛ *in vitro* για 48 ώρες απουσία οποιουδήποτε προσδέτη και μετά από διέγερση του BcR με αντι-IgM, του TLR7 με Im και του TLR9 με CpG μεμονωμένα ή σε συνδυασμό. Καταγράφονται η μέση και η διάμεση τιμή, το ανώτερο και κατώτερο όριο καθώς και ο βαθμός στατιστικής σημασίας (p) για κάθε σύγκριση

ΣΥΝΟΛΟ	CTL (48)	IgM (48)	CpG (48)	Im (48)	IgM+CpG (48)	IgM+Im (48)
Διάμεση τιμή	0,00	0,98	0,00	0,67	2,78	17,67
Μέση τιμή	4,49	6,69	18,97	24,35	23,34	38,86
↓ τιμή	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
↑ τιμή	25,22	52,21	100,00	100,00	100,00	100,00
p ^a		0,569	0,078	0,068	0,031	0,059

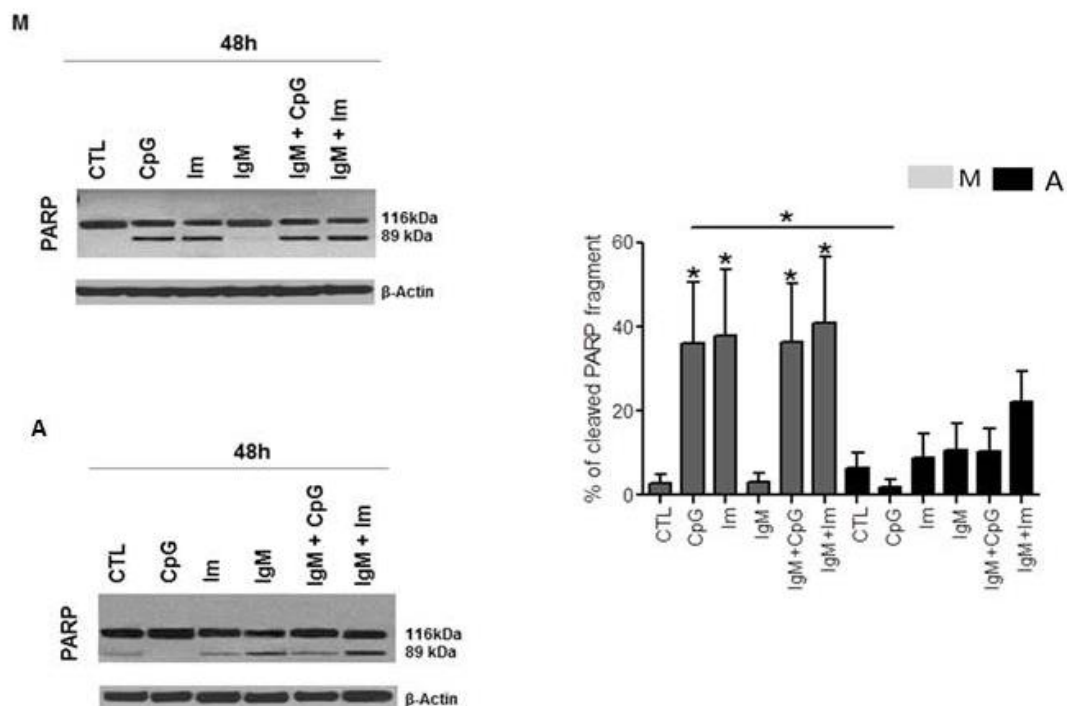
M- ΧΛΛ	CTL (48)	IgM (48)	CpG (48)	Im (48)	IgM+CpG (48)	IgM+Im (48)
Διάμεση τιμή	0,00	0,98	7,84	18,32	35,56	9,81
Μέση τιμή	2,72	3,10	36,16	37,87	36,45	40,84
↓ τιμή	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
↑ τιμή	19,51	18,80	100,00	100,00	100,00	100,00
p ^a		0,531	0,043	0,050	0,039	0,041

A-ΧΛΛ	CTL (48)	IgM (48)	CpG (48)	Im (48)	IgM+CpG (48)	IgM+Im (48)
Διάμεση τιμή	0,00	2,25	0,00	0,67	0,00	17,58
Μέση τιμή	6,49	10,74	1,78	8,90	10,22	22,14
↓ τιμή	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,62
↑ τιμή	25,22	52,21	16,01	38,56	47,72	55,74
p ^a		0,599	0,305	0,858	0,506	0,096

TTEST M vs A	0,388	0,283	0,043	0,122	0,105	0,304
--------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

^a**T-TEST κατά ζεύγη:** σύγκριση ποσοστού διασπασμένου κλάσματος PARP μετά από διέγερση με τα επίπεδα του κοντρόλ (κύτταρα της ίδιας περίπτωσης ΧΛΛ καλλιεργημένα κάτω από τις ίδιες συνθήκες χωρίς προσδέτη).

CTL: Αδιέγερτο κοντρόλ, IgM: αντί-IgM, Im:Imiquimod, CpG: CpG ODN, M-ΧΛΛ:μεταλλαγμένη, A-ΧΛΛ: αμετάλλακτη, ↑τιμή: ανώτερη τιμή, ↓τιμή: κατώτερη τιμή



Εικόνα 36. Έκφραση ολικής πρωτεΐνης και διασπασμένου κλάσματος PARP μετά από καλλιέργεια των κυττάρων της ΧΛΛ *in vitro* για 48 ώρες απουσία οποιουδήποτε προσδέτη (αδιέγερτο κοντρόλ, CTL), μετά από διέγερση με αντι-IgM, Im και CpG μεμονωμένα ή σε συνδυασμό (αντι-IgM+Im και αντι-IgM+CpG). **Αριστερά:** Αποτελέσματα ανοσοανίχνευσης Western για το ακέραιο και διασπασμένο κλάσμα της PARP και την ακτίνη σε μια αντιπροσωπευτική περίπτωση M-ΧΛΛ (πάνω) και μια αντιπροσωπευτική περίπτωση A-ΧΛΛ (κάτω). **Δεξιά:** Το γράφημα αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή με την τυπική απόκλιση του ποσοστού της διασπασμένης μορφής της PARP για τα αδιέγερτα κύτταρα, τα διεγερμένα με αντι-IgM, Im, CpG, αντι-IgM+IM και αντι-IgM+CpG κύτταρα της M-ΧΛΛ και A-ΧΛΛ. Η γραμμή με το αστεράκι πάνω από τις στήλες υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά της M-ΧΛΛ συγκριτικά με την A-ΧΛΛ ενώ το αστεράκι πάνω από τις στήλες στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το αδιέγερτο κοντρόλ. * $p < 0,05$. CTL: Αδιέγερτο κοντρόλ, IgM: αντί-IgM, Im: Imiquimod, CpG: CpG ODN, M: Μεταλλαγμένη ΧΛΛ, A: Αμετάλλακτη ΧΛΛ.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η νεοπλασματική εκτροπή είναι το αποτέλεσμα της διαταραχής των ρυθμιστικών μηχανισμών που διέπουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Αύξηση του πολλαπλασιασμού ή ελαττωμένη απόπτωση ή και τα δύο μαζί προάγουν την ανάπτυξη νεοπλασίας.

Η ΧΛΛ είναι η πιο συχνή λευχαιμία στο Δυτικό ημισφαίριο και αποτελεί υπόδειγμα για τη μελέτη των διαταραχών του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης σε κακοήθειες του αιμοποιητικού ιστού, με δεδομένο ότι τόσο η έναρξη όσο και η εξέλιξη της νόσου συνδέονται άμεσα με αλληλεπιδράσεις μεταξύ εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων μηχανισμών που επηρεάζουν το ρυθμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης των νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων^{48,123,49}.

Κυρίαρχο ρόλο στην παθογένεια της νόσου διαδραματίζει ο BcR. Τα μοριακά δεδομένα που στηρίζουν αυτήν την άποψη είναι κυρίως η επιλεκτικότητα του ρεπερτορίου των γονιδίων IGHV στη ΧΛΛ^{175,154,155,157,176,177,178}, η διαφορετική πορεία των ασθενών που φέρουν γονίδια IGHV με διαφορετικό φορτίο μεταλλάξεων (M-ΧΛΛ έναντι A-ΧΛΛ)^{140,151} καθώς και η ύπαρξη υποσυνόλων ασθενών με σχεδόν πανομοιότυπους “στερεότυπους” BcR^{154,155,176,178}. Ειδικότερα, το φορτίο των σωματικών μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV αποτελεί σήμερα έναν από τους πιο σημαντικούς βιολογικούς δείκτες για τον καθορισμό της πρόγνωσης των ασθενών με ΧΛΛ. Οι ασθενείς με A-ΧΛΛ αποδείχθηκε ότι έχουν πολύ χειρότερη πρόγνωση σε σύγκριση προς τους ασθενείς με M-ΧΛΛ^{140,151}.

Το όριο του 98% της νουκλεοτιδικής ταυτότητας που χρησιμοποιείται για την κατάταξη των κλωνοτυπικών αναδιατάξεων στη μεταλλαγμένη ή την αμετάλλακτη κατηγορία έχει μεν πρακτική, προγνωστική αξία αλλά δεν έχει βιολογική σημασία. Συγκεκριμένα, υπάρχει το παράδοξο οι αναδιατάξεις με νουκλεοτιδική ταυτότητα $\geq 98\%$ αλλά $< 100\%$ να θεωρούνται αμετάλλακτες ενώ φέρουν σωματικές μεταλλάξεις, οπότε επιβάλλεται η διάκριση μεταξύ πρόγνωσης και βιολογίας. Αναφορικά με την αναγνώριση ενός ορίου με προγνωστική αξία, ορισμένες μελέτες προτείνουν ως όριο το 3%²²⁵ ή ακόμα και το 5%²²⁶. Επίσης, μια σχετικά πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι οι ασθενείς που έφεραν γονίδια IGHV με ταυτότητα 97-97,9%

εμφάνισαν πιο επιθετική κλινική πορεία συγκριτικά με τους ασθενείς με ταυτότητα <97% αλλά λιγότερο επιθετική πορεία από τους ασθενείς με ταυτότητα >98%. Έτσι, πρότειναν την κατάταξη των ασθενών που φέρουν γονίδια IGHV με ταυτότητα 97-97,9% σε μια ανεξάρτητη ομάδα με ενδιάμεση πρόγνωση. Ο μικρός ωστόσο αριθμός των ασθενών της μελέτης εγείρει προβληματισμό για τη στατιστική αξία αυτών των ευρημάτων²²⁷.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν τα ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά των κλωνοτυπικών IGHV-IGHD-IGHJ αναδιατάξεων στη ΧΛΛ και διερευνήθηκε πιθανή συσχέτισή τους με την επιθετικότητα του νεοπλασματικού κλώνου. Αξιολογήθηκαν τα ευρήματα από 799 ασθενείς με ΧΛΛ και μέσο χρόνο παρακολούθησης τους 70 μήνες.

Αρχικά μελετήθηκε το ρεπερτόριο των γονιδίων IGHV. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επιβεβαίωσαν προηγούμενες μελέτες αναφορικά με την επιλεκτικότητα του ρεπερτορίου^{175,154}. Συγκεκριμένα, 7 γονίδια IGHV (IGHV4-34, IGHV1-69, IGHV3-30, IGHV3-23, IGHV3-7, IGHV1-2 και IGHV4-39) βρέθηκαν να χρησιμοποιούνται στο 51,2% του συνόλου των αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ. Η επιλεκτικότητα σε επίπεδο γονιδίων IGHV υποδεικνύει ότι στην ανάπτυξη της νόσου εμπλέκεται περιορισμένος αριθμός αντιγόνων ή υπεραντιγόνων διεγείροντας για πολλαπλασιασμό λεμφοκύτταρα τα οποία εκφράζουν υποδοχείς που κωδικοποιούνται από τα συγκεκριμένα γονίδια.

Στη συνέχεια, οι αναδιατάξεις IGHV-IGHD-IGHJ αρχικά διακρίθηκαν σε αμετάλλακτες και μεταλλαγμένες με βάση το γενικά αποδεκτό όριο ταυτότητας 98% του γονιδίου IGHV σε σχέση με το αντίστοιχο μη αναδιαταγμένο γονίδιο IGHV. Σε συμφωνία με όλες τις προηγούμενες μελέτες παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ως προς το ρεπερτόριο των γονιδίων IGHV στις 2 υποομάδες, με συχνότερα γονίδια στην υποομάδα των μεταλλαγμένων τα IGHV4-34, IGHV3-7 και IGHV3-23, ενώ στην υποομάδα των αμετάλλακτων τα IGHV1-69, IGHV4-39 και IGHV1-2^{175,154}. Η χρησιμοποίηση διαφορετικών γονιδίων IGHV στις δύο υποομάδες πιθανότατα αντικατοπτρίζει τη διαφορετική φύση των αντιγόνων που επιλέγουν τους προδρόμους των νεοπλασματικών κλώνων στη Μ-ΧΛΛ έναντι της Α-ΧΛΛ.

Περαιτέρω διάκριση των αναδιατάξεων με ομολογία $\geq 98\%$ σε «πραγματικά αμετάλλακτες» με ταυτότητα 100% και «ελάχιστα μεταλλαγμένες» με ταυτότητα

98-99,9% και των αναδιατάξεων με ταυτότητα <98% σε «οριακά μεταλλαγμένες» με ταυτότητα 96-97,9% και «πολύ μεταλλαγμένες» με ομολογία <96% δεν ανέδειξε γενικά σημαντικές διαφορές στο ρεπερτόριο των γονιδίων IGHV. Μοναδική εξαίρεση αποτέλεσε το γονίδιο IGHV3-21 που ήταν πιο συχνό στην υποομάδα με τις «ελάχιστα μεταλλαγμένες» και τις «οριακά μεταλλαγμένες» αναδιατάξεις.

Το γονίδιο IGHV3-21 χρησιμοποιείται σχετικά σπάνια στη ΧΛΛ με εξαίρεση τη Σκανδιναβία όπου έχει καταγραφεί αυξημένη συχνότητα, έως 11,7%^{183,228,152,229}. Στην παρούσα μελέτη η συχνότητα του γονιδίου IGHV3-21 ήταν 3,5%. Οι σημαντικές διαφορές ως προς τη συχνότητα του γονιδίου IGHV3-21 στη Σκανδιναβία σε σχέση με την υπόλοιπη Ευρώπη πιθανόν αντανakλούν γενετικές διαφορές μεταξύ των δύο πληθυσμών ή περιβαλλοντικές διαφορές στις συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές. Η χρησιμοποίηση του γονιδίου IGHV3-21 στη ΧΛΛ έχει συσχετιστεί με κακή πρόγνωση, ανεξαρτήτως του φορτίου των σωματικών μεταλλάξεων²³⁰.

