

**ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΕΘΝΙΚΩΝ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΩΝ**  
**ΠΑΝΙΣΤΗΜΙΩΝ ΑΘΗΝΩΝ & ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΧΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΤΟΥ ΕΘΝΙΚΟΥ ΙΔΡΥΜΑΤΟΣ ΕΡΕΥΝΩΝ**  
**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

---

**Προτυποποίηση μελέτης ανοσοσφαιρινών για την αναζήτηση νέων  
βιοδεικτών σε αιματολογικές κακοήθειες.**

---

**Κουκουβίνη Καλυψώ Αγγελική**

**Επιβλέπων: Αγαθαγγελίδης Ανδρέας, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα  
Βιολογίας, ΕΚΠΑ**

**Αθήνα, 2025**

Τριμελής Επιτροπή:

1. Αγαθαγγελίδης Ανδρέας, Επίκουρος Καθηγητής Γενετικής - Μοριακής Γενετικής Ευκαρυωτικών Οργανισμών, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
2. Κόλλια Παναγούλα, Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
3. Θάνος Δημήτριος, Ερευνητής Α' Πρόεδρος Επιστημονικού Συμβουλίου, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ)

## Περίληψη

Η Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΛΛ) είναι νεοπλασία ώριμων Β λεμφοκυττάρων. Η κλινική πορεία των ασθενών είναι εξαιρετικά ετερογενής, ενώ σε βιολογικό επίπεδο η νόσος οφείλεται σε συνδυασμό γενετικών παραγόντων και παραγόντων του κυτταρικού μικροπεριβάλλοντος. Στην πλειοψηφία των ασθενών, ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων παρουσιάζει μικρές αλλαγές στο χρόνο και η κατάσταση της ασθένειας μπορεί να παραμείνει σταθερή για χρόνια. Σε άλλους ασθενείς, η εξέλιξη της ασθένειας μπορεί να είναι αρκετά ταχύτερη, σε άμεση εξάρτηση από το ρυθμό πολλαπλασιασμού των λευχαιμικών κυττάρων. Σε αυτό το πλαίσιο, η ταυτοποίηση μοριακών βιοδεικτών, όπως οι γονιδιακές μεταλλάξεις και ποσοτική ανάλυση έκφρασης γονιδίων, πρωτεϊνών και άλλων μορίων βοηθά στη διάγνωση, τη σταδιοποίηση και την πρόγνωση της νόσου. Τα δεδομένα καταδεικνύουν πως ο κλωνοτυπικός Β κυτταρικός υποδοχέας (ΒκΥ) διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της ΧΛΛ, ενώ η διαρκής αλληλεπίδραση ανάμεσα στο λευχαιμικό κλώνο και τα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος μέσω του ΒκΥ επάγει φαινοτυπικές και λειτουργικές αποκλίσεις.

Ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η αναζήτηση νέων βιοδεικτών από την προτυποποίηση της μελέτης των ανοσοσφαιρινών του ΒκΥ σε ασθενείς με ΧΛΛ. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση με PCR των μορίων της ανοσοσφαιρίνης του κλωνοτυπικού ΒκΥ σε μια σειρά ασθενών με ΧΛΛ και δομική ανάλυση των συγκεκριμένων μορίων μέσω της χρήσης σύγχρονων εργαλείων βιοπληροφορικής. Με βάση τα δομικά δεδομένα, στο τελικό στάδιο πραγματοποιήθηκε ομαδοποίηση των ασθενών με απώτερο σκοπό τη βελτίωση της μοριακής τους ταξινόμησης.

Η δομική ταξινόμηση των κλωνοτυπικών ανοσοσφαιρινών του ΒκΥ φαίνεται ότι μπορεί να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τη βιολογία και την πρόγνωση της ΧΛΛ. Η παρούσα εργασία οδήγησε στην αναγνώριση ομάδων ασθενών με ΒκΥ που διαμορφώνονται δομικά από διακριτά ανοσογενετικά χαρακτηριστικά, όπως το αναδιαταγμένο γονίδιο IGHV και η κατάσταση της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης, τα οποία φαίνεται να είναι σημαντικά για τη διαδικασία της αντιγονικής επιλογής και, επομένως, της κλωνικής εξέλιξης του νοσήματος. Αυτή η προσέγγιση αναμένεται να συμβάλει στη βαθύτερη κατανόηση της παθογένειας της ΧΛΛ και την ανάπτυξη στοχευμένων θεραπευτικών παρεμβάσεων.

**Λέξεις Κλειδιά :** Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία Β κυτταρικός υποδοχέας, Βιοδείκτες, Δομική ανάλυση, Ανοσοσφαιρίνες

## **Abstract**

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is a neoplasm of mature B cells. The clinical course of patients is highly heterogeneous, while at the biological level the disease results from a combination of genetic factors and components of the cellular microenvironment. In most patients, white blood cell counts show minimal changes over time and the disease can remain stable for years. In others, disease progression may be significantly faster, directly depending on the proliferation rate of leukemic cells. In this context, the identification of molecular biomarkers - such as gene mutations and quantitative analysis of gene, protein, and other molecule expression - supports the diagnosis, staging, and prognosis of the disease. Data indicate that the clonotypic B-cell receptor (BcR) plays a central role in the pathophysiology of CLL, as continuous interaction between the leukemic clone and the microenvironment via the BcR induces phenotypic and functional divergence.

The aim of this study was to explore novel biomarkers through the standardized analysis of immunoglobulin molecules of the clonotypic BcR in patients with CLL. Specifically, PCR amplification of the BcR immunoglobulin molecules was performed in a series of CLL patients, followed by structural analysis using modern bioinformatics tools. Based on the structural data, patients were subsequently grouped with the ultimate goal of improving their molecular classification.

The structural classification of the clonotypic BcR immunoglobulins could provide important information on the biology and prognosis of CLL. The present study led to the identification of groups of patients with BcRs that are structurally shaped by distinct immunogenetic characteristics, such as the rearranged IGHV gene and the somatic hypermutations status, which appear to be important for the process of antigenic selection and, therefore, the clonal evolution of the disease. This approach is expected to contribute to a deeper understanding of the pathogenesis of CLL and the development of targeted therapeutic interventions.

**Keywords : Chronic Lymphocytic Leukemia, B Cell Receptor, Biomarkers, Structural Analysis, Immunoglobulins**

## Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όσους με στήριξαν και συνέβαλαν καθοριστικά στην επιτυχή ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας.

Πρώτα και κύρια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντά μου κ. Ανδρέα Αγαθαγγελίδη, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας στο Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, για την πολύτιμη καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη και την υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της διπλωματικής εργασίας. Η ανάθεση αυτού του ιδιαίτερα ενδιαφέροντος θέματος υπήρξε καθοριστική για την προσωπική μου εξέλιξη.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην κα Παναγούλα Κόλλια, Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, η οποία ως μέλος της τριμελούς επιτροπής διέθεσε το χρόνο της, έκανε πολύτιμες παρατηρήσεις και παρείχε σωστές κατευθύνσεις.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κο Δημήτριο Θάνο, Ερευνητή Α' και Πρόεδρο του Επιστημονικού Συμβουλίου στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή.

Όπως λέει και ένα γνωστό ποίημα, *«σημασία δεν έχει ο προορισμός ούτε το ταξίδι, αλλά η παρέα»*, και σε αυτή την παρέα, σε όλα τα παιδιά που βρίσκονταν στο εργαστήριο την περίοδο της εκπόνησης της εργασίας θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ για τη συνεργασία, την αλληλοϋποστήριξη και το φιλικό κλίμα που δημιούργησαν. Κυρίως όμως θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δημήτρη, για την υπομονή, τις αναμονές, τις γκρίνιες, τα γέλια, τα λάθη και τις επιτυχίες που μοιραστήκαμε.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου τους γονείς μου, Διονυσία και Σπύρο, και ειδικά τον αδερφό μου, Άδωνι, για την αμέριστη στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού. Η αγάπη και η υπομονή τους υπήρξαν οι ακρογωνιαίοι λίθοι που με βοήθησαν να φέρω εις πέρας αυτή την προσπάθεια.

Σας ευχαριστώ!

## Περιεχόμενα

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| Περίληψη.....                                                      | 3  |
| Abstract .....                                                     | 4  |
| Ευχαριστίες .....                                                  | 5  |
| Κατάλογος Συντομογραφιών .....                                     | 9  |
| Κεφάλαιο 1: Ανοσοποιητικό Σύστημα.....                             | 10 |
| 1.1 Γενικά .....                                                   | 10 |
| 1.2 Αιμοποίηση.....                                                | 10 |
| 1.3 Έμφυτη Ανοσία .....                                            | 11 |
| 1.4 Προσαρμοστική Ανοσία .....                                     | 12 |
| 1.5 T λεμφοκύτταρα .....                                           | 13 |
| 1.6 T κυτταρικός υποδοχέας.....                                    | 14 |
| 1.7 Δομή του T κυτταρικού υποδοχέα.....                            | 14 |
| 1.8 B λεμφοκύτταρα .....                                           | 15 |
| 1.9 Διαφοροποίηση ανεξάρτητη από αντιγόνο.....                     | 16 |
| 1.10 Διαφοροποίηση εξαρτώμενη από αντιγόνο .....                   | 17 |
| Κεφάλαιο 2: Γενετική οργάνωση των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών..... | 20 |
| 2.1 Γενικά .....                                                   | 20 |
| 2.2. Βασική δομή και λειτουργία των ανοσοσφαιρινών.....            | 21 |
| 2.3 Ισότυποι Ανοσοσφαιρινών .....                                  | 21 |
| 2.3.1 Ανοσοσφαιρίνη ισοτύπου IgM .....                             | 21 |
| 2.3.2 Ανοσοσφαιρίνη ισοτύπου IgG .....                             | 22 |
| 2.3.3 Ανοσοσφαιρίνη ισοτύπου IgA .....                             | 22 |
| 2.3.4 Ανοσοσφαιρίνη ισοτύπου IgE.....                              | 22 |
| 2.3.5 Ανοσοσφαιρίνη ισοτύπου IgD .....                             | 23 |
| 2.4 Αλληλεπιδράσεις ανοσοσφαιρινών με κυτταρικούς υποδοχείς .....  | 23 |
| 2.5 Γενετικοί τόποι των ανοσοσφαιρινών .....                       | 23 |
| 2.6 Γονιδιακός ανασυνδυασμός VDJ .....                             | 26 |
| 2.6.1 Μηχανισμός του ανασυνδυασμού V(D)J.....                      | 26 |
| 2.7 Περιοχές CDR .....                                             | 27 |
| 2.8 Συνδετική ετερογένεια.....                                     | 28 |

|                                                                                                                     |                                                |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 2.9 Γενετικός τύπος της βαριάς αλυσίδας .....                                                                       | 29                                             |
| 2.10 Γενετικοί τύποι της ελαφριάς αλυσίδας .....                                                                    | 29                                             |
| 2.10.1 κ ελαφριά αλυσίδα .....                                                                                      | <b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b> |
| 2.10.2 λ ελαφριά αλυσίδα .....                                                                                      | <b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b> |
| Κεφάλαιο 3 : Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία.....                                                                   | 31                                             |
| 3.1 Γενικά .....                                                                                                    | 31                                             |
| 3.2 Δείκτες .....                                                                                                   | 33                                             |
| 3.3. Σωματικές μεταλλάξεις των γονιδίων IGHV .....                                                                  | 33                                             |
| 3.4 Περιορισμένο ρεπερτόριο γονιδίων IGHV.....                                                                      | 34                                             |
| 3.5 Στερεοτυπία του BκΥ .....                                                                                       | 34                                             |
| 3.6 Δομική ανάλυση των ανοσοσφαιρινών .....                                                                         | 36                                             |
| Κεφάλαιο 4 : Σκοπός της μελέτης.....                                                                                | 37                                             |
| 4.1 Σκοπός της μελέτης .....                                                                                        | 37                                             |
| Κεφάλαιο 5 : Πειραματική Πορεία .....                                                                               | 38                                             |
| 5.1 Υλικά και Μέθοδοι .....                                                                                         | 38                                             |
| 5.1.1 Ομάδα μελέτης.....                                                                                            | 38                                             |
| 5.2 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων .....                                                                            | 38                                             |
| 5.3 Απομόνωση RNA .....                                                                                             | 41                                             |
| 5.4 Ποσοτικός Προσδιορισμός του RNA .....                                                                           | 41                                             |
| 5.5 Σύνθεση cDNA .....                                                                                              | 42                                             |
| 5.6 PCR για την ενίσχυση του γονιδίου αναφοράς .....                                                                | 43                                             |
| 5.7 PCR ενίσχυσης των κλωνικών αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών .....             | 44                                             |
| 5.8 Καθαρισμός των προϊόντων PCR.....                                                                               | 46                                             |
| 5.9 Ανάλυση ποιότητας και ποσότητας των καθαρών προϊόντων PCR.....                                                  | 48                                             |
| 5.10 PCR ενίσχυσης των κλωνικών αναδιατάξεων IGLV-IGLJ της ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών .....               | 49                                             |
| 5.11 Καθαρισμός των προϊόντων PCR των κλωνικών αναδιατάξεων IGKV/IGKJ της ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών..... | 51                                             |
| 5.12 Ανάλυση ποιότητας και ποσότητας των καθαρών προϊόντων PCR.....                                                 | 52                                             |
| 5.13 Αλληλούχηση των προϊόντων PCR για τις αναδιατάξεις της βαριάς αλυσίδας κατά Sanger .....                       | 53                                             |
| 5.14 Προετοιμασία δεδομένων .....                                                                                   | 54                                             |
| 5.15 Βιοπληροφορική Ανάλυση δεδομένων .....                                                                         | 55                                             |

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.15.1 Εργαλείο Chromas .....                                                    | 55 |
| 5.15.2 IMGT/V-QUEST .....                                                        | 55 |
| 5.15.3 SAbPred .....                                                             | 56 |
| 5.15.4 PDBefold.....                                                             | 57 |
| 5.15.5 Ιεραρχική ταξινόμηση των δομών των ανοσοσφαιρινών.....                    | 58 |
| Κεφάλαιο 6 : Αποτελέσματα.....                                                   | 60 |
| Α. Παρουσίαση των βασικών ανοσογενετικών χαρακτηριστικών της ομάδας μελέτης..... | 60 |
| 1. Υποομάδα γονιδίων IGHV .....                                                  | 60 |
| 2. Γονίδια IGHV .....                                                            | 61 |
| 3. Υποομάδα γονιδίων IGHD .....                                                  | 63 |
| 4. Γονίδια IGHD .....                                                            | 64 |
| 5. Γονίδια IGHJ .....                                                            | 65 |
| 6. Κατάσταση ΣΥΜ.....                                                            | 66 |
| 7. Μήκος περιοχής CDR3.....                                                      | 66 |
| 8. Στερεότυπα υποσύνολα .....                                                    | 68 |
| Β. Παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ιεραρχικής ταξινόμησης .....                 | 69 |
| Κεφάλαιο 7 : Συζήτηση/ Συμπεράσματα .....                                        | 74 |
| Δομική ταξινόμηση των κλωνοτυπικών BκΥ IG στη ΧΛΛ.....                           | 74 |
| Μελέτες σχετικά με τρισδιάστατες δομές του BκΥ IG στη ΧΛΛ .....                  | 74 |
| Το γονίδιο IGHV και η ΣΥΜ επηρεάζουν σημαντικά τη δομή του BκΥ IG.....           | 75 |
| Μήκος CDR3 και Στερεοτυπία: Δομική Σύγκλιση στην Αναγνώριση Αντιγόνου .....      | 76 |
| Σύνοψη.....                                                                      | 77 |
| Βιβλιογραφία .....                                                               | 78 |



## Κατάλογος συντομογραφιών

|                                                          |       |
|----------------------------------------------------------|-------|
| <b>Πολυδύναμα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα</b>          | PHSCs |
| <b>Στελεχιαία κύτταρα</b>                                | HSCs  |
| <b>Μυελικά προγονικά κύτταρα</b>                         | CMPs  |
| <b>Λεμφικά προγονικά κύτταρα</b>                         | CLPs  |
| <b>Υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων</b>                    | PRRs  |
| <b>Λιποπολυσακχαρίτες</b>                                | LPS   |
| <b>Υποδοχείς των T λεμφοκυττάρων</b>                     | TkY   |
| <b>Υποδοχείς των B λεμφοκυττάρων</b>                     | BkY   |
| <b>Ειδικοί επιφανειακοί δείκτες</b>                      | CDs   |
| <b>Πρωτεΐνες του μείζονος συμπλόκου ιστοσυμβατότητας</b> | MHC   |
| <b>Βοηθητικά T λεμφοκύτταρα</b>                          | TH    |
| <b>Λεμφικά προγονικά κύτταρα</b>                         | ELPs  |
| <b>Κύτταρα φυσικοί φονείς</b>                            | NKs   |
| <b>Δενδριτικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα</b>          | DCs   |
| <b>Υποκατάστατες ελαφριές αλυσίδες</b>                   | SLC   |
| <b>Σωματική υπερμεταλλαξιγένεση</b>                      | SYM   |
| <b>Οριακή ζώνη</b>                                       | MZ    |
| <b>Εναλλαγή ισοτύπου</b>                                 | EI    |
| <b>Ανοσοσφαιρίνες</b>                                    | Ig    |
| <b>Μεταβλητή περιοχή</b>                                 | VH    |
| <b>Βαριά αλυσίδα ανοσοσφαιρίνης</b>                      | IgH   |
| <b>Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία</b>                   | CLL   |
| <b>Κλωνοτυπικές ανοσοσφαιρίνες</b>                       | IGH   |

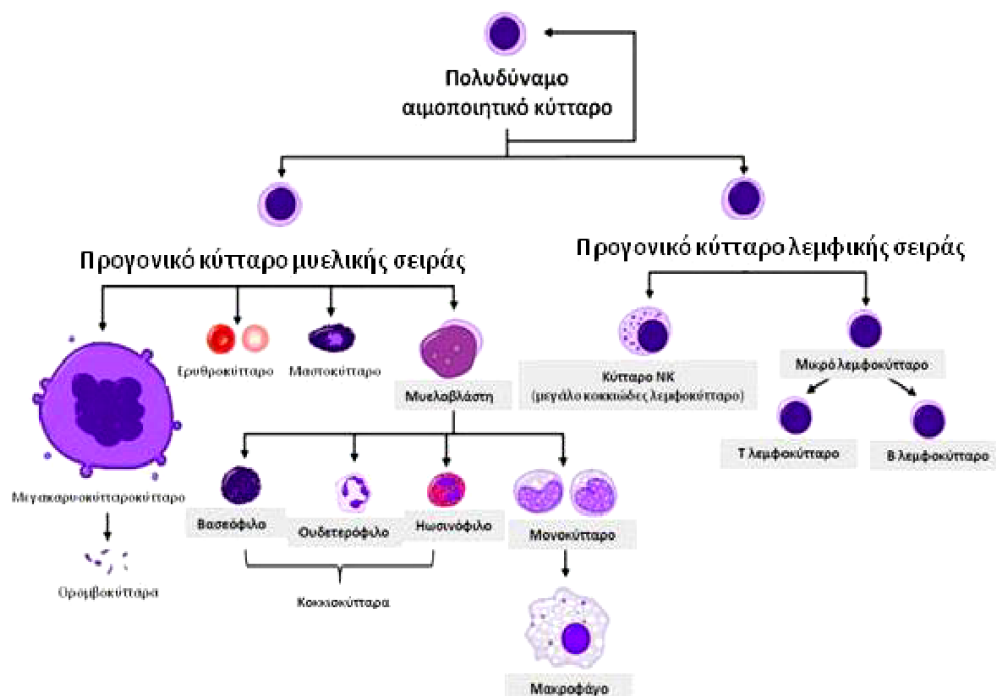
## Κεφάλαιο 1: Ανοσοποιητικό Σύστημα

### 1.1 Γενικά

Το ανοσοποιητικό σύστημα των σπονδυλωτών είναι ένα σύστημα άμυνας κατά της δράσης των παθογόνων μικροοργανισμών. Όταν ένας οργανισμός έρχεται σε επαφή με ένα παθογόνο, ενεργοποιούνται οι ανοσοποιητικοί μηχανισμοί για την εξάλειψη της απειλής και την αποκατάσταση της ομοιόστασης. Οι κύριοι ανοσοποιητικοί μηχανισμοί είναι οι αποκρίσεις της έμφυτης και της προσαρμοστικής ανοσίας. Αν και οι δύο αυτοί τύποι ανοσίας είναι διακριτοί, οι ανοσοποιητικοί μηχανισμοί αλληλεπιδρούν συνεχώς με το κοινό τους στοιχείο να είναι η συμμετοχή των λευκοκυττάρων. Τα λευκοκύτταρα είναι μια ετερογενής ομάδα κυττάρων που συντονίζουν και εκτελούν τις ανοσολογικές αποκρίσεις μόνο όταν υπάρχει απειλή και είναι ικανά για τη διάκριση μεταξύ του εαυτού και του ξένου (Janeway et al., 2001 | Kindt et al., 2007)

### 1.2 Αιμοποίηση

Όλοι οι πληθυσμοί κυττάρων του αίματος προέρχονται από πολυδύναμα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (pluripotent hematopoietic stem cells, PHSCs), τα οποία είναι αρχέγονα προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών. Τα PHSCs αυτοανανεώνονται και διαφοροποιούνται στα κοινά μυελικά προγονικά κύτταρα (common myeloid progenitors, CMPs) και τα κοινά λεμφικά προγονικά κύτταρα (common lymphoid progenitors, CLPs). Από τους κοινούς μυελικούς προγόνους προκύπτουν οι πληθυσμοί των λευκών αιμοσφαιρίων, των ερυθρών αιμοσφαιρίων και των μονοκυττάρων/μακροφάγων που συνδέουν την έμφυτη και την προσαρμοστική ανοσία. Οι κοινοί λεμφικοί πρόγονοι διαφοροποιούνται στα Β και Τ λεμφοκύτταρα, τα οποία αποτελούν βασικούς ρυθμιστές της προσαρμοστικής ανοσίας, καθώς και στα κύτταρα φυσικούς φονείς (natural killer, NK), τα οποία λειτουργούν κυρίως στο πλαίσιο της έμφυτης ανοσίας (**Εικόνα 1**) (Janeway et al., 2001 | Kindt et al., 2007).



**Εικόνα 1.** Διαφοροποίηση πολυδύναμων αιμοποιητικών κυττάρων. Πηγή: LODISH HF. Molecular cell biology. New York: W.H. Freeman and Company; 2004.

Η διαδικασία της αιμοποίησης ρυθμίζεται από έναν πολύπλοκο μηχανισμό που περιλαμβάνει διάφορους αυξητικούς παράγοντες (κυτταροκίνες) που δρουν στα αντίστοιχα κύτταρα-στόχους. Η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων, όπως τα γονίδια που καθορίζουν τη γενεαλογική γραμμή και τα γονίδια που είναι ειδικά για τη γενεαλογική γραμμή, είναι απαραίτητη για τη «δέσμευση» των προγονικών κυττάρων σε ένα συγκεκριμένο μονοπάτι διαφοροποίησης, το οποίο ρυθμίζεται αυστηρά από ένα πολύπλοκο δίκτυο μεταγραφικών παραγόντων (Kindt et al., 2007).

### 1.3 Έμφυτη Ανοσία

Η έμφυτη ανοσία είναι μια ταχεία, μη ειδική απόκριση ενάντια σε οποιαδήποτε απειλή, η οποία εμποδίζει την είσοδο παθογόνων μικροοργανισμών στον οργανισμό ή τους καταπολεμά στα πρώτα στάδια της λοίμωξης. Η παρεμπόδιση της εισόδου των παθογόνων στον οργανισμό επιτυγχάνεται μέσω ανατομικών (δέρμα και βλεννογόνοι) και βιοχημικών φραγμών (λυσοζύμη, γαλακτικό οξύ, υδροχλωρικό οξύ), ενώ η μόλυνση των παθογόνων μικροοργανισμών αντιμετωπίζεται με μηχανισμούς όπως οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις, η φαγοκυττάρωση, ο πυρετός και η παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών (π.χ. ιντερφερόνες, συμπλήρωμα, προπαλδίνη) (Janeway et al., 2001 | Chaplin, 2010).

Παρά την έλλειψη εξειδίκευσης, ο μηχανισμός της έμφυτης ανοσίας χαρακτηρίζεται από αυτοανοχή, δηλαδή από την ικανότητα αναγνώρισης των συστατικών του οργανισμού προκειμένου να αποφεύγεται η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι αυτοαντιγόνων.

Οι υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (pathogen recognition receptors, PRRs) εκφράζονται από κύτταρα της έμφυτης ανοσίας, όπως τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα, τα οποία αναγνωρίζουν χαρακτηριστικές δομές στην επιφάνεια των παθογόνων, όπως π.χ. οι λιποπολυσακχαρίτες (lipopolysaccharides, LPS). Η αναγνώριση αυτών των δομών από τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας οδηγεί σε: (α) ενδοκυτταρική επεξεργασία των παθογόνων και παρουσίασή τους σε κύτταρα της προσαρμοστικής ανοσίας (παρουσίαση αντιγόνου), (β) ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που οδηγούν σε ενισχυμένες ανοσολογικές αποκρίσεις και (γ) ενεργοποίηση των μονοπατιών οψωνινοποίησης και συμπληρώματος. Η φαγοκυττάρωση και η παρουσίαση αντιγόνων από ειδικά φαγοκύτταρα που έχουν εγκατασταθεί στους ιστούς είναι βασικές διαδικασίες για την έναρξη της προσαρμοστικής ανοσολογικής απόκρισης (Janeway et al., 2001).

#### **1.4 Προσαρμοστική Ανοσία**

Η προσαρμοστική ανοσία χαρακτηρίζεται από υψηλή εξειδίκευση και μνήμη. Αυτός ο τύπος ανοσίας περιλαμβάνει ειδικούς μηχανισμούς που επιτρέπουν τη διάκριση μεταξύ του εαυτού και του ξένου, καθοδηγώντας έτσι την παραγωγή εξειδικευμένων κυττάρων (κυτταρική προσαρμοστική ανοσία) και κυτταρικών προϊόντων (χημική προσαρμοστική ανοσία) προκειμένου να αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά ο κίνδυνος της μόλυνσης (Kindt et al., 2007). Οι κύριοι ρυθμιστές της προσαρμοστικής ανοσίας είναι τα T και B λεμφοκύτταρα. Αυτά τα κύτταρα διαθέτουν ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνειά τους, που ονομάζονται υποδοχείς των T λεμφοκυττάρων (T κυτταρικοί υποδοχείς, TcY) και υποδοχείς των B λεμφοκυττάρων (B κυτταρικοί υποδοχείς, BcY), αντίστοιχα, για την αναγνώριση αντιγόνων. Αυτοί οι υποδοχείς έχουν ειδικές δομές που απαιτούνται για την υψηλή εξειδίκευση της αναγνώρισης των αντιγόνων (Kindt et al., 2007).

Τα κύτταρα και τα προϊόντα της έμφυτης ανοσίας ενεργοποιούν τα B και T λεμφοκύτταρα και διευκολύνουν την αλληλεπίδρασή τους με τα αντιγόνα των παθογόνων μικροοργανισμών. Τελικά, το αντιγόνο αναγνωρίζεται και προσδένεται από τον υποδοχέα ενός λεμφοκυττάρου, οδηγώντας στην ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την εξειδίκευση του τελευταίου σε "εκτελεστικό" κύτταρο. Τα εκτελεστικά κύτταρα εξουδετερώνουν πλήρως την απειλή με τη δράση τους. Επιπλέον, αυτή η διαδικασία οδηγεί στην παραγωγή κυττάρων μνήμης που

διατηρούν την ειδικότητά τους. Τα κύτταρα μνήμης «θυμούνται» το συγκεκριμένο παθογόνο, το οποίο προκάλεσε την ενεργοποίηση της προσαρμοστικής ανοσίας, επιτρέποντας έτσι στην ανοσολογική απάντηση να είναι πιο άμεση και αποτελεσματική σε πιθανή επόμενη έκθεση σε αυτό το παθογόνο (Janeway et al., 2001).

### 1.5 Τ λεμφοκύτταρα

Η δημιουργία, η εξέλιξη και η ωρίμανση των Τ λεμφοκυττάρων λαμβάνουν χώρα στα πρωτογενή λεμφικά όργανα. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα Τ λεμφοκύτταρα προέρχονται από πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα που μετατρέπονται στους κοινούς λεμφικούς προγόνους (CLPs) στο μυελό των οστών. Στη συνέχεια, μετακινούνται στο θύμο αδένα, όπου χάνουν την ικανότητα να διαφοροποιηθούν σε Β λεμφοκύτταρα. Σε αυτό το στάδιο λαμβάνουν χώρα διάφορα στάδια διαφοροποίησης και επιλογής (ανεξάρτητα από αντιγόνο), οδηγώντας στην παραγωγή ώριμων και λειτουργικών Τ λεμφοκυττάρων. Κατά τη διάρκεια κάθε σταδίου αυτής της διαδικασίας, η διάκριση προκύπτει από την έκφραση ειδικών επιφανειακών δεικτών (clusters of differentiation, CD) στα κύτταρα. Καθώς τα Τ λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται, εκφράζουν στην επιφάνειά τους ένα χαρακτηριστικό μόριο δέσμευσης αντιγόνου, γνωστό ως Τ κυτταρικό υποδοχέα (TcY). Αυτός ο υποδοχέας παρέχει στα ώριμα Τ λεμφοκύτταρα την ικανότητα να αναγνωρίζουν αντιγόνα που συνδέονται με πρωτεΐνες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων.

Υπάρχουν δύο κύριοι πληθυσμοί Τ λεμφοκυττάρων:

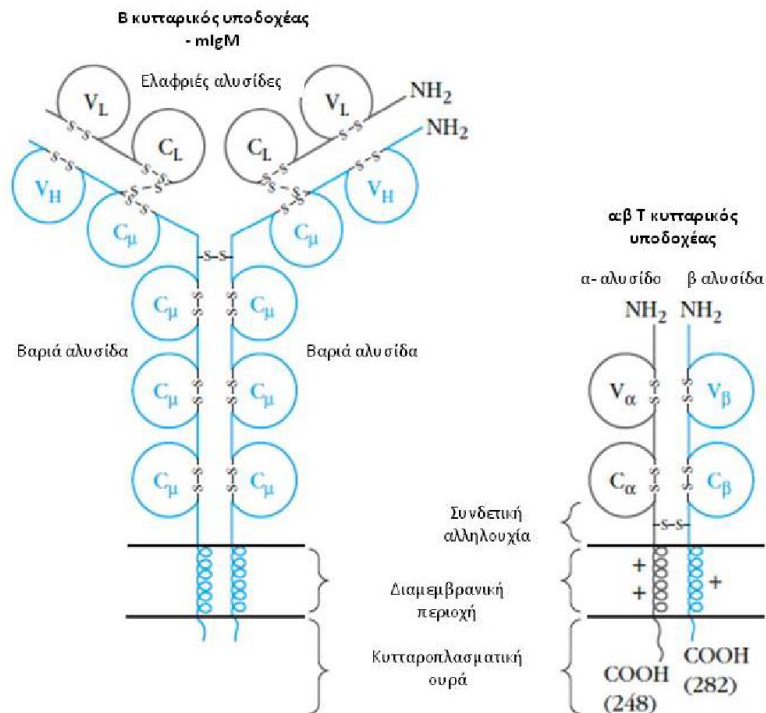
- ✓ Βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα (T helper cells - TH): Τ λεμφοκύτταρα που εκφράζουν στην επιφάνεια τους το δείκτη CD4 και αλληλεπιδρούν με αντιγόνα προσδεμένα με μόρια MHC τάξης II. Αυτή η σύνδεση οδηγεί στην περαιτέρω διαφοροποίησή τους προς εκτελεστικά κύτταρα, τα οποία εκκρίνουν πληθώρα κυτταροκινών. Αυτά τα μόρια κυτταροκινών ενεργοποιούν διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς (Β λεμφοκύτταρα, κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, κ.ά.) που συμμετέχουν στις άνοσες αποκρίσεις.
- ✓ Κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα (T cytotoxic cells - TC): εκφράζουν στην επιφάνειά τους το δείκτη CD8 και αλληλεπιδρούν με αντιγόνα που προσδέονται σε μόρια MHC τάξης I. Μετά τη σύνδεση με αντιγόνο, τα κύτταρα αυτά αναπτύσσουν κυτταροτοξική δράση (Kindt et al., 2007).

## 1.6 Τ κυτταρικός υποδοχέας

Η συμμετοχή των Τ λεμφοκυττάρων στο μηχανισμό της προσαρμοστικής ανοσίας βασίζεται στην ύπαρξη ενός αντιγονοειδικού υποδοχέα στην επιφάνεια αυτών των κυττάρων. Ο υποδοχέας αυτός ονομάζεται Τ κυτταρικός υποδοχέας (ΤκΥ) και διαμεσολαβεί σε όλα τα στάδια αναγνώρισης του αντιγόνου και στη διαφοροποίηση των Τ λεμφοκυττάρων σε εκτελεστικά κύτταρα κατά του εκάστοτε αντιγόνου.

