



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α΄ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Ν. ΚΑΒΑΝΤΖΑΣ ΚΑΘ. ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΚΠΑ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ: ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ
ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΗΣ
ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΜΕΝΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ (ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ)»

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΠΜΣ: ΣΤ. ΘΕΟΧΑΡΗΣ ΚΑΘ. ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΚΠΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΑΝΑΔΙΑΤΑΞΕΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ ΣΕ
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

ΚΛΕΟΠΑΤΡΑ ΦΡΑΓΚΙΟΥΔΑΚΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Επιβλέπων καθηγητής: ΑΝΔΡΕΑΣ ΑΓΑΘΑΓΓΕΛΙΔΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2024

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στο Πρόγραμμα:

«Νεοπλασματική Νόσος στον Άνθρωπο:

**Έρευνα και Κλινικοπαθολογοανατομική Προσέγγιση στα Πλαίσια της
Εξατομικευμένης Ιατρικής (Διάγνωση και Στοχευμένη Θεραπεία)»**

που απονέμει η Ιατρική Σχολή του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

A. ΑΓΑΘΑΓΓΕΛΙΔΗΣ (Επιβλέπων)

ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

.....

Σ. ΘΕΟΧΑΡΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

.....

M. ΣΑΜΑΡΑ

ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

.....

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας συνετέλεσε στην ολοκλήρωση των μεταπτυχιακών σπουδών μου, με αντικείμενο τη Νεοπλασματική Νόσο στον Άνθρωπο. Μία διαδρομή σπουδών, μέσα από την οποία ξαναέζησα την εμπειρία του μαθητή, αποκομίζοντας νέες πολύτιμες γνώσεις και αποκτώντας νέους φίλους - συναδέλφους.

Αρχικά, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Ανδρέα Αγαθαγγελίδη, ο οποίος είχε την υπομονή να περιμένει αρκετό καιρό μέχρι την ολοκλήρωση της συγγραφής, καθώς λόγοι ανωτέρας βίας την καθυστέρησαν. Τον ευχαριστώ επίσης, για το πολύ ενδιαφέρον θέμα που μου ανέθεσε, σχετικά με τη Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία, για τη συνεχή βοήθειά του κατά την εκπόνηση της εργασίας και τις γόνιμες υποδείξεις του κατά τη διάρκεια της συγγραφής. Μέρος της εργασίας αυτής έχει ανακοινωθεί στο συνέδριο της Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας (Νοέμβριος 2023) και ευχαριστώ τον επιβλέποντά μου, ο οποίος μου ανέθεσε την προφορική παρουσίαση.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον καθηγητή κ. Σταμάτιο Θεοχάρη και την καθηγήτρια κα Μαρία Σαμαρά για τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση της εργασίας.

Παρ' όλ' αυτά, η πραγματοποίηση της εργασίας αυτής δεν θα ήταν δυνατή, χωρίς την αμέριστη συμπαράσταση του συζύγου μου και φυσικά χωρίς την άνωθεν βοήθεια, άνευ της οποίας ουδέν έργο μικρό ή μεγάλο είναι εφικτό.

Κλεοπάτρα Φραγκιουδάκη,

Ιούλιος 2024

Αφιερώνεται στη μνήμη του πατέρα μου

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	11
ABSTRACT	12
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
Το ανοσοποιητικό σύστημα.....	13
Δομή και λειτουργία του Β κυτταρικού υποδοχέα (ΒκΥ).....	13
Μηχανισμοί δημιουργίας ποικιλομορφίας των ανοσοσφαιρινών του ΒκΥ	15
Ρεπερτόριο των ανοσοσφαιρινών του ΒκΥ και λευχαιμίες/λεμφώματα	17
Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία – Γενικά χαρακτηριστικά	19
Προγνωστικοί δείκτες στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία	20
Ρόλος της ανοσοσφαιρίνης του ΒκΥ στην παθογένεση της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας	20
Κατάσταση ΣΥΜ των γονιδίων IGHV – Προγνωστικός δείκτης στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία	21
«Στερεοτυπία» του ΒκΥ στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία	24
Μονοκλωνική και ολιγοκλωνική χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία	26
Διεθνείς συστάσεις για την αντιμετώπιση των ασθενών με μονοκλωνική και ολιγοκλωνική χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία	28
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	31
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	32
Ομάδα μελέτης	32
Τεχνικές	32
Μετα-ανάλυση δεδομένων.....	32
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	34
1. Ρεπερτόριο έκφρασης γονιδίων IGHV	34
2. Ρεπερτόριο έκφρασης αλληλομόρφων των γονιδίων IGHV	35
3. Ρεπερτόριο έκφρασης γονιδίων IGHD	37
4. Ρεπερτόριο έκφρασης αλληλομόρφων των γονιδίων IGHD	39
5. Ρεπερτόριο έκφρασης γονιδίων IGHJ	40
6. Ρεπερτόριο έκφρασης αλληλομόρφων των γονιδίων IGHJ	40
7. Συνδυασμοί γονιδίων IGHV και IGHD	41
8. Συνδυασμοί γονιδίων IGHV και IGHJ	46

9.	Κατανομή μήκους της περιοχής CDR3.....	49
10.	Συνδυασμοί γονιδίων IGHV και μήκους CDR3	50
11.	Ανάλυση κατάστασης σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης (SYM)	54
12.	Συνδυασμοί γονιδίων IGHV και κατάστασης SYM	56
13.	Συνδυασμοί κατάστασης SYM και μήκους περιοχής CDR3	58
14.	Πρότυπα της SYM στην ο-ΧΛΛ	59
15.	Ρεπερτόριο έκφρασης γονιδίων IGHV - Κατάσταση SYM στην ο-ΧΛΛ.....	61
16.	Ρεπερτόριο έκφρασης γονιδίων IGHD - Κατάσταση SYM στην ο-ΧΛΛ	65
17.	Ρεπερτόριο έκφρασης γονιδίων IGHJ -Κατάσταση SYM στην ο- ΧΛΛ.....	68
18.	Μήκος περιοχής CDR3 και κατάσταση SYM στην ο-ΧΛΛ.....	69
19.	Στερεοτυπία της περιοχής CDR3	72
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	74
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	79

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κατάσταση της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης (ΣΥΜ) του γονιδίου IGHV της βαριάς αλυσίδας της κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης αποτελεί ένα πολύ σημαντικό προγνωστικό δείκτη για την πορεία των ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ). Στο πλαίσιο αυτό, υπάρχουν ελάχιστα δεδομένα για τους ασθενείς με περισσότερους από ένα λευχαιμικούς κλώνους. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η σύγκριση ασθενών με μονοκλωνική και ολιγοκλωνική ΧΛΛ (μ-ΧΛΛ, ο-ΧΛΛ) σε ανοσογενετικό επίπεδο. Τα χαρακτηριστικά που αναλύθηκαν ήταν τα εξής: το ρεπερτόριο έκφρασης των γονιδίων IGH(V, D, J), το μήκος της περιοχής CDR3 και η κατάσταση ΣΥΜ.

Η σύγκριση του ρεπερτορίου των γονιδίων IGHV και IGHD μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ έδειξε ένα μεγάλο βαθμό ομοιότητας, υποδεικνύοντας την ύπαρξη κοινών αντιγονικών ερεθισμάτων στους δύο τύπους της νόσου. Αντιθέτως, το ρεπερτόριο των γονιδίων IGHD εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Το μήκος της περιοχής CDR3 δε φάνηκε να επηρεάζεται από το βαθμό κλωνικότητας.

Από την άλλη, το πρότυπο ΣΥΜ των γονιδίων IGHV στους δύο τύπους ΧΛΛ ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές, με το ποσοστό μεταλλαγμένων αναδιατάξεων να είναι σημαντικά υψηλότερο στην ο-ΧΛΛ, σε σχέση με τη μ-ΧΛΛ. Πιο συγκεκριμένα, η ανάλυση του προτύπου της ΣΥΜ στους ασθενείς με ο-ΧΛΛ έδειξε ότι η πλειοψηφία των ασθενών χαρακτηριζόταν από μια «σύμφωνη» κατάσταση της ΣΥΜ (ασθενείς με αμιγώς μεταλλαγμένους, ή αμετάλλακτους κλώνους), διευκολύνοντας την πρόγνυσή τους.

Εντός της ο-ΧΛΛ, παρατηρήθηκε ειδικότητα στο ρεπερτόριο των γονιδίων IGHV μεταξύ των δύο υποομάδων ασθενών με «σύμφωνες» καταστάσεις ΣΥΜ, με διαφορετικά γονίδια να εμφανίζονται συχνά σε κάθε μια από αυτές. Τέλος, τα γονίδια IGHV στην υποομάδα με «ασύμφωνη» ΣΥΜ (μεταλλαγμένοι και αμετάλλακτοι κλώνοι μαζί) εμφάνισαν μια ενδιάμεση συχνότητα σε σχέση με εκείνες που εμφάνισαν στις υποομάδες με «σύμφωνη» ΣΥΜ, υποστηρίζοντας την υπόθεση ότι η κατάληξη σε αυτές τις περιπτώσεις αναμένεται να είναι η επικράτηση του αμετάλλακτου κλώνου έναντι του μεταλλαγμένου.

Επιστημονικό πεδίο: Επιστήμες Υγείας

Λέξεις κλειδιά: Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, Σωματική υπερμεταλλαξιγένεση, Ανοσοσφαιρίνες, Γονίδιο IGHV, Προγνωστικός δείκτης, Βαθμός κλωνικότητας.

ABSTRACT

Somatic hypermutation (SHM) status of the clonotypic immunoglobulin heavy chain variable gene (IGHV) is considered to be a critical biomarker for assessing the prognosis of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). In this context, limited data is available for patients with more than one leukemic clone. To address this issue, we performed a comparative analysis of patients with monoclonal and oligoclonal CLL (m-CLL, o-CLL) at the immunogenetic level. We investigated the following immunogenetic characteristics: the IGHV/D/J gene expression repertoire, the CDR3 length and the SHM status.

The IGHV and IGHD gene repertoires showed a high degree of similarity between m-CLL and o-CLL, suggesting the existence of common antigenic stimuli in the two types of CLL. In contrast, the IGHJ gene repertoire exhibited a statistically different expression pattern among the two CLL types. The length of the CDR3 did not seem to be affected by the clonality pattern.

On the other hand, the SHM pattern of IGHV genes exhibited statistically significant differences between the two types of CLL, with the frequency of mutated rearrangements being significantly higher in o-CLL compared to m-CLL. In particular, the analysis of SHM status in o-CLL, showed that a "concordant" SHM status (patients with only mutated, or only unmutated clones) was evident in the majority of cases, thus facilitating their prognosis. The subtypes with "concordant" mutated and "concordant" unmutated SHM status displayed different patterns of IGHV gene expression, with different genes dominating the repertoire in each subtype. Finally, the expression of IGHV genes in the subtype with "discordant" SHM (coexistence of mutated and unmutated clones) exhibited an intermediate pattern compared to the subgroups with "concordant" SHM, suggesting the eventual prevalence of the unmutated clone over the mutated in such cases.

Scientific field: Health Sciences

Key words: Chronic lymphocytic leukemia, Somatic hypermutation, Immunoglobulins, IGHV gene, Prognostic marker, Clonality pattern.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ανοσοποιητικό σύστημα

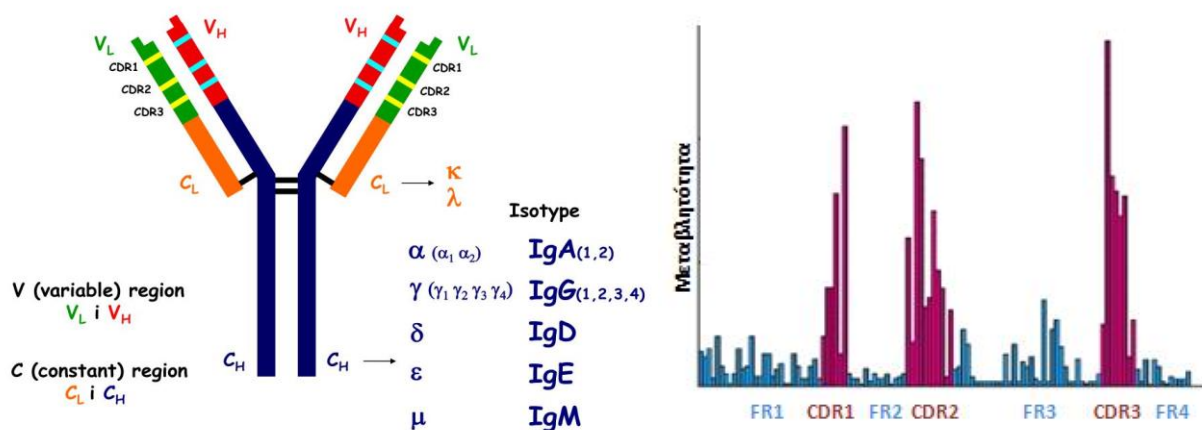
Ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος του ανθρώπου είναι να αναγνωρίζει και να εξουδετερώνει ένα τεράστιο εύρος από ξένους, πιθανά παθογόνους, παράγοντες (μικροοργανισμούς, χημικά μόρια του περιβάλλοντος, κύτταρα ξένων οργανισμών), οι οποίοι ονομάζονται αντιγόνα. Το ανοσοποιητικό σύστημα περιλαμβάνει δύο κατηγορίες απάντησης εναντίον αυτών των αντιγόνων: την έμφυτη (μη ειδική) και την προσαρμοστική (ειδική) ανοσία. Η έμφυτη ανοσία χαρακτηρίζεται από έλλειψη ειδικότητας στην αναγνώριση των ξένων παραγόντων, χαρακτηριστικό που βοηθά στην ταχεία της δράση. Αντιθέτως, η προσαρμοστική ανοσία βασίζεται σε μία μεγάλη ποικιλία εξειδικευμένων κυττάρων, κυτταρικών υποδοχέων και ουσιών με αποτέλεσμα την πολύ ειδική δράση της. Η προσαρμοστική ανοσία χαρακτηρίζεται από καθυστέρηση στην αναγνώριση του αντιγόνου μετά την πρώτη επαφή μαζί του, έχει όμως το πλεονέκτημα της πολύ γρήγορης και πολύ εξειδικευμένης δράσης σε κάθε επόμενη έκθεση στο ίδιο αντιγόνο. Η προσαρμοστική ανοσία επιτελείται κυρίως μέσω των Β και Τ κυτταρικών υποδοχέων (BκΥ και TκΥ), οι οποίοι εδράζονται στην κυτταρική μεμβράνη των Β και Τ λεμφοκυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, αντίστοιχα [1,2,3].

Δομή και λειτουργία του Β κυτταρικού υποδοχέα (BκΥ)

Ο Β κυτταρικός υποδοχέας (BκΥ) εκφράζεται στην επιφάνεια των Β λεμφοκυττάρων και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων αυτών με το περιβάλλον τους, οι οποίες απαιτούνται για την επιβίωση και την ωρίμανσή τους. Τα Β λεμφοκύτταρα ωριμάζουν και αναπτύσσονται είτε σε πλασματοκύτταρα, τα οποία εκκρίνουν τις ανοσοσφαιρίνες (αντισώματα), είτε σε Β λεμφοκύτταρα μνήμης που είναι υπεύθυνα για την ταχύτερη ανοσολογική απόκριση μετά από την επαναλαμβανόμενη αναγνώριση του ίδιου αντιγόνου [4].

Ο BκΥ αποτελείται από δύο λειτουργικές περιοχές: την εξωκυτταρική περιοχή, ρόλος της οποίας είναι να αναγνωρίζει και να συνδέεται με το αντιγόνο, και την περιοχή

μεταβίβασης σήματος, η οποία εντοπίζεται ενδοκυτταρικά και περιλαμβάνει τους υποδοχείς CD79A και CD79B [5]. Η ανοσοσφαιρίνη (immunoglobulin, IG) του ΒκΥ είναι ένα ετεροδιμερές μόριο αποτελούμενο από δύο πανομοιότυπες βαριές αλυσίδες (H) και δύο πανομοιότυπες ελαφριές αλυσίδες (L) κ ή λ, οι οποίες ενώνονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Κάθε αλυσίδα αποτελείται από δύο διαφορετικές περιοχές: την σταθερή περιοχή (Constant, C) που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο και τη μεταβλητή περιοχή (Variable, V) που βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο της αλυσίδας. Η σταθερή περιοχή είναι υπεύθυνη για τις εκτελεστικές λειτουργίες και στη βαριά αλυσίδα καθορίζει τον ισότυπο της ανοσοσφαιρίνης (IgA, IgG, IgD, IgE, IgM). Από την άλλη, η μεταβλητή περιοχή είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση του αντιγόνου [6] (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Αριστερά: Η δομή της ανοσοσφαιρίνης του ΒκΥ. Variable region: μεταβλητή περιοχή, constant region: σταθερή περιοχή, isotype: ισότυπος, Ig: ανοσοσφαιρίνη. (Πηγή: <https://slideplayer.com/slide/17230787/>). Δεξιά: ο βαθμός μεταβλητότητας των υποπεριοχών της μεταβλητής περιοχής. (Πηγή: Αγαθαγγελίδης Α., Διδακτορική διατριβή, ΑΠΘ 2012)

Η μεταβλητή περιοχή των βαριών αλυσίδων κωδικοποιείται από τα γονίδια V, D και J, ενώ η μεταβλητή περιοχή των ελαφριών αλυσίδων από τα γονίδια V και J. Περιλαμβάνει τέσσερις συντηρημένες περιοχές (Framework Regions, FRs) υπεύθυνες για τη διατήρηση της δομής του μορίου της ανοσοσφαιρίνης (Immunoglobulin, IG) και ανάμεσά τους τρεις υπερμεταβλητές περιοχές, οι οποίες ονομάζονται και περιοχές καθορισμού της συμπληρωματικότητας (Complementarity Determining Regions, CDRs) και είναι

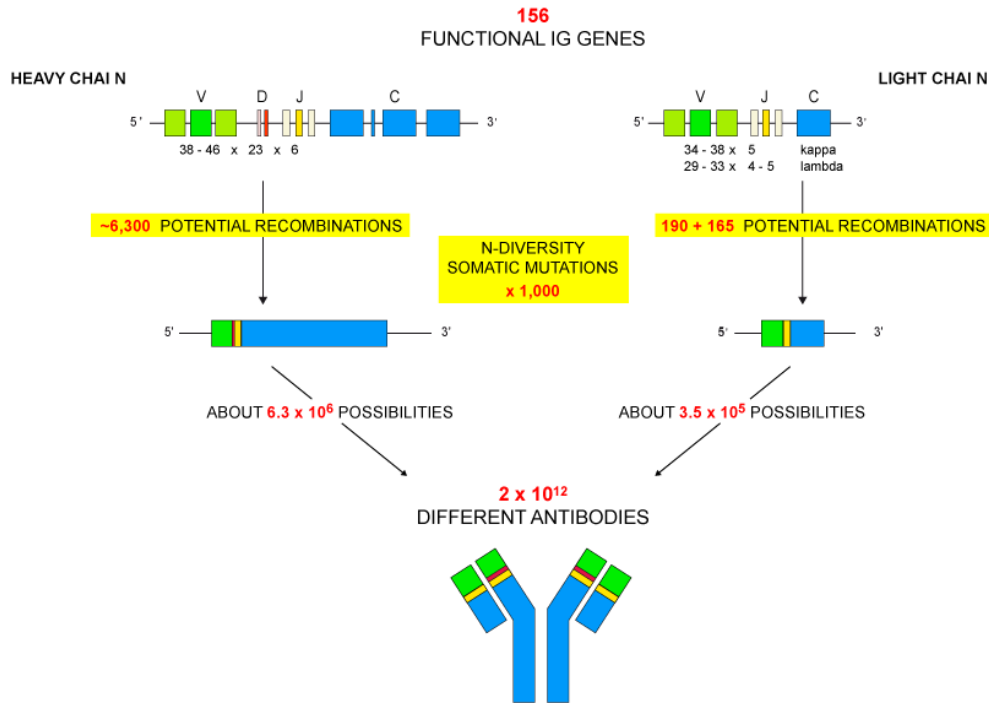
υπεύθυνες για την υψηλής ειδικότητας σύνδεση με το αντιγόνο. Η περιοχή CDR με την μεγαλύτερη μεταβλητότητα είναι η CDR3, η οποία εκτείνεται στην περιοχή σύνδεσης των V, (D) και J γονιδίων [6] (Εικόνες 1, 3).

Μηχανισμοί δημιουργίας ποικιλομορφίας των ανοσοσφαιρινών του ΒκΥ

Η ύπαρξη μίας τεράστιας ποικιλομορφίας διαφορετικών αντιγόνων έχει οδηγήσει στην ανάγκη μίας αντιστοίχου μεγέθους ποικιλομορφίας στις ανοσοσφαιρίνες του ΒκΥ στον πληθυσμό των Β λεμφοκυττάρων του ανθρώπινου οργανισμού, με σκοπό να εξασφαλιστεί η μοναδικής ειδικότητας σύνδεση αντιγόνου-ανοσοσφαιρίνης. Οι μηχανισμοί που συμβάλλουν στη δημιουργία της τεράστιας ποικιλομορφίας του ρεπερτορίου των ανοσοσφαιρινών του ΒκΥ είναι οι εξής:

1. Ετερογένεια που προκύπτει από τον ανασυνδυασμό των γονιδίων V-D-J της βαριάς αλυσίδας και ακολούθως τον ανασυνδυασμό των γονιδίων V-J της ελαφριάς αλυσίδας (συνδυαστική ετερογένεια). Στους γενετικούς τόπους της βαριάς καθώς των κ και των λ ελαφριών αλυσίδων (χρωμοσώματα 14, 2 και 22, αντίστοιχα) βρίσκονται οι ομάδες γονιδίων V, D, J (γενετικός τόπος βαριάς) και V, J (γενετικός τόπος ελαφριών), αντίστοιχα. Από κάθε ομάδα επιλέγεται ένα γονίδιο και με τον ανασυνδυασμό τους (VDJ ανασυνδυασμός στη βαριά και VJ ανασυνδυασμός στην ελαφριά αλυσίδα) παράγεται μια πλήρης αλληλουχία αναδιάταξης που κωδικοποιεί τη βαριά και μια που κωδικοποιεί την ελαφριά αλυσίδα. Στη συνέχεια, η βαριά αλυσίδα συνδυάζεται με την ελαφριά προς τον πλήρη σχηματισμό του μορίου και έτσι ολοκληρώνεται ο μηχανισμός της συνδυαστικής ετερογένειας (Εικόνα 2). Η διαδικασία αυτή επιτελείται στο μυελό των οστών και είναι ανεξάρτητη της αλληλεπίδρασης με αντιγόνο (Εικόνα 3). Με αυτόν τον τρόπο παράγονται τα παρθένα (naïve) Β λεμφοκύτταρα, καθένα από τα οποία εκφράζει στην επιφάνειά του ένα μοναδικό λειτουργικό ΒκΥ (με μία συγκεκριμένη V(D)J αναδιάταξη για τη βαριά και την ελαφριά αλυσίδα. Αυτό εξασφαλίζεται και από το γεγονός ότι η παραγωγή ενός επιτυχημένου ανασυνδυασμού στο ένα αλληλόμορφο αναστέλλει πλήρως τον ανασυνδυασμό στο άλλο αλληλόμορφο (μηχανισμός αποκλεισμού αλληλομόρφου) [7,8,9,10,11].

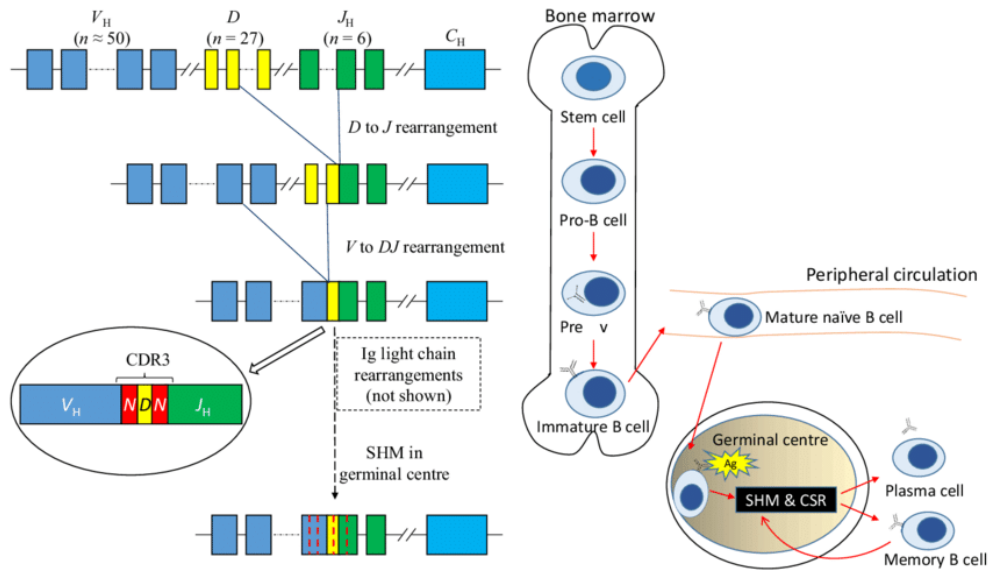
2. Συνδυετική ετερογένεια, η οποία προκύπτει μέσω του μηχανισμού διπλασιασμού και/ή εισαγωγής ή αφαίρεσης νουκλεοτιδίων στα σημεία σύνδεσης των V-(D)-J γονιδίων [12,13] (Εικόνα 2).
3. Μηχανισμός σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης (ΣΥΜ). Η διαδικασία αυτή επιτελείται στα ενεργοποιημένα Β λεμφοκύτταρα, τα οποία έχουν έρθει σε επαφή με κάποιο αντιγόνο. Λαμβάνει χώρα στο βλαστικό κέντρο των δευτερογενών λεμφικών οργάνων (π.χ. λεμφαδένες, σπλήνας) και αποσκοπεί στην αύξηση της συγγένειας του ΒκΥ με το συγκεκριμένο αντιγόνο (Εικόνα 3). Στη συνέχεια, τα Β λεμφοκύτταρα στα οποία το πρότυπο των υπερμεταλλάξεων έχει οδηγήσει στη βέλτιστη συγγένεια με το αντιγόνο επιλέγονται προς πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση προς πλασματοκύτταρα και Β λεμφοκύτταρα μνήμης. Η ΣΥΜ αφορά στην εισαγωγή μεταλλάξεων σε όλη την έκταση της μεταβλητής περιοχής της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης και σχετίζεται με πολύ υψηλή συχνότητα εισαγωγής μεταλλάξεων (10^{-5} έως 10^{-3} μεταλλάξεις/ζεύγος βάσεων/κυτταρική γενιά). Αφορά κυρίως σε αντικαταστάσεις βάσεων, των οποίων η κατανομή στις λειτουργικές V(D)J αναδιατάξεις δεν είναι τυχαία. Συγκεκριμένα, οι μεταλλάξεις αντικατάστασης βάσης εντοπίζονται κυρίως στις περιοχές CDR της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας. Επίσης, η ΣΥΜ στοχεύει επιλεκτικά συγκεκριμένα κωδικόνια των γονιδίων IGHV. Μετά τη δράση του μηχανισμού της ΣΥΜ, η ετερογένεια των ανοσοσφαιρινών μπορεί να ξεπεράσει τα 10^{12} διαφορετικά μόρια (Εικόνα 2).
Συνολικά, παράγεται μία τεράστια ποικιλία ανοσοσφαιρινών του ΒκΥ, δηλαδή ένας μεγάλος αριθμός Β λεμφοκυττάρων με διακριτούς ΒκΥ σε ένα υγιές άτομο [14,15,16,17].



Εικόνα 2: Οι μηχανισμοί που συμβάλλουν στην ποικιλομορφία των ανοσοσφαιρινών του ΒκΥ. *Functional IG genes:* λειτουργικά γονίδια ανοσοσφαιρινών, *heavy chain:* βαριά αλυσίδα, *light chain:* ελαφριά αλυσίδα, *potential recombinations:* πιθανοί ανασυνδυασμοί, *N-diversity:* συνδετική ετερογένεια, *somatic mutations:* σωματικές υπερμεταλλάξεις, *possibilities:* πιθανότητες, *different antibodies:* διαφορετικά αντισώματα. (Πηγή: <https://www.imgt.org/IMGIndex/IGsynthesis.php>)

Ρεπερτόριο των ανοσοσφαιρινών του ΒκΥ και λευχαιμίες/λεμφώματα

Ενώ η ποικιλία του ρεπερτορίου της ανοσοσφαιρίνης του ΒκΥ στα υγιή άτομα είναι δυνητικά τεράστια, στην πραγματικότητα ο αριθμός των διακριτών γονιδίων των ανοσοσφαιρινών (IG) που εκφράζονται σε έναν άνθρωπο είναι πιο περιορισμένος. Διάφοροι παράγοντες, όπως ο πληθυσμός των Β λεμφοκυττάρων, η ηλικία, κάποια γενετικά χαρακτηριστικά του ατόμου ή η αποτελεσματικότητα του μηχανισμού του ανασυνδυασμού σε κάθε γονίδιο οδηγούν συνολικά στην υπερέκφραση κάποιων γονιδίων IGHV (π.χ. IGHV3-23, IGHV4-34) σε σχέση με άλλα που απαντώνται πιο σπάνια (π.χ. IGHV3-73) [18]. Στο ίδιο πλαίσιο, το ρεπερτόριο των γονιδίων IG μπορεί να ποικίλλει στις διάφορες ασθένειες που σχετίζονται με τα Β λεμφοκύτταρα [19,20,21],



Εικόνα 3: Αριστερά ο ανασυνδυασμός VDJ της βαριάς αλυσίδας και δεξιά η αντίδραση στο βλαστικό κέντρο. *Rearrangement:* αναδιάταξη, *light chain:* ελαφριά αλυσίδα, *SHM:* σωματική υπερμετάλλαξη, *germinal center:* βλαστικό κέντρο, *bone marrow:* μυελός των οστών, *stem cell:* βλαστοκύτταρο, *pro B cell:* προ-B λεμφοκύτταρο, *pre-B cell:* προ-B λεμφοκύτταρο *mature naïve B cell:* ώριμο παρθένο B λεμφοκύτταρο, *Ag:* αντιγόνο, *plasma cell:* πλασματοκύτταρο, *memory B cell:* B λεμφοκύτταρο μνήμης, *peripheral circulation:* κυκλοφορία περιφερικού αίματος. (Πηγή: βιβλιογρ. αναφ. 89).

για παράδειγμα τα λεμφώματα [22]. Ειδικά για τα λεμφώματα, τα οποία προέρχονται από έναν κλώνο B λεμφοκυττάρων (μονοκλωνικές νόσοι), πολλές μελέτες έχουν καταδείξει το ρόλο-κλειδί της σηματοδότησης μέσω του BκΥ στην παθογένεσή τους [23,24]. Επιπλέον, η ύπαρξη ειδικού ρεπερτορίου γονιδίων IG καθώς και συγκεκριμένων προτύπων ΣΥΜ στους ασθενείς με λεμφώματα των B λεμφοκυττάρων υποδεικνύει την πίεση από αντιγονικά ερεθίσματα ως αιτία επιλογής και ανάπτυξης ενός συγκεκριμένου κλώνου B λεμφοκυττάρων με συγκεκριμένο BκΥ [25,26]. Όλα τα κακοήγη B λεμφοκύτταρα (κλώνος) ενός ασθενούς με λέμφωμα B λεμφοκυττάρων εκφράζουν πανομοιότυπους BκΥ, επομένως οι κλωνοτυπικές αναδιατάξεις των γονιδίων IG λειτουργούν ως μοριακοί δείκτες. Το γεγονός ότι η εξειδίκευση στο ρεπερτόριο και το πρότυπο ΣΥΜ των γονιδίων IG που εκφράζει ένα B λεμφοκύτταρο προσδίδει σε αυτό μία μοναδική (ανοσο)γενετική υπογραφή, ενδεικτική της προέλευσης και της ιστορίας του, μπορεί να προσφέρει

πολύτιμη βοήθεια στην κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην παθογένεση και την εξέλιξη των νόσων αυτών [27].

Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία – Γενικά χαρακτηριστικά

Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ) είναι μία χρόνια κακοήθης νεοπλασία, η οποία ταξινομείται κατά WHO στα Β χρόνια λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα (χαμηλής κακοήθειας λεμφώματα Β λεμφοκυττάρων). Η προέλευσή της είναι μικρά ώριμα Β λεμφοκύτταρα που εκφράζουν τους επιφανειακούς δείκτες CD5, CD19, CD20 και CD23, ενώ υπάρχει χαμηλή έκφραση της ανοσοσφαιρίνης του ΒκΥ και των δεικτών CD29b και CD22 [28,29]. Η νόσος χαρακτηρίζεται από νεοπλασματική διήθηση της κυκλοφορίας του αίματος, του μυελού των οστών και των δευτερογενών λεμφικών οργάνων [30]. Κάποιοι ασθενείς μπορεί να είναι ασυμπτωματικοί, ενώ άλλοι μπορεί να παρουσιάζουν ογκώδεις λεμφαδένες, σπληνομεγαλία ή διάφορα συστηματικά συμπτώματα [28].

Η ΧΛΛ αντιπροσωπεύει περίπου το 30% όλων των τύπων λευχαιμίας στο Δυτικό κόσμο, ενώ είναι ο πιο συχνός τύπος λευχαιμίας στους ενήλικες. Η νόσος εμφανίζεται με διπλάσια συχνότητα στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες. Η μέση ηλικία διάγνωσης είναι τα 70 έτη, ενώ η συχνότητα εμφάνισης αυξάνεται με την ηλικία αν και μπορεί να διαγνωστεί και σε νεαρότερους ενήλικες [31,32,33]. Η επιδημιολογία της νόσου υποδηλώνει ότι υπάρχει σαφής γενετική προδιάθεση [34].

Η κλινική πορεία της ΧΛΛ παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια. Κάποιοι ασθενείς μπορεί να μη χρειαστούν ποτέ θεραπεία παραμένοντας ασυμπτωματικοί και επιβιώνοντας για πολλά χρόνια, ενώ τελικά πεθαίνουν από άλλα αίτια. Μια άλλη κατηγορία ασθενών μπορεί να χρειαστούν θεραπεία σε βάθος χρόνου, έπειτα από συγκεκριμένες ενδείξεις, όπως η μυελική ανεπάρκεια ή η διαταραχή στη λειτουργία μιας σειράς οργάνων. Τέλος, κάποιοι χρειάζονται άμεση χορήγηση θεραπείας, καθώς η νόσος εμφανίζεται με πιο επιθετική μορφή. Σε κάθε περίπτωση, η ΧΛΛ χαρακτηρίζεται από ήπια βιολογική συμπεριφορά στην πλειονότητα των ασθενών [28,30]. Από την άλλη, η μεγάλη κλινική ετερογένεια της νόσου αντανακλά ένα σημαντικό βαθμό ποικιλότητας σε βιολογικό επίπεδο. Με άλλα λόγια, η νόσος μπορεί να εμφανιστεί με διάφορες μορφές, οι οποίες φαίνεται να διακρίνονται από διαφορετικό βιολογικό υπόβαθρο [35].

Προγνωστικοί δείκτες στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία

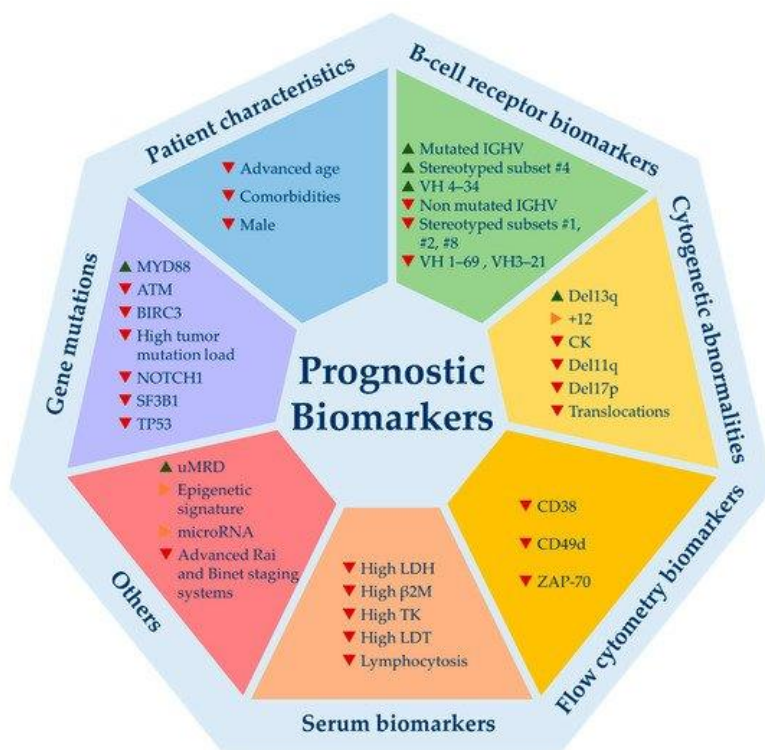
Η ετερογένεια της ΧΛΛ σε κλινικό επίπεδο δημιούργησε την ανάγκη της αναγνώρισης προγνωστικών δεικτών με σκοπό την αποτελεσματικότερη διαχείριση των ασθενών. Τα τελευταία χρόνια, έχει αναδειχθεί μία ποικιλία παραγόντων που επηρεάζουν την κλινική έκβαση της νόσου [36] (Εικόνα 4). Ανάμεσα σε αυτούς υπάρχουν γενετικοί (χρωμοσωμικές ανωμαλίες και γονιδιακές μεταλλάξεις) και επιγενετικοί (έκφραση συγκεκριμένων *microRNAs*) παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί αντανακλούν το ετερογενές βιολογικό υπόβαθρο της νόσου και αποτελούν πολύτιμους μοριακούς προγνωστικούς δείκτες. Για παράδειγμα, η έλλειψη στο χρωμόσωμα 13q σχετίζεται με καλή πρόγνωση, ενώ αντίθετα οι ελλείψεις στις χρωμοσωμικές περιοχές 11q ή 17p με κακή εξέλιξη της νόσου. Δυσμενής είναι η πρόγνωση και στους ασθενείς με μεταλλάξεις του *TP53* ή άλλων γονιδίων (π.χ. *NOTCH1*, *SF3B1*, *BIRC3*) [36,37,38] (Εικόνα 4).

Ρόλος της ανοσοσφαιρίνης του ΒκΥ στην παθογένεση της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας

Η ανοσοσφαιρίνη του ΒκΥ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην οντογένεση και την εξέλιξη της ΧΛΛ. Σειρά δεδομένων υποστηρίζει ότι η μεταβίβαση σήματος μέσω του ΒκΥ, μετά από την αναγνώριση μιας περιορισμένης σειράς αντιγόνων, οδηγεί στη νεοπλασματική εξαλλαγή των προγονικών Β λεμφοκυττάρων της ΧΛΛ. Ανοσογενετικές μελέτες έχουν καταδείξει ότι το ρεπερτόριο των γονιδίων IGHV στους ασθενείς με ΧΛΛ παρουσιάζει διαφορές σε σχέση τους υγιείς δότες και είναι σαφώς πιο επιλεκτικό [39,40,41]. Με άλλα λόγια, ένα περιορισμένο εύρος αντιγόνων φαίνεται να συνδέεται επιλεκτικά με τους κλωνοτυπικούς ΒκΥ, οι οποίοι φέρουν συγκεκριμένα γονίδια IGHV και οδηγούν τελικά στη νεοπλασματική εξαλλαγή [35]. Η άποψη αυτή ενισχύεται και από το γεγονός ότι η ΧΛΛ, όπως και αρκετοί τύποι νεοπλασιών των Β λεμφοκυττάρων, χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα πρότυπα ΣΥΜ στα αναδιαταγμένα γονίδια IGHV, τα οποία αποτελούν επιπρόσθετη ένδειξη αναγνώρισης συγκεκριμένων αντιγόνων [42].

Επιπροσθέτως, ο ρόλος του αντιγόνου πιθανόν να μην περιορίζεται μόνο στην πυροδότηση της νεοπλασματικής εξαλλαγής. Μελέτες έχουν δείξει ότι όταν εστιάσουμε στο νεοπλασματικό κυτταρικό κλώνο της ΧΛΛ μπορεί να υπάρχει διαφοροποίηση στο

πρότυπο ΣΥΜ του γονιδίου IGHV, υποστηρίζοντας την άποψη ότι το αντιγόνο μπορεί να έχει μία συνεχή επίδραση πάνω στα νεοπλασματικά κύτταρα [43,44,45,46]. Επομένως, η ανάλυση του προτύπου ΣΥΜ των αναδιαταγμένων γονιδίων IGHV στοχεύει στην άντληση πληροφοριών τόσο για τη φύση του αντιγόνου και για το στάδιο διαφοροποίησης του Β λεμφοκυττάρου κατά το οποίο μπορεί να συμβεί η νεοπλασματική εξαλλαγή, όσο και για την κλινική πορεία των ασθενών.



Εικόνα 4: Οι προγνωστικοί βιοδείκτες στη ΧΛΛ περιλαμβάνουν τα βασικά κλινικά χαρακτηριστικά του ασθενή καθώς και βιοχημικούς, ανοσοφαινοτυπικούς, γενετικούς και επιγενετικούς δείκτες καθώς και δείκτες που σχετίζονται με το ΒκΥ. Τα μαύρα, πορτοκαλί και κόκκινα τρίγωνα συμβολίζουν καλή (πράσινο χρώμα), ενδιάμεση (πορτοκαλί χρώμα) και κακή (κόκκινο χρώμα) πρόγνωση, αντίστοιχα. (Πηγή: <https://encyclopedia.pub/entry/9041>)

Κατάσταση ΣΥΜ των γονιδίων IGHV – Προγνωστικός δείκτης στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία

Με βάση την κατάσταση ΣΥΜ του αναδιαταγμένου γονιδίου IGHV της βαριάς αλυσίδας της κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης του ΒκΥ, οι ασθενείς χωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

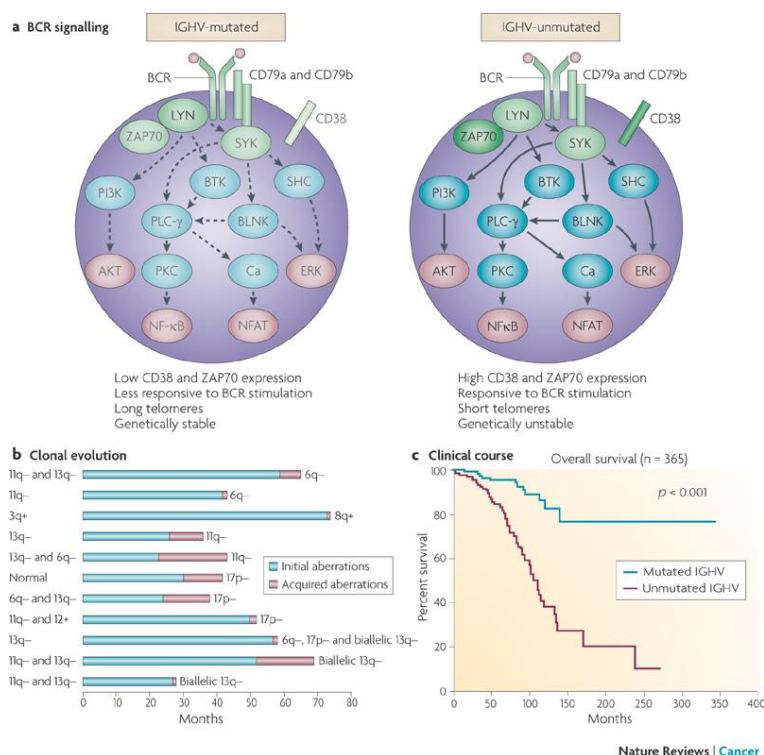
(α) τους ασθενείς με μεταλλαγμένη ΧΛΛ (Μ-ΧΛΛ), στους οποίους η αλληλουχία του κλωνοτυπικού γονιδίου IGHV παρουσιάζει <98% ομοιότητα με εκείνη του φυσιολογικού μη αναδιαταγμένου IGHV γονιδίου και (β) τους ασθενείς με αμετάλλακτη ΧΛΛ (Α-ΧΛΛ), στους οποίους η αλληλουχία του κλωνοτυπικού γονιδίου IGHV παρουσιάζει ομοιότητα ≥98% με εκείνη του αντίστοιχου μη αναδιαταγμένου γονιδίου IGHV. Οι σωματικές μεταλλάξεις στα γονίδια IGHV υπολογίζονται από την αρχή της περιοχής VH FR1 έως το τέλος της περιοχής VH FR3. Η περιοχή VH CDR3 εξαιρείται, λόγω του μεγάλου βαθμού της ετερογένειάς της, γεγονός που καθιστά αδύνατη την αξιόπιστη αναγνώριση των σωματικών μεταλλάξεων. Η αλλαγή ενός νουκλεοτιδίου χαρακτηρίζεται ως μετάλλαξη και όχι ως πολυμορφισμός όταν εμφανίζεται στην κλωνοτυπική αλληλουχία αλλά όχι στη φυσιολογική, μη αναδιαταγμένη, αλληλουχία του γονιδίου [35].

Οι μισές περίπου περιπτώσεις ΧΛΛ που εκφράζουν ανοσοσφαιρίνη του ΒκΥ με ισότυπο IgM, όπως σχεδόν το 75% των περιπτώσεων που έχουν πραγματοποιήσει εναλλαγή ισότυπου, παρουσιάζουν διαφορές >2% από το πλησιέστερο μη αναδιαταγμένο γονίδιο, είναι δηλαδή ασθενείς με Μ-ΧΛΛ. Επιπλέον, η παρουσία και το φορτίο των μεταλλάξεων ποικίλει στις διαφορετικές περιπτώσεις ΧΛΛ και φαίνεται να σχετίζεται με την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων IGHV από τα λευχαιμικά κύτταρα [39,47,48].

Όσον αφορά στην προέλευση των λευχαιμικών κυττάρων των Μ-ΧΛΛ και Α-ΧΛΛ, μελέτες έχουν δείξει ότι τα νεοπλασματικά λεμφοκύτταρα και των δύο κατηγοριών ΧΛΛ, ανεξάρτητα από το φορτίο της ΣΥΜ των γονιδίων IGHV, έχουν ανοσοφαινότυπο ώριμων Β λεμφοκυττάρων και πρότυπο γονιδιακής έκφρασης παρόμοιο με εκείνο των Β λεμφοκυττάρων μνήμης [49,50,51]. Από την άλλη, μια μεταγενέστερη επιγενετική μελέτη (DNA μεθυλίωσης) υπέδειξε μια σημαντική ομοιότητα μεταξύ των νεοπλασματικών κυττάρων της Μ-ΧΛΛ και Β λεμφοκυττάρων μνήμης. Αντίθετα, τα κύτταρα της Α-ΧΛΛ είχαν επιγενετικά πρότυπα παρόμοια με τα παρθένα (naïve) Β λεμφοκύτταρα [52].

Σε προγνωστικό επίπεδο, η μεταλλακτική κατάσταση του γονιδίου IGHV θεωρείται ένας πολύ σημαντικός βιοδείκτης για την κλινική έκβαση της ασθένειας. Συγκεκριμένα, μελέτες ήδη από την δεκαετία του 1990 [53,54] έδειξαν ότι οι ασθενείς με Μ-ΧΛΛ έχουν κατά κανόνα καλύτερη πρόγνωση, καθώς η νόσος εμφανίζεται με ήπια μορφή. Αντιθέτως, οι ασθενείς με Α-ΧΛΛ έχουν δυσμενέστερη πρόγνωση με μικρότερο προσδόκιμο ζωής,

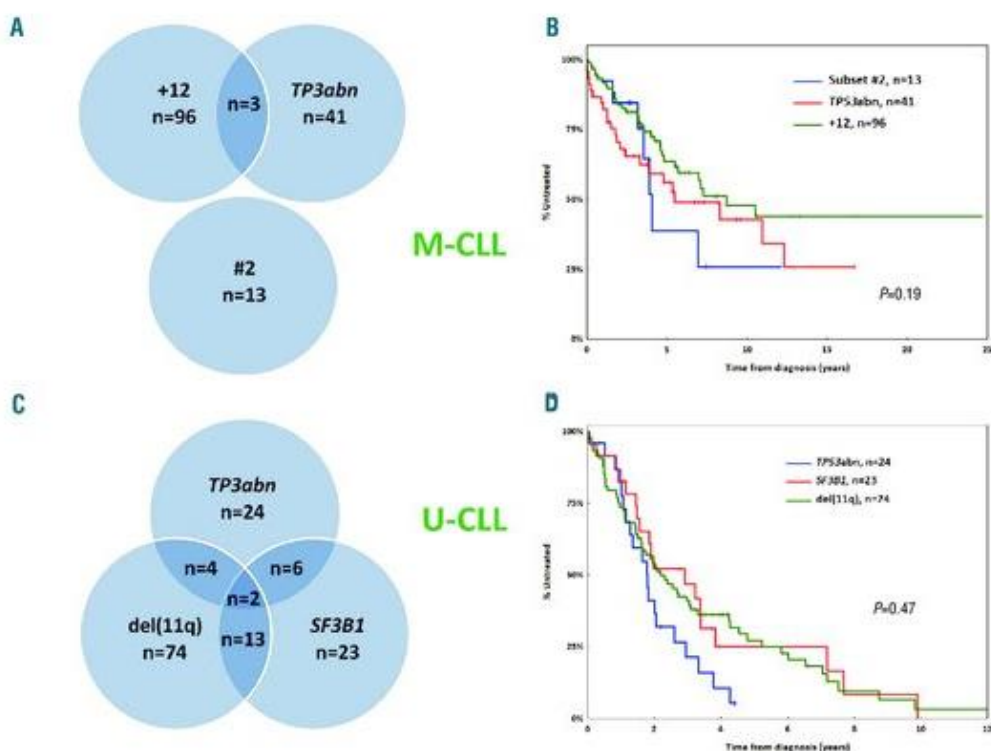
καθώς η νόσος παρουσιάζει επιθετικότερη βιολογική συμπεριφορά. Επιπλέον, οι M-ΧΛΛ περιπτώσεις με ομοιότητα 97-97.99% μεταξύ του αναδιαταγμένου γονιδίου IGHV με το αντίστοιχο μη αναδιαταγμένο, μπορεί να αφορούν σε ασθενείς με είτε ήπια είτε επιθετική νόσο [55]. Συνολικά, το φορτίο της ΣΥΜ είναι πολύ σημαντικός προγνωστικός δείκτης καθώς χαρακτηρίζεται από αξιοπιστία, σταθερότητα κατά την πορεία της νόσου και ανεξαρτησία από άλλους παράγοντες.



Εικόνα 5: Η εντονότερη σηματοδότηση στην A-ΧΛΛ (*unmutated*) σε σχέση με τη M-ΧΛΛ (*mutated*) συμβάλλει, μαζί με άλλους παράγοντες (π.χ. υψηλή έκφραση πρωτεϊνών CD38 και ZAP70), στη διαφορετική κλινική πορεία των αντίστοιχων ασθενών με ΧΛΛ. *BCR signaling*: σηματοδότηση μέσω του BκΥ, *clonal evolution*: κλωνική εξέλιξη, *clinical course*: κλινική πορεία. (Πηγή: βιβλιογρ. αναφ. 57).

Η διαφορά στην κλινική πορεία του νοσήματος που παρατηρείται μεταξύ M-ΧΛΛ και A-ΧΛΛ ασθενών αντικατοπτρίζει την ετερογένεια στο βιολογικό επίπεδο της νόσου. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα σηματοδότησης μέσω του BκΥ είναι διαφορετικά μεταξύ M-ΧΛΛ και A-ΧΛΛ, με τις περιπτώσεις με αμετάλλακτα γονίδια IGHV να εμφανίζουν εντονότερη σηματοδότηση [35,56,57] (Εικόνα 5).

Μία πιο πρόσφατη μελέτη υπέδειξε την ύπαρξη διαφορετικών παραγόντων κινδύνου που οδηγούν σε χειρότερη έκβαση της νόσου μεταξύ M-ΧΛΛ και A-ΧΛΛ [58]. Οι παράγοντες αυτοί αφορούν κυρίως χρωμοσωμικές ανωμαλίες και γονιδιακές μεταλλάξεις (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Διαφορετικοί παράγοντες κινδύνου για κακή πρόγνωση, στους A-ΧΛΛ (U-CLL) και M-ΧΛΛ (M-CLL) ασθενείς. +12: τρισωμία 12, TP53abn: μετάλλαξη του TP53, #2: στερεότυπο υποσύνολο 2, del(11q): έλλειψη στο 11q, SF3B1: μετάλλαξη του SF3B1. (Πηγή: βιβλιογρ. αναφ. 58).

«Στερεοτυπία» του ΒκΥ στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία

Υπάρχουν περιπτώσεις M-ΧΛΛ και A-ΧΛΛ ασθενών, οι οποίοι εμφανίζουν ιδιαίτερα ανοσογενετικά χαρακτηριστικά και η κλινική πορεία τους δεν συμβαδίζει απαραίτητα με την μεταλλακτική κατάσταση του γονιδίου IGHV. Σε αρκετές περιπτώσεις, αυτοί οι ασθενείς κατατάσσονται σε ειδικά «στερεότυπα» υποσύνολα [41,59].

Οι ΧΛΛ ασθενείς που κατατάσσονται σε ένα «στερεότυπο» υποσύνολο διαθέτουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά που αφορούν στην περιοχή VH CDR3 της ανοσοσφαιρίνης του ΒκΥ [48,60]. Τα κριτήρια κατάταξης ασθενών στο ίδιο «στερεότυπο» υποσύνολο έχουν διαμορφωθεί ως εξής: (α) έκφραση ίδιου γονιδίου IGHV, (β) ίδιο μήκος περιοχής VH CDR3, (γ) τουλάχιστον 50% ταυτότητα και 70% ομοιότητα (κοινές φυσικοχημικές ιδιότητες) σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας της περιοχής VH CDR3 και (δ) ίδια θέση του κοινού αμινοξικού μοτίβου εντός της περιοχής VH CDR3 [61]. Η δομική «στερεοτυπία» του ΒκΥ αποτελεί ισχυρότατη ένδειξη για την αναγνώριση παρόμοιων αντιγονικών επιτόπων, υπαινίσσεται δηλαδή τη διέγερση των κλωνικών κυττάρων της νόσου από ένα περιορισμένο αριθμό κοινών αντιγόνων [41,48,60].

Η κατάταξη των ασθενών με ΧΛΛ σε «στερεότυπα» υποσύνολα έχει μεγάλη προγνωστική σημασία, καθώς οι ασθενείς του ίδιου υποσυνόλου εμφανίζουν κοινά βιολογικά χαρακτηριστικά, καθώς και κλινική πορεία και έκβαση της νόσου [62,63]. Για παράδειγμα, το στερεότυπο υποσύνολο #2 (με κλωνοτυπική αναδιάταξη IGHV3-21/IGLV3-21), χαρακτηρίζεται από επιθετική κλινική πορεία, αντοχή στη χημειοθεραπεία και κακή πρόγνωση, παρά το γεγονός ότι η πλειοψηφία των αντίστοιχων ασθενών ανήκουν στη Μ-ΧΛΛ [64,65,66]. Επιπρόσθετα, μια πρόσφατη μελέτη [67] ανέδειξε μια συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του γονιδίου IGLV3-21 με κακή πρόγνωση των ασθενών, αναδεικνύοντας μαζί με άλλες μελέτες [43,68,69,70] το ρόλο της ελαφριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης του ΒκΥ στην επιλογή του λευχαιμικού κλώνου από το αντιγόνο. Αντιθέτως, το στερεότυπο υποσύνολο #4 (IGHV4-34/IGKV2-30 BCR IG) περιλαμβάνει αποκλειστικά ασθενείς που ανήκουν στη Μ-ΧΛΛ και αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα της ήπιας βιολογικής συμπεριφοράς της νόσου [62,66].

Στην πιο πρόσφατη μελέτη της στερεοτυπίας [22], η οποία πραγματοποιήθηκε στη μεγαλύτερη σειρά ασθενών με ΧΛΛ έως σήμερα (29.856 ασθενείς), αναφέρεται ότι το ποσοστό ασθενών που ανήκουν σε στερεότυπα υποσύνολα αναλογεί στο 41% του συνόλου των ασθενών. Συνολικά, ταυτοποιήθηκαν 29 κύρια στερεότυπα υποσύνολα, τα οποία αφορούν σε στερεότυπα υποσύνολα με μεγάλη σχετική συχνότητα. Τα κύρια υποσύνολα, κυρίως εκείνα με αμετάλλακτα IGHV γονίδια, παρουσίαζαν μεγάλη δομική ομοιότητα με άλλα μικρότερα, τα οποία ονομάστηκαν υποσύνολα «δορυφόροι». Ασθενείς που ανήκαν στα υποσύνολα «δορυφόρους» παρουσίαζαν παρόμοιο κλινικό πρότυπο

επιβίωσης με εκείνους που ανήκαν στα αντίστοιχα κύρια υποσύνολα. Επομένως, ο λεπτομερής ανοσογενετικός χαρακτηρισμός των ασθενών με ΧΛΛ μπορεί να βοηθήσει στην κλινική διαχείριση μιας νόσου με μεγάλη ετερογένεια, μέσω της κατάταξης των ασθενών σε ομοιογενείς ομάδες με συγκεκριμένα βιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά [22].

Μονοκλωνική και ολιγοκλωνική χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία

Παρόλο που η ΧΛΛ είναι κατά βάση μία μονοκλωνική νόσος, με μία μοναδική κλωνοτυπική ανοσοσφαιρίνη του ΒκΥ ανά ασθενή, έχουν ταυτοποιηθεί περιπτώσεις ΧΛΛ ασθενών με περισσότερες (δύο ή παραπάνω) παραγωγικές αναδιατάξεις της ανοσοσφαιρίνης του ΒκΥ. Η παρουσία δύο ή περισσότερων παραγωγικών αναδιατάξεων μπορεί να οφείλεται σε μια σειρά μηχανισμών, όπως: (α) η απώλεια λειτουργίας του μηχανισμού αποκλεισμού αλληλομόρφου, με καταγεγραμμένες τέτοιες περιπτώσεις ασθενών [71], (β) ο μηχανισμός αντικατάστασης του γονιδίου IGHV [72] και (γ) η ύπαρξη δύο διαφορετικών κυτταρικών κλώνων ΧΛΛ, όπως έχουν αναδείξει παλαιότερες [73-77] και πιο πρόσφατες [78,79,80,84] μελέτες. Επίσης, η παρουσία δύο παραγωγικών IGH αναδιατάξεων στον ίδιο ασθενή μπορεί να οφείλεται και στη συνύπαρξη ενός ΧΛΛ και ενός μη ΧΛΛ κλώνου [73].

Η κατάσταση ΣΥΜ των αναδιαταγμένων γονιδίων IGHV ενός ασθενή με πολλαπλούς κλώνους μπορεί να είναι είτε σε «συμφωνία», δηλαδή όλοι οι κλώνοι να είναι μεταλλαγμένοι (M-ΧΛΛ) ή αμετάλλακτοι (A-ΧΛΛ), είτε σε «ασυμφωνία», δηλαδή να υπάρχουν κλώνοι που ανήκουν στη M-ΧΛΛ και την A-ΧΛΛ. Πρόσφατη μελέτη υπέδειξε ότι στην πλειοψηφία των περιπτώσεων με πολλαπλούς κλώνους στον ίδιο ασθενή, οι κλώνοι ήταν M-ΧΛΛ [79]. Η παρουσία περισσότερων του ενός ΧΛΛ κλώνου σε έναν ασθενή, σε συνδυασμό με το φορτίο ΣΥΜ των γονιδίων IGHV, που μπορεί να διαφέρει ανάμεσα στις συνυπάρχουσες αναδιατάξεις, καθιστά πιο περίπλοκη την πρόγνωση, άρα και τη στρατηγική διαχείρισης αυτών των ασθενών.

Μία σχετική μελέτη σε δείγμα 1147 ασθενών με ΧΛΛ, οδήγησε στην ταυτοποίηση 25 ασθενών (2,2%) με δύο ή περισσότερους ΧΛΛ κλώνους. Η παρουσία πολλαπλών κλώνων παρατηρήθηκε, κατά κανόνα, σε πιο αρχικά στάδια της νόσου. Ιχνηλατώντας

χρονικά τις αναδιατάξεις (κλώνους) του κάθε ασθενή παρατηρήθηκαν αλλαγές, με κάποιους κλώνους να εξαφανίζονται και άλλους να επικρατούν κατά την εξέλιξη της νόσου. Η συγκεκριμένη μελέτη υπέδειξε ότι στους ασθενείς με κλώνους σε «ασυμφωνία» ΣΥΜ, τελικά επικρατούσε ο κλώνος με το μικρότερο φορτίο ΣΥΜ και/ή τη μεγαλύτερη σε μήκος περιοχή CDR3 (χαρακτηριστικά που ταιριάζουν με το πρότυπο των Α-ΧΛΛ κλώνων) [78]. Η επικράτηση των αμετάλλακτων κλώνων παρουσιάζει σημαντικές κλινικές προεκτάσεις για την αντιμετώπιση αυτών των ασθενών και δύναται να εξηγήσει το γεγονός ότι οι δικλωνικοί ασθενείς με προφίλ ΣΥΜ σε «ασυμφωνία» παρουσιάζουν παρόμοιο δυσμενές κλινικό προφίλ με τους μονοκλωνικούς ασθενείς που ανήκουν στην Α-ΧΛΛ [81]. Έχει επίσης δειχθεί [81] ότι οι δικλωνικοί ασθενείς με προφίλ ΣΥΜ σε «συμφωνία» έχουν κλινική πορεία παρόμοια με αυτήν των μονοκλωνικών ασθενών με την αντίστοιχη κατάσταση ΣΥΜ. Παρόμοια αποτελέσματα σχετικά με την κλινική πορεία της νόσου στους ασθενείς με «ασυμφωνία» έδειξαν κι άλλες μελέτες [82].

Σε κάθε περίπτωση, η πιθανότητα επικράτησης ενός κλώνου δεν εξαρτάται μόνο από το πρότυπο ΣΥΜ του αναδιαταγμένου γονιδίου IGHV, αλλά και από την ύπαρξη γενετικών βλαβών όπως οι μεταλλάξεις του γονιδίου *TP53*, οι οποίες προσδίδουν πλεονεκτήματα επιβίωσης και πολλαπλασιασμού στο σχετικό κλώνο έναντι των άλλων, συμβάλλοντας αρνητικά στην κλινική πορεία της νόσου [78,83].


Επιπροσθέτως και σε συμφωνία με όλες τις προαναφερθείσες μελέτες, μια πρόσφατη μελέτη [84] υπέδειξε ότι οι ασθενείς με πολλαπλούς κλώνους σε «ασυμφωνία» αποτελούν μια ομάδα υψηλού κινδύνου, καθώς οι ασθενείς αυτοί διαγιγνώσκονται σε πιο προχωρημένο στάδιο και εμφανίζουν σε μεγαλύτερη συχνότητα παράγοντες που θεωρούνται δυσμενείς για την κλινική έκβαση της νόσου, όπως οι μεταλλάξεις του γονιδίου *TP53* και οι ελλείψεις στη χρωμοσωμική περιοχή 11q. Στη συγκεκριμένη μελέτη, το ποσοστό των δικλωνικών ασθενών με κλώνους σε μεταλλακτική «συμφωνία» ήταν πολύ μεγαλύτερο από αυτό των δικλωνικών ασθενών με κλώνους σε «ασυμφωνία», υποδεικνύοντας ότι η ύπαρξη κοινών ανοσογενετικών χαρακτηριστικών πιθανόν να παίζει ρόλο για την ωρίμανση, επιλογή και συνύπαρξη αυτών των κλώνων για μεγάλο χρονικό διάστημα [84].

Διεθνείς συστάσεις για την αντιμετώπιση των ασθενών με μονοκλωνική και ολιγοκλωνική χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο, η κατάσταση ΣΥΜ του αναδιαταγμένου γονιδίου IGHV θεωρείται ένας σημαντικός προγνωστικός παράγοντας για την κλινική εξέλιξη της νόσου, με τους ασθενείς με Μ-ΧΛΛ να έχουν κατά κανόνα καλύτερη πρόγνωση. Οι σύγχρονες διεθνείς οδηγίες συστήνουν την εξέταση του συγκεκριμένου δείκτη σε όλες τις περιπτώσεις ΧΛΛ, δηλαδή και σε επίπεδο γενικής πρακτικής και σε επίπεδο κλινικών δοκιμών [85] (Εικόνα 7).

Όσον αφορά στη διαχείριση των ασθενών με ολιγοκλωνική ΧΛΛ με βάση την κατάσταση ΣΥΜ, οι σύγχρονες διεθνείς οδηγίες από το ERIC (Ευρωπαϊκή κοινοπραξία για τη ΧΛΛ) [86] φαίνονται στην Εικόνα 8. Βέβαια, οι οδηγίες αυτές βασίζονται σε περιορισμένο όγκο δεδομένων από μικρό αριθμό μελετών (αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο). Σύμφωνα με τις συστάσεις του ERIC, οι ασθενείς με δύο κλώνους (δύο παραγωγικές αναδιατάξεις) σε «συμφωνία» ΣΥΜ (Μ-ΧΛΛ, ή Α-ΧΛΛ) θα πρέπει να αντιμετωπίζονται όπως οι μονοκλωνικοί ασθενείς με την αντίστοιχη κατάσταση ΣΥΜ, ενώ οι ασθενείς με «ασυμφωνία» ΣΥΜ θα πρέπει να αντιμετωπίζονται σαν αυτούς με Α-ΧΛΛ ΣΥΜ, για λόγους ασφάλειας. Για τους ασθενείς με παραπάνω από δύο κλώνους, οι οδηγίες συνιστούν να εντοπίζεται ο κύριος κλώνος (η αναδιάταξη με την μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης) σε κάθε ασθενή και η διαχείριση να γίνεται με βάση την κατάσταση ΣΥΜ αυτού του κλώνου.

iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL

 Clinical Trials & Observations

Michael Hallek, Bruce D. Cheson, Daniel Catovsky, Federico Caligaris-Cappio, Guillermo Dighiero, Hartmut Döhner, Peter Hillmen, Michael Keating, Emili Montserrat, Nicholas Chiorazzi, Stephan Stilgenbauer, Kanti R. Rai, John C. Byrd, Barbara Eichhorst, Susan O'Brien, Tadeusz Robak, John F. Seymour, Thomas J. Kipps

 Check for updates

Blood (2018) 131 (25): 2745–2760.

Additional tests before treatment		
Molecular cytogenetics (FISH) for del(13q), del(11q), del(17p), add(12) in peripheral blood lymphocytes	Always	Always
Conventional karyotyping in peripheral blood lymphocytes (with specific stimulation)	General practice NGI*	Clinical trial Desirable
<i>TP53</i> mutation	Always	Always
IGHV mutational status	Always	Always
Serum β_2 -microglobulin	Desirable	Always
CT scan of chest, abdomen, and pelvis	NGI	Desirable
MRI, PET scans	NGI	NGI
Abdominal ultrasound†	Possible	NGI

Εικόνα 7: Οι διεθνείς οδηγίες για την διαχείριση των ΧΛΛ ασθενών με βάση διάφορους προγνωστικούς δείκτες. *IGHV mutation status:* κατάσταση ΣΥΜ του γονιδίου IGHV, *general practice:* γενική πρακτική, *clinical trial:* κλινική δοκιμή, *additional tests before treatment:* επιπρόσθετα τεστ πριν τη θεραπεία. (Πηγή: βιβλιογρ. αναφ. 85)

2.2 Double productive

2.2.1 Concordant SHM status

2.2.2 Discordant SHM status

Same as for standard cases i.e., consider as M-CLL or U-CLL, according to the SHM status.

Check immunophenotype for the presence of 2 clonal populations.

Recommend to the physician that it is safer to consider as U-CLL; close follow-up.

3. Multiple (>2) productive rearrangements

Check immunophenotype for the presence of 2 or more clonal populations.

Perform NGS to assess the relative frequency of each clonotype and consider the predominant clonotype, if it is clearly identified (NOTE: specific guidelines are still to be provided/developed here).

Εικόνα 8: Οι οδηγίες από το ERIC για τη διαχείριση των ασθενών με ολιγοκλωνική ΧΑΛ. *Productive rearrangements:* παραγωγικές αναδιατάξεις, *concordant/discordant SHM:* ΣΥΜ σε «συμφωνία»/«ασυμφωνία», *close follow-up:* στενή παρακολούθηση, *immunophenotype:* ανοσοφαινότυπος, *predominant clonotype:* κυρίαρχος κλώνος. (Πηγή: βιβλιογρ. αναφ. 86).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ανάλογα με τον αριθμό των σωματικών μεταλλάξεων στο αναδιαταγμένο γονίδιο IGHV, οι ασθενείς με ΧΛΛ ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες, συγκεκριμένα την αμετάλλακτη ΧΛΛ (Α-ΧΛΛ) και τη μεταλλαγμένη ΧΛΛ (Μ-ΧΛΛ), με διαφορετικό βιολογικό και κλινικό υπόβαθρο [53,54,58].

Η κατάσταση της ΣΥΜ του γονιδίου IGHV αποτελεί έναν πολύ σημαντικό και ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη για την πορεία των ασθενών με ΧΛΛ και σύμφωνα με τις διεθνείς συστάσεις, ο δείκτης αυτός θα πρέπει να εξετάζεται σε όλους τους ασθενείς, τόσο στο επίπεδο της γενικής πρακτικής όσο και στο επίπεδο των κλινικών δοκιμών [85].

Ωστόσο, η ανάλυση της ΣΥΜ έχει προγνωστική σημασία αποκλειστικά σε περιπτώσεις ΧΛΛ με μονοκλωνικό πρότυπο, αδυνατώντας προς το παρόν να παρέχει πληροφορίες όσον αφορά στους ασθενείς με 2 ή περισσότερες παραγωγικές αναδιατάξεις ανοσοσφαιρίνης (ΙG). Κατά συνέπεια, οι υπάρχουσες διεθνείς οδηγίες όσον αφορά στην κλινική αντιμετώπιση των ασθενών με ολιγοκλωνική νόσο βασίζονται κυρίως στη λογική, λόγω έλλειψης ικανού όγκου δεδομένων [86].

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο συγκριτικός ανοσογενετικός χαρακτηρισμός ασθενών με μονοκλωνική και ολιγοκλωνική ΧΛΛ (μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ, αντίστοιχα), με απώτερο στόχο την άντληση νέων δεδομένων που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στη βελτίωση της μοριακής κατάταξης των ασθενών της ο-ΧΛΛ με προεκτάσεις στην πρόγνωση και αντιμετώπιση της νόσου.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Ομάδα μελέτης

Για το σκοπό της παρούσας μελέτης αναλύθηκαν δεδομένα που αφορούσαν τα μοριακά χαρακτηριστικά των IGHV-D-J αναδιατάξεων από ασθενείς με μονοκλωνική και ολιγοκλωνική ΧΛΛ (μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ, αντίστοιχα). Οι ασθενείς προέρχονταν από διάφορα επιστημονικά κέντρα ανά τον κόσμο. Συνολικά, αναλύθηκαν 53.276 αλληλουχίες κλωνοτυπικών αναδιατάξεων της βαριάς αλυσίδας IGH από 51.763 ασθενείς, εκ των οποίων 50.364 ασθενείς ανήκαν στη μ-ΧΛΛ και 1.399 ασθενείς εμφάνισαν ο-ΧΛΛ (2 ή περισσότερες παραγωγικές αναδιατάξεις).

Τεχνικές

- Απομόνωση του RNA από το αίμα των ασθενών.
- Σύνθεση του cDNA.
- Ενίσχυση των κλωνοτυπικών αναδιατάξεων IGHV-D-J της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών με την τεχνική PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές.
- Καθαρισμός των προϊόντων PCR και αλληλούχηση.
- Ανοσογενετικός χαρακτηρισμός των αλληλουχιών με το πρόγραμμα βιοπληροφορικής ανάλυσης IMGT/HighV-QUEST. Το πρόγραμμα παράγει υπολογιστικά φύλλα που περιέχουν πληροφορίες για την κάθε αναδιάταξη ανοσοσφαιρίνης, όπως για τα γονίδια IG, το ποσοστό ομολογίας του αναδιαταγμένου γονιδίου IGV με το αντίστοιχο μη αναδιαταγμένο γονίδιο και το μήκος της περιοχής CDR3.

Μετα-ανάλυση δεδομένων

Τα ανοσογενετικά χαρακτηριστικά που αναλύθηκαν ήταν τα εξής:

1. Το ρεπερτόριο έκφρασης των γονιδίων IGHV, IGHD και IGHJ
2. Το μήκος της περιοχής VH CDR3
3. Η κατάσταση ΣΥΜ του γονιδίου IGHV

4. Η στερεοτυπία της περιοχής CDR3

Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν υπολογιστικά φύλλα, όπου υπολογίστηκαν: οι συχνότητα εμφάνισης κάθε γονιδίου και αλληλομόρφου IGH, η συχνότητα συνδυασμών μεταξύ συγκεκριμένων γονιδίων IGHV, D και J, η συχνότητα κάθε μήκους CDR3, οι συνδυασμοί κάθε IGHV, D, J γονιδίου με κάθε διακριτό μήκος CDR3, οι συχνότητες μεταλλαγμένων και αμετάλλακτων αναδιατάξεων (κατάσταση ΣΥΜ) συνολικά και σε συνδυασμό με κάθε IGHV γονίδιο και κάθε διακριτό μήκος CDR3. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος TEIRESIAS [90] για την αναγνώριση στερεότυπων υποσυνόλων. Συνολικά, πραγματοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση των παραπάνω ανοσογενετικών χαρακτηριστικών μεταξύ ασθενών με μ-ΧΛΛ και με ο-ΧΛΛ.

Στη συνέχεια οι ασθενείς της ο-ΧΛΛ χωρίστηκαν σε τρεις υποκατηγορίες: ασθενείς με αμιγώς Μ-ΧΛΛ κλώνους, ασθενείς με αμιγώς Α-ΧΛΛ κλώνους και ασθενείς με κλώνους σε «ασυμφωνία» ΣΥΜ (συνύπαρξη Μ-ΧΛΛ και Α-ΧΛΛ κλώνων στον ίδιο ασθενή). Για τον σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν υπολογιστικά φύλλα με σκοπό τον υπολογισμό της συχνότητας εμφάνισης κάθε μιας από τις παραπάνω κατηγορίες εντός της ο-ΧΛΛ, καθώς και τη συγκριτική ανάλυση των συχνοτήτων εμφάνισης κάθε γονιδίου IGH (V, D και J) και κάθε διακριτού μήκους CDR3, μεταξύ των τριών παραπάνω κατηγοριών ο-ΧΛΛ.

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με έλεγχο χ^2 .

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Ρεπερτόριο έκφρασης γονιδίων IGHV

Συνολικά, μελετήθηκε η συχνότητα των γονιδίων IGHV σε 50.364 αναδιατάξεις της βαριάς αλυσίδας της κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης (IGH) από ασθενείς με μονοκλωνική ΧΛΛ (μ-ΧΛΛ) και 2.912 αναδιατάξεις IGH από 1.400 ασθενείς με ολιγοκλωνική ΧΛΛ (ο-ΧΛΛ).

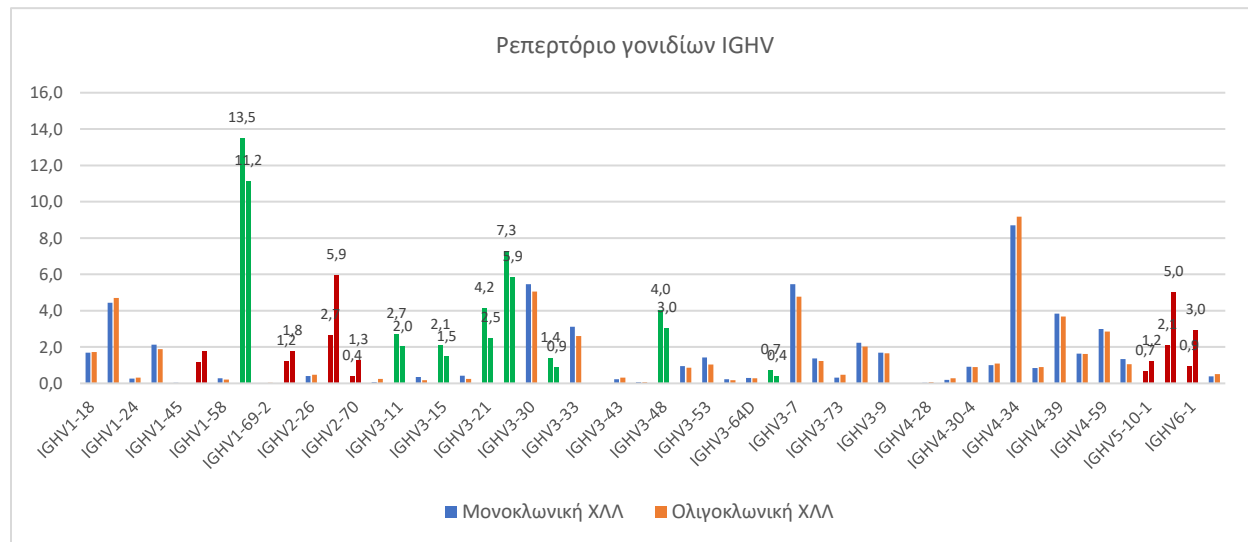
Συνολικά, στην κατηγορία της μ-ΧΛΛ ταυτοποιήθηκαν 52 διαφορετικά γονίδια IGHV. Από αυτά, τα 8 ήταν συχνά (συχνότητα εμφάνισης >4% για το καθένα) με συνολική συχνότητα 53% επί του συνόλου των αναδιατάξεων αυτής της κατηγορίας. Στην ο-ΧΛΛ ταυτοποιήθηκαν συνολικά 49 διαφορετικά γονίδια IGHV (τα οποία εντοπίστηκαν όλα και στη μ-ΧΛΛ). Και σε αυτή την περίπτωση, μόνο 8 γονίδια IGHV ήταν συχνά (συχνότητα >4%) με συνολική συχνότητα εμφάνισης 51,7% επί του συνόλου των αναδιατάξεων στην ο-ΧΛΛ. Επομένως, και στις δύο κατηγορίες ΧΛΛ με διαφορετικά πρότυπα κλωνικότητας ο αριθμός των συχνών γονιδίων ήταν ο ίδιος και σχετικά μικρός: 8/52 (15,4%) στη μ-ΧΛΛ και 8/49 (16,3%) στην ο-ΧΛΛ. Επομένως, ο βαθμός των περιορισμών στο ρεπερτόριο έκφρασης των γονιδίων IGHV ήταν παρόμοιος στις δύο κατηγορίες ΧΛΛ με διαφορετικά πρότυπα κλωνικότητας, τόσο στον αριθμό όσο και στη συνολική συχνότητα των πιο συχνά εκφραζόμενων γονιδίων.

Όσον αφορά στα συχνά γονίδια IGHV, τα ακόλουθα 6 γονίδια ήταν συχνά και στις δύο κατηγορίες ΧΛΛ: IGHV1-2, IGHV1-69, IGHV3-23, IGHV3-30, IGHV3-7 και IGHV4-34. Το γονίδιο IGHV1-69 ήταν το πιο συχνό γονίδιο και στις δύο κατηγορίες, με συχνότητες 13,5% και 11,2% σε μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ, αντίστοιχα. Από την άλλη, τα γονίδια IGHV3-21 και IGHV3-48 ήταν συχνά μόνο στη μ-ΧΛΛ, ενώ τα IGHV2-5 και IGHV5-51 εμφανίστηκαν συχνά μόνο στην ο-ΧΛΛ.

Πιο ειδικά, τα ακόλουθα 16 γονίδια IGHV (16/49, 32,7%) παρουσίασαν στατιστικά σημαντικό διαφορετικό πρότυπο έκφρασης μεταξύ της μ-ΧΛΛ και της ο-ΧΛΛ (**Διάγραμμα 1**): IGHV1-46, IGHV1-69, IGHV1-8, IGHV2-5, IGHV2-70, IGHV2-70D, IGHV3-11, IGHV3-15, IGHV3-21, IGHV3-23, IGHV3-30-3, IGHV3-48, IGHV3-66, IGHV5-10-01, IGHV5-51, IGHV6-1. Συγκεκριμένα, τα γονίδια IGHV1-69 (το πιο συχνό σε μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ),

IGHV3-11, IGHV3-15, IGHV3-21, IGHV3-23 (συχνό και στις 2 ομάδες), IGHV3-30-3, IGHV3-48 και IGHV3-66 εμφάνισαν μεγαλύτερα ποσοστά έκφρασης στη μ-ΧΛΛ σε σχέση με την ο-ΧΛΛ, ενώ τα γονίδια IGHV1-46, IGHV1-8, IGHV2-5, IGHV2-70, IGHV2-70-D, IGHV5-10-01, IGHV5-51, IGHV6-1 εμφάνισαν το αντίθετο πρότυπο έκφρασης.

Οι διαφορές μεταξύ των δύο κατηγοριών ΧΛΛ αφορούσαν κυρίως στα γονίδια που δεν ήταν συχνά σε καμία από τις δύο κατηγορίες (10/16 γονίδια). Αντίθετα, τα 6 γονίδια ήταν συχνά σε μια τουλάχιστον κατηγορία ΧΛΛ, με τις διαφορές που παρατηρήθηκαν σε αυτά τα γονίδια (IGHV1-69, IGHV2-5, IGHV3-21, IGHV3-23, IGHV3-48, IGHV5-51) να εμφανίζουν ισχυρότερη στατιστική σημασία ($P < 0.01$) σε σχέση με τα περισσότερα από τα υπόλοιπα γονίδια.



Διάγραμμα 1: Σύγκριση του ρεπερτορίου έκφρασης των γονιδίων IGHV μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα γονίδια που η συχνότητά τους ήταν σημαντικά αυξημένη στη μ-ΧΛΛ, ενώ με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα γονίδια που η συχνότητά τους ήταν σημαντικά αυξημένη στην ο-ΧΛΛ.

2. Ρεπερτόριο έκφρασης αλληλομόρφων των γονιδίων IGHV

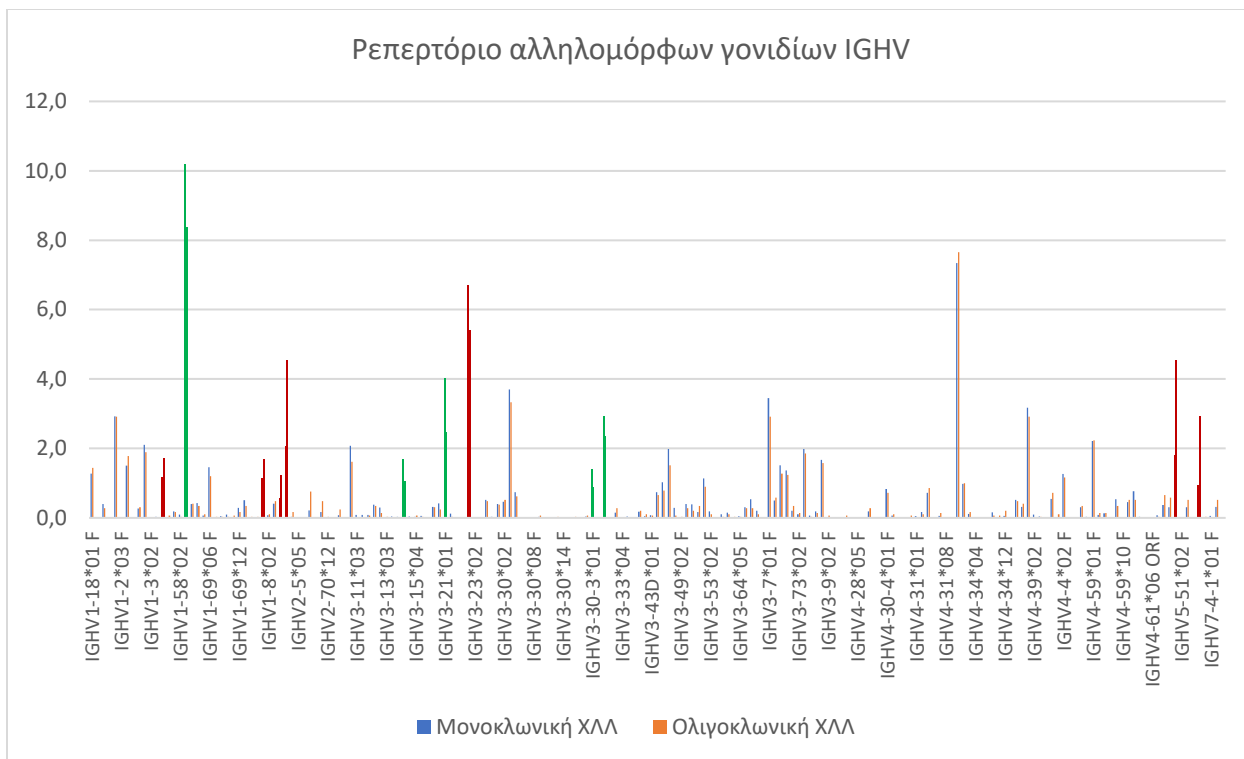
Συνολικά, τα αλληλόμορφα των γονιδίων IGHV που ταυτοποιήθηκαν ήταν 192 στη μ-ΧΛΛ και 125 στην ο-ΧΛΛ. Συνολικά, 124 αλληλόμορφα εντοπίστηκαν και στις δύο

κατηγορίες ΧΛΛ. Από τα υπόλοιπα, 1 αλληλόμορφο εντοπίστηκε μόνο στην ο-ΧΛΛ και 68 μόνο στη μ-ΧΛΛ (**Διάγραμμα 2**).

Συγκρίνοντας τις συχνότητες εμφάνισης των 124 κοινών αλληλομόρφων μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ, στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στην έκφραση 24 αλληλομόρφων (24/124, 19,4%), τα οποία ανήκαν σε 19 διαφορετικά γονίδια IGHV. Τα περισσότερα από τα αλληλόμορφα που παρουσίασαν διαφορά στην έκφρασή τους μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ (19/24, 79,2%) ανήκαν σε γονίδια με στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο κατηγοριών ΧΛΛ. Τα αλληλόμορφα αυτά ήταν τα εξής: IGHV1-46*01, IGHV1-69*01, IGHV1-8*01, IGHV2-5*01, IGHV2-5*02, IGHV2-5*04, IGHV2-70*01, IGHV2-70*11, IGHV2-70D*04, IGHV3-15*01, IGHV3-21*01, IGHV3-23*01, IGHV3-30-3*01, IGHV3-48*04, IGHV5-10-1*01, IGHV5-10-1*03, IGHV5-51*01, IGHV5-51*03, IGHV6-1*01. Τα περισσότερα από αυτά τα αλληλόμορφα εμφάνισαν τη μεγαλύτερη συχνότητα έκφρασης στο επίπεδο του κάθε μεμονωμένου γονιδίου IGHV. Εξαιρέση αποτέλεσαν τα αλληλόμορφα IGHV2-5*04 και IGHV3-48*04, τα οποία εντοπίστηκαν σε μικρότερες συχνότητες έκφρασης σε σχέση με τα υπόλοιπα αλληλόμορφα των αντίστοιχων γονιδίων IGHV.

Τα 5 από τα 24 (20,8%) αλληλόμορφα γονιδίων IGHV που παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ δεν ανήκαν σε γονίδια IGHV με σημαντική διαφορά στην έκφραση ανάμεσα σε μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Αυτά ήταν τα αλληλόμορφα IGHV3-33*03, IGHV3-43*02, IGHV3-49*05, IGHV4-34*12, και IGHV4-4*01.

Τέλος, τα γονίδια IGHV3-11 και IGHV3-66, τα οποία εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ (**Διάγραμμα 1**), δεν έφεραν κανένα αλληλόμορφο που να εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά, πιθανά λόγω της μικρότερης συχνότητας των αλληλομόρφων σε σχέση με τα αντίστοιχα γονίδια IGHV.



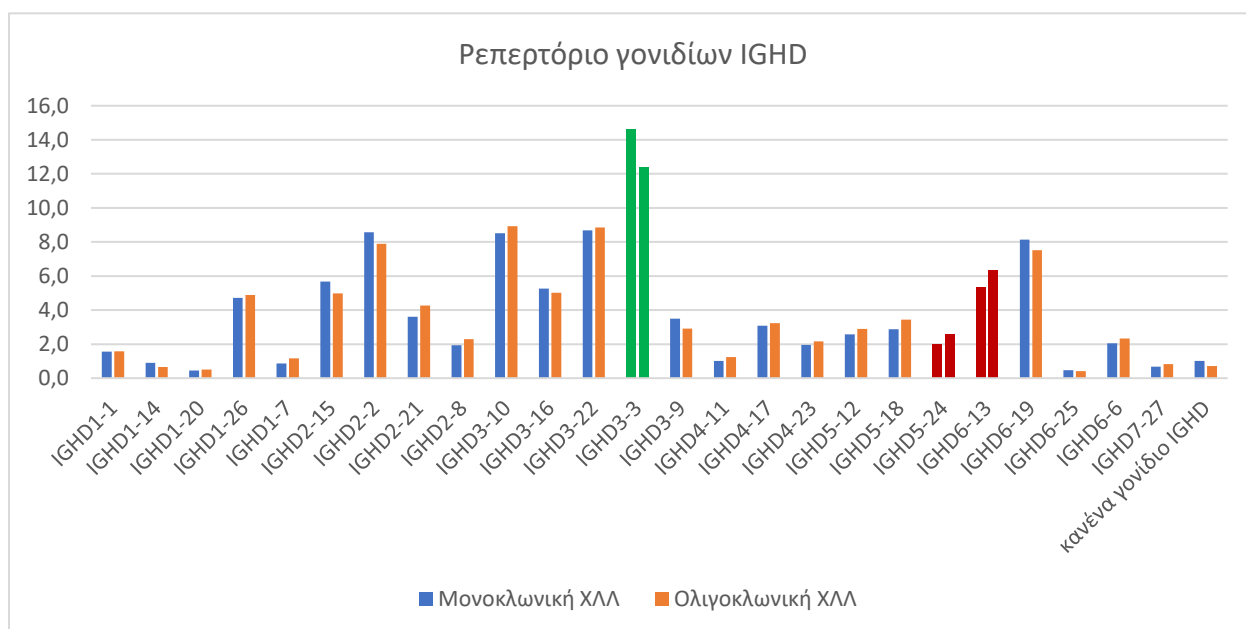
Διάγραμμα 2: Σύγκριση του ρεπερτορίου έκφρασης των αλληλομόρφων γονιδίων IGHV μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα αλληλόμορφα που η συχνότητά τους ήταν σημαντικά αυξημένη στη μ-ΧΛΛ, ενώ με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα αλληλόμορφα που η συχνότητά τους ήταν σημαντικά αυξημένη στην ο-ΧΛΛ.

3. Ρεπερτόριο έκφρασης γονιδίων IGHD

Στη μ-ΧΛΛ ταυτοποιήθηκαν συνολικά 25 διαφορετικά γονίδια IGHD, 9 εκ των οποίων (9/25, 36%) χαρακτηρίστηκαν ως συχνά (συχνότητα εμφάνισης >4%), με συνολική συχνότητα 69,5% επί του συνόλου των αναδιατάξεων αυτής της κατηγορίας της νόσου. Από την άλλη, στην ο-ΧΛΛ ταυτοποιήθηκαν τα ίδια 25 γονίδια IGHD, 10 εκ των οποίων (10/25, 40%) χαρακτηρίστηκαν ως συχνά (συχνότητα >4%), με συνολική συχνότητα 71% επί του συνόλου των αναδιατάξεων της ο-ΧΛΛ. Κανένα γονίδιο IGHD δεν ταυτοποιήθηκε στο 1% των αναδιατάξεων της μ-ΧΛΛ και στο 0,7% των αναδιατάξεων της ο-ΧΛΛ, πιθανότατα λόγω της εκτεταμένης δράσης νουκλεασών που οδήγησε στην αφαίρεση του μεγαλύτερου τμήματος του γονιδίου IGHD από την αναδιάταξη. Εννέα γονίδια IGHD ήταν συχνά και στις δύο κατηγορίες ΧΛΛ (9/25, 36%): IGHD1-26, IGHD2-15, IGHD2-2, IGHD3-

10, IGHD3-16, IGHD3-22, IGHD3-3 (το πιο συχνό και στους δύο τύπους ΧΛΛ), IGHD6-13 και IGHD6-19. Το γονίδιο IGHD2-21 ήταν συχνό μόνο στο ρεπερτόριο της ο-ΧΛΛ.

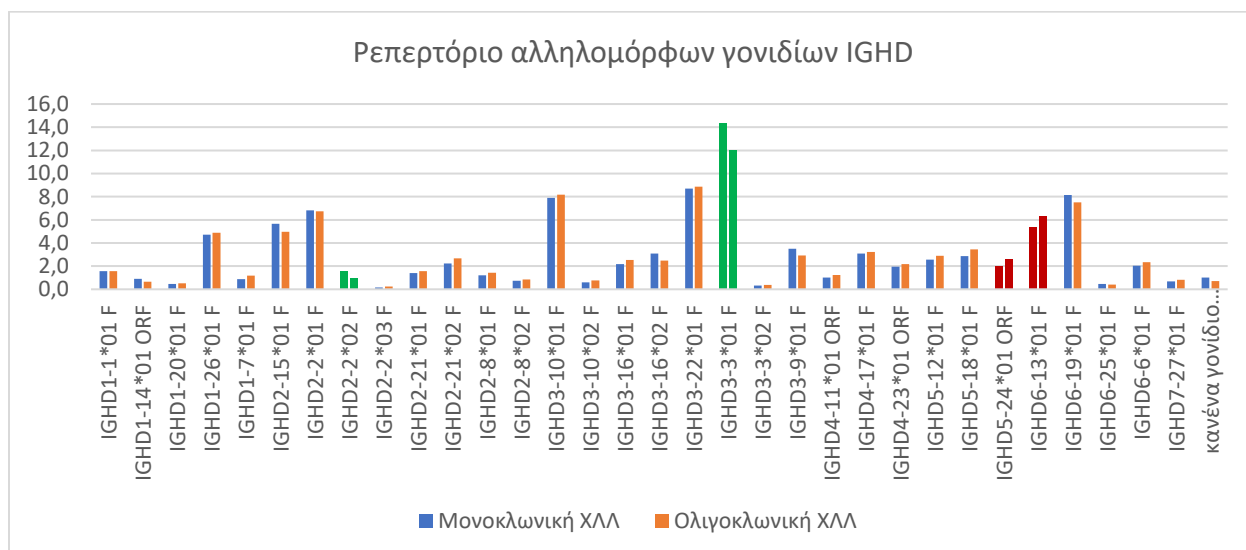
Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ παρατηρήθηκαν στο πρότυπο έκφρασης τριών γονιδίων IGHD (3/25, 12%): IGHD3-3 (το πιο συχνό σε μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ), IGHD5-24 και IGHD6-13 (συχνό σε μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ) (**Διάγραμμα 3**). Το γονίδιο IGHD3-3 ήταν συχνότερο στη μ-ΧΛΛ, ενώ τα IGHD5-24 και IGHD6-13 ήταν συχνότερα στην ο-ΧΛΛ. Η διαφορά έκφρασης του γονιδίου IGHD3-3 (το πιο συχνό και στις δύο κατηγορίες ΧΛΛ) εμφάνισε υψηλότερο επίπεδο στατιστικής σημασίας ($P < 0.01$) σε σύγκριση με τα άλλα δύο γονίδια. Επομένως, τα περισσότερα γονίδια IGHD που ήταν συχνά και στις δύο κατηγορίες ΧΛΛ (7/9) δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τη συχνότητα έκφρασής τους.



Διάγραμμα 3: Σύγκριση του ρεπερτορίου έκφρασης των γονιδίων IGHD μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα γονίδια που η συχνότητά τους ήταν σημαντικά αυξημένη στη μ-ΧΛΛ, ενώ με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα γονίδια που η συχνότητά τους ήταν σημαντικά αυξημένη στην ο-ΧΛΛ.

4. Ρεπερτόριο έκφρασης αλληλομόρφων των γονιδίων IGHD

Τα αλληλόμορφα των γονιδίων IGHD που ταυτοποιήθηκαν ήταν 32 τόσο στη μ-ΧΛΛ όσο και στην ο-ΧΛΛ. Τα αλληλόμορφα αυτά ήταν τα ίδια και στις δύο κατηγορίες ΧΛΛ. Συγκρίνοντας την έκφραση των αλληλομόρφων αυτών μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συχνότητα 4 αλληλομόρφων (4/32, 12,5%), τα οποία ανήκαν σε 4 διαφορετικά γονίδια IGHD (**Διάγραμμα 4**). Τα αλληλόμορφα αυτά ήταν τα: IGHD2-2*02, IGHD3-3*01, IGHD6-13*01 και IGHD5-24*01. Τα IGHD3-3*01, IGHD6-13*01 και IGHD5-24*01 (3/4, 75%) ανήκαν σε γονίδια στα οποία επίσης παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητά τους μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Το αλληλόμορφο IGHD2-2*02 (1/4, 25%) παρουσίασε σημαντικά αυξημένη συχνότητα στη μ-ΧΛΛ σε σχέση με την ο-ΧΛΛ, με υψηλό επίπεδο στατιστικής σημασίας ($P < 0.01$), κάτι που δεν παρατηρήθηκε στο επίπεδο του (συχνού) γονιδίου IGHD2-2. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το άλλο αλληλόμορφο (IGHD2-2*01) του εν λόγω γονιδίου, το οποίο εμφάνισε μεγαλύτερη συχνότητα από το IGHD2-2*02 δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφρασή του μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ (**Διάγραμμα 4**).