Στο επόμενο στάδιο μελετήθηκαν τα ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά των μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV στο σύνολο των αλληλουχιών με ομολογία <100% αλλά και στις υποομάδες με διαφορετικό φορτίο μεταλλάξεων (ελάχιστα, οριακά και πολύ μεταλλαγμένες) και αναζητήθηκαν πιθανές συσχετίσεις. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο σύνολο των γονιδίων IGHV αλλά και στις περιοχές VH FRs και VH CDRs των γονιδίων IGHV.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η εισαγωγή των μεταλλάξεων πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του κλασσικού μηχανισμού ΣΥΜ²³¹. Συγκεκριμένα, υπερίσχυαν οι μεταλλάξεις αντικατάστασης (R) έναντι των σιωπηρών (S), οι πουρίνες στοχεύονταν περισσότερο από τις πυριμιδίνες και οι μεταβάσεις ήταν συχνότερες από τις μεταπτώσεις. Παρατηρήθηκε αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων R προς S στις περιοχές VH CDRs σε σύγκριση με τις περιοχές VH FRs. Οι αμινοξικές αντικαταστάσεις αξιολογήθηκαν περαιτέρω με βάση τις φυσικοχημικές ιδιότητες του αμινοξέος που κωδικοποιούσε η μεταλλαγμένη αλληλουχία και του αμινοξέος που κωδικοποιούσε η μη αναδιαταγμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία. Καταγράφηκε αυξημένη συχνότητα μη συντηρημένων αμινοξικών αντικαταστάσεων στις περιοχές VH CDRs σε σχέση με τις VH FRs. Ο αυξημένος λόγος R/S στις περιοχές VH CDRs και η αυξημένη συχνότητα μη συντηρημένων αντικαταστάσεων αποτελούν επιπλέον ενδείξεις για την «πίεση» που ασκείται μέσω του αντιγόνου στις συγκεκριμένες

περιοχές του γονιδίου IGHV στη ΧΛΛ. Μελέτη των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών των μεταλλάξεων στη ΧΛΛ στις τρεις υποομάδες με διαφορετικό φορτίο μεταλλάξεων (ελάχιστα, οριακά και πολύ μεταλλαγμένες) δεν ανέδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των υποομάδων.

Με δεδομένη την επιλεκτικότητα του ρεπερτορίου των γονιδίων IGHV, επικεντρωθήκαμε στη συνέχεια σε υποομάδες αναδιατάξεων με ομολογία <100% που χρησιμοποιούν το ίδιο γονίδιο IGHV. Στα συχνότερα γονίδια IGHV4-34, IGHV3-7, IGHV3-23, IGHV3-30, IGHV1-69 και IGHV3-21, η εισαγωγή των μεταλλάξεων φαίνεται ότι πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια κλασσικού μηχανισμού ΣΥΜ και δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά στο λόγο R/S, τη στόχευση πουρινών έναντι πυριμιδινών και μεταβάσεων έναντι μεταπτώσεων.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί η αυξημένη συχνότητα εισαγωγής ασπαρτικού και γλουταμικού οξέος σε 53/113 (47%) μη συντηρημένες αντικαταστάσεις στην περιοχή VH CDR1 του γονιδίου IGHV4-34 και ιδιαίτερα σε αναδιατάξεις που ανήκουν στο στερεότυπο υποσύνολο #4. Οι ασθενείς αυτοί παρουσιάζουν μοναδικά χαρακτηριστικά και συγκεκριμένα, έχουν πολύ μικρότερη ηλικία κατά τη διάγνωση συγκριτικά με το σύνολο των ασθενών με ΧΛΛ και παρουσιάζουν πολύ ήπια κλινική πορεία^{155,154,232,233,234}.

Τα αντισώματα IGHV4-34 είναι συχνά στο ρεπερτόριο των φυσιολογικών Β λεμφοκυττάρων. Ωστόσο, η παραγωγή τους ελέγχεται αυστηρά ώστε να περιοριστεί η εγγενής αυτοαντιδραστικότητά τους, που σχετίζεται με την αναγνώριση της Ν-ακέτυλο-λακτοζαμίνης (N- acetylactosamine, NAL) μέσω ενός μοτίβου στην περιοχή VH FR1 (θέσεις 7 και 24-26: W, AVY, αντιστοίχως)²³⁵. Το μόριο NAL προσδιορίζει την ομάδα των αντιγόνων του αίματος I/i όπως και το σύνολο των αντιγόνων στη νόσο των ψυχοσυγκολλητινών. Τα αντιγόνα I/i εκφράζονται επίσης σε αποπτωτικά κύτταρα. Μέσω του μοτίβου W-AVY, τα αντισώματα IGHV4-34 αναγνωρίζουν αντιγονικούς επιτόπους NAL που εντοπίζονται σε διάφορα αυτοαντιγόνα αλλά και εξωγενή αντιγόνα.

Φαίνεται ότι τα αντισώματα IGHV4-34, παρά την εγγενή αυτοαντιδραστικότητά τους, διατηρήθηκαν στο φυσιολογικό ρεπερτόριο των Β λεμφοκυττάρων, καθώς εμπλέκονται στην απομάκρυνση αποπτωτικών σωματίων²³⁶. Ανάλυση των αναδιατάξεων IGHV4-34 στη ΧΛΛ ανέδειξε ότι παρά το μεγάλο αριθμό των

σωματικών μεταλλάξεων που παρουσιάζουν, το μοτίβο αναγνώρισης της N-ακετυλο-λακτοζαμίνης παραμένει τις περισσότερες φορές ανέπαφο, υποδεικνύοντας πιθανή διέγερση των κλωνογενών κυττάρων της ΧΛΛ από το συγκεκριμένο επίτοπο¹⁵⁴.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι βαριές αλυσίδες των ασθενών του υποσυνόλου #4 εμφανίζουν νοσο-ειδικά πρότυπα σωματικών μεταλλάξεων, ενδεικτικά για την αναγνώριση κοινού επιτόπου^{155,154}. Χαρακτηριστική είναι η συχνή εισαγωγή όξινων αμινοξέων η οποία πιθανόν αντιπροσωπεύει μια απόπειρα για την εξάλειψη της anti-DNA ειδικότητας. Πειράματα σε anti-DNA διαγονιδιακά ποντίκια έδειξαν ότι η εισαγωγή όξινων αμινοξέων (ιδίως ασπαρτικού) από τη διαδικασία της ΣΥΜ οδηγεί σε απώλεια της anti-DNA ειδικότητας^{233,237}. Η σημασία των σωματικών μεταλλάξεων για πιθανή τροποποίηση της ειδικότητας των κλωνογενών κυττάρων και την επαγωγή κάποιου βαθμού ανεργικής κατάστασης υποστηρίζεται επίσης και από *in vitro* μελέτες με ανασυνδυασμένα αντισώματα από ασθενείς με ΧΛΛ με παρόμοιο, στερεότυποIGHV4-34 BcR. Συγκεκριμένα, η αφαίρεση των σωματικών μεταλλάξεων διαφοροποιούσε πολύ την ειδικότητα των αντισωμάτων, τα οποία αποκτούσαν πολύ/αυτοαντιδραστικότητα και αυξημένη HEr-2 δράση¹⁹².

Με δεδομένο τον καθοριστικό ρόλο της περιοχής VH CDR3 στην αναγνώριση του αντιγόνου^{238,239}, μελετήθηκαν τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της περιοχής VH CDR3 και αξιολογήθηκε το μήκος αλλά και η αμινοξική σύσταση της περιοχής VH CDR3. Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, οι αμετάλλακτες αναδιατάξεις έφεραν μεγαλύτερου μήκους VH CDR3 συγκριτικά με τις μεταλλαγμένες¹⁵⁵, ενδεικτικό της διαφορετικής φύσης των αντιγόνων που διεγείρουν τα νεοπλασματικά κύτταρα στη Μ-ΧΛΛ έναντι της Α-ΧΛΛ. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν περιπτώσεις με κοινά αμινοξικά μοτίβα στην περιοχή VH CDR3 που κατατάσσονται σε στερεότυπα υποσύνολα σύμφωνα με τα καθιερωμένα κριτήρια^{183,152,153,154,155,157,158}.

Σε επίπεδο γονιδίων, μεγαλύτερο διάμεσο μήκος καταγράφηκε σε αναδιατάξεις του γονιδίουIGHV1-69 και μικρότερο σε αναδιατάξεις των γονιδίωνIGHV3-7, IGHV3-21 και IGHV3-23. Οι κλωνοτυπικές αναδιατάξεις του γονιδίουIGHV1-69 συχνά συνδυάζονται με συγκεκριμένα γονίδιαIGHD καιIGHJ, οδηγώντας συνήθως στη δημιουργία μακρών περιοχών VH CDR3s με διακριτά μοτίβα^{240,241,157}. Από τα παραπάνω συνάγεται ότι πιθανόν αναγνωρίζουν συγκεκριμένους αντιγονικούς

επιτόπους και η αναγνώριση αυτή παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη του λευχαιμικού κλώνου. Πρόσφατη *in vitro* μελέτη έδειξε ότι αναδιατάξεις ασθενών με ΧΛΛ που χρησιμοποιούν το γονίδιο IGHV1-69 και ανήκουν στο στερεότυπο υποσύνολο #6 αναγνωρίζουν την πρωτεΐνη MYH1A (βαριά αλυσίδα της μυοσίνης). Η εν λόγω πρωτεΐνη εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα αλλά εκφράζεται και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη κυττάρων που αποπίπτουν λόγω οξειδωτικού stress²⁴².

Για να αξιολογηθεί ο αντίκτυπος που έχει το διαφορετικό φορτίο των μεταλλάξεων στην επιβίωση των ασθενών, προσδιορίστηκαν η OS και ο TTT αρχικά στην Μ-ΧΛΛ έναντι της Α-ΧΛΛ και στη συνέχεια σε υποομάδες με διαφορετικό φορτίο μεταλλάξεων. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά τόσο ως προς την OS όσο και ως προς την TTT στη Μ-ΧΛΛ έναντι της Α-ΧΛΛ, σε συμφωνία με όλες τις προηγούμενες μελέτες, ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο υποομάδων της Α-ΧΛΛ (πραγματικά και ελάχιστα μεταλλαγμένες) και της Μ-ΧΛΛ (οριακά και πολύ μεταλλαγμένες) αντίστοιχα.

Τέλος, οι αναδιατάξεις διακρίθηκαν περαιτέρω σε διαδοχικά υποσύνολα που διέφεραν μεταξύ τους κατά 1% ως προς την νουκλεοτιδική ταυτότητά τους με το αντίστοιχο μη αναδιαταγμένο γονίδιο IGHV. Η διαφορά ομολογίας 1% μεταξύ των υποομάδων δεν ανέδειξε καμία σημαντική διαφορά σε ότι αφορά την OS όσο και την TTT μεταξύ των υποομάδων της Α-ΧΛΛ (100% έναντι 99-99,9% έναντι 98-98,9) και της Μ-ΧΛΛ (97-97,9 έναντι 96-96,9 έναντι <96%), αντιστοίχως. Αντίθετα, η σύγκριση των υποομάδων με ομολογία 97-97,9% και 98-98,9% ανέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά τόσο στην OS όσο και στην TTT αποδεικνύοντας ότι το όριο 98% υπερτερεί ως προς την προγνωστική σημασία για τους ασθενείς με ΧΛΛ.

Με δεδομένη τη διαφορετική κλινική πορεία που παρουσιάζουν οι ασθενείς με ΧΛΛ ανάλογα με τον αριθμό των μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών, μελετήσαμε στη συνέχεια τα αποτελέσματα της διέγερσης του υποδοχέα BcR στις δύο διαφορετικές υποομάδες ΧΛΛ και συγκεκριμένα σε 11 ασθενείς Μ-ΧΛΛ και 10 ασθενείς Α-ΧΛΛ. Στην Α-ΧΛΛ, η απουσία της ΣΥΜ σχετίζεται με πολυαντιδραστικότητα, ενώ στη Μ-ΧΛΛ η παρουσία ΣΥΜ είτε εξασθενεί/εξουδετερώνει είτε επαυξάνει την ειδικότητα του BcR για το αντιγόνο²⁴³.

Οι δύο αυτές υποομάδες διαφέρουν ως προς τον τρόπο μεταβίβασης σημάτων μετά

από ενεργοποίηση του BcR ενώ γενικά παρουσιάζουν μειωμένη απόκριση μετά τη διέγερσή του^{244,245}.

Στην Α-ΧΛΛ παρατηρείται μεταβίβαση σημάτων μέσω της επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης IgM. Αντίθετα, στη Μ-ΧΛΛ η μεταβίβαση σήματος μέσω της IgM είναι μειωμένη^{143,179}. Η ικανότητα σηματοδότησης συνδέεται με την κλινική πορεία των ασθενών, αφού η Α-ΧΛΛ εμφανίζει επιθετική κλινική πορεία, ενώ η Μ-ΧΛΛ ακολουθεί ήπια πορεία, πιθανώς λόγω εξασθενημένης σηματοδότησης μέσω του BcR.

Η σημασία της ενδοκυττάριας σηματοδότησης μέσω της διέγερσης του BcR αλλά και της επίδρασης του μικροπεριβάλλοντος αποδεικνύεται και από πρόσφατες μελέτες αλληλούχισης του γονιδιώματος ο οποίες αποκαλύπτουν νέες σωματικές μεταλλάξεις των BcR, TLR, Notch, NF-κB και των MAP κινασών που εμπλέκονται στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση με αντίκτυπο στην κλινική πορεία και εξέλιξη της νόσου^{246,247,248}.

In vivo τόσο τα φυσιολογικά Β λεμφοκύτταρα όσο και τα κύτταρα της ΧΛΛ δέχονται ταυτόχρονα ερεθίσματα εκτός από τον BcR και από τους υποδοχείς της έμφυτης ανοσίας TLRs. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα κύτταρα της ΧΛΛ αναγνωρίζουν κοινά παθογόνα, δηλαδή βακτήρια ή αποπτωτικά προϊόντα^{165,207,208,206}. Τέτοιες δομές αναγνωρίζονται επίσης από τους TLRs που εκφράζονται στα Β λεμφοκύτταρα συνδέοντας έτσι την έμφυτη με την προσαρμοστική ανοσία. TLRs εκφράζονται στα Β λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ και το ρεπερτόριο τους προσομοιάζει με το αντίστοιχο των Β λεμφοκυττάρων μνήμης^{165,207,208,206}. Επιπλέον, οι TLR που εκφράζονται είναι λειτουργικοί καθώς επάγουν έκφραση συν-διεγερτικών μορίων και πολλαπλασιασμό ή απόπτωση κατά περίπτωση^{165,207,208,206}. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι υποομάδες ασθενών με ΧΛΛ που ορίζονται με βάση ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά των κλωνοτυπικών BcR εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης και λειτουργικότητας των υποδοχέων TLR. Συγκεκριμένα, στη Μ-ΧΛΛ η ενεργοποίηση του TLR9 οδηγεί σε μεγαλύτερη αύξηση της έκφρασης των συν-διεγερτικών μορίων, ενώ το αντίστροφο συμβαίνει μετά από ενεργοποίηση του TLR7²⁰⁶.

Λαμβάνοντας υπόψη τη διαφορετική σηματοδότηση του BcR και των TLR7 και TLR9 μεταξύ των δύο κύριων υποομάδων ασθενών με ΧΛΛ, καθώς και τον καθοριστικό

ρόλο του μικροπεριβάλλοντος στην ανάπτυξη και εξέλιξη της ΧΛΛ, στην παρούσα εργασία επιλέξαμε να μελετήσουμε τους TLR7 και TLR9 οι οποίοι λειτουργικοί στα κύτταρα της ΧΛΛ και επιπλέον εκφράζονται διαφορετικά στη Μ-ΧΛΛ έναντι της Α-ΧΛΛ. Διερευνήσαμε πιθανές διαφορές στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση μεταξύ Μ-ΧΛΛ και Α-ΧΛΛ μετά από διέγερση του BcR και των TLR7 και TLR9. Επιπλέον, μελετήσαμε την επίδραση διπλών σημάτων (μέσω BcR και TLR) σε σύγκριση με σήματα που προέρχονται από έναν μόνο υποδοχέα.

