ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ & ΜΟΝΑΔΑ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ
ΑΙΜΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΝΘ « Γ. ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ»

Ρεπερτόριο και λειτουργικότητα υποδοχέων έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας στη Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία

Διδακτορική Διατριβή

ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ ΝΤΟΥΦΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Αθήνα, Ιανουάριος 2013

1. Πρόλογος

Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ) είναι η πιο κοινή μορφή λευχαιμίας στο Δυτικό ημισφαίριο. Τα τελευταία χρόνια, το status σωματικών μεταλλάξεων των γονιδίων της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών (IGHV) των λευχαιμικών λεμφοκυττάρων έχει αποδειχθεί ως ένας από τους πιο σημαντικούς βιολογικούς δείκτες για τον καθορισμό της πρόγνωσης των ασθενών με ΧΛΛ. Εκτός όμως από προγνωστικές πληροφορίες, η ανάλυση του ρεπερτορίου των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών στη ΧΛΛ προσέφερε επίσης σημαντικές ενδείξεις για τη βιολογία και την ανοσοπαθογένεια της νόσου. Το πιο εντυπωσιακό χαρακτηριστικό της ΧΛΛ είναι η ύπαρξη υποσυνόλων ασθενών που εκφράζουν ομόλογους («στερεότυπους») Β κυτταρικούς υποδοχείς (B cell receptors, BCRs). Η στερεοτυπία αποτελεί ισχυρότατη ένδειξη για την αντιγονική διέγερση των κλωνογενών κυττάρων της ΧΛΛ και υποδηλώνει πιθανή στερεοτυπία και όσον αφορά στα αντιγόνα.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα λευχαιμικά κύτταρα των ασθενών με ΧΛΛ δεν αναπτύσσονται αυτόνομα αλλά, αντίθετα, εξαρτώνται από τη συνεχή αλληλεπίδραση των υποδοχέων τους με ερεθίσματα (αντιγόνα) από το περιβάλλον (εξω/άλλο-αντιγόνα) αλλά και τον ίδιο τον οργανισμό (αυτοαντιγόνα).

Η άμυνα έναντι παθογόνων μικροοργανισμών στηρίζεται στη συνεργική δράση πολλών μηχανισμών, ώστε να επιτευχθεί αποτελεσματική άνοση απάντηση. Σε αυτούς τους μηχανισμούς συμπεριλαμβάνεται και η μη ειδική διέγερση των Β λεμφοκυττάρων μέσω των υποδοχέων έμφυτης ανοσίας, κύριοι αντιπρόσωποι των οποίων είναι οι υποδοχείς τύπου Toll και NOD (Toll Like Receptors, TLRs, Nod Like Receptors, NLRs). Οι υποδοχείς αυτοί ανήκουν σε πολυμελείς οικογένειες και η εξαιρετική σημασία τους υποδηλώνεται από την εξελικτική διατήρησή τους σε ασπόνδυλα και σπονδυλωτά. Κάθε μέλος της οικογένειας αναγνωρίζει ιδιαίτερα μοριακά μοτίβα κοινών παθογόνων και η ενεργοποίησή τους επάγει την έκφραση φλεγμονώδεων κυτταροκίνων. Κατ’ αυτόν τον τρόπο οι υποδοχείς έμφυτης ανοσίας ρυθμίζουν την προσαρμοστική ανοσία.

Η διαφαινόμενη σχέση μεταξύ άλλο-αντιδραστικότητας (εναντίον παθογόνων μικροβίων), αυτοαντιδραστικότητας και ΧΛΛ υποδηλώνει την ανάγκη μελέτης όχι μόνο των υποδοχέων BcR αλλά επίσης και των υποδοχέων της έμφυτης ανοσίας για την εξαγωγή αξιόπιστων ενδείξεων αναφορικά με τη φύση των αντιγόνων που διεγείρουν τα κλωνογενή λευχαιμικά κύτταρα. Τα δεδομένα που υπάρχουν σχετικά με την έκφραση και λειτουργικότητα των υποδοχέων TLR και NLR στη ΧΛΛ είναι περιορισμένα και προέρχονται από μικρές σειρές ασθενών.

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε ανάλυση της έκφρασης και λειτουργικότητας των υποδοχέων TLR και NLR σε μια μεγάλη και καλά χαρακτηρισμένη ομάδα ασθενών με ΧΛΛ. Επίσης, πραγματοποιήθηκε συσχέτιση των προτύπων έκφρασης και λειτουργικότητας των υποδοχέων με τα ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά των ασθενών. Τέλος, έγινε αρχική μελέτη των μηχανισμών οι οποίοι πιθανόν ελέγχουν τη διαφορετική απόκριση των ασθενών στα ερεθίσματα μέσω των υποδοχέων TLR και NLR.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη της κας. Βασιλικής Αλεπόρου - Μαρίνου, Αναπληρώτριας Καθηγήτριας του Τομέα Γενετικής & Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ). Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα. Αλεπόρου για την πολύπλευρη συμπαράσταση που μου παρείχε σε όλες τις φάσεις εκπόνησης της διατριβής. Εκφράζω επίσης ιδιαίτερες ευχαριστίες στην κα. Παναγούλα Κόλλια, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τομέα Γενετικής & Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ, καθώς και στην κα. Ελένη Παπαδάκη, Καθηγήτρια Κλινικής Αιματολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης για την καθοδήγηση και την υποστήριξή τους ως μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής της διδακτορικής διατριβής.

Το εργαστηριακό τμήμα της διδακτορικής διατριβής εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και στο Εργαστήριο Κυτταρομετρίας Ροής της Αιματολογικής Κλινικής και Μονάδας Μεταμόσχευσης Αιμοποιητικών Κυττάρων του ΓΝ «Γ. Παπανικολάου» κατά το χρονικό διάστημα 2008-2012. Θα ήθελα σε αυτό το πλαίσιο να ευχαριστήσω θερμά τον Διευθυντή της Κλινικής κ. Αχιλλέα Αναγνωστόπουλο για το ενδιαφέρον του και την πολύπλευρη στήριξή του.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον κ. Κώστα Σταματόπουλο, Αιματολόγο-Επιμελητή του Τμήματος, Υπεύθυνο του Εργαστηρίου Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας, για την άριστη συνεργασία μας, την πολύτιμη καθοδήγησή του, τις υποδείξεις και διορθώσεις του σε όλες τις φάσεις διεκπεραίωσης της παρούσας εργασίας. Τον ευχαριστώ θερμά για την καθημερινή επίβλεψη, τον χρόνο που μου αφιέρωσε και την συμπαράστασή του όλο αυτό το διάστημα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κα. Χρυσούλα Μπέλεση, Βιοπαθολόγο, Διευθύντρια στο Αιματολογικό Τμήμα του ΠΓΝ Νίκαιας, η οποία με τις γνώσεις, τον ορθολογισμό και τη μεγάλη εργαστηριακή εμπειρία της συνέβαλε αποφασιστικά στο σχεδιασμό και την ολοκλήρωση της μελέτης.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους συνεργάτες και φίλους της επιστημονικής ομάδας Ανδρέα Αγαθαγγελλίδη, Νίκο Παπακωνσταντίνου, Βασίλη Μπίκο και Μαρία Γούναρη, Βιολόγους και υποψήφιους Διδάκτορες, Δρ. Αναστασία Χατζηδημητρίου, Βιολόγο και Ευαγγελία Σταλίκα, Βιολόγο για την πολύπλευρη στήριξή τους, τις συζητήσεις και την άψογη συνεργασίας μας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό και τους συνεργάτες των εργαστηρίων Μοριακής Βιολογίας και Κυτταρομετρίας Ροής της Αιματολογικής Κλινικής και Μονάδας Μεταμόσχευσης Αιμοποιητικών Κυττάρων του ΓΝ «Γ. Παπανικολάου» και ιδιαίτερα την κα. Τασούλα Τουλουμενίδου, Βιολόγο, καθώς και τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές για την πολύτιμη βοήθειά τους στη διεκπεραίωση της πειραματικής διαδικασίας της εργασίας αυτής.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους φίλους μου για τη συναισθηματική στήριξη τη συμπαράσταση και τη μεγάλη υπομονή που έδειξαν όλο αυτό το διάστημα και πάνω απ' όλους τους γονείς και την αδερφή μου που είναι πάντοτε κοντά μου σε όλη τη διάρκεια της ζωής μου και μου παρέχουν ανιδιοτελή αγάπη, κατανόηση και ουσιαστική συμπαράσταση σε ο,τιδήποτε επιχειρώ.

Αθήνα, Ιανουάριος 2013

1. ΠΡΟΛΟΓΟΣ 2

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 8

2.1 ΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ 8
2.2 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΤΟΠΟΙ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ 10
2.3 ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ 12
2.3.1 ΓΕΝΙΚΑ 12
2.3.2 ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ 13
2.3.3 ΠΡΟΤΥΠΟ ΕΚΦΡΑΣΗΣ MICRORNAS 14
2.3.4 ΜΟΡΙΑΚΑ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ 14
2.3.4.1 Διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων 15
2.3.5 ΡΕΠΕΡΤΟΡΙΟ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ IGHV ΣΤΗ ΧΛΛ 20
2.3.6 STATUS ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ IGHV 20
2.3.7 ΜΟΡΙΑΚΗ ΣΤΕΡΕΟΤΥΠΙΑ ΤΟΥ BCR 22
2.3.8 ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΤΩΝ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗ ΧΛΛ 23
2.3.9 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ BCR ΣΤΗ ΧΛΛ 25
2.3.9.1 Σηματοδότηση μέσω του BcR 25
2.3.10 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ ΣΤΗ ΧΛΛ 29
2.4 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΕΜΦΥΤΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΣΤΗ ΧΛΛ 30
2.4.1 Η ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΟΣΙΑ ΕΛΕΓΧΕΤΑΙ ΑΠΟ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΗΣ ΕΜΦΥΤΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ 30
2.4.2 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ TLR 33
2.4.2.1 Γενικά 33
2.4.2.2 Δομή υποδοχέων TLR 33
2.4.2.3 Προσδέτες των υποδοχέων TLR 34
2.4.2.4 Πρότυπο έκφρασης των υποδοχέων TLR 36
2.4.3 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ NLR 37
2.4.3.1 Γενικά 37
2.4.3.2 Δομή των υποδοχέων NOD1 και NOD2 38
2.4.3.3 Συνδέτες και πρότυπο έκφρασης των υποδοχέων NOD1 και NOD2 39
2.4.4 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΕΜΦΥΤΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ 39
2.5 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΕΜΦΥΤΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΣΤΑ Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ 40
2.5.1 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ 40
2.5.2 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ TLR ΣΤΗ ΧΛΛ 42
2.6 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΜΕΣΩ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΕΜΦΥΤΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ 43
2.6.1 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΜΕΣΩ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ TLR 43
2.6.1.1 Ενεργοποίηση του NF-κB και AP-1 από το MyD88-εξαρτώμενο μονοπάτι 44
2.6.1.2 Ενεργοποίηση του NF-κB και AP-1 από το TRIF-εξαρτώμενο μονοπάτι 46
2.6.2 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΜΕΣΩ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ NOD 47

3. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ 49

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 52

4.1 ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΕΠΙΛΟΓΗ $CD19^+$ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΧΛΛ 52
4.1.1 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΤΩΝ $CD19^+$ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ 53
4.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA 54
4.2.1 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ RNA 55
4.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA (CDNA) 55

4.3.1 Ποιοτικος ελεγχος του cDNA 56
4.4 Ποσοτικοποιηση Μεταγραφων 57
4.4.1 RT^2 Profiler^{TM} PCR Array 57
4.4.2 Real time PCR για τα γονιδια NOD 58
4.4.3 Αναλυση αποτελεσματων με τη μεθοδο ΔΔCt 59
4.5 Προσδιορισμος εκφρασης πρωτεϊνων με κυτταρομετρια ροης 60
4.5.1 Αναλυση αποτελεσματων 62
4.6 Ανοσοανιχνευση Western 64
4.6.1 Συλλογη κυτταρων και ληψη κυτταρικου εκχυλισματος (harvesting) 64
4.6.2 Ποσοτικοποιηση των πρωτεϊνων 64
4.6.3 SDS-Ηλεκτροφορηση πρωτεϊνων 65
4.6.4 Ηλεκτρομεταφορα πρωτεϊνων σε μεμβρανη PVDF 65
4.6.5 Ανοσοανιχνευση Western με τη χρηση βιοτινης-στρεπταβιδινης 66
4.6.6 Ανοσοανιχνευση Western με τη χρηση χημειοφωταυγειας 68
4.7 Διεγερση των υποδοχεων TLR 69
4.7.1 Συλλογη κυτταρων και μετρηση της εκφρασης των συνδιεγερτικων μοριων 69
4.7.1.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων κυτταρομετρίας ροής 71
4.7.2 Συλλογη κυτταρων και μετρηση της βιωσιμοτητας των κυτταρων 71
4.7.2.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων κυτταρομετρίας ροής 72
4.8 Διεγερση των υποδοχεων TLR και Real time RT-PCR 73
4.9 Στατιστικη αναλυση 73

5. ΟΜΑΔΑ ΜΕΛΕΤΗΣ 74

5.1 Προτυπο εκφρασης των υποδοχεων TLR και μοριων του σηματοδοτικου μονοπατιου 74
5.2 Προτυπο εκφρασης των υποδοχεων NLR 75
5.3 Προσδιορισμος των επιπεδων εκφρασης των υποδοχεων TLR και των συνδιεγερτικων μοριων CD80 και CD86 σε πρωτεϊνικο επιπεδο 75
5.4 Αναλυση λειτουργικοτητας των υποδοχεων TLR και NOD2 75

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 76

6.1 Προτυπο εκφρασης των υποδοχεων TLR και μοριων του σηματοδοτικου μονοπατιου 76
6.2 Προσδιορισμος των επιπεδων εκφρασης των υποδοχεων TLR και των συνδιεγερτικων μοριων CD80 και CD86 σε πρωτεϊνικο επιπεδο 80
6.3 Συσχετιση των προτυπων γονιδιακης εκφρασης με ιδιαιτερα μοριακα χαρακτηριστικα του BcR 82
6.3.1 Status μεταλλαξεων των γονιδιων IGHV 82
6.3.2 Στερεοτυπια του Β κυτταρικου υποδοχεα 84
6.4 Προτυπο εκφρασης των υποδοχεων NOD 87
6.5 Αναλυση λειτουργικοτητας των υποδοχεων TLR και NOD2 στη ΧΛΛ 88
6.5.1 Επαγωγη της εκφρασης συνδιεγερτικων μοριων 89
6.5.2 Επαγωγη αποπτωσης 93
6.6 Συσχετιση των προτυπων λειτουργικοτητας των TLR με ιδιαιτερα μοριακα χαρακτηριστικα του BcR 96
6.6.1 Status μεταλλαξεων των γονιδιων IGHV 97
6.6.2 Στερεοτυπια του Β κυτταρικου υποδοχεα 100
6.7 Διερευνηση της ρυθμισης του σηματοδοτικου μονοπατιου των υποδοχεων TLR 107
6.7.1 Ρυθμιση σε μεταγραφικο επιπεδο 107
6.7.2 Ρυθμιση σε μετα-μεταφραστικο επιπεδο 112

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 114

7.1 ΓΕΝΙΚΑ 114
7.2 ΠΡΟΤΥΠΟ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ TLR ΚΑΙ ΜΟΡΙΩΝ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΣΤΗ ΧΛΛ 117
7.3 ΠΡΟΤΥΠΟ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ TLR ΚΑΙ NOD2 ΣΤΗ ΧΛΛ 121
7.4 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ TLR 127
7.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 128

8. ΠΕΡΙΛΗΨΗ 130

8.1 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΥΠΟΥ TOLL ΣΤΗ ΧΛΛ: ΙΔΙΑΙΤΕΡΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΠΟΥ ΑΝΗΚΟΥΝ ΣΕ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΑ ΣΤΕΡΕΟΤΥΠΑ ΥΠΟΣΥΝΟΛΑ 130
8.2 ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΥΠΟ-ΟΜΑΔΕΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΧΛΛ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΖΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΙΔΙΑΙΤΕΡΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΕΜΦΥΤΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ. 132

9. ABSTRACT 135

9.1 TOLL-LIKE RECEPTOR SIGNALING PATHWAY IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA: DISTINCT GENE EXPRESSION PROFILES OF POTENTIAL PATHOGENETIC SIGNIFICANCE IN SPECIFIC SUBSETS OF PATIENTS 135
9.2 DIFFERENTIAL FUNCTIONAL OUTCOMES AFTER STIMULATION VIA INNATE IMMUNE RECEPTORS IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA SUBTYPES DEFINED BY THE MOLECULAR FEATURES OF THE IMMUNOGLOBULIN RECEPTOR 137

10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 139

11. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ 155

12. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ 162

13. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ 173

2. Εισαγωγή

2.1 Το ανοσοποιητικό σύστημα

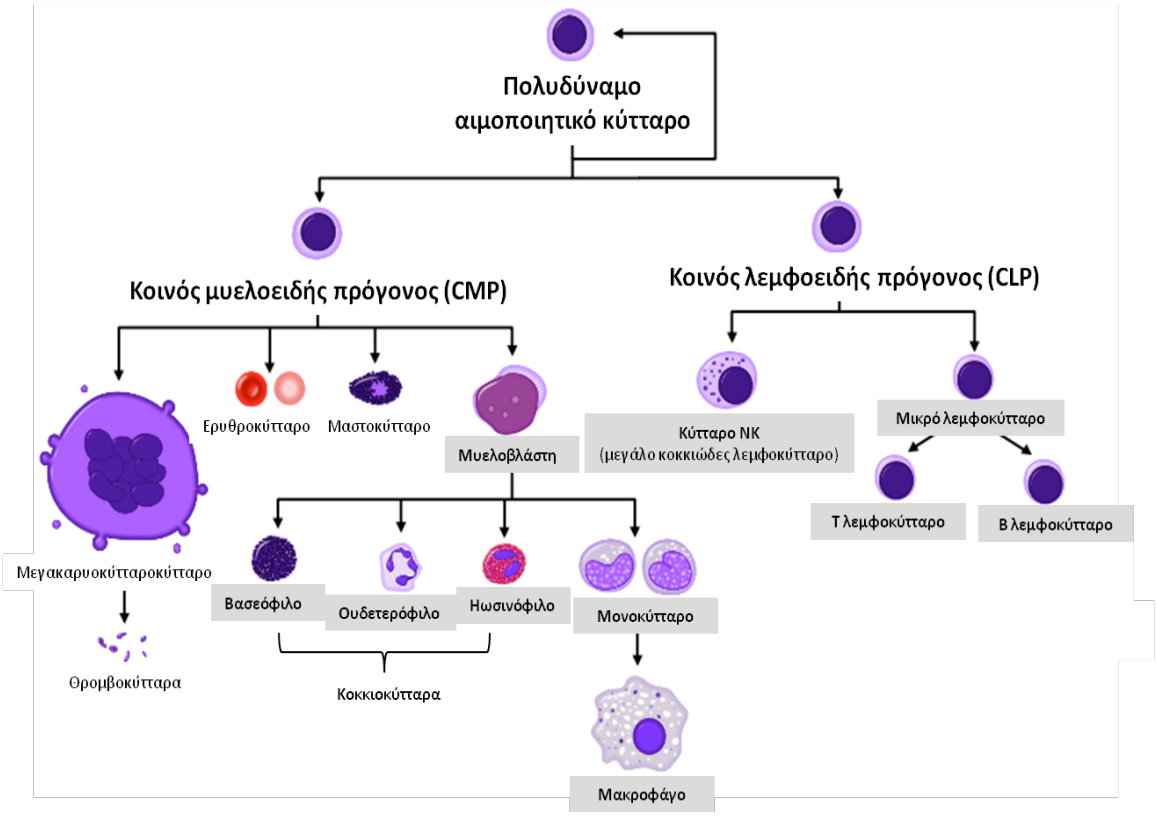
Ο άνθρωπος λειτουργεί ως ξενιστής για μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών, πολλοί από τους οποίους είναι μολυσματικοί και δυνητικά προκαλούν νόσο. Συνεπώς, ο οργανισμός έχει εξελιχθεί αναπτύσσοντας άμυνες που εξασφαλίζουν την έγκαιρη αντιμετώπιση των παθογόνων, επιτυγχάνοντας ουσιαστικά την επιβίωσή του. Η πρώτη γραμμή άμυνας συντελεί στην παρεμπόδιση της εισόδου των παθογόνων στον οργανισμό, μέσω ανατομικών (δέρμα, βλεννογόνοι, κροσσωτό επιθήλιο της αναπνευστικής οδού) και βιοχημικών φραγμών (γαλακτικό οξύ, γαστρικό υγρό, σίελος). Οι μολυσματικοί παράγοντες που τελικά εισέρχονται στον ξενιστή μπορεί να προκαλέσουν λοιμώξεις οι οποίες αντιμετωπίζονται μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος[1].

Η δομή του ανοσοποιητικού συστήματος σε επίπεδο ιστών και οργάνων περιλαμβάνει ένα ευρύ δίκτυο δομών που κατέχουν στρατηγικές θέσεις σε όλο το σώμα. Τα όργανα του ανοσοποιητικού συστήματος τα οποία εμπλέκονται στην παραγωγή των εξειδικευμένων ανοσοκυττάρων που καλούνται λεμφοκύτταρα διακρίνονται σε πρωτογενή, όπου συμβαίνει η διαφοροποίηση των αρχέγονων κυττάρων σε λεμφοκύτταρα, και δευτερογενή, όπου πραγματοποιείται η αλληλεπίδραση των λεμφοκυττάρων με τα αντιγόνα. Πρωτογενή λεμφικά όργανα είναι ο θύμος αδένας και ο μυελός των οστών, ενώ δευτερογενή οι λεμφαδένες, ο σπλήνας, ο διάχυτος λεμφικός ιστός στο σώμα και οι λεμφικοί ιστοί των βλεννογόνων (mucosa associated lymphoid tissue, MALT)[2].

Κύρια λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η αναγνώριση των παθογόνων παραγόντων και η δράση για την εξάλειψη τους, ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι βλάβες που προκαλούν. Οι άνοσες απαντήσεις διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, έμφυτες ή φυσικές και προσαρμοστικές ή επίκτητες. Οι δύο κατηγορίες άνοσων απαντήσεων διαφέρουν ως προς i) τα κύτταρα και μόρια που χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση των αντιγόνων, ii) την ειδικότητα και το χρόνο έναρξης (τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας δρουν ταχύτατα, παρότι μη

ειδικά), iii) τη «μνήμη» που χαρακτηρίζει την προσαρμοστική ανοσία. Η διέγερση τόσο της έμφυτης όσο και της προσαρμοστικής ανοσίας εξαρτάται από τη δραστηριότητα των λευκών αιμοσφαιρίων ή λευκοκυττάρων και η συνεργική δράση τους παρέχει ένα αποτελεσματικό αμυντικό σύστημα που εξασφαλίζει ότι παρά τη διαρκή επαφή μας με δυνητικά παθογόνους παράγοντες νοσούμε σχετικά σπάνια και ότι οι λοιμώξεις συνήθως αντιμετωπίζονται επιτυχώς και καταλείπουν μόνιμη ανοσία[1].

Τα λευκοκύτταρα είναι μια ομάδα κυτταρικών πληθυσμών, καθένας από τους οποίους επιτελεί συγκεκριμένη λειτουργία. Η εύρυθμη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος εξαρτάται από τη συντονισμένη δράση και αλληλεπίδραση αυτών των κυτταρικών πληθυσμών. Τα λευκοκύτταρα προέρχονται από κοινούς κυτταρικούς πρόγονους, τα πολυδύναμα ή αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα που βρίσκονται στο μυελό των οστών. Από αυτά προκύπτουν τα μητρικά κύτταρα περιορισμένης εξελικτικής εμβέλειας που είναι οι άμεσοι πρόγονοι όλων των κυτταρικών πληθυσμών του αίματος. Από το προγονικό κύτταρο της μυελικής σειράς προκύπτουν τα κοκκιοκύτταρα και τα μακροφάγα, που αποτελούν τον ένα βασικό πληθυσμό λευκοκυττάρων. Ο δεύτερος πληθυσμός είναι τα λεμφοκύτταρα που προκύπτουν από τον κοινό πρόγονο της λεμφικής σειράς και διακρίνονται σε Β και Τ λεμφοκύτταρα (Εικόνα 1)[1,2]. Οι λειτουργίες των Β και Τ λεμφοκυττάρων επιτελούνται μέσω των υποδοχέων υψηλής συγγένειας που εκφράζουν στην επιφάνειά τους, οι οποίοι είναι ο Τ και Β κυτταρικός υποδοχέας, αντίστοιχα (B cell Receptor, BcR και T cell Receptor, TcR). Το αντικείμενο της συγκεκριμένης διατριβής είναι η Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία, ΧΛΛ, που είναι νεόπλασμα των Β λεμφοκυττάρων. Για το λόγο αυτό θα ακολουθήσει μια εισαγωγή στη δομή των ανοσοσφαιρινών οι οποίες σε συνεργασία με άλλους συν-υποδοχείς δημιουργούν τον BcR.



Εικόνα 1: Διαγραμματική απεικόνιση της οντογένεσης των λευκοκυττάρων.

2.2 Δομή και γενετικοί τόποι των ανοσοσφαιρινών

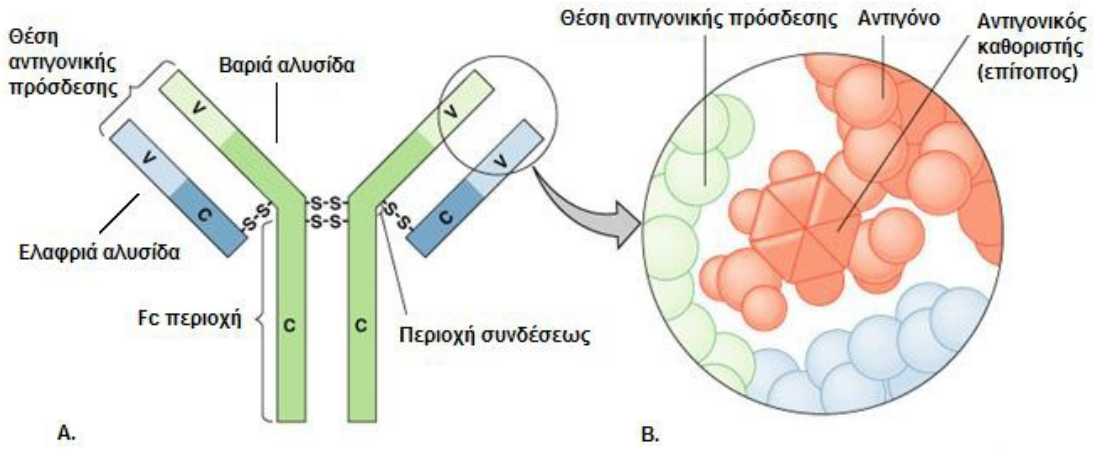
Οι ανοσοσφαιρίνες ή αντισώματα είναι οικογένεια γλυκοπρωτεϊνών του πλάσματος. Τ' αντισώματα εκκρίνονται από τα πλασματοκύτταρα και επιτελούν δύο κύριες λειτουργίες: i) αναγνωρίζουν και συνδέονται με το αντιγόνο που προκάλεσε την παραγωγή τους και ii) προσελκύουν άλλα κύτταρα και μόρια, με σκοπό την αντιμετώπιση του «κινδύνου»[2].

Οι ανοσοσφαιρίνες αποτελούνται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, δύο ταυτόσημες βαριές (heavy, H) και δύο ταυτόσημες ελαφριές (light, L) αλυσίδες. Οι βαριές αλυσίδες ενώνονται μεταξύ τους με δισουλφυδρυλικούς δεσμούς και κάθε βαριά αλυσίδα συνδέεται με την ελαφριά αλυσίδα μ' έναν δισουλφυδρυλικό δεσμό (Εικόνα 2). Σε κάθε ανοσοσφαιρίνη υπάρχει μόνο ένας τύπος ελαφριών αλυσίδων, είτε κ είτε λ. Με βάση το είδος της βαριάς αλυσίδας τους (μ, γ, δ, ε, α), οι ανοσοσφαιρίνες ταξινομούνται σε πέντε τάξεις (IgM, IgG, IgD, IgE, IgA). Η τάξη ή ισότυπος (isotype) της εκκρινόμενης ανοσοσφαιρίνης καθορίζει και το είδος των

εκτελεστικών μηχανισμών που ενεργοποιούνται. Στις βαριές και τις ελαφρές αλυσίδες διακρίνονται σταθερές (constant, **C**) και μεταβλητές (variable, **V**) περιοχές. Το αμινοτελικό άκρο των βαριών και ελαφριών αλυσίδων παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των διαφόρων τάξεων ανοσοσφαιρινών. Αντίθετα, το καρβοξυτελικό άκρο παραμένει σταθερό[3].

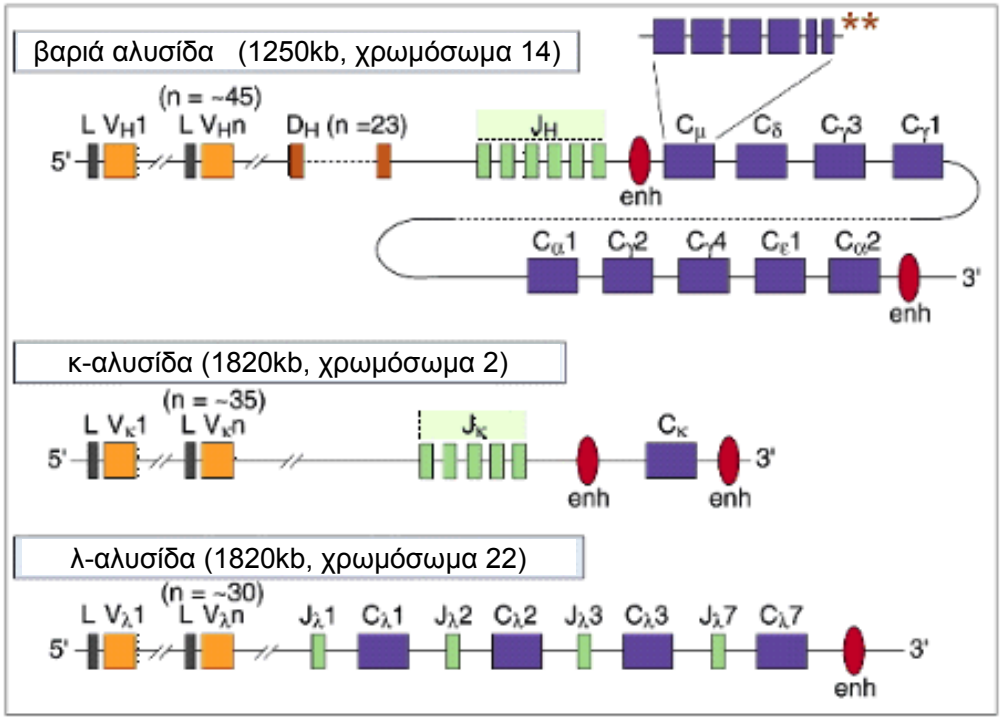
Στη μεταβλητή περιοχή τόσο των ελαφριών όσο και των βαριών αλυσίδων έχουν αναγνωριστεί τρεις περιοχές που παρουσιάζουν ακόμα μεγαλύτερη μεταβλητότητα. Οι περιοχές αυτές καλούνται υπερμεταβλητές (hypervariable regions). Οι τρεις υπερμεταβλητές περιοχές αποτελούν την περιοχή σύνδεσης με το αντιγόνο και καθορίζουν την ειδικότητα του αντισώματος, σχηματίζοντας μια θέση σύνδεσης συμπληρωματική με το αντιγόνο. Για το λόγο αυτό, οι τρεις υπερμεταβλητές περιοχές καλούνται και περιοχές καθορισμού της συμπληρωματικότητας (complementarity determining regions, **CDRs**) των L και H αλυσίδων: CDR1, CDR2 και CDR3[2,3].

Η ποικιλομορφία των περιοχών CDR ευθύνεται για την ειδικότητα που παρουσιάζουν τ' αντισώματα για τα διάφορα αντιγόνα. Τα τμήματα μεταξύ των υπερμεταβλητών περιοχών είναι λιγότερο μεταβλητά και αναφέρονται ως περιοχές πλαισίου (framework regions, **FRs**): FR1, FR2, FR3 και FR4. Οι περιοχές πλαισίου σχηματίζουν το δομικό πλαίσιο της περιοχής με τις υπερμεταβλητές αλληλουχίες[2,3].



Εικόνα 2: A. Αναπαράσταση μορίου αντισώματος. **B.** Αναπαράσταση της θέσης πρόσδεσης του αντιγόνου πάνω στο μόριο του αντισώματος *(Τροποποιημένη από Goldsby, RA, Kindt, TJ, Osborne, BA, Kuby, J, Immunology, 6th Ed, W H Freeman & Co).*

Οι γενετικοί τόποι των ανοσοσφαιρινών περιλαμβάνουν ομάδες γονιδίων. Στις βαριές αλυσίδες υπάρχουν τέσσερις ομάδες γονιδίων, οι V, D, J και C, ενώ στις ελαφριές αλυσίδες τρεις, οι V, J και C. Για τη συναρμολόγηση των κωδικοποιητικών αλληλουχιών της μεταβλητής περιοχής των ανοσοσφαιρινών, τυχαία επιλέγεται ένα γονίδιο από την κάθε ομάδα. Εκτός από τις ομάδες γονιδίων, οι γενετικοί τόποι των ανοσοσφαιρινών περιλαμβάνουν και πλήθος ρυθμιστικών γονιδίων που καθορίζουν τη μεταγραφή ή την αποσιώπηση, όπως οι αλληλουχίες-οδηγοί (leader sequences, L) πριν από κάθε γονίδιο V[4] (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Διάταξη των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών στους γενετικούς τόπους IGH, IGK, IGL. *Τροποιημένο από Elsevier Science USA, 2003*

2.3 Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία

2.3.1 Γενικά

Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (**ΧΛΛ**) είναι αιματολογική κακοήθεια που χαρακτηρίζεται από την *in vivo* συσσώρευση μονοκλωνικών Β λεμφοκυττάρων στο αίμα και το μυελό των οστών. Είναι η πιο κοινή μορφή λευχαιμίας στο Δυτικό ημισφαίριο και προσβάλλει κυρίως ηλικιωμένους και περισσότερο άνδρες

(αναλογία Α:Γ = 2:1)[5,6]. Η επιδημιολογία της ΧΛΛ υποδηλώνει γενετική προδιάθεση. Η ΧΛΛ είναι πιο κοινή στους Καυκάσιους και μειώνεται σε συχνότητα με κατιούσα σειρά μεταξύ των Μαύρων, των Ισπανών, Ινδών και των Ασιατών. Επιπλέον, το 10% των ασθενών με ΧΛΛ έχουν έναν πρώτου ή δευτέρου βαθμού συγγενή με ΧΛΛ[7].

Η κλινική πορεία της ΧΛΛ εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια: μερικοί ασθενείς επιβιώνουν για πολλά χρόνια χωρίς θεραπεία και τελικά πεθαίνουν από άλλα αίτια, ενώ άλλοι έχουν επιθετική νόσο και μικρή επιβίωση. Η κλινική ετερογένεια είναι συνυφασμένη με την ετερογένεια που παρατηρείται σε γενετικό και φαινοτυπικό επίπεδο. Η βασική έρευνα επέτρεψε τη διάκριση των ασθενών σε δύο υποομάδες με διαφορετικά μοριακά και κλινικά χαρακτηριστικά και έχει βοηθήσει στη διάγνωση καθώς και στην πρόγνωση της κλινικής πορείας της νόσου, αποκαλύπτοντας σημαντικούς προγνωστικούς δείκτες[6].

2.3.2 Κυτταρογενετικά ευρήματα

Η συχνότητα ανίχνευσης χρωμοσωμικών ανωμαλιών στα κλωνογενή κύτταρα της ΧΛΛ κυμαίνεται από 30-50% με μεθόδους κλασσικής κυτταρογενετικής και έως περίπου 80% με τη μέθοδο του φθορίζοντος in situ υβριδισμού (*FISH*)[8]. Παρότι δεν υπάρχει μια συγκεκριμένη κυτταρογενετική βλάβη που να θεωρείται ειδική για τη ΧΛΛ, κάποιες ανωμαλίες παρατηρούνται συχνότερα. Από τις πιο συχνές κυτταρογενετικές ανωμαλίες είναι η έλλειψη στο χρωμόσωμα 13, που θεωρείται ως δείκτης καλής πρόγνωσης, και η τρισωμία του χρωμοσώματος 12, η οποία έχει συσχετιστεί μ' ενδιάμεση ή δυσμενή πρόγνωση[9,10]. Επιπλέον, ελλείψεις στις χρωμοσωμικές ζώνες 11q22-q23, όπου εντοπίζονται τα γονίδια RDX (*radixin*) και ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) και, ιδίως, 17p (*TP53*) καθορίζουν μια ομάδα ασθενών με ταχεία εξέλιξη της νόσου και μικρή επιβίωση. Εξίσου δυσμενής είναι η πρόγνωση για ασθενείς με μεταλλάξεις του γονιδίου *TP53* χωρίς δομική ανωμαλία του χρωμοσώματος 17p[9] (Πινάκας 1).

Πίνακας 1: Γενετικές βλάβες με προγνωστική σημασία στη ΧΛΛ[11].

Καρυότυπος	*Πρόγνωση*	*Εμπλεκόμενα γονίδια*
έλλειψη 13q14.3	*καλή*	*mir-16.1*
τρισωμία 12	*ενδιάμεση*	*CLLU1*
έλλειψη 11q22-23	*κακή*	*ATM*
έλλειψη 17p13.1	*κακή*	*TP53*

2.3.3 Πρότυπο έκφρασης microRNAs

Ένας νέος παράγοντας για τη διάκριση ασθενών με ΧΛΛ σε υποομάδες με πιθανή προγνωστική αξία είναι το μοριακό πρότυπο των microRNA[12]. Μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση συγκεκριμένου πάνελ microRNAs (miR186, miR132, miR16-1, miR102, και miR29c) συνδέεται με καλύτερη πρόγνωση[13]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι δύο microRNA (miRN15a/miRN16-1) εντοπίζονται στην περιοχή 13q14.3, που αποτελεί ιδιαίτερα συχνό στόχο για ελλείψεις[14]. Ωστόσο, η έκφραση αυτών των microRNA φαίνεται ότι καταστέλλεται στις περισσότερες περιπτώσεις ΧΛΛ ανεξαρτήτως κυτταρογενετικού προτύπου, πιθανόν μέσω σημειακών μεταλλάξεων. Η καταστολή της έκφρασής των miRN15a και miRN16-1 φαίνεται ότι σχετίζεται με την υπερέκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης BCL-2, η οποία χαρακτηρίζει τα νεοπλασματικά κύτταρα της ΧΛΛ.

2.3.4 Μοριακά και ανοσοφαινοτυπικά ευρήματα

Η μοριακή και ανοσοφαινοτυπική ανάλυση είναι απαραίτητα εργαλεία για τη διάγνωση και κλινική πρόγνωση της ΧΛΛ και επέτρεψε τη διάκριση των ασθενών σε δύο υποομάδες με διαφορετικά μοριακά και κλινικά χαρακτηριστικά. Για να γίνουν κατανοητά τα δεδομένα που έχουν προκύψει από αυτού του είδους τις αναλύσεις καθώς και η χρησιμότητά τους, θ' ακολουθήσει μια εισαγωγή στη διαφοροποίηση των φυσιολογικών Β λεμφοκυττάρων.

2.3.4.1 Διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων

Το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών είναι υπεύθυνο για τη διαφοροποίηση των πολυδύναμων ή αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (pluripotent hematopoietic stem cells -PHSC) σε Β λεμφοκύτταρα. Το πρώτο βήμα για την ανάπτυξη του Β λεμφοκυττάρου είναι η δέσμευση του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου για διαφοροποίηση στον κοινό λεμφοειδή πρόγονο (common lymphoid progenitor-CLP), κύτταρο που χαρακτηρίζεται από ικανότητα διαφοροποίησης σε Β ή Τ λεμφοκύτταρα ή κύτταρα φυσικούς-φονείς (natural killer, NK).

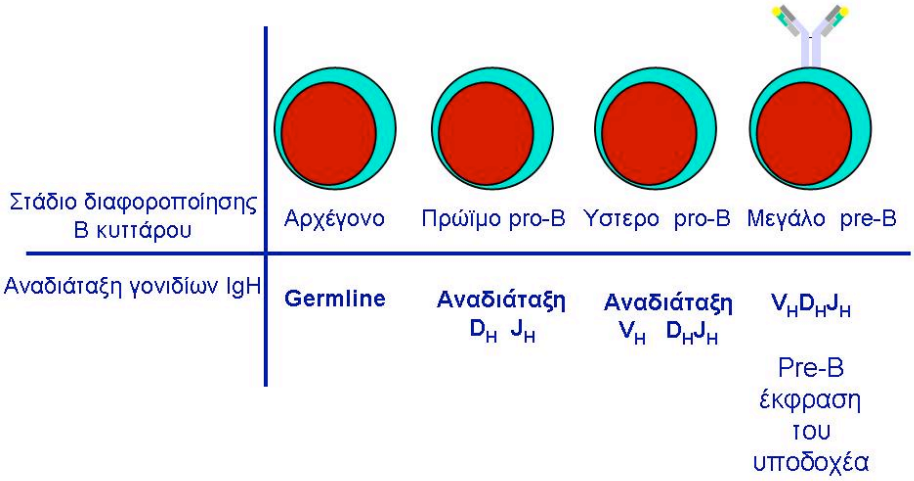
Η ανάπτυξη των Β λεμφοκυττάρων εξελίσσεται σε ποικίλα στάδια, καθένα από τα οποία καθορίζεται από τις αναδιατάξεις των γονίδιων των ανοσοσφαιρινών και την έκφραση ανοσοσφαιρινών, προσδετικών μορίων και υποδοχέων αυξητικών παραγόντων στην επιφάνεια των αναπτυσσόμενων Β λεμφοκυττάρων[15,16]. Η διεργασία των αναδιατάξεων των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών ονομάζεται ανασυνδυασμός V(D)J κι έχει ιεραρχικό χαρακτήρα (Εικόνα 4, Πίνακας 2). Η πρώτη αναδιάταξη γίνεται και στα δύο αλληλόμορφα της βαριάς αλυσίδας μεταξύ γονιδίων D και J. Το γεγονός αυτό «δεσμεύει» τα αρχέγονα κύτταρα (stem cells) ν' ακολουθήσουν τη Β λεμφική σειρά. Σε αυτή τη φάση το κύτταρο καλείται πρώιμο προ-προ Β κύτταρο (early pro B cell). Στη συνέχεια, στο στάδιο του όψιμου προ-προ Β κυττάρου (late pro B cell), γίνεται ανασυνδιασμός μεταξύ ενός γονιδίου V και του γενετικού συμπλόκου DJ.

Μόλις ολοκληρωθεί ο ανασυνδιασμός V(D)J, το κύτταρο εκφράζει το δείκτη CD19 και ολοκληρώνει τον ανασυνδυασμό στο γενετικό τόπο της βαριάς αλυσίδας. Στη φάση αυτή το κύτταρο καλείται μεγάλο προ-Β λεμφοκύτταρο (pre-B cell) κι εκφράζει στην επιφάνειά του κυττάρου τον προ-Β υποδοχέα (pre-BcR: pre B cell receptor), ο οποίος αποτελείται από τη βαριά αλυσίδα, μια υποκατάστατη ελαφριά αλυσίδα (surrogate light chain) και τους συνυποδοχείς (co-receptors) Igα και Igβ οι οποίοι είναι απαραίτητοι για τη λειτουργία του. Κύτταρα που δεν εκφράζουν προ-BCR υποδοχέα πεθαίνουν με απόπτωση. Τα κύτταρα που εκφράζουν προ-BCR υποδοχέα επιλέγονται θετικά και μετατρέπονται σε μικρά προ-Β λεμφοκύτταρα. Σε αυτό το στάδιο παύει η έκφραση των SLC και των μορίων CD44 και c-kit, γεγονός που αποτελεί το έναυσμα για την έναρξη του ανασυνδυασμού των γονιδίων που κωδικοποιούν τις ελαφριές αλυσίδες. Οι παραγόμενες μονοτυπικές (κ ή λ) ελαφριές

αλυσίδες συνδέονται με τις βαριές αλυσίδες μ και σχηματίζουν μονομερή μόρια IgM που εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια και αποτελούν τον ειδικό για το αντιγόνο υποδοχέα (B cell receptor, BCR).

Επειδή ο ανασυνδυασμός των γονιδίων γίνεται τυχαία, η επιφανειακή IgM είναι πιθανό ν' αναγνωρίζει αυτοαντιγόνα (self-antigens). Έτσι, τα Β λεμφοκύτταρα πρέπει να ελέγχονται για το ενδεχόμενο αυτοαντιδραστικότητας (self-reactivity) πριν την έξοδό τους στην περιφέρεια[17]. Εάν λοιπόν ο τυχαίος ανασυνδυασμός V(D)J παράγει έναν υποδοχέα με ισχυρή συγγένεια για κάποιο αυτοαντιγόνο τότε:

- Η σύνδεση αυτοαντιγόνου-BcR αυξάνει τη μεταβίβαση ενδοκυττάριων μηνυμάτων που ωθούν το κύτταρο ν' αλλάξει την ειδικότητα του υποδοχέα του. Το φαινόμενο αυτό αναφέρεται ως διόρθωση υποδοχέα (receptor editing) και μπορεί να οδηγήσει σε αντικατάσταση μιας βαριάς ή ελαφριάς αλυσίδας από μια νέα, γεγονός που δημιουργεί μια νέα αντιγονική ειδικότητα[18,19].
- Αν δεν επιτευχθεί αλλαγή της ειδικότητας, τ' ανώριμα Β λεμφοκύτταρα που αναγνωρίζουν χαμηλού σθένους αυτοαντιγόνα (π.χ. διαλυτά αντιγόνα) αδρανοποιούνται. Το φαινόμενο της αδρανοποίησης των ανώριμων Β λεμφοκυττάρων ονομάζεται ανεργία (anergy) και τ' αντίστοιχα κύτταρα ανεργικά (anergic)[17]. Τα ανεργικά κύτταρα εκφράζουν μικρά ποσά επιφανειακής IgM και υψηλά επίπεδα επιφανειακής IgD[20].
- Αν δεν επιτευχθεί αλλαγή της ειδικότητας, το αυτοαντιδραστικό Β λεμφοκύτταρο που αναγνωρίζει πολυσθενή αντιγόνα (π.χ. MHC) μέσω της επιφανειακής Ig υφίσταται απαλοιφή με απόπτωση (clonal deletion)[21].



Εικόνα 4: Τα στάδια διαφοροποίησης των Β λεμφοκυττάρων καθορίζονται από τις αναδιατάξεις των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών.

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικοί δείκτες στα διάφορα στάδια διαφοροποίησης των κυττάρων της Β λεμφικής σειράς στο μυελό των οστών.

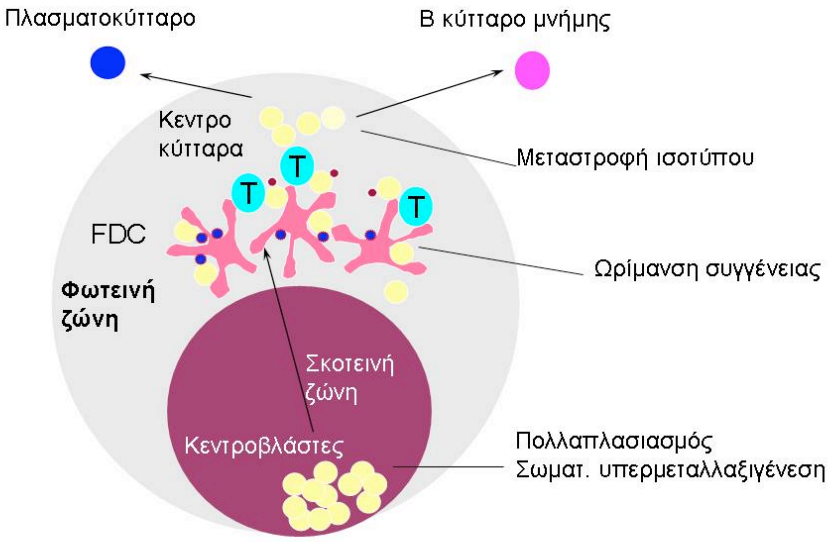
Δείκτης	PHSC	MPP	ELP	CLP	Pre-B	Pro-BI	Μεγάλο Pro-BII	Μικρό Pro-BII	Ανώριμο Β κύτταρο
Δέσμευση στη Β λεμφική σειρά	–	–	–	–	+	+	+	+	+
FLT3	–	+	+	+	(+)	–	–	–	–
KIT	+	+	+	(+)	(+)/–	(+)	–	–	–
CD25	–	–	–	–	–	–	+	+	(+)
IL-7Rα	–	–	–	+	+	+	+	(+)	–
CD43	–	–	–	–	+	+	+/–	–	–
B220	–	–	–	–	+	+	+	+	+
CD19	–	–	–	–	–	+	+	+	+
RAG1	–	–	+	+	+	+	–	+	+
RAG2	–	–	+	+	+	+	–	+	+
TDT	–	–	+	+	+	+	–	–	–
IGHD-J	–	–	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+
IGHV-DJ	–	–	–	–	–	–	+	+	+
IGK/LV-J	–	–	–	–	–	–	–	+	+
IgM	–	–	–	–	–	–	+	+	+
IgK/L	–	–	–	–	–	–	–	+	+

Μετά την ωρίμανσή τους στο μυελό των οστών, τα παρθένα Β λεμφοκύτταρα εισέρχονται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στα δευτερογενή λεμφικά όργανα[1]. Εκεί ενδέχεται να έρθουν σε επαφή με αντιγόνο και να ενεργοποιηθούν από τα Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα, οπότε πολλαπλασιάζονται πρώτα στις περιοχές των Τ λεμφοκυττάρων κι έπειτα μερικά από τα διαιρούμενα Β λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν στο κέντρο των λεμφοζιδίων όπου δημιουργούν τα βλαστικά κέντρα (germinal centers)[22]. Τα Β λεμφοκύτταρα που έχουν διεγερθεί για ταχύ πολλαπλασιασμό ονομάζονται κεντροβλάστες και δημιουργούν τη σκοτεινή ζώνη η οποία βρίσκεται προς την πλευρά της περιοχής των Τ λεμφοκυττάρων. Οι κεντροβλάστες είναι μεγάλα κύτταρα που διαιρούνται περίπου κάθε έξι ώρες και δεν εκφράζουν επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη. Όταν οι κεντροβλάστες σταματήσουν να διαιρούνται επανεκφράζουν την επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη και μεταναστεύουν στον αντίθετο πόλο του βλαστικού κέντρου. Το τμήμα αυτό ονομάζεται φωτεινή ζώνη και είναι πλούσιο σε δενδριτικά κύτταρα των λεμφοζιδίων (follicular dendritic cells, FDCs) και CD4 Τ λεμφοκύτταρα. Σε αυτή τη φάση, τα Β λεμφοκύτταρα καλούνται κεντροκύτταρα, δεν εκφράζουν τους δείκτες Ki67 και το CD77 και είναι προγραμματισμένα να πεθάνουν, εκτός αν δεχτούν σήματα επιβίωσης από βοηθητικά κύτταρα[22]. Στα βλαστικά κέντρα συμβαίνει σωματική υπερμεταλλαξιγένεση (ΣΥΜ) (somatic hypermutation, SHM) και μεταστροφή ισοτύπου (class-switch recombination, CSR).

Η ΣΥΜ είναι η διεργασία εισαγωγής μεταλλάξεων στα γονίδια των ανοσοσφαιρινών που ακολουθεί την επαφή με το αντιγόνο και σκοπό έχει ν' αυξήσει τη συγγένεια της ανοσοσφαιρίνης για το αντιγόνο. Ο όρος «υπερμεταλλαξιγένεση» οφείλεται στην εξαιρετικά υψηλή συχνότητα εισαγωγής μεταλλάξεων, η οποία κυμαίνεται από 10^{-5} έως 10^{-3}/bp/κυτταρική γενιά και είναι σαφώς μεγαλύτερη από τη συχνότητα εισαγωγής μεταλλάξεων στο γονιδίωμα ενός φυσιολογικού κυττάρου (10^{-9}-10^{-11}). Καθοριστικό ρόλο στη ΣΥΜ παίζει το ένζυμο απαμινάση της κυτιδίνης (AID; activation-induced deaminase) και οι επιρρεπείς σε λάθη πολυμεράσες (error-prone polymerases). Η ΣΥΜ συμβάλλει ουσιαστικά στην αύξηση της ποικιλότητας των αντισωμάτων με αποτέλεσμα ο οργανισμός να μπορεί να παράγει έως και 10^{12} διαφορετικά αντισώματα.

Η μεταστροφή ισοτύπου συμβαίνει μετά την επιλογή των Β λεμφοκυττάρων από αντιγόνο. Ο συνδυασμός μιας μεταβλητής περιοχής με διαφορετικές σταθερές περιοχές διασφαλίζει ότι τ' αντισώματα μιας ορισμένης ειδικότητας μπορεί να εκφράζονται με διαφορετικούς ισοτύπους και, κατά συνέπεια, να έχουν διαφορετική εκτελεστική δράση για την επίτευξη αποτελεσματικότερης απάντησης προς το αντιγόνο. Έτσι, η μεταστροφή ισοτύπου διαφοροποιεί περαιτέρω τα αντισώματα μιας συγκεκριμένης αντιγονικής ειδικότητας ώστε να επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες.

Τελικά, τα Β λεμφοκύτταρα με υποδοχείς υψηλής συγγένειας που επιλέγονται από αντιγόνο αφήνουν το βλαστικό κέντρο και μετατρέπονται σε πλασματοκύτταρα ή Β λεμφοκύτταρα μνήμης. Αντίθετα, αν κατά τον έλεγχο συγγένειας ένα Β λεμφοκύτταρο δεν επιλεγεί, τότε θα πεθάνει με απόπτωση στο βλαστικό κέντρο (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση του βλαστικού κέντρου.

2.3.5 Ρεπερτόριο των γονιδίων IGHV στη ΧΛΛ

Το ρεπερτόριο και η κατανομή των γονιδίων IGHV στη ΧΛΛ διαφέρει από το ρεπερτόριο των φυσιολογικών $CD5^+$ Β λεμφοκύτταρων του αίματος. Στο ρεπερτόριο των ώριμων φυσιολογικών Β κυττάρων επικρατούν μερικά γονίδια IGHV χωρίς ενδείξεις για επιλεκτικό συνδυασμό συγκεκριμένων γονιδίων ή υποομάδων βαριών και ελαφριών αλυσίδων.

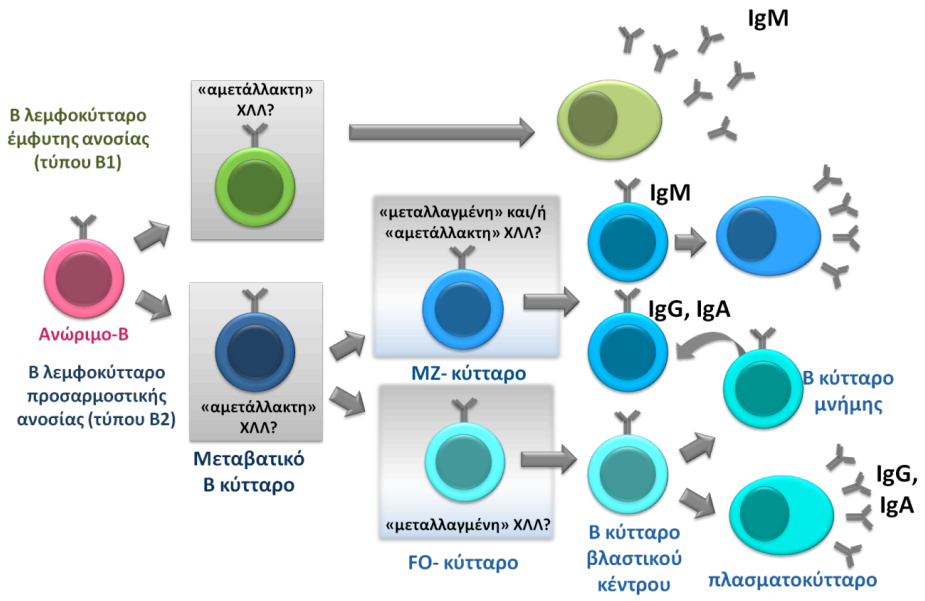
Στη ΧΛΛ χρησιμοποιούνται κυρίως γονίδια των υποομάδων IGHV1, IGHV3 και IGHV4. Συχνότερα γονίδια είναι τα IGHV1-69, IGHV3-7, IGHV3-23 και IGHV4-34, μολονότι η σχετική συχνότητά τους ποικίλει στις διάφορες σειρές[5,23]. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι στην ανάπτυξη της νόσου εμπλέκονται αντιγόνα ή υπέρ-αντιγόνα διεγείροντας για πολλαπλασιασμό κύτταρα τα οποία εκφράζουν υποδοχείς που κωδικοποιούνται από συγκεκριμένα γονίδια.

2.3.6 Status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV

Στη ΧΛΛ, η ανάλυση των μεταλλάξεων των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών αποκάλυψε δυο κατηγορίες, με ή χωρίς σωματικές μεταλλάξεις που παρουσιάζουν διαφορετική κλινική πορεία. Τα γονίδια IGHV με διαφορές >2% από το αντίστοιχο μη αναδιαταγμένο γονίδιο θεωρούνται ως «μεταλλαγμένα» (το όριο του 2% αρχικά επιλέχθηκε ώστε ν' αποφευχθεί το ενδεχόμενο κάποιες από τις διαφορές ν' αντιστοιχούν σε άγνωστους πολυμορφισμούς του γενετικού τόπου IGH). Οι αλληλουχίες των γονιδίων IGHV που έχουν διαφορές ≤2% σε σχέση με το αντίστοιχο μη αναδιαταγμένο γονίδιο θεωρούνται ως «αμετάλλακτες»[5,24]. Οι περιπτώσεις στις οποίες τα γονίδια IGHV των νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων φέρουν σωματικές μεταλλάξεις έχουν πιο ήπια εξέλιξη και μεγαλύτερη ολική επιβίωση ενώ αυτές που δεν φέρουν σωματικές μεταλλάξεις έχουν πιο δυσμενή εξέλιξη. Οι μισές περίπου περιπτώσεις ΧΛΛ που εκφράζουν IgM όπως και σχεδόν το 75% των περιπτώσεων που έχουν υποστεί μεταστροφή ισοτύπου (και εκφράζουν IgG ή, σπανιότατα, IgA) παρουσιάζουν διαφορές >2% από το πλησιέστερο μη αναδιαταγμένο γονίδιο[5,24]. Τα δεδομένα αυτά θεωρήθηκαν ως ένδειξη ότι ο λευχαιμικός κλώνος σε αυτές τις δύο ομάδες ασθενών προέρχεται από διαφορετικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, οι κλώνοι

που φέρουν αμετάλλακτες αλληλουχίες IGHV προτάθηκε ότι κατάγονται από ένα κύτταρο που δεν έχει έρθει σ' επαφή με αντιγόνο και δεν έχει περάσει από το βλαστικό κέντρο, ενώ οι κλώνοι που φέρουν μεταλλαγμένες αλληλουχίες IGHV από ένα κύτταρο μ' εμπειρία αντιγόνου που έχει περάσει από το βλαστικό κέντρο. Ωστόσο, η ύπαρξη ιδιαίτερων χαρακτηριστικών στην περιοχή VH CDR3 των αμετάλλακτων περιπτώσεων υποδεικνύει ότι τουλάχιστον σε ορισμένες από αυτές τις περιπτώσεις τα κύτταρα έχουν ενεργοποιηθεί από συγκεκριμένα αυτοαντιγόνα ή εξωγενή παθογόνα, πιθανόν εκτός βλαστικών κέντρων (Εικόνα 6)[25].

Μελέτες γονιδιακής έκφρασης έδειξαν ότι όλες οι περιπτώσεις ΧΛΛ εμφανίζουν ένα κοινό πρότυπο γονιδιακής έκφρασης ανεξάρτητα του status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV, υποδεικνύοντας έναν κοινό μηχανισμό λευχαιμικής εξαλλαγής και/ή προέλευσης. Η σύγκριση του γονιδιακού προτύπου έκφρασης των κυττάρων της ΧΛΛ με υποπληθυσμούς φυσιολογικών Β λεμφοκυττάρων έδειξε ότι μοιάζει περισσότερο με το πρότυπο των Β λεμφοκυττάρων μνήμης[26-29]. Με βάση τα δεδομένα που προέρχονται από τα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης καθώς και τον ανοσοφαινότυπο των κυττάρων (Παράγραφος 2.3.8) πλέον είναι κοινώς αποδεκτό ότι ανεξάρτητα από το status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV, τα κύτταρα έχουν έρθει σε επαφή με αντιγόνο. Ωστόσο, δε μπορούν ακόμα ν' απαντήσουν οριστικά στην ερώτηση αν τα κύτταρα των δύο ομάδων προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο ή από διαφορετικούς, σε πιο στάδιο(α) της διαφοροποίησης έγινε η λευχαιμική εξαλλαγή και ποια παθογόνα εμπλέκονται σε αυτή.



Εικόνα 6. Στάδια διαφοροποίησης Β λεμφοκυττάρων και πιθανή οντογεντική προέλευση της ΧΛΛ με μεταλλαγμένες και αμετάλλακτες αλληλουχίες IGHV.