## 1.7 Δομή του Τ κυτταρικού υποδοχέα

Οι ΤκΥ ανήκουν στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών και είναι πρωτεϊνικά ετεροδιμερή, τα οποία συνήθως αποτελούνται από αλυσίδες αβ και σπανιότερα από αλυσίδες γδ. Οι δύο αλυσίδες διαθέτουν ένα καρβοξυ-τελικό κυτταροπλασματικό άκρο μεγέθους 5-12 αμινοξέων. Πιο ανοδικά βρίσκεται μια διαμεμβρανική περιοχή πλούσια σε θετικά φορτισμένα αμινοξέα, με μήκος 21-22 αμινοξέα, η οποία αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του υποδοχέα στην πλασματική μεμβράνη των Τ λεμφοκυττάρων. Αυτή η διαμεμβρανική περιοχή είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση των υποδοχέων των Τ-λεμφοκυττάρων με τα μόρια συνυποδοχέων CD3 και εμπλέκεται στη μεταγωγή σήματος στο εσωτερικό του κυττάρου. Ακόμα πιο ανοδικά εντοπίζεται το εξωκυτταρικό τμήμα του ετεροδιμερούς, το οποίο αποτελείται από μια αλληλουχία αμινοξέων με υψηλό ποσοστό καταλοίπων κυστεΐνης σε κάθε αλυσίδα και μήκος 60-75 αμινοξέα. Η περιοχή αυτή περιέχει δύο τμήματα, τα οποία αναδιπλώνονται κατά μήκος κάθε αλυσίδας σχηματίζοντας δύο δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι συνδέουν ισχυρά τις δύο αλυσίδες. Εντός αυτής της περιοχής, το αμινοτελικό άκρο της κάθε αλυσίδας είναι ιδιαίτερα μεταβλητό ως προς την αλληλουχία του σε νουκλεοτιδικό και αμινοξικό επίπεδο και αναφέρεται ως μεταβλητή περιοχή (V - variable region). Το υπόλοιπο τμήμα είναι αρκετά συντηρημένο και αναφέρεται ως σταθερή περιοχή (C - constant region). Επιπλέον, η μεταβλητή περιοχή περιέχει τρία υπερμεταβλητά τμήματα, καθένα από τα οποία καθορίζει την ειδική πρόσδεση του υποδοχέα σε διάφορα αντιγόνα (CDR - complementarity determining regions 1, 2 και 3). Η β-αλυσίδα περιέχει μια επιπλέον υπερμεταβλητή περιοχή (CDR4), η οποία όμως δεν έρχεται σε επαφή με το αντιγόνο (**Εικόνα 2**) (Janeway et al., 2001 | Andersen et al., 2006 | Rudolph et al., 2006).



**Εικόνα 2.** Σχηματική απεικόνιση των B και T κυτταρικών υποδοχέων. Πηγή: Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. Kuby Immunology. *Kuby Immunol.* 2007;6:574.

### 1.8 B λεμφοκύτταρα

Ο μυελός των οστών είναι ένα από τα πιο σημαντικά λεμφικά όργανα (Carsetti, 2000). Το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών παρέχει ένα κατάλληλο υπόστρωμα που συμβάλλει στην ανάπτυξη των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (hematopoietic stem cells, HSCs). Όταν τα κύτταρα αυτά διαφοροποιούνται, εκφράζουν την κινάση τυροσίνης FLT3 και χάνουν την ικανότητα αυτοανανέωσης, αλλά παραμένουν ικανά να διαφοροποιούνται σε όλους τους τύπους των αιμοποιητικών κυττάρων. Σε αυτό το στάδιο ονομάζονται πολυδύναμα προγονικά κύτταρα (multipotent progenitors, MPPs) και έχουν την ικανότητα διαφοροποίησης σε κοινούς μυελικούς προγόνους (CMPs) και πρώιμα λεμφικά προγονικά κύτταρα (early lymphoid progenitors, ELPs). Στο μυελό των οστών, τα κύτταρα ELP διαφοροποιούνται περαιτέρω στους κοινούς λεμφικούς προγόνους (CLPs), οι οποίοι διαφοροποιούνται σε κύτταρα NK, T και B λεμφοκύτταρα καθώς και δένδριτικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (dendritic cells, DCs). Το επόμενο στάδιο της ανάπτυξης των B λεμφοκυττάρων είναι η ανάπτυξη του επιφανειακού υποδοχέα CD45 και της έκφρασης των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών Iga και VpreB. Ταυτόχρονα, ενεργοποιείται η διαδικασία του ανασυνδυασμού των γονιδίων της βαριάς αλυσίδας του μορίου της ανοσοσφαιρίνης. Τα κύτταρα σε αυτό το στάδιο ονομάζονται προ-προ-B λεμφοκύτταρα (pro-B cells).

Η έκφραση του υποδοχέα CD19 σηματοδοτεί την ολοκλήρωση του ανασυνδυασμού των γονιδίων της βαριάς αλυσίδας και συνδέεται με το στάδιο διαφοροποίησης των προ-B λεμφοκυττάρων (pre-B cells) (Zhang et al., 2004). Επιπλέον, τα προ-B λεμφοκύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα CD10, και παύουν να εκφράζουν τον υποδοχέα CD34 μαζί με το ένζυμο TdT. Στη συνέχεια, η βαριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης εκφράζεται στην επιφάνεια του κυττάρου, σε συνδυασμό με μια υποκατάστατη ελαφριά αλυσίδα (surrogate light chain, SLC). Η αλυσίδα αυτή αποτελείται από τις πρωτεΐνες λ5 και VpreB, αντιπροσωπεύει μια εναλλακτική μορφή ελαφριάς αλυσίδας και οδηγεί στη σωστή αναδίπλωση της βαριάς αλυσίδας (Clark et al., 2005). Το σύμπλοκο βαριάς αλυσίδας – υποκατάστατης ελαφριάς αλυσίδας σταθεροποιείται περαιτέρω από τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες Igα και Igβ (Martensson et al., 2007).

### **1.9 Διαφοροποίηση ανεξάρτητη από αντιγόνο**

Όπως αναφέρθηκε, η διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων είναι στενά συνδεδεμένη με τον ανασυνδυασμό των γονιδίων που κωδικοποιούν τις βαριές και ελαφριές αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών, οι οποίες συνθέτουν τους υποδοχείς των B λεμφοκυττάρων (BκΥ). Αυτή η διαδικασία θεωρείται τυχαία και έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός μοναδικού BκΥ για κάθε B λεμφοκύτταρο. Ως αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας προκύπτουν τα ανώριμα B λεμφοκύτταρα, τα οποία χαρακτηρίζονται από την έκφραση ανοσοσφαιρινών με ισότυπο IgM στην επιφάνειά τους (Nowosad et al., 2016).

Η κεντρική ανοχή, η οποία λαμβάνει χώρα στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, είναι μια κρίσιμη διαδικασία που βοηθά στην πρόληψη της αυτοανοσίας. Τα ανώριμα B λεμφοκύτταρα υφίστανται αυστηρή επιλογή μέσω του ελέγχου του επιφανειακού BκΥ τους. Τα B λεμφοκύτταρα που αναγνωρίζουν αυτοαντιγόνα με υψηλή συγγένεια υπόκεινται σε μηχανισμούς αρνητικής επιλογής, όπως η κλωνική εξάλειψη ή η αναδιάταξη των BκΥ τους. Η κλωνική εξάλειψη οδηγεί σε απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) των αυτοαντιδραστικών κυττάρων, ενώ η ρύθμιση των BκΥ παρέχει στα B λεμφοκύτταρα μια δεύτερη ευκαιρία να αναδιατάξουν ξανά τα γονίδια των ανοσοσφαιρινών τους και να παράξουν ένα μη-αντιδραστικό BκΥ (Peland et al., 2022).

Εάν αυτή η διαδικασία επιλογής αποτύχει, τα αυτοαντιδραστικά B λεμφοκύτταρα μπορεί να διαφύγουν της κλωνικής εξάλειψης και να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος, όπου μπορούν να ενεργοποιηθούν και να διαφοροποιηθούν σε πλασματοκύτταρα που παράγουν αυτοαντισώματα. Αυτή η διαδικασία μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η



σκληρυνση κατά πλάκας (Trembl et al., 2008). Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα αυτοαντιδραστικά B λεμφοκύτταρα καταφέρνουν να ξεφύγουν από τον έλεγχο της ανοσολογικής ανοχής δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Γενικά, θεωρείται ότι εμπλέκονται κάποιοι γενετικοί παράγοντες, όπως πολυμορφισμοί σε γονίδια που ρυθμίζουν την ανοσολογική ανοχή, καθώς και περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως λοιμώξεις ή χρόνιες φλεγμονές (Nowosad et al., 2016).

Από την άλλη, τα B λεμφοκύτταρα που δεν αναγνωρίζουν αυτοαντιγόνα επιλέγονται θετικά. Αυτά τα κύτταρα στη συνέχεια ωριμάζουν περαιτέρω, εκφράζοντας ανοσοσφαιρίνες με ισότυπο IgD στην επιφάνειά τους και μεταναστεύουν στα περιφερικά λεμφικά όργανα, όπου ολοκληρώνουν την ωρίμανσή τους (Nowosad et al., 2016).

### **1.10 Διαφοροποίηση εξαρτώμενη από αντιγόνο**

Η αναγνώριση αντιγόνου από τα ανώριμα B λεμφοκύτταρα είναι μια κρίσιμη διαδικασία για την ανοσολογική απόκριση. Αρχικά, τα κύτταρα εκφράζουν ένα BκΥ που έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει ένα μεγάλο εύρος αντιγόνων με χαμηλή συγγένεια. Όταν το ανώριμο B λεμφοκύτταρο έρχεται σε επαφή με ένα αντιγόνο, το δεσμεύει μέσω του BκΥ του και ενεργοποιείται. Στη συνέχεια, τα ενεργοποιημένα B λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν στα βλαστικά κέντρα των δευτερογενών λεμφικών οργάνων, όπως οι λεμφαδένες. Εκεί, τα B λεμφοκύτταρα υφίστανται μια διαδικασία που είναι υπεύθυνη για την εισαγωγή μεταλλάξεων με αυξημένο ρυθμό στα ανασυνδυασμένα γονίδια των ανοσοσφαιρινών (immunoglobulins, IG). Αυτές οι μεταλλάξεις στοχεύουν στην αύξηση της συγγένειας του BκΥ για το συγκεκριμένο αντιγόνο. Τα B λεμφοκύτταρα που εκφράζουν BκΥ με αυξημένη συγγένεια για το συγκεκριμένο αντιγόνο επιλέγονται για περαιτέρω ανάπτυξη και διαφοροποίηση. Τα υπόλοιπα, που επέδειξαν χαμηλή συγγένεια ή χαρακτηριστικά αυτοανοσίας, υπόκεινται στη διαδικασία της απόπτωσης (Peland et al., 2022).

Τελικά, τα B λεμφοκύτταρα που επιλέγονται διαφοροποιούνται είτε σε πλασματοκύτταρα, τα οποία παράγουν εξειδικευμένα αντισώματα, είτε σε B λεμφοκύτταρα μνήμης, τα οποία παραμένουν στον οργανισμό για μεγάλο χρονικό διάστημα. Τα B λεμφοκύτταρα μνήμης εξασφαλίζουν ταχεία και αποτελεσματική απόκριση σε μελλοντική επαφή με το ίδιο αντιγόνο, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην ανοσολογική μνήμη του οργανισμού.

Συνολικά, αυτή η σειρά διεργασιών στα βλαστικά κέντρα επιτρέπει τη δημιουργία ώριμων, εξειδικευμένων και μη-αυτοαντιδραστικών B λεμφοκυττάρων που έχουν την ικανότητα να αντιμετωπίζουν αποτελεσματικά τους παθογόνους μικροοργανισμούς, προσφέροντας μακροχρόνια προστασία στον οργανισμό (Nowosad et al., 2016).

Τα ώριμα B λεμφοκύτταρα εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και διακρίνονται από τα ανώριμα B λεμφοκύτταρα με βάση μια σειρά διακριτά χαρακτηριστικά. Εν συντομία, τα B λεμφοκύτταρα μνήμης:

- (i) έχουν αυξημένη διάρκεια ζωής,
- (ii) εντοπίζονται κυρίως σε ανατομικές περιοχές όπου είναι πιο συχνή η παρουσία αντιγόνων,
- (iii) εμφανίζουν διαφορική έκφραση παραγόντων κυτταρικής ηρεμίας και αντιανοποπρωτεϊνικών μορίων, καθώς και μεταφορέων σήματος,
- (iv) είναι ικανά, κατά την επανενεργοποίηση, να πολλαπλασιάζονται και να διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν ταχέως μεγάλες ποσότητες αντισωμάτων, παρέχοντας έτσι αποτελεσματικότερη ανοσολογική απόκριση,
- (v) μπορούν να επανεισέλθουν στο μικροπεριβάλλον του βλαστικού κέντρου (germinal center, GC) και να υποβληθούν σε περαιτέρω ωρίμανση συγγένειας προκειμένου να βελτιωθεί ακόμα περισσότερο η ειδικότητα δέσμευσης του αντιγόνου. Σε μοριακό επίπεδο, η ωρίμανση συγγένειας καθορίζεται από δύο ανεξάρτητες αλλά μηχανιστικά σχετιζόμενες διαδικασίες που επηρεάζουν τον κλωνοτυπικό BκΥ, δηλαδή τη σωματική υπερμεταλλαξιγένεση (SYM) και εναλλαγή ισοτύπου (EI) (Kurosaki et al., 2010 | Seifert & Kuppers, 2016).

Η SYM είναι ένας πολύ ειδικός μηχανισμός που αφορά στην εισαγωγή κυρίως σημειακών νουκλεοτιδικών αλλαγών στα ανασυνδυασμένα γονίδια των ανοσοσφαιρινών του BκΥ με ρυθμό που υπερβαίνει κατά πολύ το ρυθμό εισαγωγής μεταλλάξεων σε άλλες περιοχές του γονιδιώματος. Οι μεταλλάξεις της SYM δε συμβαίνουν τυχαία, αλλά αντίθετα τείνουν να συγκεντρώνονται εντός των περιοχών που σχηματίζουν τη θέση δέσμευσης του αντιγόνου, δηλαδή τις περιοχές καθορισμού της συμπληρωματικότητας (CDRs), εμπλουτισμένες για συγκεκριμένα νουκλεοτιδικά μοτίβα που χρησιμεύουν ως hotspots. Εντός του GC, ένα B λεμφοκύτταρο παράγει B λεμφοκύτταρα που εκφράζουν διαφορετικές παραλλαγές της ανοσοσφαιρίνης του BκΥ, οι οποίες εμφανίζουν διαφορετικές συγγένειες για το δεδομένο αντιγόνο. Μερικοί από τους συνδυασμούς μεταλλάξεων θα οδηγήσουν σε υψηλότερη συγγένεια για το αντιγόνο και τα B λεμφοκύτταρα που εκφράζουν αυτούς τους BκΥ θα επιλεγούν για ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό (Maul et al., 2010 | Peled et al., 2008). Η

ΣΥΜ στοχεύει όχι μόνο στα ανασυνδυασμένα γονίδια των ανοσοσφαιρινών (IG) αλλά και ορισμένα γονίδια εκτός στόχου, αν και με χαμηλότερη συχνότητα, συμπεριλαμβανομένου του γονιδίου *BCL6* και οποιασδήποτε άλλης αλληλουχίας εισαχθεί καθοδικά του υποκινητή των γονιδίων *IGHV* (Migliazza et al., 1995).

Η CSR είναι ο δεύτερος μηχανισμός που συμμετέχει στην ωρίμανση συγγένειας εντός του GC και είναι υπεύθυνος για την αλλαγή του ισοτύπου του BκY IG. Υπάρχουν πέντε διαφορετικοί ισοτύποι, δηλαδή οι IgM, IgG, IgA, IgE και IgD. Τα ανώριμα B λεμφοκύτταρα εκφράζουν τους ισοτύπους IgM και/ή IgD, ενώ μετά την αναγνώριση αντιγόνου τα B λεμφοκύτταρα μπορούν να εκφράσουν τους ισοτύπους IgG, IgA ή IgE. Η CSR αλλάζει τη σταθερή περιοχή της βαριάς αλυσίδας της BcR IG χωρίς καμία επίδραση στη μεταβλητή περιοχή, οδηγώντας στην έκφραση ενός μορίου BκY με υψηλή συγγένεια για το ίδιο αντιγόνο αλλά διαφορετικές εκτελεστικές λειτουργίες (Xu et al., 2012).

Σε σπάνιες περιπτώσεις, τα B λεμφοκύτταρα μνήμης στερούνται των επιδράσεων της ΣΥΜ στο BcR IG. Μια πιθανή εξήγηση για αυτό το φαινόμενο θα μπορούσε να είναι ότι αυτά τα κύτταρα προέρχονται από πρώιμα B λεμφοκύτταρα του GC πριν από την έναρξη της διαδικασίας της ΣΥΜ (Seifert & Kuppers, 2016). Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι η ενεργοποίηση των B λεμφοκυττάρων και η επακόλουθη γενιά των B λεμφοκυττάρων μνήμης μπορεί να προκύψει εκτός του μικροπεριβάλλοντος του GC (Takemori et al., 2014). Πράγματι, έχει περιγραφεί μια ανεξάρτητη από GC αλλά εξαρτώμενη από τα T λεμφοκύτταρα οδός για το σχηματισμό B λεμφοκυττάρων μνήμης, η οποία παράγει κύτταρα μνήμης με περιορισμένη ή καθόλου ΣΥΜ. Τέλος, ανάλογα με τον τύπο του αντιγόνου, το μικροπεριβάλλον όπου λαμβάνει χώρα η αναγνώριση του αντιγόνου και το συγκεκριμένο περιβάλλον κυτταροκινών, τα B λεμφοκύτταρα μπορούν ακόμη και να υποβληθούν σε ΣΥΜ ή και CSR εκτός του GC, αν και η έκταση του συγκεκριμένου φαινομένου είναι περιορισμένη (Seifert & Kuppers, 2009). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα B λεμφοκυττάρων που λειτουργούν εκτός του GC αφορά τον πληθυσμό των B λεμφοκυττάρων της οριακής ζώνης (marginal zone, MZ). Τα MZ B λεμφοκύτταρα παρέχουν μια προστασία πρώτης γραμμής έναντι παθογόνων που μεταδίδονται με το αίμα και ανταποκρίνονται γρήγορα στα ενθυλακωμένα βακτήρια μέσω της διαφοροποίησής τους σε ειδικά πλασματοκύτταρα. Επιπλέον, είναι υπεύθυνα για τις δραστηριότητες «καθαριότητας», καθώς αναγνωρίζουν και απομακρύνουν τα γηρασμένα κύτταρα και άλλα κυτταρικά υπολείμματα. Προκειμένου να εξυπηρετήσουν αυτές τις λειτουργίες, τα MZ B λεμφοκύτταρα εκφράζουν ένα διακριτό και περιορισμένο ρεπερτόριο γονιδίων του BcR IG. Αξίζει να σημειωθεί ότι τουλάχιστον ένα κλάσμα των MZ B λεμφοκυττάρων, ιδιαίτερα στο σπλήνα, φέρουν πρότυπα ΣΥΜ τόσο στα γονίδια BcR IG όσο

και στο γονίδιο *BCL6*, επισημαίνοντας έναν ενεργό μηχανισμό ΣΥΜ (Weill et al., 2009). Επιπλέον, τα σπληνικά MZ B λεμφοκύτταρα μοιράζονται φαινοτυπικές ομοιότητες με τα B λεμφοκύτταρα μνήμης και εμφανίζουν ενισχυμένο δυναμικό ανοσολογικής απόκρισης. Αυτές οι ομοιότητες οδήγησαν στην υπόθεση ότι τα σπληνικά MZ B λεμφοκύτταρα είναι είτε μετα-GC προέλευσης, είτε προέρχονται από μια ανεξάρτητη οδό διαφοροποίησης (Pillai et al., 2005).

## **Κεφάλαιο 2: Γενετική οργάνωση των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών**

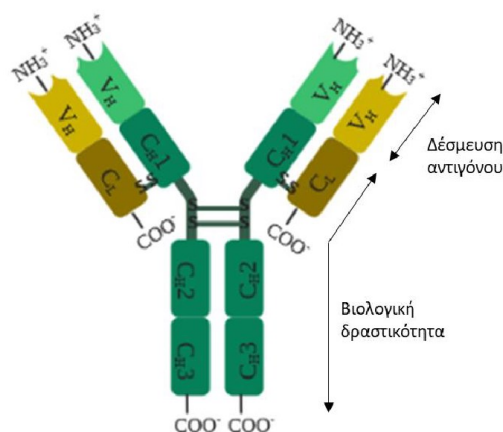
### **2.1 Γενικά**

Τα αντισώματα ή ανοσοσφαιρίνες είναι γλυκοπρωτεΐνες που συναντώνται είτε ως μέρος του BκΥ στην επιφάνεια των B λεμφοκυττάρων, είτε ως εκκρινόμενα από τα πλασματοκύτταρα μόρια. Τα διαλυτά αντισώματα μεσολαβούν στη χυμική άνοση απόκριση, ενώ οι ανοσοσφαιρίνες του BκΥ επάγουν τον κλωνικό πολλαπλασιασμό των B λεμφοκυττάρων, αφού συνδεθούν με το κατάλληλο αντιγόνο. Τα αντισώματα συμβάλλουν στην ανοσία με τρεις κύριους τρόπους. Πρώτον, συμμετέχουν στην εξουδετέρωση των παθογόνων μικροοργανισμών και των τοξινών. Δεύτερον, επιτελούν τη διαδικασία της οψωνινοποίησης, δηλαδή της κάλυψης της επιφάνειας ενός παθογόνου μικροοργανισμού με σκοπό την ενίσχυση της φαγοκυττάρωσής του. Τρίτον, ενεργοποιούν το σύστημα του συμπληρώματος, μιας ομάδας πρωτεϊνών στο πλάσμα του αίματος που σχετίζονται με την ανοσία και την άμυνα του οργανισμού.

Η διαδικασία της παραγωγής αντισωμάτων ενεργοποιείται από την αλληλεπίδραση μεταξύ αντιγόνων και του BκΥ. Στη συνέχεια, εκκινά από τον BκΥ ένα σήμα, το οποίο καθοδηγεί την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων που προωθούν τη σύνθεση αντισωμάτων. Αυτά τα αντισώματα είναι εξαιρετικά ειδικά για το αντιγόνο που διέγειρε αρχικά το B λεμφοκύτταρο. Επομένως, μέσω της ανάπτυξης B λεμφοκυττάρων μνήμης, το ανοσοποιητικό σύστημα αποκτά μνήμη για τα αντιγόνα που προκάλεσαν μια προηγούμενη αντίδραση. Τα κύτταρα μνήμης είναι ενδιάμεσα, διαφοροποιημένα B κύτταρα που μπορούν να μετατραπούν γρήγορα σε πλασματοκύτταρα, ενώ τα αντισώματα που παράγονται αναγνωρίζουν τα αντιγόνα στα υγρά των ιστών και στον ορό (Goding, 1978).

## 2.2. Βασική δομή και λειτουργία των ανοσοσφαιρινών

Τα αντισώματα ή ανοσοσφαιρίνες αποτελούνται από δύο πανομοιότυπες βαριές αλυσίδες και δύο πανομοιότυπες ελαφριές αλυσίδες σε διάταξη δομής ελαφριά-βαριά-βαριά-ελαφριά (**Εικόνα 3**). Οι σταθερές περιοχές (Fc) των βαριών αλυσίδων διαφέρουν μεταξύ των διαφορετικών ισοτύπων. Επιπλέον, τα αντισώματα περιέχουν μια περιοχή Fab στην οποία εντοπίζονται οι περιοχές συμπληρωματικότητας (CDR), οι οποίες αποτελούν τις θέσεις δέσμευσης του αντιγόνου. Υπάρχουν τρεις CDR στις μεταβλητές περιοχές (V) κάθε ελαφριάς βυάκρο κάθε μονομερούς μορίου ανοσοσφαιρίνης. Όλα τα αντισώματα επιδεικνύουν μία ή περισσότερες λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης του συστήματος συμπληρώματος, της οψωνινοποίησης των παθογόνων μικροοργανισμών, της πρόληψης της προσκόλλησης των μικροβίων στις επιφάνειες του βλεννογόνου και της εξουδετέρωσης τοξινών και ιών (Burton, 1990).



**Εικόνα 3.** Δομή της ανοσοσφαιρίνης, που αποτελεί ένα διμερές βαριών και ελαφριών αλυσίδων.

## 2.3 Ισότυποι Ανοσοσφαιρινών

### 2.3.1 Ανοσοσφαιρίνη ισοτύπου IgM

Η ανοσοσφαιρίνη ισοτύπου IgM έχει μοριακό βάρος 970 Kd και μέση συγκέντρωση ορού 1,5 mg/ml. Παράγεται κυρίως στο πλαίσιο της πρωτογενούς ανοσοαπόκρισης σε λοιμογόνους παράγοντες ή αντιγόνα. Στην πενταμερή μορφή τους, οι ανοσοσφαιρίνες IgM ενεργοποιούν την κλασική οδό του συμπληρώματος. Ο ισότυπος IgM θεωρείται ότι έχει ιδιότητες ισχυρής συγκολλητίνης (π.χ. αντι-A και αντι-B ισοσυγκολλητίνη που υπάρχει στον τύπο B και τον τύπο A του αίματος, αντίστοιχα), ενώ το μονομερές της ανοσοσφαιρίνης IgM συναντάται ως BκΥ (έκφραση στην επιφάνεια των B λεμφοκυττάρων) (Plomp et al., 2015).

### **2.3.2 Ανοσοσφαιρίνη ισοτύπου IgG**

Ο ισοτύπος IgG είναι ένα μονομερές με μοριακό βάρος 146 Kd και συγκέντρωση ορού 9,0 mg/mL. Ο συγκεκριμένος ισοτύπος συντίθεται κυρίως στο πλαίσιο δευτερογενούς ανοσοαπόκρισης σε παθογόνα, μπορεί να ενεργοποιήσει την κλασική οδό του συμπληρώματος και ο ρόλος του θεωρείται εξαιρετικά προστατευτικός. Οι τέσσερις υποκατηγορίες του ισοτύπου IgG περιλαμβάνουν τους IgG1, IgG2, IgG3 και IgG4. Ο IgG1 αφορά περίπου στο 65% του συνόλου των ανοσοσφαιρινών IgG. Συγκεκριμένα, ο ισοτύπος IgG2 καθορίζει μια σημαντική άμυνα του ξενιστή έναντι των ενθυλακωμένων βακτηρίων. Ο ισοτύπος IgG είναι η μόνη κατηγορία ανοσοσφαιρινικών που διασχίζουν τον πλακούντα, καθώς η σταθερή περιοχή του συγκεκριμένου ισοτύπου συνδέεται με τους υποδοχείς που υπάρχουν στην επιφάνειά του, προστατεύοντας με αυτό τον τρόπο το νεογνό από μολυσματικές ασθένειες (Palmeira, 2012). Επομένως, ο ισοτύπος IgG είναι ο πιο άφθονος στα νεογνά (Justiz Vaillant et al., 2024).

### **2.3.3 Ανοσοσφαιρίνη ισοτύπου IgA**

Ο ισοτύπος IgA εμφανίζεται σε 2 διαφορετικές μοριακές δομές: ως μονομερές και ως διμερές (εκκρινόμενη). Ο ισοτύπος IgA του ορού έχει μοριακό βάρος 160 Kd και συγκέντρωση 3 mg/mL. Η εκκρινόμενη IgA (sIgA) έχει μοριακό βάρος 385 Kd και μέση συγκέντρωση ορού 0,05 mg/mL. Οι ανοσοσφαιρίνες IgA είναι οι πιο συχνές στις εκκρίσεις που βρίσκονται στο σάλιο, τα δάκρυα, το πρωτόγαλα, το εντερικό και το αναπαραγωγικό σύστημα, καθώς και τις αναπνευστικές εκκρίσεις.

Ο ισοτύπος IgA εμφανίζεται στους βλεννογόνους ως διμερές και προστατεύει τις επιθηλιακές επιφάνειες του πεπτικού, του αναπνευστικού και του ουρογεννητικού συστήματος. Οι ανοσοσφαιρίνες IgA διαθέτουν ένα εκκριτικό συστατικό που εμποδίζει την ενζυματική πέψη του. Ενεργοποιεί την εναλλακτική οδό ενεργοποίησης του συμπληρώματος (Porreelaars et al., 2021).

### **2.3.4 Ανοσοσφαιρίνη ισοτύπου IgE**

Οι ανοσοσφαιρίνες IgE συναντώνται ως μονομερή. Έχουν μοριακό βάρος 188 Kd και συγκέντρωση ορού 0,00005 mg/mL. Προστατεύουν από τα παράσιτα και συνδέονται με υποδοχείς υψηλής συγγένειας στα μαστοκύτταρα και τα βασεόφιλα, προκαλώντας σε κάποιες περιπτώσεις αλλεργικές αντιδράσεις (Maurer et al., 2018 | Mukai et al., 2021). Οι ανοσοσφαιρίνες IgE θεωρούνται η πιο σημαντική άμυνα του ξενιστή έναντι διαφόρων παρασιτικών λοιμώξεων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων από τα *Strongyloides stercoralis*,

*Trichinella spiralis*, *Ascaris lumbricoides* και των αγκυλόστομων *Necator americanus* και *Ancylostoma duodenale* (Justiz Vaillant et al., 2024).

### **2.3.5 Ανοσοσφαιρίνη ισοτύπου IgD**

Οι ανοσοσφαιρίνες IgD είναι μονομερή με μοριακό βάρος 184 Kd. Εντοπίζονται σε μικρή ποσότητα στον ορό (0,03 mg/mL) και έχουν άγνωστη δράση έναντι των παθογόνων. Επιπλέον, οι συγκεκριμένες ανοσοσφαιρίνες συναντώνται αρκετά συχνά στη μορφή του BκΥ (Gutzeit et al., 2018). Οι ανοσοσφαιρίνες IgD παίζουν ουσιαστικό ρόλο στη διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων που προκαλείται από αντιγόνο (Goding, 1978).

### **2.4 Αλληλεπιδράσεις ανοσοσφαιρινών με κυτταρικούς υποδοχείς**

Οι ανοσοσφαιρίνες αλληλεπιδρούν με ειδικούς υποδοχείς σε διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς με σκοπό να εκπληρώσουν διάφορες βιολογικές λειτουργίες. Οι υποδοχείς αυτοί εκφράζονται κυρίως σε μονοπύρρηνα κύτταρα, ιστιοκύτταρα, ουδετερόφιλα, κύτταρα φυσικοί φονείς και ηωσινόφιλα. Η σύνδεση μεταξύ ανοσοσφαιρινών και των σχετικών υποδοχέων προωθεί διάφορες δραστηριότητες, συμπεριλαμβανομένης της φαγοκυττάρωσης βακτηρίων (οψωνινοποίηση), της αποκοκκίωσης μαστοκυττάρων (όπως φαίνεται στην υπερευαισθησία τύπου I ή στην αλλεργική απόκριση), της θανάτωσης κακοήθων κυττάρων και της ενεργοποίησης κυττάρων που παρουσιάζουν αντιγόνο συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων και των δενδριτικών κυττάρων (Engels & Walz, 2018).

### **2.5 Γενετικοί τύποι των ανοσοσφαιρινών**

Το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να ανταποκριθεί σε πλήθος διαφορετικών αντιγόνων μέσω της παραγωγής ανοσοσφαιρινών με διαφορετικές ιδιότητες αναγνώρισης. Οι μηχανισμοί που συμβάλλουν στην τεράστια ποικιλία των ειδικοτήτων των ανοσοσφαιρινών περιλαμβάνουν την παρουσία πολλαπλών γονιδίων της περιοχής V στη βλαστική σειρά (ποικιλότητα αντισωμάτων που προκύπτει από τον ανασυνδυασμό αυτών των γονιδίων) καθώς και τις διαδικασίες ΣΥΜ και ΕΙ που προαναφέρθηκαν.

