



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2019

# ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΗΝ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

ΜΑΡΙΑ ΤΣΑΓΙΟΠΟΥΛΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΤΟ ΕΡΓΟ ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΕΙΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΈΝΩΣΗ (ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ) ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ «ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ, ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ», ΣΤΟ ΠΛΑΙΣΙΟ ΤΗΣ ΠΡΑΞΗΣ «ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΥΠΟΤΡΟΦΙΩΝ ΓΙΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΕΣ ΣΠΟΥΔΕΣ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΣΠΟΥΔΩΝ» (MIS-5003404), ΠΟΥ ΥΛΟΠΟΙΕΙ ΤΟ ΊΔΡΥΜΑ ΚΡΑΤΙΚΩΝ ΥΠΟΤΡΟΦΙΩΝ (ΙΚΥ).



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

Επιχειρησιακό Πρόγραμμα  
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,  
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

# Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	3
Μέλη επιτροπών διδακτορικής διατριβής.....	4
Κατάλογος μελετών.....	5
Περίληψη.....	6
Abstract .....	8
Εισαγωγή .....	10
Βασικά στοιχεία ανοσολογίας.....	10
B λεμφοκύτταρα.....	10
Δομή ανοσοσφαιρινών .....	10
Γενετικοί τόποι ανοσοσφαιρινών .....	12
Διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων .....	14
Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία.....	17
Γενικά.....	17
Θεραπευτική αντιμετώπιση .....	18
Ρεπερτόριο των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών στη ΧΛΛ.....	18
Μεταλλακτικό φορτίο των γονιδίων IGHV.....	19
Μοριακή στερεοτυπία του B κυτταρικού υποδοχέα .....	20
Γενετικές βλάβες στην ΧΛΛ .....	21
Επιγενετική στην ΧΛΛ.....	23
Γενικά.....	23
Μεθυλίωση του DNA.....	24
Μεθυλίωση του DNA και ΧΛΛ .....	26
Κατάσταση της χρωματίνης στην ΧΛΛ .....	28
Γενετική και Επιγενετική στην εξέλιξη της ΧΛΛ .....	29
Σκοπός της παρούσας μελέτης .....	30
Ομάδα μελέτης.....	32
Υλικά και μέθοδοι .....	34
Αρνητική επιλογή CD19 <sup>+</sup> B λεμφοκυττάρων από δείγματα αίματος.....	34
Μέτρηση του ποσοστού των CD19 <sup>+</sup> κυττάρων με κυτταρομετρία ροής .....	34
Απομόνωση γενωμικού DNA (gDNA) .....	35
Επεξεργασία του DNA με όξινο θειώδες (Bisulfite conversion).....	35
Μικροσυστοιχίες μεθυλίωσης του DNA .....	36
<i>In silico</i> καθαρισμός των δεδομένων μεθυλίωσης του DNA .....	38

Ανάλυση των δεδομένων από τις μικροσυστοιχίες Infinium HumanMethylation 450k	39
Ανάλυση του αριθμού των αντιγράφων του DNA (Copy Number Alterations, CNA).....	39
Διαφορική ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA .....	40
Ανάλυση μηχανικής μάθησης με τη μέθοδο Random Forest.....	40
Ανάλυση εμπλουτισμού σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος, στη χρωματίνη, σε θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων και μοριακά μονοπάτια.....	41
Συσχέτιση γενετικής και επιγενετικής.....	43
Αφαίρεση των θέσεων CpG που σχετίζονται με ισχυρές συνιστώσες της μεθυλίωσης του DNA στην ΧΛΛ.....	44
Αποτελέσματα.....	46
Μελέτη I .....	46
Διαχρονική μελέτη των αλλαγών μεθυλίωσης του DNA σε σχέση με την υποτροπή μετά από θεραπεία: ανάλυση σε επίπεδα (i) ομάδας και (ii) μεμονωμένου ασθενούς.....	46
Ανάλυση εμπλουτισμού σε γονιδιακές περιοχές, στην κατάσταση της χρωματίνης, σε θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων και μοριακά μονοπάτια.....	51
Ανάλυση γενετικής εξέλιξης.....	57
Συσχέτιση των αλλαγών της μεθυλίωσης του DNA με κλινικοβιολογικά χαρακτηριστικά .....	58
Επιγενετική υπογραφή 10 CpGs με προβλεπτική αξία για την απάντηση στη θεραπεία .....	62
Μελέτη II .....	66
Μη επιβλεπόμενη ανάλυση δεδομένων μεθυλίωσης του DNA αποκάλυψε σημαντικές διαφορές μεταξύ της τρισωμίας 12 και del(11q)/del(13q).....	66
Πρότυπα μεθυλίωσης του DNA κάθε κυτταρογενετικής ομάδας σε σύγκριση με τα φυσιολογικά Β κύτταρα .....	69
Διαφορική ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA για κάθε κυτταρογενετική ομάδα σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ΧΛΛ περιπτώσεις.....	71
Λειτουργικός ρόλος της επιγενετικής υπογραφής της τρισωμίας 12.....	73
Μελέτη III .....	77
Διακριτά πρότυπα μεθυλίωσης του DNA σε στερεότυπα υποσύνολα ΧΛΛ.....	77
Συσχέτιση της μεθυλίωσης του DNA και της έκφρασης των γονιδίων .....	81
Συζήτηση .....	84
Μελέτη I .....	84
Μελέτη II .....	88
Μελέτη III .....	92
Συμπεράσματα.....	94
Βιβλιογραφία .....	96

# Πρόλογος

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών (INEB) του Εθνικού Κέντρου Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (ΕΚΕΤΑ) υπό την επίβλεψη του Διευθυντή κ. Κώστα Σταματόπουλου. Τον ευχαριστώ θερμά για την επίβλεψη, το χρόνο που μου αφιέρωσε, την εμπιστοσύνη και την καθοδήγησή του σε όλες τις φάσεις διεκπεραίωσης της παρούσας εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για την άψογη συνεργασία στους επιβλέποντες του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών Δρ. Κόλλια και Δρ. Αλεπόρου, Καθηγήτριες στο Τμήμα Βιολογίας, οι οποίες μου προσέφεραν την ευκαιρία εκπόνησης διδακτορικής διατριβής.

Θα ήθελα στο πλαίσιο αυτό να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Martin-Subero και την ομάδα του στο Ινστιτούτο IDIBAPS στην Βαρκελώνη για τη στήριξη, την καθοδήγηση, αλλά και τη φιλοξενία τους. Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους συνεργάτες μου στο INEB, ιδίως στον Δρ. Νίκο Παπακωνσταντίνου, ο οποίος επέβλεψε τη διδακτορική διατριβή μου. Επίσης, στους φίλους που δημιούργησα τα 5 αυτά χρόνια μέσα από την επιστημονική ομάδα, για την πολύπλευρη στήριξή τους και την άψογη συνεργασία μας.

Τέλος, ευχαριστώ τους φίλους μου για τη συναισθηματική στήριξη, τη συμπαράσταση και τη μεγάλη υπομονή που έδειξαν όλο αυτό το διάστημα και πάνω απ' όλους την οικογένεια μου και ιδιαίτερα 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, Δεκέμβριος 2019

# Μέλη επιτροπών διδακτορικής διατριβής

## ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Π. Κόλλια, Επ. Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας Παν/μίου Αθηνών

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Π. Κόλλια, Επ. Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας Παν/μίου Αθηνών

Β. Αλεπόρου, Αναπλ. Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας Παν/μίου Αθηνών

Κ. Σταματόπουλος, Διευθυντής ΙΝΕΒ/ΕΚΕΤΑ

## ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Π. Κόλλια, Επ. Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας Παν/μίου Αθηνών

Β. Αλεπόρου, Αναπλ. Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας Παν/μίου Αθηνών

Κ. Σταματόπουλος, Διευθυντής ΙΝΕΒ/ΕΚΕΤΑ

Ι. Παπασιδέρη, Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας Παν/μίου Αθηνών

Ι. Τρουγκάκος, Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας Παν/μίου Αθηνών

Ν. Βύνιου, Αναπληρώτρια Αιματολογίας, Ιατρική Παν/μίου Αθηνών

Φ. Κοντοπίδου, Αναπληρώτρια Αιματολογίας, Ιατρική Παν/μίου Αθηνών

# Κατάλογος μελετών

Η παρούσα διδακτορική διατριβή βασίζεται στις ακόλουθες μελέτες, οι οποίες αναφέρονται στο κείμενο με λατινικούς αριθμούς:

- I. ΔΙΑΧΡΟΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ: ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΑΝΟΣΟΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΜΕ FCR
- II. ΔΙΑΚΡΙΤΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΥΠΟΟΜΑΔΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ
- III. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA ΜΕ ΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΣΕ ΚΛΙΝΙΚΩΣ ΕΠΙΘΕΤΙΚΑ ΣΤΕΡΕΟΤΥΠΑ ΥΠΟΣΥΝΟΛΑ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ

## Περίληψη

Η μεθυλίωση του DNA διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (ΧΛΛ), ωστόσο ο ρόλος της στην εξέλιξη του νοσήματος δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Στη **Μελέτη I**, διερευνήθηκε ο ρόλος της μεθυλίωσης του DNA στην κλινική απάντηση ασθενών με ΧΛΛ στο ανοσοχημειοθεραπευτικό σχήμα FCR με ιδιαίτερη έμφαση στην ανθεκτικότητα στη θεραπεία. Για το σκοπό αυτό, αναλύθηκαν τα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA σε 34 περιπτώσεις ασθενών πριν τη χορήγηση θεραπείας και μετά την υποτροπή. Η ανάλυση των διαχρονικών δειγμάτων προσέφερε σημαντικές ενδείξεις για την ενεργό συμμετοχή των αλλαγών της μεθυλίωσης του DNA στην εξέλιξη της ΧΛΛ, ειδικότερα στην υποτροπή μετά από την χορήγηση FCR, εμπλέκοντας στη διαδικασία συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες και βιολογικά μονοπάτια. Οι αλλαγές στα πρότυπα της μεθυλίωσης του DNA βρέθηκαν να συσχετίζονται τόσο με το χρόνο έως την πρώτη θεραπεία όσο και με τον χρόνο έως την υποτροπή, εύρημα που αποτελεί σημαντική ένδειξη για τον ρόλο των επιγενετικών τροποποιήσεων στην απάντηση στη θεραπεία και, γενικότερα, στην εξέλιξη της νόσου. Τέλος, αναδείχθηκε η δυνατότητα χρήσης των επιπέδων μεθυλίωσης συγκεκριμένων θέσεων CpG ως πιθανών βιοδεικτών με προβλεπτική αξία.

Οι ασθενείς με ΧΛΛ συχνά φέρουν χρωμοσωμικές αλλοιώσεις οι οποίες εμπλέκονται στην παθογένεση της νόσου και έχουν ισχυρό αντίκτυπο στην κλινική πορεία και την έκβαση των ασθενών. Παραμένει άγνωστο εάν οι συγκεκριμένες γενετικές αλλαγές σχετίζονται με ιδιαίτερα επιγενετικά πρότυπα. Για το σκοπό αυτό, στη **Μελέτη II** αναλύθηκαν 245 περιπτώσεις που φέρουν συχνές κυτταρογενετικές βλάβες στη ΧΛΛ: (i) έλλειψη στο χρωμόσωμα 11q [del(11q)], (ii) έλλειψη στο χρωμόσωμα 13q [del(13q)], (iii) τρισωμία 12 [tris12]. Οι περιπτώσεις που έφεραν τρισωμία 12 εμφάνισαν διακριτά πρότυπα μεθυλίωσης DNA, υπογραμμίζοντας περαιτέρω το ιδιαίτερο βιολογικό υπόβαθρο αυτής της υποομάδας. Η χαμηλή συσχέτιση των μεταβολών στα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA με τις μεταβολές στην γονιδιακή έκφραση επιβεβαιώθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη, σε συμφωνία με παλαιότερες αναφορές. Παράλληλα, αναδείχθηκε η πολυπλοκότητα της αλληλεπίδρασης των

επιγενετικών προτύπων συνδέοντας δεδομένα μεθυλίωσης του DNA με δεδομένα ακετυλίωσης και ανοιχτής χρωματίνης. Τέλος, η συσχέτιση του δυσμενούς προγνωστικού del(11q) με το αυξημένο επιγενετικό φορτίο, δηλαδή τον αριθμό των διαφορεικά μεθυλιωμένες θέσεις CpG (ΔMCpG) μεταξύ του δείγματος προ-θεραπείας κάθε ασθενούς και Β κυττάρων μνήμης, υποδηλώνει τη δυνατότητα χρήσης του επιγενετικού φορτίου ως δείκτη δυσμενούς πρόγνωσης.

Οι ασθενείς με ΧΛΛ εκτός από τις γενετικές βλάβες που φέρουν, εμφανίζουν ιδιαίτερα ανοσογενετικά χαρακτηριστικά όπως η στερεοτυπία του Β κυτταρικού υποδοχέα. Οι ασθενείς που ανήκουν στα διακριτά αυτά υποσύνολα δημιουργούν κλινικοβιολογικά ομοιογενείς ομάδες, ακόμα και σε επίπεδο επιγενετικής. Στη **Μελέτη III.**, διερευνήσαμε τα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA σε ασθενείς των στερεότυπων υποσυνόλων #6 και #8 όπως επίσης και σε άλλους ασθενείς με αμετάλλακτα γονίδια IGHV (A-ΧΛΛ) και διαπιστώσαμε διακριτές επιγενετικές υπογραφές. Η επιγενετική υπογραφή έδειξε χαμηλή συσχέτιση με την γονιδιακή έκφραση, σε συμφωνία με την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Μεταξύ των γονιδίων με διαφορεική μεθυλίωση, τις μεγαλύτερες διαφορές εμφάνιζε το TP63, μέλος της οιογένειας γονιδίων TP53. Πιο λεπτομερώς, το TP63 ήταν υπομεθυλιωμένο και επίσης βρέθηκε να υπερεκφράζεται στο υποσύνολο #8, το οποίο εμφανίζει τον υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης συνδρόμου Richter μεταξύ όλων των υποομάδων ΧΛΛ.

Συνολικά, η παρούσα διατριβή επιβεβαιώνει τη σημασία της μεθυλίωσης του DNA στην ΧΛΛ, παρέχοντας σημαντικές ενδείξεις για τη συμμετοχή της στο μηχανισμό της εξέλιξης και της υποτροπής και αποκαλύπτοντας το τοπίο μεθυλίωσης του DNA σε διακριτές κυτταρογενετικές και στερεοτυπικές υποομάδες της ΧΛΛ.



# Abstract

Aberrant DNA methylation is implicated in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia (CLL), however its contribution to disease progression has not been conclusively defined. In **study I**, we investigated the role of DNA methylation changes overtime in a group of CLL patients homogeneously treated with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab (FCR). We determined methylation profiles in 34 CLL patients before treatment and at relapse. Overtime analysis highlighted the active role of DNA methylation changes in CLL evolution, particularly in regards to response to chemoimmunotherapy, involving several transcription factors and pathways. The DNA methylation changes showed correlation with the time to first treatment and the time to relapse, hence offering strong evidence regarding the active role of epigenetics in disease evolution, including the response to treatment. Moreover, our findings raise the possibility of using the DNA methylation levels of specific CpGs as prognostic biomarkers.

CLL cases show different cytogenetic alterations with clinical value, but it is unclear whether distinct CLL cytogenetic subgroups have different epigenetic landscapes. In **study II**, we analyzed whether DNA methylation profiles can be linked to the pathophysiology of particular cytogenetic subgroups. We investigated 245 CLL cases carrying del(11q), del(13q) or trisomy 12. The trisomy 12 cases showed distinct DNA methylation patterns, further underscoring their unique biological background. We found low correlation between DNA methylation and gene expression, in line with recent reports. Moreover, integration analysis demonstrated the complexity of the epigenetic markers by linking the DNA methylation data with acetylation and chromatin accessibility data. Finally, del(11q) cases showed a high epigenetic burden (i.e. number of DMCPGs per case compared to memory B cells), which represents a potential predictive biomarker for CLL.

Apart from the genetic alterations, CLL cases exhibit distinct immunogenetic characteristics such as the antigen receptor stereotypy. The cases belonging to these stereotyped subsets show homogeneous clinicobiologically characteristics, even at epigenetic level. In **study III**, we analyzed the DNA methylation profiles of patients belonging to stereotyped subset #6 and #8 as well as non-subset U-CLL patients and

we found distinct epigenetic signatures. The epigenetic signature showed a low correlation with gene expression in the line of previous reports. The TP63 gene, which is a member of TP53 family, showed the highest differences on DNA methylation levels between the two subsets. Moreover, TP63 was hypomethylated and overexpressed in subset #8, which exhibits the highest risk of Richter syndrome among all CLL subgroups.

Altogether, this thesis confirms the significance of DNA methylation in CLL, provides insight into the mechanism of the progression and relapse and further unravels the DNA methylation landscape in cytogenetic subgroups and stereotyped subsets of CLL.

## Βασικά στοιχεία ανοσολογίας

Ο όρος ανοσία αναφέρεται στην ικανότητα του οργανισμού να αμυνθεί από εξωγενείς (π.χ. τοξίνες, μολυσματικοί παράγοντες) και ενδογενείς παράγοντες (π.χ. αποπτωτικά κύτταρα). Γενικά, οι άνοσες απαντήσεις διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: έμφυτες (innate) και προσαρμοστικές (adaptive). Η έμφυτη ανοσία αναγνωρίζει συντηρημένα πρωτεϊνικά μοτίβα στην επιφάνεια παθογόνων (μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με παθογόνα, Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs) και δρα άμεσα ως πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού. Από την άλλη, η προσαρμοστική ανοσία αναγνωρίζει μεγάλη ποικιλία παθογόνων παραγόντων με μεγάλη ειδικότητα, ωστόσο χρειάζεται περισσότερο χρόνο για να προκληθεί.

Η προσαρμοστική ανοσία, εκτός από μεγάλη ειδικότητα στην αναγνώριση πληθώρας αντιγονικών επιτόπων (*εξειδίκευση και ποικιλομορφία*), χαρακτηρίζεται από:

- (i) την ικανότητα διατήρησης ανοσολογικής *μνήμης*, ώστε η επόμενη άνοση απάντηση εναντίον του ίδιου επιτόπου να εξελιχθεί πιο γρήγορα,
- (ii) *αυτορρύθμισης*, ώστε να σταματά η απάντηση όταν εξαλειφθεί η απειλή,
- (iii) *ανοχής*, ιδιότητα που επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ ξένων αντιγόνων και αυτοαντιγόνων και αποτρέπει επιτυχώς την αντίδραση εναντίον συστατικών του ίδιου του οργανισμού επιτυχώς.

Τα κύτταρα που συμμετέχουν στην προσαρμοστική ανοσία είναι τα λεμφοκύτταρα, τα οποία βρίσκονται στους λεμφαδένες και στους υπόλοιπους λεμφικούς ιστούς/όργανα του σώματος αλλά κυκλοφορούν και στο περιφερικό αίμα (1).

## B λεμφοκύτταρα

### Δομή ανοσοσφαιρινών

Οι ανοσοσφαιρίνες ή αντισώματα (immunoglobulins, Ig) είναι γλυκοπροπρωτεΐνες που παράγονται από τα B κύτταρα και υπάρχουν σε δύο βασικές μορφές:

1. ως επιφανειακά μόρια στην μεμβράνη των Β κυττάρων
2. εκκρινόμενες από πλασματοκύτταρα (αντισώματα).

Η ανοσοσφαιρίνη της επιφάνειας των Β κυττάρων λειτουργεί ως υποδοχέας αντιγόνων και μαζί με ορισμένα βοηθητικά μόρια σηματοδότησης απαρτίζει τον Β κυτταρικό υποδοχέα (BκΥ) (2, 3).

Οι ανοσοσφαιρίνες αποτελούνται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, ανά δύο πανομοιότυπες μεταξύ τους, τις βαριές (heavy, H) και τις ελαφριές (light, L) αλυσίδες.

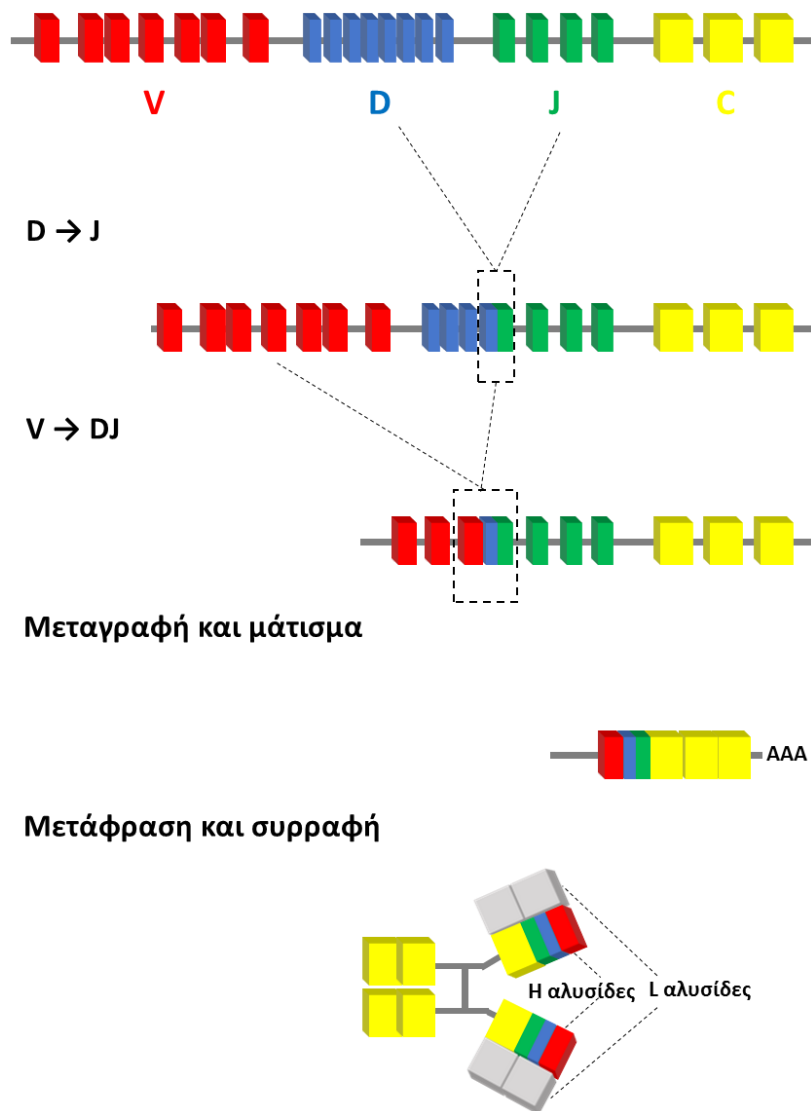
Οι βαριές αλυσίδες ενώνονται τόσο μεταξύ τους όσο και με τις ελαφριές αλυσίδες με δισουλφυδρικούς δεσμούς και μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις.

Υπάρχουν δύο τύποι ελαφριών αλυσίδων, κάππα (κ) και λάμβδα (λ), και σε κάθε μόριο ανοσοσφαιρίνης υπάρχει μόνο ένας τύπος ελαφριάς αλυσίδας. Με βάση το είδος της βαριάς αλυσίδας (μ, γ, δ, ε, α), οι ανοσοσφαιρίνες ταξινομούνται σε πέντε τάξεις: IgM, IgG, IgD, IgE, IgA. Τόσο στις βαριές όσο και στις ελαφριές αλυσίδες υπάρχουν σταθερές (constant, C) και μεταβλητές (variable, V) περιοχές (4). Η περιοχή V εμφανίζει εκτεταμένη μεταβλητότητα και συμβάλλει στην αναγνώριση και σύνδεση με το αντιγόνο, ενώ η περιοχή C είναι εξαιρετικά διατηρημένη και συμμετέχει στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών μετά την πρόσδεση του αντιγόνου. Στη V περιοχή τόσο των ελαφριών όσο και των βαριών αλυσίδων έχουν αναγνωριστεί τρεις υπερμεταβλητές περιοχές που καλούνται περιοχές καθορισμού της συμπληρωματικότητας (Complementarity Determining Regions, CDRs): CDR1, CDR2 και CDR3. Ειδικότερα, η CDR3 της βαριάς αλυσίδας παρουσιάζει την μεγαλύτερη ποικιλομορφία. 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 (2, 4). 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, 4).

## Γενετικοί τόποι ανοσοσφαιρινών

Οι γενετικοί τόποι των ανοσοσφαιρινών περιλαμβάνουν ομάδες γονιδίων. Ο γενετικός τόπος της βαριάς αλυσίδας (IGH) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 14 και περιλαμβάνει τέσσερις ομάδες γονιδίων: V (Variable), D (Diversity), J (Junctional) και C (Constant). Οι γενετικοί τόποι των ελαφριών αλυσίδων (IGK για την κ και IGL για τη λ ελαφριά αλυσίδα) βρίσκονται στα χρωμοσώματα 2 και 22, αντιστοίχως, και περιλαμβάνουν τρεις ομάδες γονιδίων: V, J και C. Επιπλέον, οι γενετικοί τόποι των ανοσοσφαιρινών περιλαμβάνουν πληθώρα ρυθμιστικών γονιδίων, όπως οι αλληλουχίες-οδηγοί (leader sequences, L) πριν από κάθε γονίδιο V (5).

Η πλήρης αλληλουχία που κωδικοποιεί μια βαριά ή ελαφριά αλυσίδα προκύπτει από ανασυνδυασμό ενός γονιδίου από κάθε ομάδα του αντίστοιχου γενετικού τόπου. Η μεταβλητή περιοχή των βαριών αλυσίδων σχηματίζεται από την αναδιάταξη γονιδίων V, D και J, ενώ η σταθερή περιοχή κωδικοποιείται από τα γονίδια C. Αντίστοιχα, η μεταβλητή περιοχή των ελαφριών αλυσίδων σχηματίζεται από την αναδιάταξη των γονιδίων V και J. Η διαδικασία του ανασυνδυασμού πραγματοποιείται ιεραρχικά με τη βοήθεια του συμπλόκου ενζύμων RAG1/RAG2: αρχικά ένα γονίδιο D ανασυνδυάζεται μ' ένα γονίδιο J και στη συνέχεια το σύμπλοκο D-J αναδιατάσσεται μ' ένα γονίδιο V. Η αναδιάταξη των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών καλείται ανασυνδυασμός V(D)J. (6). Ο μηχανισμός του ανασυνδυασμού V(D)J συνοψίζεται στην Εικόνα 1.



**Εικόνα 1.** Ο ανασυνδυασμός V(D)J στο γενετικό τόπο της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών και η δομή του μορίου της ανοσοσφαιρίνης. Για το σχηματισμό κάθε αλυσίδας επιλέγεται τυχαία ένα γονίδιο από την κάθε ομάδα γονιδίων. Πρώτα ένα γονίδιο D αναδιατάσσεται με ένα γονίδιο J και έπειτα πραγματοποιείται η αναδιάταξη του συμπλόκου D-J με ένα γονίδιο V. Ακολουθεί η μεταγραφή και το μάτισμα του συμπλόκου V-D-J και, τέλος, η συρραφή και η μετάφραση του ώριμου mRNA. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και στην περίπτωση των ελαφριών αλυσίδων. Η επιτυχής αναδιάταξη των βαριών και ελαφριών αλυσίδων οδηγεί σ' έναν πλήρως λειτουργικό ΒκΥ.

## Διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων

Η διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων ξεκινά από το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, όπου το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο διαφοροποιείται στον κοινό λεμφοειδή πρόγονο (common lymphoid progenitor-CLP) (7). Τα αρχέγονα κύτταρα (stem cells) ακολουθούν τη B λεμφική σειρά λόγω της πρώτης αναδιάταξης των δύο αλληλόμορφων της βαριάς αλυσίδας μεταξύ των γονιδίων D και J αλλά και της έκφρασης ειδικών μεταγραφικών παραγόντων π.χ. PAX5, EBF1 και TCF3 (επίσης γνωστός ως E2A) (8, 9). Σε αυτή τη φάση, το κύτταρο καλείται πρώιμο προ-προ B κύτταρο (early pro B cell). Έπειτα, στο στάδιο του όψιμου προ-προ B κυττάρου (late pro B cell) πραγματοποιείται ανασυνδυασμός μεταξύ ενός γονιδίου V και του γενετικού συμπλόκου DJ.

Μόλις ολοκληρωθεί ο ανασυνδυασμός 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-B λεμφοκύτταρο (pre-B cell) και εκφράζει στην επιφάνειά του τον προ-B υποδοχέα (pre-BcR: pre B cell receptor), ο οποίος αποτελείται από τη βαριά αλυσίδα, μια υποκατάστατη ελαφριά αλυσίδα (surrogate light chain) και τους συνυποδοχείς (co-receptors) Igα και Igβ οι οποίοι είναι απαραίτητοι για τη λειτουργία του. Τα κύτταρα που εκφράζουν προ-BcR υποδοχέα επιλέγονται θετικά και μετατρέπονται σε μικρά προ-B λεμφοκύτταρα, ενώ τα υπόλοιπα αποπίπτουν. Σε αυτό το στάδιο, συμβαίνει ο ανασυνδυασμός 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 BκΥ. Επειδή ο ανασυνδυασμός των γονιδίων γίνεται τυχαία, η επιφανειακή IgM είναι πιθανό να αναγνωρίζει αυτοαντιγόνα (self-antigens). Έτσι, τα B λεμφοκύτταρα πρέπει να ελέγχονται για το ενδεχόμενο αυτοαντιδραστικότητας (self-reactivity) πριν την έξοδό τους στην περιφέρεια (10). Έπειτα, τα παρθένα B λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν από το μυελό των οστών μέσω του αίματος στα δευτερογενή λεμφικά όργανα. Τα δευτερογενή λεμφικά όργανα περιλαμβάνουν το σπλήνα, τους λεμφαδένες, το λεμφικό ιστό που σχετίζεται με τους βλεννογόνους και το διάχυτο λεμφικό ιστό στο σώμα και περνούν στη δεύτερη φάση διαφοροποίησης

που χαρακτηρίζεται ως εξαρτώμενη από το αντιγόνο. Εάν τα παρθένα Β λεμφοκύτταρα δεν έρθουν σε επαφή με αντιγόνο τότε περνούν και πάλι στην κυκλοφορία του αίματος. Από την άλλη, αν έρθουν σε επαφή με αντιγόνο θα ενεργοποιηθούν από τα βοηθητικά Τ κύτταρα. Μερικά από τα διαιρούμενα Β λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν στο κέντρο των λεμφοζιδίων όπου δημιουργούν τα βλαστικά κέντρα (germinal centers) (11). Τα Β λεμφοκύτταρα που έχουν διεγερθεί για ταχύ πολλαπλασιασμό ονομάζονται κεντροβλάστες και δημιουργούν τη σκοτεινή ζώνη. Σε αυτό το πλαίσιο, αυξάνεται η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα BCL6, ο οποίος είναι απαραίτητος για το σχηματισμό του βλαστικού κέντρου(8).

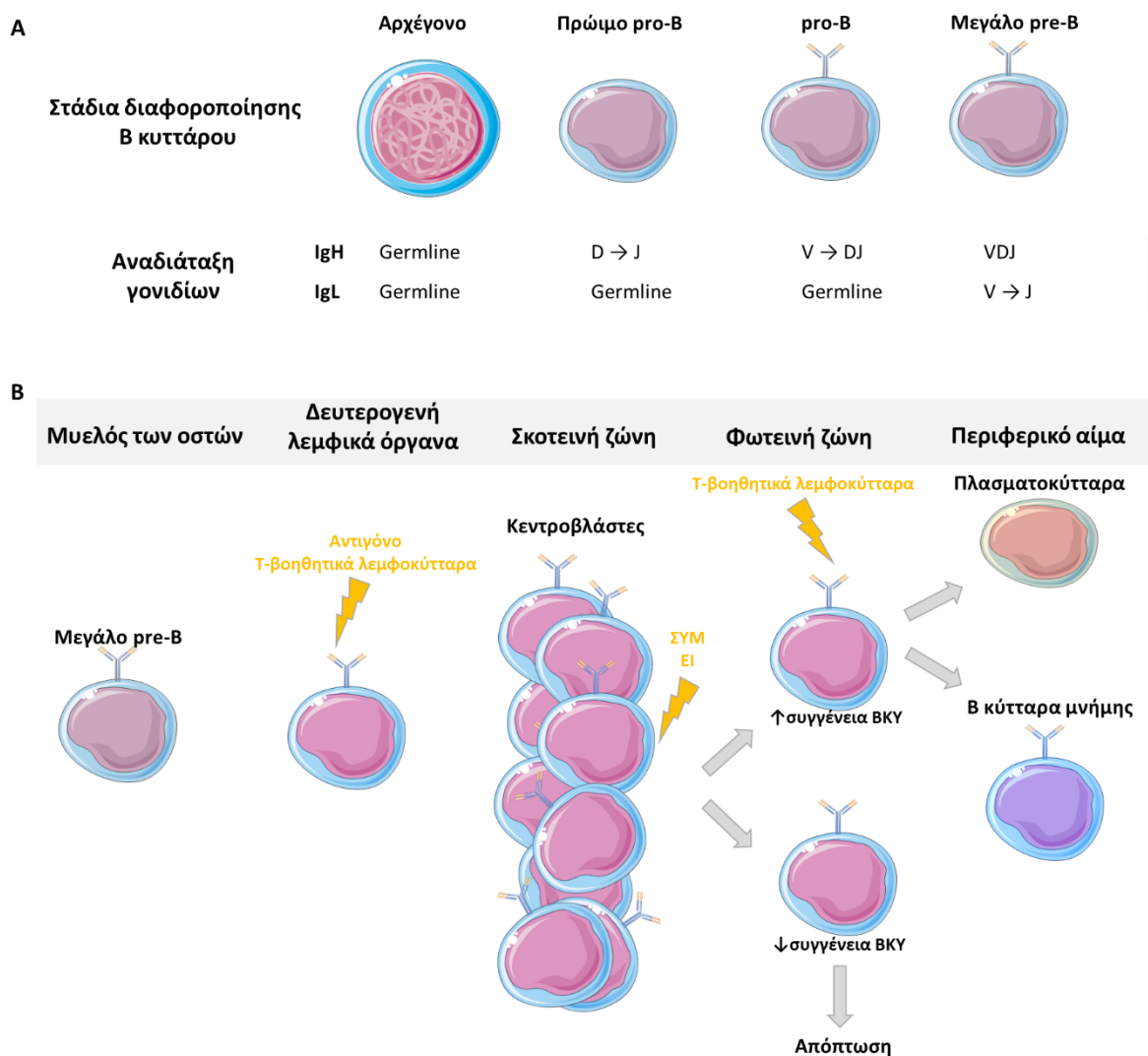
Μέσα στη σκοτεινή ζώνη συμβαίνει σωματική υπερμεταλλαξιγένεση (ΣΥΜ) και εναλλαγή ισοτύπου (MI μέσω της δράσης του ενζύμου δεαμινάση της κυτιδίνης (AID; activation-induced deaminase)). ΣΥΜ είναι η διεργασία εισαγωγής μεταλλάξεων στα γονίδια των ανοσοσφαιρινών που ακολουθεί την επαφή με το αντιγόνο και σκοπό έχει να αυξήσει τη συγγένεια της ανοσοσφαιρίνης για το αντιγόνο. Επίσης, συμβάλλει καθοριστικά στην αύξηση της ποικιλότητας των αντισωμάτων με αποτέλεσμα ο οργανισμός να μπορεί να παράγει έως και  $10^{12}$  διαφορετικά αντισώματα.

Οι κεντροβλάστες διαφοροποιούνται περαιτέρω σε κεντροκύτταρα, δηλαδή σε κύτταρα της φωτεινής ζώνης, που υφίστανται θετική και αρνητική επιλογή ανάλογα με την αυξημένη ή μειωμένη συγγένεια των Β κυτταρικών υποδοχέων, αντιστοίχως. Μετά τη θετική επιλογή, ένα κλάσμα των κεντροκυττάρων επανακυκλοφορεί στη σκοτεινή ζώνη παράγοντας παραλλαγές του αντισώματος με ακόμη μεγαλύτερη συγγένεια. Στη συνέχεια, τα κεντροκύτταρα υποβάλλονται σε ΕΙ, η οποία διαφοροποιεί περαιτέρω τα αντισώματα μιας συγκεκριμένης αντιγονικής ειδικότητας αλλάζοντας τη σταθερή περιοχή τους ώστε να επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες.

Τα Β λεμφοκύτταρα με υποδοχείς υψηλής συγγένειας που επιλέγονται από αντιγόνο αφήνουν το βλαστικό κέντρο και μετατρέπονται σε πλασματοκύτταρα ή Β λεμφοκύτταρα μνήμης. Τα πλασματοκύτταρα εκφράζουν χαμηλά επίπεδα επιφανειακής Ig, έχουν πλούσιο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και το κυτταρόπλασμα τους είναι πλούσιο σε ανοσοσφαιρίνες. Τα Β κύτταρα μνήμης, σε αντίθεση με τα πλασματοκύτταρα, είναι μακρόβια κύτταρα σε ηρεμία, που δεν παράγουν αντισώματα. Διαθέτουν υποδοχέα με υψηλή συγγένεια για το αντιγόνο και έχουν



εκτεθεί σε ΣΥΜ και πραγματοποιήσει ΕΙ. Τα κύτταρα αυτά, σε επόμενη επαφή με το ίδιο αντιγόνο, μπορεί να διαφοροποιηθούν σε πλασματοκύτταρα και να εκδηλώσουν ταχύτερη και εντονότερη δευτερογενή άνοση απάντηση. Κυκλοφορούν ελεύθερα στην περιφέρεια και δεν περιορίζονται στο σημείο της αλληλεπίδρασης με το αντιγόνο. Αν κατά τον έλεγχο συγγένειας ένα Β λεμφοκύτταρο δεν επιλεγεί, τότε θα πεθάνει με απόπτωση στο βλαστικό κέντρο (11). Όλη η παραπάνω διαδικασία διαφοροποίησης των Β κυττάρων συνοψίζεται στην Εικόνα 2.



**Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση της φυσιολογικής ανάπτυξης και ωρίμανσης Β-κυττάρων.** Τα στάδια διαφοροποίησης των Β λεμφοκυττάρων **(Α)** σε αντιπαραβολή με τις αναδιατάξεις των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών και **(Β)** μετά την έξοδο από τον μυελό των οστών. ΣΥΜ: σωματική υπερμεταλλαξιγένεση, ΕΙ: εναλλαγή ισοτύπου.

## Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία

### Γενικά

Η ΧΛΛ είναι η πιο κοινή λευχαιμία των ενηλίκων στον δυτικό κόσμο με μέση ηλικία διάγνωσης τα 71 χρόνια και εμφανίζεται συχνότερα στους άντρες σε σχέση με τις γυναίκες, με αναλογία 2:1 (12). Η ΧΛΛ χαρακτηρίζεται από *in vivo* συσσώρευση CD5<sup>+</sup> μονοκλωνικών Β λεμφοκυττάρων στο αίμα, το μυελό των οστών, λεμφαδένες και άλλα λεμφικά όργανα, όπως ο σπλήνας. Ο μονοκλωνικός πληθυσμός των Β λεμφοκυττάρων στη ΧΛΛ εμφανίζει υψηλή έκφραση των δεικτών CD19, CD5 και CD23 και μειωμένα επίπεδα των ανοσοσφαιρινών επιφάνειας IgM και IgD, καθώς και του συνυποδοχέα CD79b (13).

Η ΧΛΛ είναι εξαιρετικά ετερογενής νόσος τόσο σε βιολογικό όσο και κλινικό επίπεδο, καθώς κάποιοι ασθενείς παρουσιάζουν επιθετική μορφή της νόσου που απαιτεί θεραπεία αμέσως ή σύντομα μετά τη διάγνωση ενώ άλλοι ακολουθούν ήπια κλινική πορεία και μπορεί να μη χρειαστούν ποτέ θεραπεία (13-15).

Η βασική έρευνα επέτρεψε τη διάκριση των ασθενών σε υποομάδες με διακριτά μοριακά και κλινικά χαρακτηριστικά και έχει βοηθήσει στη διάγνωση καθώς και στην πρόγνωση της κλινικής πορείας της νόσου, αποκαλύπτοντας σημαντικούς προγνωστικούς δείκτες (**Εικόνα 3**) (16, 17).



Εικόνα 3. Κατηγορίες σημαντικών προγνωστικών δεικτών στην ΧΛΛ.

Μελέτες της τελευταίας δεκαετίας αναφέρουν ότι τα Β λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ αλληλεπιδρούν με το μικροπεριβάλλον λαμβάνοντας σήματα επιβίωσης μέσω πολλαπλών υποδοχέων, από τους οποίους ο BcR διαδραματίζει τον πιο σημαντικό ρόλο, και ότι αυτή η αλληλεπίδραση καθορίζει την εξέλιξη της νόσου. Τα μοριακά

δεδομένα που υποστηρίζουν αυτή την άποψη είναι i) η επιλεκτικότητα του ρεπερτορίου των γονιδίων της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών (Immunoglobulin Heavy Variable, IGHV) (18-21), ii) η διαφορετική πρόγνωση για ασθενείς που φέρουν γονίδια IGHV με διαφορετικό φορτίο ΣΥΜ (12, 16, 22) και iii) η ύπαρξη υποσυνόλων ασθενών με σχεδόν πανομοιότυπους “στερεότυπους” BcR (18, 19, 23).

### Θεραπευτική αντιμετώπιση

Οι θεραπευτικές επιλογές στην ΧΛΛ έχουν αυξηθεί και βελτιωθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια και συμπεριλαμβάνουν χημειοθεραπεία, μονοκλωνικά αντισώματα και μικρομοριακούς αναστολείς. Παρόλ' αυτά, η ασθένεια παραμένει ανίατη (24).

Έως σχετικά πρόσφατα, η πλέον καθιερωμένη (“gold standard”) θεραπεία για ασθενείς με ΧΛΛ σε καλή κατάσταση ικανότητας είναι ο συνδυασμός ενός αναλόγου πουρίνης, της φλουδαραβίνης (fludarabine, F) με έναν αλκυλιωτικό παράγοντα, την κυκλοφωσφαμίδη (cyclophosphamide, C) και ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του δείκτη επιφανείας των Β λεμφοκυττάρων CD20, το rituximab (R) (FCR) (25). Η συγκεκριμένη θεραπεία έχει ποσοστό ανταπόκρισης πάνω από 90%, ωστόσο διάφορες μελέτες ανέδειξαν τις βλάβες του γονιδίου *TP53* που συνδέονται με μεταλλάξεις του γονιδίου ή την έλλειψη του γενετικού τόπου 17p (del17p) ως δυσμενή προβλεπτικό παράγοντα για την απάντηση στο σχήμα FCR (26-28). Έτσι, σε αυτούς τους ασθενείς χορηγείται θεραπεία με αναστολείς του BκΥ, όπως το ibrutinib που στοχεύει την κινάση της τυροσίνης BTK και το idelalisib που στοχεύει την κινάση PI3K, ή το venetoclax που στοχεύει την αντιαποπτωτική πρωτεΐνη BCL2 (29-33).

### Ρεπερτόριο των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών στη ΧΛΛ

Μελέτες στην δεκαετία του 1990 ανέφεραν επικράτηση συγκεκριμένων IGHV γονιδίων (34, 35). Σε μετέπειτα μελέτες επιβεβαιώθηκε ότι το ρεπερτόριο των γονιδίων IGHV στη ΧΛΛ είναι επιλεκτικό και διαφορετικό από το αντίστοιχο των φυσιολογικών CD5<sup>+</sup> Β λεμφοκυττάρων του αίματος, με ορισμένα γονίδια, π.χ. IGHV1-69, IGHV4-34 και IGHV3-7 να υπερεκπροσωπούνται στη ΧΛΛ (36, 37). Επίσης, επιλεκτικότητα εμφανίζει και το ρεπερτόριο των γονιδίων IGHD και IGHJ, με πέντε

γονίδια IGHD να χρησιμοποιούνται σχεδόν στο 50% των περιπτώσεων με ΧΛΛ και επικράτηση των γονιδίων IGHJ4 και IGHJ6.

### Μεταλλακτικό φορτίο των γονιδίων IGHV

Με βάση το φορτίο σωματικών μεταλλάξεων που ανιχνεύονται στα γονίδια των ανοσοσφαιρινών, η ΧΛΛ υποδιαιρείται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: μεταλλαγμένη και αμετάλλακτη. Συγκεκριμένα, οι αλληλουχίες των γονιδίων IGHV που έχουν νουκλεοτιδική ταυτότητα κάτω από 98% με το αντίστοιχο μη αναδιαταγμένο γονίδιο χαρακτηρίζονται ως μεταλλαγμένες (Μ-ΧΛΛ). Αντίστοιχα, οι αλληλουχίες με ομολογία μεγαλύτερη ή ίση με 98% ορίζονται ως αμετάλλακτες (Α-ΧΛΛ) (12, 22). Το όριο του 2% αρχικά επιλέχθηκε ώστε να αποφευχθεί το ενδεχόμενο κάποιες από τις διαφορές να αντιστοιχούν σε άγνωστους πολυμορφισμούς του γενετικού τόπου IGH (38). Εξακολουθεί να βρίσκεται σε ισχύ επειδή οι δύο υποομάδες που διακρίνει έχουν (στατιστικά σημαντική) πολύ διαφορετική έκβαση.

Σε γενικές γραμμές, η Μ-ΧΛΛ ακολουθεί πιο ήπια πορεία από την Α-ΧΛΛ, η οποία χαρακτηρίζεται από κακή πρόγνωση. Η συγκεκριμένη κλινική διαφορά πιθανών αντικατοπτρίζει διαφορές στο βιολογικό υπόστρωμα των λευχαιμικών κλώνων που εκτείνονται από τις γενωμικές ανωμαλίες, στις ενεργοποιημένες οδούς, το βαθμό κλωνικής εξέλιξης και την αλληλεπίδραση με το μικροπεριβάλλον (39, 40). Πιο συγκεκριμένα, η Α-ΧΛΛ χαρακτηρίζεται με ΒΚΥ χαμηλής συγγένειας και πολυαντιδραστικούς, παρουσία γενετικών βλαβών υψηλού κινδύνου (π.χ. μεταλλάξεις του γονιδίου *TP53*) και κλωνική εξέλιξη. Το φορτίο σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης αποτελεί έναν από τους πιο ισχυρούς προγνωστικούς δείκτες στη ΧΛΛ, ανεξαρτήτως κλινικού σταδίου νόσου ή άλλων βιοδεικτών (41). Μάλιστα, είναι δείκτης που παραμένει σταθερός στο χρόνο, σε αντίθεση με άλλους προγνωστικούς/προβλεπτικούς δείκτες, συμπεριλαμβανομένων των γενετικών βλαβών, που επηρεάζονται από ή αντανακλούν την κλωνική εξέλιξη της νόσου (42, 43).

## Μοριακή στερεοτυπία του Β κυτταρικού υποδοχέα

Ένα μοναδικό μοριακό χαρακτηριστικό της ΧΛΛ είναι η ύπαρξη υποσυνόλων ασθενών με ταυτόσημους ή πολύ όμοιους, «στερεότυπους» ΒκΥ, οι οποίοι δημιουργούνται από τη χρήση των ίδιων γονιδίων IGHV και IGKV/IGLV και έχουν μοναδικά, κοινά μοτίβα στην περιοχή CDR3 τόσο της βαριάς όσο και της ελαφριάς αλυσίδας (18, 19, 44-46). Αυτό είναι αξιοσημείωτο επειδή η μαθηματική πιθανότητα δυο διαφορετικοί κλώνοι Β λεμφοκυττάρων να εκφράζουν στερεότυπους υποδοχείς είναι πολύ χαμηλή ( $10^{-12}$ ), λόγω της εγγενώς τεράστιας ποικιλομορφίας των ανοσοσφαιρινών (47).

Η στερεοτυπία είναι πολύ συχνή στη ΧΛΛ με ποσοστό 30% των περιπτώσεων να φέρουν στερεότυπους ΒκΥ (23) που χαρακτηρίζονται από διακριτά δομικά μοτίβα, καθένα από τα οποία ορίζει ένα διαφορετικό υποσύνολο ασθενών. Εκτός από διακριτά ανοσογενετικά χαρακτηριστικά, οι ασθενείς που κατατάσσονται στο ίδιο στερεότυπο υποσύνολο μοιράζονται κοινές γενετικές ανωμαλίες (48, 49), κοινά επιγενετικά πρότυπα (50) και κοινό μεταγράψωμα (51). Έτσι, παρουσιάζουν μεγάλη ομοιογένεια ως προς τα κλινικά χαρακτηριστικά, σε αντιπαράθεση με τη μεγάλη ετερογένεια που χαρακτηρίζει το σύνολο των περιπτώσεων ΧΛΛ, ακόμα και σε περιπτώσεις που οι ΒκΥ έχουν παρόμοιο μεταλλακτικό φορτίο (52-54).

Χαρακτηριστικά αναφέρονται τα παρακάτω στερεότυπα υποσύνολα:

- Στερεότυπο υποσύνολο #1 (Οικογένεια γονιδίων IGHV I/IGKV1(D)-39): αντιστοιχεί στο 2-2.5% του συνόλου ασθενών με ΧΛΛ. Οι περιπτώσεις του υποσυνόλου #1 συχνά φέρουν μεταλλάξεις του γονιδίου *NOTCH1* (22%, σε σύγκριση με 5-10% σε όλη τη ΧΛΛ) (55, 56) καθώς και μεταλλάξεις του γονιδίου *NFKBIE* (15% σε σύγκριση με 7% στην υπόλοιπη CLL) (57). Σε κλινικό επίπεδο, το υποσύνολο #1 σχετίζεται με επιθετική κλινική πορεία και δυσμενή πρόγνωση, παρόμοια με αυτή των ασθενών που φέρουν βλάβη του γονιδίου *TP53* (58).
- Στερεότυπο υποσύνολο #2 (IGHV3-21/IGLV3-21): το μεγαλύτερο στερεότυπο υποσύνολο, που αντιπροσωπεύει το 2.5-3% των περιπτώσεων ΧΛΛ (23, 59) Αυτό το υποσύνολο περιλαμβάνει τόσο Α-ΧΛΛ (40%) όσο και Μ-ΧΛΛ (60%) περιπτώσεις και χαρακτηρίζεται από κακή κλινική πορεία (19, 23). Η ιδιαίτερα επιθετική κλινική συμπεριφορά αυτού του υποσυνόλου δε μπορεί να

εξηγηθεί στο πλαίσιο των γενετικών ανωμαλιών που το χαρακτηρίζουν, αφού εμφανίζει κυρίως del(11q) και del(13q), με χαμηλή συχνότητα βλαβών του γονιδίου *TP53*(49, 58, 60). Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι περίπου οι μισές περιπτώσεις του υποσύνολου #2 φέρουν μεταλλάξεις του γονιδίου *SF3B1* (61, 62).

- Στερεότυπο υποσύνολο #4 (IGHV4-34/IGKV2-30): αντιπροσωπεύει το 1% των περιπτώσεων με ΧΛΛ και κατά κύριο λόγο περιλαμβάνει περιπτώσεις Μ-ΧΛΛ. Οι ασθενείς του υποσύνολου #4 χαρακτηρίζονται από καλή κλινική πορεία και συχνά παρουσιάζουν del(13q) (48), ενώ στερούνται γονιδιακών μεταλλάξεων, όσον αφορά στα πιο συχνά μεταλλάσσόμενα γονίδια στη CLL (*NOTCH1*, *SF3B1*, *TP53*)(56). Οι ΒΚΥ είναι ισοτύπου IgG, γεγονός σπάνιο στην ΧΛΛ (5-8%), και χαρακτηρίζονται από ανεργία, στα πλαίσια εξασθενημένης άνοσης απάντησης σε (αυτο)αντιγόνα (18, 63-66).
- Στερεότυπο υποσύνολο #8 (IGHV4-39/IGKV1(D)-39): χαρακτηρίζεται από την έκφραση στερεότυπων, αμετάλλακτων ΒΚΥ IgG ισοτύπου (67, 68), καθώς και υψηλή συχνότητα τρισωμίας 12 (60%)(58) και μεταλλάξεων του γονιδίου *NOTCH1* (34%-62%) (56, 61, 62). Οι κλωνοτυπικές ΙG είναι κατεχοχίν πολυαντιδραστικές, εύρημα το οποίο μεταφράζεται σε έντονη διέγερση του Β κυττάρου μετά από έκθεση σε αντιγόνο (69). Επίσης το στερεότυπο υποσύνολο #8 συνοδεύεται από αυξημένη συχνότητα εκτροπής σε σύνδρομο Richter (λέμφωμα υψηλής κακοήθειας) (70).

Η έκφραση στερεότυπων ΒκΥ είναι πολύ συχνότερη στην Α-ΧΛΛ (>40%) έναντι της Μ-ΧΛΛ (~15%) (18, 19). Η στερεοτυπία σε επίπεδο ΒκΥ μπορεί να θεωρηθεί ως ισχυρότατη ένδειξη για την αναγνώριση κοινού αντιγονικού επιτόπου (21, 71).

### Γενετικές βλάβες στην ΧΛΛ

Εξωγενή (cell-extrinsic) σήματα, δηλαδή σήματα του μικροπεριβάλλοντος που μεταδίδονται μέσω αντίστοιχων υποδοχέων στο εσωτερικό του νεοπλασματικού κυττάρου συνδιάζονται με τους ενδογενείς (cell-intrinsic) βλάβες και επηρεάζουν την εξέλιξη του νεοπλασματικού κλώνου (55). στις τελευταίες συμπεριλαμβάνονται γενετικές μεταλλάξεις και κυτταρογενικές ανωμαλίες οι οποίες έχουν βρεθεί στην

πλειονότητα των περιπτώσεων ΧΛΛ, χωρίς όμως κάποια βλάβη να είναι παθογνωμονική για τη νόσο (43, 72, 73).

Ως προς τις κυτταρογενετικές ανωμαλίες, συχνότερες είναι η έλλειψη στο χρωμόσωμα 13q [del(13q)], η έλλειψη στο χρωμόσωμα 11q [del(11q)], η έλλειψη στο χρωμόσωμα 17p [del(17p)] και τρισωμία 12 [τρिसωμία 12] (74). Οι ασθενείς που φέρουν del(13q) θεωρούνται καλής πρόγνωσης και αντιπροσωπεύουν την πιο συχνή κυτταρογενετική ομάδα στην ΧΛΛ (>50% των περιπτώσεων). Η έλλειψη αυτή συμπεριλαμβάνει δύο miRs (miR-15-a και miR-16-1) (75, 76). del(11q) βρίσκεται στο 10-15% των περιπτώσεων ΧΛΛ και έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του γονιδίου *ATM*, το οποίο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη επιδιόρθωσης του DNA. Κατά κύριο λόγο, συνοδεύεται από ογκώδη λεμφαδενοπάθεια και σχετικά γρήγορη εξέλιξη (77). Η τρισωμία 12 βρίσκεται στο ~15% των περιπτώσεων με ΧΛΛ και χαρακτηρίζεται από άτυπο ανοσοφαινότυπο, αλλά κλινική και βιολογική ετερογένεια (61, 78). Πιο συγκεκριμένα, συνδέεται με την παρουσία επιπρόσθετων τρισωμιών, χρωμοσωμικών μεταθέσεων στο γονιδιακό τόπο IGH και υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων στο γονίδιο *NOTCH1* (79-81). Επίσης, είναι ενδιαφέρον ότι η τρισωμία 12 έχει υψηλή συχνότητα εμφάνισης (~60%) στο στερεότυπο υποσύνολο #8, το οποίο σχετίζεται με υψηλότερο κίνδυνο για μετασχηματισμό σε σύνδρομο Richter σε σύγκριση με τις υπόλοιπες περιπτώσεις ΧΛΛ (68). de(17p) εντοπίζεται στο 7% των περιπτώσεων ΧΛΛ κατά τη διάγνωση, κυρίως σε περιπτώσεις A-ΧΛΛ (72). Αυτή η έλλειψη αφορά στο γονιδιακό τόπο *TP53* με το 80% των περιπτώσεων αυτών να φέρει μετάλλαξη του συγκεκριμένου γονιδίου στο άλλο αλληλόμορφο. Οι περιπτώσεις με αλλοιώσεις στο γονίδιο *TP53* εμφανίζουν υψηλή πολυπλοκότητα σε επίπεδο γονιδιώματος, δυσμενή πρόγνωση και φτωχή ανταπόκριση σε χημειοθεραπευτικά σχήματα (40).

Συμπεριλαμβανομένων των μεταλλάξεων του γονιδίου *TP53*, οι μεταλλάξεις στα γονίδια *NOTCH1* και *SF3B1*, ανιχνεύονται σε ποσοστό ~2-10% και σχετίζονται με πρόοδο νόσου και δυσμενή κλινική πορεία.(43, 73, 82). Πιο συγκεκριμένα:

- *NOTCH1*: μεταλλάξεις του γονιδίου έχουν αναφερθεί σε ~10% των ασθενών με ΧΛΛ κατά τη διάγνωση, ιδίως στην υποομάδα A-ΧΛΛ. Το ~40% των περιπτώσεων M-ΧΛΛ που φέρουν μεταλλάξεις του γονιδίου *NOTCH1* φέρουν επίσης και τρισωμία 12.

- *SF3B1*: ανιχνεύονται στο 10% των περιπτώσεων ΧΛΛ, κυρίως στην υποομάδα Α-ΧΛΛ.

## Επιγενετική στην ΧΛΛ

### Γενικά

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση των γονιδίων χωρίς καμία αλλαγή στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του DNA. Οι διαταραχές στο επιγενετικό προφίλ των γονιδίων επηρεάζουν μηχανισμούς όπως η κυτταρική διαίρεση, η απόπτωση και η απάντηση στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα (83). Τα επιγενετικά φαινόμενα προκαλούνται από ποικίλους μοριακούς μηχανισμούς, που περιλαμβάνουν τροποποιήσεις των ιστονών, αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, RNA τροποποίηση/παρεμβολή (μεταξύ άλλων, μέσω siRNA και miRNA) και μεθυλίωση του DNA. Οι μηχανισμοί αυτοί διασυνδέονται και αλληλεπιδρούν με σκοπό τη διατήρηση των επιγενετικών προτύπων στην πάροδο του χρόνου, ιδίως κατά την κυτταρική διαίρεση (84).

Η χρωματίνη είναι το μακρομοριακό σύμπλοκο του DNA με τις ιστόνες και αποτελεί το ικρίωμα όπου συσκευάζεται ολόκληρο το γονιδίωμα. Βασική μονάδα της χρωματίνης είναι το νουκλεοσωμάτιο, το οποίο περιέχει DNA μήκους 147 ζευγών βάσεων που αλληλεπιδρά μ' ένα οκταμερές ιστονών, το οποίο αποτελείται από δυο αντίγραφα καθεμιάς από τις ιστόνες H2A, H2B, H3, και H4 (85). Γενικά, η χρωματίνη υποδιαιρείται σε δύο κύριες περιοχές: (1) ετεροχρωματίνη, η οποία είναι πολύ συμπυκνωμένη, αντιγράφεται αργά και περιέχει κυρίως ανενεργά γονίδια και (2) ευχρωματίνη, η οποία έχει σχετικά ανοιχτή δομή και περιέχει τα περισσότερα ενεργά γονίδια. Οι τροποποιήσεις του DNA και των ιστονών ρυθμίζονται δυναμικά από ένζυμα τροποποίησης των ιστονών με αυστηρά ελεγχόμενο τρόπο.

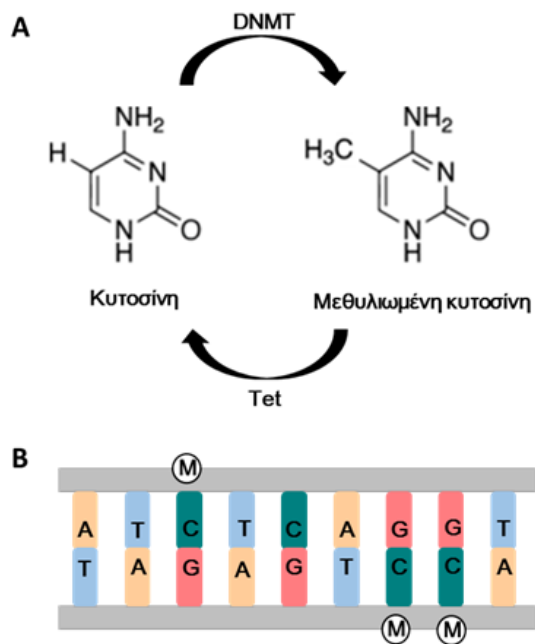
Οι επιγενετικές τροποποιήσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση όλων των διεργασιών που συμβαίνουν στο DNA, όπως η αντιγραφή, η επιδιόρθωση του DNA και η μεταγραφή. Συνεπώς, αλλοιωμένα πρότυπα έκφρασης ή γενετικές μεταλλάξεις στους ρυθμιστές της χρωματίνης μπορεί να έχουν μεγάλες επιπτώσεις και να



οδηγήσουν σε επαγωγή ή διατήρηση διαφόρων τύπων καρκίνου (86). Τα επιγενετικά πρότυπα αλλοιώνονται κατά την έναρξη και την εξέλιξη των νεοπλασιών (83, 87).

### Μεθυλίωση του DNA

Η καλύτερα μελετημένη επιγενετική τροποποίηση στον άνθρωπο είναι η μεθυλίωση της κυτοσίνης του DNA, δηλαδή η ομοιοπολική προσθήκη μιας μεθυλομάδας στην 5' θέση της κυτοσίνης (88) (**Εικόνα 4A**). Η μεθυλίωση του DNA καταλύεται από δύο οικογένειες πρωτεϊνών, DNMT και TET (89, 90) (**Εικόνα 4A**), και συμβαίνει σχεδόν αποκλειστικά στα δινουκλεοτίδια CpG, τα οποία είναι σχετικά σπάνια στο γονιδίωμα των θηλαστικών (~1%) (**Εικόνα 4B**). Τα δινουκλεοτίδια CpG συνήθως συγκεντρώνονται σε περιοχές που καλούνται νησίδες CpG και ορίζονται ως περιοχές μεγαλύτερες των 200 βάσεων με περιεκτικότητα σε C+G τουλάχιστον 50% (89).



**Εικόνα 4. A.** Μεθυλίωση του DNA, η ομοιοπολική προσθήκη μεθυλομάδας στην 5' θέση της κυτοσίνης στο DNA **B.** Η μεθυλίωση του DNA συμβαίνει σχεδόν αποκλειστικά στα δινουκλεοτίδια CpG.

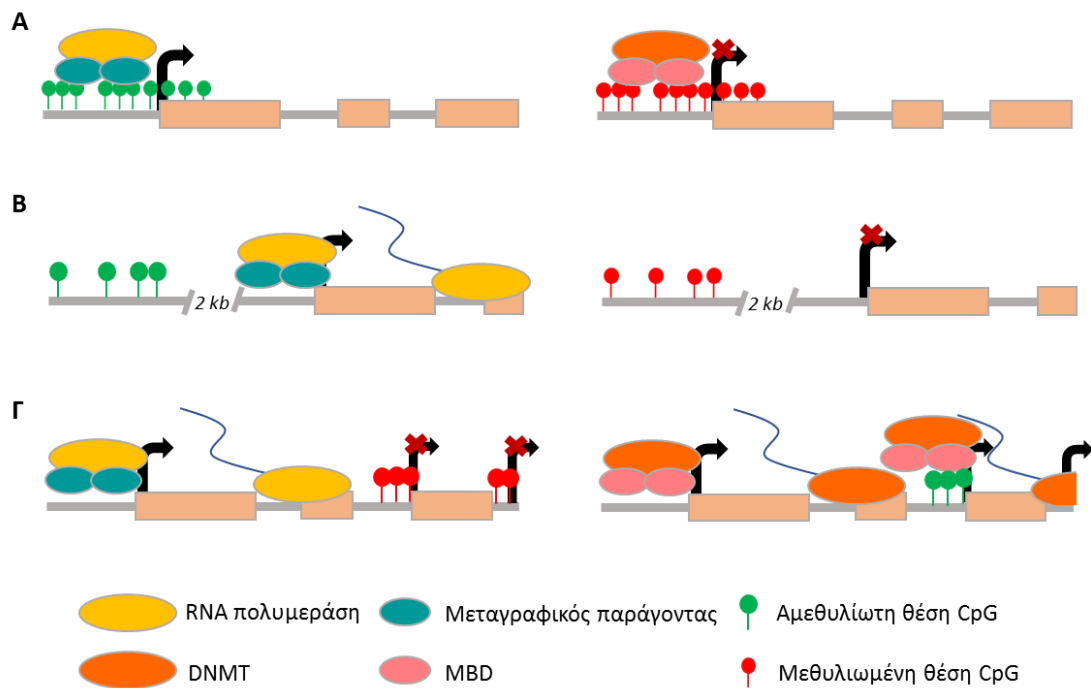
Περίπου το 60% των υποκινητών των γονιδίων του ανθρώπου σχετίζονται με νησίδες CpG, οι οποίες στα φυσιολογικά κύτταρα συνήθως είναι αμεθυλίωτες, παρότι ορισμένες (~6%) μεθυλιώνονται κατά ιστο-ειδικό τρόπο κατά την ανάπτυξη ή σε

διαφοροποιημένους ιστούς (91). Οι νησίδες CpG έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν την τοπική δομή της χρωματίνης (92).

Γενικά, κύριο χαρακτηριστικό της μεθυλίωσης του DNA είναι ότι μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση των γονιδίων με διάφορους μηχανισμούς (**Εικόνα 5A**). Το μεθυλιωμένο DNA επιστρατεύει πρωτεΐνες που φέρουν περιοχές πρόσδεσης σε CpG (methyl-CpG-binding domain, MBD proteins). Με τη σειρά τους, τα μέλη της οικογένειας MBD επιστρατεύουν σύμπλοκα τροποποίησης των ιστονών (histone-modifying) και αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (chromatin-remodeling) στις θέσεις μεθυλίωσης. Η μεθυλίωση του DNA μπορεί επίσης να καταστείλει απευθείας τη μεταγραφή αποτρέποντας την αλληλεπίδραση των μεταγραφικών παραγόντων με τις αντίστοιχες αλληλουχίες-στόχους στο DNA. Αντίθετα, οι αμεθυλιώτες νησίδες CpG δημιουργούν μια δομή χρωματίνης ευνοϊκή για την έκφραση των γονιδίων, επιτρέποντας την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων με σκοπό την επιστράτευση της RNA πολυμεράσης (88).

Μεθυλίωση του DNA δεν συμβαίνει αποκλειστικά στις νησίδες CpG. Πρόσφατα επινοήθηκε ο όρος “ακτές νησίδων CpG” (CpG island shores) που αναφέρεται σε περιοχές με χαμηλότερη πυκνότητα σε διουκλεοτίδια CpG, οι οποίες βρίσκονται κοντά (~2 kb) σε νησίδες CpG. Η μεθυλίωση των ακτών των νησίδων CpG συνδέεται στενά με καταστολή της μεταγραφής (**Εικόνα 5B**). Το μεγαλύτερο ποσοστό ιστοειδικής μεθυλίωσης φαίνεται να συμβαίνει στις ακτές των νησίδων CpG παρά στις ίδιες τις νησίδες (88, 93, 94).

Η σχέση της μεθυλίωσης στα σώματα των γονιδίων (gene bodies) και το πώς συμβάλλει στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων παραμένει ασαφής. Σύμφωνα με τα διαθέσιμα δεδομένα, η μεθυλίωση του DNA στα σώματα των γονιδίων σχετίζεται με υψηλότερο επίπεδο έκφρασης σε διαιρούμενα κύτταρα (**Εικόνα 5Γ**) (89, 94). Η μεθυλίωση του DNA δε σχετίζεται μόνο με την ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου. Ένα σημαντικό μέρος της “βαθιάς” μεθυλίωσης των CpGs βρίσκεται σε επαναλαμβανόμενα στοιχεία. Αυτή η μεθυλίωση φαίνεται αναγκαία για την προστασία της ακεραιότητας του χρωμοσώματος (88).



**Εικόνα 5. Πρότυπα μεθυλίωσης του DNA.** Μεθυλίωση DNA μπορεί να συμβεί σε διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος. Η αλλαγή αυτών των προτύπων στα κύτταρα μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις. Το φυσιολογικό σενάριο απεικονίζεται στην αριστερή στήλη και οι αλλαγές του προτύπου στη δεξιά. **(Α)** Οι νησίδες CpG που βρίσκονται στους υποκινητές των γονιδίων συνήθως είναι αμεθυλιωτές, επιτρέποντας τη μεταγραφή. Οι αλλαγές σε αυτά τα πρότυπα οδηγούν σε μεταγραφική καταστολή. **(Β)** Το ίδιο πρότυπο παρατηρείται και στις ακτές των νησίδων CpG, οι οποίες βρίσκονται έως και 2Kb ανοδικά της νησίδας CpG. **(Γ)** Ωστόσο, όταν η μεθυλίωση συμβαίνει στο σώμα του γονιδίου διευκολύνει τη μεταγραφή προστατεύοντας από αυθόρμητες ενάρξεις της μεταγραφής. Σε διάφορα νοσήματα τα σώματα των γονιδίων συνήθως απομεθυλιώνονται, οδηγώντας σε έναρξη της μεταγραφής από πολλές λάθος θέσεις.

### Μεθυλίωση του DNA και ΧΛΛ

Πολλές μελέτες έχουν αναδείξει υπομεθυλίωση του DNA σε διάφορους τύπους καρκίνου, τονίζοντας τη μαζική υπομεθυλίωση στις χρόνιες λευχαιμίες, ιδίως την ΧΛΛ (95).

Διάφορες μελέτες ανέφεραν ότι η υπομεθυλίωση σε σημαντικά γονίδια συσχετίζεται με αύξηση στην έκφρασή τους, π.χ. το ογκογονίδιο *MYC*, το αντι-αποπτωτικό γονίδιο

*BCL2*, το γονίδιο *MDR1* αλλά και το γονίδιο *TCL1A*, το οποίο κωδικοποιεί έναν ενεργοποιητή του NF-κΒ. Εκτός όμως από φαινόμενα υπομεθυλίωσης στη ΧΛΛ, παρατηρήθηκε επίσης υπερμεθυλίωση νησίδων CpG σε υποκινητές διαφόρων γονιδίων που είχε ως αποτέλεσμα την αποσιώπηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, π.χ. γονίδια που εμπλέκονται στην απόπτωση (*DAPK1*, *WIF1*, *ID4*, και *SFRPs*), γονίδια ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου [*CDKN2A* (*p16INK4*) και *CDKN2B* (*p15INK4*)] και το γονίδιο επιδιόρθωσης *MLH1*, του οποίου η αποσιώπηση σχετίζεται με την εξέλιξη της ΧΛΛ σε σύνδρομο Richter (96). Η κατάσταση μεθυλίωσης του DNA σε αρκετά από αυτά τα γονίδια έχει επίσης αναφερθεί ότι σχετίζεται με την κατάσταση των μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV (97). Ένα σημαντικό παράδειγμα είναι η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *TWIST2*, που κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό αποσιωπητή του γονιδίου *TP53*, η οποία παρατηρείται συχνότερα σε περιπτώσεις Μ-ΧΛΛ σε σχέση με Α-ΧΛΛ και σχετίζεται με καλή πρόγνωση (98). Επίσης, το γονίδιο της κινάσης της τυροσίνης *ZAP70*, που είναι γνωστός προγνωστικός δείκτης στην ΧΛΛ, βρέθηκε να είναι διαφορεικά μεθυλιωμένο. Πολλές μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση της καλής πρόγνωσης σε περιπτώσεις Μ-ΧΛΛ με χαμηλά επίπεδα έκφρασης *ZAP70* μέσω της αποσιώπησης του γονιδίου λόγω της μεθυλίωσης του DNA. Αντίθετα, η κακή πρόγνωση συνδέεται με υψηλή έκφραση του γονιδίου *ZAP70*, που συνδέεται με μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης στον υποκινητή.

Αναλύσεις μεγάλης κλίμακας της μεθυλίωσης του DNA σε φυσιολογικά Β κύτταρα και λευχαιμικά ΧΛΛ κύτταρα αποκάλυψαν ότι η εκτεταμένη υπομεθυλίωση, που στοχεύει κυρίως στα σώματα και στους ενισχυτές των γονιδίων, είναι μια επιγενετική αλλαγή με σημαντικό ρόλο τόσο στη φυσιολογική διαφοροποίηση των Β κυττάρων όσο και στην ανάπτυξη της ΧΛΛ (99, 100). Πιο συγκεκριμένα, η υπομεθυλίωση στοχεύει σε ενισχυτές και θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, ενώ η υπερμεθυλίωση αφορά κυρίως στις μεταγραφόμενες περιοχές του γονιδιώματος (101).

Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει η μεγάλη ετερογένεια στα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA μεταξύ διαφορετικών υποομάδων ΧΛΛ: διακριτά πρότυπα μεθυλίωσης χαρακτηρίζουν υποομάδες που ορίζονται με βάση σημαντικούς μοριακούς δείκτες π.χ. φορτίο σωματικών υπερμεταλλάξεων των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών (97, 99, 102) και στερεοτυπία του ΒκΥ (50). Πιο συγκεκριμένα, σημαντικές διαφορές στα

πρότυπα μεθυλίωσης έχουν βρεθεί μεταξύ A-ΧΛΛ και M-ΧΛΛ περιπτώσεων, οι οποίες φαίνεται να συνδέονται με το επιγενετικό αποτύπωμα των θεωρούμενων κυττάρων προέλευσης τους, επηρεάζοντας τις βιολογικές λειτουργίες και την κλινική εξέλιξη της νόσου (99). Επίσης, σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε τρία μεγάλα στερεότυπα υποσύνολα της ΧΛΛ, τα επιθετικά υποσύνολα #1 και #2 και το 'ήπιο' υποσύνολο #4, παρατηρήθηκαν διαφορετικά προφίλ μεθυλίωσης του DNA. Η ανάλυση γονιδιακής οντολογίας των διαφορετικά μεθυλιωμένων γονιδίων ανέδειξε σημαντικό αριθμό γονιδίων που συμμετέχουν στην άνοση απάντηση (π.χ. CD80, CD86 και IL10) (50). Σε πρόσφατη μελέτη της ομάδας μας βρέθηκαν διαφορετικά πρότυπα μεθυλίωσης του DNA μεταξύ των στερεότυπων υποσυνόλων #6 και #8, τα οποία ανήκουν μεν και τα δύο στην A-ΧΛΛ αλλά το στερεότυπο υποσύνολο #8 χαρακτηρίζεται από πιο επιθετική πορεία (103). Το συγκεκριμένο εύρημα ενισχύει την αντίληψη ότι η κατάταξη των ασθενών ΧΛΛ σε υποσύνολα με βάση τη στερεοτυπία του BκΥ αντικατοπτρίζει βιολογικές και λειτουργικές διαφορές.

### Κατάσταση της χρωματίνης στην ΧΛΛ

Η μεγάλη ετερογένεια που χαρακτηρίζει την ΧΛΛ αναδεικνύεται επίσης και σε επίπεδο χρωματίνης (104, 105). Οι ενεργές περιοχές που συνδέονται με την ΧΛΛ έδειξαν συσχέτιση με θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων π.χ. NFAT, FOX και TCF/LEF. Από την άλλη πλευρά, οι "super ενισχυτές" βρέθηκαν να σχετίζονται με το μεταγραφικό παράγοντα PAX5, ο οποίος είναι απαραίτητος για την επιβίωση των ΧΛΛ κυττάρων (106). Σε επίπεδο προγνωστικών υποκατηγοριών, οι A-ΧΛΛ περιπτώσεις έδειξαν πιο ενεργό και ανοιχτή χρωματίνη σε σύγκριση με τις M-ΧΛΛ περιπτώσεις (104, 105). Επίσης, οι περιπτώσεις που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *MYD88* ή τρισωμία 12 εμφανίζουν διακριτή αναδιαμόρφωση της χρωματίνης σε σύγκριση με τις υπόλοιπες περιπτώσεις ΧΛΛ (105).

## Γενετική και Επιγενετική στην εξέλιξη της ΧΛΛ

Κατά την εξέλιξη της ΧΛΛ συμβαίνουν σημαντικές γενετικές αλλαγές. Συγκεκριμένα, γενετικά διακριτοί υποπληθυσμοί (υποκλώνοι) διαπιστώθηκαν σε πολλές μελέτες, ενώ ο αριθμός των γενετικών μεταβολών αυξάνει κατά την πρόοδο της νόσου και την υποτροπή μετά από θεραπεία σε σχέση με τη διάγνωση (107-110). Η παρουσία υποκλώνων έχει συσχετιστεί με κακή πρόγνωση και ταχεία εξέλιξη της νόσου. Επιθετικοί υποκλώνοι, οι οποίοι κυριαρχούν στην υποτροπή, ανιχνεύθηκαν αναδρομικά και στα δείγματα πριν τη χορήγηση θεραπείας (109, 110).