2.3.7 Μοριακή στερεοτυπία του BcR

Ένα μοναδικό χαρακτηριστικό του ρεπερτορίου των ανοσοσφαιρινών στη ΧΛΛ είναι η ύπαρξη υποσυνόλων ασθενών με σχεδόν ταυτόσημους ή πολύ όμοιους BcR («στερεότυποι» BcR) (χρησιμοποίηση των ίδιων γονιδίων IGHV και IGKV/IGLV με μοναδικά, κοινά μοτίβα VH CDR3 και CDR3 ελαφριών αλυσίδων)[30-34]. Αυτό το γεγονός είναι αξιοσημείωτο καθώς, κανονικά, η πιθανότητα δύο διαφορετικά Β λεμφοκύτταρα να εκφράζουν στερεότυπους υποδοχείς είναι πολύ χαμηλή (10^{-12}), λόγω των μηχανισμών δημιουργίας ποικιλότητας των ανοσοσφαιρινών. Η τεράστια δομική ετερογένεια των ανοσοσφαιρινών είναι απαραίτητη για την αναγνώριση των πολυάριθμων επιτόπων που υπάρχουν στη φύση και επιτυγχάνεται με ειδικούς μηχανισμούς[35]:

(i) *συνδυαστική ποικιλότητα (combinatorial diversity)*: ποικιλομορφία που αποδίδεται στον ανασυνδυασμό των γονιδίων της μεταβλητής περιοχής της βαριάς και των ελαφριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών και στο συνδυασμό της βαριάς αλυσίδας είτε με κ είτε με λ ελαφριά αλυσίδα

(ii) *συνδετική ποικιλότητα (junctional diversity)*: ποικιλομορφία στα σημεία ένωσης των ανασυνδυασμένων γονιδίων

(iii) *σωματική υπερμεταλλαξιγένεση (somatic hypermutation-SHM):* εισαγωγή μεταλλάξεων στις αλληλουχίες της μεταβλητής περιοχής υπό την επίδραση του αντιγόνου

(iv) *μεταστροφή ισοτύπου (class-switch recombination-CSR):* ποικιλομορφία σε επίπεδο εκτελεστικών λειτουργιών της ανοσοσφαιρίνης.

Η στερεοτυπία είναι πολύ συχνή στη ΧΛΛ. Μια πρόσφατη μελέτη σε σειρά ασθενών με ΧΛΛ αποκάλυψε ότι περίπου το 30% των περιπτώσεων φέρουν στερεότυπους BcR[36]. Η έκφραση στερεότυπων BcR είναι πολύ συχνότερη σε ασθενείς με αμετάλλακτα γονίδια (>40%) σε σύγκριση προς τους ασθενείς με μεταλλαγμένα γονίδια IGHV (~10%)[33,34]. Εκτός από το status μεταλλάξεων, η συχνότητα της στερεοτυπίας διαφέρει ανάλογα με το ρεπερτόριο των γονιδίων IGHV. Ειδικότερα, γονίδια των υποομάδων IGHV1 και IGHV4 χρησιμοποιούνται συχνότερα σε στερεότυπους υποδοχείς σε σύγκριση με τα γονίδια της υποοομάδας IGHV3 (με σημαντική εξαίρεση τα γονίδια IGHV3-21 και IGHV3-48)[33,34].

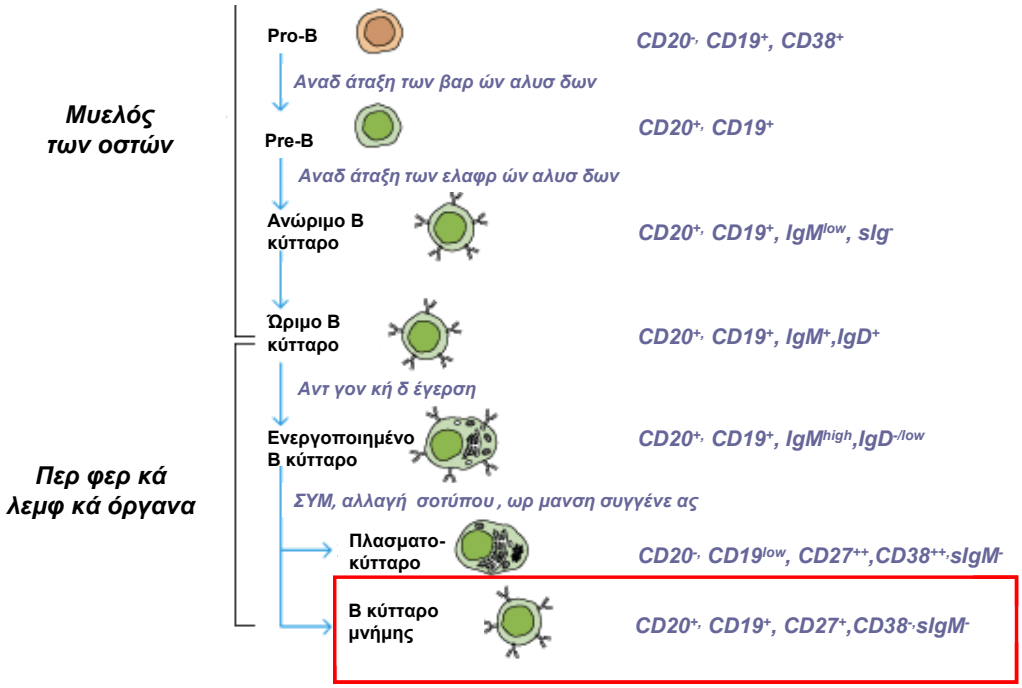
Οι περιπτώσεις ΧΛΛ που ανήκουν σε στερεότυπα υποσύνολα φαίνεται ότι μοιράζονται κοινά κλινικά χαρακτηριστικά και συγκεκριμένα στερεότυπα υποσύνολα σχετίζονται πλέον με ιδιαίτερη πρόγνωση[34,37]. Χαρακτηριστικά, οι περιπτώσεις που ανήκουν στο στερεότυπο υποσυνόλο #2 (IGHV3-21/IGLV3-21) παρότι φέρουν μεταλλαγμένες αλληλουχίες IGHV παρουσιάζουν κακή κλινική πορεία[38].

Η στερεοτυπία σε επίπεδο Β κυτταρικού υποδοχέα καταργεί τη λογική του τυχαίου στην οντογένεση της ΧΛΛ. Αντίθετα, η δομική ομολογία («στερεοτυπία») των BcR στη ΧΛΛ μπορεί να θεωρηθεί ως ισχυρότατη ένδειξη για την αναγνώριση κοινού επιτόπου. Συνεπώς, η ανάπτυξη της ΧΛΛ ίσως αφορά σε κλώνους Β λεμφοκυττάρων με καθορισμένη δομή του BcR .

2.3.8 Ανοσοφαινότυπος των νεοπλασματικών Β λεμφοκυττάρων στη ΧΛΛ

Χαρακτηριστικός φαινότυπος της ΧΛΛ είναι ένας μονοκλωνικός Β-λεμφοκυτταρικός πληθυσμός (CD19+) με μονοτυπική ελαφριά αλυσίδα (κ ή λ), χαμηλή ένταση (dim)

έκφρασης των ανοσοσφαιρινών επιφάνειας, CD20+ (ασθενές) και CD5+. Επίσης, τα κύτταρα εκφράζουν τους επιφανειακούς δείκτες ενεργοποίησης CD23, CD25, CD69 και CD71, ενώ, αντίθετα, εμφανίζουν χαμηλή έκφραση δεικτών που κανονικά καταστέλλονται μετά από κυτταρική διέγερση κι ενεργοποίηση, π.χ. CD22, FcγRIIb, CD79b και IgD[39-42]. Τα πρότυπα αυτά, σε συνδυασμό με την καθολική έκφραση του CD27 (δείκτης για τα κύτταρα μνήμης), υποδεικνύουν ότι τα λευχαιμικά κύτταρα όλων των περιπτώσεων ΧΛΛ, ανεξάρτητα από την παρουσία μεταλλάξεων στα γονίδια IGHV, έχουν έρθει σ' επαφή με το αντίγονο (Εικόνα 7). Ωστόσο, μεταξύ των «αμετάλλακτων» και των «μεταλλαγμένων» περιπτώσεων ΧΛΛ μπορεί να παρατηρούνται διαφορές στο ανοσοφαινοτυπικό πρότυπο, κυρίως όσον αφορά στην έκφραση των μορίων CD38, CD69, CD40, ZAP-70 και HLA-DR. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με καλή πρόγνωση είχαν χαμηλά επίπεδα του CD38 (< 20%), ενώ οι ασθενείς με κακή πρόγνωση υψηλά επίπεδα (>20%)[43]. Επίσης, πρόσφατες μελέτες συσχετίζουν την έκφραση της κινάσης ZAP-70 με δυσμενή πρόγνωση[44].



Εικόνα 7: Έκφραση αντιγόνων επιφανείας κατά τη διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων και αντιστοιχία με τον ανοσοφαινότυπο των Β λεμφοκυττάρων της ΧΛΛ. *(Τροποποιημένη από Goldsby, RA, Kindt, TJ, Osborne, BA, Kuby, J, Immunology, 6th Ed, W H Freeman & Co).*

2.3.9 Ο ρόλος του BcR στη ΧΛΛ

Τα τελευταία χρόνια ποικίλα δεδομένα που προήλθαν από τη μοριακή και λειτουργική ανάλυση του BcR αποκάλυψαν τον κρίσιμο ρόλο της αλληλεπίδρασης των κυττάρων της ΧΛΛ με το περιβάλλον τους, κυρίως μέσω του BcR[45]. Τα μοριακά δεδομένα που υποστηρίζουν αυτή την άποψη είναι i) το ρεπερτόριο των γονιδίων IGHV στη ΧΛΛ[5,33,34,36,46-48], ii) η διαφορετική πρόγνωση γι' ασθενείς που φέρουν γονίδια IGHV με διαφορετικό status μεταλλάξεων[6,24,49] iii) η ύπαρξη υποσυνόλων ασθενών με σχεδόν πανομοιότυπους "στερεότυπους" BcR[33,34,46,48], τα οποία ήδη έχουν αναφερθεί και iv) το διαφορετικό status σηματοδότησης μέσω του BcR[50,51].

2.3.9.1 Σηματοδότηση μέσω του BcR

Στα Β λεμφοκύτταρα το μόριο της ανοσοσφαιρίνης από μόνο του δεν έχει καμία σηματοδοτική ικανότητα. Στην επιφάνεια του κυττάρου οι βαριές αλυσίδες της ανοσοσφαιρίνης είναι συνδεδεμένες με μη ομοιοπολικούς δεσμούς με τα βοηθητικά μόρια Igα (CD79a) και Igβ (CD79b) κι έτσι δημιουργείται το πλήρως λειτουργικό σύμπλοκο του BcR που είναι απαραίτητο για την μεταγωγή σημάτων. Τα μόρια Igα και Igβ έχουν μακριές κυτταροπλασματικές ουρές που αποτελούνται από 61 και 48 αμινοξέα, αντιστοίχως. Οι κυτταροπλασματικές ουρές περιέχουν από μια διατηρημένη αλληλουχία 18 αμινοξέων που ονομάζεται αλληλουχία ενεργοποίησης των ανοσοϋποδοχέων (immunereceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) και είναι απαραίτητη τόσο για τη μεταφορά του υποδοχέα σε συγκεκριμένες περιοχές της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (lipid rafts) όσο και για τη σηματοδοτική λειτουργία του. Οι ITAM περιέχουν κατάλοιπα τυροσίνης τα οποία, μετά τη σύνδεση του αντιγόνου στον υποδοχέα, φωσφορυλιώνονται από κινάσες της οικογένειας Src όπως οι Fyn, Blk, Hck, Fgr και Lyn. Στα φυσιολογικά Β λεμφοκύτταρα η τελευταία φαίνεται να είναι η κύρια κινάση που διεκπεραιώνει τη συγκεκριμένη διαδικασία. Έτσι παρέχονται θέσεις για την επιστράτευση της πρωτεϊνικής κινάσης Syk στις φωσφορυλιωμένες ITAM.

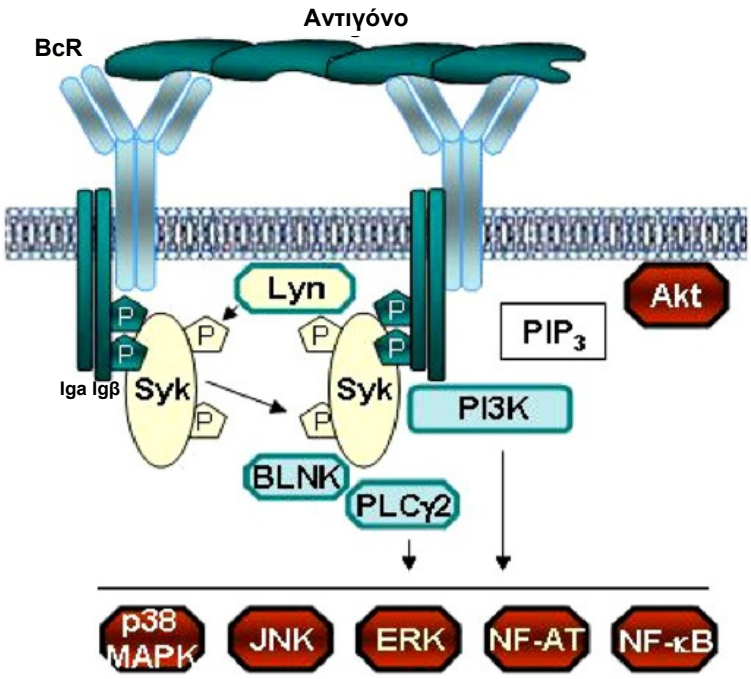
Η Syk ενεργοποιείται μέσω μιας πολύπλοκης διαδικασίας που περιλαμβάνει είτε τη φωσφορυλίωσή της από πρωτεϊνικές κινάσες της οικογένειας Src είτε

αυτοφωσφορυλίωση. Μόλις ενεργοποιηθεί, η Syk μεταδίδει το σήμα μέσω φωσφορυλίωσης καθοδικών σηματοδοτικών μορίων και μέσω αλληλεπιδράσεων με διάφορες πρωτεΐνες προσαρμογείς. Αυτός ο καταρράκτης αντιδράσεων έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση δύο κρίσιμων σηματοδοτικών μορίων, της 3-κινάσης της φωσφατίδυλοινοσιτόλης (*phosphatidylinositol 3-kinase,* ***PI3K***) και της φωσφολιπάσης Cγ2 (*phospholipase Cγ2,* ***PLCγ2***)[52] (Εικόνα 8).

Η PI3K οδηγεί στη δημιουργία της 3,4,5-τριφωσφορικής ινισιτόλης (*phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate,* ***PIP3***), που είναι ένα κρίσιμο ενδιάμεσο μόριο για την επιστράτευση της κινάσης Akt στην κυτταρική μεμβράνη, όπου συμβαίνει η ενεργοποίησή της. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt προάγει την επιβίωση των Β λεμφοκυττάρων επάγοντας την έκφραση αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως η Mcl-1 (*myeloid cell leukemia-1*) και η XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*), και απενεργοποιώντας προ-αποπτωτικές πρωτείνες, όπως η BAD (*Bcl2 antagonist of cell death*) και οι κασπάσες[53,54].

Η ενεργοποίηση της PLCγ2 οδηγεί σε απελευθέρωση ενδοκυττάριου Ca2+ κι ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (***PKC***). Ο σηματοδοτικός καταρράκτης συνεχίζει με την ενεργοποίηση MAP κινασών (*mitogen-activated protein kinases, MAPKs*), όπως η ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), η JNK (*c-JUN NH2-terminal kinase*) και η p38, καθώς και μεταγραφικών παραγόντων, μεταξύ άλλων οι NF-κB (*nuclear factor-κB*) και NF-AT (*nuclear factor of activated T cells*). Ο βαθμός ενεργοποίησης αυτών των σηματοδοτικών μορίων είναι εκείνος που τελικά θα καθορίσει τη μοίρα του Β λεμφοκυττάρου[52].

Η ενεργοποίηση του NF-κB ευνοεί την επιβίωση του Β λεμφοκυττάρου επάγοντας την έκφραση πολλών αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως οι Bcl-2 (*B-cell leukemia/lymphoma 2*) και Bcl-xL[55,56]. Ο ρόλος των τριών MAP κινασών είναι λιγότερο σαφής καθώς η ενεργοποίησή τους έχει συσχετιστεί τόσο με πολλαπλασιασμό όσο και με απόπτωση των Β λεμφοκυττάρων. Παρόλ' αυτά, για μια ολοκληρωμένη άνοσηα πάντηση είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση όλων των παραπάνω κλάδων της σηματοδότησης[57,58].



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της σηματοδότησης μέσω του BcR στα Β λεμφοκύτταρα. (*Τροποποιημένη από Efremov et al, Autoimm Rev. 2007).*

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των Β λεμφοκυττάρων της ΧΛΛ είναι η χαμηλή έκφραση των ανοσοσφαιρινών στην επιφάνειά τους. Αυτή η κατάσταση όμως δε σημαίνει απαραίτητα ότι η σηματοδότηση μέσω του BcR είναι ελαττωματική, εφόσον τουλάχιστον οι μισές περιπτώσεις ΧΛΛ απαντούν στη διέγερση μέσω της IgM, τουλάχιστον όσον αφορά σε συμβάντα κοντά στη μεμβράνη, όπως η φωσφορυλίωση της Syk, της PLCγ2 και η απελευθέρωση ενδοκυττάριου Ca2+[59-61]. Οι περιπτώσεις ΧΛΛ που συνήθως απαντούν στη διέγερση του BcR φέρουν αμετάλλακτες αλληλουχίες IGHV κι εκφράζουν ZAP70 και/ή CD38. Αντίθετα, οι περιπτώσεις ΧΛΛ που φέρουν μεταλλαγμένες αλληλουχίες IGHV και δεν εκφράζουν ZAP70 και/ή CD38 δεν απαντούν στη διέγερση μέσω της επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης, κατάσταση που προσομοιάζει με την αντίστοιχη ανεργικών κυττάρων μετά από χρόνια έκθεση σε αντιγόνο[50,62].

Η ZAP70 είναι κρίσιμο μόριο για τη σηματοδότηση των Τ λεμφοκυττάρων, αλλά βρέθηκε ότι εκφράζεται και στα λευχαιμικά Β λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ. Εμφανίζει δομική ομολογία με τη Syk και μετά από ενεργοποίηση του κυττάρου συνδέεται με

τον BcR[62]. Έρευνες έχουν δείξει ότι στα Β λεμφοκύτταρα η ZAP70 δεν είναι φωσφορυλιωμένη στα κρίσιμα κατάλοιπα που ρυθμίζουν την ενεργότητά της, συνεπώς δεν έχει σηματοδοτική λειτουργία αλλά εκτελεί κυρίως χρέη προσαρμογέα, επιστρατεύοντας σημαντικούς ρυθμιστές του σηματοδοτικού μονοπατιού[63]. Ο ρόλος του CD38 στη σηματοδότηση μέσω του BcR δεν έχει αποσφηνιστεί πλήρως. Ωστόσο, σε περιπτώσεις ΧΛΛ που φέρουν μεταλλαγμένες αλληλουχίες IGHV στις οποίες είναι δυνατή η μεταβίβαση σήματος παρατηρείται έκφραση του CD38[50].

Μια συστηματική μελέτη προσπάθησε να συσχετίσει την ενεργοποίηση των κινασών καθοδικά του BcR με το status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV. Βρέθηκε ότι οι Akt και Erk ήταν φωσφορυλιωμένες σε όλες τις αμετάλλακτες περιπτώσεις και στο 75% των μεταλλαγμένων περιπτώσεων, υποδηλώνοντας ότι στις περισσότερες περιπτώσεις ΧΛΛ το μονοπάτι είναι ενεργό. Ωστόσο, η JNK δεν ήταν ενεργός στις περισσότερες περιπτώσεις και ο NF-κB ήταν ενεργοποιημένος σχεδόν στις μισές περιπτώσεις. Έτσι φαίνεται ότι τα κύτταρα της ΧΛΛ απαντούν εν μέρει στην ενεργοποίηση του BcR[64]. Αυτό το μοριακό πρότυπο προσομοιάζει με το αντίστοιχο των ανεργικών Β λεμφοκυττάρων στα ποντίκια[65]. Ωστόσο, παρόμοιες απαντήσεις έχουν παρατηρηθεί και στα CD5+ θετικά Β λεμφοκύτταρα των ποντικών[66], οπότε δεν είναι σίγουρο αν αυτό το πρότυπο είναι χαρακτηριστικό των λευχαιμικών κυττάρων ή αντικατοπτρίζει το κύτταρο από το οποίο προέρχονται.

Επιπλέον, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι σε μια υποομάδα ασθενών στους οποίους η μεταβίβαση σήματος μέσω της IgM δεν ήταν δυνατή υπάρχει συνεχής ενεργοποίηση της Erk και απουσία ενεργοποίησης της Akt και του μεταγραφικού παράγοντα NF-AT και πρότεινε ότι τα κύτταρα αυτά έχουν καταστεί ανεργικά μετά από χρόνια in vitro έκθεση σε αντιγόνο. Η μελέτη όμως δεν κατάφερε να συσχετίσει τη διαφορά της απάντησης με το status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV[67].

Όλα τα παραπάνω δείχνουν το τελικό αποτέλεσμα επηρεάζεται από διάφορες παραμέτρους, όπως η φύση της διέγερσης, που πιθανόν είναι διαφορετική σε διαφορετικές περιπτώσεις ΧΛΛ. Επίσης, μεγάλο ρόλο παίζει η διάρκεια της διέγερσης, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από μια πρόσφατη μελέτη που έδειξε διαφορά στις απαντήσεις ακόμη και μεταξύ των κυττάρων του ίδιου κλώνου[51]. Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης της IgM πιθανόν επηρεάζουν την απάντηση αφού

στις περιπτώσεις ΧΛΛ που δεν απαντούν στη διέγερση παρατηρείται υπό-έκφραση της IgM. Επίσης, η ενεργοποίηση διαφορετικών ισοτύπων ανοσοσφαιρίνης μπορεί να επηρεάσει τη σηματοδότηση. Όπως προαναφέρθηκε, η ενεργοποίηση της IgM οδηγεί είτε σε μερική ενεργοποίηση της σηματοδότησης είτε δεν έχει κανένα αποτέλεσμα. Αντίθετα, σχεδόν όλες οι περιπτώσεις απαντούν στη διέγερση μέσω IgD αν και η απάντηση είναι πολύ παροδική. Στις σχετικά λίγες περιπτώσεις ΧΛΛ που έχει συμβεί μεταστροφή ισοτύπου και εκφράζουν IgG έχουν παρατηρηθεί διαφορετικές απαντήσεις που έχουν συσχετιστεί κυρίως με τα επίπεδα έκφρασης της IgG[68].

2.3.10 Ο ρόλος του αντιγόνου στη ΧΛΛ

Η ανάλυση των αλληλουχιών IGHV-IGHD-IGHJ των κλωνοτυπικών BcR δεν μπορεί να προσφέρει οριστική απάντηση στο ερώτημα σχετικά με τη φύση του αντιγόνου που διεγείρει τα κύτταρα της ΧΛΛ. Έτσι, για την επιβεβαίωση των προβλεπόμενων αντιγονικών στόχων χρησιμοποιήθηκαν in vitro πειραματικές προσεγγίσεις.

Βρέθηκε ότι τα κύτταρα της ΧΛΛ εκφράζουν BcRs που αλληλεπιδρούν πολυαντιδραστικά με αυτοαντιγόνα[69], όπως συστατικά του κυτταροσκελετού τα οποία εκτίθενται στην επιφάνεια του κυττάρου κατά την απόπτωση, ανοσοσφαιρίνες καθώς και μονόκλωνα μόρια DNA[32,48,70-73]. Βρέθηκε επίσης ότι τα κύτταρα της ΧΛΛ αλληλεπιδρούν με νεοαντιγόνα, δηλαδή μόρια που γίνονται ανοσογόνα μετά από χημικές τροποποιήσεις (π.χ. οξείδωση), καθώς και ξένα παθογόνα, π.χ. συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων[70,74]. Περίπου 80% των αμετάλλακτων BcR ΧΛΛ και 15% των μεταλλαγμένων BcR φάνηκε ότι αλληλεπιδρούν πολυαντιδραστικά *in vitro* με σειρά αυτοαντιγόνων και ξένων αντιγόνων. Γενικά, οι αμετάλλακτοι BcR αλληλεπιδρούν με μεγαλύτερο εύρος παθογόνων[75]. Ανασυνδυασμένα μονοκλωνικά αντισώματα που προερχόταν από μεταλλαγμένες περιπτώσεις ΧΛΛ δεν παρουσίαζαν πολυαντιδραστικότητα, παρά μόνο όταν απομακρύνονταν οι μεταλλάξεις[70].

Συνοψίζοντας, φαίνεται ότι τα κύτταρα της ΧΛΛ μπορεί να προέρχονται από έναν πληθυσμό αυτό/πολύ-αντιδραστικών κυττάρων τα οποία είτε διατηρούν

(αμετάλλακτη ΧΛΛ) ή χάνουν (μεταλλαγμένη ΧΛΛ) την πολυαντιδραστικότητά τους ως αποτέλεσμα της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης. Με βάση τα παραπάνω, η αλληλεπίδραση πολυαντιδραστικών Β λεμφοκυττάρων με ιούς, κοινά βακτήρια ή αυτοαντιγόνα θα μπορούσε να οδηγήσει στη διαίρεσή τους με αποτέλεσμα τη δημιουργία επικίνδυνων μεταλλάξεων στο DNA. Ένας παρόμοιος μηχανισμός έχει περιγραφεί για την παθογένεια του λεμφώματος του στομάχου, που αναπτύσσεται μετά από μόλυνση από το Helicobacter pylori.

2.4 Υποδοχείς έμφυτης ανοσίας στη ΧΛΛ

Το γεγονός ότι τα Β λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ μπορούν ν' αναγνωρίζουν κοινά βακτηριακά συστατικά[46,73] έχει στρέψει το ενδιαφέρον στη μελέτη των υποδοχέων της έμφυτης ανοσίας. Έχει βρεθεί ότι τα κύτταρα της ΧΛΛ εκφράζουν λειτουργικούς υποδοχείς έμφυτης ανοσίας οι οποίοι δίνουν συν-διεγερτικά σήματα στον BcR[76].

2.4.1 Η επίκτητη ανοσία ελέγχεται από υποδοχείς της έμφυτης ανοσίας

Κατά την ανάπτυξη των Β λεμφοκυττάρων, οι αυτό-αντιδραστικοί υποδοχείς που αναγνωρίζουν έναν συνδέτη με μεγάλη συγγένεια αποκλείονται μέσω των μηχανισμών διόρθωσης υποδοχέα ή με θάνατο των κυττάρων που τους εκφράζουν. Ωστόσο, αυτή η διαδικασία κάποιες φορές αποτυγχάνει και μερικά ώριμα αυτο-αντιδραστικά -και πιθανόν παθογόνα- Β λεμφοκύτταρα εμφανίζονται στην κυκλοφορία. Προφανώς, για ν' αποφευχθούν τέτοια ενδεχόμενα χρειάζονται κάποιοι επιπρόσθετοι μηχανισμοί ελέγχου.

Τα Β λεμφοκύτταρα επιτυγχάνουν πλήρη άνοση απάντηση έναντι πρωτεϊνικών αντιγόνων μόνο με τη βοήθεια ενεργοποιημένων CD4+ Τ λεμφοκυττάρων. Έτσι προτάθηκε ότι ένας μηχανισμός ελέγχου είναι η απαίτηση αυτού του ***δεύτερου σήματος*** για την πλήρη ενεργοποίηση του Β λεμφοκυττάρου, σε συνδυασμό με την ειδική αναγνώριση του παθογόνου από τον BcR που αποτελεί το ***πρώτο σήμα***. Πράγματι, η ενεργοποίηση ενός Β λεμφοκυττάρου μέσω του BcR, χωρίς τη βοήθεια

των CD4+ Τ λεμφοκυττάρων, οδηγεί το κύτταρο είτε σε απόπτωση είτε σ' ένα στάδιο σηματοδοτικής 'απάθειας' γνωστό ως ανεργία[77].

Το 1989 προτάθηκε ότι το δεύτερο σήμα ελέγχεται από την αναγνώριση εξελικτικά διατηρημένων μοριακών μοτίβων κοινών παθογόνων (*Pathogen Associated Molecular Patterns,* ***PAMPS***), τα οποία εκφράζονται σε κοινά παθογόνα αλλά όχι στον ξενιστή. Η αναγνώριση αυτή επιτυγχάνεται μέσω εξελικτικά διατηρημένων υποδοχέων έμφυτης ανοσίας που ονομάζονται υποδοχείς αναγνώρισης μοριακών μοτίβων (*Pattern Recognition Receptors,* ***PRRs***)[78]. Αργότερα σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα ανθρώπου και ποντικού αναγνωρίστηκε μια πρωτεΐνη ομόλογη με τους υποδοχείς έμφυτης ανοσίας Toll της Δροσόφιλα, η οποία ονομάστηκε υποδοχέας τύπου Toll 4 (*Toll Like Receptor 4,* ***TLR4***)[79]. Στα επόμενα χρόνια αναγνωρίστηκαν πολλοί PRRs οι οποίοι ανήκουν σε οικογένειες με πολλά μέλη και αναγνωρίζουν PAMPs που εκφράζονται από βακτήρια, ιούς, πρωτόζωα και μύκητες.

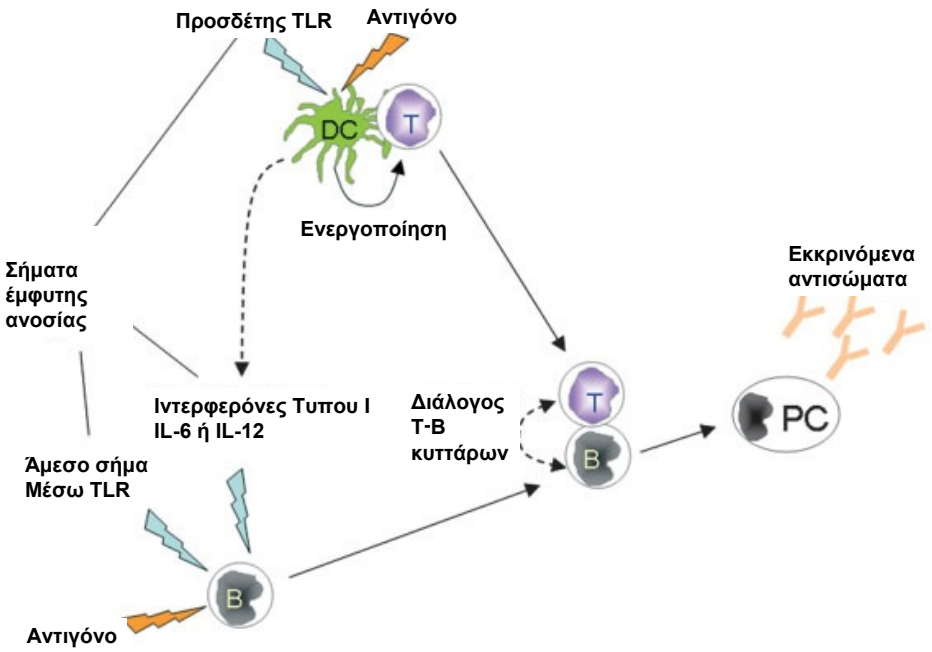
Οι κύριοι αντιπρόσωποι των PRR είναι οι TLR και οι υποδοχείς τύπου NOD (*NOD-like receptors,* ***NLRs***)[80,81]. Εκφράζονται σε όλα τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων και των Β λεμφοκυττάρων[81,82]. Η πρώτη απόδειξη ότι οι υποδοχείς έμφυτης ανοσίας ελέγχουν την επίκτητη ανοσία προήλθε από πειράματα σε ποντίκια, τα οποία έδειξαν ότι η σηματοδότηση μέσω των TLR στα δενδριτικά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή κυτταροκινών απαραίτητων για την αποτελεσματική ενεργοποίηση των ανώριμων Τ λεμφοκυττάρων[83,84].

Το 2006 βρέθηκε ότι τα Β λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται και άμεσα μέσω των υποδοχέων έμφυτης ανοσίας που εκφράζουν στην επιφάνειά τους. Οι συγγραφείς πρότειναν ότι η άμεση ενεργοποίηση μέσω των TLR αποτελεί το απαραίτητο ***τρίτο σήμα*** για την ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό, τη μεταστροφή ισοτύπου και τη διαφοροποίηση των ανώριμων Β λεμφοκυττάρων σε πλασματοκύτταρα και η απαίτηση αυτή αποτελεί ένα επιπρόσθετο σημείο ελέγχου κατά της αυτοανοσίας (Εικόνα 9)[85]. Επιπλέον, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η διέγερση των υποδοχέων NOD1 και NOD2 επίσης οδηγεί στην ενεργοποίηση των Β λεμφοκυττάρων χωρίς τη βοήθεια των CD4+ Τ λεμφοκυττάρων[86]. Ωστόσο, κάποιες άλλες μελέτες αμφισβήτησαν το αποτέλεσμα και έδειξαν ότι η σηματοδότηση μέσω υποδοχέων

έμφυτης ανοσίας ενισχύει την απάντηση των Β λεμφοκυττάρων αλλά δεν είναι απαραίτητη[87,88].

Από την άλλη πλευρά, πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η ταυτόχρονη σηματοδότηση μέσω BcR/TLR μπορεί να επάγει αυτοανοσία. Συγκεκριμένα, δύο ανεξάρτητες μελέτες έδειξαν ότι σύμπλοκα αντιγόνου-DNA και αντιγόνου-RNA μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή αυτό-αντιγόνων, ενεργοποιώντας το Β λεμφοκύτταρο μέσω του αυτό-αντιδραστικού BcR και του TLR9 ή TLR7, αντιστοίχως[89,90]. Τέλος, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι μετά από χρόνια επαφή των TLR μ' έναν συνδέτη *in vivo*, τα Β λεμφοκύτταρα καθίστανται ανεργικά σ' επόμενη επαφή με τον ίδιο συνδέτη. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως TLR-ανοχή και φαίνεται να ρυθμίζεται από τον BcR[91].

Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι η άμεση συνεισφορά της σηματοδότησης των υποδοχέων έμφυτης ανοσίας στις απαντήσεις των Β λεμφοκυττάρων εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η φύση του αντιγόνου, η διάρκεια και το σημείο της αλληλεπίδρασης.



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση της ενεργοποίησης των Β λεμφοκυττάρων. Οι TLR (***τρίτο σήμα***) μπορούν να ενεργοποιήσουν τα Β λεμφοκύτταρα είτε έμμεσα, μέσω της ενεργοποίησης των δενδριτικών κυττάρων (*DCs*), είτε άμεσα. ***Πρώτο σήμα*** είναι η ειδική

αναγνώριση του παθογόνου από τον BcR και ***δεύτερο σήμα*** η βοήθεια από ενεργοποιημένα CD4+ T λεμφοκύτταρα. (*Τροποποιημένο από Tolls for B cell,. Eur J Immunol. 2006 Fillatreau S, et al)*.

2.4.2 Υποδοχείς TLR

2.4.2.1 Γενικά

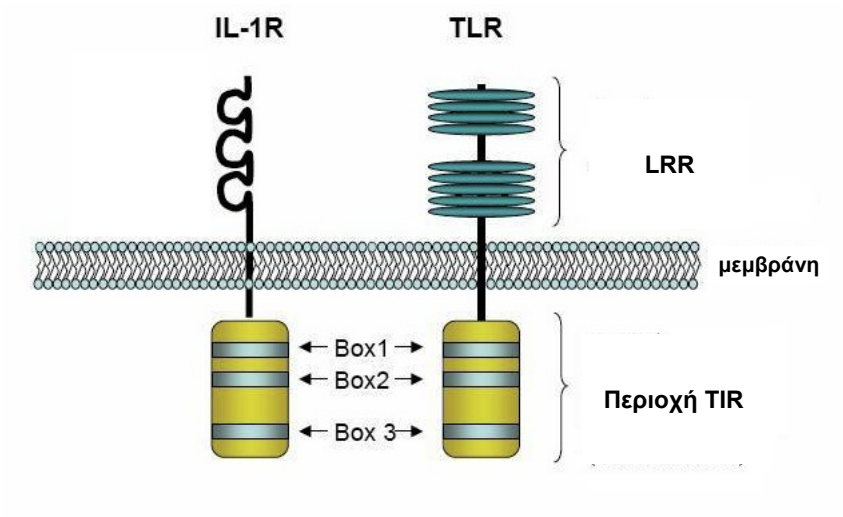
Το ανοσοποιητικό σύστημα καθημερινά έρχεται σ' επαφή τόσο με συμβιωτικά μικρόβια όσο και με ξένους παθογόνους μικροοργανισμούς. Η απόφαση του ανοσοποιητικού συστήματος για γρήγορη και αποτελεσματική άνοση απάντηση σ' ένα παθογόνο είναι αποτέλεσμα της άμεσης ενεργοποίησης των υποδοχέων έμφυτης ανοσίας, όπως οι TLR[92]. Η δράση τους είναι καθοριστική για τη σωστή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς μελέτες έχουν δείξει ότι πολυμορφισμοί των TLR συνδέονται με αυξημένη ευαισθησία και προδιάθεση σε λοιμώξεις και στο σηπτικό σοκ τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ποντίκια[93].

Μέχρι σήμερα η οικογένεια TLR αριθμεί 13 μέλη στα θηλαστικά, 11 στον άνθρωπο (TLRs1-11) και 13 (TLRs1-13) στον ποντικό. Τα μέλη της οικογένειας ομοδιμερίζονται ή ετεροδιμερίζονται κι αναγνωρίζουν διαφορετικά μοριακά μοτίβα κοινών παθογόνων, προσδίδοντας έτσι κάποια ειδικότητα στην έμφυτη ανοσία.

2.4.2.2 Δομή υποδοχέων TLR

Οι υποδοχείς TLR είναι τύπου I διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεϊνες των οποίων η εξωκυττάρια περιοχή αποτελείται από μοτίβα πλούσια σ' επαναλήψεις λευκίνης (*Leucine- Rich Repeats,* ***LRRs***) ενώ η κυτταροπλασματική σηματοδοτική περιοχή παρουσιάζει σημαντική ομολογία με ορισμένα μέλη της οικογένειας του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1 (*Interleukini-1 Receptor,* ***IL-1R***). Συγκεκριμένα, διαθέτει μια συντηρημένη περιοχή περίπου 200 αμινοξέων γνωστή ως «επικράτεια» TIR (*Toll/IL-1R domain*). Η ανάλυση της δομής της εξωκυττάριας περιοχής του TLR3, μέσω

κρυσταλλογραφίας με ακτίνες-Χ, αποκάλυψε ότι είναι διμερής πρωτεΐνη που αποτελείται από δύο πεταλοειδείς υπομονάδες[94]. Επίσης, έχουν αναλυθεί οι ενδοκυττάριες περιοχές των TLR1 και TLR2 και αποκαλύφθηκε ότι η καθεμία αποτελείται από τρία συντηρημένα «κουτιά» (*boxes*), απαραίτητα για την ενδοκυττάρια μετάδοση του σήματος[95] (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση της δομής των υποδοχέων TLR. (*Τροποποιημένο από Toll-like receptor signalling, Shizuo Akira et al. Nature Reviews Immunology 4, 499-511 (July 2004).*

2.4.2.3 Προσδέτες των υποδοχέων TLR

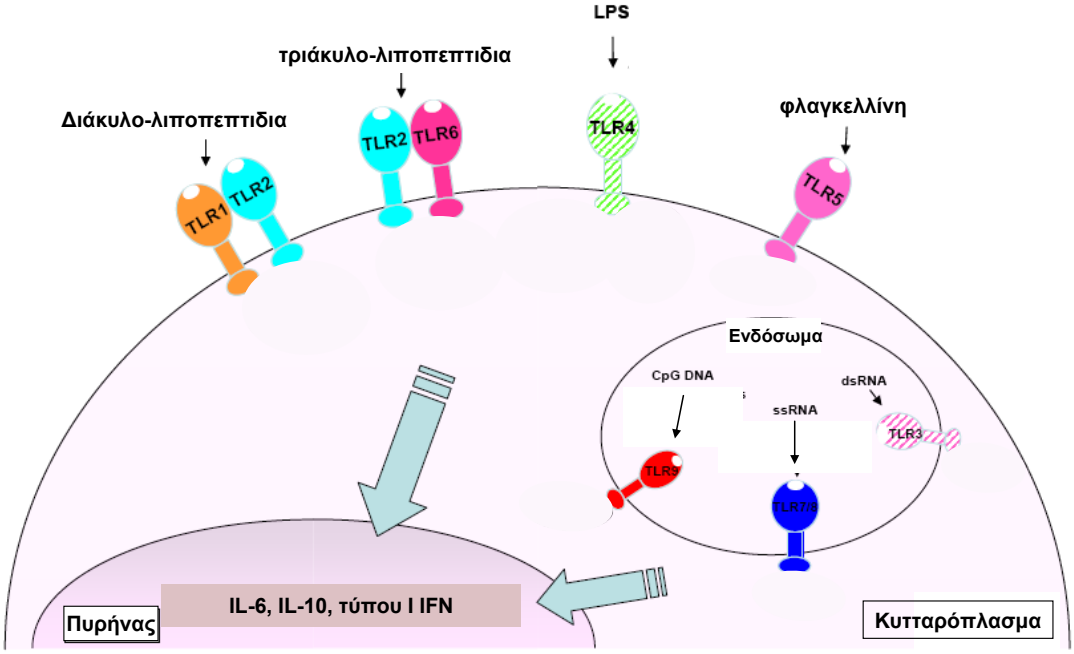
Όπως προαναφέρθηκε, οι TLR ομοδιμερίζονται ή ετεροδιμερίζονται για ν' αναγνωρίσουν τους αντίστοιχους συνδέτες (Εικόνα 11).

Οι TLR3, -7, -8, and -9 αναγνωρίζουν νουκλεϊνικά οξέα κι εντοπίζονται σε ενδοπλασματικά κυστίδια. Η θέση τους διασφαλίζει ότι δε μπορεί να έρθουν σ' επαφή με νουκλεϊνικά οξέα του ξενιστή αλλά μπορούν να αναγνωρίσουν νουκλεϊνικά οξέα ιών και βακτηρίων που έχουν εισέλθει στο κύτταρο κι έχουν υποστεί λύση[96-100]. Σε παθολογικές καταστάσεις, π.χ. όταν τα νεκρά κύτταρα δεν απομακρύνονται αποτελεσματικά, τα νουκλεϊνικά οξέα του ξενιστή μπορούν να ενεργοποιήσουν τους συγκεκριμένους TLR, οπότε προκαλούνται φαινόμενα

αυτοανοσίας[89]. Ο TLR3 αναγνωρίζει δίκλωνο RNA[101] ενώ οι TLR7 και -8 μονόκλωνο RNA[96,102,103]. Ο TLR9 ειδικεύεται στην αναγνώριση μη μεθυλιωμένων νησιδίων κυτοσίνης-γουανίνης (*cytidine-phosphate-guanosine,* ***CpG***), τόσο ιϊκής όσο και βακτηριακής προέλευσης[99,104].

Από την άλλη οι TLR1, -2, -4, and -6 εκφράζονται στην επιφάνεια του κυττάρου και αναγνωρίζουν συστατικά βακτηρίων. Ο TLR2 αναγνωρίζει πεπτιδογλυκάνες, λιποπρωτεϊνες και λιποπεπτίδια των gram$^+$ βακτηρών, καθώς επίσης και του μυκοπλάσματος. Συνήθως ετεροδιμερίζεται με τους TLR1 και TLR6 και αναγνωρίζει διακυλο- και τριακυλο-λιποπεπτίδια, αντιστοίχως. Φαίνεται ότι τα μόρια CD36 και CD14 συμμετέχουν στη σύνθεση του λειτουργικού συμπλόκου. Έχει βρεθεί επίσης ότι το σύμπλοκο TLR2/6 αναγνωρίζει λιποτειχοϊκό οξύ (*LTA*) και β-γλυκάνες όπως η ζυμοζάνη[105-108]. Ο TLR4 σε σύμπλοκο με τα μόρια CD14 και MD2 αναγνωρίζει τον λιποπολυσακχαρίτη (*LPS*) των gram$^-$ βακτηρίων. Ο TLR5 ενεργοποιείται από τη φλαγκελλίνη των βακτηρίων[109,110]. Τέλος, ο TLR11 αναγνωρίζει ουροπαθογόνα βακτήρια. Ωστόσο, η έκφραση του στον άνθρωπο είναι αμφιλεγόμενη, καθώς περιέχει στην κωδικοποιητική περιοχή του ένα κωδικόνιο τερματισμού[111].

Τα τελευταία χρόνια έχουν βρεθεί πολύ συνθετικοί συνδέτες που μπορούν να ενεργοποιήσουν αποτελεσματικά τους TLR. Οι PAM_3CSK_4 και PAM_2CSK_4 σηματοδοτούν μέσω των TLR1/2 και TLR2/6, αντιστοίχως. Οι TLR7 και TLR8 αναγνωρίζουν ανάλογα νουκεοσιδίων όπως το resiquimod ή το imiquimod, τα οποία είναι ουσίες με αντιϊική και αντικαρκινική δράση που θεωρείται ότι μιμούνται το φυσικό συνδέτη τους (μονόκλωνο RNA)[96,98,102,103].



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση της κυτταρικής εντόπισης των υποδοχέων TLR και των αντίστοιχων προσδετών. *(Τροποποιημένη από Toll-like receptors: lessons to learn from normal and malignant human B cells, Chiron D et al, Blood, 2008).*

2.4.2.4 Πρότυπο έκφρασης των υποδοχέων TLR

Οι TLR εκτός από διαφορετικούς συνδέτες και κυτταρικό εντοπισμό, διαφέρουν επίσης και στην έκφρασή τους σε διάφορους τύπους κυττάρων. Μέχρι στιγμής, έχει βρεθεί ότι οι TLR εκφράζονται σ' επιθηλιακά κι ενδοθηλιακά κύτταρα, μακροφάγα, μονοκύτταρα, σιτευτικά κύτταρα, ουδετερόφιλα, βασεόφιλα, φυσικά κύτταρα-φονείς (*NK*), δενδριτικά κύτταρα, ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα και Β λεμφοκύτταρα (Πίνακας 3)[112]. Η ενεργοποίηση των TLR σ' επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα επάγει την παραγωγή κυτταροκινών, χημειοκινών και αντι-μικροβιακών πεπτιδίων. Οι χημειοκίνες ρυθμίζουν την επιστράτευση των κυττάρων σε εστίες λοίμωξης[113]. Ταυτόχρονα, η ενεργοποίηση των TLR στα λευκοκύτταρα φαίνεται ότι αυξάνει την ικανότητά τους να μεταναστεύουν προς τη φλεγμονή και ν' απομακρύνουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς και τα μολυσμένα κύτταρα[114-116].

Τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων TLR διαφέρουν σε κάθε κυτταρικό τύπο και ρυθμίζονται από διάφορους παράγοντες, όπως το είδος του ιστού, ο τύπος της υποκείμενης φλεγμονής (παρατηρείται αυξημένη έκφραση σε χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις), ο τύπος του TLR και του PAMP (η έκφραση κάθε τύπου TLR επάγεται από την παρουσία του αντίστοιχου PAMP), η παρουσία κυτταροκινών (όπως οι IFN-γ, IL-1β, IL-4, IL-2, IL-15, TNF-α, GM-CSF και M-CSF), καθώς και αναστολέων του σηματοδοτικού μονοπατιού[117].

Σύμφωνα με τα παραπάνω φαίνεται ότι οι TLR ρυθμίζουν την απάντηση στα παθογόνα σε πολλά και διαφορετικά επίπεδα, μέσω της διαφορικής έκφρασης τους σε διάφορα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και γεφυρώνουν την έμφυτη με την επίκτητη ανοσία.

Πίνακας 3: Πρότυπο έκφρασης των υποδοχέων TLR στους διάφορους κυτταρικούς τύπους. pDCs: πλασμοκυττοειδή δενδριτικά κύτταρα

TLRs	ΕΚΦΡΑΣΗ
TLR 1	Καθολική
TLR 2	Μονοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα, ουδετερόφιλα και Τ -κύτταρα
TLR 3	Δενδριτικά και NK -κύτταρα
TLR 4	Μακροφάγα, δενδριτικά κυτταρα, ενδοθηλιακά κυτταρα,ουδετερόφιλα και Τ -κύτταρα
TLR 5	Μονοκύτταρα, ανώριμα δενδριρικά κύτταρα, NK -κύτταρα και ουδετερόφιλα
TLR 6	Β -κύτταρα, μονοκύτταρα, NK -κύτταρα και ουδετερόφιλα
TLR 7	Β -κύτταρα, pDCs και ουδετερόφιλα
TLR 8	Μονοκύτταρα, NK -, Τ –κύτταρα και ουδετερόφιλα
TLR 9	pDCs, Β -κύτταρα, μακροφάγα, NK –κύτταρα και ουδετερόφιλα
TLR 10	Β -κύτταρα, pDCs και ουδετερόφιλα
TLR 11	

2.4.3 Υποδοχείς NLR

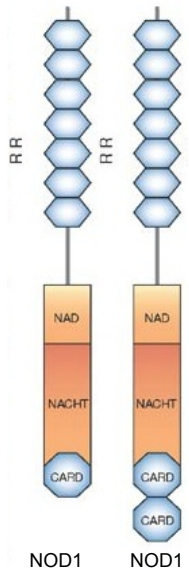
2.4.3.1 Γενικά

Στα θηλαστικά, η οικογένεια των υποδοχέων NLR περιλαμβάνει πάνω από 20 μέλη. Φαίνεται ότι οι υποδοχείς είναι εξελικτικά διατηρημένοι αφού μια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών με παρόμοια δομική οργάνωση υπάρχει και στα φυτά. Η οικογένεια αυτή καλείται NBS-LRR (*Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeats*) και εμπλέκεται στην άμυνα εναντίον των παθογόνων στα φυτά. Τα δύο μέλη της

οικογένειας NLR που έχουν μελετηθεί εκτενώς είναι οι υποδοχείς NOD1 και NOD2 (*Nucleotide Oligomerization Domain 1/2*)[81].

2.4.3.2 Δομή των υποδοχέων NOD1 και NOD2

Το 1999 ανακαλύφθηκε ο υποδοχέας NOD1 μέσω της ομολογίας του με τον προ-αποπτωτικό ρυθμιστή Apaf-1 (*Apoptotic Protease-Activating Protein*). Κατ' αναλογία προς τον Apaf-1, ο NOD1 έχει μια N-τελική CARD (*Caspase Activation and Recruitment Domain*) περιοχή, μια κεντρική περιοχή σύνδεσης με νουκλεοτίδια (*Nucleotide Binding Site-NACHT/NBS*), αλλά αντί για τις επαναλήψεις WD (τρυπτοφάνη, ασπαρτικό οξύ) που έχουν βρεθεί στον Apaf-1, ο NOD1 διαθέτει μια περιοχή LRR στο C-τελικό άκρο του. Αργότερα, βρέθηκε ο υποδοχέας NOD2, ο οποίος έχει υψηλή ομολογία με τον NOD1, αλλά διαθέτει δύο CARD περιοχές στο N-τελικό άκρο[118] (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση της δομής των υποδοχέων NOD1 και NOD2.

2.4.3.3 Συνδέτες και πρότυπο έκφρασης των υποδοχέων NOD1 και NOD2

Οι υποδοχείς NOD αναγνωρίζουν την πεπτιδογλυκάνη (*Peptidoglycan,* ***PGN***), ένα ανοσοδιεγερτικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Στην πραγματικότητα, τόσο ο NOD1 όσο και ο NOD2 ανιχνεύουν τα μονομερή μουροπεπτιδίων που απελευθερώνονται από τη βακτηριακή πεπτιδογλυκάνη με τη δράση πεπτιδασών και υδρολασών. Ο NOD2 ανιχνεύει την πεπτιδογλυκάνη τόσο των gram- όσο και των gram+ βακτηρίων, αφού το μουραμυλο-διπεπτίδιο (*muramyl dipeptide,* ***MDP***), δηλαδή το ελάχιστο κοινό μοτίβο σε όλα τα είδη πεπτιδογλυκάνης, αναγνωρίζεται στερεοειδικά από το NOD2[119]. Αντίθετα, ο NOD1 διαθέτει περιορισμένη ειδικότητα και αναγνωρίζει μόνο την πεπτιδογλυκάνη των gram- βακτηριών[120].

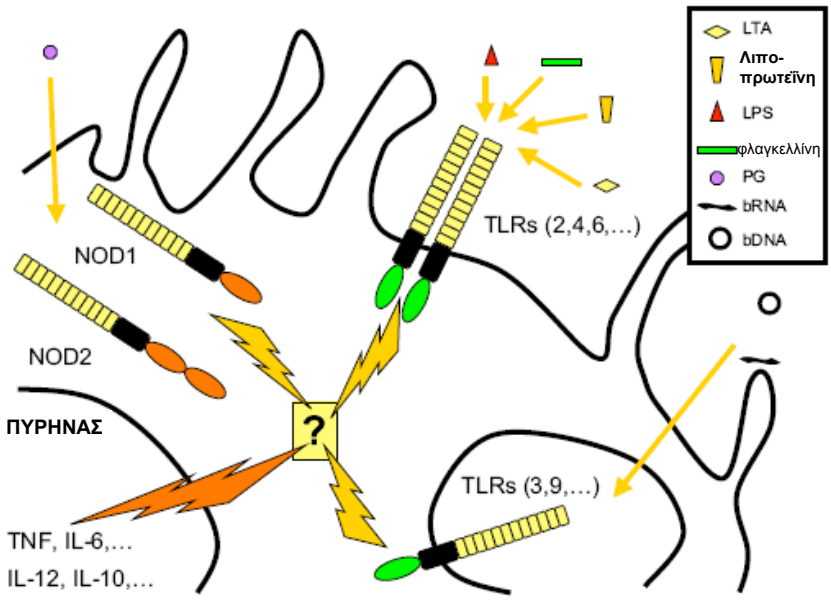
Οι υποδοχείς NOD εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, αλλά η έκφρασή τους ποικίλει στους διάφορους κυτταρικούς τύπους. Ο υποδοχέας NOD1 εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, ενώ η έκφραση του NOD2 περιορίζεται σε μονοκύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα[121]. Οι υποδοχείς NOD διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην άμυνα του ξενιστή εναντίον ενδοκυττάριων παθογόνων βακτηρίων και βακτηριακών συστατικών[122].

2.4.4 Αλληλεπίδραση υποδοχέων έμφυτης ανοσίας

Οι υποδοχείς NOD συνεργάζονται με πολλούς TLR για να ενισχύσουν τις άνοσες αποκρίσεις στ' αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Για παράδειγμα, στα μονοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα, οι αγωνιστές των υποδοχέων NOD συνεργάζονται με τους λιποπολυσακχαρίτες για να διεγείρουν την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως ο TNFα (*Tumor Necrosis Factor α*) και η IL-6. Στα δενδριτικά κύτταρα, οι υποδοχείς NOD συνεργάζονται με τους TLR3, TLR4 και TLR9 για την παραγωγή IL-12p70 με αποτέλεσμα την επαγωγή Th1 απαντήσεων[123].

Ο μοριακός μηχανισμός για τη συνεργασία των υποδοχέων NOD με τους υποδοχείς TLR με σκοπό την παραγωγή κυτταροκινών δεν είναι γνωστός. Μελέτες έχουν δείξει

ότι η διέγερση του TLR4 επάγει την έκφραση του υποδοχέα NOD2. Επίσης, η διέγερση των NOD2 και NOD1 επάγει την έκφραση σηματοδοτικών μορίων του μονοπατιού των TLR. Στα μονοκύτταρα, ο αγωνιστής του υποδοχέα NOD δρα μαζί με τους αγωνιστές των TLR2, TLR5 και TLR7, με αποτέλεσμα τη διέγερσή τους. Επίσης, το MDP φαίνεται να έχει κοινή δράση με τους αγωνιστές των TLR2 και TLR9 στα μονοκύτταρα (Εικόνα 13)[124].



Εικόνα 13. Στα κύτταρα της μυελικής σειράς οι υποδοχείς NOD συνεργάζονται με τους TLR με αποτέλεσμα τη φλεγμονώδη απάντηση. Ο μηχανισμός δεν είναι γνωστός, αλλά η παραγωγή των κυτταροκινών επιτρέπει την επαγωγή της προσαρμοστικής ανοσίας. *(Τροποποιημένη από Role of Nods in bacterial infection, Lionel Le Bourhis et al, Microbes and Infection, 2007).*

2.5 Υποδοχείς έμφυτης ανοσίας στα Β λεμφοκύτταρα

2.5.1 Φυσιολογικά Β λεμφοκύτταρα

Η έκφραση των TLR στα Β λεμφοκύτταρα του ανθρώπου χαρακτηρίζεται από υψηλή έκφραση των TLR1, -6, -7, -9 και -10[125-127]. Η χαμηλή έκφραση του TLR2 επαρκεί για το σχηματισμό των ετεροδιμερών TLR1/2 και TLR2/6. Αντίθετα από τον ποντικό, τα Β λεμφοκύτταρα του ανθρώπου χαρακτηρίζονται από αδυναμία απάντησης μέσω

του TLR4. Λεπτομερείς μελέτες σε διάφορα υποσύνολα Β λεμφοκυττάρων έχουν δείξει ότι τα παρθένα και τα Β λεμφοκύτταρα μνήμης παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των TLR. Συγκεκριμένα, ενώ οι TLR1, -2, -4 εμφανίζουν συγκρίσιμα επίπεδα έκφρασης στα παρθένα και στα Β λεμφοκύτταρα μνήμης, οι TLR6, -7, -9 και -10 φαίνεται ότι δεν εκφράζονται καθόλου στα παρθένα Β λεμφοκύτταρα και η επαφή του κυττάρου με το αντιγόνο οδηγεί σε αύξηση της έκφρασής τους. Αποδεικνύεται λοιπόν ότι οι TLR δρουν καθοδικά του Β κυτταρικού υποδοχέα και διαδραματίζουν διαφορετικούς ρόλους στην πρωτογενή απάντηση και την άνοση μνήμη (Εικόνα 14)[126]. Σημαντικό ρόλο στην έκφραση των TLR διαδραματίζει επίσης και ο εντοπισμός των Β λεμφοκυττάρων. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν παρόμοια επίπεδα έκφρασης των TLR σε ανώριμα Β λεμφοκύτταρα, Β λεμφοκύτταρα του βλαστικού κέντρου και Β λεμφοκύτταρα μνήμης των αμυγδαλών, ενώ η έκφραση του TLR9 σε αυτά τα κύτταρα ήταν υψηλότερη από την αντίστοιχη στα κυκλοφορούντα Β λεμφοκύτταρα[128]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η έκφραση του TLR2 στα κυκλοφορούντα Β λεμφοκύτταρα (*IgG-, CD27-*) περιορίζεται σε μια υποομάδα τους που χαρακτηρίζεται από ενδιάμεση έκφραση των CD19 και CD69, ενώ τα περισσότερα Β λεμφοκύτταρα των αμυγδαλών εκφράζουν TLR2[128,129]. Συνεπώς, φαίνεται ότι το πρότυπο έκφρασης των TLR στα Β λεμφοκύτταρα μπορεί να ρυθμίζεται από το τοπικό περιβάλλον[130].

Πρόσφατα βρέθηκε ότι και οι υποδοχείς NOD1 και NOD2 εκφράζονται στα Β λεμφοκύτταρα κι εμφανίζουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης και λειτουργικότητας στα Β λεμφοκύτταρα των αμυγδαλών σε σχέση με τα κυκλοφορούντα. Επιπλέον, φάνηκε ότι δεν υπήρχαν διαφορές στην έκφρασή τους μεταξύ παρθένων Β λεμφοκυττάρων, Β λεμφοκυττάρων του βλαστικού κέντρου και Β λεμφοκυττάρων μνήμης[86].

Εικόνα 14: Πρότυπο έκφρασης των υποδοχέων TLR κατά τη διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων. *(Τροποποιημένη από Toll-like receptors: lessons to learn from normal and malignant human B cells, Chiron D et al, Blood, 2008).*

2.5.2 Υποδοχείς TLR στη ΧΛΛ

Το πρότυπο έκφρασης των υποδοχεών έμφυτης ανοσίας στη ΧΛΛ δεν έχει μελετηθεί τόσο εκτενώς όσο το αντίστοιχο των φυσιολογικών Β λεμφοκυττάρων. Πολλές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την έκφραση σ' επίπεδο mRNA των TLR7 και TLR9 καθώς και σε πρωτεϊνικό επίπεδο μόνο του TLR9[131-134]. Μια πρόσφατη έρευνα ανέδειξε επιπλέον έκφραση των TLR1, TLR2, TLR6, TLR10, NOD1 και NOD2. Συνεπώς, το πρότυπο έκφρασης προσομοιάζει με το πρότυπο Β λεμφοκυττάρων μ' εμπειρία αντιγόνου[135]. Ωστόσο, σε καμία από τις παραπάνω μελέτες δεν έχει πραγματοποιηθεί συσχέτιση της έκφρασης των υποδοχέων με τα κλινικο-βιολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Αναφορικά με τη λειτουργικότητα των υποδοχέων, φαίνεται ότι η ενεργοποίηση των Β λεμφοκυττάρων της ΧΛΛ μέσω των υποδοχέων έμφυτης ανοσίας μπορεί να επάγει την έκφραση συν-διεγερτικών μορίων (π.χ. CD80, CD86, CD25), τον πολλαπλασιασμό ή την απόπτωση των κυττάρων. Μελέτες σηματοδότησης δείχνουν ότι αυτό επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης του NF-κB και των MAP κινασών[132,134,135]. Συγκεκριμένα, οι TLR1/2, TLR2/6 και NOD2 φαίνεται ότι επάγουν την έκφραση των συν-διεγερτικών μορίων και προστατεύουν τα κύτταρα από την απόπτωση[135]. Ωστόσο, παρά την ετερογένεια στις απαντήσεις μεταξύ διαφορετικών ασθενών, δε διαπιστώθηκε καμία συσχέτιση με τα μοριακά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Ο TLR7 βρέθηκε ότι επάγει αποτελεσματικά την έκφραση των συν-διεγερτικών μορίων, με μεγάλη ωστόσο ετερογένεια[132,136]. Επιπλέον, πρόσφατη μελέτη έδειξε

ότι η διέγερση των κυττάρων της ΧΛΛ μέσω του TLR7 έχει αντι-αποπτωτική δράση[137]. Οι μελέτες για τον TLR9 παρουσιάζουν αντικρουόμενα αποτελέσματα γεγονός που δείχνει ότι ίσως ασκεί πλειοτρόπο δράση στα κύτταρα της ΧΛΛ . Μια μελέτη υποστηρίζει ότι η διέγερση μέσω του TLR9 οδηγεί σε πολλαπλασιασμό των κυττάρων της ΧΛΛ[138], ενώ άλλη μελέτη έδειξε ότι επάγει την απόπτωση των κυττάρων[139]. Τα πράγματα πρόσφατα αποσαφηνίστηκαν καθώς βρέθηκε ότι η διέγερση του TLR9 επάγει πολλαπλασιασμό κυρίως στους ασθενείς που φέρουν αμετάλλακτες αλληλουχίες IGHV, ενώ επάγει απόπτωση σε ασθενείς που φέρουν μεταλλαγμένες αλληλουχίες IGHV[131]. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η διαφορετική απάντηση οφειλόταν στην ενεργότητα της κινάσης Akt.