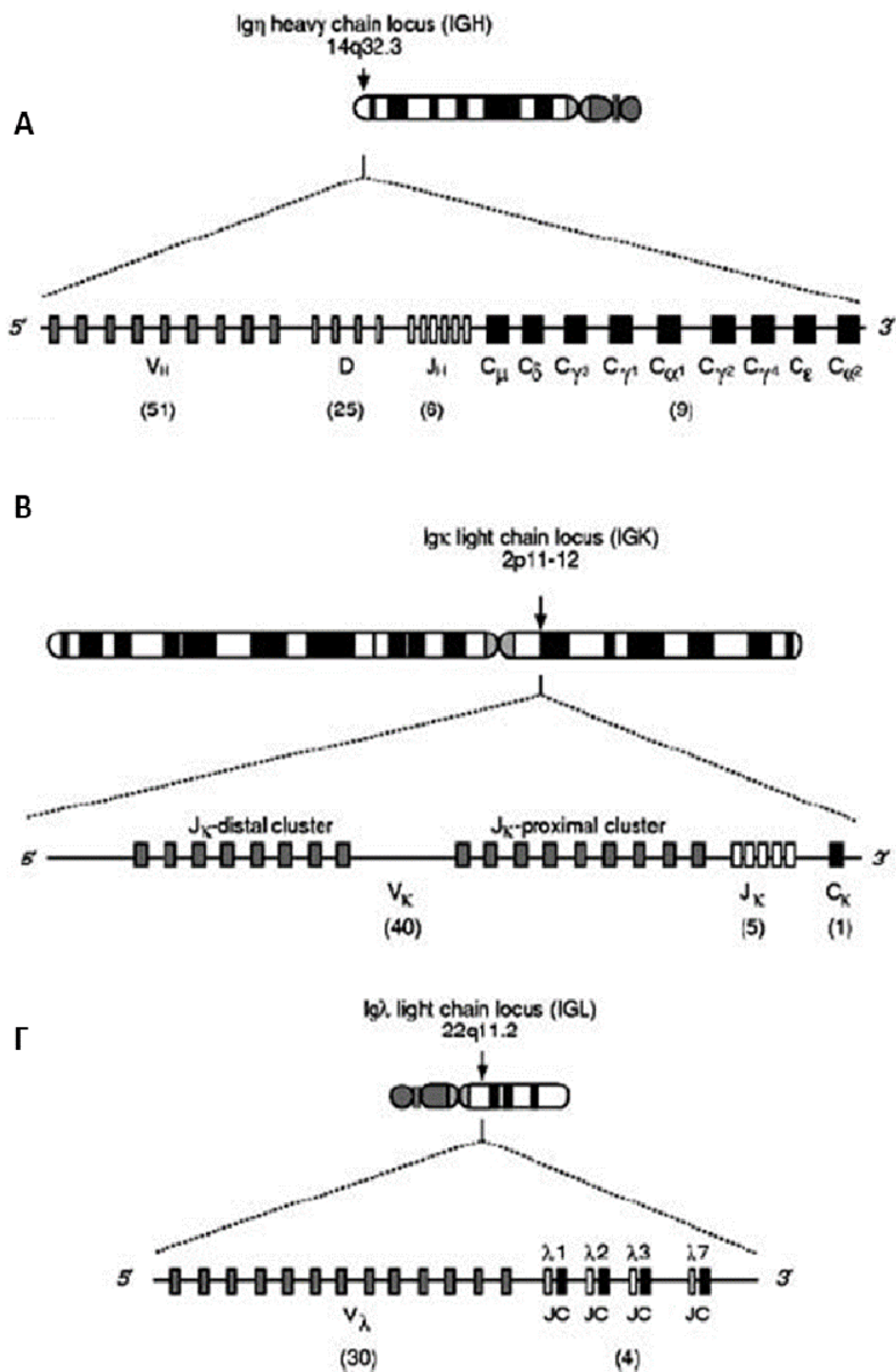
Όσον αφορά στο γενετική οργάνωση των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών, υπάρχουν δύο ομάδες γονιδίων που κωδικοποιούν τις ελαφριές αλυσίδες της ανοσοσφαιρίνης, τα γονίδια V (variable) και J (joining). Τα παραπάνω γονίδια, μαζί με τα γονίδια D (diversity), κωδικοποιούν τις βαριές αλυσίδες (**Εικόνα 4**). Ο ανασυνδυασμός των γονιδίων, οι ανασυνδυαστικές ανακρίβειες, η προσθήκη/αφαίρεση νουκλεοτιδίων στις θέσεις του ανασυνδυασμού, καθώς και οι

διαφορετικοί συνδυασμοί βαριών και ελαφριών αλυσίδων συμβάλλουν σημαντικά στην ποικιλομορφία των μορίων ανοσοσφαιρίνης (Wienand et al., 2019 | Lewis et al., 2005).

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα, ο γενετικός τόπος των γονιδίων της βαριάς αλυσίδας IgH βρίσκεται στο χρωμόσωμα 14 (Haas & Tommaso, 1988). Όσον αφορά στην ελαφριά αλυσίδα, υπάρχουν δύο ισότυποι που ονομάζονται κάππα (κ) και λάμδα (λ). Ένα δεδομένο μόριο ανοσοσφαιρίνης διαθέτει είτε κ είτε λ αλυσίδες, ποτέ μία από τον κάθε ισότυπο. Οι αντίστοιχοι γενετικοί τόποι της κ και λ ελαφριάς αλυσίδας εντοπίζονται στα χρωμοσώματα 2 και 22, αντίστοιχα. Δεν έχει βρεθεί λειτουργική διαφορά μεταξύ αντισωμάτων που έχουν ελαφριές αλυσίδες κ ή λ. Επιπλέον, οποιοσδήποτε τύπος ελαφριάς αλυσίδας μπορεί να εκφραστεί σε αντισώματα οποιασδήποτε από τις πέντε κύριες κατηγορίες ισότυπου της βαριάς αλυσίδας.

Η αναλογία των δύο ισότυπων ελαφριάς αλυσίδας ποικίλλει ανάλογα με το είδος του οργανισμού. Η μέση αναλογία κ προς λ είναι 20:1 στον ποντικό, ενώ στον άνθρωπο η αναλογία είναι 2:1 και στα βοοειδή είναι 1:20, αντίστοιχα. Οι σημαντικές διαφορές σε σχέση με αυτές τις δεδομένες αναλογίες μπορεί σε κάποιες περιπτώσεις να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση ενός κλώνου Β λεμφοκυττάρων. Σε αυτή την περίπτωση, όλα τα κύτταρα του εκπτυγμένου κλώνου (μεγάλος αριθμός πανομοιότυπων κυττάρων) θα εκφράζουν την ίδια ελαφριά αλυσίδα και αυτό το γεγονός αναμένεται να διαταράξει την αναμενόμενη αναλογία ελαφριών αλυσίδων σε ένα δεδομένο οργανισμό (Haas & Tommaso, 1988).





**Εικόνα 4.** Οργάνωση των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών της βαριάς και των ελαφριών αλυσίδων στον άνθρωπο: (Α) γονίδια της βαριάς αλυσίδας, (Β) γονίδια της κ ελαφριάς αλυσίδας, (Γ) γονίδια της λ ελαφριάς αλυσίδας (Tomlinson M. Ian, Encyclopedia of Immunology - Second Edition, 1998).

## 2.6 Γονιδιακός ανασυνδυασμός VDJ

Ο ανασυνδυασμός των γονιδίων V(D)J είναι μία κρίσιμη διαδικασία που μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία μιας εκτεταμένης ποικιλομορφίας των αντισωμάτων και των BκΥ IG, επιτρέποντας την αναγνώριση ενός σχεδόν απεριόριστου αριθμού αντιγόνων. Σε κυτταρικό επίπεδο, η διαδικασία πραγματοποιείται αποκλειστικά στα αναπτυσσόμενα B λεμφοκύτταρα. Αυτή η διαδικασία λαμβάνει χώρα πριν από την έκθεση σε αντιγόνο και είναι θεμελιώδους σημασίας για τη δημιουργία ενός ποικίλου ρεπερτορίου ανοσοσφαιρινών του BκΥ.

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις ανοσοσφαιρίνες οργανώνονται σε τρεις ομάδες: τα V (variable), D (diversity) και J (joining). Τα γονίδια V και J ανασυνδυάζονται για το σχηματισμό των ελαφριών αλυσίδων, ενώ για τις βαριές αλυσίδες εμπλέκονται γονίδια από τις ομάδες V, D και J. Κάθε κατηγορία περιλαμβάνει πολλαπλά γονίδια, και η τυχαία επιλογή ενός γονιδίου από κάθε κατηγορία αποτελεί το θεμέλιο της πρόκλησης ποικιλομορφίας στο ρεπερτόριο των ανοσοσφαιρινών. Αυτή η συνδυαστική ποικιλότητα ενισχύεται και από τη δυνατότητα παραγωγής διαφορετικών συνδυασμών βαριών και ελαφριών αλυσίδων ανοσοσφαιρίνης. Μάλιστα, η συνολική ποικιλομορφία ενισχύεται ακόμα περισσότερο μέσω της εισαγωγής ή διαγραφής νουκλεοτιδίων στις περιοχές των γονιδιακών συνδέσεων V-D και D-J. Αυτή η διαδικασία επιτυγχάνεται μέσω του ενζύμου TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase), το οποίο εισάγει τυχαία νουκλεοτίδια χωρίς την ανάγκη χρήσης εκμαγείου.

Μέσω αυτών των μηχανισμών, κάθε B λεμφοκύτταρο μπορεί να αποκτήσει μια μοναδική αλληλουχία που κωδικοποιεί το μεταβλητό τμήμα της ανοσοσφαιρίνης. Η διαδικασία του ανασυνδυασμού V(D)J ρυθμίζεται αυστηρά ώστε να διασφαλίζεται η έκφραση ενός μοναδικού μορίου IG από κάθε B λεμφοκύτταρο μέσω του μηχανισμού της αλληλικής εξαιρέσης (allelic exclusion). Η ακριβής ολοκλήρωση του ανασυνδυασμού είναι απαραίτητη για την αποφυγή γενετικών βλαβών που μπορεί να οδηγήσουν σε παθολογίες, όπως ο καρκίνος. Συνολικά, ο μηχανισμός αυτός αποτελεί τη βάση για την εξειδίκευση και την προσαρμοστικότητα του ανοσοποιητικού συστήματος, επιτρέποντας την παραγωγή εκατομμυρίων διαφορετικών αντισωμάτων και την αποτελεσματική αναγνώριση παθογόνων (Chi et al., 2020).

### 2.6.1 Μηχανισμός του ανασυνδυασμού V(D)J

Τα γονίδια των ανοσοσφαιρινών του BκΥ περιβάλλονται από συντηρημένες αλληλουχίες σήματος ανασυνδυασμού ή RSSs (recombination signal sequences). Οι RSSs αποτελούνται από μια συντηρημένη παλίνδρομη επταμερή αλληλουχία και μια εννιαμερή αλληλουχία πλούσια σε AT, διαχωρισμένες από μη συντηρημένες αλληλουχίες μήκους 12 ή 23 βάσεων. Ο ανασυνδυασμός V(D)J συμβαίνει μόνο μεταξύ δύο γονιδίων που περιβάλλονται από μη

συντηρημένες αλληλουχίες με διαφορετικό μήκος, δηλαδή είτε 12 βάσεων (12RSS) είτε 23 βάσεων (23RSS). Ο κανόνας αυτός είναι γνωστός ως κανόνας 12/23 και τον ανασυνδυασμό μεταξύ γονιδίων της ίδιας κατηγορίας (π.χ. μεταξύ δύο γονιδίων V), ενώ παράλληλα εξασφαλίζει τον ανασυνδυασμό των γονιδίων D πάντα ενδιάμεσα των γονιδίων V και J κατά το σχηματισμό της βαριάς αλυσίδας (Malu et al., 2012).

Ο ανασυνδυασμός V(D)J απαιτεί τη δράση δύο ειδικών για τα B λεμφοκύτταρα πρωτεϊνών, τις RAG1 και RAG2, οι οποίες αποτελούνται από 1040 και 527 αμινοξέα, αντίστοιχα. Η δράση τους βασίζεται στην ικανότητά τους να προκαλούν τη διάσπαση του DNA σε θέσεις με ειδική αλληλουχία. Οι δύο πρωτεΐνες RAG περιέχουν πολλαπλούς τομείς που αποτελούνται από βασικές και μη βασικές περιοχές. Οι βασικές περιοχές της RAG1 είναι υπεύθυνες για τη σύνδεση με τις συντηρημένες περιοχές RSS που εντοπίζονται εκατέρωθεν των γονιδίων V, (D), J, καθώς και για την κατάλυση της διάσπασης του DNA. Οι μη βασικές περιοχές της RAG1 παρέχουν σημαντικές ρυθμιστικές λειτουργίες, αλλά ο μηχανισμός δεν είναι απόλυτα κατανοητός. Ο ρόλος της RAG2 είναι λιγότερο σαφής, αν και φαίνεται ότι είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της RAG1 προς την ειδική δέσμευση και διάσπαση της αλληλουχίας του DNA, καθώς και για την παροχή πρόσθετης ικανότητας δέσμευσης του DNA (Ru et al., 2015). Ο ανασυνδυασμός V(D)J χωρίζεται μηχανιστικά σε δύο φάσεις: την φάση της διάσπασης και την φάση της επιδιόρθωσης. Η φάση της διάσπασης ξεκινά από τα γονίδια RAG1 και RAG2 που αναγνωρίζουν τις RSSs και προκαλούν μια θραύση διπλής έλικας (DSBs) μεταξύ των κωδικοποιητικών τμημάτων V, D, και J και των RSSs. Η αναγνώριση των RSS στο πλαίσιο της χρωματίνης διευκολύνεται από την αλληλεπίδραση της RAG2 με ιστόνες (Li et al., 2008). Αφού γίνει η διάσπαση του DNA στα όρια της επταμερούς συντηρημένης αλληλουχίας, οι RAGs εκτελούν μια αντίδραση τρανσεστεροποίησης. Σε εκείνο το στάδιο, το σύμπλοκο των πρωτεϊνών RAG βοηθά στην προσέγγιση των γονιδίων που πρόκειται να ανασυνδυαστούν πριν αυτά υποβληθούν σε επεξεργασία και συνδεθούν από τις πρωτεΐνες μη ομόλογης ένωσης άκρων (NHEJ) (Malu et al., 2012).

## 2.7 Περιοχές CDR

Όπως αναφέρθηκε, οι περιοχές καθορισμού της συμπληρωματικότητας (CDR) είναι σημαντικές για την ειδικότητα της αντιγονικής αναγνώρισης. Υπάρχουν τρεις τέτοιες περιοχές σε κάθε βαριά και ελαφριά αλυσίδα: οι CDR1, CDR2 και CDR3 (Osajima et al., 2014).

Σε επίπεδο τοπολογίας, τα γονίδια V κωδικοποιούν τις δύο πρώτες περιοχές, τις CDR1 και CDR2. Η περιοχή CDR3 είναι η πιο μεταβλητή και, επομένως, η πιο σημαντική για την

αναγνώριση αντιγόνου καθώς προκύπτει μέσω της σύνδεσης των γονιδίων V,D και J για τη βαριά αλυσίδα ή V και J για την ελαφριά αλυσίδα.

**CDR1:** η περιοχή CDR1 εντοπίζεται ανοδικά κατά μήκος των γονιδίων V. Αποτελεί μέρος της συνολικής επιφάνειας πρόσδεσης του αντιγόνου και επηρεάζει άμεσα την ειδικότητα της αλληλεπίδρασης (Osajima et al., 2014).

**CDR2:** η περιοχή CDR2 συνδέεται με την CDR1 για να σχηματίσει την επιφάνεια αναγνώρισης του αντιγόνου, συμβάλλοντας στην ειδικότητα της αναγνώρισης. Ενώ η CDR1 παρέχει μια γενική πλατφόρμα αναγνώρισης του αντιγόνου, η CDR2 συμβάλλει στο σχηματισμό ακριβούς σύνδεσης μεταξύ υποδοχέα και αντιγόνου (Gabrielli et al, 2009).

**CDR3:** περικλείει την περιοχή σύνδεσης των γονιδίων V, (D) και J των αλυσίδων της ανοσοσφαιρίνης του BκΥ και εμφανίζει μεγαλύτερη ποικιλομορφία σε σύγκριση με τις CDR1 και CDR2. Η CDR3 είναι υπεύθυνη για την ακριβή αλληλεπίδραση και πρόσδεση αντιγόνου, καθώς παρέχει την κύρια επιφάνεια αναγνώρισης. Η υψηλή ποικιλομορφία της CDR3 οφείλεται στην ανακριβή σύνδεση των γονιδίων κατά τη διαδικασία του ανασυνδυασμού V(D)J (Shirai et al., 1999).

Οι τρεις περιοχές CDR «συνεργάζονται» για να δημιουργήσουν ένα τεράστιο ρεπερτόριο BκΥ που μπορούν να αναγνωρίζουν και να προσδένονται σχεδόν στο σύνολο των αντιγόνων με υψηλή εξειδίκευση (Osajima et al., 2014).

## 2.8 Συνδυαστική ετερογένεια

Όπως αναφέρθηκε, η ποικιλομορφία των BκΥ αυξάνεται εντός των περιοχών CDR3, οι οποίες αφορούν στις περιοχές σύνδεσης των γονιδίων V, (D), και J επειδή οι διαδικασίες του ανασυνδυασμού είναι ανακριβείς. Πιο συγκεκριμένα, εξωνουκλεάσες μπορεί να αφαιρέσουν νουκλεοτίδια, ενώ παράλληλα νουκλεοτίδια μπορεί να προστεθούν με τυχαίο τρόπο από το ένζυμο τερματική δεοξυνουκλεοτιδυλοτρανσφεράση (TdT) (Dunn-Walters et al., 1995 | Engels & Walz, 2018).

Συνολικά, οι πολυάριθμοι πιθανοί συνδυασμοί μεταξύ των γονιδίων V, (D) και J, καθώς και οι τροποποιήσεις που προκαλούνται στις περιοχές της σύνδεσής τους οδηγούν σε μια συνολική ποικιλότητα του ρεπερτορίου του BκΥ της τάξης του  $10^{10}$ – $10^{11}$ , είναι οποία είναι υπεύθυνη για την εξαιρετική αποτελεσματικότητα της προσαρμοστικής ανοσίας (Grawunder et al., 1998).

## 2.9 Γενετικός τόπος της βαριάς αλυσίδας

Ο γενετικός τόπος της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης εντοπίζεται στη ζώνη 14.932.33 του χρωμοσώματος 14, κοντά στο τελομερικό άκρο του μακριού βραχίονα. Ο προσανατολισμός των γονιδίων στο γενετικό τόπο της βαριάς αλυσίδας είναι ο εξής :

τελομερές, 5' IGHV - IGHD - IGHJ - IGHC 3', κεντρομερίδιο (**Εικόνα 5**).

Ο συγκεκριμένος γενετικός τόπος έχει μήκος 1250 kb και περιλαμβάνει 170 - 176 γονίδια ανά απλότυπο. Η ομάδα των γονιδίων IGHV περιλαμβάνει συνολικά 123-129 γονίδια. Από αυτά, 82-88 γονίδια κατατάσσονται σε 7 υποομάδες γονιδίων, τις IGHV1 - IGHV7. Τα λειτουργικά γονίδια είναι 44, με τα 40 από αυτά να δίνουν αναγνωρίσιμα προϊόντα. Υπάρχουν επίσης 41 ψευδογονίδια, τα οποία αποκλίνουν αρκετά σε επίπεδο αλληλουχίας ώστε να μην είναι δυνατή η κατάταξή τους στις παραπάνω υποομάδες.

Η ομάδα των γονιδίων IGHD περιλαμβάνει 27 γονίδια, τα οποία κατατάσσονται σε 7 υποομάδες, τις IGHD1 - IGHD7. Τα λειτουργικά γονίδια είναι 23, ενώ τα υπόλοιπα είναι ψευδογονίδια. Επιπλέον, στην ομάδα γονιδίων IGHJ περιλαμβάνονται 9 γονίδια, εκ των οποίων τα 6 είναι λειτουργικά. Τέλος, η ομάδα IGHC αποτελείται από 11 γονίδια στον πιο απλό απλότυπό της (Lefranc, 2001).

## 2.10 Γενετικοί τόποι της ελαφριάς αλυσίδας

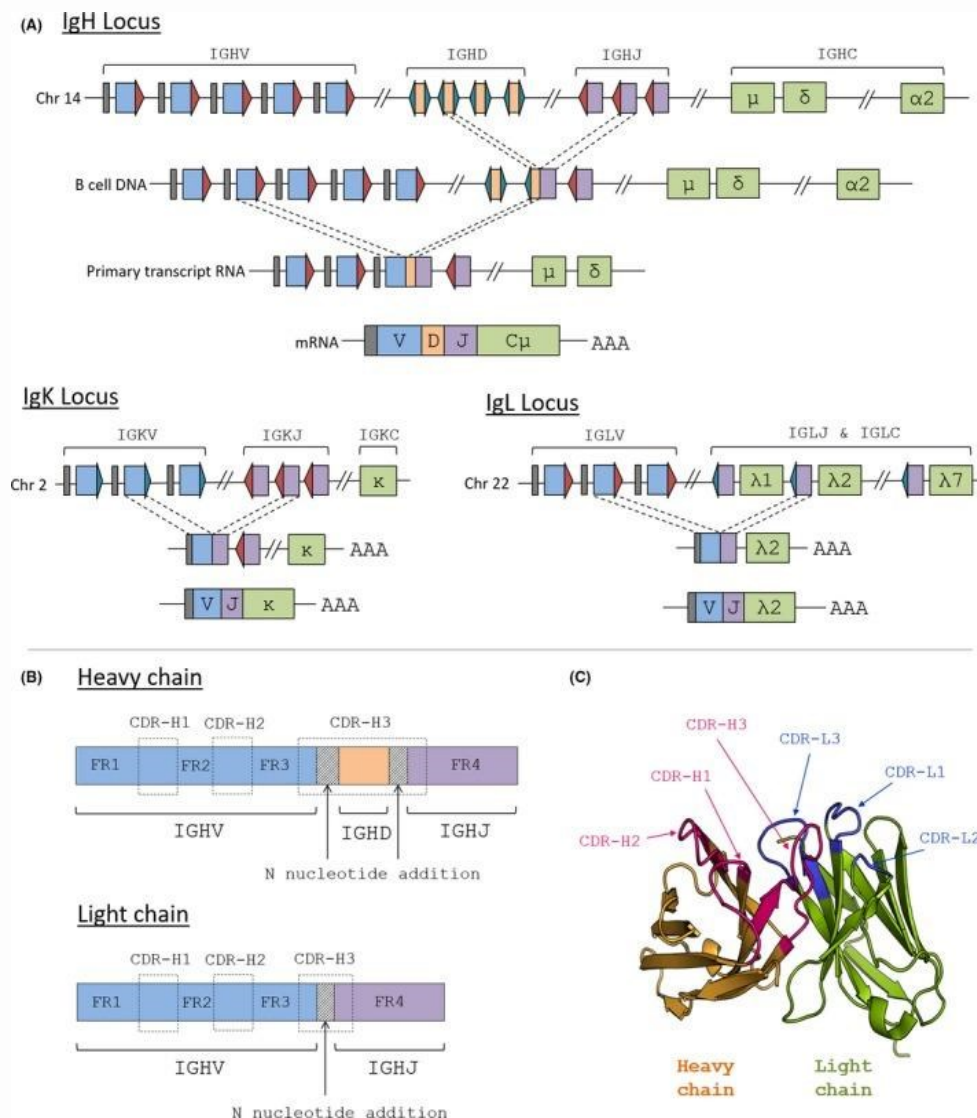
### 2.10.1 κ ελαφριά αλυσίδα

Η κ ελαφριά αλυσίδα εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 2 και πιο συγκεκριμένα στη ζώνη 2p11.2 του μικρού βραχίονα. Ο σχετικός γενετικός τόπος έχει μέγεθος 1820 kb (**Εικόνα 5**) και περιλαμβάνει συνολικά 82 γονίδια ανά απλοειδές γονιδίωμα. Η συντριπτική πλειοψηφία των σχετικών γονιδίων ανήκουν στη ομάδα γονιδίων IGKV και κατατάσσονται σε 7 υποομάδες, τις IGKV1 - IGKV7. Σε επίπεδο γονιδιώματος, τα γονίδια IGKV οργανώνονται σε δύο συστοιχίες οι οποίες απέχουν μεταξύ τους 800kb. Τέλος, στη συστοιχία γονιδίων IGKJ ανήκουν 5 γονίδια (Lefranc, 2001).

### 2.10.2 λ ελαφριά αλυσίδα

Η λ ελαφριά αλυσίδα εντοπίζεται στη ζώνη 22q11.2 του μεγάλου βραχίονα του χρωμοσώματος 22, έχει μήκος 1.050 kb και περιέχει 87-96 γονίδια (**Εικόνα 5**). Τα 73-74 γονίδια ανήκουν στην ομάδα των γονιδίων IGLV, τα 7-11 ανήκουν στην ομάδα των γονιδίων IGVJ, ενώ τα υπόλοιπα 7-11 γονίδια ανήκουν στην ομάδα IGLC, ανάλογα με τον απλότυπο. Τα 56-57 λειτουργικά γονίδια IGLV κατατάσσονται σε 11 υποομάδες, ενώ τα 17 ψευδογονίδια εμφανίζουν αρκετά μεγάλη απόκλιση και δεν είναι δυνατή η κατάταξή τους σε κάποια από τις σχετικές υποομάδες.

Τα γονίδια IGLJ είναι ισάριθμα με τα γονίδια IGLC και οργανώνονται σε ζεύγη γονιδίων (Lefranc, 2001).



**Εικόνα 5. (α)** Τα γονιδιακά τμήματα μεταβλητής (V), ποικιλομορφίας (D) και ένωσης (J) διατάσσονται σε μη λειτουργική κατάσταση στη βλαστική σειρά. Κατά τη διάρκεια του ανασυνδυασμού V(D)J, ένα από τις ομάδες γονιδίων V, D και J (μόνο V και J στην περίπτωση των ελαφρών αλυσίδων) ανασυνδυάζεται τυχαία. Οι αλληλουχίες RSS διασφαλίζουν ότι τα γονίδια ανασυνδυάζονται με τη σωστή σειρά για να σχηματίσουν μια λειτουργική μεταβλητή περιοχή. Τα μπλε, πορτοκαλί και μωβ ορθογώνια αντιπροσωπεύουν τα γονίδια V, D και J, αντίστοιχα. Οι γκριζες περιοχές αντιστοιχούν στις αλληλουχίες οδηγούς ανοδικά των γονιδίων V. Τα τριγωνικά και τα κόκκινα τρίγωνα αντιπροσωπεύουν τις περιοχές 12 RSS και 23 RSS, αντίστοιχα. Τα εξόνια της σταθερής περιοχής αντιπροσωπεύονται από πράσινα ορθογώνια. **(β)**



Οι λειτουργικές μεταβλητές περιοχές αποτελούνται από τέσσερις διατηρημένες περιοχές δομικού πλαισίου (framework, FR) και τρεις ακόμη περιοχές καθορισμού της συμπληρωματικότητας (CDR). Οι περιοχές CDR3 είναι οι πιο μεταβλητές, καθώς εκτείνονται σε πολλαπλά γονίδια και περιέχουν τυχαία προστιθέμενα νουκλεοτίδια. (γ) Οι βρόχοι CDR είναι οι περιοχές της ανοσοσφαιρίνης που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη επαφή με το αντιγόνο (PDB ID : 1 FVC).

## Κεφάλαιο 3 : Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία

### 3.1 Γενικά

Η μελέτη της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (ΧΛΛ) ξεκινά το 1845, παρά το γεγονός ότι η πρώτη τεκμηριωμένη παρατήρηση των λευχαιμικών κυττάρων είχε γίνει από τον Joseph Lieutaud (*“Elementa Physiologiae”*, 1749). Μέσα στα χρόνια, η πρόοδος στον τομέα της έρευνας βοήθησε σημαντικά στην κατανόηση της αιτιολογίας και της θεραπείας της ΧΛΛ. Σε μια αναφορά του στην ιστορία της νόσου, ο Rai τη διακρίνει σε τρεις περιόδους: την αναγνώριση της ΧΛΛ σε κλινικό επίπεδο (1845-1924), τις αρχικές κλινικές μελέτες (1924-1973) και τη σύγχρονη εποχή, από το 1973 μέχρι σήμερα (Rai, 1993).

Όσον αφορά το κομμάτι της σύγχρονης ιστορίας της ΧΛΛ, παράγοντες όπως η ανοσολογική ταξινόμηση, η μοριακή κυτταρογενετική, η μελέτη του ιστορικού και των προγνωστικών βιοδεικτών, καθώς και η ανάπτυξη νέων θεραπειών προσφέρουν ελπίδα για τη μακροπρόθεσμη διαχείριση της νόσου, ενώ παράλληλα έχουν συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση της παθογένεσής της. Επιπροσθέτως, η βαθύτερη κατανόηση της διαφοροποίησης και της ανάπτυξης των φυσιολογικών Β λεμφοκυττάρων έχει βοηθήσει σημαντικά στη μελέτη της νόσου.

Η ΧΛΛ είναι μια χρόνια κακοήθεια Β λεμφοκυττάρων που αντιπροσωπεύει το 30-40% όλων των λευχαιμιών στον ενήλικο πληθυσμό (Chiorazzi et al., 2005). Είναι μια ασθένεια με άγνωστη αιτιολογία και μεταβλητή κλινική πορεία, η οποία κυμαίνεται από πολύ ήπια έως μάλλον επιθετική, αντανakλώντας την υποκείμενη βιολογική ποικιλότητα. Πράγματι, η ΧΛΛ χαρακτηρίζεται από ένα πολύπλοκο βιολογικό «τοπίο»: η συνδυασμένη επίδραση των εγγενών κυτταρικών εκτροπών και της μικροπεριβαλλοντικής ενεργοποίησης αποτελεί τη βάση της χαρακτηριστικής αντίστασης των λευχαιμικών κυττάρων στην απόπτωση, ενώ παράλληλα προάγει τον πολλαπλασιασμό τους, οδηγώντας τελικά στην εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου (Fischer & Hallek, 2017 | Hallek, 2015).

Τα νεοπλασματικά λεμφοκύτταρα συσσωρεύονται στο αίμα, το μυελό των οστών και τους δευτερογενείς λεμφικούς ιστούς και εμφανίζουν χαρακτηριστικό ανοσοφαινότυπο (CD19+, CD5+ και CD23+, ασθενή έκφραση επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης και CD79b). Όσον αφορά σε αυτούς τους δείκτες, ο CD5 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται φυσιολογικά μόνο στα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα και στα B-1 λεμφοκύτταρα, όπου ρυθμίζει το ενδοκυτταρικό δυναμικό από τους αντιγονικούς υποδοχείς των κυττάρων αυτών. Ο CD20 είναι μια φωσφοπρωτεΐνη που εκφράζεται φυσιολογικά στα B λεμφοκύτταρα και ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή τους. Τέλος, ο CD23 εκφράζεται σε ώριμα B λεμφοκύτταρα με ανοσοσφαιρίνες ισotyπου IgE και άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Για τη διάγνωση της ΧΛΛ απαιτείται η παρουσία περισσότερων από 5.000 κλωνικών B λεμφοκυττάρων ανά μικρόλιτρο αίματος, με την έκπτυξη αυτή να πρέπει να διατηρηθεί για διάστημα μεγαλύτερο των τριών μηνών, εφόσον απουσιάζουν συμπτώματα ή άλλα σημεία της νόσου (Fabbri & Dalla-Favera, 2016 | Dighiero & Hamblin, 2008 | Rozman & Montserrat, 1995).

Παρά τη μεγάλη πρόοδο που έχει συντελεστεί τις τελευταίες δεκαετίες σχετικά με την κατανόηση της παθοφυσιολογίας της νόσου, το κύτταρο προέλευσης παραμένει αδιευκρίνιστο. Στο πλαίσιο αυτό, γνωρίζουμε πλέον από φαινοτυπικά και γενετικά ευρήματα ότι τα κύτταρα της ΧΛΛ είναι ώριμα B λεμφοκύτταρα που έχουν έρθει σε επαφή με αντιγόνο. Συγκεκριμένα, σειρά ενδείξεων τοποθετεί τον κλωνοτυπικό BκΥ σε κεντρικό ρόλο για την παθοφυσιολογία της νόσου, λόγω μιας σειράς δεδομένων: (α) το ρεπερτόριο των γονιδίων της μεταβλητής περιοχής των βαριών αλυσίδων των κλωνοτυπικών ανοσοσφαιρινών (IGH) της ΧΛΛ παρουσιάζει έντονη επιλεκτικότητα, (β) οι ασθενείς με ΧΛΛ κατατάσσονται σε διαφορετικές προγνωστικές ομάδες ανάλογα με το φορτίο της ΣΥΜ στο ανασυνδυασμένο γονίδιο IGHV, (γ) διαφορετικά υποσύνολα ασθενών εκφράζουν ταυτόσημες ή πολύ όμοιες στερεότυπες ανοσοσφαιρίνες στους BκΥ τους (stereotyped BcR IGHs), εύρημα που υποδηλώνει επιλογή των κλωνοτυπικών B λεμφοκυττάρων από συγκεκριμένους αντιγονικούς επιτόπους, και, (δ) φάρμακα που δρουν ως αναστολείς σηματοδότησης μέσω του BκΥ εμφανίζουν μεγάλη κλινική αποτελεσματικότητα (Rozman & Montserrat, 1995 | Burger et al., 2009 | Burger et al., 2013). Επιπλέον, δεδομένα από επιδημιολογικές, μοριακές και κυτταρικές μελέτες, καθώς και κλινικές παρατηρήσεις, τονίζουν την ιδιαίτερη σχέση της ΧΛΛ με αυτοάνοσα νοσήματα (Caligaris-Cappio & Hamblin, 1999).