Συγκεκριμένα, εξετάσαμε την ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού MAPK σε Β λεμφοκύτταρα από 21 περιπτώσεις ΧΛΛ (11 Μ-ΧΛΛ και 10 Α-ΧΛΛ). Σε διαφορετικά χρονικά στιγμιότυπα αναλύθηκε η ενεργοποίηση της ERK με προσδιορισμό της φωσφορυλιωμένης ισομορφής της. Τα τελευταία χρόνια, η προσοχή έχει στραφεί στο ρόλο που διαδραματίζει η κινάση ERK στην ανάπτυξη της νόσου και στο πώς συμμετέχει ενεργά στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση. Διάφορες μελέτες προσπαθούν να συσχετίσουν την ενεργοποίηση της ERK και το μεταλλακτικό φορτίο των ασθενών με στόχο τη συσχέτισή της με την ετερογενή κλινική πορεία των περιπτώσεων ΧΛΛ, ωστόσο δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί ο ακριβής ρόλος της στα νεοπλασματικά Β λεμφοκύτταρα^{198,196,199,200,201,202}.

Σε παλαιότερη μελέτη είχε αναφερθεί ότι η κινάση ERK είναι συνεχώς φωσφορυλιωμένη σε περιπτώσεις στις οποίες δεν υπάρχει ανταπόκριση μετά από διέγερση του BcR, κυρίως στη Μ-ΧΛΛ. Επίσης, στις περιπτώσεις αυτές διαπιστώθηκε αυξημένη ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα NF-AT και απουσία φωσφορυλίωσης της Akt¹⁹⁵. Τα χαρακτηριστικά αυτά έχουν συσχετιστεί με ανεργία σε Β λεμφοκύτταρα ποντικού. Έτσι, προτάθηκε ότι τα ΧΛΛ κύτταρα με παρόμοια χαρακτηριστικά έχουν καταστεί ανεργικά μετά από παρατεταμένη έκθεση σε αυτο-αντιγόνα¹⁹⁷. Στην παρούσα μελέτη ωστόσο δεν επιβεβαιώθηκε το συγκεκριμένο αποτέλεσμα, αφού στην αδιέγερτη κατάσταση φωσφορυλιωμένη ERK ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν αν και με μεγάλη διακύμανση στις τιμές.

Τα διαφορετικά αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται σε διαφορετική μεθοδολογική προσέγγιση και αξιολόγηση αποτελεσμάτων. Επιπλέον, δεδομένου ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα της ΧΛΛ αλληλεπιδρούν με το μικροπεριβάλλον κυρίως στους λεμφαδένες, τα κύτταρα με υψηλά επίπεδα pERK ίσως είναι και τα πιο πρόσφατα κυκλοφορούντα κύτταρα που μπορεί να διαφέρουν μεταξύ

διαφορετικών περιπτώσεων ή σε διαφορετικά στιγμιότυπα στην πορεία της νόσου²⁴⁹.

Η ERK βρέθηκε φωσφορυλιωμένη σε όλα τα δείγματα των ασθενών με ΧΛΛ που μελετήθηκαν, ωστόσο με μεγάλη διακύμανση. Παρότι τα κύτταρα της Α-ΧΛΛ παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα pERK σε σχέση με τα κύτταρα της Μ-ΧΛΛ, ωστόσο η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες^{223,224}.

Γενικά, παρατηρήθηκε σταδιακή πτώση των επιπέδων της pERK κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας χωρίς προσδέτη, η οποία ήταν ιδιαίτερα σημαντική στα κύτταρα της Μ-ΧΛΛ συγκριτικά με την Α-ΧΛΛ, ένδειξη ότι το σήμα στην Α-ΧΛΛ είναι πιο παρατεταμένο και τονικό σε αντίθεση με τη Μ-ΧΛΛ, όπου είναι πιο παροδικό και εξασθενεί αμέσως.

Μετά από διέγερση με αντι-IgM παρατηρήθηκε αύξηση της φωσφορυλίωσης της ERK στις περισσότερες περιπτώσεις ωστόσο με μεγάλη ετερογένεια. Η ενεργοποίηση των MAP κινασών προάγει την επιβίωση των νεοπλασματικών κυττάρων ενεργοποιώντας διάφορες προαποπτωτικές πρωτεΐνες¹⁹⁶. Στα 15 λεπτά παρατηρήθηκε αυξημένη φωσφορυλίωση της ERK σε σύγκριση με το αδιέγερτο control, η οποία ήταν στατιστικά σημαντική στη Μ-ΧΛΛ. Το γεγονός αυτό πιθανόν συνάδει με την αδυναμία απάντησης αυτών των κυττάρων στη διέγερση μέσω BcR και δείχνει ότι η p-ERK αποτελεί κρίσιμο μόριο που διαφοροποιεί τη σηματοδότηση καθοδικά του BcR. Αντίθετα αποτελέσματα βρέθηκαν μετά από 50 λεπτά καλλιέργειας, όπου τα επίπεδα της p-ERK ήταν αυξημένα μετά από τη διέγερση του BcR μόνο στην Α-ΧΛΛ. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι στη Μ-ΧΛΛ το σήμα είναι πιο παροδικό ενώ στην Α-ΧΛΛ έχει μεγαλύτερη διάρκεια, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει τη συμπεριφορά του κυττάρου.

Φαίνεται λοιπόν, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, ότι η *in vitro* ενεργοποίηση του BCR με αντι-IgM στα Β νεοπλασματικά κύτταρα οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της ERK και ότι οι ασθενείς με διαφορετικό status μεταλλάξεων απαντούν διαφορετικά^{198,196}. Αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης της ERK εμφανίζουν οι Α-ΧΛΛ, επιβεβαιώνοντας ότι σήματα επιβίωσης και επέκτασης είναι πιθανότερο να μεταδίδονται καλύτερα στην αμετάλλακτη ΧΛΛ σε σχέση με τη Μ-ΧΛΛ^{189,250}.

Σε ότι αφορά τους TLRs, βρήκαμε ότι η διέγερση του TLR9 με CpG αλλά και του TLR7 με Im οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της pERK, ωστόσο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε μετά από διέγερση του TLR9 (με CpG). Σταδιακή πτώση των επιπέδων της pERK παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας και με τους δύο προσδέτες. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με παλαιότερες μελέτες που δείχνουν ότι η διέγερση με TLR9 έχει μεγαλύτερη επίδραση στη ΧΛΛ συγκριτικά με τον TLR7²⁵¹. Συνολικά, η διέγερση του TLR9 με CpG και του TLR7 με Im οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της p-ERK κυρίως στην Α-ΧΛΛ, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες^{206,201,219}. Συνεπώς, φαίνεται ότι η p-ERK διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην σηματοδότηση των υποδοχέων TLR και ευθύνεται για τις διαφορετικές απαντήσεις που παρατηρούνται μετά από διέγερση των TLR7 και TLR9 στη Μ-ΧΛΛ και την Α- ΧΛΛ.

Η συνδιέγερση BcR και TLR οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της pERK σε σχέση με το αδιέγερτο κοντρόλ και στις δύο υποομάσδες ασθενών. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι το συνδυασμένο σήμα διαφοροποιεί την ενδοκυττάρια σηματοδότηση. Η σύγκριση των επιπέδων της pERK μετά από μεμονωμένη διέγερση μέσω του BcR, του TLR7 ή του TLR9 με τα επίπεδα της pERK μετά από σύγχρονη διέγερση του BcR με τον TLR7 ή τον TLR9 ανέδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ διαφορετικών ασθενών. Ειδικότερα, στη Μ-ΧΛΛ, η συνδιέγερση με αντί-IgM+CpG αύξησε σημαντικά τα επίπεδα της p-ERK συγκριτικά με τη μεμονωμένη διέγερση με αντί-IgM ή CpG. Αντίθετα, στην Α-ΧΛΛ, τα επίπεδα της pERK μετά από διπλή διέγερση δεν διέφεραν σημαντικά από εκείνα που καταγράφηκαν μετά από μεμονωμένη διέγερση με αντί-IgM ή CpG. Θα μπορούσε να υποθέσει κανείς πως ενώ στη Μ-ΧΛΛ BCR και TLR συνεργάζονται στην Α-ΧΛΛ δρούν ανταγωνιστικά, ιδίως ο BcR με τον TLR 9.

Η συνεργασία μεταξύ προσαρμοστικής και έμφυτης ανοσίας μέσω των αντιγονοειδικών σημάτων και των υποδοχέων TLR αποτελεί ιδιότητα όχι μόνο των φυσιολογικών αλλά και των αυτοαντιδραστικών κυττάρων¹¹⁷. Στα φυσιολογικά κύτταρα το λειτουργικό αποτέλεσμα εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξης των κυττάρων και διαφοροποιείται μεταξύ των διαφορετικών τύπων κυττάρων στους κυτταρικούς υποπληθυσμούς¹¹⁸. Πρόσφατα δεδομένα τεκμηριώνουν τα παραπάνω καθώς η διέγερση μέσω BcR μπορεί να εμποδίσει ή και ν' αντιστρέψει την

επαγόμενη από τον TLR7 ανοχή¹²¹, ενώ από την άλλη η διέγερση του TLR9 με CpG ολιγονουκλεοτίδια δρα συνεργικά με τον BcR, ενεργοποιώντας το ενδοκυττάριο μονοπάτι των MAP κινασών και προκαλώντας αύξηση της φωσφορυλίωσης πολλών πρωτεϊνών^{201,122}.

Από την άλλη πλευρά, πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η ταυτόχρονη σηματοδότηση μέσω BcR/TLR μπορεί να επαγάγει αυτοανοσία. Δύο πρόσφατες ανεξάρτητες μελέτες έδειξαν ότι σύμπλοκα αντιγόνου-DNA και αντιγόνου-RNA μπορεί να οδηγήσουν στην παραγωγή αυτό-αντιγόνων, ενεργοποιώντας το B λεμφοκύτταρο μέσω του αυτο-αντιδραστικού BcR και του TLR9 ή TLR7, αντιστοίχως^{119,121}. Μένει να αποσαφηνιστεί πώς αυτές οι παρατηρήσεις σχετίζονται με τα κύτταρα της ΧΛΛ και ποια η πιθανή συνεργική ή ανταγωνιστική σχέση των υποδοχέων BcR και TLR στην Μ-ΧΛΛ και την Α-ΧΛΛ.

Στη συγκεκριμένη μελέτη επίσης εξετάστηκε η επαγωγή της απόπτωσης σε λευχαιμικά Β λεμφοκύτταρα 18 ασθενών με ΧΛΛ (9 Α και 9 Μ) μετά από διέγερση του BcR και/ή TLR7/9. Η επαγωγή της απόπτωσης στα κύτταρα της ΧΛΛ δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Από τα διαθέσιμα δεδομένα προκύπτει ότι τα κύτταρα της ΧΛΛ εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην επαγόμενη από την Fas απόπτωση, παρότι εκφράζουν μόρια Fas και DISC²⁰⁵. Ωστόσο, η Fas-ανεξάρτητη ενεργοποίηση της κασπάσης 8 ίσως διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης στα κύτταρα της ΧΛΛ²⁰⁴.

Η διέγερση των κυττάρων της Μ-ΧΛΛ αλλά και Α-ΧΛΛ με αντι-IgM δε φαίνεται να προκαλεί απόπτωση αφού δεν επηρέασε τα επίπεδα της ενεργού ισομορφής της κασπάσης 8 και του διασπασμένου κλάσματος της PARP. Η διέγερση με CpG ή Im, ωστόσο, επάγει απόπτωση όπως φαίνεται από το διασπασμένο κλάσμα της PARP και την ενεργό ισομορφή της Casp8 τα οποία αυξάνουν στη Μ-ΧΛΛ σε σχέση με την αδιέγερτη κατάσταση. Αντίθετα, η Α-ΧΛΛ δεν ανταποκρίνεται στη διέγερση με CpG ODN και Im. Η διέγερση τόσο του TLR7 όσο και του TLR9 φαίνεται να οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση μόνο στη Μ-ΧΛΛ, ενώ δεν έχει καμία επίδραση στην Α-ΧΛΛ. Τα παραπάνω συμφωνούν και με προηγούμενη μελέτη, στην οποία η διέγερση του TLR9 οδηγεί σε πολλαπλασιασμό του λευχαιμικού κλώνου στην Α-ΧΛΛ, ενώ στη Μ-ΧΛΛ σε απόπτωση²⁰¹. Επίσης, επιβεβαιώνονται και από πρόσφατη μελέτη που δείχνει ότι τα CpG ODN ολιγονουκλεοτίδια επάγουν πολλαπλασιασμό σε Β

λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ ασθενών που φέρουν αμετάλλακτα γονίδια IGHV και παρουσιάζουν επιθετική νόσο, ενώ, αντίθετα, διακοπή της φάσης G1/S του κυτταρικού κύκλου και απόπτωση σε λευχαιμικά Β λεμφοκύτταρα ασθενών με μεταλλαγμένα γονίδια IGHV²⁵².

Η συνδιέγερση με αντί-IgM+CrG ή αντί-IgM+Im οδήγησε στις πιο εντυπωσιακές διαφορές μεταξύ Μ-ΧΛΛ και Α-ΧΛΛ. Συγκεκριμένα, στη Μ-ΧΛΛ η αύξηση των επιπέδων της ενεργού ισομορφής της κασπάσης 8 και του διασπασμένου κλάσματος της PARP μετά από συνδιέγερση ήταν μεγαλύτερη συγκριτικά με τη μεμονωμένη διέγερση των TLR7, 9 και στατιστικά σημαντικότερη ήταν η συνδιέγερση με αντί-IgM + CrG για την PARP. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η συνδυασμένη δράση του BcR με τους TLR μπορεί να οδηγήσει με μεγαλύτερη επιτυχία τα κύτταρα σε απόπτωση. Η Α-ΧΛΛ παρουσιάζει αντοχή στα αποπτωτικά σήματα και φαίνεται να εξαρτάται περισσότερο από τα σήματα που δέχεται από το μικροπεριβάλλον συγκριτικά με τη Μ-ΧΛΛ. Συνεπώς, τα κύτταρα της Μ-ΧΛΛ πιθανόν οδηγούνται σε απόπτωση ακόμη και με απλή διέγερση, ενώ τα Α-ΧΛΛ αποπίπτουν λίγο ακόμη και μετά από διπλή διέγερση (συνδιέγερση)^{201,253}.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρέχουν επιπρόσθετες ενδείξεις για την ενδοκυττάρια σηματοδότηση μετά από ενεργοποίηση ανοσοουποδοχέων στα Β λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ. Επίσης, δείχνουν ότι η συνδυασμένη ενεργοποίηση μέσω BcR και TLR7 ή TLR9 έχει διαφορετικό λειτουργικό αποτέλεσμα, που αντικατοπτρίζεται τελικά στη συμπεριφορά του λευχαιμικού κλώνου και τροποποιεί το ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την απόπτωση.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976 ;194:23-8.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts Keith, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition, 2002.
3. Schramek H. MAP Kinases: From Intracellular Signals to Physiology and Disease. *News Physiol Sci*. 2002;17: 62-7.
4. Platanias LC. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood*. 2003; 101:4667-79.
5. Diskin R, Askari N, Capone R, Engelberg D, Livnah O. Active Mutants of the Human p38 Mitogen activated Protein Kinase. *J Biol Chem*.2004;279:47040-9.
6. Chen R, Kim O, Li M, Xiong X, Guan JL, Kung HJ et al. Regulation of the PH-domain-containing tyrosine kinase Etk by focal adhesion kinases through the FERM domain. *Nat Cell Biol*. 2001; 3:439-44.
7. Samaj J, Baluka F, Hirt H. From signal to cell polarity:mitogen-activated protein kinases as sensors and effectors of cytoskeleton dynamicity. *J ExperBotany*. 2004; 55:189-98.
8. Klemke RL, Cai S, Giannini AL, Gallagher PJ, Primal de Lanerolle, Cheresch DA. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol*.1997; 137:481-92.
9. Williamson AJK, Dibling BC, Boyne JR, Selby P, Burchill SA. Basic fibroblast growth factor-induced cell death is effected through sustained activation of p38 MAPK and up-regulation of the death receptor p75 NTR. *J Biol Chem*. 2004; 279: 47912-28.
10. Yu C, Minemoto Y, Zhang J, Liu J, Tang F, Bui TN et al. JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. *Molecular Cell*. 2004; 13:329-340.
11. Jing LIU, Anning LIN. Role of JNK activation in apoptosis: A double-edged sword. *Cell Res*. 2005 15:36-42.
12. Cardoso F, Piccart M. J, Durbecq V and Di Leo A. Resistance to trastuzumab: A necessary evil or a temporary challenge. *Clin. Breast Cancer*. 2002;3:247-57.
13. Heichman KA, Roberts JM. Rules to replicate by. *Cell*. 1994; 1879:557-62.
14. Hartwell, L. H. *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriol Rev*. 1974; 38:164-98.
15. Hartwell, L. H. and T. A. Weinert .Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*. 1989; 246: 629-34.
16. Nurse, P. The incredible life and times of biological cells. *Science*. 2000; 289: 1711-6.
17. Hoffmann R.Gene expression patterns in human and mouse B cell development. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005; 294: 19-29.