Από τα παραπάνω είναι εμφανές ότι το ρεπερτόριο και η λειτουργικότητα των υποδοχέων έμφυτης ανοσίας στη ΧΛΛ δεν εχουν αποσαφηνιστεί πλήρως κυρίως λόγω του μικρού αριθμού των ασθενών στις διάφορες μελέτες και της ελλιπούς στατιστικής συσχέτισης των αποτελεσμάτων με άλλα μοριακά και κλινικο-βιολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

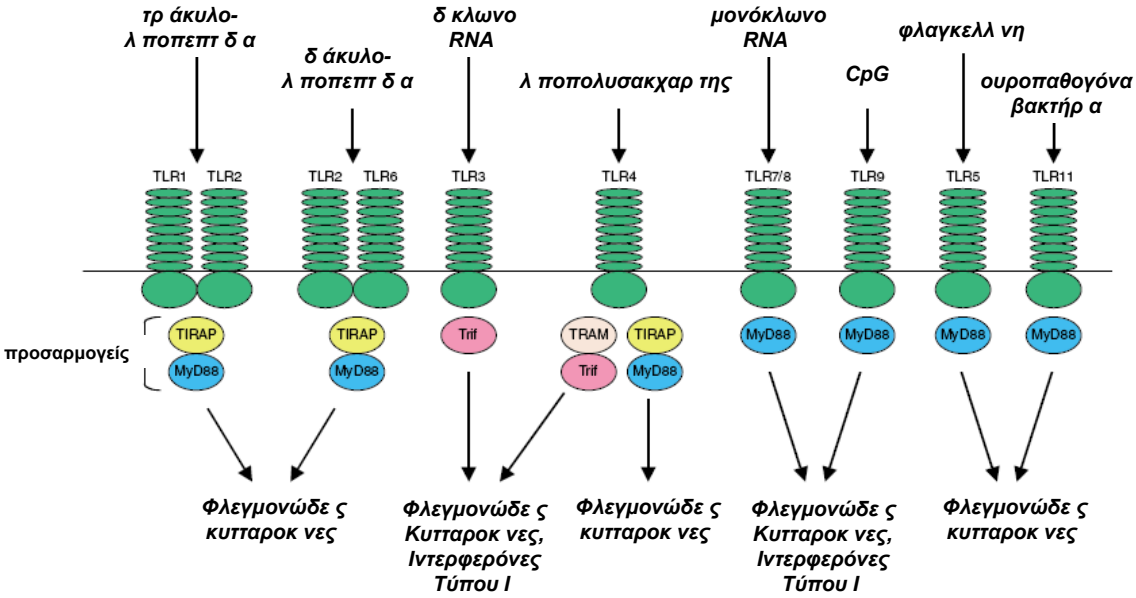
2.6 Σηματοδότηση μέσω υποδοχέων έμφυτης ανοσίας

2.6.1 Σηματοδότηση μέσω των υποδοχέων TLR

Μετά την αναγνώριση των παθογόνων οι TLR επάγουν σηματοδοτικά μονοπάτια που καταλήγουν στην ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB και AP-1 οι οποίοι προάγουν την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως οι TNFα, IL-6, IL-1b και IL-12 και την έκφραση συν-διεγερτικών μορίων. Οι TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 και TLR9 επάγουν κι εναλλακτικά μονοπάτια που οδηγούν στην παραγωγή ιντερφερονών τύπου I κι έτσι επάγουν αντι-ιϊκές απαντήσεις (Εικόνα 15)[140]. Στην περίπτωση των TLR3 και TLR4, η απάντηση αυτή φαίνεται να εξαρτάται από το μεταγραφικό παράγοντα IRF3, ενώ στην περίπτωση του TLR7 και TLR8 από τον IRF7[141].

Η σηματοδότηση ξεκινά μέσω αλληλεπίδρασης της περιοχής TIR των TLR με την περιοχή TIR κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών που είναι γνωστές ως πρωτεϊνες προσαρμογείς (*adapters*). Οι κύριοι προσαρμογείς είναι οι MyD88 (*myeloid*

differation primary response protein 88), Mal (*MyD88-adapter like*) ή TIRAP (*TIR domain containing adapter*), TRIF (*TIR domain-containing adapter inducing interferon-β*) ή TICAM-1 (*TIR-containing adapter molecule-1) και TRAM (TRIF-related adapter molecule*) ή TICAM-2 (*TIR-containing adapter molecule-2*). Επιπλέον, έχει βρεθεί ένας προσαρμογέας που φαίνεται να ρυθμίζει αρνητικά τη σηματοδότηση και ονομάζεται SARM (*sterile α and HEAT-Armadillo motifs*) (Εικόνα 15)[141].



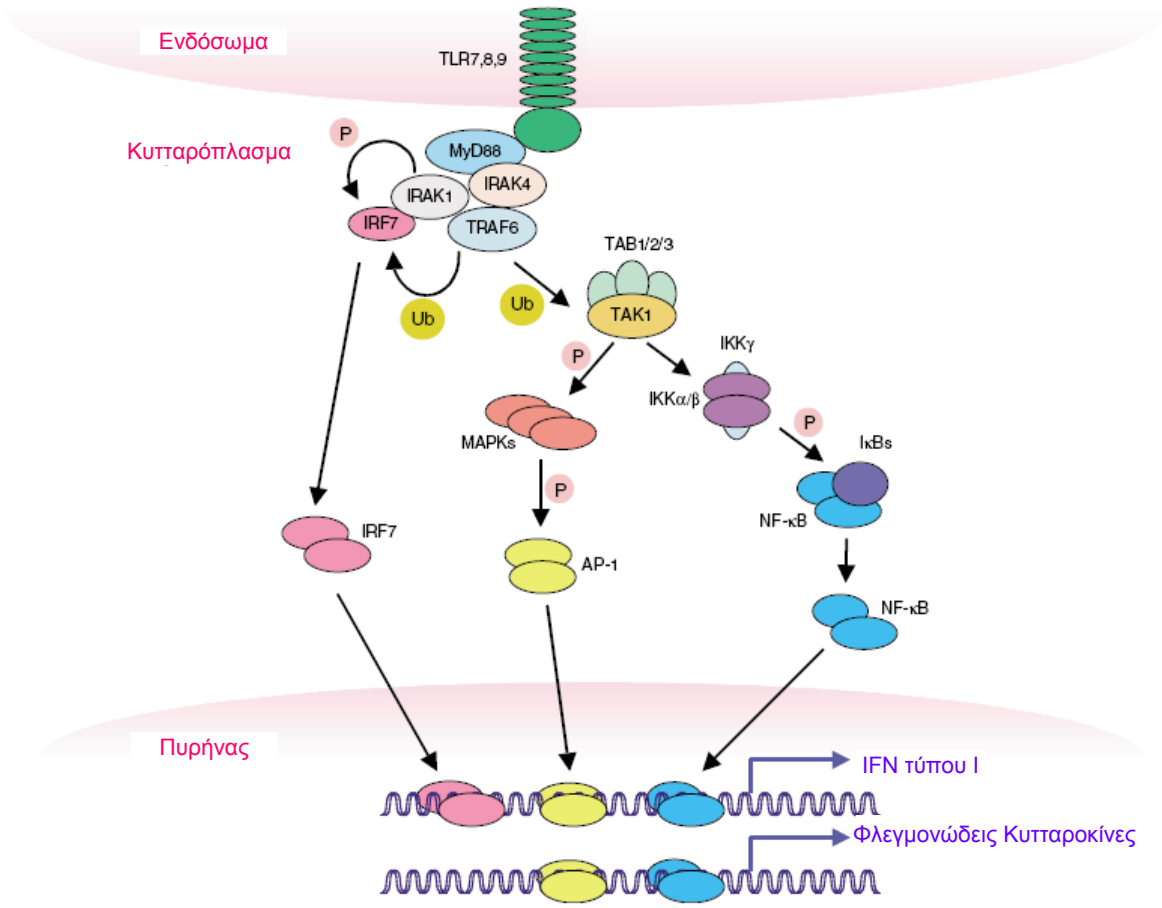
Εικόνα 15: Σχηματική αναπαράσταση των προσαρμογέων και των τελικών προϊόντων του σηματοδοτικού μονοπατιού των υποδοχέων TLR. *(Τροποποιημένο από TLR signaling, Kawai T et al, Cell Death and Differantiation 2006).*

2.6.1.1 Ενεργοποίηση του NF-κB και AP-1 από το MyD88-εξαρτώμενο μονοπάτι

Ο MyD88 χρησιμοποιείται απ' όλους τους TLR εκτός του TLR3. Στην περίπτωση των TLR2 και TLR4, απαιτείται και η παρουσία του TIRAP. Μετά τη σύνδεσή του με τους υποδοχείς, ο MyD88 συνδέεται με κινάσες της οικογένειας IRAK (*interleukin-1 receptor associated kinase*). Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί 4 μέλη της οικογένειας: IRAK1, IRAK2, IRAK4 και IRAK-M. Οι IRAK2 και IRAK-M φαίνεται να ρυθμίζουν αρνητικά το μονοπάτι. Οι IRAK4 και IRAK1 φωσφορυλιώνονται και απομακρύνονται από το σύμπλοκο για να ενεργοποιήσουν τον TRAF6 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*) ο οποίος μαζί με την IRAK1

αλληλεπιδρά με τις Ubc13 και Uev1A. Η ενεργοποίηση της κινάσης TAK1 (*transforming growth factor-b-activated protein kinase 1*) από τον TRAF6 εξαρτάται από την ουμπικουιτινίωση[142]. Η TAK1 βρίσκεται σε σύμπλοκο με τις TAB1, TAB2 και TAB3 και, μόλις ενεργοποιηθεί, οδηγεί στην ενεργοποίηση του συμπλόκου IKK που φωσφορυλιώνει τα IKKs, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του NF-κB. Ταυτόχρονα, η TAK1 φωσφορυλιώνει δύο μέλη της οικογένειας των MAP κινασών, τις MKK3 και MKK6, οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν τις JNK and p38. Επίσης, μέσω των MEK1 και MEK2, ενεργοποιείται η ERK αλλά το μόριο ανοδικά αυτών των κινασών στο μονοπάτι των TLR δεν είναι ακόμα γνωστό (Εικόνα 16)[140].

Εναλλακτικά, το MyD-88 εξαρτώμενο μονοπάτι μπορεί να ενεργοποιήσει μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων IRF που προσδένονται σε μοτίβα ISRE (*IFN-stimulated response element*) επάγοντας την παραγωγή ιντερφερονών τύπου I (Εικόνα 16).

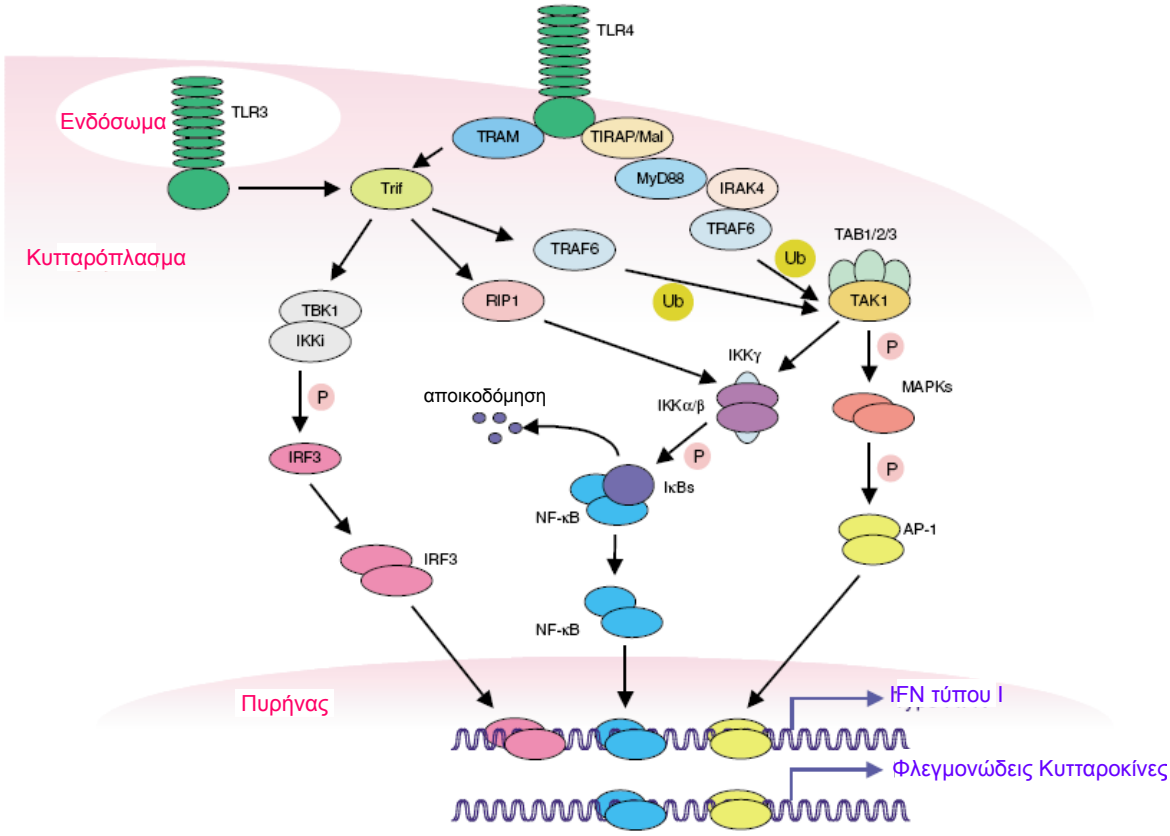


Εικόνα 16: Σχηματική αναπαράσταση του MyD-88 εξαρτώμενου σηματοδοτικού μονοπατιού των υποδοχέων TLR. Στην εικόνα φαίνεται αντιπροσωπευτικά η σηματοδότηση μέσω των TLR7, -8, -9. *(Τροποποιημένο από TLR signaling, Kawai T et al, Cell Death and Differantiation 2006).*

2.6.1.2 Ενεργοποίηση του NF-κB και AP-1 από το TRIF-εξαρτώμενο μονοπάτι

Μόνο οι υποδοχείς TLR3 και TLR4 σηματοδοτούν μέσω του προσαρμογέα TRIF. Ο TLR4 αλληλεπιδρά έμμεσα μέσω του TRAM. Ο προσαρμογέας TRIF μπορεί να ενεργοποιήσει τον NF-κB μέσω διαφορετικών οδών. Μπορεί να αλληλεπιδράσει με την TRAF6 και το σύμπλοκο να ενεργοποιήσει την πρωτεΐνη TAK1 και τελικά τον NF-κB, όπως περιγράφηκε για το MyD88-εξαρτώμενο μονοπάτι. Ταυτόχρονα, μπορεί να προσδεθεί με την κινάση RIP1 (*receptor-interacting protein-1*) η οποία συμβάλλει

επίσης στην ενεργοποίηση του NF-κB. Επιπλέον, το TRIF-εξαρτώμενο μονοπάτι μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή ιντερφερονών τύπου I μέσω ενεργοποίησης των μελών της οικογένειας IRF. Συγκεκριμένα, ο TRIF ενεργοποιεί τις κινάσες TANK1 (*TRAF family member-associated NF-kB activator 1*), TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) και IKKε (*inducible IκB kinase*), οι οποίες φωσφορυλιώνουν το μεταγραφικό παράγοντα IRF3 (Εικόνα 17)[140].

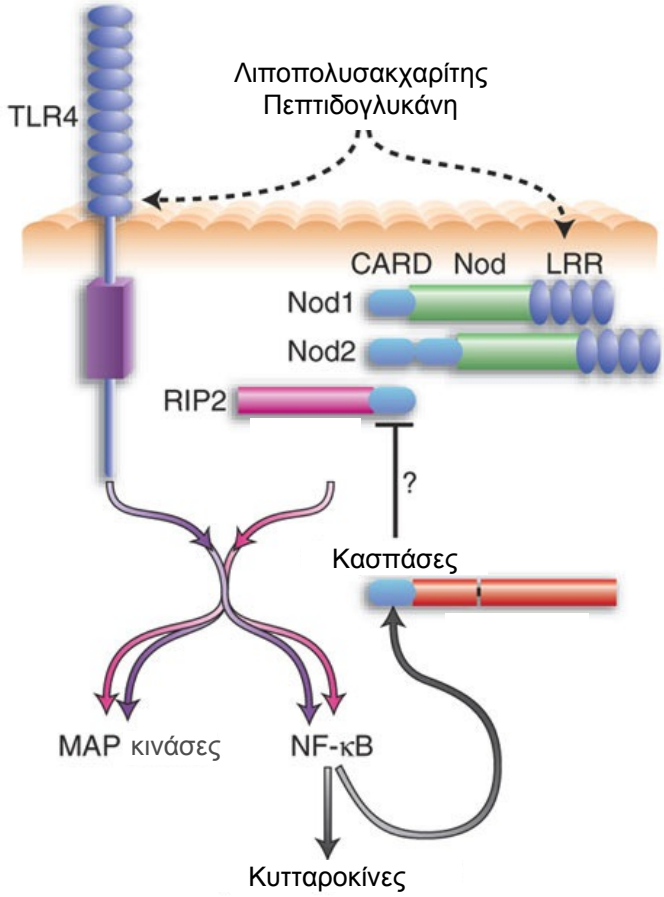


Εικόνα 17: Σχηματική αναπαράσταση του σηματοδοτικού μονοπατιού των υποδοχέων TLR. Στην εικόνα φαίνεται η σηματοδότηση μέσω των TLR4 (MyD-88 και TRIF-εξαρτώμενο μονοπάτι) και του TLR3 (TRIF-εξαρτώμενο μονοπάτι). *(Τροποποιημένο από TLR signaling, Kawai T et al, Cell Death and Differantiation 2006).*

2.6.2 Σηματοδότηση μέσω των υποδοχέων NOD

Οι υποδοχείς NOD1 και NOD2 επιστρατεύουν κι ενεργοποιούν την πρωτεΐνη RIP2 (*Receptor Interacting Protein 2*) η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί τον NF-κB και τις MAP κινάσες όπως περιγράφηκε προηγουμένως, με αποτέλεσμα την παραγωγή

προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών (Εικόνα 18)[143]. Υπάρχουν πολλά μόρια που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση του NF-κB μέσω των υποδοχέων NOD. Το ενδιαφέρον είναι ότι τα μόρια αυτά εμφανίζουν ειδικότητα ως προς τους δύο υποδοχείς. Η TRIP6 (*Thyroid Receptor Interacting Protein 6*) μπορεί να ενισχύσει την ενεργοποίηση του NOD1, κυρίως μέσω αλληλεπίδρασης με τη RIP2[144]. Η GRIM19 (*Gene associated with Retinoid-Interferon-Induced Mortality*) απαιτείται για την ενεργοποίηση του NF-κB ύστερα από την αναγνώριση του MDP από τον υποδοχέα NOD2[145]. Επίσης, η κινάση TAK1 (*TGF-β-Activated Kinase1*) ρυθμίζει αρνητικά την ενεργοποίηση του NF-κB, μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα NOD2. Άλλη μια πρωτεΐνη με παρόμοια λειτουργία είναι η ERBIN (*ErbB2 Interacting Protein*)[146]. Μελέτες υποστηρίζουν ότι οι υποδοχείς NOD1 και NOD2 εμπλέκονται και σε αποπτωτικά μονοπάτια και αλληλεπιδρούν με διάφορα μέλη της οικογένειας των κασπασών (Εικόνα 18)[147,148].



Εικόνα 18: Σχηματική αναπαράσταση του σηματοδοτικού μονοπατιού των υποδοχέων NOD. (Τροποποιημένη από Cutting into innate immunity, Astar Winoto, *Nature Immunology, 2004)*

3. Αντικείμενο μελέτης

Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ) είναι κακοήθες νεόπλασμα Β λεμφοκυττάρων που παρουσιάζουν φαινότυπο ενεργοποιημένων Β λεμφοκυττάρων. Είναι ένας από τους πιο κοινούς τύπους λευχαιμίας σε ενηλίκους των Δυτικών χωρών. Μέχρι πρόσφατα επικρατούσε η άποψη ότι η ΧΛΛ είναι ομοιογενής νόσος. Τα τελευταία χρόνια, ωστόσο, διαπιστώθηκε ότι εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια σε μοριακό, γενετικό και φαινοτυπικό επίπεδο[6].

Το ρεπερτόριο των γονιδίων IGHV στη ΧΛΛ χαρακτηρίζεται από επιλεκτικότητα και εμφανίζει σημαντικές διαφορές από το αντίστοιχο των φυσιολογικών Β λεμφοκυττάρων. Μοναδικό χαρακτηριστικό της νόσου είναι η ύπαρξη υποσυνόλων ασθενών με σχεδόν πανομοιότυπους 'στερεότυπους' Β κυτταρικούς υποδοχείς. Η συχνότητα των στερεότυπων υποδοχέων είναι εξαιρετικά υψηλή, περίπου 30%, και ο αριθμός των υποσυνόλων πολύ μεγάλος (>110)[149]. Δεδομένου ότι η πιθανότητα δύο διαφορετικοί κλώνοι Β λεμφοκυττάρων να εκφράζουν πανομοιότυπους υποδοχείς είναι εξαιρετικά χαμηλή (10^{-12}), αυτή η αξιοσημείωτη ομοιότητα των υποδοχέων BcR υποστηρίζει την ύπαρξη ενός περιορισμένου συνόλου αντιγόνων ή δομικά συσχετιζόμενων επιτόπων που εμπλέκονται στην επιλογή του λευχαιμικού κλώνου[33,34]. Πρόσφατα δεδομένα έδειξαν ότι τα Β λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ αναγνωρίζουν συστατικά κοινών παθογόνων, αλλά και μοριακά μοτίβα που σχετίζονται τόσο με την απόπτωση όσο και με οξείδωση των πρωτεϊνών και λιπιδίων που συνοδεύει την απόπτωση[74].

Τα Β λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν παθογόνα και μέσω άλλων υποδοχέων εκτός του BcR. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνεται και η οικογένεια υποδοχέων έμφυτης ανοσίας τύπου Toll (Toll Like Receptors, TLRs) καθώς και οι υποδοχείς τύπου NOD (Nod Like Receptors, NLRs). Οι υποδοχείς TLR αναγνωρίζουν διατηρημένα μοριακά μοτίβα κοινών παθογόνων. Εκφράζονται σε όλα τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και κατ' επέκταση στα Β λεμφοκύτταρα, όπου ασκούν συν-διεγερτική δράση στον BcR[81,150]. Κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι υποδοχείς αυτοί εμπλέκονται στην παθογένεια διαφόρων νοσημάτων[76,81]. Στα θηλαστικά, η

οικογένεια των υποδοχέων NLR περιλαμβάνει περισσότερα από 20 μέλη. Τα δύο μέλη της οικογένειας που έχουν μελετηθεί εκτενώς είναι οι υποδοχείς NOD1 (Nucleotide Oligomerization Domain 1) και NOD2[81]. Ακόμη και σήμερα δεν υπάρχουν σαφή συμπεράσματα για το ρεπερτόριο και τη λειτουργικότητα των υποδοχέων TLR και NLR στα λευχαιμικά κύτταρα της ΧΛΛ, καθώς τα περισσότερα δεδομένα προέρχονται από μικρές και όχι καλά χαρακτηρισμένες ομάδες ασθενών[131-133,135].

Η παρούσα μελέτη αποσκοπεί στην ανάλυση των υποδοχέων της προσαρμοστικής ανοσίας (υποδοχείς BcR) και της έμφυτης ανοσίας (υποδοχείς TLR, NOD) σε μεγάλη ομάδα ασθενών με ΧΛΛ. Επιδιώξεις της μελέτης είναι οι εξής:

- συσχέτιση προτύπων έκφρασης TLR, NOD και BcR στη ΧΛΛ
- αναζήτηση στερεοτυπίας ως προς το ρεπερτόριο των υποδοχέων TLR, NOD σε ασθενείς με στερεότυπους υποδοχείς BcR
- μελέτη λειτουργικότητας υποδοχέων TLR, NOD και πιθανής συμμετοχής τους στην παθογένεια της ΧΛΛ
- διερεύνηση πιθανής προγνωστικής σημασίας ειδικών προτύπων έκφρασης TLR, NOD στη ΧΛΛ.

Το πρώτο μέρος της μελέτης πραγματοποιήθηκε συστηματική ανάλυση της έκφρασης των υποδοχέων TLR καθώς και κρίσιμων μορίων του σηματοδοτικού μονοπατιού (προσαρμοστές, τελεστές, μόρια που εμπλέκονται σε άλλες σηματοδοτικές οδούς που αλληλεπιδρούν με τους TLR, καθώς και τελικά μόρια-στόχοι). Επίσης, με τη χρήση ειδικών εκκινητών αναλύθηκε η έκφραση των υποδοχέων NOD1/2. Η ανάλυση έδειξε ότι το πρότυπο έκφρασης των υποδοχέων TLR στα Β λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ προσομοιάζει με το αντίστοιχο πρότυπο Β λεμφοκυττάρων με εμπειρία αντιγόνου. Επίσης, στο σύνολο των ασθενών τα περισσότερα σηματοδοτικά μόρια εκφραζόταν σε υψηλά ή ενδιάμεσα επίπεδα, ενώ οι αναστολείς του μονοπατιού παρουσίαζαν χαμηλή έκφραση, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα κύτταρα της ΧΛΛ είναι ικανά για σηματοδότηση μέσω των υποδοχέων TLR. Επιπλέον, υπο-ομάδες ασθενών με ΧΛΛ που ορίζονται με βάση τα ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά των BcR τους και ιδίως οι περιπτώσεις που φέρουν στερεότυπους BcR εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης των

υποδοχέων TLR, γεγονός που υποδεικνύει ότι διαφορετικά (και ταυτόχρονα) σήματα εκτός από αυτά που προέρχονται από τον BcR μπορεί να επηρεάζουν τη συμπεριφορά του νεοπλασματικού κλώνου.

Στο δεύτερο μέρος της παρούσας διατριβής μελετήθηκε η λειτουργικότητα όλων των υποδοχέων TLR που εκφραζόταν στα Β λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ και του NOD2 καθώς το ποσοστό βιωσιμότητας των CD19+ κυττάρων μετά από διέγερση των υποδοχέων. Τα αποτελέσματα έδειξαν οι υποδοχείς TLR και NOD2 είναι λειτουργικοί στα Β λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ αλλά υπάρχει μεγάλη ετερογένεια μεταξύ διαφορετικών ασθενών, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ανάπτυξη και εξέλιξη της ΧΛΛ πιθανόν επηρεάζεται και από σήματα που λαμβάνονται μέσω των υποδοχέων έμφυτης ανοσίας. Επιπλέον, υποομάδες ασθενών με ΧΛΛ που ορίζονται με βάση τα ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά των BcR εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα λειτουργικότητας και/ή ανεργίας των υποδοχέων TLR και/ή NLR. Με βάση τα παραπάνω φαίνεται ότι η βιολογική συμπεριφορά του λευχαιμικού κλώνου, που αντικατοπτρίζεται στην κλινική πορεία της νόσου, είναι αποτέλεσμα της συνεργασίας των κλωνοτυπικών BcR με συγκεκριμένους υποδοχείς έμφυτης ανοσίας που διαφέρουν κατά περίπτωση.

4. Υλικά και Μέθοδοι

4.1 Αρνητική επιλογή CD19^{+} κυττάρων από δείγματα αίματος ασθενών με ΧΛΛ

Ο διαχωρισμός των CD19+ κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της τεχνολογίας Rosette Sep (RosetteSep; StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada). Η τεχνολογία συνδυάζει την αρνητική επιλογή των ανεπιθύμητων κυττάρων με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων και τη χρήση του αντιδραστηρίου φικόλλη (Ficoll-Hypaque) για διαχωρισμό βασισμένο σε διαβάθμιση πυκνότητας (Πίνακας 4). Στη συγκεκριμένη περίπτωση προτιμήθηκε η αρνητική επιλογή έναντι της θετικής επιλογής με αντί-CD19 αντισώματα ώστε ν' αποφευχθεί το ενδεχόμενο ενεργοποίησης των Β λεμφοκυττάρων μέσω του συν-υποδοχέα CD19. Η πρόσδεση των ανεπιθύμητων κυττάρων στα μονοκλωνικά αντισώματα είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ροζετών με τα ερυθρά αιμοσφαίρια και την καθίζηση τους.

Πίνακας 4: Το σύνολο των μονοκλωνικών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων κυττάρων

Δείκτες	Έκφραση
CD2	**Τ λεμφοκύτταρα, ΝΚ κύτταρα, Θυμοκύτταρα**
CD3	**Τ λεμφοκύτταρα, Θυμοκύτταρα**
CD16	**ΝΚ κύτταρα, Ουδετερόφιλα, Μακροφάγα**
CD36	**Μονοπύρηνα, Αιμοπετάλια**
CD56	**ΝΚ κύτταρα**
CD66b	**Κοκκιοκύτταρα**

<u>Διαδικασία:</u>

1. *Προσθήκη 50μl μείγματος μονοκλωνικών αντισωμάτων/ml αίματος και καλή ανακίνηση.*
2. *Επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.*
3. *Προσθήκη ίσου όγκου Phosphate Buffered Saline (PBS) με περιεκτικότητα 2% Fetal Bovine Serum (FBS) στο ολικό αίμα (PBS + 2% FBS).*
4. *Επιστοίβαση σε ίσο όγκο φικόλλης.*
5. *Φυγοκέντρηση στις 1900 rpm για 20 λεπτά.*

6. *Συλλογή της στοιβάδας των CD19$^+$ κυττάρων και μεταφορά τους σε νέο σωληνάριο.*
7. *Προσθήκη ανάλογης ποσότητας διαλύματος PBS +2% FBS μέχρι τελικό όγκο 12 ml.*
8. *Φυγοκέντρηση στις 2100 rpm για 8 λεπτά.*
9. *Απόρριψη του υπερκειμένου και προσθήκη 10 ml διαλύματος PBS 2% FBS. Επανάληψη της φυγοκέντρησης.*
10. *Επανεναιώρηση των κυττάρων σε 1 ml διαλύματος PBS 2% FBS.*
11. *Μέτρηση των κυττάρων σε μικροσκόπιο με τη χρήση της πλάκας Neubauer και της χρωστικής Trypan Blue.*
12. *Τοποθέτηση 12x10^6 κυττάρων ανά σωληνάριο Eppendorf.*
13. *Προσθήκη 500 μl Dimethyl sulfoxide (DMSO).*
14. *Αποθήκευση στους -80°C.*

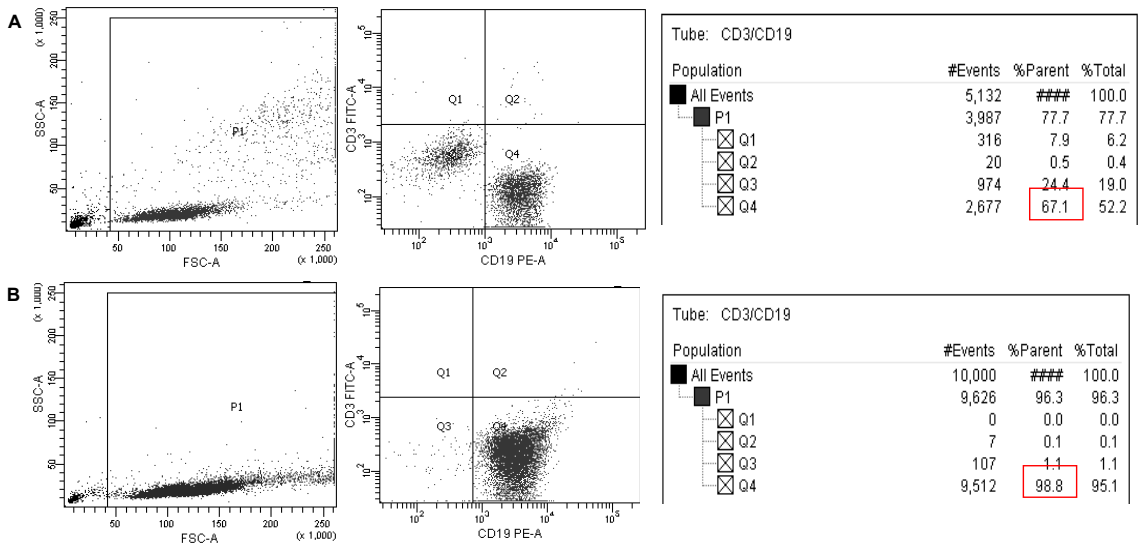
4.1.1 Μέτρηση του ποσοστού των CD19$^+$ κυττάρων με κυτταρομετρία ροής

Η μέτρηση του ποσοστού των CD19$^+$ κυττάρων πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής (FACS) σε αναλυτή BD FACS CANTO. Η ανάλυση βασίστηκε στο λογισμικό BD FACS DIVA (BD, Franklin Lakes, NJ USA).

<u>Διαδικασία:</u>

1. *Προσθήκη 10 μl μίγματος μονοκλωνικών αντισωμάτων CD3 συνδεδεμένο με ισοθειοκυανικό οξύ φλουορεσκεΐνης (fluorescein isothiocyanate, FITC) και CD19 συνδεδεμένο με φυκοερυθρίνη (phycoerythrin, PE) σε 100 μl αίματος (10^6 κύτταρα/ml).*
2. *Ανακίνηση και επώαση των δειγμάτων για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.*
3. *Προσθήκη 2 ml διαλύματος χλωριούχου αμμωνίου (NH_4CL) για λύση των ερυθροκυτττάρων .*
4. *Ανακίνηση και επώαση των δειγμάτων για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.*
5. *Φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 5 λεπτά.*
6. *Απόρριψη του υπερκειμένου.*
7. *Προσθήκη 1 ml PBS σε κάθε δείγμα.*
8. *Μέτρηση του ποσοστού των CD3$^-$/CD19$^+$ κυττάρων στον αναλυτή.*

Η διαδικασία επαναλήφθηκε και μετά την αρνητική επιλογή των κυττάρων. Για τα επόμενα στάδια της πειραματικής διαδικασίας επιλέχθηκαν τα δείγματα που περιείχαν CD19$^+$ κύτταρα σε ποσοστό μεγαλύτερο από 95% (Εικόνα 19).



Εικόνα 19: Ανάλυση του ποσοστού των CD19+ κυττάρων πριν (A) και μετά (B) την διαδικασία της αρνητικής επιλογής.

4.2 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση ολικού RNA από τα $CD19^+$ κύτταρα πραγματοποιήθηκε με το Qiagen RNAeasy mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany*)*. Η διαδικασία στηρίζεται στη χρήση χαοτροπικών παραγόντων και αυστηρών συνθηκών αλατότητας, παρεμβάλλοντας ένα βήμα απομάκρυνσης του γενωμικού DNA με τη χρήση του ενζύμου DNase I (QIAGEN, Hilden, Germany*)*. Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο για τους περαιτέρω χειρισμούς.

<u>Διαδικασία:</u>

1. *Ξεπάγωμα των κυττάρων, στους 37°C με ανακίνηση.*
2. *Φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 3 λεπτά.*
3. *Απόρριψη του υπερκείμενου και προσθήκη 700 μl διαλύματος PBS. Επανάληψη της φυγοκέντρησης.*
4. *Απόρριψη του υπερκειμένου και προσθήκη 600 μl διαλύματος RLT.*
5. *Μεταφορά του δείγματος σε Qiashredder spin column.*
6. *Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 2 λεπτά.*
7. *Προσθήκη 600 μl 70 % αιθανόλης.*
8. *Μεταφορά του δείγματος σε QIAamp spin column.*
9. *Φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 0,5 λεπτό.*
10. *Απόρριψη του εκχυλίσματος και προσθήκη 350 μl διαλύματος RW1. Επανάληψη της φυγοκέντρησης.*
11. *Απόρριψη εκχυλίσματος.*

12. *Προσθήκη 80 μl διαλύματος DNάσης (10 μl DNase 1 και 70 μl του διαλύματος RDD) σε κάθε δείγμα. Επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.*
13. *Προσθήκη 350 μl του διαλύματος RW1. Φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 0,5 λεπτό.*
14. *Απόρριψη του εκχυλίσματος και προσθήκη 500 μl διαλύματος RPE. Επανάληψη της φυγοκέντρησης.*
15. *Απόρριψη του εκχυλίσματος και προσθήκη 500 μl διαλύματος RPE. Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 3 λεπτά.*
16. *Έκλουση σε 30 μl H_20 ελεύθερο από RNάσες. Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.*
17. *Φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 1 λεπτό.*
18. *Αποθήκευση στους -80°C.*

4.2.1 Ποσοτικοποίηση και ποιοτικός έλεγχος RNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA πραγματοποιήθηκε με φωτομέτρηση στα 280/260 nm. Τα δείγματα με λόγο 280/260 μεγαλύτερο από 1,8 και συγκέντρωση μεγαλύτερη από 100ng/μl χρησιμοποιήθηκαν στα επόμενα στάδια της πειραματικής διαδικασίας.

4.3 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιήθηκε με το RT^2 First Strand Kit (SA Biosciences, USA) με τη χρήση τυχαίων εξαμερών εκκινητών. Η αρχική ποσότητα του RNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1 μg.

<u>Διαδικασία:</u>

1. *Προσθήκη σε σωληνάριο eppendorf 2μl GE (5x gDNA Elimination Buffer).*
2. *Προσθήκη κατάλληλου όγκου διαλύματος RNA (1μg).*
3. *Προσθήκη Rnase free H_2O μέχρι τελικό όγκο 10μl.*
4. *Τοποθέτηση δειγμάτων στο θερμοκυκλοποιητή σε θερμοκρασία 42°C για 5 λεπτά.*
5. *Άμεση τοποθέτηση στον πάγο για 5 λεπτά.*
6. *Προσθήκη 10 μl μίγματος εκκινητών, χλωριούχου μαγνησίου, νουκλεοτιδίων και πολυμεράσης (Πίνακας 5).*
7. *Τοποθέτηση δειγμάτων στο θερμοκυκλοποιητή.*

   <u>Συνθήκες αντίδρασης :</u>
   1) 45° C για 15 λεπτά
   2) 95° C για 5 λεπτά

3) *τελική θερμοκρασία: 4^oC*

8. *Αραίωση του cDNA με προσθήκη 91 μl αποστειρωμένου H_2O.*

Πίνακας 5: Αντιδραστήρια και ποσότητες για την αντίδραση σύνθεσης cDNA.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΟΓΚΟΣ
BC3 (5x RT Buffer 3)	**4μl**
P2 (Primer and External Control Mix)	**1μl**
RE3 (RT Enzyme Mix 3)	**2μl**
H_2O RNase Free	**3μl**
P2 (Primer and External Control Mix)	**2μl**

4.3.1 Ποιοτικός έλεγχος του cDNA

Ο έλεγχος του cDNA για την ύπαρξη επιμόλυνσης από γενωμικό DNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο PCR. Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν οι ειδικοί εκκινητές A2, A10 που προσδένονται σε εσώνιο του γονιδίου της β-ακτίνης. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ολικό DNA από Β λεμφοκύτταρα. Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε ολικό DNA από μονοπύρηνα κύτταρα αίματος. Τα δείγματα που δεν απέδωσαν προϊόν PCR χρησιμοποιήθηκαν στα επόμενα στάδια της πειραματικής διαδικασίας.

<u>Διαδικασία:</u>

1. *Μεταφορά 6 μl cDNA από κάθε δείγμα σε σωληνάριο eppendorf.*
2. *Προσθήκη 44 μl μίγματος εκκινητών, χλωριούχου μαγνησίου, νουκλεοτιδίων και πολυμεράσης (Πίνακας 6).*
3. *Τοποθέτηση δειγμάτων στο θερμοκυκλοποιητή.*

<u>Συνθήκες αντίδρασης :</u>

1) *Αρχική αποδιάταξη, 94° C για 5 λεπτά.*
2) *Αποδιάταξη, 94° C για 1 λεπτό.*
3) *Υβριδισμός, 55° C για 1,5 λεπτό.*
4) *Επιμήκυνση ,72° C για 2 λεπτά.*
5) *Επανάληψη βημάτων 2→4 για 32 φορές.*
6) *Τελικό στάδιο επιμήκυνσης, 72° C για 4 λεπτά.*
7) *Τελική θερμοκρασία 4^oC.*

Πίνακας 6: Αντιδραστήρια και ποσότητες για την αντίδραση PCR

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	*ΟΓΚΟΣ*
RB*(-10x –$MgCl_2$)	**5 μl**
$MgCl_2$	**2.5 μl**
DNTRs	**1.5μl**
A_2 εκκινητής	**3 μl**
A_{10} εκκινητής	**3 μl**
Platinum Polymerase	**0.4 μl**
H_2O	**28.6 μl**

4.4 Ποσοτικοποίηση Μεταγράφων

4.4.1 RT^2 Profiler™ PCR Array

Η ποσοτικοποίηση των mRNA μεταγράφων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Real-time PCR σε πλάκα RT^2 Profiler™ PCR Array (SA Biosciences, USA). Η συγκεκριμένη τεχνική συνδυάζει την κλασική PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR) με την τεχνική των μικροσυστοιχιών (microarrays). Η πλάκα περιείχε εκκινητές για την ενίσχυση 84 γονιδίων που κωδικοποιούν τους υποδοχείς TLR καθώς και κρίσιμα μόρια του σηματοδοτικού μονοπατιού καθοδικά των υποδοχέων (Παράρτημα 1, Εικόνα 20). Η χρωστική ουσία που χρησιμοποιήθηκε είναι η SYBR green. Η συγκεκριμένη χρωστική προσδένεται μη ειδικά στην ελάσσονα αύλακα του δίκλωνου DNA. Για το λόγο αυτό, κατά την απομόνωση του RNA έγινε απομάκρυνση του γενωμικού DNA με τη χρήση του ενζύμου DNase I.

<u>Διαδικασία:</u>

1. *Προετοιμασία του μίγματος της αντίδρασης (Πίνακας 7).*
2. *Μοίρασμα 25 μl του μίγματος σε καθένα από τα 84 πηγαδάκια της πλάκας RT^2 Profiler ™ PCR Array.*
3. *Ανακίνηση της πλάκας και spin.*
4. *Τοποθέτηση της πλάκας στο θερμοκυκλοποιητή Chromo 4, BioRad.*

<u>Συνθήκες αντίδρασης :</u>

1) *Αρχική αποδιάταξη, 95° C για 10 λεπτά.*
2) *Αποδιάταξη, 95° C για 15 δευτερόλεπτα.*
3) *Υβριδισμός, 55° C για 30 δευτερόλεπτα.*
4) *Διάβασμα πλάκας.*
5) *Επιμήκυνση, 72° C για 30 δευτερόλεπτα.*

6) *Επανάληψη βημάτων 2→5 για 32 φορές.*
7) *Τελικό στάδιο επιμήκυνσης, 72° C για 2 λεπτά.*
8) *Melting curve*

Πίνακας 7: Αντιδραστήρια για την αντίδραση Real-time PCR.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΟΓΚΟΣ
2x Superarray RT^2 q^{p}CR Master Mix	**1275 μl**
Diluted first strand cDNA synthesis reaction	**102 μl**
dd H_2O	**1173 μl**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BTK	CASP8	CCL2	CD14	CD80	CD86	CHUK	CLEC4E	CSF2	CSF3	CXCL10	EIF2AK2
B	ELK1	FADD	FOS	HMGB1	HRAS	HSPA1A	HSPD1	IFNA1	IFNB1	IFNG	IKBKB	IL10
C	IL12A	IL1A	IL1B	IL2	IL6	IL8	IRAK1	IRAK2	IRF1	IFRF3	JUN	LTA
D	CD180	LY86	LY96	MAP2K3	MAP2K4	MAP3K1	MAP3K7	MAP3K7IP1	MAP4K4	MAPK8	MAPK8IP3	MYD88
E	NFKB1	NFKB2	NFKBIA	NFKBIL1	NFRKB	NR2C2	PELI1	PPARA	PRKRA	PTGS2	REL	RELA
F	RIPK2	SARM1	SIGIRR	ECSIT	TBK1	TICAM2	TIRAP	TLR1	TLR10	TLR2	TLR3	TLR4
G	TLR5	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9	TNF	TNFRSF1A	TOLLIP	TRAF6	TICAM1	UBE2N	UBE2V1
H	B2M	HPRT1	RPL13A	GAPDH	ACTB	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Εικόνα 20: Διαγραμματική απεικόνιση της διάταξη της πλάκας που χρησιμοποιήθηκε. Με κίτρινο επισημαίνονται τα μέλη της οικογένειας TLR, με γαλάζιο οι προσαρμοστές και με πορτοκαλί οι τελεστές του μονοπατιού. Επιπλέον, επισημαίνονται διάφορα μόρια τα οποία συμμετέχουν σε μονοπάτια που αλληλεπιδρούν με το σηματοδοτικό μονοπάτι των TLR. Πράσινο: οδός NF-κB, Ροζ: οδός JNK/p38, Κόκκινο: οδός NF /IL6, Πορτοκαλί: οδός IRF, Μπλε: ρύθμιση προσαρμοστικής ανοσίας. Με γκρι επισημαίνονται τα γονίδια αναφοράς, ενώ με μοβ τα control.

4.4.2 Real time PCR για τα γονίδια NOD

Η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων NOD1 και NOD2 πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Real-Time PCR χρησιμοποιώντας τους αντίστοιχους εκκινητές (SA Biosciences, USA). Οι αντιδράσεις για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρείς φορές (Εικόνα 21). Για το τελικό αποτέλεσμα υπολογίστηκε η μέση τιμή των τριών αντιδράσεων. Επίσης, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε αραίωση cDNA 1:10,

για να διασφαλιστεί ότι κάθε δείγμα μπορεί να δώσει ανιχνεύσιμη καμπύλη φθορισμού. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο ABL.

Για τον έλεγχο επιμολύνσεων χρησιμοποιήθηκαν δύο αρνητικοί μάρτυρες σε τρεις επαναλήψεις ο καθένας (Εικόνα 21). Ο πρώτος (No Reverse Transcription, NRT) παρασκευάστηκε κατά τη σύνθεση του cDNA για κάθε δείγμα ασθενούς. Κατά τη διαδικασία δεν προστέθηκε το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης με αποτέλεσμα το αρχικό προϊόν να μη μεταγράφεται. Η ανίχνευση έκφρασης στις θέσεις C1, C2, C3 ήταν ένδειξη ότι τα δείγματα περιείχαν γενωμικό DNA, οπότε απορρίπτονταν από περαιτέρω ανάλυση. Ο δεύτερος μάρτυρας (No template Control, NTC) χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση επιμολύνσεων από DNA που μπορεί να προκύψουν κατά τη διαδικασία της προετοιμασίας της αντίδρασης. Στις αντίστοιχες θέσεις δεν υπήρχε υπόστρωμα (cDNA), συνεπώς η ανίχνευση έκφρασης ερμηνευόταν ως επιμόλυνση.

	1	2	3	4	5	6
A	NOD1	NOD1	NOD2	NOD2	ABL	ABL
B	NOD1 D	NOD1 D	NOD2 D	NOD2 D	ABL D	ABL D
C	NRT	NRT	NRT	NTC	NTC	NTC

Εικόνα 21: Διαγραμματική απεικόνιση της διάταξης της πλάκας που χρησιμοποιήθηκε. Με κίτρινο επισημαίνονται τα γονίδια NOD1 και NOD2, με πράσινο το γονίδιο αναφοράς (ABL), με μπλε όλα τα παραπάνω γονίδια σε αραίωση 1/10, με κόκκινο το εσωτερικό control NRT και με πορτοκαλί το εσωτερικό control NTC.

4.4.3 Ανάλυση αποτελεσμάτων με τη μέθοδο ΔΔCt

Η ΔΔCt είναι μέθοδος σχετικής ποσοτικοποίησης που συγκρίνει την έκφραση μεταξύ δυο διαφορετικών ομάδων δεδομένων. Ο αλγόριθμος χρησιμοποιεί ως αρχικό δεδομένο την τιμή Ct που είναι το σημείο στο οποίο το προϊόν της αντίδρασης περνά στην εκθετική φάση ενίσχυσης.

Το αρχικό βήμα στην ανάλυση είναι η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων με τη χρήση γονιδίων αναφοράς (housekeeping genes), σύμφωνα με τον τύπο:

$$\Delta Ct = Ct^{GOI} - Ct^{AVG\ HKG}$$

όπου GOI το γονίδιο προς εξέταση και AVG HKG ο μέσος όρος των γονιδίων αναφοράς. Ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τα: B2M, HPRT1, RPL13A, GAPDH, ACTB στην περίπτωση των TLR και η ACTB στην περίπτωση των NOD (Παράρτημα 1).

Στη συνέχεια υπολογίζεται η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων δεδομένων με τον τύπο:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(ομάδας\ 2)} - \Delta Ct_{(ομάδας\ 1)}$$

Τελικά, η διαφορά στην έκφραση (fold-change) υπολογίζεται

από τον τύπο:

$$Fold\ change = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

4.5 Προσδιορισμός έκφρασης πρωτεϊνών με κυτταρομετρία ροής

Για τη μέτρηση σε πρωτεϊνικό επίπεδο των επιπέδων των υποδοχέων TLR και των συνδιεγερτικών μορίων CD80 και CD86, τα δείγματα επωάστηκαν με τα κατάλληλα αντισώματα τα οποία ήταν συνδεδεμένα με φθορίζουσες χρωστικές (Πίνακας 8). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του συν-υποδοχέα CD19 ώστε ν' αναγνωριστούν τα Β λεμφοκύτταρα που θεωρείται ότι αντιστοιχούν στο νεοπλασματικό κλώνο. Τα δείγματα επίσης επωάστηκαν με τη χρωστική 7AAD η οποία βάφει τα νεκρά και αποπτωτικά κύτταρα τα οποία έτσι διακρίνονται από τα ζωντανά που τελικά αναλύθηκαν. Συνεπώς, χρησιμοποιήθηκαν συνδυασμοί τριών ή τεσσάρων φθοριοχρωμάτων ανά περίπτωση. Οι ποσότητες των μονοκλωνικών αντισωμάτων και τα φθοριοχρώματα με τα οποία ήταν συνδεδεμένα καθώς και οι συνδυασμοί των αντισωμάτων που διέφεραν κατά περίπτωση αναφέρονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8: Τα αντισώματα και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των υποδοχέων TLR με κυτταρομετρίας ροής.

Περιγραφή	*Προμηθευτής*	*Ισοτυπικο Control*	*Ποσότητα*
TLR1 antibody [GD2.F4] (FITC) (ab59702)	AbCam, Cambridge, UK	IgG1	10μl
TLR2, Mouse Anti-Human, (Alexa Fluor® 488) Cat. No. MHTLR220	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	IgG2a	10μl
TLR4 antibody [HTA125] (Phycoerythrin) (ab11227)	AbCam, Cambridge, UK	IgG2a	10μl
TLR6 antibody [TLR6.127] (FITC) (ab72362)	AbCam, Cambridge, UK	IgG1	10μl
TLR7 antibody (Phycoerythrin) (ab72331)	AbCam, Cambridge, UK	IgG	2μl
Monoclonal Antibody to TLR8/CD288 (Clone 303F1.14) Alexa 488 Conjugated	IMGENEX,San Diego, CA	IgG2a	2μl
TLR9 antibody [5G5] (FITC) (ab58864)	AbCam, Cambridge, UK	IgG2a	10μl
FITC Mouse Anti-Human CD80 (557226)	BD Pharmingen™, Franklin Lakes, NJ USA	IgG1	10μl
PE Mouse Anti-Human CD86 (555658)	BD, Franklin Lakes, NJ USA	IgG1	10μl

<u>Διαδικασία:</u>

1. *Ξεπάγωμα των κυττάρων στους 37°C με ανακίνηση.*
2. *Φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 3 λεπτά.*
3. *Απόρριψη του υπερκείμενου και προσθήκη 700 μl διαλύματος PBS. Επανάληψη της φυγοκέντρησης.*
4. *Τοποθέτηση σε πάγο.*
5. *Προσθήκη των μονοκλωνικών αντισωμάτων για επιφανειακές πρωτεϊνες σε σωληνάκια κυτταρομετρίας.*
6. *Προσθήκη ανάλογης ποσότητας δείγματος σε κάθε σωληνάκι.*
7. *Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.*
8. *Φυγοκέντρηση στις 2000rpm για 5 λεπτά.*
9. *Αφαίρεση υπερκειμένου.*
10. *Επαναδιάλυση σε 1ml PBS 1x.*
11. *Προσδιορισμός του ποσοστού των κυττάρων που εκφράζουν κάθε εξεταζόμενη πρωτεΐνη στον κυτταρομετρητή ροής.*

Για τη μελέτη των ενδοκυττάριων TLR (TLR7, TLR8, TLR9) τα δείγματα υποβλήθηκαν σε περαιτέρω επεξεργασία με τη χρησιμοποίηση του κιτ Cytofix/Cytoperm (BD, Franklin Lakes, NJ USA), ώστε να γίνει διαπερατή η μεμβράνη των κυττάρων.

Διαδικασία:

1. *Προσθήκη των μονοκλωνικών αντισωμάτων για επιφανειακές πρωτεΐνες σε σωληνάκια κυτταρομετρίας.*
2. *Προσθήκη ανάλογης ποσότητας του δείγματος σε κάθε σωληνάκι.*
3. *Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.*
4. *Προσθήκη 250μl διαλύματος Cytofix/Cytoperm και vortex.*
5. *Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.*
6. *Αραίωση 1:10 του διαλύματος Perm/Wash (3ml /δείγμα).*
7. *Προσθήκη 1ml αραιωμένου διαλύματος Perm/Wash.*
8. *Φυγοκέντρηση στις 2000rpm για 5 λεπτά.*
9. *Απόριψη υπερκειμένου και επανάληψη των βημάτων 7-8.*
10. *Προσθήκη των μονοκλωνικών αντισωμάτων για κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες.*
11. *Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.*
12. *Προσθήκη 1ml αραιωμένου διαλύματος Perm/Wash.*
13. *Φυγοκέντρηση στις 2000rpm για 5 λεπτά.*
14. *Επαναδιάλυση σε 1ml PBS 1x.*
15. *Προσδιορισμός του ποσοστού των κυττάρων που εκφράζουν κάθε εξεταζόμενη πρωτεΐνη στον κυτταρομετρητή ροής.*

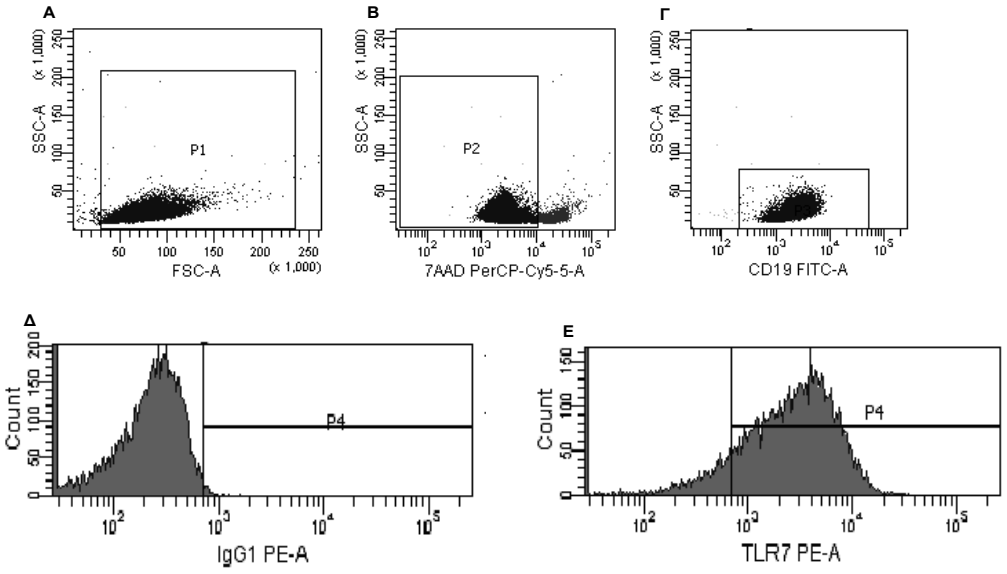
Οι προσδιορισμοί πραγματοποιήθηκαν σε αναλυτή BD FACS CANTO και η ανάλυση βασίστηκε στο λογισμικό BD FACS DIVA (BD, Franklin Lakes, NJ USA).

4.5.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων

Για τη μελέτη της έκφρασης πρωτεϊνών σε συγκεκριμένο κυτταρικό πληθυσμό γίνεται οριοθέτηση (δηλαδή διάκρισή του από τα υπόλοιπα κυτταρικά στοιχεία), διεργασία γνωστή ως περίφραξη (gating). Κάθε επόμενο διάγραμμα αναφέρεται πάντα στον πληθυσμό του προηγούμενου gate, διεργασία γνωστή ως διαδοχική περίφραξη. Για τον ορισμό της θετικότητας χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα ισοτυπικά control και, συγκεκριμένα, τα μονοκλωνικά αντισώματα IgG1 και IgG2a, κατά περίπτωση (Πίνακας 8).

Με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού αναλύθηκαν οι μετρήσεις για κάθε δείγμα, τα αποτελέσματα των οποίων παρουσιάζονται σε 5 διαγράμματα (Εικόνα 22). Στο πρώτο στικτόγραμμα (Διάγραμμα Α) παρουσιάζεται το σύνολο του κυτταρικού πληθυσμού που περιέχεται στο σωληνάριο με βάση τις ιδιότητες πρόσθιας και πλάγιας σκέδασης (forward scatter (FS), side scatter, (SS), αντιστοίχως). Τα

λεμφοκύτταρα εμφανίζουν χαμηλή FS και SS, τα μονοπύρηνα ενδιάμεσες τιμές FS και SS και τα πολυμορφοπύρηνα μεγάλες τιμές FS και SS. Σχεδόν μηδενικό FS εμφανίζουν τα νεκρά κύτταρα και τα κυτταρικά υπολείμματα τα οποία αποκλείονται από την ανάλυση. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το δείγμα αποτελούνταν σχεδόν αποκλειστικά από CD19+ Β λεμφοκύτταρα, λόγω της επιλογής τους σε προηγούμενο στάδιο. Σε αυτό το στικτόγραμμα οριοθετήθηκαν τα λεμφοκύτταρα (gate P1) με βάση τις ιδιότητες σκέδασης. Στο δεύτερο στικτόγραμμα (Διάγραμμα Β) παρουσιάζεται το σύνολο των λεμφοκυττάρων και η οριοθέτηση αφορά στα ζωντανά λεμφοκύτταρα (gate P2), τα οποία είναι αρνητικά για τη χρωστική 7AAD. Στο τρίτο στικτόγραμμα (Διάγραμμα Γ) περιέχονται τα ζωντανά λεμφοκύτταρα και η οριοθέτηση αφορά στα CD19+ Β λεμφοκύτταρα (gate P3). Τέλος, σε μορφή ιστογράμματος παρουσιάζονται το ισοτυπικό control (gate P4, Διάγραμμα Δ) και το ποσοστό έκφρασης της πρωτεΐνης στα CD19+ Β λεμφοκύτταρα (gate P4, Διάγραμμα Ε).



Εικόνα 22: Αποτελέσματα ανάλυσης της έκφρασης των πρωτεϊνών με κυτταρομετρίας ροής. Το διάγραμμα Δ αναφέρεται στο ισοτυπικό control, το οποίο για το συγκεκριμένο παράδειγμα είναι το IgG1 για τον υποδοχέα TLR7.

4.6 Ανοσοανίχνευση Western

4.6.1 Συλλογή κυττάρων και λήψη κυτταρικού εκχυλίσματος (harvesting)

Ολικές κυτταρικές πρωτεΐνες απομονώθηκαν από CD19+ Β λεμφοκύτταρα χρησιμοποιώντας διάλυμα λύσης που περιείχε 0.5M Tris-HCl, 5M NaCl, 0.5M EDTA pH 7.4, 1% Triton X-100, 10% γλυκερόλη, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate και ένα μίγμα αναστολέων πρωτεασών που συμπεριλάμβανε leupeptin (200mM) και PMSF (5μg/ml).