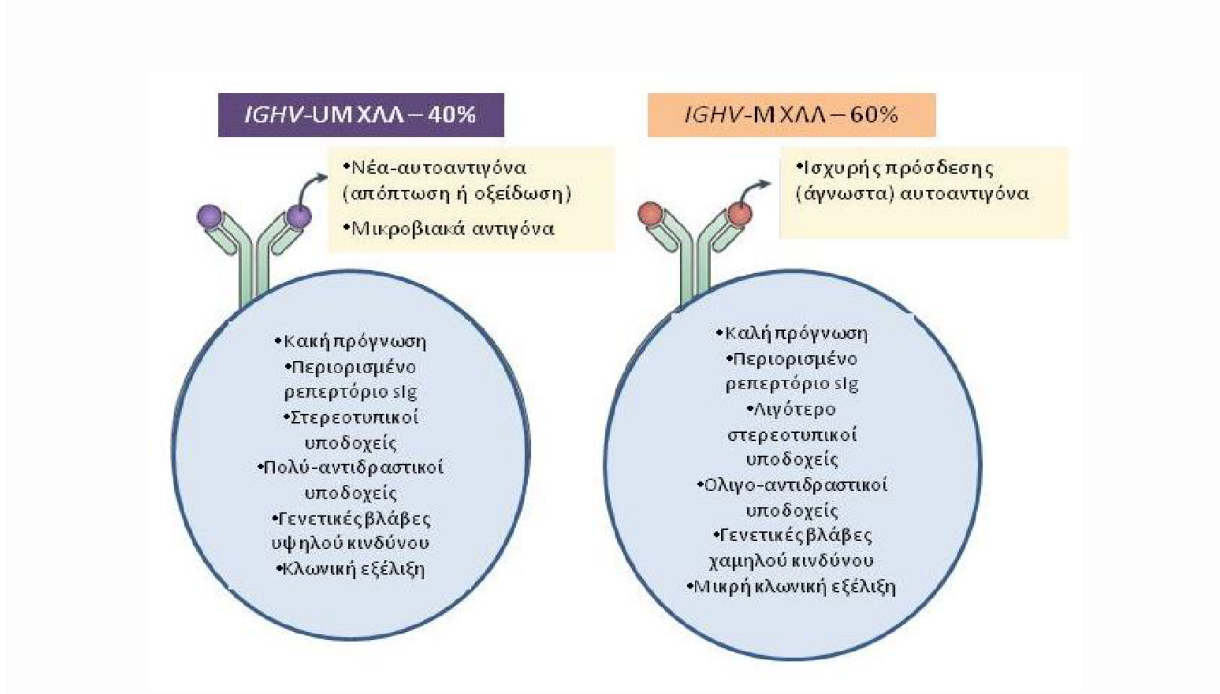


### 3.2 Δείκτες

Η κλινική πορεία της ΧΛΛ χαρακτηρίζεται από σημαντική ετερογένεια, καθώς ορισμένοι ασθενείς επιβιώνουν για μεγάλο διάστημα χωρίς την ανάγκη θεραπείας, ενώ άλλοι παρουσιάζουν πιο επιθετική πορεία της νόσου, με περιορισμένη επιβίωση και αντίσταση στη θεραπεία. Αυτή η διαφοροποίηση έχει οδηγήσει σε έντονη έρευνα για την ταυτοποίηση προγνωστικών παραγόντων.

### 3.3. Σωματικές μεταλλάξεις των γονιδίων IGHV

Οι ασθενείς με ΧΛΛ κατατάσσονται σε δύο μεγάλες προγνωστικές ομάδες ανάλογα με το φορτίο της ΣΥΜ της κλωνοτυπικής BκΥ IG. Ασθενείς με ανασυνδυασμένα γονίδια IGHV με νουκλεοτιδική ταυτότητα  $\geq 98\%$  με το αντίστοιχο γονίδιο της βλαστικής σειράς (unmutated IGHV, UM) χαρακτηρίζονται από ταχεία εξέλιξη της νόσου και δυσμενή πρόγνωση. Αντίθετα, οι ασθενείς με  $>2\%$  ταυτότητα του ανασυνδυασμένου γονιδίου IGHV σε σχέση με το αντίστοιχο της βλαστικής σειράς (mutated IGHV, M) χαρακτηρίζονται από ήπια κλινική πορεία και καλύτερη πρόγνωση. Αυτή η διαφορά στην κλινική πορεία μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών προκύπτει ως αποτέλεσμα διαφορετικής σηματοδότησης μέσω του BκΥ, όπως φαίνεται στην Εικόνα 6 (Fabbri & Dalla-Favera, 2016 | Burger et al., 2009 | Malavasi et al., 2015).



**Εικόνα 6.** Χαρακτηριστικά των προγνωστικών υποομάδων των ασθενών με ΧΛΛ με BκΥ διαφορετικής ΣΥΜ. Πηγή: Fabbri G, Dalla-Favera R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Rev. Cancer.* 2016;16(3):145–162.

### 3.4 Περιορισμένο ρεπερτόριο γονιδίων IGHV

Η ανοσογενετική ανάλυση βρίσκεται στην πρώτη γραμμή της έρευνας για τη ΧΛΛ για περισσότερο από δύο δεκαετίες, προσφέροντας ισχυρές αποδείξεις ότι ο κλωνοτυπικός BκΥ IG εμπλέκεται σε ειδική αναγνώριση και επιλογή από (αυτο)αντιγόνα. Αυτή η διαδικασία πιθανώς διαμορφώνει την κυτταρική συμπεριφορά και το τελικό κλινικό αποτέλεσμα. Αρχικές μελέτες από τη δεκαετία του 1990 ανέφεραν σημαντικούς περιορισμούς της ΧΛΛ όσον αφορά στην έκφραση των γονιδίων IGHV με σαφή επικράτηση των IGHV1-69, IGHV3-7 και IGHV4-34. Επιπλέον, οι μελέτες αυτές τεκμηρίωσαν την ύπαρξη προτύπων ΣΥΜ συμβατών με την αντιγονική επιλογή σε ένα σημαντικό κλάσμα των περιπτώσεων (Efremov et al., 1996 | Hashimoto et al., 1995). Αυτά τα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν στη συνέχεια σε μεγαλύτερες σειρές ασθενών, υποδηλώνοντας την επιλογή των προγονικών κυττάρων της ΧΛΛ από ένα περιορισμένο σύνολο (αυτο)αντιγόνων (Fais et al., 1998 | Johnson et al., 1997).

### 3.5 Στερεοτυπία του BκΥ

Η σηματοδότηση μέσω του BκΥ διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην παθογένεση της ΧΛΛ, καθώς τα κακοήγη B λεμφοκύτταρα βασίζονται στα σχετικά σήματα για την επιβίωση και την ανάπτυξη τους. Συγκεκριμένα, έχει αναδειχτεί ότι ο BκΥ μπορεί να ενεργοποιηθεί είτε από (αυτό)αντιγόνα είτε ανεξάρτητα από αυτά ("τονική σηματοδότηση") και ότι η σηματοδότηση αυτή είναι απαραίτητη για την επιβίωση των κυττάρων της ΧΛΛ. Στο ίδιο πλαίσιο, η χορήγηση αναστολέων κινασών που ενεργοποιούνται μέσω του BκΥ, όπως η BTK και η PI3Kδ, αναμένεται να αλλάξει τη θεραπευτική προσέγγιση για την ΧΛΛ και άλλες κακοήθειες των B λεμφοκυττάρων (Burger et al., 2013).

Ένα σημείο καμπής για την έρευνα στη ΧΛΛ ήταν το εύρημα ότι το 50% περίπου των περιπτώσεων που εκφράζουν BκΥ με το γονίδιο IGHV3-21 εμφάνισαν εξαιρετικά όμοια περιοχή CDR3 στη βαριά αλυσίδα (VH CDR3). Αυτές οι περιπτώσεις ΧΛΛ εξέφραζαν επίσης σχεδόν πανομοιότυπες ελαφριές αλυσίδες που έφεραν το γονίδιο IGLV3-21 (Tobin et al., 2003). Σε πλήρη αντίθεση με την τυχαιότητα, το εύρημα του αξιοσημείωτου αυτού περιορισμού υποστήριξε την άποψη ότι η αντιγονική πίεση οδηγεί στην επιλογή ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του κλωνοτυπικού BκΥ IG. Επόμενες μελέτες έδειξαν ότι οι περιορισμοί στη θέση δέσμευσης του αντιγόνου ήταν ένα χαρακτηριστικό του ρεπερτορίου της ΧΛΛ πέρα από τις περιπτώσεις που εξέφραζαν το γονίδιο IGHV3-21. Πράγματι, ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με ΧΛΛ αντιστοιχίστηκαν σε υποσύνολα που χαρακτηρίζονται από πολύ παρόμοιες, ή αλλιώς «στερεότυπες» περιοχές VH CDR3. Για τους λόγους αυτούς, προτάθηκε εύλογα ότι

οι κλωνοτυπικές BκY IG που ανήκουν στο ίδιο στερεότυπο υποσύνολο επιλέχθηκαν από ένα περιορισμένο εύρος κοινών αντιγονικών επιτόπων (Bomben et al., 2007 | Belessi et al., 2006). Η εμβάθυνση σε αυτό το φαινόμενο σε όλο και μεγαλύτερες σειρές ασθενών με ΧΛΛ (Agathangelidis et al., 2012; Darzentas et al., 2010) αποκάλυψε ότι οι στερεότυπες BκY IG αντιπροσώπευαν συλλογικά σχεδόν το ένα τρίτο των περιπτώσεων ΧΛΛ και αφορούσαν συνολικά σε ένα μεγάλο αριθμό στερεότυπων υποσυνόλων, των οποίων το μέγεθος κυμαινόταν από ένα μόνο ζευγάρι περιπτώσεων έως εκατοντάδες περιπτώσεις ("κύρια" υποσύνολα).

Αναπόφευκτα, κατέστη σημαντικό να αντιμετωπιστεί το ζήτημα του κατά πόσον τα υποσύνολα με στερεότυπους BκY IGs εμφανίζονταν αποκλειστικά στη ΧΛΛ ή θα μπορούσαν να εμφανίζονται και σε άλλες κακοήθειες των Β λεμφοκυττάρων ή μη κακοήθειες οντότητες. Οι συγκρίσεις μεταξύ τέτοιων οντοτήτων εντόπισαν λίγες μόνο κοινές στερεότυπες VH CDR3, αποκαλύπτοντας έτσι ότι η πλειοψηφία των στερεότυπων BκY IG είναι ειδικές για τη ΧΛΛ. Οι λίγες αντιστοιχίες σε επίπεδο αλληλουχίας BκY IG αφορούσαν σε αυτοαντιδραστικούς κλώνους Β λεμφοκυττάρων, καθώς και σε λεμφοϋπερπλαστικές διαταραχές Β λεμφοκυττάρων που συνδέονταν άμεσα ή έμμεσα με λοιμώξεις από ορισμένα παθογόνα (π.χ. ο ιός της ηπατίτιδας C στην περίπτωση του στερεότυπου υποσυνόλου 13 της ΧΛΛ) (Kostareli et al., 2012). Αν και οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί παραμένουν ασαφείς, αυτή η παρατήρηση υπογραμμίζει την ευελιξία των Β λεμφοκυττάρων, ενώ παράλληλα αμφισβητεί τη σημασία της «ευθείας» αντιστοίχισης 1:1 μεταξύ των φυσιολογικών υποπληθυσμών των Β λεμφοκυττάρων και των λευχαιμιών/λεμφωμάτων (Gemenetzi et al., 2020).

Σε κλινικό επίπεδο, η κατηγοριοποίηση των ασθενών με ΧΛΛ που ανήκουν σε υποσύνολα με στερεότυπους BκY IGs, έχει οδηγήσει στην αναγνώριση υποομάδων της νόσου με ειδικά βιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά, παρέχοντας έναν πιο οργανωμένο τρόπο κατανόησης της νόσου (Agathangelidis et al., 2012 | Agathangelidis et al., 2014).

Συνολικά, ο κλωνοτυπικός BκY IG βρίσκεται στον πυρήνα της κλινικής έρευνας για τη ΧΛΛ, προσδίδοντας της δυνατότητα εφαρμογής εξατομικευμένων θεραπειών για τα διαφορετικά υποσύνολα. Συγκεκριμένα, η αναγνώριση των σημαντικών χαρακτηριστικών του BκY IG και της σηματοδότησης μέσω του BκY για κάθε συγκεκριμένο στερεότυπο υποσύνολο παρέχει νέες δυνατότητες για την ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών (Stevenson & Caligaris-Cappio, 2004).

### 3.6 Δομική ανάλυση των ανοσοσφαιρινών

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι όλες οι μελέτες που αναφέρθηκαν σχετικά με τη μελέτη του ρεπερτορίου του BκΥ IG στη ΧΛΛ βασίστηκαν στην αξιολόγηση σε επίπεδο αλληλουχίας με ελάχιστες ή μηδενικές αναφορές στη δομή των συγκεκριμένων μορίων.

Στη ΧΛΛ, οι περιοχές CDR του BκΥ εμφανίζουν συχνά μοναδικά δομικά χαρακτηριστικά που τα διακρίνουν από τους αντίστοιχους υποδοχείς των φυσιολογικών Β λεμφοκυττάρων, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην παθολογική συμπεριφορά των λευχαιμικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, οι CDR συχνά εμφανίζουν υψηλό βαθμό διατήρησης και δομικής ομοιότητας στη ΧΛΛ, ειδικά σε περιπτώσεις με στερεότυπους BκΥ, η οποία διευκολύνει τη δέσμευση αυτο-αντιγόνων ή μικροβιακών αντιγόνων, συμβάλλοντας στην πολυαντιδραστικότητα που παρατηρείται συνήθως στους BκΥ της ΧΛΛ.

Επιπλέον, οι δομικές αναλύσεις με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ και πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (NMR) έχουν παράσχει σημαντικές πληροφορίες για τις συγκεκριμένες διαμορφώσεις των CDR στη ΧΛΛ. Αυτές οι μελέτες αποκάλυψαν ότι οι περιοχές CDR στους BκΥ της ΧΛΛ διαμορφώνονται συχνά με τρόπο που υποστηρίζει τη σύνδεση με πολλαπλά, δομικά σχετικά, αντιγόνα. Για παράδειγμα, η υδρόφοβη φύση ορισμένων περιοχών CDR3 μπορεί να επιτρέψει αλληλεπιδράσεις με λιπιδικές δομές, οι οποίες είναι κοινές μεταξύ των αυτοαντιγόνων. Τέτοιες δομικές προσαρμογές υπογραμμίζουν την τάση των BκΥ της ΧΛΛ να εμπλέκονται σε αυτο- και πολύ-αντιδραστικότητα, χαρακτηριστικό γνώρισμα της νόσου (Forconi et al., 2022).

Ένα άλλο βασικό εύρημα είναι η παρουσία διατηρημένων δομικών μοτίβων στις θέσεις δέσμευσης αντιγόνου, ιδιαίτερα και πάλι μεταξύ των στερεότυπων υποσυνόλων. Για παράδειγμα, οι BκΥ που χρησιμοποιούν το γονίδιο IGHV1-69 εμφανίζουν συχνά ένα χαρακτηριστικό υδρόφοβο θύλακα εντός της περιοχής CDR3, ο οποίος μπορεί να αναγνωρίσει διάφορα αντιγόνα με υδρόφοβους επιτόπους. Αυτό το δομικό χαρακτηριστικό όχι μόνο ενισχύει τη συγγένεια δέσμευσης για ορισμένα αντιγόνα, αλλά υποδηλώνει επίσης έναν κοινό μηχανισμό αναγνώρισης αντιγόνου μεταξύ ασθενών με ΧΛΛ που εκφράζουν παρόμοιους BκΥ. Από την άλλη, έχει παρατηρηθεί ότι τα λευχαιμικά κύτταρα που εκφράζουν βαριά αλυσίδα του γονιδίου IGHV3-21 έχουν τάση να συνδυάζονται με συγκεκριμένες ελαφριές αλυσίδες, κυρίως ισοτύπου λ (IGLV3-21), ανάλογα με το μοτίβο στην περιοχή VH CDR3 (Forconi et al., 2022). Συμπερασματικά, η λεπτομερής δομική ανάλυση των θέσεων δέσμευσης αντιγόνου και των περιοχών CDR σε BκΥ της ΧΛΛ έχει αποκαλύψει μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση με διατηρημένα μοτίβα στο πλαίσιο της πολυαντιδραστικότητας (Agathangelidis et al., 2012).

## Κεφάλαιο 4 : Σκοπός της μελέτης

### 4.1 Σκοπός της μελέτης

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αναζήτηση νέων ανοσογενετικών βιοδεικτών για την καλύτερη κατανόηση και ταξινόμηση της Χρόνιας Λεμφοκυτταρικής Λευχαιμίας (ΧΛΛ). Στο πλαίσιο αυτό, η μελέτη επικεντρώθηκε στην προτυποποίηση της ανάλυσης των ανοσοσφαιρινών του ΒκΥ (Β κυτταρικός υποδοχέας) σε ασθενείς με ΧΛΛ, προκειμένου να αναδειχθούν νέοι μοριακοί δείκτες που θα μπορούσαν να συμβάλουν στη διάγνωση, τη σταδιοποίηση και την πρόγνωση της νόσου.

Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση με PCR των μορίων ανοσοσφαιρίνης του κλωνοτυπικού ΒκΥ σε ασθενείς με ΧΛΛ, ακολουθούμενη από δομική ανάλυση των μορίων αυτών χρησιμοποιώντας σύγχρονα εργαλεία βιοπληροφορικής. Στο τέλος της διαδικασίας, πραγματοποιήθηκε ομαδοποίηση των ασθενών της παρούσας μελέτης (n=10) και άλλων ασθενών με ΧΛΛ (n=166) με βάση τη δομή του κλωνοτυπικού ΒκΥ IG. Απώτερος σκοπός της μελέτης ήταν να χαρακτηριστούν τα σημαντικά δομικά χαρακτηριστικά των συγκεκριμένων μορίων, τα οποία θα μπορούσαν στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν για τη βελτίωση της μοριακής ταξινόμησης των ασθενών. Η βελτίωση της ταξινόμησης των ασθενών θα μπορούσε στη συνέχεια να οδηγήσει σε μια καλύτερη κατηγοριοποίηση της νόσου και ενδεχομένως στην ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπειών για τους ασθενείς.

## **Κεφάλαιο 5 : Πειραματική Πορεία**

### **5.1 Υλικά και Μέθοδοι**

#### **5.1.1 Ομάδα μελέτης**

Στην ομάδα μελέτης της παρούσας διπλωματικής εργασίας περιλήφθηκαν 10 ασθενείς με ΧΛΛ, στην περίπτωση των οποίων πραγματοποιήθηκε εκτενής εργαστηριακή ανάλυση δειγμάτων αίματος. Επιπλέον, συμπεριλήφθηκαν και ανοσογενετικά δεδομένα από 166 ασθενείς με ΧΛΛ σκοπό την πραγματοποίηση συγκρίσεων σε βιοπληροφορικό επίπεδο με τα δεδομένα που παράχθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας.

#### **5.2 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων**

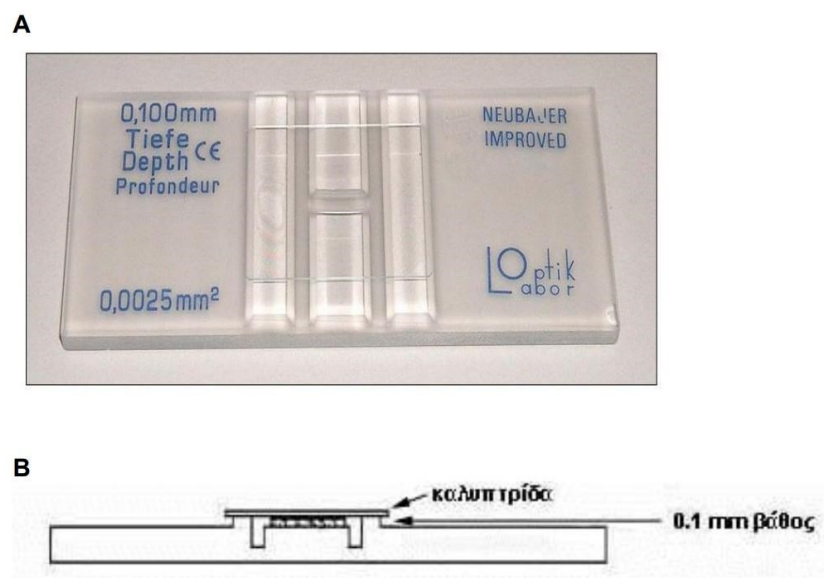
Για την εκτέλεση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν 20 ml αίματος από κάθε ασθενή της ομάδας μελέτης. Από τα δείγματα αίματος απομονώθηκε ο πληθυσμός των μονοπύρηνων κυττάρων με βάση το εξής πρωτόκολλο:

- 1) Προετοιμασία ενός σωληναρίου των 50 ml με 200 μl EDTA (αντιπηκτικό). Μετά την προσθήκη των 20 ml αίματος προστέθηκαν 15 ml διαλύματος RPMI. Ακολούθησε ανάμιξη του διαλύματος.
- 2) Προσθήκη 15 ml φικόλης σε νέο σωληνάριο των 50 ml και επιστοίβαση του διαλύματος αίματος με μεγάλη προσοχή ώστε να μην αναμιχθεί με τη φικόλη.
- 3) Φυγοκέντρηση του σωληναρίου σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min στις 2300 rpm χωρίς φρένο σε θερμοκρασία δωματίου.
- 4) Συλλογή της στοιβάδας των μονοπύρηνων κυττάρων με προσοχή χρησιμοποιώντας πλαστική πιπέτα τύπου παστέρ. Μεταφορά των μονοπύρηνων κυττάρων σε νέο σωληνάριο των 15 ml.
- 5) Προσθήκη διαλύματος RPMI μέχρι τα 12 ml και ανάμιξη του διαλύματος με την ίδια πιπέτα.
- 6) Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 8 min στις 2100 rpm με χαμηλό φρένο και απόρριψη του υπερκείμενου υγρού.
- 7) Έκπλυση του ιζήματος των κυττάρων με 10 ml RPMI.
- 8) Επανάληψη της προηγούμενης φυγοκέντρησης σε θερμοκρασία δωματίου και απόρριψη του υπερκείμενου υγρού.
- 9) Έντονη ανάδευση του ιζήματος, προσθήκη 1 ml RPMI και μεταφορά του διαλύματος σε σωληνάριο τύπου erppendorf. Μέτρηση των ζωντανών κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο.



Για τη μέτρηση του αριθμού των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ειδική αντικειμενοφόρος πλάκα, γνωστή και ως αιμοκυτταρόμετρο (haemocytometer), με την οποία είναι δυνατή η μέτρηση κυττάρων που βρίσκονται σε εναιώρημα.

Το αιμοκυτταρόμετρο (**Εικόνα 7Α**) περιέχει ένα ή δύο πλέγματα μέτρησης κυττάρων. Κάθε πλέγμα υποδιαιρείται σε 9 μεγάλα τετράγωνα με πλευρές μήκους 1 mm. Τα μεγάλα γωνιακά εξωτερικά τετράγωνα υποδιαιρούνται σε 16 μικρότερα τετράγωνα, καθένα από τα οποία έχει πλευρές με μήκος 0,25 mm. Το μεγάλο κεντρικό τετράγωνο υποδιαιρείται σε 25 μικρά τετράγωνα, καθένα από τα οποία έχει μήκος πλευράς 0,20 mm. Κάθε ένα από τα 25 μικρότερα τετράγωνα υποδιαιρείται σε 16 ακόμα μικρότερα τετράγωνα. Επομένως, το κεντρικό τετράγωνο περιέχει  $16 \times 25 = 400$  πολύ μικρά τετράγωνα, καθένα από τα οποία έχει πλευρές μήκους 0,05 mm.



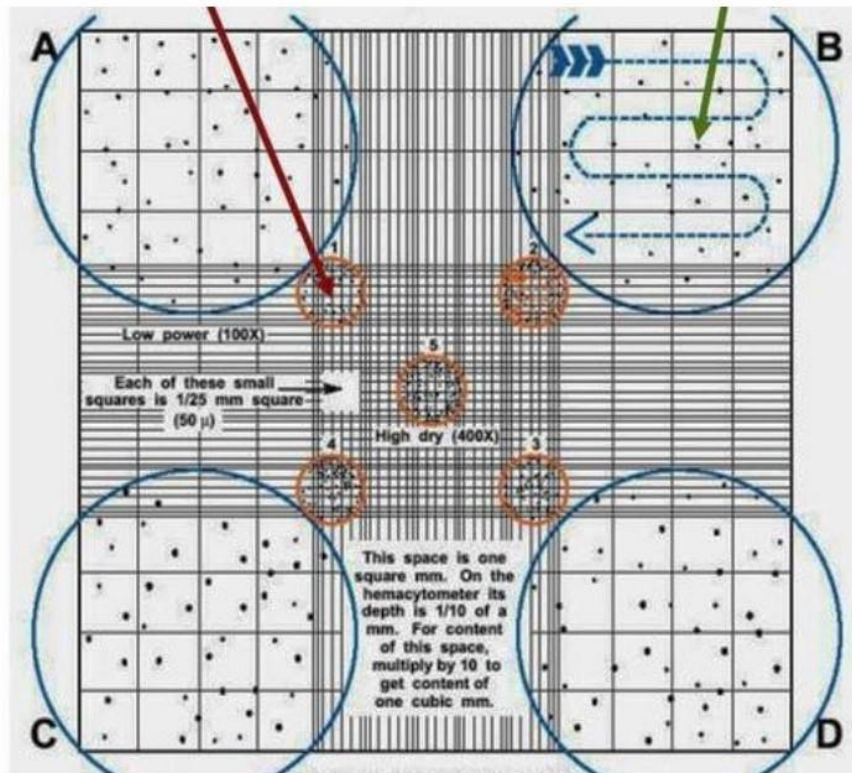
**Εικόνα 7.** Α. Αιμοκυτταρόμετρο με δύο πλέγματα μέτρησης. Β. Πλάγια όψη του αιμοκυτταρόμετρου.

Το επίπεδο κάθε πλέγματος είναι 0,1 mm χαμηλότερα απ' ότι το επίπεδο στήριξης της καλυπτρίδας (**Εικόνα 7Β**). Επομένως μεταξύ πλέγματος και καλυπτρίδας δημιουργείται ένας χώρος, ύψους 0,1 mm, στον οποίο εισέρχεται το εναιώρημα των κυττάρων. Στα 5 μικρά τετράγωνα του κεντρικού τετραγώνου γίνεται η μέτρηση μικρών κυττάρων (π.χ. ερυθρά αιμοσφαίρια), ενώ στα 4 μεγάλα ακραία τετράγωνα (**Εικόνα 8**, μπλε τετράγωνα) γίνεται η μέτρηση των λευκών αιμοσφαιρίων. Ο όγκος των τεσσάρων γωνιακών 16αδων είναι:

$$0,1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ cm}^3 = 10^{-4} \text{ ml}$$

Επομένως αν είναι N ο μέσος αριθμός κυττάρων που υπάρχουν σε κάθε μια από τις γωνιακές 16αδες τότε η συγκέντρωση των κυττάρων είναι:

$$M \text{ κύτταρα} / 10^{-4} \text{ ml} = M \times 10^4 \text{ κύτταρα} / \text{ml}$$



**Εικόνα 8.** Μεγεθυμένη άποψη του πλέγματος μέτρησης. Α, Β, C, D με όγκο  $10^{-4}$  ml (μπλε κύκλοι στις γωνίες). 1, 2, 3, 4, 5 με όγκο  $4 \times 10^{-6}$  ml (πορτοκαλί κύκλοι στο κέντρο). Από τα κύτταρα που εφάπτονται στη περίμετρο, μετρούμε μόνον εκείνα που υπάρχουν στην επάνω και στην αριστερή πλευρά του κάθε τετραγώνου. Πηγή:

<https://eclass.upatras.gr/modules/document/file.php/BIO297/%CE%9D%CE%BF%203%20%CE%9C%CE%AD%CF%84%CF%81%CE%B7%CF%83%CE%B7%20%CE%BA%CF%85%CF%84%CF%84%CE%B1%CF%81%CE%B9%CE%BA%CE%BF%CF%8D%20%CF%80%CE%BB%CE%B7%CE%B8%CF%85%CF%83%CE%BC%CE%BF%CF%8D.pdf>

10) Επανάληψη της προηγούμενης φυγοκέντρωσης σε θερμοκρασία δωματίου και απόρριψη του υπερκείμενου υγρού.



### 5.3 Απομόνωση RNA

- 1) Προσθήκη 2-3 ml TRIzol στο σωληνάριο τύπου eppendorf με το ίζημα των κυττάρων. Ανάδευση, ομογενοποίηση και αποθήκευση στους -80 °C. Το TRIzol είναι ένα πλήρες, έτοιμο προς χρήση αντιδραστήριο για την απομόνωση ολικού RNA υψηλής ποιότητας.
- 2) Προσθήκη 250 µl χλωροφορμίου για κάθε 1200 µl TRIzol και έντονη ανάδευση. Η προσθήκη του χλωροφορμίου θα οδηγήσει στη δημιουργία ενός διφασικού δείγματος.
- 3) Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 4 °C για 15 min στις 13000 rpm. Μεταφορά του υπερκείμενου υγρού σε σωληνάριο eppendorf όγκου 1.5 ml. Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης για την κατακρήμνιση του RNA. Ελαφριά ανακίνηση του σωληναρίου και αποθήκευση στους -20 °C για 14 με 18 ώρες.
- 4) Φυγοκέντρηση στους 4 °C για 20 min στις 12000 rpm. Αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού.
- 5) Προσθήκη 800 µl αιθανόλης 70% και ανάδευση με πιπέτα.
- 6) Φυγοκέντρηση στους 4 °C για 10 min στις 12000 rpm. Αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού.
- 7) Προσθήκη 800 µl αιθανόλης 100%. Ελαφριά ανάδευση με πιπέτα.
- 8) Φυγοκέντρηση στους 4 °C για 10 min στις 12.000 rpm. Απόρριψη του υπερκείμενου υγρού και αποξήρανση του δείγματος με σκοπό την εξάτμιση των υπολειμμάτων αιθανόλης.
- 9) Διάλυση του ιζήματος RNA σε 33 µl ddH<sub>2</sub>O. Ανάδευση με πιπέτα και αποθήκευση στους -80 °C.

### 5.4 Ποσοτικός Προσδιορισμός του RNA

Αφού απομονώθηκε επιτυχώς το ολικό RNA των μονοπύρηνων κυττάρων, ελέγχθηκε η ακεραιότητά του και υπολογίστηκε η συγκέντρωσή του. Αρχικά, 1 µl ολικού RNA από κάθε δείγμα ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 1% (w/v) (Agarose Molecular biology grade, AG02, NIPPON Genetics). Σκοπός της συγκεκριμένης διαδικασίας ήταν η εκτίμηση της ακεραιότητας του RNA και ο εντοπισμός πιθανής πρόσμιξης από γενωμικό DNA. Στις περιπτώσεις δειγμάτων RNA καλής ποιότητας, η ηλεκτροφόρηση καθιστά ευδιάκριτες δύο ζώνες που αντιστοιχούν στα ριβοσωμικά RNA 18S και 28S. Αν τα μόρια RNA είναι αποδομημένα (degraded), τότε παρατηρούνται ζώνες ποικίλου μεγέθους. Τέλος, αν υπάρχει πρόσμιξη από γενωμικό DNA θα φαίνεται παράλληλα μία ζώνη σε ύψος πολύ μεγαλύτερο από τη ζώνη του 28S RNA.

Εφόσον οι εικόνες της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων της ομάδας μελέτης δεν υπέδειξαν την παρουσία προσμίξεων και αποδόμησης, το βήμα που ακολούθησε ήταν ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA μέσω φωτομέτρησης.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο BioSpec Nano Spectrophotometer for Life Sciences (Shimadzu, Kyoto, Japan). Συγκεκριμένα, 1  $\mu$ l κάθε δείγματος RNA τοποθετήθηκε στην ειδική κεφαλή του φωτομέτρου. Στη συνέχεια, το μηχανήμα δημιουργεί μια «κυψελίδα» εξαιτίας της επιφανειακής τάσης και πραγματοποιεί τις μετρήσεις με τη βοήθεια ενός λαμπτήρα ξένου (xenon). Το φως συγκεκριμένου μήκους κύματος διαπερνά κάθετα την κυψελίδα και η απορρόφηση μετريέται από το φωτόμετρο. Για να μειωθεί η πιθανότητα σφάλματος, η συγκέντρωση του RNA θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 40 ng/ $\mu$ l. Η καθαρότητα υπολογίζεται μέσω του λόγου απορρόφησης του δείγματος στα 260nm προς εκείνη στα 280nm, ο οποίος στα δείγματα RNA υψηλής ποιότητας και καθαρότητας λαμβάνει μια τιμή μεταξύ 1,8 και 2. Επιπλέον, το φάσμα απορρόφησης που εμφανίζεται στο λογισμικό του μηχανήματος θα πρέπει να έχει ομαλές καμπύλες και άκρα σε συγκεκριμένα nm ώστε να θεωρείται ότι δεν υπάρχουν προσμίξεις.