Συγκριτικά με τις γενετικές αλλαγές, πολύ λιγότερες πληροφορίες είναι διαθέσιμες για τη σημασία των επιγενετικών αλλαγών στη φυσική πορεία της ΧΛΛ. Έχει αναφερθεί ότι οι Μ-ΧΛΛ περιπτώσεις με σταθερή νόσο παρουσίασαν σταθερά πρότυπα μεθυλίωσης DNA κατά την πάροδο του χρόνου, παράλληλα με περιορισμένες γενετικές αλλαγές (102). Αντίθετα, Α-ΧΛΛ περιπτώσεις με ανάγκη θεραπείας παρουσίασαν μεγάλη διακύμανση αλλαγών στα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA (102, 111) παράλληλα με εμφάνιση υποκλώνων με διαφορετικό γενετικό υπόστρωμα (111).

# Σκοπός της παρούσας μελέτης

Κύριος στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση των επιγενετικών προτύπων και κυρίως της μεθυλίωσης του DNA στην ΧΛΛ τόσο μεταξύ των ασθενών αλλά και σε σύγκριση με τα φυσιολογικά Β κύτταρα.

- **Μελέτη I.** Η μελέτη στόχευε στη διαχρονική ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA στη ΧΛΛ πριν τη θεραπεία και στην υποτροπή των ασθενών μετά από θεραπεία. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε ο ρόλος της μεθυλίωσης του DNA στην υποτροπή ασθενών με ΧΛΛ μετά θεραπεία με το πρωτόκολλο φλουνταραμπίνη/κυκλοφωσφαμίδη/Rituximab (FCR). Επίσης, εξετάστηκε η έκταση των αλλαγών της μεθυλίωσης του DNA στους ΧΛΛ κλώνους σε σχέση με φυσιολογικά Β κύτταρα υγιών δοτών πριν τη χορήγηση θεραπείας. Κύρια ερωτήματα αποτέλεσαν η συνέργεια των επιγενετικών προτύπων καθώς και η συνεισφορά των μεταγραφικών παραγόντων στο ρυθμιστικό αυτό κύκλωμα. Επιπλέον, αξιολογήθηκε η αλληλεπίδραση των επιγενετικών αλλοιώσεων με τις γενετικές βλάβες και αναζητήθηκαν επιγενετικές «υπογραφές» με δυνατότητα χρήσης ως βιοδείκτες.
- **Μελέτη II.** Με βάση ενδείξεις από τη **Μελέτη I**, διερευνήσαμε τα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA σε περιπτώσεις που φέρουν συχνές κυτταρογενετικές βλάβες στη ΧΛΛ. Ειδικότερα, αξιολογήθηκαν τα προφίλ μεθυλίωσης του DNA σε ασθενείς που έφεραν: (i) del(11q), (ii) del(13q) και (iii) τρισωμία 12, οι οποίες, μαζί με την del(17p) αποτελούν τις συχνότερες κυτταρογενετικές ανωμαλίες στη ΧΛΛ. Στη μελέτη δεν εντάχθηκαν περιπτώσεις με del(17p) επειδή για τους συγκεκριμένους ασθενείς δεν ενδείκνυται ανοσοχημειοθεραπεία (με FCR ή άλλο σχήμα). Επίσης, αναζητήθηκαν πιθανές συσχετίσεις μεταξύ των επιγενετικών προτύπων με τα ιδιαίτερα κλινικοβιολογικά χαρακτηριστικά της κάθε υποομάδας. Τέλος, καίριο ερώτημα της έρευνας ήταν η διερεύνηση του λειτουργικού ρόλου της μεθυλίωσης του DNA στην έκφραση των γονιδίων

αλλά και η συνέργεια των επιγενετικών προτύπων, καθώς και η συνεισφορά των μεταγραφικών παραγόντων στο επιγενετικό κύκλωμα ρύθμισης.

- **Μελέτη III.** Αναλύθηκαν τα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA σε υποομάδες ασθενών A-ΧΛΛ και, πιο συγκεκριμένα, σε περιπτώσεις των στερεότυπων υποσυνόλων #6 και #8 και αλλά και περιπτώσεις A-ΧΛΛ που δεν ανήκουν σε κάποιο στερεότυπο υποσύνολο. Βασική επιδίωξη ήταν να εντοπιστούν επιγενετικές τροποποιήσεις που πιθανώς εξηγούν τη διαφορετική κλινική συμπεριφορά των συγκεκριμένων υποομάδων καθώς, ενώ πρόκειται στο σύνολό τους για περιπτώσεις A-ΧΛΛ, οι ασθενείς που ανήκουν στο στερεότυπο υποσύνολο #8 έχουν πολύ αυξημένη πιθανότητα να παρουσιάσουν συνδρομο Richter, ενώ οι ασθενείς του υποσυνόλου #6 παρουσιάζουν πολύ ηπιότερη κλινική πορεία. Επίσης, διερεύνηθηκε η συσχέτιση της επιγενετικής υπογραφής των στερεότυπων υποσυνόλων με την έκφραση των γονιδίων.



## Ομάδα μελέτης

Οι περιπτώσεις της ομάδας μελέτης διαγνώστηκαν με ΧΛΛ σύμφωνα με τα καθιερωμένα κριτήρια του International Workshop Chronic Lymphocytic Leukemia/National Cancer Institute (iwCLL/NCI) (24).

Στη **Μελέτη I** αναλύθηκαν 80 δείγματα από 40 ασθενείς με ΧΛΛ: το πρώτο δείγμα για κάθε ασθενή ελήφθη λίγο πριν τη χορήγηση της θεραπείας ενώ το δεύτερο μετά την υποτροπή, με το χρονικό διάστημα μεταξύ των δύο στιγμιότυπων να κυμαίνεται από 8.5 έως 130.8 μήνες (μέσος όρος: 33.6 μήνες). Θεραπευτικό σχήμα FCR χορηγήθηκε σε 36/40 ασθενείς, FC σε 2/40 ασθενείς και BR (Bendamustine-Rituximab) ή FCR+mitoxantrone (FCMR) στους υπόλοιπους 2. Από τους 40 ασθενείς, οι 32 (80%) ανήκαν στην κατηγορία A-ΧΛΛ, 3 (7.5%) στην κατηγορία M-ΧΛΛ, ενώ για τους υπόλοιπους 5 (12.5%) δεν υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα. Η συλλογή των δειγμάτων και των κλινικοβιολογικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε μετά από έγγραφη συγκατάθεση των ασθενών.

Στη **Μελέτη II** συμπεριλήφθηκαν 232 περιπτώσεις ΧΛΛ από το International Cancer Genome Consortium (ICGC) και 23 περιπτώσεις ΧΛΛ της **Μελέτης I**. Όλες οι περιπτώσεις δεν είχαν λάβει θεραπεία και δεν παρουσίασαν σύνθετο καρυότυπο. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν περιπτώσεις με del(11q), del(13q) ή τρισωμία 12 όπως φαίνεται στον **Πίνακα 1**. Με βάση τα κριτήρια επιλογής των περιπτώσεων (π.χ ανταπόκριση στην θεραπεία με το σχήμα FCR), οι περιπτώσεις με del (17p) δεν αναλύθηκαν.

Στη **Μελέτη III** αναλύθηκαν 26 δείγματα ασθενών με ΧΛΛ που ανήκουν στο στερεότυπο υποσύνολο #8 (n=13) και το στερεότυπο υποσύνολο #6 (n=13).

Οι μελέτες διεξήχθησαν σύμφωνα με τις αρχές της Διακήρυξης του Ελσίνκι μετά από έγκριση της Επιστημονικής Επιτροπής των συμμετεχόντων φορέων.

**Πίνακας 1.** Αριθμός περιπτώσεων που εξετάστηκαν στη **Μελέτη II.**

<b>Κυτταρογενετικός δείκτης</b>	<b>Μ-ΧΛΛ</b>	<b>Α-ΧΛΛ</b>
del(11q)	3	26
del(13q)	181	50
τρισωμία 12	17	28

## Υλικά και μέθοδοι

### Αρνητική επιλογή CD19<sup>+</sup> B λεμφοκυττάρων από δείγματα αίματος

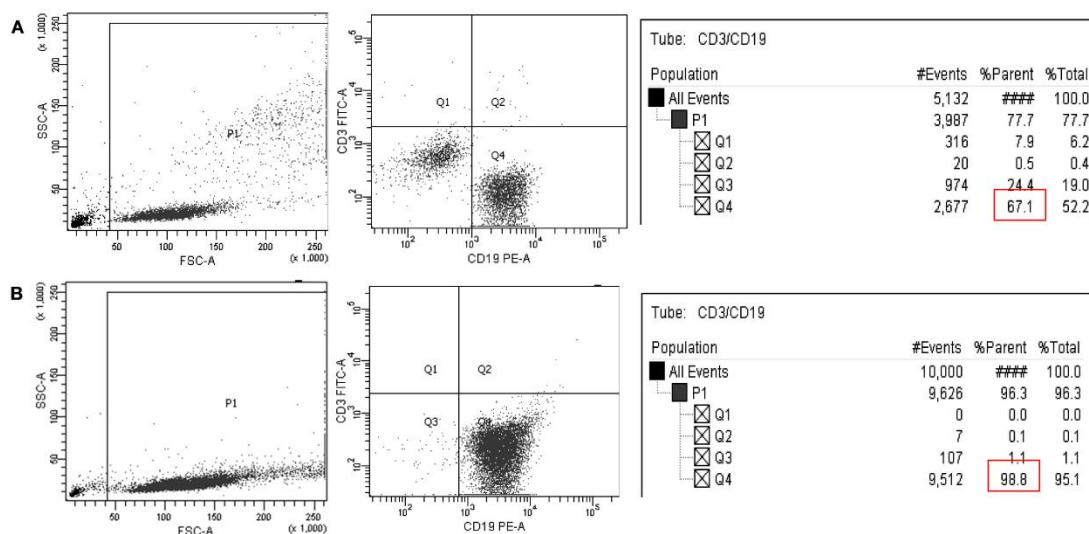
Ο διαχωρισμός των CD19<sup>+</sup> B λεμφοκυττάρων πραγματοποιήθηκε με την τεχνολογία RosetteSep (RosetteSep, StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada). Η τεχνολογία συνδυάζει την αρνητική επιλογή των ανεπιθύμητων κυττάρων με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων και του αντιδραστηρίου φικόλλη (Ficoll-Hyraque) για διαχωρισμό βασισμένο σε διαβάθμιση πυκνότητας (**Πίνακας 2**). Στη συγκεκριμένη περίπτωση προτιμήθηκε η αρνητική επιλογή έναντι της θετικής με αντί-CD19 αντισώματα ώστε να αποφευχθεί το ενδεχόμενο ενεργοποίησης των B λεμφοκυττάρων μέσω του συν-υποδοχέα CD19.

**Πίνακας 2:** Το σύνολο των μονοκλωνικών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων κυττάρων

Δείκτες	Έκφραση
CD2	T λεμφοκύτταρα, NK κύτταρα, Θυμοκύτταρα
CD3	T λεμφοκύτταρα, Θυμοκύτταρα
CD16	NK κύτταρα, Ουδετερόφιλα, Μακροφάγα
CD36	Μονοκύτταρα, Αιμοπετάλια
CD56	NK κύτταρα
CD66b	Κοκκιοκύτταρα

### Μέτρηση του ποσοστού των CD19<sup>+</sup> κυττάρων με κυτταρομετρία ροής

Η μέτρηση του ποσοστού των CD19<sup>+</sup> κυττάρων πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής (FACS) σε αναλυτή BD FACS CANTO και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη χρήση του λογισμικού BD FACS DIVA (BD, Franklin Lakes, NJ USA). Η διαδικασία επαναλήφθηκε και μετά την αρνητική επιλογή των κυττάρων. Για τα επόμενα στάδια της πειραματικής διαδικασίας επιλέχθηκαν τα δείγματα που περιείχαν CD19<sup>+</sup> κύτταρα σε ποσοστό μεγαλύτερο από 95% (**Εικόνα 6**).



**Εικόνα 6.** Ανάλυση του ποσοστού των CD19<sup>+</sup> κυττάρων πριν (A) και μετά (B) τη διαδικασία της αρνητικής επιλογής.

### Απομόνωση γενωμικού DNA (gDNA)

Η απομόνωση gDNA από CD19<sup>+</sup> Β λεμφοκύτταρα πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της αντιστρεπτής πρόσδεσης σε στήλες σιλικόνης με χρήση του QIAamp DNA MiniKit (QIAGEN). Η στήλη επιλεκτικά δεσμεύει νουκλεϊνικά οξέα (σε συνθήκες χαμηλής αλατότητας), ενώ είναι διαπερατή από πρωτεϊνικά μόρια και δισθενή κατιόντα που μπορεί να αναστείλουν τη δράση της DNA πολυμεράσης κατά την αντίδραση PCR. Η αποδέσμευση του γενετικού υλικού επιτυγχάνεται με αλλαγή των συνθηκών αλατότητας.

### Επεξεργασία του DNA με όξινο θειώδες (Bisulfite conversion)

Η επεξεργασία του DNA με όξινο θειώδες με σκοπό τη μελέτη της μεθυλίωσης του DNA πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό kit EpiTect Bisulfite kit (QIAGEN). Το kit βασίζεται σε μια αντίδραση τριών βημάτων μεταξύ της κυτοσίνης και του όξινου θειώδους κατά την οποία η κυτοσίνη μετατρέπεται σε ουρακίλη. Χρησιμοποιήθηκε 1 μg γενωμικού DNA.

## Μικροσυστοιχίες μεθυλίωσης του DNA

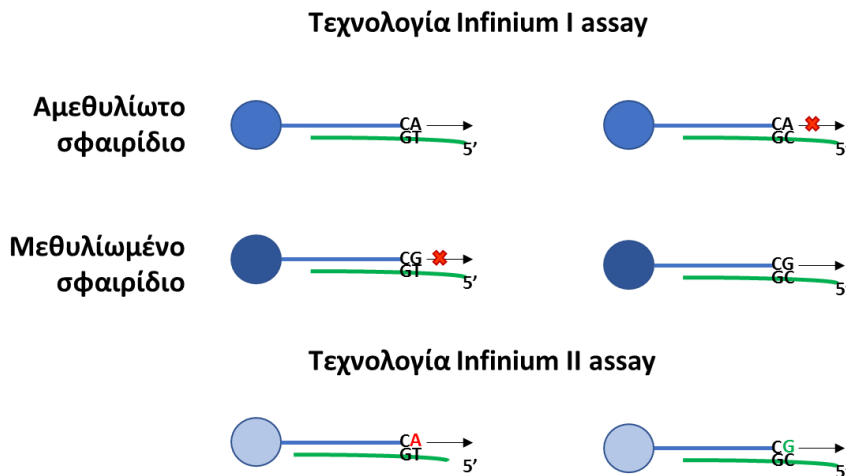
Για τη μελέτη της μεθυλίωσης του DNA κατά μήκος του γονιδιώματος εφαρμόστηκε η μικροσυστοιχία DNA Infinium Human Methylation 450 BeadChip array της εταιρείας Illumina Inc. Με τη συγκεκριμένη πλατφόρμα είναι δυνατή η μελέτη 485,577 θέσεων μεθυλίωσης (482,421 σημεία CpG, 3091 σημεία non-CpG και 65 τυχαία SNP) που αντιπροσωπεύουν διάφορες κατηγορίες, μεταξύ των οποίων γονίδια RefSeq, νησίδες CpG, ακτές νησιδίων CpG (CpG island shores) και άλλα (112).

Η εφαρμογή των μικροσυστοιχιών μεθυλίωσης του DNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή (Infinium protocol – User Guide part #15019519 B). Σύμφωνα με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο απαιτούνται 500 ng γενωμικού DNA επεξεργασμένου με όξινο θειώδες.

Συνοπτικά η διαδικασία έχει ως εξής:

1. *Ενίσχυση κατεργασμένου DNA με όξινο θειώδες.* Τα δείγματα DNA αποδιατάσσονται και ουδετεροποιούνται (neutralized) και έπειτα ενισχύονται σε ένα βήμα overnight.
3. *Τεμαχισμός του DNA.* Το ενισχυμένο προϊόν τεμαχίζεται μέσω μιας ελεγχόμενης ενζυματικής διαδικασίας.
4. *Κατακρήμνιση του DNA.* Πραγματοποιείται κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη και τα κλάσματα του DNA συλλέγονται με φυγοκέντρηση στους 4°C.
5. *Επαναιώρηση του DNA.* Το κατακρημνισμένο DNA επανεωρείται σε διάλυμα υβριδοποίησης.
6. *Υβριδοποίηση στο chip πολυσφαιριδίων (Multi Bead Chip).* Σε κάθε chip εφαρμόζονται 12 δείγματα με μια μεμβράνη IntelliHyb η οποία τα διαχωρίζει. Στην συνέχεια, η υβριδοποίηση των δειγμάτων πάνω στο chip πραγματοποιείται μέσω επώασης στο φούρνο υβριδοποίησης της Illumina. Τα ενισχυμένα και τεμαχισμένα δείγματα DNA υβριδίζονται σε τοπο-ειδικά 50μερή (ομοιοπολικά συνδεδεμένα σε έναν από τους >500,000 τύπους σφαιριδίων). Σχετικά με τα Infinium I assays, για κάθε θέση CpG αντιστοιχούν δύο διαφορετικοί τύποι σφαιριδίων (**Εικόνα 7**), ένας για τη μεθυλιωμένη κατάσταση (C) και ένας άλλος τύπος για τη μη μεθυλιωμένη (T). Από την άλλη, στα Infinium II assays για κάθε θέση CpG αντιστοιχεί ένας τύπος σφαιριδίου.

7. Πλύσιμο του chip για την απομάκρυνση του μη υβριδοποιημένου και του μη-ειδικά υβριδοποιημένου DNA
8. Επιμήκυνση και σήμανση του chip. Το chip υποβάλλεται σε επιμήκυνση και σήμανση σε τριχοειδή. Κατά την επιμήκυνση χρησιμοποιείται ως εκμαγείο το ήδη μονιμοποιημένο (captured) DNA, που ενσωματώνει ανιχνεύσιμα σήματα (labels) στο chip, τα οποία προσδιορίζουν τα επίπεδα μεθυλίωσης των σημείων CpG.
10. Απεικόνιση του chip. Το chip σαρώνεται με το σύστημα Illumina iScan System χρησιμοποιώντας ένα λέιζερ που διεγείρει το φθοριοφόρο του προϊόντος της επιμήκυνσης. Ο σαρωτής καταγράφει σε εικόνες υψηλής ανάλυσης το φως που εκπέμπεται από τα φθοριοφόρα.



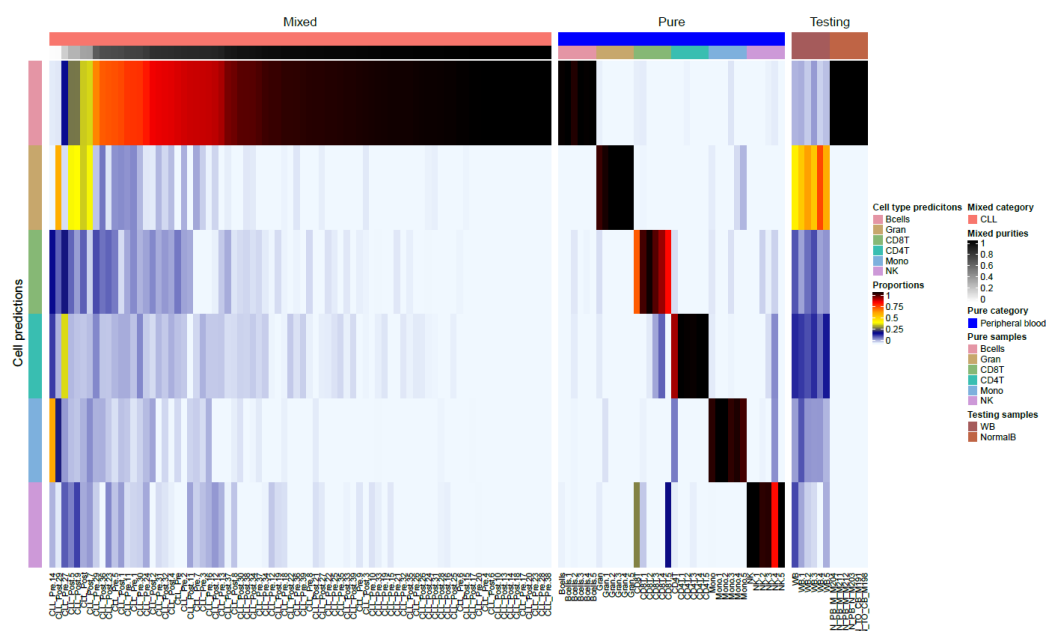
**Εικόνα 7.** Σχηματική απεικόνιση της τεχνολογίας που χρησιμοποιείται στη μικροσυστοιχία ανάλυσης της μεθυλίωσης Infinium (Infinium Methylation Assay). **Τεχνολογία Infinium I assay:** για κάθε θέση CpG αντιστοιχούν δύο διαφορετικοί τύποι σφαιριδίων - ένας για τη μεθυλιωμένη κατάσταση (C) και ένας άλλος τύπος για τη μη μεθυλιωμένη (T) κατάσταση της θέσης CpG. Και τα δύο είδη σφαιριδίων για την ίδια θέση CpG θα ενσωματώσουν τον ίδιο τύπο σημασμένου νουκλεοτιδίου, που καθορίζεται από τη βάση που προηγείται της εξεταζόμενης "C" στη θέση CpG. **Τεχνολογία Infinium II assay:** σε κάθε θέση CpG αντιστοιχεί ένας τύπος σφαιριδίου. Ο ανιχνευτής μπορεί να περιέχει έως και 3 υποκείμενες θέσεις CpG, με εκφυλισμένες βάσεις R να αντιστοιχούν στη "C" της θέσης CpG. Η κατάσταση μεθυλίωσης ανιχνεύεται με επιμήκυνση μονής βάσης. Κάθε θέση θα ανιχνεύεται σε δύο χρώματα. Σε αυτή την έκδοση της τεχνολογίας Infinium II assay, η σημασμένη "A"

ενσωματώνεται πάντα στην αμεθυλίωτη θέση προς μελέτη ("T"), και η σημασμένη "G" ενσωματώνεται πάντα στην μεθυλωμένη θέση προς μελέτη ("C").

### *In silico* καθαρισμός των δεδομένων μεθυλίωσης του DNA

Σε πρόσφατη μελέτη αποδείχθηκε η επίπτωση της μειωμένης καθαρότητας των δειγμάτων στα αποτελέσματα της μεθυλίωσης του DNA και αναπτύχθηκε αλγόριθμος που «καθαρίζει» *in silico* τις εντάσεις της μεθυλίωσης μικτών υποπληθυσμών βοηθώντας να απομονωθούν τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA των καρκινικών κυττάρων (113, 114).

Με δεδομένο ότι στην ομάδα μελέτης της **Μελέτης I** συμπεριλήφθηκαν δείγματα με καθαρότητα CD19<sup>+</sup> B κυττάρων <95%, προχωρήσαμε σε *in silico* καθαρισμό των δειγμάτων, σύμφωνα με την καθιερωμένη μεθοδολογία που αναφέρθηκε παραπάνω (114). Τα αποτελέσματα του καθαρισμού ανέδειξαν 7/80 δείγματα ως ακατάλληλα για περαιτέρω ανάλυση λόγω της υψηλής συγκέντρωσης κοκκιοκυττάρων (**Εικόνα 8**).



**Εικόνα 8.** Εκτίμηση της αναλογίας των κυτταρικών υποπληθυσμών σε δείγματα ΧΛΛ με βάση «καθαρά» δείγματα που προέρχονται από Β λεμφοκύτταρα (B cells), CD8<sup>+</sup> Τ κύτταρα, CD4<sup>+</sup> Τ κύτταρα, κύτταρα φυσικοί φονείς (NK), μονοκύτταρα (Mono) και κοκκιοκύτταρα (Gran). Οι καθαροί κυτταρικοί υποπληθυσμοί (δεξιό μέρος του θερμικού χάρτη) χρησιμοποιήθηκαν για την πρόβλεψη και οι περιπτώσεις ΧΛΛ

ταξινομήθηκαν από το χαμηλότερο προς τα υψηλότερο ποσοστό των Β κυττάρων (αριστερό μέρος του θερμικού χάρτη).

### Ανάλυση των δεδομένων από τις μικροσυστοιχίες Infinium HumanMethylation 450k

Τα δεδομένα των μικροσυστοιχιών αναλύθηκαν με το πακέτο “minfi” που αναπτύχθηκε στη γλώσσα προγραμματισμού R (115), και είναι διαθέσιμο μέσω του ανοιχτού κώδικα Bioconductor. Οι θέσεις CpG της μικροσυστοιχίας φιλτραρίστηκαν με αφαίρεση δεδομένων από ανιχνευτές οι οποίοι: i) συνδέονται με φυλετικά χρωμοσώματα, ii) συσχετίζονται με νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs), iii) δεν ανήκουν σε πλαίσιο CpG και iv) απέτυχαν στο στατιστικό έλεγχο του αλγόριθμου GreedyCut, ο οποίος φιλτράρει τον ανιχνευτή ή το δείγμα με το υψηλότερο κλάσμα αναξιόπιστων μετρήσεων. Η μέθοδος subset-quantile within array normalization (SWAN) (116) επιλέχθηκε για να διορθώσει τις διαφορές των ανιχνευτών της χημείας τύπου 1 και τύπου 2, βελτιώνοντας την αξιοπιστία της ανάλυσης.

Εφαρμόζοντας τα παραπάνω κριτήρια, παρέμειναν για περαιτέρω ανάλυση 464302, 478160 και 448898 θέσεις CpG για κάθε δείγμα για τη **Μελέτη I**, τη **Μελέτη II** και τη **Μελέτη III**, αντιστοίχως. Για καθεμία από τις επιλεγμένες θέσεις υπολογίστηκαν τα επίπεδα μεθυλίωσης μέσω της τιμής-β ( $\beta$ = ένταση μεθυλιωμένου αλληλομόρφου/ένταση αμεθυλιωμένου αλληλομόρφου + ένταση μεθυλιωμένου αλληλομόρφου + 100). Ο ποιοτικός έλεγχος των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε αξιοποιώντας τις πληροφορίες των ανιχνευτών ελέγχου που υπάρχουν στη μικροσυστοιχία.

### Ανάλυση του αριθμού των αντιγράφων του DNA (Copy Number Alterations, CNA)

Πρόσφατη Μελέτη έδειξε ότι η μικροσυστοιχία Infinium HumanMethylation 450k προσφέρει επίσης τη δυνατότητα ανεύρεσης copy number alterations (CNA) μέσω ποσοτικοποίησης της έντασης φθορισμού των ανιχνευτών (117). Στη **Μελέτη I** πραγματοποιήθηκε ανάλυση των CNA μέσω της γλώσσας προγραμματισμού R και του πακέτου ChaMP (118). Τρία δείγματα CD19<sup>+</sup> Β λεμφοκυττάρων από υγιείς δότες



χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου για τον υπολογισμό των CNAs και σημαντικά θεωρήθηκαν αυτά με  $\text{Log}_2\text{-ratios}=|0.2|$ .

### Διαφορική ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA

Για την ανεύρεση διαφορών στα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA μεταξύ δύο ομάδων/καταστάσεων, στη **Μελέτη I** και στη **Μελέτη III** εφαρμόστηκαν τα εξής κριτήρια: (i) απόλυτη διαφορά των μέσων τιμών μεθυλίωσης ( $\Delta\beta$ ) των ομάδων και (ii) επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (έλεγχος Kruskal). Στη **Μελέτη II**, εφαρμόστηκαν τα εξής κριτήρια: (i) απόλυτη διαφορά των μέσων τιμών μεθυλίωσης ( $\Delta\beta$ ) των ομάδων και (ii) επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας μέσω ελέγχου t-test και FDR. Η συνολική τυπική απόκλιση (standard deviation, sd) κάθε θέσης CpG υπολογίστηκε και στις δυο μελέτες. Διαφορετικά κριτήρια χρησιμοποιήθηκαν σε διαφορετικού τύπου αναλύσεις.

### Ανάλυση μηχανικής μάθησης με τη μέθοδο Random Forest

Ο αλγόριθμος μάθησης Random Forest (RF) εφαρμόστηκε με χρήση του πακέτου “varSelRF” (119) της γλώσσας προγραμματισμού R προκειμένου να ανιχνευθεί ένα μικρό σύνολο θέσεων CpG με ικανοποιητικά αποτελέσματα ταξινόμησης.

Η γενική ιδέα του αλγορίθμου RF είναι η κατασκευή πολλαπλών δέντρων αποφάσεων, όπου κάθε δέντρο ψηφίζει για μια τάξη και όλα μαζί σχηματίζουν ένα δάσος. Κάθε δέντρο κατασκευάζεται με βάση ένα σύνολο δειγμάτων που επιλέγεται με επανάθεση από τα αρχικά δείγματα. Κατά συνέπεια, ορισμένα δείγματα (περίπου  $0.368 \cdot \text{σύνολο}$ ) εξαιρούνται: τα συγκεκριμένα δείγματα χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό αφενός του σφάλματος πρόβλεψης και αφετέρου της σημαντικότητας (προβλεπτική αξία) κάθε μεταβλητής/θέσης CpG. Ένα μοντέλο RF κρίνεται ως καλός ταξινομητής όταν το ποσοστό των σωστά ταξινομημένων περιπτώσεων είναι υψηλότερο από 50% (τυχαία ταξινόμηση).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μια προσέγγιση «bootstrap», η οποία περιλαμβάνει την επιλογή 100 τυχαία επιλεγμένων συνόλων. Η μεθοδολογία εφαρμόστηκε ξανά για κάθε επιλογή προκειμένου να ληφθεί η υπογραφή CpG που προέκυψε. Για την αξιολόγηση του RF χρησιμοποιήθηκαν επίσης καμπύλες ROC και

AUC (area under the curve), που αντιπροσωπεύει την απόδοση του μοντέλου. Όσο η τιμή AUC του μοντέλου πλησιάζει σε τιμή 1, τόσο μεγαλύτερη η ακρίβεια της πρόβλεψης. Οι καμπύλες ROC είναι χρήσιμες για τη σύγκριση διαφορετικών αλγορίθμων μηχανικής μάθησης. Η τιμή AUC αντιπροσωπεύει την πιθανότητα ο ταξινομητής να ταξινομήσει σωστά μια περίπτωση στην πραγματική του τάξη. Οι ταξινομητές με τιμές AUC πάνω από 90% χαρακτηρίζονται ως τέλειοι ταξινομητές (50% αντιπροσωπεύουν τυχαία ταξινόμηση). Ο υπολογισμός των καμπυλών ROC και AUC πραγματοποιήθηκε με το πακέτο της R «ROCR». Το μοντέλο τροφοδοτήθηκε με τις θέσεις μεθυλίωσης του DNA που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη διακύμανση τιμών-β μεταξύ των δειγμάτων με βάση την τυπική απόκλιση ( $sd \geq 0.3$ ).

### Ανάλυση εμπλουτισμού σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος, στη χρωματίνη, σε θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων και μοριακά μονοπάτια

Η ανάλυση εμπλουτισμού σε περιοχές των γονιδίων πραγματοποιήθηκε με το αρχείο που παρέχει η Illumina, το οποίο χαρακτηρίζει τις θέσεις CpG ανάλογα με την χρωμοσωμική θέση τους σε εκκινητές, σώματα γονιδίων (gene bodies), 5'UTR και 3'UTR. Η ανάλυση εμπλουτισμού σε περιοχές του γονιδιώματος σχετικές με την κατάσταση της χρωματίνης (ετεροχρωματίνη, ενισχυτές, ενεργοί εκκινητές κ.α.) πραγματοποιήθηκε με βάση τα δεδομένα που προέκυψαν από πρόσφατη σχετική Μελέτη (114). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν ChIP-seq δεδομένα με αντισώματα έναντι 6 τροποποιήσεων των ιστονών (H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac, H3K36me3, H3K27me3, H3K9me3) από Β κύτταρα μνήμης (**Πίνακας 3**). Η στατιστική σημαντικότητα του εμπλουτισμού υπολογίστηκε με την υπεργεωμετρική κατανομή. Στη **Μελέτη I** και στη **Μελέτη III**, η ανάλυση εμπλουτισμού των γονιδίων που συσχετίζονται με τα διαφορικά μεθυλιωμένα CpG σε μοριακά μονοπάτια (pathway enrichment analysis) πραγματοποιήθηκε με το βιοπληροφορικό εργαλείο EnrichR (120) και τη χρήση της βάσης δεδομένων KEGG. Η ανάλυση εμπλουτισμού σε θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων (Transcription Factor Binding Sites Enrichment Analysis) των περιοχών που συνδέονται με CpGs πραγματοποιήθηκε με τη βάση JASPAR 2018 (121) και χρήση του πακέτου της R “TFBSTools” (122). Το

κατώφλι ομοιότητας τέθηκε στο 80% με κάθε θέση CpG να έχει επιμηκυνθεί  $\pm 12$ bp. Η στατιστική σημαντικότητα της κάθε ανάλυσης εμπλουτισμού υπολογίστηκε με την υπεργεωμετρική κατανομή. Στη **Μελέτη II**, ο εμπλουτισμός στη βάση Gene Ontology (GO) πραγματοποιήθηκε με βάση τα γονίδια που επικαλύπτονται με ΔMCpGs χρησιμοποιώντας το πακέτο της R “GOSTATS” και η στατιστική σημαντικότητα υπολογίστηκε με FDR. Η ανάλυση εμπλουτισμού σε θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων των αλληλουχιών που συνδέονται με ανοιχτή χρωματίνη πραγματοποιήθηκε μέσω του MEME suite και χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων AME. Τα κριτήρια που επιλέχθηκαν ήταν με βάση τα στατιστικά maximum odd score και Ranksum test.

**Πίνακας 3.** Χαρακτηρισμός της κατάστασης χρωματίνης με τη βάση δεδομένων CHIP-seq με αντισώματα έναντι 6 τροποποιήσεων των ιστονών (H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac, H3K36me3, H3K27me3, H3K9me3)

Κατάσταση χρωματίνης	Αντισώματα τροποποιήσεων ιστονών
Ενεργός ενισχυτής	H3K4me3+, H3K27ac+
Ετεροχρωματίνη, Χαμηλή ένταση σήματος	-
Ετεροχρωματίνη-κατεσταλμένες περιοχές	H3K9me3+
Κατεσταλμένες περιοχές polycomb	H3K27me3+
Σταθερός υποκινητής	H3K4me1+, H3K4me3+, H3K27me3+
Ισχυρός ενισχυτής 1	H3K4me1+, H3K4me3+, H3K27me3+
Ισχυρός ενισχυτής 2	H3K4me1+, H3K27ac+
Μεταγραφική επιμήκυνση	H3K36me3+
Μεταγραφική μετάβαση	H3K36me3+, H3K4me1+, H3K27ac+/-
Αδύναμη μεταγραφή	H3K36me3+/-
Αδύναμος ενισχυτής	H3K4me1+
Αδύναμος υποκινητής	H3K4me1+, H3K4me3+

### Συσχέτιση γενετικής και επιγενετικής

Από τις μικροσυστοιχίες μεθυλίωσης του DNA είναι δυνατή η ταυτόχρονη ανάλυση του αριθμού των αντιγράφων (Copy Number Alterations, CNAs).

Στη **Μελέτη I**, τα δεδομένα που προέκυψαν από τη συγκεκριμένη ανάλυση συνδυάστηκαν και με δεδομένα κυτταρογενετικών βλαβών [καρυστύπου ή/και FISH (fluorescent in situ hybridization)]. Επιπλέον, σε πρόσφατη Μελέτη της ομάδας μας (110)(Ljungström et al, Blood, 2016) αναφέρθηκαν δεδομένα από αλληλούχιση εξονίων [Whole Exome Sequencing (WES)] για 28/40 ασθενείς της παρούσας ομάδας μελέτης, στους οποίους αναζητήθηκαν συσχετίσεις με μεταλλάξεις των γονιδίων *ATM*, *BIRC3*, *EGR2*, *MGA*, *NFKBIE*, *NOTCH1*, *SF3B1* και *TP53*.

Στη **Μελέτη II**, χρησιμοποιήθηκαν διαθέσιμα δεδομένα από: (i) μικροσυστοιχίες έκφρασης γονιδίων (69/255 περιπτώσεις ΧΛΛ), (ii) CHIP-seq έναντι του αντισώματος H3K27ac (21/255 περιπτώσεις ΧΛΛ), (iii) ATAC-seq (20/255 περιπτώσεις ΧΛΛ)

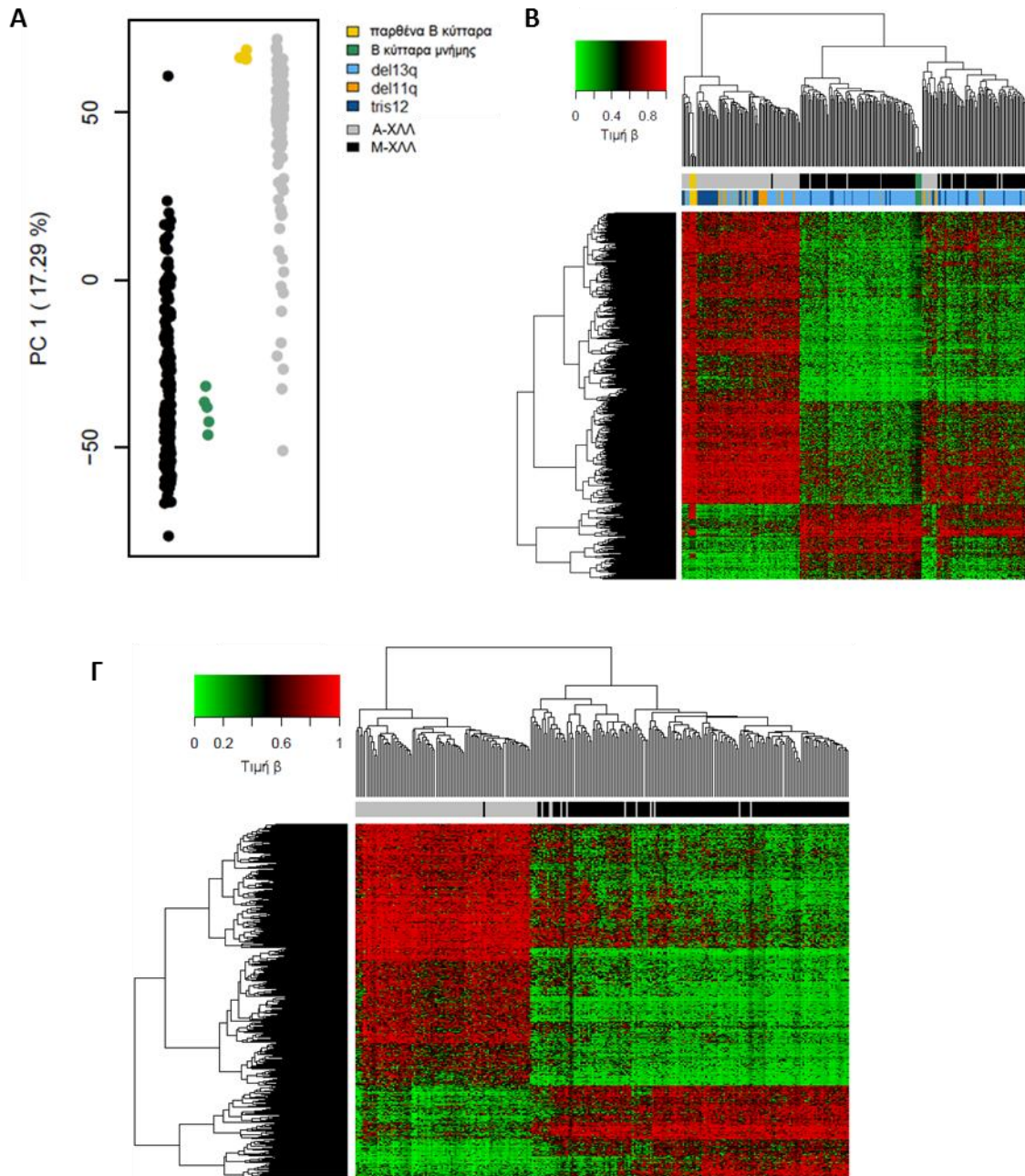
(Beekman et al. 2018). Τα δεδομένα προέρχονται από τα ίδια δείγματα ασθενών και είναι μέρος του BLUEPRINT epigenome project, στο European Genome-Phenome Archive (EGA), το οποίο εδρεύει στο EBI (European Bioinformatics Institute). Η συσχέτιση της μεθυλίωσης του DNA με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων ελέγχθηκε με τον έλεγχο Spearman correlation coefficient ( $p < 0.05$ ). Έπειτα, εξετάστηκε η επικάλυψη των χρωμοσωμικών τοποθεσιών μεταξύ των θέσεων CpG και των περιοχών που εμφάνισαν δείκτη H3K27ac και ανοιχτής χρωματίνης σε τουλάχιστον ένα δείγμα της ομάδας μελέτης.