<u>Διαδικασία:</u>

1. *Ξεπάγωμα των κυττάρων, στους 37°C με ανακίνηση.*
2. *Φυγοκέντρηση (10 min, 2000rpm, 4°C). Απομάκρυνση του υπερκειμένου.*
3. *1ml διαλύματτος PBS.*
4. *Επανάληψη των βημάτων 2 και 3*
5. *Φυγοκέντρηση (10 min, 2000rpm, 4°C). Απομάκρυνση όλης της ποσότητας του PBS.*
6. *Επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 20 μl του διαλύματος λύσης για κάθε 10^{6} κύτταρα. Οι αναστολείς πρωτεασών, PMSF και leupeptin, προστίθενται στο lysis buffer πριν από τη χρήση του.*
7. *Επώαση στον πάγο για 15 λεπτά*
8. *Φυγοκέντρηση των διαλυμένων κυττάρων (15 min, 14000rpm, 4°C)*
9. *Μεταφορά του υπερκειμένου σε παγωμένο δοκιμαστικό σωληνάριο.*
10. *Αποθήκευση στους -80^{0}C.*

4.6.2 Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών

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

4.6.3 SDS-Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Προετοιμασία διαλύματος εργασίας (Πίνακας 9) και αποδιάταξη στους 70^0C για 10 λεπτά. Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 20-40 μικρογραμμάρια πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.

Πίνακας 9: Προετοιμασία πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

Αντιδραστήρια	*Όγκοι*
Πρωτεϊνικό εκχύλισμα	Ανάλογα με την συγκέντρωση της πρωτεΐνης (<26μl)
NuPAGE LDS sample buffer	¼ του τελικού όγκου μl
NuPAGE Reducing buffer	1/10 του τελικού όγκου μl
dH_2O	Ανάλογα με την ποσότητα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος
Τελικός όγκος	**Έως 40μl**

<u>Διαδικασία:</u>

1. *Προετοιμασία της ηλεκτροφορητικής συσκευής Invitrogen XCell SureLock (Invitrogen, Paisley, UK) με τοποθέτηση και κατάλληλη στήριξη του NuPAGE Bis-Tris gel (Invitrogen, Paisley, UK) και συμπλήρωση των δύο «θαλάμων» της συσκευής με 200ml και 600ml running buffer NuPAGE MOPS (1x), αντιστοίχως. Προσθήκη 500μl Antioxidant στον εσωτερικό «θάλαμο».*
2. *Φόρτωση των δειγμάτων σε 10% NuPAGE Bis-Tris gel. Κατά την ηλεκτροφόρηση, χρησιμοποιήθηκε επίσης ένας δείκτης μεγεθών που αποδίδει χαρακτηριστικές έγχρωμες ζώνες για διαφορετικά μοριακά βάρη (SeeBlue 2 Plus Prestained standard), όπως επίσης κι ένας δείκτης με δυνατότητα να φθορίζει μετά από έκθεση σε υπεριώδη (UV) ακτινοβολία (MagicMark™ XP).*
3. *Ηλεκτροφόρηση επί 60 min περίπου σε τάση 200 V (αναμενόμενη ένταση ηλεκτρικού ρεύματος: 120-125 mA αρχικά, 60-80 mA τελικά).*

4.6.4 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης έγινε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF (BioRad, USA) με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου.

Διαδικασία:

1. *Προετοιμασία του διαλύματος μεταφοράς (Tranfer buffer 1x) σύμφωνα με τον* Πίνακα 10.

Πίνακας 10: Σύσταση διαλύματος μεταφοράς

Αντιδραστήρια	*Όγκοι*
NuPAGE Transfer Buffer 20x	50 ml
NuPAGE Antioxidant	1 ml
Μεθανόλη	100 ml
dH_2O	Έως τελικό όγκο 1000 ml
Τελικός όγκος	**1000 ml**

2. *Τοποθέτηση της μεμβράνης PVDF σε δοχείο με μεθανόλη για 10 min.*
3. *Πλύσιμο με dH_2O και κατόπιν με το διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer 1x).*
4. *Τοποθέτηση της μεμβράνης PVDF, 2 χαρτιών Whatman και 4 σφουγγαριών σε tranfer buffer (1x)*
5. *Εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου 40 V για 1-1,5 ώρες.*

4.6.5 Ανοσοανίχνευση Western με τη χρήση βιοτίνης-στρεπταβιδίνης

Η ανοσοανίχνευση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του WesternDot™ 625 Western Blot Kit (Invitrogen, Paisley, UK). Το στάδιο ανίχνευσης στηρίζεται στην παρουσία ενός δευτερογενούς αντισώματος σε σύμπλοκο με βιοτίνη, goat anti-mouse ή rabbit anti-goat, αντιστοίχως, και στην αλληλεπίδρασή του με το σύμπλοκο QdotR 625 στρεπταβιδίνης. Με δεδομένο ότι ο νανοκρύσταλλος QdotR 625 εκπέμπει στο φάσμα της UV και σε μήκος κύματος του μπλε φωτός, η ανίχνευση των πρωτεϊνών έγινε δυνατή με τη χρήση του συστήματος ανίχνευσης MiniBIS Pro UV (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Σε κάθε περίπτωση, υπολογίστηκε ο λόγος της έντασης των ζωνών για κάθε TLR σε σχέση με την αντίστοιχη ζώνη της β-ακτίνης (μάρτυρας).

Διαδικασία:

1. *Τοποθέτηση της μεμβράνης σε κατάλληλο δοχείο και πλύσιμο με 20 ml dH_2O για 5 min, ώστε ν' απομακρυνθούν συστατικά του gel και του transfer buffer.*
2. *Επανάληψη πλυσίματος*
3. *Τοποθέτηση της μεμβράνης σε συνοδευτικό δοχείο που περιέχει 8 ml WesternDot™ blocking buffer. Επώαση για 60 min υπό ήπια ανάδευση (1 revolution/sec).*
4. *Διάλυση του πρωτογενούς αντισώματος σε 8 ml διαλύματος wash buffer (1x) που περιέχει 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% TweenR-20. Η συγκέντρωση του πρωτογενούς αντισώματος εξαρτάται από τις οδηγίες του προμηθευτή. Στη συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν τα πρωτογενή αντισώματα goat anti-TLR1 (R&D Systems, Minneapolis, USA), goat anti TLR2 (R&D Systems, Minneapolis, USA), mouse anti-TLR8 (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) και mouse anti-TLR9 (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) και για καθένα από αυτά πραγματοποιήθηκε διάλυση σε wash buffer σε αναλογία 1:200. Το αντίσωμα mouse anti-actin (Invitrogen, Paisley, UK) διαλύθηκε σε αναλογία 1:5000 σε wash buffer και χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για την ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης.*
5. *Απομάκρυνση του διαλύματος blocking και ολονύκτια επώαση της μεμβράνης με το διάλυμα του πρωτογενούς αντισώματος στους 4 ^{0}C υπό ανάδευση.*
6. *Πλύσιμο της μεμβράνης με 15 ml wash buffer για 5 min και απομάκρυνση του διαλύματος.*
7. *Επανάληψη του πλυσίματος δύο φορές.*
8. *Προετοιμασία του διαλύματος του δευτερογενούς αντισώματος διαλύοντας 4 μL Biotin-XX Goat anti-mouse ή 8 μL Biotin-XX Rabbit anti-goat σε 8 mL 1X Wash buffer.*
9. *Απομάκρυνση του Wash buffer και επώαση της μεμβράνης με 8 ml διαλύματος δευτερογενούς αντισώματος για 60 min υπό ανάδευση.*
10. *Πλύσιμο της μεμβράνης με 15 ml wash buffer για 5 min και απομάκρυνση του διαλύματος.*
11. *Επανάληψη του πλυσίματος δύο φορές.*
12. *Προετοιμασία του διαλύματος QdotR 625 streptavidin conjugate, διαλύοντας 4 μL QdotR625 streptavidin conjugate σε 8 mL WesternDot™ blocking buffer.*
13. *Απομάκρυνση του Wash buffer και επώαση της μεμβράνης με 8 ml διαλύματος QdotR 625 streptavidin conjugate για 60 min υπό ανάδευση.*
14. *Πλύσιμο της μεμβράνης με 15 ml wash buffer για 5 min και απομάκρυνση του διαλύματος.*
15. *Επανάληψη του πλυσίματος δύο φορές.*
16. *Πλύσιμο με 15-20 ml dH_2O.*
17. *Φωτογράφηση της μεμβράνης με τη χρήση του συστήματος MiniBIS Pro UV (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel) και του λογισμικού GelCapture. Η σχετική ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε μετά από σύγκριση κάθε ζώνης-στόχου με την αντίστοιχη ζώνη της β-ακτίνης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GelQuant, που στηρίζεται στον υπολογισμό της επιφάνειας κάθε ζώνης και του λόγου της προς την αντίστοιχη επιφάνεια της ζώνης της β-ακτίνης.*

4.6.6 Ανοσοανίχνευση Western με τη χρήση χημειοφωταύγειας

Στην περίπτωση της ανίνευσης των κινασών JNK και p-38, καθώς και των φωσφορυλιωμένων τους μορφών η ανοσοανίχνευση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας.

<u>Διαδικασία</u>

1. *Δέσμευση των μη ειδικών θέσεων προσδέσεως των αντισωμάτων, με προ-επώαση της μεμβράνης σε 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε μορφή σκόνης, διαλυμένο σε PBS με περιεκτικότητα 0.001% Tween (PBS-tween) για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.*

2. *Επώαση του διαλυμένου πρωτογενούς μονοκλωνικού σε γάλα είτε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, είτε overnight στους 4°C. Τα αντισώματα και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: phospho-JNK (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA). JNK1/3 ή p38α (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), phospho-p38 (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA) και β-ακτίνη (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany). Όλα τα αντισώματα χρησιμοποίθηκαν σε αραίωση 1:500 σε γάλα.*

3. *Πλύσιμο της μεμβράνης με 8ml PBS-tween για πέντε λεπτά.*
4. *Επανάλυψη του βήματος 3 για άλλες δύο φορές.*
5. *Επώαση του διαλυμένου δευτερογενούς μονοκλωνικού IgG (συνδεδεμένο με ραφανική υπεροξειδάση) σε γάλα ή BSA (anti-mouse HPR Pierce, Rockford, IL 1:10000) για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.*
6. *Πλύσιμο της μεμβράνης με 8ml PB- tween για πέντε λεπτά.*
7. *Επανάλυψη του βήματος 6 για άλλες δύο φορές.*
8. *Για την ανοσοανίχνευση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το Super signal west pico chemiluminescent substrate το οποίο αποτελεί κατάλληλο υπόστρωμα που πραγματοποιεί αντίδραση χημειοφωταύγειας.*

Σε αυτή την περίπτωση η σχετική ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε μετά από σύγκριση κάθε ζώνης-στόχου με την αντίστοιχη ζώνη της β-ακτίνης χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Image J (http://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots-with-image-j/).

4.7 Διέγερση των υποδοχέων TLR

Η διέγερση των υποδοχέων TLR στα CD19+ Β λεμφοκύτταρα έγινε με καταλλήλους προσδέτες (ligands) σε συνθήκες υγρής καλλιέργειας.

<u>Διαδικασία:</u>

1. *Ξεπάγωμα των κυττάρων, στους 37°C με ανακίνηση.*
2. *Φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 3 λεπτά.*
3. *Απόρριψη του υπερκείμενου και προσθήκη 700 μl διαλύματος PBS. Επανάληψη της φυγοκέντρησης.*
4. *Αφαίρεση υπερκειμένου*
5. *Επαναδιάλυση των κυττάρων σε θρεπτικό υλικό RPMI Complete (RPMI 1640 με περιεκτικότητα 10% foetal calf serum, 2 mmol/l l-glutamine και 15 lg/ml gentamicin) ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 3x10^{6} κύτταρα ανά ml θρεπτικού υλικού.*
6. *Μεταφορά 0,5 ml δείγματος σε κάθε πηγαδάκι σε πλάκα με 24 πηγαδάκια.*
7. *Προσθήκη κατάλληλου προσδέτη σε κάθε πηγαδάκι (Πίνακας 11).*
8. *Τοποθέτηση σε κλίβανο στους 37^{0}C με περιεκτικότητα 5% CO_2 και ολονύκτια επώαση.*

Πίνακας 11: Οι προσδέτες και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τη διέγερση των υποδοχέων TLR

Υποδοχέας	*Προσδέτης*	*Περιγραφή*	*Συγκέντρωση*
TLR1/2	Pam3CSK4	Synthetic bacterial lipoprotein	1 μg/ml
TLR2/6	MALP-2[1]	Mycoplasmal Lipopeptide	0,2 μg/ml
TLR4	LPS[2]	Ultra Pure E. Coli	200 ng/ml
TLR7	Loxoribine	Guanosine analog	1mM
TLR7	Imiquomod-R837	Small synthetic antiviral molecule	0,1 μg/ml
TLR9	ODN 2006	Type B oligonucleotide	2,5μg/ml
TLR8	ORN 06	GU-rich oligonucleotide	1 μg/ml

4.7.1 Συλλογή κυττάρων και μέτρηση της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων

Η μέτρηση της ενεργοποίησης των CD19+ λεμφοκυττάρων μετά τη διέγερση των υποδοχέων TLR με τους κατάλληλους προσδέτες, έγινε με προσδιορισμό της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων CD25 και CD86 με κυτταρομετρία ροής.

Διαδικασία:

1. *Μεταφορά των κυττάρων σε σωληνάκια*
2. *Πλύσιμο των κύτταρων με 2 ml PBS.*
3. *Φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 5 λεπτά.*
4. *Αφαίρεση υπερκειμένου.*
5. *Επανάληψη βημάτων 2 έως 4.*
6. *Προσθήκη μονοκλωνικών αντισωμάτων συνδεδεμένων με φθοριοχρώματα ειδικά για το CD25 και CD86 με βάση τον πίνακα 12*
7. *Επώαση στο σκοτάδι για 20 λεπτά.*
8. *Πλύσιμο των κύτταρων με 2 ml PBS.*
9. *Φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 5 λεπτά.*
10. *Αφαίρεση υπερκειμένου.*
11. *Προσθήκη 1 ml PBS σε κάθε δείγμα.*

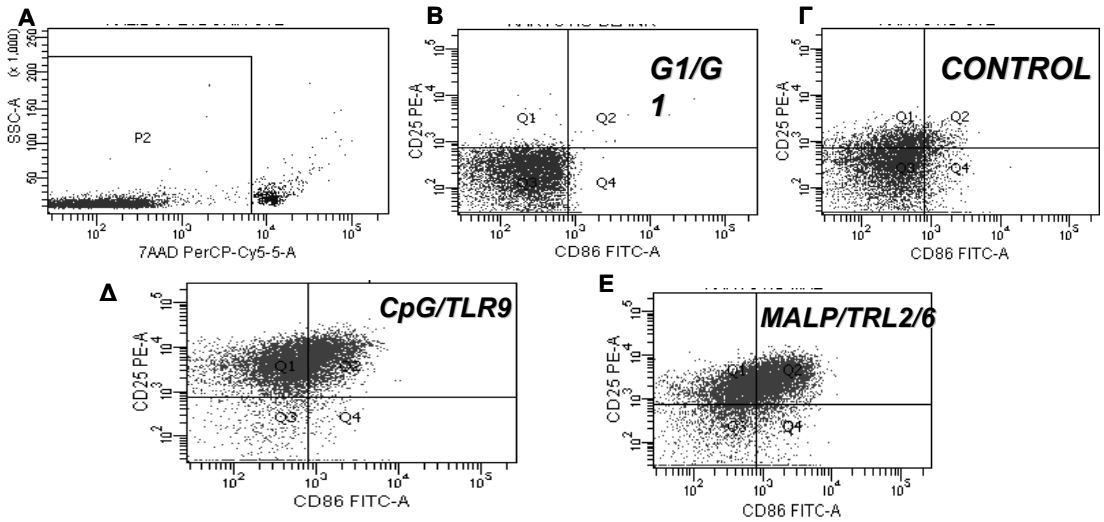
Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε αναλυτή BD FACS CANTO και η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων βασίστηκε στο λογισμικό BD FACS DIVA (BD, Franklin Lakes, NJ USA).

Πίνακας 12: Μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση των δεικτών CD25 και CD86 σε CD19+ λεμφοκυττάρα μετά τη διέγερση των υποδοχέων TLR με κατάλληλους προσδέτες

Περιγραφή	*Προμηθευτής*	*Ισοτυπικο Control*	*Ποσότητα*
FITC Mouse anti-human CD86 antibody (555657)	BD Pharmingen™, Franklin Lakes, NJ USA	IgG1	10μl
Monoclonal Mouse Anti-Human CD25, Interleukin-2 Receptor, Clone ACT-1 (R 0811)	Dako, Denmark. A/S	IgG1	10μl
7-AAD Viability Dye (PN IM3422)	Beckman Coulter International SA, Nyon, Switzerland		20μl

4.7.1.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων κυτταρομετρίας ροής

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με την ίδια λογική που περιγράφηκε παραπάνω. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ένα αδιέγερτο control για τη μέτρηση του ποσοστού έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων στην αδιέγερτη κατάσταση. Σε κάθε δείγμα και για κάθε προσδέτη το τελικό ποσοστό έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων που οφείλονταν στη διέγερση υπολογίστηκε μετά από αφαίρεση του ποσοστού έκφρασης των μορίων στην αδιέγερτη κατάσταση (Εικόνα 23).



Εικόνα 23: Ανάλυση της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων μετά από διέγερση των TLR με τους κατάλληλους προσδέτες. Στο στικτόγραμμα (Α) επιλέγονται τα ζωντανά κύτταρα ($7AAD^-$). Στα στικταγράμματα (Β) και (Γ) παρουσιάζονται το ισοτυπικό control και η έκφραση των δεικτών CD25 και CD86 στην αδιέγερτη κατάσταση. Τέλος, στα διάγραμματα (Δ) και (Ε) παρουσιάζεται η έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων μετά από διέγερση του TLR9 και του ετεροδιμερούς TLR2/6, αντιστοίχως, σ' ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα.

4.7.2 Συλλογή κυττάρων και μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων

Η διέγερση των κυττάρων με τους κατάλληλους προσδέτες έγινε σε υγρή καλλιέργεια όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε συγκεκριμένα χρονικά στιγμιότυπα (Ημέρα 3, 6 και 9) και μετρήθηκε η βιωσιμότητα των κυττάρων με κυτταρομετρία ροής.

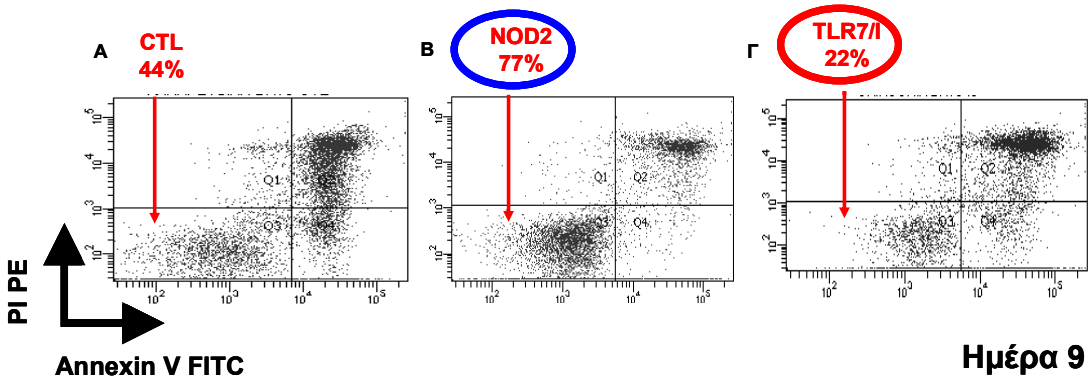
Διαδικασία:

1. *Μεταφορά των κυττάρων σε σωληνάκια*
2. *Πλύσιμο των κύτταρων με 2 ml PBS.*
3. *Φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 5 λεπτά.*
4. *Αφαίρεση υπερκειμένου.*
5. *Επανάληψη βημάτων 2 έως 4.*
6. *Προσθήκη 5μl Ανεξίνης V-FITC και 5μl PI-PE*
7. *Ανακίνηση και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.*
8. *Προσθήκη 400μl διαλύματος πρόσδεσης.*

Η μέτρηση του ποσοστού των αποπτωτικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε αναλυτή BD FACS CANTO και η ανάλυση βασίστηκε στο λογισμικό BD FACS DIVA (BD, Franklin Lakes, NJ USA).

4.7.2.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων κυτταρομετρίας ροής

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με την ίδια λογική που περιγράφηκε προηγουμένως. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ένα αδιέγερτο control για τη μέτρηση του ποσοστού των ζωντανών κυττάρων στην αδιέγερτη κατάσταση. Σε κάθε δείγμα και για κάθε προσδέτη, το τελικό ποσοστό των ζωντανών κυττάρων υπολογίστηκε μετά από αφαίρεση του ποσοστού τους στην αδιέγερτη κατάσταση (Εικόνα 24).



Εικόνα 24: Ανάλυση του ποσοστού των ζωντανών κυττάρων μετά από διέγερση των TLR με κατάλληλους προσδέτες. Στο στικτόγραμμα (Α) παρουσιάζεται το αδιέγερτο control ενώ στα στικτογράμματα (Β) και (Γ) παρουσιάζονται τα στικτογράμματα μετά από διέγερση του NOD2 και του TLR7, αντιστοίχως, για ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα. Στο τεταρτημόριο Q1 (PI+/AnV$^-$) εμφανίζονται τα νεκρά κύτταρα, στο τεταρτημόρια Q2 και Q4 (AnV+/PI+, AnV+/PI$^-$) τ' αποπτωτικά κύτταρα και στο τεταρτημόριο Q3 (AnV-/PI-) τα ζωντανά κύτταρα.

4.8 Διέγερση των υποδοχέων TLR και Real time RT-PCR

Η διέγερση των κυττάρων με τους κατάλληλους προσδέτες έγινε σε υγρή καλλιέργεια όπως περιγράφηκε πριν. Τα κύτταρα συλλέχτηκαν μετά από 18 ώρες επώασης και λύθηκαν για την απομόνωση ολικού RNA. Το RNA μεταγράφηκε σε cDNA και πραγματοποιήθηκε ποσοτική Real time RT-PCR για τη μέτρηση 84 γονιδίων που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι των TLR (RT^2 Profiler ^{TM} PCR Array, SA Biosciences, USA). Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφηκε παραπάνω. Μετρήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των μορίων σε δύο καταστάσεις (αδιέγερτη και διεγερμένη) και υπολογίστηκε η διαφορά στην έκφραση τους (fold difference) μεταξύ των δύο καταστάσεων με τη χρήση της μεθόδου ΔΔCt.

4.9 Στατιστική ανάλυση

Χρησιμοποιήθηκαν τα στατιστικά προγράμματα GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA, USA) και SPSS 17.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc, Chicago, USA) καθώς και το πρόγραμμα Excel. Για τις ποσοτικές μεταβλητές υπολογίστηκαν οι μέσες και οι διάμεσες τιμές καθώς και η τυπική απόκλιση. Η σημασία των διπαραμετρικών συσχετίσεων μεταξύ των παραγόντων εκτιμήθηκε με τη χρήση του Student’s t-test. Στις περιπτώσεις που οι τιμές δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή πραγματοποιήθηκε ανάλυση Mann-Witney. Για την ανάλυση συσχέτισης υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης Spearman. Όλες οι αναλύσεις έγιναν σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

5. Ομάδα Μελέτης

5.1 Πρότυπο έκφρασης των υποδοχέων TLR και μορίων του σηματοδοτικού μονοπατιού

Δείγματα αίματος συγκεντρώθηκαν από ασθενείς με ΧΛΛ που παρακολουθούνται στην Αιματολογική Κλινική του ΓΝ «Γ. Παπανικολάου» και στο Αιματολογικό Τμήμα του ΓΝ Νίκαιας. Οι ασθενείς είτε δεν είχαν πάρει ποτέ θεραπεία, είτε είχαν σταματήσει τη θεραπεία πριν από τουλάχιστον 6 μήνες. Τα δημογραφικά, κλινικά και βιολογικά δεδομένα για το σύνολο των ασθενών φαίνονται στον Πίνακα 13. Το γονίδιο IGHV1-69 υπέραντιπροσωπεύεται μεταξύ των αμετάλλακτων αναδιατάξεων ενώ το γονίδιο IGHV4-34 υπέραντιπροσωπεύεται μεταξύ των μεταλλαγμένων αναδιατάξεων. Η ομάδα μελέτης περιλάμβανε 30/192 περιπτώσεις που ανήκαν σε στερεότυπα υποσύνολα σύμφωνα με τα καθιερωμένα κριτήρια (Παράρτημα 2).

Πίνακας 13: Δημογραφικά, κλινικά και βιολογικά δεδομένα για το σύνολο των ασθενών

Παράμετρος	Αριθμός
Φύλο	
Αρσενικό	113
Θηλυκό	79
Στάδιο Binet κατά τη διάγνωση	
A	149
B	12
C	4
Έκφραση CD38	
Θετική	57
Αρνητική	120
Έκφραση επιφανειακής Ig	
MD-M	143
G	26
Status μεταλλάξεων γονιδίων IGHV	
Μεταλλαγμένα	124
Αμετάλλακτα	67
Πρόοδος Νόσου	
Προοδευτική	50
Σταθερή	113

5.2 Πρότυπο έκφρασης των υποδοχέων NLR

Η μελέτη της έκφρασης των υποδοχέων NLR πραγματοποιήθηκε σε 50 ασθενείς που ανήκαν σε διαφορετικές υποομάδες σύμφωνα με τα βιολογικά χαρακτηριστικά των κλωνοτυπικών BcR. Συνολικά, 35/50 ασθενείς (70%) έφεραν μεταλλαγμένες αλληλουχίες IGHV, ενώ 15/46 (30%) έφεραν αμετάλλακτες αλληλουχίες IGHV (Παράρτημα 2).

5.3 Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των υποδοχέων TLR και των συνδιεγερτικών μορίων CD80 και CD86 σε πρωτεϊνικό επίπεδο

Η μελέτη της έκφρασης των υποδοχέων TLR σε πρωτεϊνικό επίπεδο πραγματοποιήθηκε σε 30 ασθενείς που ανήκαν σε διαφορετικές υποομάδες ΧΛΛ, σύμφωνα με τα βιολογικά χαρακτηριστικά των BcR τους (Παράρτημα 2).

5.4 Ανάλυση λειτουργικότητας των υποδοχέων TLR και NOD2

Η ανάλυση λειτουργικότητας των υποδοχέων TLR και NOD2 πραγματοποιήθηκε σε 67 περιπτώσεις. Η ομάδα μελέτης περιλάμβανε 19/67 περιπτώσεις που ανήκαν σε στερεότυπα υποσύνολα σύμφωνα με καθιερωμένα κριτήρια. Επιπλέον, σε 28/67 ασθενείς μελετήθηκε το ποσοστό βιωσιμότητας των CD19+ κυττάρων μετά από διέγερση των υποδοχέων TLR και NOD2 (Παράρτημα 2).

6. Αποτελέσματα

6.1 Πρότυπο έκφρασης των υποδοχέων TLR και μορίων του σηματοδοτικού μονοπατιού

Με τη χρήση cDNA μικροσυστοιχιών αναλύθηκε η έκφραση 84 γονιδίων που κωδικοποιούν κρίσιμα μόρια της σηματοδότησης των υποδοχέων TLR. Συγκεκριμένα, οι μικροσυστοιχίες περιείχαν γονίδια που κωδικοποιούν όλους τους υποδοχείς TLR (TLR1-10), εκτός του TLR11 ο οποίος δεν έχει συσχετιστεί με τη ΧΛΛ. Επίσης, αναλύθηκε το μόριο CD180, που ανήκει στην οικογένεια των TLR, και το μόριο SIGIRR, το οποίο είναι αρνητικός ρυθμιστής του μονοπατιού των TLR. Επίσης, αναλύθηκαν οι πέντε κύριοι προσαρμοστές του μονοπατιού που αλληλεπιδρούν έμμεσα ή άμεσα με τους υποδοχείς TLR (MYD88, TICAM1, TICAM2, TIRAP, SARM1). Οι τελεστές εκπροσωπούνταν από μόρια που σχηματίζουν το κύριο σηματοδοτικό σύμπλοκο καθοδικά των προσαρμοστών, όπως τα μόρια IRAK1, IRAK2, TRAF6, TAB1, UBE2N, UBE2V1. Καθοδικά των τελεστών, η σηματοδότηση των TLR εμπλέκεται με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια. Έτσι, η συστοιχία περιείχε όλα τα κύρια μέλη της οικογένειας NF-κB (IKBKB, CHUK, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, NFKBIL1, NFRKB, REL, RELA) και σημαντικά μέλη της οικογένειας των MAP κινασών που αντιπροσωπεύουν όλους τους κλάδους του μονοπατιού (MAP4K4, MAP3K7, MAP3K1, MAP2K3, MAP2K4 MAPK8IP3, ELK1, FOS, JUN, MAPK8) και της σηματοδότησης IRF (IRF1, IRF3). Τέλος, αναλύθηκαν γονίδια για ιντερφερόνες, κυτταροκίνες και τα συνδιεγερτικά μόρια που έχει βρεθεί ότι παράγονται μετά από ενεργοποίηση των υποδοχέων TLR (Παράρτημα 1). Τα 83/84 γονίδια που αναλύθηκαν παρουσίαζαν κανονικές καμπύλες φθορισμού στα περισσότερα δείγματα. Αντίθετα, το γονίδιο PTGS2 δεν παρουσίαζε κανονικές καμπύλες φθορισμού και εξαιρέθηκε από την ανάλυση.

Από τους υποδοχείς που αναλύθηκαν ο TLR7 και το μόριο CD180 παρουσίαζαν τα υψηλότερα επίπεδα mRNA. Η υψηλή έκφραση του TLR7 συνάδει με τα αποτελέσματα μελετών που δείχνουν ότι η διέγερσή του επηρεάζει τα Β λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ επάγοντας την έκφραση συνδιεγερτικών μορίων και καθιστώντας τα έτσι πιο ανοσογόνα[132,151]. Το αποτέλεσμα για την έκφραση του

CD180 επιβεβαιώνει προηγούμενες μελέτες που δείχνουν ότι το μόριο εκφράζεται στα κύτταρα της ΧΛΛ και είναι λειτουργικό σε κάποιες περιπτώσεις[152]. Οι TLR1, TLR6 και TLR10 παρουσίαζαν ενδιάμεσα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με την έκφραση των γονιδίων αναφοράς, ενώ οι TLR2 και TLR9 παρουσίαζαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης. Τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων προσομοιάζουν το πρότυπο έκφρασης Β λεμφοκυττάρων με εμπειρία αντιγόνου[135]. Όσον αφορά τους TLR4 και TLR8, τα επίπεδα έκφρασης ήταν πολύ χαμηλά και σε πολλές περιπτώσεις μη ανιχνεύσιμα. Κατά το αναμενόμενο, οι TLR3 και TLR5 δεν εκφράζονταν στην πλειονότητα των περιπτώσεων (Εικόνα 25, Πινακας 14/ οι συγκεκριμένοι υποδοχείς δεν εκφράζονται στα ανθρώπινα Β λεμφοκύτταρα).

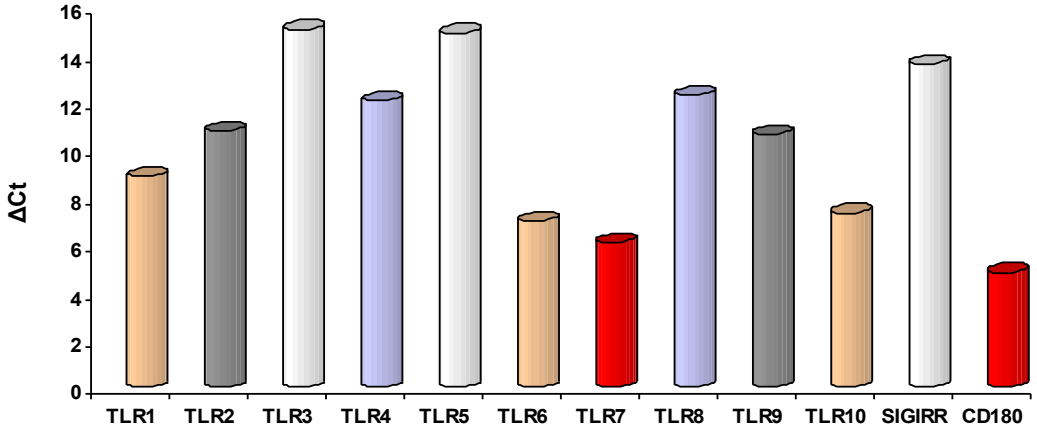
Ο MyD88, ο οποίος είναι ο κύριος προσαρμοστής και χρησιμοποιείται από όλους τους TLR που εκφράζονται στη ΧΛΛ, παρουσίαζε υψηλή έκφραση. Το ίδιο συνέβαινε και με τον TICAM1 ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη σηματοδότηση μέσω TLR3 και TLR4. Η έκφραση των ενδιάμεσων προσαρμογέων TICAM2 και TIRAP που επιστρατεύουν τους MyD88 και TICAM1 στους υποδοχείς TLR4 και TLR3 ήταν χαμηλή και αυτό συνάδει με την πολύ χαμηλή έκφραση των TLR3 και TLR4. Τέλος, η έκφραση του SARM1 (άγνωστη λειτουργία) ήταν ενδιάμεση. Όλα τα παραπάνω δείχνουν ότι το μονοπάτι καθοδικά των υποδοχέων που εκφράζονται στα κύτταρα της ΧΛΛ είναι ικανό για σηματοδότηση.

Οι τελεστές, που ρυθμίζουν τη λειτουργία του μονοπατιού παρουσίαζαν διακυμάνσεις στα επίπεδα έκφρασης και φαίνεται ότι από το σημείο αυτό αρχίζει να διαφοροποιείται η σηματοδότηση καθοδικά των υποδοχέων. Συγκεκριμένα, οι TRAF6 και UBE2N παρουσίαζαν υψηλή έκφραση, ενώ οι IRAK1, IRAK2 και TAB1 ενδιάμεση. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η IRAK1 παρουσίαζε μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των ασθενών (μέση τιμή ΔCt ± τυπική απόκλιση: 8.6±1.74).

Όσον αφορά το μονοπάτι NF-κB, τα μόρια CHUK, IKBKB (IKK, inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase) εμφάνιζαν υψηλή έκφραση, το ίδιο όμως και ο αναστολέας NFKBIA. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η έκφραση του NFKBIL1, ο οποίος θεωρείται ότι εμποδίζει την ενεργοποίηση του NF-κB από τους TLR2 και TLR4 παρουσίαζε μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των ασθενών (μέση τιμή ΔCt ± τυπική απόκλιση: 8.9±2.37). Τα γονίδια για τις τέσσερις υπομονάδες του NF-κB (NFKB1, NFKB2, RELA και REL) που ενεργοποιούνται μετά τη φωσφορυλίωση

του NFKBIA από τις IKK, παρουσίαζαν υψηλή και ενδιάμεση έκφραση, ένδειξη ότι το μονοπάτι είναι λειτουργικό. Αντίστοιχα ήταν και τα αποτελέσματα για τα μέλη της οικογένειας MAPK, εκφραζόταν δηλαδή σε υψηλά και ενδιάμεσα επίπεδα και επίσης παρουσίαζαν διακυμάνσεις μεταξύ των ασθενών. Συγκεκριμένα, μεγάλες διακυμάνσεις παρουσίασαν η MAP4K4, που θεωρείται ότι ενεργοποιεί τον IKBKB, (μέση τιμή ΔCt value ± τυπική απόκλιση: 7.66±2.09) και οι JUN καI FOS.

Οι ιντερλευκίνες (IL12A, IL6, IL10, IL8) και ο TNF παρουσίαζαν ενδιάμεση ή χαμηλή έκφραση αλλά εμφάνιζαν μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των ασθενών (IL6: μέση τιμή ΔCt ± τυπική απόκλιση:13.56±2.46 και IL8: μέση τιμή± τυπική απόκλιση 13.76±2.16). Το ίδιο συνέβαινε και με τα συνδιεγερτικά μόρια CD80 (χαμηλή έκφραση) και CD86 (ενδιάμεση έκφραση) (μέση τιμή ΔCt ± SD; 11.47±2.51 και 7.12±2.23, αντιστοίχως). Το γεγονός αυτό φαίνεται να αντικατοπτρίζει το αποτέλεσμα των διαφορικά εκφραζόμενων μορίων, αφού το τελικό αποτέλεσμα, δηλαδή η ενεργοποίηση των τελικών μορίων-στόχων, εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια (Πίνακας 14).



Εικόνα 25: Πρότυπο έκφρασης των υποδοχέων TLR στην παρούσα μελέτη. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η μέση τιμή των τιμών ΔCt όλων των περιπτώσεων. Τα διαφορετικά χρώματα αντιπροσωπεύουν τα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με τα γονίδια αναφοράς (κόκκινο: υψηλά, ροζ: ενδιάμεσα, γκρι: χαμηλά, μπλε: πολύ χαμηλά, λευκά: αρνητικά). Εξ ορισμού (βλέπε «Υλικό και Μέθοδοι»), οι τιμές ΔCt είναι αντιστρόφως ανάλογες με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων.

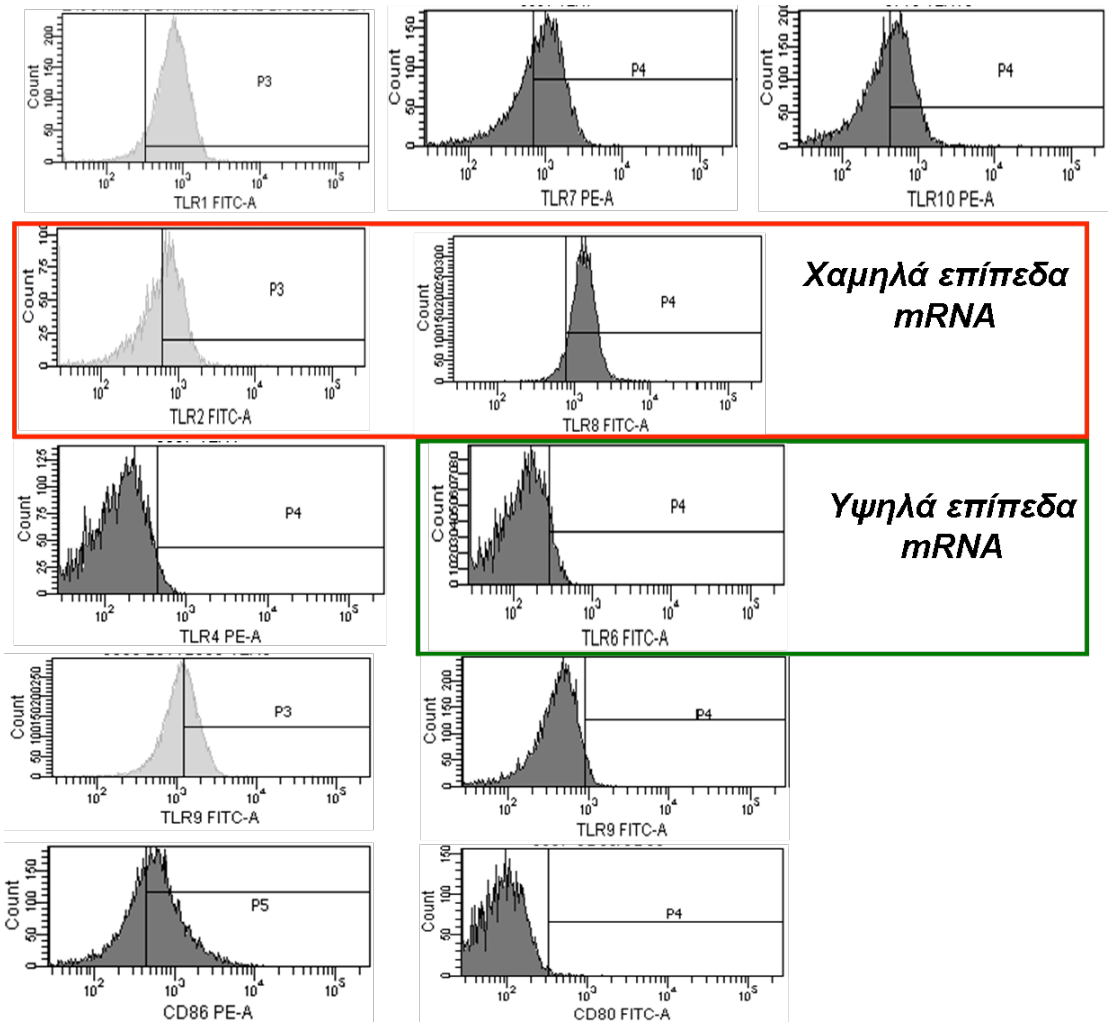
Πίνακας 14. Επίπεδα έκφρασης mRNA των 83 γονιδίων που αναλύθηκαν.

Γονίδιο	Επίπεδα Έκφρασης	Γονίδιο	Επίπεδα Έκφρασης
Υποδοχείς		**Μονοπάτια NF-κB/JNK/p38**	
CD180	ΥΨΗΛΑ	CHUK	ΥΨΗΛΑ
TLR7	ΥΨΗΛΑ	IKBKB	ΥΨΗΛΑ
TLR1	ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ	JUN*	ΥΨΗΛΑ
TLR6	ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ	MAP2K3	ΥΨΗΛΑ
TLR10	ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ	MAP3K1	ΥΨΗΛΑ
TLR2	ΧΑΜΗΛΑ	MAPK8	ΥΨΗΛΑ
TLR4*	ΧΑΜΗΛΑ	NFKB1	ΥΨΗΛΑ
TLR8*	ΧΑΜΗΛΑ	NFKBIA	ΥΨΗΛΑ
TLR9	ΧΑΜΗΛΑ	REL	ΥΨΗΛΑ
SIGIRR	ΑΡΝΗΤΙΚΑ	RELA	ΥΨΗΛΑ
TLR3	ΑΡΝΗΤΙΚΑ	ELK1	ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ
TLR5	ΑΡΝΗΤΙΚΑ	FOS*	ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ
Σηματοδοτικό Σύμπλοκο		MAP2K4	ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ
HMGB1	ΥΨΗΛΑ	MAP4K4*	ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ
HRAS	ΥΨΗΛΑ	NFKB2	ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ
HSPA1A	ΥΨΗΛΑ	NFKBIL1	ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ
HSPD1	ΥΨΗΛΑ	NFRKB	ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ
LY86	ΥΨΗΛΑ	CLEC4E	ΑΡΝΗΤΙΚΑ
MAPK8IP3	ΥΨΗΛΑ	**Κυτταροκίνες και συνδιεγερτικά μόρια**	
MYD88	ΥΨΗΛΑ	CD86*	ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ
PELI1	ΥΨΗΛΑ	LTA	ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ
RIPK2	ΥΨΗΛΑ	TNF	ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ
Γονίδιο	**Επίπεδα Έκφρασης**	**Γονίδιο**	**Επίπεδα Έκφρασης**
TRAF6	ΥΨΗΛΑ	CD80*	ΧΑΜΗΛΑ
BTK	ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ	IL1B*	ΧΑΜΗΛΑ
IRAK1	ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ	IL8*	ΧΑΜΗΛΑ
IRAK2	ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ	CCL2	ΑΡΝΗΤΙΚΑ
LY96	ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ	CSF2	ΑΡΝΗΤΙΚΑ
SARM1	ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ	CSF3	ΑΡΝΗΤΙΚΑ
TOLLIP	ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ	IL10*	ΑΡΝΗΤΙΚΑ
TICAM2	ΧΑΜΗΛΑ	IL1A	ΑΡΝΗΤΙΚΑ
TIRAP	ΧΑΜΗΛΑ	IL2	ΑΡΝΗΤΙΚΑ
CD14	ΑΡΝΗΤΙΚΑ	IL6*	ΑΡΝΗΤΙΚΑ
Τελεστές		TNFRSF1A	ΑΡΝΗΤΙΚΑ
EIF2AK2	ΥΨΗΛΑ	**Μονοπάτι IRF**	
NR2C2	ΥΨΗΛΑ	IRF1	ΥΨΗΛΑ
PRKRA	ΥΨΗΛΑ	IRF3	ΥΨΗΛΑ
UBE2N	ΥΨΗΛΑ	TBK1	ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ
CASP8	ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ	IFNG*	ΧΑΜΗΛΑ
FADD	ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ	CXCL10	ΑΡΝΗΤΙΚΑ
MAP3K7	ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ	IFNA1	ΑΡΝΗΤΙΚΑ
PPARA	ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ	IFNB1	ΑΡΝΗΤΙΚΑ
TAB1	ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ		
ECSIT	ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ		
UBE2V1	ΧΑΜΗΛΑ		

*Γονίδια με σημαντικές διακυμάνσεις έκφρασης μεταξύ των ασθενών που αναλύθηκαν.

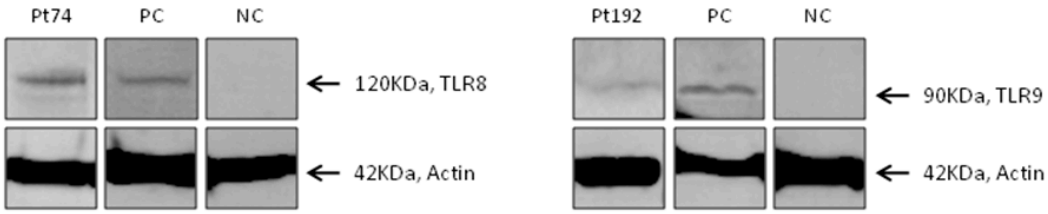
6.2 Προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των υποδοχέων TLR και των συνδιεγερτικών μορίων CD80 και CD86 σε πρωτεϊνικό επίπεδο

Για να διερευνήσουμε αν τα επίπεδα mRNA αντικατοπτρίζουν και τα πρωτεϊνικά επίπεδα των υποδοχέων και αντιπροσωπευτικών συνδιεγερτικών μορίων, αναλύσαμε με κυτταρομετρία ροής την πρωτεϊνική έκφραση των υποδοχέων TLR που εκφραζόταν σε επίπεδο mRNA έστω και σε χαμηλά επίπεδα όπως επίσης και την έκφραση των CD80 και CD86. Με όριο θετικότητας 5% οι υποδοχείς TLR1, TLR7, TLR10 εκφραζόταν σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις, σε αντιστοιχία με τα επίπεδα mRNA. Ο υποδοχέας TLR6 εκφραζόταν σε 20/30 περιπτώσεις αλλά, παρότι σε επίπεδο mRNA η έκφρασή του ήταν υψηλή, στο μεγαλύτερο ποσοστό των περιπτώσεων μόνο το 5-10% των κυττάρων του νεοπλασματικού κλώνου εξέφραζαν την πρωτεΐνη. Αντίθετα, οι TLR2 και TLR8 εκφραζόταν σε πρωτεϊνικό επίπεδο παρότι που σε επίπεδο mRNA παρουσίαζαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης. Φαίνεται ότι στις περιπτώσεις αυτές συμβαίνει μετά-μεταγραφική ρύθμιση. Αναφορικά με τον TLR9, 8/30 (26.6%) περιπτώσεις εξέφραζαν τον TLR9 ωστόσο, μόνο σε 3/30 περιπτώσεις το ποσοστό των κυττάρων που τον εξέφραζε ξεπερνούσε το 10%. Τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του TLR9 τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο παρουσιάζουν ενδιαφέρον ιδίως αν συνεκτιμηθεί το γεγονός ότι η διέγερση μέσω του TLR9 χρησιμοποιείται ευρέως για την ενεργοποίηση των κυττάρων της ΧΛΛ με κυριότερο παράδειγμα τη χρήση των ολιγονουκεοτιδίων CpG για τη λήψη μεταφάσεων στην κλασική κυτταρογενετική ανάλυση. Συνεπώς, είναι εύλογο να υποθέσει κανείς ότι η επίδραση του συγκεκριμένου προσδέτη ίσως μεσολαβείται και από άλλα είδη υποδοχέων. Τέλος, όσον αφορά τα συνδιεγερτικά μόρια, το CD86 εκφραζόταν στην πλειονότητα των περιπτώσεων που μελετήθηκαν σε αντίθεση με το CD80 που δεν εκφραζόταν σε καμία περίπτωση. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τα επίπεδα mRNA των συγκεκριμένων μορίων (Εικόνα 26).



Εικόνα 26: Πρότυπο πρωτεϊνικής έκφρασης των TLR και των μορίων CD80 και CD86: ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. Στα ιστογράμματα παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές περιπτώσεις για κάθε υποδοχέα.

Η πρωτεϊνική έκφραση των TLR1, TLR2, TLR8 και TLR9 προσδιορίστηκε επίσης και με ανοσοαποτύπωση Western (Εικόνα 27). Τα αποτελέσματα ήταν αντίστοιχα με αυτά της κυτταρομετρίας ροής. Οι TLR1 και TLR2 ήταν θετικοί σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν, ο TLR8 ήταν θετικός σε 43/59 περιπτώσεις (72.7%), ενώ ο TLR9 σε 18/59 (30.5%) περιπτώσεις. Και με αυτή την τεχνική, ο λόγος της έντασης της ζώνης του TLR9 προς την αντίστοιχη της β-ακτίνης (πρωτεΐνη αναφοράς) ήταν πολύ μικρός σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν.



Εικόνα 27: **Πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης των TLR8 και TLR9 σε δύο χαρακτηριστικές περιπτώσεις.**

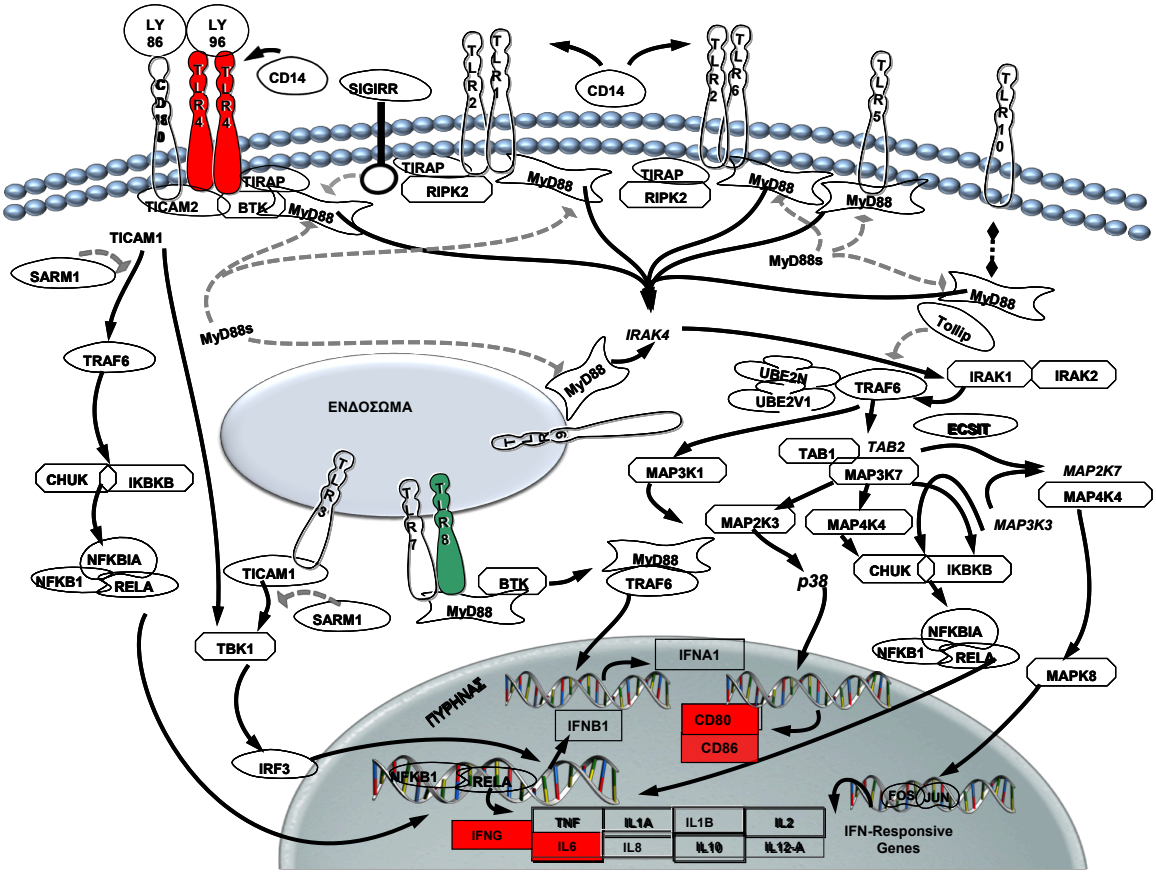
6.3 Συσχέτιση των προτύπων γονιδιακής έκφρασης με ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά του BcR

Με δεδομένο ότι η ΧΛΛ διακρίνεται σε υποομάδες που ορίζονται με βάση τα μοριακά χαρακτηριστικά του BcR και εμφανίζουν διαφορετικά κλινικά και βιολογικά χαρακτηριστικά (π.χ. σηματοδότηση) καθώς και ότι οι TLR έχουν συν-διεγερτική δράση στον BcR, στη συνέχεια αναζητήθηκαν πιθανές διαφορές στα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης των υποδοχέων TLR και των μορίων του σηματοδοτικού μονοπατιού.

6.3.1 Status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV

Η σύγκριση των περιπτώσεων που φέρουν μεταλλαγμένες αλληλουχίες IGHV (Μ-ΧΛΛ) έναντι εκείνων που φέρουν αμετάλλακτες αλληλουχίες IGHV (Α-ΧΛΛ) (124 και 67 περιπτώσεις, αντιστοίχως) αποκάλυψε στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση συγκεκριμένων μορίων. Συγκεκριμένα, τα μόρια CD80, CD86, IL6, IFNG και TLR4 υπερεκφράζονταν, ενώ τα μόρια TLR8 και NFKBIL1 υποεκφράζονταν στην Μ-ΧΛΛ έναντι της Α-ΧΛΛ (Εικόνα 28). Η μεγαλύτερη διαφορά καταγράφηκε για το μόριο CD86 το οποίο παρουσίαζε παρόμοια διαφορά και σε πρωτεϊνικό επίπεδο (Μ-ΧΛΛ: μέση τιμή: 42%, εύρος: 9.9 - 94.2% Α-ΧΛΛ: μέση τιμή: 18%, εύρος: 5.3 - 51.1%, $p<0.01$). Η υπερέκφραση των συνδιεγερτικών μορίων CD80 και CD86 στη Μ-ΧΛΛ υποδηλώνει ότι τα κύτταρα αυτά πιθανόν είναι πιο ανοσογόνα από τα ατνίστοιχα της Α-ΧΛΛ, υπόθεση που συνάδει με την καλύτερη πρόγνωση των

ασθενών με Μ-ΧΛΛ. Η IL6 αναστέλλει την ανάπτυξη των Β λεμφοκυττάρων της ΧΛΛ παρεμποδίζοντας την δράση του TNF[153]. Η έκφραση της IL6 στα κύτταρα της ΧΛΛ είναι γενικά χαμηλή και η υπερέκφρασή της στη Μ-ΧΛΛ υποδηλώνει έναν πιθανό μηχανισμό για την αναστολή της αναπτυξής τους.Η δράση του NFKBIL1 δεν είναι ακόμα σαφήςη, φαίνεται όμως να λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής του NF-κB.