### 5.5 Σύνθεση cDNA

Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιήθηκε μέσω της διαδικασίας της αντίστροφης *in vitro* μεταγραφής (reverse transcription, RT) χρησιμοποιώντας ως εκκινητές ολιγονουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας [oligo (dT) primers].

Κάθε αντίδραση είχε τελικό όγκο 20  $\mu$ l, ενώ τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν και οι αντίστοιχες ποσότητες δίνονται στον **Πίνακα 1**. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ήταν η αντίστροφη μεταγραφάση FireScript. Για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκαν επίσης RT buffer (10x) με DDT, μίγμα dNTP (20Mm) και αναστολέας RNAασών (40 U/ $\mu$ l). Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε ολικό RNA.

Ανάλογα με τη συγκέντρωση του κάθε δείγματος χρησιμοποιήθηκε μέγιστη ποσότητα 8  $\mu$ l RNA. Οι θερμικές συνθήκες της αντίδρασης δίνονται στον **Πίνακα 2**.

| Αντιδραστήριο                                                         | Ποσότητα (ανά αντίδραση)      |
|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Firescript Enzyme                                                     | 1 $\mu$ l                     |
| RT buffer 10X (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> ) | 2 $\mu$ l                     |
| RNAase (40 U/ $\mu$ l)                                                | 0,5 $\mu$ l                   |
| dNTPs(20mM)                                                           | 0,5 $\mu$ l                   |
| Random Primers                                                        | 1 $\mu$ l                     |
| RNA Sample                                                            | 8 $\mu$ l (μέγιστη ποσότητα)  |
| ddH <sub>2</sub> O                                                    | 7 $\mu$ l (ελάχιστη ποσότητα) |
| Final volume.                                                         | 20 $\mu$ l                    |

**Πίνακας 1.** Αντιδραστήρια για τη διαδικασία σύνθεσης cDNA.

| Θερμοκρασία | Διάρκεια        | Αριθμός κύκλων | Περιγραφή                                                 |
|-------------|-----------------|----------------|-----------------------------------------------------------|
| 65°C        | 5 min           | 1              | Αποδιάταξη δευτεροταγών δομών στο RNA                     |
| 35°C        | 5 - 10 min      | 1              | Υβριδισμός εκκινητών στο RNA                              |
| 52°C        | 29 min          | 1              | Σύνθεση cDNA από το RNA με χρήση αντίστροφης μεταγραφάσης |
| 83°C        | 5 - 15 min      | 1              | Απενεργοποίηση του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης       |
| 4°C         | Αόριστος χρόνος | 1              | Διατήρηση του cDNA                                        |

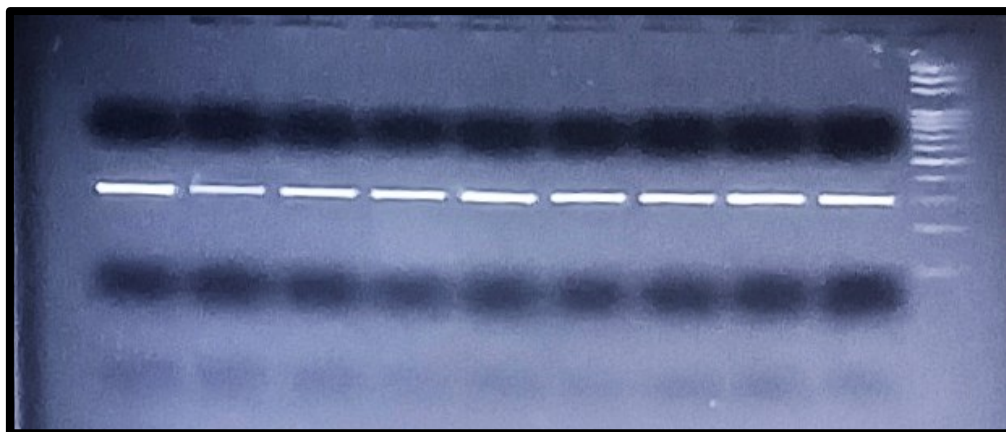
**Πίνακας 2.** Συνθήκες της αντίδρασης PCR για την σύνθεση της cDNA από το απομονωμένο RNA.

### 5.6 PCR για την ενίσχυση του γονιδίου αναφοράς

Για την εξακρίβωση της επιτυχίας της σύνθεσης cDNA πραγματοποιήθηκε PCR με ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο της ακτίνης. Η ακτίνη είναι μια σημαντική πρωτεΐνη που εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα των κυττάρων και χαρακτηρίζεται από την ικανότητά της να πολυμερίζεται σχηματίζοντας ελικοειδή νημάτια (F-ακτίνη). Στο κυτταρόπλασμα η ακτίνη αποτελεί μέρος του κυτταροσκελετού, ενώ στον πυρήνα του

κυττάρου έχει σημαντικό ρόλο στη γονιδιακή έκφραση και τη διατήρηση της γονιδιωματικής ακεραιότητας (Ulferts et al., 2021 | Kyheroinen et al., 2022).

Οι ειδικοί εκκινητές σχεδιάστηκαν έτσι ώστε ο ένας να υβριδίζεται στο τέλος του 1<sup>ου</sup> εξωνίου και ο άλλος στο 2<sup>ο</sup> εξώνιο. Με αυτό τον τρόπο, το τμήμα DNA που παρεμβάλλεται μεταξύ των θέσεων υβριδισμού των εκκινητών περιέχει και το πρώτο εσώνιο του γονιδίου. Το συγκεκριμένο εσώνιο έχει μεγάλο μέγεθος, με αποτέλεσμα οι περιοχές υβριδισμού των εκκινητών να απέχουν μεταξύ τους στο γονιδίωμα περίπου 17.000 bp. Επομένως, είναι αδύνατη η ενίσχυση μέσω PCR του σχετικού τμήματος σε επίπεδο DNA. Αντίθετα, στο επίπεδο mRNA η διαδικασία της συρραφής θα έχει οδηγήσει στην απομάκρυνση του εσωνίου και οι περιοχές υβριδισμού των εκκινητών θα απέχουν μεταξύ τους μόνο 253bp (μέγεθος του προϊόντος PCR). Επιπλέον, το τελικό προϊόν PCR μπορεί να ελεγχθεί μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αгарόζης περιεκτικότητας 2% (Εικόνα 9).



**Εικόνα 9.** Αποτελέσματα της PCR για το γονίδιο αναφοράς (ακτίνη) μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 2%.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της αλληλουχίας του γονιδίου της ακτίνης ήταν οι εξής:

- 5' - GGTGCCTCCCTACGCCTTCT - 3'
- 5' - GGCGCTGACCCCATAGTGGT - 3'

### **5.7 PCR ενίσχυσης των κλωνικών αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών**

Η ενίσχυση της μεταβλητής περιοχής της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών πραγματοποιήθηκε με PCR με τη χρήση συναινετικών εκκινητών (consensus primers), ειδικών για την περιοχή οδηγό (leader sequence) που εντοπίζεται ανοδικά κάθε γονιδίου IGHV, καθώς

και εκκινητών ειδικών για τα γονίδια IGHJ. Οι 5' συναινετικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι αντιπροσωπευτικοί για καθεμιά από τις υποομάδες των γονιδίων IGHV (IGHV1 – IGHV6 / ο εκκινητής VHL1 λειτουργεί και για την υποομάδα IGHV7). Αντίστοιχα, οι 3' συναινετικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι αντιπροσωπευτικοί για καθένα από τα έξι γονίδια IGHJ (IGHJ1 – IGHJ6) (**Πίνακας 3**). Για την αντίδραση της PCR χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια που αναφέρονται στον **Πίνακα 3**, ενώ ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 40  $\mu$ l.

| Αντιδραστήριο                                                     | Ποσότητα (ανά αντίδραση) |
|-------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| δείγμα cDNA                                                       | 5 $\mu$ l                |
| 10x PCR buffer [Invitrogen, 200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl] | 4 $\mu$ l                |
| MgCl <sub>2</sub> (50 mM)                                         | 3 $\mu$ l                |
| dNTPs (10mM)                                                      | 1 $\mu$ l                |
| Μίγμα εκκινητών VHL 1-6 (10 pm/ $\mu$ l)                          | 3 $\mu$ l                |
| Μίγμα εκκινητών IGHJ                                              | 3 $\mu$ l                |
| ddH <sub>2</sub> O                                                | 24,8 $\mu$ l             |
| Taq πολυμεράση (5 U/ $\mu$ l)                                     | 0,5 $\mu$ l              |
| Τελικός όγκος                                                     | 40 $\mu$ l               |

**Πίνακας 3.** Συστατικά για την αντίδραση PCR για την ενίσχυση των κλωνικών αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση κλωνικών αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών δίνονται στον **Πίνακα 4**, ενώ οι συνθήκες της αντίδρασης δίνονται στον **Πίνακα 5**.

| IGHV leader εκκινητές | Αλληλουχία 5' – 3'                  |
|-----------------------|-------------------------------------|
| IGHV1L                | AAATCGATACCACCATGGACTGGACCTGGAGG    |
| IGHV2L                | AAATCGATACCACCATGGACATACTTTGTTCCAC  |
| IGHV3aL               | AAATCGATACCACCACCATGGAGTTTGGGCTGAGC |
| IGHV3bL               | AAATCGATACCACCACCATGGA              |
| IGHV4L                | AAATCGATACCACCATGAAACACCTGTGGTTCTT  |
| IGHV5L                | AAATCGATACCACCATGGGGTCAACCGCCATC    |
| IGHV6L                | AAATCGATACCACCATGTCTGTCTCCTTCCTC    |
| IGHJ εκκινητές        | Αλληλουχία 5' – 3'                  |
| IGHJ                  | CTTACCTGAGGAGACGGTGACC              |

**Πίνακας 4.** Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αντίδραση PCR για την ενίσχυση των κλωνικών αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών.

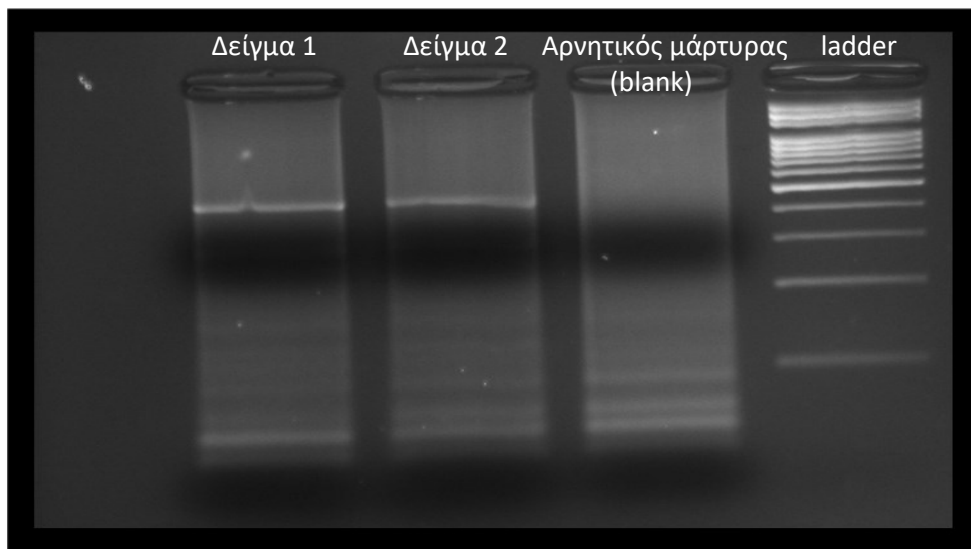
| Θερμοκρασία | Διάρκεια | Αριθμός κύκλων | Περιγραφή                |
|-------------|----------|----------------|--------------------------|
| 94 °C       | 3 min    | 1              | ενεργοποίηση πολυμεράσης |
| 94 °C       | 30 sec   | 39             | αποδιάταξη               |
| 59 °C       | 1 min    |                | υβριδισμός               |
| 72 °C       | 1 min    |                | επιμήκυνση               |
| 72 °C       | 10 min   | 1              | τελική επιμήκυνση        |
| 18 °C       | ∞        | 1              | διατήρηση                |

**Πίνακας 5.** Συνθήκες της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση των κλωνικών αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών.

### 5.8 Καθαρισμός των προϊόντων PCR

Τα προϊόντα PCR υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης χαμηλού σημείου τήξης, περιεκτικότητας 2-3%. Η ζώνη που αντιστοιχούσε στη μονοκλωνική αναδιάταξη IGHV-IGHD-IGHJ (την αναδιάταξη που αντιστοιχούσε στη βαριά αλυσίδα του BκY IG που

εκφράζεται από τα λευχαιμικά κύτταρα) αντιστοιχούσε σε μέγεθος 400-450 ζευγών βάσεων (Εικόνα 10).

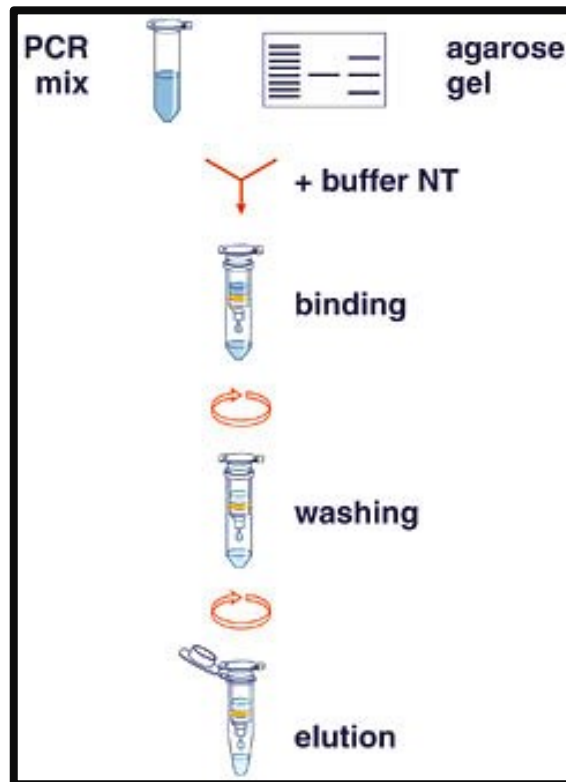


**Εικόνα 10.** Προϊόντα PCR των κλωνικών αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών.

Η συγκεκριμένη ζώνη αφαιρέθηκε από την πηκτή με τη χρήση χειρουργικού νυστεριού και ο καθαρισμός του προϊόντος PCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit, σύμφωνα με το ενδεδειγμένο πρωτόκολλο (Εικόνα 11):

- 1) Για κάθε 150 mg του τμήματος αγαρόζης που αφαιρέθηκε, προστέθηκαν 300 µl από το αντιδραστήριο NT1 σε σωληνάριο τύπου eppendorf.
- 2) Το σωληνάριο με την απομονωμένη ζώνη αγαρόζης και το αντιδραστήριο NT1 τοποθετήθηκε στο υδατόλουτρο στους 50-55°C για 3-5 min μέχρι το χρονικό σημείο που έλιωσε η αγαρόζη. Πραγματοποιήθηκε ανάδευση με Vortex ανά 1 min, μέχρι την πλήρη ομογενοποίηση της αγαρόζης με το αντιδραστήριο NT1.
- 3) Μεταφορά του διαλύματος σε μια καθαρή στήλη του kit (μέγιστος όγκος 500 µl).
- 4) Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 sec στις 11.000 rpm.
- 5) Απόρριψη του υγρού που διαπέρασε τη στήλη.
- 6) Προσθήκη 500 µl από το buffer NT3 του kit.
- 7) Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 sec στις 11.000 rpm.
- 8) Απόρριψη του υγρού που διαπέρασε τη στήλη.
- 9) Προσθήκη 300 µl από το buffer NT3 του kit.
- 10) Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min στις 11.000 rpm.

- 11) Μεταφορά της στήλης σε καθαρό σωληνάριο τύπου erppendorf.
- 12) Προσθήκη 12  $\mu$ l από το buffer Nt3 του kit.
- 13) Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min στις 11.000 rpm.



**Εικόνα 11.** Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας καθαρισμού των προϊόντων PCR.

### 5.9 Ανάλυση ποιότητας και ποσότητας των καθαρών προϊόντων PCR

Έπειτα από την απομόνωση του τελικού προϊόντος από τη στήλη, το προϊόν ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 2%. Επίσης, για πιο ακριβή αποτελέσματα το καθαρισμένο προϊόν κάθε δείγματος φωτομετρήθηκε στο φασματοφωτόμετρο BioSpec Nano Spectrophotometer for Life Sciences (Shimadzu, Kyoto, Japan). Συγκεκριμένα, 1  $\mu$ l κάθε δείγματος καθαρισμένου προϊόντος PCR τοποθετήθηκε στην ειδική κεφαλή του φωτομέτρου, όπως και στη φωτομέτρηση των δειγμάτων RNA. Λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης των δειγμάτων, τα καθαρισμένα προϊόντα PCR υποβλήθηκαν σε επαναληπτική αντίδραση ενίσχυσης με 38 κύκλους (Πίνακες 6 & 7).



| Αντιδραστήριο                                                     | Ποσότητα (ανά αντίδραση) |
|-------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Προϊόν PCR                                                        | 10 $\mu$ l               |
| 10x PCR buffer [Invitrogen, 200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl] | 4 $\mu$ l                |
| MgCl <sub>2</sub> (50 mM)                                         | 3 $\mu$ l                |
| dNTPs (10mM)                                                      | 1 $\mu$ l                |
| Μίγμα εκκινητών VHL 1-6 (10 pm/ $\mu$ l)                          | 3 $\mu$ l                |
| Μίγμα εκκινητών IGHJ                                              | 3 $\mu$ l                |
| ddH <sub>2</sub> O                                                | 19,8 $\mu$ l             |
| Taq πολυμεράση (5 U/ $\mu$ l)                                     | 0,5 $\mu$ l              |
| Τελικός όγκος                                                     | 40 $\mu$ l               |

**Πίνακας 6.** Αντιδραστήρια για την αντίδραση ενίσχυσης με PCR των καθαρισμένων προϊόντων PCR των κλωνικών αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών.

| Θερμοκρασία | Διάρκεια | Αριθμός κύκλων | Περιγραφή                |
|-------------|----------|----------------|--------------------------|
| 94 °C       | 3 min    | 1              | ενεργοποίηση πολυμεράσης |
| 94 °C       | 30 sec   | 38             | αποδιάταξη               |
| 59 °C       | 1 min    |                | υβριδισμός               |
| 72 °C       | 1 min    |                | επιμήκυνση               |
| 72 °C       | 10 min   | 1              | τελική επιμήκυνση        |
| 18 °C       | $\infty$ | 1              | διατήρηση                |

**Πίνακας 7.** Συνθήκες αντίδρασης της ενίσχυσης με PCR των καθαρισμένων προϊόντων PCR των κλωνικών αναδιατάξεων IGHV-IGHD-IGHJ της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών.

### 5.10 PCR ενίσχυσης των κλωνικών αναδιατάξεων IGLV-IGLJ της ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών

Οι κλωνικές αναδιατάξεις της μεταβλητής περιοχής της ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών ενισχύθηκαν και αυτές με την τεχνική PCR. Για την ενίσχυση των

αναδιατάξεων IGKV-J της κ ελαφριάς αλυσίδας χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές VK1-6 και οι JK1-5 στη μορφή ισομοριακού μίγματος (**Πίνακας 8**). Οι εκκινητές VK1-6 είναι αντιπροσωπευτικοί για καθεμιά από τις έξι υποομάδες γονιδίων IGKV (υβριδίζονται στην περιοχή FR1 των γονιδίων IGKV), ενώ οι εκκινητές JK1-5 είναι αντιπροσωπευτικοί για τα γονίδια IGKJ, αντίστοιχα. Στις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το cDNA που συντέθηκε από το ολικό RNA κάθε δείγματος της μελέτης. Τα αντιδραστήρια δίνονται στον **Πίνακα 9**, ενώ οι συνθήκες της αντίδρασης δίνονται στον **Πίνακα 10**.

| IGKV FR1 εκκινητές | Αλληλουχία 5' – 3'       |
|--------------------|--------------------------|
| VK1                | GACATCCAGATGACCCAGTCTCC  |
| VK2                | GATGTTGTGATGACTCAGTCTCC  |
| VK3                | GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCC  |
| VK4                | GACATCGTGATGACCCAGTCTCC  |
| IVK5               | GAAACGACACTCACGCAGTCTCC  |
| VK6                | GAAATTGTGCTGACTCAGTCTTCC |
| IGKJ εκκινητές     | Αλληλουχία 5' – 3'       |
| JK1                | ACGTTTGATTTCCACCTTGGTCCC |
| JK2                | ACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC |
| JK3                | ACGTTTGATATCCACTTTGGTCCC |
| JK4                | ACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCC |
| JK5                | ACGTTTAATCTCCAGTCGTGTCCC |

**Πίνακας 8.** Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αντίδραση της PCR για την ενίσχυση των κλωνικών αναδιατάξεων IGKV-J της ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών.

| Αντιδραστήριο                                                     | Ποσότητα (ανά αντίδραση) |
|-------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Δείγμα cDNA                                                       | 8 $\mu$ l                |
| 10x PCR buffer [Invitrogen, 200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl] | 4 $\mu$ l                |
| MgCl <sub>2</sub> (50 mM)                                         | 2 $\mu$ l                |
| dNTPs (10mM)                                                      | 1 $\mu$ l                |
| Μίγμα εκκινητών VK1-6 (10 pm/ $\mu$ l)                            | 3 $\mu$ l                |
| mixΜίγμα εκκινητών JK1-5                                          | 3 $\mu$ l                |
| ddH <sub>2</sub> O                                                | 18,5 $\mu$ l             |
| Taq polymerase (5 U/ $\mu$ l)                                     | 0,5 $\mu$ l              |
| Τελικός όγκος                                                     | 40 $\mu$ l               |

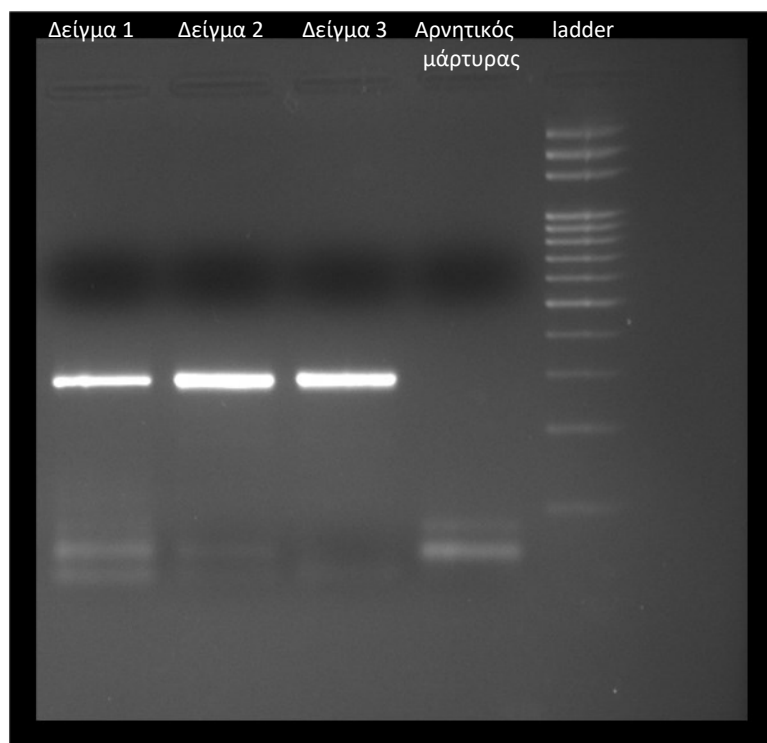
**Πίνακας 9.** Αντιδραστήρια για την ενίσχυση με PCR των κλωνικών αναδιατάξεων IGKV-J της ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών.

| Θερμοκρασία | Διάρκεια | Αριθμός κύκλων | Περιγραφή                |
|-------------|----------|----------------|--------------------------|
| 95 °C       | 3 min    | 1              | ενεργοποίηση πολυμεράσης |
| 95 °C       | 1 min    | 39             | αποδιάταξη               |
| 59 °C       | 1 min    |                | υβριδισμός               |
| 72 °C       | 1 min    |                | επιμήκυνση               |
| 72 °C       | 10 min   | 1              | τελική επιμήκυνση        |
| 18 °C       | $\infty$ | 1              | διατήρηση                |

**Πίνακας 10.** Συνθήκες αντίδρασης της ενίσχυσης με PCR των κλωνικών αναδιατάξεων IGKV-J της ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών.

### 5.11 Καθαρισμός των προϊόντων PCR των κλωνικών αναδιατάξεων IGKV/IGKJ της ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών

Τα προϊόντα PCR υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης χαμηλού σημείου τήξης, περιεκτικότητας 2-3%. Η ζώνη που αντιστοιχούσε στη μονοκλωνική αναδιάταξη αντιστοιχούσε στα 300-350 ζεύγη βάσεων (**Εικόνα 12**).



**Εικόνα 12.** Ποιοτικά αποτελέσματα της PCR των κλωνικών αναδιατάξεων IGKV-J της ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών.

### **5.12 Ανάλυση ποιότητας και ποσότητας των καθαρών προϊόντων PCR**

Όπως και στην περίπτωση της ενίσχυσης των αναδιατάξεων της βαριάς αλυσίδας, τα προϊόντα PCR υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης χαμηλού σημείου τήξης περιεκτικότητας 2-3%. Στη συνέχεια ακολούθησε ο καθαρισμός τους από το πήκτωμα. Τα καθαρισμένα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν ξανά σε πήκτωμα αгарόζης περιεκτικότητας 2%. Λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης των δειγμάτων, τα καθαρισμένα προϊόντα PCR υποβλήθηκαν σε επαναληπτική αντίδραση ενίσχυσης στους 38 κύκλους (**Πίνακες 11 & 12**).

| Αντιδραστήριο                                                     | Ποσότητα (ανά αντίδραση) |
|-------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Δείγμα cDNA                                                       | 10 $\mu$ l               |
| 10x PCR buffer [Invitrogen, 200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl] | 4 $\mu$ l                |
| MgCl <sub>2</sub> (50 mM)                                         | 2 $\mu$ l                |
| dNTPs (10mM)                                                      | 1 $\mu$ l                |
| Μίγμα εκκινητών VK1-6 (10 pm/ $\mu$ l)                            | 3 $\mu$ l                |
| Μίγμα εκκινητών JK1-5                                             | 3 $\mu$ l                |
| ddH <sub>2</sub> O                                                | 16,5 $\mu$ l             |
| Taq polymerase (5 U/ $\mu$ l)                                     | 0,5 $\mu$ l              |
| Τελικός όγκος                                                     | 40 $\mu$ l               |

**Πίνακας 11.** Αντιδραστήρια για την αντίδραση ενίσχυσης με PCR των καθαρισμένων προϊόντων PCR των κλωνικών αναδιατάξεων IGKV-J της ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών.

| Θερμοκρασία | Διάρκεια | Αριθμός κύκλων | Περιγραφή                |
|-------------|----------|----------------|--------------------------|
| 95 °C       | 3 min    | 1              | ενεργοποίηση πολυμεράσης |
| 95 °C       | 1 min    | 38             | αποδιάταξη               |
| 59 °C       | 1 min    |                | υβριδισμός               |
| 72 °C       | 1 min    |                | επιμήκυνση               |
| 72 °C       | 10 min   | 1              | τελική επιμήκυνση        |
| 18 °C       | $\infty$ | 1              | διατήρηση                |

**Πίνακας 12.** Συνθήκες αντίδρασης της ενίσχυσης με PCR των καθαρισμένων προϊόντων PCR των κλωνικών αναδιατάξεων IGKV-J της ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών.

### 5.13 Αλληλούχηση των προϊόντων PCR για τις αναδιατάξεις της βαριάς αλυσίδας κατά Sanger

- Ο καθορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων PCR πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο κατά Sanger στο μηχάνημα ABI3730xl.

Η τεχνική της αλληλούχησης κατά Sanger, γνωστή επίσης ως "μέθοδος τερματισμού αλυσίδας", αναπτύχθηκε από τον Frederick Sanger και την ομάδα του το 1977. Συνήθως, αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για την προσδιορισμό αλληλουχίας τμημάτων DNA μικρότερων από 1.000 βάσεις.

Η αλληλούχηση κατά Sanger θεωρείται ως το «χρυσό πρότυπο» με ακρίβεια αλληλούχησης βάσης 99.99% και χρησιμοποιείται για την επιβεβαίωση γενετικών παραλλαγών. Επίσης, εφαρμόστηκε στο Πρόγραμμα Αλληλούχησης του Ανθρώπινου Γονιδιώματος για την ανάλυση της αλληλουχίας μικρών τμημάτων ανθρώπινου DNA, με μέγεθος 900 βάσεων ή μικρότερων. Κατά την αλληλούχηση, ένας συμπληρωματικός εκκινητής DNA χρησιμοποιείται ως σημείο εκκίνησης, ενώ η πολυμεράση επεκτείνει το τμήμα του εκκινητή προσθέτοντας συμπληρωματικά τετραφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs). Η αντίδραση τερματίζεται μέσω της χρήσης τετραφωσφορικών διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs) που είναι συνδεδεμένα με φθορίζουσες χρωστικές.

Από τη διαδικασία αυτή προκύπτουν τμήματα DNA διαφορετικού μεγέθους λόγω του τερματισμού της αντίδρασης σε κάθε πιθανή θέση. Στη συνέχεια, τα μόρια DNA διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους σε ηλεκτρικό πεδίο, και ο ανιχνευτής καταγράφει την ένταση και το σήμα του φθορισμού από κάθε μόριο DNA, παρέχοντας μια σειρά κορυφών που αντιστοιχούν στην αλληλουχία του.

#### **5.14 Προετοιμασία δεδομένων**

Στο πλαίσιο του αρχικού πειραματικού σχεδιασμού θα πραγματοποιούνταν η παράλληλη ανάλυση των αναδιατάξεων τόσο της βαριάς όσο και της ελαφριάς αλυσίδας (κ ή λ) του κλωνοτυπικού BκΥ κάθε ασθενούς, με σκοπό την πληρέστερη καταγραφή και δομική αξιολόγηση του ανοσολογικού ρεπερτορίου. Ωστόσο, κατά την πειραματική φάση της εργασίας διαπιστώθηκε ότι η ποιότητα της αλληλούχησης των προϊόντων PCR για τις ελαφριές αλυσίδες δεν ήταν ικανοποιητική. Οι αναλύσεις παρήγαγαν δεδομένα μειωμένης ευκρίνειας και ανεπαρκές σήμα, καθιστώντας την περαιτέρω επεξεργασία τους επισφαλή και ενδεχομένως παραπλανητική. Λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα αυτά, κρίθηκε σκόπιμο να μη χρησιμοποιηθούν τα δεδομένα που αφορούσαν τις ελαφριές αλυσίδες από την παρούσα εργασία. Ως εκ τούτου, η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε βασίστηκε αποκλειστικά στα αποτελέσματα της αλληλούχησης των προϊόντων PCR για τις αναδιατάξεις της βαριάς αλυσίδας. Αξίζει να σημειωθεί ότι η βαριά αλυσίδα έχει τον κυρίαρχο ρόλο στην ποικιλομορφία και την ειδικότητα του BκΥ, καθώς αφορά στο μεγαλύτερο τμήμα της δομής

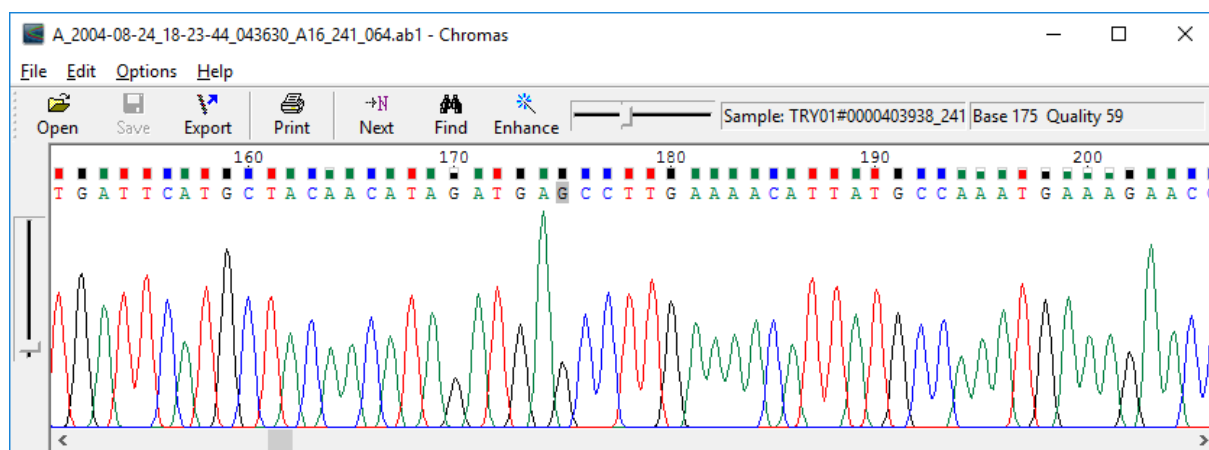
του (Schatz et al., 2011). Επομένως, η επικέντρωση στην ανάλυση της βαριάς αλυσίδας αναμένεται να παρέχει επαρκή πληροφορία για τη μελέτη της δομής του BκΥ.