18. Sanchez I, Dynlacht BD. New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Semin Cell Dev Biol.* 2005;16:311-21.
19. Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1997;13:261-91.
20. Nakayama K, Nakayama K. Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development. *Bioessays.* 1998;20:1020-9.
21. Harper JW. Cyclin dependent kinase inhibitors. *Cancer Surv.* 1997;29:91-107.
22. Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2002 ;1602:73-87.
23. Wong KK and Depinho RA. Telomerase in Cancer, Principles and Practice of Oncology. Edited by DeVita VT, , Hellman S and Rosenberg SA. Lippincott Edition 7th. 2005: p105-112.
24. Roy S, Nicholson DW. Cross-talk in cell death signaling. *J Exp Med.* 2000;192:21-5.
25. Chang KC, Unsinger J, Davis CG, et al. Multiple triggers of cell death in sepsis: death receptor and mitochondrial-mediated apoptosis. *FASEB J.* 2007;21:708-719.
26. Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: Definition, mechanisms and rel-evance to disease. *Am J Med.* 1999; 107:489-506.
27. Talanian RV, Quinlan C, Trautz S , Hacket MC, Mankovich JA, Banach D, Ghayur T, Brady KD and . Wong WW. Substrate specificities of caspase family proteases. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:9677-82.
28. Soldani, C. and Scovassi A. I. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: An update. *Apoptosis.* 2002; 7:321-8.
29. Fernandes-Alnemri T, Takahashi A, Armstrong R, Krebs J, Fritz L, Tomaselli KJ, Wang L, Yu Z, Croce CM, Salveson G, et al. Mch3, a novel human apoptotic cysteine protease highly related to CPP32. *Cancer Res.* 1995; 55: 6045-52.
30. Feritandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM and Wang.In vitro, activation of CPP 32 and Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD like domains. *Proc Natl Acad. Sci USA.* 1996; 93:7464-9.
31. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997 ;91:479-89.
32. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell.* 1997;88:355-65.
33. Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem.* 1998;252:1-15.
34. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999;15:269-90.
35. Savill J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br Med Bull.* 1997;53:491-508.

36. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 1998 ;281:1322-6.
37. Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell*. 1994 ;79:189-92.
38. Meijerink JP. t(14;18), a journey to eternity. *Leukemia*. 1997 ;11:2175-87.
39. Battel OP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116:281-97.
40. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*. 2010;11:597-610.
41. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet*. 2011;12:99-110.
42. Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:11755-60.
43. 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. *The New England Journal of Medicine*. 2005; 353:1793-1801.
44. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*. 2010;28:1057-68.
45. Hoffman, Hematology; Basic principles and Practice, 6th ed.
46. WHO classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Edited by Swerdlow S, Campo E, Harris NL, Jaffe E, Pileri S, Stein H, Thiele J, Vardiman J. International Agency for Research and cancer. Lyon 2008.
47. Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M, Neyman N, et al. (eds). Surveillance Epidemiology and End Results (SEER). SEER Cancer Statistics Review. 2009:1975–2006.
48. Bannerji R, Byrd JC. Update on the biology of chronic lymphocytic leukemia. *Current opinion in oncology*. 2000;12: 22-9.
49. Ghia P, Chiorazzi N, Stamatopoulos K. Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation. *J Intern Med* 2008;264: 549-62.
50. Del Giudice I, Rossi D, Chiaretti S, Marinelli M, Tavoraro S, Gabrielli S, Laurenti L, Marasca R, Rasi S, Fangazio M, Guarini A, Gaidano G, Foà R NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL. *Haematologica*. 2012; 97: 437-41.
51. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabani H, Ma J, Grunn A, Fangazio M, Capello D, Monti S, Cresta S, Gargiulo E, Forconi F, Guarini A, Arcaini L, Paulli M, Laurenti L, Larocca LM, Marasca R, Gattei V, Oscier D, Bertoni F, Mullighan CG, Foà R, Pasqualucci L, Rabadan R, Dalla-Favera R, Gaidano G Analysis of the chronic

lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med*.2011;208: 1389-1401.

52. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, Spina V, Fangazio M, Forconi F, Marasca R, Laurenti L, Bruscaggin A, Cerri M, Monti S, Cresta S, Famà R, De Paoli L, Bulian P, Gattei V, Guarini A, Deaglio S, Capello D, Rabadan R, Pasqualucci L, Dalla-Favera R, Foà R, Gaidano G. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*.2012; 119: 521-9.

53. Best O, Gardiner A, Majid A, Walewska R, Austen B, Skowronska A, Ibbotson R, Stankovic T, Dyer M, Oscier D A novel functional assay using etoposide plus nutlin-3a detects and distinguishes between ATM and TP53 mutations in CLL. *Leukemia* 2008; 22: 1456-9.

54. Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, Trbusek M, Rossi D, Kater AP, Cymbalista F, Eichhorst B, Hallek M, Döhner H, Hillmen P, van Oers M, Gribben J, Ghia P, Montserrat E, Stilgenbauer S, Zenz T. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2012;26:1458-61.

55. Skowronska A, Parker A, Ahmed G, Oldreive C, Davis Z, Richards S, Dyer M, Matutes E, Gonzalez D, Taylor AM, Moss P, Thomas P, Oscier D, Stankovic T . Biallelic ATM inactivation significantly reduces survival in patients treated on the United Kingdom Leukemia Research Fund Chronic Lymphocytic Leukemia 4 trial. *J Clin Oncol*.2012; 30: 4524-32.

56. Zenz T, Vollmer D, Trbusek M, Smardova J, Benner A, Soussi T, Helfrich H, Heuberger M, Hoth P, Fuge M, Denzel T, Häbe S, Malcikova J, Kuglik P, Truong S, Patten N, Wu L, Oscier D, Ibbotson R, Gardiner A, Tracy I, Lin K, Pettitt A, Pospisilova S, Mayer J, Hallek M, Döhner H, Stilgenbauer S, (ERIC) ERioC. TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia*. 2010; 24: 2072-9.

57. Janeway C TP, Walport M, Shlomchik M. Immunobiology. The immune system in health and disease 6th Ed: Garland Publishing Inc,2004.

58. Janeway. An Introduction to immunobiology and Innate Immunity. Ed 7th,2008.

59. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. Immunology 6th Ed.New York: W.H Freeman & Co, 2006.

60. Roitt IM DP. Roitt's essential immunology. 10th ed. Oxford: Blackwell Science; 2001.

61. Burmester GR PA, Wandrey SO, Ulrichs T. Color Atlas of immunology. Vol 2nd edition.Thieme, 2003.

62. Lefranc MP and Lefranc G. The immunoglobulin FactsBook.London: Academic Press, 2001.

63. Kuby J. Immunobiology. 4th ed: W.H Freeman & Co, 2001.

64. Weichhold GM, Zachau HG, Zachau HG. The human immunoglobulin κ locus consists of two copies that are organized in opposite polarity. *Genomics*. 1993; 16:503-11.
65. Dunham I, Shimizu N, Roe BA, Chisoe S, Hunt AR, Collins JE, et al. The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature*. 1999; 402:489-95.
66. Matthias P, Rolink AG. Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:497-508.
67. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. 2008;112:1570-80.
68. Melchers F, Rolink AR. B cell tolerance--how to make it and how to break it. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;305:1-23.
69. Nemazee D. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:728-40.
70. Schlissel MS. The regulation of receptor editing. *Adv Exp Med Biol*. 2007;596:173-9.
71. Neuberger MS, Ehrenstein MR, Rada C, Sale J, Batista FD, Williams G, Milstein C. Memory in the B-cell compartment: antibody affinity maturation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.B*. 355:357-60.
72. Papavasiliou FN, Schatz DG. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity. *Cell*. 2002;109(Suppl):S35-S44.
73. 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.
74. Odegard VH, Schatz DG. Targeting of somatic hypermutation. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:573-83.
75. Seki M, Gearhart PJ, Wood RD. DNA polymerases and somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *EMBO Reports*. 2005;6:1143-8.
76. Manis JP, Tian M, Alt FW. Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol*. 2002; 23:31-9.
77. Franklin A, Blanden RV. On the molecular mechanism of somatic hypermutation of rearranged immunoglobulin genes. *Immunology and cell biology*. 2004;2:557-67.
78. Shapiro GS, Wysocki LJ. DNA target motifs of somatic mutagenesis in antibody genes. *Critical reviews in immunology*. 2002;22:183-200.
79. Dickerson SK, Market E, Besmer E, Papavasiliou FN. AID mediates hypermutation by deaminating single stranded DNA. *The Journal of experimental medicine*. 2003;197:1291-6.
80. Muramatsu M, Nagaoka H, Shinkura R, Begum NA, Honjo T. Discovery of activation-induced cytidine deaminase, the engraver of antibody memory. *Advances in immunology*. 2007;94:1-36.

81. Neuberger MS and Rada C. Somatic hypermutation: activation-induced deaminase for C/G followed by polymerase η for A/T. *The Journal of Experimental Medicine*. 2007; 204:7-10.
82. Neuberger MS, Di Noia JM, et al. Somatic hypermutation at A.T pairs: polymerase error versus dUTP incorporation. *Nature Reviews. Immunology*. 2005; 5:171-8.
83. Martomo SA and Gearhart PJ. Somatic hypermutation: subverted DNA repair. *Current Opinion in Immunology*. 2006; 18:243-8.
84. Casali P, Pal Z, et al. DNA repair in antibody somatic hypermutation. *Trends in Immunology*. 2006; 27:313-21.
85. Ivan Roitt, Jonathan Brostoff, David Male. *Immunology* Ed 5th, 2002.
86. Kenter AL. Class switch recombination: an emerging mechanism. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005; 290:171-99.
87. Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol*. 2008; 26:261-92.
88. Longerich S, Basu U, Alt F, Storb U. AID in somatic hypermutation and class switch recombination. *Curr Opin Immunol*. 2006; 18:164-74.
89. Monroe JG. ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6:283-9.
90. Niiri H, Clark EA. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2:945-56.
91. Contri A, Brunati AM, Trentin L, Cabrelle A, Miorin M, Cesaro L, Pinna LA, Zambello R, Semenzato G, Donella-Deana A. Chronic lymphocytic leukemia B cells contain anomalous Lyn tyrosine kinase, a putative contribution to defective apoptosis. *J Clin Invest*. 2005; 115:369-78.
92. Efremov DG, Gobessi S, Longo PG. Signaling pathways activated by antigen-receptor engagement in chronic lymphocytic leukemia B-cells. *Autoimmun Rev*. 2007; 7:102-8.
93. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. 1998; 282:1318-21.
94. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997; 91:231-41.
95. Miyake A K, Sha W, et al. B lymphocytes differentially use the Rel and nuclear factor kappaB1 (NF-kappaB1) transcription factors to regulate cell cycle progression and apoptosis in quiescent and mitogen-activated cells. *J Exp Med*. 1998; 187:663-74.
96. Saijo K, Mecklenbrauker I, Santana A, Leitger M, Schmedt C, Tarakhovsky A. Protein kinase C beta controls nuclear factor kappaB activation in B cells through selective regulation of the IkappaB kinase alpha. *J Exp Med*. 2002; 195:1647-52.

97. Yong Liao, Mien-Chie Hung. Regulation of the activity of p38 mitogen-activated protein kinase by Akt in cancer and adenoviral protein E1A mediated Sensitization to apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2003; 23:6836-48.
98. Seidman R, Gitelman I, Sagi O, Horwitz SB, Wolfson M. The role of ERK 1/2 and p38 MAP-kinase pathways in taxol-induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 2001; 268:84-92.
99. Choi K-C, Auersperg N, Leung P. Mitogen-activated protein kinases in normal and (pre)neoplastic ovarian surface epithelium. *Reprod Biol Endocrinol* 1:71, 2003.
100. Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell May.* 1991; 65:663-75.
101. Seger R, Shaul Y. The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2006; 1773: 1213–26.
102. Cooper AB, Sawai CM, Sicinska E, Powers SE, Sicinski P, Clark MR Aifantis I. *Nat. Immunol.* 2006; 7: 489–97.
103. Jiang A, Craxton A, Kurosaki T, Clark EA. Different protein tyrosine kinases are required for B cell antigen receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase, c-Jun NH2-terminal kinase 1, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Exp Med.* 1998;188:1297-306.
104. Richards JD, Dave SH, Chou CH, Mamchak AA, DeFranco AL. Inhibition of the MEK/ERK signaling pathway blocks a subset of B cell responses to antigen. *J Immunol.* 2001;166:3855-64.
105. Frank K, Atkinson JP. In Austen KF, Frank K, Atkinson JP, Cantor H. eds. *Complement system Samter's Immunologic Diseases*, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. Ed. 6th; Vol. 1: p. 281-98, 2001.
106. Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and Molecular Immunology* Philadelphia: Saunders. Ed. 5th, 2003.
107. 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;279:2575-82.
108. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1989;54 :1-13.
109. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997;388:394-7.
110. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol.* 2002;168:4531-7.