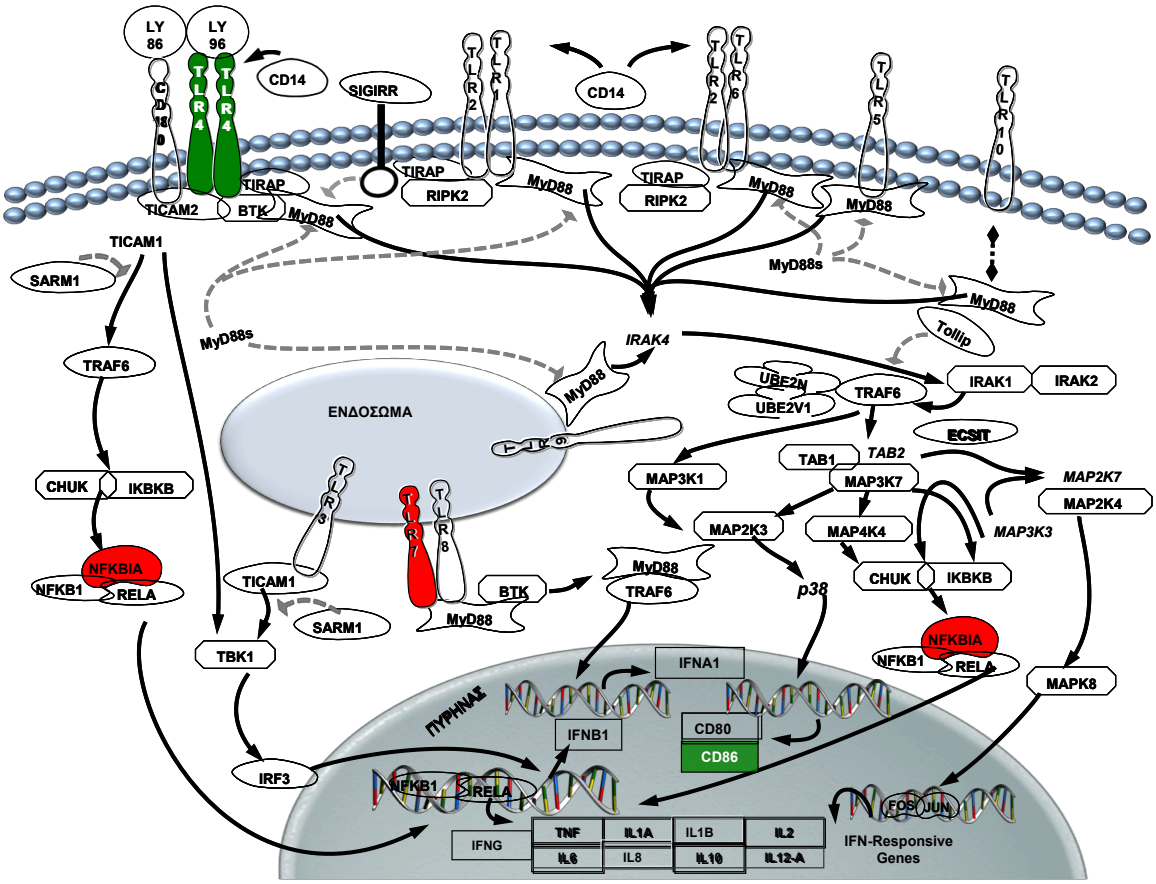


Εικόνα 28: Περιπτώσεις ΧΛΛ με διαφορετικό status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης των υποδοχέων TLR και των μορίων του σηματοδοτικού μονοπατιού. Παρουσιάζονται τα πιο σημαντικά μόρια του σηματοδοτικού μονοπατιού και με διαφορετικά χρώματα επισημαίνονται τα μόρια με διαφορετική έκφραση σε ασθενείς με διαφορετικό status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV (Κόκκινο: υπερέκφραση πράσινο: υποέκφραση στις «μεταλλαγμένες» έναντι των αμετάλλακτων περιπτώσεων ΧΛΛ). *Προσαρμοσμένο από http://www.sabiosciences.com/pathway.*

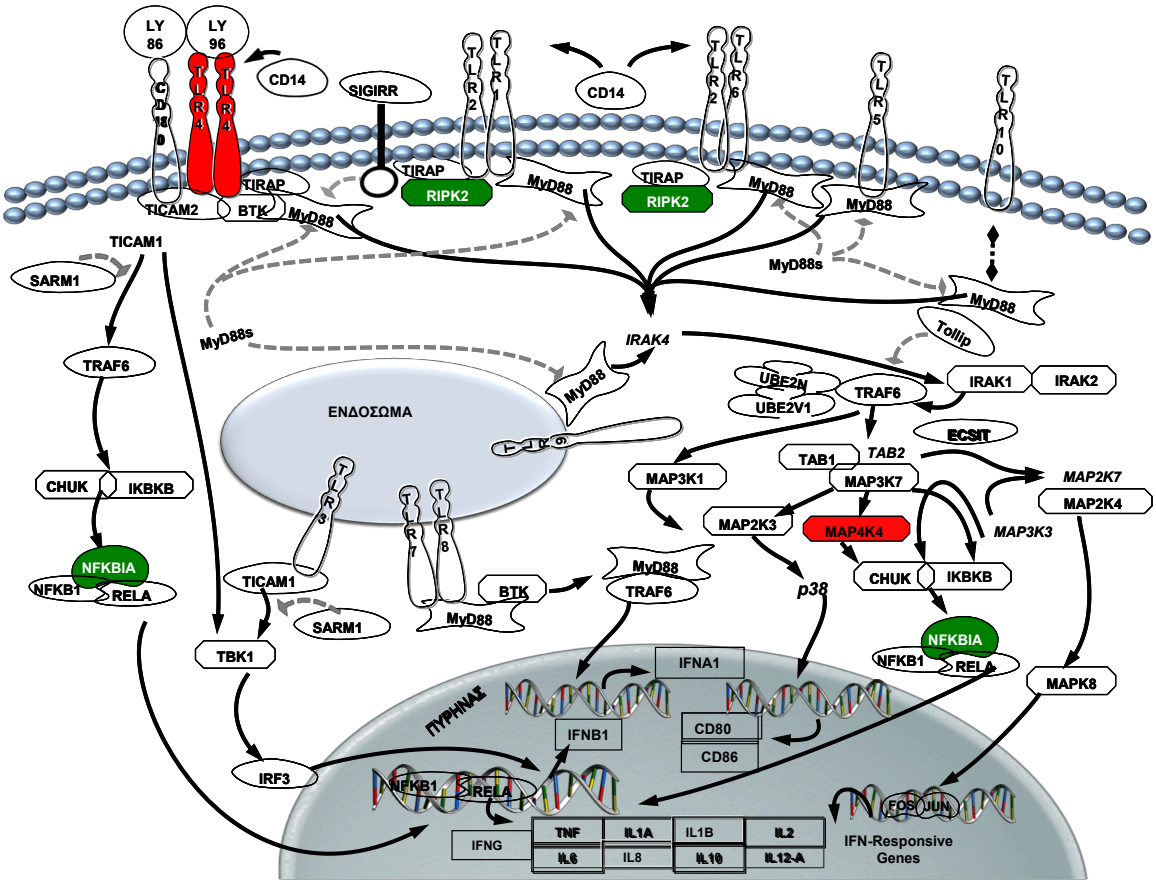
6.3.2 Στερεοτυπία του Β κυτταρικού υποδοχέα

Συγκρίθηκαν περιπτώσεις που ανήκαν σε τρία διαφορετικά στερεότυπα υποσύνολα (στερεότυπο υποσύνολο #4, IGHV4-34/1GKV2-30 BcR: 10 περιπτώσεις, στερεότυπο υποσύνολο #1, IGHV1/5/7-IGKV1(D)-39 BcR: 10 περιπτώσεις, στερεότυπο υποσύνολο #8, IGHV4-39/IGKV1(D)-39 BcR: 4 περιπτώσεις). Οι ασθενείς του στερεότυπου υποσυνόλου #4 φέρουν μεταλλαγμένους BcR και έχουν ήπια κλινική πορεία. Οι ασθενείς των στερεότυπων υποσυνόλων #1 και #8 φέρουν αμετάλλακτους BcR και εμφανίζουν επιθετική νόσο. Σε όλες τις συγκρίσεις βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση συγκεκριμένων μορίων: (i) υπερέκφραση των μορίων TLR7 και NFKBIA και υποέκφραση των μορίων CD86 και TLR4 στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσυνόλου #1 έναντι του στερεότυπου υποσυνόλου #4 (Εικόνα 29). Η υψηλότερη έκφραση του CD86 και η χαμηλότερη έκφραση του TLR7 στο στερεότυπο υποσύνολο #4 είναι ευρήματα ενδεικτικά κυττάρων που έχουν καταστεί ανεργικά μέσω του TLR7 λόγω προηγούμενης in vivo επαφής τους με κάποιον προσδέτη του TLR7. Η υπερέκφραση του NFKBIA, αναστολέα του NF-κB, στο στερεότυπο υποσύνολο #1, πιθανόν συνδέεται με τη χαμηλή έκφραση του CD86, αφού έχει βρεθεί ότι ο NF-κB ρυθμίζει την έκφραση του CD86 σε άλλους κυτταρικούς τύπους π.χ. δενδριτικά κύτταρα. (ii) υπερέκφραση ων μορίων TLR4 και MAP4K4 και υποέκφραση των μορίων NFKBIA και RIPK2 στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσυνόλου #8 έναντι του στερεότυπου υποσυνόλου #1 (Εικόνα 30)

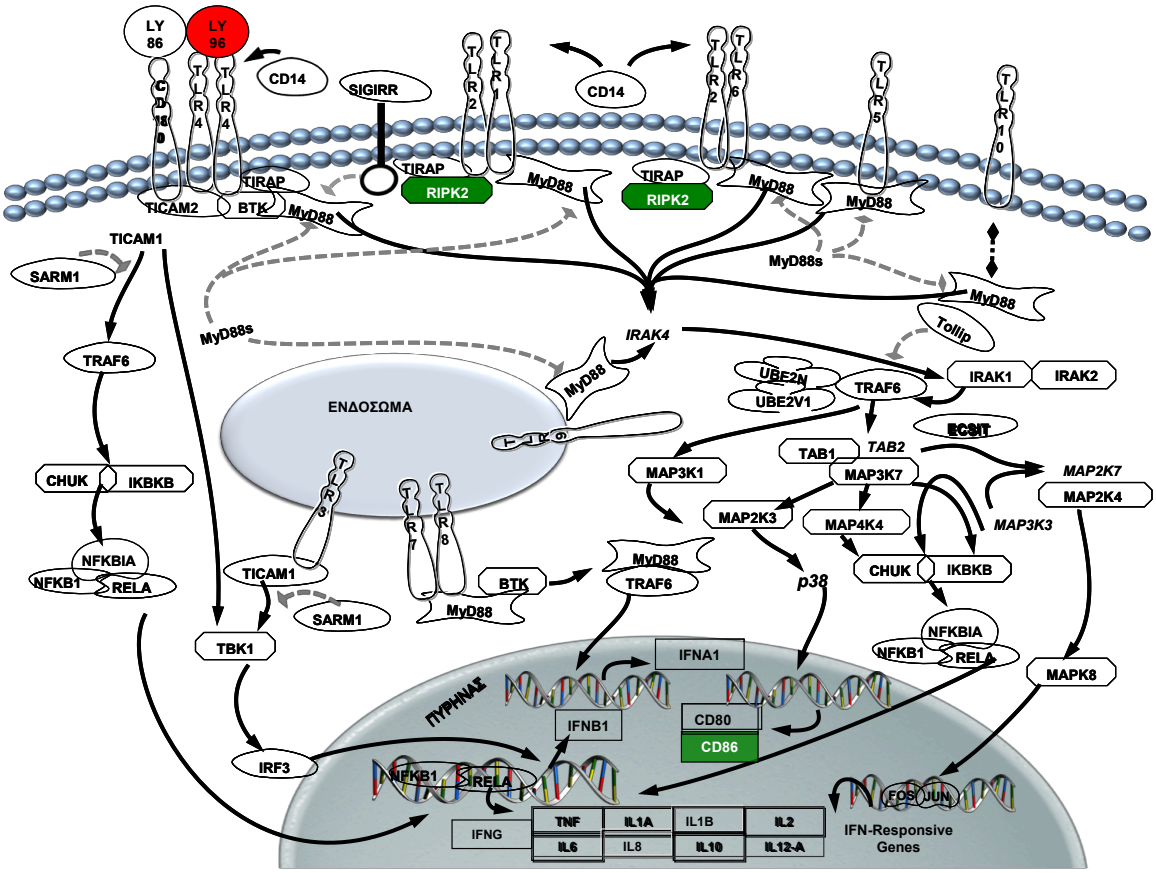
(iii) υπερέκφραση του μορίου LY96 και υποέκφραση των μορίων RIPK2 και CD86 στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσυνόλου #8 έναντι του στερεότυπου υποσυνόλου #4 (Εικόνα 31). Το στερεότυπο υποσύνολο #8 δεν έχει μελετηθεί εκτενώς και τα βιολογικά χαρακτηριστικά του δεν είναι ακόμα γνωστά. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης μπορεί να αξιοποιηθούν υπό το πρίσμα μελλοντικών ερευνών. Συνολικά, οι διαφορές αυτές δείχνουν ότι οι ασθενείς που ανήκουν σε διαφορετικά στερεότυπα υποσύνολα εμφανίζουν διαφορές στη σηματοδότηση μέσω των υποδοχέων TLR που αντικατοπτρίζονται στη διαφορετική κλινική τους πορεία.



Εικόνα 29: Ασθενείς με ΧΛΛ με διαφορετικούς στερεότυπους BcR εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης των υποδοχέων TLR και των μορίων του σηματοδοτικού μονοπατιού. Παρουσιάζονται τα πιο σημαντικά μόρια του σηματοδοτικού μονοπατιού και με διαφορετικά χρώματα επισημαίνονται τα μόρια με διαφορετική έκφραση μεταξύ ασθενών που ανήκουν σε διαφορετικά υποσύνολα (Κόκκινο: υπέρέκφραση πράσινο: υπόέκφραση στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσυνόλου #1 έναντι του στερεότυπου υποσυνόλου #4). *Προσαρμοσμένο από http://www.sabiosciences.com/pathway*



Εικόνα 30: Ασθενείς με ΧΛΛ με διαφορετικούς στερεότυπους BcR εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης των υποδοχέων TLR και των μορίων του σηματοδοτικού μονοπατιού. Παρουσιάζονται τα πιο σημαντικά μόρια του σηματοδοτικού μονοπατιού και με διαφορετικά χρώματα επισημαίνονται τα μόρια με διαφορετική έκφραση μεταξύ ασθενών που ανήκουν σε διαφορετικά υποσύνολα (Κόκκινο: υπερέκφραση πράσινο: υποέκφραση στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσυνόλου #8 έναντι του στερεότυπου υποσυνόλου #1). *Προσαρμοσμένο από http://www.sabiosciences.com/pathway*

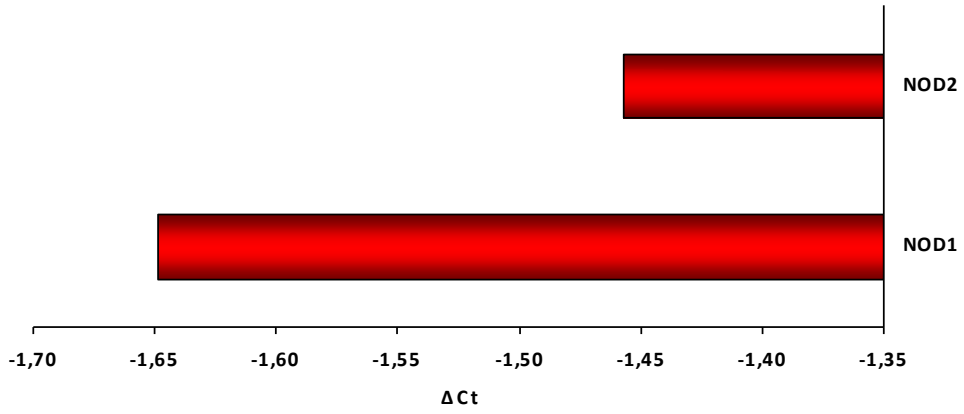


Εικόνα 31: Ασθενείς με ΧΛΛ με διαφορετικούς στερεότυπους BcR εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης των υποδοχέων TLR και των μορίων του σηματοδοτικού μονοπατιού. Παρουσιάζονται τα πιο σημαντικά μόρια του σηματοδοτικού μονοπατιού και με διαφορετικά χρώματα επισημαίνονται τα μόρια με διαφορετική έκφραση μεταξύ ασθενών που ανήκουν σε διαφορετικά υποσύνολα (Κόκκινο: υπερέκφραση πράσινο: υποέκφραση στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσυνόλου #8 έναντι του στερεότυπου υποσυνόλου #4). *Προσαρμοσμένο από http://www.sabiosciences.com/pathway*

6.4 Πρότυπο έκφρασης των υποδοχέων NOD

Εκτός από τους υποδοχείς TLR, τα Β λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ εκφράζουν και τους υποδοχείς NOD1 και NOD2[135]. Στην παρούσα μελέτη, προσδιορίστηκαν με RT-PCR τα επίπεδα mRNA των υποδοχέων NOD1 και NOD2 που είναι μέλη της οικογένειας των υποδοχέων NLR και αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς TLR. Στην Εικόνα 32 απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων NOD στο σύνολο των

περιπτώσεων που αναλύθηκαν. Φαίνεται ότι και οι δύο υποδοχείς εκφράζονται αλλά τα επίπεδα έκφρασής τους διαφέρουν. Συγκεκριμένα, ο υποδοχέας NOD1 εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με τον υποδοχέα NOD2. Η συγκριτική ανάλυση της έκφρασης των υποδοχέων NOD σε διάφορες υποομάδες ασθενών με ΧΛΛ δεν αποκάλυψε στατιστικά σημαντικές διαφορές.



Εικόνα 32: Διαγραμματική απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης των υποδοχέων NOD. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η μέση τιμή των τιμών ΔCt του συνόλου των περιπτώσεων που αναλύθηκαν. Εξ ορισμού (βλέπε «Υλικό και Μέθοδοι»), οι τιμές ΔCt είναι αντιστρόφως ανάλογες με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων.

6.5 Ανάλυση λειτουργικότητας των υποδοχέων TLR και NOD2 στη ΧΛΛ

Το επόμενο ερώτημα ήταν εάν οι υποδοχείς TLR που εκφραζόταν σε επίπεδο mRNA και μεταφραζόταν σε πρωτεΐνη ήταν λειτουργικοί στα Β λεμφοκύτταρα των ασθενών με ΧΛΛ. Οι παρατηρούμενες διαφορές έκφρασης μεταξύ υποομάδων ασθενών με ΧΛΛ παρακίνησαν επίσης μελέτες με αντικείμενο τη λειτουργικότητα των TLR4 και TLR8, παρότι, γενικά, η έκφρασή τους τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε πρωτεϊνικό ήταν χαμηλή. Επίσης, μελετήθηκε η λειτουργικότητα του υποδοχέα NOD2 για τον οποίο υπάρχει διαθέσιμος προσδέτης. Έχει βρεθεί ότι η διέγερση των υποδοχέων TLR και NOD2 στα κύτταρα της ΧΛΛ επάγει την έκφραση πολλών μορίων

όπως CD80, CD86, CD25, CD83, CD54[132,135]. Η αύξηση της έκφρασης όλων αυτών των δεικτών δείχνει ότι η διέγερση μέσω TLR καθιστά τα κύτταρα της ΧΛΛ πιο ανοσογόνα και συνεπώς πιο ευαίσθητα στη δράση των Τ κυτταροτοξικών κυττάρων[132]. Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκε η έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων CD25 και CD86 μετά από διέγερση των υποδοχέων TLR και NOD2 σε 67 ασθενείς με ΧΛΛ. Επιλέχθηκε το συνδιεγερτικό μόριο CD86, επειδή έχει βρεθεί ότι είναι ο πιο αξιόπιστος δείκτης για τη μέτρηση της ενεργοποίησης των Β λεμφοκυττάρων της ΧΛΛ, ακόμα και όταν η έκφραση των TLR είναι χαμηλή[154]. Τα Β λεμφοκύτταρα που εκφράζουν CD25 (α αλυσίδα του υποδοχέα της IL2) φαίνεται ότι είναι πιο ικανά στην ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων. Επίσης, η διέγερση μέσω TLR επάγει την έκφραση του CD25 και έτσι προσδίδει στα Β λεμφοκύτταρα την ικανότητα ενεργοποίησης Τ λεμφοκυττάρων[155]. Επιπλέον, μελετήθηκε η βιωσιμότητα των CD19+ ΧΛΛ κυττάρων μετά από διέγερση των υποδοχέων TLR και NOD2 σε 30 περιπτώσεις ΧΛΛ, θέμα για το οποίο προηγούμενες μελέτες έδωσαν αντικρουόμενα αποτελέσματα[131,138,139].

6.5.1 Επαγωγή της έκφρασης συνδιεγερτικών μορίων

Τα CD19+ κύτταρα της ΧΛΛ καλλιεργήθηκαν για 12 ώρες μετά από διέγερση με τον κατάλληλο προσδέτη για κάθε υποδοχέα ή χωρίς διέγερση (αδιέγερτο control). Σε κάθε περίπτωση και για κάθε προσδέτη το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων δεν διέφερε από το αντίστοιχο του αδιέγερτου control πάνω από 10%, εύρημα που σημαίνει ότι κανένας προσδέτης δεν ήταν τοξικός για τα κύτταρα. Με όριο θετικότητας το 20%, στην αδιέγερτη κατάσταση, τα μόρια CD25 και CD86, εκφραζόταν στις 35/67 περιπτώσεις (52.2%) και 20/67 περιπτώσεις (30%), αντιστοίχως.

Στη συνέχεια, σε κάθε περίπτωση και για κάθε διέγερση μετρήθηκε το ποσοστό έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων, από το οποίο αφαιρέθηκε το ποσοστό έκφρασής του αδιέγερτου control. Διαφορές >10% θεωρηθήκαν σημαντικές. Στο σύνολο των ασθενών παρατηρήθηκε:

(i) επαγωγή της έκφρασης του CD25 σε όλες τις περιπτώσεις εκτός από μια (εύρος: 10.7-94.9%; μέση τιμή 56.1%) και του CD86 σε 44/67 περιπτώσεις (εύρος: 11.3-82.6%; μέση τιμή 43.4%) μετά από διέγερση του TLR9 με CpG ολιγονουκλεοτίδια

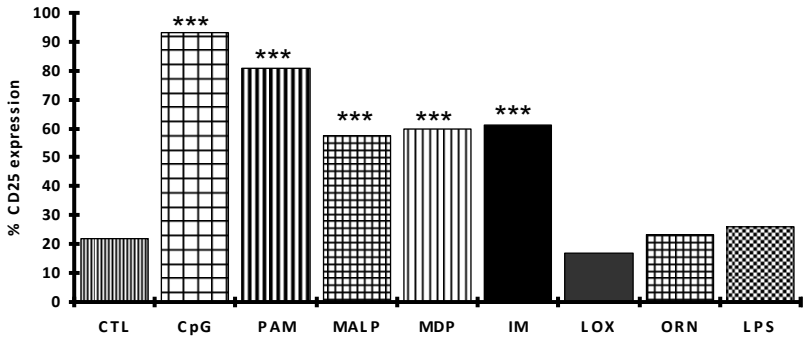
(ii) επαγωγή της έκφρασης των CD25 και CD86 στις περισσότερες περιπτώσεις, μετά από διέγερση των ετεροδιμερών TLR1/2 και TLR2/6 με τους προσδέτες τους Pam3CSK4 and MALP-2, αντιστοίχως. Συγκεκριμένα, η έκφραση του CD25 αυξήθηκε σε 57/67 περιπτώσεις (εύρος: 10.4-89.4%; μέση τιμή 48.4%) και του CD86 σε 49/67 περιπτώσεις (εύρος: 10.5-74.6%; μέση τιμή 41.2%) μετά από διέγερση του TLR1/2. Η διέγερση του ετεροδιμερούς TLR2/6 είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης του CD25 σε 55/67 περιπτώσεις (εύρος 10.8-80.1%; μέση τιμή 35%), και του CD86 σε 44/67 περιπτώσεις (εύρος 11.2-70.9%; μέση τιμή 29.7%).

(iii) επαγωγή της έκφρασης του CD25 στις περισσότερες περιπτώσεις (55/67, εύρος :10.9-72.1%; μέση τιμή 31.3%) και του CD86 περίπου στις μισές περιπτώσεις (35/67, εύρος: 10.3-56.3%; μέση τιμή 26.7%) μετά από διέγερση του NOD2 με τον προσδέτη του MDP.

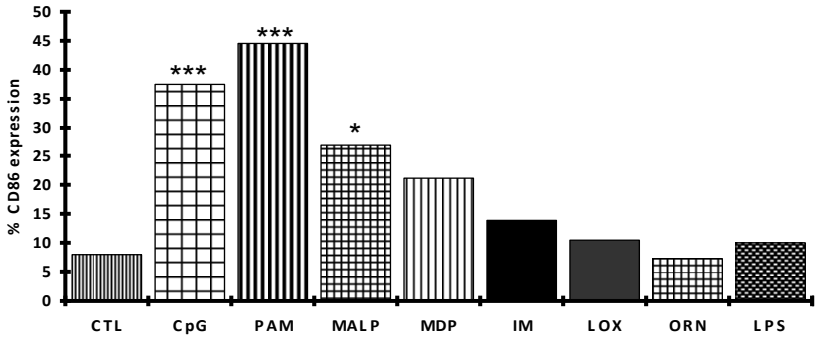
Στην περίπτωση του TLR7 χρησιμοποιήθηκαν δύο προσδέτες. Η Loxoribine (Lox) που είναι ένα ανάλογο γουανοσίνης, μικρού μοριακού βάρους, και ενεργοποιεί τα κύτταρα μέσω του TLR7 με αποτέλεσμα την παραγωγή κυτταροκινών και το Imiquimod (Im), ένα μικρό συνθετικό μόριο με αντιική δράση που δρα μέσω του TLR7. Οι δύο προσδέτες είχαν διαφορετική επίδραση στα κύτταρα της ΧΛΛ. Συγκεκριμένα, η διέγερση του TLR7 με Im οδήγησε σε επαγωγή της έκφρασης του CD25 σε μία υπολογίσιμη ομάδα ασθενών (39/67 περιπτώσεις/ εύρος: 10.1-93.7%; μέση τιμή 41.1%), ενώ η Lox δεν επηρέασε τα κύτταρα σχεδόν καθόλου. Επίσης, μόνο το Im οδήγησε σε επαγωγή της έκφρασης του CD86 σε 21/67 περιπτώσεις (εύρος: 10.3-45.3%; μέση τιμή 22.4%).

Η διέγερση μέσω του TLR4 με λιποπολυσακχαρίτη (LPS) και του TLR8 με συνθετικά μονόκλωνα ριβονουκλεοτίδια (ORN 06) δεν είχε καμία επίδραση στην έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων στο σύνολο των ασθενών που μελετήθηκαν (Εικόνα 33). Συνολικά, οι TLR1/2, TLR2/6, TLR7, TLR9 και NOD2 είναι λειτουργικοί στα κύτταρα της ΧΛΛ, αφού επάγουν την έκφραση των δεικτών ενεργοποίησης CD25 και CD86, ενώ οι TLR4 και TLR8 δεν είναι λειτουργικοί, αποτέλεσμα που συμφωνεί με τα πολύ χαμηλά έως μηδενικά επίπεδα έκφρασής τους.

A.

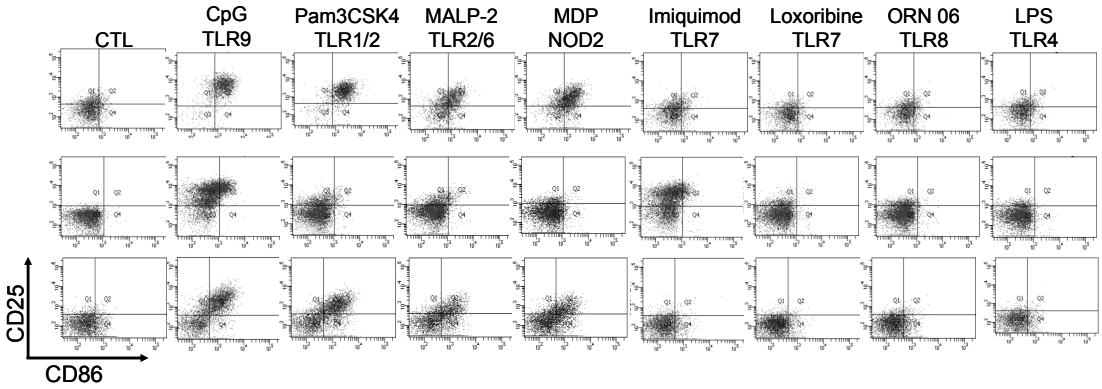


B.

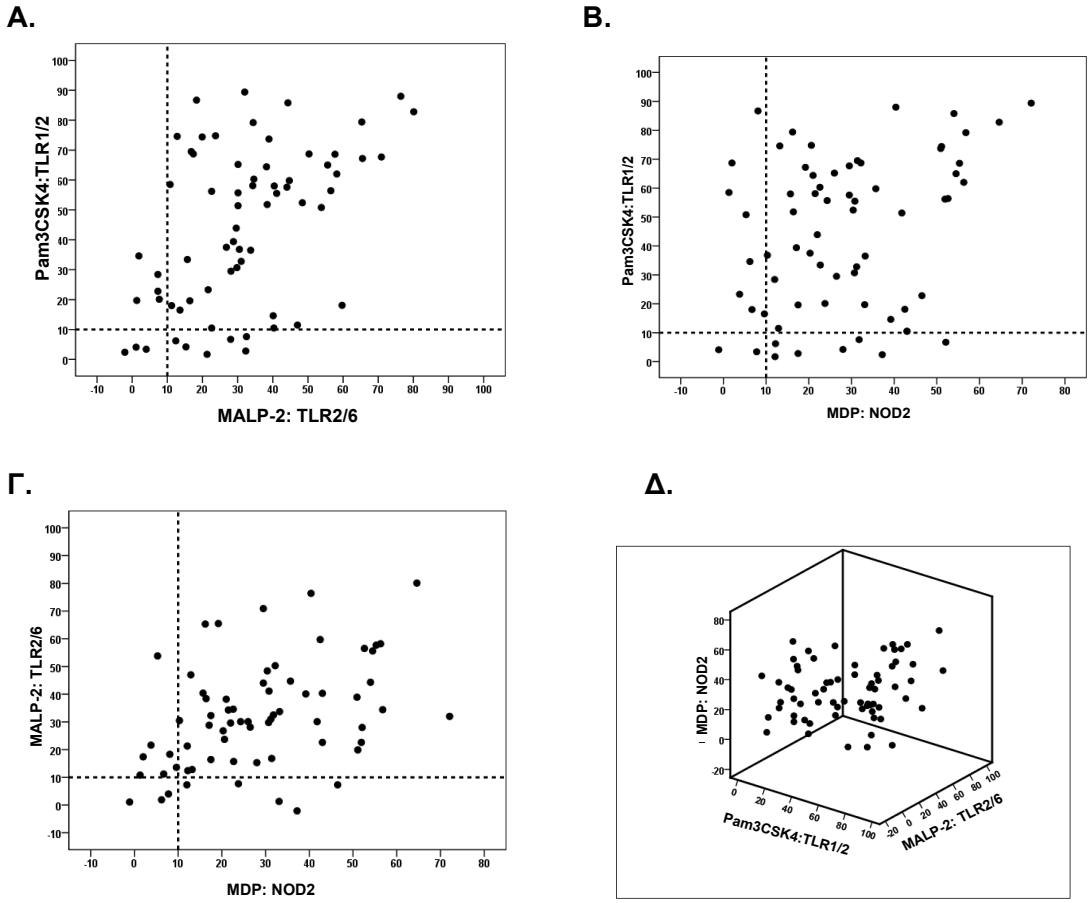


Εικόνα 33: Τα κύτταρα της ΧΛΛ απαντούν διαφορετικά στη διέγερση διαφορετικών TLR με κατάλληλους προσδέτες. Αλλαγές στην έκφραση των CD25 (A) και CD86 (B) στο σύνολο των περιπτώσεων που αναλύθηκαν. Τα γραφήματα παρουσιάζουν τις μέσες τιμές έκφρασης όλων των περιπτώσεων για κάθε προσδέτη. Η στατιστική ανάλυση για τη σύγκριση με το αδιέγερτο control έγινε χρησιμοποιώντας το Student's t-test. Οι διαφορές >10% από το αδιέγερτο control με $p<0.05$ θεωρήθηκαν σημαντικές (*** και * επισημαίνουν p-values < 0.0005 και 0.05, αντιστοίχως). CTL: αδιέγερτο Control, CpG: ODN 2006, PAM: Pam3CSK4, MALP: MALP-2, IM:Imiquimod, LOX:Loxoribine, ORN:ORN06.

Αν και γενικά, παρατηρήθηκε μεγάλη ετερογένεια στις αποκρίσεις των λειτουργικών υποδοχέων μεταξύ διαφορετικών περιπτώσεων ΧΛΛ (Εικόνα 34), από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων διαπιστώθηκε ισχυρή συσχέτιση των προτύπων απάντησης μετά από διέγερση των υποδοχέων TLR1/2, TLR2/6 και NOD2 με τους κατάλληλους προσδέτες. Συγκεκριμένα, 53/58 (91%) περιπτώσεις που απαντούσαν στη διέγερση με Pam3CSK4, απαντούσαν και στη διέγερση με MALP-2 ($p<0.001$). Επιπλέον, 50/57 (88%) και 52/57 (91%) περιπτώσεις που απαντούσαν στη διέγερση με MDP, απαντούσαν επίσης και στη διέγερση με Pam3CSK4 και MALP-2, αντιστοίχως ($p<0.05$ και $p<0.001$, αντιστοίχως). Τέλος, 46/65 περιπτώσεις (71%) απαντούσαν και στους τρεις προσδέτες (Εικόνα 35). Η συσχέτιση των προτύπων λειτουργικότητας των υποδοχέων TLR1/2, TLR2/6 και NOD2 δείχνει ότι τα Β λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ μπορεί να αναγνωρίζουν τα παθογόνα ταυτόχρονα μέσω πολλών υποδοχέων.



Εικόνα 34: Ανομοιογενή πρότυπα απόκρισης, μεταξύ διαφορετικών περιπτώσεων ΧΛΛ. Παρουσιάζονται στικτογράμματα που δείχνουν την έκφραση των μορίων CD25 (κάθετος άξονας) και CD86 (οριζόντιος άξονας) μετά από διέγερση των υποδοχέων με τους κατάλληλους προσδέτες, σε τρεις αντιπροσωπευτικές περιπτώσεις ασθενών.

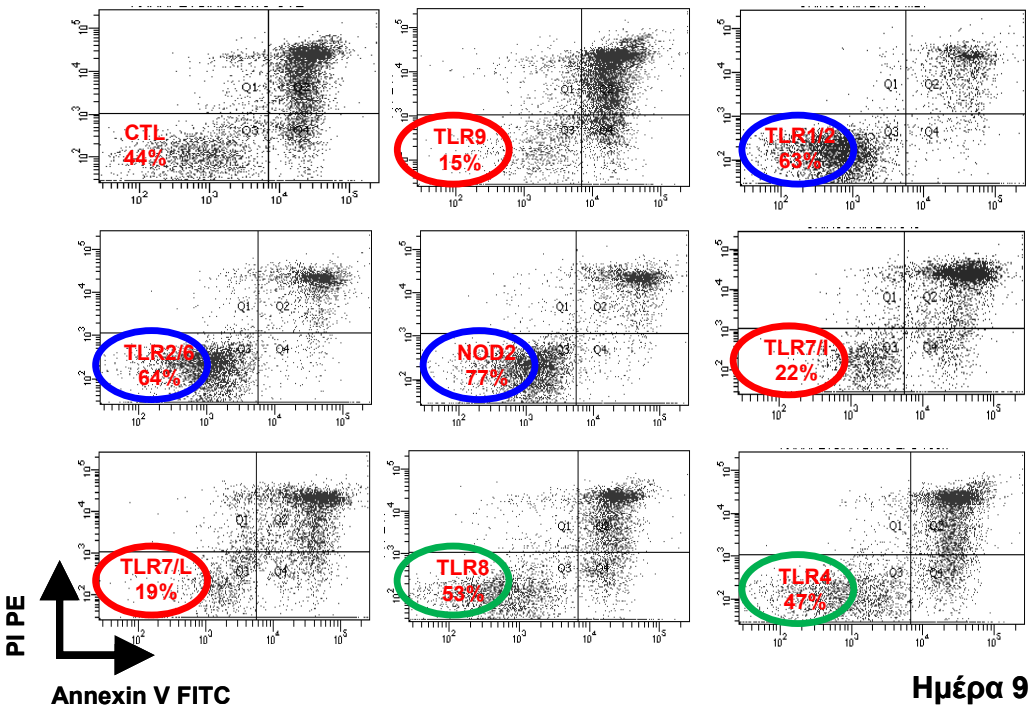


Εικόνα 35: Ισχυρή συσχέτιση των προτύπων απάντησης μετά τη διέγερση των υποδοχέων TLR1/2, TLR2/6 και NOD2 με τους κατάλληλους προσδέτες. Για κάθε περίπτωση από τα ζεύγη των τιμών του CD25 και CD86 μετά από κάθε διέγερση με Pam3CSK4, MALP-2 και MDP, επιλέχθηκε η υψηλότερη τιμή ως αντιπροσωπευτική για τη λειτουργικότητα του υποδοχέα. Τα καρτεσιανά διαγράμματα δείχνουν την κατανομή των τιμών ανά ζεύγη (Α) TLR1/2 και TLR2/6; (Β) TLR1/2 και NOD-2; (Γ) TLR2/6 και NOD-2; και, (Δ) όλων των υποδοχέων. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Spearman και η συσχέτιση θεωρήθηκε σημαντική όταν $p<0.05$.

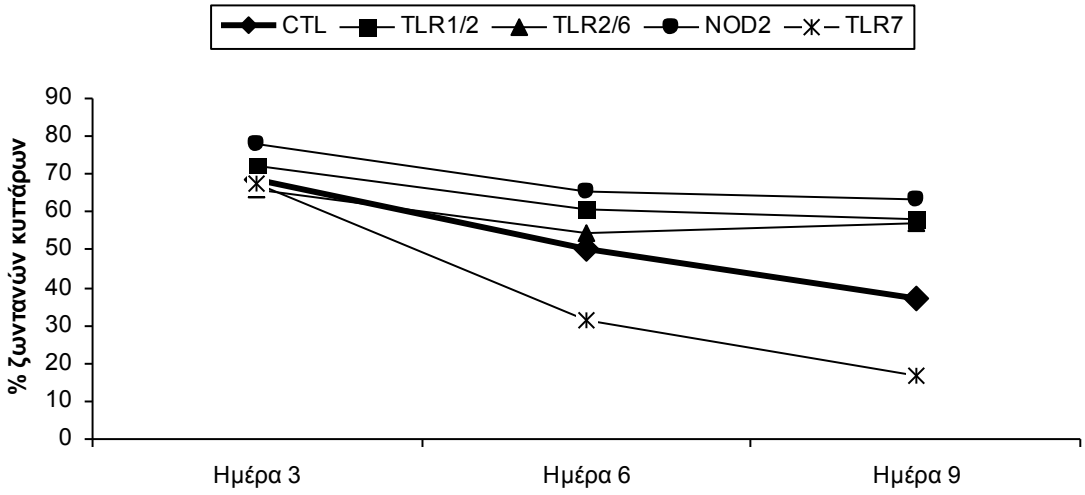
6.5.2 Επαγωγή απόπτωσης

Τα CD19+ κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 9 ημέρες μετά από διέγερση με τον κατάλληλο προσδέτη για κάθε υποδοχέα ή χωρίς διέγερση (αδιέγερτο control). Η βιωσιμότητα των κυττάρων μετρήθηκε με κυτταρομετρία ροής σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (ημέρες 3, 6 και 9) χρησιμοποιώντας AnnexinV και PI.

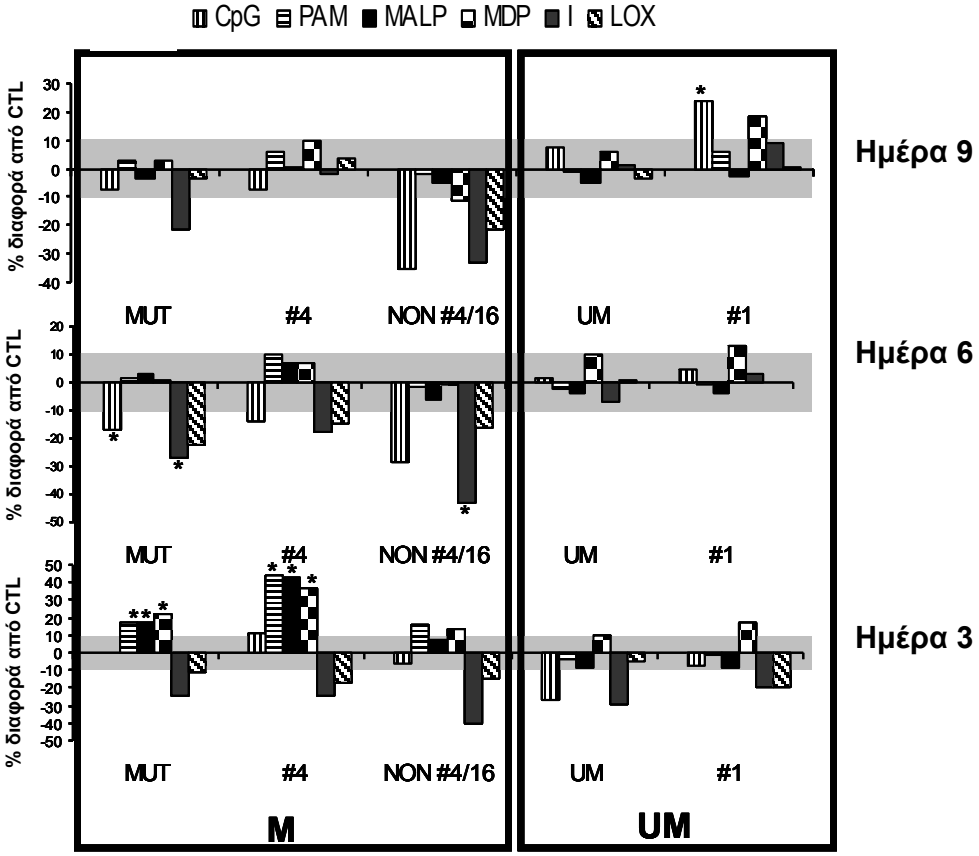
Για τα διεγερμένα κύτταρα, σε κάθε χρονικό στιγμιότυπο και για κάθε υποδοχέα, μετρήθηκε το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων (AnV^-/PI^-) και υπολογίστηκε η διαφορά από το αδιέγερτο control (διαφορές >10% θεωρήθηκαν σημαντικές). Στο σύνολο των περιπτώσεων, η διέγερση των TLR4 και TLR8 δεν είχε καμία επίπτωση στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Αντίθετα, η διέγερση των TLR1/2, TLR2/6, NOD2, TLR7 και TLR9 με τους κατάλληλους προσδέτες είχε σημαντική επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων (Εικόνα 36). Αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα της μελέτης των μορίων ενεργοποίησης, όσον αφορά το πρότυπο λειτουργικότητας των υποδοχέων TLR. Στο σύνολο των ασθενών, η διέγερση του TLR7 με Im προκαλούσε απόπτωση των κυττάρων τις ημέρες 6 και 9, ενώ η διέγερση των TLR1/2, TLR2/6 και NOD2 με τους κατάλληλους προσδέτες είχε αντι-αποπτωτική δράση την ημέρα 9, σε σύγκριση με το αδιέγερτο control (Εικόνα 37). Και στην ανάλυση της απόπτωσης παρατηρήθηκε μεγάλη ετερογένεια στις αποκρίσεις των λειτουργικών υποδοχέων, ιδιαίτερα του TLR9, μεταξύ διαφορετικών ομάδων ασθενών με ΧΛΛ που φέρουν BCR με ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά (Εικόνα 38).



Εικόνα 36: Η βιωσιμότητα των κυττάρων της ΧΛΛ επηρεάζεται με διαφορετικό τρόπο μετά από διέγερση των TLR με τους κατάλληλους προσδέτες. Στην εικόνα παρουσιάζονται τα ιστογράμματα μιας χαρακτηριστικής περίπτωσης. Τα ποσοστά αναφέρονται στα ζωντανά κύτταρα (τεταρτημόριο Q3) και τα διαφορετικά χρώματα υποδεικνύουν διαφορετικά αποτελέσματα (κόκκινο: επαγωγή απόπτωσης, μπλέ: προστασία από απόπτωση, πράσινο: καμία επίδραση).



Εικόνα 37: Η βιωσιμότητα των κυττάρων της ΧΛΛ επηρεάζεται με διαφορετικό τρόπο μετά από διέγερση των TLR1/2, TLR2/6, TLR7 και NOD2 με τους κατάλληλους προσδέτες. Στο σύνολο των ασθενών, η διέγερση του TLR7 με Imiquimod προκαλεί απόπτωση των κυττάρων τις ημέρες 6 και 9, ενώ η διέγερση των TLR1/2, TLR2/6 και NOD2 προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση την ημέρα 9, σε σύγκριση με το αδιέγερτο control.



Εικόνα 38: Ανομοιογενή πρότυπα απόπτωσης, μεταξύ διαφορετικών ομάδων ασθενών με ΧΛΛ που φέρουν BcR με ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται οι μέσες τιμές για κάθε υποσύνολο ασθενών όπως ορίστηκαν με βάση τα μοριακά χαρακτηριστικά των BcR τους. Το γκρι πλαίσιο αντιπροσωπεύει το όριο *'απάντησης'* 10%. CpG: ODN 2006, PAM: Pam3CSK4, MALP: MALP-2, I:Imiquimod, LOX:Loxoribine. Με * επισημαίνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές από το αδιέγερτο control.

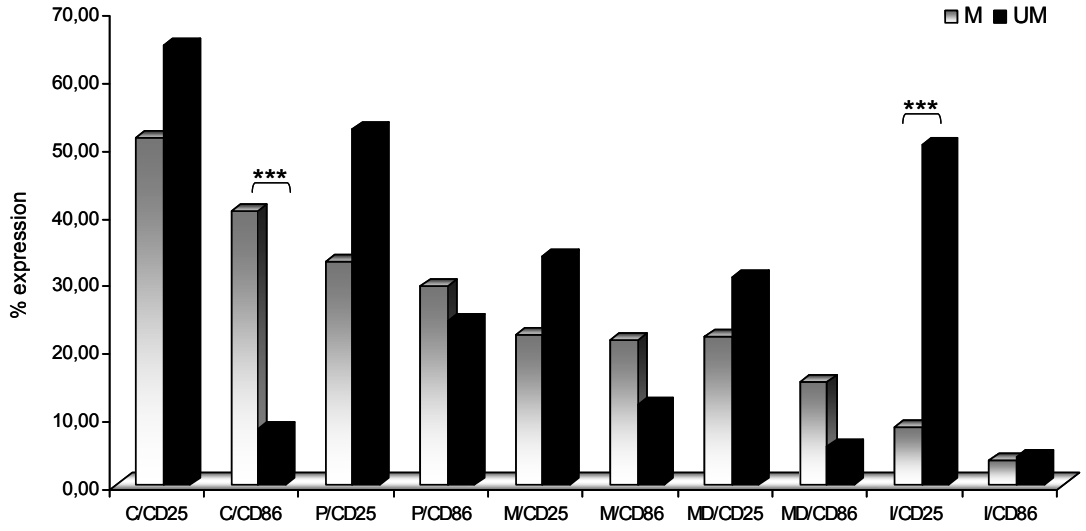
6.6 Συσχέτιση των προτύπων λειτουργικότητας των TLR με ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά του BcR

Με δεδομένο ότι οι TLR εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης αναζητήθηκαν διαφορές και στα πρότυπα λειτουργικότητάς τους μεταξύ υποομάδων ασθενών με ΧΛΛ που ορίστηκαν με βάση τα μοριακά χαρακτηριστικά του BcR, όπως το ρεπερτόριο και το status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV και η έκφραση στερεότυπων BcR.

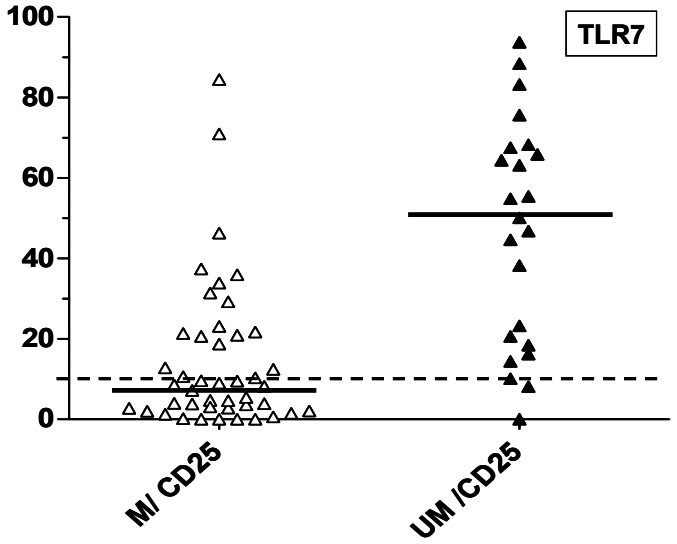
6.6.1 Status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV

Αρχικά συγκρίθηκαν τα λειτουργικά πρότυπα ασθενών με μεταλλαγμένα ή αμετάλλακτα γονίδια IGHV (Μ-ΧΛΛ και Α-ΧΛΛ: 44 και 23 περιπτώσεις, αντιστοίχως). Αναφορικά με την επαγωγή των συνδιεγερτικών μορίων, και οι δύο ομάδες παρουσίαζαν παρόμοια πρότυπα λειτουργικότητας μετά από διέγερση των υποδοχέων TLR1/2, TLR2/6 και NOD2 (Εικόνα 39Α). Αντίθετα, διαφορετικά πρότυπα λειτουργικότητας παρατηρήθηκαν μετά από διέγερση των υποδοχέων TLR7 και TLR9. Συγκεκριμένα, δεν παρατηρήθηκε επαγωγή της έκφρασης του CD86 σε καμία από τις δύο ομάδες, αλλά το ποσοστό των CD25 θετικών κυττάρων αυξήθηκε περισσότερο στην Α-ΧΛΛ μετά από διέγερση του TLR7 με Im (διαφορά διάμεσων τιμών, 46.4%; $p<0.001$, Εικόνα 39Α, Β). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι μόνο τα κύτταρα της Α-ΧΛΛ απαντούν έντονα στη διέγερση του TLR7 επάγοντας όμως μόνο την έκφραση του CD25. Αντίθετα, μετά από διέγερση του TLR9 με CpG, παρατηρήθηκε επαγωγή της έκφρασης του CD25 σε παρόμοιο ποσοστό και στις δύο ομάδες αλλά, το ποσοστό των CD86 θετικών κυττάρων ήταν μεγαλύτερο στην Μ-ΧΛΛ (διαφορά διάμεσων τιμών, 31%; $p<0.001$) (Εικόνα 39Α, Γ). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι η ικανότητα σηματοδότησης μέσω του TLR7 διαφέρει ανάμεσα στις δύο ομάδες. Η διαφορετική επίδραση στα δύο μόρια, CD25 και CD86, δείχνει ότι η έκφραση τους ρυθμίζεται από διαφορετικούς κλάδους των μονοπατιών καθοδικά των υποδοχέων.

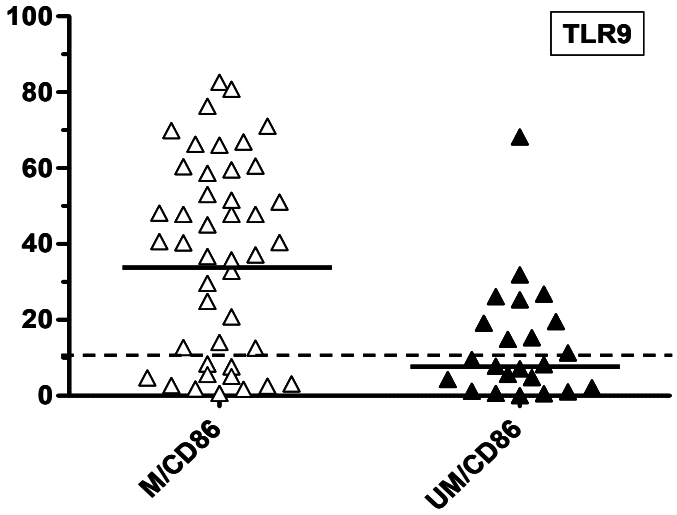
A.



Β.



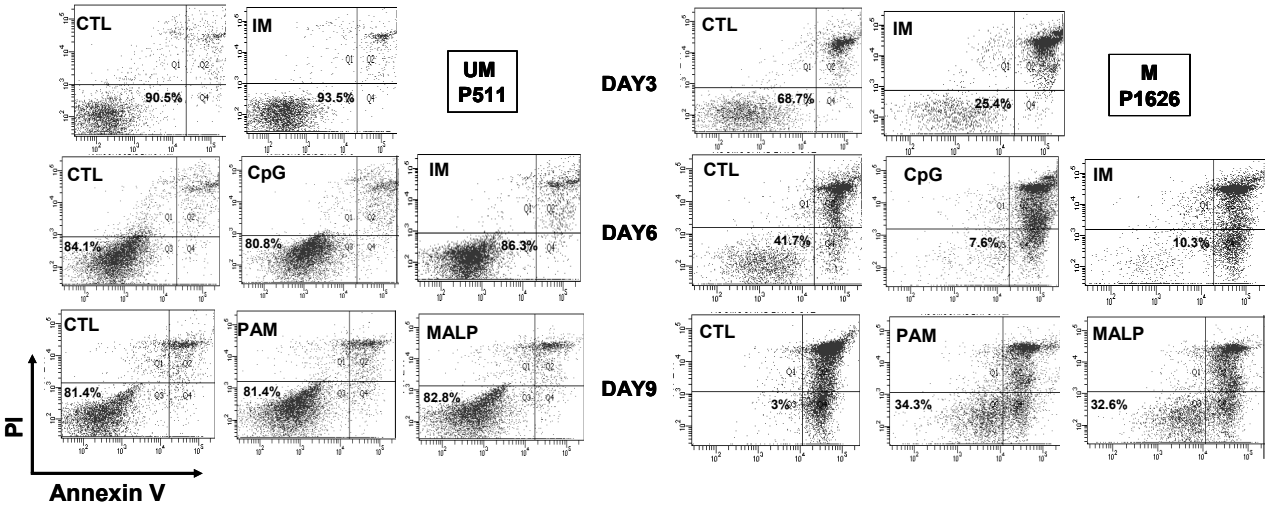
Γ.



Εικόνα 39: Οι περιπτώσεις ΧΛΛ με διαφορετικό status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα λειτουργικότητας των υποδοχέων TLR. (Α)Επαγωγή της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων μετά από διέγερση όλων των λειτουργικών υποδοχέων. (Β) Επαγωγή της έκφρασης του CD25 μετά από διέγερση του TLR7 με Im. (Γ) Επαγωγή της έκφρασης του CD86 μετά από διέγερση του TLR9 με CpG. Η μαύρη γραμμή αντιπροσωπεύει τις διάμεσες τιμές για κάθε ομάδα και η διακεκομμένη γραμμή το όριο *'απάντησης'* 10%. C: CpG ODN 2006, P: Pam3CSK4, M: MALP-2, MD: MDP, I:Imiquimod.

Σχετικά με την απόπτωση, παρατηρήθηκε ότι η διέγερση του TLR9 με CpG (ημέρα 6) και του TLR7 με Im (ημέρες 3 και 6) προκαλούσε μεγαλύτερη απόπτωση στην M-

ΧΛΛ έναντι της Α-ΧΛΛ (p<0.01). Αντίθετα, η διέγερση των TLR1/2 και TLR2/6 είχε αντιαποπτωτική δράση την ημέρα 9 στην Μ-ΧΛΛ ενώ, δεν είχε καμία επίδραση στην Α-ΧΛΛ (p<0.05) (Εικόνα 40). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η διέγερση συγκεκριμένων TLR επάγει ή προστατεύει τα κύτταρα από απόπτωση επιλεκτικά στη Μ-ΧΛΛ.

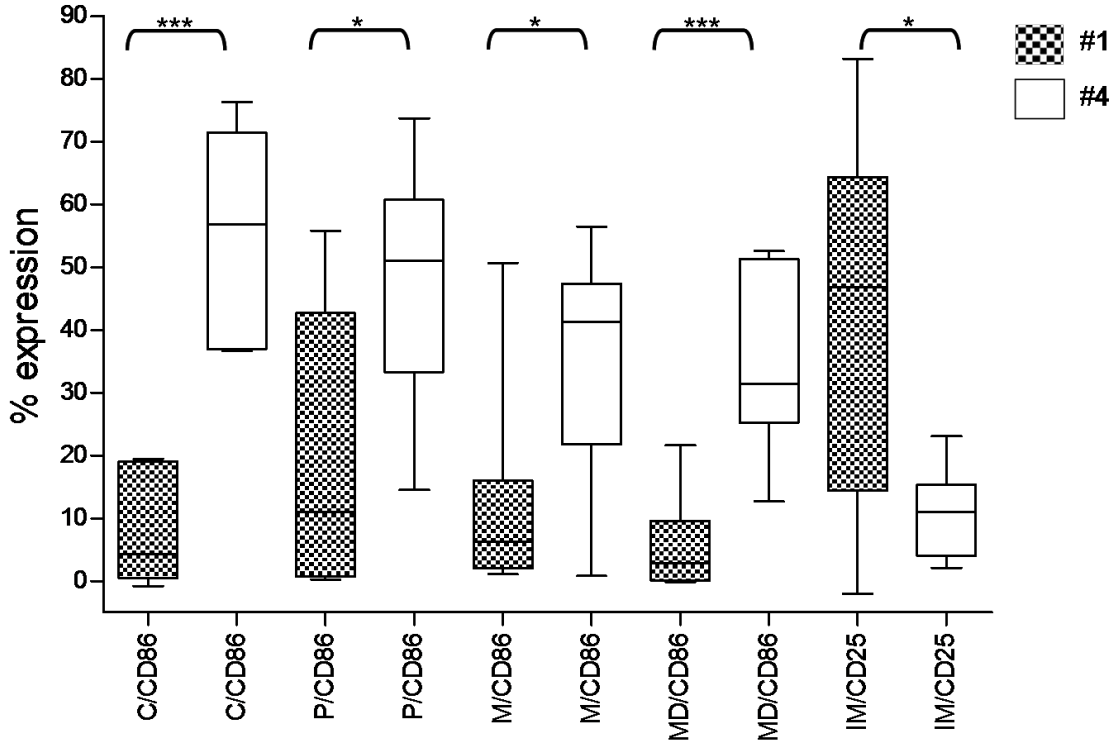


Εικόνα 40: Οι περιπτώσεις ΧΛΛ με διαφορετικό status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV παρουσιάζουν διαφορετική βιωσιμότητα μετά από διέγερση διαφορετικών TLR. Στα στικτογράμματα παρουσιάζονται μία χαρακτηριστική περίοτωση για κάθε ομάδα ασθενών. Η διέγερση των TLR9 και TLR7 επάγει απόπτωση σε συγκεκριμένα χρονικά στιγμιότυπα, ενώ η διέγερση των TLR1/2 και TLR2/6 προστατεύει τα κύτταρα της ΧΛΛ από απόπτωση την ημέρα 9 μόνο στις στην Μ-ΧΛΛ. Οι ίδιες διεγέρσεις δεν έχουν σχεδόν καμία επίδραση στις «αμετάλλακτες» περιπτώσεις ΧΛΛ. CTL: αδιέγερτο Control, PAM: Pam3CSK4, ΜΑΛΠ: MALP-2, IM: Imiquimod.

6.6.2 Στερεοτυπία του Β κυτταρικού υποδοχέα

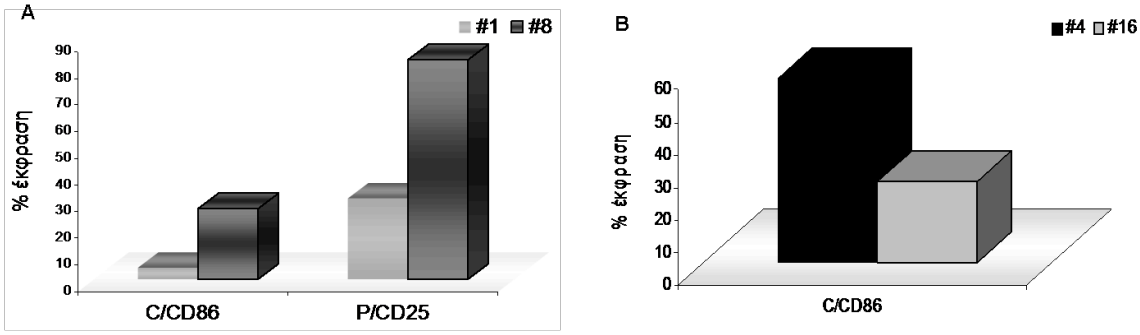
Στη συνέχεια μελετήθηκε η πιθανότητα ομαδοποίησης των περιπτώσεων της ΧΛΛ σε ομάδες που χαρακτηρίζονται από στερεότυπους υποδοχείς να αντικατοπτρίζεται και στα πρότυπα λειτουργικότητας των υποδοχέων TLR. Για την απάντηση του συγκεκριμένου ερωτήματος συγκρίθηκαν περιπτώσεις που ανήκαν σε διαφορετικά στερεότυπα υποσύνολα. Δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στις περιπτώσεις που ανήκαν στα στερεότυπα υποσύνολα #1 και #4 επειδή πολλά πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι μπορούν να θεωρηθούν σαν πρότυπα κακής και καλής πρόγνωσης της νόσου, αντιστοίχως.

Αναφορικά με την επαγωγή της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων όλες οι περιπτώσεις αποκρινόταν στη διέγερση των TLR9, TLR1/2, TLR2/6, και NOD2 με τους κατάλληλους προσδέτες με αύξηση της έκφρασης του CD25. Αντίθετα, η έκφραση του CD86 επαγόταν ισχυρά στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσύνολου #4, ενώ στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσύνολου #1 η επαγωγή της έκφρασης ήταν χαμηλή έως μηδενική. ($p<0.05$) (Εικόνα 41). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι τα κύτταρα του στερεότυπου υποσυνόλου #4, απαντούν πιο έντονα στη διέγερση των TLR9, TLR1/2, TLR2/6 και NOD2 και ότι υπάρχει διαφορετική ρύθμιση στη σηματοδότηση καθοδικά των υποδοχέων. Η διέγερση του TLR7 με Im δεν είχε καμία επίδραση στην έκφραση του CD86, αλλά οδηγούσε σε αυξημένη έκφραση του CD25 μόνο στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσυνόλου #1 ($p<0.05$) (Εικόνα 41). Συνεπώς τα κύτταρα του στερεότυπου υποσυνόλου #4 δεν απαντούν καθόλου στη διέγερση μέσω του TLR7.



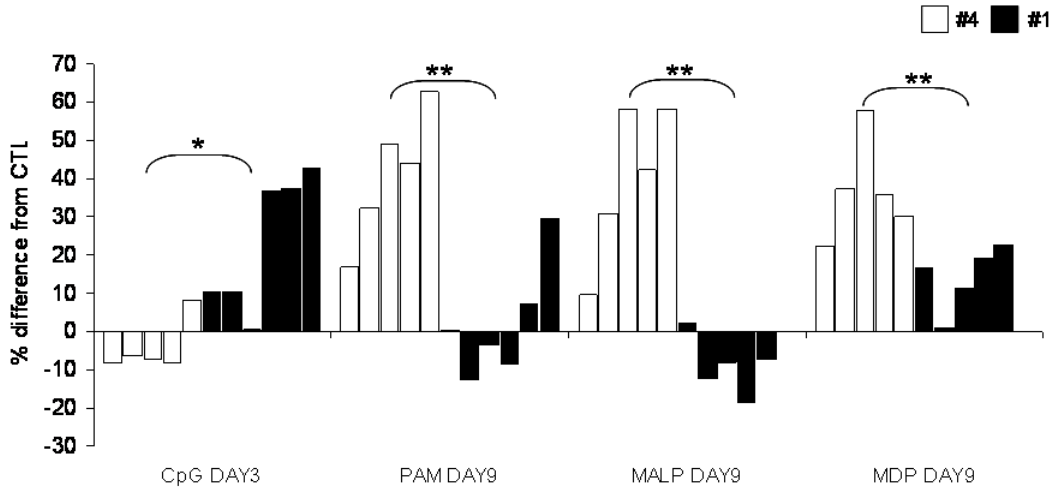
Εικόνα 41: Οι περιπτώσεις ΧΛΛ που ανήκουν σε διαφορετικά στερεότυπα υποσύνολα εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα λειτουργικότητας των υποδοχέων TLR. Η διέγερση των TLR9, TLR1/2, TLR2/6, και NOD2 με τους κατάλληλους προσδέτες επάγει την έκφραση του CD86 στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσύνολου #4 ενώ έχει πολύ μικρή έως καμία επίδραση στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσύνολου #1. Αντίθετα η διέγερση του TLR7 επάγει την έκφραση του CD25 μόνο στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσύνολου #1. Στο διάγραμμα απεικονίζονται σε Whisker boxes (min to max) μόνο οι στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Στην ομάδα μελέτης συμπεριλαμβανόταν και περιπτώσεις που ανήκαν στα στερεότυπα υποσύνολα #8 (IGHV4-39/IGKV1(D)-39) και #16 (IGHV4-34/IGKV3-20) (3 περιπτώσεις από το καθένα). Οι ασθενείς του στερεότυπου υποσυνόλου #8 φέρουν αμετάλλακτους BcR ενώ του υποσυνόλου #16 μεταλλαγμένους. Όταν συγκρίθηκαν περιπτώσεις που ανήκαν σε στερεότυπα υποσύνολα με ίδιο status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV, δηλαδή το στερεότυπο υποσύνολο #1 έναντι του #8 (Α-ΧΛΛ) και στερεότυπο υποσύνολο subset #4 έναντι του #16 (Μ-ΧΛΛ) παρατηρήθηκαν ιδιαίτερα λειτουργικά πρότυπα για συγκεκριμένους TLR. Οι διαφορές αφορούσαν τους TLR9 και TLR1/2 (Εικόνα 42).



Εικόνα 42: Οι περιπτώσεις ΧΛΛ που ανήκουν σε διαφορετικά στερεότυπα υποσύνολα εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα λειτουργικότητας των υποδοχέων TLR. (A) επαγωγή της έκφρασης του CD25 και του CD86 σε περιπτώσεις ΧΛΛ που ανήκουν στα στερεότυπα υποσύνολα #1 και #8, μετά από διέγερση των TLR1/2 και TLR9 με Pam3CSK4 (P) και CpG (C), αντιστοίχως. (B) επαγωγή της έκφρασης του CD86 σε περιπτώσεις ΧΛΛ που ανήκουν στα στερεότυπα υποσύνολα #4 και #16, μετά από διέγερση του TLR9 με CpG (C). Στα διαγράμματα παρουσιάζονται μόνο τα αποτελέσματα των συγκρίσεων που είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0.05$). C:CpG ODN 2009, P:Pam3CSK4.

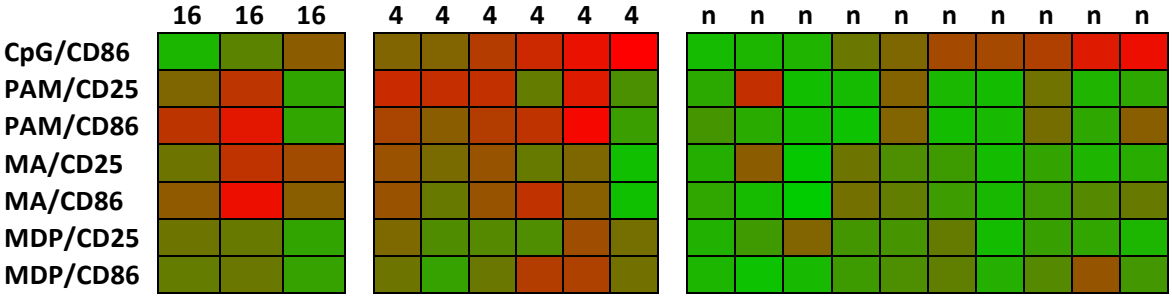
Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της διέγερσης των υποδοχέων TLR και NOD2 στη βιωσιμότητα των κυττάρων στις περιπτώσεις που ανήκαν στα στερεότυπα υποσύνολα #1 και #4. Από τη σύγκριση προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0.05$) για συγκεκριμένους υποδοχείς, συγκεκριμένα: (i) η διέγερση του TLR9 είχε αντιαποπτωτική δράση την ημέρα 3 στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσύνολου #1 και καμία επίδραση στην άλλη ομάδα ασθενών, ενώ (ii) η διέγερση των TLR1/2, TLR2/6 και NOD2 είχε το ίδιο αποτέλεσμα στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσύνολου #4 την ημέρα 9 και καμία ή ελάχιστη επίδραση στην άλλη ομάδα ασθενών (Εικόνα 43). Για τα υπόλοιπα στερεότυπα υποσύνολα δεν πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις λόγω του μικρού αριθμού περιπτώσεων. Τα αποτελέσματα της βιωσιμότητας υποδεικνύουν ότι η χρήση των TLR με σκοπό να οδηγηθούν τα κύτταρα της ΧΛΛ σε απόπτωση μπορεί να έχει αντίθετα αποτελέσματα σε ομάδες ασθενών που ανήκουν σε στερεότυπα υποσύνολα, ανεξάρτητα από το status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV.



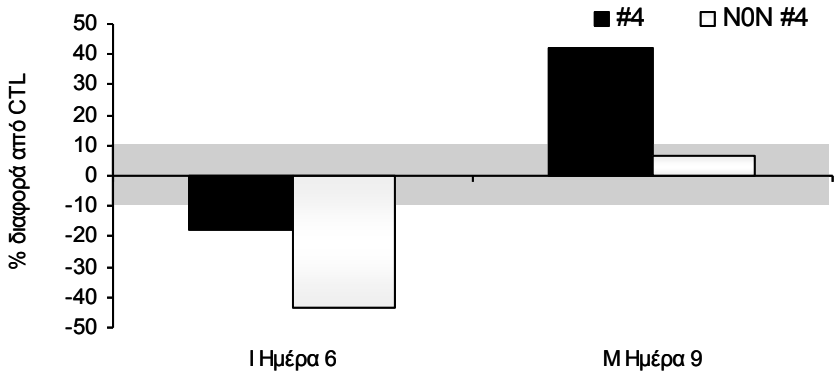
Εικόνα 43. Οι περιπτώσεις ΧΛΛ που ανήκουν στα στερεότυπα υποσύνολα #1 και #4 παρουσιάζουν διαφορετική βιωσιμότητα μετά από διέγερση συγκεκριμένων TLR. Η διέγερση του TLR9 έχει αντιαποπτωτική δράση την ημέρα 3 στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσύνολου #1, ενώ η διέγερση των TLR1/2, TLR2/6 και NOD2 έχει αντιαποπτωτική δράση στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσύνολου #4 την ημέρα 9. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται μόνο τα αποτελέσματα που είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0.05$). Κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει έναν ασθενή. PAM: Pam3CSK4, MALP: MALP-2.

Στη συνέχεια, για να διαπιστώσουμε εάν η χρησιμοποίηση του ίδιου γονιδίου V στη βαριά αλυσίδα σχετίζεται με τα πρότυπα λειτουργικότητας των υποδοχέων TLR αναλύθηκαν οι περιπτώσεις που χρησιμοποιούσαν το γονίδιο IGHV4-34. Συγκεκριμένα, συγκρίθηκαν δύο στερεότυπα υποσύνολα (#4: IGHV4-34/IGKV2-30 και #16: IGHV4-34/IGKV3-20) με περιπτώσεις που χρησιμοποιούσαν το γονίδιο IGHV4-34 σε μη στερεότυπες αναδιατάξεις (non #4/16). Με αυτή την προσέγγιση παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0.05$) ανάμεσα στις τρεις ομάδες ασθενών αναφορικά με την έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων μετά από διέγερση των TLR1/2, TLR2/6, NOD2 και TLR9 (Εικόνα 44). Συνεπώς, τα ιδιαίτερα

πρότυπα λειτουργικότητας σχετίζονται με τη χρήση στερεότυπων BcR και είναι ανεξάρτητα από το γονίδιο V. Επίσης, παρατηρήθηκαν διαφορές στη βιωσιμότητα των κυττάρων μετά από διέγερση συγκεκριμένων υποδοχέων, όταν συγκρίθηκαν οι περιπτώσεις του στερεότυπου υποσύνολου #4 με τις περιπτώσεις που χρησιμοποιούσαν το γονίδιο IGHV4-34 σε μη στερεότυπες αναδιατάξεις (non #4/16) (Εικόνα 45).



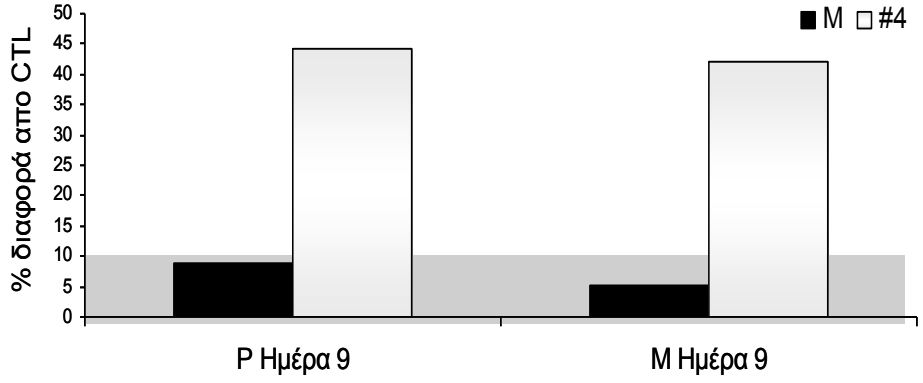
Εικόνα 44. Οι περιπτώσεις ΧΛΛ που χρησιμοποιούν το γονίδιο IGHV4-34 σε στερεότυπες (#4 και #16) και μη (non #4/16) αναδιατάξεις εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα λειτουργικότητας των υποδοχέων TLR. Στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων μετά από διέγερση των TLR1/2, TLR2/6, TLR9 και NOD2 με τους κατάλληλους προσδέτες στις περιπτώσεις που χρησιμοποιούν το γονίδιο IGHV4-34 σε στερεότυπες (#4 και #16, 4 και 16 αντιστοίχως) και μη (non #4/16, n) αναδιατάξεις. CpG: ODN 2006, PAM: Pam3CSK4, MA: MALP. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει μία διαφορετική περίπτωση ενώ κάθε κελί απεικονίζει το αποτέλεσμα μιας συγκεκριμένης διέγερσης. Ο χρωματικός κώδικας βασίστηκε στα ποσοστά έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων. Το κόκκινο χρώμα αντιστοιχεί στη μεγαλύτερη τιμή ενώ το πράσινο στην μικρότερη.



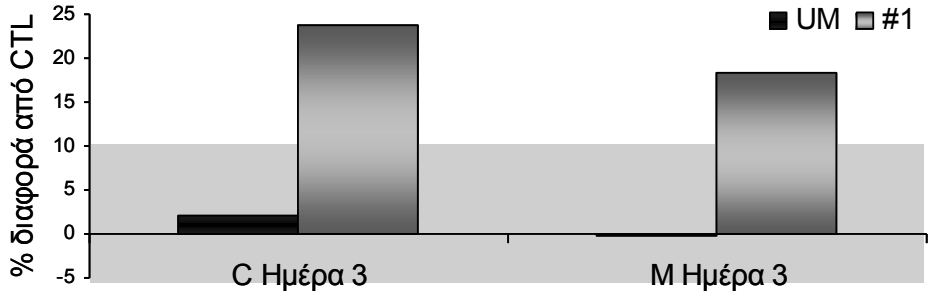
Εικόνα 45: Τα λευχαιμικά λεμφοκύτταρα περιπτώσεων ΧΛΛ που χρησιμοποιούν το γονίδιο IGHV4-34 σε στερεότυπες (#4) και μη (non #4/16) αναδιατάξεις παρουσιάζουν διαφορετική βιωσιμότητα μετά από διέγερση συγκεκριμένων TLR. Η διέγερση του TLR7 με Im (I) και του TLR2/6 με MALP-2 (M) έχουν αντίθετα αποτελέσματα στις δύο ομάδες ασθενών σε συγκεκριμένα χρονικά στιγμιότυπα. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται μόνο τα αποτελέσματα που είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0.05$). Το γκρι πλαίσιο αντιπροσωπεύει το όριο *'απάντησης'* 10%.

Οι ασθενείς που ανήκουν στα στερεότυπα υποσύνολα #1 και #4 φέρουν αποκλειστικά μεταλλαγμένες και αμετάλλακτες αλληλουχίες των γονιδίων IGHV, αντιστοίχως. Έτσι, συγκρίναμε τα πρότυπα λειτουργικότητας τους με τ' αντίστοιχα πρότυπα ασθενών με το ίδιο status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV. Με τη συγκεκριμένη προσέγγιση παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές τόσο ως προς την επαγωγή της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων, όσο και στο ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων μετά από διέγερση συγκεκριμένων υποδοχέων (Εικόνα 46Α, Β, Γ). Επιπλέον, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όταν η ανάλυση επεκτάθηκε στα "μικρά" στερεότυπα υποσύνολα (π.χ. #8 and #16), παρότι ο αριθμός των περιπτώσεων ήταν μικρός (Εικόνα 46Γ, Δ). Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι τα λειτουργικά πρότυπα των TLR στα στερεότυπα υποσύνολα είναι ειδικά και ανεξάρτητα από το status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι ο διαχωρισμός των ασθενών της ΧΛΛ σε στερεότυπα υποσύνολα έχει κλινική και βιολογική σημασία.

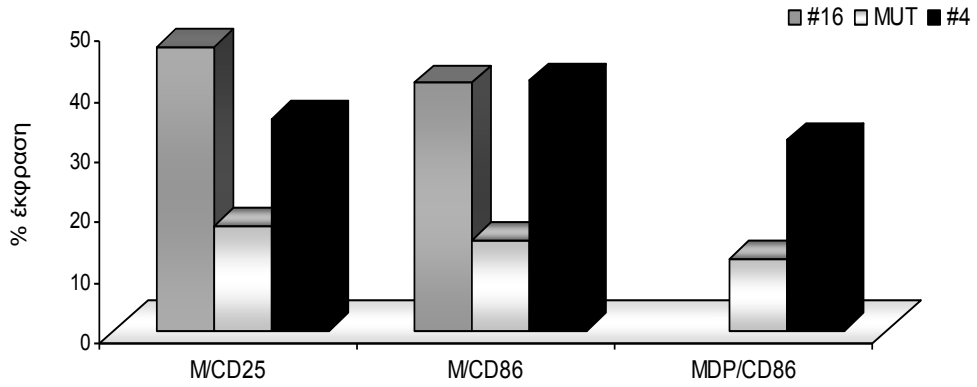
Α.



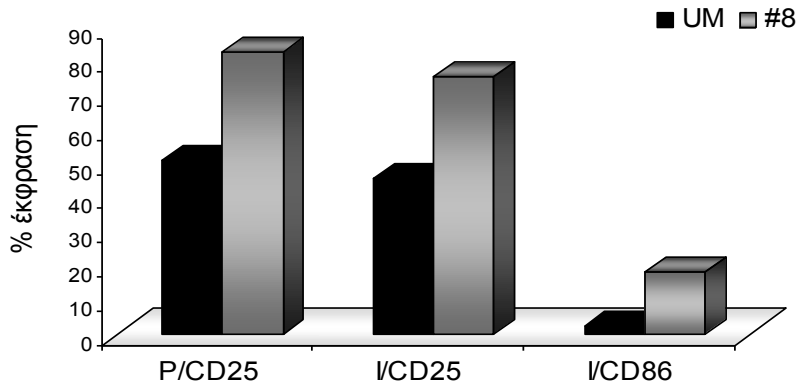
Β.


UM
#1
% διαφορά από CTL
25
20
15
10
5
0
-5
C Ημέρα 3
M Ημέρα 3

Γ.


#16
MUT
#4
% έκφραση
50
40
30
20
10
0
M/CD25
M/CD86
MDP/CD86

Δ.


UM
#8
% έκφραση
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
P/CD25
I/CD25
I/CD86

Εικόνα 46: Οι ασθενείς που φέρουν στερεότυπους BcR εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα λειτουργικότητας των υποδοχέων TLR και NOD2 συγκριτικά με ασθενείς με το ίδιο status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV. (Α) Διαφορετικά ποσοστά βιωσιμότητας στην Μ-ΧΛΛ σε σύγκριση με περιπτώσεις του στερεότυπου υποσύνολου #4 μετά από διέγερση του TLR9 με Pam3CSK4(P) και του TLR2/6 με MALP-2 (M). (Β) Διαφορετικά ποσοστά βιωσιμότητας στην Α-ΧΛΛ σε σύγκριση με ασθενείς του στερεότυπου υποσύνολου #1 μετά από διέγερση του TLR9 με CpG(C) και του NOD2 με MDP (M). (Γ) Επαγωγή της έκφρασης των CD25 και CD86 σε ασθενείς που ανήκουν στα στερεότυπα υποσύνολα #4 και #16 σε σύγκριση με Μ-ΧΛΛ μετά από διέγερση των TLR2/6 και NOD2 με MALP-2 (M) και MDP, αντιστοίχως. (Δ) Επαγωγή της έκφρασης των CD25 και CD86 σε ασθενείς που ανήκουν στο στερεότυπο υποσύνολο #8 σε σύγκριση με Α-ΧΛΛ μετά από διέγερση των TLR1/2 και TLR7 με Pam3CSK4 (P) και imiquimod (I), αντιστοίχως. Σε όλα τα διαγράμματα παρουσιάζονται μόνο οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0.05$).

6.7 Διερεύνηση της ρύθμισης του σηματοδοτικού μονοπατιού των υποδοχέων TLR

Στη συνέχεια μελετήθηκαν πιθανοί μηχανισμοί που οδηγούν στη διαφορετική σηματοδότηση μέσω των υποδοχέων TLR μεταξύ διαφορετικών υποομάδων ασθενών. Αρχικά μελετήθηκε εάν υπάρχει ρύθμιση σε μεταγραφικό επίπεδο και γι' αυτό το λόγο επιλέχθηκαν ομάδες ασθενών που παρουσίαζαν διαφορετικά πρότυπα λειτουργικότητας των υποδοχέων TLR. Έπειτα εξετάστηκε εάν συμβαίνει ρύθμιση σε μετά-μεταφραστικό επίπεδο στο στερεότυπο υποσύνολο #4 και εάν κατ' αυτόν τον τρόπο ρυθμίζεται η ανεργική κατάσταση των κυττάρων του υποσυνόλου στον TLR7.

6.7.1 Ρύθμιση σε μεταγραφικό επίπεδο

Συνολικά αναλύθηκαν 11 ασθενείς που επιλέχθηκαν με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα. Τα CD19+ κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 18 ώρες μετά από διέγερση με τον κατάλληλο προσδέτη για κάποιον υποδοχέα ή χωρίς διέγερση (αδιέγερτο control). Η επιλογή των υποδοχέων έγινε με βάση τα λειτουργικά πρότυπα των υποομάδων που εξετάστηκαν. Επιλέχθηκαν δύο διαφορετικοί λειτουργικοί υποδοχείς για να διερευνηθεί εάν η σηματοδότηση μέσω διαφορετικών υποδοχέων

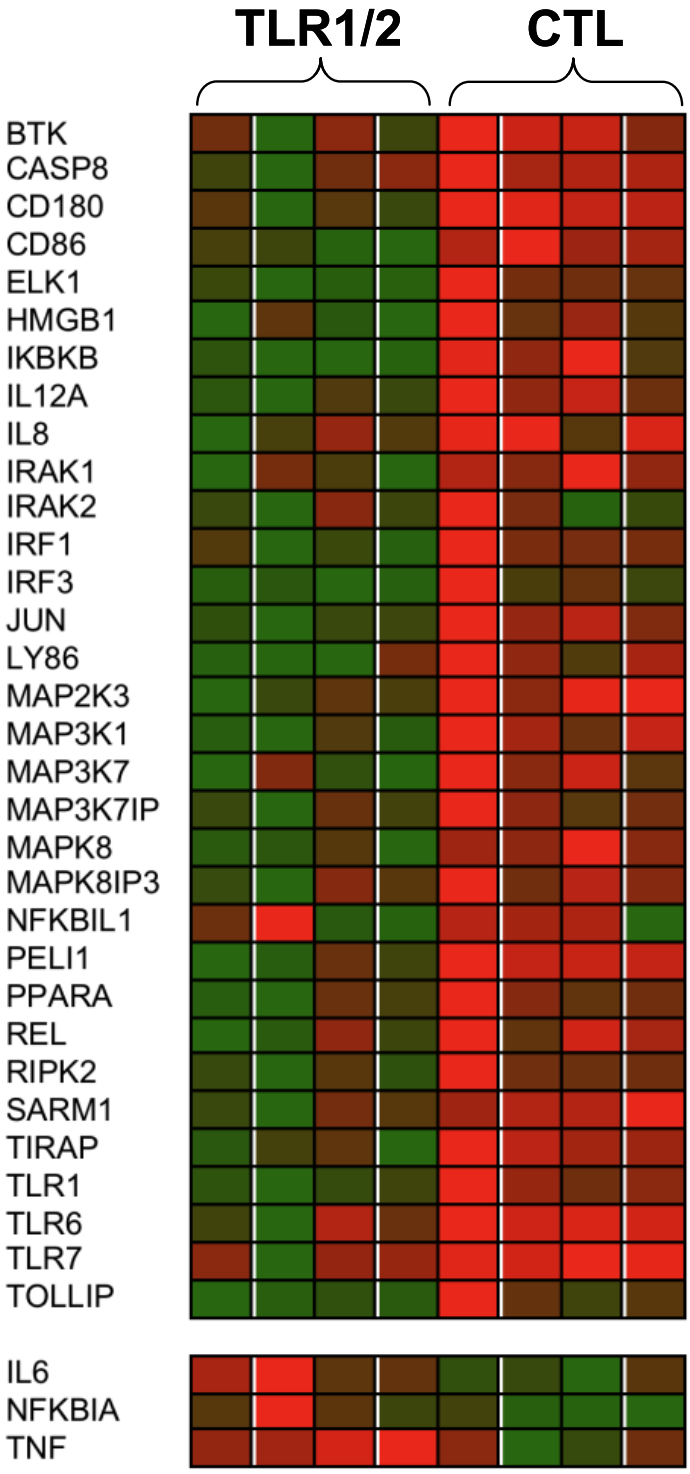
TLR ρυθμίζονται με τον ίδιο τρόπο σε μεταγραφικό επίπεδο. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε διέγερση του TLR7 με Imiquimod σε περιπτώσεις που ανήκαν στο στερεότυπο υποσύνολο #1, (4 περιπτώσεις) και του TLR1/2 με Pam3CSK4 στο στερεότυπο υποσύνολο #4 (4 περιπτώσεις) επειδή ήταν λειτουργικοί στις συγκεκριμένες περιπτώσεις. Επίσης, πραγματοποιήθηκε διέγερση του TLR1/2 με Pam3CSK4 σε περιπτώσεις που χρησιμοποιούσαν το γονίδιο IGHV4-34 σε μη στερεότυπες αναδιατάξεις (non #4/16, 3 περιπτώσεις), στις οποίες ο TLR1/2 δεν ήταν λειτουργικός. Με τη χρήση cDNA μικροσυστοιχιών μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA 83 γονιδίων που σχετίζονται με το μονοπάτι των TLR συμπεριλαμβανομένων των υποδοχέων, προσαρμοστών, τελεστών και κρίσιμων κινασών στη διεγερμένη και την αδιέγερτη κατάσταση. Έπειτα, συγκρίθηκαν τα επίπεδα έκφρασης στις δύο καταστάσεις με τη χρήση της μεθόδου ΔΔCt και αξιολογήθηκαν οι διαφορές (FD>2, $p<0.05$).

Στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσυνόλου #4 μετά τη διέγερση του λειτουργικού TLR1/2 παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης των περισσοτέρων γονιδίων που μελετήθηκαν. Μειώθηκε η έκφραση υποδοχέων TLR (TLR1, TLR6, TLR7, CD180), φαινόμενο που έχει αποδειχθεί και σε μελέτες σε μακροφάγα, σύμφωνα με τις οποίες η διέγερση μέσω ενός TLR ρυθμίζει την έκφραση και άλλων μελών της οικογένειας[156,157]. Επιπλέον, μειώθηκε η έκφραση προσαρμοστών και τελεστών ειδικών για το σηματοδοτικό μονοπάτι των TLR (π.χ. TIRAP, SARM και IRAK1 IRAK2, αντιστοίχως). Εκτός από τα ειδικά μόρια της σηματοδότησης των TLR επηρεάστηκε αρνητικά η έκφραση πολλών μορίων που συμμετέχουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια MAPK (MAP2K3, MAP3K1, MAP3K7, MAP3K7IP1, MAPK8, MAPK8IP3) και NF-κB (IKBKB, REL) καθοδικά των TLR. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η έκφραση του αναστολέα NFKBIA αυξήθηκε μετά τη διέγερση. Η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα JUN μειώθηκε ραγδαία (x50). Από τα τελικά μόρια-στόχους μειώθηκε η έκφραση του CD86, της IL12 και της IL8, ενώ αυξήθηκε η έκφραση της IL6 και του TNF (Εικόνα 47Α). Ο TNF-α παράγεται πάντα μετά από διέγερση των υποδοχέων TLR και παρατηρείται πτώση του μετά από δεύτερη διέγερση του ίδιου υποδοχέα, δηλαδή σε ανεργική κατάσταση. Η IL6, φαίνεται να έχει κατασταλτική δράση σε αυτοαντιδραστικά Β λεμφοκύτταρα. Η μείωση του

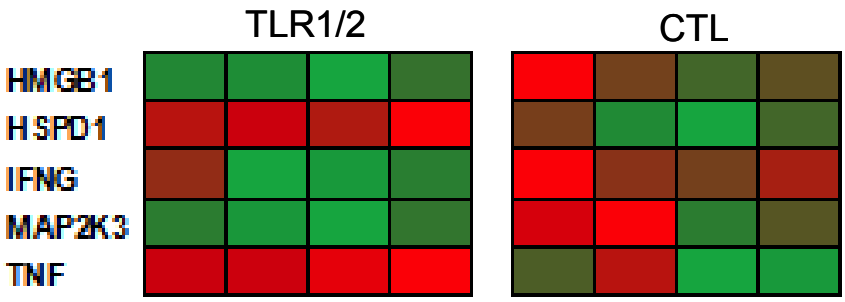
CD86 και της IL12 αναστέλλει την αλληλεπίδραση με άλλα κύτταρα και η μείωση της IL8 εμποδίζει την αγγειογένεση και την επιβίωση των κυττάρων. Φαίνεται ότι υπάρχει μία γενική αρνητική ανάστροφη ρύθμιση και το κύτταρο προσπαθεί να διατηρήσει την αρχική του κατάσταση.

Στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσυνόλου #1 παρότι ο TLR7 είναι λειτουργικός, σε αντιστοιχία με τον TLR1/2 στο στερεότυπο υποσύνολο #4, παρατηρήθηκαν λίγες μεταγραφικές αλλαγές μεταξύ των δύο καταστάσεων (βασική/διεγερμένη). Συγκεκριμένα, μετά τη διέγερση του TLR7 παρατηρήθηκε η αναμενόμενη αύξηση της έκφρασης του TNF και μείωση της έκφρασης της MAP2K3 που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της p38 και της IFNG (Εικόνα 47Β). Φαίνεται ότι οι απαντήσεις στη διέγερση των υποδοχέων TLR ρυθμίζονται διαφορετικά ανάλογα με τον υποδοχέα και την ομάδα ασθενών. Στις περιπτώσεις non#4/16, που δεν απαντούσαν στη διέγερση μέσω TLR1/2, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης των γονιδίων IL6, MAP2K4, MAP4K4, NFKB2, SARM1, TICAM2, TLR6, TLR9, TNF και μείωση της έκφρασης των αναστολέων του μονοπατιού NFKBIL1 και SIGIRR (Εικόνα 47Γ). Φαίνεται ότι το μονοπάτι έχει την ικανότητα σηματοδότησης, αφού συμβαίνουν μεταγραφικές αλλαγές που υποδεικνύουν ότι η έκφραση των σηματοδοτικών μορίων αυξάνει, αλλά το σήμα ρυθμίζεται αρνητικά με κάποιον άλλο τρόπο, αφού η έκφραση των δεικτών ενεργοποίησης CD25 και CD86 τελικά δεν επηρεάζεται.

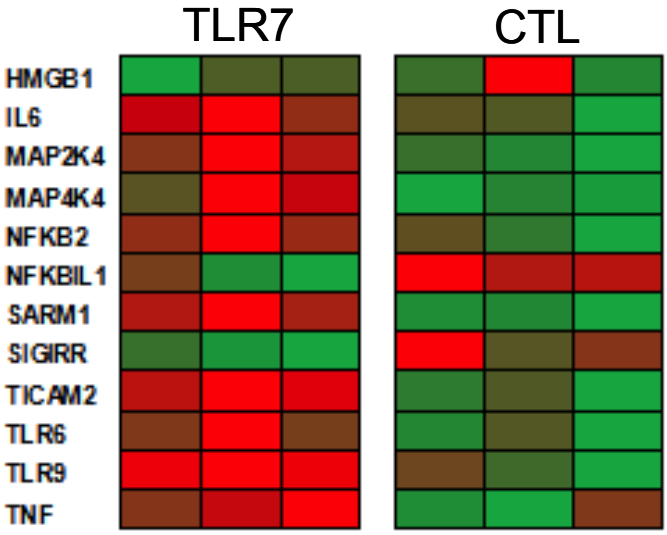
A.


TLR1/2
CTL
BTK
CASP8
CD180
CD86
ELK1
HMGB1
IKBKB
IL12A
IL8
IRAK1
IRAK2
IRF1
IRF3
JUN
LY86
MAP2K3
MAP3K1
MAP3K7
MAP3K7IP
MAPK8
MAPK8IP3
NFKBIL1
PELI1
PPARA
REL
RIPK2
SARM1
TIRAP
TLR1
TLR6
TLR7
TOLLIP
IL6
NFKBIA
TNF

Β.



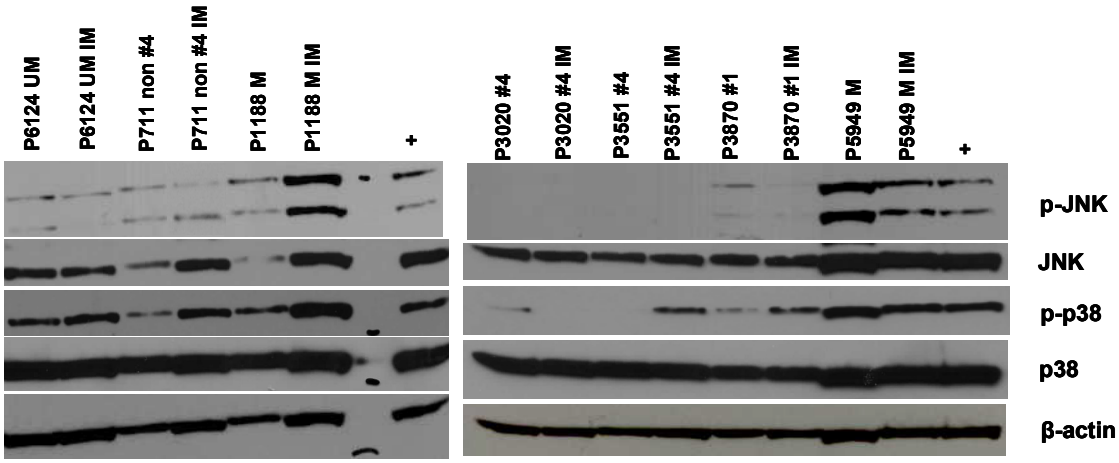
Γ.



Εικόνα 47. Τα ετερογενή λειτουργικά πρότυπα απάντησης στη διέγερση του μονοπατιού TLR σε υποομάδες ασθενών με ΧΛΛ σχετίζονται με διαφορετική μεταγραφική ρύθμιση. Τα κύτταρα της ΧΛΛ διεγέρθηκαν μέσω του TLR1/2 με Pam3CSK4 (στερεότυπο υποσύνολο #4 και περιπτώσεις non#4/16, Α και Γ αντιστοίχως) ή με Imiquimod (στερεότυπο υποσύνολο #1, Β). Οι cDNA μικροσυστοιχίες έδειξαν διαφορετική μεταγραφική ρύθμιση στο στερεότυπο υποσύνολο #4. Αντίθετα, στο στερεότυπο υποσύνολο #1 και στις περιπτώσεις non#4/16 συμβαίνουν άλλες διεργασίες που ρυθμίζουν το μονοπάτι είτε θετικά (στερεότυπο υποσύνολο #1) είτε αρνητικά (περιπτώσεις non#4/16). Ο χρωματικός κώδικας βασίστηκε στις τιμές ΔCt. Το πράσινο χρώμα αντιστοιχεί στη μεγαλύτερη τιμή ενώ το κόκκινο στη μικρότερη.

6.7.2 Ρύθμιση σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο

Οι διαφορές στην απάντηση μετά από διέγερση του TLR7 και ιδιαίτερα το γεγονός ότι το στερεότυπο υποσύνολο #4 δεν απαντά καθόλου σε αυτή τη διέγερση, σε αντίθεση με όλες τις άλλες περιπτώσεις, καθώς και το ότι οι συγκεκριμένες περιπτώσεις εκφράζουν τον TLR7 σε επίπεδα χαμηλότερα σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες ασθενών και ταυτόχρονα εκφράζουν το CD86 σε υψηλότερα επίπεδα, αποτελούν στοιχεία που υποδεικνύουν ότι τα κύτταρα αυτών των ασθενών μάλλον στο παρελθόν έχουν έρθει σε επαφή με κάποιον προσδέτη για τον TLR7 και έχουν γίνει ανεργικά (tolerant) για αυτόν το υποδοχέα. Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, η διέγερση μέσω του TLR7 επάγει την φωσφορυλίωση της TAK1, η οποία ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι της πρωτεϊνικής κινάσης SAPK ενεργοποιώντας μέσω φωσφορυλίωσης τις κινάσες MKK4 ή MKK3 και MKK6, οι οποίες με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν την JNK ή την p38, αντιστοίχως. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα προσδιορίστηκαν σε 12 ασθενείς τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών JNK και p38 στην αδιέγερτη κατάσταση και μετά από διέγερση του TLR7 για 1 ώρα[151]. Ως θετικό control, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα ΧΛΛ διεγερμένα με CpG για 1 ώρα[131]. Στις περισσότερες περιπτώσεις που μελετήθηκαν, οι πρωτεΐνες JNK και p38 ήταν φωσφορυλιωμένες και στις δύο καταστάσεις (διεγερμένη και αδιέγερτη), μολονότι τα επίπεδα φωσφορυλίωσης εμφάνιζαν ετερογένεια. Οι μόνες περιπτώσεις που διέφεραν ήταν εκείνες του στερεότυπου υποσυνόλου #4 στις οποίες παρατηρήθηκαν χαμηλά έως μηδενικά επίπεδα φωσφορυλίωσης της JNK ή της p38, ενώ τα επίπεδα έκφρασης της ολικής πρωτεΐνης ήταν συγκρίσιμα με των υπολοίπων περιπτώσεων (Εικόνα 48). Αυτή η συνολική εικόνα αποτελεί τη βιοχημική σφραγίδα ανεργίας για τον υποδοχέα TLR7[151].



Εικόνα 48: Η διέγερση μέσω του TLR7 ρυθμίζει τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών p38 και JNK σε όλους τους ασθενείς εκτός από το στερεότυπο υποσύνολο #4. Μελέτες ανοσοαποτύπωσης σε υποομάδες ασθενών με ΧΛΛ. Η διέγερση μέσω του TLR7 με Imiquimod επηρεάζει τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών JNK και p-38 σε διάφορες υποομάδες ασθενών με ΧΛΛ (μεταλλαγμένες και αμετάλλακτες) με εξαίρεση τις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσυνόλου #4. M: «μεταλλαγμένες» περιπτώσεις ΧΛΛ; UM: «αμετάλλακτες» περιπτώσεις ΧΛΛ; non#4: περιπτώσεις που εκφράζουν το γονίδιο IGHV4-34 σε μη στερεότυπες αναδιατάξεις; #1, #4: στερεότυπο υποσύνολο #1, #4; +: θετικό control.

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

7.1 Γενικά

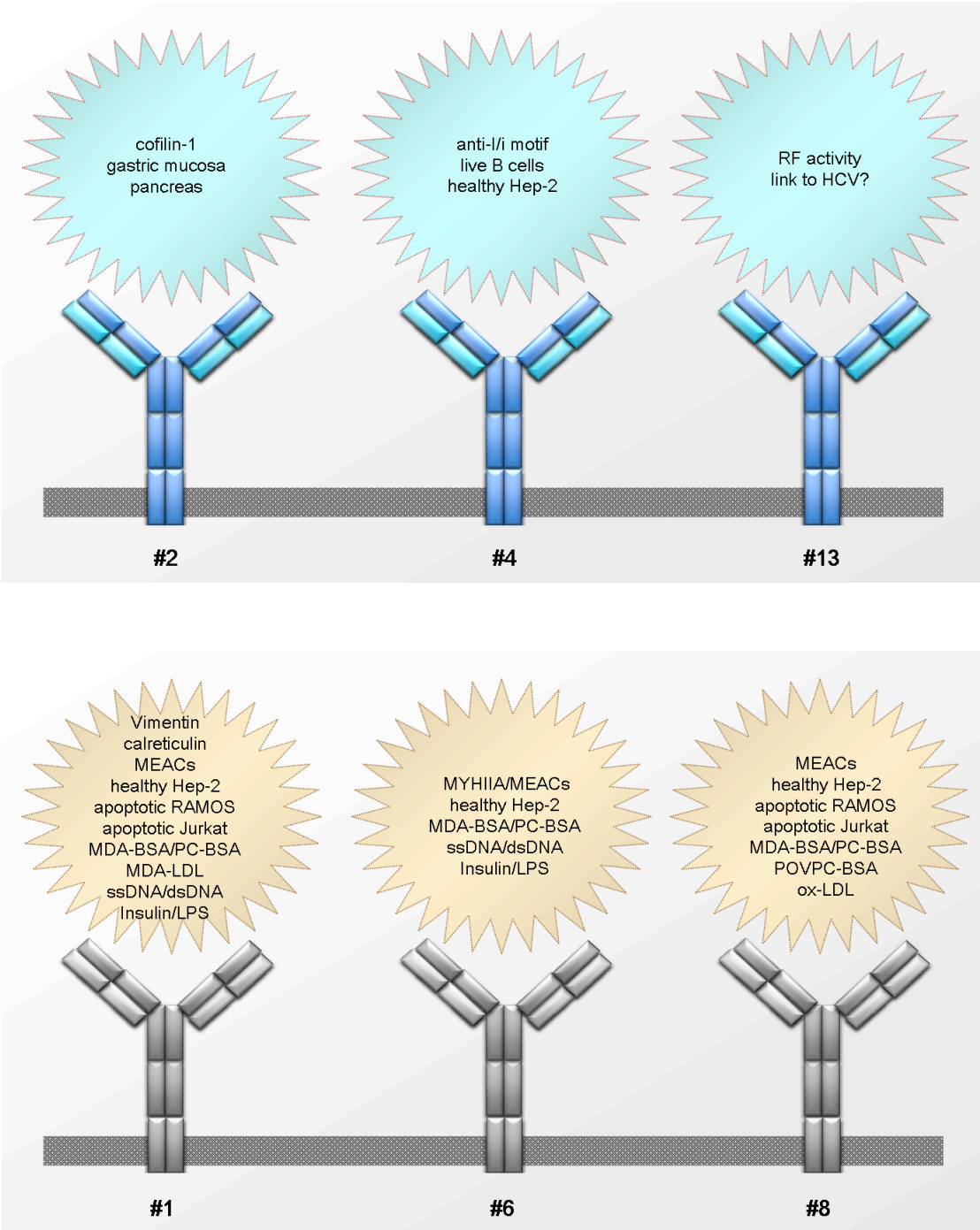
Πρόσφατα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η διέγερση μέσω του BcR διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της ΧΛΛ. Τα δεδομένα που έχουν οδηγήσει σε αυτό το συμπέρασμα και προσφέρουν ισχυρές ενδείξεις ότι στην παθογένεια της νόσου εμπλέκεται περιορισμένος αριθμός παθογόνων[158] συνοπτικά είναι τα εξής: (i) η επιλεκτικότητα του ρεπερτορίου των γονιδίων IGHV[5,33,34,36,46-48], (ii) η διαφορετική πρόγνωση για ασθενείς με διαφορετικό status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV[6,24,49] και (iii) η ύπαρξη υποσυνόλων ασθενών οι οποίοι φέρουν BcRs με σχεδόν πανομοιότυπες περιοχές CDR3 (στερεότυπους BcR), σε συχνότητα περίπου 30% του συνόλου[33,34,46,48].

Μελέτες από τη δεκαετία του 1980 έδειξαν ότι οι BcR των κυττάρων της ΧΛΛ εμφανίζουν πολυαντιδραστικότητα και προσδένουν αυτοαντιγόνα, όπως IgG, καρδιολιπίνη, ακτίνη, και DNA[159,160]. Πιο πρόσφατα δεδομένα έδειξαν ότι οι BcR που φέρουν αμετάλλακτα γονίδια IGHV είναι πολυαντιδραστικοί και προσδένουν DNA, ινσουλίνη και LPS. Αντίθετα, οι BcR που φέρουν μεταλλαγμένα γονίδια IGHV δεν ήταν πολυαντιδραστικοί, όμως όταν απομακρυνόταν οι μεταλλάξεις έδειχναν πρότυπα αντιδραστικότητας όμοια με την Α-ΧΛΛ. Με βάση αυτά τα ευρήματα, οι συγγραφείς πρότειναν ότι όλα τα κύτταρα της ΧΛΛ προέρχονται από Β λεμφοκύτταρα που παράγουν πολυαντιδραστικά αντισώματα, τα οποία είτε διατηρούν (Α-ΧΛΛ) είτε χάνουν την πολυαντιδραστικότητά τους (Μ-ΧΛΛ) εξαιτίας της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης[70]. Αργότερα, αρκετές μελέτες έδειξαν ότι πολλά αντισώματα της ΧΛΛ προσδένουν μοριακές δομές στην επιφάνεια αποπτωτικών κυττάρων και βακτηρίων, όπως βιμεντίνη, cofilin-1, PRAP-1, καρδιολιπίνη, οξειδωμένη LDL και πολυσακχαρίτες του στρεπτόκοκκου (*Streptococcus pneumoniae).* Επίσης, έδειξαν ότι οι περιπτώσεις που ανήκουν σε στερεότυπα υποσύνολα εμφανίζουν ιδιαίτερα πρότυπα αναγνώρισης παθογόνων (Εικόνα 49)[73,74]. Πρόσφατα επιδημιολογικά ευρήματα αναφέρουν ότι οι λοιμώξεις του αναπνευστικού σχετίζονται με μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης ΧΛΛ[161]. Επίσης, σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα, τα περισσότερα αντισώματα της Α-ΧΛΛ

προσδένουν ακέραια βακτήρια πολλών στελεχών. Τα δεδομένα αυτά προτείνουν ένα πιθανό μοντέλο ανάπτυξης της ΧΛΛ, σύμφωνα με το οποίο η νόσος ίσως προκαλείται από φυσιολογικά Β λεμφοκύτταρα που συμμετέχουν στην απομάκρυνση κυτταρικών υπολειμμάτων κατά την κυτταρική απόπτωση και στην αναγνώριση και καταπολέμηση βακτηρίων. Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, είναι πιθανό βακτηριακές λοιμώξεις να δρουν συνεργικά με νεο-αντιγόνα ή αυτό-αντιγόνα ή αποπτωτικά κύτταρα και να οδηγούν τα πρόδρομα κύτταρα ή τα ίδια τα λευχαιμικά κύτταρα της ΧΛΛ σε εξέλιξη ή πολλαπλασιασμό, διεγείροντας συνεχώς το BcR[74].

Το ακριβές χρονικό πλαίσιο της αλληλεπίδρασης, η διάρκειά της και, κυρίως, η φύση της αντιγονικής διέγερσης παραμένουν μέχρι σήμερα άγνωστα. Επιπλέον, μολονότι ο ρόλος του BcR έχει μελετηθεί εκτενώς, η ανάλυση άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών που είναι ανεξάρτητα ή αλληλεπιδρούν με το μονοπάτι του BcR, βρίσκεται ακόμα σε αρχικά στάδια. Αυτό ισχύει και για τους υποδοχείς έμφυτης ανοσίας (π.χ. TLR, NLR), οι οποίοι αναγνωρίζουν μοριακά μοτίβα κοινών παθογόνων. Το γεγονός αυτό καθιστά τους υποδοχείς TLR ένα πολύ ενδιαφέρον πεδίο έρευνας, αφού πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η ταυτόχρονη διέγερση μέσω BcR και TLR από σύμπλοκα αντιγόνου-DNA/RNA μπορεί να σπάσουν την αυτο-ανοχή[89,90]. Όπως προαναφέρθηκε, οι υποδοχείς TLR και NLR είναι λειτουργικοί στα Β λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ, η δράση τους είναι συνδιεγερτική προς τον BcR και κάθε μέλος της οικογένειας αναγνωρίζει διαφορετικές τάξεις παθογόνων[76,127,150].

Σε αυτό το πλαίσιο και σε συνδυασμό με τα δεδομένα που δείχνουν ότι υποομάδες ασθενών, ιδιαίτερα αυτοί που ανήκουν σε στερεότυπα υποσύνολα, εμφανίζουν ιδιαίτερα πρότυπα αναγνώρισης παθογόνων, η παρούσα μελέτη εστίασε στην ανάλυση του προτύπου έκφρασης και λειτουργικότητας των υποδοχέων έμφυτης ανοσίας TLR και NLR σε μια μεγάλη και καλά χαρακτηρισμένη σειρά ασθενών με ΧΛΛ. Σκοπός της μελέτης ήταν η αναγνώριση ειδικών προτύπων έκφρασης και λειτουργικότητας των υποδοχέων TLR και NLR σε υποομάδες ασθενών με ΧΛΛ που ορίστηκαν με βάση τα μοριακά χαρακτηριστικά των BcR τους καθώς και η συσχέτιση με τα κλινικοβιολογικά χαρακτηριστικά της νόσου.



Εικόνα 49: Πρότυπα αντιδραστικότητας επιλεγμένων στερεότυπων υποσυνόλων. Τα αντισώματα της Α-ΧΛΛ είναι πολυαντιδραστικά και προσδένουν αυτοαντιγόνα, σε αντίθεση με τα αντισώματα της Μ-ΧΛΛ. Α. Τα στερεότυπα υποσύνολα #2, #4 and #32 φέρουν μεταλλαγμένους BcR και εμφανίζουν ιδιαίτερα πρότυπα αντιδραστικότητας. Β. Τα στερεότυπα υποσύνολα #1, #6, #8 φέρουν αμετάλλακτους BcR και είναι πολυαντιδραστικά, με διαφορετικά, ωστόσο, πρότυπα αναγνώρισης.

7.2 Πρότυπο έκφρασης των υποδοχέων TLR και μορίων του σηματοδοτικού μονοπατιού στη ΧΛΛ

Τα διαθέσιμα δεδομένα για την έκφραση των υποδοχέων TLR στη ΧΛΛ είναι περιορισμένα και προέρχονται από αναλύσεις σε μικρές ομάδες ασθενών[135,162,163]. Στο πρώτο μέρος της παρούσας μελέτης, πραγματοποιήθηκε συστηματική ανάλυση της έκφρασης των υποδοχέων TLR και NLR καθώς και κρίσιμων μορίων του σηματοδοτικού μονοπατιού (προσαρμοστές, τελεστές, μόρια που εμπλέκονται σε άλλες σηματοδοτικές οδούς που αλληλεπιδρούν με τους TLR, καθώς και τελικά μόρια-στόχοι). Με τη χρήση cDNA μικροσυστοιχιών, οι οποίες σχεδιάστηκαν ώστε να επιτρέπουν την ανάλυση γονιδίων που αντιπροσωπεύουν τα πιο κρίσιμα μόρια της σηματοδότησης των υποδοχέων TLR, αναλύθηκαν συνολικά 84 γονίδια. Συγκεκριμένα, αναλύθηκαν γονίδια που κωδικοποιούν για τους υποδοχείς TLR (TLR1-10), το μόριο CD180, που ανήκει στην οικογένεια των TLR ο αρνητικός ρυθμιστής του μονοπατιού των TLR, SIGIRR. Επίσης, αναλύθηκαν όλοι οι προσαρμοστές του μονοπατιού που που δρουν καθοδικά των υποδοχέων TLR (MYD88, TICAM1, TICAM2, TIRAP, SARM1). Καθοδικά αναλύθηκαν τα μόρια που σχηματίζουν το κύριο σηματοδοτικό σύμπλοκο, όπως οι IRAK1, IRAK2, TRAF6, TAB1, UBE2N, UBE2V1. Από τα άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια που αλληλεπιδρούν με το μονοπάτι των TLR η συστοιχία περιείχε όλα τα κύρια μέλη της οικογένειας NF-κB (IKBKB, CHUK, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, NFKBIL1, NFRKB, REL, RELA) και σημαντικά μέλη της οικογένειας των MAP κινασών που αντιπροσωπεύουν όλους τις κλάδους του μονοπατιού (MAP4K4, MAP3K7, MAP3K1, MAP2K3, MAP2K4 MAPK8IP3, ELK1, FOS, JUN, MAPK8) και της σηματοδότησης IRF (IRF1, IRF3). Τέλος αναλύθηκαν οι ιντερφερόνες, κυτταροκίνες και τα συνδιεγερτικά μόρια που έχει βρεθεί ότι παράγονται μετά από ενεργοποίηση των υποδοχέων TLR. Επίσης, μελετήθηκε η έκφραση των υποδοχέων NOD1 και NOD2, που είναι μέλη της οικογένειας των υποδοχέων NLR και αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς TLR. Φαίνεται ότι και οι δύο υποδοχείς εκφράζονται αλλά σε διαφορετικό βαθμό. Συγκεκριμένα, ο υποδοχέας NOD1 εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με τον υποδοχέα NOD2.

Η ανάλυση αποκάλυψε υψηλή έκφραση των TLR7 και CD180, ενδιάμεση έκφραση των TLR1, TLR6 και TLR10, χαμηλή έκφραση των TLR2 και TLR9 και απουσία έκφρασης των TLR4 και TLR8. Επίσης, εκφράζονταν τα μέλη της οικογένειας NLR,

NOD1 και NOD2. Συνολικά, το συγκεκριμένο πρότυπο προσομοιάζει με το αντίστοιχο πρότυπο Β λεμφοκυττάρων με εμπειρία αντιγόνου[135], και επιβεβαιώνει ότι τα κύτταρα της ΧΛΛ έχουν έρθει σε επαφή με αντιγόνο ανεξάρτητα από το status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η χαμηλή έκφραση του TLR9 τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο στην πλειονότητα των περιπτώσεων. Η διέγερση μέσω του TLR9 χρησιμοποιείται ευρέως για την ενεργοποίηση των κυττάρων της ΧΛΛ με κυριότερο παράδειγμα τη χρήση των ολιγονουκεοτιδίων CpG για τη λήψη μεταφάσεων στην κλασική κυτταρογενετική ανάλυση. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι η επίδραση του συγκεκριμένου προσδέτη ίσως μεσολαβείτε και από άλλα είδη υποδοχέων.

Η υψηλή έκφραση του TLR7 συνάδει με τα αποτελέσματα μελετών που δείχνουν ότι η διέγερσή του επηρεάζει τα Β λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ αυξάνοντας την έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων τους και καθιστώντας τα πιο ανοσογόνα[132,151]. Το αποτέλεσμα για την έκφραση του CD180 επιβεβαιώνει προηγούμενες μελέτες που δείχνουν ότι το μόριο εκφράζεται στα κύτταρα της ΧΛΛ και είναι λειτουργικό σε κάποιες περιπτώσεις[152].

Ακόμη, η ανάλυση έδειξε ότι στο σύνολο των ασθενών τα περισσότερα σηματοδοτικά μόρια καθοδικά των υποδοχέων εκφραζόταν σε υψηλά ή ενδιάμεσα επίπεδα, ενώ οι αναστολείς του μονοπατιού παρουσίαζαν χαμηλή έκφραση, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα κύτταρα της ΧΛΛ είναι ικανά για σηματοδότηση μέσω των υποδοχέων TLR και NLR.

Συγκεκριμένα, ο MyD88, ο οποίος είναι ο κύριος προσαρμοστής και χρησιμοποιείται από όλους τους TLR που εκφράζονται στη ΧΛΛ, παρουσίαζε υψηλή έκφραση. Το ίδιο συνέβαινε και με τον TICAM1 ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη σηματοδότηση μέσω TLR3 και TLR4. Η έκφραση των ενδιάμεσων προσαρμογέων TICAM2 και TIRAP που χρησιμεύουν στην επιστράτευση των MyD88 και TICAM1 στους υποδοχείς TLR4 και TLR3 ήταν χαμηλή και αυτό συνάδει με την πολύ χαμηλή έκφραση των TLR3 και TLR4. Τέλος, η έκφραση του SARM1 που ακόμα η λειτουργία του στο μονοπάτι δεν είναι ξεκάθαρη ήταν ενδιάμεση. Όλα τα παραπάνω δείχνουν ότι το μονοπάτι καθοδικά των υποδοχέων που εκφράζονται στα κύτταρα της ΧΛΛ είναι ικανό για σηματοδότηση.

Οι τελεστές, που ρυθμίζουν τη λειτουργία του μονοπατιού, παρουσίαζαν διακυμάνσεις στα επίπεδα έκφρασης και φαίνεται ότι από το σημείο αυτό αρχίζει να διαφοροποιείται η σηματοδότηση καθοδικά των υποδοχέων. Συγκεκριμένα, οι TRAF6 και UBE2N παρουσίαζαν υψηλή έκφραση, ενώ οι IRAK1, IRAK2 και TAB1 ενδιάμεση. Όσον αφορά το μονοπάτι NF-κB τα μόρια CHUK, IKBKB εμφάνιζαν υψηλή έκφραση, το ίδιο όμως και ο αναστολέας NFKBIA. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις τέσσερις υπομονάδες του NF-κB (NFKB1, NFKB2, RELA και REL), τα οποία ενεργοποιούνται μετά τη φωσφορυλίωση του NFKBIA από τις IKK, παρουσίαζαν υψηλή και ενδιάμεση έκφραση, γεγονός που δείχνει ότι το μονοπάτι είναι λειτουργικό. Το ίδιο παρατηρήθηκε και για τα μέλη της οικογένειας MAPK, τα οποία επίσης παρουσίαζαν διακυμάνσεις μεταξύ των ασθενών.

Οι ιντερλευκίνες (IL12A, IL6, IL10, IL8) και ο TNF παρουσίαζαν ενδιάμεση ή χαμηλή έκφραση αλλά εμφάνιζαν μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των). Το ίδιο συνέβαινε και με τα συνδιεγερτικά μόρια CD80 (χαμηλή έκφραση) και CD86 (ενδιάμεση έκφραση). Το γεγονός αυτό φαίνεται να αντικατοπτρίζει το αποτέλεσμα των διαφορικά εκφραζόμενων μορίων, αφού το τελικό αποτέλεσμα, δηλαδή η ενεργοποίηση των τελικών μορίων στόχων, εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια.

Η αναζήτηση συσχετίσεων μεταξύ της έκφρασης των μορίων που αναλύθηκαν με τα ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά των BcR απέδωσε ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Οι υποομάδες ασθενών με διαφορετικό status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση συγκεκριμένων μορίων. Μεταξύ αυτών, τα συνδιεγερτικά μόρια CD80 και CD86 που είναι μέλη της οικογένειας B7 και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των B με τα T λεμφοκύτταρα, υπερεκφράζονταν στις μεταλλαγμένες περιπτώσεις ΧΛΛ. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι τα κύτταρα των συγκεκριμένων περιπτώσεων αυτών είναι πιο ανοσογόνα, ιδιότητα που πιθανόν σχετίζεται με την καλύτερη κλινική πορεία τους. Η IL6 αναστέλλει την ανάπτυξη των B λεμφοκυττάρων της ΧΛΛ παρεμποδίζοντας την δράση του TNF[153]. Η έκφραση της IL6 στα κύτταρα της ΧΛΛ είναι γενικά χαμηλή και η υπερέκφρασή της στη Μ-ΧΛΛ δείχνει ότι αυτός μπορεί να είναι ένας μηχανισμός που παρεμποδίζει την ανάπτυξή τους. Οι TLR4 και TLR8, αν και εμφάνισαν διαφορές εκφραζόταν σε πολύ χαμηλά επίπεδα και δεν εκφραζόταν ούτε σε πρωτεϊνικό επίπεδο σε καμία περίπτωση, συνεπώς η διαφορά στην

έκφραση δε έχει κάποιο βιολογικό αποτέλεσμα. Η δράση του NFKBIL1 δεν είναι ακόμα ξεκάθαρη, φαίνεται όμως να λειτουργεί σαν αρνητικός ρυθμιστής του NF-κB. Η σύγκριση περιπτώσεων που ανήκουν σε διαφορετικά στερεότυπα υποσύνολα (#1, #4 και #8) αποκάλυψε ιδιαίτερα γονιδιακά πρότυπα έκφρασης σε κάθε υποσύνολο, ένδειξη για ιδιαίτερα πρότυπα αναγνώρισης και επιλογής από αντιγόνα. Οι ασθενείς του στερεότυπου υποσυνόλου #4 φέρουν μεταλλαγμένους BcR και έχουν καλή κλινική πορεία. Οι ασθενείς των στερεότυπων υποσυνόλων #1 και #8 φέρουν αμετάλλακτους BcR και εμφανίζουν επιθετική νόσο. Συγκεκριμένα η σύγκριση του στερεότυπου υποσυνόλου #1 με το #4, τα οποία είναι καλά χαρακτηρισμένα, έδειξε μεγαλύτερη έκφραση του CD86 και η μικρότερη έκφραση του TLR7 στο στερεότυπο υποσύνολο #4. Τα δεδομένα αυτά χαρακτηρίζουν κύτταρα που έχουν καταστεί ανεργικά μέσω του TLR7 λόγω προηγούμενης in vivo επαφής τους με κάποιον προσδέτη του TLR7. Επιπλέον, η υπερέκφραση του αναστολέα του NF-κB, NFKBIA, στο στερεότυπο υποσύνολο #1 πιθανόν συνδέεται με τη χαμηλή έκφραση του CD86, αφού έχει βρεθεί ότι ο NF-κB ρυθμίζει την έκφραση του CD86 σε άλλους κυτταρικούς τύπους π.χ. δενδριτικά κύτταρα. Τα βιολογικά χαρακτηριστικά του στερεότυπου υποσυνόλου #8 δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς, συνεπώς τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης μπορεί να αξιοποιηθούν προς αυτή την κατεύθυνση σε συνδυασμό με μελλοντικές μελέτες. Συνολικά, οι διαφορές που εμφανίζονται στα στερεότυπα υποσύνολα υποδηλώνουν διαφορές στη σηματοδότηση μέσω των υποδοχέων TLR που αντικατοπτρίζονται στη διαφορετική κλινική πορεία των ασθενών.

Τέλος, η σύγκριση των περιπτώσεων που ανήκουν σε στερεότυπα υποσύνολα με περιπτώσεις που έχουν ίδιο status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV καθώς και με περιπτώσεις που χρησιμοποιούν το ίδιο γονίδιο IGHV σε μη στερεότυπες αναδιατάξεις ανέδειξε ότι τα ιδιαίτερα πρότυπα έκφρασης των υποδοχέων TLR είναι χαρακτηριστικά των στερεότυπων υποσυνόλων, ανεξάρτητα από τη χρήση συγκεκριμένου γονιδίου IGHV ή status μεταλλάξεων.

7.3 Πρότυπο λειτουργικότητας των υποδοχέων TLR και NOD2 στη ΧΛΛ

Η παρούσα μελέτη επιβεβαίωσε ότι οι υποδοχείς TLR και NLR είναι λειτουργικοί στα κύτταρα της ΧΛΛ και αποκάλυψε διαφορετικά πρότυπα λειτουργικότητας και/ή ανεργίας ανάμεσα σε υποομάδες ασθενών με ΧΛΛ, ιδίως με στερεότυπους BcR. Συγκεκριμένα, σε 69 ασθενείς με ΧΛΛ, αναλύσαμε το πρότυπο λειτουργικότητας των υποδοχέων TLR που εκφραζόταν σε επίπεδο mRNA και μεταφραζόταν σε πρωτεΐνη ήταν λειτουργικοί στα Β λεμφοκύτταρα των ασθενών με ΧΛΛ. Λόγω των διαφορών που παρουσίασαν στην έκφρασης μεταξύ υποομάδων ασθενών με ΧΛΛ, μελετήθηκε επίσης η λειτουργικότητα των TLR4 και TLR8, αν και η έκφρασή τους τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε πρωτεϊνικό ήταν χαμηλή έως μηδενική.

Επίσης, μελετήθηκε η λειτουργικότητα του υποδοχέα NOD2 για τον οποίο υπάρχει διαθέσιμος προσδέτης. Έχει βρεθεί ότι η διέγερση των υποδοχέων TLR και NOD2 στα κύτταρα της ΧΛΛ επάγει την έκφραση πολλών μορίων, όπως CD80, CD86, CD25, CD83, CD54[132,135]. Η αύξηση της έκφρασης όλων αυτών των δεικτών δείχνει ότι η διέγερση μέσω TLR καθιστά τα κύτταρα της ΧΛΛ πιο ανοσογόνα και πιο ευαίσθητα στη δράση των Τ κυτταροτοξικών κυττάρων[132]. Για την απάντηση του συγκεκριμένου ερωτήματος μελετήθηκε η έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων CD25 και CD86 μετά από διέγερση των υποδοχέων TLR και NOD2 σε 67 ασθενείς με ΧΛΛ. Επιλέχθηκε το συνδιεγερτικό μόριο CD86, επειδή έχει βρεθεί ότι είναι ο πιο αξιόπιστος δείκτης για τη μέτρηση της ενεργοποίησης των Β λεμφοκυττάρων της ΧΛΛ, ακόμα και όταν η έκφραση των TLR είναι χαμηλή[154]. Τα Β λεμφοκύτταρα που εκφράζουν CD25 (υποδοχέας της IL2, IL-2R a αλυσίδα) φαίνεται ότι είναι πιο ικανά στην ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων. Επίσης, η διέγερση μέσω TLR επάγει την έκφραση του CD25 και έτσι προσδίδει στα Β λεμφοκύτταρα την ικανότητα ενεργοποίησης Τ λεμφοκυττάρων[155]. Επιπλέον, μελετήθηκε η βιωσιμότητα των CD19+ κυττάρων μετά από διέγερση των υποδοχέων TLR και NOD2 σε 30 περιπτώσεις ΧΛΛ. Επιβεβαιώσαμε ότι εκτός από τους TLR7 και TLR9, που ήδη γνωρίζαμε ότι είναι λειτουργικοί, επίσης λειτουργικοί είναι και οι υποδοχείς TLR1/2, TLR2/6 και NOD2. Οι TLR4 και TLR8 δεν είναι λειτουργικοί, αποτέλεσμα που συμφωνεί με τα πολύ χαμηλά έως μηδενικά επίπεδα έκφρασής τους.

Και κατά τη μελέτη της απόπτωσης τα αποτελέσματα, όσον αφορά το πρότυπο λειτουργικότητας των υποδοχέων TLR, συμφωνούσαν με τα αποτελέσματα της μελέτης των μορίων ενεργοποίησης. Στο σύνολο των ασθενών, η διέγερση του TLR7 με Im προκαλούσε απόπτωση των κυττάρων τις ημέρες 6 και 9, ενώ η διέγερση των TLR1/2, TLR2/6 και NOD2 με τους κατάλληλους προσδέτες είχε αντιαποπτωτική δράση την ημέρα 9, σε σύγκριση με το αδιέγερτο control. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η διέγερση διαφορετικών μελών της οικογένειας TLR επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο τα κύτταρα της ΧΛΛ.

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι υποδοχείς TLR1/2, TLR2/6 και NOD2 παρουσίαζαν όμοια πρότυπα λειτουργικότητας, καθώς, ανά περίπτωση, οι απαντήσεις τους στη διέγερση με τον κατάλληλο προσδέτη ήταν παρόμοιες. Το αποτέλεσμα αυτό είναι ίσως αναμενόμενο, καθώς και οι τρείς υποδοχείς αναγνωρίζουν μοριακά μοτίβα που συνυπάρχουν στον ίδιο τύπο παθογόνων. Τα ετεροδιμερή TLR1/2 και TLR2/6 αναγνωρίζουν διάκυλο- και τριάκυλο-λιποπεπτίδια των Gram-θετικών βακτηρίων, αντιστοίχως[106,107], ενώ ο NOD2 αναγνωρίζει την πεπτιδογλυκάνη τόσο των Gram- βακτηρίων όσο και των Gram+ βακτηρίων[119]. Συνεπώς, τα συγκεκριμένα αποτελέσματα ενισχύουν την άποψη ότι ένα μοναδικό παθογόνο μπορεί να επηρεάσει τα κύτταρα της ΧΛΛ μέσω ταυτόχρονης αλληλεπίδρασης με πολλούς διαφορετικούς υποδοχείς.

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης αποκάλυψαν μεγάλη ετερογένεια στα πρότυπα λειτουργικότητας των υποδοχέων TLR και NOD2 στις διαφορετικές περιπτώσεις που μελετήθηκαν και για πρώτη φορά η παρατηρούμενη ετερογένεια συσχετίσθηκε με τα ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά των BcR.

Αρχικά παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων ανάμεσα σε υποομάδες ασθενών με διαφορετικό status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV μετά από διέγερση συγκεκριμένων υποδοχέων. Η διέγερση με CpG ή Imiquimod διέγειρε πιο αποτελεσματικά την έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων στις μεταλλαγμένες ή αμετάλλακτες περιπτώσεις ΧΛΛ, αντιστοίχως. Επιπλέον, η διέγερση του TLR7 προκαλούσε αύξηση της έκφρασης μόνο του CD25, ενώ του TLR9 προκαλούσε αύξηση της έκφρασης και των δύο συνδιεγερτικών μορίων που αναλύθηκαν. Το διαφορετικό αποτέλεσμα ανάμεσα στα δύο μόρια, δείχνει ότι η έκφραση των CD25 και CD86 ρυθμίζεται από

διαφορετικούς κλάδους των μονοπατιών καθοδικά των υποδοχέων. Η διαφορετική λειτουργικότητα των υποδοχέων TLR σε σχέση με το status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV αντικατοπτρίζει την ικανότητα των κυττάρων να αλληλεπιδρούν με παθογόνα. Φαίνεται ότι τα κύτταρα της Α-ΧΛΛ σε συνδυασμό με την πολυαντιδραστικότητα μέσω BcR και αντίθετα από τη Μ-ΧΛΛ, έχουν την ικανότητα αναγνώρισης πολλών διαφορετικών παθογόνων και μέσω TLR αφού εμφανίζουν επιπλέον λειτουργικότητα του TLR7, ο οποίος αναγνωρίζει RNA.

Επιπλέον, παρατηρήθηκαν διαφορές στη βιωσιμότητα των κυττάρων της ΧΛΛ, εφόσον η διέγερση συγκεκριμένων υποδοχέων είχε ουσιαστική επίπτωση μόνο στις μεταλλαγμένες περιπτώσεις ΧΛΛ ενώ δεν είχε κανένα αποτέλεσμα στις αμετάλλακτες περιπτώσεις. Αυτό το αποτέλεσμα βρίσκεται σε συμφωνία με μια πρόσφατη μελέτη που αποκάλυψε ότι η διέγερση μέσω του TLR9 επάγει επιλεκτικά την απόπτωση μόνο στις «μεταλλαγμένες» περιπτώσεις ΧΛΛ[131].

Συνεπώς, εξάγεται με ασφάλεια το συμπέρασμα ότι οι περιπτώσεις ΧΛΛ με διαφορετικό status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα λειτουργικότητας των υποδοχέων TLR. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με δεδομένα που δείχνουν σαφώς διαφορετική σηματοδότηση των δύο υποομάδων μέσω και του BcR[50,51,67], υποδεικνύουν ιδιαίτερα πρότυπα συνεργασίας των BcR με συγκεκριμένα μέλη της οικογένειας των υποδοχέων TLR ανάλογα με το status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV. Το αποτέλεσμα αυτής της συνεργασίας αναμένεται να έχει σημαντική επίδραση στη συμπεριφορά του νεοπλασματικού κλώνου και πιθανόν σχετίζεται με τη διαφορετική κλινική πορεία των ασθενών με μεταλλαγμένους ή αμετάλλακτους υποδοχείς.

Η ομαδοποίηση των περιπτώσεων της ΧΛΛ σε στερεότυπα υποσύνολα, σε συνδυασμό ή ανεξάρτητα από το status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV, είναι λειτουργικά και, πολύ πιθανόν, κλινικά σημαντική[33,34,48]. Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στα στερεότυπα υποσύνολα #1 και #4.

Οι ασθενείς με ΧΛΛ που κατατάσσονται στο στερεότυπο υποσύνολο #4 χρησιμοποιούν το γονίδιο IGHV4-34. Οι ανοσοσφαιρίνες IGHV4-34 εμφανίζουν εγγενή αυτοαντιδραστικότητα, καθώς αναγνωρίζουν μέσω της περιοχής FR1 τον αντιγονικό καθοριστή της N-ακετυλο-λακτοζαμίνης (N-acetyllactosamine, NAL) που εκφράζεται στην ομάδα των αντιγόνων αίματος I/i. Ορισμένες ανοσοσφαιρίνες

IGHV4-34 μπορούν να προσδέσουν μόρια DNA. Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι συγκεκριμένες ανοσοσφαιρίνες αναγνωρίζουν και μια ισομορφή του επιφανειακού υποδοχέα CD45 που εκφράζεται κυρίως από τα άωρα Β λεμφοκύτταρα[164]. Παρόλο που το γονίδιο IGHV4-34 είναι ένα από τα συχνότερα γονίδια IGHV στον άνθρωπο, τέτοιου είδους αντισώματα σπάνοια εντοπίζονται στον ορό υγειών δοτών γεγονός που δείχνει ότι αυτά τα πολύ-αντιδραστικά Β λεμφοκύτταρα καθίστανται ανεργικά.

Οι ασθενείς με ΧΛΛ που κατατάσσονται στο στερεότυπο υποσύνολο #4 χρησιμοποιούν το γονίδιο IGHV4-34 σε συνδυασμό με το γονίδιο IGKV2-30 και οι αντιγονικοί υποδοχείς τους εμφανίζουν ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά. Η περιοχή VH CDR3 έχει μεγάλο μήκος και είναι πλούσια σε αρωματικά και θετικά φορτισμένα αμινοξέα, των οποίων η παρουσία συνδέεται με δραστικότητα εναντίον μορίων DNA[34,165]. Επιπλέον, η σωματική υπερμεταλλαξιγένεση είναι στοχευμένη και οδηγεί σε "στερεότυπες" αλλαγές αμινοξέων ενώ η περιοχή VH FR1 που είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση υπεραντιγόνων που εκφράζουν τον επίτοπο της N-ακετυλο-λακτοζαμίνης[33] παραμένει άθικτη. Αντισώματα που φέρουν το γονίδιο IGHV4-34 εντοπίζονται σε ασθενείς με Ερυθηματώδη Λύκο (SLE), καθώς και σε υγιείς δότες μετά από οξεία μόλυνση με EBV, CMV and M. pneumoniae[166]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το στερεότυπο υποσύνολο #4 έχει συσχετιστεί με επίμονη μόλυνση από CMV and EBV was correlated specifically with the stereotyped subset #4[167]. Πρόσφατα βρέθηκε ότι το στερεότυπο υποσύνολο #4 χαρακτηρίζεται από ενδοκλωνική ετερογένεια πιθανόν λόγω συνεχούς αλληλεπίδρασης με παθογόνα μετά τη λευχαιμική εξαλλαγή[167,168]. Τέλος, εμφανίζει ιδιαίτερα πρότυπα πολυμορφισμών (SNPs)[169] και γονιδιακής έκφρασης[170]. Οι ασθενείς του στερεότυπου υποσυνόλου #4 εμφανίζουν πολύ καλή κλινική πορεία και συνήθως δεν τους χορηγείται θεραπεία. Όλα τα παραπάνω υποδηλώνουν την κοινή αναγνώριση ιδιαίτερων, ξεχωριστών αντιγόνων ή κατηγοριών δομικά όμοιων επιτόπων, η οποία ακολουθείται από επιλογή των λευχαιμικών κλώνων.

Το στερεότυπο υποσύνολο #1 περιλαμβάνει ασθενείς με αμετάλλακτες IGHV1/5/7 clan/IGHD5-12/IGHJ6 βαριές αλυσίδες και IGKV1-39/1D-39-IGKJ2 κ-ελαφριές αλυσίδες. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η ποικιλότητα της χρησιμοποίησης IGHV γονιδίων αφορά μόνο σε γονίδια που ανήκουν στην ίδια φυλογενετική υποομάδα (clan) (γονίδια: IGHV1-2/IGHV1-3/IGHV1-18/IGHV5-a). Οι

VH CDR3 περιοχές των ασθενών του στερεότυπου υποσυνόλου #1 φέρουν τη συντηρημένη αλληλουχία αμινοξέων QWL (όπου: Q= γλουταμίνη W= τρυπτοφάνη L= λευκίνη). Τα αντισώματα του στερεότυπου υποσυνόλου #1 αναγνωρίζουν προϊόντα που δημιουργούνται κατά την απόπτωση (Εικόνα 49)[74]. Οι ασθενείς που εκφράζουν μη στερεότυπες IGHV1-2/1-3/1-18/5 αναδιατάξεις και δεν ανήκουν στο υποσύνολο #1 χαρακτηρίζονται από ποικιλότητα στη χρήση IGV ελαφριών αλυσίδων, ποικίλο status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV, ετερογενή έκφραση CD38 και ποικίλη κλινική πορεία. Αντίθετα, οι ασθενείς του υποσυνόλου #1 έχουν δυσμενή πρόγνωση και επιθετική νόσο σε σχέση με τους ασθενείς που φέρουν μη στερεότυπους, ετερογενείς υποδοχείς[34].

Συνεπώς, με βάση όλα τα παραπάνω φαίνεται ότι τα στερεότυπα υποσύνολα #1 και #4 εμφανίζουν ιδιαίτερα κλινικο-βιολογικά χαρακτηριστικά και μπορεί να θεωρηθούν ως πρότυπα κακής και καλής πρόγνωσης της νόσου, αντιστοίχως[33,34,48]. Επιπλέον, όπως προαναφέρθηκε, παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα αναγνώρισης παθογόνων και έκφρασης ορισμένων υποδοχέων TLR καθώς και κρίσιμων μορίων του σηματοδοτικού μονοπατιού καθοδικά των υποδοχέων, που υποδεικνύουν ειδική αναγνώριση και επιλογή αυτών των κυττάρων από συγκεκριμένους προσδέτες διαφορετικής φύσης.

Τα αποτελέσματα της λειτουργικής μελέτης υποστηρίζουν την παραπάνω άποψη, καθώς ιδιαίτερα πρότυπα λειτουργικότητας μεταξύ των στερεότυπων υποσυνόλων #1 και #4. Παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην επαγωγή της έκφρασης των συν-διεγερτικών μορίων μετά από διέγερση συγκεκριμένων υποδοχέων. Για παράδειγμα, η διέγερση των TLR1/2, TLR2/6, TLR9, και NOD2 αύξησε την έκφραση του CD86 μόνο στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσυνόλου #4, ενώ δεν είχε καμία επίδραση στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσυνόλου #1. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι τα κύτταρα του στερεότυπου υποσυνόλου #4 απαντούν πιο έντονα στη διέγερση των TLR9, TLR1/2, TLR2/6, και NOD2 και ότι υπάρχει διαφορετική ρύθμιση στη σηματοδότηση καθοδικά των υποδοχέων. Επίσης, η επιλεκτική αύξηση της έκφρασης του CD86 στο στερεότυπο υποσύνολο #4 δείχνει ότι τα κύτταρα αυτά μετά από διέγερση των TLR9, TLR1/2, TLR2/6, και NOD2 μπορούν να καταστούν πιο ανοσογόνα και να προσελκύσουν Τ κυτταροτοξικά κύτταρα, με τελικό αποτέλεσμα το θάνατό τους. Αυτός μπορεί να

είναι ένας μηχανισμός που διαταράσσει το λόγο πολλαπλασιασμού/απόπτωσης και διατηρεί τον κλώνο σε σταθερά επίπεδα, εξηγώντας ίσως και την καλύτερη κλινική πορεία αυτών των ασθενών.

Αντίστροφα αποτελέσματα είχε η διέγερση του TLR7 με Imiquimod, η οποία αύξησε την έκφραση του CD25 μόνο στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσυνόλου #1. Συνεπώς, τα κύτταρα του στερεότυπου υποσυνόλου #4 δεν απαντούν καθόλου στη διέγερση μέσω του TLR7. Οι αντίστοιχοι λευχαιμικοί κλώνοι εμφανίζουν υψηλή έκφραση του υποδοχέα TLR7 τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Ωστόσο, τα επίπεδα έκφρασης είναι χαμηλότερα από τ' αντίστοιχα σε άλλες υποομάδες ασθενών με ΧΛΛ και ιδίως στο στερεότυπο υποσύνολο #1. Αντίθετα, τα επίπεδα έκφρασης του συνδιεγερτικού μορίου CD86 είναι υψηλότερα σε σύγκριση με τις παραπάνω υποομάδες ασθενών. Επιπλέον, τα κύτταρα δεν επάγουν την έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων ούτε αλλάζει η βιωσιμότητά τους μετά από διέγερση μέσω του TLR7. Αυτό το πρότυπο λειτουργικότητας είναι μοναδικό για το υποσύνολο #4. Τέλος, τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών JNK και p38 στους κλώνους του στερεότυπου υποσυνόλου #4 είναι πολύ χαμηλά έως μηδενικά και δεν επηρεάζονται από τη διέγερση μέσω του TLR7.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία[151], όλα τα παραπάνω παρέχουν πολύ ισχυρές ενδείξεις ότι τα λευχαιμικά λεμφοκύτταρα είναι ανεργικά μέσω του TLR7 πιθανόν λόγω προηγούμενης *in vivo* επαφής τους με προσδέτες ειδικούς για τον υποδοχέα. Ασφαλώς, δεν είναι ακόμα σαφής η φύση και το ακριβές χρονικό πλαίσιο της αντιγονικής διέγερσης που οδήγησε στην ανάπτυξη και εξέλιξη των λευχαιμικών κλώνων, ωστόσο το γεγονός ότι ο TLR7 αναγνωρίζει μονόκλωνο RNA και ειδικεύεται στην ανίχνευση ιών παρέχει χαρακτηριστικές ενδείξεις.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι βρέθηκαν διαφορετικά λειτουργικά πρότυπα των υποδοχέων TLR και NOD2 ακόμα και κατά τη σύγκριση περιπτώσεων που ανήκαν σε διαφορετικά στερεότυπα υποσύνολα με παρόμοιο status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV (π.χ. στερεότυπα υποσύνολα #1 έναντι #8, #4 έναντι #16) ή τη σύγκριση περιπτώσεων που χρησιμοποιούσαν το γονίδιο IGHV4-34 σε στερεότυπες ή μη αναδιατάξεις (στερεότυπα υποσύνολα #4 έναντι #16 έναντι μη στερεότυπες #4/16 IGHV4-34 περιπτώσεις). Όλα τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι οι

απαντήσεις της έμφυτης ανοσίας στα Β λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ συσχετίζονται άμεσα με τη χρήση στερεότυπων BcR.

7.4 Ρύθμιση της σηματοδότησης των υποδοχέων TLR

Η ανάλυση της ρύθμισης του σηματοδοτικού μονοπατιού σε μεταγραφικό επίπεδο περιελάμβανε τη διέγερση λειτουργικών υποδοχέων, συγκεκριμένα του TLR7 με Imiquimod στο στερεότυπο υποσύνολο #1, (4 περιπτώσεις) και του TLR1/2 με Pam3CSK4 στο στερεότυπο υποσύνολο #4 (4 περιπτώσεις). Στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσυνόλου #4 παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης των περισσοτέρων γονιδίων που μελετήθηκαν. Μειώθηκε η έκφραση υποδοχέων TLR (TLR1, TLR6, TLR7, CD180), φαινόμενο που έχει αποδειχθεί και σε μελέτες σε μακροφάγα που δείχνουν ότι η διέγερση μέσω ενός TLR ρυθμίζει την έκφραση και άλλων μελών της οικογένειας[156,157]. Επιπλέον, μειώθηκε η έκφραση μορίων ειδικών για το σηματοδοτικό μονοπάτι των TLR (π.χ. οι προσαρμοστές TIRAP, SARM και οι τελεστές IRAK1 IRAK2, αντίστοιχα). Επιπλέον, επηρεάστηκε αρνητικά η έκφραση πολλών μορίων που συμμετέχουν στη σηματοδότηση των MAP κινασών (MAP2K3, MAP3K1, MAP3K7, MAP3K7IP1, MAPK8, MAPK8IP3) και του NF-κB (IKBKB, REL) που επηρεάζονται τόσο από τη σηματοδότηση μέσω των TLR όσο και του BcR. Εκτός από τον NF-κB μειώθηκε σημαντικά και η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα JUN. Από τα τελικά μόρια στόχους μειώθηκε η έκφραση του CD86, της IL12 και της IL8. Η μείωση του CD86 και της IL12 αναστέλλει την αλληλεπίδραση με άλλα κύτταρα. Επιπλέον, η μείωση της IL8 εμποδίζει την αγγειογένεση και την επιβίωση των κυττάρων. Στα ελάχιστα μόρια των οποίων η έκφραση αυξήθηκε ήταν ο TNF, γεγονός αναμενόμενο αφού ο TNF-α παράγεται πάντα μετά από διέγερση των υποδοχέων TLR. Επιπλέον, αυξήθηκε η έκφραση της IL6, η οποία έχει βρεθεί ότι έχει κατασταλτική δράση σε αυτοαντιδραστικά Β λεμφοκύτταρα.

Συνεπώς, φαίνεται ότι μετά τη διέγερση του υποδοχέα TLR1/2 στο στερεότυπο υποσύνολο #4, δημιουργείται μια αρνητική ανάστροφη ρύθμιση ώστε η

ενεργοποίηση να διατηρηθεί σε συγκεκριμένα επίπεδα. Στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσυνόλου #1 παρατηρήθηκαν λίγες μεταγραφικές αλλαγές μεταξύ των δύο καταστάσεων. Φαίνεται ότι οι απαντήσεις στη διέγερση των υποδοχέων TLR ρυθμίζονται διαφορετικά ανάλογα με τον υποδοχέα και την ομάδα ασθενών. Στις περιπτώσεις non#4/16, που δεν απαντούσαν στη διέγερση μέσω TLR1/2, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης των γονιδίων IL6, MAP2K4, MAP4K4, NFKB2, SARM1, TICAM2, TLR6, TLR9, TNF και μείωση της έκφρασης των αναστολέων του μονοπατιού NFKBIL1 και SIGIRR. Φαίνεται ότι το μονοπάτι έχει την ικανότητα σηματοδότησης, αφού συμβαίνουν μεταγραφικές αλλαγές που υποδυκνείουν ότι η έκφραση των σηματοδοτικών μορίων αυξάνει, αλλά το σήμα ρυθμίζεται αρνητικά με κάποιον άλλο τρόπο, αφού η έκφραση των δείκτών ενεργοποίησης CD25, CD86, τελικά δεν επηρεάζεται.

7.5 Συμπεράσματα

Συνολικά, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης αποκαλύπτουν νέα δεδομένα τόσο για τη φύση των Β λεμφοκυττάρων της ΧΛΛ όσο και για την αλληλεπίδραση τους με το μικροπεριβάλλον. Τα κύρια συμπεράσματα συνοψίζονται ως εξής:

(i) Το πρότυπο έκφρασης και λειτουργικότητας των υποδοχέων TLR και NLR στη ΧΛΛ είναι παρόμοιο με το αντίστοιχο των ενεργοποιημένων Β λεμφοκυττάρων, ενισχύοντας την άποψη ότι τα κύτταρα της ΧΛΛ έχουν εμπειρία αντιγόνου.

(ii) Η ανάπτυξη και εξέλιξη της ΧΛΛ πιθανόν επηρεάζεται και από σήματα που λαμβάνονται μέσω των υποδοχέων έμφυτης ανοσίας καθώς εκφράζονται από τα κύτταρα και είναι λειτουργικοί

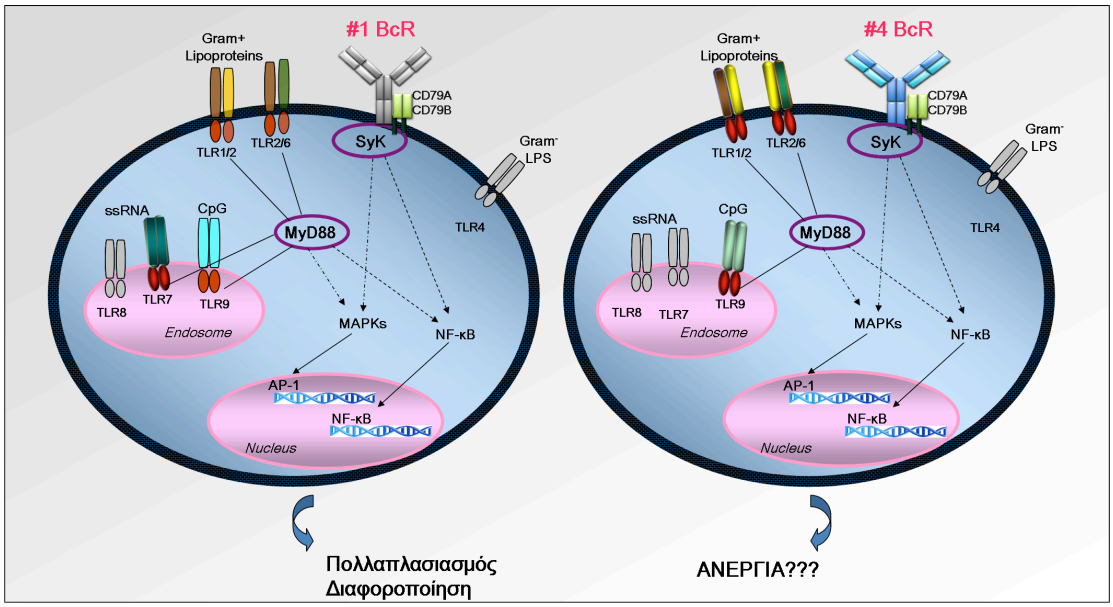
(iii) Υποομάδες ασθενών με ΧΛΛ που ορίζονται με βάση τα ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά των BcR και ιδίως οι περιπτώσεις που φέρουν στερεότυπους BcR εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης και λειτουργικότητας των υποδοχέων TLR και/ή NLR. Με βάση τα παραπάνω, η βιολογική συμπεριφορά του λευχαιμικού κλώνου, που αντικατοπτρίζεται στην κλινική πορεία της νόσου, είναι αποτέλεσμα

της συνεργασίας των κλωνοτυπικών BcR με συγκεκριμένους υποδοχείς έμφυτης ανοσίας που διαφέρουν κατά περίπτωση (Εικόνα 50).

(iv) Η σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα TLR1/2, ρυθμίζεται σε μεταγραφικό επίπεδο στο στερεότυπο υποσύνολο #4. Σε άλλες υποομάδες ασθενών χρησιμοποιούνται διαφορετικοί μηχανισμοί ρύθμισης (π.χ. μετα-μεταφραστική ρύθμιση, miRNAs), που αποτελούν ένα πολύ ενδιαφέρον πεδίο έρευνας.

(v) Οι περιπτώσεις που ανήκουν στο στερεότυπο υποσύνολο #4 παρουσιάζουν ιδιαίτερο πρότυπο έκφρασης και λειτουργικότητας των υποδοχέων έμφυτης ανοσίας, ενδεικτικό ανεργικής κατάστασης για τον υποδοχέα TLR7.

(vi) Καθώς συγκεκριμένοι προσδέτες των υποδοχέων TLR δοκιμάζονται ως ανοσοθεραπεία στη ΧΛΛ, με αντικρουόμενα όμως αποτελέσματα[171], τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης θα μπορούσε να χρησιμεύσουν για τη διάκριση ομάδων ασθενών που θα ωφελούνταν από τη θεραπεία με συγκεκριμένους προσδέτες.



Εικόνα 50: Στη ΧΛΛ οι στερεότυποι BcR συνεργάζονται με συγκεκριμένους TLRs και ρυθμίζουν τις άνοσες απαντήσεις των Β λεμφοκυττάρων. Η διέγερση του TLR7 στο στερεότυπο υποσύνολο #1 (αριστερά) επάγει την έκφραση συν-διεγερτικών μορίων σε αντίθεση με το στερεότυπο υποσύνολο #4 (δεξιά). Αντίθετα η διέγερση των TLR1/2, TLR2/6 και TLR9 επάγει ισχυρότερες αποκρίσεις στο στερεότυπο υποσύνολο #4 σε σχέση με το #1. Οι TLR4 και TLR8 (γκρί) εκφράζονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα, αλλά δεν είναι λειτουργικοί στα κύτταρα της ΧΛΛ.

8. Περίληψη

8.1 Σηματοδοτικό μονοπάτι των υποδοχέων τύπου Toll στη ΧΛΛ: ιδιαίτερα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης σε ασθενείς που ανήκουν σε συγκεκριμένα στερεότυπα υποσύνολα

Ο ρόλος του αντιγόνου στη ΧΛΛ υποδεικνύεται από τη χρήση συγκεκριμένων γονιδίων IGHV για τη δημιουργία των Β κυτταρικών υποδοχέων (B cell Receptors, BcRs) που εκφράζουν τα νεοπλασματικά κύτταρα, την προγνωστική αξία της δομής των BcR καθώς και την ύπαρξη υποσυνόλων ασθενών με σχεδόν πανομοιότυπους, στερεότυπους, BcR. Η δομική ομολογία υποδεικνύει το σημαντικό ρόλο ενός περιορισμένου εύρους παθογόνων ή δομικά σχετιζόμενων επιτόπων, στη λευχαιμογένεση. Η άμυνα έναντι παθογόνων μικροοργανισμών στηρίζεται στη συνεργική δράση πολλών μηχανισμών, ώστε να επιτευχθεί μία αποτελεσματική άνοση απάντηση. Σε αυτούς τους μηχανισμούς συμπεριλαμβάνεται και η μη ειδική διέγερση των Β λεμφοκυττάρων μέσω των υποδοχέων έμφυτης ανοσίας, κύριοι αντιπρόσωποι των οποίων οι τύπου Toll και NOD (Toll Like Receptors, TLRs, Nod Like Receptors, NLRs). Τα δεδομένα που υπάρχουν σχετικά με την έκφραση των υποδοχέων TLR και NLR στη ΧΛΛ είναι περιορισμένα και προέρχονται από μικρές σειρές ασθενών.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήσαμε μια συστηματική ανάλυση του προτύπου έκφρασης του σηματοδοτικού μονοπατιού των υποδοχέων TLR καθώς και των υποδοχέων NLR, σε μία μεγάλη σειρά 191 ασθενών με ΧΛΛ. Η ανάλυση περιελάμβανε όλους τους TLR και τους NOD1/2, προσαρμοστές, τελεστές, μόρια που εμπλέκονται σε άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια που αλληλεπιδρούν με το μονοπάτι των TLR, καθώς και τελικά μόρια-στόχους. Παρατηρήθηκαν διαφορετικά πρότυπα γονιδιακής έκφρασης μεταξύ υποομάδων ασθενών με ΧΛΛ που ορίστηκαν με βάση τα μοριακά χαρακτηριστικά του BcR, όπως το ρεπερτόριο και το status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV και η έκφραση στερεότυπων BcR. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε $CD19^+$ Β λεμφοκύτταρα που επιλέχθηκαν αρνητικά από ολικό αίμα. Το γονιδιακό πρότυπο έκφρασης του σηματοδοτικού μονοπατιού των TLR

πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του RT² *Profiler*™ PCR Array kit (PAHS-018A array, SABiosciences), ενώ τα επίπεδα των mRNA μεταγράφων των υποδοχέων NOD1/2 μετρήθηκαν με τη χρήση ειδικών εκκινητών. Στο σύνολο των ασθενών, μεταξύ των υποδοχέων υψηλά επίπεδα έκφρασης παρουσίαζαν οι TLR7 και CD180, ενδιάμεσα οι TLR1, TLR6 και TLR10 και χαμηλά οι TLR2 και TLR9. Τα επίπεδα έκφρασης των TLR4 και TLR8 ήταν πολύ χαμηλά και σε πολλές περιπτώσεις μη ανιχνεύσιμα. Η έκφραση των TLR3 και TLR5 ήταν αρνητική στην πλειονότητα των περιπτώσεων. Οι NOD1/2 παρουσίαζαν υψηλά επίπεδα έκφρασης. Οι περισσότεροι προσαρμοστές (MyD88, TICAM1, TRAF6), οι τελεστές που ρυθμίζουν τη λειτουργία του μονοπατιού (UBE2N) καθώς και τα μόρια που εμπλέκονται στα άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια των NFKB, JNK/p38, NF/IL6 και IRF καθοδικά του μονοπάτιου των TLR εμφάνιζαν υψηλά ή ενδιάμεσα επίπεδα έκφρασης, ενώ οι αναστολείς του μονοπατιού εκφραζόταν σε χαμηλά έως μηδενικά επίπεδα (TOLLIP, SIGIRR/TIR8). Η σύγκριση των περιπτώσεων που φέρουν μεταλλαγμένες αλληλουχίες IGHV (Μ-ΧΛΛ) έναντι εκείνων που φέρουν αμετάλλακτες αλληλουχίες IGHV (Α-ΧΛΛ) (124 και 67 περιπτώσεις, αντιστοίχως) αποκάλυψε ότι τα μόρια CD80, CD86, IL6, IFNG και TLR4 υπερεκφράζονταν, ενώ τα μόρια TLR8 και NFKBIL1 υποεκφράζονταν στην Μ-ΧΛΛ έναντι της Α-ΧΛΛ. Σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν και κατά τη σύγκριση ασθενών που ανήκαν σε διαφορετικά στερεότυπα υποσύνολα (στερεότυπο υποσύνολο #4, IGHV4-34/1GKV2-30 BcR, στερεότυπο υποσύνολο #1, IGHV1/5/7-IGKV1(D)-39 BcR, στερεότυπο υποσύνολο #8, IGHV4-39/IGKV1(D)-39 BcR): (i) υπερέκφραση των μορίων TLR7 και NFKBIA και υποέκφραση των μορίων CD86 και TLR4 στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσυνόλου #1 έναντι του στερεότυπου υποσυνόλου #4, (ii) υπερέκφραση ων μορίων TLR4 και MAP4K4 και υποέκφραση των μορίων NFKBIA και RIPK2 στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσυνόλου #8 έναντι του στερεότυπου υποσυνόλου #1 και (iii) υπερέκφραση του μορίου LY96 και υποέκφραση των μορίων RIPK2 και CD86 στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσυνόλου #8 έναντι του στερεότυπου υποσυνόλου #4. Συμπερασματικά, το πρότυπο έκφρασης των υποδοχέων TLR είναι παρόμοιο με το αντίστοιχο των ενεργοποιημένων Β λεμφοκυττάρων, ενισχύοντας την άποψη ότι τα κύτταρα της ΧΛΛ έχουν εμπειρία αντιγόνου. Επιπλέον, υπο-ομάδες ασθενών με ΧΛΛ που ορίζονται με βάση τα ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά των BcR -ιδίως οι

περιπτώσεις που φέρουν στερεότυπους BcR- εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης των υποδοχέων TLR, γεγονός που υποδεικνύει ότι διαφορετικά (και ταυτόχρονα) σήματα εκτός από τα σήματα που προέρχονται από τον BcR μπορεί να επηρεάζουν τη συμπεριφορά του νεοπλασματικού κλώνου.

8.2 Διάφορες υπό-ομάδες ασθενών με ΧΛΛ χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα πρότυπα λειτουργικότητας των υποδοχέων έμφυτης ανοσίας.

Τα ώριμα Β λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν αντιγόνα ειδικά μέσω του Β κυτταρικού υποδοχέα (B cell Receptor, BcR) αλλά και μέσω των υποδοχέων έμφυτης ανοσίας, όπως οι υποδοχείς τύπου Toll (Toll Like Receptors, TLRs) και υποδοχείς τύπου NOD (NOD Like Receptors, NLRs), οι οποίοι ασκούν συν-διεγερτική δράση στον BcR. Φαίνεται ότι η σηματοδότηση μέσω BcR διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και ίσως στην εξέλιξη της Χρόνιας Λεμφοκυτταρικής Λευχαιμίας (ΧΛΛ). Ωστόσο, η ακριβής χρονική στιγμή, η διάρκεια και κυρίως η φύση της αντιγονικής διέγερσης είναι μέχρι και σήμερα αδιευκρίνιστα. Παρόλο που σημαντικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι υποδοχείς έμφυτης ανοσίας σχετίζονται με την παθογένεια της ΧΛΛ, η λειτουργικότητα των υποδοχέων TLR και NLR δεν έχει μελετηθεί εκτενώς στη ΧΛΛ. Μελετήσαμε τη λειτουργικότητα των υποδοχέων TLR και NLR σε υποομάδες ασθενών με ΧΛΛ οι οποίες διαχωρίστηκαν με βάση το ρεπερτόριο, το status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV και την έκφραση στερεότυπων BcR. Για το λόγο αυτό μελετήσαμε 67 ασθενείς, με σκόπιμη υπερ-αντιπροσώπευση περιπτώσεων που εκφράζουν στερεότυπους υποδοχείς χαρακτηριστικούς των στερεότυπων υποσυνόλων #1 (IGHV1/5/7-IGKV1(D)-39) και #4 (IGHV4-34/IGKV2-30), τα οποία θεωρούνται υποδείγματα κακής και καλής πρόγνωσης, αντίστοιχα. Έγινε διέγερση CD19+ κυττάρων, που είχαν επιλεγεί αρνητικά από ολικό αίμα, με προσδέτες ειδικούς για όλους τους TLR/NLR που εκφράζονται στα Β λεμφοκύτταρα. Τα αποτελέσματα της διέγερσης εκτιμήθηκαν μετά από 12 ώρες με μέτρηση της έκφρασης των μορίων CD25 και CD86 (δείκτες ενεργοποιημένων Β

λεμφοκυττάρων), με κυτταρομετρία ροής. Επίσης, μετρήθηκε η βιωσιμότητα των κυττάρων σε συγκεκριμένα χρονικά στιγμιότυπα (Ημέρα 3, 6, 9). Οι TLR1/2, TLR2/6, TLR9 και NOD2 απάντησαν στη διέγερση με τους ειδικούς προσδέτες στις περισσότερες περιπτώσεις που μελετήθηκαν, αν και με μεγάλη ετερογένεια. Η διέγερση του TLR7 με Imiquimod, ένα μικρό συνθετικό αντι-ιικό μόριο, οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης του CD25 και/ή CD86 σε ~50% των περιπτώσεων. Αντίθετα, η loxoribine που είναι ο φυσικός προσδέτης του TLR7 δεν είχε καμία επίδραση στα Β λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ. Παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην απάντηση μετά από διέγερση επιλεγμένων TLR όταν μεταξύ περιπτώσεων που έφεραν μεταλλαγμένες έναντι αμετάλλακτων αλληλουχιών IGHV (Μ-ΧΛΛ vs Α-ΧΛΛ). Συγκεκριμένα, το ποσοστό των CD25 θετικών κυττάρων αυξήθηκε περισσότερο στην Α-ΧΛΛ μετά από διέγερση του TLR7 με Im. Αντίθετα, μετά από διέγερση του TLR9 με CpG, το ποσοστό των CD86 θετικών κυττάρων ήταν μεγαλύτερο στην Μ-ΧΛΛ. Ιδιαίτερα λειτουργικά πρότυπα των TLR και NOD2 παρατηρήθηκαν και στα διαφορετικά στερεότυπα υποσύνολα ασθενών. Συγκεκριμένα, μετά από διέγερση των υποδοχέων TLR9, TLR1/2, TLR2/6, και NOD2 με τους κατάλληλους προσδέτες, η έκφραση του CD86 επαγόταν ισχυρά στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσύνολου #4, ενώ στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσύνολου #1 η επαγωγή της έκφρασης ήταν χαμηλή έως μηδενική. Η διέγερση του TLR7 με Im δεν είχε καμία επίδραση στην έκφραση του CD86, αλλά οδηγούσε σε αυξημένη έκφραση του CD25 μόνο στις περιπτώσεις του στερεότυπου υποσυνόλου #1. Η μελέτη μας περιλάμβανε επίσης περιπτώσεις που ανήκαν στα στερεότυπα υποσύνολα #8 (IGHV4-39/IGKV1(D)-39, UM) και #16 (IGHV4-34/IGKV3-20, M). Παρατηρήσαμε ιδιαίτερα λειτουργικά πρότυπα ακόμα και όταν συγκρίναμε περιπτώσεις που ανήκαν σε στερεότυπα υποσύνολα με ίδιο status μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV (στερεότυπο υποσύνολο #1 έναντι #8 και στερεότυπο υποσύνολο #4 έναντι #16), γεγονός που υποδεικνύει ότι τα ιδιαίτερα πρότυπα έκφρασης των υποδοχέων TLR είναι χαρακτηριστικά των στερεότυπων υποσυνόλων, ανεξάρτητα από τη χρήση συγκεκριμένου γονιδίου IGHV ή status μεταλλάξεων. Για να επιβεβαιώσουμε το παραπάνω συμπέρασμα, επικεντρωθήκαμε στις περιπτώσεις που χρησιμοποιούσαν το γονίδιο IGHV4-34 σε στερεότυπες (#4 και #16) και μη (non #4/16) αναδιατάξεις. Με αυτή την προσέγγιση παρατηρήθηκαν στατιστικά

σημαντικές διαφορές ($p<0.05$) ανάμεσα στις τρεις ομάδες ασθενών αναφορικά με την έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων μετά από διέγερση των TLR1/2, TLR2/6, NOD2 και TLR9. Σε όλες τις παραπάνω συγκρίσεις παρατηρήθηκαν επίσης διαφορετικά ποσοστά βιωσιμότητας μετά από διέγερση συγκεκριμένων TLR και/ή NLR με τους κατάλληλους προσδέτες. Συμπερασματικά, η ανάπτυξη και εξέλιξη της ΧΛΛ πιθανόν επηρεάζεται και από σήματα που λαμβάνονται μέσω των υποδοχέων έμφυτης ανοσίας. Υποομάδες ασθενών με ΧΛΛ που ορίζονται με βάση τα ιδιαίτερα μοριακά χαρακτηριστικά των BcR εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα λειτουργικότητας των υποδοχέων TLR και/ή NLR. Με βάση τα παραπάνω, η βιολογική συμπεριφορά του λευχαιμικού κλώνου, που αντικατοπτρίζεται στην κλινική πορεία της νόσου, είναι αποτέλεσμα της συνεργασίας των κλωνοτυπικών BcR με συγκεκριμένους υποδοχείς έμφυτης ανοσίας που διαφέρουν κατά περίπτωση. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης θα μπορούσε να χρησιμεύσουν για τη διάκριση ομάδων ασθενών που θα ωφελούνταν από τη θεραπεία με συγκεκριμένους προσδέτες.

9. Abstract

9.1 Toll-Like Receptor signaling pathway in Chronic Lymphocytic Leukemia: distinct gene expression profiles of potential pathogenetic significance in specific subsets of patients

The role of antigen in the development of CLL is underscored by the biased immunoglobulin (IG) gene repertoire expressed by the malignant clones, the prognostic implications of B-cell receptor (BcR) structure and the identification of subsets of patients with quasi-identical, stereotyped BcRs. The structural homology of BcRs implies a role for a limited set of antigens or structurally related epitopes in leukemogenesis. Antigen recognition and host defense rely on multiple mechanisms acting synergistically in order to mount an effective immune response. These include specific stimulation through the BcR and non-specific stimulation through innate immune receptors, of which the major classes are Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like Receptors (NLRs). The available data on TLR and NLR expression in CLL are limited and derive from small series of patients. We performed a systematic gene expression profiling of the TLR signaling pathway and NLRs, in a large series of 191 patients with CLL. The analysis extended from all TLRs and NOD1/2 to adaptors, effectors, inhibitors and members of the NFKB, JNK/p38, NF/IL6, and IRF signaling pathways downstream of TLR signaling. In addition, differences in gene expression profiles were sought for among subgroups of cases defined by BcR molecular features, such as the repertoire and mutational status of the IG heavy variable (IGHV) genes or the expression of stereotyped BcRs. CD19+ B lymphocytes were negatively selected from peripheral blood samples. The gene expression profile of the TLR signalling pathway was determined by the RT² *Profiler*™ PCR Array kit (PAHS-018A array, SABiosciences), while NOD1/2 expression levels were determined with specific primers. At cohort level, among the receptors, high expression was recorded for TLR7 and CD180, intermediate for TLR1, TLR6 and TLR10 and low expression for TLR2 and TLR9. TLR4 and TLR8 were characterized by low to undetectable

expression, with significant variations between patients, while TLR3 and TLR5 were not expressed in any case. The NOD1/2 receptors were highly expressed. The vast majority of adaptors (e.g. MyD88, TICAM1, TRAF6), effectors (UBE2N) and members of the NFKB, JNK/p38, NF/IL6, and IRF signaling pathways downstream of TLR signaling were intermediately-to-highly expressed, while the inhibitors of TLR activity were generally low-to-undetectable (TOLLIP, SIGIRR/TIR8). Further comparison in subgroups of cases carrying mutated vs. unmutated IGHV sequences (124 and 67 cases, respectively) revealed upregulation of CD80, CD86, IL6, IFNG and TLR4 and downregulation of TLR8 and NFKBIL1 in the mutated subgroup. Significant differences in gene expression profiles were also found in subgroups of cases with stereotyped receptors. Comparison of subset #4 (mutated IGHV4-34/1GKV2-30 BcR, 10 cases) vs. subset #1 (unmutated IGHV1/5/7-IGKV1(D)-39 BcR, 10 cases) vs. subset #8 (unmutated IGHV4-39/IGKV1(D)-39 BcR, 4 cases) revealed: (i) upregulation of TLR7 and NFKB1A and downregulation of CD86 and TLR4 in #1 vs #4 cases; (ii) upregulation of MAP4K4 and TLR4 and downregulation of NFKB1A and CD180 in #8 vs #1 cases; and, (iii) upregulation of LY96 and downregulation of RIPK2 and CD86 in #8 vs #4 cases. In conclusion, the TLR gene expression profile of CLL is consistent with derivation from antigen-experienced B cells. Significant variations were identified in different subgroups of cases defined by BcR molecular features, indicating distinctive activation patterns of the TLR signaling pathway, especially among cases assigned to subsets with stereotyped BcRs. These findings indicate that different or concomitant signals acting through receptors other than the BcR can affect the behavior of the malignant clone.

9.2 Differential functional outcomes after stimulation via innate immune receptors in Chronic Lymphocytic Leukemia subtypes defined by the molecular features of the immunoglobulin receptor

Mature B cells recognize antigens through the B cell receptor (BcR) in a specific way and through innate immunity receptors, such as the Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs), in a costimulatory manner. Signaling through the BcR appears to be a major contributing factor in CLL development and, perhaps, evolution. However, the timing, duration and, most importantly, the nature of antigenic exposures remain unclear. Although emerging data suggest that innate immunity receptors are relevant for CLL pathogenesis, the functionality of TLRs and NLRs in CLL is largely unexplored. We investigated TLR and NLR function within CLL subgroups defined by IGHV gene usage, IGHV gene mutational status, or BcR stereotypy. To this end, we studied a series of 67 patients, with an intentional bias to cases expressing stereotyped BcRs assigned to subsets #1 (IGHV1/5/7-IGKV1(D)-39) and #4 (IGHV4-34/IGKV2-30), which can be considered as prototypes of "unmutated/adverse prognosis" and "mutated/good prognosis" subsets, respectively. Negatively isolated CLL cells were stimulated with specific ligands for all TLRs/NLRs expressed in B cells. The functional outcome was assessed after 24 hours by flow cytometric determination of CD25 and CD86 expression as a measure of cell activation. We also measured cell viability at certain time points. At cohort level, TLR1/2, TLR2/6, TLR9 and NOD2 were responsive to stimulation with their respective ligands in most cases, yet in a heterogeneous fashion. TLR7 stimulation with Imiquimod, a small synthetic antiviral molecule, induced CD25 and/or CD86 in ~50% of cases; in contrast, loxoribine, a naturally occurring TLR7 agonist, had no effects. Markedly different qualitative responses were observed when comparing mutated vs. unmutated CLL cases, with TLR9 upregulating CD86 expression in mutated CLL cases, while TLR7 upregulating CD25 expression in unmutated CLL cases ($p<0.05$ for all comparisons). Different patterns of functional responses to TLR and NOD2 stimulation were also identified in subsets with stereotyped BcRs. In particular, stimulation of TLR9, TLR1/2, TLR2/6, and NOD2 with the respective ligands strongly

upregulated CD86 expression in subset #4 cases, whereas the same treatment had a significantly less pronounced effect on subset #1 cases ($p<0.05$ for all comparisons). Opposite results were obtained after stimulation of the TLR7 with imiquimod, in that subset #1 cases exhibited stronger up-regulation of CD25 expression compared to subset #4 cases ($p<0.05$). Our study included additional cases belonging to stereotyped subsets #8 (IGHV4-39/IGKV1(D)-39, unmutated) and #16 (IGHV4-34/IGKV3-20, mutated). Differential, subset-biased profiles were also identified when limiting the comparisons to subsets with similar mutational status (i.e. subset #1 vs. #8 and subset #4 vs #16), underscoring the idea of "subset-biased" innate immunity responses independently of IGHV gene usage and/or mutational status. To further corroborate this concept, we focused on cases utilizing the IGHV4-34 gene, which were intentionally over-represented in the cohort. By this approach, we identified significantly ($p<0.05$) different responses after stimulation of TLR1/2, TLR2/6, TLR9 and NOD2 in subset #4 vs. non subset#4/16 IGHV4-34 cases (in terms of induction of either CD25 or CD86 or both. For all the above comparisons, we also identified differential percentages of viable cells after stimulation of certain TLRs and/or NLRs with their respective ligands. In conclusion, we demonstrate that the behavior of CLL malignant B cells can be influenced by signals triggered by innate immunity receptors. CLL patient subgroups defined by specific molecular characteristics of their clonotypic BcRs have distinct patterns of TLR/NLR function and/or TLR tolerance. These differences support the hypothesis that specific modalities of BcR/TLR collaboration and/or regulation may eventually impact on the biological behavior of the malignant clones. Additionally, they might prove relevant both for elucidating the immune mechanisms which underlie CLL development and also for defining subgroups of patients who might benefit from treatment with specific TLR ligands, already used in the clinical setting.

10. Βιβλιογραφία

1. Janeway C TP. The immune system in health and disease (ed 2nd): Garland Publising Inc.

2. Janeway. An Introduction to immunobiology and Innate Immunity (ed 7th); 2008.

3. Burmester. Color Atlas of immunology (ed 2nd): Thieme; 2003.

4. Goldsby. Immunology: W H Freeman & Co; 2006.

5. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, Allen SL, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. J Clin Invest. 1998;102(8):1515-25.

6. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2005;352(8):804-15.

7. Linet MS, Schubauer-Berigan MK, Weisenburger DD, Richardson DB, Landgren O, Blair A, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: an overview of aetiology in light of recent developments in classification and pathogenesis. Br J Haematol. 2007;139(5):672-86.

8. Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, Kern W, Schoch C. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: A study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. Blood. 2006;108(9):3152-60.

9. Mehes G. Chromosome abnormalities with prognostic impact in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Pathol Oncol Res. 2005;11(4):205-10.

10. AbdelSalam M, El Sissy A, Samra MA, Ibrahim S, El Markaby D, Gadallah F. The impact of trisomy 12, retinoblastoma gene and P53 in prognosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia. Hematology. 2008;13(3):147-53.

11. Seiler T, Dohner H, Stilgenbauer S. Risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. Semin Oncol. 2006;33(2):186-94.

12. Nicoloso MS, Kipps TJ, Croce CM, Calin GA. MicroRNAs in the pathogeny of chronic lymphocytic leukaemia. Br J Haematol. 2007;139(5):709-16.

13. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2005;353(17):1793-801.

14. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(24):15524-9.

15. Matthias P, Rolink AG. Transcriptional networks in developing and mature B cells. Nat Rev Immunol. 2005;5(6):497-508.

16. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. Blood. 2008;112(5):1570-80.

17. Melchers F, Rolink AR. B cell tolerance--how to make it and how to break it. Curr Top Microbiol Immunol. 2006;305(1-23.

18. Nemazee D. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. Nat Rev Immunol. 2006;6(10):728-40.

19. Schlissel MS. The regulation of receptor editing. Adv Exp Med Biol. 2007;596(173-9.

20. Cambier JC, Gauld SB, Merrell KT, Vilen BJ. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? Nat Rev Immunol. 2007;7(8):633-43.

21. Strasser A, Puthalakath H, O'Reilly LA, Bouillet P. What do we know about the mechanisms of elimination of autoreactive T and B cells and what challenges remain. Immunol Cell Biol. 2008;86(1):57-66.

22. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. Nat Rev Immunol. 2008;8(1):22-33.

23. Potter KN, Orchard J, Critchley E, Mockridge CI, Jose A, Stevenson FK. Features of the overexpressed V1-69 genes in the unmutated subset of chronic lymphocytic leukemia are distinct from those in the healthy elderly repertoire. Blood. 2003;101(8):3082-4.

24. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. Blood. 1999;94(6):1848-54.

25. S OB. Origin and Nature of Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells Chiorazzi N. Ferarrini M.; 2008.

26. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. J Exp Med. 2001;194(11):1625-38.

27. Stratowa C, Loffler G, Lichter P, Stilgenbauer S, Haberl P, Schweifer N, et al. CDNA microarray gene expression analysis of B-cell chronic lymphocytic leukemia proposes potential new prognostic markers involved in lymphocyte trafficking. Int J Cancer. 2001;91(4):474-80.

28. Durig J, Nuckel H, Huttmann A, Kruse E, Holter T, Halfmeyer K, et al. Expression of ribosomal and translation-associated genes is correlated with a favorable clinical course in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2003;101(7):2748-55.

29. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. J Exp Med. 2001;194(11):1639-47.

30. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Thorn I, Soderberg O, Hultdin M, et al. Somatically mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2002;99(6):2262-4.

31. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Eriksson I, Soderberg O, Karlsson K, et al. Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted Vlambda2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. Blood. 2003;101(12):4952-7.

32. Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, Ghiotto F, Allen SL, Kolitz J, et al. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. J Exp Med. 2004;200(4):519-25.

33. Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Tobin G, Boudjogra M, Scielzo C, et al. Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. Blood. 2008;111(3):1524-33.

34. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Boudjograh M, Guida G, Smilevska T, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. Blood. 2007;109(1):259-70.

35. Maizels N. Immunoglobulin gene diversification. Annu Rev Genet. 2005;39(23-46.

36. Darzentas N, Hadzidimitriou A, Murray F, Hatzi K, Josefsson P, Laoutaris N, et al. A different ontogenesis for chronic lymphocytic leukemia cases carrying stereotyped antigen receptors: molecular and computational evidence. Leukemia;24(1):125-32.

37. Ghiotto F, Fais F, Valetto A, Albesiano E, Hashimoto S, Dono M, et al. Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. J Clin Invest. 2004;113(7):1008-16.

38. Thorselius M, Krober A, Murray F, Thunberg U, Tobin G, Buhler A, et al. Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in VH3-21-using chronic lymphocytic leukemia patients independent of geographic origin and mutational status. Blood. 2006;107(7):2889-94.

39. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. Leukemia. 1994;8(10):1640-5.

40. DiRaimondo F, Albitar M, Huh Y, O'Brien S, Montillo M, Tedeschi A, et al. The clinical and diagnostic relevance of CD23 expression in the chronic lymphoproliferative disease. Cancer. 2002;94(6):1721-30.

41. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). Am J Clin Pathol. 1997;108(4):378-82.

42. Matutes E, Polliack A. Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia. Rev Clin Exp Hematol. 2000;4(1):22-47.

43. Boonstra JG, van Lom K, Langerak AW, Graveland WJ, Valk PJ, Kraan J, et al. CD38 as a prognostic factor in B cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL): comparison of three approaches to analyze its expression. Cytometry B Clin Cytom. 2006;70(3):136-41.

44. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. Lancet. 2004;363(9403):105-11.

45. Ghia P, Chiorazzi N, Stamatopoulos K. Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation. J Intern Med. 2008;264(6):549-62.

46. Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. Blood;117(6):1781-91.

47. Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. Annu Rev Immunol. 2003;21(841-94.

48. Bomben R, Dal Bo M, Capello D, Forconi F, Maffei R, Laurenti L, et al. Molecular and clinical features of chronic lymphocytic leukaemia with stereotyped B cell receptors: results from an Italian multicentre study. Br J Haematol. 2009;144(4):492-506.

49. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 1999;94(6):1840-7.

50. Lanham S, Hamblin T, Oscier D, Ibbotson R, Stevenson F, Packham G. Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2003;101(3):1087-93.

51. Mockridge CI, Potter KN, Wheatley I, Neville LA, Packham G, Stevenson FK. Reversible anergy of sIgM-mediated signaling in the two subsets of CLL defined by VH-gene mutational status. Blood. 2007;109(10):4424-31.

52. Efremov DG, Gobessi S, Longo PG. Signaling pathways activated by antigen-receptor engagement in chronic lymphocytic leukemia B-cells. Autoimmun Rev. 2007;7(2):102-8.

53. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. Science. 1998;282(5392):1318-21.

54. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. Cell. 1997;91(2):231-41.

55. Grumont RJ, Rourke IJ, O'Reilly LA, Strasser A, Miyake K, Sha W, et al. B lymphocytes differentially use the Rel and nuclear factor kappaB1 (NF-kappaB1)

transcription factors to regulate cell cycle progression and apoptosis in quiescent and mitogen-activated cells. J Exp Med. 1998;187(5):663-74.

56. Saijo K, Mecklenbrauker I, Santana A, Leitger M, Schmedt C, Tarakhovsky A. Protein kinase C beta controls nuclear factor kappaB activation in B cells through selective regulation of the IkappaB kinase alpha. J Exp Med. 2002;195(12):1647-52.

57. Jiang A, Craxton A, Kurosaki T, Clark EA. Different protein tyrosine kinases are required for B cell antigen receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase, c-Jun NH2-terminal kinase 1, and p38 mitogen-activated protein kinase. J Exp Med. 1998;188(7):1297-306.

58. Richards JD, Dave SH, Chou CH, Mamchak AA, DeFranco AL. Inhibition of the MEK/ERK signaling pathway blocks a subset of B cell responses to antigen. J Immunol. 2001;166(6):3855-64.

59. Hivroz C, Geny B, Brouet JC, Grillot-Courvalin C. Altered signal transduction secondary to surface IgM cross-linking on B-chronic lymphocytic leukemia cells. Differential activation of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C. J Immunol. 1990;144(6):2351-8.

60. Michel F, Merle-Beral H, Legac E, Michel A, Debre P, Bismuth G. Defective calcium response in B-chronic lymphocytic leukemia cells. Alteration of early protein tyrosine phosphorylation and of the mechanism responsible for cell calcium influx. J Immunol. 1993;150(8 Pt 1):3624-33.

61. Semichon M, Merle-Beral H, Lang V, Bismuth G. Normal Syk protein level but abnormal tyrosine phosphorylation in B-CLL cells. Leukemia. 1997;11(11):1921-8.

62. Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2002;100(13):4609-14.

63. Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, Sica S, Leone G, Efremov DG. ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. Blood. 2007;109(5):2032-9.

64. Petlickovski A, Laurenti L, Li X, Marietti S, Chiusolo P, Sica S, et al. Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. Blood. 2005;105(12):4820-7.

65. Healy JI, Dolmetsch RE, Timmerman LA, Cyster JG, Thomas ML, Crabtree GR, et al. Different nuclear signals are activated by the B cell receptor during positive versus negative signaling. Immunity. 1997;6(4):419-28.

66. Wong SC, Chew WK, Tan JE, Melendez AJ, Francis F, Lam KP. Peritoneal CD5+ B-1 cells have signaling properties similar to tolerant B cells. J Biol Chem. 2002;277(34):30707-15.

67. Muzio M, Apollonio B, Scielzo C, Frenquelli M, Vandoni I, Boussiotis V, et al. Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. Blood. 2008;112(1):188-95.

68. Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ, Steele AJ, Packham G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. Blood;118(16):4313-20.

69. Borche L, Lim A, Binet JL, Dighiero G. Evidence that chronic lymphocytic leukemia B lymphocytes are frequently committed to production of natural autoantibodies. Blood. 1990;76(3):562-9.

70. Herve M, Xu K, Ng YS, Wardemann H, Albesiano E, Messmer BT, et al. Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. J Clin Invest. 2005;115(6):1636-43.

71. Chu CC, Catera R, Hatzi K, Yan XJ, Zhang L, Wang XB, et al. Chronic lymphocytic leukemia antibodies with a common stereotypic rearrangement recognize nonmuscle myosin heavy chain IIA. Blood. 2008;112(13):5122-9.

72. Chu CC, Catera R, Zhang L, Didier S, Agagnina BM, Damle RN, et al. Many chronic lymphocytic leukemia antibodies recognize apoptotic cells with exposed nonmuscle myosin heavy chain IIA: implications for patient outcome and cell of origin. Blood;115(19):3907-15.

73. Lanemo Myhrinder A, Hellqvist E, Sidorova E, Soderberg A, Baxendale H, Dahle C, et al. A new perspective: molecular motifs on oxidized LDL, apoptotic cells, and bacteria are targets for chronic lymphocytic leukemia antibodies. Blood. 2008;111(7):3838-48.

74. Catera R, Silverman GJ, Hatzi K, Seiler T, Didier S, Zhang L, et al. Chronic lymphocytic leukemia cells recognize conserved epitopes associated with apoptosis and oxidation. Mol Med. 2008;14(11-12):665-74.

75. Seiler T, Woelfle M, Yancopoulos S, Catera R, Li W, Hatzi K, et al. Characterization of structurally defined epitopes recognized by monoclonal antibodies produced by chronic lymphocytic leukemia B cells. Blood. 2009;114(17):3615-24.

76. Chiron D, Bekeredjian-Ding I, Pellat-Deceunynck C, Bataille R, Jego G. Toll-like receptors: lessons to learn from normal and malignant human B cells. Blood. 2008;112(6):2205-13.

77. Bretscher P, Cohn M. A theory of self-nonself discrimination. Science. 1970;169(950):1042-9.

78. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1989;54 Pt 1(1-13.

79. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature. 1997;388(6640):394-7.

80. Muzio M, Mantovani A. Toll-like receptors. Microbes Infect. 2000;2(3):251-5.

81. Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. Nat Immunol. 2006;7(12):1250-7.

82. McGettrick AF, O'Neill LA. Toll-like receptors: key activators of leucocytes and regulator of haematopoiesis. Br J Haematol. 2007;139(2):185-93.

83. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science. 1998;282(5396):2085-8.

84. Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. Nat Immunol. 2001;2(10):947-50.

85. Ruprecht CR, Lanzavecchia A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. Eur J Immunol. 2006;36(4):810-6.

86. Petterson T, Jendholm J, Mansson A, Bjartell A, Riesbeck K, Cardell LO. Effects of NOD-like receptors in human B lymphocytes and crosstalk between NOD1/NOD2 and Toll-like receptors. J Leukoc Biol;89(2):177-87.

87. Pasare C, Medzhitov R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. Nature. 2005;438(7066):364-8.

88. Meyer-Bahlburg A, Khim S, Rawlings DJ. B cell intrinsic TLR signals amplify but are not required for humoral immunity. J Exp Med. 2007;204(13):3095-101.

89. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. Nature. 2002;416(6881):603-7.

90. Lau CM, Broughton C, Tabor AS, Akira S, Flavell RA, Mamula MJ, et al. RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. J Exp Med. 2005;202(9):1171-7.

91. Poovassery JS, Vanden Bush TJ, Bishop GA. Antigen receptor signals rescue B cells from TLR tolerance. J Immunol. 2009;183(5):2974-83.

92. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell. 2006;124(4):783-801.

93. Zhang SY, Jouanguy E, Sancho-Shimizu V, von Bernuth H, Yang K, Abel L, et al. Human Toll-like receptor-dependent induction of interferons in protective immunity to viruses. Immunol Rev. 2007;220(225-36.

94. Choe J, Kelker MS, Wilson IA. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. Science. 2005;309(5734):581-5.

95. Xu Y, Tao X, Shen B, Horng T, Medzhitov R, Manley JL, et al. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. Nature. 2000;408(6808):111-5.

96. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. Science. 2004;303(5663):1529-31.

97. Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Gellert T, et al. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. Eur J Immunol. 2003;33(11):2987-97.

98. Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(15):5598-603.

99. Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. J Exp Med. 2003;198(3):513-20.

100. Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, et al. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. J Immunol. 2003;171(6):3154-62.

101. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. Nature. 2001;413(6857):732-8.

102. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. Nat Immunol. 2002;3(2):196-200.

103. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. Science. 2004;303(5663):1526-9.

104. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature. 2000;408(6813):740-5.

105. Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, et al. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. J Immunol. 2000;164(2):554-7.

106. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, et al. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. J Immunol. 2002;169(1):10-4.

107. Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, et al. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. Int Immunol. 2001;13(7):933-40.

108. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(25):13766-71.

109. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. Science. 1990;249(4975):1431-3.

110. Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, et al. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. Nat Immunol. 2002;3(7):667-72.

111. Anders HJ, Zecher D, Pawar RD, Patole PS. Molecular mechanisms of autoimmunity triggered by microbial infection. Arthritis Res Ther. 2005;7(5):215-24.

112. Hopkins PA, Sriskandan S. Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. Clin Exp Immunol. 2005;140(3):395-407.

113. Kagnoff MF, Eckmann L. Epithelial cells as sensors for microbial infection. J Clin Invest. 1997;100(1):6-10.

114. Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Tomizawa H, Matsushima K, et al. Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. J Immunol. 2003;171(8):3977-82.

115. McCurdy JD, Olynych TJ, Maher LH, Marshall JS. Cutting edge: distinct Toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells. J Immunol. 2003;170(4):1625-9.