### Αφαίρεση των θέσεων CpG που σχετίζονται με ισχυρές συνιστώσες της μεθυλίωσης του DNA στην ΧΛΛ

Προηγούμενες μελέτες (99, 123) αποκάλυψαν ότι οι Μ-ΧΛΛ και οι Α-ΧΛΛ φέρουν διαφορετικό επιγενετικό αποτύπωμα ως προς τα διαφορετικά στάδια ωρίμανσης των Β κυττάρων. Με αυτό το δεδομένο, στη **Μελέτη II**, αναπτύχθηκε μέθοδος για την ‘αφαίρεση’ της επίδρασης του μεταλλακτικού φορτίου των γονιδίων IGHV στα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA με σκοπό να δημιουργηθούν ‘καθαρά’ δεδομένα μεθυλίωσης του DNA, εστιάζοντας μόνο στην επίδραση των κυτταρογενετικών δεικτών.

Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση κυρίων συνιστωσών με βάση τα πιο μεταβλητά CpGs ( $sd=0.25$ ). Η κύρια συνιστώσα (principal component, PC) 1 φανέρωσε την υπογραφή της μεθυλίωσης του DNA των Α-ΧΛΛ, η οποία τις συνδέει με τα παρθένα Β κύτταρα (**Εικόνα 9Α**). Έπειτα, οι τιμές της PC1 συσχετίστηκαν με τις τιμές-β ( $|r|=0.5$ ) και βρέθηκε η υπογραφή των 3485 CpGs, η οποία επιβεβαιώθηκε και με ανάλυση ιεραρχικής ομαδοποίησης (**Εικόνα 9Β**). Αυτές οι θέσεις CpGs αφαιρέθηκαν από την ανάλυση. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε διαφορική ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA ( $|\delta\beta|=0.3$ ,  $FDR < 0.01$ ) με σκοπό την αφαίρεση της επίδρασης των διαφορών που εμφανίζουν οι Μ-ΧΛΛ και Α-ΧΛΛ περιπτώσεις (99). Έτσι, βρέθηκαν 1913 διαφορεικά μεθυλωμένα CpGs ( $\Delta MCpGs$ ) σχετικά με το μεταλλακτικό φορτίο των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών (**Εικόνα 9Γ**), τα οποία αφαιρέθηκαν από την ανάλυση. Τέλος, αφαιρέθηκαν όλες οι θέσεις CpG οι οποίες

επικαλύπτονται με τις χρωμοσωμικές περιοχές των κυτταρογενετικών βλαβών που εξετάστηκαν. Όλα τα παραπάνω οδήγησαν σε έναν πίνακα 426.647 θέσεων CpG.



**Εικόνα 9. Α.** Γράφημα με τις τιμές της PC1 με βάση τα πιο μεταβλητά CpGs ( $sd= 0.25$ ) **Β.** Ανάλυση ιεραρχικής ομαδοποίησης των 3485 CpGs, τα οποία έδειξαν συσχέτιση μεταξύ των τιμών της PC1 και των τιμών  $\beta$  ( $|r|=0.5$ ) **Γ.** Ανάλυση ιεραρχικής ομαδοποίησης των 1913  $\Delta$ MCpGs που βρέθηκαν στην σύγκριση A-XLL έναντι M-XLL. Κάθε γραμμή αντιπροσωπεύει μία θέση CpG και κάθε στήλη ένα δείγμα ασθενούς.

# Αποτελέσματα

## Μελέτη I

Διαχρονική μελέτη των αλλαγών μεθυλίωσης του DNA σε σχέση με την υποτροπή μετά από θεραπεία: ανάλυση σε επίπεδα (i) ομάδας και (ii) μεμονωμένου ασθενούς

Μελετήθηκαν 68 διαχρονικά δείγματα από 34 ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε χημειοανασοθεραπεία ως πρώτη γραμμή θεραπείας. Συγκεκριμένα, στους 31/34 ασθενείς χορηγήθηκε το σχήμα FCR και στις υπόλοιπες 3 περιπτώσεις:

FC, FCMR ή BR. Το μεσοδιάστημα μεταξύ των δύο καταστάσεων (πριν την χορήγηση θεραπείας και μετά την υποτροπή) παρουσίασε διάκυμαση από 0.75 έως 10.9 έτη με ενδιάμεση τιμή τα 2.5 έτη (**Πίνακας 4**).

**Πίνακας 4.** Πίνακας κλινικοβιολογικών χαρακτηριστικών κάθε ασθενούς, καθώς και αποτελέσματα της ανάλυσης μεθυλίωσης του DNA σε σχέση με το επιγενετικό φορτίο και με την υποτροπή.

ID	Χρόνος μέχρι τη θεραπεία	Χρόνος μέχρι την υποτροπή	Κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά	Pearson R (επιγενετικό φορτίο)	ΔM CpGs (Επιγενετικό φορτίο)	Υπομεθυλωμένα CpGs (Επιγενετικό φορτίο)	Υπερμεθυλωμένα CpGs (Επιγενετικό φορτίο)	Pearson R (υποτροπή)	ΔM CpGs (υποτροπή)	Υπερμεθυλωμένα CpGs (υποτροπή)	Υπομεθυλωμένα CpGs (υποτροπή)	Υποτροπή <2 χρόνια
P1	1,6	4,7	none	0,93	32380	22659	9721	0,99	117	49	68	ΌΧΙ
P2	1,1	2,6	del(13q)	0,92	33441	23644	9797	0,96	20440	6069	14371	ΌΧΙ
P3	0,1	2,3	none	0,93	34285	26618	7667	0,82	81383	15264	66119	ΌΧΙ
P4	4,3	5,5	tris12	0,93	35098	26208	8890	0,98	8052	3710	4342	ΌΧΙ
P5	1,4	1,4	del(13q)	0,92	36696	29532	7164	0,98	3430	699	2731	NAI
P6	4,1	6,4	del(13q)	0,92	37146	24015	13131	0,99	3441	1023	2418	ΌΧΙ
P7	2,2	3,6	del(11q), del(13q)	0,92	37465	31098	6367	0,89	58299	35901	22398	ΌΧΙ
P8	0,3	1,7	del(11q)	0,92	38023	29031	8992	0,99	1514	209	1305	NAI

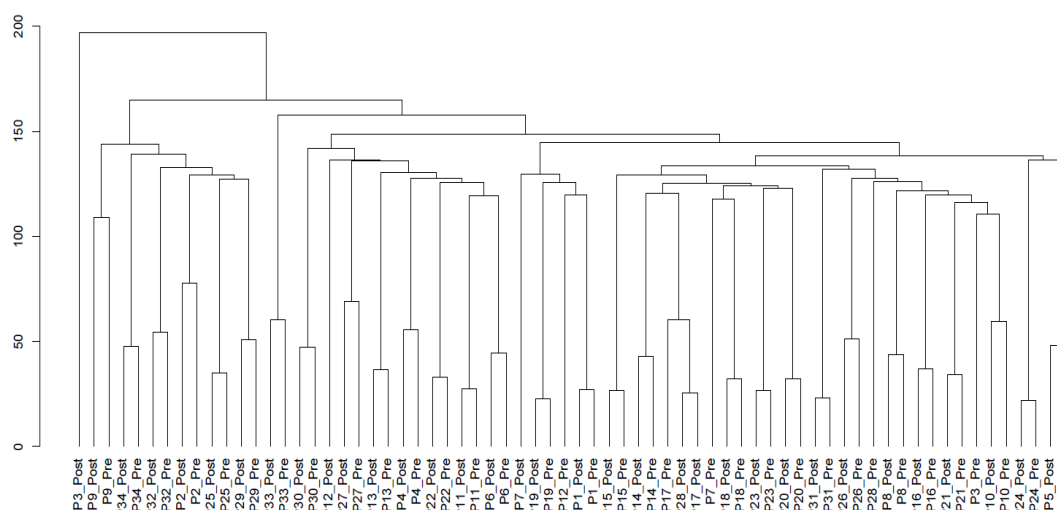
P9	4,1	3,8	none	0,91	38652	27349	11303	0,92	40706	11763	28943	ΌΧΙ
P10	1,2	2,2	del(11q)	0,91	39164	30272	8892	0,97	8199	4421	3778	ΌΧΙ
P11	2	3,9	del(13q)	0,92	39658	28034	11624	1,00	45	37	8	ΌΧΙ
P12	0,2	3,8	-	0,92	40403	29391	11012	0,87	60970	30420	30550	ΌΧΙ
P13	2,5	4,1	tris12	0,91	40669	19187	21482	0,99	511	186	325	ΌΧΙ
P14	1,5	4,8	del(11q), del(13q)	0,91	40755	26330	14425	0,99	1263	211	1052	ΌΧΙ
P15	3,4	0,9	del(11q), del(13q)	0,91	41333	30386	10947	0,99	261	96	165	ΝΑΙ
P16	2,7	1,4	del(11q)	0,91	41399	28693	12706	0,99	392	304	88	ΝΑΙ
P17	2,2	5,0	none	0,90	41875	28813	13062	0,98	3150	1780	1370	ΌΧΙ
P18	0,9	1,3	del(17p)	0,91	42313	32742	9571	0,99	949	194	755	ΝΑΙ
P19	6,1	1,8	del(13q)	0,92	42384	33866	8518	1,00	45	23	22	ΝΑΙ
P20	0	1,1	del(6q)	0,91	42543	28151	14392	0,99	457	120	337	ΝΑΙ
P21	0	1,2	none	0,91	42615	32361	10254	0,99	907	345	562	ΝΑΙ
P22	0	0,8	del(11q)	0,91	42721	26855	15866	0,99	287	41	246	ΝΑΙ
P23	1,5	0,9	del(11q), del(13q)	0,90	44283	32231	12052	0,99	90	46	44	ΝΑΙ
P24	4,7	1,2	del(11q), del(13q)	0,91	45253	35766	9487	1,00	45	25	20	ΝΑΙ
P25	2	8,0	del(13q)	0,91	45372	38182	7190	0,99	905	41	864	ΌΧΙ
P26	0,1	2,2	del(11q)	0,89	45383	30571	14812	0,98	4689	2301	2388	ΌΧΙ
P27	0,1	10,9	tris12	0,89	45999	28889	17110	0,96	10449	4273	6176	ΌΧΙ
P28	0,1	1,4	del(17p)	0,90	46314	34601	11713	0,89	51925	32873	19052	ΝΑΙ
P29	0	7,9	none	0,90	50072	40088	9984	0,98	8546	2396	6150	ΌΧΙ
P30	2	3,0	del(11q)	0,89	50443	32277	18166	0,98	2740	1109	1631	ΌΧΙ
P31	0,1	1,5	del(13q)	0,89	52336	41814	10522	1,00	57	27	30	ΝΑΙ
P32	0,2	5,1	del(11q)	0,89	53793	39757	14036	0,98	4504	1972	2532	ΌΧΙ
P33	0	2,1	del(6q)	0,86	59041	42892	16149	0,97	6584	5313	1271	ΌΧΙ
P34	1	3,0	del(13q)	0,89	60526	51180	9346	0,98	2985	2508	477	ΌΧΙ

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μη επιβλεπόμενη ιεραρχική ομαδοποίηση στο σύνολο των 68 δειγμάτων, βασισμένη στις τιμές-β των 451756 θέσεων CpG για κάθε δείγμα, η οποία όμως δεν οδήγησε σε διαχωρισμό των δειγμάτων προ θεραπείας από τα δείγματα μετά την υποτροπή (**Εικόνα 10**). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε διαφορική ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA μεταξύ των δειγμάτων προ θεραπείας και των



δειγμάτων μετά την υποτροπή χωρίς όμως να εντοπιστούν ΔMCrGs μεταξύ των δύο καταστάσεων.

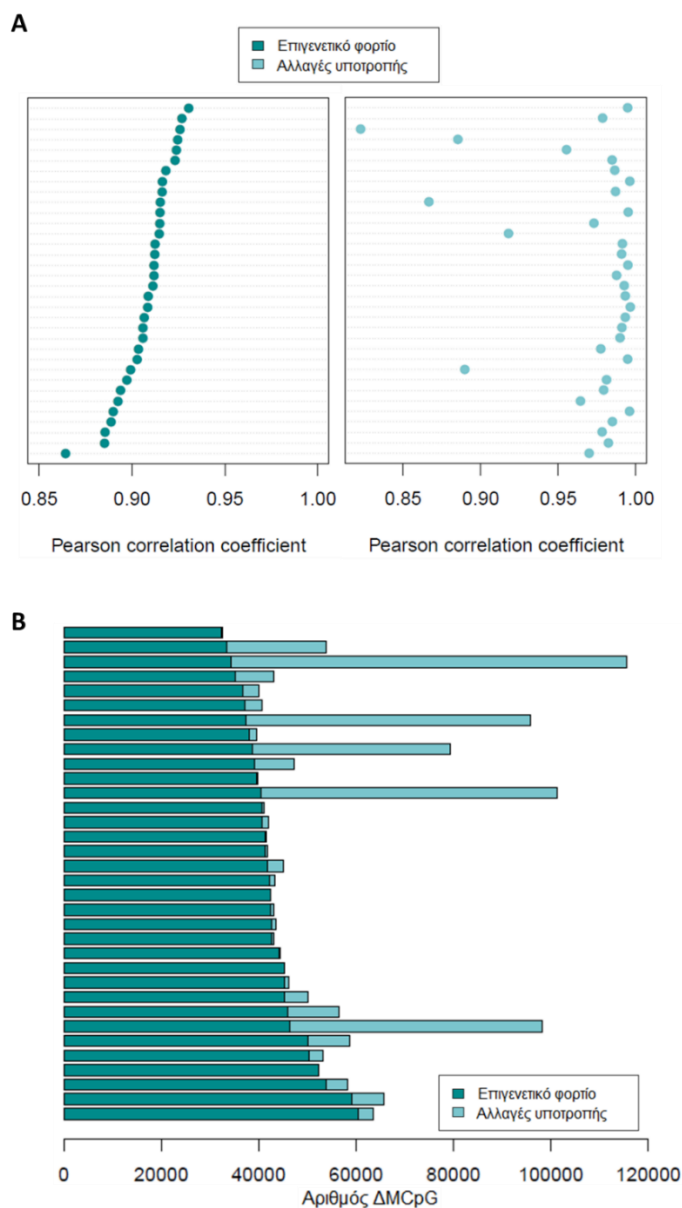
Συνοψίζοντας, σε επίπεδο ομάδας, δε βρέθηκαν επαναλαμβανόμενες (recurrent) αλλαγές στα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA που να διαχωρίζουν τα δείγματα με βάση το στιγμιότυπο συλλογής τους (δείγματα προ θεραπείας έναντι δειγμάτων μετά την υποτροπή).



**Εικόνα 10.** Ιεραρχική ομαδοποίηση των 68 δειγμάτων με βάση τις τιμές μεθυλίωσης του DNA των 451756 θέσεων CrG που αναλύθηκαν. Το δείγμα πριν την θεραπεία σημειώνεται με pre (pre-treatment) ενώ το δείγμα μετά την υποτροπή με post (post-treatment). Οι 30 περιπτώσεις έδειξαν ισχυρή ενδοατομική ομοιότητα.

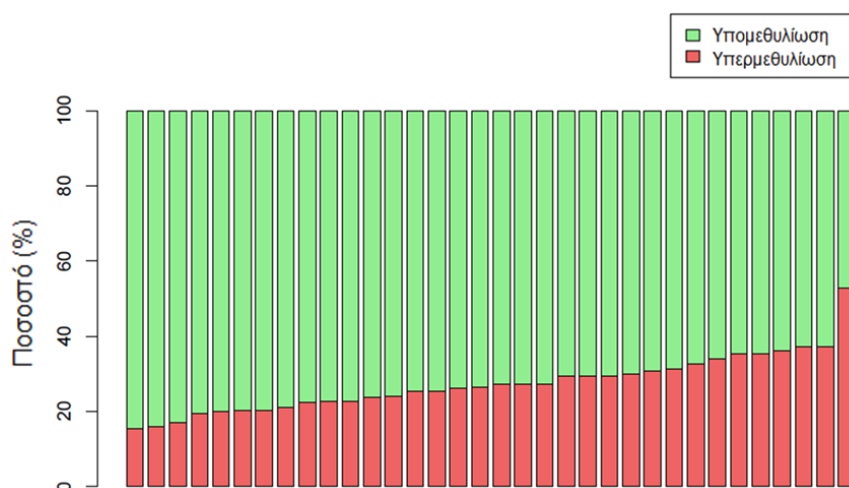
Για το λόγο αυτό και με δεδομένη την πολύ μεγάλη ετερογένεια της ΧΛΛ, πραγματοποιήθηκε διαχρονική ανάλυση των προτύπων της μεθυλίωσης του DNA σε επίπεδο μεμονωμένου ασθενούς, συγκρίνοντας τα διαχρονικά δείγματα για κάθε ασθενή ξεχωριστά. Επίσης, εκτός από τις αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA μετά την υποτροπή, διερευνήθηκαν οι διαφορές του δείγματος πριν την θεραπεία σε σύγκριση με δυο διαθέσιμα δείγματα Β κυττάρων μνήμης από υγιείς δότες. Τα δύο δείγματα Β κυττάρων μνήμης έδειξαν μεγάλο βαθμό συσχέτισης (Pearson  $R=0.99$ ), γι' αυτό ενώθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ως ένα δείγμα αναφοράς.

Πρώτα, συγκρίθηκαν τα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA των δειγμάτων προ θεραπείας για κάθε περίπτωση ΧΛΛ με τα Β κύτταρα μνήμης και παρατηρήθηκε μεγάλη διακύμανση στις τιμές Pearson R, οι οποίες κυμαίνονται από 0.864 έως 0.930. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε ο αριθμός των ΔMCpGs ( $|db| \geq 0.3$ ), ο οποίος χαρακτηρίστηκε ως επιγενετικό φορτίο, βρέθηκε να κυμαίνεται από 32380 έως 60526 (Εικόνα 11A-B) (Πίνακας 4). Όλες οι περιπτώσεις έδειξαν μαζική υπομεθυλίωση σε σύγκριση με τα Β κύτταρα μνήμης, σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές (95, 99) (Εικόνα 12).



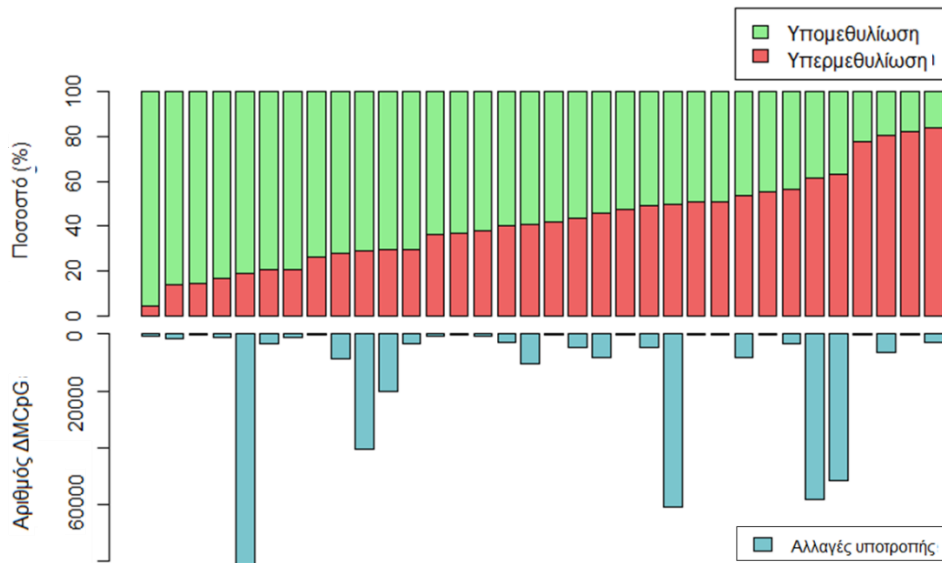
**Εικόνα 11.** Ατομική ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA αποκάλυψε μεγάλη διακύμανση του επιγενετικού φορτίου και των αλλαγών κατά την υποτροπή

μεταξύ των ΧΛΛ περιπτώσεων. **A.** Διάγραμμα με τον αριθμό συσχέτισης Pearson ( $\chi$  άξονας) που αντιπροσωπεύει τη συσχέτιση των τιμών-β μεταξύ των Β κυττάρων μνήμης με το δείγμα πριν την θεραπεία (σκούρο μπλε) και μεταξύ του δείγματος πριν την θεραπεία με το δείγμα μετά την υποτροπή (γαλάζιο). Κάθε κουκκίδα αντιπροσωπεύει μια από τις 34 περιπτώσεις της ομάδας μελέτης. **B.** Ραβδόγραμμα με τον αριθμό των ΔMCpG σε κάθε περίπτωση. Με σκούρο μπλε επισημαίνονται οι αλλαγές ως προς το επιγενετικό φορτίο και με γαλάζιο οι αλλαγές ως προς την υποτροπή. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει μια από τις 34 περιπτώσεις της ομάδας μελέτης.



**Εικόνα 12.** Διάγραμμα με το ποσοστό των υπερμεθυλιωμένων (κόκκινο χρώμα) και υπομεθυλιωμένων (πράσινο χρώμα) θέσεων CpG μετά από την σύγκριση των Β κυττάρων μνήμης με το δείγμα πριν την χορήγηση θεραπεία. Κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει έναν ασθενή.

Στη συνέχεια, αξιολογήθηκαν οι αλλαγές ως προς την υποτροπή συγκρίνοντας το δείγμα προ θεραπείας με το δείγμα μετά την υποτροπή. Η ανάλυση αποκάλυψε σημαντική μεταβλητότητα μεταξύ των ασθενών που κυμαίνεται από 45 έως 81.383 ΔMCpGs ( $| db | \geq 0.3$ ) (Pearson R: 0.822-0.996) (**Εικόνα 11A-B**) (**Πίνακας 4**). Στα 26/34 (68%) δείγματα παρατηρήθηκε μεγαλύτερος αριθμός υπομεθυλιωμένων CpGs μετά την υποτροπή (**Εικόνα 13**).



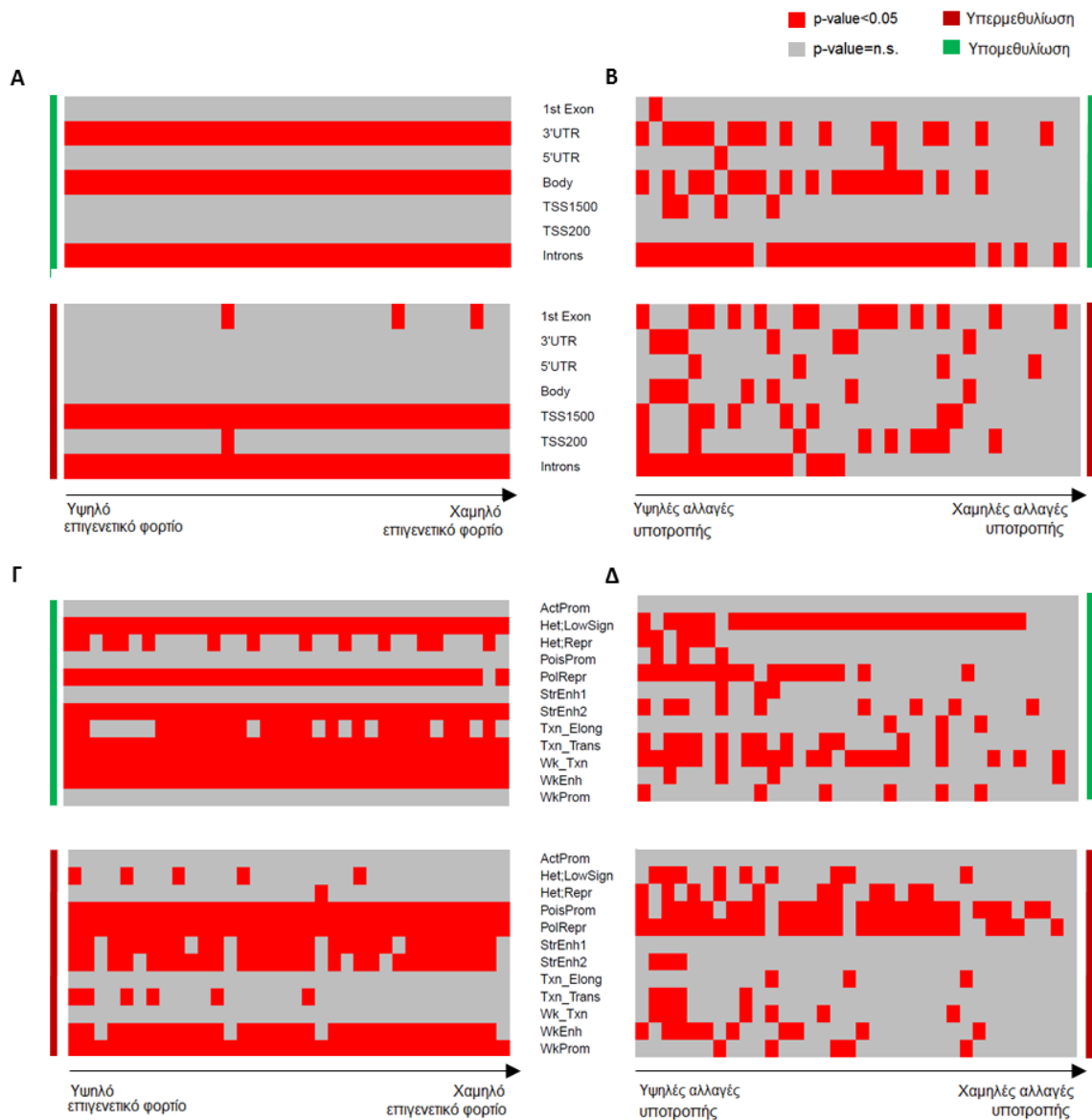
**Εικόνα 13.** Διάγραμμα με το ποσοστό των υπερμεθυλιωμένων (κόκκινο χρώμα) και υπομεθυλιωμένων (πράσινο χρώμα) CpGs που αναδείχθηκαν από τη σύγκριση του δείγματος πριν την χορήγηση θεραπείας με το δείγμα μετά την υποτροπή. Το κάτω διάγραμμα δείχνει τον συνολικό αριθμό αλλαγών ως προς την υποτροπή. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει έναν ασθενή.

Ανάλυση εμπλουτισμού σε γονιδιακές περιοχές, στην κατάσταση της χρωματίνης, σε θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων και μοριακά μονοπάτια

Με δεδομένο ότι δεν βρέθηκαν κοινές αλλαγές μεταξύ των ασθενών, διερευνήθηκε η πιθανότητα οι συγκεκριμένες αλλαγές να επηρεάζουν ή να επηρεάζονται από κοινούς μοριακούς μηχανισμούς. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε εμπλουτισμός των ΔΜCpGs, οι οποίες βρέθηκαν για κάθε ασθενή σχετικές με το επιγενετικό φορτίο αλλά και με την υποτροπή, με βάση: i) την γονιδιακή τοποθεσία τους, ii) την κατάσταση της χρωματίνης από δεδομένα Β κυττάρων μνήμης, iii) τις θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων και iv) τα μοριακά μονοπάτια της βάσης KEGG.

Όσον αφορά στο επιγενετικό φορτίο σε σύγκριση με τις γονιδιακές θέσεις και την κατάσταση της χρωματίνης, σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικός εμπλουτισμός ( $p < 0.001$ ) των υπομεθυλιωμένων CpGs σε ιντρονικές περιοχές, σώματα των γονιδίων και σε 3'UTR που βρίσκονται κυρίως σε

ετεροχρωματίνη και ενισχυτές (**Εικόνα 14A,Γ**). Επίσης, οι υπερμεθυλιωμένες CpGs έδειξαν στατιστικά σημαντικό εμπλουτισμό σε ιντρονικές περιοχές και περιοχές έναρξης της μεταγραφής (TSS1500) που βρίσκονται σε περιοχές πρόσδεσης του συμπλόκου polycomb, υποκινητές και ενεργούς ενισχυτές. Οι ΔMCpGs της υποτροπής έδειξαν ομοιότητες αλλά και διαφορές σε σύγκριση με το επιγενετικό φορτίο. Πιο συγκεκριμένα, οι υπομεθυλιωμένες θέσεις έδειξαν εμπλουτισμό σε ιντρονικές περιοχές, σώματα των γονιδίων και 3'UTR, όπως παρατηρήθηκε και στο επιγενετικό φορτίο, αλλά εδράζονταν κυρίως σε ετεροχρωματίνη με εξαίρεση κάποιων περιπτώσεων που βρέθηκαν και σε ενισχυτές. Οι υπερμεθυλιωμένες CpGs της υποτροπής δεν έδειξαν συγκεκριμένο μοτίβο εμπλουτισμού μεταξύ των περιπτώσεων, παρατηρήθηκε όμως μια τάση συγκέντρωσης στο πρώτο εξώνιο, στα ιντρόνια και περιοχές έναρξης της μεταγραφής (TSS1500) τα οποία βρέθηκαν σε σταθερούς υποκινητές, κατεσταλμένες περιοχές polycomb, ενώ δεν βρέθηκαν πολλές περιοχές ενισχυτών (**Εικόνα 14B,Δ**).

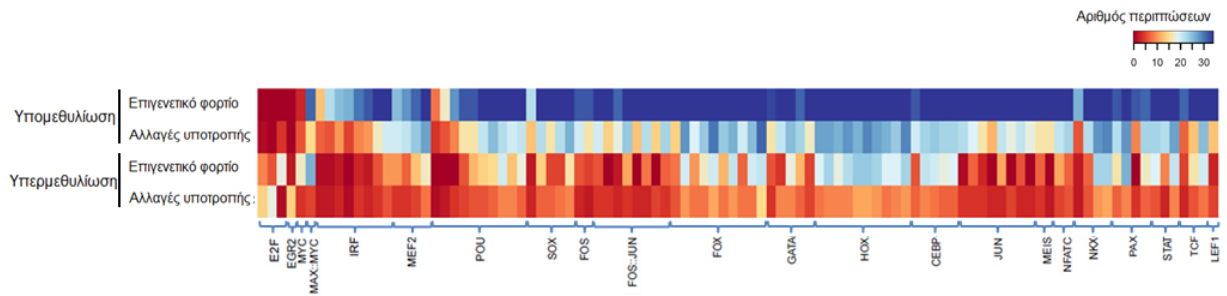


**Εικόνα 14. Ανάλυση εμπλουτισμού του επιγενετικού φορτίου και των αλλαγών της υποτροπής με βάση τη γονιδιακή τοποθεσία τους, την κατάσταση της χρωματίνης και τις θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων.** Ανάλυση εμπλουτισμού γονιδιακής τοποθεσίας του (A) επιγενετικού φορτίου [υπομεθυλιωμένες CpGs (πράσινο), υπερμεθυλιωμένες CpGs (κόκκινο)] και (B) των αλλαγών της υποτροπής [υπομεθυλιωμένες CpGs (πράσινο), υπερμεθυλιωμένες CpGs (κόκκινο)] για κάθε περίπτωση (x άξονας). Ανάλυση εμπλουτισμού κατάστασης της χρωματίνης (Γ) του επιγενετικού φορτίου [υπομεθυλιωμένες CpGs (πράσινο), υπερμεθυλιωμένες CpGs (κόκκινο)] και (Δ) των αλλαγών της υποτροπής [υπομεθυλιωμένες CpGs (πράσινο), υπερμεθυλιωμένες CpGs (κόκκινο)] για κάθε περίπτωση (x άξονας). Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει έναν ασθενή και είναι ταξινομημένες από τον μεγαλύτερο στον

μικρότερο αριθμό ΔMCpG. Κάθε γραμμή αντιπροσωπεύει ένα γενετικό στοιχείο. Με κόκκινο χρώμα στο χάρτη θερμότητας σημειώνονται οι περιπτώσεις που έδειξαν στατιστικά σημαντικό εμπλουτισμό ( $p < 0.05$ ) για το εκάστοτε γενετικό στοιχείο. [ActProm: ενεργός ενισχυτής (Active promoter), Hete;LowSign: Ετεροχρωματίνη, Χαμηλή ένταση σματος (Heterochromatin Low signal), Het;Repr: Ετεροχρωματίνη-κατεσταλμένες περιοχές (Heterochromatin-repressed), PolRepr: Κατεσταλμένες περιοχές polycomb (polycomb repression), PoisProm: Σταθερός υποκινητής (Poised Promoter), StrEnh1: Ισχυρός ενισχυτής 1 (Strong Enhancer 1), StrEnh2: Ισχυρός ενισχυτής 2 (Strong Enhancer 2), Txn\_Elong: Μεταγραφική επιμήκυνση (Transcription Elongation), Txn\_Trans: Μεταγραφική μετάβαση (Transcription Transition), Wk\_Txn: Αδύναμη μεταγραφή (Weak Transcription), WkEnh: Αδύναμος ενισχυτής (Weak Enhancer), WkProm: Αδύναμος υποκινητής (Weak Promoter)]

Η ανάλυση σε θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων αποκάλυψε στατιστικά σημαντικό εμπλουτισμό ( $FDR < 0.05$ ) των υπομεθυλιωμένων θέσεων του επιγενετικού φορτίου και της υποτροπής σε μεγάλο κατάλογο μεταγραφικών παραγόντων (**Εικόνα 15**). Συγκεκριμένα, σε όλες τις περιπτώσεις οι υπομεθυλιωμένες θέσεις του επιγενετικού φορτίου έδειξαν εμπλουτισμό για αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες σχετικούς με τη βιολογία των Β κυττάρων ή/και της ΧΛΛ, συμπεριλαμβανομένων μελών των οικογενειών AP-1, GATA, IRF, POU, NFAT, STAT, TCF, καθώς και των περισσότερων μελών των οικογενειών HOX και FOX. Αυτό το πρότυπο παρατηρήθηκε και στις υπομεθυλιωμένες θέσεις της υποτροπής, παρότι σε μικρότερο αριθμό περιπτώσεων (**Εικόνα 15**).

Οι υπερμεθυλιωμένες θέσεις έδειξαν εμπλουτισμό σε λιγότερες περιπτώσεις σε σχέση με τις υπομεθυλιωμένες θέσεις. Οι υπό- και υπέρ- μεθυλιωμένες θέσεις εμπλουτίστηκαν στις οικογένειες πρωτεϊνών HOX και FOX σε αντίθεση με τις οικογένειες FOS, JUN, IRF και CEBP, οι οποίες βρέθηκαν να σχετίζονται μόνο με τις υπομεθυλιωμένες θέσεις (Σχήμα 2E). Είναι ενδιαφέρον ότι οι υπερμεθυλιωμένες θέσεις της υποτροπής εμπλουτίστηκαν σε θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων EGR2 και E2P4 σε μεγάλο αριθμό περιπτώσεων ( $n=14$  και  $n=18$ , αντιστοίχως), ωστόσο οι περισσότερες περιπτώσεις δεν εμφάνισαν παρόμοιο εμπλουτισμό συγκριτικά με το επιγενετικό φορτίο.



**Εικόνα 15.** Ανάλυση πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων σε υπό- και υπέρ-μεθυλιωμένες θέσεις του επιγενετικού φορτίου και των αλλαγών της υποτροπής αποκάλυψε σημαντικό εμπλουτισμό για πολλές οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων (άξονας x). Η πυκνότητα στο χάρτη θερμότητας απεικονίζει τον αριθμό των ασθενών που έδειξαν στατιστικά σημαντικό εμπλουτισμό για κάθε μεταγραφικό παράγοντα (FDR<0.05).

Τέλος, η ανάλυση εμπλουτισμού στη βάση δεδομένων KEGG με βάση τα γονίδια που σχετίζονται με τα DMCpGs ( $p < 0.01$ ) κάθε ασθενούς έδειξε ότι σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις οι υπό- και υπέρ-μεθυλιωμένες θέσεις του επιγενετικού φορτίου EB εμπλουτίστηκαν σε μονοπάτια σημαντικά για τη βιολογία της ΧΛΛ, όπως ErbB, φωσφολιπάσης D, Ras, HIF, MAPK, Wnt, σηματοδότησης μέσω T και B κυττάρων καθώς και Notch (**Πίνακας 5**). Αντίθετα, παρόμοια ανάλυση για τις αλλαγές της υποτροπής κάθε ασθενούς έδειξε εμπλουτισμό μόνο σε ορισμένες περιπτώσεις, ειδικά σε εκείνες με υψηλό αριθμό αλλαγών, σε μονοπάτια όπως οδοί του καρκίνου, μονοπάτι σηματοδότησης ασβεστίου, μονοπάτι σηματοδότησης Rap1 (**Πίνακας 6**).



**Πίνακας 5.** Μοριακά μονοπάτια της βάσης KEGG που εμφανίζονται κοινά μεταξύ των περιπτώσεων ΧΛΛ σύμφωνα με τα υπό- και υπέρ- μεθυλιωμένα γονίδια του επιγενετικού φορτίου. Η στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των δύο κατηγοριών υπολογίστηκε με υπεργεωμετρική κατανομή.

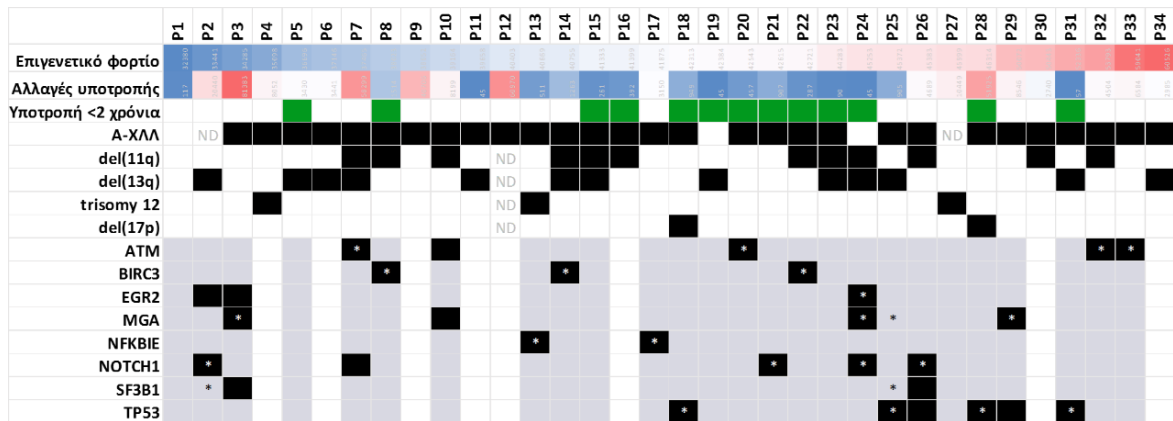
<b>Μονοπάτι KEGG</b>	<b>Νο. περιπτώσεων ΧΛΛ που εμπλουτίστηκαν σε κάθε μονοπάτι για τα υπερμεθυλιωμένα γονίδια/ Συνολικός αριθμός περιπτώσεων που εμπλουτίστηκαν (n=34)</b>	<b>Νο. περιπτώσεων ΧΛΛ που εμπλουτίστηκαν σε κάθε μονοπάτι για τα υπομεθυλιωμένα γονίδια/ Συνολικός αριθμός περιπτώσεων που εμπλουτίστηκαν (n=34)</b>	<b>p-value</b>
Σηματοδότηση μέσω ασβεστίου	33/34	34/34	1
Οδοί του καρκίνου	33/34	34/34	1
Σηματοδότηση μέσω φωσφολυπάσης D	7/34	34/34	1,16E-10
Σηματοδότηση μέσω cAMP	25/34	33/34	0,016537
Σηματοδότηση μέσω PI3K-Akt	22/34	32/34	0,006951
Σηματοδότηση μέσω Ras	16/34	32/34	6,55E-05
Ρύθμιση του κυτταροσκελετού	15/34	32/34	2,67E-05
Σηματοδότηση μέσω MAPK	12/34	32/34	1,43E-06
Σηματοδότηση μέσω ErbB	1/34	31/34	1,84E-12
Σηματοδότηση μέσω HIF-1	0/34	23/34	1,71E-08
Σηματοδότηση μέσω T κυττάρων	0/34	19/34	1,15E-06
Σηματοδότηση μέσω B κυττάρων	0/34	11/34	0,00099
Σηματοδότηση μέσω NOTCH	0/34	11/34	0,00099
Σηματοδότηση μέσω TGF-β	0/34	11/34	0,00099

**Πίνακας 6.** Μοριακά μονοπάτια της βάσης KEGG που εμφανίζονται κοινά μεταξύ των περιπτώσεων ΧΛΛ σύμφωνα με τα υπό- και υπέρ- μεθυλιωμένα γονίδια των αλλαγών της υποτροπής. Η στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των δύο κατηγοριών υπολογίστηκε με υπεργεωμετρική κατανομή.

Μονοπάτι KEGG	Νο. περιπτώσεων ΧΛΛ που εμπλουτίστηκαν σε κάθε μονοπάτι για τα υπερμεθυλιωμένα γονίδια/ Συνολικός αριθμός περιπτώσεων που εμπλουτίστηκαν (n=17)	Νο. περιπτώσεων ΧΛΛ που εμπλουτίστηκαν σε κάθε μονοπάτι για τα υπομεθυλιωμένα γονίδια/ Συνολικός αριθμός περιπτώσεων που εμπλουτίστηκαν (n=18)	p-value
Οδοί του καρκίνου	11/17	4/18	0,028
Σηματοδότηση μέσω ασβεστίου	8/17	7/18	0,883
Σηματοδότηση μέσω cAMP	8/17	7/18	0,883
Σηματοδότηση μέσω Rap1	8/17	7/18	0,883
Αλληλεπιδράσης του υποδοχέα ECM	6/17	7/18	1
Σηματοδότηση μέσω PI3K-Akt	5/17	3/18	0,620
Σηματοδότηση μέσω Ras	4/17	5/18	1

### Ανάλυση γενετικής εξέλιξης

Με σκοπό τη διερεύνηση της γενετικής εξέλιξης μετά την υποτροπή σε σύγκριση με το δείγμα προ θεραπείας πραγματοποιήθηκε ανάλυση για τον αριθμό των αντιγράφων (Copy Number Alterations, CNAs) ανά ασθενή μέσω των μικροσυστοιχιών μεθυλίωσης του DNA. Τα δεδομένα που προέκυψαν από αυτή την ανάλυση συνδυάστηκαν και με δεδομένα κυτταρογενετικών βλαβών [καρυότυπος ή/και FISH]. Επιπλέον, σε πρόσφατη Μελέτη της ομάδας μας (110) αναφέρθηκαν δεδομένα από αλληλούχιση εξωνίων για 26/34 ασθενείς της παρούσας ομάδας μελέτης, στους οποίους αναζητήσαμε την παρουσία μεταλλάξεων στα γονίδια *ATM*, *BIRC3*, *EGR2*, *MGA*, *NFKBIE*, *NOTCH1*, *SF3B1* και *TP53*. Στην **Εικόνα 16** παρουσιάζονται οι πληροφορίες τόσο της γενετικής εξέλιξης όσο και της επιγενετικής.

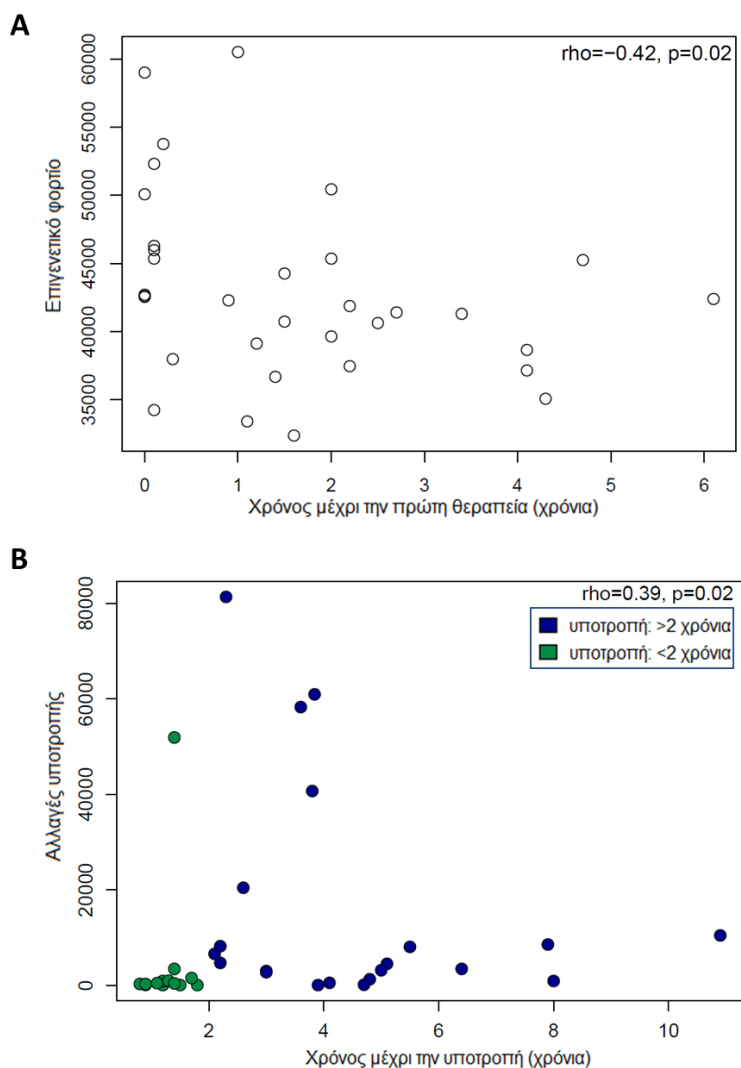


**Εικόνα 16.** Κυτταρογενετικά ευρήματα και γονιδιακές μεταλλάξεις για όλες τις περιπτώσεις της ομάδας μελέτης. Κάθε στήλη (n=34) αναπαριστά έναν ασθενή και κάθε γραμμή ένα κλινικοβιολογικό χαρακτηριστικό. Η διαβάθμιση χρώματος αναπαριστά τον αριθμό των ΔMCrGs, διατεταγμένα από τον χαμηλότερο (μπλε) προς τον υψηλότερο (κόκκινο) αριθμό. Σχετικά με τα κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά, τα μαύρα κουτιά δηλώνουν την παρουσία, ενώ τα άσπρα την απουσία. Σχετικά με τις γονιδιακές μεταλλάξεις, τα γκρι κουτιά δηλώνουν τη διαθεσιμότητα δεδομένων από WES χωρίς παρουσία μετάλλαξης στο συγκεκριμένο γονίδιο, ενώ τα άσπρα την απουσία δεδομένων από WES. Τα μαύρα κουτιά δηλώνουν την παρουσία μετάλλαξης στην υποτροπή και τα κουτιά με αστερίσκο (\*) την παρουσία της μετάλλαξης πριν την χορήγηση θεραπείας. ND: μη διαθέσιμα δεδομένα.

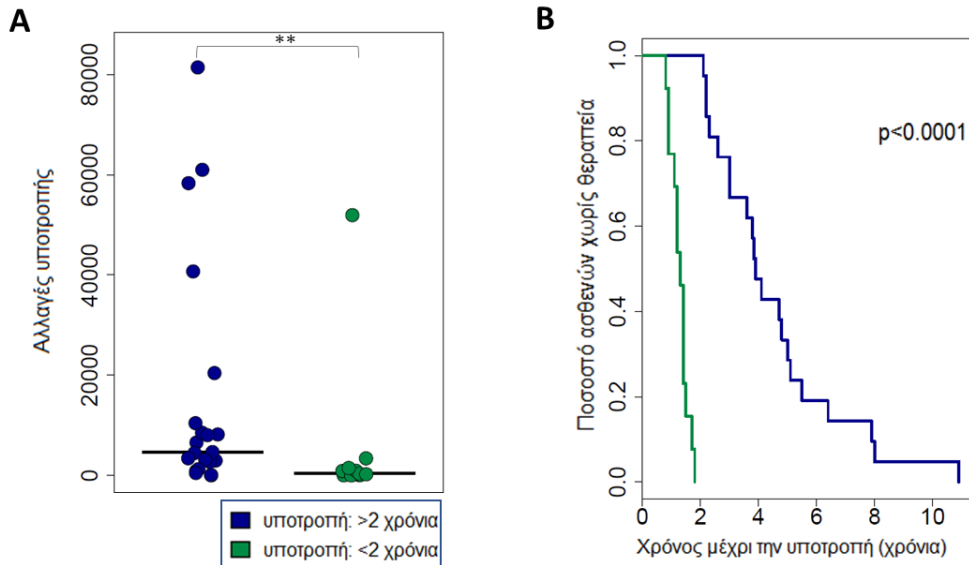
### Συσχέτιση των αλλαγών της μεθυλίωσης του DNA με κλινικοβιολογικά χαρακτηριστικά

Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης σε επίπεδο ασθενούς, όπου βρέθηκε διαφορετικός αριθμός CpG να επηρεάζονται τόσο στη σύγκριση με τα Β κύτταρα μνήμης όσο και μετά την υποτροπή, διερευνήσαμε πιθανές συσχετίσεις με μοριακά και κλινικά χαρακτηριστικά. Αρχικά, παρατηρήθηκε ότι το επιγενετικό φορτίο έχει αρνητική συσχέτιση με τον χρόνο μέχρι τη θεραπεία ( $\rho = -0.42$ ,  $p = 0.02$ ) (**Εικόνα 17A**) ενώ οι αλλαγές ως προς την υποτροπή είχαν θετική συσχέτιση με το χρόνο μέχρι την υποτροπή ( $\rho = 0.39$ ,  $p = 0.02$ ) (**Εικόνα 17B**). Επισημαίνεται σημειωθεί ότι 13/34 περιπτώσεις υποτροπίασαν μέσα σε 2 έτη από τη χορήγηση θεραπείας. Ειδικότερα, βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις αλλαγές ως προς την υποτροπή στις

περιπτώσεις με χρόνο υποτροπής <2 χρόνια σε σύγκριση με τις υπόλοιπες περιπτώσεις (διάμεση τιμή των DMCPGs: 39 vs 4,689,  $p=0.002$ ) (**Εικόνα 18A**) και στον χρόνο μέχρι την υποτροπή, όπως αναμενόταν (διάμεση τιμή του χρόνου μέχρι την υποτροπή: 1.3 vs 3.9 χρόνια,  $p=4.32e-11$ ) (**Εικόνα 18B**).



**Εικόνα 17. A.** Διάγραμμα που απεικονίζει το επιγενετικό φορτίο (άξονας ψ) σε σύγκριση με τον χρόνο μέχρι την θεραπεία (άξονας χ) σε κάθε ασθενή. **B.** Διάγραμμα που αναπαριστά τις αλλαγές ως προς την υποτροπή σε συνάρτηση με τον χρόνο μέχρι την υποτροπή. Οι περιπτώσεις με χρόνο υποτροπής <2 χρόνια σημειώνονται με πράσινο χρώμα και με χρόνο υποτροπής >2 χρόνια με μπλε.

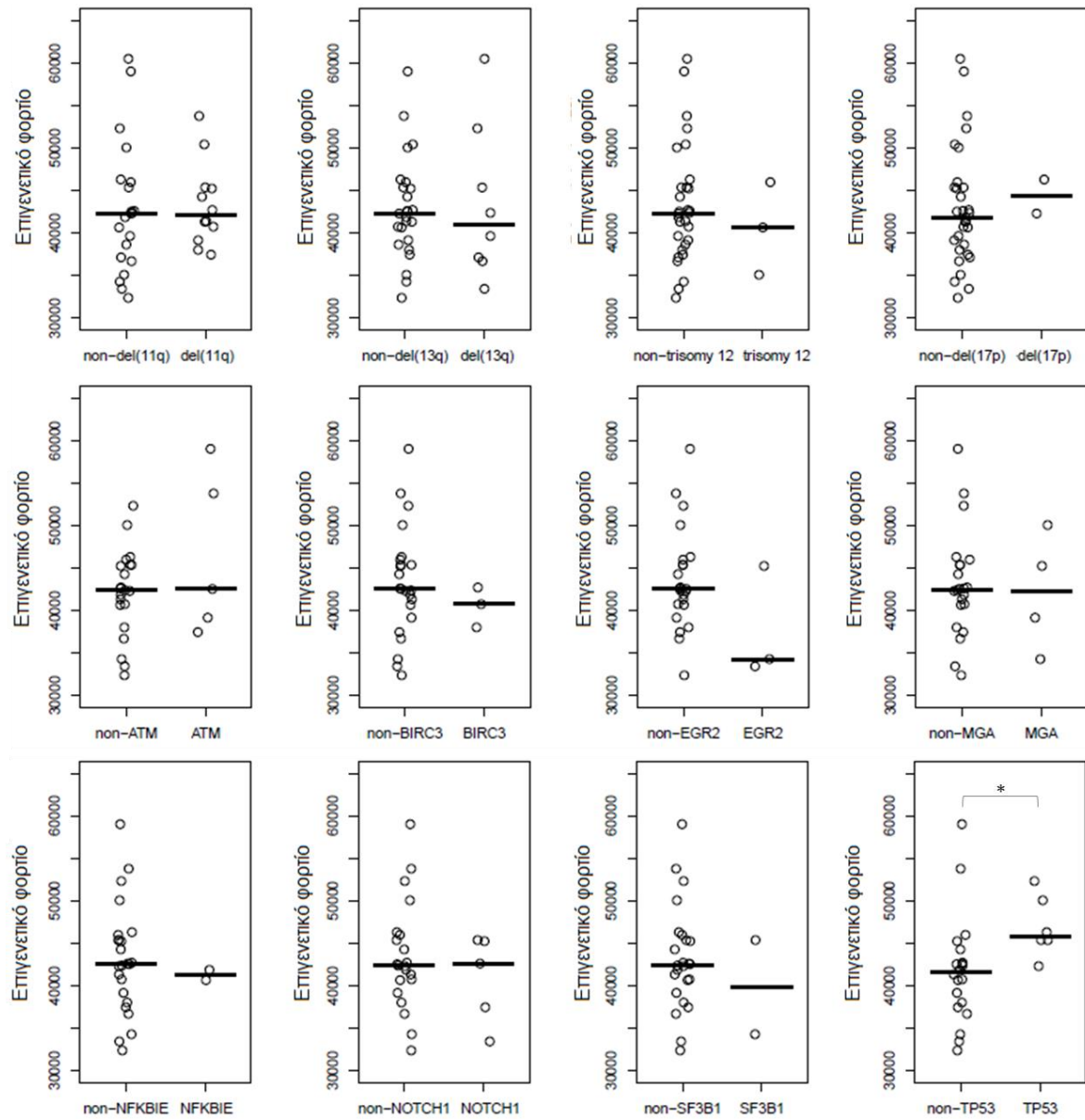


**Εικόνα 18. Α.** Διάγραμμα που απεικονίζει τις αλλαγές της υποτροπής στις δύο υποομάδες. **Β.** Καμπύλης επιβίωσης (Kaplan-Meier curves) των δύο ομάδων ως προς το χρόνο μέχρι την θεραπεία. Με πράσινο σημειώνονται οι περιπτώσεις που παρουσίασαν υποτροπή σε < 2 χρόνια ενώ με μπλε αυτές με > 2 χρόνια. \*\* $p < 0.01$

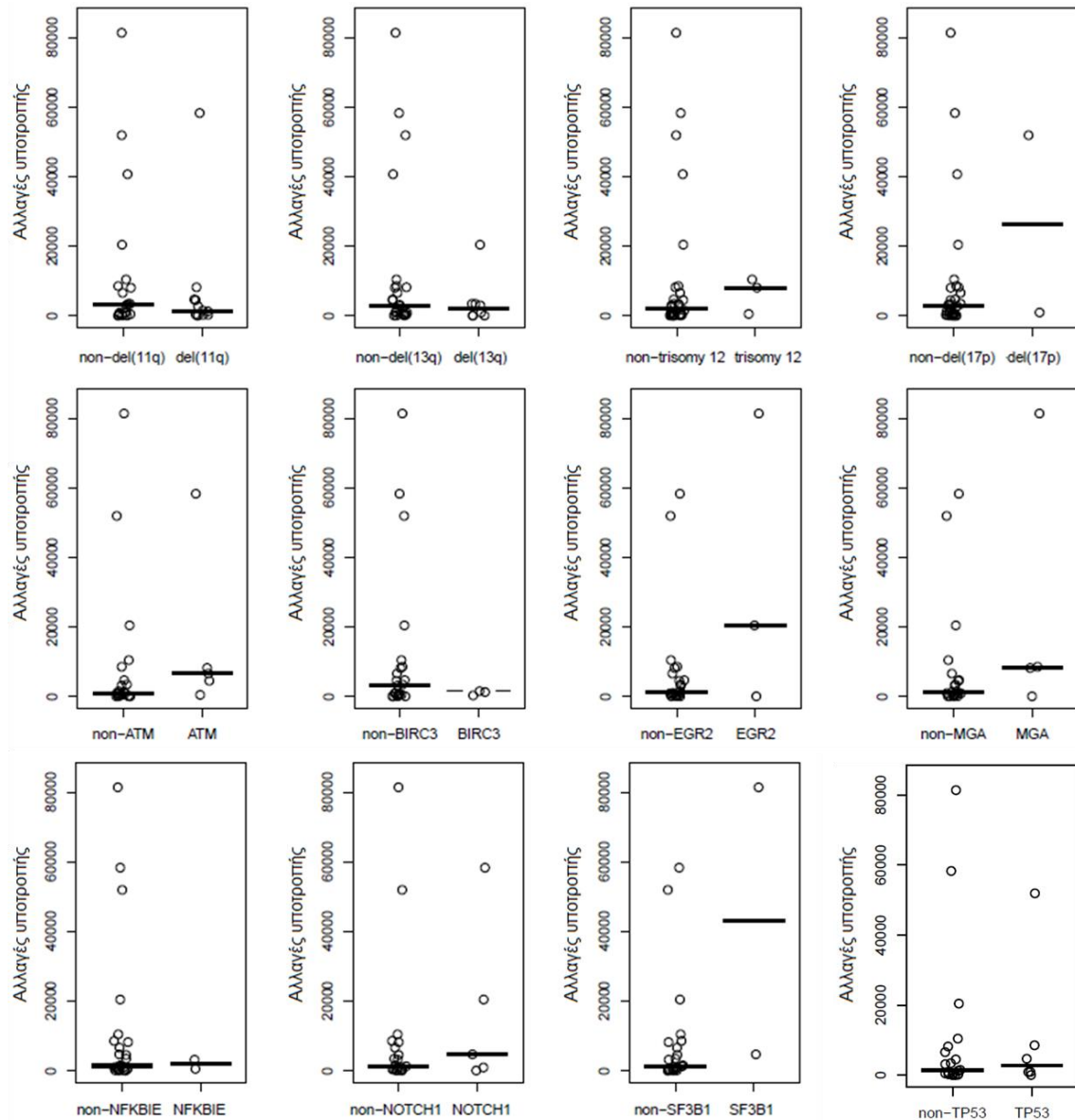
Στη συνέχεια, διερευνήσαμε τυχόν συσχετίσεις με κυτταρογενετικά δεδομένα (FISH και/ή καρυότυπος: del(11q), del(13q), del(17q), tris12] ή μεταλλάξεις των γονιδίων *ATM*, *BIRC3*, *EGR2*, *MGA*, *NFKBIE*, *NOTCH1*, *SF3B1* και *TP53* από δεδομένα αλληλούχισης εξωνίων πρόσφατης δημοσιευμένης έρευνας, με κοινή ομάδα μελέτης (26/34 δείγματα) (**Εικόνα 19**, **Εικόνα 20**)

Οι περιπτώσεις που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53* έδειξαν σημαντικά υψηλότερο επιγενετικό φορτίο συγκριτικά με τις υπόλοιπες (διάμεση τιμή επιγενετικού φορτίου: 45848.5 vs 42384, αντίστοιχα,  $p = 0.0176$ ) (**Εικόνα 19**).

Δεν αναζητήθηκαν συσχετίσεις με τα ανοσογενετικά χαρακτηριστικά καθώς 29/34 περιπτώσεις (85.2%) ήταν Α-ΧΛΛ.



**Εικόνα 19.** Διάγραμμα με τη διάμεση τιμή (μπάρα) να απεικονίζει το επιγενετικό φορτίο των περιπτώσεων ΧΛΛ σε σχέση με τα γενετικά χαρακτηριστικά. Κάθε κύκλος αναπαριστά έναν ασθενή.



**Εικόνα 20.** Διάγραμμα με τη διάμεση τιμή (μπάρα) να απεικονίζει τις αλλαγές της υποτροπής των περιπτώσεων ΧΛΛ σε σχέση με τα γενετικά χαρακτηριστικά. Κάθε κύκλος αναπαριστά έναν ασθενή.

### Επιγενετική υπογραφή 10 CpGs με προβλεπτική αξία για την απάντηση στη θεραπεία

Με σκοπό την ανεύρεση θέσεων CpG που θα μπορούσε να λειτουργήσουν ως βιοδείκτες ικανοί να προβλέψουν την πρόωρη υποτροπή (υποτροπή σε <2 χρόνια), χρησιμοποιήθηκαν 38 περιπτώσεις πριν την χορήγηση θεραπείας με γνωστό χρόνο μέχρι την υποτροπή. Όπως προαναφέρθηκε, 13 από τις 38 περιπτώσεις εμφάνισαν υποτροπή σε <2 χρόνια, ενώ οι υπόλοιπες 25 περιπτώσεις ανήκαν στην ομάδα με

υποτροπή σε >2 χρόνια. Ο αλγόριθμος Random Forest (RF) τροφοδοτήθηκε με τις 6593 πιο μεταβλητές θέσεις CpG μεταξύ των δειγμάτων ( $sd \leq 0.3$ ) προκειμένου να αξιολογηθεί η ικανότητα ταξινόμησης με βάση τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA. Διαπιστώθηκαν 6 CpGs με ποσοστό σφάλματος 5.3% αλλά με διορθωμένο ποσοστό σφάλματος 32.6%. Για να ληφθεί υπόψη η διαφορά μεταξύ του αρχικού και του διορθωμένου ποσοστού σφάλματος επιλέξαμε μια πιο ισχυρή προσέγγιση, όπου πραγματοποιήθηκαν 100 bootstrap επαναλήψεις. Τέλος, επιλέξαμε τα 10 CpGs με την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης στα προκύπτοντα σύνολα CpGs: η αρχική ομάδα 6 CpGs συμπεριλήφθηκε σε αυτές τις κορυφαίες 10 θέσεις CpGs (**Πίνακας 7**). Με βάση την επιγενετική υπογραφή των 10 CpGs τροφοδοτήθηκε ένα νέο μοντέλο RF, το οποίο ταξινόμησε 34/38 περιπτώσεις στη σωστή ομάδα (10/13 με υποτροπή σε <2 χρόνια και 24/25 περιπτώσεις με υποτροπή σε >2 χρόνια) με ποσοστό σφάλματος 10.5%. Η αντίστοιχη τιμή AUC-ROC ήταν 0.98% (δείκτης που αντιπροσωπεύει την απόδοση του μοντέλου) (**Εικόνα 21A**). Οι 10 θέσεις CpGs της επιγενετικής υπογραφής εντοπίστηκαν στο πρώτο εξόνιο των γονιδίων *DLG2* (cg00846036), *PHOX2B* (cg01416712) και *ANKRD33* (cg19948393), το σώμα των γονιδίων *SAMD11* (cg10146935, cg06531475) και *MAD1L1* (cg22621310), τον υποκινητή των γονιδίων *RTKN* (cg19515035) και *CHD1L* (cg21917976) και δύο CpG εκτός γονιδίων (cg09123507, cg11165391) (**Πίνακας 7, Εικόνα 21B**).

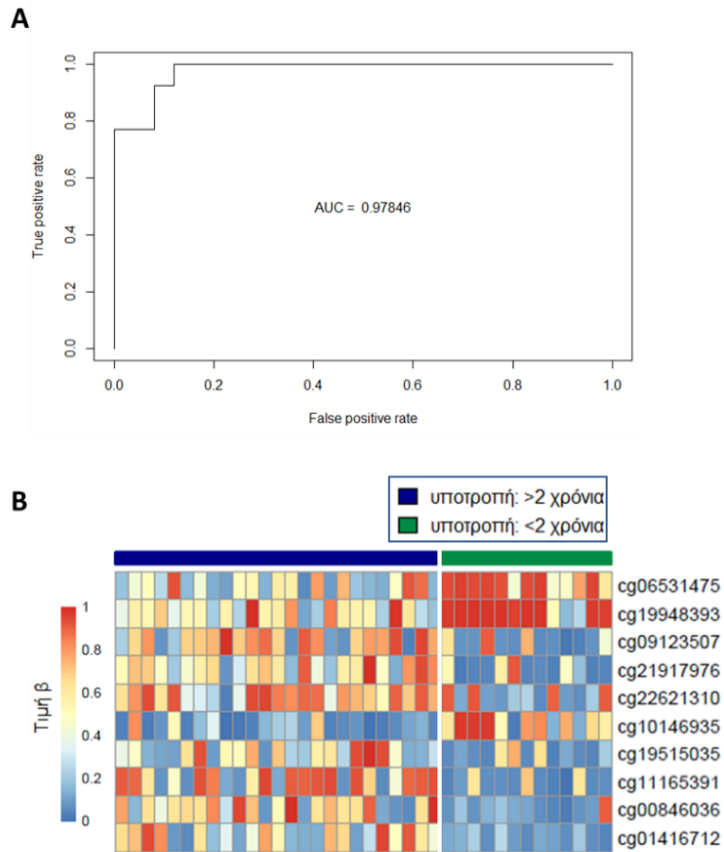
Με σκοπό την επικύρωση της αξιοπιστίας του μοντέλου, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα 9 ασθενών M-ΧΛΛ από δημοσιευμένη μελέτη (9) οι οποίοι (i) δεν είχαν λάβει θεραπεία και (ii) σε διαχρονική μελέτη της μεθυλίωσης του DNA δεν εμφάνισαν αλλαγές στα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA. Η επιγενετική υπογραφή των 10 CpGs οδήγησε στην ορθή ταξινόμηση των 8/9 (89%) περιπτώσεων στην ομάδα των περιπτώσεων με >2 χρόνια υποτροπή.

Επιπλέον, διερευνήθηκε εάν τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA της επιγενετικής υπογραφής ήταν σταθερά στο χρόνο. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν οι 34 περιπτώσεις με τα δείγματα που λήφθηκαν πριν από τη θεραπεία και μετά την υποτροπή. Ο συντελεστής συσχέτισης Pearson (R) βρέθηκε να κυμαίνεται από 0.83 μέχρι 0.93 ( $p < 0.0001$ ), φανερώνοντας υψηλή συσχέτιση των επιπέδων μεθυλίωσης του DNA μεταξύ των διαδοχικών δειγμάτων.



**Πίνακας 7.** Γενετικά και επιγενετικά χαρακτηριστικά της επιγενετικής υπογραφής των 10 CpGs. Τα 6 CpGs του πρώτου RF σημειώνονται με έντονο μαύρο.

CpG ID	Γονίδιο	Γονιδιακή τοποθεσία	Περιοχές νησίδων	Μέσος όρος τιμής β: <2 χρόνια υποτροπή	Μέσος όρος τιμής β: >2 χρόνια υποτροπή	Pearson R (προ θεραπείας vs υποτροπή)	p-value
cg00846036	DLG2	1stExon		0.16	0.53	0.83	<0.0001
cg01416712	PHOX2B	1stExon	N_Shore	0.12	0.50	0.89	<0.0001
cg06531475	SAMD11	Body	Island	0.80	0.42	0.91	<0.0001
<b>cg09123507</b>				0.25	0.57	0.80	<0.0001
<b>cg10146935</b>	SAMD11	Body	Island	0.62	0.18	0.93	<0.0001
<b>cg11165391</b>				0.19	0.67	0.83	<0.0001
cg19515035	RTKN	TSS1500	S_Shore	0.22	0.44	0.90	<0.0001
<b>cg19948393</b>	ANKRD33	1stExon		0.82	0.54	0.90	<0.0001
<b>cg21917976</b>	CHD1L	TSS1500	N_Shore	0.23	0.57	0.82	<0.0001
<b>cg22621310</b>	MAD1L1	Body	Island	0.37	0.72	0.92	<0.0001



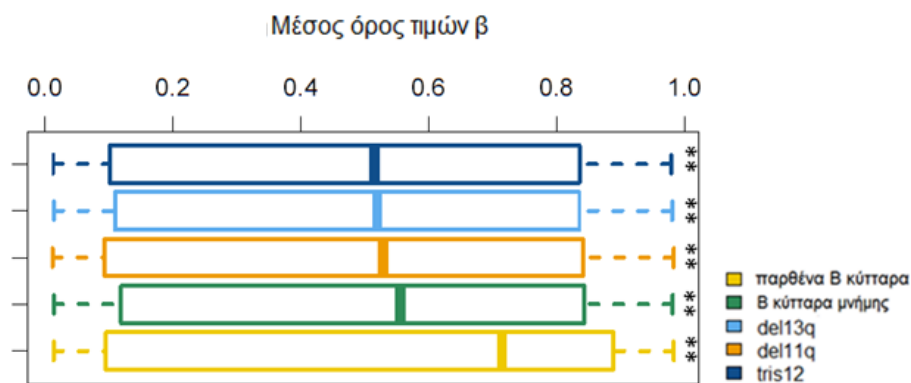
**Εικόνα 21. A.** Καμπύλη ROC-AUC σχετικά με την ικανότητα του μοντέλου να προβλέψει τις ομάδες. Η περιοχή κάτω από την καμπύλη [area under the curve (AUC)] είναι 0.98 **B.** Heatmap με βάση τις τιμές β των 10 CpG στις περιπτώσεις με υποτροπή >2 χρόνια (μπλε) και με υποτροπή <2 χρόνια (πράσινο).

## Μελέτη II

Στην προσπάθεια να συνδέσουμε τις κυτταρογενετικές βλάβες με τις επιγενετικές αλλαγές κατά την πρόοδο νόσου στη **Μελέτη I**, παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς με τρισωμία 12 εμφάνιζαν διακριτά πρότυπα μεθυλίωσης του DNA σε σύγκριση τους υπόλοιπους ασθενείς. Η επαλήθευση αυτής της παρατήρησης υποστηρίχθηκε μέσω συνεργασίας με το Ινστιτούτο IDIBAPS στην Βαρκελώνη υπό την επίβλεψη του Dr. Martin-Subero. Για το σκοπό αυτό, συγκεντρώθηκαν συνολικά 245 περιπτώσεις ΧΛΛ που έφεραν τις τρεις πιο συχνές κυτταρογενετικές βλάβες [del(11q), del(13q), tris12]. Επίσης, στην ομάδα μελέτης συμπεριλήφθηκαν 5 δείγματα παρθένων Β κυττάρων και 5 δείγματα Β κυττάρων μνήμης από υγιείς δότες.

Μη επιβλεπόμενη ανάλυση δεδομένων μεθυλίωσης του DNA αποκάλυψε σημαντικές διαφορές μεταξύ της τρισωμίας 12 και del(11q)/del(13q)

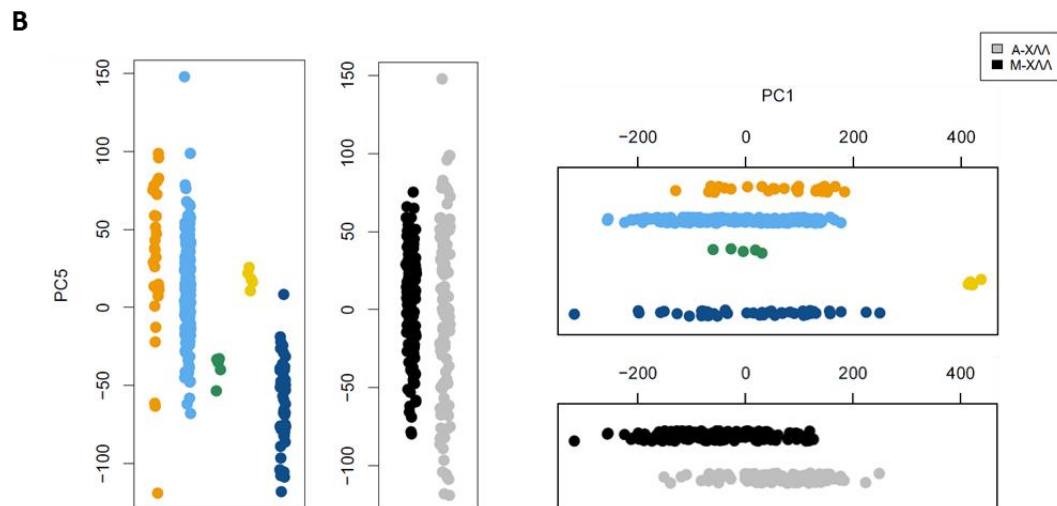
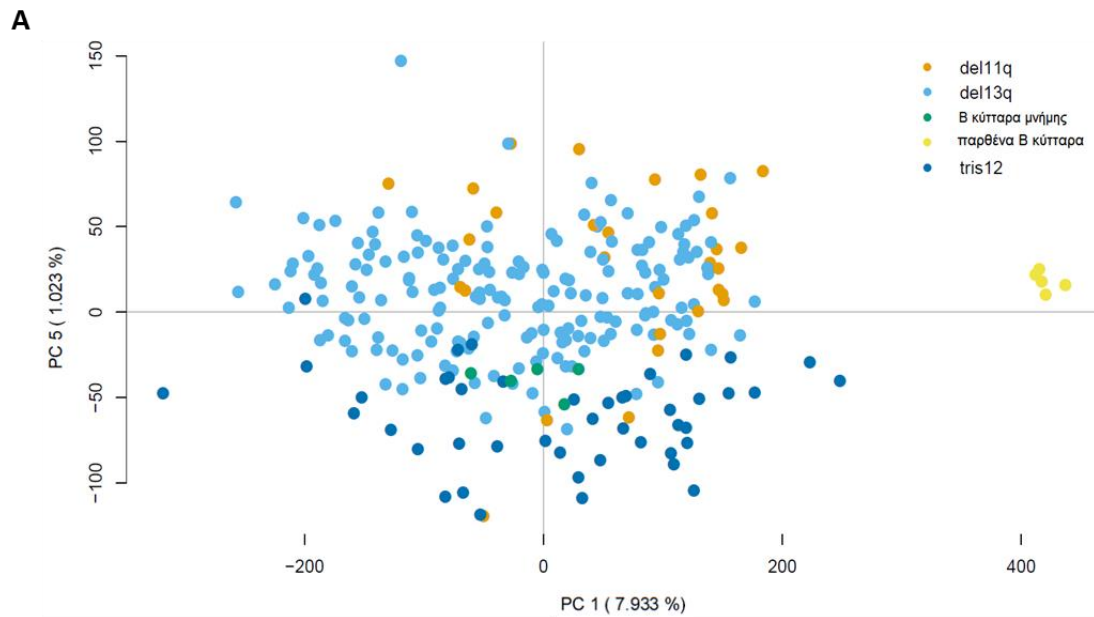
Αρχικά, υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τιμών-β κάθε θέσης CpG για κάθε ομάδα ξεχωριστά και βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυτταρογενετικών ομάδων (τρिसωμία 12 vs del(11q),  $p=0.006$  | τρισωμία 12 vs del(13q),  $p=7.166e-08$  | del(13q) vs del(11q),  $p=0.01$ ) (**Εικόνα 22**).



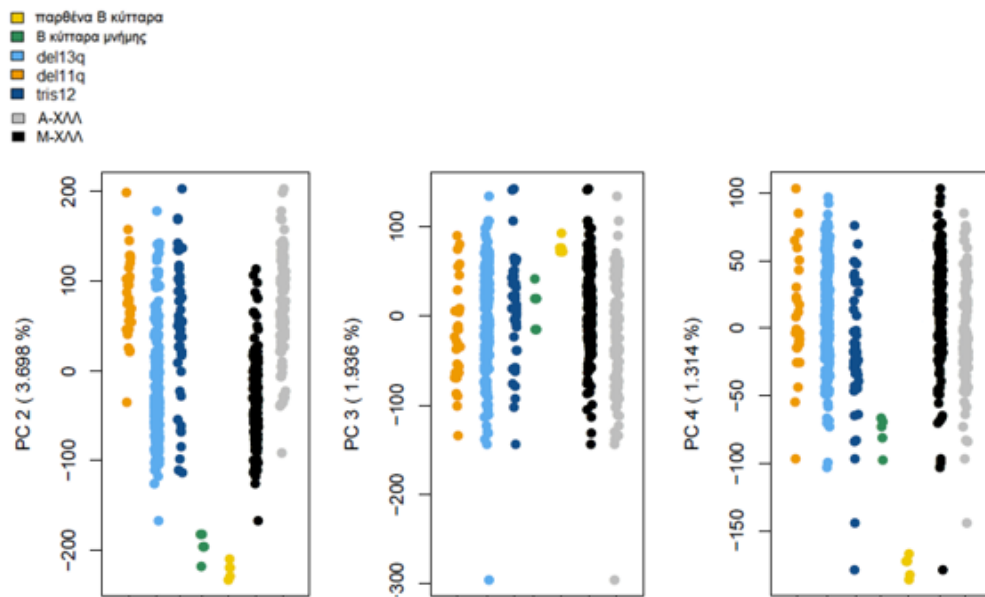
**Εικόνα 22.** Διάγραμμα boxplot που παρουσιάζει τις διάμεσες τιμές β ανά θέση CpG της κάθε ομάδας. \*\*  $p \leq 0.01$ ,

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε μη επιβλεπόμενη ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) εστιάζοντας στις 185936 πιο μεταβλητές θέσεις CpG

( $sd \geq 0.1$ ). Η PC1 (7.93%) τοποθέτησε τις περιπτώσεις ΧΛΛ με τα Β κύτταρα μνήμης και τις διαχώρισε από τα παρθένα Β κύτταρα (**Εικόνα 22A,B**). Ενδιαφέρον έδειξε η PC5 (1.02%), η οποία φανέρωσε διακριτή επιγενετική υπογραφή για τις περιπτώσεις που φέρουν τρισωμία 12, ανεξάρτητη από το μεταλλακτικό φορτίο των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών (**Εικόνα 22A,B**). Η συσχέτιση των τιμών β με τις τιμές της PC5 αποκάλυψε 1760 CpGs τα οποία χαρακτηρίζουν την τρισωμία 12, εύρημα που επιβεβαιώθηκε με ανάλυση ιεραρχικής ομαδοποίησης. Σχετικά με τις PC2-4, έδειξαν ομαδοποιήσεις των δειγμάτων που συνάδουν με την υπάρχουσα βιβλιογραφία (99): η PC4 (1.31%) τοποθέτησε τις περιπτώσεις ΧΛΛ με τα Β κύτταρα μνήμης και τα διαχώρισε από τα παρθένα Β κύτταρα, η PC2 (3.70%) διαχώρισε τα φυσιολογικά Β κύτταρα από τα ΧΛΛ και η PC3 (1.94%) τις περιπτώσεις Μ-ΧΛΛ και Α-ΧΛΛ (**Εικόνα 23**).



**Εικόνα 21. Ανάλυση κυρίων συνιστωσών. Α.** Στο δισδιάστατο γράφημα απεικονίζονται οι τιμές της PC1 και PC5 **Β.** Στα μονοδιάστατα γραφήματα φαίνεται η PC1 και PC5 για κάθε κυτταρογενετική ομάδα σε σύγκριση με το μεταλλακτικό status των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών καθώς και με τα φυσιολογικά B κύτταρα.



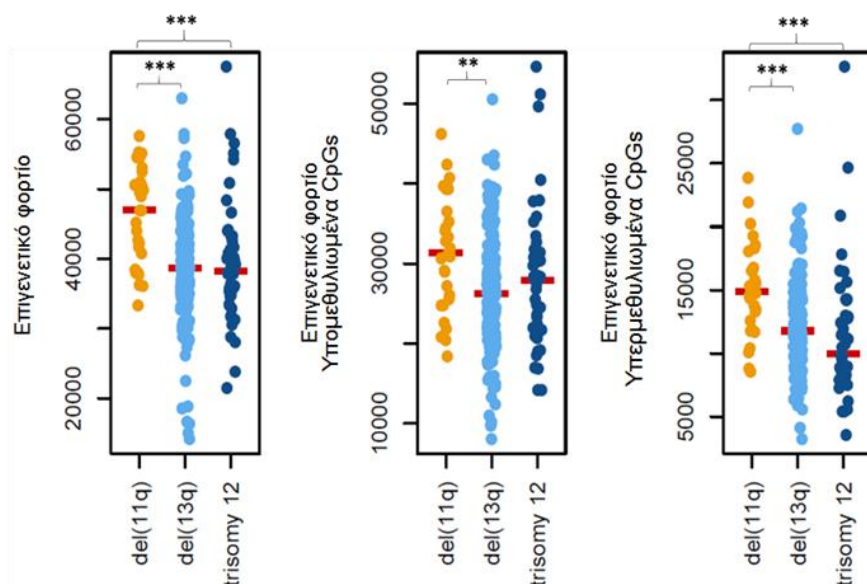
**Εικόνα 22.** Μονοδιάστατα γραφήματα που φαίνεται η PC2, PC3, PC4 για κάθε κυτταρογενετική ομάδα σε σύγκριση με το μεταλλακτικό status των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών καθώς και με τα φυσιολογικά B κύτταρα.

Πρότυπα μεθυλίωσης του DNA κάθε κυτταρογενετικής ομάδας σε σύγκριση με τα φυσιολογικά B κύτταρα

Τα διακριτά πρότυπα μεθυλίωσης του DNA της τρισωμίας 12 μέσω μη επιβλεπόμενων μεθόδων μας οδήγησαν σε διαφορικές αναλύσεις κάθε κυτταρογενετικού δείκτη με τα φυσιολογικά B λεμφοκύτταρα.

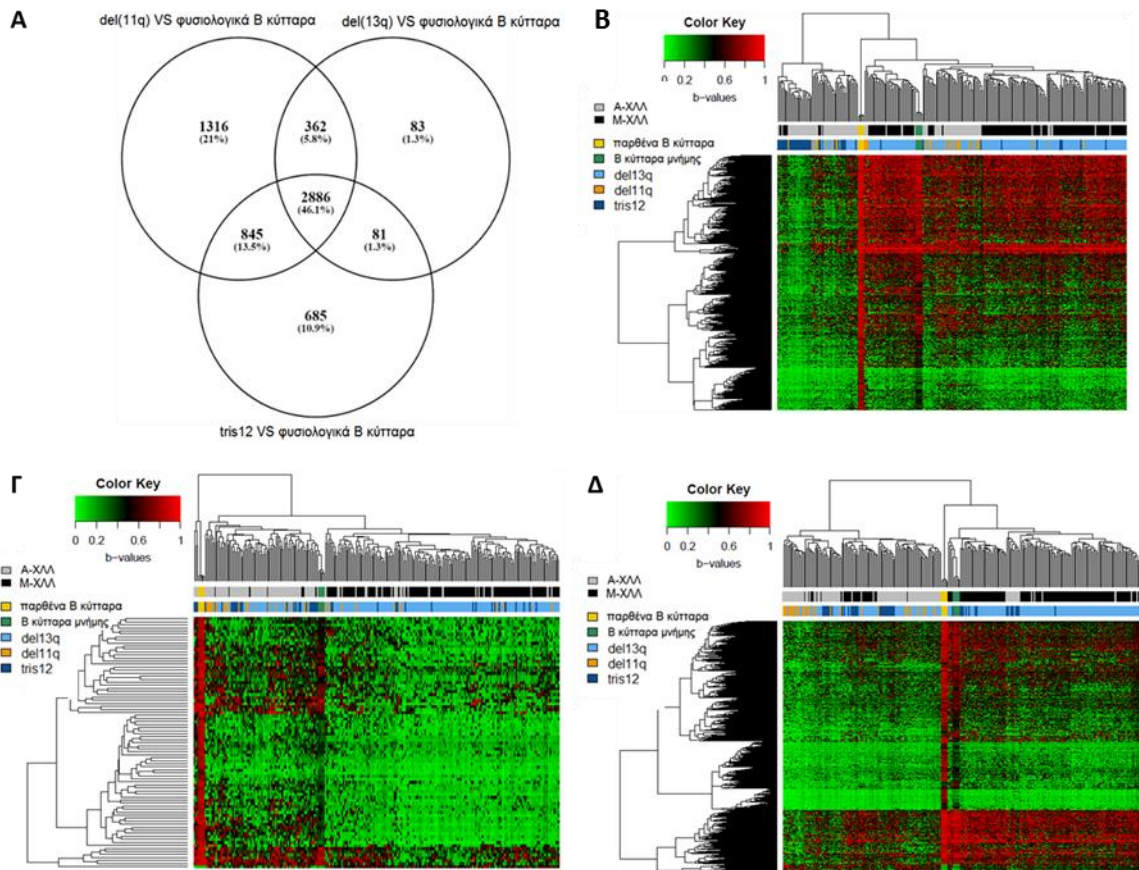
Αρχικά, αναπτύχθηκε μία μέθοδος με σκοπό να αφαιρέσουμε την επίδραση του μεταλλακτικού φορτίου των γονιδίων IGHV και του κυττάρου προέλευσης. Επίσης, εξαιρέθηκαν οι CpGs που βρίσκονται στις χρωμοσωμικές περιοχές των κυτταρογενετικών ευρημάτων. Με τη χρήση των «καθαρισμένων» δεδομένων υπολογίστηκε το επιγενετικό φορτίο για κάθε περίπτωση (X/LL δείγμα έναντι B κυττάρου μνήμης,  $|\delta\beta| = 0.25$ ). Οι περιπτώσεις κακής πρόγνωσης που φέρουν del(11q) εμφάνισαν το υψηλότερο επιγενετικό φορτίο (διάμεση τιμή: 47117) σε σύγκριση με τις περιπτώσεις del(13q) (διάμεση τιμή: 38702, τιμή,  $p = 1.582e-06$ ) και τρισωμία 12 (διάμεση τιμή: 38336,  $p = 0.0005$ ) (**Εικόνα 23**). Με βάση τις υπομεθυλωμένες CpGs του επιγενετικού φορτίου, οι περιπτώσεις del(11q) έδειξαν

στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με την καλής πρόγνωσης del(13q) ( $p$ -value = 0.001).



**Εικόνα 23.** Διάγραμμα που απεικονίζει το συνολικό, υπο- και υπέρ- μεθυλωμένο επιγενετικό φορτίο κάθε περίπτωσης σε συνάρτηση με την κυτταρογενετική βλάβη που φέρει.  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ . Με πορτοκαλί σημειώνονται οι περιπτώσεις που φέρουν del(11q), με γαλάζιο οι περιπτώσεις με del(13q) και με μπλε οι περιπτώσεις με τρισωμία 12.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση διαφορικής μεθυλίωσης ( $\delta\beta = | 0.4 |$ , FDR  $< 0.01$ ) για κάθε κυτταρογενετική υποομάδα έναντι των φυσιολογικών B κυττάρων. Βρέθηκαν 5409 ΔMCpG στις περιπτώσεις del(11q), 4497 στις περιπτώσεις τρισωμίας 12 και 3412 στις περιπτώσεις del(13q) που σε μεγάλο βαθμό αντικατοπτρίζουν μια γενική επιγενετική υπογραφή της ΧΛΛ, εφόσον οι 2886 ΔMCpG ήταν κοινές και στις 3 συγκρίσεις (**Εικόνα 24A**). Επιπλέον, τα 685/4497 CpGs που βρέθηκαν να είναι μοναδικά για την τρισωμία 12 ήταν ικανά να τη διακρίνουν από τα φυσιολογικά B λεμφοκύτταρα και από τις υπόλοιπες περιπτώσεις ΧΛΛ (**Εικόνα 24B**) σε αντίθεση με τις μοναδικές θέσεις των del(11q) και del(13q) (**Εικόνα 24Γ-Δ**).



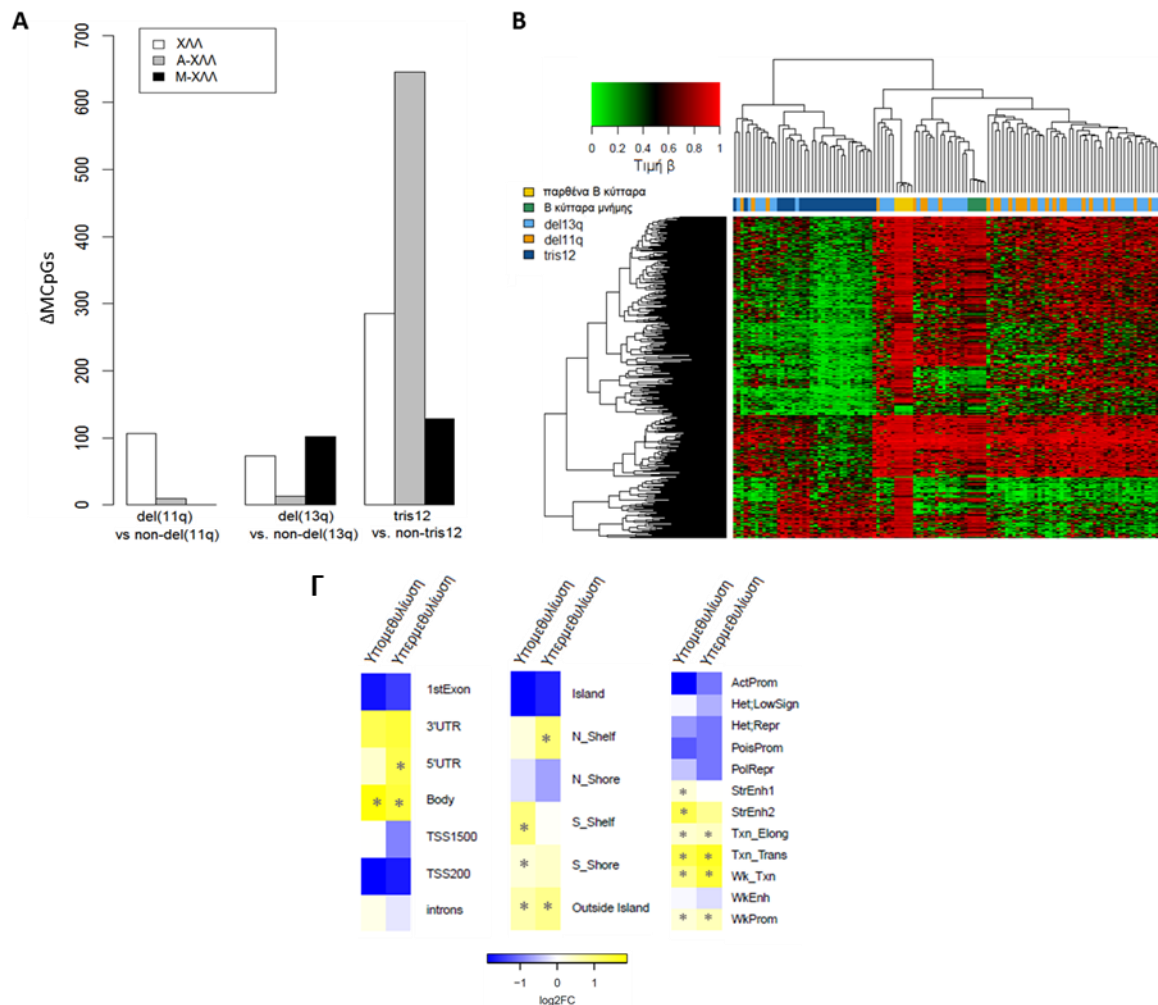
**Εικόνα 24. A.** Διάγραμμα Venn για κάθε σύγκριση των κυτταρογενετικών δεικτών έναντι των φυσιολογικών B κυττάρων **B-Δ**. Ανάλυση ιεραρχικής ομαδοποίησης των μοναδικών θέσεων CpG που βρέθηκαν για κάθε σύγκριση στο διάγραμμα Venn για: **(B)** τρισωμία 12 (μπλε) **(Γ)** del(13q) (γαλάζιο) και **(Δ)** del(11q) (πορτοκαλί). Κάθε γραμμή αντιπροσωπεύει μία θέση CpG και κάθε στήλη ένα δείγμα ασθενούς.

Διαφορική ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA για κάθε κυτταρογενετική ομάδα σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ΧΛΛ περιπτώσεις

Η διαφορική ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA για κάθε κυτταρογενετική ομάδα ξεχωριστά έναντι όλων των άλλων περιπτώσεων ΧΛΛ αποκάλυψε σημαντικές αλλαγές για την τρισωμία 12 (285 ΔMCpG vs χωρίς-τρисωμία 12 ΧΛΛ, 646 ΔMCpG vs χωρίς-τρисωμία 12 A-ΧΛΛ) ( $\delta\beta=|0.25|$ ,  $FDR<0.05$ ) **(Εικόνα 25A)**. Εστιάζοντας στις A-ΧΛΛ περιπτώσεις, οι 523 υπό- and 123 υπέρ- μεθυλωμένες θέσεις CpG **(Εικόνα 25B)** βρέθηκαν στα σώματα των γονιδίων εκτός νησίδων CpG. Η υπερμεθυλίωση βρέθηκε να σχετίζεται με κατεσταλμένες περιοχές polycomb και ισχυρούς ενισχυτές, ενώ η



υπομεθυλίωση με αδύναμους και ισχυρούς ενισχυτές (**Εικόνα 25Γ**). Τα γονίδια στα οποία εδράζονται οι υπομεθυλιωμένες θέσεις CpG έδειξαν στατιστικά σημαντικό εμπλουτισμό (FDR <0.001) σε όρους της gene ontology (GO) όπως πρωτεΐνες κυτταροσκελετού, δέσμευση ακτίνης και κινάσης, ενώ οι υπερμεθυλιωμένες θέσεις CpG σε μεταγραφικούς παράγοντες και στην ενεργότητα της αποακετυλάσης των ιστονών.



**Εικόνα 25. Α.** Στηλόγραμμα με βάση τον αριθμό των ΔMCpGs για κάθε σύγκριση των κυτταρογενετικών δεικτών. Με άσπρο χρώμα απεικονίζονται όλες οι περιπτώσεις ΧΛΛ, με γκρι οι Α-ΧΛΛ και με μαύρο οι Μ-ΧΛΛ. **Β.** Ανάλυση ιεραρχικής ομαδοποίησης των περιπτώσεων Α-ΧΛΛ που φέρουν τρισωμία 12 σε σύγκριση με τις περιπτώσεις Α-ΧΛΛ που δε φέρουν τη συγκεκριμένη κυτταρογενετική βλάβη με βάση τα 646 ΔMCpGs. **Γ.** Ανάλυση εμπλουτισμού των υπό- και υπέρ- μεθυλιωμένων CpG σε

γονιδιακές περιοχές, περιοχές νησίδων CpG και κατάσταση χρωματίνης. Ο χάρτης θερμότητας αντικατοπτρίζει το log2FC των θέσεων σε σχέση με το background και με αστερίσκο σημειώνεται η στατιστική σημαντικότητα που ελέγχθηκε με υπεργεωμετρική κατανομή ( $p < 0.05$ )

## Λειτουργικός ρόλος της επιγενετικής υπογραφής της τρισωμίας 12

Η αναζήτηση ενδείξεων για τον πιθανό λειτουργικό ρόλο των 646 ΔMCpG πραγματοποιήθηκε μέσω συσχέτισης των επιπέδων μεθυλίωσης του DNA με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων. Επίσης, εξετάστηκε η επικάλυψη των θέσεων CpG με τις περιοχές ενεργών ενισχυτών (ChIP-seq με αντίσωμα έναντι H3K27ac) και ανοιχτής χρωματίνης (ATAC-seq). Η ανάλυση ανέδειξε χαμηλή συσχέτιση της μεθυλίωσης του DNA με την έκφραση (3.6%), εύρημα που συνάδει με τη βιβλιογραφία (99), αλλά μεγάλη επικάλυψη με ενεργούς ενισχυτές (40.7%) και περιοχές ανοιχτής χρωματίνης (32.3%) (**Εικόνα 26A**). Η ανάλυση επίσης αποκάλυψε 6 θέσεις CpG οι οποίες εμφάνισαν διαφορεική μεθυλίωση και έκφραση σε περιοχές με δομή ανοιχτής χρωματίνης (**Εικόνα 26B**). Οι δύο από τις 6 CpG βρέθηκαν στο γονίδιο *TFDP1*, το οποίο βρέθηκε να υπερεκφράζεται ( $\log_2FC = 1.31$ ) και να είναι υπομεθυλιωμένο ( $\delta\beta: cg08183317 = -0.38 | cg17707487 = -0.33, \rho = -0.6 | -0.56$ ) σε περιπτώσεις τρισωμίας 12 (**Πίνακας 8**)(**Εικόνα 26Γ**).

**Πίνακας 8.** Θέσεις CpG που εμφάνισαν διαφορεική μεθυλίωση του DNA καθώς και έκφραση σε περιοχές ακετυλίωσης με δομή ανοιχτής χρωματίνης.

CpG ID	Probe ID	Όνομα Γονιδίου	Γονιδιακή τοποθεσία	Συνελεστής		Log2FC		$\Delta\beta$	p-value
				συσχέτισης Spearman (rho)	p-value	tris12 VS non-tris12	p-value		
cg07173823	11752398_a_at	C1orf228	Body	-0,509	0,002485	2,145098	0,016168	-0,40	1,08E-07
cg23077884	11739427_a_at	GPD2	Body	-0,585	0,000344	-1,42507	0,000229	0,47	3,38E-07
cg13103485	11724924_a_at	PPP1R9A	TSS1500	-0,885	8,11E-12	1,007259	0,064952	-0,26	0,009707
cg15544721	11724924_a_at	PPP1R9A	TSS1500	-0,865	7,89E-11	1,007259	0,064952	-0,30	0,003193
cg08183317	11725349_s_at	TFDP1	Body	-0,605	0,000186	1,31211	0,001165	-0,38	2,45E-05
cg17707487	11725349_s_at	TFDP1	Body	-0,561	0,000674	1,31211	0,001165	-0,33	5,65E-05

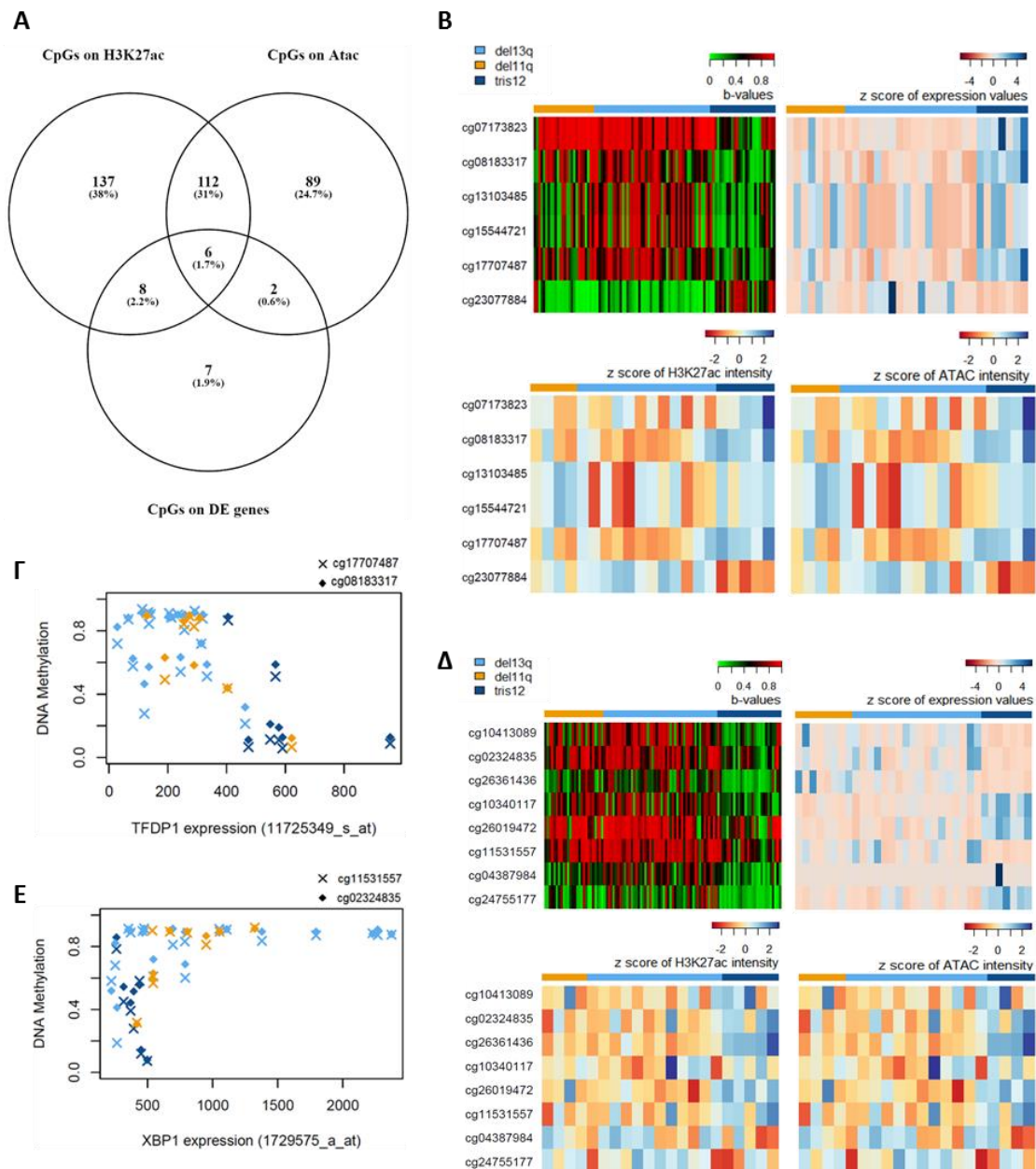
Στη συνέχεια, οι 112 θέσεις οι οποίες βρέθηκαν σε περιοχές ενισχυτών (H3K27ac) και ανοιχτής χρωματίνης συνδέθηκαν με τα 10 πιο κοντινά γονίδια, που πιθανόν ρυθμίζονται από αυτές τις θέσεις μέσω της τριτοταγούς δομής της χρωματίνης. Βρέθηκαν 8 CpGs που παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης με τα επίπεδα μεθυλίωσης του ενισχυτή (**Πίνακας 9**)(**Εικόνα 26Δ**). Η έκφραση του γονιδίου *XBP1* βρέθηκε να σχετίζεται με τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA δύο θέσεων CpG που βρίσκονται στην ίδια περιοχή ενισχυτή με δομή ανοιχτής χρωματίνης. Το γονίδιο *XBP1* βρέθηκε να υποεκφράζεται ( $\log_2FC=-1,23$ ) συνοδευμένο με υπομεθυλωμένο ( $\delta\beta$ :  $cg02324835=-0.294$  |  $cg11531557=-0.261$ ,  $\rho$ :  $0.45$  |  $0.51$ ) ενισχυτή στις περιπτώσεις τρισωμίας 12 (**Εικόνα 26Ε**).

**Πίνακας 9.** Θέσεις CpG που εμφάνισαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης με τα επίπεδα μεθυλίωσης του ενισχυτή στον οποίο εδράζονται.

CpG ID	Probe ID	Όνομα Γονιδίου	Αρίθμηση κοντινότερου γονιδίου	Συνελεστής συσχέτισης Spearman ( $\rho$ )	p-value	Log2FC tris12 VS non-tris12 A-XΛΛ	p-value	$\Delta\beta$	p-value
cg26361436	11733913_at	<i>HS3ST1</i>	5	0,42	0,013	-1,88358	0,000801	-0,27	8,86E-05
cg10413089	11723310_at	<i>TNFRSF10D</i>	5	0,48	0,004	-1,53157	9,51E-05	-0,32	0,000211
cg02324835	11729575_a_at	<i>XBP1</i>	6	0,45	0,007	-1,22565	0,000351	-0,29	0,000219
cg11531557	11729575_a_at	<i>XBP1</i>	6	0,51	0,002	-1,22565	0,000351	-0,26	0,000107
cg24755177	11756363_a_at	<i>NCKAP1L</i>	4	-0,44	0,010	1,277431	0,001303	-0,25	0,002872
cg26019472	11731786_a_at	<i>ERC1</i>	2	-0,38	0,028	1,319171	0,001912	-0,26	0,02882
cg10340117	11729981_s_at	<i>PARP11</i>	1	-0,38	0,027	1,496026	0,004012	-0,27	0,001125
cg04387984	11748239_x_at	<i>TBCD</i>	3	-0,38	0,025	2,601602	0,347415	-0,25	0,000487

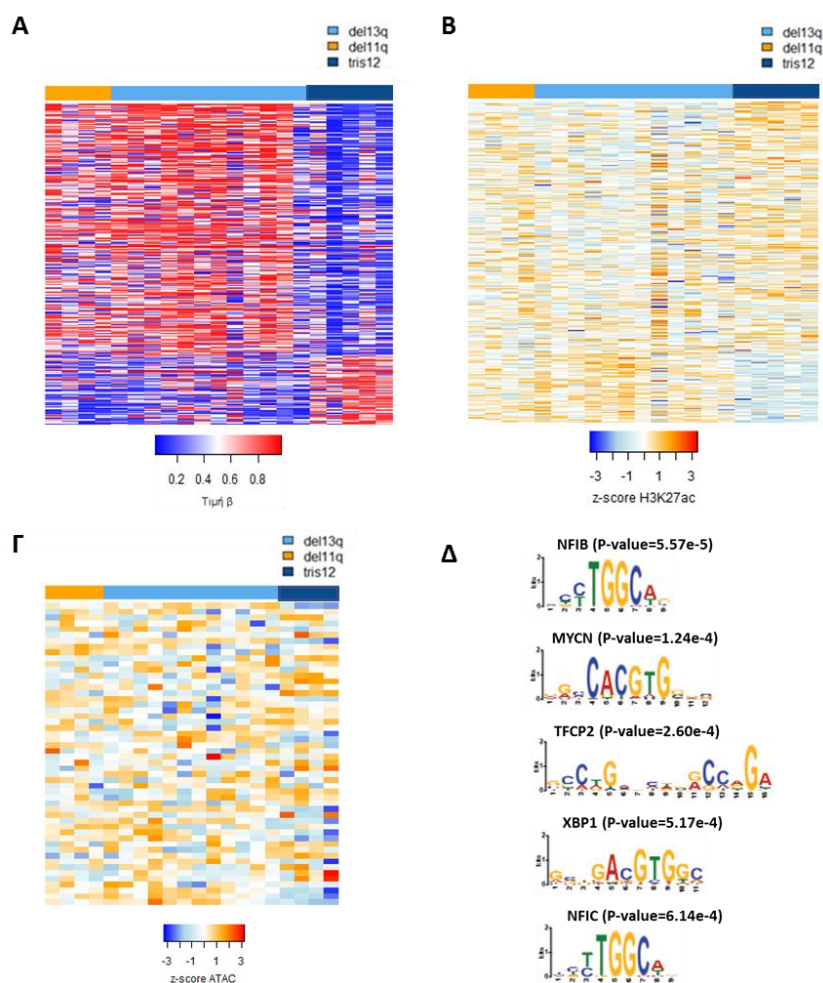
Με δεδομένη τη μικρή συσχέτιση της μεθυλίωσης του DNA με την έκφραση των γονιδίων, εξετάστηκε η επικάλυψη των ΔMCpGs που συνδέονται με περιοχές ακετυλίωσης έναντι των θέσεων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων. Αρχικά, βρέθηκαν 253 θέσεις CpG να επικαλύπτονται με περιοχές σχετικές με ακετυλίωση στην ΧΛΛ (**Εικόνα 27Α,Β**). Έπειτα, ελέγχθηκε η διαφορά στην ενεργότητα μεταξύ της τρισωμίας 12 και των υπόλοιπων περιπτώσεων με χρήση του πακέτου της R, DeSeq2. Οι 79/253 περιοχές έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα ακετυλίωσης ( $\text{padj}<0.05$ ), από τις οποίες οι 47 έδειξαν υπομεθυλίωση και βρέθηκε να

επικαλύπτονται με 52 περιοχές ανοιχτής χρωματίνης (**Εικόνα 27Γ**). Με βάση τις 52 θέσεις, πραγματοποιήθηκε ανάλυση πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων και βρέθηκαν 5 μεταγραφικοί παράγοντες [NFI -B και -C, MYCN, TFCP2 και XBP1] με στατιστικά σημαντικό εμπλουτισμό ( $p < 0.001$ ) (**Εικόνα 27Δ**).



**Εικόνα 26. Α.** Διάγραμμα Venn στο οποίο απεικονίζεται η επικάλυψη των ΔMCpGs με τη διαφορική έκφραση γονιδίων, τις περιοχές H3K27ac και ανοιχτής χρωματίνης **Β.** Heatmaps των 6 CpGs που βρέθηκε να σχετίζονται με την έκφραση των γονιδίων σε περιοχές ανοιχτής χρωματίνης και H3K27ac και **Δ.** των 8 CpGs που βρέθηκαν σε

περιοχές ενισχυτών και σχετίζονται με τα επίπεδα έκφρασης. Η ένταση των heatmaps απεικονίζει τις τιμές β, τα επίπεδα έκφρασης, την ένταση της H3K27ac και ανοιχτής χρωματίνης (από αριστερά προς τα δεξιά) Γ-Ε. Διάγραμμα των επιπέδων έκφρασης (άξονας X) σε σύγκριση με τα επίπεδα μεθυλίωσης (άξονας y) των γονιδίων TFDP1 και XPB1 τα οποία έδειξαν 2 ΔMCpGs (σχήμα σταυρού και ρόμβου).

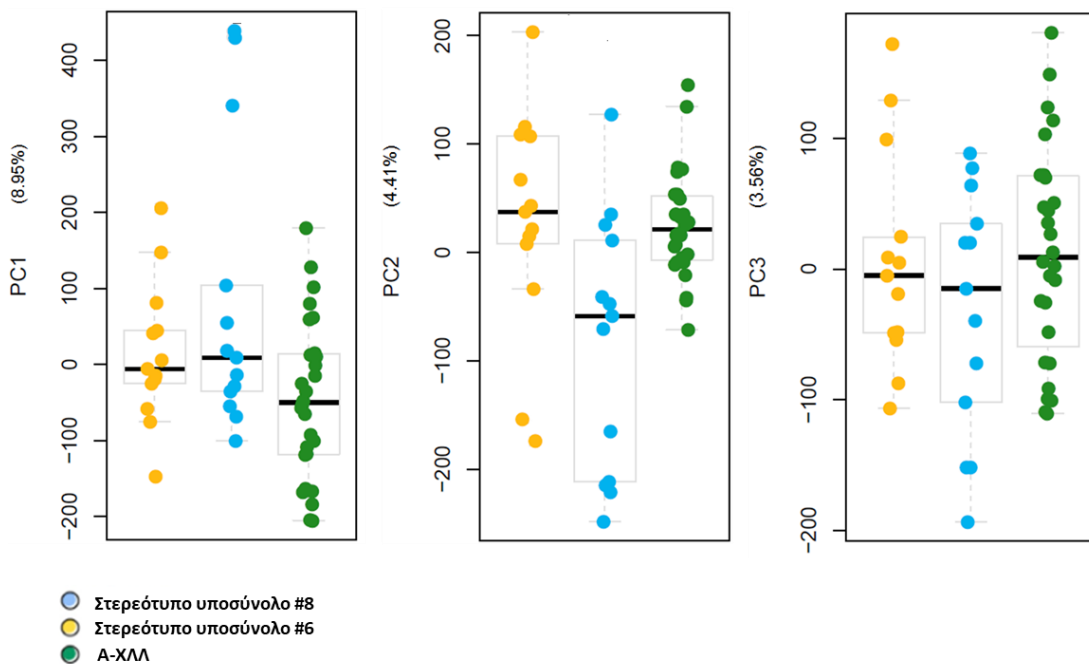


**Εικόνα 27. A-B.** Heatmap των 253 θέσεων CpG που επικαλύπτονται με περιοχές ακετυλίωσης **(A)** με βάση τις τιμές β και **(B)** με βάση τις τιμές που προέκυψαν από τα δεδομένα CHIP-seq/H3K27ac **Γ.** Heatmap των 52 περιοχών με βάση τις τιμές που προέκυψαν από τα δεδομένα ATAC-seq **Δ.** Ανάλυση μεταγραφικών παραγόντων στις 52 περιοχές με την χρήση της βάσης MEME suites-AME.

## Μελέτη III

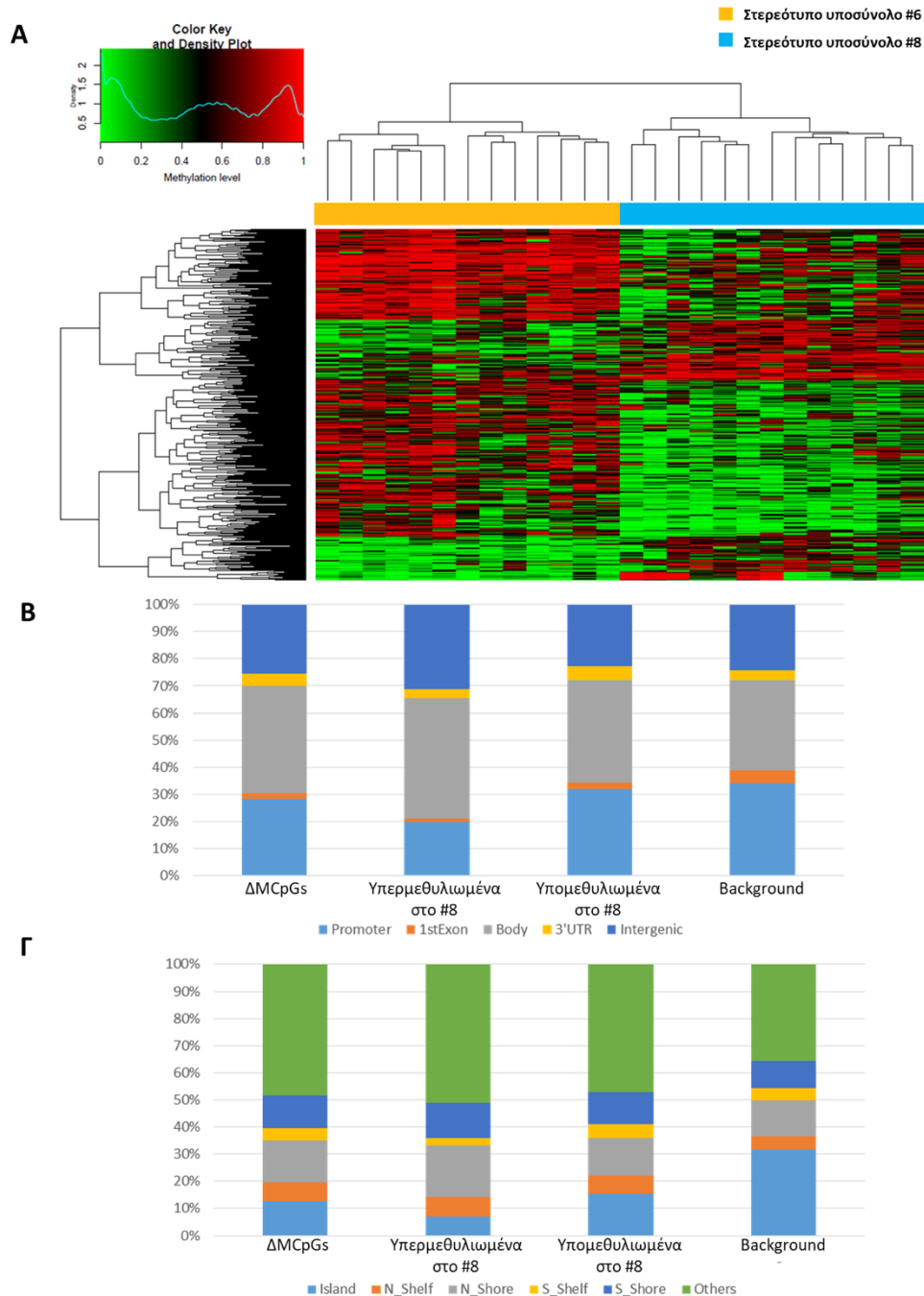
### Διακριτά πρότυπα μεθυλίωσης του DNA σε στερεότυπα υποσύνολα ΧΛΛ

Πρώτα αναλύθηκαν τα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA σε 13 περιπτώσεις που ανήκαν στο στερεότυπο υποσύνολο #8 και 13 περιπτώσεις που ανήκαν στο στερεότυπο υποσύνολο #6, τα οποία περιλαμβάνουν ασθενείς με αμετάλλακτα γονίδια IGHV και επιθετική νόσο, ιδίως στην περίπτωση του υποσυνόλου #8, το οποίο εμφανίζει τον υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης συνδρόμου Richter μεταξύ όλων των υποομάδων ασθενών με ΧΛΛ. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε μη επιβλεπόμενη ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) εστιάζοντας στις πιο μεταβλητές θέσεις CpG ( $sd \geq 0.1$ ). Η PC2 (4.41%) έδειξε ότι το στερεότυπο υποσύνολο #8 έχει διακριτά πρότυπα μεθυλίωσης του DNA σε σύγκριση τόσο με το στερεότυπο υποσύνολο #6 όσο και με τις υπόλοιπες Α-ΧΛΛ περιπτώσεις (Εικόνα 28).



**Εικόνα 28.** Μονοδιάστατα γραφήματα που φαίνεται η PC1, PC2, PC3 για κάθε στερεότυπο υποσύνολο σε σύγκριση με Α-ΧΛΛ περιπτώσεις που δεν ανήκουν σε στερεότυπα υποσύνολα.

Το παραπάνω εύρημα, επιβεβαιώθηκε με διαφορική ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA ( $\delta\beta=0.3$ ,  $p\text{-value}=0.01$ ). Συγκεκριμένα, βρέθηκαν 493 ΔMCpGs κατά τη σύγκριση του στερεότυπου υποσύνολου #8 έναντι του #6 (Εικόνα 29A) και 699 ΔMCpGs έναντι των Α-ΧΛΛ περιπτώσεων που δε φέρουν στερεότυπους υποδοχείς.



**Εικόνα 29. Α.** Ανάλυση ιεραρχικής ομαδοποίησης των περιπτώσεων που ανήκουν στο στερεότυπο υποσύνολο #8 (γαλάζιο χρώμα) και στο στερεότυπο υποσύνολο #6

(πορτοκαλί χρώμα) με βάση τα 493 ΔMCpGs. **Β-Γ.** Κατανομή των ολικών, υπερ- και υπο- μεθυλιωμένων CpGs σε γονιδιακές περιοχές (**Β**) και περιοχές νησίδων CpG (**Γ**)

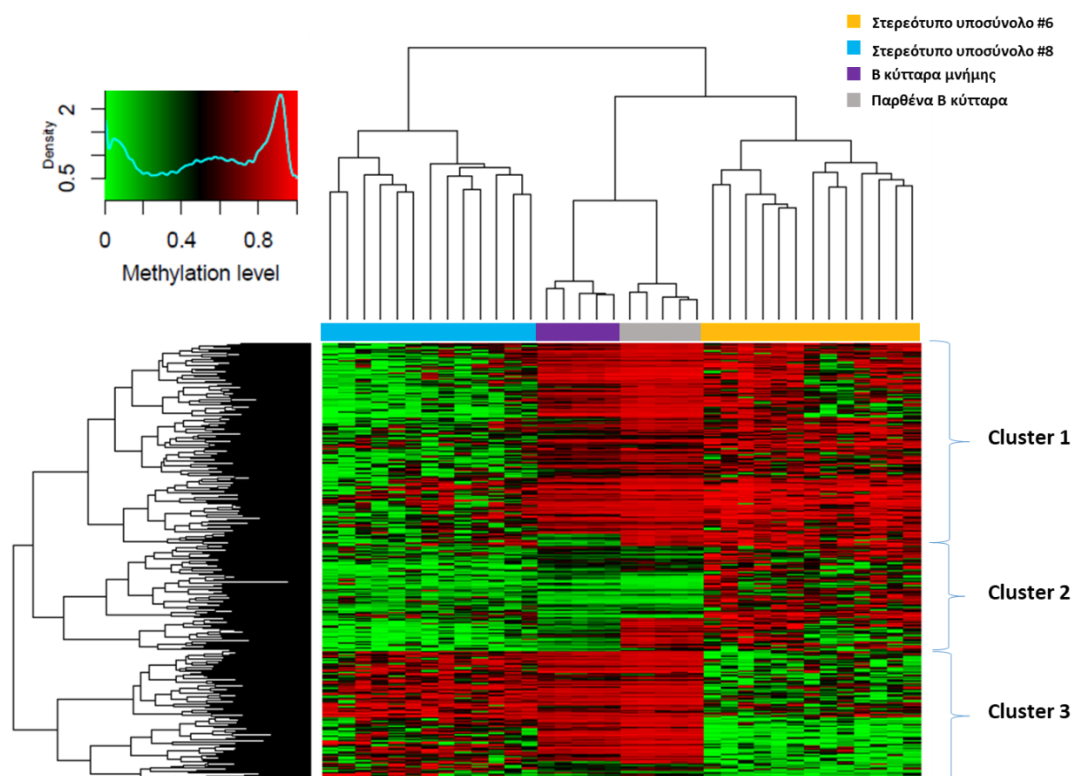
Το στερεότυπο υποσύνολο #6 γενικά εμφάνισε παρόμοια πρότυπα μεθυλίωσης με τους ασθενείς Α-ΧΛΛ που δεν ανήκουν σε κάποιο στερεότυπο υποσύνολο, καθώς κατά τη σύγκρισή τους διαπιστώθηκαν μόνο 66 ΔMCpG. Εστιάζοντας στη σύγκριση των στερεότυπων υποσυνόλων #8 και #6, παρατηρήθηκε υπομεθυλίωση στα 346/493 ΔMCpGs (70%) στο στερεότυπο υποσύνολο #8. Οι υπομεθυλιωμένες αυτές θέσεις βρέθηκαν να στοχεύουν σε υποκινητές (31.8% vs 19.7%,  $p=0.006$ ) οι οποίοι εδράζονται εντός νησίδων CpGs (15.3% vs 6%,  $p=0.0095$ ). Από την άλλη, οι υπερμεθυλιωμένες θέσεις έδειξαν να στοχεύουν περιοχές εκτός γονιδίων (31.3% vs. 22.8%,  $p=0.05$ ) (Εικόνα 29B-Γ). Τα γονίδια στα οποία εδράζονται οι υπομεθυλιωμένες θέσεις CpG έδειξαν στατιστικά σημαντικό εμπλουτισμό ( $FDR < 0.001$ ) σε όρους της βάσης KEGG, μεταξύ άλλων σηματοδότηση μέσω ασβεστίου και cGMP-PKG. Τα δέκα γονίδια με τη μεγαλύτερη διαφορά στα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA μεταξύ των δύο στερεότυπων υποσυνόλων ήταν τα: *C6orf150*, *TP63*, *TBC1D22A*, *SDK1*, *GLCC11*, *ATP5F1*, *WDR77*, *RUNX3*, *BRP44L* και *ETV6*, με το γονίδιο *TP63* να εμφανίζει 6 ΔMCpGs (**Πίνακας 10**).

Η ανάλυση των 493 ΔMCpGs σε αντιπαράβολή με τα φυσιολογικά Β κύτταρα έδειξε ότι τα γονίδια *TP63*, *TBC1D22A*, *SDK1*, *ATP5F1*, *WDR77*, *RUNX3*, *BRP44L* ήταν υπομεθυλιωμένα μόνο στο στερεότυπο υποσύνολο #8 (cluster A, **Εικόνα 30**). Τα γονίδια *ETV6* και *GLCC11* (cluster C, **Εικόνα 30**) ήταν υπομεθυλιωμένα μόνο στο στερεότυπο υποσύνολο #6 ενώ το γονίδιο *C6orf150* ήταν υπομεθυλιωμένο στο στερεότυπο υποσύνολο #8 και στα Β κύτταρα μνήμης (cluster B, **Εικόνα 30**).



**Πίνακας 10.** Λίστα των 10 γονιδίων που εμφάνισαν την μεγαλύτερη διαφορά στα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA στην σύγκριση του στερεότυπου υποσυνόλου #6 με το #8.

CpG	Γονίδιο	Γονιδιακή τοποθεσία	Τοποθεσία νησίδας CpG	Δβ #6 vs #8	p-value	Μ.Ο τιμής β στα Β κύτταρα μνήμης	Μ.Ο τιμής β στα παρθένα Β κύτταρα
cg17808910	<i>GLCC1</i>	Body	S_Shelf	-0,492431	0,000246	0,72254705	0,88128379
cg05161923	<i>ETV6</i>	Body		0,4734135	0,001608	0,8974051	0,93987421
cg27099277	<i>BRP44L</i>	Body		0,473394	0,003762	0,92317504	0,89639494
cg21723486	<i>TP63</i>	1stExon		0,4805475	0,000442	0,85012042	0,90371201
cg14182690	<i>RUNX3</i>	Body		0,4806124	0,002888	0,45033643	0,89960069
cg06441150	<i>WDR77;ATP5F1</i>	Body;TSS1500	N_Shore	0,4817293	0,0003	0,69602333	0,85224065
cg04902838	<i>SDK1</i>	Body		0,5084539	0,001232	0,2366676	0,88004776
cg07607066	<i>TBC1D22A</i>	Body	Island	0,5366305	0,000164	0,91063434	0,94092069
cg04489243	<i>TP63;TP63;TP63</i>	TSS200		0,5785158	0,000364	0,85061993	0,8967059
cg09931909	<i>C6orf150</i>	Body	N_Shore	0,6994289	0,000135	0,23862992	0,78885968

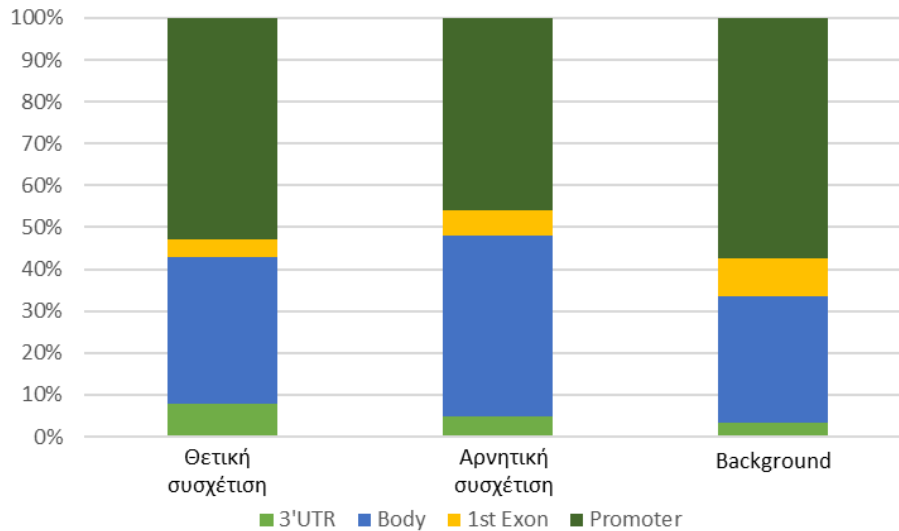


**Εικόνα 30.** Ανάλυση ιεραρχικής ομαδοποίησης των στερεότυπων υποσυνόλων #6 και #8 σε αντιπαραβολή με τα παρθένα Β κύτταρα και τα Β κύτταρα μνήμης με βάση τα

493 ΔMCpG ( $\delta\beta \geq 0.3$ ,  $p \leq 0.01$ ). Κάθε γραμμή αντιπροσωπεύει μια θέση CpG και κάθε στήλη ένα δείγμα ασθενούς.

### Συσχέτιση της μεθυλίωσης του DNA και της έκφρασης των γονιδίων

Με σκοπό την ανεύρεση γονιδίων των οποίων η έκφραση επηρεάζεται από τη μεθυλίωση του DNA, ενοποιήθηκαν τα δεδομένα μεθυλίωσης του DNA με διαθέσιμα δεδομένα αλληλούχησης ολικού RNA (RNA-seq) σε 5 περιπτώσεις του στερεότυπου υποσυνόλου #6 και 4 περιπτώσεις του στερεότυπου υποσυνόλου #8. Ο συντελεστής συσχέτισης Spearman ( $\rho$ ) υπολογίστηκε με βάση τις μετρήσεις μεθυλίωσης του DNA ανά θέση CpG και τις τιμές γονιδιακής έκφρασης του αντίστοιχου γονιδίου με το οποίο συνδέεται η κάθε θέση CpG. Θέσεις CpG με στατιστικά σημαντική συσχέτιση θεωρήθηκαν όσες παρουσίασαν  $\rho = |0.7|$  και τιμή  $p \leq 0.05$ . Συνολικά, 21.647/341.559 (6.3%) θέσεις CpG που εδράζονται σε γονίδια (2.5% των συνολικών θέσεων CpG της μικροσυστοιχίας) έδειξαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την γονιδιακή έκφραση. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση της μεθυλίωσης του DNA με την γονιδιακή έκφραση σε 12442 (57%) CpGs, με την πλειονότητα να αφορούν περιοχές υποκινητών των γονιδίων. Αντίθετα, τα υπόλοιπα 9204 (43%) CpGs έδειξαν θετική συσχέτιση με την έκφραση των γονιδίων και αφορούσαν σε περιοχές τόσο υποκινητών όσο και σώματων των γονιδίων (**Εικόνα 31**).

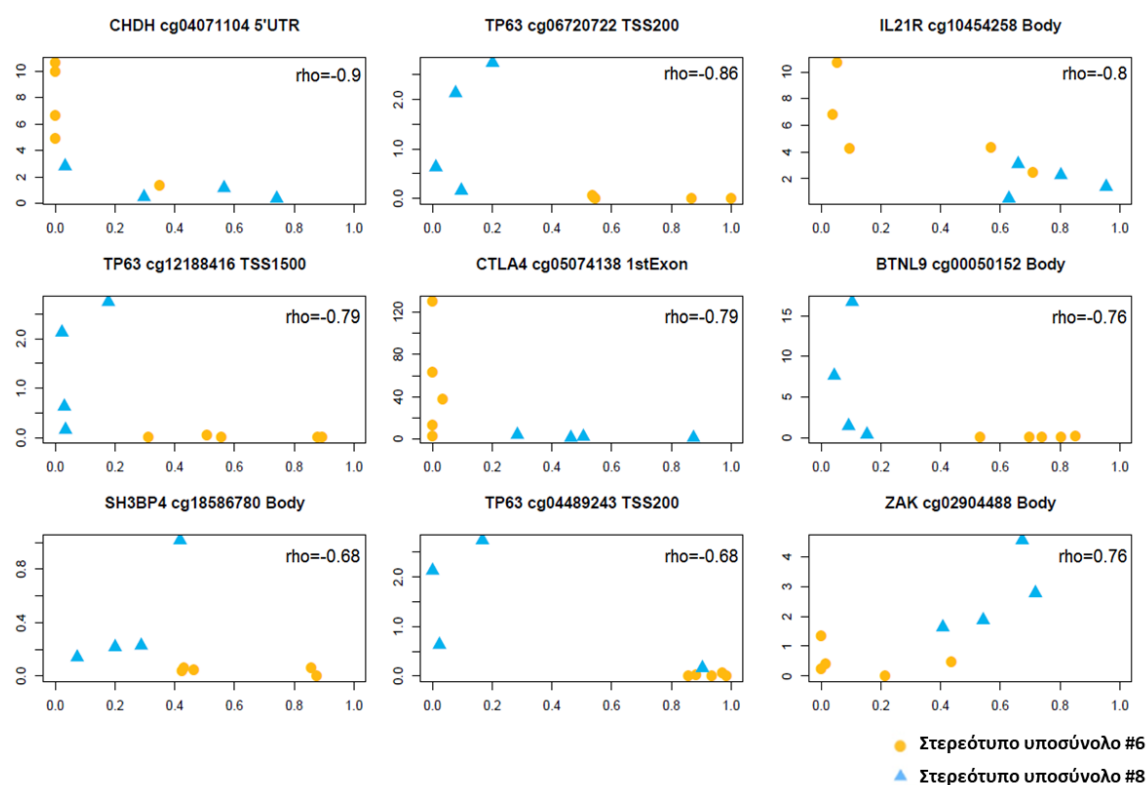


**Εικόνα 31.** Κατανομή των CpG με θετική και αρνητική συσχέτιση με την έκφραση των γονιδίων σε γονιδιακές περιοχές [3'UTR, σώματα γονιδίων (Body), πρώτο εξόνιο (1st exon), υποκινητής (promoter)].

Η διαφορική ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων μεταξύ των στερεότυπων υποσυνόλων #6 και #8 ( $\log_2FC \geq 1$ ,  $p \leq 0.05$ ) ανέδειξε 321 γονίδια τα οποία σχετίζονται με 3512 CpGs. Παρατηρήθηκε επίσης στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p < 0.05$ ) μεταξύ της έκφρασης των γονιδίων και της μεθυλίωσης του DNA σε 390/3512 CpGs, τα οποία σχετίζονται με 115/321 γονίδια. Πιο συγκεκριμένα, 7/115 γονίδια (*BTNL9*, *CHDH*, *CTLA4*, *IL21R*, *SH3BP4*, *ZAK*, *TP63*) βρέθηκαν και διαφορικά μεθυλωμένα ( $db \geq 0.3$   $p \leq 0.01$ ) μεταξύ των δύο στερεότυπων υποσυνόλων. Με εξαίρεση το γονίδιο *ZAK*, τα υπόλοιπα έδειξαν αρνητική συσχέτιση μεταξύ μεθυλίωσης του DNA και της έκφρασης των γονιδίων. Πιο συγκεκριμένα, τα γονίδια *TP63*, *SH3BP4* και *BTNL9* βρέθηκαν υπομεθυλωμένα και υπερεκφραζόμενα στο στερεότυπο υποσύνολο #8 σε σύγκριση με το #6, ενώ τα γονίδια *IL21R*, *CTLA4* και *CHDH* εμφάνισαν το αντίθετο πρότυπο (**Πίνακας 11**, **Εικόνα 32**). Τα παραπάνω δεδομένα υπογραμμίζουν τον ρόλο του γονιδίου *TP63*, αφού βρέθηκε να εμφανίζει 6 ΔMCpGs και να είναι διαφορικά εκφραζόμενο μεταξύ των δυο στερεότυπων υποσυνόλων. Επίσης, οι 6 ΔMCpGs βρέθηκαν υπομεθυλωμένες στο στερεότυπο υποσύνολο #8 κατά τη σύγκριση τόσο με το στερεότυπο υποσύνολο #6 όσο και με τα παρθένα B κύτταρα και τα B κύτταρα μνήμης.

**Πίνακας 11.** Κατάλογος γονιδίων με διαφορεική μεθυλίωση του DNA, διαφορεική έκφραση και στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των δύο μεταβλητών

CpG	Γονιδιακή Τοποθεσία	Γονίδιο	Spearman rho	p-value	δβ #6 vs #8	p-value	Log2FC #6 vs #8	p-value
cg04071104	5'UTR	CHDH	-0,91	0,001	-0,4	0	2,5	0,03
cg06720722	TSS200	TP63	-0,86	0,003	0,44	0,001	-6,7	0,01
cg12188416	TSS1500	TP63	-0,8	0,01	0,39	0,001	-6,7	0,01
cg04489243	TSS200	TP63	-0,68	0,045	0,58	0	-6,7	0,01
cg10454258	Body	IL21R	-0,8	0,01	-0,35	0,004	1,7	0,03
cg05074138	1stExon	CTLA4	-0,79	0,011	-0,43	0	4,4	0,03
cg00050152	Body	BTNL9	-0,76	0,017	0,31	0,002	-6,7	0,01
cg18586780	Body	SH3BP4	-0,68	0,042	0,3	0,007	-3,4	0,01
cg02904488	Body	ZAK	0,76	0,017	-0,37	0,007	-2,5	0,01



**Εικόνα 32.** Γραφήματα με τις τιμές FPKM (έκφραση γονιδίων) και β-τιμές (μεθυλίωση του DNA) για τα 7 γονίδια που έδειξαν διαφορεική έκφραση και μεθυλίωση του DNA. Σε κάθε γράφημα αναφέρεται η συσχέτιση μεταξύ των τιμών τους (spearman rho).

## Μελέτη I

Πρόσφατες μελέτες έχουν τεκμηριώσει εκτεταμένη γενετική ετερογένεια στην κλωνική εξέλιξη της ΧΛΛ με δυσμενή αντίκτυπο στην έκβαση των ασθενών (109, 110). Εκτός από τις γενετικές βλάβες, η ΧΛΛ χαρακτηρίζεται και από αλλοιώσεις στα επιγενετικά πρότυπα και συγκεκριμένα στη μεθυλίωση του DNA (50, 97, 99, 100, 102). Ωστόσο, δεν είναι πλήρως κατανοητό πώς ακριβώς η επιγενετική εμπλέκεται στην εξέλιξη και την υποτροπή της νόσου μετά θεραπεία (102, 111, 124, 125).

Στη παρούσα μελέτη αναλύθηκαν διαχρονικά δείγματα από ΧΛΛ περιπτώσεις που έλαβαν κατά θεραπεία κύριο λόγο με το σχήμα FCR με σκοπό τη διερεύνηση των προτύπων μεθυλίωσης του DNA στην πάροδο του χρόνου και τη συσχέτισή τους με την απάντηση στην θεραπεία. Σε επίπεδο ομάδων, δε βρέθηκαν αλλαγές των προτύπων μεθυλίωσης του DNA συγκρίνοντας τα δείγματα πριν τη θεραπεία με τα δείγματα μετά την υποτροπή που να χαρακτηρίζουν καθολικά όλους τους ασθενείς, εύρημα που βρίσκεται σε συμφωνία με δυο προηγούμενες μελέτες (102, 111). Αυτό πιθανόν εξηγείται από την πολύ μεγάλη ετερογένεια που χαρακτηρίζει τα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA στην ΧΛΛ (124, 126), ακόμα και των περιπτώσεων που ανήκουν στην A-ΧΛΛ (103). Γι' αυτό, καθίσταται προβληματική η αξιολόγηση του συνόλου των ασθενών ως ενιαία ομάδα, καθώς στην παρούσα μελέτη οι 29/34 περιπτώσεις ανήκαν στην A-ΧΛΛ. Σε αυτό συνηγορεί η σύγκριση της μεθυλίωσης του DNA σε επίπεδο μεμονωμένου ασθενούς, εξετάζοντας το επιγενετικό φορτίο αλλά και τις αλλαγές της υποτροπής. Η συγκεκριμένη ανάλυση επιβεβαίωσε τη μεγάλη ετερογένεια που χαρακτηρίζει την ΧΛΛ, αφού σε κάθε ασθενή βρέθηκε να επηρεάζονται διαφορετικός αριθμός και διαφορετικές θέσεις σχετικά τόσο με το επιγενετικό φορτίο όσο και με τις αλλαγές της υποτροπής.

Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, παρατηρήθηκε εκτεταμένη υπομεθυλίωση σε σύγκριση με τα Β κύτταρα μνήμης (95, 99, 101, 123). Επισημαίνεται ότι πρόσφατα αναφέρθηκε ότι ο υψηλός αριθμός αλλαγών ως προς το φυσιολογικά Β κύτταρα, δηλαδή το επιγενετικό φορτίο, είναι δείκτης κακής πρόγνωσης στο λέμφωμα από το

κύτταρο του μανδύα (114). Ακολουθώντας την ίδια στρατηγική ανάλυσης, προέκυψε παρόμοιο αποτέλεσμα στην παρούσα μελέτη αφού το υψηλότερο επιγενετικό φορτίο βρέθηκε να συνδέεται με μικρότερο χρόνο ως την πρώτη θεραπεία.

Σχετικά με τις αλλαγές της υποτροπής, διαπιστώθηκε μεγάλη διακύμανση, με κάποιους ασθενείς να έχουν σταθερά επιγενετικά πρότυπα μετά την υποτροπή, σε αντίθεση με άλλους που έδειξαν επιγενετική εξέλιξη. Ο αριθμός των αλλαγών της υποτροπής εμφάνισε θετική συσχέτιση με το χρόνο έως την υποτροπή. Ειδικότερα, οι ασθενείς που υποτροπίασαν σε λιγότερο από 2 χρόνια δεν έδειξαν εξέλιξη των επιγενετικών προτύπων, υποδηλώνοντας ότι πιθανόν δεν είχαν επαρκή χρόνο για να συσσωρεύσουν αλλαγές και/ή ήταν ήδη επιθετικές. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με πρόσφατη Μελέτη (111), όπου αναφέρθηκε ότι οι περιπτώσεις που παρουσιάζουν επιγενετική εξέλιξη σχετίζονται με μικρό χρόνο μέχρι τη δεύτερη γραμμή θεραπείας και μειωμένη ολική επιβίωση. Οι διαφορές πιθανότατα οφείλονται στο διαφορετικό μέγεθος των αντίστοιχων ομάδων μελέτης (21 έναντι 34 ασθενών στην παρούσα μελέτη), στη διαφορετική μεθοδολογία αλλά και στο γεγονός ότι οι ασθενείς της δημοσιευμένης μελέτης είχαν λάβει ετερογενείς θεραπείες (125). Αναζητώντας συσχετίσεις των διαχρονικών αλλαγών της μεθυλίωσης του DNA με μοριακά και κλινικά χαρακτηριστικά, παρατηρήθηκε ότι οι περιπτώσεις που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53* εμφάνιζαν με υψηλότερο επιγενετικό φορτίο και μικρό χρόνο μέχρι την πρώτη θεραπεία. Αυτό το εύρημα συνδέει μια γενετική βλάβη δυσμενούς πρόγνωσης με υψηλότερη τάση επιγενετικής εξέλιξης, ίσως ως συνέπεια της αυξημένης κυτταρικής διαίρεσης την οποία επάγει (24-26). Η επιγενετική εξέλιξη θα μπορούσε ενδεχομένως να διευκολύνει την κλωνική εξέλιξη, όπως υποδηλώνεται από προηγούμενη μελέτη η οποία έδειξε ότι το υψηλό επίπεδο μεταβολών στη μεθυλίωση του DNA συνοδεύεται από μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης νέων υποκλώνων (20). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι συγκεκριμένες μεταλλάξεις του γονιδίου *TP53* επιτρέπουν στην πρωτεΐνη p53 να προσδένεται και ρυθμίζει θετικά τα ρυθμιστικά γονίδια της χρωματίνης, τα οποία μπορεί να επηρεάσουν τα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA (27).

Οι αλλαγές της μεθυλίωσης του DNA μετά την υποτροπή δεν αποτελούν ένα στοχαστικό φαινόμενο καθώς βρέθηκαν να ακολουθούν ένα πρότυπο που παρατηρείται τόσο κατά τη διαφοροποίηση των B κυττάρων όσο και σε άλλους

τύπους καρκίνου και πιθανόν αποτελεί συνέπεια του ιστορικού πολλαπλασιασμού και της μακράς επιβίωσης των κυττάρων (99, 123, 127, 128). Επίσης, υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις που υποστηρίζουν την αλληλεπίδραση των μεταγραφικών παραγόντων και της μεθυλίωσης του DNA τόσο κατά τη διαφοροποίηση των B κυττάρων όσο και στην ΧΛΛ (99, 101, 123). Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ότι η υπομεθυλίωση του επιγενετικού φορτίου αλλά και των αλλαγών της υποτροπής στοχεύει σε θέσεις πρόσδεσης αρκετών οικογενειών μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με τη βιολογία των B ή/και ΧΛΛ κυττάρων, όπως GATA, STAT, HOX και FOX. Μεταξύ άλλων, βρέθηκαν μεταγραφικοί παράγοντες που έχουν ήδη συσχετιστεί με την υπομεθυλίωση κατά την ωρίμανση των B κυττάρων όπως οι AP-1, POU και IRF αλλά και η οικογένεια NFAT που έχει συσχετιστεί με την ΧΛΛ (101). Επίσης, σε πρόσφατη Μελέτη, οι ενεργοί περιοχές της χρωματίνης στη ΧΛΛ σε σύγκριση με τα φυσιολογικά B κύτταρα βρέθηκαν να σχετίζονται με τις θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων FOX, NFAT και TCF/LEF (105). Ωστόσο, οι μεταγραφικοί παράγοντες EGR2 και E2F4 βρέθηκαν στις υπερμεθυλωμένες περιοχές της υποτροπής, υποδηλώνοντας μια άμεση συσχέτιση με τον μηχανισμό της υποτροπής. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις του γονιδίου *EGR2* έχουν αναφερθεί πρόσφατα σε επιθετικές υποομάδες της ΧΛΛ (129), ενώ ο μεταγραφικός παράγοντας E2F4, ένας βασικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου, έχει βρεθεί απορυθμισμένος τόσο στο λέμφωμα Burkitt όσο και στο διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα B κύτταρα (130).

Τα τελευταία χρόνια, οι επιγενετικές τροποποιήσεις έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο για διαγνωστικούς όσο και για προγνωστικούς σκοπούς στον καρκίνο (131). Ειδικότερα στην ΧΛΛ, η ισχύς της μεθυλίωσης του DNA ως βιοδείκτη αποδείχθηκε σε πρόσφατη μελέτη καθώς ήταν ικανή να ταξινομήσει σωστά τις ΧΛΛ περιπτώσεις σε τρεις υποομάδες με διακριτά κλινικοβιολογικά χαρακτηριστικά με βάση 5 θέσεις CpG (132). Μέσω της εφαρμογής του αλγορίθμου μηχανικής μάθησης Random Forest βρέθηκαν 10 θέσεις CpG που με βάση τα επίπεδα μεθυλίωσης πριν τη θεραπεία μπορούσαν να προβλέψουν με μικρό ποσοστό σφάλματος αν ο ασθενής θα παρουσιάσει υποτροπή σε λιγότερο από 2 χρόνια μετά από θεραπεία με FCR. Είναι ενδιαφέρον ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA της επιγενετικής υπογραφής των 10 CpG παραμένουν σταθερά στον χρόνο και επαληθεύθηκαν σε ανεξάρτητες

περιπτώσεις, αυξάνοντας περαιτέρω τη δυνατότητα χρήσης αυτής της επιγενετικής υπογραφής ως προγνωστικού βιοδείκτη.

Συμπερασματικά, η παρούσα εργασία αναδεικνύει τον ενεργό ρόλο της μεθυλίωσης του DNA στην εξέλιξη της ΧΛΛ, ειδικότερα στην απάντηση με ανοσοχημειοθεραπεία-FCR, περιλαμβάνοντας μεταγραφικούς παράγοντες και συγκεκριμένα γενετικά γεγονότα. Επιπλέον, υπογραμμίζει την πιθανή χρήση των επιπέδων μεθυλίωσης του DNA συγκεκριμένων θέσεων CpGs ως εργαλείου πρόγνωσης στην ΧΛΛ.



## Μελέτη II

Στη ΧΛΛ διαφορετικές κυτταρογενετικές βλάβες συνοδεύονται από διαφορετική πρόγνωση. Μέχρι σήμερα δεν έχει αποσαφηνιστεί αν οι διακριτές κυτταρογενετικές ομάδες χαρακτηρίζονται από διαφορετικά πρότυπα μεθυλίωσης του DNA. Στην παρούσα μελέτη, αναλύθηκε μια μεγάλη ομάδα ασθενών με ΧΛΛ που εμφάνιζαν del(11q) (δυσμενούς πρόγνωσης), del(13q) (ευνοϊκής πρόγνωσης) και τρισωμία 12 (ενδιάμεσης πρόγνωσης). Σε προηγούμενη μελέτη με μικρότερο αριθμό περιπτώσεων (104 vs 255 στην παρούσα μελέτη) βρέθηκαν ΔMCpGs μεταξύ των τριών αυτών υποομάδων, χωρίς όμως να συνδέονται με κάποια βιολογική λειτουργία (99). Στην προσπάθεια να βρεθεί βιολογικό νόημα, αυξήσαμε σημαντικά την ομάδα μελέτης συμπεριλαμβάνοντας τόσο A-ΧΛΛ και M-ΧΛΛ περιπτώσεις. επίσης αναπτύξαμε μια στρατηγική για την αφαίρεση των θέσεων CpG που επηρεάζονται από το μεταλλακτικό φορτίο των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών αλλά και από την επιγενετική υπογραφή του κυττάρου προέλευσης, οι οποίες αποτελούν δύο ισχυρές συνιστώσες στα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA στην ΧΛΛ (97, 99).

Με τη χρήση μη επιβλεπόμενων μεθόδων, η οποία ήταν ανεξάρτητη από το μεταλλακτικό φορτίο των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών, βρέθηκε ότι οι περιπτώσεις που φέρουν τρισωμία 12 φέρουν διακριτά πρότυπα μεθυλίωσης του DNA σε σύγκριση με τις υπόλοιπες περιπτώσεις ΧΛΛ και τα φυσιολογικά Β κύτταρα. Αυτό το εύρημα επιβεβαιώθηκε με διαφορική ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA μεταξύ της τρισωμίας 12 και των φυσιολογικών Β κυττάρων, αλλά και τη σύγκριση με τις περιπτώσεις ΧΛΛ που δε φέρουν τρισωμία 12. Τα αποτελέσματα αυτά προσφέρουν σαφείς ενδείξεις για την επίδραση της μεθυλίωσης του DNA στην κυτταρογενετική υποομάδα της τρισωμίας 12. Η συγκεκριμένη υποομάδα χαρακτηρίζεται από υψηλά ποσοστά κυτταρικού πολλαπλασιασμού, κλινική και βιολογική ετερογένεια (61, 78), καθώς συνδέεται με επιπρόσθετες γενωμικές αλλοιώσεις όπως τρισωμία 19, υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων του γονιδίου *NOTCH1* (79-81) και αυξημένη επίπτωση στο επιθετικό στερεότυπο υποσύνολο #8 (68).

Εστιάζοντας στο βιολογικό νόημα της διακριτής επιγενετικής υπογραφής, βρέθηκε ότι οι ΔMCpGs της τρισωμίας 12 στοχεύουν σε σώματα γονιδίων εκτός νησίδων CpG, όπως ήδη έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία της ΧΛΛ σε σύγκριση με τα φυσιολογικά

B κύτταρα (99). Πιο συγκεκριμένα, η υπομεθυλίωση βρέθηκε σε περιοχές ετεροχρωματίνης και ενισχυτών, ενώ η υπερμεθυλίωση σε κατεσταλμένες περιοχές *polycomb* και ισχυρούς ενισχυτές, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες της ΧΛΛ σε σύγκριση με τα φυσιολογικά B κύτταρα (99, 123).

Επιπλέον, οι A-ΧΛΛ περιπτώσεις που έφεραν τρισωμία 12 έδειξαν μεγαλύτερο αριθμό αλλαγών σε σύγκριση με τις M-ΧΛΛ περιπτώσεις. Εστιάζοντας στις επιθετικές A-ΧΛΛ περιπτώσεις, βρέθηκε συσχέτιση της μεθυλίωσης του DNA με την έκφραση των γονιδίων μόλις στο 3% των DMCPG, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες στη ΧΛΛ (99, 103). Ωστόσο, είναι γνωστό ότι η μεθυλίωση του DNA λειτουργεί ως υπόστρωμα για τις τροποποιήσεις των ιστονών κατά την αντιγραφή του DNA, χωρίς την ανάγκη αναγνώρισης συγκεκριμένων αλληλουχιών (133). Επίσης, πρόσφατη Μελέτη έδειξε ότι η τρισωμία 12 έχει διακριτά επιγενετικά πρότυπα σε επίπεδο ακετυλίωσης και ανοιχτής χρωματίνης σε σύγκριση με τις υπόλοιπες περιπτώσεις ΧΛΛ, παρόμοια με τα πρότυπα των φυσιολογικών B κυττάρων. Συνοψίζοντας σε επιγενετικό επίπεδο, η τρισωμία 12 δείχνει ένα κέρδος της μεθυλίωσης του DNA τόσο μεταξύ των φυσιολογικών B κυττάρων αλλά και των υπόλοιπων ΧΛΛ περιπτώσεων αλλά φαίνεται να υστερεί σε αλλαγές στη χρωματίνη σε σύγκριση με τις υπόλοιπες περιπτώσεις ΧΛΛ και σε αντιπαράθεση με τα φυσιολογικά B κύτταρα. Καθώς η μεθυλίωση του DNA διατηρεί ένα αποτύπωμα της ιστορίας του κυττάρου, τα παραπάνω ευρήματα υποστηρίζουν περαιτέρω τη μοναδικότητα της τρισωμίας 12 (123).