111. 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;101:4500-4.
112. 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;102:956-63.
113. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:499-511.
114. Petterson T, Jendholm J, Mansson A, Bjartell A, Riesbeck K, Cardell LO. Effects of NOD-like receptors in human B lymphocytes and crosstalk between NOD1/NOD2 and Toll-like receptors. *J Leukoc Biol*. 2011;89:177-87.
115. Pasare C, Medzhitov R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature*. 2005;438:364-8.
116. Meyer-Bahlburg A, Khim S, Rawlings DJ. B cell intrinsic TLR signals amplify but are not required for humoral immunity. *J Exp Med*. 2007;204:3095-101.
117. Lanzavecchia A, Sallusto F. Toll-like receptors and innate immunity in B-cell activation and antibody responses. *Curr Opin Immunol* 2007;19: 268-74.
118. Rawlings DJ, Schwartz MA, Jackson SW, Meyer-Bahlburg A. Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors. *Nat Rev Immunol* 2012;12: 282-94.
119. 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: 603-7.
120. Chaturvedi A, Dorward D, Pierce SK. The B cell receptor governs the subcellular location of Toll-like receptor 9 leading to hyperresponses to DNA-containing antigens. *Immunity*. 2008;28: 799-809.
121. Lau CM, Broughton C, Tabor AS, Akira S, Flavell RA, Mamula MJ, et al. RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *J Exp Med*. 2005;202:1171-7.
122. Poovassery JS, Vanden Bush TJ, Bishop GA. Antigen receptor signals rescue B cells from TLR tolerance. *J Immunol* 2009;183: 2974-83.
123. Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 1995;333: 1052-7.
124. Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, Botteman MF, Pashos CL: The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2004;13:279-87.
125. Linet MS, Schubauer-Berigan MK, Weisenburger DD, Richardson DB, Landgren O, Blair A, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: an overview of aetiology in light of recent developments in classification and pathogenesis. *Br J Haematol*. 2007;139:672-86.

126. Houlston RS, Catovsky D, Yuille MR: Genetic susceptibility to chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2002;16:1008-14.
127. Yuille MR, Houlston RS, Catovsky D: Anticipation in familial chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*. 1998;12:1696-8.
128. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ: 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;111:5446-56.
129. Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Catovsky :Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol*. 1998;51:364-9.
130. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, Seon BK, Catovsky D: Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol*.1997;108:378-82.
131. Eichhorst B, Hallek M. Revision of the guidelines for diagnosis and therapy of chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007;20:469-77.
132. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005;352:804–15.
133. 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;40:855-64.
134. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975;46:219-34.
135. 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;72:141-9.
136. 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;27:523-32.
137. 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.
138. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000; 343:1910-6.
139. Matthews C, Catherwood MA, Morris TC, Kettle PJ, Drake MB, Gilmore WS, Alexander HD. Serum TK levels in CLL identify Binet stage A patients within

biologically defined prognostic subgroups most likely to undergo disease progression. *Eur J Haematol*. 2006; 77:309-17.

140. 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: 1840-7.

141. 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; 101:1262-9.

142. 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; 363:105-11.

143. Kipps TJ. The B-cell receptor and ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia. *Best Practice & research. Clinical Haematology*. 2007; 20:415-24.

144. Munoz L, Lasa A, Carricondo MT, Hernández C, Ubeda J, Nomdedéu JF. Comparative analysis of ZAP-70 expression and Ig VH mutational status in Bcell chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B, ClinCytom*. 2007; 72:96-102.

145. Catherwood MA, Matthews C, Niblock R, Dobbin E, Morris TC, Alexander HD. ZAP-70 mRNA quantification in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *European Journal of Haematology*. 2006; 76:294-8.

146. 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; 90:1533-40.

147. Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, Kern W, Schoch C. 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; 108:3152-60.

148. Méhes G. Chromosome abnormalities with prognostic impact in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Pathology oncology research: POR*. 2005; 11:205-10.

149. 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; 13:147-53.

150. Nicoloso MS, Kipps TJ, Croce CM, Calin GA. MicroRNAs in the pathogeny of chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2007; 139:709-16.

151. 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: 1848-54.

152. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Eriksson I, Soderberg O, Karlsson K, et al. Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted Vlambda2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood*. 2003;101:4952-7.

153. 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;200:519-25.
154. 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;111:1524-33.
155. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Boudjogra 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: 259-70.
156. Maizels N. Immunoglobulin gene diversification. *Annu Rev Genet*. 2005;39:23-46.
157. Darzentas N, Hadzidimitriou A, Murray F, et al. A different ontogenesis for chronic lymphocytic leukemia cases carrying stereotyped antigen receptors: molecular and computational evidence. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.* Jan 2010;24:125-32
158. Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Brochet X, Murray F, Yan XJ, et al. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood* 2012;119: 4467-75.
159. Ghiotto F, Fais F, Valetto A, Albesiano E, Hashimoto S, Dono M, et al. Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2004;113:1008-16.
160. Thorselius M, Krober A, Murray F, Thunberg U, Tobin G, Buhler A, et al. Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in VH3-21-using chronic lymphocytic leukemia patients independent of geographic origin and mutational status. *Blood*. 2006;107:2889-94.
161. Rossi D, Spina V, Cerri M, Rasi S, Deambrogi C, De Paoli L, et al. Stereotyped B-cell receptor is an independent risk factor of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Clin Cancer Res*. 2009;15:4415-22.
162. 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;194:1625-38.
163. 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;194:1639-47.
164. Marincevic M, Mansouri M, Kanduri M, Isaksson A, Goransson H, Smedby KE, et al. Distinct gene expression profiles in subsets of chronic lymphocytic leukemia expressing stereotyped IGHV4-34 B-cell receptors. *Haematologica*. 2010;95:2072-9.

165. Arvaniti E, Ntoufa S, Papakonstantinou N, Touloumenidou T, Laoutaris N, Anagnostopoulos A, et al. Toll-like receptor signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia: distinct gene expression profiles of potential pathogenic significance in specific subsets of patients. *Haematologica*. 2011;96:1644-52.
166. Calin GA, Croce CM. Chronic lymphocytic leukemia: interplay between noncoding RNAs and protein-coding genes. *Blood*. 2009;114:4761-70.
167. Zenz T, Mohr J, Eldering E, Kater AP, Buhler A, Kienle D, et al. miR-34a as part of the resistance network in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009;113:3801-8.
168. Asslaber D, Pinon JD, Seyfried I, Desch P, Stocher M, Tinhofer I, et al. microRNA-34a expression correlates with MDM2 SNP309 polymorphism and treatment-free survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2010;115:4191-7.
169. Merkel O, Asslaber D, Pinon JD, Egle A, Greil R. Interdependent regulation of p53 and miR-34a in chronic lymphocytic leukemia. *Cell Cycle*. 2010;9:2764-8.
170. Wahlfors J, Hiltunen H, Heinonen K, Hamalainen E, Alhonen L, Janne J. Genomic hypomethylation in human chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1992;80:2074-80.
171. Fabris S, Bollati V, Agnelli L, Morabito F, Motta V, Cutrona G, et al. Biological and clinical relevance of quantitative global methylation of repetitive DNA sequences in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenetics*. 2011;6:188-94.
172. Plass C, Byrd JC, Raval A, Tanner SM, de la Chapelle A. Molecular profiling of chronic lymphocytic leukaemia: genetics meets epigenetics to identify predisposing genes. *Br J Haematol*. 2007;139:744-52.
173. 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;26:4497-503.
174. Calissano C, Damle RN, Hayes G, Murphy EJ, Hellerstein MK, Moreno C, et al. In vivo intraclonal and interclonal kinetic heterogeneity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009;114:4832-42.
175. 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;102:1515-25.
176. Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood*;117:1781-91.
177. Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:841-94.
178. 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;144:492-506.

179. 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; 101:1087-93.
180. Mockridge CI, Potter KN, Wheatley I, Neville LA, Packham G, Stevenson FK. Reversible anergy of sIgM-mediated signaling in the two subsets of CLL defined by VH-gene mutational status. *Blood* 2007;109: 4424-31.
181. Wiestner A. Emerging role of kinase-targeted strategies in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;120: 4684-91.
182. Woyach JA, Johnson AJ, Byrd JC. The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood* 2012;120: 1175-84.
183. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Thorn I, Soderberg O, Hultdin M, et al. Somatically mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;99:2262-4.
184. Hivroz C, Geny B, Brouet JC, Grillot-Courvalin C. Altered signal transduction secondary to surface IgM cross-linking on B-chronic lymphocytic leukemia cells. Differential activation of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Immunol*. 1990;144:2351-8.
185. Michel F, Merle-Beral H, Legac E, Michel A, Debre P, Bismuth G. Defective calcium response in B-chronic lymphocytic leukemia cells. Alteration of early protein tyrosine phosphorylation and of the mechanism responsible for cell calcium influx. *J Immunol*. 1993;150:3624-33.
186. Semichon M, Merle-Beral H, Lang V, Bismuth G. Normal Syk protein level but abnormal tyrosine phosphorylation in B-CLL cells. *Leukemia*. 1997;11:1921-8.
187. Chen L, Widhopf G, Huynh L, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002 ;100: 4609-14.
188. Vuillier F, Dumas G, Magnac C, Prevost MC, Lalanne AI, Oppezio P, Melanitou E, Dighiero G, Payelle-Brogard B. Lower levels of surface B-cell-receptor expression in chronic lymphocytic leukemia are associated with glycosylation and folding defects of the mu and CD79a chains. *Blood*. 2005;105:2933-40.
189. Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ, Steele AJ, Packham G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011;118: 4313-20.
190. Broker B. M, Klajman A, Youinou P, Jouquan J, Worman CP, Murphy J, Mackenzie L, Quartey-Papafio R, Blaschek M, Collins P, and et al. Chronic lymphocytic leukemic (CLL) cells secrete multispecific autoantibodies, *Journal of autoimmunity*. 1988; 1: 469-81.
191. Sthoeger ZM, Wakai M, Tse DB, Vinciguerra VP, Allen SL, Budman DR, Lichtman SM, Schulman P, Weiselberg LR, and Chiorazzi N. Production of autoantibodies by CD5-expressing B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of experimental medicine*. 1989;169: 255-68.

192. 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;115:1636-43.
193. CATERA R, Silverman GJ, 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;14:665-74.
194. Seiler T, Woelfle M, Yancopoulos S, CATERA R, Li W, Hatzi K, et al. Characterization of structurally defined epitopes recognized by monoclonal antibodies produced by chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood.* 2009;114:3615-24.
195. Muzio M, Apollonio B, Scielzo C, et al. Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood.* 2008;112:188-95.
196. Petlickovski A, Laurenti L, Li X, Marietti S, Chiusolo P, Sica S, et al. Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood.* 2005;105:4820-7.
197. Merrell KT, Benschop RJ, Gauld SB, et al. Identification of anergic B cells within a wild-type repertoire. *Immunity.* 2006; 25:953-62.
198. Allsup DJ, Kamiguti AS, Lin K, Sherrington PD, Matrai Z, Slupsky JR, et al. B-cell receptor translocation to lipid rafts and associated signaling differ between prognostically important subgroups of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* 2005;65:7328-37.
199. Paterson A, Mockridge CI, Adams JE, Krysov S, Potter KN, Duncombe AS, et al. Mechanisms and clinical significance of BIM phosphorylation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2012;119:1726-36
200. Krysov S, Dias S, Paterson A, Mockridge CI, Potter KN, Smith KA, et al. Surface IgM stimulation induces MEK1/2-dependent MYC expression in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood.* 2012;119:170-9.
201. 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: 110-20.
202. Scupoli MT, Pizzolo G. Signaling pathways activated by the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia. *Expert Rev Hematol.* 2012; 5:341-8.
203. Besnault L, Schrantz N, Auffredou M. T, Leca G, Bourgeade M. F, and Vazquez A. B cell receptor cross-linking triggers a caspase-8-dependent apoptotic pathway that is independent of the death effector domain of Fas- associated death domain protein. *Journal of immunology.* 2001;167: 733-40.
204. Jones DT, Ganeshaguru K, Virchis A E, Folarin N I, Lowdell M W, Mehta A B, Prentice HG, Hoffbrand AV and Wickremasinghe R G. Caspase 8 activation

independent of Fas (CD95/APO-1) signaling may mediate killing of B-chronic lymphocytic leukemia cells by cytotoxic drugs or gamma radiation. *Blood*. 2001; 98: 2800-07.

205. De Toter D, Montera M, Rosso O, Clavio M, Balleari E, Foa R, and Gobbi M. Resistance to CD95-mediated apoptosis of CD40-activated chronic lymphocytic leukemia B cells is not related to lack of DISC molecules expression. *The hematology journal: the official journal of the European Haematology Association*. 2004 ; EHA 5: 152-60.

206. Ntoufa S, Vardi A, Papakonstantinou N, Anagnostopoulos A, Aleporou-Marinou V, Belessi C, et al. Distinct innate immunity pathways to activation and tolerance in subgroups of chronic lymphocytic leukemia with distinct immunoglobulin receptors. *Mol Med* 2012;18: 1281-91.

207. Grandjette C, Kennel A, Faure GC, Bene MC, Feugier P. Expression of functional toll-like receptors by B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica*. 2007;92:1279-81.

208. 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: 507-16.

209. Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect*. 2004;6:1382–7.

210. 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;95:999-1006.

211. 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;69:81-8.

212. Rozkova D, Novotna L, Pytlik R, Hochova I, Kozak T, Bartunkova J, et al. Toll-like receptors on B-CLL cells: expression and functional consequences of their stimulation. *Int J Cancer* 2010;126: 1132-43.

213. 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;115:5041-52.

214. Jahrsdorfer B, Jox R, Muhlenhoff L, Tschoep K, Krug A., Rothenfusser S, Meinhardt G, Emmerich B, Endres S, and Hartmann G. Modulation of malignant B cell activation and apoptosis by bcl-2 antisense ODN and immunostimulatory CpG ODN. *Journal of leukocyte biology*. 2002; 72: 83-92.

215. Spaner DE, Shi Y, White D, Mena J, Hammond C, Tomic J, et al. Immunomodulatory effects of Toll-like receptor-7 activation on chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*. 2006;20:286-95.

216. Spaner D.E. & Masellis N.A. Toll-like receptor agonists in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2007; 21:53-60.
217. Tomic J, White D, Shi Y, Mena J, Hammond C, He L, et al. Sensitization of IL-2 signaling through TLR-7 enhances B lymphoma cell immunogenicity. *J Immunol*. 2006;176:3830-9.
218. Hammadi A, Billard C, Faussat AM, Kolb JP. Stimulation of iNOS expression and apoptosis resistance in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells through engagement of Toll-like receptor 7 (TLR-7) and NF-kappaB activation. *Nitric Oxide*. 2008;19:138-45.
219. Jahrsdorfer B, Wooldridge JE, Blackwell SE, Taylor CM, Griffith TS, Link BK, et al. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides induce apoptosis of B cell chronic lymphocytic leukemia cells. *J Leukoc Biol* 2005;77: 378-87.
220. Brochet X, Lefranc MP, et al. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis, *Nucleic Acids Research*. 2008; 36(Web Server issue): W503-W508.
221. Lefranc MP, Giudicelli V, et al. IMGT, the international ImMunoGeneTics information system, *Nucleic Acids Research*. 2009; 37(Database issue):D1006-D1012.
222. Pommie C, Levadoux S, Sabatier R, Lefranc C, Lefranc MP. *J. Mol. Recognit*. 2004; 17: 17-32.
223. Apollonio B, Scielzo C, Bertilaccio MT, Ten Hacken E, Scarfo L, Raghetti P, et al. Targeting B cell anergy in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;121:3879-88.
224. Cesano A, Perbellini O, Evensen E, Chu CC, Cioffi F, Ptacek J, et al. Association between B-cell receptor responsiveness and disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: results from single cell network profiling studies. *Haematologica* 2013;98: 626-34.
225. 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;100:1410-6.
226. Lin K, Sherrington P.D, Dennis M, Matrai Z, Cawley J.C. & Pettitt A.R. Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgV(H) mutation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002; 100: 1404–09.
227. Hamblin et al. Determination of how many immunoglobulin variable region heavy chain mutations are allowable in unmutated CLL-long term follow up of patients with different percentages of mutations. *Br j haematol* 2008 140:320-3.
228. Lin K, Manocha S, Harris RJ, Matrai Z, Sherrington PD, Pettitt AR. High frequency of p53 dysfunction and low level of VH mutation in chronic lymphocytic leukemia patients using the VH3-21 gene segment. *Blood*. 2003; 102:1145-6.
229. 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;105:1678–85.

230. Philippe J, Janssens A, Smits K, et al. Prognostic value of specific VH-genes in CLL [abstract]. *Leuk Lymph*. 2003;44:S40.
231. Di Noia JM, Neuberger MS. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annual review of biochemistry*. 2007;76:1-22.
232. Athanasiadou A, Stamatopoulos K, Gaitatzi M, et al. Recurrent cytogenetic findings in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia expressing IgG-switched stereotyped immunoglobulins. *Haematologica*. 2008; 93: 473-4.
233. Li Y, Li H, Ni D, Weigert M. Anti-DNA B cells in MRL/lpr mice show altered differentiation and editing pattern. *J Exp Med*. 2002; 196: 1543-52.
234. Li H, Jiang Y, Prak EL, Radic M, Weigert M. Editors and editing of anti-DNA receptors. *Immunity*. 2001;15:947-57.
235. Potter KN, Hobby P, Klijn S, Stevenson FK, Sutton BJ. Evidence for involvement of a hydrophobic patch in framework region 1 of human V4-34- encoded Igs in recognition of the red blood cell I antigen. *J Immunol*. 2002;169:3777-82.
236. Pugh-Bernard A, Hocknell K, Cappione A, Anolik J, Sanz I. VH4-34 anti-I/i autoantibodies recognize apoptotic cells. *Arthritis Rheum*. 2000;46:S126.
237. Behrendt M, Partridge LJ, Griffiths B, Goodfield M, Snaith M, Lindsey NJ. The role of somatic mutation in determining the affinity of anti-DNA antibodies. *Clin Exp Immunol*. 2003;131:182-9.
238. Barrios Y, Jirholt P, Ohlin M. Length of the antibody heavy chain complementarity determining region 3 as a specificity-determining factor. *Journal of molecular recognition : JMR*. 2004;17:332-8.
239. Xu JL, Davis MM. Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. *Immunity*. 2000;13:37-45.
240. Potter KN, Orchard JA, Critchley E, Mockridge CI, Jose A, Stevenson FK. Features of the over-expressed V1-69 genes in the unmutated subset of chronic lymphocytic leukemia are distinct from those in the healthy elderly repertoire. *Blood*. 2003; 101:3082-4.
241. Widhopf GF, Kipps TJ. Normal B cells express 51p1-encoded Ig heavy chains that are distinct from those expressed by chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol*. 2001; 166:95-102.
242. 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;112:5122-9.
243. Stevenson F.K, and Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor, *Blood*.2004;103: 4389-95.
244. Hivroz C, Grillot-Courvalin C, Brouet J.C, and Seligmann M. Heterogeneity of responsiveness of chronic lymphocytic leukemic B cells to B cell growth factor or interleukin 2, *European journal of immunology*. 1986; 16: 1001- 4.

245. 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.
246. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordonez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011;475: 101-5.
247. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2011;365: 2497-506.
248. Rossi D, Rasi S, Spina V, Bruscaggin A, Monti S, Ciardullo C, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013;121: 1403-12.
249. Herishanu Y, Perez-Galan P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011;117: 563-74.
250. Guarini A, Chiaretti S, Tavolaro S, Maggio R, Peragine N, Citarella F, et al. BCR ligation induced by IgM stimulation results in gene expression and functional changes only in IgV H unmutated chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Blood* 2008;112: 782-92.
251. McGettrick AF, O'Neill LA. Toll-like receptors: key activators of leucocytes and regulator of haematopoiesis. *Br J Haematol.* 2007;139:185–93.
252. Efremov D.G, Bomben R, Gobessi S, and Gattei V. TLR9 signaling defines distinct prognostic subsets in CLL. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library.* 2013; 18: 371-86.
253. Deglesne PA, Chevallier N, Letestu R, Baran-Marszak F, Beitar T, Salanoubat C, et al. Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer Res* 2006;66: 7158-66.

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Παράρτημα 1

Πίνακας Π₁. Κατανομή των μεταλλάξεων αντικατάστασης (R) προς σιωπηρές (S) στις περιοχές VH FRs και VH CDRs.

	VHFR1	VHFR2	VHFR3	VHFRs	VHCDR1	VHCDR2	VHCDRs	Σύνολο
R	755	730	2614	4099	1162	1251	2413	6512
S	454	384	1323	2161	273	274	547	2708
R/S	1,66	1,90	1,98	1,90	4,26	4,57	4,41	2,40

Πίνακας Π₂. Στόχευση μεταλλάξεων σε πουρίνες, πυριμιδίνες στις περιοχές VH FRs και VH CDRs.

	VHFR1	VHFR2	VHFR3	VHFRs	VHCDR1	VHCDR2	VHCDRs	Σύνολο
A	200	240	1168	1608	259	569	828	2436
G	431	512	1247	2190	516	465	981	3171
C	375	259	1185	1819	442	216	658	2477
T	203	103	337	643	218	275	493	1136
Π	631	752	2415	3798	775	1034	1809	5607
π	578	362	1522	2462	660	491	1151	3613

A:Αδενίνη, G: Γουανίνη, C: Κυτοσίνη, T: Θυμίνη, Π: πουρίνες, π: πυριμιδίνες

Πίνακας Π₃. Κατανομή των μεταβάσεων έναντι των μεταπτώσεων στις περιοχές VH FRs και VH CDRs.

	VHFR1	VHFR2	VHFR3	VHFRs	VHCDR1	VHCDR2	VHCDRs	Σύνολο
a>g	113	152	676	941	126	316	442	1383
g>a	240	267	611	1118	327	230	557	1675
c>t	187	190	807	1184	285	114	399	1583
t>c	75	68	208	351	126	137	263	614
a>c	49	49	219	317	61	131	192	509
c>a	69	14	131	214	60	33	93	307
a>t	38	39	273	350	72	122	194	544
t>a	33	12	70	115	57	87	144	259
g>c	153	194	473	820	150	181	331	1151
c>g	119	55	247	421	97	69	166	587
g>t	38	51	163	252	39	54	93	345
t>g	95	23	59	177	35	51	86	263
Mβ	615	677	2302	3594	864	797	1661	5255
Mπ	594	437	1635	2666	571	728	1299	3965

a: Αδενίνη, g: Γουανίνη, c: Κυτοσίνη, t: Θυμίνη Mβ=μεταβάσεις, Mπ=μεταπτώσεις

Πίνακας Π₄. Κατανομή των μεταλλάξεων αντικατάστασης (R) προς σιωπηρές (S) στις περιοχές VH FRs και VH CDRs στις 3 υποομάδες με διαφορετικό φορτίο μεταλλάξεων (<96%, 96-97,9% και 98-99,9%).

	%	VHFR1	VHFR2	VHFR3	VHFRs	VHCDR1	VHCDR2	VHCDRs	Σύνολο
R	<96	665	653	2395	3713	1034	1109	2143	5856
	96-97,9	65	52	176	293	110	108	218	511
	98-99,9	25	25	43	93	18	31	49	142
S	<96	399	345	1196	1940	240	241	481	2421
	96-97,9	40	31	102	173	27	32	59	232
	98-99,9	15	8	25	48	6	4	10	58
R/S	<96	1,67	1,89	2	1,91	4,31	4,60	4,46	2,42
	96-97,9	1,63	1,68	1,73	1,69	4,07	3,38	3,69	2,20
	98-99,9	1,67	3,13	1,72	1,94	3	7,75	4,90	2,45

Πίνακας Π₅. Στόχευση μεταλλάξεων σε πουρίνες, πυριμιδίνες στις περιοχές VH FRs και VH CDRs στις 3 υποομάδες με διαφορετικό φορτίο μεταλλάξεων (<96%, 96-97,9% και 98-99,9%).

	%	VHFR1	VHFR2	VHFR3	VHFRs	VHCDR1	VHCDR2	VHCDRs	Σύνολο
A	<96	179	223	1062	1464	230	504	734	2198
	96-97,9	17	15	84	116	28	53	81	197
	98-99,9	4	2	22	28	1	12	13	41
G	<96	379	451	1139	1969	444	408	852	2821
	96-97,9	35	43	88	166	61	45	106	272
	98-99,9	17	18	20	55	11	12	23	78
C	<96	322	231	1072	1625	398	197	595	2220
	96-97,9	38	20	93	151	35	13	48	199
	98-99,9	15	8	20	43	9	6	15	58
T	<96	184	93	318	595	202	241	443	1038
	96-97,9	15	5	13	33	13	29	42	75
	98-99,9	4	5	6	15	3	5	8	23
Π	<96	558	674	2201	3433	674	912	1586	5019
	96-97,9	52	58	172	282	89	98	187	469
	98-99,9	21	20	42	83	12	24	36	119
π	<96	506	324	1390	2220	600	438	1038	3258
	96-97,9	53	25	106	184	48	42	90	274
	98-99,9	19	13	26	58	12	11	23	81

A:Αδενίνη, G: Γουανίνη, C: Κυτοσίνη, T: Θυμίνη, Π: πουρίνες, π: πυριμιδίνες

Πίνακας Π₆. Κατανομή των μεταβάσεων και των μεταπτώσεων στις περιοχές VH FRs και VH CDRs στις 3 υποομάδες με διαφορετικό φορτίο μεταλλάξεων (<96%, 96-97,9% και 98-99,9%).

	%	VHFR1	VHFR2	VHFR3	VHFRs	VHCDR1	VHCDR2	VHCDRs	Σύνολο
a>g	<96	99	143	611	853	110	273	383	1236
	96-97,9	12	9	50	71	15	35	50	121
	98-99,9	2	0	15	17	1	8	9	26
g>a	<96	219	239	561	1019	288	203	491	1510
	96-97,9	16	20	43	79	31	24	55	134
	98-99,9	5	8	7	20	8	3	11	31
c>t	<96	162	170	730	1062	252	101	353	1415
	96-97,9	18	15	66	99	24	10	34	133
	98-99,9	7	5	11	23	9	3	12	35
t>c	<96	70	58	196	324	119	121	240	564
	96-97,9	4	5	9	18	5	13	18	36
	98-99,9	1	5	3	9	2	3	5	14
a>c	<96	44	46	203	293	54	122	176	469
	96-97,9	4	3	10	17	7	7	14	31
	98-99,9	1	0	6	7	0	2	2	9
c>a	<96	57	12	120	189	59	31	90	279
	96-97,9	7	2	9	18	1	2	3	21
	98-99,9	5	0	2	7	0	0	0	7
a>t	<96	36	34	248	318	66	109	175	493
	96-97,9	1	3	24	28	6	11	17	45
	98-99,9	1	2	1	4	0	2	2	6
t>a	<96	29	12	65	106	53	77	130	236
	96-97,9	2	0	3	5	4	8	12	17
	98-99,9	2	0	2	4	0	2	2	6
g>c	<96	129	167	426	722	118	158	276	998
	96-97,9	14	20	37	71	29	16	45	116
	98-99,9	10	7	10	27	3	7	10	37
c>g	<96	103	49	222	374	87	65	152	526
	96-97,9	13	3	18	34	10	1	11	45
	98-99,9	3	3	7	13	0	3	3	16
g>t	<96	31	45	152	228	38	47	85	313
	96-97,9	5	3	8	16	1	5	6	22
	98-99,9	2	3	3	8	0	2	2	10
t>g	<96	85	23	57	165	30	43	73	238
	96-97,9	9	0	1	10	4	8	12	22
	98-99,9	1	0	1	2	1	0	1	3
Μβ	<96	550	610	2098	3258	769	698	1467	4725
	96-97,9	50	49	168	267	75	82	157	424
	98-99,9	15	18	36	69	20	17	37	106
Μπ	<96	514	388	1493	2395	505	652	1157	3552
	96-97,9	55	34	110	199	62	58	120	319
	98-99,9	25	15	32	72	4	18	22	94

α: Αδενίνη, γ: Γουανίνη, c: Κυτοσίνη, t: Θυμίνη Μβ=μεταβάσεις, Μπ=μεταπτώσεις

Πίνακας Π7. Κατανομή των μεταλλάξεων αντικατάστασης (R) προς σιωπηρές (S) στις περιοχές VH FRs και VH CDRs σε υποομάδες που χρησιμοποιούν το ίδιο γονίδιο IGHV.

	Γονίδιο	VHFR1	VHFR2	VHFR3	VHFRs	VHCDR1	VHCDR2	VHCDRs	Σύνολο
R	IGHV4-34	109	135	346	590	146	127	273	863
	IGHV3-7	91	69	308	468	162	134	296	764
	IGHV3-23	82	116	243	441	103	180	283	724
	IGHV3-30	93	52	350	495	139	163	302	797
	IGHV1-69	17	7	57	81	33	24	57	138
	IGHV3-21	20	0	29	49	19	36	55	104
S	IGHV4-34	78	72	225	375	32	31	63	438
	IGHV3-7	60	45	140	245	29	21	50	295
	IGHV3-23	61	44	129	234	33	36	69	303
	IGHV3-30	41	34	143	218	32	40	72	290
	IGHV1-69	12	11	31	54	7	7	14	68
	IGHV3-21	9	5	17	31	8	7	15	54
R/S	IGHV4-34	1,40	1,88	1,54	1,57	4,56	4,1	4,33	1,97
	IGHV3-7	1,52	1,53	2,2	1,91	5,59	6,38	5,92	2,59
	IGHV3-23	1,34	2,64	1,88	1,88	3,12	5	4,10	2,39
	IGHV3-30	2,27	1,53	2,45	2,27	4,34	4,08	4,19	2,75
	IGHV1-69	1,42	0,64	1,84	1,5	4,71	3,73	4,07	2,03
	IGHV3-21	2,22	0	1,71	1,58	2,38	5,14	3,67	1,93

Πίνακας Π₈. Στόχευση μεταλλάξεων σε πουρίνες, πυριμιδίνες στις περιοχές VH FRs και VH CDRs σε υποομάδες που χρησιμοποιούν το ίδιο γονίδιο IGHV.

	Γονίδιο	VHFR1	VHFR2	VHFR3	VHFRs	VHCDR1	VHCDR2	VHCDRs	Σύνολο
A	IGHV4-34	44	38	160	242	22	67	89	331
	IGHV3-7	12	18	144	174	40	71	111	285
	IGHV3-23	9	22	137	168	23	47	70	238
	IGHV3-30	17	17	151	185	30	129	159	344
	IGHV1-69	7	1	21	29	3	5	8	37
	IGHV3-21	2	2	22	26	4	21	25	51
G	IGHV4-34	61	101	188	350	97	34	131	481
	IGHV3-7	56	53	120	229	64	57	121	350
	IGHV3-23	59	75	100	234	45	111	156	390
	IGHV3-30	55	45	165	265	54	23	77	342
	IGHV1-69	11	10	28	49	16	5	21	70
	IGHV3-21	15	0	13	28	13	12	25	53
C	IGHV4-34	59	64	186	309	28	41	69	378
	IGHV3-7	46	40	132	218	59	20	79	297
	IGHV3-23	43	51	100	194	58	15	73	267
	IGHV3-30	45	9	124	178	56	1	57	235
	IGHV1-69	5	4	32	41	14	7	21	62
	IGHV3-21	8	3	8	19	8	0	8	27
T	IGHV4-34	23	4	37	64	31	16	47	111
	IGHV3-7	37	3	52	92	28	7	35	127
	IGHV3-23	32	12	35	79	10	43	53	132
	IGHV3-30	17	15	53	85	31	50	81	166
	IGHV1-69	6	3	7	16	7	14	21	37
	IGHV3-21	4	0	3	7	2	10	12	19
Π	IGHV4-34	105	139	348	592	119	101	220	812
	IGHV3-7	68	71	264	403	104	128	232	635
	IGHV3-23	68	97	237	402	68	158	226	628
	IGHV3-30	72	62	316	450	84	152	236	686
	IGHV1-69	18	11	49	78	19	10	29	107
	IGHV3-21	17	2	35	54	17	33	50	104
π	IGHV4-34	82	68	223	373	59	57	116	489
	IGHV3-7	83	43	184	310	87	27	114	424
	IGHV3-23	75	63	135	273	68	58	126	399
	IGHV3-30	62	24	177	263	87	51	138	401
	IGHV1-69	11	7	39	57	21	21	42	99
	IGHV3-21	12	3	11	26	10	10	20	46

A: Αδενίνη, G: Γουανίνη, C: Κυτοσίνη, T: Θυμίνη, Π: πουρίνες, π: πυριμιδίνες

Πίνακας Π₉. Κατανομή των μεταβάσεων και των μεταπτώσεων στις περιοχές VH FRs και VH CDRs σε υποομάδες που χρησιμοποιούν το ίδιο γονίδιο IGHV.

	Γονίδιο	VHFR1	VHFR2	VHFR3	VHFRs	VHCDR1	VHCDR2	VHCDRs	Σύνολο
a>g	IGHV4-34	25	24	88	137	2	43	45	182
	IGHV3-7	6	17	90	113	18	34	52	165
	IGHV3-23	2	15	73	90	16	31	47	137
	IGHV3-30	13	11	87	111	14	59	73	184
	IGHV1-69	4	1	11	16	0	3	3	19
	IGHV3-21	2	0	15	17	2	12	14	31
g>a	IGHV4-34	28	54	98	180	76	15	91	271
	IGHV3-7	33	22	58	113	42	21	63	176
	IGHV3-23	37	43	51	131	30	57	87	218
	IGHV3-30	27	28	77	132	31	15	46	178
	IGHV1-69	8	5	15	28	12	3	15	43
	IGHV3-21	5	0	6	11	4	2	6	17
c>t	IGHV4-34	29	58	116	203	25	22	47	250
	IGHV3-7	19	31	97	147	33	3	36	183
	IGHV3-23	21	25	73	119	30	12	42	161
	IGHV3-30	20	5	75	100	32	1	33	133
	IGHV1-69	1	4	24	29	10	3	13	42
	IGHV3-21	3	3	4	10	7	0	7	17
t>c	IGHV4-34	10	2	22	34	19	9	28	62
	IGHV3-7	10	2	28	40	17	3	20	60
	IGHV3-23	9	7	24	40	8	23	31	71
	IGHV3-30	4	12	34	50	13	17	30	80
	IGHV1-69	4	3	5	12	3	10	13	25
	IGHV3-21	1	0	1	2	2	4	6	8
a>c	IGHV4-34	7	10	34	51	6	15	21	72
	IGHV3-7	4	0	23	27	9	20	29	56
	IGHV3-23	5	5	26	36	1	6	7	43
	IGHV3-30	2	1	26	29	9	38	47	76
	IGHV1-69	1	0	5	6	1	0	1	7
	IGHV3-21	0	0	2	2	1	6	7	9
c>a	IGHV4-34	13	3	21	37	1	6	7	44
	IGHV3-7	9	3	11	23	13	2	15	38
	IGHV3-23	9	0	9	18	10	1	11	29
	IGHV3-30	8	1	16	25	9	0	9	34
	IGHV1-69	1	0	5	6	1	1	2	8
	IGHV3-21	4	0	2	6	0	0	0	6
a>t	IGHV4-34	12	4	38	54	14	9	23	77
	IGHV3-7	2	1	31	34	13	17	30	64
	IGHV3-23	2	2	38	42	6	10	16	58
	IGHV3-30	6	2	14	22	11	19	30	52
	IGHV1-69	2	0	5	7	2	2	4	11
	IGHV3-21	0	2	5	7	1	3	4	11
t>a	IGHV4-34	5	1	7	13	8	5	13	26
	IGHV3-7	4	0	16	20	7	1	8	28
	IGHV3-23	4	2	3	9	2	12	14	23

	IGHV3-30	6	2	14	22	11	19	30	52
	IGHV1-69	2	0	1	3	4	3	7	10
	IGHV3-21	1	0	2	3	0	4	4	7
g>c	IGHV4-34	25	42	70	137	17	13	30	167
	IGHV3-7	19	28	47	94	15	28	43	137
	IGHV3-23	19	20	35	74	12	42	54	128
	IGHV3-30	20	9	60	89	21	6	27	116
	IGHV1-69	2	4	11	17	1	2	3	20
	IGHV3-21	8	0	5	13	9	7	16	29
c>g	IGHV4-34	17	3	49	69	2	13	15	84
	IGHV3-7	18	6	24	48	13	15	28	76
	IGHV3-23	13	26	18	57	18	2	20	77
	IGHV3-30	17	3	33	53	15	0	15	68
	IGHV1-69	3	0	3	6	3	3	6	12
	IGHV3-21	1	0	2	3	1	0	1	4
g>t	IGHV4-34	8	5	20	33	4	6	10	43
	IGHV3-7	4	3	15	22	7	8	15	37
	IGHV3-23	3	12	14	29	3	12	15	44
	IGHV3-30	8	8	28	44	2	2	4	48
	IGHV1-69	1	1	2	4	3	0	3	7
	IGHV3-21	2	0	2	4	0	3	3	7
t>g	IGHV4-34	8	1	8	17	4	2	6	23
	IGHV3-7	23	1	8	32	4	3	7	39
	IGHV3-23	19	3	8	30	0	8	8	38
	IGHV3-30	7	1	5	13	7	14	21	34
	IGHV1-69	0	0	1	1	0	1	1	2
	IGHV3-21	2	0	0	2	0	2	2	4
Μβ	IGHV4-34	92	138	324	554	122	89	211	765
	IGHV3-7	68	72	273	413	110	61	171	584
	IGHV3-23	69	90	221	380	84	123	207	587
	IGHV3-30	64	56	273	393	90	92	182	575
	IGHV1-69	17	13	55	85	25	19	44	129
	IGHV3-21	11	3	26	40	15	18	33	73
Μπ	IGHV4-34	95	69	247	411	56	69	125	536
	IGHV3-7	83	42	175	300	81	94	175	475
	IGHV3-23	74	70	151	295	52	93	145	440
	IGHV3-30	70	30	220	320	81	111	192	512
	IGHV1-69	12	5	33	50	15	12	27	77
	IGHV3-21	18	2	20	40	12	25	37	77

α: Αδενίνη, γ: Γουανίνη, c: Κυτοσίνη, t: Θυμίνη Μβ=μεταβάσεις, Μπ=μεταπτώσεις

Πίνακας Π₁₀. «Κανονικοποιημένη» κατανομή όλων των τύπων νουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων στις περιοχές VH FRs και VH CDRs στις περιοχές VH FRs και VH CDRs σε υποομάδες που χρησιμοποιούν το ίδιο γονίδιο IGHV.

	Γονίδιο	VHFR1	VHFR2	VHFR3	VHFRs	VHCDR1	VHCDR2	VHCDRs
a>g	IGHV4-34	1,0	1,4	2,6	5,1	0,2	5,6	5,8
	IGHV3-7	0,2	1,0	2,7	4,0	2,2	4,4	6,6
	IGHV3-23	0,1	0,9	2,2	3,2	1,9	4,0	6,0
	IGHV3-30	0,5	0,7	2,6	3,8	1,7	7,7	9,4
	IGHV1-69	0,2	0,1	0,3	0,6	0,0	0,4	0,4
	IGHV3-21	0,1	0,0	0,5	0,5	0,2	1,6	1,8
g>a	IGHV4-34	1,1	3,2	2,9	7,3	9,1	2,0	11,1
	IGHV3-7	1,3	1,3	1,7	4,4	5,0	2,7	7,8
	IGHV3-23	1,5	2,6	1,5	5,6	3,6	7,4	11,0
	IGHV3-30	1,1	1,7	2,3	5,1	3,7	2,0	5,7
	IGHV1-69	0,3	0,3	0,5	1,1	1,4	0,4	1,8
	IGHV3-21	0,2	0,0	0,2	0,4	0,5	0,3	0,7
c>t	IGHV4-34	1,2	3,5	3,5	8,1	3,0	2,9	5,9
	IGHV3-7	0,8	1,9	2,9	5,5	4,0	0,4	4,4
	IGHV3-23	0,8	1,5	2,2	4,5	3,6	1,6	5,2
	IGHV3-30	0,8	0,3	2,3	3,4	3,8	0,1	4,0
	IGHV1-69	0,0	0,2	0,7	1,0	1,2	0,4	1,6
	IGHV3-21	0,1	0,2	0,1	0,4	0,8	0,0	0,8
t>c	IGHV4-34	0,4	0,1	0,7	1,2	2,3	1,2	3,5
	IGHV3-7	0,4	0,1	0,8	1,4	2,0	0,4	2,4
	IGHV3-23	0,4	0,4	0,7	1,5	1,0	3,0	4,0
	IGHV3-30	0,2	0,7	1,0	1,9	1,6	2,2	3,8
	IGHV1-69	0,2	0,2	0,2	0,5	0,4	1,3	1,7
	IGHV3-21	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,5	0,8
a>c	IGHV4-34	0,3	0,6	1,0	1,9	0,7	2,0	2,7
	IGHV3-7	0,2	0,0	0,7	0,9	1,1	2,6	3,7
	IGHV3-23	0,2	0,3	0,8	1,3	0,1	0,8	0,9
	IGHV3-30	0,1	0,1	0,8	0,9	1,1	4,9	6,0
	IGHV1-69	0,0	0,0	0,2	0,2	0,1	0,0	0,1
	IGHV3-21	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,8	0,9
c>a	IGHV4-34	0,5	0,2	0,6	1,3	0,1	0,8	0,9
	IGHV3-7	0,4	0,2	0,3	0,9	1,6	0,3	1,8
	IGHV3-23	0,4	0,0	0,3	0,6	1,2	0,1	1,3
	IGHV3-30	0,3	0,1	0,5	0,9	1,1	0,0	1,1
	IGHV1-69	0,0	0,0	0,2	0,2	0,1	0,1	0,3
	IGHV3-21	0,2	0,0	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0
a>t	IGHV4-34	0,5	0,2	1,1	1,9	1,7	1,2	2,9
	IGHV3-7	0,1	0,1	0,9	1,1	1,6	2,2	3,8
	IGHV3-23	0,1	0,1	1,1	1,3	0,7	1,3	2,0
	IGHV3-30	0,2	0,1	0,4	0,8	1,3	2,5	3,8
	IGHV1-69	0,1	0,0	0,2	0,2	0,2	0,3	0,5
	IGHV3-21	0,0	0,1	0,2	0,3	0,1	0,4	0,5
t>a	IGHV4-34	0,2	0,1	0,2	0,5	1,0	0,7	1,6
	IGHV3-7	0,2	0,0	0,5	0,6	0,8	0,1	1,0

	IGHV3-23	0,2	0,1	0,1	0,4	0,2	1,6	1,8
	IGHV3-30	0,2	0,1	0,4	0,8	1,3	2,5	3,8
	IGHV1-69	0,1	0,0	0,0	0,1	0,5	0,4	0,9
	IGHV3-21	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,5	0,5
g>c	IGHV4-34	1,0	2,5	2,1	5,6	2,0	1,7	3,7
	IGHV3-7	0,8	1,7	1,4	3,9	1,8	3,6	5,4
	IGHV3-23	0,8	1,2	1,1	3,0	1,4	5,5	6,9
	IGHV3-30	0,8	0,5	1,8	3,1	2,5	0,8	3,3
	IGHV1-69	0,1	0,2	0,3	0,7	0,1	0,3	0,4
	IGHV3-21	0,3	0,0	0,2	0,5	1,1	0,9	2,0
c>g	IGHV4-34	0,7	0,2	1,5	2,3	0,2	1,7	1,9
	IGHV3-7	0,7	0,4	0,7	1,8	1,6	2,0	3,5
	IGHV3-23	0,5	1,6	0,5	2,6	2,2	0,3	2,4
	IGHV3-30	0,7	0,2	1,0	1,9	1,8	0,0	1,8
	IGHV1-69	0,1	0,0	0,1	0,2	0,4	0,4	0,8
	IGHV3-21	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1
g>t	IGHV4-34	0,3	0,3	0,6	1,2	0,5	0,8	1,3
	IGHV3-7	0,2	0,2	0,5	0,8	0,8	1,0	1,9
	IGHV3-23	0,1	0,7	0,4	1,3	0,4	1,6	1,9
	IGHV3-30	0,3	0,5	0,8	1,6	0,2	0,3	0,5
	IGHV1-69	0,0	0,1	0,1	0,2	0,4	0,0	0,4
	IGHV3-21	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,4	0,4
t>g	IGHV4-34	0,3	0,1	0,2	0,6	0,5	0,3	0,7
	IGHV3-7	0,9	0,1	0,2	1,2	0,5	0,4	0,9
	IGHV3-23	0,8	0,2	0,2	1,2	0,0	1,0	1,0
	IGHV3-30	0,3	0,1	0,2	0,5	0,8	1,8	2,7
	IGHV1-69	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1
	IGHV3-21	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,3	0,3

Πίνακας Π₁₁. Κατανομή των μη συντηρημένων έναντι των συντηρημένων αμινοξικών αντικαταστάσεων στις περιοχές VH FRs και VH CDRs.

	VH FR1	VH FR2	VH FR3	VH FRs	VH CDR1	VH CDR2	VH CDRs
μΣ	439	386	1346	2171	692	662	1354
Σ	228	242	846	1316	203	332	535
μΣ/Σ	1,9	1,6	1,6	1,6	3,4	2,0	2,5

μΣ: μη συντηρημένες, Σ: συντηρημένες

Πίνακας Π₁₂. Κατανομή των μη συντηρημένων έναντι των συντηρημένων αμινοξικών αντικαταστάσεων στις περιοχές VH FRs και VH CDRs στις 3 υποομάδες με διαφορετικό φορτίο μεταλλάξεων (<96%, 96-97,9% και 98-99,9%).