## 5.15 Βιοπληροφορική Ανάλυση δεδομένων

### 5.15.1 Εργαλείο Chromas

Το εργαλείο Chromas είναι ένα λογισμικό που έχει σχεδιαστεί με σκοπό την ανάλυση αλληλουχιών DNA. Επιτρέπει την προβολή και την επεξεργασία μιας ακολουθίας χρωματογραφημάτων που λαμβάνονται από διάφορες πλατφόρμες αλληλούχησης. Το λογισμικό επιτρέπει στους χρήστες να «πλοηγούνται» στα χρωματογραφήματα (**Εικόνα 13**), να διαχωρίζουν τις κορυφές και να παρατηρούν τις βάσεις με λεπτομέρεια. Αυτό τονίζεται από το γεγονός ότι είναι επίσης σε θέση να διαβάσει τις πιο κοινές μορφές αρχείων, όπως SCF και ABIF, και είναι επίσης συμβατό με το ZTR, ένα εξαιρετικά δημοφιλές sequencer.

Παρέχει τυπικά βοηθητικά εργαλεία, όπως τη χρήση περικοπής, εκτύπωσης και εξαγωγής ακολουθιών σε διάφορες μορφές.



**Εικόνα 13.** Παράδειγμα χρωματογραφήματος ενός προϊόντος PCR των κλωνικών αναδιατάξεων IGKV-J της ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών.

### 5.15.2 IMGT/V-QUEST

Το IMGT/V-QUEST είναι ένα ευρέως αναγνωρισμένο διαδικτυακό εργαλείο της βάσης δεδομένων IMGT (ImMunoGeneTics), που αποτελεί τη διεθνή αναφορά για την ανοσογενετική και την ανοσοπληροφορική. Αυτό το εργαλείο είναι εξειδικευμένο για την ανάλυση της μεταβλητής (V) περιοχής ανοσοσφαιρινών (IG) ή υποδοχέων T λεμφοκυττάρων (TκΥ). Είναι εξαιρετικά χρήσιμο για ερευνητές στην ανοσολογία και συναφείς τομείς, καθώς είναι σε θέση

να χαρακτηρίζει επακριβώς τις αναδιατάξεις των γονιδίων IG και TkY, οι οποίες είναι κρίσιμες για την προσαρμοστική ανοσολογική απόκριση.

Το εργαλείο παρέχει μια ενδελεχή ανάλυση αλληλουχίας που περιλαμβάνει την ανίχνευση των γονιδίων V, D και J, επιτρέποντας στους χρήστες να λάβουν τις πιο ολοκληρωμένες και λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη χρήση γονιδίων, τη ΣΥΜ και τις σχέσεις μεταξύ διαφορετικών αναδιατάξεων. Οι χρήστες εισάγουν στο εργαλείο τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των αναδιατάξεων, και στη συνέχεια το IMGT/V-QUEST παρουσιάζει τα αποτελέσματα με τη μορφή μιας φιλικής προς το χρήστη πλατφόρμας με γραφικές αναπαράστασεις και δεδομένα με δυνατότητα λήψης (**Εικόνα 14**).

#### A Result summary of 'Detailed view'

Example of a productive sequence

| Result summary:                                         | Productive IGH rearranged sequence (no stop codon and in frame junction) |                                |                                |
|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| V-GENE and allele                                       | IGHV5-51*01                                                              | score = 1327                   | identity = 95.83% (276/288 nt) |
| J-GENE and allele                                       | IGHJ3*02 (a)                                                             | score = 191                    | identity = 87.76% (43/49 nt)   |
| D-GENE and allele by IMGT/JunctionAnalysis              | IGHD1-26*01                                                              | D-REGION is in reading frame 3 |                                |
| [CDR1-IMGT.CDR2-IMGT.CDR3-IMGT] lengths and AA JUNCTION | [8.8.13]                                                                 | CARQGGSYPDADFIDW               |                                |

(a) Other possibilities: IGHJ6\*02 (highest number of consecutive identical nucleotides)

Example of an unproductive sequence

| Result summary:                                         | Unproductive IGH rearranged sequence (out of frame junction) |                                |                                |
|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| V-GENE and allele                                       | IGHV5-51*01                                                  | score = 1408                   | identity = 98.96% (285/288 nt) |
| J-GENE and allele                                       | IGHJ4*02                                                     | score = 66                     | identity = 75.00% (18/24 nt)   |
| D-GENE and allele by IMGT/JunctionAnalysis              | IGHD6-6*01                                                   | D-REGION is in reading frame 3 |                                |
| [CDR1-IMGT.CDR2-IMGT.CDR3-IMGT] lengths and AA JUNCTION | [8.8.X]                                                      | CANIPSLIAARRP##YW              |                                |

#### B Summary table of 'Synthesis view'

| Sequence ID | V-GENE and allele | Functionality              | V-REGION score | V-REGION identity % (nt) | J-GENE and allele | D-GENE and allele | D-REGION reading frame | CDR-IMGT lengths | AA JUNCTION          | JUNCTION frame |
|-------------|-------------------|----------------------------|----------------|--------------------------|-------------------|-------------------|------------------------|------------------|----------------------|----------------|
| seq1        | IGHV3-73*01       | Productive                 | 1240           | 91.50% (269/294 nt)      | IGHJ1*01 (a)      | IGHD3-10*01       | 3                      | [8.10.10]        | CVIRGDVYNRQW         | in frame       |
| seq2        | IGHV5-51*01       | Productive                 | 1210           | 91.32% (263/288 nt)      | IGHJ4*02          | IGHD2-15*01       | 2                      | [8.8.17]         | CVRRGYCSAGSCYDFVYW   | in frame       |
| seq3        | IGHV5-51*01       | Unproductive               | 1408           | 98.96% (285/288 nt)      | IGHJ4*02          | IGHD6-6*01        | 3                      | [8.8.X]          | CANIPSLIAARRP##YW    | out of frame   |
| seq4        | IGHV5-51*01       | Productive                 | 1300           | 94.79% (273/288 nt)      | IGHJ6*02          | IGHD3-10*01       | 2                      | [8.8.18]         | CARARGSGSYSSYYGVNDWW | in frame       |
| seq5        | IGHV5-51*01       | Productive                 | 1210           | 91.32% (263/288 nt)      | IGHJ4*02          | IGHD2-15*01       | 2                      | [8.8.17]         | CVRRGYCSAGSCYDFVYW   | in frame       |
| seq6        | IGHV5-51*01       | Unproductive (stop codons) | 1426           | 98.65% (287/288 nt)      | IGHJ4*02          | IGHD6-6*01        | 1                      | [8.8.16]         | CARRQKDSSTSFSEDFVYW  | in frame       |
| seq7        | IGHV5-51*01       | Productive                 | 1327           | 95.83% (276/288 nt)      | IGHJ3*02          | IGHD6-13*01       | 3                      | [8.8.14]         | CARGSGPEVPDAFDIW     | in frame       |
| seq8        | IGHV5-51*01       | Productive                 | 1327           | 95.83% (276/288 nt)      | IGHJ3*02 (a)      | IGHD1-26*01       | 3                      | [8.8.13]         | CARQGGSYPDADFIDW     | in frame       |
| seq9        | IGKV3-15*01       | Productive                 | 1291           | 98.06% (258/279 nt)      | IGKJ1*01          | -                 | -                      | [8.3.8]          | CQQYHYWPTF           | in frame       |
| seq10       | IGLV2-14*01       | Productive                 | 1408           | 98.96% (285/288 nt)      | IGLJ2*01          | -                 | -                      | [9.3.12]         | CSSYTSSTLGVWF        | in frame       |
| seq11       | IGLV2-14*01       | Productive                 | 1228           | 92.01% (265/288 nt)      | IGLJ3*02          | -                 | -                      | [9.3.10]         | CNSYTTDTWVWF         | in frame       |

(a) Other possibilities may be found, please check the alignments for this sequence in 'Detailed view'

**Εικόνα 14.** Παραδείγματα αποτελέσματος του εργαλείου IMGT/V-QUEST από την ανάλυση δεδομένων της παρούσας μελέτης.

### 5.15.3 SAbPred

Το εργαλείο SAbPred (Structural Antibody Prediction) παρέχει προβλέψεις για την τρισδιάστατη δομή των αντισωμάτων. Η διαδικασία λειτουργίας του SAbPred ξεκινά με την εισαγωγή από τον χρήστη της αλληλουχίας αμινοξέων της ανοσοσφαιρίνης, ξεχωριστά για τη βαριά και την ελαφριά αλυσίδα (**Εικόνα 15**). Μόλις εισαχθεί η αλληλουχία, το SAbPred προχωρά στον προσδιορισμό των διαφόρων περιοχών της ανοσοσφαιρίνης,



συμπεριλαμβανομένων των θέσεων πρόσδεσης και των περιοχών που καθορίζουν τη συμπληρωματικότητα (CDR), οι οποίες είναι σημαντικές για τη σύνδεση με το αντιγόνο. Στη συνέχεια, το εργαλείο χρησιμοποιεί υπολογιστικά μοντέλα και αλγορίθμους για να προβλέψει την τρισδιάστατη διάταξη των αμινοξέων. Η διαδικασία εκτιμά τις δυνάμεις που επηρεάζουν τη δομή της ανοσοσφαιρίνης, συμπεριλαμβανομένων των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, των δεσμών υδρογόνου και των δυνάμεων van der Waals. Με βάση αυτές τις εκτιμήσεις, το SAbPred δημιουργεί ένα τρισδιάστατο μοντέλο της ανοσοσφαιρίνης, απεικονίζοντας την ακριβή διάταξη των περιοχών πρόσδεσης.

Η αξιολόγηση του μοντέλου περιλαμβάνει τη σύγκριση με γνωστές δομές ανοσοσφαιρινών, εάν υπάρχουν, ή με άλλες θεωρητικές εκτιμήσεις. Η διαδικασία αυτή επιτρέπει τον εντοπισμό και τη διόρθωση πιθανών αποκλίσεων, βελτιώνοντας την ακρίβεια του μοντέλου πρόβλεψης.

> Search for therapeutics by sequence similarity

Heavy chain sequence:

 load example

```
QVQLVESGSGVVPQGRSLRLSCAISGFIQSGYAMHYVRQAPGNLEWVAFMGYDGSQKKYADSVKGRFTISRDN SKN  
TLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDQSIALGGNYYYYGGDVWGQGT VTVSS
```

Light chain sequence:

 load example

```
ELVMTQSPSSLSASVGRVNIACRASQGISSALAWYQOKPGKAPRLLIYDASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLOPED  
FAIYYCQQFN SYPLTFGGGTKVEIKRTV
```

Structures to be returned:

10

Minimum sequence identity:

70

Region to consider:

Full variable region

Search BISDab

**Εικόνα 15.** Παράδειγμα της επιφάνειας διεπαφής του εργαλείου SAbPred για την παραγωγή μοντέλων των μορίων των ανοσοσφαιρινών.

#### 5.15.4 PDBefold

Το PDBefold είναι ένα ειδικό υπολογιστικό εργαλείο που έχει σχεδιαστεί για τη σύγκριση και τον προσδιορισμό τρισδιάστατων πρωτεϊνικών δομών. Βασίζεται στη βάση δεδομένων Protein Data Bank (PDB), η οποία περιέχει λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τις δομές των

πρωτεϊνών, και διευκολύνει την κατανόηση της βιολογικής λειτουργίας και της εξέλιξης των πρωτεϊνών μέσω της ανάλυσης των δομών τους.

Η λειτουργία των πρωτεϊνών εξαρτάται άμεσα από την τρισδιάστατη δομή τους και το PDBefold συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση αυτής της σχέσης δομής-λειτουργίας συγκρίνοντας τις τρισδιάστατες δομές των πρωτεϊνών με τις γνωστές τρισδιάστατες δομές της βάσης δεδομένων PDB. Συγκεκριμένα, το PDBefold χρησιμοποιεί μαθηματικούς και υπολογιστικούς αλγορίθμους για την ανάλυση και τη σύγκριση των τρισδιάστατων δομών των πρωτεϊνών.

Με βάση το εργαλείο PDBefold πραγματοποιήθηκε δομική σύγκριση όλων των πιθανών ζευγών των παραγόμενων μοντέλων και κατασκευάστηκε ένας πίνακας αποστάσεων (distance matrix) της μετρικής RMSD (Root Mean Square Deviation) (**Εικόνα 16**). Η μετρική RMSD είναι κρίσιμη για τη δομική σύγκριση πρωτεϊνικών δομών. Μετρά ποσοτικά τη μέση απόσταση μεταξύ των αντίστοιχων ατόμων (συνήθως της ραχοκοκαλιάς) δύο δομών πρωτεΐνης μετά τη βέλτιστη υπέρθεση. Παρέχει μια ενιαία αριθμητική τιμή που συνοψίζει πόσο όμοιες ή διαφορετικές είναι οι δύο πρωτεϊνικές δομές. Μια χαμηλή τιμή RMSD υποδηλώνει υψηλότερο βαθμό ομοιότητας, ενώ μια υψηλότερη τιμή RMSD υποδηλώνει μεγαλύτερη δομική απόκλιση.

| Label                     | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    | 13    | 14    | 15    | 16    | 17    | 18    | 19    | 20    | 21    | 22    | 23    | 24    | 25    | 26    | 27    | 28    | 29    |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 CL11-R.pdbefold         | 0     | 0.892 | 1.124 | 1.032 | 0.969 | 1.101 | 1.137 | 1.129 | 1.397 | 0.917 | 1.347 | 1.318 | 1.688 | 1.32  | 0.958 | 1.37  | 1.304 | 1.103 | 1.324 | 1.293 | 1.208 | 0.91  | 1.298 | 1.361 | 1.477 | 1.145 | 1.442 | 1.452 | 1.395 |
| 2 CL12-R.pdbefold         | 0.892 | 0     | 1.135 | 0.774 | 0.932 | 1.214 | 1.089 | 0.921 | 1.408 | 0.756 | 1.306 | 1.272 | 1.669 | 1.3   | 0.838 | 1.344 | 1.326 | 1.204 | 1.306 | 1.198 | 1.183 | 0.93  | 1.332 | 1.368 | 1.445 | 1.076 | 1.394 | 1.409 | 1.332 |
| 3 CL13-R.pdbefold         | 1.124 | 1.135 | 0     | 1.052 | 0.891 | 1.227 | 0.756 | 1.368 | 1.198 | 1.219 | 1.186 | 1.178 | 1.406 | 1.35  | 0.955 | 1.337 | 1.251 | 0.544 | 1.271 | 1.309 | 1.408 | 0.947 | 0.989 | 1.425 | 1.27  | 1.425 | 1.256 | 1.213 | 1.373 |
| 4 CL14-R.pdbefold         | 1.032 | 0.774 | 1.052 | 0     | 0.818 | 1.397 | 0.996 | 1.024 | 1.277 | 0.938 | 1.391 | 1.421 | 1.656 | 1.475 | 0.95  | 1.419 | 1.48  | 1.043 | 1.394 | 1.087 | 1.233 | 1.07  | 1.142 | 1.502 | 1.365 | 1.214 | 1.343 | 1.315 | 1.471 |
| 5 CL15-R.pdbefold         | 0.969 | 0.932 | 0.891 | 0.818 | 0     | 1.179 | 1.087 | 1.17  | 1.326 | 1.031 | 1.364 | 1.367 | 1.621 | 1.417 | 0.95  | 1.389 | 1.421 | 0.949 | 1.425 | 1.058 | 1.219 | 1.156 | 1.251 | 1.427 | 1.324 | 1.228 | 1.306 | 1.237 | 1.402 |
| 6 CL16-R.pdbefold         | 1.101 | 1.214 | 1.227 | 1.397 | 1.179 | 0     | 1.249 | 1.411 | 1.226 | 1.31  | 1.383 | 1.342 | 1.671 | 1.152 | 1.387 | 1.243 | 1.303 | 1.156 | 1.211 | 1.522 | 1.544 | 1.028 | 1.42  | 1.07  | 1.218 | 1.436 | 1.286 | 1.273 | 1.168 |
| 7 CL17-R.pdbefold         | 1.137 | 1.089 | 0.756 | 0.996 | 1.087 | 1.249 | 0     | 1.313 | 1.187 | 1.148 | 1.163 | 1.148 | 1.548 | 1.398 | 0.872 | 1.365 | 1.261 | 0.709 | 1.246 | 1.345 | 1.426 | 0.763 | 0.843 | 1.447 | 1.31  | 1.424 | 1.291 | 1.279 | 1.406 |
| 8 CL18-R.pdbefold         | 1.129 | 0.921 | 1.368 | 1.024 | 1.17  | 1.411 | 1.313 | 0     | 1.152 | 0.93  | 1.425 | 1.456 | 1.797 | 1.495 | 1.056 | 1.401 | 1.493 | 1.394 | 1.06  | 1.294 | 1.2   | 1.189 | 1.091 | 1.525 | 1.579 | 1.277 | 1.547 | 1.508 | 1.379 |
| 9 CL19-R.pdbefold         | 1.397 | 1.408 | 1.198 | 1.277 | 1.326 | 1.226 | 1.187 | 1.152 | 0     | 1.351 | 1.463 | 1.489 | 1.682 | 1.369 | 1.224 | 1.315 | 1.505 | 1.162 | 0.882 | 1.443 | 1.556 | 1.252 | 0.758 | 1.309 | 1.185 | 1.558 | 1.247 | 1.197 | 1.303 |
| 10 CL20-R.pdbefold        | 0.917 | 0.756 | 1.219 | 0.938 | 1.031 | 1.31  | 1.148 | 0.93  | 1.351 | 0     | 1.339 | 1.327 | 1.763 | 1.351 | 0.873 | 1.324 | 1.332 | 1.285 | 1.304 | 1.25  | 1.174 | 1.04  | 1.294 | 1.396 | 1.459 | 1.098 | 1.394 | 1.372 | 1.355 |
| 11 Q8-01-0012-R1.pdbefold | 1.347 | 1.304 | 1.186 | 1.391 | 1.364 | 1.383 | 1.163 | 1.425 | 1.443 | 1.339 | 0     | 0.365 | 1.092 | 0.846 | 1.337 | 0.822 | 0.557 | 1.212 | 1.345 | 1.042 | 0.902 | 1.047 | 1.258 | 0.966 | 1.041 | 0.948 | 0.968 | 0.971 | 0.852 |
| 12 Q8-01-0016-R1.pdbefold | 1.318 | 1.272 | 1.178 | 1.421 | 1.367 | 1.342 | 1.148 | 1.456 | 1.489 | 1.327 | 0.365 | 0     | 1.122 | 0.789 | 1.358 | 0.818 | 0.482 | 1.175 | 1.378 | 1.041 | 0.899 | 1.045 | 1.31  | 0.888 | 0.966 | 0.916 | 0.941 | 0.945 | 0.888 |
| 13 Q8-01-0019-R1.pdbefold | 1.488 | 1.669 | 1.406 | 1.456 | 1.421 | 1.471 | 1.548 | 1.797 | 1.682 | 1.763 | 1.092 | 1.122 | 0     | 1.213 | 1.44  | 1.341 | 1.104 | 1.481 | 1.626 | 1.289 | 1.451 | 1.507 | 1.558 | 1.328 | 1.279 | 1.359 | 1.252 | 1.27  | 1.324 |
| 14 Q8-01-0013-R1.pdbefold | 1.32  | 1.3   | 1.35  | 1.475 | 1.417 | 1.152 | 1.388 | 1.485 | 1.369 | 1.351 | 0.846 | 0.789 | 1.213 | 0     | 1.434 | 0.687 | 0.758 | 1.391 | 1.228 | 1.052 | 1.041 | 1.227 | 1.478 | 0.51  | 0.754 | 0.841 | 0.619 | 0.748 | 0.558 |
| 15 Q8-01-0071-R1.pdbefold | 0.958 | 0.838 | 0.955 | 0.95  | 0.85  | 1.387 | 0.872 | 1.056 | 1.224 | 0.873 | 1.337 | 1.358 | 1.64  | 1.434 | 0     | 1.344 | 1.419 | 0.988 | 1.303 | 1.146 | 1.206 | 1.038 | 1.049 | 1.509 | 1.37  | 1.251 | 1.342 | 1.381 | 1.424 |
| 16 Q8-01-0076-R1.pdbefold | 1.37  | 1.344 | 1.337 | 1.419 | 1.389 | 1.243 | 1.365 | 1.401 | 1.315 | 1.324 | 0.822 | 0.818 | 1.341 | 0.637 | 1.344 | 0     | 0.852 | 1.348 | 1.209 | 1.025 | 0.832 | 1.308 | 1.397 | 0.741 | 0.77  | 0.994 | 0.754 | 0.694 | 0.426 |
| 17 Q8-01-0095-R1.pdbefold | 1.304 | 1.326 | 1.251 | 1.48  | 1.421 | 1.303 | 1.261 | 1.483 | 1.505 | 1.332 | 0.557 | 0.482 | 1.104 | 0.758 | 1.419 | 0.852 | 0     | 1.253 | 1.378 | 1.123 | 0.992 | 1.094 | 1.389 | 0.848 | 1.018 | 0.954 | 0.997 | 0.999 | 0.826 |
| 18 Q8-01-0097-R1.pdbefold | 1.103 | 1.204 | 0.564 | 1.063 | 0.969 | 1.156 | 0.709 | 1.384 | 1.162 | 1.285 | 1.212 | 1.175 | 1.481 | 1.391 | 0.988 | 1.368 | 1.253 | 0     | 1.303 | 1.33  | 1.424 | 0.889 | 0.94  | 1.397 | 1.222 | 1.446 | 1.277 | 1.247 | 1.385 |
| 19 Q8-01-0118-R1.pdbefold | 1.324 | 1.304 | 1.271 | 1.394 | 1.425 | 1.211 | 1.246 | 1.04  | 0.852 | 1.304 | 1.345 | 1.378 | 1.626 | 1.228 | 1.303 | 1.209 | 1.378 | 1.303 | 0     | 1.514 | 1.437 | 1.143 | 0.993 | 1.329 | 1.373 | 1.442 | 1.298 | 1.32  | 1.17  |
| 20 Q8-01-0127-R1.pdbefold | 1.293 | 1.198 | 1.309 | 1.057 | 1.058 | 1.522 | 1.345 | 1.284 | 1.443 | 1.25  | 1.042 | 1.041 | 1.288 | 1.052 | 1.146 | 1.025 | 1.123 | 1.33  | 1.514 | 0     | 0.782 | 1.397 | 1.378 | 1.095 | 0.823 | 0.763 | 0.876 | 0.85  | 1.049 |
| 21 Q8-01-0128-R1.pdbefold | 1.208 | 1.183 | 1.408 | 1.233 | 1.219 | 1.544 | 1.426 | 1.2   | 1.556 | 1.174 | 0.902 | 0.899 | 1.511 | 1.041 | 1.206 | 0.832 | 0.992 | 1.424 | 1.437 | 0.782 | 0     | 1.332 | 1.445 | 1.128 | 1.158 | 0.775 | 1.108 | 1.04  | 0.912 |
| 22 Q8-01-0129-R1.pdbefold | 0.91  | 0.93  | 0.947 | 1.07  | 1.156 | 1.028 | 0.763 | 1.189 | 1.252 | 1.04  | 1.047 | 1.045 | 1.507 | 1.227 | 1.038 | 1.308 | 1.094 | 0.889 | 1.143 | 1.397 | 1.332 | 0     | 1.054 | 1.253 | 1.36  | 1.249 | 1.337 | 1.361 | 1.265 |
| 23 Q8-01-0139-R1.pdbefold | 1.298 | 1.332 | 0.989 | 1.142 | 1.251 | 1.42  | 0.843 | 1.091 | 0.758 | 1.294 | 1.255 | 1.31  | 1.558 | 1.478 | 1.049 | 1.397 | 1.389 | 0.94  | 0.993 | 1.378 | 1.445 | 1.054 | 0     | 1.508 | 1.366 | 1.502 | 1.362 | 1.342 | 1.443 |
| 24 Q8-01-0144-R1.pdbefold | 1.361 | 1.368 | 1.425 | 1.502 | 1.427 | 1.07  | 1.447 | 1.525 | 1.309 | 1.386 | 0.946 | 0.888 | 1.328 | 0.51  | 1.509 | 0.741 | 0.848 | 1.397 | 1.329 | 1.095 | 1.128 | 1.253 | 1.508 | 0     | 0.652 | 0.953 | 0.726 | 0.71  | 0.594 |
| 25 Q8-01-0145-R1.pdbefold | 1.477 | 1.445 | 1.27  | 1.365 | 1.324 | 1.218 | 1.31  | 1.579 | 1.185 | 1.459 | 1.041 | 0.946 | 1.278 | 0.754 | 1.37  | 1.018 | 1.222 | 1.373 | 0.928 | 1.158 | 1.36  | 1.346 | 0.652 | 0     | 1.083 | 0.465 | 0.419 | 0.747 |       |
| 26 Q8-01-0147-R1.pdbefold | 1.145 | 1.076 | 1.425 | 1.214 | 1.228 | 1.436 | 1.424 | 1.277 | 1.558 | 1.098 | 0.948 | 0.916 | 1.359 | 0.841 | 1.251 | 0.994 | 0.954 | 1.466 | 1.462 | 0.763 | 0.775 | 1.249 | 1.502 | 0.953 | 1.083 | 0     | 0.958 | 1.027 | 0.978 |
| 27 Q8-01-0171-R1.pdbefold | 1.462 | 1.394 | 1.256 | 1.343 | 1.304 | 1.286 | 1.291 | 1.547 | 1.247 | 1.394 | 0.948 | 0.941 | 1.252 | 0.618 | 1.342 | 0.754 | 0.997 | 1.277 | 1.298 | 0.876 | 1.108 | 1.337 | 1.362 | 0.726 | 0.465 | 0.958 | 0     | 0.438 | 0.714 |

**Εικόνα 16.** Τμήμα του πίνακα αποστάσεων της μετρικής RMSD που παράχθηκε με το εργαλείο PDBefold κατά την ανάλυση των δεδομένων.

### 5.15.5 Ιεραρχική ταξινόμηση των δομών των ανοσοσφαιρινών

Η ιεραρχική συγκεντρωτική μέθοδος ταξινόμησης (hierarchical agglomerative clustering) είναι μια προσέγγιση ταξινόμησης από κάτω προς τα πάνω, που δημιουργεί σταδιακά μεγαλύτερες συστάδες δεδομένων, με ιεραρχικό τρόπο. Στην αρχή, κάθε σημείο δεδομένων θεωρείται ως μια ξεχωριστή συστάδα. Σε κάθε επανάληψη, οι δύο συστάδες που είναι πιο κοντά η μία με την

άλλη συγχωνεύονται σε μια ενιαία συστάδα. Η διαδικασία συνεχίζεται έως ότου όλες οι συστάδες συγχωνευθούν σε μια ενιαία συστάδα, το οποίο περιέχει όλα τα σημεία των δεδομένων. Η απόσταση μεταξύ δύο συστάδων ορίζεται ως η μέση τιμή των αποστάσεων ανά ζεύγη μεταξύ κάθε ζεύγους σημείων στις δύο συστάδες. Η ιεραρχική ταξινόμηση έχει ως αποτέλεσμα μια δενδροειδή αναπαράσταση των δεδομένων. Η κοπή του δέντρου σε ένα καθορισμένο ύψος έχει ως αποτέλεσμα τη ομαδοποίηση των δεδομένων σε διαφορετικές συστάδες. Το ύψος της κοπής προσδιορίζεται από τον καθορισμό του αριθμού των επιθυμητών συστάδων.

## Κεφάλαιο 6 : Αποτελέσματα

### Α. Παρουσίαση των βασικών ανοσογενετικών χαρακτηριστικών της ομάδας μελέτης

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν τα ανοσογενετικά χαρακτηριστικά της ομάδας μελέτης ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ). Η ομάδα μελέτης περιλάμβανε συνολικά 176 ασθενείς. Για 10 από αυτούς, η πλήρης επεξεργασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης. Ακολούθησε η ανάλυση των ανοσογενετικών δεδομένων για το σύνολο των ασθενών της ομάδας μελέτης.

Στη συνέχεια αναφέρονται τα βασικά ανοσογενετικά χαρακτηριστικά των αναδιατάξεων της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών (immunoglobulin heavy chain, IGH) στο σύνολο των ασθενών της ομάδας μελέτης.

#### 1. Υποομάδα γονιδίων IGHV

| Υποομάδα IGHV | Αριθμός περιπτώσεων | % περιπτώσεων |
|---------------|---------------------|---------------|
| IGHV1         | 40                  | 22,7          |
| IGHV2         | 2                   | 1,1           |
| IGHV3         | 85                  | 48,3          |
| IGHV4         | 40                  | 22,7          |
| IGHV5         | 5                   | 2,8           |
| IGHV6         | 4                   | 2,3           |
| IGHV7         | 0                   | 0,0           |
| Σύνολο        | 176                 | 100           |

**Πίνακας 6.1.** Συχνότητα των υποομάδων γονιδίων IGHV στους 176 ασθενείς της ομάδας μελέτης.

Η ανάλυση της κατανομής των υποομάδων γονιδίων IGHV (**Πίνακας 6.1**) έδειξε ότι η υποομάδα IGHV3 είναι ήταν η πλέον συχνή, αντιπροσωπεύοντας το 48,3% του συνόλου. Ακολούθησαν οι υποομάδες IGHV1 και IGHV4, οι οποίες εμφάνισαν ίση συχνότητα, με ποσοστό 22,7% η καθεμία. Τέλος, οι υποομάδες IGHV2, IGHV5 και IGHV6 παρουσίασαν χαμηλή συχνότητα, κυμαινόμενη από 1,1% έως 2,8%, ενώ η υποομάδα IGHV7 δεν εμφανίστηκε σε καμία περίπτωση. Συνολικά, οι τρεις κύριες υποομάδες IGHV3, IGHV1 και

IGHV4 αντιστοιχούσαν στο 93,7% του συνόλου των περιπτώσεων. Αυτή η κατανομή υποδεικνύει μια σαφή επικράτηση συγκεκριμένων αυτών των υποομάδων, πιθανώς αντανakλώντας τη βιολογική σημασία τους καθώς και τον αριθμό γονιδίων που ανήκουν στην κάθε υποομάδα.

## 2. Γονίδια IGHV

| Γονίδιο IGHV | Αριθμός περιπτώσεων | % περιπτώσεων |
|--------------|---------------------|---------------|
| IGHV1-18     | 1                   | 0,6           |
| IGHV1-2      | 8                   | <b>4,5</b>    |
| IGHV1-3      | 3                   | 1,7           |
| IGHV1-46     | 3                   | 1,7           |
| IGHV1-58     | 1                   | 0,6           |
| IGHV1-69     | 7                   | <b>4,0</b>    |
| IGHV1-69D    | 14                  | <b>8,0</b>    |
| IGHV1-8      | 3                   | 1,7           |
| IGHV2-26     | 1                   | 0,6           |
| IGHV2-5      | 1                   | 0,6           |
| IGHV3-11     | 2                   | 1,1           |
| IGHV3-15     | 5                   | 2,8           |
| IGHV3-20     | 1                   | 0,6           |
| IGHV3-21     | 2                   | 1,1           |
| IGHV3-23     | 4                   | 2,3           |
| IGHV3-23D    | 9                   | <b>5,1</b>    |
| IGHV3-30     | 4                   | 2,3           |
| IGHV3-30-3   | 5                   | 2,8           |
| IGHV3-30-5   | 11                  | <b>6,3</b>    |
| IGHV3-33     | 5                   | 2,8           |
| IGHV3-48     | 7                   | <b>4,0</b>    |
| IGHV3-49     | 2                   | 1,1           |
| IGHV3-53     | 3                   | 1,7           |
| IGHV3-64     | 1                   | 0,6           |
| IGHV3-66     | 1                   | 0,6           |

|                   |     |            |
|-------------------|-----|------------|
| <b>IGHV3-7</b>    | 16  | <b>9,1</b> |
| <b>IGHV3-72</b>   | 4   | 2,3        |
| <b>IGHV3-73</b>   | 2   | 1,1        |
| <b>IGHV3-74</b>   | 3   | 1,7        |
| <b>IGHV3-9</b>    | 2   | 1,1        |
| <b>IGHV4-30</b>   | 5   | 2,8        |
| <b>IGHV4-31</b>   | 1   | 0,6        |
| <b>IGHV4-34</b>   | 14  | <b>8,0</b> |
| <b>IGHV4-39</b>   | 5   | 2,8        |
| <b>IGHV4-4</b>    | 3   | 1,7        |
| <b>IGHV4-59</b>   | 5   | 2,8        |
| <b>IGHV4-61</b>   | 3   | 1,7        |
| <b>IGHV5-10-1</b> | 1   | 0,6        |
| <b>IGHV5-51</b>   | 4   | 2,3        |
| <b>IGHV6-1</b>    | 4   | 2,3        |
| <b>Σύνολο</b>     | 176 | 100        |

**Πίνακας 6.2.** Πρότυπα κατανομής της έκφρασης των γονιδίων IGHV στους 176 ασθενείς της ομάδας μελέτης.

Ο **Πίνακας 6.2** παρουσιάζει την κατανομή των γονιδίων IGHV στις περιπτώσεις της ομάδας μελέτης. Συνολικά, αναγνωρίστηκαν 40 διαφορετικά γονίδια IGHV, με σημαντικές διαφορές ως προς τη συχνότητα εμφάνισης του κάθε γονιδίου. Οχτώ γονίδια εμφάνισαν υψηλή συχνότητα ( $\geq 4\%$ ), τα οποία στο σύνολό τους αντιπροσώπευαν το 49% του συνόλου των περιπτώσεων.