Παρά το γεγονός της χαμηλής συσχέτισης της έκφρασης των γονιδίων με τη μεθυλίωση του DNA, η μελέτη επιβεβαίωσε την πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ των επιγενετικών δεικτών (134, 135), αφού βρέθηκε σημαντική επικάλυψη των περιοχών της μεθυλίωσης, ακετυλίωσης και ανοιχτής χρωματίνης. Η ενοποίηση των διαφορετικών αυτών δεδομένων αποκάλυψε 4 γονίδια (*PPP1R9A*, *TFDP1*, *C1orf228*, *GPD2*) με διαφορετική έκφραση και μεθυλίωση του DNA που εδράζονται σε ανοιχτή και ενεργό χρωματίνη στην τρισωμία 12 σε σύγκριση με τις A-ΧΛΛ περιπτώσεις χωρίς τρισωμία 12. Ειδικότερα, τα γονίδια *PPP1R9A*, *C1orf228* και *TFDP1* βρέθηκαν υπομεθυλωμένα και υπερεκφραζόμενα στην τρισωμία 12 σε σύγκριση με τις υπόλοιπες A-ΧΛΛ περιπτώσεις. Παράλληλα, η διερεύνηση του ρόλου της μεθυλίωσης του DNA σε απομακρυσμένες ενεργές περιοχές του γονιδιώματος αποκάλυψε 8 CpGs

όπου τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA συνάδουν με την έκφραση κοντινών γονιδίων στην τρισωμία 12 σε σύγκριση με τις υπόλοιπες A-ΧΛΛ περιπτώσεις (*ERC1, HS3ST1, NCKAP1L, PARP11, TBCD, TNFRSF10D, XBP1*). Επίσης, ο μεταγραφικός παράγοντας XBP1 μαζί με τους NFI -B και -C, MYCN και TFCEP2 έδειξε στατιστικά σημαντικό εμπλουτισμό πρόσδεσης στις υπομεθυλιωμένες και ενεργές περιοχές της επιγενετικής υπογραφής, προτείνοντας ένα ρυθμιστικό κύκλωμα μεταξύ της επιγενετικής ρύθμισης και της έκφρασης των γονιδίων στο οποίο καθοριστική είναι επίσης και η συμβολή των μεταγραφικών παραγόντων. Τα γονίδια που έδειξαν διακριτά πρότυπα για την τρισωμία 12 ίσως εμπλέκονται στο διακριτό βιολογικό της υπόβαθρο αφού βρέθηκαν να σχετίζονται με την ΧΛΛ ή άλλους καρκίνους.

Εκτός από την ανάλυση σε επίπεδο ομάδων, υπολογίστηκε το επιγενετικό φορτίο, δηλαδή ο αριθμός των αλλαγών της μεθυλίωσης του DNA κάθε ασθενή σε σύγκριση με τα Β κύτταρα μνήμης. Τα Β κύτταρα μνήμης προτιμήθηκαν έναντι των παρθένων Β κυττάρων επειδή τα ΧΛΛ κύτταρα εμφανίζουν παραπάνω από το 70% του προγραμματισμού των Β κυττάρων μνήμης (101) και, όπως αποδείχθηκε στην παρούσα μελέτη, μοιράζονται κοινά πρότυπα μεθυλίωσης με τα Β κύτταρα μνήμης (PC1 στην **Εικόνα 21**). Η ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA σε επίπεδο μεμονωμένου ασθενούς ανέδειξε μεγάλη ετερογένεια μεταξύ των περιπτώσεων ΧΛΛ και μαζική υπομεθυλίωση σε σύγκριση με τα Β κύτταρα μνήμης, σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (95, 99, 101, 123). Συγκεκριμένα, οι περιπτώσεις που έφεραν del(11q) έδειξαν υψηλότερο επιγενετικό φορτίο σε σύγκριση με τις περιπτώσεις που έφεραν del(13q) και τρισωμία 12, εύρημα που υποστηρίζει περεταίρω την υψηλή επιγενετική εξέλιξη σε κλινικά επιθετικές περιπτώσεις, όπως αναφέρθηκε στο λέμφωμα κυττάρων του μανδύα (101). Με άλλα λόγια, η εμφάνιση μαζικού επιγενετικού επαναπρογραμματισμού είναι αποτέλεσμα της κλινικής επιθετικότητας που συνδυάζεται με υψηλά ποσοστά πολλαπλασιασμού, π.χ. σε περιπτώσεις με del(11q) (136).

Συμπερασματικά, τα δεδομένα μας αποκάλυψαν ότι διαφορετικές κυτταρογενετικές υποομάδες συνδέονται με διαφορετικές επιγενετικές συνθέσεις. Οι υπογραφές μεθυλίωσης του DNA της tris12 τόσο σε σύγκριση με τα φυσιολογικά Β κύτταρα αλλά και μεταξύ των ΧΛΛ περιπτώσεων τονίζουν το μοναδικό βιολογικό υπόβαθρο της τρισωμίας 12. Επίσης, τα διακριτά πρότυπα μεθυλίωσης του DNA έδειξαν μεγάλη

ομοιότητα με τα πρότυπα ακετυλίωσης, ενός δείκτη ενεργότητας της χρωματίνης. Από την άλλη, παρατηρήσαμε υψηλότερο επιγενετικό φορτίο στις περιπτώσεις με del(11q), που αντιπροσωπεύει έναν νέο πιθανό προγνωστικό βιοδείκτη για την ΧΛΛ. Συνολικά, τα αποτελέσματά μας παρέχουν μια ισχυρή ένδειξη για την αλληλεπίδραση μεταξύ επιγενετικών και γενετικών δεικτών στην ΧΛΛ.

## Μελέτη III

Αλλοιώσεις στα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA αναφέρονται ως γενικό χαρακτηριστικό της ΧΛΛ (95, 97, 98, 137-139). Αλλαγές στη μεθυλίωση των υποκινητών διαφόρων γονιδίων έχουν συσχετιστεί με την κλινική πορεία των ασθενών, υπογραμμίζοντας τον αντίκτυπο των επιγενετικών τροποποιήσεων στη βιολογική και κλινική συμπεριφορά των λευχαιμικών κλώνων (97, 98, 137, 139). Οι συγκεκριμένες αλλαγές αφορούσαν είτε σε (i) υπομεθυλίωση σε σημαντικά γονίδια (π.χ. ογκογονίδιο *MYC*, αντι-αποπτωτικό γονίδιο *BCL2*), η οποία οδήγησε σε αύξηση στην έκφρασή τους, είτε σε (ii) υπερμεθυλίωση σε υποκινητές διαφόρων ογκοκατασταλτικών γονιδίων που είχε ως αποτέλεσμα την αποσιώπησή τους π.χ. γονίδια που εμπλέκονται στην απόπτωση (*DAPK1*, *WIF1*, *ID4*, και *SFRPs*), ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου [*CDKN2A* (p16INK4) και *CDKN2B* (p15INK4)], και το γονίδιο επιδιόρθωσης *MLH1* του οποίου η αποσιώπηση σχετίζεται με την εξέλιξη της ΧΛΛ σε σύνδρομο Richter (96). Τέλος, επισημαίνεται ότι μελέτες του γονιδιώματος σε ευρεία κλίμακα του γονιδιώματος ανέδειξαν διακριτά πρότυπα μεθυλίωσης του DNA μεταξύ συγκεκριμένων προγνωστικών ομάδων της ΧΛΛ, π.χ. M-ΧΛΛ και A-ΧΛΛ, υπογραμμίζοντας την ετερογένεια της νόσου και σε επιγενετικό επίπεδο (97, 139). Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν τα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA σε υποομάδες ασθενών A-ΧΛΛ και, πιο συγκεκριμένα, σε περιπτώσεις των στερεότυπων υποσύνολων #6 και #8 και αλλά και περιπτώσεις A-ΧΛΛ που δεν ανήκουν σε στερεότυπο υποσύνολο. Βασική επιδίωξη ήταν να εντοπιστούν επιγενετικές τροποποιήσεις που πιθανόν εξηγούν τη διαφορετική κλινική συμπεριφορά των συγκεκριμένων υποομάδων.

Με τη χρήση μικροσυστοιχιών DNA παρατηρήθηκαν διακριτά πρότυπα μεθυλίωσης στο στερεότυπο υποσύνολο #8 σε σύγκριση με το στερεότυπο υποσύνολο #6 αλλά και τις A-ΧΛΛ περιπτώσεις που δεν ανήκαν σε κάποιο στερεότυπο υποσύνολο. Αυτό ίσως συνδέεται με την επιθετικότητα του στερεότυπου υποσύνολου #8, το οποίο χαρακτηρίζεται από πολύ αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης συνδρόμου Richter, η οποία είναι ανεξάρτητη από άλλους προγνωστικούς δείκτες (70). Η συσχέτιση των επιπέδων μεθυλίωσης του DNA με την έκφραση των γονιδίων αποκάλυψε σημαντικές συσχετίσεις για λίγες θέσεις CpG, σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (99).

Συγκεκριμένα, η αρνητική συσχέτιση της μεθυλίωσης του DNA με την έκφραση των γονιδίων βρέθηκε να στοχεύει σε υποκινητές γονιδίων. Επίσης, μεταξύ των γονιδίων με στατιστικά σημαντική συσχέτιση βρέθηκαν τα γονίδια *BTNL9*, *CHDH*, *CTLA4*, *IL21R*, *SH3BP4*, *ZAK* και *TP63*, τα οποία παρουσίαζαν διαφορετική έκφραση και διαφορεική μεθυλίωση του DNA μεταξύ των δύο στερεότυπων υποσυνόλων και πιθανόν εμπλέκονται στο διαφορετικό βιολογικό υπόβαθρο και την κλινική πορεία τους.

Μολονότι οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των περισσότερων από αυτά τα γονίδια εμπλέκονται σε διάφορους καρκίνους, ελάχιστες είναι οι πληροφορίες που υπάρχουν για τη ΧΛΛ (140-142), με εξαίρεση τα γονίδια *IL21R*, *CTLA4* και *TP63*. Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει ότι το γονίδιο *IL-21R* ρυθμίζεται θετικά από το CD40 και σηματοδοτεί προαποπτωτική σηματοδότηση στα ΧΛΛ κύτταρα(143), ενώ τα υψηλά επίπεδα *CTLA4* συνδέονται με καλή πρόγνωση(144). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με αυτή την παρατήρηση, καθώς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *CTLA4* ήταν υψηλότερα στο στερεότυπο υποσύνολο #6 σε σύγκριση με το #8, σε συμφωνία με τη λιγότερο επιθετική κλινική συμπεριφορά του.

Από την άλλη, το γονίδιο *TP63* εμφάνισε τις περισσότερες διαφορεικά μεθυλιωμένες θέσεις CpGs. Συγκεκριμένα, βρέθηκε υπομεθυλιωμένο και υπερεκφραζόμενο στο υποσύνολο #8 σε σχέση με όλες τις άλλες ομάδες ασθενών που εξετάστηκαν. Επιπλέον, βρέθηκε υπομεθυλιωμένο στο στερεότυπο υποσύνολο #8 και κατά τη σύγκριση με τα παρθένα B κύτταρα και B κύτταρα μνήμης. Ο ρόλος του συγκεκριμένου γονιδίου σε νεοπλασίες των B κύτταρων είναι ασαφής. Ιδιαίτερα στην ΧΛΛ, οι δύο δημοσιευμένες μελέτες ανέφεραν αντικρουόμενα αποτελέσματα, προτείνοντας το γονίδιο *TP63* ως προαποπτωτικό ή αντι-αποπτωτικό παράγοντα(145, 146).

Συμπερασματικά, το στερεότυπο υποσύνολο #8 έδειξε διακριτή επιγενετική υπογραφή σε σύγκριση με το στερεότυπο υποσύνολο #6, η οποία πιθανόν συνδέεται με την επιθετικότητα του συγκεκριμένου υποσυνόλου. Η δεδομένη χαμηλή συσχέτιση των αλλαγών στη μεθυλίωση του DNA με την έκφραση των γονιδίων, αποκάλυψε μικρό αριθμό μεταβαλλόμενων γονιδίων που ενδέχεται να εμπλέκονται στις διαφορές των δύο στερεότυπων υποσυνόλων, όπως το γονίδιο *TP63*.

## Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη προσφέρει νέα δεδομένα για τη συνεισφορά της μεθυλίωσης του DNA στην εξέλιξη και την υποτροπή της ΧΛΛ καθώς και στα διακριτά κλινικοβιολογικά χαρακτηριστικά υποομάδων ΧΛΛ. Τα κύρια συμπεράσματα συνοψίζονται ως εξής:

- Ο ενεργός ρόλος της μεθυλίωσης του DNA στην πρόοδο της ΧΛΛ αλλά και στην υποτροπή αναδείχθηκε από την ανάλυση διαχρονικών δειγμάτων, ακολουθώντας διαφορετική δυναμική σε ανάλυση μεμονωμένου ασθενούς. Διαπιστώθηκε συσχέτιση των αλλαγών της μεθυλίωσης του DNA τόσο με το χρόνο έως την πρώτη θεραπεία αλλά και με το χρόνο έως την υποτροπή.
- Οι περιπτώσεις με μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53* και οι περιπτώσεις που φέρουν *del(11q)* έδειξαν υψηλό επιγενετικό φορτίο, ίσως ως αποτέλεσμα της κλινικής επιθετικότητας και των υψηλών ποσοστών κυτταρικού πολλαπλασιασμού που τις χαρακτηρίζει (24-26).
- Οι αλλαγές στα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA τόσο κατά την υποτροπή όσο και κατά τη σύγκριση μεταξύ των υποομάδων της ΧΛΛ έδειξαν να στοχεύουν σε κοινά λειτουργικά στοιχεία των γονιδίων και της χρωματίνης. Συνολικά, αυτά τα ευρήματα επιβεβαιώνουν ότι οι αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA σε σύγκριση με τα φυσιολογικά Β κύτταρα αλλά και μεταξύ των περιπτώσεων ΧΛΛ χαρακτηρίζονται από επιλεκτικότητα, ένδειξη ότι δεν πρόκειται για στοχαστικό φαινόμενο.
- Η χαμηλή συσχέτιση της μεθυλίωσης του DNA με την έκφραση των γονιδίων στη ΧΛΛ (99) επιβεβαιώθηκε στην παρούσα διατριβή. Παράλληλα, αναδείχθηκε σημαντικός αριθμός υποψηφίων γονιδίων που ρυθμίζονται από επιγενετικά φαινόμενα και ίσως εμπλέκονται στα διακριτά κλινικοβιολογικά χαρακτηριστικά των υποομάδων στην ΧΛΛ.
- Οι ΔΜCpGs του επιγενετικού φορτίου, της υποτροπής αλλά και της επιγενετικής υπογραφής της τρισωμίας 12 έδειξαν σημαντική συσχέτιση με θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων. Η μεγάλη αλληλεπίδραση μεταξύ μεταγραφικών παραγόντων και αλλαγών της μεθυλίωσης του DNA στη

ΧΛΛ αναφέρθηκε πρόσφατα τόσο σε σύγκριση με τα φυσιολογικά Β κύτταρα αλλά και μεταξύ υποομάδων ΧΛΛ (101, 128).

- Αναδείχθηκε η δυνατότητα χρήσης των επιπέδων μεθυλίωσης συγκεκριμένων θέσεων CpG ως εργαλείου με προβλεπτική αξία. Συγκεκριμένα, η επιγενετική υπογραφή των 10 CpGs προβλέπει με μεγάλη ακρίβεια τις περιπτώσεις που υποτροπιάζουν >2 χρόνια μετά τη χορήγηση FCR.



# Βιβλιογραφία

1. Janeway C TP. The immune system in health and disease. 2nd ed: Garland Publishing Inc.
2. Janeway. An Introduction to immunobiology and Innate Immunity. 7th ed2008.
3. Adler R. Janeway's immunobiology. Choice: Current Reviews for Academic Libraries. 2008;45(10):1793-4.
4. Burmester. Color Atlas of immunology. 2nd ed: Thieme; 2003. 25-32 p.
5. Lefranc MP LG. The immunoglobulin FactsBook. London: Academic Press; 2001.
6. Goldsby. Immunology. W H Freeman & Co; 2006.
7. Melchers F. Checkpoints that control B cell development. J Clin Invest. 2015;125(6):2203-10.
8. Matthias P, Rolink AG. Transcriptional networks in developing and mature B cells. Nat Rev Immunol. 2005;5(6):497-508.
9. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. Blood. 2008;112(5):1570-80.
10. Melchers F, Rolink AR. B cell tolerance--how to make it and how to break it. Current topics in microbiology and immunology. 2006;305:1-23.
11. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. Nat Rev Immunol. 2008;8(1):22-33.
12. 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.
13. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Mechanisms of disease: Chronic lymphocytic leukemia. New Engl J Med. 2005;352(8):804-15.
14. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. Am J Hematol. 2015;90(5):446-60.
15. 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. British journal of haematology. 2007;139(5):672-86.
16. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. The New England journal of medicine. 2005;352(8):804-15.
17. Chiorazzi N. Implications of new prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2012;2012:76-87.
18. 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.
19. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Boudjogra M, Guida G, Smilevska T, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. Blood. 2007;109(1):259-70.
20. Darzentas N, Hadzidimitriou A, Murray F, Hatzi K, Josefsson P, Laoutaris N, et al. A different ontogenesis for chronic lymphocytic leukemia cases carrying stereotyped antigen receptors: molecular and computational evidence. Leukemia. 2010;24(1):125-32.
21. Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. Blood. 2011;117(6):1781-91.

22. 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.
23. 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.
24. Woyach JA, Johnson AJ. Targeted therapies in CLL: mechanisms of resistance and strategies for management. *Blood*. 2015;126(4):471-7.
25. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2010;376(9747):1164-74.
26. Rossi D, Terzi-di-Bergamo L, De Paoli L, Cerri M, Ghilardi G, Chiarenza A, et al. Molecular prediction of durable remission after first-line fludarabine-cyclophosphamide-rituximab in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015;126(16):1921-4.
27. Thompson PA, Tam CS, O'Brien SM, Wierda WG, Stingo F, Plunkett W, et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab treatment achieves long-term disease-free survival in IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2016;127(3):303-9.
28. Fischer K, Bahlo J, Fink AM, Goede V, Herling CD, Cramer P, et al. Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood*. 2016;127(2):208-15.
29. Brown JR, Byrd JC, Coutre SE, Benson DM, Flinn IW, Wagner-Johnston ND, et al. Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110delta, for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;123(22):3390-7.
30. Byrd JC, O'Brien S, James DF. Ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2013;369(13):1278-9.
31. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2013;369(1):32-42.
32. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2014;370(11):997-1007.
33. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, et al. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(4):311-22.
34. Schroeder HW, Jr., Dighiero G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunology today*. 1994;15(6):288-94.
35. Hashimoto S, Dono M, Wakai M, Allen SL, Lichtman SM, Schulman P, et al. Somatic diversification and selection of immunoglobulin heavy and light chain variable region genes in IgG+ CD5+ chronic lymphocytic leukemia B cells. *The Journal of experimental medicine*. 1995;181(4):1507-17.
36. 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. *The Journal of clinical investigation*. 1998;102(8):1515-25.
37. 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.
38. Forconi F, Sahota SS, Lauria F, Stevenson FK. Revisiting the definition of somatic mutational status in B-cell tumors: does 98% homology mean that a V(H)-gene is unmutated? *Leukemia*. 2004;18(4):882-3.
39. Kostareli E, Gounari M, Agathangelidis A, Stamatopoulos K. Immunoglobulin gene repertoire in chronic lymphocytic leukemia: insight into antigen selection and

- microenvironmental interactions. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2012;4(1):e2012052.
40. Fabbri G, Dalla-Favera R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(3):145-62.
41. Mertens D, Stilgenbauer S. Prognostic and predictive factors in patients with chronic lymphocytic leukemia: relevant in the era of novel treatment approaches? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(9):869-72.
42. Sutton LA, Rosenquist R. Deciphering the molecular landscape in chronic lymphocytic leukemia: time frame of disease evolution. *Haematologica*. 2015;100(1):7-16.
43. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Rossi D, Minga E, Villamor N, et al. Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2015;29(2):329-36.
44. 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.
45. 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.
46. Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, Ghiotto F, Allen SL, Koltz J, et al. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of experimental medicine*. 2004;200(4):519-25.
47. Stamatopoulos K, Agathangelidis A, Rosenquist R, Ghia P. Antigen receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2017;31(2):282-91.
48. Athanasiadou A, Stamatopoulos K, Gaitatzi M, Stavroyianni N, Fassas A, Anagnostopoulos A. Recurrent cytogenetic findings in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia expressing IgG-switched stereotyped immunoglobulins. *Haematologica*. 2008;93(3):473-4.
49. Marincevic M, Cahill N, Gunnarsson R, Isaksson A, Mansouri M, Goransson H, et al. High-density screening reveals a different spectrum of genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia patients with 'stereotyped' IGHV3-21 and IGHV4-34 B-cell receptors. *Haematologica*. 2010;95(9):1519-25.
50. Kanduri M, Marincevic M, Halldorsdottir AM, Mansouri L, Junevik K, Ntoufa S, et al. Distinct transcriptional control in major immunogenetic subsets of chronic lymphocytic leukemia exhibiting subset-biased global DNA methylation profiles. *Epigenetics*. 2012;7(12):1435-42.
51. Marincevic M, Mansouri M, Kanduri M, Isaksson A, Goransson H, Smedby KE, et al. Distinct gene expression profiles in subsets of chronic lymphocytic leukemia expressing stereotyped IGHV4-34 B-cell receptors. *Haematologica*. 2010;95(12):2072-9.
52. Papakonstantinou N, Ntoufa S, Chartomatsidou E, Papadopoulos G, Hatzigeorgiou A, Anagnostopoulos A, et al. Differential microRNA profiles and their functional implications in different immunogenetic subsets of chronic lymphocytic leukemia. *Molecular medicine*. 2013;19:115-23.
53. Ntoufa S, Vardi A, Papakonstantinou N, Anagnostopoulos A, Aleporou-Marinou V, Belessi C, et al. Distinct innate immunity pathways to activation and tolerance in subgroups of chronic lymphocytic leukemia with distinct immunoglobulin receptors. *Molecular medicine*. 2012;18:1281-91.
54. Arvaniti E, Ntoufa S, Papakonstantinou N, Touloumenidou T, Laoutaris N, Anagnostopoulos A, et al. Toll-like receptor signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia: distinct gene expression profiles of potential pathogenic significance in specific subsets of patients. *Haematologica*. 2011;96(11):1644-52.

55. Sutton LA, Rosenquist R. The complex interplay between cell-intrinsic and cell-extrinsic factors driving the evolution of chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in cancer biology*. 2015;34:22-35.
56. Sutton LA, Young E, Baliakas P, Hadzidimitriou A, Moysiadis T, Plevova K, et al. Different spectra of recurrent gene mutations in subsets of chronic lymphocytic leukemia harboring stereotyped B-cell receptors. *Haematologica*. 2016.
57. Mansouri L, Sutton LA, Ljungstrom V, Bondza S, Arngarden L, Bhoi S, et al. Functional loss of IkappaBepsilon leads to NF-kappaB deregulation in aggressive chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of experimental medicine*. 2015;212(6):833-43.
58. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Minga E, Agathangelidis A, Nichelatti M, et al. Clinical effect of stereotyped B-cell receptor immunoglobulins in chronic lymphocytic leukaemia: a retrospective multicentre study. *The Lancet Haematology*. 2014;1(2):e74-84.
59. Baliakas P, Agathangelidis A, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Minga E, Tsanousa A, et al. Not all IGHV3-21 chronic lymphocytic leukemias are equal: prognostic considerations. *Blood*. 2015;125(5):856-9.
60. Malcikova J, Stalika E, Davis Z, Plevova K, Trbusek M, Mansouri L, et al. The frequency of TP53 gene defects differs between chronic lymphocytic leukaemia subgroups harbouring distinct antigen receptors. *British journal of haematology*. 2014;166(4):621-5.
61. Rossi D, Spina V, Bomben R, Rasi S, Dal-Bo M, Brusca A, et al. Association between molecular lesions and specific B-cell receptor subsets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;121(24):4902-5.
62. Strefford JC, Sutton LA, Baliakas P, Agathangelidis A, Malcikova J, Plevova K, et al. Distinct patterns of novel gene mutations in poor-prognostic stereotyped subsets of chronic lymphocytic leukemia: the case of SF3B1 and subset #2. *Leukemia*. 2013;27(11):2196-9.
63. Hadzidimitriou A, Darzentas N, Murray F, Smilevska T, Arvaniti E, Tresoldi C, et al. Evidence for the significant role of immunoglobulin light chains in antigen recognition and selection in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009;113(2):403-11.
64. 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.
65. Sutton LA, Kostareli E, Stalika E, Tsaftaris A, Anagnostopoulos A, Darzentas N, et al. Temporal dynamics of clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia with stereotyped IGHV4-34/IGKV2-30 antigen receptors: longitudinal immunogenetic evidence. *Molecular medicine*. 2013;19:230-6.
66. Sutton LA, Papadopoulos G, Hadzidimitriou A, Papadopoulos S, Kostareli E, Rosenquist R, et al. An entity evolving into a community: defining the common ancestor and evolutionary trajectory of chronic lymphocytic leukemia stereotyped subset #4. *Molecular medicine*. 2014;20:720-8.
67. 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.
68. Vardi A, Agathangelidis A, Sutton LA, Chatzouli M, Scarfo L, Mansouri L, et al. IgG-switched CLL has a distinct immunogenetic signature from the common MD variant: ontogenetic implications. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014;20(2):323-30.
69. Gounari M, Ntoufa S, Apollonio B, Papakonstantinou N, Ponzoni M, Chu CC, et al. Excessive antigen reactivity may underlie the clinical aggressiveness of chronic lymphocytic leukemia stereotyped subset #8. *Blood*. 2015;125(23):3580-7.

70. Rossi D, Spina V, Cerri M, Rasi S, Deambrogi C, De Paoli L, et al. Stereotyped B-cell receptor is an independent risk factor of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Clin Cancer Res*. 2009;15(13):4415-22.
71. Stevenson FK, Forconi F, Packham G. The meaning and relevance of B-cell receptor structure and function in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol*. 2014;51(3):158-67.
72. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343(26):1910-6.
73. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*. 2015;526(7574):525-30.
74. Baliakas P, Mattsson M, Stamatopoulos K, Rosenquist R. Prognostic indices in chronic lymphocytic leukaemia: where do we stand how do we proceed? *Journal of internal medicine*. 2016;279(4):347-57.
75. Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer cell*. 2010;17(1):28-40.
76. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(24):15524-9.
77. Neilson JR, Auer R, White D, Bienz N, Waters JJ, Whittaker JA, et al. Deletions at 11q identify a subset of patients with typical CLL who show consistent disease progression and reduced survival. *Leukemia*. 1997;11(11):1929-32.
78. Tsimberidou AM, Keating MJ. Richter syndrome: biology, incidence, and therapeutic strategies. *Cancer*. 2005;103(2):216-28.
79. Ibbotson R, Athanasiadou A, Sutton LA, Davis Z, Gardiner A, Baliakas P, et al. Coexistence of trisomies of chromosomes 12 and 19 in chronic lymphocytic leukemia occurs exclusively in the rare IgG-positive variant. *Leukemia*. 2012;26(1):170-2.
80. Baliakas P, Iskas M, Gardiner A, Davis Z, Plevova K, Nguyen-Khac F, et al. Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *American journal of hematology*. 2014;89(3):249-55.
81. Del Giudice I, Rossi D, Chiaretti S, Marinelli M, Tavolaro S, Gabrielli S, et al. NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL. *Haematologica*. 2012;97(3):437-41.
82. Puente XS, Bea S, Valdes-Mas R, Villamor N, Gutierrez-Abril J, Martin-Subero JI, et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2015;526(7574):519-24.
83. Ghavifekr Fakhri M, Farshdousti Hagh M, Shanehbandi D, Baradaran B. DNA Methylation Pattern as Important Epigenetic Criterion in Cancer. *Genetics research international*. 2013;2013:317569.
84. Tost J. DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. *Molecular biotechnology*. 2010;44(1):71-81.
85. Ernst J, Kheradpour P, Mikkelsen TS, Shores N, Ward LD, Epstein CB, et al. Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature*. 2011;473(7345):43-9.
86. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*. 2012;150(1):12-27.

87. Klutstein M, Nejman D, Greenfield R, Cedar H. DNA Methylation in Cancer and Aging. *Cancer Res.* 2016;76(12):3446-50.
88. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nature biotechnology.* 2010;28(10):1057-68.
89. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology.* 2013;38(1):23-38.
90. Wu X, Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat Rev Genet.* 2017;18(9):517-34.
91. Tost J. DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. *Methods in molecular biology.* 2009;507:3-20.
92. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & development.* 2011;25(10):1010-22.
93. Doi A, Park IH, Wen B, Murakami P, Aryee MJ, Irizarry R, et al. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet.* 2009;41(12):1350-3.
94. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet.* 2012;13(7):484-92.
95. Wahlfors J, Hiltunen H, Heinonen K, Hamalainen E, Alhonen L, Janne J. Genomic hypomethylation in human chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1992;80(8):2074-80.
96. Plass C, Byrd JC, Raval A, Tanner SM, de la Chapelle A. Molecular profiling of chronic lymphocytic leukaemia: genetics meets epigenetics to identify predisposing genes. *British journal of haematology.* 2007;139(5):744-52.
97. Kanduri M, Cahill N, Goransson H, Enstrom C, Ryan F, Isaksson A, et al. Differential genome-wide array-based methylation profiles in prognostic subsets of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2010;115(2):296-305.
98. Raval A, Lucas DM, Matkovic JJ, Bennett KL, Liyanarachchi S, Young DC, et al. TWIST2 demonstrates differential methylation in immunoglobulin variable heavy chain mutated and unmutated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2005;23(17):3877-85.
99. Kulis M, Heath S, Bibikova M, Queiros AC, Navarro A, Clot G, et al. Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet.* 2012;44(11):1236-42.
100. Pei L, Choi JH, Liu J, Lee EJ, McCarthy B, Wilson JM, et al. Genome-wide DNA methylation analysis reveals novel epigenetic changes in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenetics.* 2012;7(6):567-78.
101. Oakes CC, Seifert M, Assenov Y, Gu L, Przekopowicz M, Ruppert AS, et al. DNA methylation dynamics during B cell maturation underlie a continuum of disease phenotypes in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet.* 2016;48(3):253-64.
102. Cahill N, Bergh AC, Kanduri M, Goransson-Kultima H, Mansouri L, Isaksson A, et al. 450K-array analysis of chronic lymphocytic leukemia cells reveals global DNA methylation to be relatively stable over time and similar in resting and proliferative compartments. *Leukemia.* 2013;27(1):150-8.
103. Papakonstantinou N, Ntoufa S, Tsagiopoulou M, Moysiadis T, Bhoi S, Malousi A, et al. Integrated epigenomic and transcriptomic analysis reveals TP63 as a novel player in clinically aggressive chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer.* 2019;144(11):2695-706.
104. Rendeiro AF, Schmidl C, Strefford JC, Walewska R, Davis Z, Farlik M, et al. Chromatin accessibility maps of chronic lymphocytic leukaemia identify subtype-specific epigenome signatures and transcription regulatory networks. *Nat Commun.* 2016;7:11938.
105. Beekman R, Chapaprieta V, Russinol N, Vilarrasa-Blasi R, Verdaguer-Dot N, Martens JHA, et al. The reference epigenome and regulatory chromatin landscape of chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med.* 2018;24(6):868-80.

106. Ott CJ, Federation AJ, Schwartz LS, Kasar S, Klitgaard JL, Lenci R, et al. Enhancer Architecture and Essential Core Regulatory Circuitry of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell*. 2018;34(6):982-95 e7.
107. Bea S, Lopez-Guillermo A, Ribas M, Puig X, Pinyol M, Carrio A, et al. Genetic imbalances in progressed B-cell chronic lymphocytic leukemia and transformed large-cell lymphoma (Richter's syndrome). *The American journal of pathology*. 2002;161(3):957-68.
108. Shanafelt TD, Witzig TE, Fink SR, Jenkins RB, Paternoster SF, Smoley SA, et al. Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(28):4634-41.
109. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*. 2013;152(4):714-26.
110. Ljungstrom V, Cortese D, Young E, Pandzic T, Mansouri L, Plevova K, et al. Whole-exome sequencing in relapsing chronic lymphocytic leukemia: clinical impact of recurrent RPS15 mutations. *Blood*. 2016;127(8):1007-16.
111. Oakes CC, Claus R, Gu L, Assenov Y, Hullein J, Zucknick M, et al. Evolution of DNA methylation is linked to genetic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer discovery*. 2014;4(3):348-61.
112. Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, et al. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*. 2011;98(4):288-95.
113. Duran-Ferrer M, Beekman R, Martin-Subero JJ. In silico deconvolution and purification of cancer epigenomes. *Oncoscience*. 2017;4(3-4):25-6.
114. Queiros AC, Beekman R, Vilarrasa-Blasi R, Duran-Ferrer M, Clot G, Merkel A, et al. Decoding the DNA Methylome of Mantle Cell Lymphoma in the Light of the Entire B Cell Lineage. *Cancer cell*. 2016;30(5):806-21.
115. Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, Ladd-Acosta C, Feinberg AP, Hansen KD, et al. Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics*. 2014;30(10):1363-9.
116. Maksimovic J, Gordon L, Oshlack A. SWAN: Subset-quantile within array normalization for illumina infinium HumanMethylation450 BeadChips. *Genome biology*. 2012;13(6):R44.
117. Feber A, Guilhamon P, Lechner M, Fenton T, Wilson GA, Thirlwell C, et al. Using high-density DNA methylation arrays to profile copy number alterations. *Genome biology*. 2014;15(2):R30.
118. Morris TJ, Butcher LM, Feber A, Teschendorff AE, Chakravarthy AR, Wojdacz TK, et al. ChAMP: 450k Chip Analysis Methylation Pipeline. *Bioinformatics*. 2014;30(3):428-30.
119. Diaz-Uriarte R. GeneSrF and varSelRF: a web-based tool and R package for gene selection and classification using random forest. *BMC bioinformatics*. 2007;8:328.
120. Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC bioinformatics*. 2013;14:128.
121. Khan A, Fornes O, Stigliani A, Gheorghe M, Castro-Mondragon JA, van der Lee R, et al. JASPAR 2018: update of the open-access database of transcription factor binding profiles and its web framework. *Nucleic acids research*. 2018;46(D1):D260-D6.
122. Tan G, Lenhard B. TFBSTools: an R/bioconductor package for transcription factor binding site analysis. *Bioinformatics*. 2016;32(10):1555-6.
123. Kulis M, Merkel A, Heath S, Queiros AC, Schuyler RP, Castellano G, et al. Whole-genome fingerprint of the DNA methylome during human B cell differentiation. *Nature genetics*. 2015;47(7):746-56.

124. Landau DA, Clement K, Ziller MJ, Boyle P, Fan J, Gu H, et al. Locally disordered methylation forms the basis of intratumor methylome variation in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer cell*. 2014;26(6):813-25.
125. Smith EN, Ghia EM, DeBoever CM, Rassenti LZ, Jepsen K, Yoon KA, et al. Genetic and epigenetic profiling of CLL disease progression reveals limited somatic evolution and suggests a relationship to memory-cell development. *Blood cancer journal*. 2015;5:e303.
126. Guieze R, Wu CJ. Genomic and epigenomic heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015;126(4):445-53.
127. Cahill N, Rosenquist R. Uncovering the DNA methylome in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*. 2013;8(2):138-48.
128. Martin-Subero JI, Oakes CC. Charting the dynamic epigenome during B-cell development. *Semin Cancer Biol*. 2018;51:139-48.
129. Young E, Noerenberg D, Mansouri L, Ljungstrom V, Frick M, Sutton LA, et al. EGR2 mutations define a new clinically aggressive subgroup of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2017;31(7):1547-54.
130. Molina-Privado I, Jimenez PR, Montes-Moreno S, Chiodo Y, Rodriguez-Martinez M, Sanchez-Verde L, et al. E2F4 plays a key role in Burkitt lymphoma tumorigenesis. *Leukemia*. 2012;26(10):2277-85.
131. Holder LB, Haque MM, Skinner MK. Machine learning for epigenetics and future medical applications. *Epigenetics*. 2017;12(7):505-14.
132. Queiros AC, Villamor N, Clot G, Martinez-Trillos A, Kulis M, Navarro A, et al. A B-cell epigenetic signature defines three biologic subgroups of chronic lymphocytic leukemia with clinical impact. *Leukemia*. 2015;29(3):598-605.
133. Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature reviews Genetics*. 2009;10(5):295-304.
134. Zhang T, Cooper S, Brockdorff N. The interplay of histone modifications - writers that read. *EMBO reports*. 2015;16(11):1467-81.
135. Vaissiere T, Sawan C, Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutation research*. 2008;659(1-2):40-8.
136. Quijano S, Lopez A, Rasillo A, Sayagues JM, Barrena S, Sanchez ML, et al. Impact of trisomy 12, del(13q), del(17p), and del(11q) on the immunophenotype, DNA ploidy status, and proliferative rate of leukemic B-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2008;74(3):139-49.
137. Corcoran M, Parker A, Orchard J, Davis Z, Wirtz M, Schmitz OJ, et al. ZAP-70 methylation status is associated with ZAP-70 expression status in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2005;90(8):1078-88.
138. Fabris S, Bollati V, Agnelli L, Morabito F, Motta V, Cutrona G, et al. Biological and clinical relevance of quantitative global methylation of repetitive DNA sequences in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenetics*. 2011;6(2):188-94.
139. Tong WG, Wierda WG, Lin E, Kuang SQ, Bekele BN, Estrov Z, et al. Genome-wide DNA methylation profiling of chronic lymphocytic leukemia allows identification of epigenetically repressed molecular pathways with clinical impact. *Epigenetics*. 2010;5(6):499-508.
140. Lebrero-Fernandez C, Wenzel UA, Akeus P, Wang Y, Strid H, Simren M, et al. Altered expression of Butyrophilin (BTN) and BTN-like (BTNL) genes in intestinal inflammation and colon cancer. *Immun Inflamm Dis*. 2016;4(2):191-200.
141. Kim YM, Stone M, Hwang TH, Kim YG, Dunlevy JR, Griffin TJ, et al. SH3BP4 is a negative regulator of amino acid-Rag GTPase-mTORC1 signaling. *Mol Cell*. 2012;46(6):833-46.



142. Wang Z, Dahiya S, Provencher H, Muir B, Carney E, Coser K, et al. The prognostic biomarkers HOXB13, IL17BR, and CHDH are regulated by estrogen in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(21):6327-34.
143. de Toter D, Meazza R, Zupo S, Cutrona G, Matis S, Colombo M, et al. Interleukin-21 receptor (IL-21R) is up-regulated by CD40 triggering and mediates proapoptotic signals in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood.* 2006;107(9):3708-15.
144. Joshi AD, Hegde GV, Dickinson JD, Mittal AK, Lynch JC, Eudy JD, et al. ATM, CTLA4, MND1, and HEM1 in high versus low CD38 expressing B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res.* 2007;13(18 Pt 1):5295-304.
145. Humphries LA, Godbersen JC, Danilova OV, Kaur P, Christensen BC, Danilov AV. Proapoptotic TP53 homolog TAp63 is repressed via epigenetic silencing and B-cell receptor signalling in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2013;163(5):590-602.
146. Binsky I, Lantner F, Grabovsky V, Harpaz N, Shvidel L, Berrebi A, et al. TAp63 regulates VLA-4 expression and chronic lymphocytic leukemia cell migration to the bone marrow in a CD74-dependent manner. *J Immunol.* 2010;184(9):4761-9.