116. Fan J, Malik AB. Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling augments chemokine-induced neutrophil migration by modulating cell surface expression of chemokine receptors. Nat Med. 2003;9(3):315-21.

117. Cook DN, Hollingsworth JW, Jr., Schwartz DA. Toll-like receptors and the genetics of innate immunity. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2003;3(6):523-9.

118. Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. J Biol Chem. 2001;276(7):4812-8.

119. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. J Biol Chem. 2003;278(11):8869-72.

120. Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala J, et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. Science. 2003;300(5625):1584-7.

121. Inohara, Chamaillard, McDonald C, Nunez G. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. Annu Rev Biochem. 2005;74(355-83.

122. Chamaillard M, Girardin SE, Viala J, Philpott DJ. Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. Cell Microbiol. 2003;5(9):581-92.

123. Fritz JH, Girardin SE, Fitting C, Werts C, Mengin-Lecreulx D, Caroff M, et al. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. Eur J Immunol. 2005;35(8):2459-70.

124. Lee MS, Kim YJ. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. Annu Rev Biochem. 2007;76(447-80.

125. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. J Immunol. 2002;168(9):4531-7.

126. Bernasconi NL, Onai N, Lanzavecchia A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. Blood. 2003;101(11):4500-4.

127. Bourke E, Bosisio D, Golay J, Polentarutti N, Mantovani A. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. Blood. 2003;102(3):956-63.

128. Mansson A, Adner M, Hockerfelt U, Cardell LO. A distinct Toll-like receptor repertoire in human tonsillar B cells, directly activated by PamCSK, R-837 and CpG-2006 stimulation. Immunology. 2006;118(4):539-48.

129. Ganley-Leal LM, Liu X, Wetzler LM. Toll-like receptor 2-mediated human B cell differentiation. Clin Immunol. 2006;120(3):272-84.

130. Zarember KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. J Immunol. 2002;168(2):554-61.

131. Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Petlickovski A, Pelosi M, Chiusolo P, et al. The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease. Leukemia. 2007;21(1):110-20.

132. Spaner DE, Shi Y, White D, Mena J, Hammond C, Tomic J, et al. Immunomodulatory effects of Toll-like receptor-7 activation on chronic lymphocytic leukemia cells. Leukemia. 2006;20(2):286-95.

133. Decker T, Peschel C. Effect of immunostimulatory CpG-oligonucleotides in chronic lymphocytic leukemia B cells. Leuk Lymphoma. 2001;42(3):301-7.

134. Jahrsdorfer B, Hartmann G, Racila E, Jackson W, Muhlenhoff L, Meinhardt G, et al. CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens. J Leukoc Biol. 2001;69(1):81-8.

135. Muzio M, Scielzo C, Bertilaccio MT, Frenquelli M, Ghia P, Caligaris-Cappio F. Expression and function of toll like receptors in chronic lymphocytic leukaemia cells. Br J Haematol. 2009;144(4):507-16.

136. Tomic J, White D, Shi Y, Mena J, Hammond C, He L, et al. Sensitization of IL-2 signaling through TLR-7 enhances B lymphoma cell immunogenicity. J Immunol. 2006;176(6):3830-9.

137. Hammadi A, Billard C, Faussat AM, Kolb JP. Stimulation of iNOS expression and apoptosis resistance in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells through engagement of Toll-like receptor 7 (TLR-7) and NF-kappaB activation. Nitric Oxide. 2008;19(2):138-45.

138. Decker T, Schneller F, Sparwasser T, Tretter T, Lipford GB, Wagner H, et al. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. Blood. 2000;95(3):999-1006.

139. Jahrsdorfer B, Wooldridge JE, Blackwell SE, Taylor CM, Griffith TS, Link BK, et al. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides induce apoptosis of B cell chronic lymphocytic leukemia cells. J Leukoc Biol. 2005;77(3):378-87.

140. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol. 2004;4(7):499-511.

141. Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. Nature. 2005;434(7034):772-7.

142. Chen ZJ. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. Nat Cell Biol. 2005;7(8):758-65.

143. Kufer TA, Fritz JH, Philpott DJ. NACHT-LRR proteins (NLRs) in bacterial infection and immunity. Trends Microbiol. 2005;13(8):381-8.

144. Dufner A, Pownall S, Mak TW. Caspase recruitment domain protein 6 is a microtubule-interacting protein that positively modulates NF-kappaB activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(4):988-93.

145. Barnich N, Hisamatsu T, Aguirre JE, Xavier R, Reinecker HC, Podolsky DK. GRIM-19 interacts with nucleotide oligomerization domain 2 and serves as downstream effector of anti-bacterial function in intestinal epithelial cells. J Biol Chem. 2005;280(19):19021-6.

146. Kufer TA, Kremmer E, Banks DJ, Philpott DJ. Role for erbin in bacterial activation of Nod2. Infect Immun. 2006;74(6):3115-24.

147. Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, et al. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. J Biol Chem. 1999;274(21):14560-7.

148. da Silva Correia J, Miranda Y, Leonard N, Hsu J, Ulevitch RJ. Regulation of Nod1-mediated signaling pathways. Cell Death Differ. 2007;14(4):830-9.

149. Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Brochet X, Murray F, Yan XJ, et al. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. Blood. 2012;119(19):4467-75.

150. Fillatreau S, Manz RA. Tolls for B cells. Eur J Immunol. 2006;36(4):798-801.

151. Shi Y, White D, He L, Miller RL, Spaner DE. Toll-like receptor-7 tolerizes malignant B cells and enhances killing by cytotoxic agents. Cancer Res. 2007;67(4):1823-31.

152. Porakishvili N, Memon A, Vispute K, Kulikova N, Clark EA, Rai KR, et al. CD180 functions in activation, survival and cycling of B chronic lymphocytic leukaemia cells. Br J Haematol. 2011;153(4):486-98.

153. Aderka D, Maor Y, Novick D, Engelmann H, Kahn Y, Levo Y, et al. Interleukin-6 inhibits the proliferation of B-chronic lymphocytic leukemia cells that is induced by tumor necrosis factor-alpha or -beta. Blood. 1993;81(8):2076-84.

154. Jahrsdorfer B, Muhlenhoff L, Blackwell SE, Wagner M, Poeck H, Hartmann E, et al. B-cell lymphomas differ in their responsiveness to CpG oligodeoxynucleotides. Clin Cancer Res. 2005;11(4):1490-9.

155. Brisslert M, Bokarewa M, Larsson P, Wing K, Collins LV, Tarkowski A. Phenotypic and functional characterization of human CD25+ B cells. Immunology. 2006;117(4):548-57.

156. Sato S, Nomura F, Kawai T, Takeuchi O, Muhlradt PF, Takeda K, et al. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. J Immunol. 2000;165(12):7096-101.

157. Lehner MD, Morath S, Michelsen KS, Schumann RR, Hartung T. Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. J Immunol. 2001;166(8):5161-7.

158. Rosen A, Murray F, Evaldsson C, Rosenquist R. Antigens in chronic lymphocytic leukemia--implications for cell origin and leukemogenesis. Semin Cancer Biol;20(6):400-9.

159. Broker BM, Klajman A, Youinou P, Jouquan J, Worman CP, Murphy J, et al. Chronic lymphocytic leukemic (CLL) cells secrete multispecific autoantibodies. J Autoimmun. 1988;1(5):469-81.

160. Sthoeger ZM, Wakai M, Tse DB, Vinciguerra VP, Allen SL, Budman DR, et al. Production of autoantibodies by CD5-expressing B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia. J Exp Med. 1989;169(1):255-68.

161. Landgren O, Rapkin JS, Caporaso NE, Mellemkjaer L, Gridley G, Goldin LR, et al. Respiratory tract infections and subsequent risk of chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2007;109(5):2198-201.

162. Grandjenette C, Kennel A, Faure GC, Bene MC, Feugier P. Expression of functional toll-like receptors by B-chronic lymphocytic leukemia cells. Haematologica. 2007;92(9):1279-81.

163. Rozkova D, Novotna L, Pytlik R, Hochova I, Kozak T, Bartunkova J, et al. Toll-like receptors on B-CLL cells: expression and functional consequences of their stimulation. Int J Cancer;126(5):1132-43.

164. Silberstein LE, George A, Durdik JM, Kipps TJ. The V4-34 encoded anti-i autoantibodies recognize a large subset of human and mouse B-cells. Blood Cells Mol Dis. 1996;22(2):126-38.

165. Li H, Jiang Y, Prak EL, Radic M, Weigert M. Editors and editing of anti-DNA receptors. Immunity. 2001;15(6):947-57.

166. Mockridge CI, Rahman A, Buchan S, Hamblin T, Isenberg DA, Stevenson FK, et al. Common patterns of B cell perturbation and expanded V4-34 immunoglobulin gene usage in autoimmunity and infection. Autoimmunity. 2004;37(1):9-15.

167. Kostareli E, Hadzidimitriou A, Stavroyianni N, Darzentas N, Athanasiadou A, Gounari M, 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. 2009;23(5):919-24.

168. Sutton LA, Kostareli E, Hadzidimitriou A, Darzentas N, Tsaftaris A, Anagnostopoulos A, et al. Extensive intraclonal diversification in a subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with stereotyped IGHV4-34 receptors: implications for ongoing interactions with antigen. Blood. 2009;114(20):4460-8.

169. Marincevic M, Cahill N, Gunnarsson R, Isaksson A, Mansouri M, Goransson H, et al. High-density screening reveals a different spectrum of genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia patients with 'stereotyped' IGHV3-21 and IGHV4-34 B-cell receptors. Haematologica;95(9):1519-25.

170. Marincevic M, Mansouri M, Kanduri M, Isaksson A, Goransson H, Smedby KE, et al. Distinct gene expression profiles in subsets of chronic lymphocytic leukemia expressing stereotyped IGHV4-34 B-cell receptors. Haematologica;95(12):2072-9.

171. Spaner DE, Masellis A. Toll-like receptor agonists in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. Leukemia. 2007;21(1):53-60.

11. Παραρτήματα

Παράρτημα 1: Η διάταξη της πλάκας που χρησιμοποιήθηκε και επιπρόσθετα δεδομένα για τα γονίδια που αναλύθηκαν

ΘΕΣΗ	UniGene	ΣΥΜΒΟΛΟ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΟΝΟΜΑ ΓΟΝΙΔΙΟΥ
A01	Hs.159494	BTK	Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase	AGMX1/AT
A02	Hs.591630	CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	CAP4/FLICE
A03	Hs.303649	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	GDCF-2/GDCF-2 HC11
A04	Hs.163867	CD14	CD14 molecule	CD14
A05	Hs.838	CD80	CD80 molecule	CD28LG/CD28LG1
A06	Hs.171182	CD86	CD86 molecule	B7-2/B70
A07	Hs.198998	CHUK	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	IKBKA/IKK-alpha
A08	Hs.236516	CLEC4E	C-type lectin domain family 4, member E	CLECSF9/MINCLE
A09	Hs.1349	CSF2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	GMCSF
A10	Hs.2233	CSF3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	G-CSF/GCSF
A11	Hs.632586	CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	C7/IFI10
A12	Hs.131431	EIF2AK2	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	EIF2AK1/PKR
B01	Hs.181128	ELK1	ELK1, member of ETS oncogene family	Elk1
B02	Hs.86131	FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	GIG3/MORT1
B03	Hs.25647	FOS	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	c-fos
B04	Hs.434102	HMGB1	High-mobility group box 1	DKFZp686A04236/HMG1
B05	Hs.37003	HRAS	V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	HRAS1/K-ras
B06	Hs.520028	HSPA1A	Heat shock 70kDa protein 1A	HSP70-1/HSP72
B07	Hs.595053	HSPD1	Heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	CPN60/GROEL
B08	Hs.37026	IFNA1	Interferon, alpha 1	IFL/IFN
B09	Hs.93177	IFNB1	Interferon, beta 1, fibroblast	IFB/IFF
B10	Hs.856	IFNG	Interferon, gamma	IFG/IFI
B11	Hs.413513	IKBKB	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	IKK-beta/IKK2
B12	Hs.193717	IL10	Interleukin 10	CSIF/IL-10
C01	Hs.673	IL12A	Interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)	CLMF/IL-12A
C02	Hs.1722	IL1A	Interleukin 1, alpha	IL-1A/IL1
C03	Hs.126256	IL1B	Interleukin 1, beta	IL-1/IL1-BETA

ΘΕΣΗ	UniGene	ΣΥΜΒΟΛΟ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΟΝΟΜΑ ΓΟΝΙΔΙΟΥ
C04	Hs.89679	IL2	Interleukin 2	IL-2/TCGF
C05	Hs.654458	IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)	BSF2/HGF
C06	Hs.624	IL8	Interleukin 8	3-10C/AMCF-I
C07	Hs.522819	IRAK1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1	IRAK/pelle
C08	Hs.449207	IRAK2	Interleukin-1 receptor-associated kinase 2	IRAK-2
C09	Hs.436061	IRF1	Interferon regulatory factor 1	IRF-1/MAR
C10	Hs.75254	IRF3	Interferon regulatory factor 3	IRF-3
C11	Hs.525704	JUN	Jun oncogene	AP1/c-Jun
C12	Hs.36	LTA	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)	LT/TNFB
D01	Hs.87205	CD180	CD180 molecule	LY64/Ly78
D02	Hs.653138	LY86	Lymphocyte antigen 86	MD-1
D03	Hs.69328	LY96	Lymphocyte antigen 96	MD-2
D04	Hs.514012	MAP2K3	Mitogen-activated protein kinase kinase 3	MAPKK3/MEK3
D05	Hs.514681	MAP2K4	Mitogen-activated protein kinase kinase 4	JNKK/JNKK1
D06	Hs.634810	MAP3K1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	MAPKKK1/MEKK
D07	Hs.644143	MAP3K7	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	TAK1/TGF1a
D08	Hs.507681	MAP3K7IP1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 1	TAB1
D09	Hs.431550	MAP4K4	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4	FLH21957/HGK
D10	Hs.138211	MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8	JNK/JNK1
D11	Hs.207763	MAPK8IP3	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3	DKFZp762N1113/JIP3
D12	Hs.82116	MYD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)	MyD88
E01	Hs.431926	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	DKFZp686C01211/EBP-1
E02	Hs.73090	NFKB2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)	LYT-10/LYT10
E03	Hs.81328	NFKBIA	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	IKBA/MAD-3
E04	Hs.2764	NFKBIL1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 1	IKBL/LST1
E05	Hs.530539	NFRKB	Nuclear factor related to kappaB binding protein	DKFZp547B2013
E06	Hs.549074	NR2C2	Nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2	TAK1/TR2R1
E07	Hs.7886	PELI1	Pellino homolog 1 (Drosophila)	DKFZp686C18116
E08	Hs.103110	PPARA	Peroxisome proliferative activated receptor, alpha	NR1C1/PPAR
E09	Hs.632540	PRKRA	Protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator	HSD14/PACT

ΘΕΣΗ	UniGene	ΣΥΜΒΟΛΟ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΟΝΟΜΑ ΓΟΝΙΔΙΟΥ
E10	Hs.196384	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	COX-2/COX2
E11	Hs.631886	REL	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian)	C-Rel
E12	Hs.502875	RELA	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3, p65 (avian)	NFKB3
F01	Hs.103755	RIPK2	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2	CARD3/CARDIAK
F02	Hs.532781	SARM1	Sterile alpha and TIR motif containing 1	SAMD2/SARM
F03	Hs.501624	SIGIRR	Single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain	TIR8
F04	Hs.515146	ECSIT	ECSIT homolog (Drosophila)	SITPEC
F05	Hs.505874	TBK1	TANK-binding kinase 1	NAK/T2K
F06	Hs.642817	TICAM2	Toll-like receptor adaptor molecule 2	TICAM-2/TIRAP3
F07	Hs.537126	TIRAP	Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein	Mal/wyatt
F08	Hs.111805	TLR1	Toll-like receptor 1	CD281/DKFZp547I0610
F09	Hs.120551	TLR10	Toll-like receptor 10	MGC104967
F10	Hs.519033	TLR2	Toll-like receptor 2	CD282/TIL4
F11	Hs.543332	TLR3	Toll-like receptor 3	CD283
F12	Hs.174312	TLR4	Toll-like receptor 4	CD284/TOLL
G01	Hs.135853	TLR5	Toll-like receptor 5	SLEB1/TIL3
G02	Hs.575090	TLR6	Toll-like receptor 6	TLR6
G03	Hs.443036	TLR7	Toll-like receptor 7	TLR7
G04	Hs.272410	TLR8	Toll-like receptor 8	MGC119599
G05	Hs.87968	TLR9	Toll-like receptor 9	CD289
G06	Hs.241570	TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	DIF/TNF-alpha
G07	Hs.279594	TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	CD120a/FPF
G08	Hs.368527	TOLLIP	Toll interacting protein	IL-1RAcPIP
G09	Hs.591983	TRAF6	TNF receptor-associated factor 6	MGC:3310/RNF85
G10	Hs.29344	TICAM1	Toll-like receptor adaptor molecule 1	PRVTIRB/TICAM-1
G11	Hs.524630	UBE2N	Ubiquitin-conjugating enzyme E2N (UBC13 homolog, yeast)	UBC13/UbcH-ben
G12	Hs.420529	UBE2V1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	CIR1/CROC-1
H01	Hs.534255	B2M	Beta-2-microglobulin	B2M

ΘΕΣΗ	UniGene	ΣΥΜΒΟΛΟ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΟΝΟΜΑ ΓΟΝΙΔΙΟΥ
H02	Hs.412707	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan syndrome)	HGPRT/HPRT
H03	Hs.546356	RPL13A	Ribosomal protein L13a	RPL13A
H04	Hs.544577	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3PD/GAPD
H05	Hs.520640	ACTB	Actin, beta	PS1TP5BP1
H06	N/A	HGDC	Human Genomic DNA Contamination	HIGX1A
H07	N/A	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
H08	N/A	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
H09	N/A	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
H10	N/A	PPC	Positive PCR Control	PPC
H11	N/A	PPC	Positive PCR Control	PPC
H12	N/A	PPC	Positive PCR Control	PPC

Παράρτημα 2: Στον πίνακα εμφανίζονται τα μοριακά χαρακτηριστικά όλων των ασθενών που μελετήθηκαν. Επίσης, επισημαίνεται σε ποιες μελέτες χρησιμοποιήθηκε το κάθε δείγμα.

Κωδικός	Στερεότυπο	IGHV	IGHD	IGHJ		Μήκος	Έκφραση	Έκφραση	Έκφραση	Λειτουργικότητα	Απόπτωση
	Υποσύνολο				%	CDR3	mRNA	πρωτεΐνη	NOD		
P103	4	IGHV4-34*01	IGHD3-10*01	IGHJ6*02	95,90	20	NAI	NAI	NAI	NAI	NAI
P104		IGHV4-39*06	IGHD2-2*01	IGHJ6*02	99,60	22	NAI		NAI	NAI	NAI
P1050	8	IGHV4-39*01	IGHD6-13*01	IGHJ5*02	100,00	19	NAI		NAI	NAI	
P1055		IGHV3-74*02	IGHD4-17*01	IGHJ4*03	92,20	11	NAI			NAI	
P1060		IGHV4-b*02	IGHD5-5*01	IGHJ4*02	96,60	14	NAI				
P1082	16	IGHV4-34*01	IGHD2-15*01	IGHJ6*02	96,30	24	NAI			NAI	
P1097		IGHV3-7*01	IGHD5-24*01	IGHJ1*01	91,20	14	NAI		NAI		
P1142		IGHV4-39*01	IGHD6-19*01	IGHJ6*02	95,40	16	NAI				
P1156		IGHV3-13*01	IGHD3-3*01	IGHJ3*02	88,70	13	NAI	NAI	NAI	NAI	NAI
P1173	1	IGHV5-a*01	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	99,60	13	NAI			NAI	NAI
P1182		IGHV1-2*02	IGHD1-14*01	IGHJ3*02	95,60	13	NAI		NAI		
P1188		IGHV3-9*01	ND	IGHJ6*02	96,30	13	NAI	NAI		NAI	NAI
P1289		IGHV4-59*02	IGHD5-24*01	IGHJ3*02	87,00	12	NAI				
P130		IGHV1-2*02	IGHD6-13*01	IGHJ4*03	96,30	17	NAI		NAI		
P1422	4	IGHV4-34*02	IGHD5-12*01	IGHJ6*02	91,90	20	NAI				
P1456		IGHV4-4*02	IGHD6-6*01	IGHJ4*02	89,00	11	NAI				
P1522		IGHV4-61*02	IGHD6-6*01	IGHJ3*02	98,30	15	NAI	NAI		NAI	
P1563		IGHV4-34*01	IGHD1-26*01	IGHJ6*03	93,20	19	NAI			NAI	
P1610		IGHV1-18*01	IGHD3-3*01	IGHJ4*02	99,60	15	NAI		NAI		
P1615	8	IGHV4-39*01	IGHD6-13*01	IGHJ5*02	100,00	19	NAI		NAI	NAI	
P1626	4	IGHV4-34*02	IGHD4-17*01	IGHJ6*02	94,80	18	NAI	NAI	NAI	NAI	NAI
P1697		IGHV1-69*01	IGHD3-22*01	IGHJ4*03	93,9	12				NAI	NAI
P1707		IGHV1-8*01	IGHD3-3*01	IGHJ6*02	100,00	21	NAI			NAI	
P1812		IGHV3-48*01	IGHD3-3*01	IGHJ4*02	100,00	10	NAI				
P1837		IGHV1-2*02	IGHD3-3*01	IGHJ4*02	100,00	18	NAI				
P1894		IGHV3-30*18	IGHD1-26*01	IGHJ3*02	92,90	16	NAI	NAI		NAI	
P1989		IGHV3-33*01	IGHD3-10*01	IGHJ3*02	96,60	22	NAI				
P2184		IGHV3-7*01	IGHD3-16*01	IGHJ4*02	93,90	13	NAI		NAI		
P2329		IGHV3-21*01	IGHD4-4*01	IGHJ4*02	96,30	13	NAI			NAI	
P2355	1	IGHV1-2*02	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100,00	13	NAI	NAI	NAI	NAI	NAI
P2446	8	IGHV4-39*06	IGHD6-13*01	IGHJ5*02	99,70	19	NAI			NAI	
P2512		IGHV1-69*01	IGHD3-3*01	IGHJ4*02	99,30	22	NAI				
P2528		IGHV4-34*01	IGHD1-14*01	IGHJ4*02	95,60	13	NAI		NAI	NAI	NAI
P2548		IGHV3-33*01	IGHD2-15*01	IGHJ5*02	100,00	23	NAI			NAI	NAI
P2577		IGHV3-33*01	IGHD6-6*01	IGHJ3*02	91,90	12	NAI		NAI	NAI	
P2618		IGHV3-23*01	IGHD6-6*01	IGHJ4*02	95,90	16	NAI			NAI	
P2685		IGHV1-3*01	IGHD1-26*01	IGHJ5*02	87,80	16	NAI		NAI	NAI	
P2740		IGHV4-34*01	IGHD4-4*01	IGHJ4*02	95,90	14	NAI			NAI	
P280		IGHV4-31*01	IGHD4-4*01	IGHJ6*02	94,30	11	NAI			NAI	
P2920	4	IGHV4-34*01	IGHD3-10*01	IGHJ6*02	93,50	20	NAI				
P3020	4	IGHV4-34*01	IGHD3-10*01	IGHJ6*02	90,00	20	NAI		NAI	NAI	NAI
P3021		IGHV4-34*01	IGHD3-10*01	IGHJ3*02	93,50	15	NAI		NAI	NAI	NAI
P3073	1	IGHV1-3*01	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100,00	13	NAI			NAI	
P3123		IGHV3-7*01	IGHD2-15*01	IGHJ3*02	89,90	13	NAI		NAI		
P323		IGHV4-59*01	IGHD1-1*01	IGHJ5*01	97,30	9	NAI				
P325		IGHV3-9*01	IGHD3-3*01	IGHJ4*02	100,00	19	NAI				
P326	2	IGHV3-21*02	IGHD1-14*01	IGHJ6*02	98,60	9	NAI		NAI		
P3492		IGHV2-5*01	IGHD3-3*02	IGHJ4*02	100,00	25	NAI	NAI			
P3506	1	IGHV1-2*02	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	99,70	14	NAI	NAI	NAI	NAI	NAI
P3551	4	IGHV4-34*01	IGHD5-12*01	IGHJ6*02	93,30	20	NAI			NAI	NAI
P3716		IGHV1-8*01	IGHD2-2*01	IGHJ5*02	89,20	19	NAI		NAI		
P3870	1	IGHV1-2*02	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100,00	13	NAI	NAI		NAI	NAI
P3916	4	IGHV4-34*01	IGHD3-10*01	IGHJ6*02	91,20	20	NAI			NAI	NAI
P3966		IGHV5-a*01	IGHD1-1*01	IGHJ5*02	99,30	20	NAI				
P4086		IGHV5-51*03	IGHD5-24*01	IGHJ4*02	95,80	13	NAI				
P427		IGHV3-30*18	IGHD5-24*01	IGHJ2*01	91,20	15	NAI	NAI		NAI	
P4295		IGHV1-2*02	IGHD2-8*02	IGHJ4*02	93,80	20	NAI			NAI	
P436		IGHV3-7*01	IGHD3-3*01	IGHJ3*02	92,20	17	NAI				
P4383		IGHV3-30*03	IGHD3-10*01	IGHJ4*02	95,10	24	NAI	NAI		NAI	NAI
P4438		IGHV3-23*01	IGHD3-10*02	IGHJ4*02	89,60	13	NAI				
P450		IGHV6-1*01	IGHD6-19*01	IGHJ6*02	94,80	15	NAI		NAI		
P4557		IGHV4-34*01	IGHD2-2*01	IGHJ4*02	97,20	11	NAI	NAI		NAI	
P4562		IGHV3-48*03	IGHD3-16*01	IGHJ4*01	95,10	9	NAI				
P458		IGHV3-11*01	IGHD5-24*01	IGHJ4*02	97,70	11	NAI				
P459		IGHV1-3*01	IGHD1-26*01	IGHJ4*02	89,00	16	NAI				
P4699	1	IGHV1-18*01	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	99,7	13				NAI	
P4712		IGHV1-24*01	IGHD3-10*01	IGHJ6*02	98,90	25	NAI	NAI			
P4875		IGHV3-53*02	IGHD2-15*01	IGHJ3*02	92,6	16				NAI	
P4906		IGHV6-1*01	IGHD3-10*01	IGHJ3*02	92,30	10	NAI		NAI		
P4972		IGHV3-7*01	IGHD3-16*01	IGHJ3*01	88,50	9	NAI				
P4994		IGHV4-34*12	IGHD6-6*01	IGHJ4*02	94,00	11	NAI	NAI		NAI	
P5005							NAI				
P5017		IGHV3-7*01	IGHD2-2*01	IGHJ6*02	100,00	25	NAI	NAI		NAI	NAI
P5063		IGHV3-23*01	IGHD2-15*01	IGHJ6*03	100,00	26	NAI	NAI			
P5092	**1**	IGHV5-a*03	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100,00	13	NAI	NAI		NAI	NAI
P511		IGHV3-20*01	IGHD3-3*01	IGHJ5*02	100	22				NAI	NAI
P5130		IGHV3-7*01	IGHD7-27*01	IGHJ4*03	97,80	12	NAI				
P5231	167	IGHV3-43*01	IGHD5-5*01	IGHJ4*02	100	15				NAI	
P5283		IGHV3-20*01	IGHD6-19*01	IGHJ1*01	97,20	10	NAI	NAI	NAI	NAI	NAI
P5359		IGHV3-15*01	IGHD2-2*01	IGHJ3*01	91,50	22	NAI				
P545		IGHV3-7*01	IGHD5-24*01	IGHJ4*01	92,90	10	NAI		NAI		
P5587		IGHV4-31*09	IGHD4-23*01	IGHJ6*03	94,10	12	NAI		NAI		
P5588	1	IGHV1-2*02	IGHD5-5*01	IGHJ4*02	100,00	13	NAI		NAI		
P5610		IGHV4-34*01	IGHD4-23*01	IGHJ6*02	94,70	18	NAI		NAI	NAI	NAI
P5642		IGHV3-11*01	IGHD2-8*01	IGHJ6*02	100,00	29	NAI				
P571		IGHV1-69*01	IGHD3-10*01	IGHJ6*02	99,40	20	NAI	NAI		NAI	
P5728		IGHV3-48*01	IGHD3-16*01	IGHJ4*02	97,60	10	NAI		NAI	NAI	
P573		IGHV1-69*01	IGHD3-22*01	IGHJ5*01	100,00	16	NAI				
P5740		IGHV4-4*02	IGHD6-6*01	IGHJ3*01	87,90	12	NAI		NAI		
P5744		IGHV3-74*03	IGHD2-8*01	IGHJ5*02	92,40	23	NAI		NAI		

Κωδικός	Στερεότυπο	IGHV	IGHD	IGHJ		Μήκος	Έκφραση	Έκφραση	Έκφραση	Λειτουργικότητα	Απόπτωση
	Υποσύνολο				%	CDR3	mRNA	πρωτεΐνη	NOD		
P585		IGHV4-31*03	IGHD2-8*01	IGHJ4*03	93,30	22	NAI				
P5895		IGHV3-15*01	IGHD4-4*01	IGHJ4*02	92,20	14	NAI				
P5949		IGHV3-49*03	IGHD1-1*01	IGHJ6*02	95,20	19	NAI	NAI	NAI	NAI	
P5975		IGHV1-69*01	IGHD2-2*01	IGHJ6*02	100,00	22	NAI		NAI		
P6068		IGHV3-7*01	IGHD3-22*01	IGHJ4*02	94,80	17	NAI			NAI	
P6077		IGHV1-69*01	IGHD2-21*02	IGHJ6*02	99,30	20	NAI		NAI		
P6079		IGHV3-30*03	IGHD4-4*01	IGHJ4*02	91,70	12	NAI		NAI		
P608		IGHV3-30*15	IGHD3-22*01	IGHJ4*02	92,20	19	NAI				
P6090	2	IGHV3-21*02	ND	IGHJ6*02	96,20	9	NAI		NAI		
P6103		IGHV4-34*01	IGHD2-15*01	IGHJ1*01	95,20	14	NAI		NAI		
P611		IGHV3-11*01	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100,00	14	NAI				
P6124		IGHV3-30*01	IGHD3-10*01	IGHJ5*02	100,00	24	NAI	NAI	NAI	NAI	NAI
P6237		IGHV1-3*01	IGHD1-7*01	IGHJ4*02	100,00	14	NAI				
P6264		IGHV5-51*01	IGHD2-2*01	IGHJ6*03	92,70	23	NAI		NAI	NAI	
P6391		IGHV4-39*01	IGHD3-22*01	IGHJ2*01	100,00	18	NAI		NAI		
P6414		IGHV4-34*01	IGHD3-22*01	IGHJ4*02	91,90	19	NAI				
P6460		IGHV3-30*03	IGHD3-10*01	IGHJ6*02	94,10	19	NAI		NAI	NAI	NAI
P6480		IGHV4-30-4*01	IGHD3-3*01	IGHJ6*02	100,00	26	NAI		NAI		
P6481		IGHV3-23*01	IGHD2-2*01	IGHJ4*02	98,60	14	NAI		NAI		
P6498		IGHV4-34*02	IGHD2-15*01	IGHJ6*02	94,70	20	NAI		NAI		
P650		IGHV1-69*01	IGHD2-2*01	IGHJ4*02	100,00	18	NAI				
P6520	4	IGHV4-34*02	IGHD3-10*01	IGHJ6*02	94,40	20	NAI	NAI		NAI	
P6539		IGHV1-69*04	IGHD3-9*01	IGHJ4*02	100,00	20	NAI				
P6613		IGHV2-26*01	IGHD2-2*02	IGHJ3*01	96,70		NAI				
P6638		IGHV4-4*02	IGHD2-8*01	IGHJ3*02	90,30	14	NAI				
P6668		IGHV4-4*02	IGHD3-22*01	IGHJ3*02	96,50	18	NAI				
P6823		IGHV3-7*01	IGHD3-16*01	IGHJ4*02	91,30	11	NAI				
P6832		IGHV3-30*03	IGHD3-22*01	IGHJ6*02	91,30	21	NAI				
P689		IGHV4-34*02	IGHD1-7*01	IGHJ4*01	94,50	16	NAI				
P7022		IGHV1-18*01	IGHD6-6*01	IGHJ4*02	96,20	12	NAI	NAI			
P7057		IGHV5-51*01	IGHD4-17*01	IGHJ4*02	90,30	14	NAI				
P7107		IGHV3-48*03	IGHD2-8*02	IGHJ4*02	89,20	14	NAI				
P711		IGHV4-34*02	IGHD6-19*01	IGHJ4*03	97,40	9	NAI	NAI		NAI	NAI
P7112		IGHV2-5*10	IGHD6-25*01	IGHJ4*02	94,20	16	NAI				
P7155		IGHV3-23*01	IGHD2-15*01	IGHJ3*02	100,00	23	NAI			NAI	
P717		IGHV3-49*03	IGHD3-3*01	IGHJ4*02	91,70	20	NAI		NAI		
P7209		IGHV3-53*01	IGHD2-2*01	IGHJ4*02	91,20	12	NAI				
P7225		IGHV4-61*01	IGHD3-22*01	IGHJ4*02	93,10	15	NAI				
P7226		IGHV5-51*01	IGHD3-3*01	IGHJ6*03	100,00	21	NAI				
P7317		IGHV3-7*01	IGHD3-10*01	IGHJ6*02	100,00	18	NAI	NAI			
P7395		IGHV3-30*04	IGHD2-15*01	IGHJ6*03	100,00	24	NAI	NAI			
P7396		IGHV3-33*01	IGHD3-3*01	IGHJ4*02	100,00	19	NAI				
P7732		IGHV1-2*04	IGHD2-2*01	IGHJ6*03	91,60	8	NAI				
P775		IGHV4-34*04	IGHD2-8*01	IGHJ3*01	94,1	17				NAI	NAI
P7794		IGHV3-23*04	IGHD2-15*01	IGHJ4*02	87,85	14					
P781	16	IGHV4-34*04	IGHD1-26*01	IGHJ6*02	95,00	24	NAI	NAI	NAI	NAI	NAI
P7833		IGHV3-73*01	IGHD3-22*01	IGHJ4*02	90,80	9	NAI				
P7929		IGHV3-20*01	IGHD3-22*01	IGHJ3*02	94,10	19	NAI				
P7937	1	IGHV7-4-1*02	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100,00	13				NAI	
P7961		IGHV3-64*05	IGHD3-3*01	IGHJ4*02	99,30	19	NAI			NAI	
P8071		IGHV1-2*02	IGHD2-2*01	IGHJ4*02	100,00	21	NAI	NAI			
P8192		IGHV3-23*01	IGHD3-9*01	IGHJ4*02	91,9	13				NAI	
P84		IGHV3-53*01	IGHD2-15*01	IGHJ4*01	97,20	16	NAI				
P860		IGHV4-30-4*01	IGHD4-23*01	IGHJ5*02	91,00	7	NAI				
P8699		IGHV4-34*01	IGHD3-3*01	IGHJ4*02	91,9					NAI	
P8762		IGHV1-69*06	IGHD5-24*01	IGHJ4*02	100	14				NAI	
P8805		IGHV1-69*01	IGHD2-15*01	IGHJ5*02	100,00	21				NAI	
P907	4	IGHV4-34*02	IGHD5-12*01	IGHJ6*02	93,20	20	NAI	NAI	NAI		
P922		IGHV3-7*01	IGHD3-9*01	IGHJ6*03	96,00	18	NAI		NAI		
P9297	16	IGHV4-34*02	IGHD2-2*01	IGHJ6*02	95,09	24				NAI	
P9320	6	IGHV1-69*01	IGHD3-16*02	IGHJ3*02	100,00	21				NAI	NAI
P9391		IGHV5-51*01	IGHD1-26*01	IGHJ4*02	93,40	13				NAI	NAI
P9940		IGHV3-30*03	IGHD3-3*01	IGHJ6*03	94,44	23				NAI	
IT01-0174-H1		IGHV5-51*03	IGHD3-3*01	IGHJ4*02	98,96	21	NAI				
IT01-0252-H1	8	IGHV4-39*07	IGHD6-19*01	IGHJ5*02	100,00	19	NAI				
IT01-0269-H1		IGHV3-43*01	IGHD3-9*01	IGHJ4*02	100,00	19	NAI				
IT01-0270-H1		IGHV1-46*01	IGHD3-22*01	IGHJ4*02	100,00	18	NAI				
IT01-0277-H1		IGHV3-33*01	IGHD3-10*01	IGHJ6*02	100,00	25	NAI				
IT01-0278-H1	4	IGHV4-34*01	IGHD2-21*02	IGHJ6*02	93,15	20	NAI				
IT01-0290-H1		IGHV1-2*02	IGHD1-26*01	IGHJ6*02	100,00	18	NAI				
IT01-0298-H1	1	IGHV1-3*01	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100,00	13	NAI				
IT01-0320-H1	1	IGHV1-3*01	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100,00	13	NAI				
IT01-0331-H1		IGHV1-69*02	IGHD3-3*01	IGHJ6*02	100,00	21	NAI				
N1314		IGHV3-23*01	IGHD4-23*01	IGHJ4*03	91,00	18	NAI				
N1498		IGHV1-58*01	IGHD3-3*01	IGHJ6*03	100,00	18	NAI		NAI		
N1660		IGHV1-8*01	IGHD4-17*01	IGHJ4*03	97,00	10	NAI				
N1704		IGHV1-69*01	IGHD2-2*01	IGHJ2*01	100,00	26	NAI				
N1713		IGHV1-18*01		IGHJ4*02	97,20	27	NAI		NAI		
N1728		IGHV4-34*01	IGHD1-7*01	IGHJ4*02	91,93	12	NAI				
N1777		IGHV3-30*18	IGHD3-22*01	IGHJ6*02	100,00	28	NAI				
N1839		IGHV4-31*03	IGHD3-3*01	IGHJ2*01	92,00	20	NAI				
N1868		IGHV3-33*01	IGHD3-16*01	IGHJ4*01	94,50	17	NAI				
N1887		IGHV1-69*01	IGHD5-12*01	IGHJ6*02	100,00	21	NAI				
N1930		IGHV4-34*02	IGHD2-15*01	IGHJ4*02	94,10	15	NAI				
N2199		IGHV1-69*01	IGHD3-22*01	IGHJ6*02	100,00	23	NAI				
N2325		IGHV3-23*01	IGHD3-16*01	IGHJ4*02	96,00	15	NAI				
N2386		IGHV4-4*02	IGHD2-15*01	IGHJ4*03	94,60	17	NAI				
N2396		IGHV1-46*03	IGHD6-19*01	IGHJ4*03	92,90	8	NAI				
N2687		IGHV3-23*01	IGHD5-24*	IGHJ4*02	92,60	16	NAI				
N3372		IGHV3-48*02	IGHD3-16*02	IGHJ4*02	96,87	17	NAI				

Κωδικός	Στερεότυπο	IGHV	IGHD	IGHJ		Μήκος	Έκφραση	Έκφραση	Έκφραση	Λειτουργικότητα	Απόπτωση
	Υποσύνολο				%	CDR3	mRNA	πρωτεΐνη	NOD		
N3517		IGHV3-7*01	IGHD5-24*01	IGHJ3*02	93,40	8	NAI				
N3527		IGHV6-1*01	IGHD2-15*01	IGHJ4*02	97,64	14	NAI				
N4556		IGHV3-30-3*01	IGHD2-2*01	IGHJ6*02	94,10	15	NAI				
N4617		IGHV3-7*01	IGHD2-21*01	IGHJ3*02	92,00	19	NAI				
N4691		IGHV3-48*03	IGHD5-12*01	IGHJ4*02	91,30	12	NAI				
N4707		IGHV1-18*01	IGHD6-13*01	IGHJ5*02	**93,75**	18	NAI				
N4708		IGHV3-48*01	IGHD4-17*01	IGHJ3*02	**95,49**	11	NAI				
N4797		IGHV3-23*01	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100,00	14	NAI				
N4798		IGHV3-23*01	IGHD2-2*01	IGHJ4*02	90,97	18	NAI				
N4848		IGHV3-15*01	IGHD1-14*01	IGHJ6*02	91,84	12	NAI				
N4865		IGHV3-23*01	IGHD3-10*02	IGHJ6*02	97,22	15	NAI				
N4931		IGHV1-69*01	IGHD2-2*01	IGHJ3*02	100,00	23	NAI				
N4932	33	IGHV4-39*01	IGHD3-22*01	IGHJ4*02	100,00	17	NAI				
N4969	262	IGHV3-30-3*01	IGHD2-2*01	IGHJ6*02	100,00	29	NAI				
N5059		IGHV4-34*01	IGHD3-22*01	IGHJ4*02	94,20	20	NAI				
N5760	1	IGHV1-3*01	IGHD6-19*01	IGHJ4*02	100,00	13	NAI				
N5761		IGHV4-4*07	IGHD3-22*01	IGHJ5*02	90,88	16	NAI				
N6015		IGHV3-48*01	IGHD3-9*01	IGHJ4*01	94,60	21	NAI				
N6084		IGHV4-34	IGHD3-22	IGHJ4	95,79	18	NAI				
N6101		IGHV3-49	IGHD3-10	IGHJ6	91,84	19	NAI				
N6205		IGHV1-18*01	IGHD3-9*01	IGHJ6*02	100,00	25	NAI				
N6296		IGHV1-69*06	IGHD3-16*02	IGHJ3*02	100,00	21	NAI				
N6343		IGHV3-30*03	IGHD5-24*01	IGHJ3*02	94,10	14	NAI				
N6448		IGHV1-69*06	IGHD3-3*01	IGHJ6*02	100,00	26	NAI				
N6450		IGHV3-23*01	IGHD2-21*02	IGHJ3*02	92,36	14	NAI				
N6490		IGHV4-61*02	IGHD3-10*01	IGHJ4*02	93,13	12	NAI				
N6901		IGHV3-66*02	IGHJ3*01, or IGHJ3*02	IGHD5-24*01	85,96	16	NAI				
N893		IGHV3-7*01	IGHD6-19*01	IGHJ4*01	94,20	11	NAI				

12. Βιογραφικό Σημείωμα

Προσωπικά στοιχεία

Ονοματεπώνυμο: Σταυρούλα Ντούφα

Τίτλος: Υποψήφια διδάκτωρ

Τόπος και Ημερομηνία Γέννησης: Λάρισα, 12 Ιουνίου 1984

Διεύθυνση: Ισιδώρου 52, Άνω Τούμπα, Θεσσαλονίκη

E-mail: s_ntoufa@yahoo.gr

Τηλέφωνο: 6944753237, 2310-844612

Εκπαίδευση

2008-σήμερα

Υποψήφια διδάκτωρ του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών σε συνεργασία με το εργαστήριο Μοριακής και Κυτταρικής Βιολογίας της Αιματολογικής Κλινικής & Τμήματος Μεταμοσχεύσεων Αιμοποιητικών κυττάρων του Νοσοκομείου Γ. Παπανικολάου και με το Εθνικό κέντρο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (ΕΚΕΤΑ)/ Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών (ΙΝΕΒ) με θέμα διδακτορικής διατριβής: «ΡΕΠΕΡΤΟΡΙΟ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΕΜΦΥΤΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΑΡΜΟΣΤΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ»

2008-2009 (25/11-20/3)

Επισκέπτρια στο Department of Oncology, Unit and Laboratory of Lymphoid Malignancies, Istituto Scientifico San Raffaele and Universita` Vita-Salute San Raffaele, Milano, Italy (υπεύθυνη Muzio Marta) με σκοπό την εκπαίδευση στην ανάλυση της σηματοδότησης των υποδοχέων έμφυτης ανοσίας.

2006-2007

Εκπόνηση διπλωματικής εργασίας με θέμα : « ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ-ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΔΕΙΞΗ ΤΗΣ DNA ΜΕΘΥΛΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΠΟΥ ΕΙΝΑΙ ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΓΚΑΘΙΔΡΥΣΗ ΤΟΥ ΠΑΤΡΙΚΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΗΤΡΙΚΟΥ ΑΠΟΤΥΠΩΜΑΤΟΣ (GENOMIC IMPRINTING)». Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης σε συνεργασία με το Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλ. Φλέμιγκ», τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής. (Υπό την επίβλεψη της Δρ. Αγαλιώτη Θεοδώρας).

2004 (05/07-10/08)

Εκπόνηση Πρακτικής άσκησης: Στο Γενικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής. (Υπό την επίβλεψη της Δρ. Κόλλια Παναγούλας).

2002-2006

Φοιτήτρια του τμήματος Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης. Βαθμός πτυχίου : Λίαν καλώς

Συμμετοχή σε ερευνητικά προγράμματα

2012 (01/01-31/05)

Υπότροφος του Εθνικού κέντρου Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (ΕΚΕΤΑ)/ Ινστιτούτο Αγροβιοτεχνολογίας (ΙΝΑ) στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος «CARIPLO: a multidisciplinary investigation into the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia for the identification of novel molecular therapeutic targets»

2012-13 (01/07/2012-28/02/2013)

Θέση Βιολόγου στο Γενικό Νοσοκομείο Γ. Παπανικολάου στα πλαίσια υλοποίησης του ερευνητικού προγράμματος «ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ 2009 - Ολοκληρωμένη γονοτυπική και φαινοτυπική ανάλυση επίκτητων νοσημάτων του αιμοποιητικού ιστού: παθογενετικές, διαγνωστικές, προγνωστικές και θεραπευτικές προεκτάσεις (ΕΝοσΑΙ)» στο εργαστήριο Μοριακής και Κυτταρικής Βιολογίας της Αιματολογικής Κλινίκης και Μονάδας Μεταμοσχέυσεων Αιμοποιητικών Κυττάρων

Εργαστηριακή εμπειρία

- απομόνωση κυττάρων και κυτταρικών υποπληθυσμών (Cell separation on density gradients, positive/negative cell selection)
- απομόνωση νουκλεϊκών οξέων (DNA/RNA/microRNA extraction)
- σχεδιασμός εκκινητών (primer design)
- αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain raction, PCR)
- αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time-PCR)
- αντίστροφη μεταγραφή ώριμων microRNA (reverse transcription of mature microRNAs)
- ανάλυση της έκφρασης μορίων του σηματοδοτικού μονοπατιού των υποδοχέων TLR με την τεχνική των συστοιχιών cDNA (cDNA microarrays)
- ανάλυση της έκφρασης των microRNA με την τεχνική των συστοιχιών cDNA (cDNA microarrays)
- αλληλούχιση του DNA με τη μέθοδο Sanger (Sanger sequencing)
- πέψη με ένζυμα περιορισμού (enzymatic digestion)
- κλωνοποίηση προιόντων PCR (cloning of PCR products)
- Southern Blotting
- διαμόλυνση πρωτογενών καρκινικών κυττάρων (primary cancer cell transfection using Amaxa nucleofector)
- κυτταροκαλλιέργιες μικρής και μεγάλης διέρκειας (cell culture)
- ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blotting)
- Κυτταρομετρία Ροής
- βιοπληροφορική ανάλυση ανοσοσφαιρινών (IMGT/V-GUEST, ClustalW)
- χειρισμός βιοπληροφορικών εργαλείων σχετικών με την βιολογία των microRNA (Diana Micro-T, Diana- mirPath, Tarbase, MirTarBase, Targetscan, PicTar)

Οργανωτικό έργο

2008-σήμερα

Συμμετοχή στην επίβλεψη διπλωματικών εργασιών στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, Αιματολογική Κλινική και Μονάδα Μεταμοσχεύσεων Αιμοποιητικών Κυττάρων, Γενικό Νοσοκομείο Γ. Παπανικολάου.

Διπλωματικές εργασίες:

ΓΙΩΡΓΟΣ ΚΟΓΙΑΣ: «Μελέτη Υποδοχέων TLR Στη Χρονια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία» Συνεργασία με το Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής. Ολοκληρώθηκε επιτυχώς και βαθμολογήθηκε με «Άριστα»

ΑΘΑΝΑΣΙΑ ΛΕΟΝΤΙΑΔΟΥ: «Μελέτη υποδοχέων έμφυτης ανοσίας στα Β λεμφοκύτταρα ασθενών με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία» Συνεργασία με το μεταπτυχιακό τμήμα της Σχολής Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Ολοκληρώθηκε επιτυχώς και βαθμολογήθηκε με «Άριστα».

VARDI ANNA: «Functional Analysis Of Innate Immunity Receptors In Chronic Lymphocytic Leukemia» Συνεργασία με το μεταπτυχιακό The molecular Basis of Human Disease του Πανεπιστημίου Κρήτης, Ιατρική σχολή, Τμήμα Βιολογίας. Ολοκληρώθηκε επιτυχώς και βαθμολογήθηκε με «Άριστα».

ΓΡΗΓΟΡΙΟΣ ΠΑΠΑΤΖΗΚΑΣ: «Μοριακή μελέτη της οδού TLR στη Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία» Συνεργασία με το Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής. Ολοκληρώθηκε επιτυχώς και βαθμολογήθηκε με «Άριστα».

ΜΑΡΙΑ ΤΣΙΑΜΙΤΑ: «Μοριακή Μελέτη των Υποδοχέων της Έμφυτης Ανόσιας Στη Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία» Συνεργασία με το Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής. Ολοκληρώθηκε επιτυχώς και βαθμολογήθηκε με «Άριστα».

ΧΡΗΣΤΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΥ: ANALYSIS OF miRNA EXPRESSION LEVELS, IMPACT AND REGULATION MECHANISMS, IN SUBSETS OF PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA. Συνεργασία με το Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Βιολογικών εφαρμογών και τεχνολογιών. Ολοκληρώθηκε επιτυχώς και βαθμολογήθηκε με «Άριστα».

ΕΛΙΣΑΒΕΤ ΧΑΡΤΟΜΑΤΖΙΔΟΥ: Ανάλυση της σηματοδότησης μέσω υποδοχέων έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας στη χρονιά λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Συνεργασία με το Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Βιολογικών εφαρμογών και τεχνολογιών. Σε εξέλιξη.

Επιπλέον εκπαίδευση

Αγγλικά - άριστα

2000 Certificate of Proficiency in English | University of Michigan.

Αγγλικά - πολύ καλά

1998 First Certificate in English | University of Cambridge.

Γερμανικά - πολύ καλά

1999 Zertifikat Deutsch als Fremdsprache, Goethe Institut.

Συμμετοχή σε συνέδρια

Ελληνικά Συνέδρια

11/2003| 55ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας-Αθήνα

11/2007| 18ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας-Θεσσαλονίκη

11/2008| 14° 19ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας- Θεσσαλονίκη

04/2010| 6ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κυτταρομετρίας- Κεφαλονιά

11/2010| 21ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας- θεσσαλονίκη

Διεθνή Συνέδρια

09/2007| IVth Conference on Stem Cell Gene Therapy- Halkidiki, Greece

06/2008| 13th Congress of the European Hematology Association- Copenhagen, Denmark

09/2009| 3rd International Conference on crossroads between innate and adaptive immunity- Chania, Greece

09/2009| IgCLL 3rd Educational Workshop on Immunoglobulin Gene Analysis in Chronic Lymphocytic Leukemia, Thessaloniki, Greece.

09/2010| 6th European Course on Clinical Cytometry;10th Euroconference on Clinical Cell Analysis- Valencia, Spain

10/2010| Antigens and Lymphomas Meeting- Santorini, Greece

12/2010| 52nd Annual Meeting of the American Society of Hematology- Orlando, Florida

06/2011| 15th Congress of EHA – London, UK

<u>**Ε**πιστημονικό έργο – **Δ**ημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά</u>

1. Arvaniti E*, ***<u>Ntoufa S*</u>***, Papakonstantinou N, Touloumenidou T, Laoutaris N, Anagnostopoulos A, et al. Toll-like receptor signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia: distinct gene expression profiles of potential pathogenetic significance in specific subsets of patients. *Haematologica; 2011 vol. 96 no. 11 1644-1652*

**** Equal First Authors***

2. Distinct Innate Immunity Pathways to Activation and Tolerance in Subgroups of Chronic Lymphocytic Leukemia with Distinct Immunoglobulin Receptors.

Ntoufa S, Vardi A, Papakonstantinou N, Anagnostopoulos A, et al. *Molecular Medicine. 2012. Mar 19. [Epub ahead of print]*

3. Distinct profiles of microrna modulating immune signaling pathways in different subsets of Chronic Lymphocytic Leukemia. Papakonstantinou N*, Ntoufa S*, Papadopoulos G, et al. *Paper under Revision*

**** Equal First Authors***

4. Distinct transcriptional control in major immunogenetic subsets of chronic lymphocytic leukemia exhibiting subset-biased global DNA methylation profiles. M. Kanduri, M. Marincevic, A. M. Halldórsdóttir, L. Mansouri, K. Juvenik, ***S. Ntoufa***, et al. *Epigenetics Volume 7 Issue 12*

5. ANTIGENS AND ANTIGEN RECEPTORS IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA. A. Agathangelidis, ***S. Ntoufa***, K. Stamatopoulos. *Advances in Experimental Medicine and Biology*

Aνακοινώσεις σε συνέδρια

1. Ι. Αθανασιάδου, Β. Ταχυνοπούλου, ***Σ. Ντούφα*** και συνεργάτες. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ (ΧΛΛ) ΚΛΙΝΙΚΟΥ ΣΤΑΔΙΟΥ ΒΙΝΕΤ-Α ΣΕ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΜΕ ΣΥΝΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ CD38, ZAP-70 ΚΑΙ ΤΟΥ STATUS ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ IGHV. 18ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας, Θεσσαλονίκη, 11/2007. **(Προφορική Ανακοίνωση)**

2. E. Kostareli, M. Gounari, A. Agathagelidis, ***S. Ntoufa***, I. Chiotoglou, N. Psatha, A. Kouvatsi, A. Anagnostopoulos, K.M.Thompson, C. Belessi, K. Stamatopoulos. ESTABLISHMENT OF HETEROHYBRIDOMAS FROM CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA (CLL) CELLS: PROMISES AND LIMITATIONS. 13th

International conference on Human Antibodies et Hybridomas, Milan, Italy, 11/2007. **(Αναρτημένη Ανακοίνωση)**

3. ***Σ. Ντούφα***, Ε. Αρβανίτη, Τ. Τουλουμενίδου, Ν. Σταυρογιάννη, Β. Ταχυνοπούλου, Χ. Βαδικόλια, Θ. Νακόπουλος, Ν. Λαουτάρης, Α. Αναγνωστόπουλος, Π. Κόλλια, Χ. Μπέλεση, Κ. Σταματόπουλος. ΕΥΡΕΙΑ ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΕΜΦΥΤΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΤΥΠΟΥ TOLL, ΣΥΝΔΕΤΩΝ, ΠΡΟΣΑΡΜΟΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΚΑΙ ΤΕΛΕΣΤΩΝ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ TLR ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ. 19ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας, Αθήνα, 11/2008. **(Προφορική Ανακοίνωση)**

4. Α Αγαθαγγελίδης ,Ε Σταλίκα ,***Σ Ντούφα*** ,Ν Σταυρογιάννη ,Β Ταχυνοπούλου ,Α Παλέτα ,Κ Μαυραγάνη ,Κ Σταματόπουλος ,Α Φάσσας ,Α Αναγνωστόπουλος. ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΡΕΠΕΡΤΟΡΙΟΥ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ. 20ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας, Ηράκλειο, 11/2009. **(Προφορική Ανακοίνωση)**

5. ***Σ. Ντούφα***, Α. Λεοντιάδου, Κ. Κώττα, Α. Βαρδή, Β. Ταχυνοπούλου, Α. Τσομπανάκου, Α. Αναγνωστόπουλος, Κ. Σταματόπουλος. ΡΕΠΕΡΤΟΡΙΟ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΥΠΟΥ TOLL ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ 6ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κυτταρομετρίας, Κεφαλονιά, 04/2010. **(Προφορική Ανακοίνωση)**

6. ***S. Ntoufa***, A. Vardi, N. Papakonstantinou, A. Anagnostopoulos, V. Aleporou-Marinou, C. Belessi, P. Ghia, F. Caligaris-Cappio, M. Muzio , K. Stamatopoulos. DIFFERENTIAL FUNCTIONAL OUTCOMES AFTER STIMULATION VIA INNATE IMMUNE RECEPTORS IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA SUBTYPES DEFINED BY THE MOLECULAR FEATURES OF THE IMMUNOGLOBULIN RECEPTOR. Antigens and Lymphomas Meeting, Santorini, 10/2010. **(Προφορική Ανακοίνωση)**

7. Ν. Παπακωνσταντίνου, ***Σ. Ντούφα***, Γ. Παπαδόπουλος, Α. Αναγνωστόπουλος, Α. Χλίχλια, Α. Χατζηγεωργίου, Χ. Μπέλεση, Κ. Σταματόπουλος. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ microRNAs ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΟΔΩΝ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΜΕΣΩ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΗΣ ΕΜΦΥΤΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΑΡΜΟΣΤΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ. 21ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας, θεσσαλονίκη, 11/2010. **(Προφορική Ανακοίνωση)**

8. E. Arvaniti, ***S. Ntoufa***, N. Papakonstantinou, T. Touloumenidou, N. Laoutaris, A. Anagnostopoulos, K. Lamnisou, F. Caligaris-Cappio, K. Stamatopoulos, P. Ghia, M. Muzio, C. Belessi. TOLL-LIKE RECEPTOR SIGNALING PATHWAY IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA: DISTINCT GENE EXPRESSION PROFILES OF POTENTIAL PATHOGENETIC SIGNIFICANCE IN SPECIFIC SUBSETS OF PATIENTS 52nd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando, Florida, 12/2010. **(Προφορική Ανακοίνωση)**

9. ***S. Ntoufa***, A. Vardi, N. Papakonstantinou, A. Anagnostopoulos, V. Aleporou-Marinou, F. Caligaris-Cappio, C. Belessi, P. Ghia, M. Muzio, K. Stamatopoulos. DIFFERENTIAL FUNCTIONAL OUTCOMES AFTER STIMULATION VIA INNATE IMMUNE RECEPTORS IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA SUBTYPES DEFINED BY THE MOLECULAR FEATURES OF THE IMMUNOGLOBULIN RECEPTOR. 52nd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando, Florida, 12/2010. **(Προφορική Ανακοίνωση)**

10. ***S. Ntoufa***, N. Papakonstantinou, A. Anagnostopoulos, V. Aleporou-Marinou, F. Caligaris-Cappio, C. Belessi, P. Ghia, M. Muzio, K. Stamatopoulos. DIFFERENTIAL FUNCTIONAL OUTCOMES AFTER STIMULATION OF CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA CELLS WITH DISTINCT TLR LIGANDS ARE REFLECTED IN DISTINCT PATTERNS OF TRANSCRIPTIONAL CHANGES. 15th Congress of EHA, London, 06/2011. **(Αναρτημένη Ανακοίνωση)**

11. N. Papakonstantinou, ***S. Ntoufa***, G.Papadopoulos, A. Hatzigeorgiou, et al. DISTINCT PROFILES OF miRNAs MODULATING IMMUNE SIGNALLING PATHWAYS IN DIFFERENT SUBSETS OF CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA. 16th Congress of EHA, Amsterdam, 06/12. **(Προφορική Ανακοίνωση)**

12. ***Σ. Ντούφα***, Ν. Παπακωνσταντίνου, Χ. Νικολάου, Ε. Χαρτοματζίδου, και συν. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΣΤΗ ΧΛΛ: Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ miR~17-92 ΕΜΠΛΕΚΕΤΑΙ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΑΠΑΝΤΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΣΤΕΡΕΟΤΥΠΟΥ ΥΠΟΣΥΝΟΛΟΥ 4 ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ TLR. 23ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας, θεσσαλονίκη, 11/2012. **(Προφορική Ανακοίνωση)**

13. Maria Gounari, ***Stavroula Ntoufa***, Charles C. Chu, Athanasios Tsaftaris, Nicholas Chiorazzi, Kostas Stamatopoulos, Paolo Ghia. PROMISCUOUS ANTIGEN REACTIVITY MAY UNDERLIE CLINICAL AGGRESSIVENESS AND INCREASED RISK FOR RICHTER'S SYNDROME IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA WITH STEREOTYPED IGHV4-39/IGKV1(D)-39 B CELL RECEPTORS. 54th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, GA, 12/2012. **(Προφορική Ανακοίνωση)**

14. ***Stavroula Ntoufa***, Nikos Papakonstantinou, Christos Nikolaou, Elisavet Chartomatzidou, et al. The Mir17~92 Cluster Is an Immunomodulator in CLL Regulating Distinct Functional Responses to Toll-Like Receptors in Subsets with Stereotyped Antigen Receptors. 54th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, GA, 12/2010. **(Αναρτημένη Ανακοίνωση)**

Βραβεύσεις

1. 11/2010: 21ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας, Βραβείο Καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης

Ν. Παπακωνσταντίνου, ***Σ. Ντούφα***, Γ. Παπαδόπουλος, Α. Αναγνωστόπουλος, Α. Χλίχλια, Α. Χατζηγεωργίου, Χ. Μπέλεση, Κ. Σταματόπουλος. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ microRNAs ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΟΔΩΝ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΜΕΣΩ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΗΣ ΕΜΦΥΤΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΑΡΜΟΣΤΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ.

2. 11/2012: 23ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας, Βραβείο Καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης

   Σ. Ντούφα, Ν. Παπακωνσταντίνου, Χ. Νικολάου, Ε. Χαρτοματζίδου, και συν. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΣΤΗ ΧΛΛ: Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ miR~17-92 ΕΜΠΛΕΚΕΤΑΙ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΑΠΑΝΤΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΣΤΕΡΕΟΤΥΠΟΥ ΥΠΟΣΥΝΟΛΟΥ 4 ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ TLR. 23ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας, θεσσαλονίκη, 11/2012

13. Δημοσιεύσεις