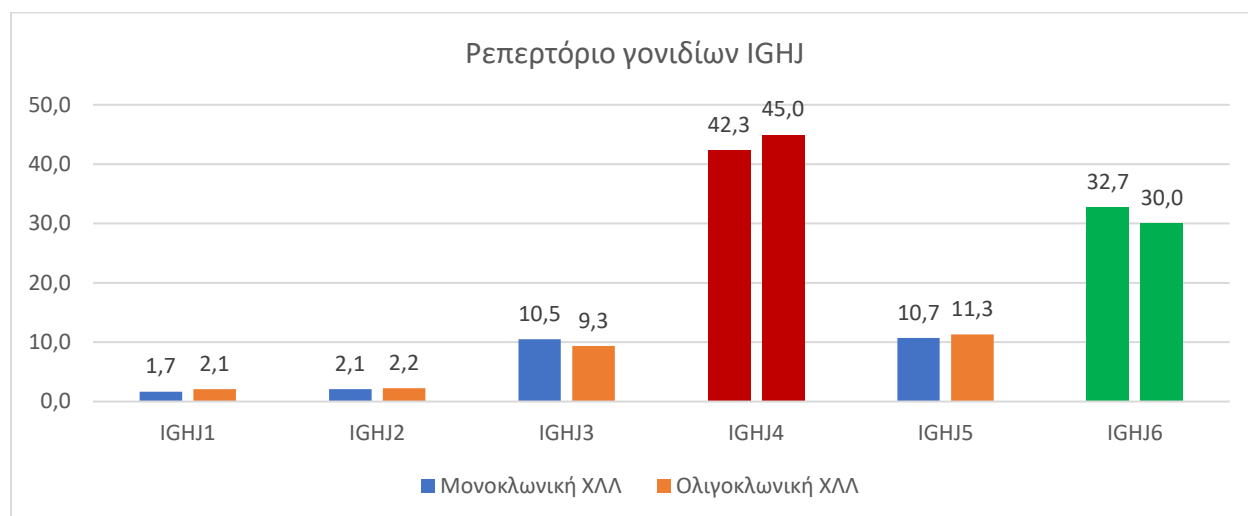
Διάγραμμα 4: Σύγκριση του ρεπερτορίου έκφρασης των αλληλομόρφων γονιδίων IGHD μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα αλληλόμορφα που η συχνότητά τους

ήταν σημαντικά αυξημένη στη μ-ΧΛΛ, ενώ με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα αλληλόμορφα που η συχνότητά τους ήταν σημαντικά αυξημένη στην ο-ΧΛΛ.

5. Ρεπερτόριο έκφρασης γονιδίων IGHJ

Το γονίδιο IGHJ4 «κυριάρχησε» στο ρεπερτόριο τόσο της μ-ΧΛΛ όσο και της ο-ΧΛΛ, με αμέσως επόμενο το IGHJ6. Ειδικότερα, οι συχνότητες εμφάνισης στη μ-ΧΛΛ ήταν 42,3% για το IGHJ4 και 32,7% για το IGHJ6 ενώ οι αντίστοιχες τιμές για την ο-ΧΛΛ ήταν 45% και 30,1% (**Διάγραμμα 5**).

Οι πιο σημαντικές διαφορές μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ παρατηρήθηκαν στα δύο αυτά συχνά γονίδια IGHJ (2/6, 33,3%). Συγκεκριμένα το IGHJ4 εντοπίστηκε σε σημαντικά αυξημένη συχνότητα στην ο-ΧΛΛ, ενώ το IGHJ6 εμφάνισε σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα στη μ-ΧΛΛ (**Διάγραμμα 5**).



Διάγραμμα 5: Σύγκριση του ρεπερτορίου έκφρασης των γονιδίων IGHJ μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα γονίδια που η συχνότητά τους ήταν αυξημένη στη μ-ΧΛΛ, ενώ με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα γονίδια που η συχνότητά τους ήταν αυξημένη στην ο-ΧΛΛ.

6. Ρεπερτόριο έκφρασης αλληλομόρφων των γονιδίων IGHJ

Συνολικά, εντοπίστηκαν 13 διαφορετικά αλληλόμορφα των γονιδίων IGHIJ στις δύο κατηγορίες ΧΛΛ. Από αυτά, μόνο το αλληλόμορφο IGHIJ6*02 (1/13, 7,7%) παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητά του μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ (**Διάγραμμα 6**). Όπως και το αντίστοιχο γονίδιο, το αλληλόμορφο IGHIJ6*02 εντοπίστηκε με μεγαλύτερη συχνότητα στη μ-ΧΛΛ.



Διάγραμμα 6: Σύγκριση του ρεπερτορίου έκφρασης των αλληλομόρφων γονιδίων IGHIJ μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα αλληλόμορφα που η συχνότητά τους ήταν σημαντικά αυξημένη στη μ-ΧΛΛ.

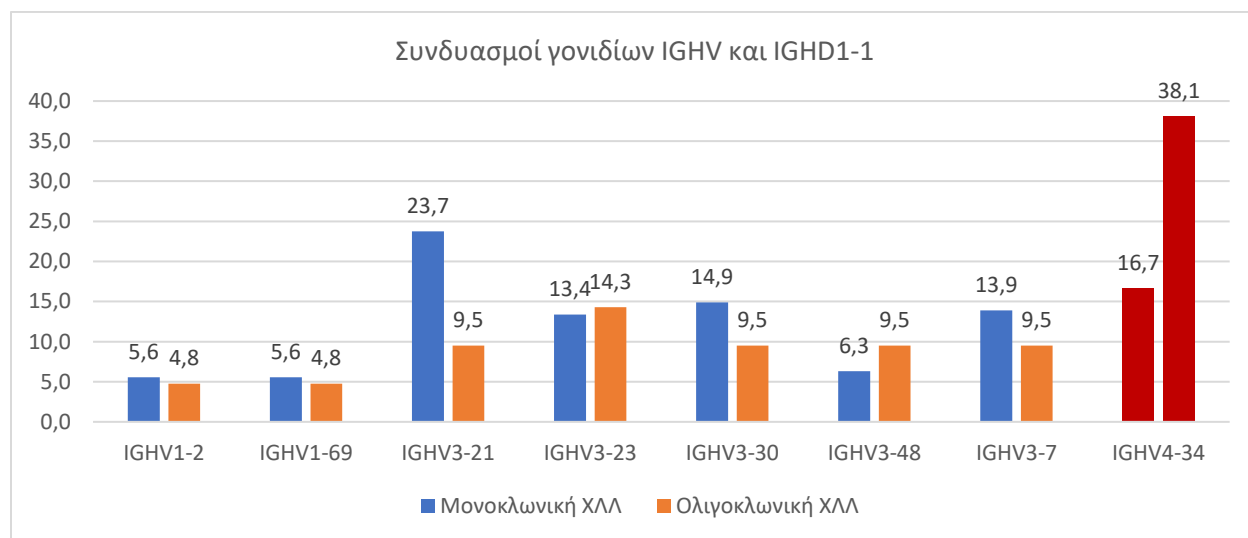
7. Συνδυασμοί γονιδίων IGHV και IGHD

Στη συγκεκριμένη ανάλυση συμπεριλήφθηκαν μόνο τα 8 γονίδια IGHV με αυξημένη συχνότητα σε μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ (συχνότητα >4%): IGHV1-2, IGHV1-69, IGHV3-21, IGHV3-23, IGHV3-30, IGHV3-48, IGHV3-7, και IGHV4-34. Τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια (6/8, 75%) εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ όσον αφορά στην τάση τους να συνδυάζονται με συγκεκριμένα IGHD γονίδια.

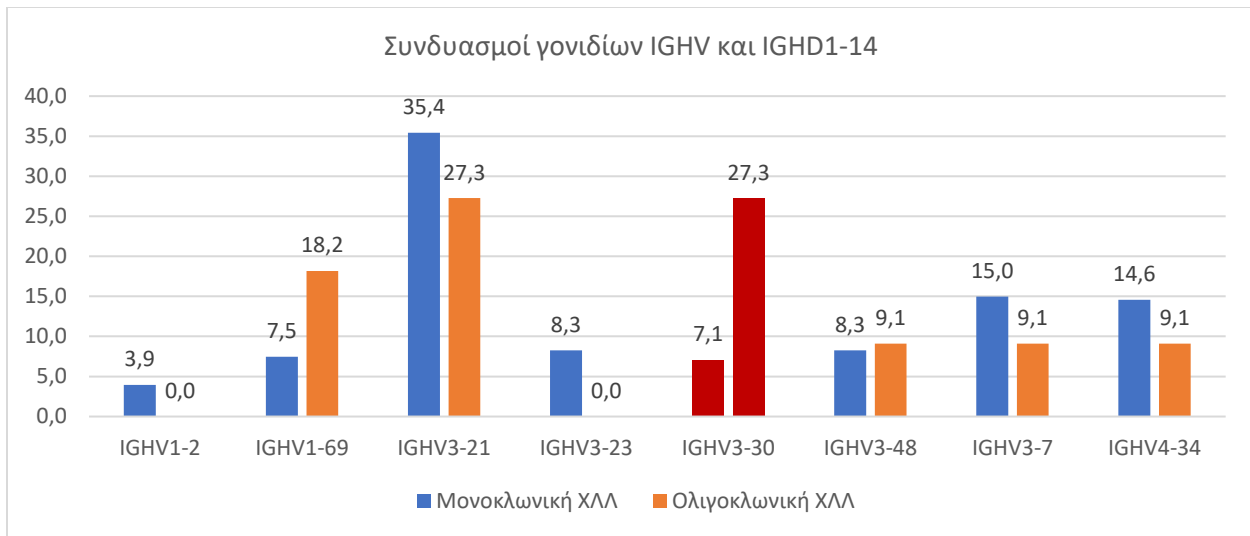
Οι ακόλουθοι συνδυασμοί γονιδίων IGHV-IGHD χαρακτηρίστηκαν από στατιστικά σημαντικές διαφορές: οι συνδυασμοί IGHV3-48/IGHD4-23 και IGHV3-7/IGHD6-13 ήταν πιο συχνόι στη μ-ΧΛΛ. Αντίθετο πρότυπο εμφάνισης παρατηρήθηκε για τους εξής

συνδυασμούς: IGHV1-2/IGHD4-11, IGHV1-2/IGHD4-23, IGHV1-2/IGHD6-13, IGHV3-23/IGHD3-9, IGHV3-30/IGHD1-14, IGHV3-30/IGHD4-11, IGHV3-7/IGHD1-26, IGHV3-7/IGHD3-9, IGHV4-34/IGHD1-1 και IGHV4-34/IGHD3-16. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στα **Διαγράμματα 7.1 έως 7.8**, στα οποία οι συνδυασμοί που υπερτερούν στη μ-ΧΛΛ απεικονίζονται με πράσινο χρώμα, ενώ εκείνοι που υπερτερούν στην ο-ΧΛΛ απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα. Τα γονίδια IGHV1-69 και IGHV3-21 δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά στις συχνότητες συνδυασμού τους με τα διαφορετικά γονίδια IGHD μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ.

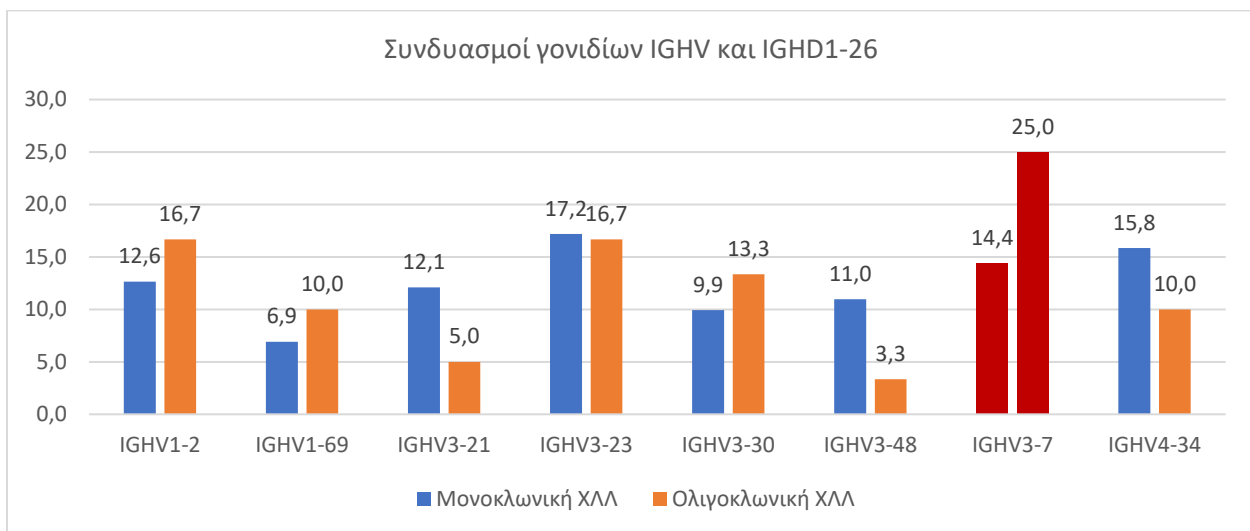
Συνολικά, πολύ λίγοι συνδυασμοί γονιδίων IGHV-IGHD (12/200, 6%) παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο κατηγοριών της νόσου. Στις περισσότερες περιπτώσεις (10/12) η συχνότητα ήταν μεγαλύτερη στην ο-ΧΛΛ. Το φαινόμενο αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι αυτή η ομάδα ΧΛΛ περιλάμβανε πολύ λιγότερες αναδιατάξεις και άρα ήταν πιο πιθανό οι περιορισμοί να γίνουν πιο εμφανείς.



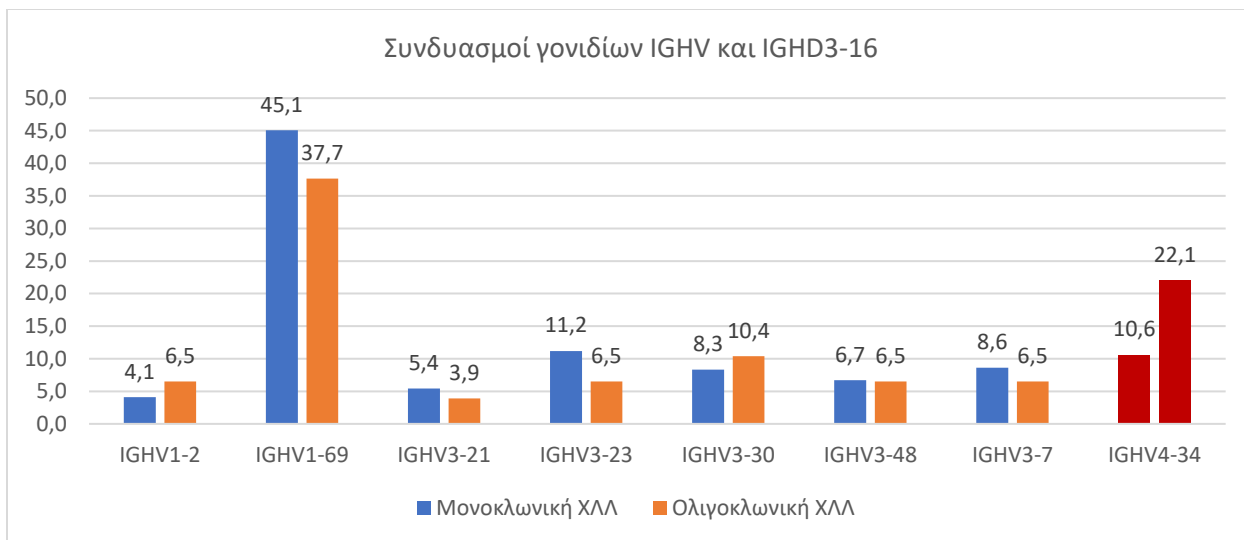
Διάγραμμα 7.1: Σύγκριση της συχνότητας συνδυασμών γονιδίων IGHV με το γονίδιο IGHD1-1 μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι συνδυασμοί που η συχνότητα τους ήταν σημαντικά αυξημένη στην ο-ΧΛΛ.



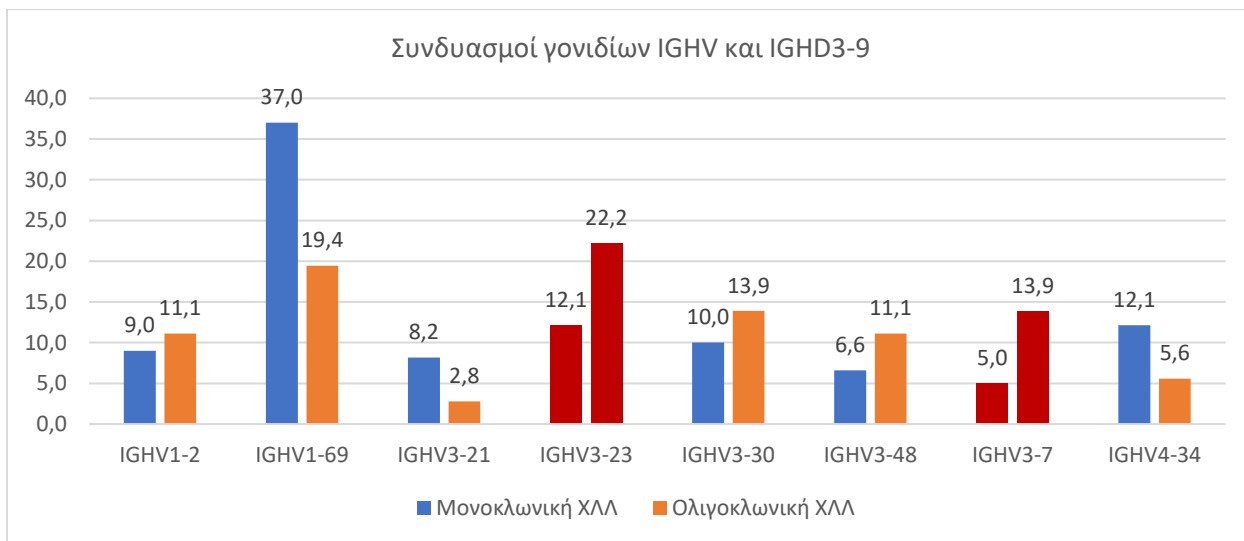
Διάγραμμα 7.2: Σύγκριση της συχνότητας συνδυασμών γονιδίων IGHV με το γονίδιο IGHD1-14 μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι συνδυασμοί που η συχνότητά τους ήταν σημαντικά αυξημένη στην ο-ΧΛΛ.



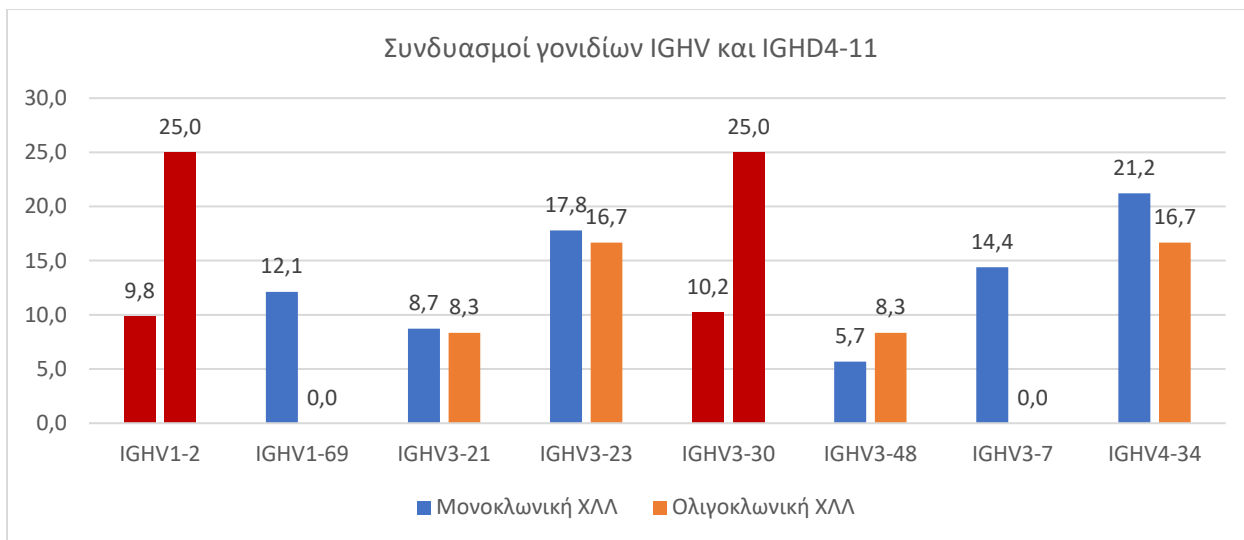
Διάγραμμα 7.3: Σύγκριση της συχνότητας συνδυασμών γονιδίων IGHV με το γονίδιο IGHD1-26 μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι συνδυασμοί που η συχνότητά τους ήταν σημαντικά αυξημένη στην ο-ΧΛΛ.



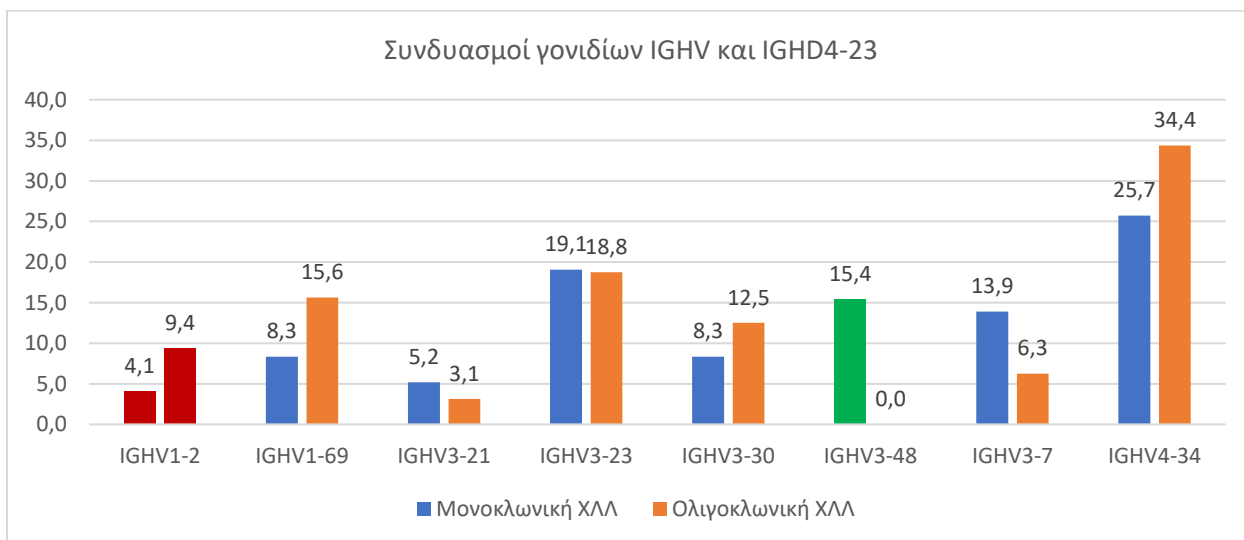
Διάγραμμα 7.4: Σύγκριση της συχνότητας συνδυασμών γονιδίων IGHV με το γονίδιο IGHD3-16 μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι συνδυασμοί που η συχνότητά τους ήταν σημαντικά αυξημένη στην ο-ΧΛΛ.



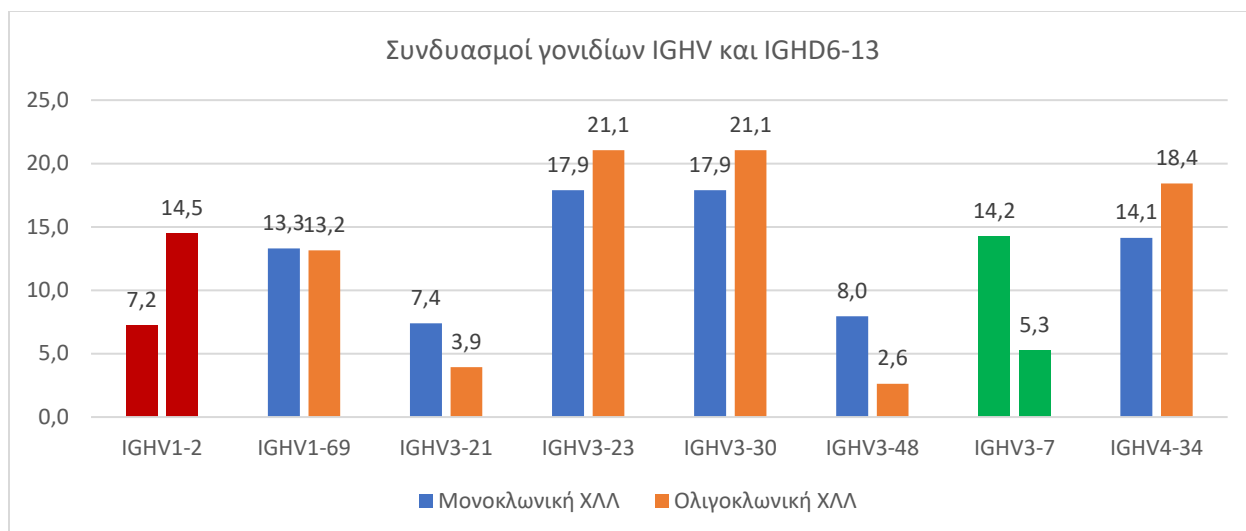
Διάγραμμα 7.5: Σύγκριση της συχνότητας συνδυασμών γονιδίων IGHV με το γονίδιο IGHD3-9 μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι συνδυασμοί που η συχνότητά τους ήταν σημαντικά αυξημένη στην ο-ΧΛΛ.



Διάγραμμα 7.6: Σύγκριση της συχνότητας συνδυασμών γονιδίων IGHV με το γονίδιο IGHD4-11 μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι συνδυασμοί που η συχνότητά τους ήταν σημαντικά αυξημένη στην ο-ΧΛΛ.



Διάγραμμα 7.7: Σύγκριση της συχνότητας συνδυασμών γονιδίων IGHV με το γονίδιο IGHD4-23 μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι συνδυασμοί που η συχνότητά τους ήταν σημαντικά αυξημένη στη μ-ΧΛΛ, ενώ με κόκκινο χρώμα οι συνδυασμοί που η συχνότητά τους ήταν σημαντικά αυξημένη στην ο-ΧΛΛ.



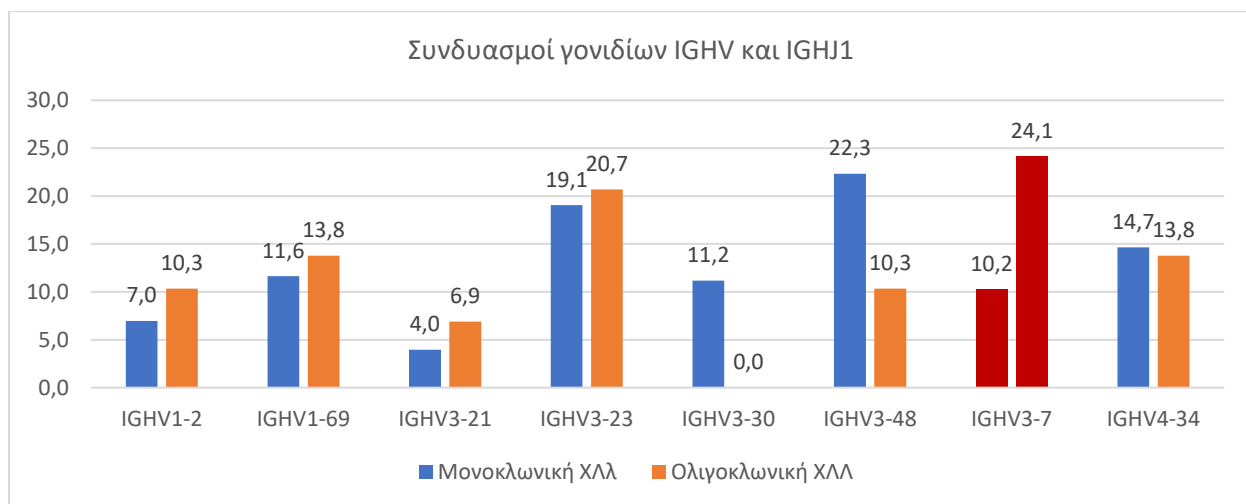
Διάγραμμα 7.8: Σύγκριση της συχνότητας συνδυασμών γονιδίων IGHV με το γονίδιο IGHD6-13 μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι συνδυασμοί που η συχνότητα τους ήταν σημαντικά αυξημένη στη μ-ΧΛΛ, ενώ με κόκκινο χρώμα οι συνδυασμοί που η συχνότητα τους ήταν σημαντικά αυξημένη στην ο-ΧΛΛ.

8. Συνδυασμοί γονιδίων IGHV και IGHJ

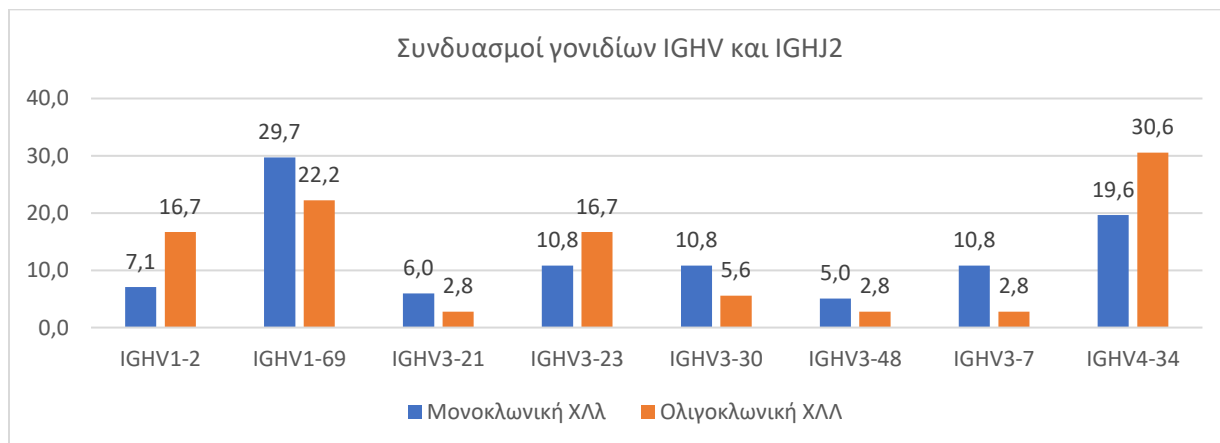
Από τα 8 συχνά γονίδια IGHV που συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση, μόνο 3 (3/8, 37,5%) εκδήλωσαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην τάση τους να συνδυάζονται με συγκεκριμένα γονίδια IGHJ μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Οι συνδυασμοί με σημαντικά αυξημένη συχνότητα ήταν οι εξής: IGHV1-2/IGHJ5 και IGHV3-7/IGHJ1 για την ο-ΧΛΛ και IGHV3-21/IGHJ6 για τη μ-ΧΛΛ. Τα γονίδια IGHV1-69, IGHV3-23, IGHV3-30, IGHV3-48 και IGHV4-34 δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ όσον αφορά στους συνδυασμούς τους με τα γονίδια IGHJ. Τα παραπάνω αποτελέσματα απεικονίζονται λεπτομερώς στα **Διαγράμματα 8.1 έως 8.6**, στα οποία παρουσιάζονται τα ποσοστά των συνδυασμών IGHV/IGHJ στη μ-ΧΛΛ και την ο-ΧΛΛ.

Συνεπώς, πολύ λίγοι συνδυασμοί IGHV-IGHJ (3/48, 6,3%) εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητά τους μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Ο ένας από αυτούς (1/3), ο IGHV3-21/IGHJ6 αφορούσε σε γονίδια IGHV και IGHJ με στατιστικά αυξημένη συχνότητα εμφάνισης στη μ-ΧΛΛ. Αντίθετα, οι συνδυασμοί IGHV3-7/IGHJ1 και IGHV1-2/IGHJ5 ήταν σημαντικά συχνότεροι στην ο-ΧΛΛ σε σχέση με τη μ-ΧΛΛ.

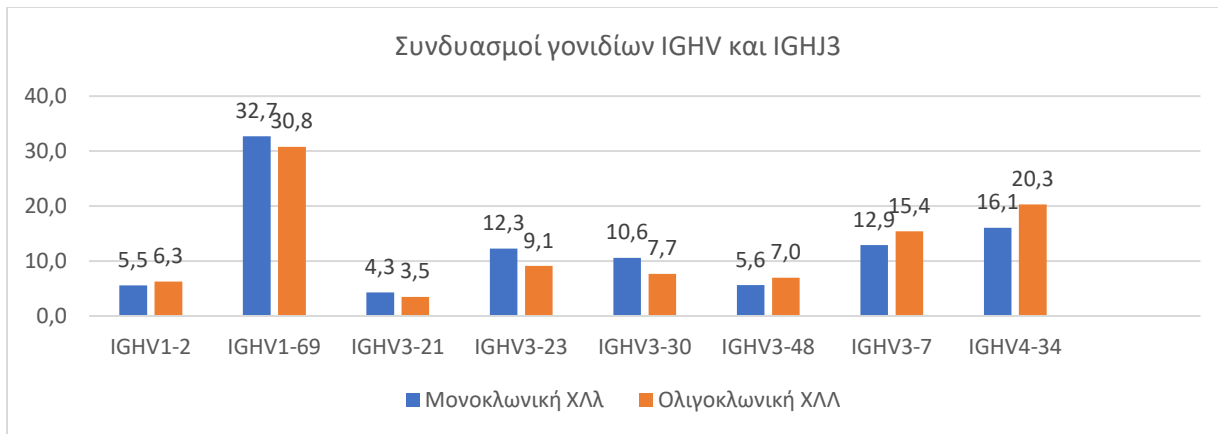
Επίσης, τόσο στη μ-ΧΛΛ όσο και στην ο-ΧΛΛ παρατηρήθηκε προτίμηση στους ακόλουθους συνδυασμούς γονιδίων IGHV-IGHJ: τα IGHV1-2, IGHV3-23, IGHV3-30 και IGHV3-7 με το IGHJ4, τα IGHV1-69 και IGHV3-21 με το IGHJ6, ενώ το γονίδιο IGHV3-48 έδειξε προτίμηση στο IGHJ4, αλλά μόνο στον τύπο της μ-ΧΛΛ. Τέλος, το γονίδιο IGHV4-34 συνδυαζόταν εξίσου με τα γονίδια IGHJ4 και IGHJ6 τόσο στη μ-ΧΛΛ όσο και στην ο-ΧΛΛ.



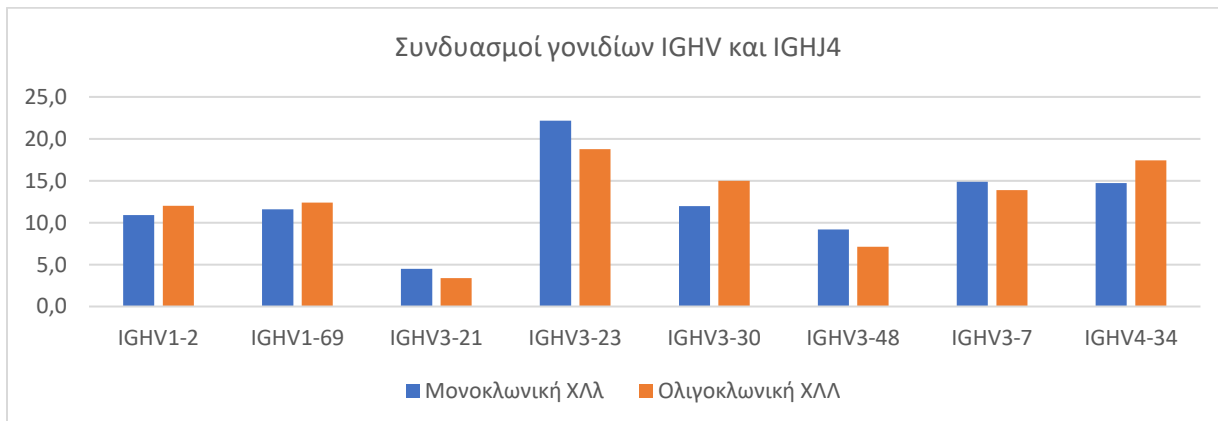
Διάγραμμα 8.1: Σύγκριση της συχνότητας συνδυασμών γονιδίων IGHV με το γονίδιο IGHJ1 μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι συνδυασμοί που η συχνότητα τους ήταν σημαντικά αυξημένη στην ο-ΧΛΛ.



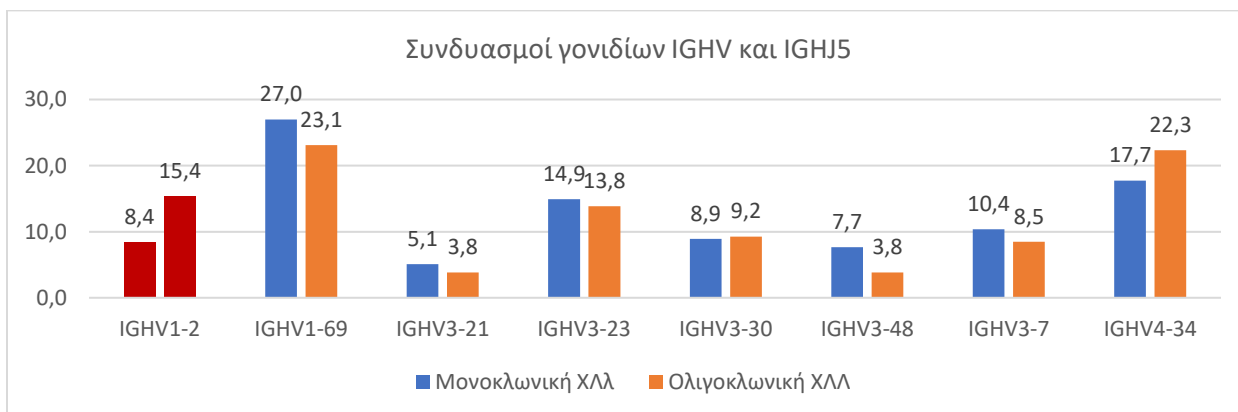
Διάγραμμα 8.2: Σύγκριση της συχνότητας συνδυασμών γονιδίων IGHV με το γονίδιο IGHJ2 μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ.



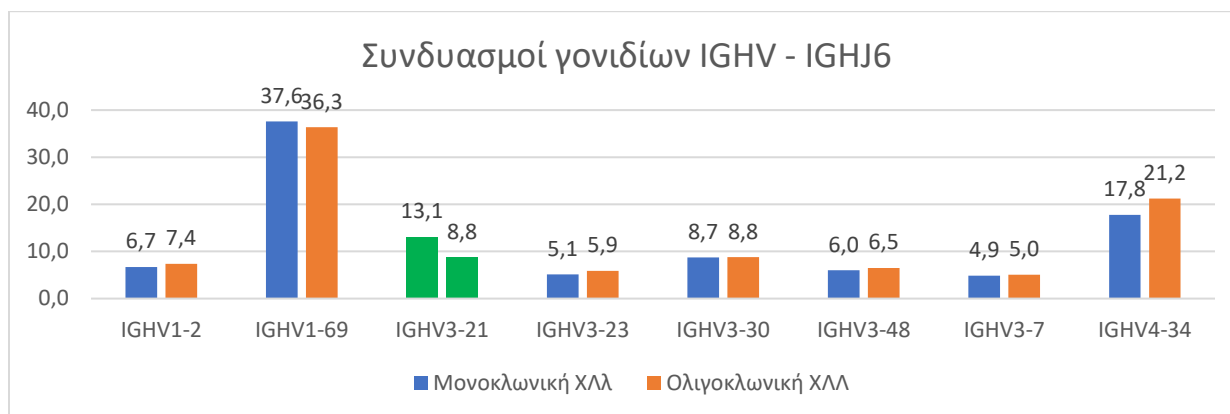
Διάγραμμα 8.3: Σύγκριση της συχνότητας συνδυασμών γονιδίων IGHV με το γονίδιο IGHJ3 μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ.



Διάγραμμα 8.4: Σύγκριση της συχνότητας συνδυασμών γονιδίων IGHV με το γονίδιο IGHJ4 μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ.



Διάγραμμα 8.5: Σύγκριση της συχνότητας συνδυασμών γονιδίων IGHV με το γονίδιο IGHJ5 μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι συνδυασμοί που η συχνότητα τους ήταν σημαντικά αυξημένη στην ο-ΧΛΛ.

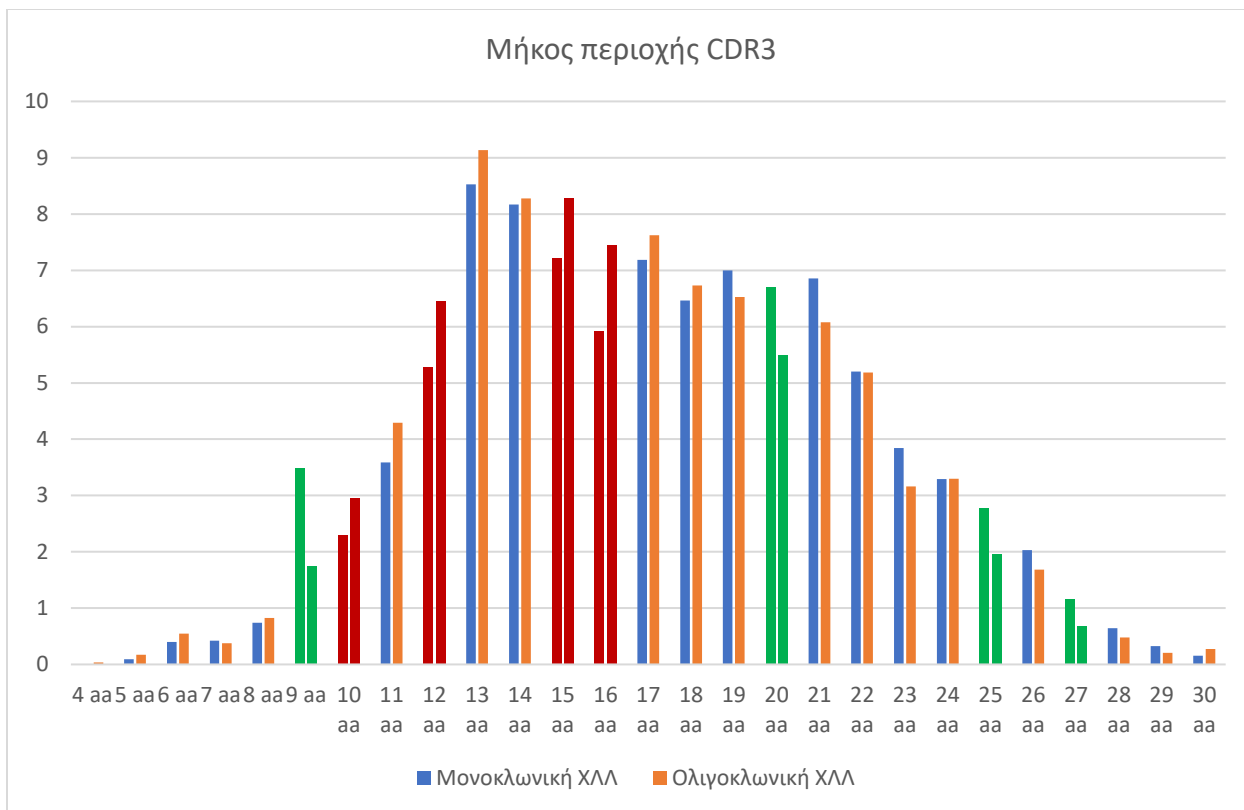


Διάγραμμα 8.6: Σύγκριση της συχνότητας συνδυασμών γονιδίων IGHV με το γονίδιο IGHJ6 μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι συνδυασμοί που η συχνότητά τους ήταν σημαντικά αυξημένη στη μ-ΧΛΛ.

9. Κατανομή μήκους της περιοχής CDR3

Η κατανομή του μήκους της περιοχής CDR3 ήταν παρόμοια μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Ειδικότερα, ο μέσος όρος και η διάμεση τιμή του μήκους της περιοχής CDR3 ήταν 17,2 και 17 αμινοξέα (amino acids, aa) στη μ-ΧΛΛ, ενώ στην ο-ΧΛΛ οι τιμές ήταν λίγο χαμηλότερες, 16,8 και 16 aa, αντίστοιχα. Στη μ-ΧΛΛ, 11 μήκη της CDR3 ήταν συχνά (συχνότητα >4%) και αφορούσαν στο 74,5% όλων των αναδιατάξεων σε αυτή την κατηγορία ΧΛΛ. Στην ο-ΧΛΛ, 12 μήκη της CDR3 ήταν συχνά (συχνότητα >4%) και αφορούσαν στο 81,5% όλων των περιπτώσεων αυτής της κατηγορίας ΧΛΛ. Επομένως, η ο-ΧΛΛ επέδειξε ένα λίγο μεγαλύτερο βαθμό περιορισμών στο επίπεδο του μήκους της περιοχής CDR3 (Διάγραμμα 9).

Στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους δύο τύπους ΧΛΛ εντοπίστηκαν στη συχνότητα αναδιατάξεων με 8 διαφορετικά μήκη της CDR3: 9 aa, 10 aa, 12 aa (συχνό σε μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ), 15 aa (συχνό σε μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ), 16 aa (συχνό σε μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ), 20 aa (συχνό σε μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ), 25 aa και 27 aa. Στα μήκη CDR3 10 aa, 12 aa, 15 aa και 16 aa παρατηρήθηκε μεγαλύτερη συχνότητα στην ο-ΧΛΛ σε σχέση με τη μ-ΧΛΛ, ενώ το αντίθετο πρότυπο παρατηρήθηκε για τη συχνότητα αναδιατάξεων με μήκη CDR3 9 aa, 20 aa, 25 aa και 27 aa (Διάγραμμα 9).



Διάγραμμα 9: Σύγκριση της κατανομής του μήκους της περιοχής CDR3 μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα μήκη που η συχνότητα των αντίστοιχων αναδιατάξεων ήταν σημαντικά αυξημένη στη μ-ΧΛΛ, ενώ με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα μήκη που η συχνότητα των αντίστοιχων αναδιατάξεων ήταν σημαντικά αυξημένη στην ο-ΧΛΛ.

10. Συνδυασμοί γονιδίων IGHV και μήκους CDR3

Μόνο τα 8 συχνότερα IGHV γονίδια συμπεριλήφθηκαν στη συγκεκριμένη ανάλυση. Τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια (6/8, 75%) παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ, όσον αφορά στο συνδυασμό τους με συγκεκριμένα μήκη της περιοχής CDR3. Τα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά στα **Διαγράμματα 10.1 έως 10.6**, όπου παρουσιάζονται τα ποσοστά των συνδυασμών γονιδίων IGHV/μήκους CDR3 στη μ-ΧΛΛ σε σύγκριση με την ο-ΧΛΛ.

Πιο ειδικά, οι στατιστικά σημαντικές διαφορές αφορούσαν στις εξής περιπτώσεις συνδυασμών:

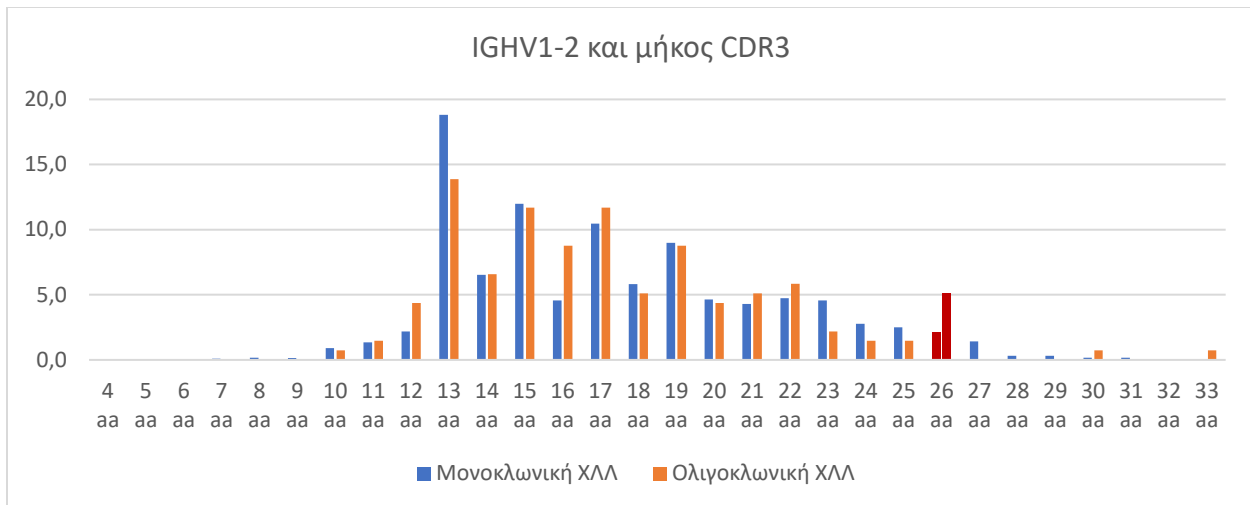
- Γονίδιο IGHV1-2 με μήκος CDR3 26 aa (συχνότερος στην ο-ΧΛΛ)

- Γονίδιο IGHV1-69 με μήκος CDR3 16 aa (συχνότερος στην ο-ΧΛΛ) και 19 aa (συχνότερος στη μ-ΧΛΛ)
- Γονίδιο IGHV3-21 με μήκος CDR3 9 aa (συχνότερος στη μ-ΧΛΛ), 17 aa (συχνότερος στην ο-ΧΛΛ) και 25 aa (συχνότερος στην ο-ΧΛΛ)
- Γονίδιο IGHV3-30 με μήκος CDR3 15 aa (συχνότερος στην ο-ΧΛΛ), 19 aa (συχνότερος στη μ-ΧΛΛ) και 27 aa (συχνότερος στην ο-ΧΛΛ)
- Γονίδιο IGHV3-48 με μήκος CDR3 8 aa (συχνότερος στην ο-ΧΛΛ) και 9 aa (συχνότερος στη μ-ΧΛΛ)
- Γονίδιο IGHV3-7 με μήκος CDR3 6 aa (συχνότερο στην ο-ΧΛΛ).

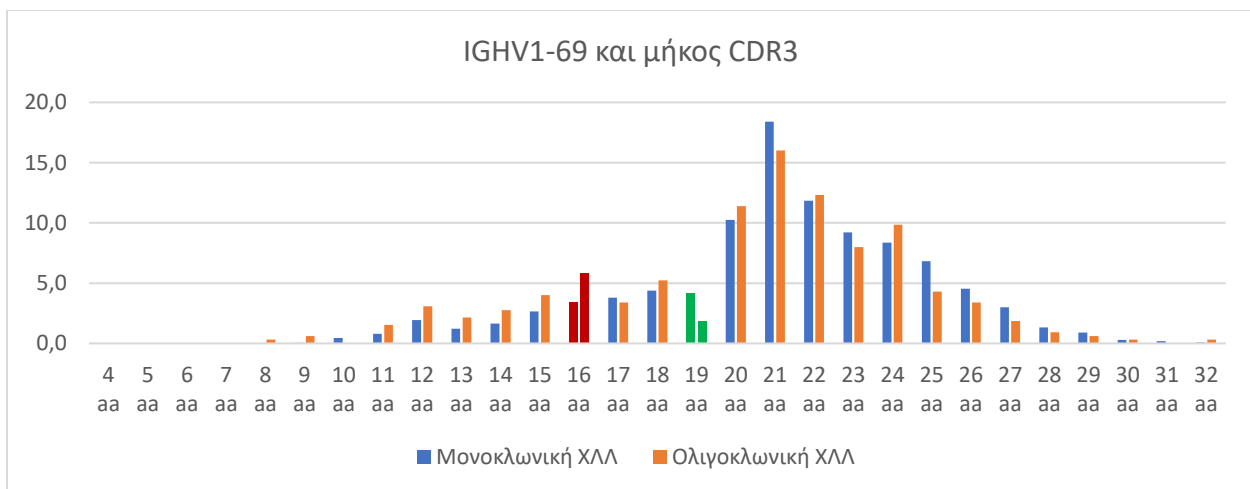
Από τους παραπάνω συνδυασμούς, οι συνδυασμοί IGHV3-21/CDR3 9 aa, IGHV3-21/CDR3 17 aa, IGHV3-48/CDR3 8 aa και IGHV3-7/CDR3 6 aa εμφάνισαν διαφορές ως προς τη συχνότητά τους μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ σε υψηλό επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ($P < 0.01$).

Η αξιολόγηση όλων των παραπάνω στατιστικά σημαντικών διαφορών χρίζει ιδιαίτερης προσοχής. Για παράδειγμα, η στατιστικά σημαντική διαφορά στο συνδυασμό IGHV3-21/25 aa υπέρ της ο-ΧΛΛ φαίνεται να έχει ενδιαφέρον, δεδομένου ότι τόσο το γονίδιο IGHV3-21 όσο και το μήκος CDR3 25 aa ανευρίσκονται σε σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα στη μ-ΧΛΛ σε σχέση με την ο-ΧΛΛ. Αντίστροφα, η διαφορά στο συνδυασμό IGHV3-21/9 aa υπέρ της μ-ΧΛΛ ($P < 0.01$) βρίσκεται σε συμφωνία με τις διαφορές ($P < 0.01$) τόσο στη συχνότητα του γονιδίου IGHV3-21, όσο και του μήκους 9 aa υπέρ της μ-ΧΛΛ σε σχέση με την ο-ΧΛΛ.

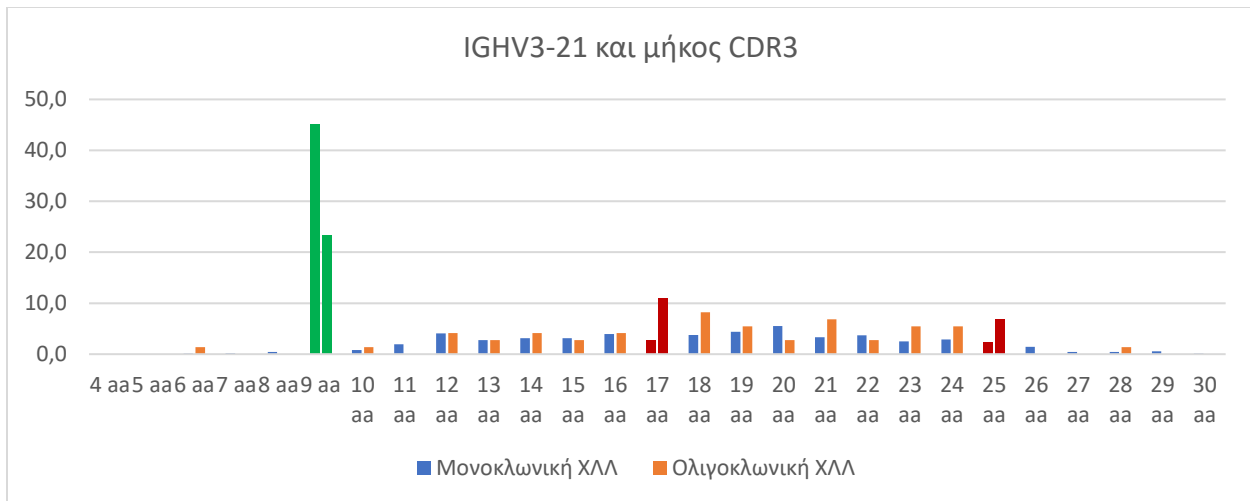
Παρά τις στατιστικά σημαντικές διαφορές στην προηγούμενη σύγκριση, κάποιοι συνδυασμοί γονιδίων IGHV με συγκεκριμένα μήκη CDR3 ήταν ιδιαίτερα συχνοί και στους δύο τύπους ΧΛΛ. Τέτοια παραδείγματα αποτελούσαν οι εξής συνδυασμοί: IGHV1-2 με CDR3 13 aa, IGHV1-69 με CDR3 21 aa, IGHV3-21 με CDR3 9 aa (αν και σημαντικά συχνότερος στη μ-ΧΛΛ) και IGHV4-34 με CDR3 20 aa. Επιπλέον, φαίνεται ότι έστω κάποιοι από τους συνδυασμούς που ήταν πιο συχνοί στη μ-ΧΛΛ υποδεικνύουν την παρουσία ειδικών στερεότυπων υποσυνόλων, με πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα τα υποσύνολα #2 (IGHV3-21 και 9 aa) και #169 (IGHV3-48 και 9 aa).



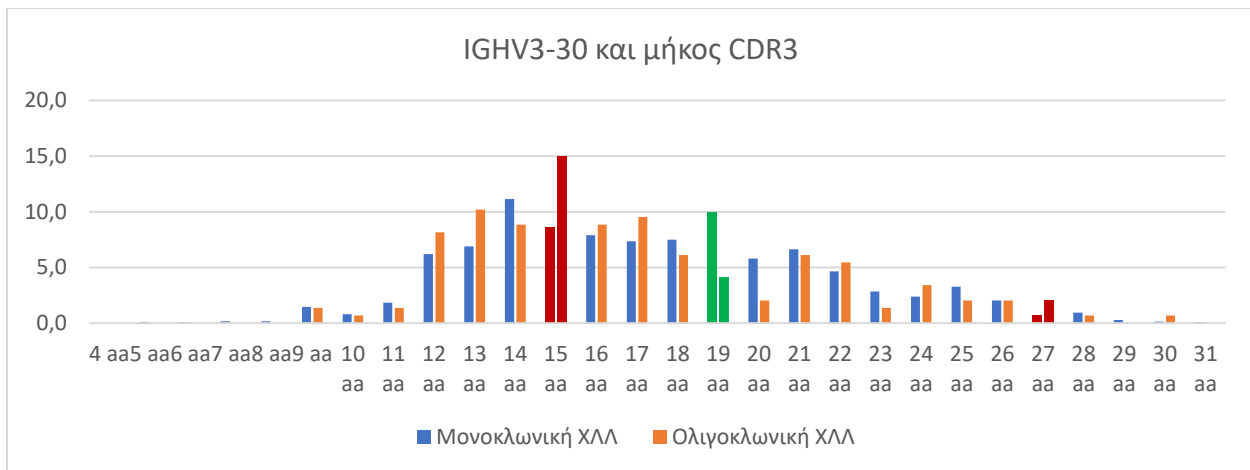
Διάγραμμα 10.1: Σύγκριση της συχνότητας συνδυασμών του γονιδίου IGHV1-2 με το μήκος της περιοχής CDR3 μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι συνδυασμοί που η συχνότητα τους ήταν σημαντικά αυξημένη στη μ-ΧΛΛ, ενώ με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι συνδυασμοί που η συχνότητα τους ήταν σημαντικά αυξημένη στην ο-ΧΛΛ.



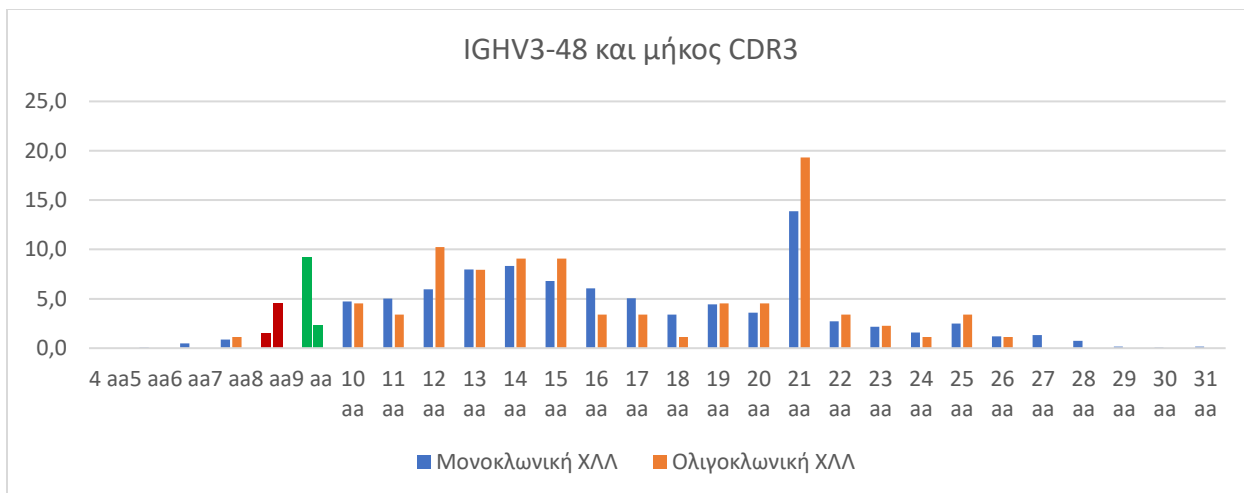
Διάγραμμα 10.2: Σύγκριση της συχνότητας συνδυασμών του γονιδίου IGHV1-69 με το μήκος της περιοχής CDR3 μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι συνδυασμοί που η συχνότητα τους ήταν σημαντικά αυξημένη στη μ-ΧΛΛ, ενώ με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι συνδυασμοί που η συχνότητα τους ήταν σημαντικά αυξημένη στην ο-ΧΛΛ.



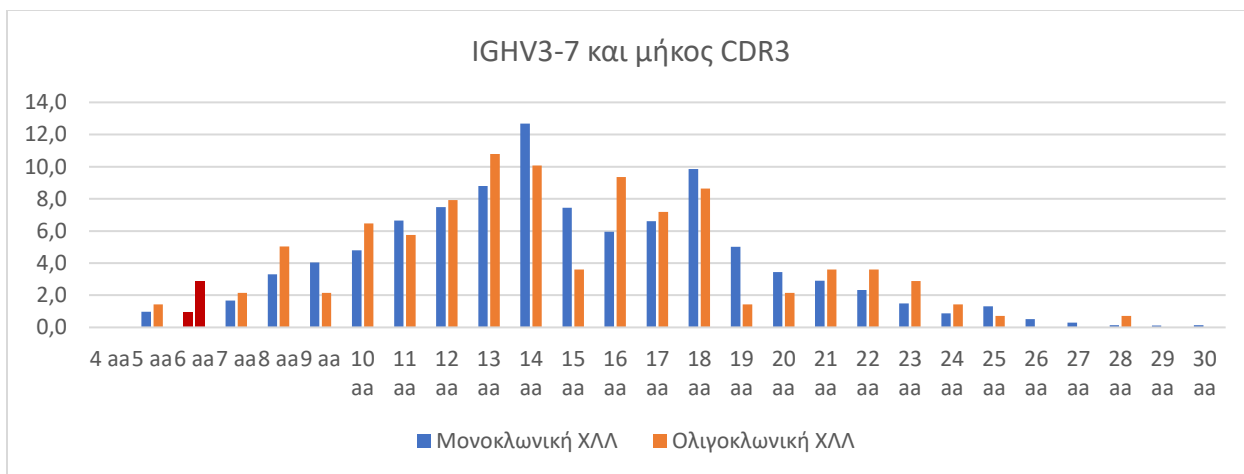
Διάγραμμα 10.3: Σύγκριση της συχνότητας συνδυασμών του γονιδίου IGHV3-21 με το μήκος της περιοχής CDR3 μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι συνδυασμοί που η συχνότητα τους ήταν σημαντικά αυξημένη στη μ-ΧΛΛ, ενώ με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι συνδυασμοί που η συχνότητα τους ήταν σημαντικά αυξημένη στην ο-ΧΛΛ.



Διάγραμμα 10.4: Σύγκριση της συχνότητας συνδυασμών του γονιδίου IGHV3-30 με το μήκος της περιοχής CDR3 μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι συνδυασμοί που η συχνότητα τους ήταν σημαντικά αυξημένη στη μ-ΧΛΛ, ενώ με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι συνδυασμοί που η συχνότητα τους ήταν σημαντικά αυξημένη στην ο-ΧΛΛ.



Διάγραμμα 10.5: Σύγκριση της συχνότητας συνδυασμών του γονιδίου IGHV3-48 με το μήκος της περιοχής CDR3 μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι συνδυασμοί που η συχνότητα τους ήταν σημαντικά αυξημένη στη μ-ΧΛΛ, ενώ με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι συνδυασμοί που η συχνότητα τους ήταν σημαντικά αυξημένη στην ο-ΧΛΛ.



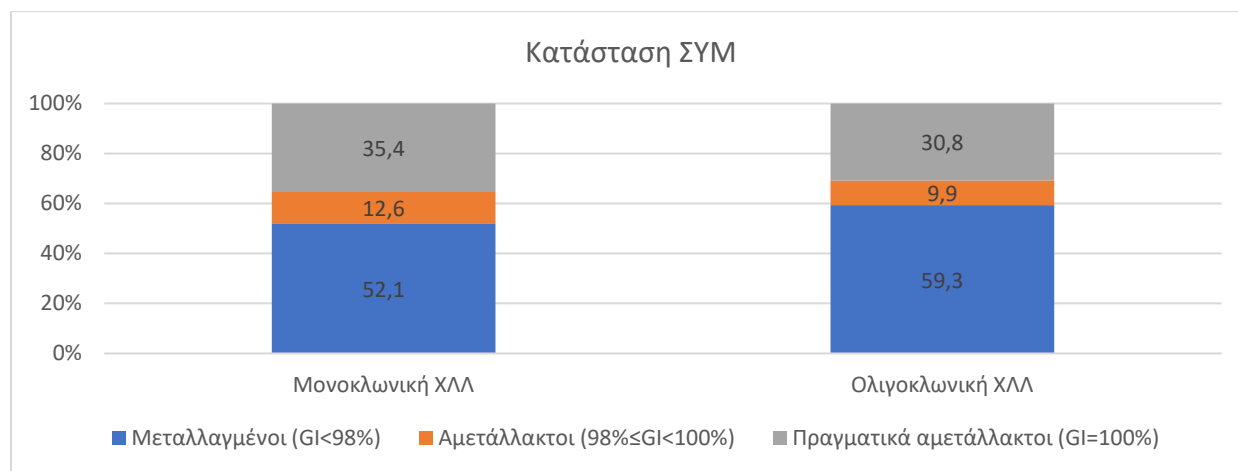
Διάγραμμα 10.6: Σύγκριση της συχνότητας συνδυασμών του γονιδίου IGHV3-7 με το μήκος της περιοχής CDR3 μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι συνδυασμοί που η συχνότητα τους ήταν σημαντικά αυξημένη στη μ-ΧΛΛ, ενώ με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι συνδυασμοί που η συχνότητα τους ήταν σημαντικά αυξημένη στην ο-ΧΛΛ.

11. Ανάλυση κατάστασης σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης (ΣΥΜ)

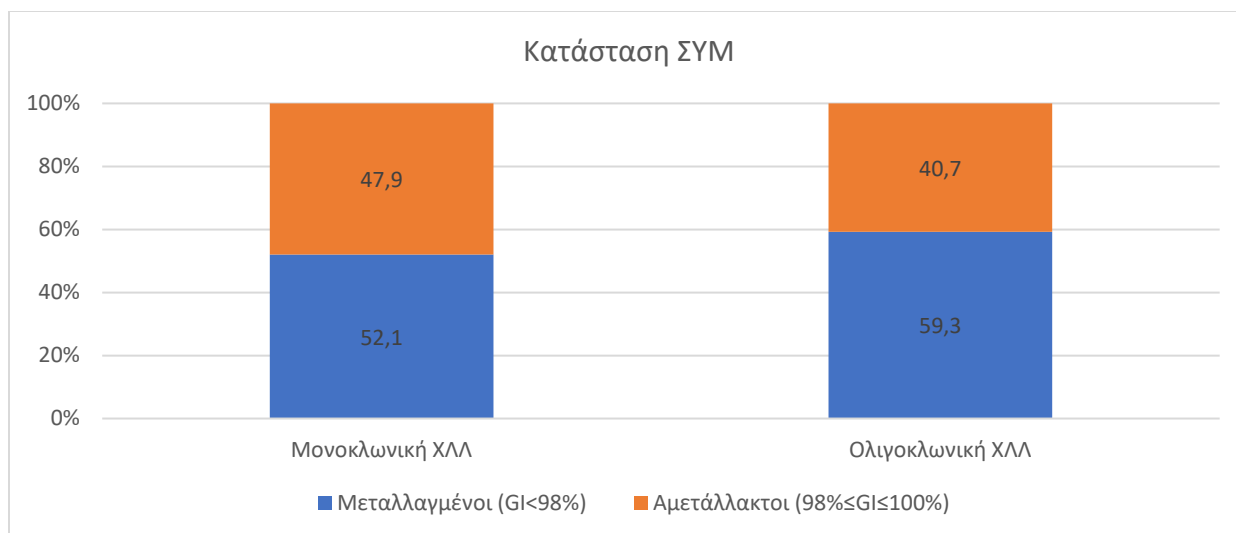
Συνολικά χαρακτηρίστηκαν τρεις τύποι αναδιατάξεων με βάση το φορτίο των σωματικών υπερμεταλλάξεων: οι μεταλλαγμένοι κλώνοι [Μ-ΧΛΛ, ποσοστό ομολογίας με

το μη αναδιαταγμένο γονίδιο (germline identity, GI) <98%], οι πραγματικά αμετάλλακτοι κλώνοι (ΠΑ-ΧΛΛ, GI=100%) και οι αμετάλλακτοι κλώνοι (Α-ΧΛΛ, 98≤GI<100%). Τόσο στη μ-ΧΛΛ όσο και στην ο-ΧΛΛ, οι Μ-ΧΛΛ κλώνοι αντιπροσώπευαν την πλειοψηφία των αναδιατάξεων (52,1% και 59,3%, αντίστοιχα), ενώ ακολουθούσαν σε ποσοστό οι ΠΑ-ΧΛΛ (35,4% και 30,8%, αντίστοιχα) και, τέλος, οι Α-ΧΛΛ (12,6% και 9,9%, αντίστοιχα) αναδιατάξεις (**Διάγραμμα 11.1**).

Στατιστικά σημαντικές διαφορές με υψηλό επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (P=0.0001) παρουσιάστηκαν μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ στη συχνότητα και των 3 παραπάνω τύπων αναδιατάξεων. Ειδικότερα, η ο-ΧΛΛ εμφάνισε μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης Μ-ΧΛΛ αναδιατάξεων, ενώ το ποσοστό εμφάνισης τόσο των ΠΑ-ΧΛΛ όσο και των Α-ΧΛΛ κλώνων ήταν μικρότερο σε σύγκριση με τη μ-ΧΛΛ. Το ίδιο πρότυπο διαφορών (P=0.0001) μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ παρουσιάστηκε και στην περίπτωση που οι αναδιατάξεις χωρίστηκαν σε δύο τύπους: Μ-ΧΛΛ (GI<98%) και Α-ΧΛΛ (98≤GI≤100%). Και σε αυτή την ανάλυση, η ο-ΧΛΛ εμφάνισε μεγαλύτερο ποσοστό Μ-ΧΛΛ αναδιατάξεων και μικρότερο ποσοστό Α-ΧΛΛ αναδιατάξεων σε σχέση με τη μ-ΧΛΛ (**Διάγραμμα 11.2**).



Διάγραμμα 11.1: Κατανομή των αναδιατάξεων στη μ-ΧΛΛ και την ο-ΧΛΛ με βάση την κατάσταση ΣΥΜ (Μ-ΧΛΛ, Α-ΧΛΛ και ΠΑ-ΧΛΛ).



Διάγραμμα 11.2: Κατανομή των αναδιατάξεων στη μ-ΧΛΛ και την ο-ΧΛΛ με βάση την κατάσταση ΣΥΜ (Μ-ΧΛΛ και Α-ΧΛΛ).

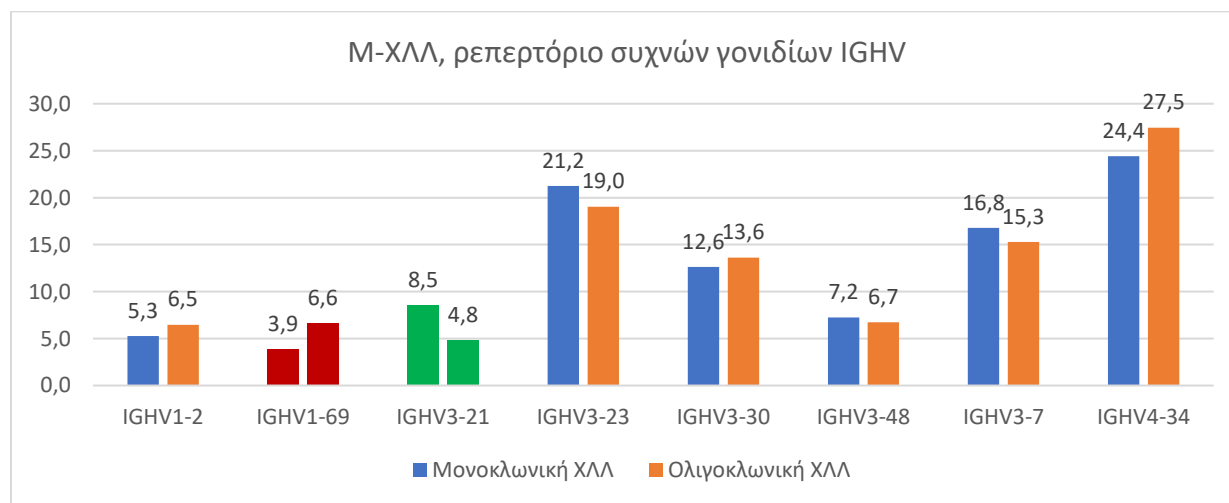
12. Συνδυασμοί γονιδίων IGHV και κατάστασης ΣΥΜ

Στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν μόνο τα 8 πιο συχνά γονίδια IGHV. Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ όσον αφορά στην τάση τους να συσχετίζονται με συγκεκριμένη κατάσταση ΣΥΜ παρατηρήθηκαν σε μόνο 3 από αυτά (3/8, 37,5%). Οι ακόλουθοι συνδυασμοί γονιδίων IGHV - κατάστασης ΣΥΜ χαρακτηρίστηκαν από στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ: IGHV1-69/Μ-ΧΛΛ (μεγαλύτερη συχνότητα στην ο-ΧΛΛ), IGHV3-21/Μ-ΧΛΛ (μεγαλύτερη συχνότητα στη μ-ΧΛΛ) και IGHV1-2/Α-ΧΛΛ (μεγαλύτερη συχνότητα στην ο-ΧΛΛ). Τα γονίδια IGHV3-23, IGHV3-30, IGHV3-48, IGHV3-7 και IGHV4-34 δεν εκδήλωσαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά στην τάση τους να συσχετίζονται με συγκεκριμένη κατάσταση ΣΥΜ μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ (**Διαγράμματα 12.1 και 12.2**).

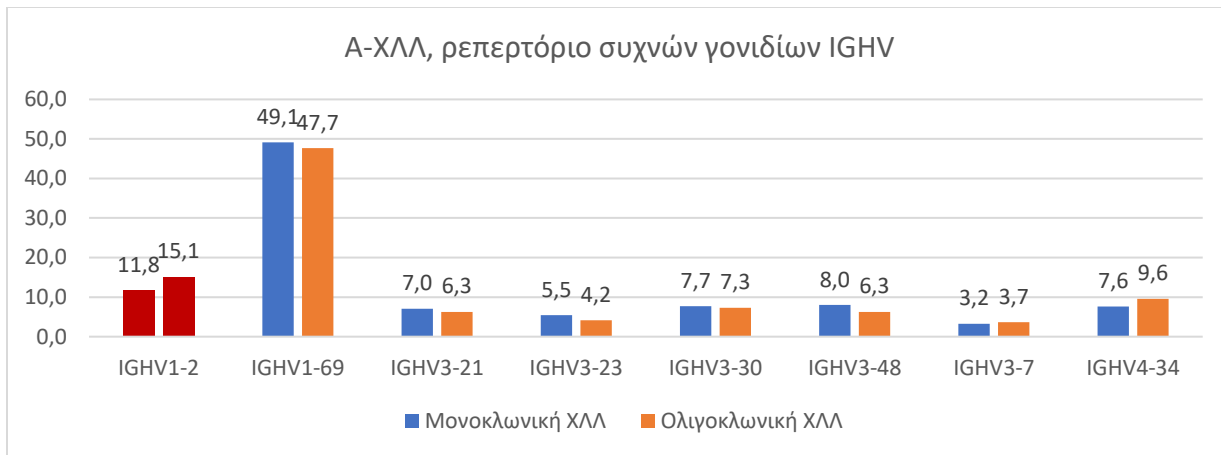
Σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της Παραγράφου 1 των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκαν τα εξής: το γονίδιο IGHV1-69 ήταν το πιο συχνό γονίδιο και στους δύο τύπους ΧΛΛ, με στατιστικά μεγαλύτερη συχνότητα στη μ-ΧΛΛ. Όμως, στη μεταλλαγμένη του κατάσταση το γονίδιο αυτό ήταν πιο συχνό στην ο-ΧΛΛ ($P=0.0002$). Το γονίδιο IGHV3-21, το οποίο και αυτό εμφάνισε αυξημένη συχνότητα στη μ-ΧΛΛ, παρουσίασε αυτήν την τάση μόνο στη μεταλλαγμένη του κατάσταση. Τέλος, το γονίδιο IGHV1-2, αν

και δεν είχε παρουσιάσει στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα συχνότητάς του μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ, εντοπίστηκε σε στατιστικά σημαντικά αυξημένο ποσοστό στην ο-ΧΛΛ στην αμετάλλακτη κατάστασή του.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε και μια δεύτερη στατιστική σύγκριση, όσον αφορά στη συχνότητα των γονιδίων IGHV σε μεταλλαγμένη και αμετάλλακτη κατάσταση, ξεχωριστά για τη μ-ΧΛΛ και την ο-ΧΛΛ. Στη μ-ΧΛΛ, όλα τα συχνά γονίδια IGHV εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορετικές συχνότητες μεταξύ μεταλλαγμένης (Μ-ΧΛΛ) και αμετάλλακτης κατάστασης (Α-ΧΛΛ) ($P < 0.001$, εκτός από IGHV3-48 όπου $P < 0.05$). Πιο ειδικά, τα IGHV1-2, IGHV1-69 και IGHV3-48 ήταν πιο συχνά στην αμετάλλακτη κατάσταση, ενώ τα IGHV3-21, IGHV3-23, IGHV3-30, IGHV3-7 και IGHV4-34 ήταν πιο συχνά στη μεταλλαγμένη κατάσταση. Στην ο-ΧΛΛ παρατηρήθηκε ακριβώς το ίδιο πρότυπο διαφορών. Εξαιρέση αποτέλεσαν τα γονίδια IGHV3-21 και IGHV3-48, όπου δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (τα γονίδια αυτά εντοπίστηκαν σε μικρότερες συχνότητες σε σχέση με τα υπόλοιπα). Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι η μεταλλακτική κατάσταση είναι ειδική για το κάθε γονίδιο IGHV ανεξάρτητα από το βαθμό της κλωνικότητας.



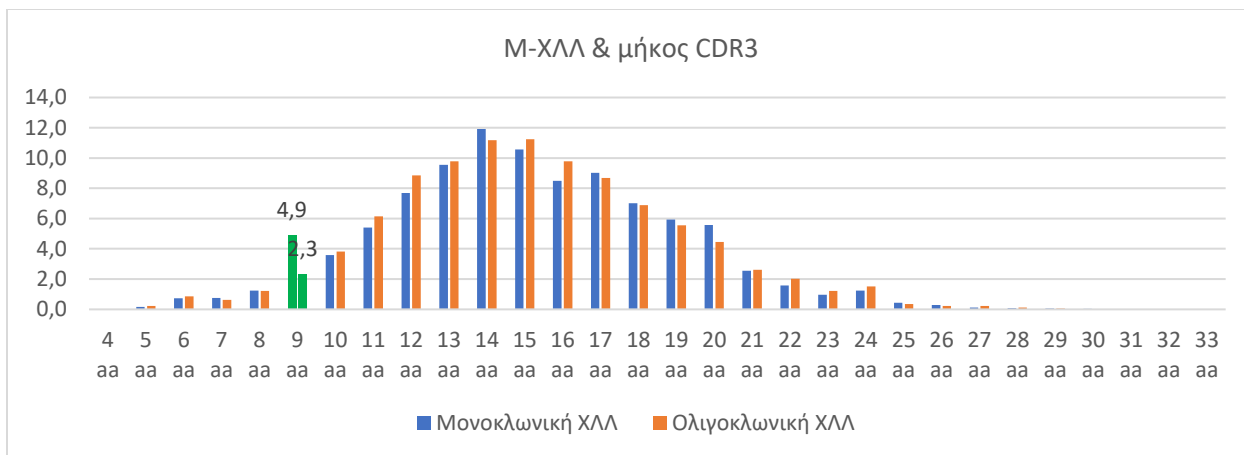
Διάγραμμα 12.1: Σύγκριση του ρεπερτορίου έκφρασης των γονιδίων IGHV στη μεταλλαγμένη τους κατάσταση (Μ-ΧΛΛ, $GI < 98\%$), μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με πράσινο χρώμα απεικονίζεται το γονίδιο που η συχνότητα του ήταν σημαντικά αυξημένη στη μ-ΧΛΛ, ενώ με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται το γονίδιο που η συχνότητα του ήταν σημαντικά αυξημένη στην ο-ΧΛΛ.



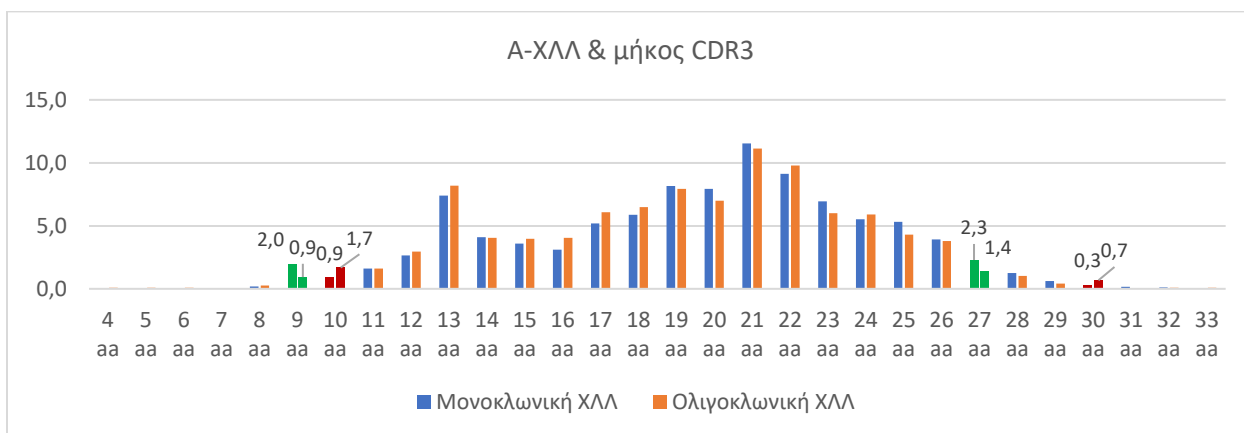
Διάγραμμα 12.2: Σύγκριση του ρεπερτορίου έκφρασης των γονιδίων IGHV στην αμετάλλακτη τους κατάσταση (Α-ΧΛΛ, $98 \leq GI \leq 100\%$) μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται το γονίδιο που η συχνότητά του ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένη στην ο-ΧΛΛ.

13. Συνδυασμοί κατάστασης ΣΥΜ και μήκους περιοχής CDR3

Η συγκριτική ανάλυση του μήκους της περιοχής CDR3 μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά για τις περιπτώσεις των μεταλλαγμένων (Μ-ΧΛΛ) και των αμετάλλακτων (Α-ΧΛΛ) αναδιατάξεων. Ο συνδυασμός της κατάστασης Μ-ΧΛΛ και CDR3 μήκους 9 aa εμφάνισε στατιστικά μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στη μ-ΧΛΛ σε σχέση με την ο-ΧΛΛ. Στατιστικά σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν επίσης στους συνδυασμούς της Α-ΧΛΛ κατάστασης με περιοχή CDR3 μήκους 9 aa (πιο συχνός στη μ-ΧΛΛ), 10 aa (πιο συχνός στην ο-ΧΛΛ), 27 aa (πιο συχνός στη μ-ΧΛΛ) και 30 aa (πιο συχνός στην ο-ΧΛΛ) (**Διαγράμματα 13.1 και 13.2**). Επίσης, η κατανομή του μήκους της περιοχής CDR3 παρουσίασε διαφορές μεταξύ Μ-ΧΛΛ και Α-ΧΛΛ, με την Α-ΧΛΛ να χαρακτηρίζεται γενικότερα από μεγαλύτερα μήκη aa σε σχέση με την Μ-ΧΛΛ και στις δύο κατηγορίες ΧΛΛ με διαφορετικά πρότυπα κλωνικότητας.



Διάγραμμα 13.1: Σύγκριση της κατανομής του μήκους της CDR3 περιοχής για τις περιπτώσεις των μεταλλαγμένων αναδιατάξεων, μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με πράσινο χρώμα απεικονίζεται το μήκος που η συχνότητα του ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένη στη μ-ΧΛΛ.



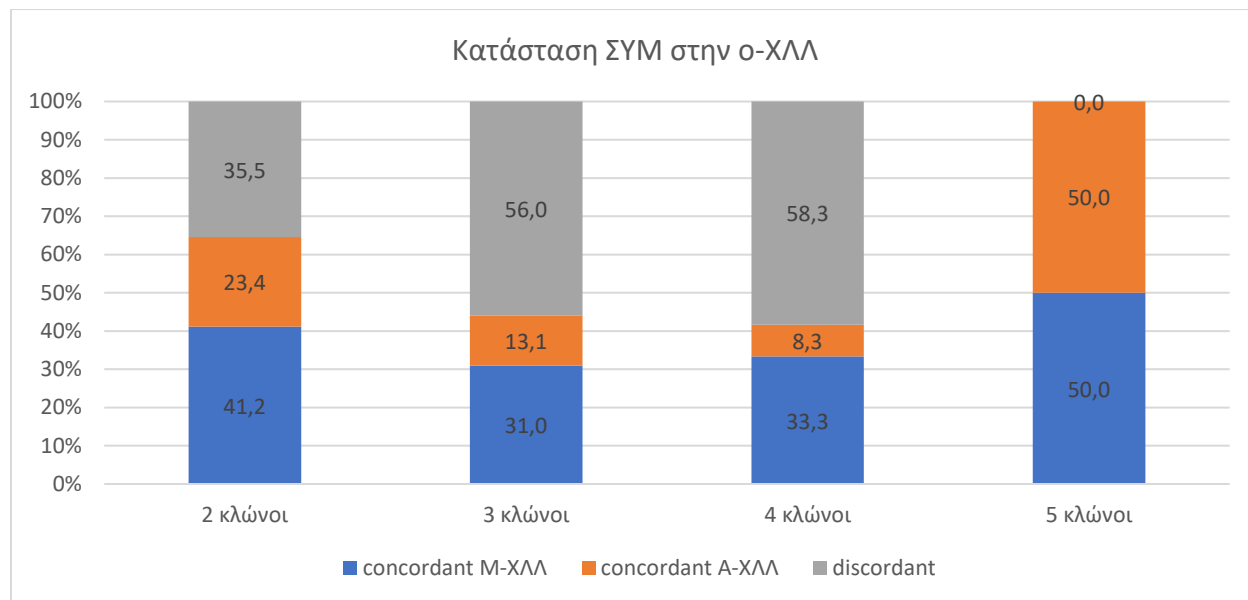
Διάγραμμα 13.2: Σύγκριση της κατανομής του μήκους της CDR3 περιοχής για τις περιπτώσεις των αμετάλλακτων αναδιατάξεων μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα μήκη που η συχνότητα τους ήταν σημαντικά αυξημένη στη μ-ΧΛΛ, ενώ με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα μήκη που η συχνότητα τους ήταν σημαντικά αυξημένη στην ο-ΧΛΛ.

14. Πρότυπα της ΣΥΜ στην ο-ΧΛΛ

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά για τις υποκατηγορίες ασθενών της ο-ΧΛΛ με 2, 3, 4 και 5 παραγωγικές αναδιατάξεις (κλώνους), και αφορούσε στη συγκριτική ανάλυση της κατάστασης ΣΥΜ μεταξύ των πολλαπλών αναδιατάξεων του κάθε ασθενή. Με απλά λόγια, ελέγχθηκε αν οι πολλαπλές αναδιατάξεις ήταν είτε σε «μεταλλακτική συμφωνία»,

στην περίπτωση που όλοι οι κλώνοι ήταν είτε μεταλλαγμένοι είτε αμετάλλακτοι (concordance), είτε σε «μεταλλακτική ασυμφωνία», δηλαδή μεταλλαγμένοι και αμετάλλακτοι κλώνοι στον ίδιο ασθενή (discordance). Επομένως, οι υποκατηγορίες μεταλλακτικής κατάστασης ΣΥΜ ήταν οι εξής: «concordant M-ΧΛΛ» (όταν όλοι οι κλώνοι είναι μεταλλαγμένοι), «concordant A-ΧΛΛ» (όταν όλοι οι κλώνοι είναι αμετάλλακτοι) και «discordant» (όταν υπάρχουν μεταλλαγμένοι και αμετάλλακτοι κλώνοι στον ίδιο ασθενή).

Η πλειοψηφία των ασθενών με 2 αναδιατάξεις (41,1%) ανήκαν στην υποκατηγορία «concordant M-ΧΛΛ», ενώ το 23,4% των περιπτώσεων ανήκαν στην υποκατηγορία «concordant A-ΧΛΛ». Ως εκ τούτου, το 64,5% των ασθενών με 2 αναδιατάξεις είχε πρότυπο ΣΥΜ σε συμφωνία, ενώ το 35,5% εμφάνισε «ασυμφωνία» («discordance»). Στις περιπτώσεις ασθενών με 3 και 4 αναδιατάξεις το ποσοστό των ασθενών με «discordant» πρότυπο ΣΥΜ αυξήθηκε και αφορούσε στο 56% και το 58,3% του συνόλου των ασθενών, αντίστοιχα (**Διάγραμμα 14**). Η μικρή διαφορά μεταξύ των περιπτώσεων με 3 και 4 κλώνους, ίσως οφειλόταν στο μικρό δείγμα ασθενών με 4 κλώνους (μόλις 12 ασθενείς) ή εναλλακτικά στο γεγονός ότι η αύξηση του αριθμού των κλώνων μειώνει την πιθανότητα μεταλλακτικής «συμφωνίας».



Διάγραμμα 14: Κατανομή των ασθενών της ο-ΧΛΛ με βάση τη μεταλλακτική τους κατάσταση, ξεχωριστά για τις περιπτώσεις με 2, 3, 4 και 5 παραγωγικούς κλώνους. concordant M-ΧΛΛ: όλοι οι κλώνοι μεταλλαγμένοι, concordant A-ΧΛΛ: όλοι οι κλώνοι αμετάλλακτοι, discordant: μεταλλαγμένοι και αμετάλλακτοι κλώνοι στον ίδιο ασθενή.

15. Ρεπερτόριο έκφρασης γονιδίων IGHV - Κατάσταση ΣΥΜ στην ο-ΧΛΛ

A. Υποκατηγορία «concordant M-ΧΛΛ» και υποκατηγορία «concordant A-ΧΛΛ»

Τα γονίδια IGHV που εμφάνισαν υψηλή συχνότητα εμφάνισης (>4% το κάθε ένα) στην υποκατηγορία «concordant M-ΧΛΛ» ήταν 7/49 (14,3%) και αντιστοιχούσαν στο 50,8% του συνολικού ρεπερτορίου των γονιδίων IGHV. Τα αντίστοιχα συχνά εμφανιζόμενα γονίδια IGHV στην υποκατηγορία «concordant A-ΧΛΛ» ήταν 6/49 (12,2%) και αντιστοιχούσαν στο 49,4% του συνολικού ρεπερτορίου έκφρασης των γονιδίων IGHV. Επομένως, ο βαθμός των περιορισμών στο ρεπερτόριο έκφρασης των γονιδίων IGHV ήταν παρόμοιος στις υποκατηγορίες της ο-ΧΛΛ με διαφορετικά μεταλλακτικά πρότυπα. Στο επίπεδο έκφρασης μεμονωμένων γονιδίων μόνο τρία από τα συχνά γονίδια εμφάνισαν αυτή τη συχνότητα και στις δύο υποκατηγορίες (3/49, 6,1%): τα IGHV3-30, IGHV4-34 και IGHV5-51. Τα υπόλοιπα γονίδια ήταν συχνά εμφανιζόμενα μόνο σε μία από τις δύο υποκατηγορίες. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν την ύπαρξη διαφορών, όσον αφορά στα συγκεκριμένα γονίδια IGHV που εμφανίζονται συχνά στις υποκατηγορίες με «concordant M-ΧΛΛ» και «concordant A-ΧΛΛ» αναδιατάξεις.

Ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων IGHV (20/49, 40,8%) εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συχνότητα έκφρασής τους μεταξύ των υποκατηγοριών με «concordant M-ΧΛΛ» και «concordant A-ΧΛΛ» αναδιατάξεις. Τα υπόλοιπα γονίδια ήταν τα εξής: IGHV1-2, IGHV1-46, IGHV1-69, IGHV1-8, IGHV2-5, IGHV3-11, IGHV3-15, IGHV3-20, IGHV3-23, IGHV3-33, IGHV3-43, IGHV3-64D, IGHV3-7, IGHV3-72, IGHV3-74, IGHV4-34, IGHV4-39, IGHV4-4, IGHV4-59 και IGHV6-1. Τέσσερα από αυτά τα γονίδια ήταν συχνά εμφανιζόμενα μόνο στην υποκατηγορία «concordant M-ΧΛΛ» και τρία μόνο στην υποκατηγορία «concordant A-ΧΛΛ». Επίσης, παρατηρήθηκε ότι όλες οι διαφορές στα συχνά εμφανιζόμενα γονίδια IGHV χαρακτηρίζονταν από υψηλό επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας. Αντίθετα, μόνο ένα γονίδιο, το IGHV4-34 (1/49, 2%), ήταν συχνά εμφανιζόμενο και στις δύο υποκατηγορίες με διαφορετικά πρότυπα ΣΥΜ.

B. Υποκατηγορία «concordant» A-ΧΛΛ και υποκατηγορία «discordant ΣΥΜ»

Τα γονίδια IGHV που εμφάνισαν υψηλή συχνότητα εμφάνισης (>4%) στην υποκατηγορία με πρότυπο ΣΥΜ «concordant A-ΧΛΛ» ήταν 6/49 (12,2%) και αντιστοιχούσαν στο 49,4% του συνολικού ρεπερτορίου. Τα συχνά εμφανιζόμενα γονίδια IGHV στην υποκατηγορία με «discordant ΣΥΜ» ήταν 8/49 (16,3%) και αντιστοιχούσαν στο 53,5% του συνολικού ρεπερτορίου έκφρασης. Επομένως, το ρεπερτόριο συχνότητας έκφρασης των IGHV γονιδίων ήταν σε γενικές γραμμές παρόμοιο στις δύο παραπάνω υποκατηγορίες με διαφορετικό πρότυπο ΣΥΜ. Πέντε από τα συχνά γονίδια ήταν κοινά και στις δύο υποκατηγορίες με διαφορετικά πρότυπα ΣΥΜ (5/49, 10,2%): IGHV1-2, IGHV1-69, IGHV3-30, IGHV4-34, IGHV5-51. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι τα περισσότερα συχνά γονίδια IGHV είχαν παρόμοια επίπεδα έκφρασης στις δύο συγκεκριμένες υποκατηγορίες της ο-ΧΛΛ.

Ο αριθμός των γονιδίων IGHV που εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συχνότητα έκφρασης μεταξύ των υποκατηγοριών με μεταλλακτικά πρότυπα «concordant A-ΧΛΛ» και «discordant ΣΥΜ» ήταν 13/49 (26.5%). Τα συγκεκριμένα γονίδια ήταν τα εξής: IGHV1-2 (συχνό και στις δύο υποομάδες), IGHV1-46, IGHV1-69 (συχνό και στις δύο υποκατηγορίες), IGHV1-8, IGHV2-5 (συχνό στην υποκατηγορία «discordant ΣΥΜ»), IGHV3-11, IGHV3-23 (συχνό στην υποκατηγορία «discordant ΣΥΜ»), IGHV3-43, IGHV3-7 (συχνό στην υποκατηγορία «discordant ΣΥΜ»), IGHV3-72, IGHV4-34 (συχνό και στις δύο υποκατηγορίες), IGHV4-39 (συχνό στην υποκατηγορία «concordant A-ΧΛΛ») και IGHV4-59. Επομένως, τρία από αυτά τα γονίδια ήταν συχνά εμφανιζόμενα και στις δύο υποκατηγορίες, τρία μόνο στην υποκατηγορία «discordant ΣΥΜ» και ένα μόνο στην υποκατηγορία «concordant A-ΧΛΛ».

Γ. Υποκατηγορία «concordant M-ΧΛΛ» και υποκατηγορία «discordant ΣΥΜ»

Τα γονίδια IGHV που εμφάνισαν υψηλή συχνότητα εμφάνισης (>4%) στην υποκατηγορία «concordant M-ΧΛΛ» ήταν 7/49 (14,3%) και αντιστοιχούσαν στο 50,8% του συνολικού ρεπερτορίου. Τα συχνά εμφανιζόμενα IGHV γονίδια στην υποκατηγορία «discordant ΣΥΜ» ήταν 8/49 (16,3%) και αντιστοιχούσαν στο 53,5% του συνολικού

ρεπερτορίου. Επομένως, το ρεπερτόριο έκφρασης των IGHV γονιδίων ήταν παρόμοιο στις δύο αυτές υποκατηγορίες με διαφορετικό πρότυπο ΣΥΜ. Έξι από τα παραπάνω συχνά γονίδια ήταν κοινά και στις δύο υποκατηγορίες με διαφορετικά πρότυπα ΣΥΜ (6/49, 12,2%): IGHV2-5, IGHV3-23, IGHV3-30, IGHV3-7, IGHV4-34, IGHV5-51. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι τα περισσότερα συχνά IGHV γονίδια είχαν κοινό πρότυπο έκφρασης στις δύο αυτές υποκατηγορίες με διαφορετικά πρότυπα ΣΥΜ.

Ο αριθμός των γονιδίων IGHV που εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συχνότητα έκφρασης μεταξύ της «concordant M-ΧΛΛ» υποκατηγορίας και της υποκατηγορίας με «discordant ΣΥΜ» ήταν 12/49 (24,5%). Πιο συγκεκριμένα, τα γονίδια αυτά ήταν τα εξής: IGHV1-2 (συχνό στην υποκατηγορία «discordant ΣΥΜ»), IGHV1-69 (συχνό στην υποκατηγορία «discordant ΣΥΜ»), IGHV2-5 (συχνό και στις δύο υποκατηγορίες), IGHV3-11, IGHV3-15, IGHV3-23 (συχνό και στις δύο υποκατηγορίες), IGHV3-53, IGHV3-64-D, IGHV3-74, IGHV4-34 (συχνό και στις δύο υποκατηγορίες), IGHV4-4 και IGHV6-1 (συχνό στην «concordant M-ΧΛΛ» υποκατηγορία). Συνολικά, τρία από τα γονίδια ήταν συχνά εμφανιζόμενα και στις δύο υποκατηγορίες, ένα μόνο στη «concordant M-ΧΛΛ» υποκατηγορία και δύο μόνο στη «discordant ΣΥΜ» υποκατηγορία. Οι διαφορές στα συχνά εμφανιζόμενα γονίδια IGHV (σχεδόν όλες σε υψηλό επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας) θεωρήθηκαν οι πιο σημαντικές, λόγω της υψηλής συχνότητας εμφάνισης των γονιδίων αυτών.

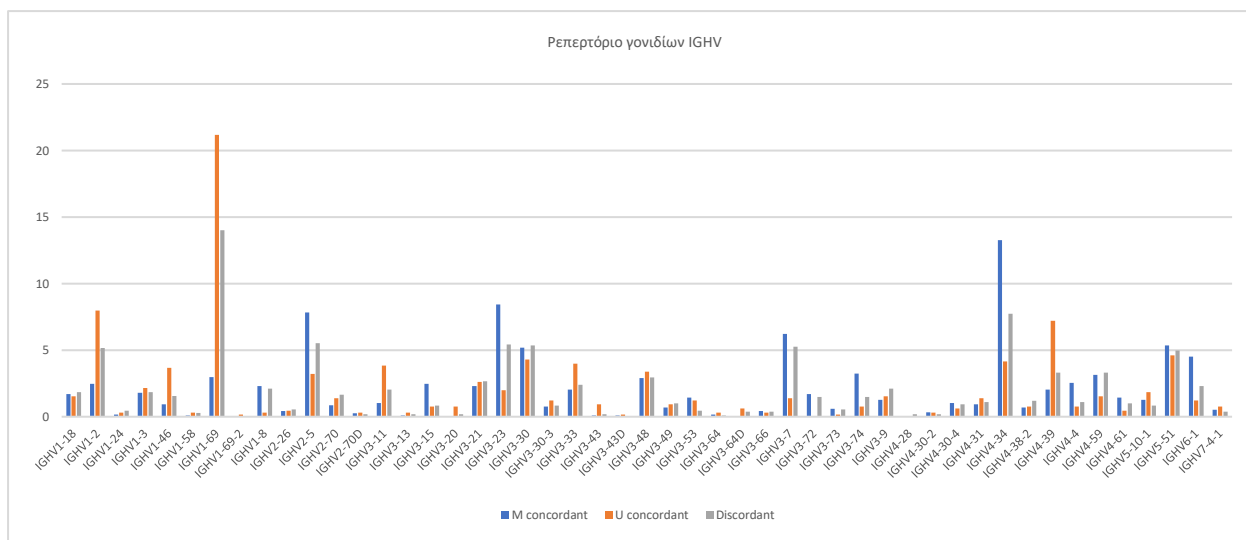
Από τα αποτελέσματα των υποπαραγράφων Α, Β και Γ, παρατηρήθηκε ότι υπάρχουν διαφορές στο ρεπερτόριο των γονιδίων IGHV ανάμεσα στις τρεις υποκατηγορίες ΣΥΜ των ασθενών με ο-ΧΛΛ. Πιο ειδικά:

1. Όσον αφορά στα συχνά (>4%) εμφανιζόμενα γονίδια IGHV, τα περισσότερα κοινά γονίδια εμφανίστηκαν στις συγκρίσεις μεταξύ των υποκατηγοριών «concordant Α-ΧΛΛ»/«discordant ΣΥΜ» (5/14, 35,7%) και των υποκατηγοριών «concordant Μ-ΧΛΛ»/«discordant ΣΥΜ» (6/15, 40%), σε σχέση με τη σύγκριση «concordant Μ-ΧΛΛ»/«concordant Α-ΧΛΛ» (3/13, 23%).

2. Όταν συγκρίθηκαν οι υποκατηγορίες με «concordant Μ-ΧΛΛ» και «concordant Α-ΧΛΛ» εμφανίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε περισσότερα γονίδια IGHV (20/49, 40,8%), σε σχέση με τις συγκρίσεις «concordant Α-ΧΛΛ»/«discordant ΣΥΜ» και «concordant Μ-ΧΛΛ»/«discordant ΣΥΜ», όπου οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ήταν

μικρότερου και παρόμοιου βαθμού (13/49, 26,5% και 12/49, 24,5%, αντίστοιχα). Αναφορικά με τα συχνά γονίδια IGHV, τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν αρκετά μεγαλύτερα χωρίς όμως να αλλάζει το παρατηρούμενο πρότυπο. Συγκεκριμένα, τα συχνά γονίδια IGHV με στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των υποκατηγοριών ΣΥΜ της ο-ΧΛΛ ήταν: 8 στα 10 (80%) ανάμεσα σε «concordant M-ΧΛΛ»/«concordant A-ΧΛΛ», 7 στα 9 (77,8%) ανάμεσα σε «concordant A-ΧΛΛ»/«discordant ΣΥΜ» και 6 στα 9 (66,7%) ανάμεσα σε «concordant M-ΧΛΛ»/«discordant ΣΥΜ».

3. Τα γονίδια IGHV1-2, IGHV1-69, IGHV2-5, IGHV3-23 και IGHV4-34, τα οποία ήταν συχνά εμφανιζόμενα στην κατηγορία ο-ΧΛΛ, παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές και στις τρεις συγκρίσεις μεταξύ των υποομάδων με διαφορετικά πρότυπα ΣΥΜ (**Διάγραμμα 15**). Συγκεκριμένα, τα γονίδια IGHV1-2 και IGHV1-69 εντοπίστηκαν πιο συχνά στην «concordant A-ΧΛΛ» υποκατηγορία, στη συνέχεια στην υποκατηγορία «discordant ΣΥΜ», ενώ παρουσίασαν τη χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης στην υποκατηγορία «concordant M-ΧΛΛ». Αντιθέτως, τα γονίδια IGHV2-5, IGHV3-23 και IGHV4-34 εντοπίστηκαν πιο συχνά στην υποκατηγορία ασθενών «concordant M-ΧΛΛ», ακολούθως στην υποκατηγορία «discordant ΣΥΜ», ενώ παρουσίασαν τη χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης στην «concordant A-ΧΛΛ» υποκατηγορία ασθενών. Τέλος, το συχνά εμφανιζόμενο γονίδιο της ο-ΧΛΛ, το IGHV3-7, εντοπίστηκε σε στατιστικά σημαντικά μικρότερο ποσοστό στην «concordant A-ΧΛΛ» υποκατηγορία ασθενών σε σχέση με τις άλλες δύο υποκατηγορίες.



Διάγραμμα 15: Σύγκριση του ρεπερτορίου έκφρασης των γονιδίων IGHV μεταξύ των τριών υποομάδων της ο-ΧΛΛ με διαφορετικό πρότυπο ΣΥΜ.

16. Ρεπερτόριο έκφρασης γονιδίων IGHD - Κατάσταση ΣΥΜ στην ο-ΧΛΛ

A. Υποκατηγορία «concordant M-ΧΛΛ» και υποκατηγορία «concordant A-ΧΛΛ»

Τα γονίδια IGHD που εμφάνισαν υψηλή συχνότητα εμφάνισης (>4%) στην υποκατηγορία με «concordant M-ΧΛΛ» πρότυπο ΣΥΜ ήταν 11/25 (44%) και αντιστοιχούσαν στο 68,7% του συνολικού ρεπερτορίου. Τα αντίστοιχα συχνά εμφανιζόμενα γονίδια IGHD στην υποκατηγορία με «concordant A-ΧΛΛ» ΣΥΜ ήταν 8/25 (32%) και αντιστοιχούσαν στο 77,8% του συνολικού ρεπερτορίου των IGHD γονιδίων. Επομένως, η υποκατηγορία με «concordant A-ΧΛΛ» ΣΥΜ εμφάνισε ένα υψηλότερο επίπεδο περιορισμών στο επίπεδο του ρεπερτορίου των γονιδίων IGHD σε σχέση με την υποκατηγορία με «concordant M-ΧΛΛ» ΣΥΜ. Τα παρακάτω 8 συχνά εμφανιζόμενα IGHD γονίδια ήταν κοινά ανάμεσα στις δύο υποομάδες (8/25, 32%): IGHD2-15, IGHD2-2, IGHD3-10, IGHD3-16, IGHD3-22, IGHD3-3, IGHD6-13 και IGHD6-19. Ως εκ τούτου, παρατηρήθηκε μεγάλη ομοιότητα στο ρεπερτόριο των γονιδίων IGHD ανάμεσα στις δύο υποκατηγορίες.

Τα μισά περίπου γονίδια IGHD (13/25, 52%) εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συχνότητα έκφρασής τους μεταξύ των υποκατηγοριών με «concordant M-ΧΛΛ» και «concordant A-ΧΛΛ» ΣΥΜ. Τα γονίδια αυτά ήταν τα εξής: IGHD1-1, IGHD1-20, IGHD1-26 (συχνό στην υποκατηγορία «concordant M-ΧΛΛ»), IGHD2-2 (συχνό και στις δύο υποκατηγορίες), IGHD2-21 (συχνό στην υποκατηγορία «concordant M-ΧΛΛ»), IGHD3-3 (συχνό και στις δύο υποκατηγορίες), IGHD4-11, IGHD4-17, IGHD4-23, IGHD5-18 (συχνό στην υποκατηγορία «concordant M-ΧΛΛ»), IGHD5-24, IGHD6-19 (συχνό και στις δύο υποκατηγορίες) και IGHD7-27. Από αυτά, μόνο τα τρία γονίδια ήταν συχνά και στις δύο υποκατηγορίες, ενώ τρία ήταν συχνά μόνο στην υποκατηγορία «concordant M-ΧΛΛ». Ως εκ τούτου, ενώ αρκετά γονίδια IGHD εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των υποκατηγοριών «concordant M-ΧΛΛ» και «concordant A-ΧΛΛ», μόνο λίγα από αυτά αντιπροσώπευαν μεγάλο αριθμό ασθενών.

B. Υποκατηγορία «concordant A-ΧΛΛ» και υποκατηγορία «discordant ΣΥΜ»

Τα γονίδια IGHD που εμφάνισαν υψηλή συχνότητα εμφάνισης (>4%) στην υποκατηγορία με «concordant A-ΧΛΛ» ΣΥΜ ήταν 8/25 (32%) και αντιστοιχούσαν στο 77,8% του συνολικού ρεπερτορίου των γονιδίων IGHD. Από την άλλη, τα συχνά εμφανιζόμενα γονίδια IGHD στην υποκατηγορία με «discordant ΣΥΜ» ήταν 9/25 (36%) και αντιστοιχούσαν στο 67,6% του συνολικού ρεπερτορίου έκφρασης των IGHD γονιδίων. Επομένως, η υποκατηγορία με «concordant A-ΧΛΛ» ΣΥΜ εμφάνισε ένα υψηλότερο επίπεδο περιορισμών στο επίπεδο του ρεπερτορίου των γονιδίων IGHD σε σχέση με την υποκατηγορία με «discordant ΣΥΜ». Μόνο δύο συχνά γονίδια ήταν κοινά και στις δύο υποκατηγορίες (2/25, 8%): τα IGHD6-13 και IGHD6-19. Ως εκ τούτου, αναδείχθηκε ένας πολύ μικρός βαθμός ομοιότητας όσον αφορά στα πρότυπα έκφρασης των γονιδίων IGHD στις δύο παραπάνω υποκατηγορίες.

Τέσσερα γονίδια IGHD (4/25, 16%) εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τη συχνότητα έκφρασής τους μεταξύ των υποκατηγοριών με «discordant ΣΥΜ» και «concordant A-ΧΛΛ» ΣΥΜ. Τα γονίδια αυτά ήταν τα IGHD3-3 (συχνό μόνο στην υποκατηγορία με «concordant A-ΧΛΛ»), IGHD4-17, IGHD6-19 (το μόνο συχνό και στις δύο υποκατηγορίες) και IGHD6-6 (συχνό μόνο στην υποκατηγορία με «discordant ΣΥΜ»). Επομένως, τα γονίδια IGHD τα οποία εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο συγκεκριμένων υποκατηγοριών ήταν λίγα και αντιπροσώπευαν περιορισμένο αριθμό ασθενών.

Γ. Υποκατηγορία «concordant M-ΧΛΛ» και υποκατηγορία «discordant ΣΥΜ»

Τα γονίδια IGHD που εμφάνισαν υψηλή συχνότητα έκφρασης (>4%) στην υποκατηγορία με «concordant M-ΧΛΛ» ΣΥΜ ήταν 11/25 (44%) και αντιστοιχούσαν στο 68,7% του συνολικού ρεπερτορίου έκφρασης των γονιδίων IGHD. Τα συχνά εμφανιζόμενα γονίδια IGHD στην υποκατηγορία με «discordant ΣΥΜ» ήταν 9/25 (36%) και αντιστοιχούσαν στο 67,6% του συνολικού ρεπερτορίου. Επομένως, το ρεπερτόριο συχνότητας έκφρασης των γονιδίων IGHD ήταν παρόμοιο στις δύο παραπάνω υποκατηγορίες με διαφορετικό πρότυπο ΣΥΜ. Μόνο τρία συχνά γονίδια ήταν κοινά

ανάμεσα στις δύο υποκατηγορίες (3/25, 12%): τα IGHD5-18, IGHD6-13 και IGHD6-19. Ως εκ τούτου, αναδείχθηκε μικρή ομοιότητα στα γονίδια IGHD που ήταν κοινά ανάμεσα στις δύο παραπάνω υποκατηγορίες.

Έξι γονίδια IGHD (6/25, 24%) εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συχνότητα έκφρασης μεταξύ της υποκατηγορίας με «discordant ΣΥΜ» και της υποκατηγορίας με «concordant M-ΧΛΛ» ΣΥΜ. Τα γονίδια αυτά ήταν τα IGHD1-1, IGHD2-2 (συχνό μόνο στην υποκατηγορία με «concordant M-ΧΛΛ» ΣΥΜ), IGHD2-21 (συχνό στην υποκατηγορία με «concordant M-ΧΛΛ» ΣΥΜ), IGHD3-3 (συχνό στην υποκατηγορία με «concordant M-ΧΛΛ» ΣΥΜ), IGHD5-24 (συχνό στην υποκατηγορία με «discordant ΣΥΜ») και IGHD7-27 (συχνό στην υποκατηγορία με «discordant ΣΥΜ»). Επομένως, τα γονίδια IGHD τα οποία εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των 2 συγκεκριμένων υποομάδων ήταν λίγα και αντιπροσώπευαν περιορισμένο αριθμό ασθενών.

Συνολικά, τα αποτελέσματα των υποπαραγράφων Α, Β και Γ έδειξαν ότι υπάρχουν κάποιες διαφορές στο ρεπερτόριο των γονιδίων IGHD ανάμεσα στις τρεις υποκατηγορίες ασθενών με ο-ΧΛΛ. Πιο ειδικά:

1. Ανάμεσα στις υποκατηγορίες «concordant M-ΧΛΛ» και «concordant A-ΧΛΛ» ΣΥΜ, τα περισσότερα συχνά (>4%) εμφανιζόμενα IGHD γονίδια (8/11, 72,7%) ήταν κοινά. Αντιθέτως, στις συγκρίσεις των υποκατηγοριών με «concordant A-ΧΛΛ» ΣΥΜ και «discordant ΣΥΜ» καθώς και των υποκατηγοριών με «concordant M-ΧΛΛ» ΣΥΜ και «discordant ΣΥΜ», τα κοινά συχνά IGHD γονίδια ήταν πολύ λιγότερα (2/15, 13,3% και 3/17, 17,6% αντίστοιχα). Επομένως, ενώ το ρεπερτόριο έκφρασης των κοινών συχνά εμφανιζόμενων γονιδίων IGHD μεταξύ των τριών υποκατηγοριών ασθενών με ο-ΧΛΛ ήταν διαφορετικό, εν τούτοις παρουσιάστηκε μεγαλύτερη ομοιότητα μεταξύ των υποκατηγοριών με «concordant M-ΧΛΛ» και «concordant A-ΧΛΛ» ΣΥΜ, σε σχέση με τη σύγκριση των υποκατηγοριών αυτών με την υποκατηγορία «discordant ΣΥΜ».
2. Στις τρεις συγκρίσεις που πραγματοποιήθηκαν, το ποσοστό των γονιδίων IGHD που εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές ήταν 52%, 16% και 24% για τις συγκρίσεις «concordant M-ΧΛΛ»/«concordant A-ΧΛΛ», «concordant A-ΧΛΛ»/«discordant ΣΥΜ» και «concordant M-ΧΛΛ»/«discordant ΣΥΜ»,

αντίστοιχα. Παρόμοια ήταν τα ποσοστά των γονιδίων που εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, όταν λάβαμε υπ' όψη μόνο τα συχνά εμφανιζόμενα γονίδια: 54,5%, 20% και 29,4% για τις τρεις παραπάνω συγκρίσεις, αντιστοίχως. Έγινε δηλαδή εμφανές ότι ενώ οι υποκατηγορίες «concordant A-ΧΛΛ» και «concordant M-ΧΛΛ» ΣΥΜ είχαν τα περισσότερα κοινά συχνά γονίδια IGHD, εν τούτοις παρουσίασαν και τις πιο σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης αυτών των γονιδίων. Επίσης, όπως παρατηρήθηκε και στα γονίδια IGHV, οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ήταν εντονότερες μεταξύ των υποκατηγοριών με «concordant A-ΧΛΛ» και «concordant M-ΧΛΛ» ΣΥΜ.

3. Το γονίδιο IGHD3-3, το οποίο ήταν το πιο συχνό γονίδιο IGHD στη μ-ΧΛΛ, παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ όλων των υποκατηγοριών που συγκρίθηκαν ($P=0.0001$) και εμφανίστηκε πολύ συχνότερα στην υποκατηγορία «concordant A-ΧΛΛ» ΣΥΜ σε σχέση με τις άλλες υποκατηγορίες.

17. Ρεπερτόριο έκφρασης γονιδίων IGHJ -Κατάσταση ΣΥΜ στην ο-ΧΛΛ

A. Υποκατηγορία «concordant M-ΧΛΛ» και υποκατηγορία «concordant A-ΧΛΛ»

Στην υποκατηγορία με «concordant M-ΧΛΛ» ΣΥΜ, το συχνότερο γονίδιο ήταν το IGHJ4 (52,8%) και ακολουθούσε το IGHJ6 (19,7%). Αντίθετα, στην υποκατηγορία με «concordant A-ΧΛΛ» ΣΥΜ το συχνότερο γονίδιο ήταν το IGHJ6 (45,6%) και ακολουθούσε το IGHJ4 (32,7%). Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν για τα δύο παραπάνω συχνά γονίδια IGHJ, αλλά και σε άλλα πιο σπάνια, όπως τα IGHJ1 και IGHJ3.

B. Υποκατηγορία «concordant A-ΧΛΛ» και υποκατηγορία «discordant ΣΥΜ»

Στην υποκατηγορία «concordant A-ΧΛΛ» ΣΥΜ, το συχνότερο γονίδιο ήταν το IGHJ6 (45,6%) και ακολουθούσε το IGHJ4 (32,7%). Στην υποκατηγορία «discordant ΣΥΜ» παρατηρήθηκε το αντίστροφο πρότυπο, δηλαδή το συχνότερο γονίδιο ήταν το IGHJ4 (44%) και ακολουθούσε το IGHJ6 (32%). Τα γονίδια IGHJ τα οποία εμφάνισαν στατιστικά

σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο αυτών υποκατηγοριών ήταν τρία: τα IGHJ1, IGHJ4 και IGHJ6.

Γ. Υποκατηγορία «concordant M-ΧΛΛ» και υποκατηγορία «discordant ΣΥΜ»

Στην υποκατηγορία με «concordant M-ΧΛΛ» ΣΥΜ, το συχνότερο γονίδιο ήταν το IGHJ4 (52,8%) και ακολουθούσε το IGHJ6 (19,7%). Το ίδιο πρότυπο παρατηρήθηκε και στην υποκατηγορία με «discordant ΣΥΜ», με τα αντίστοιχα ποσοστά να είναι 44% για το IGHJ4 και 32% για το IGHJ6. Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στα εξής τρία γονίδια: IGHJ3, IGHJ4 και IGHJ6.

Από τα αποτελέσματα των υποπαραγράφων Α, Β και Γ παρατηρήθηκε ότι οι συχνότητες του καθενός από τα επικρατούντα γονίδια IGHJ4 και IGHJ6 παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P < 0.01$) ανάμεσα σε όλες τις υποκατηγορίες ασθενών που μελετήθηκαν. Το γονίδιο IGHJ4 ήταν το πιο συχνό στις υποκατηγορίες με «concordant M-ΧΛΛ» και «discordant ΣΥΜ», με δεύτερο το γονίδιο IGHJ6. (IGHJ4/IGHJ6: 52,8%/19,7% και 44%/32%, για τις δύο καταστάσεις ΣΥΜ, αντίστοιχα). Αντιθέτως, στην υποκατηγορία με «concordant A-ΧΛΛ» ΣΥΜ το πιο συχνό ήταν το γονίδιο IGHJ6 με δεύτερο το IGHJ4 (45.6% και 32.7%, αντίστοιχα).

18. Μήκος περιοχής CDR3 και κατάσταση ΣΥΜ στην ο-ΧΛΛ

Η κατανομή του μήκους της περιοχής CDR3 παρουσίασε διαφορές μεταξύ των τριών υποκατηγοριών ασθενών της ο-ΧΛΛ με διαφορετικά πρότυπα ΣΥΜ («concordant M-ΧΛΛ», «concordant A-ΧΛΛ» και «discordant ΣΥΜ»). Συγκεκριμένα, ο μέσος όρος και η διάμεση τιμή του μήκους της CDR3 ήταν 15,2 και 15 aa στην υποκατηγορία «concordant M-ΧΛΛ» ΣΥΜ, 19,4 και 20 aa στην υποκατηγορία «concordant A-ΧΛΛ», και τέλος 17 και 17 aa στην υποκατηγορία «discordant ΣΥΜ». Επομένως, η υποκατηγορία ασθενών με «concordant M-ΧΛΛ» ΣΥΜ χαρακτηρίστηκε από το μικρότερο μήκος της περιοχής CDR3, η υποκατηγορία με «discordant ΣΥΜ» από ένα ενδιάμεσο μήκος, ενώ οι ασθενείς με «concordant A-ΧΛΛ» ΣΥΜ είχαν αναδιατάξεις με το μεγαλύτερο μήκος CDR3.

A. Υποκατηγορία «concordant M-ΧΛΛ» και υποκατηγορία «concordant A-ΧΛΛ»

Οι περισσότερες περιπτώσεις της υποκατηγορίας με «concordant M-ΧΛΛ» ΣΥΜ έφεραν περιοχή CDR3 με μήκος 15 aa, ενώ οι περισσότερες περιπτώσεις της υποκατηγορίας «concordant A-ΧΛΛ» έφεραν περιοχή CDR3 μήκους 21 aa. Στην υποκατηγορία με «concordant M-ΧΛΛ» ΣΥΜ εμφανίστηκαν σε μεγάλη συχνότητα (>4%) αναδιατάξεις με 10 διαφορετικά μήκη CDR3, που αντιστοιχούσαν συνολικά στο 83,7% του συνόλου των αναδιατάξεων. Οι συχνές αναδιατάξεις που κυριαρχούσαν στην υποκατηγορία «concordant A-ΧΛΛ» ΣΥΜ είχαν 11 διαφορετικά μήκη CDR3 και αφορούσαν στο 80,5% των αναδιατάξεων της υποκατηγορίας αυτής. Παρά τις ομοιότητες αυτές, εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές στον αριθμό των αναδιατάξεων που αντιστοιχούσαν στο κάθε μήκος CDR3. Για παράδειγμα, το μήκος 15 aa που ήταν το κυρίαρχο στην υποκατηγορία «concordant M-ΧΛΛ» ΣΥΜ, δεν ήταν συχνό στην υποκατηγορία «concordant A-ΧΛΛ» ΣΥΜ. Αντίθετα, το μήκος 21 aa που κυριαρχούσε στην υποκατηγορία «concordant A-ΧΛΛ» ΣΥΜ, δεν ήταν συχνό στην υποκατηγορία με «concordant M-ΧΛΛ» ΣΥΜ.

Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο παραπάνω υποκατηγοριών παρατηρήθηκαν για τα περισσότερα μήκη CDR3, και πιο συγκεκριμένα για τα εξής 19 διακριτά μήκη: 6 aa, 7aa, 8 aa, 9 aa, 10 aa, 11 aa (συχνό στην υποκατηγορία με «concordant M-ΧΛΛ» ΣΥΜ), 12 aa (συχνό στην υποκατηγορία «concordant M-ΧΛΛ» ΣΥΜ), 14 aa (συχνό και στις 2 υποκατηγορίες), 15 aa (συχνό στην υποκατηγορία «concordant M-ΧΛΛ» ΣΥΜ), 16 aa (συχνό στην υποκατηγορία «concordant M-ΧΛΛ» ΣΥΜ), 21 aa (συχνό στην υποκατηγορία «concordant A-ΧΛΛ» ΣΥΜ), 22 aa (συχνό στην υποκατηγορία «concordant A-ΧΛΛ» ΣΥΜ), 23 aa (συχνό στην υποκατηγορία «concordant A-ΧΛΛ» ΣΥΜ), 24 aa (συχνό στην υποκατηγορία «concordant A-ΧΛΛ» ΣΥΜ), 25 aa, 26 aa (συχνό στην υποκατηγορία «concordant A-ΧΛΛ» ΣΥΜ), 27 aa, 28 aa, 30 aa, με τις διαφορές στα συχνά μήκη να είναι σε υψηλό επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ($P=0.0001$). Εξάιρεση αποτέλεσαν τα μήκη 13 aa, 17 aa, 18 aa, 19 aa και 20 aa, τα οποία ήταν συχνά και στις δύο υποκατηγορίες, χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συχνότητές τους.

B. Υποκατηγορία «concordant A-ΧΛΛ» και υποκατηγορία «discordant ΣΥΜ»

Το πιο συχνό μήκος της περιοχής CDR3 στην υποκατηγορία «concordant A-ΧΛΛ» ΣΥΜ ήταν 21 aa, ενώ η αντίστοιχη τιμή στην υποκατηγορία «discordant ΣΥΜ» ήταν 13 aa. Συνολικά, στην υποκατηγορία «concordant A-ΧΛΛ» ΣΥΜ αναγνωρίστηκαν ως συχνά (>4%) 11 διακριτά μήκη CDR3 που αντιστοιχούσαν στο 80,5% των αναδιατάξεων της υποκατηγορίας. Τα διακριτά μήκη CDR3 που κυριαρχούσαν στην υποκατηγορία με «discordant ΣΥΜ» ήταν 11 και αφορούσαν στο 75,6 % των αναδιατάξεων της υποκατηγορίας αυτής. Επιπλέον, σε αυτή τη σύγκριση παρατηρήθηκε ένας μεγαλύτερος βαθμός ομοιότητας ανάμεσα στις δύο υποκατηγορίες σε σχέση με την προηγούμενη σύγκριση («concordant M-ΧΛΛ»/«concordant A-ΧΛΛ» ΣΥΜ).

Στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συχνότητα παρατηρήθηκαν για 13 διακριτά μήκη CDR3: 8 aa, 9 aa, 10 aa, 11 aa, 12 aa (συχνό στην υποκατηγορία «discordant ΣΥΜ»), 14 aa (συχνό και στις δύο υποκατηγορίες), 15 aa (συχνό στην υποκατηγορία «discordant ΣΥΜ»), 16 aa (συχνό στην υποκατηγορία «discordant ΣΥΜ»), 21 aa (συχνό και στις δύο υποκατηγορίες), 22 aa (συχνό και στις δύο υποκατηγορίες), 23 aa (συχνό στην υποκατηγορία με «concordant A-ΧΛΛ» ΣΥΜ), 24 aa (συχνό στην υποκατηγορία με «concordant A-ΧΛΛ» ΣΥΜ), 26 aa (συχνό στην υποκατηγορία με «concordant A-ΧΛΛ» ΣΥΜ).

Γ. Υποκατηγορία «concordant M-ΧΛΛ» και υποκατηγορία «discordant ΣΥΜ»

Το πιο συχνό μήκος της περιοχής CDR3 στην υποκατηγορία με «concordant M-ΧΛΛ» ΣΥΜ ήταν 15 aa, ενώ στην υποκατηγορία «discordant ΣΥΜ» η αντίστοιχη τιμή ήταν 13 aa. Στην υποκατηγορία με «concordant M-ΧΛΛ» ΣΥΜ αναγνωρίστηκαν συχνές αναδιατάξεις (>4%) με 10 διαφορετικά μήκη CDR3, οι οποίες αντιστοιχούσαν στο 83,7% των αναδιατάξεων αυτής της υποκατηγορίας. Αντίστοιχα, τα μήκη της CDR3 που κυριαρχούσαν στην υποκατηγορία «discordant ΣΥΜ» ήταν 11 και αφορούσαν στο 75,6 % των αναδιατάξεων της υποκατηγορίας αυτής.

Στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συχνότητα μεταξύ των υποκατηγοριών με «concordant M-ΧΛΛ» και «discordant ΣΥΜ» παρατηρήθηκαν για 13 διακριτά μήκη της

περιοχής CDR3: 11 aa (συχνό στην υποομάδα με «concordant M-ΧΛΛ» ΣΥΜ), 14 aa (συχνό και στις δύο υποκατηγορίες), 15 aa (συχνό και στις δύο υποκατηγορίες), 16 aa (συχνό και στις δύο υποκατηγορίες), 21 aa (συχνό στην υποκατηγορία «discordant ΣΥΜ»), 22 aa (συχνό στην υποκατηγορία «discordant ΣΥΜ»), 23 aa, 24 aa, 25 aa, 26 aa, 27 aa, 28 aa και 30 aa.

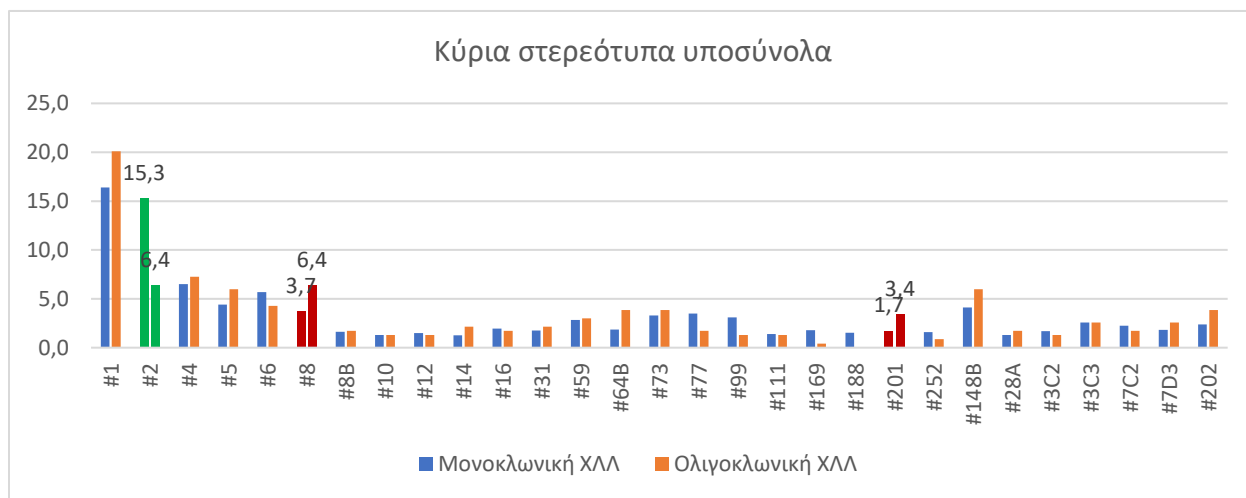
Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα των υποπαραγράφων Α, Β, και Γ παρατηρήθηκε ότι η κατανομή του μήκους της περιοχής CDR3 ήταν διαφορετική ανάμεσα στις 3 υποκατηγορίες της ο-ΧΛΛ με διαφορετικά πρότυπα ΣΥΜ. Ειδικότερα, τα μικρότερα μήκη CDR3 εντοπίστηκαν στην υποκατηγορία με «concordant M-ΧΛΛ» ΣΥΜ, ενώ η υποομάδα «concordant Α-ΧΛΛ» χαρακτηρίστηκε από μεγαλύτερα μήκη. Επίσης, οι περισσότερες στατιστικά σημαντικές διαφορές στην κατανομή του μήκους της περιοχής CDR3 παρατηρήθηκαν μεταξύ των υποκατηγοριών με «concordant M-ΧΛΛ» και «concordant Α-ΧΛΛ» ΣΥΜ.

Τέλος, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα των Παραγράφων 9 και 13 παρατηρήθηκε ότι: (α) το μήκος CDR3 που αντιστοιχούσε σε 21 aa, το οποίο ήταν το πιο συχνό στην υποκατηγορία με «concordant Α-ΧΛΛ» ΣΥΜ, ήταν επίσης το πιο συχνό στις αναδιατάξεις Α-ΧΛΛ στους ασθενείς με μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ, (β) το μήκος 15 aa που ήταν το πιο συχνό στην υποκατηγορία με «concordant M-ΧΛΛ» ΣΥΜ, ήταν επίσης το πιο συχνό στις Μ-ΧΛΛ αναδιατάξεις στους ασθενείς με ο-ΧΛΛ. Τέλος, (γ) το μήκος 13 aa, το πιο συχνό στην υποκατηγορία ασθενών με «discordant ΣΥΜ», το οποίο όμως εντοπίστηκε με αρκετά μεγάλη συχνότητα και στις υποκατηγορίες «concordant M-ΧΛΛ» και «concordant Α-ΧΛΛ», ήταν συνολικά το πιο συχνό σε ασθενείς με μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ.

19. Στερεοτυπία της περιοχής CDR3

Η παραπάνω ανάλυση ανέδειξε 29 κύρια στερεότυπα υποσύνολα (**Διάγραμμα 16**). Συνολικά, τα περισσότερα από αυτά τα υποσύνολα εντοπίστηκαν σε παρόμοια συχνότητα μεταξύ των μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Στατιστικά σημαντικές διαφορές στην κατανομή μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ αναδείχθηκαν μόνο για τα υποσύνολα #2, #8 και #201. Πιο ειδικά, το υποσύνολο #2 εμφάνισε μεγαλύτερη συχνότητα στη μ-ΧΛΛ, ενώ τα υποσύνολα #8 και #201 ήταν πιο συχνά στην ο-ΧΛΛ. Σχετικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα υποσύνολα

#2 και #8 σχετίζονται με επιθετική βιολογική συμπεριφορά, ενώ το #201 χαρακτηρίζεται από σχετικά ήπια κλινική συμπεριφορά. Επομένως, η κατανομή των περιπτώσεων των υποσυνόλων #2 και #201 μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ ήταν αναμενόμενη, κάτι που δεν ίσχυε στην περίπτωση του υποσυνόλου #8.



Διάγραμμα 16: Σύγκριση της κατανομής των αναδιατάξεων που ανήκαν στα 29 κύρια στερεότυπα υποσύνολα μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Με πράσινο χρώμα απεικονίζεται το υποσύνολο που η συχνότητά τους ήταν σημαντικά αυξημένη στη μ-ΧΛΛ, ενώ με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα υποσύνολα που η συχνότητά τους ήταν σημαντικά αυξημένη στην ο-ΧΛΛ.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ταυτοποίηση ασθενών με ΧΛΛ που εκφράζουν περισσότερες από μία παραγωγικές αναδιατάξεις ανοσοσφαιρίνης του ΒκΥ αποτελεί ένα φαινόμενο με μεγάλο ενδιαφέρον τόσο σε βιολογικό όσο και σε κλινικό επίπεδο. Στην παρούσα κατάσταση, απουσιάζουν δεδομένα που να αφορούν στην οντογένεση και εξέλιξη της ΧΛΛ σε τέτοιες περιπτώσεις με τελικό αποτέλεσμα την απουσία της δυνατότητας ερμηνείας σε κλινικό επίπεδο. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε ανοσογενετική ανάλυση σε μια μεγάλη σειρά ασθενών με ΧΛΛ που περιλάμβανε ασθενείς με μια παραγωγική αναδιάταξη της βαριάς αλυσίδας της κλωνοτυπικής ανοσοσφαιρίνης (μονοκλωνική ΧΛΛ, μ-ΧΛΛ) καθώς και ασθενείς με περισσότερες από μία παραγωγικές αναδιατάξεις (ολιγοκλωνική ΧΛΛ, ο-ΧΛΛ).

Η ανάλυση του ρεπερτορίου των γονιδίων IGHV σε μονο-ΧΛΛ και ολιγο-ΧΛΛ έδειξε ένα μεγάλο βαθμό ομοιότητας. Επομένως, ο βαθμός κλωνικότητας δεν φαίνεται να σχετίζεται με την επιλογή των γονιδίων IGHV, υποδεικνύοντας την ύπαρξη κοινών αντιγονικών ερεθισμάτων στις δύο κατηγορίες της νόσου. Από την άλλη, κάποια γονίδια IGHV εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τη συχνότητα έκφρασής τους μεταξύ των δύο κατηγοριών ΧΛΛ. Όμως, στις περισσότερες περιπτώσεις τα γονίδια αυτά εμφάνισαν κυρίως χαμηλές συχνότητες έκφρασης και άρα οι διαφορές μπορεί να οφείλονται στο μέγεθος της ομάδας μελέτης. Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις, οι στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συχνότητες των συγκεκριμένων γονιδίων μεταξύ των δύο κατηγοριών ΧΛΛ εμφανίστηκαν και στο επίπεδο των αλληλομόρφων τους.

Ο βαθμός κλωνικότητας δε φαίνεται να επηρεάζει ούτε το ρεπερτόριο των γονιδίων IGHD, το οποίο ήταν παρόμοιο ανάμεσα σε μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ. Πολύ λίγα γονίδια IGHD εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο κατηγοριών ΧΛΛ, οι οποίες εμφάνιστηκαν και σε επίπεδο αλληλομόρφου. Αντίθετα με τα γονίδια IGHV και IGHD, το ρεπερτόριο των IGHJ γονιδίων εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συχνότητα των δύο επικρατέστερων γονιδίων, μεταξύ των δύο τύπων ΧΛΛ με το IGHJ4 να είναι συχνότερο στην ο-ΧΛΛ και το IGHJ6 συχνότερο στη μ-ΧΛΛ. Σε επίπεδο αλληλομόρφου IGHJ, στατιστικά σημαντική διαφορά έκφρασης παρατηρήθηκε μόνο σε ένα αλληλόμορφο του γονιδίου IGHJ6. Κάποια από τα γονίδια IGHV που ήταν συχνά εμφανιζόμενα και στις δύο κατηγορίες ΧΛΛ έδειξαν κοινές τάσεις προτίμησης συνδυασμού με τα ίδια γονίδια

IGHD και IGHJ. Επομένως, ο βαθμός κλωνικότητας δε φαίνεται να διαδραματίζει κάποιον ρόλο στην επιλογή συγκεκριμένων συνδυασμών γονιδίων IGHV-IGHD και IGHV-IGHJ και άρα μπορεί να υποτεθεί ότι τα αντιγόνα που παίζουν ρόλο στην επιλογή των κλωνοτυπικών ΒκΥ είναι τα ίδια και στις δύο κατηγορίες ΧΛΛ με διαφορετικό βαθμό κλωνικότητας.

Η ανάλυση της συχνότητας εμφάνισης μεταλλαγμένων (Μ-ΧΛΛ) και αμετάλλακτων (Α-ΧΛΛ) αναδιατάξεων (κλώνων) των γονιδίων IGHV στις δύο κατηγορίες ΧΛΛ ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές, με το ποσοστό των μεταλλαγμένων αναδιατάξεων να είναι σημαντικά υψηλότερο στην ο-ΧΛΛ σε σχέση με τη μ-ΧΛΛ. Αναμενόμενα, οι αμετάλλακτες αναδιατάξεις εμφάνισαν το αντίθετο πρότυπο κατανομής. Επίσης, το ποσοστό των Μ-ΧΛΛ αναδιατάξεων ήταν μεγαλύτερο από εκείνο των Α-ΧΛΛ, ανεξάρτητα από το βαθμό κλωνικότητας, αποτέλεσμα που συμφωνεί με τα ως τώρα γνωστά δεδομένα για τα ποσοστά ασθενών με μεταλλαγμένα και αμετάλλακτα γονίδια IGHV [79].

Η ανάλυση της σχέσης μεταξύ διαφορετικών ανοσογενετικών χαρακτηριστικών, όπως το γονίδιο IGHV και το πρότυπο της ΣΥΜ, μεταξύ μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μόνο σε τρεις συγκεκριμένους συνδυασμούς. Η πιο ενδιαφέρουσα διαφορά αφορούσε στο συνδυασμό IGHV1-69/Μ-ΧΛΛ, που ήταν σημαντικά πιο συχνός στην ο-ΧΛΛ σε σχέση με τη μ-ΧΛΛ. Δεδομένου ότι το γονίδιο IGHV1-69 ήταν το πιο συχνό στη μ-ΧΛΛ και μάλιστα σε αμετάλλακτη κατάσταση, μπορεί να υποτεθεί ότι ο συνδυασμός IGHV1-69/Μ-ΧΛΛ πιθανόν να συνδέεται με ήπια νόσο. Γενικότερα, η μεταλλακτική κατάσταση φαίνεται να είναι ειδική για τις αναδιατάξεις του κάθε γονιδίου IGHV, χωρίς να παίζει σημαντικό ρόλο ο βαθμός της κλωνικότητας. Αυτό προέκυψε από τη σύγκριση της συχνότητας της μεταλλαγμένης και αμετάλλακτης κατάστασης των γονιδίων IGHV, ξεχωριστά για τη μ-ΧΛΛ και την ο-ΧΛΛ. Τα γονίδια που εμφάνισαν ισχυρή πίεση επιλογής είτε για τη μεταλλαγμένη είτε για την αμετάλλακτη κατάσταση (π.χ. το IGHV1-69 που αναφέρθηκε παραπάνω) ήταν κοινά για τους δύο τύπους ΧΛΛ. Όσον αφορά στη μεταλλακτική κατάσταση των γονιδίων IGHV1-69 και IGHV4-34, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με εκείνα προηγούμενων μελετών, οι οποίες ανέφεραν μια ισχυρή συσχέτιση με την αμετάλλακτη και τη μεταλλαγμένη κατάσταση, αντίστοιχα [39,87].

Η ανάλυση του πρότυπου της ΣΥΜ στους ασθενείς με ο-ΧΛΛ έδειξε ότι η πλειοψηφία των περιπτώσεων χαρακτηριζόταν από μια «σύμφωνη» κατάσταση της ΣΥΜ. Συγκεκριμένα, οι περισσότερες περιπτώσεις εμφάνισαν είτε μόνο μεταλλαγμένες αναδιατάξεις («concordant M-ΧΛΛ»), είτε μόνο αμετάλλακτες αναδιατάξεις («concordant A-ΧΛΛ»). Αυτό το αποτέλεσμα είναι πολύ σημαντικό καθώς διευκολύνει την πρόγνωση των ασθενών με ο-ΧΛΛ, για τη διαχείριση των οποίων οι πιο πρόσφατες οδηγίες βασίστηκαν περισσότερο στη λογική παρά σε μεγάλο μέγεθος δεδομένων [86]. Οι ασθενείς με «discordant ΣΥΜ» και επομένως με ιδιαίτερη δυσκολία ως προς την πρόγνωσή τους αντιπροσώπευαν το ένα τρίτο περίπου των περιπτώσεων της ο-ΧΛΛ. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης [84], η οποία έδειξε μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης δικλωνικών ασθενών με «σύμφωνη» κατάσταση της ΣΥΜ, σε σχέση με εκείνους με «discordant ΣΥΜ». Συνολικά, η παρουσία κοινών ανοσογενετικών χαρακτηριστικών στις πολλαπλές αναδιατάξεις των περισσότερων ασθενών φαίνεται να είναι σημαντική, καθώς μπορεί να επιφέρει μια ισορροπία στον ανταγωνισμό μεταξύ των διαφορετικών κλώνων που με τη σειρά της επιτρέπει τη συνύπαρξη των κλώνων αυτών για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Επιπλέον, οι ασθενείς της υποομάδας με «concordant M-ΧΛΛ» κατάσταση ΣΥΜ ήταν πολύ περισσότεροι από εκείνους της υποομάδας με «concordant A-ΧΛΛ» κατάσταση. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τη γενικότερη υπεροχή των αναδιατάξεων M-ΧΛΛ σε σχέση με τις A-ΧΛΛ που παρατηρήθηκε στην ο-ΧΛΛ. Σε παλαιότερη έρευνα είχε επίσης διαπιστωθεί ότι οι περισσότερες περιπτώσεις ΧΛΛ με πολλαπλούς κλώνους εξέφραζαν μεταλλαγμένα γονίδια IGHV [79].

Στο ρεπερτόριο των γονιδίων IGHV της ο-ΧΛΛ παρατηρήθηκε ειδικότητα στις δύο υποκατηγορίες ασθενών με «σύμφωνες» καταστάσεις ΣΥΜ (είτε μεταλλαγμένη είτε αμετάλλακτη), με διαφορετικά γονίδια να εμφανίζονται συχνά στην υποκατηγορία «concordant M-ΧΛΛ» και την υποκατηγορία «concordant A-ΧΛΛ». Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία και με την ειδικότητα της μεταλλακτικής κατάστασης των αντίστοιχων γονιδίων. Επομένως, η ειδικότητα του ρεπερτορίου των γονιδίων IGHV στις 3 μεταλλακτικές υποομάδες της ο-ΧΛΛ μπορεί να αποτελεί ένα από τα χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στη συνύπαρξη των κλώνων σε «συμφωνία».

Η υποκατηγορία ασθενών με «discordant ΣΥΜ» δεν χαρακτηρίστηκε από ένα πολύ ειδικό ρεπερτόριο γονιδίων IGHV. Συγκεκριμένα, τα γονίδια IGHV στη συγκεκριμένη υποομάδα εμφάνισαν μια συχνότητα που ήταν ενδιάμεση σε σχέση με εκείνες που εμφάνισαν στις δύο υποομάδες με σύμφωνη κατάσταση ΣΥΜ. Με άλλα λόγια, τα αποτελέσματα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι οι Α-ΧΛΛ και οι Μ-ΧΛΛ αναδιατάξεις της ο-ΧΛΛ είναι παρόμοιες με τις Α-ΧΛΛ και Μ-ΧΛΛ αναδιατάξεις της μ-ΧΛΛ. Επομένως, η τελική κατάληξη του κλωνικού ανταγωνισμού σε αυτές τις περιπτώσεις αναμένεται να είναι η επικράτηση του αμετάλλακτου κλώνου έναντι του μεταλλαγμένου [78].

Στο ίδιο πλαίσιο, το γονίδιο IGHD3-3, το οποίο ήταν πιο συχνό στη μ-ΧΛΛ σε σχέση με την ο-ΧΛΛ, ήταν επίσης σημαντικά συχνότερο στην υποκατηγορία της ο-ΧΛΛ με «concordant Α-ΧΛΛ». Τα γονίδια IGHI4 και IGHI6, ήταν πιο συχνά στην ο-ΧΛΛ και μ-ΧΛΛ, αντίστοιχα. Όταν εστιάσαμε στη μελέτη της ο-ΧΛΛ, τα γονίδια αυτά ήταν πιο συχνά στις υποκατηγορίες με «concordant Μ-ΧΛΛ» και «concordant Α-ΧΛΛ» αναδιατάξεις, αντίστοιχα. Επομένως, τα ρεπερτόριο των γονιδίων IGHD και IGHI φαίνεται να παρουσιάζουν ένα βαθμό ειδικότητας στις τρεις μεταλλακτικές υποομάδες της ο-ΧΛΛ.

Από την ανάλυση της κατανομής του μήκους της CDR3 περιοχής προέκυψε ότι σε γενικές γραμμές δεν επηρεάζεται από τον βαθμό κλωνικότητας. Οι σημαντικές διαφορές υπέρ της μ-ΧΛΛ εντοπίζονταν σε μεγαλύτερα μήκη (>19 aa), με εξαίρεση το μήκος 9 aa, ενώ οι διαφορές υπέρ της ο-ΧΛΛ εντοπίζονταν σε μικρότερα μήκη (<17 aa).

Η ανάλυση του συνδυασμού των ανοσογενετικών χαρακτηριστικών γονίδιο IGHV και μήκος CDR3 ανέδειξε κάποιες τάσεις προτίμησης συγκεκριμένων συνδυασμών που ήταν κοινές και στους δύο τύπους ΧΛΛ με διαφορετικό βαθμό κλωνικότητας. Η σημαντική διαφορά στη συχνότητα του συνδυασμού IGHV3-21/25 aa υπέρ της ο-ΧΛΛ φαίνεται να έχει ενδιαφέρον, δεδομένου ότι κάθε ένα από τα παραπάνω ανοσογενετικά χαρακτηριστικά ήταν μεμονωμένα πιο συχνό στη μ-ΧΛΛ. Επίσης, συνδυασμοί που ήταν πιο συχνοί στη μ-ΧΛΛ (π.χ. IGHV3-21/9 aa) υποδεικνύουν την παρουσία στερεότυπων υποσυνόλων, με πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα τα στερεότυπα υποσύνολα #2 (IGHV3-21 και 9 aa) και #169 (IGHV3-48 και 9 aa) [22,70].

Τα μεγαλύτερα μήκη της περιοχής CDR3 φαίνεται να συνδέονται με την αμετάλλακτη κατάσταση και τα μικρότερα με τη μεταλλαγμένη, όπως είναι αναμενόμενο με βάση τη βιβλιογραφία [79]. Αυτό το αποτέλεσμα προέκυψε τόσο από την ανάλυση σε επίπεδο

αναδιατάξεων και στους δύο κατηγορίες ΧΛΛ με διαφορετικό βαθμό κλωνικότητας, όσο και σε επίπεδο ασθενών εντός της ο-ΧΛΛ. Στο πλαίσιο αυτό, οι ασθενείς με «concordant A-ΧΛΛ» κατάσταση χαρακτηρίζονταν από τα μεγαλύτερα μήκη της περιοχής CDR3, οι ασθενείς με «discordant ΣΥΜ» από ενδιάμεσα και οι ασθενείς με «concordant M-ΧΛΛ» κατάσταση από τα μικρότερα μήκη CDR3.

Τέλος, η ανάλυση στερεοτυπίας στους δύο τύπους ΧΛΛ με διαφορετικά πρότυπα κλωνικότητας δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές. Οι μόνες σημαντικές διαφορές αφορούσαν στα υποσύνολα #2 και #201, που εντοπίστηκαν συχνότερα σε μ-ΧΛΛ και ο-ΧΛΛ, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα δεδομένα για την κλινική συμπεριφορά των ασθενών που ανήκουν σε αυτά τα υποσύνολα, με το υποσύνολο #2 να χαρακτηρίζεται από επιθετική νόσο και το #201 να σχετίζεται με ήπια νόσο [22,64,66]. Αντιθέτως, η στατιστικά υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης του υποσυνόλου #8 στην ο-ΧΛΛ σε σχέση με τη μ-ΧΛΛ, δε φαίνεται να βρίσκεται σε συμφωνία με την επιθετική νόσο που εμφανίζουν οι συγκεκριμένοι ασθενείς (63,66,88].

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*. 1996;381:751–8.
2. Medzhitov R, Janeway Jr C. Innate immunity. *N Engl J Med*. 2000;343(5):338–44.
3. Marrack P, Kappler J. The T cell receptor. *Science (80-)*. 1987;238(4830):1073–9.
4. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: How they develop and function. *Blood*. 2008;112(5):1570–80.
5. Pleiman CM, D'Ambrosio D, Cambier JC. The B-cell antigen receptor complex: structure and signal transduction. *Immunol Today*. 1994;15(9):393–9.
6. Stewart AK, Schwartz RS. Immunoglobulin V regions and the B cell. *Blood*. 1994;83 (7): 1717–1730.
7. Lefranc M-P, Lefranc G. *The immunoglobulin factsbook*. Academic press; 2001.
8. Nussenzweig MC. Immune receptor editing: Revise and select. *Cell*. 1998; Dec 23;95(7):875-8
9. Pallarès N, Lefebvre S, Contet V, et al. The human immunoglobulin heavy variable genes. *Exp Clin Immunogenet*. 1999;16(1):36–60.
10. Ruiz M, Pallarès N, Contet V, et al. The human immunoglobulin heavy diversity (IGHD) and joining (IGHJ) segments. *Exp Clin Immunogenet*. 1999;16(3):173–84.
11. Korsmeyer SJ, Hieter PA, Ravetch J V, et al. Developmental hierarchy of immunoglobulin gene rearrangements in human leukemic pre-B-cells. *Proc Natl Acad Sci*. 1981;78(11):7096–100.
12. Alt FW, Baltimore D. Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions. *Proc Natl Acad Sci*. 1982;79(13):4118–22.
13. Komori T, Okada A, Stewart V, et al. Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science (80-)*. 1993;261(5125):1171–5.
14. Papavasiliou FN, Schatz DG. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity. *Cell*. Apr 2002;109 Suppl: S35-44.

15. Odegard VH, Schatz DG. Targeting of somatic hypermutation. *Nature reviews Immunology*. Aug 2006;6(8):573-583.
16. Franklin A, Blanden RV. On the molecular mechanism of somatic hypermutation of rearranged immunoglobulin genes. *Immunology and cellbiology*. Dec 2004;82(6):557-567.
17. Shapiro GS, Wysocki LJ. DNA target motifs of somatic mutagenesis in antibody genes. *Critical reviews in immunology*. 2002;22(3):183-200.
18. Davi F. Immunoglobulin genes in B cell development. In: *Immunoglobulin Gene Analysis in Chronic Lymphocytic Leukemia*. 2008. p. 1–19.
19. Itoh K, Patki V, Furie RA, et al. Clonal expansion is a characteristic feature of the B-cell repertoire of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2000;2(1):50–8.
20. Baranzini SE, Jeong MC, Butunoi C, et al. B cell repertoire diversity and clonal expansion in multiple sclerosis brain lesions. *J Immunol*. 1999;163(9):5133–44.
21. Dörner T, Giesecke C, Lipsky PE. Mechanisms of B cell autoimmunity in SLE. *Arthritis Res Ther*. 2011;1–12.
22. Agathangelidis A., Anastasia Chatzidimitriou, Katerina Gemenetzi, et al. Higher-order connections between stereotyped subsets : implications for improved patient classification in CLL. *Blood*. 2021 Mar 11;137(10):1365-1376.
23. Jerkeman M, Hallek M, Dreyling M, et al. Targeting of B-cell receptor signalling in B-cell malignancies. *J Intern Med*. 2017;282(5):415–28.
24. Rossi D, Ciardullo C, Gaidano G. Genetic aberrations of signaling pathways in lymphomagenesis: Revelations from next generation sequencing studies. *Semin Cancer Biol*. 2013;23(6 Part A):422–30.
25. Sutton LA, Agathangelidis A, Belessi C, et al. Antigen selection in B-cell lymphomas -Tracing the evidence. *Semin Cancer Biol*. 2013;23(6 Part A):399–409.
26. Stevenson FK, Sahota SS, Ottensmeier CH, et al. The occurrence and significance of V gene mutations in B cell-derived human malignancy. *Advances in Cancer Research*. 2001. p. 81–116.
27. Zaragoza Infante L. Functional implications of affinity maturation for the ontogeny and evolution of B cell lymphomas through combined NGS immunogenetics and

- 3D IG analysis. PhD Thesis. Aristotle University of Thessaloniki 2022.
28. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute–Working Group 1996 guidelines. *Blood, J Am Soc Hematol.* 2008;111(12):5446–56.
 29. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *American journal of clinical pathology.* Oct 1997;108(4):378-382.
 30. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine.* Feb 24 2005;352(8):804-815.
 31. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer Statistics. *CA cancer J Clin.* 2012;62(1):10–29.
 32. Smith A, Howell D, Patmore R, et al. Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer.* 2011;105(11):1684–92.
 33. Dores GM, Anderson WF, Curtis RE, et al. Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. *Br J Haematol.* 2007;139(5):809–19.
 34. Linet MS, Schubauer-Berigan MK, Weisenburger DD, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: an overview of aetiology in light of recent developments in classification and pathogenesis. *British journal of haematology.* Dec 2007;139(5):672-686.
 35. Agathangelidis A. Analysis of the rearrangements of immunoglobulin genes in B cell neoplasms. PhD Thesis. Aristotle University of Thessaloniki 2012.
 36. González-Gascón-Y-Marín I., Carolina Muñoz-Novas, Ana-Eugenia Rodríguez - Vicente, et al. From Biomarkers to Models in the Changing Landscape of Chronic Lymphocytic Leukemia: Evolve or Become Extinct. *Cancers* 2021;13(8):1782.
 37. AbdelSalam M, El Sissy A, Samra MA, Ibrahim S, El Markaby D, Gadallah F. The impact of trisomy 12, retinoblastoma gene and P53 in prognosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Hematology.* Jun 2008;13(3):147-153.
 38. Mehes G. Chromosome abnormalities with prognostic impact in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Pathology oncology research : POR.* 2005;11(4):205-210.

39. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest.* 1998;102(8):1515–25.
40. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood.* Jan 1 2007;109(1):259-270.
41. Tobin G, Thunberg U, Karlsson K, et al. Subsets with restricted immunoglobulin gene rearrangement features indicate a role for antigen selection in the development of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* Nov 1 2004;104(9):2879-2885.
42. Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A, 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.* Feb 1 2008;111(3):1524-1533.
43. Kostareli E, Sutton LA, Hadzidimitriou A, et al. Intraclonal diversification of immunoglobulin light chains in a subset of chronic lymphocytic leukemia alludes to antigen-driven clonal evolution. *Leukemia.* 2010;24(7):1317–24.
44. Gurrieri C, McGuire P, Zan H, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells can undergo somatic hypermutation and intraclonal immunoglobulin VHDJH gene diversification. *J Exp Med.* 2002;196(5):629–39.
45. Sutton L, Kostareli E, Hadzidimitriou 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. 2009;114(20):4460–8.
46. Bagnara D, Tang C, Brown JR, et al. Post-Transformation IGHV-IGHD-IGHJ Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells: Implications for Mutational Mechanisms and Impact on Clinical Course. *Front Oncol.* 2021;11(May):1–14.
47. Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annual review of immunology.* 2003;21:841-894.
48. Widhopf GF, 2nd, Rassenti LZ, Toy TL, Gribben JG, Wierda WG, Kipps TJ. Chronic

- lymphocytic leukemia B cells of more than 1% of patients express virtually identical immunoglobulins. *Blood*. Oct 15 2004;104(8):2499-2504.
49. Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, et al. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood*. Jun 1 2002;99(11):4087-4093.
 50. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *The Journal of experimental medicine*. Dec 3 2001;194(11):1625-1638.
 51. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of experimental medicine*. Dec 3 2001;194(11):1639-1647.
 52. Kulis M, Heath S, Bibikova M, Queiros AC, Navarro A, Clot G, et al. Epigenomic analysis detects wide-spread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nature genetics*. 2012; 44(11):1236–42.
 53. Damle BRN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V Gene Mutation Status and CD38 Expression As Novel Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*. 1999; Sep 15;94(6):1840-7.
 54. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, et al. Unmutated Ig VH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood, J Am Soc Hematol*. 1999;94(6):1848–54.
 55. Langerak AW, Davi F, Ghia P, et al. Immunoglobulin sequence analysis and prognostication in CLL: guidelines from the ERIC review board for reliable interpretation of problematic cases. *Leukemia*. 2011;25(6):979–84.
 56. Lanham S, Hamblin T, Oscier D, Ibbotson R, Stevenson F, Packham G. Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational 125 status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. Feb 1 2003;101(3):1087-1093.
 57. Zenz T. Daniel Mertens, Ralf Küppers, Hartmut Döhner, Stephan Stilgenbauer. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2010 Jan;10(1):37-50.

58. Baliakas P, Moysiadis T, Hadzidimitriou A, et al. Tailored approaches grounded on immunogenetic features for refined prognostication in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2019 Feb;104(2):360-369.
59. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, et al. Somatically mutated Ig VH3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood, J Am Soc Hematol*. 2002;99(6):2262-4.
60. Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, et al. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2004;200(4):519-25.
61. Stamatopoulos K, Agathangelidis A, Rosenquist R, et al. Antigen receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia [Internet]*. 2017;31(2):282-91.
62. Catera R, Liu Y, Gao C, et al. Binding of CLL subset 4 B cell receptor immunoglobulins to viable human memory B lymphocytes requires a distinctive IGKV somatic mutation. *Mol Med*. 2017;23(1):1-12.
63. Gounari M, Ntoufa S, Apollonio B, et al. Excessive antigen reactivity may underlie the clinical aggressiveness of chronic lymphocytic leukemia stereotyped subset# 8. *Blood, J Am Soc Hematol*. 2015;125(23):3580-7.
64. Baliakas P, Agathangelidis A, Hadzidimitriou A, et al. Not all IGHV3-21 chronic lymphocytic leukemias are equal: Prognostic considerations. *Blood*. 2015;125(5):856-9.
65. Jaramillo S, Agathangelidis A, Schneider C, et al. Prognostic impact of prevalent chronic lymphocytic leukemia stereotyped subsets: analysis within prospective clinical trials of the German CLL Study Group (GCLLSG). *Haematologica*. 2020 Nov 1;105(11):2598-2607.
66. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, et al. Clinical effect of stereotyped B-cell receptor immunoglobulins in chronic lymphocytic leukaemia: A retrospective multicentre study. *Lancet Haematol [Internet]*. 2014;1(2):e74-84.
67. Stamatopoulos B, Smith T, Crompton E, et al. The Light Chain IgLV3-21 Defines a New Poor Prognostic Subgroup in Chronic Lymphocytic Leukemia: Results of a Multicenter Study The Light Chain IgLV3-21 Defines a Poor Prognosis in CLL. *Clin Cancer Res*. 2018;24(20):5048-57.

68. Hadzidimitriou A, Darzentas N, Murray F, et al. Evidence for the significant role of immunoglobulin light chains in antigen recognition and selection in chronic lymphocytic leukemia. *Blood, J Am Soc Hematol.* 2009;113(2):403–11.
69. Nadeu F, Royo R, Clot G, et al. IGLV3-21R110 identifies an aggressive biological subtype of chronic lymphocytic leukemia with intermediate epigenetics. *Blood.* 2021;137(21):2935–46.
70. Gemenetzi K, Psomopoulos F, Carriles AA et al. Higher-order immunoglobulin repertoire restrictions in CLL: the illustrative case of stereotyped subsets 2 and 169. *Blood.* 2021 Apr 8;137(14):1895-1904
71. Rassenti LZ, Kipps TJ. Lack of allelic exclusion in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med.* 1997;185(8):1435-45.
72. Stamatopoulos K, Kosmas C, Stavroyianni N, Loukopoulos D. Evidence for immunoglobulin heavy chain variable region gene replacement in a patient with B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 1996;10(9):1551-6.
73. Sanchez ML, Almeida J, Gonzalez D, Gonzalez M, Garcia-Marcos MA, Balanzategui A, et al. Incidence and clinico-biologic characteristics of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders with more than one B-cell clone. *Blood* 2003;102(8):2994-3002.
74. González-Campos J, Ríos-Herranz E, De Blas-Orlando JM, Martín-Noya A, Parody-Ruiz-Berdejo R, Rodríguez-Fernández JM. Chronic lymphocytic leukemia with two cellular populations: a biphenotypic or biclonal disease. *Ann Hematol.* 1997;74(5):243-6.
75. Hsi ED, Hoeltge G, Tubbs RR. Biclonal chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol.* 2000;113(6):798-804
76. Chang H, Cerny J. Molecular characterization of chronic lymphocytic leukemia with two distinct cell populations: evidence for separate clonal origins. *Am J Clin Pathol.* 2006;126(1):23-8.
77. Acker C, Staal A, Aumont C, Didion J, Dorvaux V, Rio Y, et al. [Biclonal or biphenotypic chronic lymphocytic leukemia? An answer brought by the treatment]. *Ann Biol Clin (Paris).* 2011;69(3):325-30.

78. Plevova K, Francova HS, Burckova K, et al. Multiple productive immunoglobulin heavy chain gene rearrangements in chronic lymphocytic leukemia are mostly derived from independent clones. *Haematologica* 2014; 99: 329–338.
79. Kriangkum J, Motz SN, Mack T, Beiggi S, Baigorri E, Kuppusamy H et al. Single-cell analysis and next-generation immuno-sequencing show that multiple clones persist in patients with chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One* 2015; 10: e0137232.
80. Mimmi S, Vecchio E, Iaccino E, Rossi M, Lupia A, Albano F et al. Evidence of shared epitopic reactivity among independent B-cell clones in chronic lymphocytic leukemia patients. *Leukemia* 2016; 30: 2419–2422.
81. Visco C, Moretta F, Falisi E, Facco M, Maura F, Novella E, et al. Double productive immunoglobulin sequence rearrangements in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol.* 2013;88(4):277-82.
82. Stamatopoulos B, Timbs A, Bruce D, Smith T, Clifford R, Robbe P et al. Targeted deep sequencing reveals clinically relevant subclonal IgHV rearrangements in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2017; 31: 837–845.
83. Rossi D, Khiabani H, Spina V, Ciardullo C, Brusca A, Fama R, et al. Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2014; 123(14):2139–47.
84. Brazdilova K., Plevova K., Skuhrova Francova H, et. al. Multiple productive IGH rearrangements denote oligoclonality even in immunophenotypically monoclonal CLL. *Leukemia* 2018; 32:234–236.
85. Hallek M, Cheson B, Catovsky D, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood* (2018) 131 (25): 2745–2760.
86. Agathangelidis A., Chatzidimitriou A., Chatzikonstantinou T. et al. Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: the 2022 update of the recommendations by ERIC, the European Research Initiative on CLL. *Leukemia.* 2022 Aug;36(8):1961-1968.
87. 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.
88. Rossi D., Spina V., Cerri., et al. Stereotyped B-cell receptor is an independent risk factor of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Clin Cancer Res*. 2009 Jul 1;15(13):4415-22.
 89. Bai et al. Molecular detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *British J. of Heamatology*. 2018 Apr;181(1):11-26
 90. Rigoutsos I, Floratos A. Combinatorial pattern discovery in biological sequences: The TEIRESIAS algorithm. *Bioinformatics*. 1998;14(1):55-67.