		VH FR1	VH FR2	VH FR3	VH FRs	VH CDR1	VH CDR2	VH CDRs
μΣ	<96	389	346	1211	1946	614	588	1202
	96-97,9	38	22	115	175	65	57	122
	98-99,9	12	18	20	50	13	17	30
Σ	<96	194	209	770	1173	167	279	446
	96-97,9	24	27	53	104	33	38	71
	98-99,9	10	6	23	39	3	15	18
μΣ/Σ	<96	2,0	1,7	1,6	1,7	3,7	2,1	2,7
	96-97,9	1,6	0,8	2,2	1,7	2,0	1,5	1,7
	98-99,9	1,2	3,0	0,9	1,3	4,3	1,1	1,7

μΣ: μη συντηρημένες, Σ: συντηρημένες

Πίνακας Π₁₃. Κατανομή των μη συντηρημένων έναντι των συντηρημένων αμινοξικών αντικαταστάσεων στις περιοχές VH FRs και VH CDRs σε υποομάδες που χρησιμοποιούν το ίδιο γονίδιο IGHV.

		VH FR1	VH FR2	VH FR3	VH FRs	VH CDR1	VH CDR2	VH CDRs
μΣ	IGHV4-34	65	65	180	310	113	63	176
	IGHV3-7	52	30	151	223	89	64	153
	IGHV3-23	40	72	129	241	64	84	148
	IGHV3-30	61	30	184	275	86	101	187
	IGHV1-69	10	5	27	42	23	15	38
	IGHV3-21	7	0	17	24	6	13	19
Σ	IGHV4-34	24	49	107	180	8	45	53
	IGHV3-7	27	27	108	162	20	46	66
	IGHV3-23	29	21	84	134	17	48	65
	IGHV3-30	30	18	98	146	21	23	44
	IGHV1-69	5	2	18	25	4	3	7
	IGHV3-21	11	0	11	22	8	17	25
μΣ/Σ	IGHV4-34	2,7	1,3	1,7	1,7	14,1	1,4	3,3
	IGHV3-7	1,9	1,1	1,4	1,4	4,5	1,4	2,3
	IGHV3-23	1,4	3,4	1,5	1,8	3,8	1,8	2,3
	IGHV3-30	2,0	1,7	1,9	1,9	4,1	4,4	4,3
	IGHV1-69	2,0	2,5	1,5	1,7	5,8	5,0	5,4
	IGHV3-21	0,6	0,0	1,5	1,1	0,8	0,8	0,8

μΣ: μη συντηρημένες, Σ: συντηρημένες

Παράρτημα 2

Πίνακας Π2. Στερεότυπα υποσύνολα. Κατανομή γονιδίων IGHV, IGHD, IGHJ , ομολογία γονιδίων IGHV, μήκος CDR3 και αμινογική αλληλουχία της περιοχής VH CDR3

A/α	# ¹	IGHV gene	IGHD gene	IGHJ gene	%	CDR3	VH CDR3 AA ²
N1457	1	IGHV1-18*01	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	99,3	13	CARKQWLPQYYFDYW
N2837	1	IGHV5-a*01	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100,0	13	CARVQWLVRIFYFDYW
N3660	1	IGHV1-3*01	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100,0	13	CAREQWLVRNFYDW
N5760	1	IGHV1-3*01	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100,0	13	CAREQWLVLHYFDYW
P10029	1	IGHV1-3*01	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100,0	13	CARLQWLSLHYFDYW
P1173	1	IGHV5-a*01	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	99,7	13	CAREQWLGIKNFYDW
P2355	1	IGHV1-2*02	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100,0	13	CARAQWLVTNFYDW
P3073	1	IGHV1-3*01	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100,0	13	CAREQWLVRNFYDW
P3129	1	IGHV1-3*01	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100,0	13	CAREQWLDLAFYDW
P3506	1	IGHV1-2*02	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	99,7	14	CARAQWLVLVSYFYDW
P3560	1	IGHV1-2*02	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100,0	13	CAREQWLAPPFYDW
P3574	1	IGHV1-2*02	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	99,7	13	CAREQWLVRIFYDW
P3870	1	IGHV1-2*02	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100,0	13	CARGQWLVLNFYDW
P439	1	IGHV1-3*01	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100,0	13	CARWQWLVLGYFYDW
P4699	1	IGHV1-18*01	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	99,7	13	CARVQWLATYYFYDW
P5092	1	IGHV5-a*03	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100,0	13	CAREQWLVLHFYDW
P5220	1	IGHV1-2*02	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100,0	13	CARAQWLVLPHFYDW
P5432	1	IGHV5-a*03	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100,0	13	CAREQWLVLTSFYDW
P5850	1	IGHV1-3*01	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100,0	13	CAREQWLGFNFYDW
P6857	1	IGHV1-2*02	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100,0	13	CARDQWLPLANFYDW
P79	1	IGHV5-a*01	IGHD6-19*01	IGHJ4*01	99,6	14	CARAQWLALSMPFYDW
P7937	1	IGHV7-4-1*02	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100,0	13	CARGQWLPTNFYDW
P8139	1	IGHV5-51*01	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100,0	13	CARQQWLGLNYFYDW
N1405	2	IGHV3-11*01	IGHD3-9*01	IGHJ6*02	100,0	9	CARDLNAMDVW
N1553	2	IGHV3-21*01	IGHD3-9*01	IGHJ6*02	98,2	9	CARDLNAMDVW
N3690	2	IGHV3-21*01		IGHJ6*02	96,2	9	CARDANGMDVW
N4002	2	IGHV3-21*01	IGHD1-26*01	IGHJ6*02	98,6	9	CATDGNMGMDVW
N5000	2	IGHV3-21*01		IGHJ6*02	97,6	9	CARDANGMDVW
P11475	2	IGHV3-21*01		IGHJ6*02	98,0	9	CARDQNAMDVW
P1321	2	IGHV3-21*01	IGHD1-1*01	IGHJ6*02	98,6	9	CARDQNAMDVW
P1531	2	IGHV3-21*01	ND	IGHJ6*02	97,6	9	CARDANGMDVW
P326	2	IGHV3-21*01	IGHD1-14*01	IGHJ6*02	98,6	9	CAIDRNGMDVW
P6090	2	IGHV3-21*02	ND	IGHJ6*02	96,2	9	CVTDRNGMDVW
N2889	4	IGHV4-34*01	IGHD5-12*01	IGHJ6*02	90,5		CARGYPLDTVTRYYYYGMDVW
N3561	4	IGHV4-34*02	IGHD3-16*01	IGHJ6*02	94,3	20	CARGFPLEAVIRRRYYYYGMDVW
N3729	4	IGHV4-34*01	IGHD5-5*01	IGHJ6*02	94,4	20	CARGFGDTAVRRYYYYGMDVW
P10011	4	IGHV4-34*01	IGHD3-9*01	IGHJ6*02	97,2	20	CVQGYPTAYDIRRRYYYYGMDVW
P103HA	4	IGHV4-34*01	IGHD3-10*01	IGHJ6*02	95,8	20	CARGYPDTPVRRYYYYGMDVW
P12321	4	IGHV4-34*01	IGHD6-19*01	IGHJ6*02	93,3	20	CVRGWGDTVDSRRYYYYGMDVW
P13443	4	IGHV4-34*01	IGHD5-18*01	IGHJ6*02	97,5	20	CARGYPDTPVRRHHYYGMDVW
P1422	4	IGHV4-34*02	IGHD5-12*01	IGHJ6*02	93,0	20	CARGYADTPTFRRRYYYYGMDVW

P1626	4	IGHV4-34*02	IGHD4-17*01	IGHJ6*02	94,6	18	CARSYGSTPTTRRRYYYYGMDVW
P1939	4	IGHV4-34*01	IGHD5-5*01	IGHJ6*02	94,5	20	CVRGYPDТАVVKRRYYYYGMEVW
P2451	4	IGHV4-34*01	IGHD5-5*01	IGHJ6*02	91,9	20	CVRGYADТАVRRYYYYGMDVW
P2920	4	IGHV4-34*01	IGHD3-10*01	IGHJ6*02	93,3	20	CARGYGSDPTKRRYYFGLDVW
P3020	4	IGHV4-34*03	IGHD3-10*01	IGHJ6*02	89,6	20	CARGYGTSDTRRRYYFYGMDVW
P3551HA	4	IGHV4-34*01	IGHD5-12*01	IGHJ6*02	93,3	20	CARGWPEDAVTRRRYYYYGMEIW
P3916	4	IGHV4-34*01	IGHD3-10*01	IGHJ6*02	89,8	20	CARGYADSDVIRRRYYYYGMDVW
P6520	4	IGHV4-34*02	IGHD3-10*01	IGHJ6*02	94,4	20	CARGYPEVPTTRRRYYYYGMELW
P6752	4	IGHV4-34*01	IGHD5-5*01	IGHJ6*02	94,7	20	CARGYPDTPVRRRRYYYYGFDVW
P7622	4	IGHV4-34*01	IGHD4-17*01	IGHJ6*02	90,2	20	CVRGYGVТАЕТRRYYFYGMDVW
P907	4	IGHV4-34*02	IGHD5-12*01	IGHJ6*02	93,3	20	CARGYGTSAТTKRRYYYYGMDVW
P9881	4	IGHV4-34*01	IGHD5-5*01	IGHJ6*02	94,0	20	CVRGYGDPTLRRRRYYYYGMDVW
N1659_KA	6	IGHV1-69*01	IGHD3-16*01	IGHJ3*02	100,0	21	CARGGDYDIWGSYRASDAFDIW
N7439	6	IGHV1-69*06	IGHD3-3*01	IGHJ3*02	100,0	21	CARGGTYDFWSGYKPNDAFDIW
P11887	6	IGHV1-69*06	IGHD3-16*02	IGHJ3*02	100,0	21	CARGGPYDYVWGSYRPSDAFDIW
P3810	6	IGHV1-69*01	IGHD3-16*02	IGHJ3*02	99,7	21	CARGGYDYVWGSYRPNDAFDIW
P7150	6	IGHV1-69*01	IGHD3-16*02	IGHJ3*02	100,0	21	CARGGSYDYVWGSYRPNDAFDIW
P896	6	IGHV1-69*01	IGHD3-16*01	IGHJ3*02	100,0	21	CARGGPYDYVWGSYRPPDAFDIW
P9320	6	IGHV1-69*01	IGHD3-16*02	IGHJ3*02	100,0	21	CARGGDYDIWGSYRPNDAFDIW
N3756	8	IGHV4-39*01	IGHD6-13*01	IGHJ5*02	99,7	19	CARQLGYSSSWYGNRNWFDPW
P1050	8	IGHV4-39*01	IGHD6-13*01	IGHJ5*02	100,0	19	CAIYQGYSSSWFSQVNWFDPW
P1114	8	IGHV4-39*01	IGHD6-13*01	IGHJ5*02	100,0	19	CARRTGYSSSWYSTYNWFDPW
P1615	8	IGHV4-39*01	IGHD6-13*01	IGHJ5*02	100,0	19	CASRRGYSSSWFNVVAFDPW
P2446	8	IGHV4-39*07	IGHD6-13*01	IGHJ5*02	100,0	19	CASLTGYSSSWYTPANWFDPW
N3859	10	IGHV4-39*01	IGHD2-2*01	IGHJ6*02	100,0	22	CARHRLGYCSSTSCYYYYGMDVW
P104HB	10	IGHV4-39*07	IGHD2-2*01	IGHJ6*02	100,0	22	CARDRGGYCSSTSCYLFYYGMDVW
P437	10	IGHV4-39*01	IGHD2-2*01	IGHJ6*02	100,0	22	CARHRLGYCSSTSCYYYYGMDVW
P1082	16	IGHV4-34*01	IGHD2-15*01	IGHJ6*02	96,5	24	CAGRFCYCSGAGCDSEGFYYYYGLDVW
P8973	16	IGHV4-34*01	IGHD2-2*01	IGHJ6*02	95,1	24	CAGRFCYSGTTCSSPQYFYYYGMDVW
P9297	16	IGHV4-34*02	IGHD2-2*01	IGHJ6*02	95,1	24	CAGRFCYCSGASCDRVDFYYYYGLDAW
N2754	18	IGHV3-23*01	IGHD4-23*01	IGHJ3*02	96,5	13	CAKGDGGNLDAFDIW
N236	24	IGHV1-2*04	IGHD2-2*03	IGHJ6*02	96,7	26	CARGGYCSSINCYSRVGSdynyyGTDVW
N1737KA	41	IGHV3-21*01	IGHD2-2*01	IGHJ6*01	98,9	24	CARDRLGYCSSTSCWDYYYYGMDVW
N4810	44	IGHV3-53*01	IGHD4-4*01	IGHJ6*02	100,0	20	CARDPGVTТFRDYYYYGMDVW
N1482	45	IGHV4-39*01	IGHD3-22*01	IGHJ5*02	91,1	19	CVRADSWYYYDSSGPGWFDPW
N1810	45	IGHV4-39*01	IGHD3-22*01	IGHJ5*02	100,0	19	CARLHWYYYDSSGYERWFDPW
N1691	47	IGHV3-66*02	IGHD2-15*01	IGHJ5*02	98,9	14	CARDGDCSGGTCYSGW
N4138	50	IGHV4-59*01	IGHD3-22*01	IGHJ6*01	100,0	22	CARGVGDIYDSSGYLNYYGMDVW
N1451	52	IGHV4-34*01	IGHD2-2*01	IGHJ6*02	93,8	19	CARGQGYCSGSSCYYYGMDVW
N1707	58	IGHV3-23*01	IGHD3-22*01	IGHJ1*01	97,2	13	CAKDYDSSGANFQHW
N1867	59	IGHV1-69*09	IGHD3-3*01	IGHJ5*02	95,8	12	CATADDFWSGHIW
N2231	59	IGHV1-58*01	IGHD3-3*01	IGHJ4*02	99,6	12	CAAGYDFWSGYIYW
N4418	59	IGHV1-58*01	IGHD3-3*01	IGHJ4*02	100,0	12	CAATYDFWSGSHYW
N1680	83	IGHV3-30*03	IGHD3-16*01	IGHJ2*01	92,7	13	CVKEGEFSKYFYLW
N1542	87	IGHV3-30*01	IGHD3-3*01	IGHJ4*02	100,0	16	CARGPRGDFWSGYTVDYW
N1187	99	IGHV3-303*01	IGHD4-17*01	IGHJ4*03	100,0	14	CARGASGDYAAPFDYW
N1508	104	IGHV3-9*01	IGHD2-21*01	IGHJ6*02	94,1	15	CAKGGGGQLFLYGMVDVW
N5151	116	IGHV1-2*02	IGHD2-2*02	IGHJ5*02	94,8	15	CATDNELRYSQGWFDPW

N1404HA	124	IGHV1-3*01	IGHD3-10*01	IGHJ4*02	93,3	19	CTRGLRYHGSYSYADYFDYW
N2152	133	IGHV1-69*01	IGHD3-3*01	IGHJ5*02	90,3	15	CARGGFWSGYYSWFDPW
N5550	148	IGHV2-5*10	IGHD1-7*01	IGHJ4*02	95,5	17	CSHRRRIMSDWNYGSFDYW
N3312	239	IGHV4-34*01	IGHD2-2*01	IGHJ2*01	100,0	20	CARGLWIVVPAASDYWYFDLW
N4969	262	IGHV3-30-*01	IGHD2-2*01	IGHJ6*02	100,0	29	CARVPPVEGDIVVPAAMGPLYYYYGMDVW
N1492LA	276	IGHV3-30*02	IGHD3-9*01	IGHJ4*02	89,5	10	CAKDFKWGFDYW
N5494	64B	IGHV3-21*01	IGHD2-15*01	IGHJ6*02	100,0	21	CARDSPLVVVAIFYYYYGMDVW

#¹: στερεότυπο υποσύνολο, AA²: αμινοξική αλληλουχία