Το γονίδιο με τη μεγαλύτερη συχνότητα ήταν το IGHV3-7 (ποσοστό 9,1%), ακολουθούμενο από τα IGHV1-69D και IGHV4-34, το καθένα από τα οποία εμφάνισε συχνότητα 8,0%. Άλλα γονίδια με υψηλή συχνότητα ήταν τα IGHV3-30-5 και IGHV3-23D με συχνότητες με 6,3% και 5,1%, αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα συχνά γονίδια ήταν τα IGHV1-2 (4,5%), IGHV1-69 (4,0%), και IGHV3-48 (4,0%). Επιπλέον, μια μεγάλη σειρά 15 γονιδίων εμφάνισαν χαμηλότερα ποσοστά που κυμαίνονταν μεταξύ 0,6% και 2,8%, όπως τα IGHV3-30, IGHV3-15, και IGHV4-30. Τέλος, τα γονίδια με τη χαμηλότερη συχνότητα (0,6%) ήταν τα IGHV1-18, IGHV1-58, IGHV2-26, IGHV2-5, IGHV3-20, IGHV3-64, IGHV3-66, IGHV4-31 και IGHV5-10-1.

### 3. Υποομάδα γονιδίων IGHD

| Υποομάδα IGHD | Αριθμός περιπτώσεων | % περιπτώσεων |
|---------------|---------------------|---------------|
| <b>IGHD1</b>  | 6                   | 3,4           |
| <b>IGHD2</b>  | 34                  | 19,4          |
| <b>IGHD3</b>  | 72                  | <b>53,3</b>   |
| <b>IGHD4</b>  | 9                   | 5,1           |
| <b>IGHD5</b>  | 21                  | 12,0          |
| <b>IGHD6</b>  | 31                  | 17,7          |
| <b>IGHD7</b>  | 2                   | 1,1           |
| <b>Σύνολο</b> | 175                 | 100           |

**Πίνακας 6.3.** Συχνότητα των υποομάδων γονιδίων IGHD σε 175 ασθενείς της ομάδας μελέτης. Σε μια περίπτωση δεν εντοπίστηκε γονίδιο IGHD στον αντίστοιχο ανασυνδυασμό της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης.

Ο **Πίνακας 6.3** παρουσιάζει την κατανομή των υποομάδων IGHD στις 175 περιπτώσεις της ομάδας μελέτης – όπως αναφέρθηκε, το εργαλείο ανάλυσης IMGT/V-QUEST δεν εντόπισε κάποιο γονίδιο IGHD σε μια περίπτωση. Με βάση τα ευρήματά μας, η υποομάδα **IGHD3** ήταν η πιο επικρατής, αντιπροσωπεύοντας το **53,3%** του συνόλου. Ακολούθησαν οι υποομάδες **IGHD2** και **IGHD6** με συχνότητες **19,4%** και **17,7%**, αντίστοιχα. Η υποομάδα **IGHD5** εμφάνισε ποσοστό **12%**, ενώ οι υποομάδες **IGHD4** και **IGHD1** έχουν μικρότερη συχνότητα με ποσοστά **5,1%** και **3,4%**, αντίστοιχα. Τέλος, η υποομάδα **IGHD7** εμφανίστηκε πιο σπάνια από όλες τις άλλες υποομάδες, με ποσοστό μόλις **1,1%**. Συνολικά, η κατανομή έδειξε ότι περισσότερες από τις μισές περιπτώσεις εξέφραζαν γονίδια της υποομάδας IGHD3, ενώ οι υπόλοιπες υποομάδες συνέβαλαν με μικρότερα ποσοστά.

#### 4. Γονίδια IGHD

| Γονίδιο IGHD  | Αριθμός περιπτώσεων | % περιπτώσεων |
|---------------|---------------------|---------------|
| IGHD1-1       | 1                   | 0,6           |
| IGHD1-14      | 2                   | 1,1           |
| IGHD1-26      | 3                   | 1,7           |
| IGHD2-15      | 7                   | 4,0           |
| IGHD2-2       | 17                  | 9,7           |
| IGHD2-21      | 7                   | 4,0           |
| IGHD2-8       | 3                   | 1,7           |
| IGHD3-10      | 19                  | 10,9          |
| IGHD3-16      | 15                  | 8,6           |
| IGHD3-22      | 11                  | 6,3           |
| IGHD3-3       | 27                  | 15,4          |
| IGHD4-11      | 1                   | 0,6           |
| IGHD4-17      | 4                   | 2,3           |
| IGHD4-23      | 4                   | 2,3           |
| IGHD5-12      | 4                   | 2,3           |
| IGHD5-18      | 7                   | 4,0           |
| IGHD5-24      | 10                  | 5,7           |
| IGHD6-13      | 11                  | 6,3           |
| IGHD6-19      | 16                  | 9,1           |
| IGHD6-6       | 4                   | 2,3           |
| IGHD7-27      | 2                   | 1,1           |
| <b>Σύνολο</b> | <b>175</b>          | <b>100</b>    |

**Πίνακας 6.4.** Πρότυπα κατανομής της έκφρασης των γονιδίων IGHD στους 175 ασθενείς της ομάδας μελέτης.

Ο Πίνακας 6.4 παρουσιάζει την κατανομή των γονιδίων IGHD στις περιπτώσεις της ομάδας μελέτης. Συνολικά, αναγνωρίστηκαν 21 διαφορετικά γονίδια IGHD, με σημαντικές διαφορές ως τα πρότυπα έκφρασης του κάθε γονιδίου. Ένδεκα γονίδια εμφάνισαν υψηλή συχνότητα ( $\geq 4\%$ ), τα οποία στο σύνολό τους αντιπροσώπευαν το 84% του συνόλου των περιπτώσεων.



Σε επίπεδο μεμονωμένου γονιδίου, το γονίδιο IGHD3-3 ήταν το πιο συχνό, αντιπροσωπεύοντας το 15,4% του συνόλου. Ακολούθησαν τα γονίδια IGHD3-10, IGHD2-2 και IGHD6-19 με συχνότητες 10,9%, 9,7% με 9,1%, αντίστοιχα. Τα γονίδια IGHD3-16, IGHD3-22 και IGHD6-13 εμφάνισαν επίσης σημαντικές συχνότητες (8,6%, 6,3% και 6,3%, αντίστοιχα). Μέτρια συχνότητα εμφάνισαν το γονίδιο IGHD5-24 (5,7%) καθώς και τα γονίδια IGHD5-18, IGHD2-15, και IGHD2-21 (4,0% το καθένα). Λιγότερο συχνά εμφανίστηκαν τα γονίδια IGHD4-17, IGHD4-23, IGHD5-12, και IGHD6-6 (2,3% το καθένα), ενώ πιο σπάνια ήταν τα γονίδια IGHD1-14 και IGHD7-27 με συχνότητα μόλις 1,1%. Τέλος, τα IGHD1-1 και IGHD4-11 παρουσίασαν τη χαμηλότερη συχνότητα, με 0,6% το καθένα. Η κατανομή υποδεικνύει ότι λίγα γονίδια εμφάνισαν υψηλή επικράτηση, ενώ η πλειοψηφία των γονιδίων εμφάνισε μικρότερα ποσοστά συχνότητας.

## 5. Γονίδια IGHJ

| Γονίδιο IGHJ | Αριθμός περιπτώσεων | % περιπτώσεων |
|--------------|---------------------|---------------|
| IGHJ1        | 4                   | 2,3           |
| IGHJ2        | 7                   | 4,0           |
| IGHJ3        | 20                  | 11,4          |
| IGHJ4        | 76                  | 43,2          |
| IGHJ5        | 17                  | 9,7           |
| IGHJ6        | 52                  | 29,5          |
| Σύνολο       | 176                 | 100           |

**Πίνακας 6.5.** Πρότυπα κατανομής της έκφρασης των γονιδίων IGHJ στους 176 ασθενείς της ομάδας μελέτης.

Ο **Πίνακας 6.5** παρουσιάζει την κατανομή των γονιδίων IGHJ στις 176 περιπτώσεις της ομάδας μελέτης. Το γονίδιο IGHJ4 ήταν το πιο συχνό, αντιπροσωπεύοντας το 43,2% του συνόλου. Ακολούθησε το γονίδιο IGHJ6 με 29,5%, καταδεικνύοντας τη σημαντική συμμετοχή αυτών των δύο γονιδίων στη συνολική κατανομή. Τα γονίδια IGHJ3 και IGHJ5 εμφάνισαν μέτρια συχνότητα, με ποσοστά 11,4% και 9,7%, αντίστοιχα. Τέλος, τα γονίδια IGHJ2 (4,0%) και IGHJ1 (2,3%) ήταν εξαιρετικά σπάνια. Συνολικά, η πλειονότητα των περιπτώσεων εξέφραζαν τα γονίδια IGHJ4 και IGHJ6, τα οποία κάλυπταν συνολικά πάνω από το 70% των περιπτώσεων, αναδεικνύοντας την ύπαρξη μιας ανισομερούς κατανομής των γονιδίων IGHJ.

## 6. Κατάσταση ΣΥΜ

| Κατάσταση ΣΥΜ                      | Αριθμός περιπτώσεων | % περιπτώσεων |
|------------------------------------|---------------------|---------------|
| Μεταλλαγμένη (<98%)                | 108                 | 61,4          |
| Αμετάλλακτη ( $\geq 98\%$ , <100%) | 17                  | 9,7           |
| Πλήρως αμετάλλακτη (100%)          | 51                  | 29,0          |
| Σύνολο                             | 176                 | 100           |

**Πίνακας 6.6.** Πρότυπα κατανομής των αναδιατάξεων των γονιδίων της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης με βάση το μεταλλακτικό φορτίο της ΣΥΜ στους 176 ασθενείς της ομάδας μελέτης.

Ο Πίνακας 6.6 παρουσιάζει την κατανομή των αναδιατάξεων των ασθενών της ομάδας μελέτης με βάση της κατάσταση της ΣΥΜ. Η πλειοψηφία των περιπτώσεων εξέφραζε ανασυνδυασμένες ανοσοσφαιρίνες με σημαντικό φορτίο μεταλλάξεων (ομοιότητα με το μη αναδιαταγμένο γονίδιο IGHV <98%), αντιπροσωπεύοντας το 61,4% του συνόλου. Ακολούθησαν οι περιπτώσεις με πλήρως αμετάλλακτες αλληλουχίες ανοσοσφαιρίνης (100% ομοιότητα με το μη αναδιαταγμένο γονίδιο IGHV) με συχνότητα 29%. Τέλος, οι περιπτώσεις με αμετάλλακτες αλληλουχίες, οι οποίες στην πραγματικότητα χαρακτηρίζονται από μικρό φορτίο ΣΥΜ (ομοιότητα με το μη αναδιαταγμένο γονίδιο IGHV  $\geq 98\%$  και <100%) εμφάνισαν τη χαμηλότερη συχνότητα, με ποσοστό 9,7%.

## 7. Μήκος περιοχής CDR3

| Μήκος CDR3 | Αριθμός περιπτώσεων | % περιπτώσεων |
|------------|---------------------|---------------|
| 7 aa       | 1                   | 0,6           |
| 8 aa       | 1                   | 0,6           |
| 9 aa       | 5                   | 2,8           |
| 10 aa      | 7                   | 4,0           |
| 11 aa      | 9                   | 5,1           |
| 12 aa      | 18                  | 10,2          |
| 13 aa      | 16                  | 9,1           |
| 14 aa      | 15                  | 8,5           |

|               |     |            |
|---------------|-----|------------|
| <b>15 aa</b>  | 10  | <b>5,7</b> |
| <b>16 aa</b>  | 11  | <b>6,3</b> |
| <b>17 aa</b>  | 11  | <b>6,3</b> |
| <b>18 aa</b>  | 6   | 3,4        |
| <b>19 aa</b>  | 11  | <b>6,3</b> |
| <b>20 aa</b>  | 13  | <b>7,4</b> |
| <b>21 aa</b>  | 8   | 4,5        |
| <b>22 aa</b>  | 10  | <b>5,7</b> |
| <b>23 aa</b>  | 5   | 2,8        |
| <b>24 aa</b>  | 6   | 3,4        |
| <b>25 aa</b>  | 5   | 2,8        |
| <b>26 aa</b>  | 4   | 2,3        |
| <b>27 aa</b>  | 1   | 0,6        |
| <b>28 aa</b>  | 1   | 0,6        |
| <b>29 aa</b>  | 1   | 0,6        |
| <b>30 aa</b>  | 1   | 0,6        |
| <b>Σύνολο</b> | 176 | 100        |

**aa: amino acids, αμινοξέα**

**Πίνακας 6.7.** Πρότυπα κατανομής των αναδιατάξεων των γονιδίων της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης με βάση το μήκος της περιοχής CDR3 στους 176 ασθενείς της ομάδας μελέτης.

Ο **Πίνακας 6.7** παρουσιάζει την κατανομή των αναδιατάξεων των γονιδίων της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης με βάση το μήκος της περιοχής CDR3 στις περιπτώσεις της ομάδας μελέτης. Συνολικά, αναγνωρίστηκαν 24 διαφορετικά μήκη για την περιοχή CDR3, με σημαντικές διαφορές ως προς τη συχνότητά τους. Δέκα διακριτά μήκη της περιοχής CDR3 εμφάνισαν υψηλή συχνότητα ( $\geq 5\%$ ), αντιπροσωπεύοντας το 70,6% του συνόλου των περιπτώσεων.

Το συχνότερο μήκος για την περιοχή CDR3 ήταν τα 12 αμινοξέα (aa), το οποίο αντιπροσώπευε το 10,2% των περιπτώσεων, ακολουθούμενο από τα μήκη 13 aa με 9,1% και 14 aa με 8,5%, αντίστοιχα. Τα μήκη 20 aa (7,4%), 16 aa, 17 aa, και 19 aa (6,3% το καθένα) εμφάνισαν επίσης σημαντική συχνότητα. Μικρότερη συχνότητα παρατηρήθηκε για τα μήκη 15 aa και 22 aa, τα οποία εμφανίστηκαν το καθένα με συχνότητα 5,7%, και το μήκος 11 aa (5,1%).

Μικρότερα ποσοστά παρατηρήθηκαν για τα μήκη 18 aa και 24 aa (3,4% το καθένα), καθώς και για τα μήκη 9 aa, 23 aa, και 25 aa, τα οποία εμφανίστηκαν με ποσοστό 2,8% το καθένα. Τέλος, τα μήκη 7 aa, 8 aa, 27 aa, 28 aa, 29 aa, και 30 aa εμφάνισαν τη χαμηλότερη συχνότητα, με μόλις 0,6% το καθένα. Συνολικά, η πλειονότητα των περιπτώσεων εμφάνισε μήκος περιοχής CDR3 είτε μεταξύ 11-17 aa (συνολικό ποσοστό 51,2%) είτε μεταξύ 19-22 aa (συνολικό ποσοστό 23,9%), υποδεικνύοντας μια τάση για την επιλογή αναδιατάξεων ανοσοσφαιρινών με μέτριο μήκος περιοχής CDR3.

## 8. Στερεότυπα υποσύνολα

| Στερεότυπο υποσύνολο | Αριθμός περιπτώσεων | % περιπτώσεων |
|----------------------|---------------------|---------------|
| #1                   | 7                   | 30,4          |
| #3                   | 2                   | 8,8           |
| #4                   | 4                   | 17,4          |
| #5                   | 1                   | 4,3           |
| #6                   | 3                   | 13,1          |
| #14                  | 1                   | 4,3           |
| #59                  | 3                   | 13,1          |
| #77                  | 1                   | 4,3           |
| #7H                  | 1                   | 4,3           |
| Σύνολο               | 23                  | 100           |

**Πίνακας 6.8.** Πρότυπα κατανομής των αναδιατάξεων που ταξινομήθηκαν στα κύρια στερεότυπα υποσύνολα στους 176 ασθενείς της ομάδας μελέτης.

Ο Πίνακας 6.8 παρουσιάζει την κατανομή των αναδιατάξεων του συνόλου των περιπτώσεων της ομάδας μελέτης στα κύρια στερεότυπα υποσύνολα. Συνολικά, σε στερεότυπα υποσύνολα ταξινομήθηκαν 23 περιπτώσεις, που αντιστοιχούν στο 13,1% του συνόλου της ομάδας μελέτης. Στο επίπεδο του μεμονωμένου υποσυνόλου, το στερεότυπο υποσύνολο #1 ήταν το πιο συχνό, με 7 περιπτώσεις (30,4%), ενώ τα υποσύνολα #4, #6 και #59 ακολούθησαν με 4 (17,4%), 3 (13,1%) και 3 (13,1%) περιπτώσεις, αντίστοιχα. Το υποσύνολο #4 περιλάμβανε 2 περιπτώσεις (8,8%), ενώ τα υποσύνολα #5, #14, #77, και #7H κατέγραψαν μόλις 1 περίπτωση το καθένα (4,3% για το κάθε υποσύνολο). Η κατανομή υποδεικνύει ότι κάποια στερεότυπα υποσύνολα

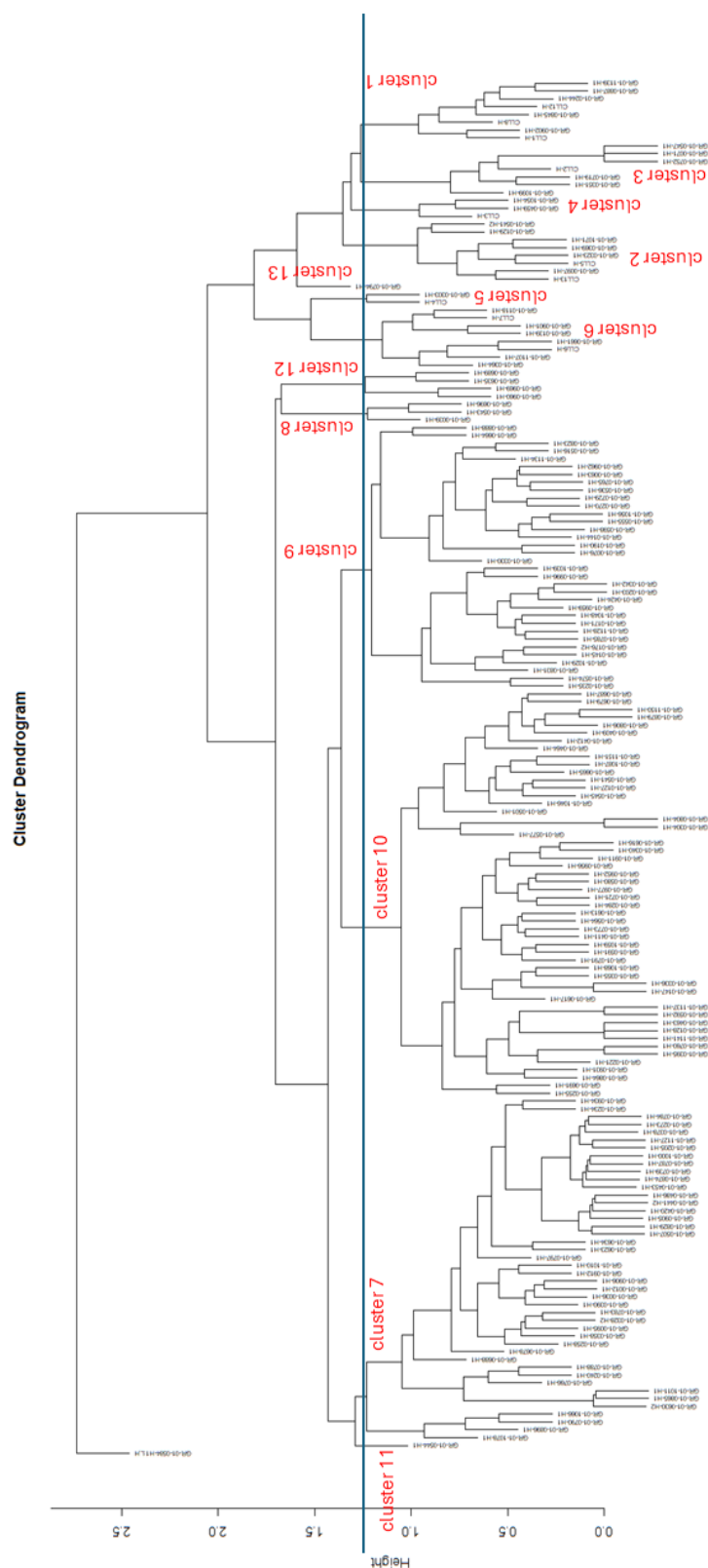
(όπως το κύριο υποσύνολο #1) ήταν πολύ συχνά στην ομάδα μελέτης της παρούσας εργασίας, ενώ τα υπόλοιπα εμφανίστηκαν σπανιότερα.

## **B. Παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ιεραρχικής ταξινόμησης**

Η ταξινόμηση των τρισδιάστατων μοντέλων των ανοσοσφαιρινών με βάση το βαθμό ομοιότητας της δομής τους οδήγησε στη δημιουργία 13 συστάδων (clusters), οι οποίες συνολικά συμπεριέλαβαν 175/176 μοντέλα. Πιο συγκεκριμένα, το μέγεθος του κάθε cluster δίνεται στον **Πίνακα 6.9**, ενώ τα αποτελέσματα της ταξινόμησης δίνονται στην **Εικόνα 17**.

| <b>Συστάδα (cluster)</b> | <b>Αριθμός περιπτώσεων</b> | <b>% περιπτώσεων</b> |
|--------------------------|----------------------------|----------------------|
| <b>1</b>                 | 8                          | 4,6                  |
| <b>2</b>                 | 8                          | 4,6                  |
| <b>3</b>                 | 7                          | 4                    |
| <b>4</b>                 | 3                          | 1,7                  |
| <b>5</b>                 | 2                          | 1,1                  |
| <b>6</b>                 | 8                          | 4,6                  |
| <b>7</b>                 | 44                         | 25,1                 |
| <b>8</b>                 | 3                          | 1,7                  |
| <b>9</b>                 | 34                         | 19,4                 |
| <b>10</b>                | 52                         | 29,7                 |
| <b>11</b>                | 1                          | 0,6                  |
| <b>12</b>                | 4                          | 2,3                  |
| <b>13</b>                | 1                          | 0,6                  |
| <b>Σύνολο</b>            | 175                        | 100                  |

**Πίνακας 6.9.** Πρότυπα κατανομής των τρισδιάστατων μοντέλων των αναδιατάξεων της ομάδας μελέτης σε clusters με βάση τη συγκριτική ανάλυση των δομών τους.



**Εικόνα 17.** Αποτελέσματα της ιεραρχικής ταξινόμησης των τρισδιάστατων μοντέλων των αναδιατάξεων της ομάδας μελέτης σε 13 συστάδες (clusters) με βάση τη συγκριτική ανάλυση των δομών τους.

Στη συνέχεια, ακολούθησε συγκριτική ανάλυση των ανοσογενετικών χαρακτηριστικών μεταξύ των περιπτώσεων που ταξινομήθηκαν σε διακριτά clusters, με σκοπό την αναγνώριση των χαρακτηριστικών που παίζουν πιο κρίσιμο ρόλο στη δομή των αντίστοιχων BκΥ IG. Η συγκεκριμένη ανάλυση επικεντρώθηκε στα clusters 7, 9 και 10, λόγω του μεγάλου αριθμού περιπτώσεων που περιλάμβαναν.

Το Cluster 7, το οποίο περιλάμβανε 44 περιπτώσεις, εμφάνισε μια σαφή επικράτηση περιπτώσεων της υποομάδας γονιδίων IGHV4 (26/44 περιπτώσεις, 57,5%). Αντίθετα, το Cluster 9, με 34 περιπτώσεις, εμφάνισε σχεδόν απόλυτη κυριαρχία της υποομάδας γονιδίων IGHV1 (30/34 περιπτώσεις, 88,2%). Τέλος, το Cluster 10, το οποίο ήταν το μεγαλύτερο με 52 περιπτώσεις, εμφάνισε σχεδόν απόλυτη κυριαρχία της υποομάδας IGHV3 (50/52 περιπτώσεις, 96,2%), καθιστώντας το ιδιαίτερα ομοιογενές. Η στατιστική αξιολόγηση των συγκεκριμένων διαφορών με τη μέθοδο  $\chi^2$  ανέδειξε τη μεγάλη σημασία τους ( $p < 0.00001$ ).

Εξετάζοντας στη συνέχεια την κατανομή των γονιδίων IGHV μεταξύ των 3 μεγάλων clusters, το γονίδιο IGHV4-34 κυριάρχησε στο ρεπερτόριο του Cluster 7 (13/44 περιπτώσεις, 29,5%) ενώ σχεδόν απουσίαζε από τα clusters 9 (0/34 περιπτώσεις, 0%) και 10 (1/52 περιπτώσεις, 1,9%). Η συγκεκριμένη διαφορά στη κατανομή του γονιδίου IGHV4-34 ήταν στατιστικά σημαντική ( $p = 0.000026$ ). Αντίστοιχα, το γονίδιο IGHV1-69 αφορούσε στην πλειοψηφία των περιπτώσεων του cluster 9 (19/34 περιπτώσεις, 55,9%) αλλά απουσίαζε από τα clusters 7 (1/44 περιπτώσεις, 2,3%) και 10 (0/52 περιπτώσεις, 0%). Η συγκεκριμένη διαφορά στη κατανομή του γονιδίου IGHV1-69 ήταν στατιστικά σημαντική ( $p < 0.00001$ ). Τέλος, το cluster 10 εμφάνισε ως επικρατή τα γονίδια IGHV3-30 (15/52 περιπτώσεις, 28,9%), IGHV3-23 (8/52 περιπτώσεις, 12,5%) και IGHV3-7 (6/52 περιπτώσεις, 11,5%). Τα γονίδια αυτά ήταν απόντα από τα clusters 7 (0, 1 και 1 περίπτωση ανά γονίδιο, αντίστοιχα) και 9 (0, 0 και 1 περίπτωση ανά γονίδιο, αντίστοιχα). Η διαφορά στη συνολική κατανομή των γονιδίων IGHV3-30, IGHV3-23 και IGHV3-7 ήταν στατιστικά σημαντική ( $p < 0.00001$ ).

Το Cluster 7 εμφάνισε μια σαφή επικράτηση περιπτώσεων της υποομάδας γονιδίων IGHD3 (15/44 περιπτώσεις, 34,1%), ακολουθούμενη από την υποομάδα IGHD2 (11/44 περιπτώσεις, 25%). Το Cluster 9 εμφάνισε σχετικά όμοιο πρότυπο, με κυριαρχία της υποομάδας γονιδίων IGHD3 (18/34 περιπτώσεις, 52,9%), ακολουθούμενη από την υποομάδα IGHD6 (7/44 περιπτώσεις, 20,6%). Τέλος, στο Cluster 10 η IGHD3 αποτέλεσε τη συχνότερη υποομάδα (26/52 περιπτώσεις, 50,0%), ενώ ακολούθησε η υποομάδα IGHD6 (9/52 περιπτώσεις, 17,3%). Συνολικά, οι διαφορές στην κατανομή των υποομάδων γονιδίων IGHD3, IGHD2 και IGHD6 δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ( $p = 0.174272$ ,  $p = 0.209261$  και  $p = 0.544623$ , αντίστοιχα). Λόγω

της απουσίας σημαντικών διαφορών στην κατανομή των υποομάδων IGHD δεν πραγματοποιήθηκε έλεγχος της κατανομής των επιμέρους γονιδίων IGHD.

Αναφορικά με τα γονίδια IGHJ, τα clusters 7, 9 και 10 παρουσιάζουν αυξημένες συχνότητες για τα γονίδια IGHJ4 και IGHJ6. Στο Cluster 7, το γονίδιο IGHJ4 ήταν κυρίαρχο (22/44 περιπτώσεις, 50,0%), ακολουθούμενο από το IGHJ6 (11/44 περιπτώσεις, 25,0%). Παρόμοια κατανομή παρατηρήθηκε στο Cluster 9, όπου το IGHJ4 κυριαρχούσε με ποσοστό 47,1% (16/34 περιπτώσεις) ακολουθούμενο από το IGHJ6 (10/34 περιπτώσεις, 29,4%). Το ίδιο πρότυπο παρατηρήθηκε και στο Cluster 10, με την κυριαρχία των γονιδίων IGHJ4 (21/52 περιπτώσεις, 40,4%) και IGHJ6 (15/52 περιπτώσεις, 28,8%). Συνολικά, οι διαφορές στην κατανομή των γονιδίων IGHJ4 και IGHJ6 δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ( $p=0.624674$  και  $p=0.885124$ , αντίστοιχα).

Η ανάλυση του φορτίου της SYM έδειξε ότι η πλειοψηφία των περιπτώσεων ήταν μεταλλαγμένες στα clusters 7 (28/44 περιπτώσεις, 63,6%) και 10 (39/52 περιπτώσεις, 75%). Αντίθετα, στο Cluster 9 επικρατούσαν οι περιπτώσεις με πλήρως αμετάλλακτες ανοσοσφαιρίνες (22/34 περιπτώσεις, 62,9%). Συνολικά, οι διαφορές στην κατανομή των περιπτώσεων ανάλογα με την κατάσταση SYM μεταξύ των clusters 7, 9 και 10 ήταν σημαντικές για τις μεταλλαγμένες και πλήρως αμετάλλακτες ανοσοσφαιρίνες ( $p=0.000032$  και  $p=0.000025$ , αντίστοιχα) και μη σημαντικές για τις περιπτώσεις με αμετάλλακτες ανοσοσφαιρίνες ( $p=0.615445$ ).

Η κατανομή του μήκους της περιοχής CDR3 παρουσίασε σημαντικές διαφορές μεταξύ των clusters 7, 9 και 10. Συγκεκριμένα, στο cluster 7 επικρατούσαν τα μήκη 19 aa (6/44 περιπτώσεις, 13,6%), 11 aa (5/44 περιπτώσεις, 11,4%) και 14 aa (5/44 περιπτώσεις, 11,4%). Το cluster 9 χαρακτηρίστηκε από την επικράτηση των μηκών 12 aa (7/34 περιπτώσεις, 20,6%) και 13 aa (6/34 περιπτώσεις, 17,6%). Στο Cluster 10, κυριαρχούσαν τα μήκη 16 aa (9/52 περιπτώσεις, 17,3%), 14 aa (7/52 περιπτώσεις, 13,5%) και 12 aa (11,5%). Συνολικά, οι διαφορές στην κατανομή των μηκών της περιοχής CDR3 μεταξύ των clusters 7, 9 και 10 ήταν σημαντικές για τα μήκη 12 aa και 16 aa ( $p=0.034239$  και  $p=0.012481$ , αντίστοιχα) και μη σημαντικές για τα μήκη 13 aa, 14 aa και 19 aa ( $p=0.096577$ ,  $p=0.263742$  και  $p=0.170239$ , αντίστοιχα).

Τέλος, όσον αφορά στην κατανομή των περιπτώσεων που ανήκαν σε στερεότυπα υποσυνόλα μεταξύ των clusters 7, 9 και 10, μελετήθηκε συγκεκριμένα η κατανομή των περιπτώσεων του υποσυνόλου #1 καθώς και του συνόλου των περιπτώσεων. Συγκεκριμένα, οι περιπτώσεις του υποσυνόλου #1 εμφανίστηκαν κυρίως στο cluster 9 (4/34 περιπτώσεις, 11,8%) ενώ ήταν πρακτικά απύσες από τα clusters 7 (1/44 περιπτώσεις, 2,3%) και 10 (0/52 περιπτώσεις, 0%).



Για το σύνολο των περιπτώσεων που ανήκαν σε στερεότυπα υποσύνολα, παρατηρήθηκε ένα παρόμοιο πρότυπο καθώς αυτές ήταν πιο συχνές στο cluster 9 (13/34 περιπτώσεις, 38,2%) ενώ ήταν πρακτικά απύσες από τα clusters 7 (5/44 περιπτώσεις, 11,4%) και 10 (0/52 περιπτώσεις, 0%). Συνολικά, οι διαφορές στην κατανομή των περιπτώσεων του υποσυνόλου #1 ήταν σχεδόν στατιστικά σημαντικές ( $p=0.068831$ ). Αντίθετα, οι διαφορές στην κατανομή του συνόλου των περιπτώσεων που ανήκαν σε στερεότυπα υποσύνολα μεταξύ των clusters 7, 9 και 10 ήταν στατιστικά σημαντικές ( $p=0.000014$ ).

Συνολικά, τα μεγαλύτερα clusters 7, 9 και 10 εμφάνισαν σημαντικές διαφορές ως προς την κατανομή των περιπτώσεων με βάση την υποομάδα γονιδίων IGHV και τα επιμέρους γονίδια IGHV, καθώς και όσον αφορά στην κατάσταση ΣΥΜ, συγκεκριμένα μήκη της περιοχής CDR3 και την ταξινόμηση σε στερεότυπα υποσύνολα.

## **Κεφάλαιο 7 : Συζήτηση/ Συμπεράσματα**

### **Δομική ταξινόμηση των κλωνοτυπικών BκY IG στη ΧΛΛ**

Η μοριακή αρχιτεκτονική του BκY στη ΧΛΛ μπορεί να χρησιμεύσει τόσο ως αποτύπωμα της γενεαλογίας των λευχαιμικών κυττάρων, δηλαδή να παράσχει πληροφορίες για τον πληθυσμό των προγονικών B λεμφοκυττάρων, όσο και ως λειτουργικός παράγοντας της συμπεριφοράς τους. Η περιεκτική ανάλυση των τρισδιάστατων μοντέλων των BκY IG σε 176 ασθενείς με ΧΛΛ υποδεικνύει ότι η δομική ομαδοποίηση οδηγεί σε μια ταξινόμηση των ασθενών σε ομάδες με διακριτούς συνδυασμούς ανοσογενετικών χαρακτηριστικών. Επομένως, αυτή η προσέγγιση μπορεί να προσφέρει νέα γνώση σχετικά με τις πιέσεις της αντιγονικής επιλογής, την πιθανότητα κλωνικής εξέλιξης και την πιθανή εφαρμογή ειδικών θεραπειών με στόχο το BκY IG.

### **Μελέτες σχετικά με τρισδιάστατες δομές του BκY IG στη ΧΛΛ**

Η σημασία της ανάλυσης της τρισδιάστατης δομής των κλωνοτυπικών BκY IG έχει τονιστεί από πρόσφατες μελέτες που χρησιμοποιούν προηγμένες τεχνικές βιοπληροφορικής για την ομαδοποίηση των πρωτεϊνικών δομών με βάση τις γεωμετρικές τους ιδιότητες. Σε μια σχετική ανάλυση και ταξινόμηση μεγάλης κλίμακας (Marcatili et al., 2013) των θέσεων πρόσδεσης αντιγόνου των κλωνοτυπικών BκY IG από 366 ασθενείς με ΧΛΛ αναγνωρίστηκε, όπως και στην παρούσα μελέτη, ένας περιορισμένος αριθμός διακριτών συστάδων, καθεμία από τις οποίες χαρακτηριζόταν από κοινά δομικά χαρακτηριστικά και φυσικοχημικές ιδιότητες. Μάλιστα, όπως και στην παρούσα μελέτη, ένας από τους παράγοντες που παρουσίασε σημαντική συσχέτιση ήταν η κατάσταση της ΣΥΜ αλλά και η παρουσία στερεότυπων υποδοχέων. Ιδιαίτερης σημασίας ήταν ότι η δομική ταξινόμηση με βάση το BκY IG έδειξε ανώτερη προγνωστική αξία, τουλάχιστον για κάποιες από τις περιπτώσεις.

Επιπλέον, μια πιο πρόσφατη μελέτη (Polychronidou et al., 2018) πρότεινε μια νέα προσέγγιση ομαδοποίησης με βάση το σχήμα που ενσωματώνει μεθόδους 3D αναγνώρισης αντικειμένων για την ταξινόμηση των δομών του BκY IG σε ασθενείς με ΧΛΛ. Αυτή η μελέτη έδειξε ότι η δομική ομαδοποίηση βελτιώνει την ακρίβεια σε σχέση με τις παραδοσιακές μεθόδους που βασίζονται αποκλειστικά στην αλληλουχία όταν συσχετίζει τα χαρακτηριστικά του BκY IG με κλινικά δεδομένα. Συγκεκριμένα, έδειξε ότι τα διατηρημένα δομικά μοτίβα μέσα σε στερεότυπα υποσύνολα θα μπορούσαν να συνδεθούν με κοινές ιδιότητες δέσμευσης αντιγόνου και μοτίβα εξέλιξης της νόσου. Επομένως, τα δεδομένα και αυτής της μελέτης υποδεικνύουν

τη σημασία συγκεκριμένων ανοσογενετικών χαρακτηριστικών της βαριάς αλυσίδας του BκY IG στον καθορισμό της δομής του μορίου, η οποία είναι εξαιρετικά σημαντική για την εξειδίκευση της αντιγονικής αναγνώρισης.

### **Το γονίδιο IGHV και η SYM επηρεάζουν σημαντικά τη δομή του BκY IG**

Η παρούσα μελέτη ανέδειξε τη σημασία του γονιδίου IGHV και της κατάστασης SYM στη δομή του BκY IG. Το εύρημα αυτό αναδείχτηκε αρχικά από σημαντικές διαφορές στο ρεπερτόριο των συγκεκριμένων γονιδίων σε υποομάδες της ΧΛΛ με διαφορετική πρόγνωση: συγκεκριμένα παρατηρείται επικράτηση του γονιδίου IGHV1-69 στην αμετάλλακτη ΧΛΛ (Α-ΧΛΛ) έναντι της επικράτησης των γονιδίων IGHV3-7, IGHV3-23 και IGHV3-30 στη μεταλλαγμένη ΧΛΛ (Μ-ΧΛΛ) (Vardi et al., 2014). Η διαφορά αυτή πιθανόν να αντανakλά πιθανές αποκλίσεις στη δομική βελτιστοποίηση του BκY IG στο πλαίσιο της ΧΛΛ. Οι κλωνοτυπικοί BκY IG στην Α-ΧΛΛ, οι οποίοι εξέφραζαν κυρίως το γονίδιο IGHV1-69, υιοθετούν κυρίως ανοιχτές διαμορφώσεις με εκτεταμένους βρόχους στην περιοχή CDR3, δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο θύλακες προσβάσιμους από διαλύτες εμπλουτισμένους σε αρωματικά κατάλοιπα (Phe, Tyr, Trp). Αυτή η αρχιτεκτονική διευκολύνει χαμηλής συγγένειας, πολυσθενείς αλληλεπιδράσεις με λιπιδικά αυτοαντιγόνα, όπως η οξειδωμένη LDL και τα αποπτωτικά κυτταρικά υπολείμματα, σύμφωνα με την «έμφυτη» αντιδραστικότητα που παρατηρείται στην Α-ΧΛΛ (Catera et al., 2008). Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι η έκφραση του γονιδίου IGHV σχετίζεται άμεσα με την αντιγονική αναγνώριση: συγκεκριμένα, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ανασυνδυασμένα αντισώματα από ασθενείς με ΧΛΛ που εξέφραζαν τα γονίδια IGHV1-69 ή IGHV3-21, αλλά όχι το γονίδιο IGHV4-39, αντιδρούσαν έναντι μίας μόνο πρωτεΐνης του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού (human cytomegalovirus, CMV). Η πρωτεΐνη CMV ταυτοποιήθηκε ως η μεγάλη δομική φωσφοπρωτεΐνη pUL32 (Steininger et al., 2012).

Αντίθετα, οι δομές του BκY IG σε περιπτώσεις Μ-ΧΛΛ εμφάνισαν πιο συμπαγείς περιοχές δέσμευσης του αντιγόνου, λόγω του μικρού μήκους της περιοχής CDR3. Επιπλέον, η εισαγωγή της SYM μειώνει την αυτοαντιδραστικότητα εισάγοντας δομικές αλλαγές (π.χ. Ν-γλυκοζυλίωση σε περιοχές πλαισίου) που καλύπτουν τις περιοχές που συμμετέχουν στις πολυδραστικές διεπαφές. Σε αυτό το πλαίσιο, ιδιαίτερα ενδιαφέρον ήταν το εύρημα ότι η επαναφορά των μεταλλαγμένων αλληλουχιών στις αντίστοιχες της βλαστικής σειράς αποκατέστησε την πολυαντιδραστικότητα και την αυτοαντιδραστικότητα *in vitro* (Hervé et al., 2005).

Οι BκY IG της M-XΛΛ επιδεικνύουν συχνά ειδική αντιδραστικότητα έναντι κυτταροπλασματικών αντιγόνων (π.χ. πυρηνικά ή κυτταροπλασματικά αντιγόνα σε κύτταρα HEp-2) (Hervé et al., 2005), αυτοαντιγόνων (π.χ. έναντι της ΙΙΑ βαριάς αλυσίδας της μη μυϊκής μυοσίνης, η οποία εμπλέκεται στην απόπτωση και την αυτοανοσία) (Chu et al., 2008) και μικροβιακών αντιγόνων (π.χ. πολυσακχαρίτες β-γλυκάνης) (Hatzi et al., 2006).

### **Μήκος CDR3 και Στερεοτυπία: Δομική Σύγκλιση στην Αναγνώριση Αντιγόνου**

Το μήκος της περιοχής CDR3 προέκυψε ως μια σημαντική παράμετρος που διέπει τη δομική ομαδοποίηση του BκY IG στην παρούσα μελέτη. Γενικά, οι BκY IG με μεγαλύτερες περιοχές CDR3 εμφανίζουν αυξημένη δομική ετερογένεια και δυνατότητα δέσμευσης αντιγόνου, χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την πολυαντιδραστικότητα (Hatzi et al., 2006). Στο πλαίσιο της ΧΛΛ, οι περιπτώσεις με μεγάλες περιοχές CDR3 (>18 αμινοξέα) συναντώνται κυρίως στην Α-ΧΛΛ και είναι εν μέρει υπεύθυνες για την εκδήλωση πολυαντιδραστικότητας. Αντίθετα, οι περιπτώσεις με κοντές περιοχές CDR3 (<15 αμινοξέα) εντοπίζονται στη Μ-ΧΛΛ και περιορίζουν τη δέσμευση σε μικρότερους, καλά καθορισμένους επίτοπους, ευνοώντας τη διαδικασία της ωρίμανσης συγγένειας.

Στο πλαίσιο της στερεοτυπίας του BκY IG, μια σχετική μελέτη έδειξε ότι αντισώματα από το υποσύνολο #6 (IGHV1-69/IGKV3-20) αναγνωρίζουν τη ΙΙΑ βαριά αλυσίδα της μη μυϊκής μυοσίνης (MYHIIA) (Chu et al., 2008). Κανονικά μια ενδοκυτταρική πρωτεΐνη, όπως η MYHIIA, εκτίθεται στην επιφάνεια των αποπτωτικών κυττάρων, ορίζοντας ένα υποσύνολο γνωστό ως αποπτωτικά κύτταρα που εκτίθενται στη μυοσίνη (MEACs) (Conti et al., 2008). Είναι σημαντικό ότι η δέσμευση MEAC δεν ήταν αποκλειστική για το υποσύνολο #6, καθώς πολλαπλά μονοκλωνικά αντισώματα ΧΛΛ αναγνώρισαν αυτά τα αποπτωτικά κύτταρα. Από προγνωστική άποψη, η ισχυρή δέσμευση MEAC συσχετίστηκε με κακή επιβίωση των ασθενών, ανεξάρτητα από την κατάσταση της ΣΥΜ. Συγκεκριμένα, τα mAbs από το ίδιο στερεότυπο υποσύνολο εμφάνισαν παρόμοια προφίλ δέσμευσης MEAC, ενισχύοντας τη λειτουργική και κλινική συνάφεια της στερεοτυπίας του BκY IG στη ΧΛΛ (Agathangelidis et al., 2020).

Περαιτέρω στοιχεία που συνδέουν τα μικροβιακά παθογόνα με την ανάπτυξη ΧΛΛ προέκυψαν από μια μοριακή μελέτη που έδειξε σημαντικά υψηλότερο επιπολασμό επίμονων λοιμώξεων από EBV και/ή CMV σε περιπτώσεις του υποσυνόλου #4 σε σύγκριση με άλλες περιπτώσεις ΧΛΛ (Kostareli et al., 2009). Επιπλέον, ένα μικρότερο υποσύνολο, το υποσύνολο #13 (IGHV4-59/IGKV3-20), συσχετίστηκε με λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV), με μοριακά

χαρακτηριστικά που μοιάζουν με μικτή κρυοσφαιριναιμία τύπου II που σχετίζεται με τον HCV (Kostareli et al., 2012).

Διακεκριμένα πρότυπα αντιδραστικότητας παρατηρήθηκαν επίσης σε στερεότυπα υποσύνολα της ΧΛΛ με επιθετική νόσο (Gounari et al., 2015). Αντισώματα από περιπτώσεις του υποσυνόλου #8 εμφάνισαν σύνδεση υψηλής συγγένειας ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα αντιγόνων, συμπεριλαμβανομένων μικροβιακών συστατικών, αυτοαντιγόνων και νεο-επιτόπων που προκύπτουν από οξειδωτικό στρες κατά την απόπτωση. Αντίθετα, τα αντισώματα του υποσυνόλου #1 εμφάνισαν μόνο μέτρια προς χαμηλή αντιδραστικότητα, ιδιαίτερα προς τα προϊόντα οξείδωσης και το dsDNA, με ελάχιστη δέσμευση στο LPS. Τέλος, τα αντισώματα από περιπτώσεις του υποσυνόλου #2, παρά την επιθετική κλινική τους πορεία, δεν έδειξαν ανιχνεύσιμη αντιγονική αντιδραστικότητα. Η ευρεία αντιγονική αναγνώριση του υποσυνόλου #8 μπορεί να παρέχει συνεχή διέγερση σε προγονικά ή κλωνικά κύτταρα, οδηγώντας την εξέλιξη της νόσου και ευνοώντας την επιλογή πιο επιθετικών λευχαιμικών κυττάρων.

## Σύνοψη

Χαρτογραφώντας το δομικό τοπίο του BκY IG στη ΧΛΛ, αυτή η μελέτη παρέχει ένα πλαίσιο για την επανερμηνεία της ανοσογενετικής ετερογένειας της νόσου. Η συσχέτιση δομικών χαρακτηριστικών με μοριακά και κλινικά δεδομένα αναμένεται να βοηθήσει στην ανάπτυξη ενός ενοποιημένου μοντέλου παθογένεσης της ΧΛΛ, όπου η αρχιτεκτονική του BκY IG καθορίζει τις πιέσεις αντιγονικής επιλογής, διαμορφώνει τις εξελικτικές τροχιές και υπαγορεύει τις θεραπευτικές επιλογές.

## Βιβλιογραφία

- Lieutaud J. “Elementa Physiologiae” Google Books, 2025, [books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=kvN8pbutMb8C&oi=fnd&pg=PA1&dq=Lieutaud](https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=kvN8pbutMb8C&oi=fnd&pg=PA1&dq=Lieutaud).
- Agathangelidis A, 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. doi: 10.1182/blood-2011-11-393694
- Agathangelidis A, et al. Higher-Order Connections between Stereotyped Subsets: Implications for Improved Patient Classification in CLL. *Blood*, 29 Sept. 2020, <https://doi.org/10.1182/blood.2020007039>.
- Agathangelidis, Andreas, et al. Stereotyped B-Cell Receptors in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, vol. 55, no. 10, 17 Mar. 2014, pp. 2252–2261, <https://doi.org/10.3109/10428194.2013.879715>.
- Agathangelidis A, et al. Stereotyped B-Cell Receptors in One-Third of Chronic Lymphocytic Leukemia: A Molecular Classification with Implications for Targeted Therapies. Vol. 119, no. 19, 10 May 2012, pp. 4467–4475, <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-393694>.
- Andersen MH, et al. Cytotoxic T Cells. *J. Invest. Dermatol.* 2006;126(126):32–41.
- Belessi C, et al. IGHV gene insertions and deletions in chronic lymphocytic leukemia: “CLL-biased” deletions in a subset of cases with stereotyped receptors. *Eur J Immunol.* (2006) 36:1963–74. doi: 10.1002/eji.200535751
- Berkowska M, et al. Human Memory B Cells Originate from Three Distinct Germinal Center-Dependent and -Independent Maturation Pathways. *Blood*, vol. 118, no. 8, 25 Aug. 2011, pp. 2150–2158, <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-345579>.
- Bomben R, et al. Comprehensive characterization of IGHV3-21-expressing B-cell chronic lymphocytic leukemia: an Italian multicenter study. *Blood*. (2007) 109:2989–98. doi: 10.1182/blood-2006-10-051110
- Burger JA, Chiorazzi N. B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends Immunol.* 2013;34(12):592–601.
- Burger JA, et al. The microenvironment in mature B-cell malignancies: A target for new treatment strategies. *Blood*. 2009;114(16):3367–3375

- Burger JA, and Chiorazzi N. B Cell Receptor Signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Trends in Immunology*, vol. 34, no. 12, Dec. 2013, pp. 592–601, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3898793/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3898793/), <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.07.002>.
- Burton DR. (1990). Antibody: the flexible adaptor molecule. *Trends in Biochemical Sciences*, 15(2), pp.64–69. doi:[https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90178-e](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90178-e).
- Caligaris-Cappio F and Hamblin TJ. B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia: A Bird of a Different Feather. *Journal of Clinical Oncology*, vol. 17, no. 1, Jan. 1999, pp. 399–399, <https://doi.org/10.1200/jco.1999.17.1.399>.
- Carsetti R. The development of B cells in the Bone Marrow is controlled by the balance between cell-autonomous mechanisms and signals from the microenvironment. *J Exp med*. 2000; 191:5-8.
- CATERA R, et al. Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Recognize Conserved Epitopes Associated with Apoptosis and Oxidation. Vol. 14, no. 11-12, 25 Sept. 2008, pp. 665–674, <https://doi.org/10.2119/2008-00102.catera>.
- Chaplin DD. Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010;125(2 SUPPL. 2):S3–S23.
- Chi X, et al. V(D)J Recombination, Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination of Immunoglobulins: Mechanism and Regulation. *Immunology*, vol. 160, no. 3, 27 Feb. 2020, pp. 233–247, <https://doi.org/10.1111/imm.13176>.
- Chiorazzi N, et al. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. (2005) 352:804–15. doi: 10.1056/NEJMra041720
- Chu CC, et al. Chronic Lymphocytic Leukemia Antibodies with a Common Stereotypic Rearrangement Recognize Nonmuscle Myosin Heavy Chain IIA. *Blood*, vol. 112, no. 13, 15 Dec. 2008, pp. 5122–5129, <https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-162024>.
- Clark MR, et al. The pre-B cell receptor in B cell development: recent advances, persistent questions, and conserved mechanisms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005; 290:87-103.
- Conti MA, et al. Nonmuscle Myosin II Moves in New Directions. *Journal of Cell Science*, vol. 121, no. 1, 1 Jan. 2008, pp. 11–18, <https://doi.org/10.1242/jcs.007112>.
- Corcoran AE. Immunoglobulin locus silencing and allelic exclusion. *Semin Immunol*. 2005; 17:141-54.

- Darzentas N, et al. A different ontogenesis for chronic lymphocytic leukemia cases carrying stereotyped antigen receptors: molecular and computational evidence. *Leukemia*. (2010) 24:125–32. doi: 10.1038/leu.2009.186
- Dighiero G, and Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* (London, England). 2008;371(9617):1017–29.
- Dunn-Walters DK, et al. Analysis of Mutations in Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Genes of Microdissected Marginal Zone (MGZ) B Cells Suggests That the MGZ of Human Spleen Is a Reservoir of Memory B Cells. *Journal of Experimental Medicine*, vol. 182, no. 2, 1 Aug. 1995, pp. 559–566, <https://doi.org/10.1084/jem.182.2.559>.
- Efremov DG, et al. Restricted immunoglobulin VH region repertoire in chronic lymphocytic leukemia patients with autoimmune hemolytic anemia. *Blood*. (1996) 87:3869–76. doi: 10.1182/blood.V87.9.3869.bloodjournal87 93869
- Engels A, and Walz K. Dealing with Multi-Perspectivity in Real-World Laboratories: Experiences from the Transdisciplinary Research Project Urban Transformation Laboratories. *GAIA - Ecological Perspectives for Science and Society*, vol. 27, no. 1, 1 Jan. 2018, pp. 39–45, <https://doi.org/10.14512/gaia.27.s1.10>.
- Fabbri G, and Dalla-Favera R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Rev. Cancer*. 2016;16(3):145–162.
- Fais F, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Investig*. (1998) 102:1515–25. doi: 10.1172/JCI3009
- Fischer K, and Hallek M. Optimizing frontline therapy of CLL based on clinical and biological factors. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. (2017) 2017:338–45. doi: 10.1182/asheducation-2017.1.338
- Forconi F, et al. Biological and Clinical Insight from Analysis of the Tumor B-Cell Receptor Structure and Function in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancers*, vol. 14, no. 3, 28 Jan. 2022, pp. 663–663, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8833472/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8833472/), <https://doi.org/10.3390/cancers14030663>.
- Gabrielli E, et al. Antibody Complementarity-Determining Regions (CDRs): A Bridge between Adaptive and Innate Immunity. *PLoS ONE*, vol. 4, no. 12, 4 Dec. 2009, p. e8187, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008187>.



- Gemenetzi K, et al. B Cell Receptor Immunogenetics in B Cell Lymphomas: Immunoglobulin Genes as Key to Ontogeny and Clinical Decision Making. *Frontiers in Oncology*, (2020) 10:67. doi: 10.3389/fonc.2020.00067
- Goding JW. (1978). Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent. *Journal of Immunological Methods*, [online] 20, pp.241–253. doi:[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(78\)90259-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(78)90259-4).
- Gounari M, et al. Excessive Antigen Reactivity May Underlie the Clinical Aggressiveness of Chronic Lymphocytic Leukemia Stereotyped Subset #8. *Blood*, vol. 125, no. 23, Apr. 2015, pp. 3580–7, [pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25900981/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25900981/), <https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-603217>.
- Grawunder U, et al. Requirement for an interaction of XRCC4 with DNA ligase IV for wild-type V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in vivo. *J Biol Chem*. 1998;273(38):24708–14.
- Gutzeit C, et al. The Enigmatic Function of IgD: Some Answers at Last. *European Journal of Immunology*, vol. 48, no. 7, 12 June 2018, pp. 1101–1113, <https://doi.org/10.1002/eji.201646547>.
- Haas IJ, et al. cDNA Cloning of the Immunoglobulin Heavy Chain Binding Protein. Vol. 85, no. 7, 1 Apr. 1988, pp. 2250–2254, <https://doi.org/10.1073/pnas.85.7.2250>.
- Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol*. (2015) 90:446–60. doi: 10.1002/ajh.23979
- Hashimoto S, et al. Somatic diversification and selection of immunoglobulin heavy and light chain variable region genes in IgG+ CD5+ chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Exp Med*. (1995) 181:1507–17. doi: 10.1084/jem.181.4.1507
- Hatzi K et al. B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia (B-CLL) Cells Express Antibodies Reactive with Antigenic Epitopes Expressed on the Surface of Common Bacteria. *Blood*, vol. 108, no. 11, 16 Nov. 2006, pp. 25–25.
- Hervé M, et al. Unmutated and Mutated Chronic Lymphocytic Leukemias Derive from Self-Reactive B Cell Precursors despite Expressing Different Antibody Reactivity. *Journal of Clinical Investigation*, vol. 115, no. 6, 1 June 2005, pp. 1636–1643, <https://doi.org/10.1172/jci24387>.

- Janeway CA, et al. Immunobiology: The Immune System In Health And Disease. 2001.
- Johnson TA, et al. Ig VH1 genes expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia exhibit distinctive molecular features. J Immunol. (1997) 158:235–46
- Jung D, et al. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. Annu Rev Immunol. 2006; 24:541-70.
- Justiz-Vaillant A, et al. Neuropsychiatric Systemic Lupus Erythematosus: Molecules Involved in Its Immunopathogenesis, Clinical Features, and Treatment. Molecules, vol. 29, no. 4, 6 Feb. 2024, pp. 747–747, <https://doi.org/10.3390/molecules29040747>.
- Kindt TJ, et al. Kuby Immunology. 2007.
- Kostareli E, et al. Antigen Receptor Stereotypy across B-Cell Lymphoproliferations: The Case of IGHV4-59/IGKV3-20 Receptors with Rheumatoid Factor Activity. Leukemia, vol. 26, no. 5, May 2012, pp. 1127–31, <https://doi.org/10.1038/leu.2011.311>.
- Kostareli E, et al. “Molecular Evidence for EBV and CMV Persistence in a Subset of Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia Expressing Stereotyped IGHV4-34 B-Cell Receptors.” Leukemia, vol. 23, no. 5, 15 Jan. 2009, pp. 919–924, <https://doi.org/10.1038/leu.2008.379>.
- Kurosaki T, et al. Unique properties of memory B cells of different isotypes. Immunol Rev. (2010) 237:104–16. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00939.x.
- Kyheroinen S, et al. Regulation of nuclear actin levels and MRTF/SRF target gene expression during PC6.3 cell differentiation, Experimental Cell Research, 420:113356, 2022
- Lefranc MP. IMGT, the International ImMunoGeneTics Database. Nucleic Acids Research, vol. 29, no. 1, 1 Jan. 2001, pp. 207–209, <https://doi.org/10.1093/nar/29.1.207>.
- Lewis MJ, et al. Structural Requirements for the Interaction of Human IgA with the Human Polymeric Ig Receptor. The Journal of Immunology, vol. 175, no. 10, 15 Nov. 2005, pp. 6694–6701, [journals.aai.org/jimmunol/article/175/10/6694/74892](https://journals.aai.org/jimmunol/article/175/10/6694/74892).
- Li G, et al. Lymphocyte-specific compensation for XLF/cernunnos end-joining functions in V(D)J recombination. Mol Cell. 2008;31(5):631–40.
- Malavasi F, et al. Review article CD38 and chronic lymphocytic leukemia : a decade later. 2015;118(13):3470–3479.

- Malu S, et al. Role of Non-Homologous End Joining in V(D)J Recombination. *Immunologic Research*, vol. 54, no. 1-3, 9 May 2012, pp. 233–246, <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8329-z>.
- Marcatili P, et al. Igs Expressed by Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells Show Limited Binding-Site Structure Variability. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), vol. 190, no. 11, Jan. 2013, pp. 5771–8, [pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23636053/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23636053/),
- Martensson IL, et al. The pre B-cell receptor. *Curr Opin Immunol*. 2007; 19:137-42.
- Maul RW, et al. Controlling somatic hypermutation in immunoglobulin variable and switch regions. *Immunol Res*. (2010) 47:113–22. doi: 10.1007/s12026-009-8142-5
- Maurer MJ, et al. Diagnosis-To-Treatment Interval Is an Important Clinical Factor in Newly Diagnosed Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Has Implication for Bias in Clinical Trials. *Journal of Clinical Oncology*, vol. 36, no. 16, 1 June 2018, pp. 1603–1610, <https://doi.org/10.1200/jco.2017.76.5198>.
- Migliazza A, et al. Frequent somatic hypermutation of the 5' noncoding region of the BCL6 gene in B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1995) 92:12520–4. doi: 10.1073/pnas.92.26.12520
- Mukai, et al. Establishment and Implementation of Cancer Genomic Medicine in Japan. *Cancer Science*, vol. 112, no. 3, 2 Feb. 2021, pp. 970–977, <https://doi.org/10.1111/cas.14754>.
- Nowosad C, et al. Germinal Center B Cells Recognize Antigen through a Specialized Immune Synapse Architecture. *Nature Immunology*, vol. 17, no. 7, 16 May 2016, pp. 870–877, <https://doi.org/10.1038/ni.3458>. Accessed 3 Dec. 2021.
- Osajima T, et al. Computational and Statistical Study on the Molecular Interaction between Antigen and Antibody. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, vol. 53, Sept. 2014, pp. 128–139, <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2014.07.005>.
- Palmeira P, et al. IgG Placental Transfer in Healthy and Pathological Pregnancies. *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 2012, no. 985646, 2012, pp. 1–13, <https://doi.org/10.1155/2012/985646>.
- Pelanda R, et al. B-Cell Intrinsic and Extrinsic Signals That Regulate Central Tolerance of Mouse and Human B Cells. *Immunological Reviews*, vol. 307, no. 1, 8 Jan. 2022, pp. 12–26.

- Peled JU, et al. The biochemistry of somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol.* (2008) 26:481–511. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.0 90236
- Pillai S, et al. Marginal zone B cells. *Ann Rev Immun.* (2005) 23:161–96. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115728
- Plomp R, et al. Hinge-Region O-Glycosylation of Human Immunoglobulin G3 (IgG3). *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 14, no. 5, May 2015, pp. 1373–1384, <https://doi.org/10.1074/mcp.m114.047381>.
- Polychronidou E, et al. Automated Shape-Based Clustering of 3D Immunoglobulin Protein Structures in Chronic Lymphocytic Leukemia. *BMC Bioinformatics*, vol. 19, no. S14, Nov. 2018, <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2381-1>.
- Poppelaars F, et al. The Contribution of Complement to the Pathogenesis of IgA Nephropathy: Are Complement-Targeted Therapies Moving from Rare Disorders to More Common Diseases? *Journal of Clinical Medicine*, vol. 10, no. 20, 14 Oct. 2021, p. 4715, <https://doi.org/10.3390/jcm10204715>.
- Rai K. Progress in chronic lymphocytic leukaemia: a historical perspective. *Baillière's Clinical Haematology*, Vol. 6, No. 4, December 1993 ISBN 0-7020-1705-1.
- Rozman C, and Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 1995;333(16):1052–1057.
- Ru H, et al. Molecular Mechanism of V(D)J Recombination from Synaptic RAG1-RAG2 Complex Structures. *Cell*, vol. 163, no. 5, Nov. 2015, pp. 1138–1152, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.055>.
- Rudolph MG, et al. How Tcrs Bind Mhcs, Peptides, and Coreceptors. *Annu. Rev. Immunol.* 2006;24(1):419–466.
- Schatz D, et al. V(D)J Recombination: Mechanisms of Initiation. *Annual Review of Genetics*, vol. 45, no. 1, 15 Dec. 2011, pp. 167–202, <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132552>.
- Seifert M, and Kuppers R. Human memory B cells. *Leukemia.* (2016) 30:2283–92. doi: 10.1038/leu.2016.226

- Seifert M, and Kuppers R. Molecular footprints of a germinal center derivation of human IgM+(IgD+)CD27+ B cells and the dynamics of memory B cell generation. *J Exp Med.* (2009) 206:2659–69. doi: 10.1084/jem.20091087
- Shirai H, et al. H3-Rules: Identification of CDR-H3 Structures in Antibodies. *FEBS Letters*, vol. 455, no. 1-2, 15 July 1999, pp. 188–197.
- Steininger C, et al. Recombinant Antibodies Encoded by IGHV1-69 React with PUL32, a Phosphoprotein of Cytomegalovirus and B-Cell Superantigen. *Blood*, vol. 119, no. 10, 8 Mar. 2012, pp. 2293–2301, <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-374058>.
- Stevenson F, and Caligaris-Cappio F. Chronic Lymphocytic Leukemia: Revelations from the B-Cell Receptor. *Blood*, vol. 103, no. 12, 15 June 2004, pp. 4389–4395, <https://doi.org/10.1182/blood-2003-12-4312>.
- Takemori T, et al. Generation of memory B cells inside and outside germinal centers. *Eur J Immunol.* (2014) 44:1258–64. doi: 10.1002/eji.201343716
- Tobin G, 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. doi: 10.1182/blood-2002-11-3485
- Tomonori, et al. Computational and Statistical Study on the Molecular Interaction between Antigen and Antibody. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, vol. 53, Sept. 2014, pp. 128–139, <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2014.07.005>.
- Treml J, et al. The BLyS Family: Toward a Molecular Understanding of B Cell Homeostasis. *Cell Biochemistry and Biophysics*, vol. 53, no. 1, 26 Nov. 2008, pp. 1–16, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2654184/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2654184/).
- Ulferts S, et al. Emerging properties and functions of actin and actin filaments inside the nucleus, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 13 (2021).
- Van Bockstaele F, et al. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: A comprehensive review. *Blood Rev.* 2009;23(1):25–47.
- Vardi A, et al. Immunogenetic Studies of Chronic Lymphocytic Leukemia: Revelations and Speculations about Ontogeny and Clinical Evolution. *Cancer Research*, vol. 74, no. 16, 13 Aug. 2014, pp. 4211–4216, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-14-0630>.

- Vasilev V, et al. Clinical Relevance of Anti-C3 and Anti-C4 Autoantibodies in Lupus Nephritis. *Kidney International Reports*, 1 Feb. 2023.
- Weill JC, et al. Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol.* (2009) 27:267–85. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132607
- Wienand K, et al. Genomic Analyses of Flow-Sorted Hodgkin Reed-Sternberg Cells Reveal Complementary Mechanisms of Immune Evasion. *Blood Advances*, vol. 3, no. 23, 9 Dec. 2019, pp. 4065–4080.
- Xu Z, et al. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat Rev Immunol.* (2012) 12:517–31. doi: 10.1038/nri3216
- Yao C-Y, et al. Distinct Immunogenetic Profiles of Chronic Lymphocytic Leukemia in Asia: A Taiwan Cooperative Oncology Group Registry Study. *HemaSphere*, vol. 6, no. 12, 25 Nov. 2022, p. e803, [pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9704955/](https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9704955/), <https://doi.org/10.1097/hs9.0000000000000803>.
- Zhang M, et al. The pre-B cell receptor and its function during B cell development. *Cell Mol Immunol.* 2004; 1:89-94.

«Δηλώνω ρητά ότι το κείμενο της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας δεν αποτελεί προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον»