ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ: Βασικών Επιστημών
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: Βιολογίας
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Καθ. Ν.Βαμβακόπουλος

ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΑΔΙΑΤΑΞΕΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ
κ- ΕΛΑΦΡΙΑΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ ΚΑΙ
ΠΟΛΛΑΠΛΟΥΝ ΜΥΕΛΩΜΑ

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΧΑΤΖΗΔΗΜΗΤΡΙΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ
2006

994 19

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 7742/1
Ημερ. Εισ.: 14-11-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
616.994 19
ΧΑΤ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

004000083795

✓

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ: Βασικών Επιστημών
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: Βιολογίας
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Καθ. Ν.Βαμβακόπουλος**

**ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΑΔΙΑΤΑΞΕΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ
κ- ΕΛΑΦΡΙΑΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ
ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ ΚΑΙ
ΠΟΛΛΑΠΛΟΥΝ ΜΥΕΛΩΜΑ**

**ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΧΑΤΖΗΔΗΜΗΤΡΙΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ
2006**

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Κόλλια Π., Επικ. Καθηγήτρια Βιολογίας

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κόλλια Π., Επικ. Καθηγήτρια Βιολογίας

Σταθάκης Ν., Καθηγητής Παθολογίας

Τσέζου Α., Επικ. Καθηγήτρια Γενετικής

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Βαμβακόπουλος Ν., Καθηγητής Βιολογίας

Κόλλια Π., Επικ. Καθηγήτρια Βιολογίας

Κουκούλης Γ., Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής

Κυριάκου Δ., Επικ. Καθηγήτρια Ιατρικών Μεταγγίσεων

Παπανδρέου Χ., Επικ. Καθηγητής Ογκολογίας

Σταθάκης Ν., Καθηγητής Παθολογίας

Τσέζου Α., Επικ. Καθηγήτρια Γενετικής

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1.1 ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΕΣ: ΔΟΜΗ-ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	11
1.2 ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ	17
1.3 Ο ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΤΟΠΟΣ ΤΗΣ κ ΕΛΑΦΡΙΑΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ	19
1.4 ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ V(D)J	21
1.4.1 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ V(D)J	21
1.4.2 ΕΝΖΥΜΑ ΤΟΥ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ	25
1.5. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	27
1.5.1 ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΗ ΑΠΟ ΤΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ ΦΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ	27
1.5.2 ΔΙΑΣΩΣΗ ΑΥΤΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ	32
Α. ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ IGHV	32
Β. ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΗ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΣΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΩΝ ΕΛΑΦΡΙΩΝ ΑΛΥΣΙΔΩΝ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ	33
1.5.3 ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ ΦΑΣΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	34
Α. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΥΠΕΡΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ	37
Β. ΜΕΤΑΣΤΡΟΦΗ ΙΣΟΤΥΠΟΥ	38
1.5.4 ΑΝΟΣΕΣ ΑΠΑΝΤΗΣΕΙΣ ΤΩΝ Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΕΣ ΑΠΟ ΤΑ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	39
1.6 ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	41
1.6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	41
1.6.2 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΛΕΥΧΑΙΜΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗ Β-ΧΛΛ	42
1.6.3 ΜΕΤΑΒΙΒΑΣΗ ΣΗΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ Β ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΣΤΑ ΛΕΥΧΑΙΜΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ	43
1.6.4 ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	44
1.7. ΠΟΛΛΑΠΛΟΥΝ ΜΥΕΛΩΜΑ	45
1.7.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	45
1.7.2 ΑΝΟΣΟΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΟΥ ΜΥΕΛΩΜΑΤΟΣ	46
ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	49
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	53
2.1 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ	53
2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA	53
2.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA	53
2.4 ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA	53
2.5 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΑΔΙΑΤΑΞΕΩΝ IGKV-J, IGKV-KDE ΚΑΙ IGKJ-C-INTRON-KDE ΣΤΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΤΟΠΟ IGK	55
2.6 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR	59
2.7 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR	59
2.8 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΑ ΑΝΑΔΙΑΤΑΓΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΛΗΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ	59
2.9 ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ	60
2.9.1 ΟΙ ΑΡΧΕΣ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ ΚΑΙ ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ	60
ΟΜΑΔΑ ΜΕΛΕΤΗΣ	61

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	65
3.1 ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΥΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	65
3.1.1 Αναδιατάξεις IGKV-J	65
3.1.2 Σύγκριση των αλληλουχιών με τις δημόσιες βάσεις δεδομένων	71
3.1.3 Αναδιατάξεις της αλληλουχίας KDE	75
3.1.4 Πολλαπλές αναδιατάξεις του γενετικού τόπου IGK	78
3.1.5 Ανάλυση σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης	79
3.2 ΠΟΛΛΑΠΛΟΥΝ ΜΥΕΛΩΜΑ	80
3.2.1 Αναδιατάξεις IGKV-J	80
3.2.2 Αναδιατάξεις της αλληλουχίας KDE	85
3.2.3 Πολλαπλές αναδιατάξεις του γενετικού τόπου IGK	85
3.2.4 Ανάλυση σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης	86
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	89
4.1 ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	89
4.2 ΠΟΛΛΑΠΛΟΥΝ ΜΥΕΛΩΜΑ	100
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	105
1. ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	105
2. ΠΟΛΛΑΠΛΟΥΝ ΜΥΕΛΩΜΑ	106
SUMMARY	108
1. CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA	108
2. MULTIPLE MYELOMA	109
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	113

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι αναδιατάξεις στους γενετικούς τόπους των ελαφριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών (IGK, IGL) ρυθμίζονται σύμφωνα με το μοντέλο του αποκλεισμού αλληλομόρφου (allelic exclusion). Οι αναδιατάξεις έχουν «ιεραρχικό» χαρακτήρα: πρώτα αναδιατάσσεται ο γενετικός τόπος της κ-ελαφριάς αλυσίδας (IGK) και μόνο εάν αποτύχει η αναδιάταξη και στα δύο αλληλόμορφα IGK, ακολουθεί ανασυνδυασμός του γενετικού τόπου της λ-ελαφριάς αλυσίδας (IGL). Η ιδιαίτερη μοριακή δομή του γενετικού τόπου IGK ευνοεί αντιδράσεις αντικατάστασης με δευτερογενείς αναδιατάξεις. Η ανάλυση των δευτερογενών αναδιατάξεων προσφέρει ενδείξεις για τη λειτουργία των μοριακών μηχανισμών και των δυνάμεων επιλογής που διαμορφώνουν το εκφραζόμενο ρεπερτόριο των Β λεμφοκυττάρων.

Τα νεοπλασματικά Β λεμφοκύτταρα μπορεί να θεωρηθούν ως ένα μοντέλο “in vivo μεμονωμένου κυττάρου” (“in vivo single-cell model”). Έτσι, προσφέρονται για την ανάλυση των μηχανισμών αναδιάταξης και έκφρασης των ελαφριών αλυσίδων. Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν οι παραγωγικές και μη παραγωγικές αναδιατάξεις του γενετικού τόπου IGK (IGKV-J, IGKV-KDE και IGKJ-C-INTRON-KDE) σε μια ομάδα 291 ασθενών με ΧΛΛ. Ακολούθησε σύγκριση των ρεπερτορίων των γονιδίων σε ασθενείς που εκφράζουν κ ή λ κλωνοτυπική αλυσίδα. Επιπλέον, μελετήθηκαν οι παραγωγικές και μη παραγωγικές αναδιατάξεις του γενετικού τόπου IGK σε 101 ασθενείς με Πολλαπλούν Μυέλωμα (ΠΜ). Το ΠΜ επιλέχθηκε προς αντιπαράβολή με την ΧΛΛ για δύο λόγους: (i) προέρχεται από νεοπλασματική εξαλλαγή κυττάρων τα οποία έχουν περάσει από το βλαστικό κέντρο (postgerminal center cell) (ii) αντίθετα από τη ΧΛΛ δεν συσχετίζεται με αυτοαντιδραστικότητα ούτε έχει συνδεθεί με αυτοάνοσες εκδηλώσεις.

Σκοπός της μελέτης ήταν να διερευνηθεί ο ρόλος των πολλαπλών αναδιατάξεων του γενετικού τόπου IGK στη διαμόρφωση του εκφραζόμενου ρεπερτορίου στην ΧΛΛ και στο ΠΜ και να εντοπιστούν πιθανές διαφορές μεταξύ περιπτώσεων με κλωνοτυπική κ ή λ ελαφριά αλυσίδα. Επιπλέον, αναζητήθηκαν τα αίτια για τα οποία απέτυχαν να εκφραστούν οι λειτουργικές πρωτογενείς αναδιατάξεις IGKV-J. Οι αλληλουχίες IGKV-J της ομάδας συγκρίθηκαν με όλες τις αλληλουχίες IGKV-J που ανασύρθηκαν από τη βάση δεδομένων IMGT/IGM-DB με σκοπό την αναγνώριση ομόλογων αλληλουχιών και την αναζήτηση ενδείξεων αναγνώρισης συγκεκριμένων αντιγόνων. Τέλος, αναζητήθηκαν ενδείξεις για την οντογενετική προέλευση του νεοπλασματικού κλώνου.

Η μελέτη χωρίζεται σε δύο μέρη:

Στο γενικό μέρος αναφέρονται στοιχεία σχετικά με: (i) τους μηχανισμούς αναδιάταξης στους γενετικούς τόπους των ανοσοσφαιρινών (ii) τα αίτια και τη λειτουργική σημασία των πολλαπλών αναδιατάξεων του γενετικού τόπου IGK (iii) την προέλευση του νεοπλασματικού λεμφοκυττάρου και την παθογένεια της ΧΛΛ και του ΠΜ.

Στο ειδικό μέρος περιγράφονται ο σκοπός, το υλικό και οι μέθοδοι και τα αποτελέσματα της έρευνας. Ακολουθεί συζήτηση των ευρημάτων και συσχέτιση τους με τα βιβλιογραφικά δεδομένα και η περίληψη με τα κύρια ευρήματα και συμπεράσματα της εργασίας.

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την καθοδήγηση της κας. Παναγούλας Κόλλια, Επίκουρης Καθηγήτριας Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ευχαριστώ θερμά την κα. Κόλλια για την πολύπλευρη συμπαράσταση που μου παρείχε σε όλες τις φάσεις εκπόνησης της διατριβής. Εκφράζω ιδιαίτερες ευχαριστίες στον κ. Νικόλαο Σταθάκη, Καθηγητή Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, και στην κα. Ασπασία Τσέζου, Επικ. Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής του ίδιου Τμήματος, για την καθοδήγηση και την υποστήριξή τους ως μέλη της τριμελούς επιτροπής της διδακτορικής διατριβής.

Η συλλογή και ο χαρακτηρισμός των δειγμάτων της μελέτης, πραγματοποιήθηκε στην Αιματολογική Κλινική και Μονάδα Μεταμόσχευσης Αιμοποιητικών Κυττάρων του ΠΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου» που διευθύνουν οι κύριοι Αθανάσιος Φάσσας και Αχιλλέας Αναγνωστόπουλος, και στο Αιματολογικό Τμήμα του ΠΓΝ Νίκαιας «Ο Άγιος Παντελεήμων» που διευθύνει ο κ. Νικόλαος Λαουτάρης. Επιθυμώ να εκφράσω θερμές ευχαριστίες στους διευθυντές των δύο Τμημάτων για τη δυνατότητα που μου προσέφεραν και την υποστήριξη που παρείχαν στην εκπόνηση της παρούσας μελέτης.

Η παρούσα διατριβή ολοκληρώθηκε χάρη στην πολύτιμη συνδρομή των φίλων συνεργατών μου:

- ο κ. Κώστας Σταματούπουλος, Αιματολόγος, Επιμελητής στην Αιματολογική Κλινική και Μονάδα Μεταμόσχευσης Αιμοποιητικών Κυττάρων του ΠΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», με καθοδήγησε στα πρώτα βήματά μου, παρακολούθησε ενεργά όλες τις φάσεις εκπόνησης της διατριβής μου και μοιράστηκε μαζί μου τις σκέψεις και τις ιδέες του.

- η κα. Χρυσούλα Μπέλεση, Βιοπαθολόγος, Αναπληρώτρια Διευθύντρια στο Αιματολογικό Τμήμα του ΠΓΝ Νίκαιας «Ο Άγιος Παντελεήμων», με τον ορθολογισμό και τη μεγάλη εργαστηριακή εμπειρία της συνέβαλε ουσιαστικά στον σχεδιασμό της μελέτης.
- ο κ. Ιωάννης Ζορμπάς, Βιολόγος στην Αιματολογική Κλινική και Μονάδα Μεταμόσχευσης Αιμοποιητικών Κυττάρων του ΠΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», με στήριξε καθόλη την εκπόνηση της διατριβής μου και μου έμαθε πολλά τεχνικά “μυστικά”.
- οι κυρίες Μαρία Σαμαρά και Μαρία Σάτρα, Βιολόγοι στο Εργαστήριο Βιολογίας και Γενετικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με βοήθησαν ουσιαστικά και ανέχθηκαν αδιαμαρτύρητα τις απαιτήσεις μου.
- οι κυρίες Tatjana Smilevska και Βασιλική Δούκα εργάστηκαν μαζί μου από την έναρξη μέχρι και την ολοκλήρωση της μελέτης, σχολίασαν κριτικά, ενίσχυσαν και συμπλήρωσαν τις προσπάθειές μου.
- οι κυρίες Έφη Κωσταρέλη και Κατερίνα Χατζή βοήθησαν ουσιαστικά στη συλλογή και επεξεργασία των δειγμάτων, προσέφεραν τις γνώσεις τους στην πληροφορική και συνέβαλαν στη μορφοποίηση του κειμένου.

Λάρισα, Ιούλιος 2006

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΕΣ: ΔΟΜΗ-ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Οι μηχανισμοί της ειδικής ανοσίας και πιο συγκεκριμένα η χυμική ανοσία περιλαμβάνει τα Β κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος με τα ειδικά μόρια που παράγουν, τις ανοσοσφαιρίνες ή αντισώματα. Οι ανοσοσφαιρίνες μπορεί να θεωρηθούν ως προϊόντα ενός πρωτεϊνοσυνθετικού μηχανισμού με προορισμό τη δημιουργία ενός ουσιαστικά απεριόριστου ρεπερτορίου συμπληρωματικών μοριακών επιφανειών. Αναγνωρίζουν τα αντιγόνα και προσδένονται σε μια ειδική περιοχή τους, τον επίτοπο ή αντιγονικό καθοριστή. Κάθε ανοσοσφαιρίνη αναγνωρίζει και προσδένεται σ' έναν μόνον, ειδικό γι' αυτήν επίτοπο. Η τεράστια δομική ετερογένεια των ανοσοσφαιρινών είναι απαραίτητη για την αναγνώριση των πολυάριθμων αντιγονικών καθοριστών που υπάρχουν στη φύση.

Καθημερινά στον ανθρώπινο οργανισμό παράγονται 10^7 νέα Β κύτταρα, που παράγουν έναν μόνο τύπο υποδοχέα-ανοσοσφαιρίνης με μια και μοναδική αντιγονική ειδικότητα. Το συνολικό ρεπερτόριο των αντιγονικών ειδικοτήτων είναι περίπου 10^9 , ενώ ο συνολικός αριθμός των Β κυττάρων σ' έναν ενήλικο άνθρωπο είναι περίπου $10^{11(1)}$.

Τα διαφοροποιημένα δραστικά κύτταρα που προέρχονται από ένα ενεργοποιημένο λεμφοκύτταρο παράγουν υποδοχείς πανομοιότυπης ειδικότητας με αυτήν του κυττάρου από το οποίο προήλθαν. Για την παραγωγή επαρκούς αριθμού ειδικών δραστικών λεμφοκυττάρων, και επομένως αντισωμάτων, πρέπει να προηγηθεί πολλαπλασιασμός του ενεργοποιημένου λεμφοκυττάρου (κλωνική έκπτυξη, clonal expansion). Η καθυστέρηση που παρατηρείται χαρακτηρίζει μόνο την πρώτη ή πρωτογενή ανοσοποίηση, ενώ η δεύτερη ή δευτερογενής ανοσοποίηση με το ίδιο αντιγόνο εμφανίζει μικρότερη περίοδο αναμονής, υψηλότερο και πιο παρατεταμένο επίπεδο μέγιστης απόκρισης. Αυτό οφείλεται στην ιδιότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να δημιουργεί ένα είδος άνοσης μνήμης για την αμεσότερη απάντηση σε περίπτωση δευτερογενούς ανοσοποίησης. Η ειδική ανοσία προϋποθέτει επίσης πως τα λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν ως «ξένα» συστατικά μόνο τα παθογόνα (διάκριση μεταξύ «ξένου» / «εαυτού»). Έτσι, τα λεμφοκύτταρα που έχουν υποδοχείς ειδικούς για αυτόλογα μόρια εξαλείφονται σ' ένα πρώιμο στάδιο λεμφικής ανάπτυξης και συνεπώς απουσιάζουν από το ρεπερτόριο των ώριμων λεμφοκυττάρων. Κατά

συνέπεια, οι αρχές που διέπουν την ειδική ανοσία είναι η αυστηρή ειδικότητα, η ποικιλότητα, η άνοση μνήμη και η αυτοανοχή (self-tolerance).

Τα μόρια των αντισωμάτων έχουν διττή λειτουργία. Επάγουν την άνοση απάντηση, αφού συνδεθούν ειδικά με το αντιγόνο, και επιστρατεύουν άλλα μόρια και κύτταρα με σκοπό την καταστροφή του παθογόνου μετά την πρόσδεσή του σε αυτό. Οι δύο αυτές λειτουργίες επιτελούνται από διαφορετικές περιοχές του αντισώματος: ένα τμήμα αναγνωρίζει ειδικά το αντιγόνο, ενώ το υπόλοιπο εξασφαλίζει τους δραστικούς μηχανισμούς που θα το εξουδετερώσουν.

Οι ανοσοσφαιρίνες χαρακτηρίζονται από μια βασική δομή που αποτελείται από δύο όμοιες βαριές αλυσίδες (H), μοριακού βάρους (M.B.) 50-70 kDa, και δύο επίσης όμοιες ελαφριές αλυσίδες (L) με M.B. 25 kDa⁽²⁾. Οι δύο βαριές αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφυδρικούς δεσμούς και κάθε μια τους συνδέεται με μια ελαφριά αλυσίδα με έναν δισουλφυδρικό δεσμό⁽³⁾. Σε κάθε μόριο ανοσοσφαιρίνης οι δύο βαριές και οι δύο ελαφριές αλυσίδες είναι όμοιες, έτσι ώστε το μόριο να εμφανίζει δίπτυχο άξονα συμμετρίας (Εικόνα 1.1).

Εικόνα 1.1 Δομή του μορίου της ανοσοσφαιρίνης. Τροποποιημένο από IMGT Web Resources.

Η περιοχή του αντισώματος που συνδέεται με το αντιγόνο ποικίλει σημαντικά μεταξύ των αντισωμάτων και για το λόγο αυτό είναι γνωστή ως μεταβλητή περιοχή (variable region) ή περιοχή V. Η μεταβλητότητα αυτή επιτρέπει σε κάθε μόριο να αναγνωρίζει ένα συγκεκριμένο αντιγόνο. Αντίθετα, η περιοχή που ευθύνεται για την ενεργοποίηση

των μηχανισμών ανοσίας δεν εμφανίζει την ίδια ποικιλομορφία και ονομάζεται σταθερή περιοχή (constant region) ή περιοχή C.

Υπάρχουν μόνο δύο τύποι ελαφριάς αλυσίδας, οι οποίοι ορίζονται ως αλυσίδες κάππα (κ) και λάμδα (λ). Δεν έχει αναγνωριστεί καμία διαφορά στη λειτουργία μεταξύ των αντισωμάτων με κ ελαφριές και λ ελαφριές αλυσίδες. Η αναλογία των δύο τύπων ελαφριάς αλυσίδας διαφέρει σε κάθε είδος. Στον άνθρωπο, η αναλογία αλυσίδων κ προς λ είναι περίπου 2:1. Αντίθετα, υπάρχουν πέντε κύριες τάξεις ή ισότυποι βαριών αλυσίδων: IgM, IgD, IgG, IgA και IgE (Εικόνα 1.2). Καθένας από αυτούς τους ισότυπους έχει μια ιδιαίτερη βαριά αλυσίδα (μ, δ, γ, α και ε, αντίστοιχα) και συγκεκριμένη λειτουργία στις άνοσες απαντήσεις⁽⁴⁾. Οι ανοσοσφαιρίνες του ανθρώπου IgG και IgA διακρίνονται σε τέσσερις (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) και δύο (IgA1, IgA2) υποομάδες αντιστοίχως, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά των βαριών αλυσίδων τους (γ1, γ2, γ3, γ4/ α1, α2).

Εικόνα 1.2 Ισότυποι των βαριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών (IgA, IgE, IgD, IgM, IgG). Τροποποιημένο από Kuby Immunology, 4^η έκδοση.

Οι αλληλουχίες αμινοξέων πολλών βαριών και ελαφριών αλυσίδων έχουν καθοριστεί και δείχνουν ότι κάθε αλυσίδα περιέχει αλληλουχίες μήκους περίπου 100 αμινοξέων η καθεμία. Οι ελαφριές αλυσίδες έχουν δύο κύριες περιοχές, ενώ τέσσερις ή πέντε περιοχές (ανάλογα με τον ισότυπο) σχηματίζονται σε κάθε βαριά αλυσίδα⁽⁵⁾. Οι ομοιότητες που παρατηρούνται στην αλληλουχία των αμινοξέων τους υποδηλώνουν ότι οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών έχουν εξελιχθεί μέσω επαναλαμβανόμενων αντιγραφών ενός προγονικού γονιδίου, που αντιστοιχούσε σε μια περιοχή⁽⁶⁾. Η αμινοτελική (N-τελική) περιοχή των ελαφριών και βαριών αλυσίδων

είναι η μεταβλητή περιοχή (V). Οι καρβοξυτελικές (C-τελικές) περιοχές είναι σταθερές τόσο μεταξύ των βαριών όσο και των ελαφριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών του ίδιου τύπου (περιοχές C).

Από τη σύγκριση της αλληλουχίας των μεταβλητών περιοχών πολλών διαφορετικών αντισωμάτων αναγνωρίστηκαν τρεις περιοχές ιδιαίτερης μεταβλητότητας που ορίζονται αδρά από τα αμινοξέα 28-35, 57-65 και 105-118. Οι περιοχές αυτές ορίζονται ως υπερμεταβλητές (hypervariable regions) και συμβολίζονται ως HV1, HV2 και HV3. Το πιο μεταβλητό μέρος της περιοχής V βρίσκεται στην περιοχή HV3. Τα τμήματα μεταξύ των υπερμεταβλητών περιοχών, που είναι λιγότερο μεταβλητά, ορίζονται ως περιοχές πλαισίου (framework regions, FRs) και συμβολίζονται ως FR1, FR2, FR3 και FR4. Οι περιοχές πλαισίου σχηματίζουν το δομικό πλαίσιο της περιοχής με τις υπερμεταβλητές αλληλουχίες. Οι υπερμεταβλητές περιοχές αντιστοιχούν σε τρεις θηλιές (loops), στο άκρο κάθε β-φύλλου, που βρίσκονται κοντά όταν η πρωτεΐνη είναι διπλωμένη και σχηματίζουν το σημείο πρόσδεσης του αντιγόνου (Εικόνα 1.3).

Εικόνα 1.3 Οι υπερμεταβλητές περιοχές που αντιστοιχούν σε τρεις θηλιές (loops), στο άκρο κάθε β-φύλλου και σχηματίζουν το σημείο πρόσδεσης του αντιγόνου. Τροποποιημένο από IMGT Web Resources.

Κατ' αυτόν τον τρόπο οι υπερμεταβλητές περιοχές καθορίζουν την εξειδίκευση του αντισώματος και για το λόγο αυτό ονομάζονται περιοχές καθορισμού της συμπληρωματικότητας (complementarity determining regions, CDRs: CDR1, CDR2 και CDR3) (Εικόνα 1.4). Η συμμετοχή και των δύο αλυσίδων στη διαμόρφωση της αντιγονικής ειδικότητας συμβάλλει στην ετερογένειά τους που ονομάζεται συνδυαστική ετερογένεια (combinatorial diversity)⁽⁷⁾.

Εικόνα 1.4. Οι περιοχές καθορισμού της συμπληρωματικότητας (CDRs) καθορίζουν την εξειδίκευση του αντισώματος.

Στον άνθρωπο, όλες οι ανοσοσφαιρίνες είναι γλυκοζυλιωμένες. Οι ανοσοσφαιρίνες IgG, IgD και IgE εκκρίνονται ως μονομερή, ενώ τα μόρια των IgM και IgA μπορούν να σχηματίσουν πολυμερή. Τα μόρια IgM διασυνδέονται μεταξύ τους και με μια πολυπεπτιδική αλυσίδα 15 kDa που ονομάζεται αλυσίδα J για το σχηματισμό μιας πενταμερούς δομής. Το μόριο IgA συνήθως υπάρχει ως μονομερές στον ορό και ως διμερές στις εκκρίσεις, επίσης ενωμένο με μια αλυσίδα J. Εδώ, τα μονομερή συνδέονται με δισουλφυδρικούς δεσμούς με την αλυσίδα J και όχι μεταξύ τους. Η βιολογική δράση των εκκρινόμενων ανοσοσφαιρινών συνοψίζεται ανά τάξη ως εξής:

IgM: Αποτελούν περίπου το 10% των ολικών ανοσοσφαιρινών του ορού στον άνθρωπο και είναι τα αντισώματα που παράγονται νωρίς κατά την άνοση απάντηση. Έχουν πενταμερή δομή και μεγάλο μοριακό βάρος (Εικόνα 1.5), γι' αυτό και περιορίζονται στον ενδοαγγειακό χώρο.

Εικόνα 1.5 Η πενταμερής δομή της ανοσοσφαιρίνης IgM. Τροποποιημένο από Kuby Immunology, 4^η έκδοση.

IgD: Αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 1% των ολικών ανοσοσφαιρινών του ορού. Διαθέτουν μια μακρά και εκτεταμένη περιοχή άρθρωσης 58 αμινοξέων. Το C-τελικό μισό της άρθρωσης είναι πλούσιο σε φορτισμένα αμινοξέα και για το λόγο αυτό είναι πολύ ευαίσθητο σε πρωτεολυτική δράση. Το γεγονός αυτό καθιστά την IgD του ορού πολύ ασταθή.

IgG: Είναι η κύρια τάξη ανοσοσφαιρίνης στον ορό του αίματος των υγιών ανθρώπων και αποτελεί περίπου το 70% του συνόλου των ανοσοσφαιρινών. Κυριαρχεί στις δευτερογενείς άνοσες απαντήσεις. Υπάρχουν τέσσερις υποομάδες ανοσοσφαιρινών IgG.

IgA: Υπό μορφή μονομερούς στον ορό, αποτελεί το 15-20% των ανοσοσφαιρινών. Η IgA είναι η κυρίαρχη τάξη στις εκκρίσεις, όπου βρίσκεται υπό μορφή διμερούς (Εικόνα 1.6) γνωστού ως εκκρινόμενη IgA (sIgA). Υπάρχουν δύο υποομάδες IgA: η IgA1 και η IgA2. Η IgA1 κυριαρχεί στον ορό, ενώ, αντίθετα στις εκκρίσεις η αναλογία IgA1 προς IgA2 είναι περίπου 1:1.

Εικόνα 1.6 Το διμερές της εκκρινόμενης ανοσοσφαιρίνης IgA. Τροποποιημένο από Kuby Immunology, 4^η έκδοση.

IgE: Η IgE εντοπίζεται σε πολύ μικρές ποσότητες στον ορό. Συμμετέχει στην προστασία εναντίον παρασίτων και συνήθως σχετίζεται με τις αλλεργικές αντιδράσεις. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα μετά την πρόσδεση με το πολυδύναμο αντιγόνο οδηγεί σε λύση των κοκκίων των κυττάρων και απελευθέρωση δραστικών ουσιών που συμμετέχουν στην αλλεργική απάντηση⁽⁸⁾.

1.2 ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Η σύγχρονη έρευνα και η κλωνοποίηση πολλών γονιδίων ανοσοσφαιρινών απέδειξε ότι το τεράστιο ρεπερτόριο των αντισωμάτων δημιουργείται από μεγάλο αριθμό γονιδίων τα οποία υφίστανται ανασυνδυασμό.

Στον άνθρωπο, οι πολυγονιδιακές οικογένειες που κωδικοποιούν τις βαριές αλυσίδες, τις κ ελαφριές και τις λ ελαφριές αλυσίδες εντοπίζονται στους γενετικούς τόπους IGH, IGK και IGL των χρωμοσωμάτων 14 (14q32.33), 2 (2p11.2) και 22 (22q11.2), αντιστοίχως (Εικόνες 1.7-1.9).

Εικόνα 1.7. Γενετικός τόπος της βαριάς αλυσίδας (IGH). Από IMGT Web Resources.

Εικόνα 1.8. Γενετικός τόπος της κ ελαφριάς αλυσίδας (IGK). Από IMGT Web Resources.

Εικόνα 1.9. Γενετικός τόπος της λ ελαφριάς αλυσίδας (IGL). Από IMGT Web Resources.

Οι γενετικοί τόποι IGK και IGL περιλαμβάνουν γονίδια L (Leader:Οδηγό), V (Variable: Μεταβλητό), J (Junctional: Συνδετικό) και C (Constant: Σταθερό). Οι μεταβλητές περιοχές των ελαφριών αλυσίδων σχηματίζονται από τη συμβολή των γονιδίων V και J. Το τμήμα V κωδικοποιεί τα πρώτα 104-111 αμινοξέα της αλυσίδας, ενώ το J κωδικοποιεί τα επόμενα 13 αμινοξέα της περιοχής. Η σταθερή περιοχή της αλυσίδας κωδικοποιείται από τα γονίδια C. Ο γενετικός τόπος της βαριάς αλυσίδας περιλαμβάνει επιπλέον τα γονίδια D (Diversity: Ποικιλότητα) ανάμεσα στα γονίδια V και J. Η μικρή αλληλουχία-οδηγός (L) πριν από κάθε γονίδιο V κατευθύνει τις συνπιθέμενες βαριές και ελαφριές αλυσίδες στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η αλληλουχία αυτή αφαιρείται από την αλυσίδα κατά την τελική επεξεργασία. Κάθε γονίδιο V διαχωρίζεται από το επόμενο με ένα ιντρόνιο. Η ίδια διάταξη υπάρχει και στους γενετικούς τόπους των ελαφριών αλυσίδων (Εικόνα 1.10)⁽²⁾.

Εικόνα 1.10 Η διάταξη των γονιδίων στους γενετικούς τόπους IGH, IGK, IGL.

Πολλά από τα γονίδια εκφράζονται, ενώ άλλα είναι ψευδογονίδια. Στον πίνακα φαίνεται ο αριθμός των λειτουργικών γονιδίων στον άνθρωπο.

Γονίδιο	Ελαφριές αλυσίδες		Βαριά αλυσίδα
	κ	λ	Η
Μεταβλητό (V)	30-35	29-33	38-46
Ποικιλότητας (D)	0	0	23
Συνδετικό (J)	5	4-5	6
Σταθερό (C)	1	4-5	9

Τα γονίδια των ανοσοσφαιρινών εκφράζονται μόνο στα Β κύτταρα και με διαφορετικό ρυθμό στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης των κυττάρων. Στους γενετικούς τόπους των ανοσοσφαιρινών υπάρχουν τρεις τύποι cis-ρυθμιστικών στοιχείων:

Υποκινητές (promoters): Μικρές αλληλουχίες ~200bp στο 5' άκρο του γονιδίου που προωθούν την έναρξη της μεταγραφής προς μια ορισμένη κατεύθυνση.

Ενισχυτές (enhancers): Αλληλουχίες σε μικρή απόσταση από το 5' ή 3' άκρο του γονιδίου που ενεργοποιούν τη μεταγραφή από την αλληλουχία του εκκινήτη ανεξάρτητα από την κατεύθυνση⁽⁹⁾.

Αποσιωπητές (silencers): Περιορίζουν τη μεταγραφή από απόσταση, λειτουργώντας και προς τις δύο κατευθύνσεις.

1.3 Ο ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΤΟΠΟΣ ΤΗΣ κ ΕΛΑΦΡΙΑΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Η δομή του γενετικού τόπου της κ ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών (IGK) διαμορφώνεται από εκτεταμένες περιοχές γονιδίων IGKV και μια περιοχή IGKJ-IGKC. Στον άνθρωπο, ο γενετικός τόπος IGK εντοπίζεται στη χρωμοσωμική ζώνη 2p11.2. Περιλαμβάνει 76 γονίδια IGKV που κατατάσσονται σε 7 διαφορετικές υποομάδες, 5 γονίδια IGKJ και ένα μοναδικό γονίδιο IGKC.

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του γενετικού τόπου IGK είναι ο διπλασιασμός του μεγαλύτερου τμήματος της περιοχής IGKV. Έτσι, τα γονίδια IGKV διαχωρίζονται σε δυο συμπλέγματα ή αθροίσματα (clusters), το «εγγύς» ή IGKJ-proximal και το «άπω» ή IGKJ-distal (σε σχέση με την περιοχή IGKJ-IGKC). Το πρώτο περιλαμβάνει 40 γονίδια IGKV και έχει μήκος 600kb, ενώ το δεύτερο περιλαμβάνει 36 γονίδια IGKV και έχει μήκος 440kb. Τα δύο αθροίσματα συνολικά περιέχουν 34 ζευγάρια γονιδίων με ομολογία αλληλουχίας 95-100%, ενώ υπάρχουν και 8 μοναδικά γονίδια. Επίσης τα

αθροίσματα έχουν αντίθετη πολικότητα 5'-3', δηλαδή είναι ανεστραμμένες επαναλήψεις. Το γεγονός αυτό προσδίδει στον γενετικό τόπο IGK συμμετρική δομή. Ένα τυπικό γονίδιο IGKV περιέχει ρυθμιστικές αλληλουχίες πριν από την κωδικοποιητική αλληλουχία, μια αλληλουχία οδηγό (leader sequence) στο 5' άκρο του, την κωδικοποιητική αλληλουχία και μια αλληλουχία-σήμα του ανασυνδυασμού (recombination signal sequence, RSS) στο 3' άκρο. Στα ρυθμιστικά στοιχεία εκτός από την αλληλουχία TATA (TATA box), συμπεριλαμβάνονται διατηρημένα δεκανουκλεοτίδια και δεκαπεντανουκλεοτίδια. Η αλληλουχία-σήμα του ανασυνδυασμού (RSS) στην 3' θέση κάθε IGKV γονιδίου αποτελείται από ένα 7μερές και ένα 9μερές που χωρίζονται από μια περιοχή (spacer) μήκους 12 bp. Σύμφωνα με τον κανόνα 12-23, ένα γενετικό τμήμα με spacer 12 bp μπορεί να συνδεθεί μόνο με ένα άλλο τμήμα που έχει RSS με spacer 23 bp. Έτσι, διασφαλίζεται η σύνδεση των τμημάτων IGKV μόνο με τα τμήματα IGKJ και όχι με τις σταθερές περιοχές IGKC ή μεταξύ τους.

Στο απλοειδές γονιδίωμα υπολογίζεται ότι υπάρχουν 31-35 λειτουργικά γονίδια IGKV που ανήκουν σε πέντε διαφορετικές υποομάδες. Δεν αναδιατάσσονται ούτε εκφράζονται όλα αυτά τα γονίδια, ενώ βρέθηκε πως αναδιατάσσονται και εκφράζονται αλληλόμορφα κάποιων ελαττωματικών γονιδίων.

Η 5'-3' πολικότητα των γονιδίων IGKV υποδεικνύει τον τύπο της αναδιάταξης. Όλα τα γονίδια IGKV της distal περιοχής και τα δύο γονίδια της proximal περιοχής που βρίσκονται πλησιέστερα προς τα τμήματα IGKJ ανασυνδυάζονται με αναστροφή (inversion), επειδή έχουν αντίστροφη πολικότητα σε σχέση με τα γονίδια IGKJ-IGKC. Αντίθετα, όλα τα υπόλοιπα γονίδια IGKV ανασυνδυάζονται με απαλοιφή (deletion) του DNA που παρεμβάλλεται ανάμεσα στα γονίδια IGKV και IGKJ.

Περίπου 24 kb από το 3' του γονιδίου IGKC εντοπίζεται το στοιχείο διαγραφής κάππα ή KDE (kappa deleting element) (Εικόνα 1.11). Το KDE μπορεί ν' αναδιατάσσεται σύμφωνα με τον κανόνα 12-23: α) με ένα μη αναδιαταγμένο γονίδιο IGKV (IGKV/KDE) που βρίσκεται στο 5' άκρο μιας αναδιάταξης IGKV-J με αποτέλεσμα την απώλεια (ή σπανίως αναστροφή) της πιθανής αναδιάταξης που παρεμβάλλεται και του τμήματος IGKC όπως και των ενισχυτών και β) με το επταμερές της αλληλουχίας RSS στο ιντρόνιο IGKJ-IGKC (IGKJ-C-INTRON/KDE) με απώλεια των τμημάτων IGKJ-IGKC και των ενισχυτών, όμως μια πιθανή προϋπάρχουσα αναδιάταξη IGKV-J παραμένει στο χρωμόσωμα.

Εικόνα 1.11 Οι δύο τρόποι αναδιάταξης του στοιχείου διαγραφής κάππα (KDE).

Οι αναδιατάξεις του KDE φαίνεται ότι προκαλούν αδρανοποίηση του γενετικού τόπου IGK με αποτέλεσμα να είναι αδύνατη η παραγωγή κ ελαφριάς αλυσίδας. Για το λόγο αυτό, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι οι αναδιατάξεις του KDE «προετοιμάζουν το έδαφος» για την έκφραση της λ ελαφριάς αλυσίδας. Η ανάλυση των αναδιατάξεων των γονιδίων των ελαφριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών σε φυσιολογικά και νεοπλασματικά λεμφοκύτταρα με τη μέθοδο της εκτύπωσης κατά Southern (Southern blot) έδειξε ότι σε κύτταρα που εκφράζουν κ αλυσίδα ο γενετικός τόπος της λ ελαφριάς αλυσίδας σπάνια είναι αναδιαταγμένος, ενώ, αντίθετα, σε κύτταρα που εκφράζουν λ αλυσίδα οι γενετικοί τόποι IGK είναι συχνότατα αναδιαταγμένοι και απενεργοποιημένοι από αναδιατάξεις του KDE.

1.4 ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ V(D)J

1.4.1 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ V(D)J

Ο ανασυνδυασμός V(D)J πραγματοποιείται στο μυελό των οστών κατά την πρώιμη φάση της οντογένεσης των B λεμφοκυττάρων. Εξελίσσεται με ιεραρχική σειρά: πρώτα αναδιατάσσονται τα γονίδια των βαριών αλυσίδων και στη συνέχεια τα γονίδια των ελαφριών αλυσίδων (κ ή λ). Έτσι το αναπτυσσόμενο B λεμφοκύτταρο μπορεί να εκφράσει ένα πλήρως λειτουργικό αντιγονικό υποδοχέα (ανοσοσφαιρίνη)⁽¹⁰⁾ μέσω του οποίου μπορεί να μεταβιβάζει σήματα για την περαιτέρω ανάπτυξη και διαφοροποίησή του^(11,12).

Κάθε γονίδιο που μπορεί να αναδιαταχθεί έχει μια αλληλουχία σηματοδότησης του ανασυνδυασμού (RSS, recombination signal sequences)⁽¹³⁻¹⁵⁾. Οι RSS αποτελούνται από ένα καλά διατηρημένο παλίνδρομο επτανουκλεοτίδιο (heptamer) (5'-CACTGTG-3'), ένα καλά διατηρημένο εννεανουκλεοτίδιο (nonamer) (5'-ACAAAAACC-3'), πλούσιο σε A ή T και ανάμεσα τους μια διαστηματική αλληλουχία (spacer region) μήκους 12 ή 23 νουκλεοτιδίων (± 1 νουκλεοτίδιο) με διατηρημένο μήκος αλλά χωρίς συντηρημένη αλληλουχία (Εικόνα 1.12). Το μήκος της διαστηματικής αλληλουχίας παίζει σημαντικό ρόλο στην αντίδραση. Για να συμβεί αποτελεσματικός ανασυνδυασμός απαιτούνται δύο αλληλουχίες σηματοδότησης ανασυνδυασμού, μια με διαστηματική αλληλουχία 12- και μια με 23-br. Αυτός ο σχετικά απλός περιορισμός, ο «κανόνας 12/23» (Εικόνα 1.13), έχει σημαντικές βιολογικές συνέπειες. Πρώτον, όλα τα γονίδια ενός συγκεκριμένου είδους περιβάλλονται από έναν τύπο αλληλουχίας σηματοδότησης και όλα τα γονίδια με τα οποία θα μπορούσαν να αναδιαταχθούν φέρουν τον αντίθετο τύπο αλληλουχίας σηματοδότησης. Έτσι, διασφαλίζεται ότι ο ανασυνδυασμός οδηγεί σε λειτουργικό προϊόν.

Εικόνα 1.12 Η δομή των αλληλουχιών RSS που περιβάλλουν τα γονίδια των ανοσοσφαιρινών.

Εικόνα 1.13 Ο «κανόνας 12/23». Όλα τα γονίδια του ίδιου είδους περιβάλλονται από έναν τύπο αλληλουχίας σηματοδότησης και τα γονίδια με τα οποία αναδιατάσσονται φέρουν τον αντίθετο τύπο αλληλουχίας σηματοδότησης.

Για να σχηματιστεί ένα πλήρες γονίδιο της μεταβλητής περιοχής μιας ελαφριάς αλυσίδας (VL), ανασυνδυάζεται ένα μεταβλητό τμήμα (V) με ένα συνδετικό τμήμα (J). Κατά την αναδιάταξη VJ τα ανασυνδυαζόμενα γενετικά τμήματα μπορεί να έχουν τον ίδιο προσανατολισμό, οπότε συμβαίνει διαγραφή (deletion) του παρεμβαλλόμενου DNA (signal joint), ή αντίθετο προσανατολισμό, οπότε συμβαίνει αναστροφή (inversion) του παρεμβαλλόμενου DNA (Εικόνα 1.14).

Εικόνα 1.14 (α) Ανασυνδυασμός V-J με απαλοιφή του παρεμβαλλόμενου DNA. (β) Ανασυνδυασμός V-J με αναστροφή. Δεν παρατηρείται απαλοιφή DNA. Το παρεμβαλλόμενο κομμάτι αναστρέφεται. Τροποποιημένο από: Kuby, Immunology, 4^η έκδοση.

Συγκεκριμένα, για τη δημιουργία της μεταβλητής περιοχής της κ ελαφριάς αλυσίδας, αντιπαράτίθεται ένα από τα γονίδια IGKV με ένα από τα γονίδια IGKJ⁽¹⁶⁾. Ακολουθεί η μεταγραφή των ανασυνδυασμένων γενετικών τμημάτων και η απομάκρυνση (κατά τη συρραφή του RNA, RNA splicing) των αλληλουχιών που παρεμβάλλονται μεταξύ των τμημάτων IGKJ και IGKC, ώστε να σχηματιστεί ώριμο mRNA μιας συγκεκριμένης κ ελαφριάς αλυσίδας. Στην περίπτωση της λ ελαφριάς αλυσίδας, η προμεταγραφική διαδικασία του ανασυνδυασμού είναι παρόμοια, αλλά η οργάνωση των γονιδίων είναι λίγο διαφορετική: υπάρχουν λιγότερα τμήματα IGLV, ενώ κάθε τμήμα IGLV και IGLJ σχετίζεται με ένα διαφορετικό τμήμα IGLC.

Κατά την αναδιάταξη των γονιδίων της μεταβλητής περιοχής της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών, πρώτα ανασυνδυάζεται ένα τμήμα D (diversity) με ένα τμήμα J και στη συνέχεια ένα τμήμα V ανασυνδυάζεται με το σύμπλοκο DJ. Ακολουθεί μεταγραφή του γενετικού συμπλόκου IGHV(D)J, επεξεργασία και συρραφή του προ-mRNA (RNA splicing), μετάφραση του ώριμου mRNA στο κυταρόπλασμα και

μετασυνθετική τροποποίηση των αντίστοιχων πεπτιδίων (κυρίως με γλυκοζυλίωση στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στη συσκευή Golgi). Κάθε γονίδιο V φέρει στο 5' άκρο του ένα μικρό εξόνιο, την αλληλουχία-οδηγό (leader). Αυτό συνθέτει ένα μικρό πεπτίδιο-οδηγό ή πεπτίδιο-σήμα (signal ή leader L peptide). Το πεπτίδιο-οδηγός καθοδηγεί τη βαριά ή την ελαφριά αλυσίδα στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τελικά αφαιρείται από τις ελαφριές και βαριές αλυσίδες πριν από την πλήρη συναρμολόγηση της ανοσοσφαιρίνης.

1.4.2 ENZYMA ΤΟΥ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ

Ο ανασυνδυασμός ξεκινά με την αναγνώριση των RSS αλληλουχιών από τα ένζυμα RAG1 (Recombinase Activating Gene 1: γονίδιο ενεργοποίησης του ανασυνδυασμού τύπου 1) και RAG2 (Recombinase Activating Gene 2: γονίδιο ενεργοποίησης του ανασυνδυασμού τύπου 2)⁽¹⁷⁻¹⁸⁾. Τα ένζυμα αυτά σχηματίζουν ένα ετεροπολυμερές το οποίο αναγνωρίζει και κόβει ένα ζεύγος 12/23 RSS ακριβώς στη συμβολή του επτανουκλεοτιδίου και της κωδικοποιητικής αλληλουχίας (Εικόνα 1.15). Με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται τέσσερα άκρα DNA.

Οι πρωτεΐνες RAG1 και RAG2 είναι δραστικές μόνο σε πρόδρομα B και T λεμφοκύτταρα, όχι όμως στα ώριμα λεμφοκύτταρα. Γι' αυτό οι αναδιατάξεις των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών - και αντιστοίχως των υποδοχέων των T λεμφοκυττάρων - δε συνεχίζονται σε κύτταρα με λειτουργικούς αντιγονικούς υποδοχείς. Στη συνέχεια, τα δυο σύμπλοκα RAG1/RAG2 ενώνονται και φέρνουν κοντά την περιοχή D με την περιοχή J. Το πολύ δραστικό 3'-OH «επιτίθεται» στον απέναντι κλώνο και τον σπάει, οπότε σε κάθε άκρο κωδικοποιητικής αλληλουχίας σχηματίζεται μια δομή «φουρκέτας» (hairpin), μέσω μιας αντίδρασης trans-εστεροποίησης. Σε αυτό το στάδιο, οι RAG παραμένουν προσδεσμένες στα άκρα των επταμερών, τα οποία ενώνονται μεταξύ τους με τη δράση της DNA λιγκάσης IV και σχηματίζουν μια δομή γνωστή ως «σηματοδοτική συμβολή» (signal joint).

Εικόνα 1.15 Τα στάδια του ενζυμικού ανασυνδυασμού των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών.

Οι πρωτεΐνες μη ομόλογου ανασυνδυασμού των άκρων (non-homologous end joining proteins, NHEJ) που εκφράζονται στα επόμενα στάδια του ανασυνδυασμού αναγνωρίζουν τη δομή της φουρκέτας. Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη ARTEMIS ανοίγει τη φουρκέτα. Η ARTEMIS ενεργοποιείται από την πρωτεΐνη DNA-PK, η οποία με τη σειρά της έχει ενεργοποιηθεί από το σύμπλοκο των πρωτεϊνών Ku70/Ku80. Το κόψιμο είναι τυχαίο και μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο της φουρκέτας⁽²⁰⁾. Το τυχαίο κόψιμο της δομής της φουρκέτας είναι δυνατό να οδηγήσει στη δημιουργία παλινδρομων διπλασιασμών. Οι διπλασιασμοί αυτοί είναι γνωστοί ως P νουκλεοτίδια (palindromic, P).

Η ετερογένεια της συμβολής των γονιδίων V, (D), J αυξάνεται από τη δράση του ενζύμου TdT (τελική δεοξυνουκλεοτιδική τρανσφεράση) που προσθέτει τυχαία νουκλεοτίδια (N) στα προεξέχοντα άκρα των γονιδίων⁽²⁰⁻²²⁾. Η TdT είναι ένζυμο του πυρήνα που καταλύει την προσθήκη τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοσιδίων (κατά προτίμηση γουανίνης και κυτοσίνης) στο 3' OH άκρο του DNA χωρίς να απαιτεί εκμαγείο (non-templated nucleotides). Τέλος, μια εξωνουκλεάση κόβει τα μη

συμπληρωματικά νουκλεοτίδια, μια ενδονουκλεάση προσθέτει τα συμπληρωματικά νουκλεοτίδια και η λιγκάση IV ενώνει τα άκρα. Η ενεργότητα της λιγκάσης IV αυξάνει με την δράση της πρωτεΐνης XRCC4.

Η συμβολή των γονιδίων V(D)J περιλαμβάνεται στην περιοχή CDR3. Οι διαφορετικές αλληλουχίες αμινοξέων των περιοχών CDR3 είναι περισσότερες από αυτές που μπορεί να κωδικοποιηθούν από τα τμήματα V, J και D της γαμετικής σειράς. Η ποικιλότητα των συμβολών από την προσθήκη και αφαίρεση νουκλεοτιδίων ονομάζεται συνδετική ποικιλότητα (junctional diversity) και συμβάλλει στην ετερογένεια και τη μοναδικότητα των αντιγονικών υποδοχέων.

1.5. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

1.5.1 ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΗ ΑΠΟ ΤΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ ΦΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ

Τα Β λεμφοκύτταρα προέρχονται από αρχέγονα πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα. Κατά την εμβρυϊκή ζωή η ανάπτυξή τους εξελίσσεται στα αιμونهσίδια, τον πλακούντα και το ήπαρ, ενώ κατά την ενήλικη ζωή πραγματοποιείται στο μυελό των οστών⁽²⁵⁾. Στο τέλος της «αντιγονοανεξάρτητης» (antigen-independent) φάσης ανάπτυξης παράγεται το ώριμο, «παρθένο» Β λεμφοκύτταρο (naive, virgin B cell). Πρέπει να διευκρινιστεί ότι οι όροι αντιγονοανεξάρτητη και αντιγονοεξαρτώμενη (antigen-dependent) φάση ανάπτυξης αναφέρονται σε ξένα αντιγόνα και όχι σε συστατικά του ίδιου του οργανισμού⁽²³⁻²⁴⁾.

Ο σκοπός της πρώτης φάσης ανάπτυξης είναι η έκφραση ενός λειτουργικού μορίου ανοσοσφαιρίνης (υποδοχέας του Β κυττάρου, B cell receptor, BCR) στην επιφάνεια του κυττάρου. Η αδυναμία έκφρασης επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης οδηγεί το κύτταρο σε θάνατο με απόπτωση.

Στον άνθρωπο υπάρχουν δύο αλληλόμορφα για τη βαριά και τέσσερα για την ελαφριά αλυσίδα (2 για την κ και 2 για τη λ). Το Β κύτταρο χρησιμοποιεί για την παραγωγή της ανοσοσφαιρίνης μόνο ένα είδος βαριάς και ένα είδος ελαφριάς αλυσίδας. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται αποκλεισμός αλληλομόρφου (allelic exclusion).

Κατά το πρώτο στάδιο ανάπτυξης, τα γονίδια των αρχέγονων κυττάρων βρίσκονται σε διάταξη βλαστικού (germline) DNA. Απαραίτητη προϋπόθεση για την έναρξη της διαφοροποίησης είναι η προσκόλληση των αρχέγονων κυττάρων στα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών. Συγκεκριμένα η σύνδεση της ιντεγκρίνης VLA-4 (CD49d) των προγονικών Β κυττάρων με το μόριο VCAM-1 (CD106) των

στρωματικών κυττάρων είναι η πρώτη μοριακή αλληλεπίδραση για τη σύναψη των δύο αυτών κυτταρικών τύπων που επάγει την έκφραση του συμπλόκου της V(D)J ρεκομπινάσης (RAG1, RAG2, TdT)⁽²⁵⁻²⁸⁾ με αποτέλεσμα την έναρξη του ανασυνδυασμού.

Τα γονίδια IGHD και IGHJ αναδιατάσσονται πρώτα. Με την αναδιάταξη αυτή τα αρχέγονα κύτταρα (stem cells) «δεσμεύονται» να ακολουθήσουν τη B λεμφική σειρά (Εικόνα 1.16). Σε αυτή τη φάση το κύτταρο ονομάζεται πρώιμο προ-προ B κύτταρο (early pro-B cell)⁽²⁵⁾ και στην επιφάνειά του εκφράζεται ο υποδοχέας Kit, ο οποίος έχει δραστηριότητα κινάσης της τυροσίνης. Μετά την σύνδεση του υποδοχέα Kit με τον τροφικό παράγοντα (SCF) το πρώιμο προ-προ B κύτταρο διεγείρεται σε πολλαπλασιασμό (Εικόνα 1.16).

Εικόνα 1.16 Τα στάδια διαφοροποίησης της B λεμφικής σειράς και το είδος της ανοσοσφαιρίνης που παράγεται σε κάθε στάδιο.

Ακολουθεί ανασυνδυασμός μεταξύ του τμήματος IGHD-J και ενός από τα γονίδια IGHV. Στα 2/3 των περιπτώσεων, το γονίδιο αναδιατάσσεται εκτός πλαισίου ανάγνωσης, οπότε ο ανασυνδυασμός συνεχίζεται στο δεύτερο αλληλόμορφο. Το κύτταρο περνά στην φάση του όψιμου προ-προ B κυττάρου (late pro-B cell) και στην

επιφάνειά του εκφράζεται ο υποδοχέας της IL-7, η οποία εκκρίνεται σε μικρά ποσά από τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών και είναι απολύτως απαραίτητη για να καθοδηγήσει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των προ-B κυττάρων. Προς το τέλος αυτού του σταδίου παρατηρείται μεταγραφή των γονιδίων VDJ-Cμ, Igα, Igβ, λ5 και VpreB και η βαριά αλυσίδα εντοπίζεται πλέον στο κυτταρόπλασμα. Το κύτταρο ονομάζεται μεγάλο προ-B λεμφοκύτταρο (large pre B cell). Ακολουθεί μια από τις σημαντικότερες φάσεις της ανάπτυξης του κυττάρου, η φάση του προ-B κυττάρου (pre-B cell). Στην επιφάνειά του εκφράζεται ο υποδοχέας του προ-B κυττάρου (pre-B cell receptor)⁽²⁹⁻³⁰⁾ (Εικόνα 1.17).

Εικόνα 1.17 Ο υποδοχέας του προ-B λεμφοκυττάρου (pre-B cell receptor) και ο υποδοχέας του ώριμου B λεμφοκυττάρου (B cell receptor). Τροποποιημένο από IMGT Web Resources.

Ο υποδοχέας αυτός αποτελείται από τη βαριά αλυσίδα και τα προϊόντα των γονιδίων VpreB και λ5 που εκφράστηκαν στο προηγούμενο στάδιο και σχηματίζουν την αναπληρωματική ελαφριά αλυσίδα (surrogate light chain, SLC). Συναρμολογείται με τις πρωτεΐνες-συνυποδοχείς Igα και Igβ και έχει παρόμοια μορφή με τον αντιγονικό υποδοχέα που εντοπίζεται στα ώριμα B κύτταρα. Έτσι, ελέγχεται η καταλληλότητα των μεταβλητών περιοχών της βαριάς αλυσίδας, όπως επίσης κι αν είναι δυνατό να ταιριάξουν με μια ελαφριά αλυσίδα για την παραγωγή λειτουργικής θέσης πρόσδεσης για το αντιγόνο. Εάν η αναδιάταξη VDJ στην βαριά αλυσίδα είναι παραγωγική αλλά η βαριά αλυσίδα που προκύπτει δεν μπορεί να ενωθεί σωστά με την αναπληρωματική ή την κανονική ελαφριά αλυσίδα, το κύτταρο δεν θα εκφράσει υποδοχέα και θα πεθάνει με απόπτωση⁽³¹⁾. Η έκφραση του υποδοχέα επάγει την έκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-x_L. Έτσι το κύτταρο διασώζεται από την απόπτωση και λαμβάνει σήματα για διαίρεση. Με την έκφραση του λειτουργικού υποδοχέα καταστέλλονται τα γονίδια RAG, με αποτέλεσμα να διακόπτεται ο ανασυνδυασμός.

Όταν τα κύτταρα πάψουν να διαιρούνται, ονομάζονται μικρά προ-B κύτταρα (small pre-B cells). Τα γονίδια RAG, τα οποία προηγουμένως είχαν κατασταλεί, ενεργοποιούνται και τα γονίδια των γενετικών τόπων της ελαφριάς αλυσίδας αρχίζουν να αναδιατάσσονται. Κατά κανόνα προηγείται ο ανασυνδυασμός της κ αλυσίδας. Εάν αποτύχει, τότε το κύτταρο περνά στον ανασυνδυασμό των γονιδίων της λ αλυσίδας. Στον άνθρωπο, το 60% των B κυττάρων εκφράζουν κ και το 40% λ ελαφριές αλυσίδες.

Όταν το κύτταρο αποκτήσει και μια λειτουργική ελαφριά αλυσίδα, τότε εκφράζεται το μόριο της επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης IgM με τους συνυποδοχείς Igα και Igβ. Το κύτταρο πλέον δεν διαιρείται και βρίσκεται στο στάδιο του ανώριμου B κυττάρου (immature B cell). Θεωρητικά, μέσω της επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης IgM μπορεί να αναγνωρίζει αυτοαντιγόνα (self-antigens). Για το λόγο αυτό πρέπει να ελέγχεται για αυτοανοχή (self-tolerance) προτού εγκαταλείψει τον μυελό των οστών και εξέλθει στην περιφέρεια. Ο έλεγχος αυτός είναι ιδιαίτερα σημαντικός επειδή περίπου το 60-70% των ανώριμων B-κυττάρων είναι αυτοαντιδραστικά⁽³⁰⁻³¹⁾.

Σε περίπτωση αυτοαντιδραστικότητας, η αυτοανοχή επιτυγχάνεται με τρεις μηχανισμούς (Εικόνα 1.18):

Εικόνα 1.18 Οι τρεις μηχανισμοί για την επίτευξη αυτοανοχής (self-tolerance).

Κλωνική απαλοιφή (clonal deletion). Εάν ο αντιγονικός υποδοχέας του B κυττάρου αναγνωρίζει πολυσθενές αυτοαντιγόνο (π.χ., MHC στην επιφάνεια των κυττάρων) με υψηλή συγγένεια, τότε εξαλείφεται με απόπτωση.

Ανεργία (anergy). Σε περίπτωση που το κύτταρο αναγνωρίζει αυτοαντιγόνα χαμηλού σθένους (π.χ., διαλυτά), παύει να εκφράζει στην επιφάνεια ανοσοσφαιρίνη IgM (ενώ συνεχίζει να υπάρχει στο κυτταρόπλασμα). Το κύτταρο εκφράζει πλέον μόνο επιφανειακή IgD και δεν μπορεί να πολλαπλασιαστεί.

Διόρθωση υποδοχέα (receptor editing). Η ανάπτυξη μπορεί να σταματήσει στο στάδιο αυτό και να συνεχιστεί η έκφραση των γονιδίων RAG. Το κύτταρο συνεχίζει την αναδιάταξη των γονιδίων της ελαφριάς αλυσίδας για να τροποποιήσει την εξειδίκευση του αντιγονικού υποδοχέα (Εικόνα 1.19).

Εικόνα 1.17 Ο μηχανισμός της αναθεώρησης υποδοχέα, κατά τον οποίο η αναδιάταξη των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών συνεχίζεται και σχηματίζεται υποδοχέας με διαφορετική αντιγονική ειδικότητα.

Εάν το ανώριμο κύτταρο περάσει με επιτυχία τον έλεγχο για αυτοαντιδραστικότητα, ωριμάζει εγκαταλείποντας τον μυελό των οστών⁽³⁰⁾. Στη φάση αυτή εκφράζει στην επιφάνειά του τις ανοσοσφαιρίνες IgM και IgD, οι οποίες προκύπτουν από εναλλακτική συρραφή του πρωτογενούς μετάγραφου. Στην επιφάνειά του επίσης εντοπίζονται και πολλές άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες, απαραίτητες για την κυτταρική απάντηση στο αντιγόνο και στα ρυθμιστικά κύτταρα. Πολλά από τα γονίδια που εκφράζονταν ως αυτό το στάδιο ανάπτυξης (π.χ., τα VpreB, λ5, RAG1, RAG2, TdT και LEF-1) δεν είναι πλέον απαραίτητα και καταστέλλονται. Στην περιφέρεια το ώριμο παρθένο B κύτταρο είναι πλέον σε θέση να ενεργοποιηθεί μέσω του αντιγονικού

υποδοχέα του και να διαφοροποιηθεί σε απάντηση μετά από επαφή του με το αντιγόνο ή με κάποιο T λεμφοκύτταρο.

1.5.2 ΔΙΑΣΩΣΗ ΑΥΤΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ

A. ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ IGHV

Σαράντα λειτουργικά γονίδια IGHV στον άνθρωπο περιέχουν επταμερή μοτίβα cRSS (cryptic recombination signal sequence) (5'-TACTGTG-3'), τα οποία δυνητικά μπορεί να συμμετάσχουν σε ανασυνδυασμό με σκοπό την αντικατάσταση ήδη αναδιαταγμένων γονιδίων IGHV⁽²⁶⁾. Σε κάθε τέτοια αντικατάσταση, η προηγούμενη αναδιάταξη IGHV-D-J αντικαθίσταται από ένα νέο IGHV γονίδιο, αφήνοντας ένα αποτύπωμα στην περιοχή CDR3 του νέου γονιδίου της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης. Το παρεμβαλλόμενο τμήμα DNA αποκόπτεται.

Η συμμετοχή του επταμερούς cRSS στον ανασυνδυασμό μέσω των πρωτεϊνών RAG επιβεβαιώθηκε με *in vitro* μεθόδους πρόσδεσης και πέψης χρησιμοποιώντας RAG1 και RAG2 πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες RAG προσδένονται αποτελεσματικά σε καθεμιά από τις θέσεις cRSS. Η πρόσδεσή τους στην αλληλουχία cRSS συμβαίνει με μικρότερη συγγένεια σε σχέση με τις 12- ή 23-bp RSS^(32,33). Η συμμετοχή του επταμερούς cRSS στον ανασυνδυασμό μέσω των πρωτεϊνών RAG αντικατοπτρίζει μια παράβαση του κανόνα 12/23, επειδή η αλληλουχία cRSS δεν έχει καθορισμένο μήκος διαστηματικής περιοχής.

Στην τρίτη περιοχή πλαισίου των μη αναδιαταγμένων γονιδίων IGHV εκτός από το επταμερές cRSS εντοπίζονται και άλλα μοτίβα που μοιάζουν με τα cRSS και περιέχουν αλληλουχίες CAC. Έχει διατυπωθεί η πρόταση ότι παίζουν ρόλο στην αντικατάσταση ενός περιορισμένου τμήματος ενός αναδιαταγμένου γονιδίου IGHV με το αντίστοιχο τμήμα ενός άλλου μη αναδιαταγμένου γονιδίου IGHV⁽³⁴⁻³⁶⁾. Δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί εάν η αντικατάσταση IGHV συμβάλλει στη διαφοροποίηση του ρεπερτορίου κατά τα όψιμα στάδια ανάπτυξης των B κυττάρων μετά την έναρξη της αντίδρασης στο βλαστικό κέντρο⁽³⁷⁾.

Αντικατάσταση γονιδίου IGHV παρατηρείται σχετικά συχνά στην Β οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία^(38,39). Επίσης έχει αναφερθεί σε μια περίπτωση Β χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας, εύρημα που υποδηλώνει ότι ο μηχανισμός του ανασυνδυασμού είναι ενεργός στο νεοπλασματικό κλώνο⁽⁴⁰⁾.

B. ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΗ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΣΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΩΝ ΕΛΑΦΡΙΩΝ ΑΛΥΣΙΔΩΝ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Τα παρθένα B κύτταρα έχουν την ικανότητα να αλλάζουν την ελαφριά αλυσίδα των ανοσοσφαιρινών. Αυτή η διεργασία, γνωστή ως αναθεώρηση υποδοχέα (receptor editing) μπορεί να διασώσει τα αυτοαντιδραστικά B κύτταρα, τροποποιώντας την αντιγονική τους ειδικότητα⁽²⁵⁻²⁷⁾. Οι περισσότερες μελέτες για την αναθεώρηση υποδοχέα εστιάζονται στα γονίδια των ελαφριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών. Η οργάνωση των γονιδίων IGK/LV και IGK/LJ στους γενετικούς τόπους IGK/IGL επιτρέπει τη δημιουργία δευτερογενών αναδιατάξεων με την συμβολή ενός IGJ γονιδίου που βρίσκεται στο 5' άκρο μιας προϋπάρχουσας αναδιάταξης και ενός IGJ γονιδίου στο 3' άκρο, με αποτέλεσμα την απαλοιφή της πρωτογενούς αναδιάταξης⁽²⁸⁾. Επειδή τα μη αναδιαταγμένα γενετικά τμήματα που παραμένουν περιβάλλονται από συμβατές αλληλουχίες RSS, οι δευτερογενείς αναδιατάξεις των γονιδίων των ελαφριών αλυσίδων συμβαίνουν κατά τον ίδιο τρόπο με τις πρωτογενείς αναδιατάξεις⁽²⁶⁾.

Η οργάνωση του γενετικού τόπου IGK προάγει τη διεργασία αναθεώρησης του υποδοχέα και με έναν ακόμη τρόπο και συγκεκριμένα με αναδιατάξεις με το «στοιχείο διαγραφής κάππα» (kappa-deleting element, KDE), μια γενετική αλληλουχία που εντοπίζεται στο 3' άκρο του γονιδίου IGKC. Η αλληλουχία KDE αναδιατάσσεται είτε με ένα μη αναδιαταγμένο γονίδιο που βρίσκεται στο 5' άκρο μιας αναδιάταξης IGKV-J είτε με το επταμερές της αλληλουχίας RSS στο ιντρόνιο IGKJ-IGKC (IGKJ-C-INTRON-KDE)^(41,42). Στην πρώτη περίπτωση συμβαίνει απώλεια (ή σπανίως αναστροφή) της πρωτογενούς αναδιάταξης IGKV-J, του τμήματος IGKC όπως και των ενισχυτών. Στη δεύτερη περίπτωση, της αναδιάταξης με το IGKJ-C-INTRON, συμβαίνει απώλεια των τμημάτων IGKJ-IGKC και των ενισχυτών, όμως μια πιθανή προϋπάρχουσα αναδιάταξη IGKV-J παραμένει στο χρωμόσωμα⁽⁴³⁾.

Δευτερογενείς αναδιατάξεις στις ελαφριές αλυσίδες ως μέσο αναθεώρησης του υποδοχέα παρατηρήθηκαν αρχικά σε διαγονιδιακά ποντίκια που εξέφραζαν ανοσοσφαιρίνες με ειδικότητα για το μείζον σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας ή το DNA^(26, 29-31). Η αναθεώρηση του υποδοχέα στα πρώιμα B κύτταρα επηρεάζεται επίσης από τη θέση επαφής με το αντιγόνο επειδή το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών παρέχει σήματα που μπορούν να εμποδίσουν την απόπτωση που επάγεται από το αντιγόνο και προάγει την επανενεργοποίηση των πρωτεϊνών RAG και την αναθεώρηση του υποδοχέα⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾.

1.5.3 ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ ΦΑΣΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Τα ώριμα παρθένα Β κύτταρα μεταναστεύουν στα δευτερογενή λεμφικά όργανα και περνούν στην εξαρτώμενη από το αντιγόνο φάση ανάπτυξης. Οι απαντήσεις των Β κυττάρων σε αντιγόνα διακρίνονται σε:

α) κλασσικές Τ-εξαρτώμενες

β) ανεξάρτητες από τα CD4 Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα.

Σε αυτό το σημείο θα αναλυθούν οι Τ-εξαρτώμενες απαντήσεις.

Τα παρθένα Β κύτταρα ωριμάζουν, εγκαταλείπουν τον μυελό των οστών και εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος. Μέσω των φλεβιδίων με υψηλό ενδοθήλιο εισέρχονται στα δευτερογενή λεμφικά όργανα (σπλήνας, λεμφαδένες, πλάκες του Peyer και αμυγδαλές). Εάν κάποιο από τα Β κύτταρα αναγνωρίσει το ειδικό αντιγόνο και ενεργοποιηθεί κατάλληλα από τα βοηθητικά Τ κύτταρα (T_4 , TH_2 cells), λαμβάνει το σήμα για να διαιρεθεί και να ακολουθήσει μια συγκεκριμένη οδό διαφοροποίησης⁽⁴⁷⁾, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή αντιγονοειδικών πλασματοκυττάρων και Β κυττάρων μνήμης. Σε διαφορετική περίπτωση τα Β κύτταρα εξέρχονται από τα δευτερογενή λεμφικά όργανα και επιστρέφουν στην κυκλοφορία με τα απαγωγά λεμφαγγεία.

Τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Antigen Presenting Cells, APCs) παρουσιάζουν πρωτεϊνικά αντιγόνα στα βοηθητικά (T_4) κύτταρα και τα ενεργοποιούν. Η επιλογή T_4 -κυττάρων με ειδικό υποδοχέα (TCR) για το αντιγόνο συμβαίνει μόλις 3-5 ημέρες μετά την ανοσοποίηση. Τα πιο αποτελεσματικά APCs ίσως είναι τα διαπλεκόμενα δένδριτικά κύτταρα (dendritic cells, DCs), που εντοπίζονται στις περιοχές των Τ κυττάρων των περιφερικών λεμφικών οργάνων⁽⁴⁸⁾. Οι αλληλεπιδράσεις των T_4 -κυττάρων με τα διαπλεκόμενα δένδριτικά κύτταρα περιλαμβάνουν μια κεντρική συστοιχία του Τ-κυτταρικού υποδοχέα που προσδένεται σε ένα MHC μόριο μέσω του αντιγόνου και περικλείεται από αλληλεπιδρώντα συμπληρωματικά μόρια προσκόλλησης.

Εικόνα 1.20 Στην άνοση σύναψη, τα ενεργοποιημένα T-βοηθητικά κύτταρα (TH₂) αλληλεπιδρούν με τα B αντιγονοειδικά κύτταρα.

Ο σχηματισμός αυτός ονομάζεται άνοση σύναψη, ή σύναψη I. Ακολουθεί κλωνική έκπτυξη (clonal expansion) των αντιγονοειδικών, ενεργοποιημένων βοηθητικών T-κυττάρων (TH₂), τα οποία τώρα μπορούν να προσφέρουν βοήθεια στα B αντιγονοειδικά κύτταρα (Εικόνα 1.20). Η άνοση σύναψη II διαφέρει ποσοτικά και ποιοτικά από τη σύναψη I.

Το βασικό αποτέλεσμα της άνοσης σύναψης II είναι η κλωνική έκπτυξη των αντιγονοειδικών B λεμφοκυττάρων. Κάποια από τα κύτταρα που προκύπτουν από τον πολλαπλασιασμό αυτό σχηματίζουν πρωταρχικές εστίες στις περιοχές των T κυττάρων και δημιουργούν τα βραχύβια πλασματοκύτταρα (χρόνος ημιζωής in vivo 3-5 ημέρες), που εκκρίνουν ανοσοσφαιρίνη σε άμεση απάντηση του οργανισμού προς το αντιγόνο. Ανάλογα με τα σήματα που δέχονται από την άνοση σύναψη II με τα T-κύτταρα, τα πλασματοκύτταρα εκκρίνουν ανοσοσφαιρίνη IgM και ανοσοσφαιρίνες άλλων ισοτύπων. Τα πλασματοκύτταρα αυτά εκφράζουν και εκκρίνουν αντιγονοειδικά αντισώματα τα οποία κωδικοποιούνται από το βλαστικό DNA (germline-encoded) και είναι χαμηλής συγγένειας (low affinity). Πρώτα εμφανίζονται στις περιοχές των T κυττάρων και στη συνέχεια μετακινούνται προς τον ερυθρό πολφό στον σπλήνα.

Τα εναπομείναντα αντιγονοειδικά B κύτταρα μεταναστεύουν στις περιοχές των B κυττάρων και εισέρχονται στα πρωτογενή λεμφοζήδια⁽⁴⁷⁾. Ο αρχικός πολλαπλασιασμός συμβαίνει μετά από 6-8 ώρες και σχηματίζονται μεγάλες IgD-αρνητικές περιοχές μέσα στα πρωτογενή λεμφοζήδια, τα οποία πλέον ονομάζονται δευτερογενή λεμφοζήδια. Επτά έως δέκα ημέρες μετά την ανοσοποίηση, τα δευτερογενή λεμφοζήδια αποκτούν πολικότητα: το τμήμα που βρίσκεται προς την περιοχή των T κυττάρων περιέχει ταχέως πολλαπλασιαζόμενα B κύτταρα (κεντροβλάστες) και ονομάζεται σκοτεινή ζώνη, ενώ η περιοχή στον αντίθετο πόλο περιέχει ήρεμα, μη διαιρούμενα B κύτταρα (γνωστά ως κεντροκύτταρα) και σχηματίζει τη φωτεινή ζώνη. Το δυναμικό αυτό μικροπεριβάλλον, όταν αποκτά πολικότητα, ονομάζεται βλαστικό κέντρο (germinal center)^(45,49,50) (Εικόνα 1.21-1.22).

Εικόνα 1.21 Πολικότητα των δευτερογενών λεμφοζιδίων, διαμόρφωση του βλαστικού κέντρου και διαφορές στη λειτουργία των δύο «διαμερισμάτων» (φωτεινή-σκοτεινή ζώνη).

Οι κεντροβλάστες της σκοτεινής ζώνης είναι μεγάλα κύτταρα που διαιρούνται περίπου κάθε έξι ώρες και δεν εκφράζουν επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη. Στα κύτταρα αυτά παρατηρείται σωματική υπερμεταλλαξίγνωση (somatic hypermutation).

Εικόνα 1.22 Φυσιολογικό λεμφοζίδιο. Η πρωτεΐνη Bcl-2 (αντι-αποπτωτική/πράσινο χρώμα) εκφράζεται από μακρόβια B λεμφοκύτταρα στον μανδύα και στην οριακή ζώνη, ενώ η πρωτεΐνη Ki-67 (δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού/κόκκινο χρώμα) εκφράζεται από B λεμφοκύτταρα του βλαστικού κέντρου. Από IMGT Web Resources.

A. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΥΠΕΡΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ

Τα Β κύτταρα που αναγνωρίζουν ειδικά ένα αντιγόνο εισέρχονται στο βλαστικό κέντρο, διαιρούνται γρήγορα και διαφοροποιούν τον αντιγονικό υποδοχέα τους μέσω της διεργασίας της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης (somatic hypermutation, SHM). Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται αύξηση του ρεπερτορίου των υποδοχέων και παραγωγή αντισωμάτων με υψηλή συγγένεια για το αντιγόνο^(46,51,52). Στόχοι για την εισαγωγή μεταλλάξεων είναι η μεταβλητή περιοχή και ένα μικρό τμήμα του ιντρονίου J-C, ενώ οι σταθερές περιοχές δεν επηρεάζονται. Η εισαγωγή μεταλλάξεων πιθανόν κατευθύνεται από διάφορα cis-ρυθμιστικά στοιχεία (ενισχυτές και υποκινητές) που σχετίζονται με τη μεταγραφή, τα οποία όμως μπορεί να αντικατασταθούν από ετερόλογο υποκινητή χωρίς να επηρεαστεί η υπερμεταλλαξιγένεση.

Η σωματική υπερμεταλλαξιγένεση μπορεί να επηρεάζει τόσο τα λειτουργικά όσο και τα μη παραγωγικά γονίδια. Σε κάθε περίπτωση, το πρότυπο κατανομής των μεταλλάξεων διαφέρει. Στα λειτουργικά γονίδια, οι μεταλλάξεις αντικατάστασης (replacement mutations, R) συγκεντρώνονται στις περιοχές CDRs. Αντίθετα, οι «σιωπηλές» μεταλλάξεις (silent mutations, S) κατανέμονται σε όλες τις περιοχές πλαισίου⁽⁵³⁾. Στα μη παραγωγικώς αναδιαταγμένα γονίδια οι μεταλλάξεις δεν έχουν συγκεκριμένη εστίαση αλλά κατανέμονται τυχαία^(54,55). Συνεπώς, φαίνεται ότι το αντιγόνο «επιλέγει» τα Β κύτταρα που έχουν μεταλλαγμένους υποδοχείς με μεγαλύτερη συγγένεια. Ο αυξημένος λόγος R/S μεταλλάξεων στις περιοχές CDR3 αποτελεί ισχυρή ένδειξη επιλογής από αντιγόνο για αντισώματα με υψηλότερη συγγένεια.

Ο μηχανισμός της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Ωστόσο, μερικά, βασικά χαρακτηριστικά του είναι γνωστά:

- Επικράτηση των σημειακών μεταλλάξεων έναντι των ελλείψεων (deletions) ή των ενθέσεων (insertions).
- Επικράτηση των μεταβάσεων (transitions) σε σχέση με τις μεταπτώσεις (transversions)⁽⁵⁶⁾.
- Οι μεταλλάξεις αντικατάστασης (R) είναι συχνότερες από τις σιωπηλές μεταλλάξεις (S).
- Επιλεκτική στόχευση σε νουκλεοτίδια G και C έναντι των A και T.
- Προτίμηση στις πουρίνες (R) έναντι των πυριμιδινών (Y).
- Η σωματική υπερμεταλλαξιγένεση φαίνεται να στοχεύει συχνότερα μερικά κωδικόνια των V γονιδίων σε σχέση με άλλα. Τα σημεία αυτά ονομάζονται «επίκεντρα» (“hotspots”) για την εισαγωγή μεταλλάξεων και συχνά ακολουθούν μοτίβα τριών ή τεσσάρων νουκλεοτιδίων, όπως τα RGYW (W: A

ήT) και GNW. Εντοπίζονται κυρίως στους βρόχους που ενώνουν τα β πτυχωτά φύλλα και σχηματίζουν τις περιοχές πρόσδεσης του αντιγόνου.

B. ΜΕΤΑΣΤΡΟΦΗ ΙΣΟΤΥΠΟΥ

Η διαδικασία της μεταστροφής ισοτύπου (class-switch recombination, CSR) συμβαίνει μετά την επιλογή των κεντροκυττάρων. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ύπαρξη του CD40 στην επιφάνεια του κυττάρου⁽⁴⁰⁾. Ο συνδυασμός μιας μεταβλητής περιοχής με διαφορετικές σταθερές περιοχές διασφαλίζει ότι τα αντισώματα μιας ορισμένης ειδικότητας μπορεί να εκφράζονται με διαφορετικούς ισοτύπους και κατά συνέπεια να έχουν διαφορετική λειτουργία, για την επίτευξη καλύτερης απάντησης προς το αντιγόνο(Εικόνα 1.23).

Εικόνα 1.23 Ο μοριακός μηχανισμός της μεταστροφής ισοτύπου.

Η μεταστροφή ισοτύπου είναι μη αντιστρεπτή διαδικασία, η οποία επιτυγχάνεται με ανασυνδυασμό μεταξύ ειδικών αλληλουχιών μεταστροφής (switch regions), που εντοπίζονται περίπου 2 kb στο 5' άκρο κάθε C γονιδίου (εκτός του Cδ)^(57,58). Οι αλληλουχίες μεταστροφής αποτελούνται από 20-80 νουκλεοτιδικές επαναλήψεις (βραχείες επαναλήψεις GGGCT και GAGCT όπως και βραχείες επαναλήψεις TGGG ή TGAG) κοντά στο σημείο του ανασυνδυασμού⁽³²⁾. Η διαδικασία αυτή επιτρέπει στην ανασυνδυασμένη V-D-J αλληλουχία, που μέχρι τώρα μπορούσε να συνδεθεί μόνο με τις Cμ και Cδ, να συνδέεται και να εκφράζεται και με τα υπόλοιπα γονίδια της

σταθερής περιοχής. Κατά τη διεργασία της μεταστροφής ισοτύπου, οι αλληλουχίες μεταστροφής (S) των σταθερών περιοχών ανασυνδυάζονται και το ενδιάμεσο DNA αποκόπτεται. Άρα το κύτταρο δεν είναι πλέον σε θέση να εκφράσει τους ισοτύπους που βρίσκονταν στο τμήμα που έχει απομακρυνθεί. Η διεργασία μπορεί να επαναληφθεί έως ότου εκφραστεί ο επιθυμητός ισοτύπος.

1.5.4 ΑΝΟΣΕΣ ΑΠΑΝΤΗΣΕΙΣ ΤΩΝ Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΕΣ ΑΠΟ ΤΑ Τ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Εκτός από κλασσικές T-εξαρτώμενες απαντήσεις, τα Β λεμφοκύτταρα εκδηλώνουν και απαντήσεις σε αντιγόνα που δεν απαιτούν την βοήθεια των Τ κυττάρων (T-ανεξάρτητες). Τα κύτταρα που είναι υπεύθυνα για τις απαντήσεις αυτές ανήκουν σε τρεις μεγάλους υποπληθυσμούς των ώριμων παρθένων Β κυττάρων.

Ο πρώτος τύπος είναι τα λεμφοζυδιακά ή θυλακιώδη (follicular, FO) Β κύτταρα⁽⁵⁹⁾. Τα ώριμα FO κύτταρα έχουν χρόνο ημιζωής περίπου 2-3 μήνες. Είναι τα κύτταρα που εμπλέκονται στις κλασσικές T-εξαρτώμενες απαντήσεις. Παρόλ' αυτά, σε περίπτωση που δεχθούν κάποιο σχετικά ισχυρό σήμα από αντιγόνα, όπως τα συστατικά του βακτηριακού τοιχώματος, τότε μπορούν να επαγάγουν T-ανεξάρτητες απαντήσεις στα περισσότερα δευτερογενή λεμφικά όργανα⁽⁶⁰⁾. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των FO κυττάρων που αναγνωρίζουν τέτοιου είδους αντιγόνα είναι η έκφραση του μορίου CD21⁽⁶¹⁾. Επειδή το CD21 αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα του Β κυττάρου μόνο όταν συναντήσει αντιγόνα επικαλυμμένα με μόρια του συμπληρώματος, πιστεύεται ότι τα αυτοαντιγόνα ή τα αντιγόνα που προέρχονται από την ενδογενή χλωρίδα του οργανισμού είναι πολύ σημαντικά στην επιλογή και την ωρίμανση των περιφερικών Β λεμφοκυττάρων.

Η αλληλεπίδραση αντιγόνου-υποδοχέα μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικό τρόπο, διάρκεια και ένταση της σηματοδότησης. Επομένως, κατά περίπτωση, το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας θα διαφέρει αρκετά, τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά. Τα αναπτυσσόμενα Β κύτταρα που δέχονται σχετικά ισχυρό σήμα από τον BCR διαφοροποιούνται σε FO κύτταρα. Αντίθετα, όσα δέχονται ασθενή σήματα διαφοροποιούνται προς κύτταρα της οριακής ζώνης (marginal zone, MZ B cells)^(62,63). Τα MZ Β κύτταρα εντοπίζονται στην οριακή ζώνη των δευτερογενών λεμφικών οργάνων και κυρίως του σπλήνα, όπου συνεχώς εκτίθενται σε αντιγόνα που κυκλοφορούν στο αίμα. Τα κύτταρα αυτά αναγνωρίζουν κυρίως αντιγόνα με πολύ επαναληπτικές δομές, όπως π.χ. συστατικά του βακτηριακού τοιχώματος. Χάρη στη μοναδική θέση τους, επάγουν άνοσες απαντήσεις πολύ γρήγορα. Η πλήρης ανάπτυξη της οριακής ζώνης και του συνόλου των MZ Β κυττάρων καθυστερεί έως

την ηλικία των 2 ετών στον άνθρωπο και των 3-4 εβδομάδων στα ποντίκια⁽⁶⁴⁻⁶⁷⁾. Το γεγονός αυτό πιθανόν σχετίζεται με την ανικανότητα των βρεφών κάτω των 2 ετών να εκδηλώσουν ικανοποιητικές άνοσες απαντήσεις σε πολυσακχαριδικά αντιγόνα. Ακόμα μια κατηγορία κυττάρων με παρόμοια χαρακτηριστικά με τα MZ B κύτταρα είναι τα B-1a κύτταρα. Τα κύτταρα αυτά αναπτύσσονται από αρχέγονα κύτταρα του μυελού των οστών και εκφράζουν στην επιφάνειά τους το μόριο CD5 (CD5⁺ κύτταρα)^(68,69). Αφθονούν στην περιτοναϊκή κοιλότητα, συνεισφέρουν το μεγαλύτερο μέρος των IgM στον ορό των ενηλίκων και είναι ιδιαίτερα μακρόβια και αυτοανανεούμενα. Τα B-1a κύτταρα συχνά παράγουν ανοσοσφαιρίνες εναντίον βακτηριακών υδατανθράκων ή πολυσθενών αυτοαντιγόνων. Οι ανοσοσφαιρίνες αυτές είναι χαμηλής συγγένειας, προσδένουν πολλά αντιγόνα (πολυ-αντιδραστικά φυσικά αντισώματα) και πολλές φορές μπορεί να γίνουν αυτοαντιδραστικές, επειδή αναγνωρίζουν ως αντιγόνα συστατικά όπως οι IgG, ssDNA, dsDNA, οι ιστώνες, η καρδιολιπίνη, η ακτίνη και ο κυτταροσκελετός⁽⁷⁰⁾. Είναι η πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού και, όπως και τα FO κύτταρα, απαιτούν ισχυρά σήματα μέσω του BCR για την ανάπτυξή τους.

Ορισμένα από τα χαρακτηριστικά των B-1a κυττάρων εμφανίζονται μετά από διέγερση των B κυττάρων του σπλήνα με αντι-IgM αντισώματα. Έτσι, με κατάλληλη διέγερση, ίσως κάθε B κύτταρο μπορεί να αποκτήσει τον B-1a φαινότυπο. Συνεπώς, η προέλευση των B-1a κυττάρων δεν είναι αποκλειστικά εμβρυϊκή. Ωστόσο, τα εμβρυϊκά B-1a κύτταρα παρουσιάζουν κάποιες διαφορές σε σχέση με τα ενήλικα. Για παράδειγμα, τα εμβρυϊκά κύτταρα δεν εκφράζουν TdT και επομένως δεν φέρουν N νουκλεοτίδια στις συμβολές IGHV-D-J.

1.6 ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

1.6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Β χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ) είναι κακόηθες νεόπλασμα Β λεμφοκυττάρων που εκφράζουν CD19 ή CD20, CD5, CD23 και χαμηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης στην επιφάνειά τους. Επιπρόσθετα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που είναι χρήσιμα στη διάγνωση της ΧΛΛ είναι η χαμηλή έκφραση του CD79b και του CD22. Η ΧΛΛ χαρακτηρίζεται από σταδιακή συσσώρευση μικρών, ώριμων λεμφοκυττάρων στο αίμα, στο μυελό των οστών και στους λεμφικούς ιστούς. Τα νεοπλασματικά λεμφοκύτταρα έχουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής, είναι μικρά, με στρογγυλό πυρήνα, πυκνή χρωματίνη και λιγοστό κυτταρόπλασμα.

Η ΧΛΛ είναι η πιο κοινή μορφή λευχαιμίας στο Δυτικό ημισφαίριο. Προσβάλλει κυρίως ηλικιωμένους και περισσότερο άντρες (αναλογία Α:Γ = 2:1). Στις Ηνωμένες Πολιτείες, κάθε χρόνο περίπου 7500 άνθρωποι εμφανίζουν ΧΛΛ και σχεδόν 5000 πεθαίνουν από την ασθένεια. Η κλινική πορεία της ΧΛΛ εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια: μερικοί ασθενείς επιβιώνουν για πολλά χρόνια χωρίς θεραπεία και τελικά πεθαίνουν από άλλα αίτια, ενώ άλλοι έχουν επιθετική νόσο και μικρή επιβίωση.

Πρόσφατα ευρήματα υποδιαιρούν την ΧΛΛ σε δύο ομάδες: (i) περιπτώσεις στις οποίες τα γονίδια των ανοσοσφαιρινών των νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων φέρουν σωματικές μεταλλάξεις και έχουν πιο ήπια εξέλιξη και μεγαλύτερη ολική επιβίωση και (ii) περιπτώσεις με αμετάλλακτες αναδιατάξεις των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών και πιο δυσμενή εξέλιξη⁽⁷¹⁾. Σε μερικές περιπτώσεις ΧΛΛ φαίνεται ότι στα κύτταρα του κλώνου συνεχίζεται η σωματική υπερμεταλλαξιγένεση και η μεταστροφή ιστοτύπου, επειδή εμφανίζουν ιδιοσυστασιακή ενεργοποίηση του ενζύμου AID, όπως συμβαίνει και στα φυσιολογικά κύτταρα του βλαστικού κέντρου. Πρόσφατες ανοσοφαινοτυπικές και μοριακές μελέτες έδειξαν ότι στις περισσότερες περιπτώσεις ΧΛΛ τα νεοπλασματικά κύτταρα έχουν φαινότυπο Β λεμφοκυττάρου μνήμης(Εικόνα 1.24).

Εικόνα 1.24 Υποτύποι ΧΛΛ στάδια ανάπτυξης και εξέλιξης του νεοπλασματικού κλώνου.
Τροποποιημένο από: Chiorazzi N et al. N Engl J Med 2005;352:804-15.

1.6.2 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΛΕΥΧΑΙΜΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗ Β-ΧΛΛ

Υπό την προϋπόθεση ότι η εισαγωγή μεταλλάξεων στα γονίδια IGV συμβαίνει μετά από διέγερση του Β κυτταρικού υποδοχέα από αντιγόνο, οι περιπτώσεις ΧΛΛ με μεταλλαγμένο αντιγονικό υποδοχέα (ανοσοσφαιρίνη επιφάνειας) πιθανότατα προέκυψαν από διεγερμένα Β λεμφοκύτταρα. Εντούτοις, η απουσία μεταλλάξεων δεν σημαίνει αναγκαστικά και απουσία προηγούμενης διέγερσης από αντιγόνο. Συνεπώς, οι αμετάλλακτες περιπτώσεις θα μπορούσε να προέρχονται από Β λεμφοκύτταρα που είχαν διεγερθεί από αντιγόνο αλλά δεν συγκέντρωσαν μεταλλάξεις εξαιτίας του τύπου της αντιγονικής διέγερσης (π.χ., Τ ανεξάρτητη διέγερση) ή του σταδίου στο οποίο συνέβη η νεοπλασματική εξαλλαγή. Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι όλα τα λευχαιμικά κύτταρα στην ΧΛΛ προέρχονται από Β λεμφοκύτταρα που ήρθαν σε επαφή με αντιγόνο και ότι η διέγερση από αντιγόνο είναι προαπαιτούμενο για την εξέλιξη της Β-ΧΛΛ ακόμη και σε περιπτώσεις χωρίς σωματικές μεταλλάξεις⁽⁷²⁻⁷⁶⁾.

1.6.3 ΜΕΤΑΒΙΒΑΣΗ ΣΗΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ Β ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΣΤΑ ΛΕΥΧΑΙΜΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ

Με βάση τα μοριακά και φαινοτυπικά δεδομένα η αντιγονική διέγερση των πρόδρομων Β λεμφοκυττάρων της Β-ΧΛΛ είναι πιθανό να έχει συμβεί πριν ή κατά τη διάρκεια της λευχαιμικής εξαλλαγής. Είναι επίσης πιθανό ότι η αντιγονική διέγερση επάγει την ανάπτυξη συγκεκριμένων κλώνων ΧΛΛ μετά την εξαλλαγή. Αυτή η υπόθεση ίσως αληθεύει επειδή σε αρκετές περιπτώσεις ΧΛΛ το μονοπάτι μεταβίβασης σήματος μέσω του Β κυτταρικού υποδοχέα είναι ακέραιο. Οι περιπτώσεις αυτές είναι ιδιαίτερα συχνές στην «αμετάλλακτη» υποομάδα της ΧΛΛ και ιδίως σε ασθενείς που εκφράζουν το αντιγόνο CD38^(77,78).

Το αποτέλεσμα του σήματος που μεταβιβάζεται μέσω του Β κυτταρικού υποδοχέα εξαρτάται από το στάδιο της ωρίμανσης και/ή ενεργοποίησης των κυττάρων. Έτσι τα ίδια σήματα μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την απόπτωση των ανώριμων Β λεμφοκυττάρων αλλά τον πολλαπλασιασμό των ώριμων λεμφοκυττάρων^(79,80). Το επίπεδο της ενεργοποίησης του Β κυτταρικού υποδοχέα ποικίλει ανάλογα με το σθένος του αντιγόνου, την πυκνότητα του αντιγονικού επιτόπου και την οργάνωση του. Τα ώριμα, «παρθένα» Β λεμφοκύτταρα απαιτούν μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιγόνου για την έναρξη μιας απάντησης από τα Β λεμφοκύτταρα μνήμης. Στην πλειονότητα των «αμετάλλακτων» περιπτώσεων ΧΛΛ μπορεί να μεταβιβάζεται σήμα μέσω της ανοσοσφαιρίνης επιφάνειας IgM. Αντίθετα, στην πλειονότητα των «μεταλλαγμένων» περιπτώσεων ΧΛΛ in vitro είναι αδύνατη η μεταβίβαση σήματος μέσω της ανοσοσφαιρίνης επιφάνειας IgM. Σε ποσοστό περίπου 50% των «μεταλλαγμένων» περιπτώσεων ΧΛΛ στις οποίες η μεταβίβαση σήματος μέσω της ανοσοσφαιρίνης επιφάνειας IgM δεν ήταν δυνατή, η όλη διεργασία εξελισσόταν μέσω της ανοσοσφαιρίνης επιφάνειας IgD⁽⁸¹⁻⁸⁴⁾. Σε μια μικρότερη υποομάδα, η μεταβίβαση σήματος ήταν δυνατή μόνο μέσω του επικουρικού μορίου Igα (CD79α). Η δυνατότητα μεταβίβασης σήματος μέσω άλλων συστατικών του Β κυτταρικού υποδοχέα υποδεικνύει ότι τα επόμενα στοιχεία της οδού μεταβίβασης είναι λειτουργικά στην ΧΛΛ. Έτσι, η αποτυχία μεταβίβασης σήματος οφείλεται σε γεγονότα κοντά στη μεμβράνη και αποτελεί χαρακτηριστικό των ανεργικών κυττάρων. Η χαρακτηριστική ανεργική κατάσταση στην πλειονότητα των «μεταλλαγμένων» περιπτώσεων ΧΛΛ, και σε ένα ποσοστό «αμετάλλακτων», είναι πιθανώς το αποτέλεσμα προγενέστερων γεγονότων σηματοδότησης που κατέστησαν την κυτταρική μεμβράνη ανθεκτική σε περαιτέρω διέγερση. Παρόλ' αυτά, στις «μεταλλαγμένες» περιπτώσεις ΧΛΛ η έκφραση του CD38 τροποποιεί την ικανότητα μεταβίβασης σήματος. Τα σήματα που μεταβιβάζονται μέσω του Β κυτταρικού υποδοχέα ίσως οδηγούν σε αυξημένη

μιτωτική δραστηριότητα και αυτό συνάδει με την παρουσία μικρότερων τελομεριδίων (ένδειξη πολλών κυτταρικών διαιρέσεων) στις «αμετάλλακτες» περιπτώσεις ΧΛΛ⁽⁸⁵⁾. Το ένζυμο δεαμινάση της κυτιδίνης (AID) εκφράζεται περισσότερο στις «αμετάλλακτες» περιπτώσεις ΧΛΛ σε σχέση με τις «μεταλλαγμένες» τουλάχιστον σε επίπεδο mRNA⁽⁸⁶⁾. Η ZAP-70 (zeta-associated protein 70), πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης που συνδέεται με τον υποδοχέα και εντοπίζεται συχνά στα Τ λεμφοκύτταρα, εκφράζεται επίσης σε υψηλότερα επίπεδα στην πλειονότητα των «αμετάλλακτων» περιπτώσεων ΧΛΛ⁽⁸⁷⁻⁸⁸⁾.

1.6.4 ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

Στην Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία και στα υπόλοιπα νεοπλασμάτα των Β λεμφοκυττάρων χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο η ανάλυση των μεταλλάξεων στα γονίδια των ανοσοσφαιρινών. Ανάλογα με το στάδιο της νεοπλασματικής εξαλλαγής οι κακοήθειες αυτές κατατάσσονται σε όγκους πριν το βλαστικό κέντρο, όγκους του βλαστικού κέντρου, ή όγκους μετά το βλαστικό κέντρο. Το στάδιο μπορεί να προσδιοριστεί με κριτήριο την ύπαρξη σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης και ενδοκλωνικής ετερογένειας (intracloal diversity).

Οι μεταλλάξεις του γονιδίου IGHV καταμετρούνται από την αρχή της περιοχής FR1 έως το τέλος της περιοχής FR3. Η αλλαγή ενός νουκλεοτιδίου χαρακτηρίζεται ως μετάλλαξη και όχι ως πολυμορφισμός, όταν εμφανίζεται μόνο στην κλωνική αλληλουχία και όχι στη φυσιολογική μη αναδιαταγμένη αλληλουχία.

Η ανάλυση των μεταλλάξεων των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών αποκάλυψε πρόσφατα δυο κατηγορίες ΧΛΛ, με ή χωρίς σωματικές μεταλλάξεις⁽⁸⁹⁾. Τα γονίδια IGHV με διαφορές >2% από το αντίστοιχο μη αναδιαταγμένο γονίδιο θεωρούνται ως «μεταλλαγμένα» (το όριο του 2% επιλέχθηκε, ώστε να αποφευχθεί το ενδεχόμενο κάποιες από τις διαφορές ν' αντιστοιχούν σε άγνωστους πολυμορφισμούς του γενετικού τύπου IGH). Οι αλληλουχίες των γονιδίων IGHV που έχουν διαφορές <2% σε σχέση με το αντίστοιχο μη αναδιαταγμένο γονίδιο θεωρούνται ως «αμετάλλακτες». Οι μισές περίπου περιπτώσεις ΧΛΛ που εκφράζουν IgM όπως και σχεδόν το 75% των περιπτώσεων που έχουν υποστεί μεταστροφή ισotyπου (και εκφράζουν IgG ή, σπανιότατα, IgA) παρουσιάζουν διαφορές >2% από το πλησιέστερο μη αναδιαταγμένο γονίδιο. Η παρουσία και το φορτίο των μεταλλάξεων ποικίλει στις διαφορετικές περιπτώσεις ΧΛΛ και φαίνεται να ακολουθείται μια ιεραρχία με βάση τη γονιδιακή οικογένεια IGHV και το συγκεκριμένο γονίδιο IGHV της οικογένειας που εκφράζεται στα λευχαιμικά κύτταρα. Επίσης, οι μεταλλάξεις αντικατάστασης

(replacement mutations, R) συσσωρεύονται κυρίως στις περιοχές CDRs και όχι στις περιοχές FRs^(90,91).

Με βάση τα παραπάνω οι πρόδρομοι των λευχαιμικών κυττάρων στην ΧΛΛ μπορεί να έχουν διεγερθεί από διαφορετικούς τύπους αντιγόνου πριν την λευχαιμική εξαλλαγή ή να έχουν μεταμορφωθεί σε λευχαιμικά κύτταρα σε διαφορετικά οντογενετικά στάδια της Β λεμφικής σειράς.

1.7. ΠΟΛΛΑΠΛΟΥΝ ΜΥΕΛΩΜΑ

1.7.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το πολλαπλούν μυέλωμα χαρακτηρίζεται από νεοπλασματική υπερπλασία των πλασματοκυττάρων στον μυελό των οστών. Συχνά, τα νεοπλασματικά κύτταρα έχουν ανώμαλη μορφολογία: εμφανίζουν πιο αρχέγονα χαρακτηριστικά και μεγαλύτερη διακύμανση στο μέγεθος από τα κλασσικά πλασματοκύτταρα. Επίσης, παρατηρούνται πολυπύρρηνα κύτταρα. Στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων μπορεί να βρεθούν έγκλειστα εξαιτίας εναποθέσεων ανώμαλης ανοσοσφαιρίνης.

Στις περισσότερες περιπτώσεις παράγεται μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη (Μ-πρωτεΐνη ή παραπρωτεΐνη) η οποία μπορεί να ανιχνευθεί στον ορό ή στα ούρα. Τυπικά, οι πρωτεΐνες του ορού είναι αυξημένες και η ηλεκτροφόρηση αποκαλύπτει μια παθολογική παραπρωτεΐνη στην περιοχή των γ-σφαιρινών. Το κλάσμα ανοσοσφαιρίνης που είναι αυξημένο αποκαλύπτεται με την τεχνική της ανοσοδιάχυσης. Η τεχνική της ανοσοηλεκτροφόρησης επιβεβαιώνει την παρουσία παθολογικής ανοσοσφαιρίνης και αναδεικνύει τον μονοκλωνικό χαρακτήρα της. Σε ασθενείς με πλήρη μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη στον ορό, η σύνθεση των βαριών και ελαφριών αλυσίδων στα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα συχνά είναι ανισομερής, με αποτέλεσμα να παράγονται ελαφριές αλυσίδες σε περίσσεια. Τα ούρα περιέχουν πρωτεΐνη Bence-Jones στα 2/3 των περιπτώσεων. Η πρωτεΐνη αυτή συνίσταται από ελαφριές αλυσίδες, κ ή λ, του ίδιου τύπου με την Μ-πρωτεΐνη του ορού.

Το προχωρημένο στάδιο αυτής της νόσου χαρακτηρίζεται από ορθόχρωμη, ορθοκυτταρική αναιμία, η οποία συχνά συνδυάζεται με ουδετεροπενία και θρομβοπενία, γεγονός που αντικατοπτρίζει την ανεπάρκεια του μυελού των οστών. Η ακτινογραφική μελέτη του σκελετού δείχνει οστεολυτικές βλάβες στο 60% των ασθενών με χαρακτηριστικό συνοδό άλγος. Σε ορισμένους ασθενείς, οι εναποθέσεις των μυελωματικών κυττάρων επεκτείνονται και εκτός του σκελετού, στους

περιβάλλοντες μαλακούς ιστούς. Σημαντικό κλινικό πρόβλημα για τους ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα είναι οι νεφρικές επιπλοκές. Οι ασθενείς με εμμένουσα νεφρική ανεπάρκεια και επίπεδα ουρίας αίματος μεγαλύτερα από 14 mmol/l έχουν κακή πρόγνωση. Οι βλάβες οφείλονται σε πρωτεϊνουρία Bence-Jones, αμυλοείδωση, νεφροασβέστωση και πτελονεφρίτιδα.

1.7.2 ΑΝΟΣΟΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΟΥ ΜΥΕΛΩΜΑΤΟΣ

Η ανάπτυξη του ΠΜ είναι μια διεργασία που περιλαμβάνει πολλά στάδια. Σύμφωνα με πρόσφατες ενδείξεις, πιθανόν ξεκινά ως μονοκλωνική γαμμαπάθεια απροσδιόριστης σημασίας (monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS), ασυμπτωματική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από ένα μονοκλωνικό κλάσμα στις ανοσοσφαιρίνες του ορού. Η συχνότητα των χρωμοσωμικών ανωμαλιών είναι ανάλογη με τη βαρύτητα της νόσου. Παθολογικός καρυότυπος (ιδίως με την τεχνική FISH) ανιχνεύεται σε ποσοστό 50% των περιπτώσεων MGUS, 65% του ΠΜ και 85% των περιπτώσεων πλασματοκυτταρικής λευχαιμίας (Εικόνα 1.25). Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι παρά την παρουσία χρωμοσωμικών ανωμαλιών, οι περισσότερες περιπτώσεις MGUS δεν εξελίσσονται σε ΠΜ, εύρημα που στηρίζει το μοντέλο του μετασχηματισμού σε πολλά στάδια.

Εικόνα 1.25 Οντογένεση του πολλαπλού μυελώματος. Συσσωρευση γενετικών βλαβών κατά την εξέλιξη της νόσου.

Στις χρωμοσωμικές μεταθέσεις που ανιχνεύονται στο ΠΜ συχνά συνδέεται ο γενετικός τύπος της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών (IGH) με τα γονίδια *c-maf*, *FGFR3* (υποδοχέας 3 του παράγοντα ανάπτυξης των ινοβλαστών), *MMSET*, *IRF4*, *myc* και τα γονίδια των κυκλινών *D1* και *D3*. Εξαιτίας των μεταθέσεων, τα παραπάνω γονίδια καταλήγουν να βρίσκονται κοντά στον ενισχυτή του γενετικού τύπου IGH με συνέπεια να υπερεκφράζονται. Η απορύθμιση των παραπάνω γονιδίων θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην νεοπλασματική εξαλλαγή. Επίσης, παρατηρείται ενεργοποίηση του γονιδίου *ras* και απενεργοποίηση των γονιδίων *p53*, *Rb*, *p16* και *p18*.

Κυταροκίνες, όπως η *IL-6*, ο *TNFα*, ο *VEGF* και ο *IGF-1*, παίζουν σημαντικό ρόλο στο ΠΜ, επάγοντας τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την ανθεκτικότητα στα φάρμακα των κυττάρων του ΠΜ, την οστεοκλαστική δραστηριότητα και την αγγειογένεση⁽⁹²⁾. Τα μονοπάτια των κυταροκινών προσφέρουν δυνητικούς στόχους για θεραπευτική παρέμβαση. Ασφαλώς, περισσότεροι δυνητικοί στόχοι θ' ανακαλυφθούν με την κατανόηση της βιολογίας της νόσου.

Η ανάλυση του ρεπερτορίου των γονιδίων *IGHV* στο πολλαπλούν μυέλωμα ανέδειξε πολύ μικρή χρησιμοποίηση του γονιδίου *IGHV4-34*, το οποίο κωδικοποιεί αυτοαντισώματα με δράση ψυχροσυγκολλητίνης (*anti-I/i*): το γεγονός αυτό συνάδει με την απουσία αυτοάνοσων φαινομένων στο πολλαπλούν μυέλωμα, σε αντιδιαστολή προς πολλά άλλα κακοήγη λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα (χαρακτηριστικά, τη ΧΛΛ). Τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα φέρουν πολύ μεταλλαγμένα γονίδια ανοσοσφαιρινών, δεν εμφανίζουν ενδοκλωνική ετερογένεια και σχεδόν πάντοτε έχουν πραγματοποιήσει μεταστροφή ιστού. Με βάση τα παραπάνω, ο καλύτερος «υποψήφιος» για τον τίτλο του «κλωνογενούς κυττάρου του πολλαπλού μυελώματος» είναι ένα Β λεμφοκύτταρο που έχει περάσει από το βλαστικό κέντρο (*post-germinal center cell*) (Εικόνα 1.26).

Ωστόσο, είναι άγνωστη η ταυτότητα των κυττάρων που εμπλέκονται στην έναρξη και την εξέλιξη της νόσου, κυρίως εξαιτίας της αδυναμίας να διατηρηθούν τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα *in vitro* αλλά και *in vivo*. Στον μυελό των οστών των ασθενών υπάρχουν πληθυσμοί Β λεμφοκυττάρων σε διαφορετικά στάδια διαφοροποίησης που εμφανίζουν κλωνική συγγένεια με τα κακοήγη πλασματοκύτταρα. Η ανίχνευση στην κυκλοφορία του αίματος άφθονων Β λεμφοκυττάρων που εμφανίζουν ταυτόσημες αναδιατάξεις *IGHV-D-J* με τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα στηρίζει ακόμα περισσότερο την υπόθεση της προέλευσης από ένα πρωιμότερο κύτταρο, πιθανόν μετά το βλαστικό κέντρο.

Εικόνα 1.26 Το φυσιολογικό κυτταρικό αντίστοιχο του κλωνογενούς κυττάρου του ΠΜ είναι ένα κύτταρο που έχει περάσει από το βλαστικό κέντρο.

ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Οι αναδιατάξεις στους γενετικούς τόπους των ελαφριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών (IGK, IGL) ακολουθούν το μοντέλο αποκλεισμού αλληλομόρφου (allelic exclusion). Οι αναδιατάξεις έχουν «ιεραρχικό» χαρακτήρα: πρώτα αναδιατάσσεται ο γενετικός τόπος της κ-ελαφριάς αλυσίδας (IGK) και μόνο εάν αποτύχει η αναδιάταξη και στα δύο αλληλόμορφα IGK, ακολουθεί ανασυνδυασμός του γενετικού τόπου της λ-ελαφριάς αλυσίδας (IGL). Στον άνθρωπο, η ανάλυση των αναδιατάξεων του γενετικού τόπου IGK σε φυσιολογικά IgM⁺ B λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος αποκάλυψε ότι το ρεπερτόριο των γονιδίων IGKV εμφανίζει ιδιαίτερη επιλεκτικότητα ίσως επειδή μερικά γονίδια IGKV είναι ικανά να συνδέονται με ποικίλα αντιγόνα και έχουν αποκτήσει «εξελικτικό πλεονέκτημα» έναντι των υπολοίπων, με αποτέλεσμα να υπεραντιπροσωπεύονται στο ρεπερτόριο των φυσιολογικών, αυτοαντιδραστικών ή νεοπλασματικών B λεμφοκυττάρων.

Τα λευχαιμικά B λεμφοκύτταρα μπορεί να θεωρηθούν ως ένα μοντέλο "in vivo μεμονωμένου κυττάρου" ("in vivo single-cell model"). Έτσι, προσφέρονται για την ανάλυση των μηχανισμών αναδιάταξης και έκφρασης των ελαφριών αλυσίδων. Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν οι παραγωγικές και μη-παραγωγικές αναδιατάξεις του γενετικού τόπου IGK (IGKV-J, IGKV-KDE και IGKJ-C-INTRON-KDE) σε μια ομάδα 291 ασθενών με ΧΛΛ. Ακολούθησε σύγκριση των ρεπερτορίων των γονιδίων σε ασθενείς που εκφράζουν κ ή λ κλωνοτυπική αλυσίδα. Επιπλέον, μελετήθηκαν οι παραγωγικές και μη-παραγωγικές αναδιατάξεις του γενετικού τόπου IGK σε 101 ασθενείς με Πολλαπλούν Μυέλωμα (ΠΜ). Το ΠΜ επιλέχθηκε προς αντιπαράβολή με την ΧΛΛ για δύο λόγους: (i) προέρχεται από νεοπλασματική εξαλλαγή κυττάρων τα οποία έχουν περάσει από το βλαστικό κέντρο (postgerminal center cell) (ii) αντίθετα από τη ΧΛΛ δεν συσχετίζεται με αυτοαντιδραστικότητα ούτε έχει συνδεθεί με αυτοάνοσες εκδηλώσεις. Συνεπώς, το αντίστοιχο κλωνογενές κύτταρο μάλλον έχει ένα ιστορικό πολύ διαφορετικών εμπειριών σε σχέση με το αντίστοιχο της ΧΛΛ, τόσο υπό την έννοια διαφορετικών (αυτο)αντιγόνων όσο και του ανατομικού διαμερίσματος όπου συμβαίνει η συνάντηση με το αντιγόνο (βλαστικό κέντρο/ οριακή ζώνη).

Σκοπός της μελέτης ήταν να διερευνηθεί ο ρόλος των πολλαπλών αναδιατάξεων του γενετικού τόπου IGK στη διαμόρφωση του εκφραζόμενου ρεπερτορίου στην ΧΛΛ και στο ΠΜ και να εντοπιστούν πιθανές διαφορές μεταξύ περιπτώσεων με κλωνοτυπική κ ή λ ελαφριά αλυσίδα. Επιπλέον, αναζητήθηκαν τα αίτια για τα οποία απέτυχαν να εκφραστούν οι λειτουργικές πρωτογενείς αναδιατάξεις IGKV-J. Οι αλληλουχίες IGKV-J της ομάδας συγκρίθηκαν με όλες τις αλληλουχίες IGKV-J που ανασύρθηκαν από τη

βάση δεδομένων IMGT/LIGM-DB με σκοπό την αναγνώριση ομόλογων αλληλουχιών και την αναζήτηση ενδείξεων αναγνώρισης συγκεκριμένων αντιγόνων. Τέλος, αναζητήθηκαν ενδείξεις για την οντογενετική προέλευση του νεοπλασματικού κλώνου.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

Ο διαχωρισμός των μονοπύρηνων κυττάρων από δείγματα περιφερικού αίματος και μυελού των οστών έγινε με φυγοκέντρηση σε βαθμίδωση φικόλλης (Ficoll-Hydraque). Η μέτρηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε μικροσκόπιο με τη χρήση πλάκας Neubauer και χρωστικής Trypan blue.

2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA

Η απομόνωση DNA έγινε με πέψη με πρωτεΐνάση K χρησιμοποιώντας στήλες (QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN). Οι στήλες (QIAamp Spin Columns) χρησιμοποιούνται για την απομόνωση νουκλεϊνικών οξέων. Η απομόνωση βασίζεται στη χρήση μεμβρανών από πηκτή σιλικόνης, η οποία δεσμεύει εκλεκτικά νουκλεϊνικά οξέα, ενώ είναι διαπερατή από πρωτεΐνες και δισθενή κατιόντα που μπορεί να αναστείλουν την πολυμεράση κατά την αντίδραση PCR.

2.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA

Η απομόνωση ολικού RNA έγινε με τη μέθοδο του θειοκυανικού γουανιδινίου σύμφωνα με πρότυπες διαδικασίες.

2.4 ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA

Η σύνθεση του cDNA έγινε με αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription, RT) χρησιμοποιώντας ως εκκινητές εξανουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας (random hexamers, 500μg/ml). Η αντίδραση είχε τελικό όγκο 30μl. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση είναι η αντίστροφη μεταγραφάση MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase, 200U/μl). Για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα ολικό κυτταρικό RNA (Πίνακας 2.1).

Πίνακας 2.1

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΙ (ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ)/ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ
RT buffer 5x*	6μl
Αναστολέας RNAασών (40U/μl)	1.5μl
dNTPs (10mM)	1.5μl
DTT (0.1M)	3μl
Τυχαία εξανουκλεοτίδια (500μg/ml)	3μl
MMLV RT (200U/μl)	1.5μl (300U)
ddH ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο 30 μl
Υπόστρωμα	
RNA	1 μg
ddH ₂ O	3.5μl

*Σύνθεση ρυθμιστικού διαλύματος RT buffer 5x:250mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂.

Συνθήκες αντίδρασης

Αρχική αποδιάταξη: 65°C, 10 λεπτά

37°C, 60 λεπτά

65°C, 10 λεπτά

Το ενδεχόμενο ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων από αδυναμία ενίσχυσης του RNA μπορεί να αποκλειστεί με ενίσχυση αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε μετάγραφα γονιδίων τα οποία εκφράζονται πάντοτε στον υπό ανάλυση ιστό (μετάγραφα “αναφοράς”). Στην παρούσα μελέτη, ως μετάγραφο “αναφοράς” χρησιμοποιήθηκε το mRNA του γονιδίου RARα (retinoic acid receptor α) το οποίο κωδικοποιεί έναν από τους υποδοχείς του ρετινοϊκού οξέος.

Συνθήκες αντίδρασης

Αρχική αποδιάταξη: 94°C, 5min

Κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 40 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:

φάση αποδιάταξης: 94°C, 1min

φάση σύνδεσης εκκινητών: 53°C, 1min

φάση επέκτασης μορίων DNA: 72°C, 1:30min

Τελική επέκταση συντεθειμένων μορίων DNA: 72°C, 10min

Πίνακας 2.2

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΙ (ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ)/ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ
Υπόστρωμα	cDNA: 3μl
RB 10x	5μl
MgCl ₂ (50mM)	2μl (2mM)
dNTPs (10mM)	1μl (200μM για κάθε ένα)
RAR6	1.5μl
RAR8	1.5μl
Taq polymerase (5 units/μl)	0.5μl (2.5 units)
ddH ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο 50μl

2.5 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΚΛΩΝΙΚΩΝ ΑΝΑΔΙΑΤΑΞΕΩΝ IGKV-J, IGKV-KDE ΚΑΙ IGKJ-C-INTRON-KDE ΣΤΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΤΟΠΟ IGK

Μεταγραφόμενες κλωνικές αναδιατάξεις της μεταβλητής περιοχής της κ ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών (IGKV-J) ενισχύθηκαν με την τεχνική RT-PCR. Για την ενίσχυση των συμβολών IGKV-J χρησιμοποιήθηκαν οι συναινετικοί εκκινητές (consensus primers) Vk1-6 και Jk1-5 ως μείγμα ολιγονουκλεοτιδίων (Πίνακα 2.3). Οι εκκινητές είναι αντιπροσωπευτικοί για καθεμιά από τις έξι υποομάδες γονιδίων IGKV και αντίστοιχα για τα γονίδια IGKJ. Στις παραπάνω αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα cDNA.

Αναζητήθηκαν επίσης κλωνικές, μη μεταγραφόμενες αναδιατάξεις στον γενετικό τόπο IGK. Συγκεκριμένα, αναζητήθηκαν οι αναδιατάξεις IGKV-J, IGKV-KDE και IGKJ-C-INTRON-KDE. Στις αντιδράσεις αυτές χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα γενωμικό DNA και ως εκκινητές, οι εκκινητές Vk1-6 και Jk1-5 για τις αναδιατάξεις IGKV-J, Vk1-6 και KDE για τις συμβολές IGKV/KDE και οι εκκινητές Jkintron και KDE για τις συμβολές IGKJ-C-INTRON-KDE.

Πίνακας 2.3 Οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων

Εκκινήτης	Αλληλουχία
Vκ1	5'-GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CC -3'
Vκ2	5'-GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT CC-3'
Vκ3	5'-GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CC -3'
Vκ4	5'-GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CC -3'
Vκ5	5'-GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC-3'
Vκ6	5'-GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CC-3'
Jκ1	5'-ACG TTT GAT TTC CAC CTT GGT CCC-3'
Jκ2	5'-ACG TTT GAT CTC CAG CTT GGT CCC -3'
Jκ3	5'-ACG TTT GAT ATC CAC TTT GGT CCC-3'
Jκ4	5'-ACG TTT GAT CTC CAC CTT GGT CCC-3'
Jκ5	5'-ACG TTT AAT CTC CAG TCG TGT CCC-3'
Jkintron	5'-GTT ATT CCC AAA AGC TCA ATC TCA AAG-3'
KDE	5'-CCC TTC ATA GAC CCT TCA GGC AC-3'
RAR6	5'-GGTGCCTCCCTACGCCTTCT-3'
RAR8	5'-GGCGCTGACCCCATAGTGGT-3'

Οι συγκεντρώσεις και ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στους Πίνακες 2.4 (αντίδραση PCR για την ενίσχυση των συμβολών IGKV-J) και στους πίνακες 2.5 και 2.6 (αντίδραση PCR για την ενίσχυση των συμβολών IGKV-KDE και IGKJ-C-INTRON-KDE).

Πίνακας 2.4

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΙ (ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ)/ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ
Υπόστρωμα	cDNA: 5μl, DNA: 1μg
RB 10x*	10μl
MgCl ₂ (50mM)	3μl (1.5mM)
dNTPs (10mM)	2μl (0.2mM για κάθε ένα)
μείγμα εκκινητών Vκ1-6	6μl
μείγμα εκκινητών Jκ1-5	6μl
Taq polymerase (5 units/μl)	0.5μl
ddH ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο 100μl

*Σύνθεση ρυθμιστικού διαλύματος RB10x(PCR buffer): 500mM KCl, 200 mM Tris-HCl(pH 8.4).

Για τον έλεγχο της ακρίβειας της αντίδρασης και τον έλεγχο επιμόλυνσης των αντιδραστηρίων σε κάθε πείραμα προστέθηκε ένα σωληνάριο που περιείχε όλα τα αντιδραστήρια εκτός από υπόστρωμα (PCR control). Επιπλέον στα πειράματα ενίσχυσης των συμβολών IGKV-KDE και IGKJ-C-INTRON-KDE, για τον αποκλεισμό ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων, παράλληλα με τα προς έλεγχο δείγματα DNA εξετάστηκε και δείγμα DNA θετικό για την αντίστοιχη αναδιάταξη.

Πίνακας 2.5

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΙ (ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ)/ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ
Υπόστρωμα	DNA: 1μg
RB 10x	10μl
MgCl ₂ (50mM)	3μl (1.5mM)
dNTPs (10mM)	2μl (0.2mM για κάθε ένα)
μείγμα εκκινητών Vκ1-6	6μl
εκκινητής KDE	4μl
Taq polymerase (5 units/μl)	0,5μl
ddH ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο 100 μl

Οι συνθήκες αντίδρασης είναι κοινές για τις τρεις αντιδράσεις ενίσχυσης των συμβολών IGKV-J, IGKV/KDE και IGKJ-C-INTRON-KDE. Τα στάδια της αντίδρασης PCR και οι αντίστοιχες θερμοκρασίες αναλύονται παρακάτω:

Συνθήκες αντίδρασης

Αρχική αποδιάταξη: 94°C, 5min

Κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 40 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:

φάση αποδιάταξης: 94°C, 1min

φάση σύνδεσης εκκινητών: 59°C, 1min

φάση επέκτασης μορίων DNA: 72°C, 1,5min

Τελική επέκταση συντεθειμένων μορίων DNA: 72°C, 10min

Πίνακας 2.6

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΙ(ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ)/ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ
Υπόστρωμα	DNA:1μg
RB 10x*	10μl
MgCl ₂ (50mM)	3 μl (1.5mM)
dNTPs (10mM)	2 μl (0.2mM για κάθε ένα)
εκκινητής Jkintron	3μl
εκκινητής KDE	3μl
Taq polymerase (5 units/μl)	0.5μl
ddH ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο 100μl

Στο τέλος της αντίδρασης 10μl του προϊόντος της αντίδρασης υποβάλλονται σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 3% με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr,10mg/ml) σε 1xTAE buffer. Παρατήρηση της πηκτικής αгарόζης σε UV και φωτογράφιση.

2.6 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR

Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης 3% με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr, 10mg/ml) σε ρυθμιστικό διάλυμα 1xTAE buffer. Το κομμάτι πηκτής που περιέχει τη ζώνη κόβεται και τοποθετείται σε σωληνάριο erppendorff. Για τον καθαρισμό του προϊόντος PCR από το gel αγαρόζης χρησιμοποιείται το QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) με στήλες που δεσμεύουν το προϊόν της PCR σε μεμβράνη από πηκτή σιλικόνης.

2.7 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR

Τα καθαρισμένα προϊόντα PCR αναλύθηκαν άμεσα με τη μέθοδο τερματισμού των νεοσυντεθειμένων αλυσίδων DNA με διδεοξυριβονουκλεοτίδια (μέθοδος Sanger) σε αυτόματο αναλυτή [Applied Biosystems ABI 3730 sequencer, version 1 “Big Dye” dye-terminator chemistry (ABI)]. Για την ανάλυση του antisense κλώνου χρησιμοποιήθηκαν συναινετικά ολιγονουκλεοτίδια, συμπληρωματικά με τις αλληλουχίες των γονιδίων IGKJ, ενώ για την ανάλυση του κωδικού κλώνου χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί για την αλληλουχία εκκινήτης βάσει της αλληλουχίας που προέκυψε από το πρώτο διάβασμα (αλληλουχία antisense κλώνου). Κάθε αντίδραση επαναλήφθηκε τουλάχιστον τρεις φορές σε προϊόντα PCR τριών ανεξάρτητων αντιδράσεων ενίσχυσης που είχαν πραγματοποιηθεί σε διαφορετικές ημέρες.

2.8 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΑ ΑΝΑΔΙΑΤΑΓΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΛΗΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση των αλληλουχιών μελετήθηκαν και συγκρίθηκαν με τη βοήθεια του αλγορίθμου του προγράμματος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) με τις συγγενέστερες, μη αναδιαταγμένες αλληλουχίες των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών που είναι καταχωρημένες στη βάση δεδομένων των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών του NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>, National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) και στη διεθνή βάση δεδομένων ανοσογενετικής IMGT (international ImMunoGeneTics database, <http://imgt.cines.fr>. δημιουργία και συντονισμός: Marie-Paule Lefranc, Montpellier, France). Τέλος,

υπολογίστηκε η ομολογία του κάθε γονιδίου με το αντίστοιχο του μη αναδιαταγμένο γονίδιο (germline gene).

2.9 ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ονοματολογίας της IMGT (ονοματολογία εγκεκριμένη από το HUGO, Human Genome Organization, 1999) για τα γονιδιακά τμήματα IGKV και IGJK. Το σύστημα ονοματολογίας IMGT/HUGO εκτός από το όνομα κάθε γονιδίου παρέχει επιπλέον και πληροφορίες για τον αριθμό των αλληλομόρφων και τη λειτουργικότητα του κάθε γονιδίου (ως λειτουργικά ορίζονται τα γονίδια με ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης χωρίς κωδικόνιο τερματισμού και λειτουργικά ρυθμιστικά στοιχεία, αλληλουχίες RSS ή αλληλουχίες συρραφής), καθώς και τους αριθμούς πρόσβασης των αλληλουχιών αναφοράς (reference sequences) και τον κωδικό πρόσβασης (ID) στις βάσεις δεδομένων Genome Database GDB και NCBI LocusLink, όπου έχουν κατατεθεί οι αλληλουχίες όλων των γονιδίων IGK στον άνθρωπο. Με κριτήριο τη βαρύτητα των ελαττωμάτων σε κάποια γονίδια, αυτά θεωρήθηκαν ως ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF), ψευδογονίδια ή υπολειμματικά. Με βάση την υψηλά συντηρημένη δομή της μεταβλητής περιοχής, το σύστημα IMGT χρησιμοποιεί ένα σύστημα αρίθμησης για τα κωδικόνια των γονιδίων των μεταβλητών περιοχών των ανοσοσφαιρινών. Για την αρίθμηση χρησιμοποιήθηκαν δομικά δεδομένα από περίθλαση ακτίνων X, τα όρια των περιοχών FR και CDR και ο χαρακτηρισμός των υπερμεταβλητών βρόχων. Επίσης επαναπροσδιορίστηκαν οι περιοχές FRs και CDRs.

2.9.1 ΟΙ ΑΡΧΕΣ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ ΚΑΙ ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ

Το όνομα κάθε γονιδίου συντίθεται από τέσσερα μέρη:

- Γενετικός τόπος: ορίζεται ως IGK για την κ ελαφριά αλυσίδα των ανοσοσφαιρινών.
- Ομάδα: δηλώνει τον τύπο του γονιδιακού τμήματος (V, D, J ή C) π.χ., IGKV.
- Υποομάδα: δηλώνει μια οικογένεια γονιδίων που ανήκουν στην ίδια ομάδα και η ελάχιστη ομολογία μεταξύ τους είναι 75% (π.χ., IGKV3).
- Γονίδιο: ένας αριθμός προστίθεται για να ορίσει την αλληλουχία ενός γονιδίου (π.χ., IGKV3-20).
- Αλληλόμορφο: για κάθε γονίδιο έχουν βρεθεί πολυμορφισμοί σε επίπεδο αλληλουχίας. Οι αλληλουχίες αυτές συγκρίνονται με την αλληλουχία αναφοράς (το αλληλόμορφο αυτό ορίζεται ως *01, π.χ., IGKV3-20*01).

ΟΜΑΔΑ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η ομάδα μελέτης περιλαμβάνει: (1) 291 ασθενείς με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία που παρακολουθούνται στην Αιματολογική Κλινική του ΠΓΝ «Γ. Παπανικολάου» και το Αιματολογικό Τμήμα του ΠΓΝ Νίκαιας «Ο Άγιος Παντελεήμων». Η διάγνωση των ασθενών έγινε σύμφωνα με τα κριτήρια του National Cancer Institute. (2) 101 ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα που παρακολουθούνται στην Αιματολογική Κλινική του ΠΓΝ «Γ. Παπανικολάου» και το Αιματολογικό Τμήμα του ΠΓΝ Νίκαιας «Ο Άγιος Παντελεήμων». Όλοι οι ασθενείς πληρούσαν τα κριτήρια διάγνωσης του πολλαπλού μυελώματος.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΥΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

3.1.1 Αναδιατάξεις IGKV-J

Μελετήθηκαν 188 ασθενείς με κ-Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία. Συνολικά ενισχύθηκαν 219 κλωνικές αναδιατάξεις IGKV-J. Τριάντα μία περιπτώσεις (16.5%) έφεραν διπλές αναδιατάξεις, ενώ σε 14/188 (7.44%) περιπτώσεις οι αναδιατάξεις αυτές ήταν εντός πλαισίου ανάγνωσης (in-frame, IF). Διπλά IF μετάγραφα ανιχνεύθηκαν μόνο σε 3/188 περιπτώσεις (1.6%).

Αναγνωρίστηκαν είκοσι ένα λειτουργικά γονίδια IGKV των υποομάδων IGKV1-4 σε 191 IF μετάγραφα IGKV-J. Το γονίδιο IGKV3-20 ήταν το συχνότερο γονίδιο IGKV (29/191 αλληλουχίες, 15.3%), ακολουθούσαν τα IGKV1-39/1D-39 (25/191, 13.1%), IGKV1-5 (20/191, 10.5%), IGKV4-1 (19/191, 10%) και τα IGKV2-30 και IGKV3-11 (13/191 αλληλουχίες το καθένα, 6.8%) (Πίνακας 3.1-Εικόνα 3.1).

Πίνακας 3.1 Ρεπερτόριο γονιδίων IGKV σε μεταγραφόμενες, εντός πλαισίου αναδιατάξεις IGKV-J στην κ-ΧΛΛ.

Γονίδια IGKV	No	%
IGKV1-12	5	2.6
IGKV1-13/1D-13	2	1.1
IGKV1-16	2	1.1
IGKV1-17	5	2.6
IGKV1-27	7	3.65
IGKV1-33/1D-33	7	3.65
IGKV1-39/1D-39	25	13
IGKV1-5	20	10.5
IGKV1-6	2	1.1
IGKV1-8	12	6.8
IGKV1-9	5	2.6
IGKV1D-16	1	0.5
IGKV2-24	3	1.6
IGKV2-28/2D-28	7	3.65
IGKV2-30	13	6.8
IGKV2D-29	3	1.6
IGKV2D-30	1	0.5
IGKV3-11	13	6.8
IGKV3-15	10	5.2
IGKV3-20	29	15.2
IGKV4-1	19	9.9
Σύνολο	191	100

Εικόνα 3.1 Έξι γονίδια IGKV συμμετέχουν στο 63.5% των μεταγραφόμενων, IF αναδιατάξεων IGKV-J στην κ-ΧΛΛ.

Το IGKJ2 ήταν το συχνότερο IGKJ γονίδιο, ενώ ακολουθούσαν κατά σειρά τα IGKJ1, IGKJ4, IGKJ3 και IGKJ5. Σε 60/191 αναδιατάξεις παρατηρήθηκε χρησιμοποίηση των γονιδίων IGKJ3-5 (31.4%).

Δεκαπέντε γονίδια IGKV αναγνωρίστηκαν στις υπόλοιπες 28 αναδιατάξεις IGKV-J, οι οποίες δεν εκφραζόταν επειδή είχαν αναδιαταχθεί εκτός πλαισίου ανάγνωσης (18/28 περιπτώσεις, 64%) και/ή δεν είχαν μεταγραφεί (23/28 περιπτώσεις, 82%). Συχνότερα ήταν τα γονίδια IGKV4-1 (9/28 αλληλουχίες, 32%) και IGKV2-30 (3/28, 10.7%) (Πίνακας 3.2-Εικόνα 3.2).

Πίνακας 3.2 Ρεπερτόριο γονιδίων IGKV σε εκτός πλαισίου ή/και μη μεταγραφόμενες αναδιατάξεις IGKV-J στην κ-ΧΛΛ.

Γονίδια IGKV	No	%
IGKV1-12	1	3.57
IGKV1-16	1	3.57
IGKV1-33/1D-33	2	7.1
IGKV1-39/1D-39	1	3.57
IGKV2-28/2D-28	1	3.57
IGKV2-29	1	3.57
IGKV2-30	3	10.7
IGKV2-40/2D-40	1	3.57
IGKV2D-26	1	3.57
IGKV2D-29	1	3.57
IGKV3-11	1	3.57
IGKV3-15	2	7.1
IGKV3-20	2	7.1
IGKV3D-15	1	3.57
IGKV4-1	9	32.1
Σύνολο	28	100

Εικόνα 3.2 Πέντε γονίδια IGKV συμμετέχουν στο 74.1% των εκτός πλαισίου ή/και μη μεταγραφόμενων αναδιατάξεων IGKV-J στην κ-ΧΛΛ.

Σημαντικές διαφορές αναγνωρίστηκαν μεταξύ εκφραζόμενων και μη εκφραζόμενων αναδιατάξεων IGKV-J. Τα γονίδια IGKV3-20, IGKV1-5 και IGKV1-39/1D-39 επικρατούσαν στο εκφραζόμενο ρεπερτόριο, αντίθετα από το γονίδιο IGKV4-1, που επικρατούσε στις μη εκφραζόμενες αναδιατάξεις.

Κλωνικές αναδιατάξεις IGKV-J ενισχύθηκαν σε 64/103 περιπτώσεις (62%) με λ-ΧΛΛ. Πέντε περιπτώσεις είχαν 2 διαφορετικές αναδιατάξεις. Σε αυτές τις περιπτώσεις κάθε αναδιάταξη περιελάμβανε ένα διαφορετικό γονίδιο IGKV. Αναγνωρίστηκαν δεκαεννιά διαφορετικά γονίδια των υποομάδων IGKV1-5. Το γονίδιο IGKV4-1 ήταν το συχνότερο γονίδιο IGKV (15/69 αλληλουχίες, 21.7%), ακολουθούσαν τα γονίδια IGKV1-33/1D-33 (9/69, 13%), IGKV1-39/1D-39, IGKV2-30 και IGKV1-16 (7/69 αναδιατάξεις το καθένα, 10%) (Πίνακας 3.3-Εικόνα 3.3).

Πίνακας 3.3 Ρεπερτόριο γονιδίων IGKV σε μη εκφραζόμενες αναδιατάξεις IGKV-J στη λ-ΧΛΛ.

Γονίδια IGKV	No	%
IGKV1-13/1D-13	1	1.45
IGKV1-16	7	10.15
IGKV1-17	1	1.45
IGKV1-27	1	1.45
IGKV1-33/1D-33	9	13.05
IGKV1-37/1D-37	5	7.25
IGKV1-39/1D-39	7	10.15
IGKV1-5	1	1.45
IGKV1-9	1	1.45
IGKV1D-17	2	2.9
IGKV2-28/2D-28	1	1.45
IGKV2-29	1	1.45
IGKV2-30	7	10.15
IGKV3-11	2	2.9
IGKV3-15	3	4.3
IGKV3-20	1	1.45
IGKV3D-11	2	2.9
IGKV4-1	15	21.7
IGKV5-2	2	2.9
Σύνολο	69	100

Εικόνα 3.3 Έξι γονίδια IGKV συμμετέχουν στο 72.45% των μη εκφραζόμενων αναδιατάξεων IGKV-J στη λ-ΧΛΛ.

Σε 10/64 περιπτώσεις λ-ΧΛΛ με αναδιατάξεις IGKV-J ανιχνεύθηκαν μετάγραφα IGKV-J. Τέσσερα από τα 10 μετάγραφα ήταν εντός πλαισίου ανάγνωσης (IF). Στις τέσσερις περιπτώσεις λ-ΧΛΛ με IF μετάγραφα IGKV-J, η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής και ανοσοιστοχημεία έδειξε πως είχε διατηρηθεί η μονοτυπική έκφραση ανοσοσφαιρίνης. Σε πέντε από τις δέκα περιπτώσεις λ-ΧΛΛ με μετάγραφα IGKV-J τα δύο αλληλόμορφα KDE ήταν μη αναδιαταγμένα. Για τις υπόλοιπες αλληλουχίες υπήρχαν ενδείξεις για μονοαλληλική αναδιάταξη του KDE (2 περιπτώσεις με αναδιατάξεις IGKV-KDE και 3 περιπτώσεις με αναδιατάξεις IGKV-C-INTRON-KDE). Σημαντικές διαφορές στο ρεπερτόριο των γονιδίων IGKV ανιχνεύθηκαν μεταξύ εκφραζόμενων και μη εκφραζόμενων αναδιατάξεων IGKV-J στην κ έναντι της λ-ΧΛΛ, αντίστοιχα (Εικόνα 3.4). Έτσι, τα γονίδια IGKV3-20 και IGKV1-5 ήταν σαφώς συχνότερα στο εκφραζόμενο ρεπερτόριο της κ-ΧΛΛ (χ^2 test, $p < 0.01$). Αντίθετα τα γονίδια IGKV4-1, IGKV1-16, IGKV1-33/1D-33 και IGKV1-37/1D-37 υπεραντιπροσωπεύονταν στις μη εκφραζόμενες αναδιατάξεις IGKV-J της λ-ΧΛΛ (χ^2 test, $p < 0.05$).

Εικόνα 3.4 Σύγκριση του ρεπερτορίου των γονιδίων IGKV μεταξύ εκφραζόμενων και μη εκφραζόμενων αναδιατάξεων IGKV-J στην κ έναντι της λ-ΧΛΛ.

Η πλήρης ανάλυση της περιοχής KCDR3 ήταν δυνατή σε 62/69 αναδιατάξεις IGKV-J. Είκοσι τέσσερις συμβολές IGKV-J (38.7%) είχαν αναδιαταχθεί εντός πλαισίου. Μια από τις IF, μη μεταγραφόμενες αναδιατάξεις χρησιμοποιούσε το γονίδιο IGKV1-37/1D-37, που περιέχει γλυκίνη αντί για κυστείνη στη θέση 104 της περιοχής FR3. Τρεις αναδιατάξεις είχαν απενεργοποιηθεί λειτουργικά εξαιτίας της εκτεταμένης δράσης 5' ή 3' εξωνουκλεάσης, που οδήγησε σε απαλοιφή της κυστείνης της θέσης 104 στην περιοχή FR3 ή της φαινυλαλανίνης στη θέση 118 της περιοχής FR4. Το IGKJ4 ήταν το συχνότερο IGKJ γονίδιο, ενώ ακολουθούσαν κατά σειρά τα IGKJ2, IGKJ1, IGKJ3 και IGKJ5. Συνολικά, παρατηρήθηκε χρησιμοποίηση των γονιδίων IGKJ3-5 σε 34/62 αναδιατάξεις (54.8%).

3.1.2 Σύγκριση των αλληλουχιών με τις δημόσιες βάσεις δεδομένων

Οι αλληλουχίες IGKV-J συγκρίθηκαν με όλες τις αλληλουχίες από τη βάση αλληλουχιών IMGT/LIGM-DB (<http://imgt.cines.fr/cgi-bin/IMGTElect.jv>). Ανασύρθηκαν από τις δημόσιες βάσεις δεδομένων 1747 αλληλουχίες IGKV-J από φυσιολογικές περιπτώσεις (Εικόνα 3.5) και από 407 περιπτώσεις «άνοσης δυσλειτουργίας» (Εικόνα 3.6).

Εικόνα 3.5 Ρεπερτόριο των γονιδίων IGKV σε φυσιολογικά Β λεμφοκύτταρα. Προέλευση αλληλουχιών: GenBank/EMBL, LIGM-DB.

Εικόνα 3.6 Ρεπερτόριο των γονιδίων IGKV σε αυτοαντιδραστικά Β λεμφοκύτταρα και καταστάσεις «άνοσης δυσλειτουργίας» (π.χ., άσθμα, αλλεργία). Προέλευση αλληλουχιών: GenBank/EMBL, LIGM-DB.

Με την ανάλυση αυτή αναγνωρίστηκαν υποομάδες με παρόμοιες αλληλουχίες με ιδιαίτερα ομόλογες περιοχές CDR3 που περιλαμβάνουν κυρίως ή αποκλειστικά αλληλουχίες ασθενών με ΧΛΛ.

Ειδικότερα, στην κ-ΧΛΛ: (i) μεταξύ 13 αναδιατάξεων του γονιδίου IGKV2-30 στη ΧΛΛ (παρούσα μελέτη) και σε άλλες οντότητες (μη ΧΛΛ), οκτώ αλληλουχίες IGKV2-30-IGKJ2 ΧΛΛ της παρούσας μελέτης (6/7 μεταλλαγμένες) είχαν σχεδόν παρόμοια, όξινη, περιοχή KCDR3 (MQGT[H/Y]W[+/-P][P/G]YT) (Εικόνα 3.7).

Σύνολο 1	IGKV	IGKJ	KCDR3
P103	IGKV2-30	IGKJ2	MQGTHWPPYT
P1422	IGKV2-30	IGKJ2	-----
P2451	IGKV2-30	IGKJ2	-----
P1939	IGKV2-30	IGKJ2	-----
P2920	IGKV2-30	IGKJ2	-----
P3020	IGKV2-30	IGKJ2	---S---
P907	IGKV2-30	IGKJ2	----Y--

Εικόνα 3.7 Στερεότυπες αναδιατάξεις IGKV2-30-IGKJ2 της παρούσας μελέτης.

(ii) μεταξύ 25 αναδιατάξεων του γονιδίου IGKV1-39/1D-39 στη ΧΛΛ (παρούσα μελέτη) και σε άλλες οντότητες (μη ΧΛΛ), αναγνωρίστηκαν δύο ομόλογες ομάδες. Η πρώτη περιλάμβανε 3 αμετάλλακτες αναδιατάξεις ΧΛΛ IGKV1-39/1D-39-IGKJ2 από τη δική μας μελέτη με παρόμοια, όξινη περιοχή KCDR3 (QQSYSTPPYT μήκους 10 αμινοξέων), όλες συνδυασμένες με αμετάλλακτο γονίδιοIGHV1 (Εικόνα 3.8).

Σύνολο 2α	IGKV	IGKJ	KCDR3
P1986	IGKV1-39/1D-39	IGKJ2	QQSYSTPPYT
N1457	IGKV1-39/1D-39	IGKJ2	-----
P439	IGKV1-39/1D-39	IGKJ2	-----

Εικόνα 3.8 Στερεότυπες αναδιατάξεις IGKV1-39/1D-39-IGKJ2 της παρούσας μελέτης.

Η δεύτερη ομάδα περιλάμβανε 6 αμετάλλακτες αναδιατάξεις ΧΛΛ IGKV1-39/1D-39-IGKJ1/4 με παρόμοια, όξινη περιοχή KCDR3 [QQSYSTPL(P)T] (Εικόνα 3.9).

Σύνολο 2β	IGKV	IGKJ	KCDR3
P1114	IGKV1-39/1D-39	IGKJ4	QQSYSTPLT
P1615	IGKV1-39/1D-39	IGKJ1	-----P-
P191	IGKV1-39/1D-39	IGKJ4	-----
N235	IGKV1-39/1D-39	IGKJ4	-----
P2446	IGKV1-39/1D-39	IGKJ1	-----R-
P242	IGKV1-39/1D-39	IGKJ1	-----R-

Εικόνα 3.9 Στερεότυπες αναδιατάξεις IGKV1-39/1D-39-IGKJ1/4 της παρούσας μελέτης.

Όμοια, όξινη περιοχή KCDR3 αναγνωρίστηκε σε 5 IGKV1-39/1D-39 αλληλουχίες της δημόσιας βάσης δεδομένων (AJ399870, AF306388, L12112, X98985, L12065), όλες προερχόμενες από κύτταρα με δράση αντι-θυρεοδικής υπεροξειδάσης⁽⁹³⁻⁹⁵⁾.

(iii) Μεταξύ 20 αναδιατάξεων του γονιδίου IGKV1-5 στη ΧΛΛ (παρούσα μελέτη) και σε άλλες οντότητες (μη ΧΛΛ), 4 αλληλουχίες IGKV1-5-IGKJ1/3 ΧΛΛ από την παρούσα μελέτη (3 αμετάλλακτες) είχαν παρόμοια, όξινη περιοχή KCDR3 (QQYNSYP[W/F]T)(Εικόνα 3.10).

Σύνολο 3	IGKV	IGKJ	KCDR3
N31	IGKV1-5	IGKJ1	QQYNSYPWT
N232	IGKV1-5	IGKJ1	-----
N1622	IGKV1-5	IGKJ1	-----
P1289	IGKV1-5	IGKJ3	-----F-

Εικόνα 3.10 Στερεότυπες αναδιατάξεις IGKV1-5-IGKJ1/3 της παρούσας μελέτης.

Επίσης, στην παρούσα μελέτη αναγνωρίστηκαν δύο ομόλογα IF μετάγραφα αναδιατάξεων IGKV1-17-IGKJ4. Η πρώτη ανιχνεύθηκε σε έναν ασθενή με λ-ΧΛΛ που εκφράζει βαριά αλυσίδα IGHV6-1. Η δεύτερη ενισχύθηκε παράλληλα με μια μεταγραφόμενη IF αναδιάταξη IGKV1-39/1D-39 σε μια ασθενή με κ-ΧΛΛ που εξέφραζε αμετάλλακτη βαριά αλυσίδα IGHV4-39/IGHD6-13/IGHJ2 και εμφάνιζε μεταστροφή ισotyπου σε IgG. Περιπτώσεις IgG+ με ομόλογους, αμετάλλακτους υποδοχείς IGHV4-39-IGKV1-39/1D-39 έχουν αναφερθεί πρόσφατα από τρεις διαφορετικές ερευνητικές ομάδες⁽⁹⁶⁻⁹⁸⁾. Οι δύο ομόλογες αναδιατάξεις IGKV1-17-IGKJ4 από την παρούσα μελέτη είχαν ταυτόσημη περιοχή KCDR3 (LQHNSYPLT) με δύο αλληλουχίες από τις δημόσιες βάσεις αλληλουχιών (GenBank accession

numbers L33034, AF007572) που προέρχονται από αντι-DNA αντισώματα με ειδικότητα εναντίον των αιμοπεταλίων^(99,27)(Εικόνα 3.11α). Αυτά τα αντισώματα χρησιμοποιούσαν γονίδια της υποομάδας IGHV3 (IGHV3-11 και IGHV3-23, αντιστοίχως) ^(99,27) και έφεραν διαφορετικά HCDR3s. Τέλος, μια μεταλλαγμένη, μη-μεταγραφόμενη IF αναδιάταξη IGKV1-39/1D-39-IGKJ2 από μια περίπτωση λ-ΧΛΛ της παρούσας μελέτης (που εκφράζει βαριά αλυσίδα IGHV3-30) ήταν ομόλογη με την κ ελαφριά αλυσίδα (L12108) ενός αντισώματος εναντίον της θυρεοειδικής υπεροξειδάσης (anti-TPO)⁽¹⁰⁰⁾(Εικόνα 3.11β). Το συγκεκριμένο αντίσωμα χρησιμοποιεί βαριά αλυσίδα IGHV1-3 (L12109).

A.

		IGKV	IGKJ	KCDR3
P242	ΧΛΛ κ	IGKV1-17	IGKJ4	LQHNSSYPPLT
P1597	ΧΛΛ λ	IGKV1-17	IGKJ4	----- --
AF007572	Anti-DNA	IGKV1-17	IGKJ4	----- --
L33034	Anti-DNA	IGKV1-17	IGKJ4	----- --

B.

		IGKV	IGKJ	KCDR3
N1857	ΧΛΛ λ	IGKV1-39/D-39	IGKJ2	QQSYHTPYT
L12108	Anti-TPO	IGKV1-39/D-39	IGKJ2	----G----

Εικόνα 3.11 α) Πανομοιότυπες αμινοξικές αλληλουχίες δύο ομόλογων αναδιατάξεων της παρούσας μελέτης (P1597,P242) με δύο αλληλουχίες από τις δημόσιες βάσεις αλληλουχιών (L33034, AF007572). β) Πανομοιότυπες αλληλουχίες μιας αναδιάταξης της παρούσας μελέτης (N1857) με μια αλληλουχία από τις δημόσιες βάσεις αλληλουχιών (L12108).

3.1.3 Αναδιατάξεις της αλληλουχίας KDE

Εξετάσθηκαν 170 περιπτώσεις κ-ΧΛΛ για μη παραγωγικές αναδιατάξεις IGKV-KDE και IGKJ-C-INTRON-KDE. Συνολικά, σε 50/170 περιπτώσεις (29.4%) η ανάλυση με PCR προσέφερε ενδείξεις για αναδιατάξεις της αλληλουχίας KDE μόνο στο ένα αλληλόμορφο, που οδήγησαν σε απενεργοποίηση του γενετικού τόπου IGK στο συγκεκριμένο αλληλόμορφο. Αναλυτικότερα, είκοσι τέσσερις περιπτώσεις (14%) έφεραν αναδιατάξεις IGKV-KDE. Η ανάλυση της αλληλουχίας ήταν δυνατή σε 22/24 αναδιατάξεις IGKV-KDE και αποκάλυψε συχνή χρησιμοποίηση του γονιδίου IGKV1D-43 (4/22 περιπτώσεις, 18.1%), το οποίο εμφανιζόταν σπάνια τόσο στο εκφραζόμενο όσο και στο μη εκφραζόμενο ρεπερτόριο της ΧΛΛ (Πίνακας 3.4-Εικόνα 3.12). Αναδιατάξεις IGKJ-C-INTRON-KDE ενισχύθηκαν σε 26/170 (15.3%) περιπτώσεις.

Πίνακας 3.4 Ρεπερτόριο των γονιδίων IGKV στις αναδιατάξεις IGKV-KDE της κ-ΧΛΛ.

Γονίδια IGKV	No	%
IGKV1-13/1D-13	1	4.55
IGKV1-16	2	9.09
IGKV1-17	1	4.55
IGKV1-5	1	4.55
IGKV1-8	1	4.55
IGKV1D-12	2	9.09
IGKV1D-43	4	18.18
IGKV2-30	1	4.55
IGKV3-15	3	13.64
IGKV3-20	1	4.55
IGKV3D-1	1	4.55
IGKV4-1	2	9.09
IGKV5-2	2	9.09
Σύνολο	22	100

Εικόνα 3.12 Έξι γονίδια IGKV συμμετέχουν στο 68.18% των αναδιατάξεων IGKV-KDE της κ-ΧΛΛ.

Εξετάσθηκαν 100 περιπτώσεις με λ-ΧΛΛ για μη παραγωγικές αναδιατάξεις IGKV-KDE και IGKV-C-INTRON-KDE. Αναδιατάξεις IGKV-KDE ενισχύθηκαν σε 60/100 (60%) περιπτώσεις λ-ΧΛΛ. Μια περίπτωση έφερε αναδιατάξεις IGKV-KDE και στα δύο αλληλόμορφα. Δεδομένα από την ανάλυση της αλληλουχίας ήταν διαθέσιμα σε 56 αναδιατάξεις και αποκάλυψαν συχνή χρησιμοποίηση των γονιδίων IGKV3-20 και 2-30 (9/56 και 8/56 περιπτώσεις, αντίστοιχα) (Πίνακας 3.5-Εικόνα 3.13). Το γονίδιο

IGKV4-1 χρησιμοποιήθηκε μόλις σε 3/56 αλληλουχίες. Αναδιατάξεις IGKJ-C-INTRON-KDE ενισχύθηκαν σε 54/100 περιπτώσεις που αναλύθηκαν (54%): μια περίπτωση έφερε αναδιατάξεις IGKJ-C-INTRON-KDE και στα δύο αλληλόμορφα.

Πίνακας 3.5 Ρεπερτόριο των γονιδίων IGKV στις αναδιατάξεις IGKV-KDE της λ-ΧΛΛ.

Γονίδια IGKV	No	%
IGKV1-12	2	3.57
IGKV1-16	2	3.57
IGKV1-17	2	3.57
IGKV1-27	3	5.36
IGKV1-33/1D-33	4	7.14
IGKV1-39/1D-39	2	3.57
IGKV1-5	4	7.14
IGKV1-6	1	1.79
IGKV1-8	1	1.79
IGKV1D-12	1	1.79
IGKV1D-13	1	1.79
IGKV1D-43	1	1.79
IGKV2-24	1	1.79
IGKV2-28/2D-28	2	3.57
IGKV2-30	8	14.29
IGKV2D-26	3	5.36
IGKV2D-30	2	3.57
IGKV3-11	1	1.79
IGKV3-20	9	6.07
IGKV3D-11	1	1.79
IGKV4-1	3	5.36
IGKV5-2	1	1.79
IGKV7-3	1	1.79
Σύνολο	56	100

Εικόνα 3.13 Τέσσερα γονίδια IGKV συμμετέχουν στο 44.64% των αναδιατάξεων IGKV-KDE της λ-ΧΛΛ .

3.1.4 Πολλαπλές αναδιατάξεις του γενετικού τόπου IGK

Αναλύθηκαν 170 περιπτώσεις κ-ΧΛΛ τόσο για αναδιατάξεις IGKV-J όσο και για αναδιατάξεις με το KDE. Εκατόν τέσσερις περιπτώσεις (61.2%) έφεραν μονοαλληλικές αναδιατάξεις του γενετικού τόπου IGK υπό μορφή μιας μόνο συμβολής IGKV-J (Πίνακας 3.6). Ενδείξεις για αναδιατάξεις του γενετικού τόπου IGK και στα δύο αλληλόμορφα βρέθηκαν σε: (i) 50/170 περιπτώσεις (29.4%) που έφεραν μια αναδιάταξη με το KDE και μια εκφραζόμενη αναδιάταξη IGKV-J (Πίνακας 3.6) και (ii) 3/170 περιπτώσεις (1.8%) με διπλές αναδιατάξεις IGKV-J που χρησιμοποιούσαν το ίδιο γονίδιο IGKJ και στις δύο συμβολές IGKV-J. Στις υπόλοιπες 13 περιπτώσεις κ-ΧΛΛ με διπλές συμβολές IGKV-J, με βάση τόσο την ανάλυση του ρεπερτορίου των γονιδίων IGKV και IGKJ όσο και την εντόπιση και τον τρόπο ανασυνδυασμού (με απαλοιφή ή με αναστροφή) των γονιδίων IGKV που αναγνωρίστηκαν στις δύο αναδιατάξεις, ενδείξεις για αναδιάταξη του γενετικού τόπου IGK και στα δύο αλληλόμορφα προέκυψαν σε 12/13 περιπτώσεις. Τέλος, σε μια περίπτωση και οι δυο αναδιατάξεις θα μπορούσε να έχουν συμβεί διαδοχικά είτε στο ένα είτε και στα δύο αλληλόμορφα IGK .

Εκατό περιπτώσεις λ-ΧΛΛ αναλύθηκαν τόσο για αναδιατάξεις IGKV-J όσο και για αναδιατάξεις με το KDE. Μόνο σε τρεις περιπτώσεις (3%) δεν ανιχνεύθηκαν αναδιατάξεις του γενετικού τόπου IGK, τριάντα τρεις περιπτώσεις έφεραν μια αναδιάταξη, ενώ 44 και 20 περιπτώσεις, αντιστοίχως, έφεραν δύο ή τρεις αναδιατάξεις (Πίνακας 3.6).

Σε 19/64 περιπτώσεις λ-ΧΛΛ με πολλαπλές αναδιατάξεις στο γενετικό τόπο IGK, με βάση τη χρησιμοποίηση των γονιδίων IGKV και IGKJ αλλά και το είδος της

αναδιάταξης με το KDE (IGKV-KDE ή JKI-KDE), θα ήταν αδύνατο να προσδιοριστεί με βεβαιότητα εάν οι αναδιατάξεις που ανιχνεύθηκαν συνέβησαν στο ένα ή και στα δύο αλληλόμορφα IGK. Με την λογική που περιγράφηκε παραπάνω, στις υπόλοιπες περιπτώσεις (45/64) βρέθηκαν ενδείξεις που ενίσχυσαν την υπόθεση αναδιατάξεων του γενετικού τόπου IGK και στα δύο αλληλόμορφα.

Στις περιπτώσεις λ-ΧΛΛ με αναδιατάξεις του KDE και στα δύο αλληλόμορφα, ο γενετικός τόπος IGK είχε καταστεί ανενεργός, εμποδίζοντας έτσι την έκφραση μιας προϋπάρχουσας, εντός πλαισίου συμβολής IGKV-J. Αυτό ίσως ερμηνεύει την αποτυχία έκφρασης μιας λειτουργικής κ ελαφριάς αλυσίδας, τουλάχιστον σε σημαντικό ποσοστό περιπτώσεων (9/18) που έφεραν εντός πλαισίου αναδιατάξεις IGKV-J παράλληλα με αναδιατάξεις του KDE και στα δύο αλληλόμορφα. Η ανάλυση με τη μέθοδο RT-PCR απέδειξε ότι καμία από αυτές τις αναδιατάξεις IGKV-J δεν μεταγραφόταν.

Πίνακας 3.6 Αναδιατάξεις του γενετικού τόπου IGK στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία.

Είδος Αναδιάταξης	κ-ΧΛΛ (n=170)	λ-ΧΛΛ (n=100)
	%	%
Καμία αναδιάταξη	0	3
IGKV-J	61.2	12
IGKV-KDE	0	15
IGKJ-C-INTRON-KDE	0	6
IGKV-J + IGKV-J	10	3
IGKV-J + IGKV-KDE	10.6	12
IGKV-J + IGKJ-C-INTRON-KDE	11.2	15
IGKV-KDE + IGKV-KDE	0	1
IGKJ-C-INTRON-KDE + IGKJ-C-INTRON-KDE	0	1
2 IGKV-J + IGKV-KDE	3.5	0
2 IGKV-J + IGKJ-C-INTRON-KDE	3.5	1
IGKV-KDE + IGKJ-C-INTRON-KDE	0	13
IGKV-J + IGKV-KDE + IGKJ-C-INTRON-KDE	0	18

3.1.5 Ανάλυση σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης

Στην κ-ΧΛΛ, 62/36/93 εντός πλαισίου (IF) μετάγραφα IGKV-J είχαν, αντιστοίχως, ομολογία 100/98-99.6/<98% με τα πιο συγγενικά γονίδια της γαμετικής σειράς. Μεταξύ των μη εκφραζόμενων αναδιατάξεων IGKV-J στην κ-ΧΛΛ, 15/3/10 είχαν

100/98-99.6/<98% ομολογία με τα πιο συγγενικά γονίδια της γαμετικής σειράς, αντίστοιχα. Τέσσερα από τα έξι εκτός πλαισίου μετάγραφα IGKV-J ήταν μεταλλαγμένα, με ομολογία από 90.4% έως 96%. Τρία από τα έξι έφεραν διαγραφές/ενθέσεις νουκλεοτιδίων στην κωδικοποιητική αλληλουχία. Επιπλέον, σε 4/6 περιπτώσεις οι αλληλουχίες έφεραν ένα ή περισσότερα κωδικόνια τερματισμού. Στις περιοχές πλαισίου (FRs) παρατηρήθηκε υψηλή αναλογία μεταλλάξεων αντικατάστασης (R: replacement) προς σιωπηλές μεταλλάξεις (S: silent) (R/S>2), γεγονός που υποδηλώνει πως αυτές οι αναδιατάξεις μάλλον δεν είχαν επιλεγεί θετικά από αντιγόνο.

Στην λ-Χ/Λ, 43/22/4 αναδιατάξεις IGKV-J είχαν, αντιστοίχως, ομολογία 100/98-99.6/<98%, με τα πιο συγγενικά γονίδια της γαμετικής σειράς. Δύο από τις 4 μεταλλαγμένες, μη εκφραζόμενες αναδιατάξεις ήταν εντός πλαισίου. Η αναζήτηση σε δημόσιες βάσεις δεδομένων (GenBank, LIGM-DB) έδειξε ότι η αλληλουχία των εν λόγω αναδιατάξεων ήταν ομόλογη με την αλληλουχία αναδιατάξεων που εκφράζονταν από αυτοαντιδραστικά κύτταρα.

3.2 ΠΟΛΛΑΠΛΟΥΝ ΜΥΕΛΩΜΑ

3.2.1 Αναδιατάξεις IGKV-J

Σε 43 περιπτώσεις πολλαπλού μυελώματος που εξέφραζαν κ-ελαφριά αλυσίδα (κ-ΠΜ) ενισχύθηκαν 52 κλωνικές αναδιατάξεις IGKV-J. Εννέα περιπτώσεις έφεραν διπλές αναδιατάξεις, ενώ διπλά εντός πλαισίου (IF) μετάγραφα ανιχνεύθηκαν σε μια περίπτωση (Πίνακας 3.7-Εικόνα 3.14).

Πίνακας 3.7 Ρεπερτόριο των γονιδίων IGKV στις αναδιατάξεις του κ-ΠΜ.

Γονίδια IGKV	No	%
IGKV1-12	1	1.92
IGKV1-27	1	1.92
IGKV1-5	3	5.77
IGKV1-6	1	1.92
IGKV1-8	1	1.92
IGKV1-9	1	1.92
IGKV1-33/1D-33	7	13.46
IGKV1-39/1D-39	8	15.38
IGKV1D-43	1	1.92
IGKV2-24	1	1.92
IGKV2-30	2	3.85
IGKV2-28/2D-28	2	3.85
IGKV2-40/2D-40	1	1.92
IGKV3-15	4	7.69
IGKV3-20	6	11.54
IGKV4-1	12	23.08
Σύνολο	52	100

Εικόνα 3.14 Τέσσερα γονίδια IGKV συμμετέχουν στο 63.5% των αναδιατάξεων IGKV-J κ-ΠΜ.

Στα 42 IF μετάγραφα IGKV-J αναγνωρίσθηκαν δεκαέξι λειτουργικά γονίδια IGKV των υποομάδων IGKV1-4. Συνολικά, 28/42 αναδιατάξεις IGKV-J (66.6%) χρησιμοποιούσαν γονίδια IGKV από το «εγγύς» σε σχέση με την περιοχή JcCk άθροισμα γονιδίων (J-proximal cluster), ενώ μόνο μια αναδιάταξη (2.4%) που χρησιμοποιούσε το γονίδιο IGKV2D-40 από το «άπω» άθροισμα γονιδίων (J-distal cluster). Σε 14/43 περιπτώσεις (31%) δεν μπορούσε να διευκρινιστεί το άθροισμα στο οποίο ανήκαν τα γονίδια, επειδή πολλά γονίδια από το J-distal cluster είναι πανομοιότυπα με γονίδια από το J-proximal cluster και τα μέλη των ζευγαριών αυτών δε διακρίνονται. Το γονίδιο IGKV4-1 επικρατούσε στα IF μετάγραφα, ενώ ακολουθούσαν τα IGKV1-39/1D-39, IGKV1-33/1D-33 και IGKV3-20(Πίνακας 3.8-Εικόνα 3.15).

Πίνακας 3.8 Ρεπερτόριο των γονιδίων IGKV στις εκφραζόμενες αναδιατάξεις του κ-ΠΜ.

Γονίδια IGKV	No	%
IGKV1-12	1	2.38
IGKV1-27	1	2.38
IGKV1-5	3	7.14
IGKV1-6	1	2.38
IGKV1-9	1	2.38
IGKV1-33/1D-33	6	14.29
IGKV1-39/1D-39)	6	14.29
IGKV2-24	1	2.38
IGKV2-30	2	4.76
IGKV2-28/2D-28	2	4.76
IGKV2-40/2D-40	1	2.38
IGKV3-15	4	9.52
IGKV3-20	5	11.91
IGKV4-1	8	19.05
Σύνολο	42	100

Εικόνα 3.15 Πέντε γονίδια IGKV συμμετέχουν στο 69% των IF αναδιατάξεων IGKV-J κ-ΠΜ.

Έξι διαφορετικά γονίδια IGKV αναγνωρίστηκαν σε δέκα εκτός πλαισίου και/ή μη μεταγραφόμενες αναδιατάξεις IGKV-J: το γονίδιο IGKV4-1 χρησιμοποιήθηκε σε 4/10 περιπτώσεις (Πίνακας 3.9). Τα γονίδια IGKV1-2 κυριαρχούσαν (36/52 αναδιατάξεις, 69.2%), όπως και στο φυσιολογικό ρεπερτόριο⁽¹⁰¹⁻¹⁰²⁾.

Πίνακας 3.9 Ρεπερτόριο των γονιδίων IGKV σε OF, μη μεταγραφόμενες αναδιατάξεις IGKV-J στο κ-ΠΜ.

Γονίδια IGKV	No	%
IGKV1-8	1	10
IGKV1-33/1D-33	1	10
IGKV1-39/1D-39	2	20
IGKV1D-43	1	10
IGKV3-20	1	10
IGKV4-1	4	40
Σύνολο	10	100

Σε 17 περιπτώσεις πολλαπλού μυελώματος που εξέφραζαν λ-ελαφριά αλυσίδα (λ-ΠΜ) ενισχύθηκαν 19 κλωνικές αναδιατάξεις IGKV-J: δύο περιπτώσεις έφεραν διαφορετικές αναδιατάξεις. Αναγνωρίστηκαν δέκα διαφορετικά γονίδια των υποομάδων IGKV1/2/3/4/7. Το γονίδιο IGKV4-1 επικρατούσε, ενώ ακολουθούσαν τα IGKV1-33/1D-33 και IGKV1-39/1D-39 (Πίνακας 3.10-Εικόνα 3.16). Οκτώ από τις 19 αναδιατάξεις (42%) ήταν εντός πλαισίου, ενώ 11/19 αναδιατάξεις (58%) ήταν εκτός πλαισίου. Τα γονίδια IGKV3-IGKV5 χρησιμοποιήθηκαν σε 8/19 περιπτώσεις (42%).

Πίνακας 3.10 Ρεπερτόριο των γονιδίων IGKV στις αναδιατάξεις IGKV-J του λ-ΠΜ.

Γονίδια IGKV	Νο	%
IGKV1-12	1	5.26
IGKV1-5	1	5.26
IGKV1-33/1D-33	3	15.79
IGKV1-37/1D-37	2	10.53
IGKV1-39/1D-39	3	15.79
IGKV2-30	2	10.53
IGKV2D-29	1	5.26
IGKV3-20	1	5.26
IGKV4-1	4	21.05
IGKV7-3	1	5.26
Σύνολο	19	100

Εικόνα 3.16 Πέντε γονίδια IGKV συμμετέχουν στο 73.7% των αναδιατάξεων IGKV-J λ-ΠΜ.

3.2.2 Αναδιατάξεις της αλληλουχίας KDE

Εξετάσθηκαν 43 περιπτώσεις κ-ΠΜ για μη παραγωγικές αναδιατάξεις IGKV-KDE και IGKJ-C-INTRON-KDE. Εννέα από τις 43 περιπτώσεις (20.9%) έφεραν αναδιατάξεις IGKV-KDE. Αναδιατάξεις IGKJ-C-INTRON-KDE ενισχύθηκαν σε 8/43 περιπτώσεις (18.6%). Συνολικά, σε 17/43 περιπτώσεις (39.5%) βρέθηκαν ενδείξεις για μονοαλληλικές αναδιατάξεις της αλληλουχίας KDE που οδήγησαν σε λειτουργική αδρανοποίηση του συγκεκριμένου αλληλομόρφου. Το γονίδιο IGKV4-1 επικρατούσε στις αναδιατάξεις IGKV-KDE (3/10 περιπτώσεις).

Στο λ-ΠΜ, 42 περιπτώσεις αναλύθηκαν για μη παραγωγικές αναδιατάξεις IGKV-KDE και IGKJ-C-INTRON-KDE. Αναδιατάξεις IGKV-KDE ενισχύθηκαν σε 15/42 (35.7%) περιπτώσεις, ενώ αναδιατάξεις IGKJ-C-INTRON-KDE ενισχύθηκαν σε 26/42 περιπτώσεις (61.9%).

3.2.3 Πολλαπλές αναδιατάξεις του γενετικού τόπου IGK

Δεκαεννέα από τις 43 περιπτώσεις κ-ΠΜ (44.2%) που αναλύθηκαν για αναδιατάξεις IGKV-J, IGKV-KDE και IGKJ-C-INTRON-KDE έφεραν μόνο μια αναδιάταξη του γενετικού τόπου IGK υπό μορφή μιας συμβολής IGKV-J (Πίνακας 3.11). Ενδείξεις για διαλληλικές αναδιατάξεις του γενετικού τόπου IGK προέκυψαν σε: (i) 17/43 περιπτώσεις (39.5%) που έφεραν μια αναδιάταξη της αλληλουχίας KDE παράλληλα με μια εκφραζόμενη αναδιάταξη IGKV-J (Πίνακας 3.11), και (ii) 5/43 περιπτώσεις (9.3%) με διπλές αναδιατάξεις IGKV-J. Σε αυτές τις πέντε περιπτώσεις το συμπέρασμα ότι συνέβησαν διαλληλικές αναδιατάξεις IGKV-J προέκυψε από την ανάλυση του ρεπερτορίου των γονιδίων IGKJ καθώς και από την εντόπιση και τον τρόπο ανασυνδυασμού (απαλοιφή ή αναστροφή) των γονιδίων IGKV που αναγνωρίστηκαν και στις δύο αναδιατάξεις. Σε μια περίπτωση κ-ΠΜ, και οι δύο αναδιατάξεις θα μπορούσε να έχουν συμβεί διαδοχικά στο ένα ή και στα δύο αλληλόμορφα IGK.

Σαράντα δύο περιπτώσεις λ-ΠΜ αναλύθηκαν για αναδιατάξεις IGKV-J, IGKV-KDE και IGKJ-C-INTRON-KDE. Μόνο σε έξι περιπτώσεις (14.3%) δεν υπήρξαν ενδείξεις για αναδιάταξη του γενετικού τόπου IGK. Δεκαοκτώ περιπτώσεις έφεραν μια αναδιάταξη στο γενετικό τόπο IGK, ενώ 12 και 6 περιπτώσεις, αντιστοίχως, έφεραν δύο ή τρεις αναδιατάξεις στο γενετικό τόπο IGK (Πίνακας 3.11). Με βάση το ρεπερτόριο των γονιδίων IGKV και IGKJ καθώς και το είδος της αναδιάταξης με το KDE (IGKV-KDE ή IGKJ-C-INTRON-KDE), σε 4/18 περιπτώσεις λ-ΠΜ με πολλαπλές αναδιατάξεις του γενετικού τόπου IGK ήταν αδύνατο να προσδιοριστεί εάν οι

αναδιατάξεις συνέβησαν στο ένα ή και στα δύο αλληλόμορφα IGK. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις (14/18) συγκεντρώθηκαν ενδείξεις για διαλληλικές αναδιατάξεις του γενετικού τόπου IGK.

Πίνακας 3.11 Αναδιατάξεις του γενετικού τόπου IGK στο πολλαπλούν μυέλωμα.

Είδος Αναδιάταξης	κ-ΠΜ (n=43)	λ-ΠΜ (n=42)
	%	%
Καμία αναδιάταξη	0	14.3
IGKV-J	44.2	11.9
IGKV-KDE	0	7.1
IGKJ-C-INTRON-KDE	0	23.8
IGKV-J + IGKV-J	16.3	2.4
IGKV-J + IGKV-KDE	20.9	2.4
IGKV-J + IGKJ-C-INTRON-KDE	14	9.5
2 IGKV-J + IGKJ-C-INTRON-KDE	4.7	2.4
IGKV-KDE + IGKJ-C-INTRON-KDE	0	14.3
IGKV-J + IGKV-KDE + IGKJ-C-INTRON-KDE	0	11.9

3.2.4 Ανάλυση σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης

Όλα τα IF μετάγραφα IGKV-J στο κ-ΠΜ είχαν ομολογία που κυμαινόταν από 84% έως 98% (μέση ομολογία: 93.8%). Οι περισσότερες μεταλλάξεις αντικατάστασης συνέβησαν στο KCDR1 (κυρίως στα κωδικόνια 30-32 του KCDR1). Μια περίπτωση που εξέφραζε το γονίδιο IGKV2-28/2D-28 παρουσίαζε αλλαγές στην αλληλουχία IGKV συμβατές με απαλοιφή τριών ζευγών βάσεων (bp) στο κωδικόνιο 29 του KCDR1. Οι μέσοι λόγοι R/S των KCDRs και KFRs ήταν 2.98 και 1.5, αντιστοίχως. Επτά από τις δέκα μη μεταγραφόμενες και/ή εκτός πλαισίου αναδιατάξεις IGKV-J στο κ-ΠΜ ήταν αμετάλλακτες (ομολογία 100%). Δύο από τις υπόλοιπες τρεις αναδιατάξεις ήταν πολύ μεταλλαγμένες: η μια από αυτές έφερε πολλά κωδικόνια τερματισμού και απαλοιφή ενός bp στο KFR3. Στο λ-ΠΜ, έξι από τις 19 αναδιατάξεις IGKV-J είχαν ομολογία <100% (μεταλλαγμένες): 3/6 μεταλλαγμένες περιπτώσεις είχαν ομολογία <98%. Μια πολύ μεταλλαγμένη αλληλουχία έφερε ένα κωδικόνιο τερματισμού καθώς και απαλοιφή ενός bp στο KFR2.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ) είναι κακόηθες νεόπλασμα Β λεμφοκυττάρων που εκφράζουν στην επιφάνειά τους CD5, CD19, CD20, CD23 και χαμηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης. Η ΧΛΛ χαρακτηρίζεται από σταδιακή συσσώρευση μικρών, ώριμων λεμφοκυττάρων στο αίμα, στο μυελό των οστών και στους λεμφικούς ιστούς. Πρόσφατα ευρήματα υποδιαιρούν την ΧΛΛ σε δύο ομάδες: (i) περιπτώσεις στις οποίες τα γονίδια των ανοσοσφαιρινών των νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων φέρουν σωματικές μεταλλάξεις και έχουν πιο ήπια εξέλιξη και μεγαλύτερη ολική επιβίωση, (ii) περιπτώσεις με αμετάλλακτες αναδιατάξεις των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών και πιο δυσμενή εξέλιξη ⁽¹⁰³⁾.

Το ρεπερτόριο των γονιδίων IGHV στην ΧΛΛ διαφέρει από το ρεπερτόριο των φυσιολογικών CD5⁺ Β λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος ⁽¹⁰⁴⁻¹⁰⁵⁾. Στην ΧΛΛ χρησιμοποιούνται κυρίως γονίδια των υποομάδων IGHV1, IGHV3 και IGHV4 και η κατανομή τους είναι διαφορετική από την αντίστοιχη στα φυσιολογικά CD5⁺ Β λεμφοκύτταρα. Συχνότερα γονίδια είναι τα IGHV1-69, IGHV3-7, IGHV3-23 και IGHV4-34, μολονότι η σχετική συχνότητά τους ποικίλει στις διάφορες σειρές ^(103,105,106). Το ρεπερτόριο των γονιδίων IGHV στην ΧΛΛ πιθανόν σχετίζεται και με περιβαλλοντικούς παράγοντες. Επίσης, οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών ίσως σχετίζονται και με γενετικές ιδιαιτερότητες των πληθυσμών ^(103,105,107).

Σύμφωνα με πρόσφατες απόψεις, όλες οι περιπτώσεις ΧΛΛ πιθανόν προέρχονται από νεοπλασματική εξαλλαγή φυσικών αυτοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων. Σχετικές ενδείξεις είναι: (i) η συσχέτιση της ΧΛΛ με αυτοάνοσες εκδηλώσεις, (ii) η αυτοαντιδραστικότητα των ανοσοσφαιρινών της ΧΛΛ εναντίον ποικίλων αντιγόνων (π.χ., DNA, καρδιολιπίνη, ιστόνες, ακτίνη, θυρεοσφαιρίνη, αντιγόνα ερυθροκυττάρων) ^(98,108-111), (iii) τα μοριακά χαρακτηριστικά των περιοχών CDR3, που αποκαλύπτουν την ύπαρξη υποομάδων ασθενών με ΧΛΛ με ταυτόσημους, «ομόλογους» υποδοχείς ⁽¹¹²⁻¹¹⁷⁾: η δομική ομολογία θεωρείται ως ισχυρότατη ένδειξη για την αναγνώριση κοινού επιτόπου. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό το γεγονός ότι τέτοια υποσύνολα ασθενών συνήθως περιλαμβάνουν αμετάλλακτες περιπτώσεις, όπως επίσης και ότι ορισμένες από αυτές τις περιπτώσεις, παρότι αμετάλλακτες, εκφράζουν ανοσοσφαιρίνη G, δηλαδή έχουν σαφώς έλθει σε επαφή με αντιγόνο. Συνεπώς, οι αμετάλλακτες περιπτώσεις ίσως προέρχονται από Β λεμφοκύτταρα που

είχαν διεγερθεί από αντιγόνο αλλά δεν συγκέντρωσαν μεταλλάξεις^(1,3-4,112-117). Αυτό θα μπορούσε να είναι συνέπεια του τύπου της αντιγονικής διέγερσης (π.χ., T ανεξάρτητη διέγερση) ή του χρόνου στον οποίο συνέβη η νεοπλασματική εξαλλαγή. Το πεπρωμένο των αυτοαντιδραστικών κυττάρων καθορίζεται από τρεις μηχανισμούς. Εάν ο αντιγονικός υποδοχέας του B κυττάρου αναγνωρίζει με υψηλή συγγένεια πολυσθενές αυτοαντιγόνο (π.χ., MHC στην επιφάνεια των κυττάρων), τότε εξαλείφεται με απόπτωση (κλωνική απαλοιφή, clonal deletion). Εάν αναγνωρίζει αυτοαντιγόνα χαμηλού σθένους (π.χ., διαλυτά), παύει να εκφράζει επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη IgM, ενώ εκφράζει πλέον μόνο επιφανειακή IgD και δεν μπορεί να πολλαπλασιαστεί (ανεργία, anergy). Η ανάπτυξη μπορεί να σταματήσει στο στάδιο αυτό και να συνεχιστεί η έκφραση των γονιδίων RAG. Ο τρίτος μηχανισμός περιλαμβάνει δευτερογενή αναδιάταξη των γονιδίων της ελαφριάς αλυσίδας ώστε να τροποποιηθεί η εξειδίκευση του αντιγονικού υποδοχέα (διόρθωση υποδοχέα, receptor editing).

Οι περισσότερες μελέτες για την αναθεώρηση υποδοχέα εστιάζονται στα γονίδια των ελαφριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών. Η οργάνωση των γονιδίων IGK/LV και IGK/LJ στους γενετικούς τόπους IGK/IGL επιτρέπει τη δημιουργία δευτερογενών αναδιατάξεων μεταξύ ενός IGV γονιδίου που βρίσκεται στο 5' άκρο μιας προϋπάρχουσας αναδιάταξης και ενός IGJ γονιδίου στο 3' άκρο, με αποτέλεσμα την απαλοιφή της πρωτογενούς αναδιάταξης⁽²⁸⁾. Επειδή τα μη αναδιαταγμένα γενετικά τμήματα που παραμένουν περιβάλλονται από αλληλουχίες RSS, οι δευτερογενείς αναδιατάξεις των γονιδίων των ελαφριών αλυσίδων συμβαίνουν κατά τον ίδιο τρόπο με τις πρωτογενείς αναδιατάξεις⁽²⁶⁾ (Εικόνα 4.1- 4.3).

Εικόνα 4.1 Πρωτογενής αναδιάταξη IGKV-J

Εικόνα 4.2 Δευτερογενής αναδιάταξη IGKV-J με απαλοιφή.

Εικόνα 4.3 Δευτερογενής αναδιάταξη IGKV-J με αναστροφή.

Δευτερογενείς αναδιατάξεις στις ελαφριές αλυσίδες ως μέσο αναθεώρησης του υποδοχέα παρατηρήθηκαν αρχικά σε διαγονιδιακά ποντίκια που εξέφραζαν ανοσοσφαιρίνες με ειδικότητα για το μείζον σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας ή το DNA^(26, 29-31). Η αναθεώρηση του υποδοχέα στα πρώιμα Β κύτταρα επηρεάζεται επίσης από τη θέση επαφής με το αντιγόνο, επειδή το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών παρέχει σήματα που μπορούν να εμποδίσουν την απόπτωση που επάγεται από το αντιγόνο και προάγει την επανενεργοποίηση των πρωτεϊνών RAG και την αναθεώρηση του υποδοχέα⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾.

Η οργάνωση του γενετικού τόπου IGK προάγει τη διεργασία αναθεώρησης του υποδοχέα και μέσω των αναδιατάξεων με το «στοιχείο διαγραφής κάππα» (kappa-deleting element, KDE), μια γενετική αλληλουχία που εντοπίζεται 3' άκρο του γονιδίου IGKC. Η αλληλουχία KDE αναδιατάσσεται είτε μ' ένα μη αναδιαταγμένο γονίδιο που βρίσκεται στο 5' μιας αναδιάταξης IGKV-J είτε με το επταμερές της αλληλουχίας RSS στο ιντρόνιο IGKJ-IGKC (IGKJ-C-INTRON-KDE)^(41,42). Στην πρώτη περίπτωση συμβαίνει απώλεια (ή σπανίως αναστροφή) της πρωτογενούς αναδιάταξης IGKV-J, του τμήματος IGKC όπως και των ενισχυτών. Στη δεύτερη περίπτωση, της αναδιάταξης με το IGKJ-C-INTRON, συμβαίνει απώλεια των τμημάτων IGKJ-IGKC και των ενισχυτών, όμως μια πιθανή προϋπάρχουσα αναδιάταξη IGKV-J παραμένει στο χρωμόσωμα⁽⁴³⁾ (Εικόνα 4.4-4.6).

Εικόνα 4.4 Αναδιάταξη μεταξύ του KDE και του JKINTRON.

Εικόνα 4.5 Αναδιάταξη του KDE με ένα μη αναδιαταγμένο γονίδιο IGKV με απαλοιφή.

Εικόνα 4.6. Αναδιάταξη του KDE με ένα μη αναδιαταγμένο γονίδιο IGKV με αναστροφή.

Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν οι αναδιατάξεις του γενετικού τόπου IGK σε 291 ασθενείς με ΧΛΛ. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο RNA (RT-PCR) και DNA (DNA-PCR) ώστε ν' ανιχνευθούν μεταγραφόμενες και μη μεταγραφόμενες αναδιατάξεις IGKV-J. Η ανάλυση των μεταγραφόμενων, λειτουργικών (εντός πλαισίου) αναδιατάξεων στην κ-ΧΛΛ έδειξε ότι επτά γονίδια (IGKV3-20, IGKV1-39/1D-39, IGKV1-5, IGKV4-1, IGKV2-30, IGKV3-11, IGKV1-8) βρέθηκαν σε ποσοστό 68,6% των περιπτώσεων. Γενικά, η κατανομή των γονιδίων IGKV σε μεταγραφόμενες αναδιατάξεις της κ-ΧΛΛ, με ορισμένες χαρακτηριστικές εξαιρέσεις (π.χ., IGKV4-1, IGKV3-20, IGKV1-5, IGKV3-11), δεν διέφερε σημαντικά από την αντίστοιχη κατανομή στις παραγωγικές αναδιατάξεις του ρεπερτορίου των φυσιολογικών IgM⁺ Β λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος⁽¹⁰²⁾.

Διπλά λειτουργικά μετάγραφα IGKV-J ενισχύθηκαν με RT-PCR μόνο σε 3/188 περιπτώσεις ΧΛΛ με κλωνοτυπική κ ελαφριά αλυσίδα (κ-ΧΛΛ). Στις περιπτώσεις αυτές δεν μπορεί ν' αποκλειστεί η πιθανότητα ότι τα λευχαιμικά κύτταρα εξέφραζαν περισσότερες από μια κ ελαφριά αλυσίδα, δηλαδή δεν εμφάνιζαν αποκλεισμό αλληλομόρφου. Το φαινόμενο της αποτυχίας του αποκλεισμού αλληλομόρφου (lack of allelic exclusion, allelic inclusion) έχει αναφερθεί σε αυτοαντιδραστικά Β κύτταρα που επιχειρούν ν' αποφύγουν την κλωνική απαλοιφή εκφράζοντας στην επιφάνειά τους πολλαπλούς υποδοχείς διαφορετικής ειδικότητας ώστε να «αραιώνουν» την επικίνδυνη ειδικότητα (receptor dilution)⁽¹¹⁸⁾.

Η αποτυχία του αποκλεισμού αλληλομόρφου που οδηγεί σε «αραίωση υποδοχέα» είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό των φυσιολογικών κυττάρων της οριακής ζώνης⁽¹¹⁹⁾, μια ανατομική μικροπεριοχή των δευτερογενών λεμφικών ιστών (ιδίως του σπλήνα) στην οποία συσσωρεύονται φυσικά αυτοαντιδραστικά κύτταρα. Επίσης, έχει αναφερθεί σε μοριακό επίπεδο από την ανάλυση των γονιδίων των βαριών αλυσίδων σε ασθενείς με ΧΛΛ⁽⁹⁷⁾. Συνεπώς, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, υπό το πρίσμα και των λειτουργικών ομοιοτήτων φυσικών αυτοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων-κυττάρων οριακής ζώνης-ΧΛΛ, μπορεί να θεωρηθούν ως επιπρόσθετη ένδειξη υπέρ της άποψης ότι η ΧΛΛ πιθανόν προέρχεται από νεοπλασματική εξαλλαγή κυττάρων της οριακής ζώνης. Η ομοιότητα μεταξύ των Β κυττάρων που παράγουν φυσικά αυτοαντισώματα και των νεοπλασματικών κυττάρων της ΧΛΛ ίσως υποδηλώνει ότι η διεργασία της θετικής επιλογής των φυσικών αυτοαντιδραστικών Β κυττάρων εμπεριέχει τον κίνδυνο νεοπλασματικής εξαλλαγής⁽¹²⁰⁾.

Στα φυσιολογικά Β λεμφοκύτταρα, η ανάλυση με PCR μεμονωμένου κυττάρου (single cell PCR) Β λεμφοκυττάρων από περιφερικό αίμα υγιών ατόμων έδειξε ότι, ενώ μόνο το 2-3% των κυττάρων που εκφράζουν κ ελαφριά αλυσίδα έφεραν

συμβολές IGLV-J, σχεδόν όλα τα B κύτταρα που εκφράζουν λ αλυσίδα είχαν αναδιαταγμένα γονίδια στο γενετικό τόπο IGK και έφεραν συμβολές IGKV-J⁽⁴³⁾. Στην παρούσα μελέτη, σχεδόν όλες (97%) οι περιπτώσεις ΧΛΛ με κλωνοτυπική λ ελαφριά αλυσίδα (λ-ΧΛΛ) έφεραν αναδιατάξεις στον γενετικό τόπο IGK. Συνεπώς, η «ιεραρχία» των αναδιατάξεων των γονιδίων των ελαφριών αλυσίδων στην ΧΛΛ δεν είναι εγγενώς διαφορετική από την αντίστοιχη των φυσιολογικών Β λεμφοκυττάρων. Αναδιατάξεις IGKV-J ανιχνεύθηκαν σε 64/103 (62%) περιπτώσεις λ-ΧΛΛ. Στην πραγματικότητα, ο αριθμός είναι μάλλον μεγαλύτερος, επειδή μερικές συμβολές IGKV-J πιθανόν δεν ενισχύθηκαν. Το ενδεχόμενο να ενισχύθηκαν αναδιατάξεις από μη-λευχαιμικά κύτταρα είναι πολύ μικρό επειδή: (i) σε όλες τις περιπτώσεις της παρούσας μελέτης, το «νεοπλασματικό φορτίο» (ποσοστό CD5+CD19+ κυττάρων) ήταν >70%, (ii) όλα τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές και έδωσαν τα ίδια αποτελέσματα, (iii) η ανάλυση των δειγμάτων αίματος που απομονώθηκαν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές έδωσε ίδια αποτελέσματα (πολλαπλά δείγματα ήταν διαθέσιμα σε 180/291 περιπτώσεις της παρούσας μελέτης).

Όπως και στα φυσιολογικά Β κύτταρα που εκφράζουν λ ελαφριά αλυσίδα⁽⁴³⁾, σημαντικό ποσοστό (38.7%) των αναδιατάξεων IGKV-J στις περιπτώσεις λ-ΧΛΛ της παρούσας μελέτης ήταν εντός πλαισίου (συνεπώς, δυνητικά λειτουργικές). Επίσης, μετάγραφα IGKV-J ανιχνεύθηκαν σε 10/64 περιπτώσεις λ-ΧΛΛ: 4/10 μετάγραφα ήταν εντός πλαισίου. Παρότι στις 4 περιπτώσεις ΧΛΛ με κλωνοτυπική λ ελαφριά αλυσίδα και λειτουργικά μετάγραφα IGKV-J ο έλεγχος με κυτταρομετρία ροής και ανοσοϊστοχημεία δεν επιβεβαίωσε έκφραση κ ελαφριάς αλυσίδας, το ενδεχόμενο αυτό δεν μπορεί ν' αποκλεισθεί (χαμηλή έκφραση κάτω από τα όρια ευαισθησίας της μεθόδου). Σε αυτό το πλαίσιο, ένα μικρό ποσοστό ώριμων Β κυττάρων του ανθρώπου εκφράζουν τόσο κ όσο και λ ελαφριά αλυσίδα και παράγουν αντισώματα διπλής εξειδίκευσης. Η πιθανότερη εξήγηση γι' αυτό το φαινόμενο είναι ότι συμβαίνουν ταυτόχρονες αναδιατάξεις στους γενετικούς τόπους των ελαφριών αλυσίδων με χαμηλή συχνότητα και σε μερικές περιπτώσεις τα κύτταρα είναι κ⁺λ⁺ ⁽¹²¹⁾.

Τρεις περιπτώσεις λ-ΧΛΛ της παρούσας μελέτης έφεραν λειτουργικές (εντός πλαισίου) αναδιατάξεις IGKV-J που χρησιμοποιούσαν το γονίδιο IGKV1-37/1D-37. Το γονίδιο αυτό έχει ελαττωματική δομή επειδή κωδικοποιεί γλυκίνη αντί για κυστεΐνη στη θέση 104 της περιοχής FR3-IMGT⁽¹²²⁾. Το συγκεκριμένο γονίδιο έχει αναφερθεί στο ρεπερτόριο IGKV ενός ασθενούς με συστηματικό ερυθματώδη λύκο⁽¹²³⁾. Εντούτοις, η σχετική μελέτη βασιζόταν σε ανάλυση του DNA και διέκρινε μόνο τις

εντός πλαισίου από τις εκτός πλαισίου αναδιατάξεις: συνεπώς, ήταν αδύνατη η εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για το εκφραζόμενο ρεπερτόριο.

Γενικά, διάφορα γονίδια IGKV που χρησιμοποιήθηκαν στις μη εκφραζόμενες αναδιατάξεις IGKV-J της κ- και λ-ΧΛΛ της παρούσας μελέτης έχουν ανιχνευθεί σε ελαφριές αλυσίδες αυτοαντισωμάτων (π.χ. IGKV1-33/1D-33, IGKV1-39/1D-39, IGKV3-20, IGKV1-17)[μολονότι το γεγονός αυτό ίσως απλώς αντικατοπτρίζει τη γενική συχνότητά τους στο ρεπερτόριο⁽¹⁰²⁾].

Οι βαριές και οι ελαφριές αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών στη ΧΛΛ έχουν μοναδικά δομικά χαρακτηριστικά. Τα χαρακτηριστικά αυτά, κατά περίπτωση, έχουν επίσης αναφερθεί και σε αυτοαντιδραστικά κύτταρα^(98,124). Εντυπωσιακό γνώρισμα της ΧΛΛ είναι η ύπαρξη υποσυνόλων ασθενών με πανομοιότυπες («στερεότυπες») ανοσοσφαιρίνες. Το εύρημα αυτό στηρίζει το ενδεχόμενο αναγνώρισης επιλεγμένων, διακριτών αντιγόνων ή τάξεων δομικά παρόμοιων επιτόπων^(98,125). Στην παρούσα μελέτη αναγνωρίστηκαν πέντε υποσύνολα ομόλογων αλληλουχιών IGKV-J. Με βάση τα παραπάνω ευρήματα, η ανάπτυξη της ΧΛΛ ίσως αφορά σε κλώνους Β κυττάρων με καθορισμένη δομή του BCR. Αυτός ο «περιορισμός του BCR» (BCR restriction) ίσως είναι συνέπεια: (i) τυχαίου μετασχηματισμού ενός υποπληθυσμού Β κυττάρων με πολύ περιορισμένη ετερογένεια αντιγονικού υποδοχέα που προσδιορίζεται γενετικά ή με επιλογή από αντιγόνο, (ii) ειδικού μετασχηματισμού Β κυττάρων που επιλέχθηκαν από το αντιγόνο ανάμεσα σ' έναν υποπληθυσμό κυττάρων με ετερογενείς υποδοχείς ή (iii) και των δύο παραπάνω μηχανισμών.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αναγνώριση ομολογίας μεταξύ δύο λειτουργικών αναδιατάξεων του γονιδίου IGKV1-17 από περιπτώσεις ΧΛΛ της παρούσας μελέτης με αλληλουχίες αυτοαντισωμάτων από τις δημόσιες βάσεις αλληλουχιών^(126,127). Στην ΧΛΛ, η μια αναδιάταξη ανιχνεύθηκε σε ασθενή με κ-ελαφριά αλυσίδα, η οποία όμως εξέφραζε και δεύτερη, λειτουργική, μεταγραφόμενη αναδιάταξη IGKV1-39/1D-39. Η δεύτερη αναδιάταξη ανιχνεύθηκε σε ασθενή με λ-ελαφριά αλυσίδα. Συνεπώς, και στις δύο περιπτώσεις η αναδιάταξη του γονιδίου IGKV1-17 είτε δεν εκφράστηκε (receptor editing) είτε δεν ήταν η αποκλειστική εκφραζόμενη αναδιάταξη των νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων (receptor dilution). Με βάση αυτά τα ευρήματα, είναι λογικό να υποθέσουμε ότι τα κλωνογενή κύτταρα αυτών των δύο περιπτώσεων ΧΛΛ προσπάθησαν ν' απαλλαγούν από την αναδιάταξη του γονιδίου IGKV1-17 μέσω του μηχανισμού των δευτερογενών αναδιατάξεων. Γιατί άραγε;

Το γονίδιο IGKV1-17 έχει οριστεί ως λειτουργικό γονίδιο IGKV: δεν υπάρχει κάποια δομική ανωμαλία στις επταμερείς-εννιάμερείς αλληλουχίες ή την περιοχή του υποκινητή⁽¹²⁸⁾. Παρόλ' αυτά εκφράζεται σπάνια στο ρεπερτόριο των φυσιολογικών κυττάρων⁽¹²⁹⁾. Η αιτία της χαμηλής συχνότητας του λειτουργικού γονιδίου IGKV1-17

δεν έχει προσδιοριστεί. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι κωδικοποιεί αυτοαντισώματα. Συγκεκριμένα, το γονίδιο IGKV1-17 εμπλέκεται στην ανάπτυξη της νεφρίτιδας στα πλαίσια συστηματικού ερυθρεματοειδούς λύκου⁽⁹⁹⁾. Η χαμηλή συχνότητα του γονιδίου IGKV1-17 στο φυσιολογικό ρεπερτόριο σε συνδυασμό με τον πιθανό παθογενετικό ρόλο του στην ανάπτυξη αυτοανοσίας υποδηλώνει ότι στα φυσιολογικά κύτταρα το πεπρωμένο των αναδιατάξεων του IGKV1-17 είναι η αδρανοποίηση. Στους ασθενείς με λύκο πιθανόν υπάρχει αδυναμία αδρανοποίησης των αναδιατάξεων του γονιδίου IGKV1-17 με συνέπεια την ανάπτυξη νεφρίτιδας. Αντίθετα, με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, οι μηχανισμοί αναθεώρησης υποδοχέα φαίνεται ότι λειτουργούν αποτελεσματικά στην ΧΛΛ, τουλάχιστον σε μια υποομάδα ασθενών.

Ένα ενδιαφέρον εύρημα της παρούσας μελέτης ήταν η συχνή χρησιμοποίηση των γονιδίων IGKJ3-5 σε ασθενείς με λ-ΧΛΛ, αντίθετα με το φυσιολογικό ρεπερτόριο των IgM+ Β λεμφοκυττάρων^(101,102) ή το ρεπερτόριο της κ-ΧΛΛ⁽⁹⁸⁾. Σε διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν αυτοαντισώματα, η χρήση των γονιδίων IGKJ3-5 είναι συχνή σε Β λεμφοκύτταρα που διαφεύγουν τον αναμενόμενο αποπτωτικό θάνατο με δευτερογενείς αναδιατάξεις οι οποίες αλλάζουν την ειδικότητα του υποδοχέα^(30,130). Η χρησιμοποίηση των γονιδίων IGKJ3-5 θεωρείται συμβατή με παρατεταμένο ανασυνδυασμό στο γενετικό τόπο IGK⁽¹⁰⁸⁾. Συνεπώς, η αυξημένη συχνότητα των γονιδίων IGKJ3-5 στη λ-ΧΛΛ υποδηλώνει ότι τα αντίστοιχα κλωνογενή κύτταρα επιχείρησαν πολλές αναδιατάξεις στο γενετικό τόπο IGK προτού τελικά στραφούν σε παραγωγή λ αλυσίδας.

Επιπρόσθετη ένδειξη για παρατεταμένο ανασυνδυασμό στο γενετικό τόπο IGK στους ασθενείς με λ-ΧΛΛ αποτελεί το γεγονός ότι στις αναδιατάξεις IGKV-KDE αυτών των ασθενών είχαν χρησιμοποιηθεί γονίδια IGKV πιο απομακρυσμένα από την περιοχή J σε σχέση με τα γονίδια IGKV που χρησιμοποιούνται συνήθως σε αναδιατάξεις IGKV-J. Οι αναδιατάξεις με την αλληλουχία KDE συμβαίνουν σε σχετικά προχωρημένο στάδιο κατά την οντογένεση των Β λεμφοκυττάρων, ενώ έχουν ήδη πραγματοποιηθεί κάποιες αναδιατάξεις στον γενετικό τόπο IGK. Προϋπόθεση για να συμβεί μια αναδιάταξη είναι η έκφραση των πρωτεϊνών RAG. Από την άλλη πλευρά, η έκφραση αυτών των πρωτεϊνών καταστέλλεται μόλις τα κύτταρα αποκτήσουν πλήρη ανοσοσφαιρίνη. Συνεπώς, οι αναδιατάξεις της αλληλουχίας KDE πιθανότατα υποδηλώνουν την ανάγκη των Β λεμφοκυττάρων ν' απαλλαγούν (ή να αδρανοποιήσουν) μια προηγηθείσα αναδιάταξη IGKV-J, η οποία κρίνεται από το κύτταρο ως επικίνδυνη. Στο συγκεκριμένο οντογενετικό στάδιο (κατά την προετοιμασία για την έναρξη αναδιάταξης των γονιδίων της λ ελαφριάς αλυσίδας, η οποία τελικά θα οδηγήσει σε έκφραση λ ελαφριάς αλυσίδας), το σύμπλοκο ανασυνδυασμού (ρεκομπινάση) πιθανότατα έχει μετατοπιστεί προς πιο

απομακρυσμένες από την περιοχή J περιοχές του γενετικού τόπου IGK και άρα επιλέγει διαφορετικά γονίδια IGKV.

Ενενήντα δύο από τις 191 μεταγραφόμενες αναδιατάξεις IGKV-J (48.2%) ήταν αμετάλλακτες ($\geq 98\%$ ομολογία με το πλησιέστερο μη ανασυνδυασμένο γονίδιο), 50/92 αμετάλλακτες αλληλουχίες IGKV-J είχαν 100% ομολογία. Η κατανομή των γονιδίων IGKV ανάμεσα σε μεταλλαγμένες και αμετάλλακτες αναδιατάξεις διέφερε σημαντικά. Στην περίπτωση ορισμένων γονιδίων IGKV (IGKV1-33/1D-33, IGKV2-30), η σύγκριση με φυσιολογικές και αυτοαντιδραστικές αλληλουχίες αποκάλυψε πως τα πρότυπα των μεταλλάξεων στην παρούσα μελέτη ήταν ειδικά για τη ΧΛΛ.

Τόσο στην κ- όσο και στη λ-ΧΛΛ, λίγες μη εκφραζόμενες αναδιατάξεις IGKV-J (εντός πλαισίου, μη μεταγραφόμενες / εκτός πλαισίου, μεταγραφόμενες ή μη) ήταν $<100\%$ ομόλογες με τα γονίδια της γαμετικής σειράς. Η ύπαρξη μεταλλαγμένων, εντός πλαισίου, μη εκφραζόμενων αναδιατάξεων IGKV-J μπορεί να θεωρηθεί ως έμμεση ένδειξη για δευτερογενείς αναδιατάξεις μετά την έναρξη της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης (SHM). Η χρόνια αντιγονική διέγερση μπορεί να επαγάγει δευτερογενείς αναδιατάξεις στους γενετικούς τόπους IGH ή IGK/IGL^(130,132-142).

Παλαιότερα, επικρατούσε η άποψη ότι τα φυσιολογικά ώριμα Β λεμφοκύτταρα δεν πραγματοποιούν δευτερογενείς αναδιατάξεις⁽¹⁴³⁾. Ωστόσο, αρκετές πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι δευτερογενείς αναδιατάξεις μπορεί να συμβούν ακόμα και μετά την έναρξη της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης (δηλαδή σε ώριμα Β λεμφοκύτταρα), ιδίως στα πλαίσια επιμένουστος αντιγονικού ερεθισμού σε καταστάσεις αυτοανοσίας ή νεοπλασίας^(133,135,137,142,144). Μολαταύτα, τα χαρακτηριστικά της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης στις μη εκφραζόμενες αναδιατάξεις της παρούσας μελέτης (υψηλός λόγος R/S μεταλλάξεων στα FRs, κωδικόνια τερματισμού, ενθέσεις/ διαγραφές) θα μπορούσαν πιο εύλογα ν' αποδοθούν στο φαινόμενο της «παρατυχούσας μεταλλαξιγένεσης» («bystander mutagenesis»), κατά το οποίο οι μη εκφραζόμενες αναδιατάξεις μεταλλάσσονται, ενώ δεν υπόκεινται σε πίεση επιλογής για την έκφραση λειτουργικού αντιγονικού υποδοχέα. Σχετικά ευρήματα έχουν αναφερθεί σε μελέτες σε φυσιολογικά και νεοπλασματικά Β λεμφοκύτταρα⁽¹⁴⁵⁻¹⁴⁷⁾.

Πολλά κληρονομικά νοσήματα οφείλονται σε αλλαγή στο πλαίσιο ανάγνωσης ή σε μεταλλάξεις που οδηγούν στη δημιουργία πρώιμων κωδικονίων τερματισμού (premature termination codons - PTCs). Κανονικά, τα περισσότερα ελαττωματικά μετάγραφα αποδομούνται από το κύτταρο με τη λειτουργία ειδικών μηχανισμών (nonsense-mediated decay, NMD). Επειδή κατά τον ανασυνδυασμό V(D)J, οι δύο στις τρεις αναδιατάξεις έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός πρώιμου κωδικονίου τερματισμού, τα λεμφοκύτταρα πρέπει ν' απαλλάσσονται από

ελαττωματικά μετάγραφα, τα οποία είναι δυνητικώς επικίνδυνα. Γι' αυτό το λόγο, τα Β και Τ λεμφοκύτταρα έχουν αναπτύξει πολύ αποτελεσματικούς μηχανισμούς NMD, ώστε ν' αποφεύγεται η παραγωγή ελαττωματικών αλυσίδων IG και TCR⁽¹⁰⁸⁻¹⁰⁹⁾. Περιστασιακά, τα ελαττωματικά μετάγραφα μπορεί να διατηρούνται: αυτό έχει αναφερθεί στα πλαίσια αυτοανοσίας⁽¹⁴⁸⁾ ή ανοσοανεπάρκειας⁽¹⁴⁹⁾. Στην παρούσα μελέτη, ελαττωματικά μετάγραφα IGKV-J ανιχνεύθηκαν σε 12/291 ασθενείς (4%) με ΧΛΛ. Συνεπώς, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι ελαττωματικά μετάγραφα ανοσοσφαιρίνης ανιχνεύονται επίσης και στην ΧΛΛ. Εντούτοις, η χαμηλή συχνότητά τους υποδηλώνει τη λειτουργία ενεργών μηχανισμών επιτήρησης του mRNA στα κλωνογενή κύτταρα της ΧΛΛ.

4.2 ΠΟΛΛΑΠΛΟΥΝ ΜΥΕΛΩΜΑ

Το πολλαπλούν μυέλωμα είναι νεόπλασμα τελικώς διαφοροποιημένων πλασματοκυττάρων που αποικίζουν τον μυελό των οστών όπου και πολλαπλασιάζονται. Εξακολουθεί να είναι άγνωστο το φυσιολογικό αντίστοιχο του κλωνογενούς κυττάρου της νόσου, δηλαδή το στάδιο κατά τη φυσιολογική διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων στο οποίο συμβαίνει η νεοπλασματική εξαλλαγή.

Τα νεοπλασματικά κύτταρα στο ΠΜ φέρουν πολύ μεταλλαγμένα γονίδια IGHV, χωρίς ενδοκλωνική ετερογένεια και εμφανίζουν σχεδόν πάντα μεταστροφή ισοτύπου^(92,150,151). Συνεπώς, ο καλύτερος «υποψήφιος» για τον τίτλο του «κλωνογενούς κυττάρου του πολλαπλού μυελώματος» είναι ένα Β λεμφοκύτταρο που έχει περάσει από το βλαστικό κέντρο (postgerminal center cell). Η ανάλυση της αλληλουχίας κλωνικώς σχετιζόμενων μεταγράφων IGHV-D-J-Cμ και IGHV-D-J-Cγ ή IGHV-D-J-Cα απέδειξε ότι μετά τη μεταστροφή ισοτύπου δεν εισάγονται επιπρόσθετες σωματικές μεταλλάξεις.

Η ανάλυση του ρεπερτορίου των γονιδίων IGHV στο ΠΜ ανέδειξε πολύ μικρή χρησιμοποίηση του γονιδίου IGHV4-34, το οποίο κωδικοποιεί αυτοαντισώματα με δράση ψυχροσυγκολλητίνης (anti-Ii): το γεγονός αυτό συνάδει με την έλλειψη αυτοάνοσων φαινομένων στο πολλαπλούν μυέλωμα, σε αντιδιαστολή προς πολλά άλλα κακοήγη λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα (π.χ., ΧΛΛ, διάφοροι τύποι λεμφωμάτων). Ωστόσο, είναι άγνωστη η ταυτότητα των κυττάρων που εμπλέκονται στην έναρξη και την εξέλιξη της νόσου, κυρίως εξαιτίας της αδυναμίας να διατηρηθούν τα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα *in vitro* αλλά και *in vivo*.

Εάν το κύτταρο προέλευσης έχει υποστεί σωματική υπερμεταλλαξιγένεση και αντιγονική επιλογή πριν την νεοπλασματική εξαλλαγή, αυτό θα έπρεπε να αντανakλάται στις αλληλουχίες των γονιδίων των βαριών και ελαφριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών. Η ανάλυση των ελαφριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών παρέχει επίσης ενδείξεις για το ρόλο της αναθεώρησης υποδοχέα στη διαμόρφωση του εκφραζόμενου ρεπερτορίου. Όπως προαναφέρθηκε, η δομή του γενετικού τόπου IGK επιτρέπει εκτεταμένη αναθεώρηση του υποδοχέα μέσω δευτερογενών αναδιατάξεων^(26,152).

Τα δεδομένα για το ρεπερτόριο των ανοσοσφαιρινών στο ΠΜ προέρχονται κυρίως από ανάλυση των αναδιαταγμένων γονιδίων IGHV^(151,153-156). Πολύ λιγότερα δεδομένα είναι γνωστά για τα αναδιαταγμένα γονίδια IGKV ή IGLV⁽¹⁵⁷⁻¹⁶⁰⁾. Μελέτες σε μικρό αριθμό περιπτώσεων έδειξαν ότι οι βαριές και οι ελαφριές αλυσίδες του κλωνογενούς κυττάρου του ΠΜ έχουν συμπληρωματικό ρόλο στη διεργασία αναγνώρισης του αντιγόνου⁽¹⁵⁷⁾. Τα πρότυπα σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης υποδηλώνουν ότι το κύτταρο προέλευσης του ΠΜ συμπεριφέρεται ως φυσιολογικό B κύτταρο του βλαστικού κέντρου⁽¹⁵⁷⁾.

Η σύγκριση του ρεπερτορίου του ΠΜ που προέκυψε από την παρούσα μελέτη με το αντίστοιχο ρεπερτόριο φυσιολογικών κυττάρων^(101,102,110,111) αποκάλυψε σημαντικές ομοιότητες. Τα μοναδικά γονίδια που χρησιμοποιούνται πιο συχνά στο ΠΜ σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα ήταν τα IGKV4-1 και IGKV1-33/1D-33. Η αυξημένη συχνότητα του γονιδίου IGKV4-1 ίσως δεν σχετίζεται παθογενετικά με την ασθένεια, αλλά πιθανόν οφείλεται στη μεγάλη αποτελεσματικότητα με την οποία ανασυνδυάζεται (μοριακοί μηχανισμοί του ανασυνδυασμού ανεξάρτητα από πίεση επιλογής από το αντιγόνο). Η σύγκριση μεταξύ των ρεπερτορίων IGKV του ΠΜ και της ΧΛΛ⁽⁹⁸⁾ επιβεβαίωσε ότι η υπεραντιπροσώπευση του γονιδίου IGKV1-33/1D-33 είναι «ειδική» για το ΠΜ. Το γονίδιο IGKV1-33/1D-33 εμφανίζεται επίσης συχνά στο ρεπερτόριο των ασθενών με αμυλοείδωση⁽¹⁶¹⁻¹⁶³⁾.

Συνυπολογίζοντας τις αναδιατάξεις IGKV-J, IGKV-KDE και IGKJ-C-INTRON-KDE, 22/43 περιπτώσεις κ-ΠΜ (51.2%) της παρούσας μελέτης έφεραν διαλλαλικές αναδιατάξεις στο γενετικό τόπο IGK. Στη μεγάλη πλειονότητα των περιπτώσεων λ-ΠΜ (36/42 περιπτώσεις, 85.7%) βρέθηκαν τουλάχιστον μονοαλληλικές αναδιατάξεις του γενετικού τόπου IGK, κατ' αντιστοιχία προς τα φυσιολογικά κύτταρα⁽⁴³⁾ αλλά επίσης –όπως συνάγεται από την παρούσα μελέτη- και την ΧΛΛ. Αυτό υποδηλώνει ότι η ιεραρχική αναδιάταξη των ελαφριών αλυσίδων στα κλωνογενή κύτταρα του ΠΜ δεν είναι εγγενώς διαφορετική από την αντίστοιχη των φυσιολογικών κυττάρων ή άλλων τύπων νεοπλασματικών B κυττάρων.

Σημαντικό ποσοστό των αναδιατάξεων IGKV-J που ενισχύθηκαν στις περιπτώσεις λ-ΠΜ της παρούσας μελέτης (8/19 περιπτώσεις, 42.1%) ήταν εντός πλαισίου (παραγωγικές), κατ' αντιστοιχία προς τα φυσιολογικά κύτταρα (39), αλλά επίσης – όπως συνάγεται από την παρούσα μελέτη- και τη λ-ΧΛΛ. Η απενεργοποίηση πρωτογενών παραγωγικών αναδιατάξεων με δευτερογενείς αναδιατάξεις στο γενετικό τόπο IGK θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένδειξη για το γεγονός ότι η αναθεώρηση υποδοχέα παίζει ενεργό ρόλο στη διαμόρφωση του εκφραζόμενου ρεπερτορίου των ανοσοσφαιρινών στο ΠΜ όπως και στα φυσιολογικά Β κύτταρα. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν πρόσφατα σε μια ομάδα 29 περιπτώσεων λ-ΠΜ⁽¹⁵⁹⁾.

Στην παρούσα μελέτη, όλες οι μεταγραφόμενες αναδιατάξεις IGKV-J ήταν μεταλλαγμένες. Τόσο σε ασθενείς με κ-ΠΜ όσο και σε ασθενείς με λ-ΠΜ, μεταλλάξεις παρατηρήθηκαν επίσης και σε μια αναλογία μη εκφραζόμενων αναδιατάξεων IGKV-J. Η ανίχνευση μεταλλαγμένων, παραγωγικών, μη εκφραζόμενων αναδιατάξεων IGKV-J μπορεί να θεωρηθεί ως έμμεση ένδειξη για δευτερογενείς αναδιατάξεις μετά την έναρξη της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης, δηλαδή δευτερογενείς αναδιατάξεις σε περιφερικούς λεμφικούς ιστούς.

Στο μυελό των οστών, τα αναπτυσσόμενα Β λεμφοκύτταρα αλλάζουν τους υποδοχείς με ειδικότητα για αυτοαντισώματα συμβάλλοντας έτσι στην διατήρηση της αυτοανοχής («receptor editing») ^(27,43,164,165). Ένα παρόμοιο φαινόμενο συμβαίνει στα βλαστικά κέντρα ⁽¹⁶⁶⁻¹⁷¹⁾, όμως η διεργασία είναι λίγο διαφορετική και αναφέρεται ως «receptor revision» (δευτερογενείς αναδιατάξεις σε περιφερικούς λεμφικούς ιστούς) ^(165,172,173). Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι ο μηχανισμός της αναθεώρησης υποδοχέα σε περιφερικούς λεμφικούς ιστούς (receptor revision) συμμετέχει στη διεργασία ωρίμανσης-αύξησης της συγγένειας του αντισώματος. Συγκεκριμένα, προσφέρει στα Β λεμφοκύτταρα που έχουν αποκτήσει επιβλαβείς μεταλλάξεις στις ανοσοσφαιρίνες νέες περιοχές V ή αμινοξέα που μειώνουν σημαντικά τη συγγένεια με το αντιγόνο δημιουργώντας ένα νέο υπόστρωμα για σωματική υπερμεταλλαξιγένεση ^(165,172,174). Στον άνθρωπο, οι ισχυρότερες ενδείξεις⁽¹⁷²⁾ για την αναθεώρηση υποδοχέα σε περιφερικούς λεμφικούς ιστούς προέρχονται από Β λεμφοκύτταρα που έχουν υποστεί σωματική υπερμεταλλαξιγένεση και ταυτόχρονα αναθεώρηση του υποδοχέα. Ωστόσο, τα σχετικά παραδείγματα στα φυσιολογικά Β κύτταρα είναι περιορισμένα⁽¹⁷⁵⁻¹⁷⁷⁾. Αντίθετα, υπάρχουν πολλές αναφορές για αναθεώρηση υποδοχέα σε ασθενείς με λέμφωμα^(137,178-180) ή αυτοάνοσα νοσήματα^(135,142,181). Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η επιμένουσα αντιγονική διέγερση προκαλεί επανενεργοποίηση των πρωτεϊνών RAG η οποία τελικά οδηγεί σε δευτερογενείς αναδιατάξεις.

Συνολικά, τρεις από τις 20 εκτός πλαισίου αναδιατάξεις IGKV-J της παρούσας μελέτης που ενισχύθηκαν σε περιπτώσεις κ- και λ-ΠΜ μεταγράφονταν. Όπως προαναφέραμε, κανονικά τα ελαττωματικά mRNA μετάγραφα αποσυντίθενται από ειδικούς μηχανισμούς επιτήρησης του RNA (nonsense-mediated decay), που λειτουργούν αποτελεσματικά στα Β και Τ λεμφοκύτταρα⁽¹⁰⁸⁻¹⁰⁹⁾. Ο μικρός αριθμός ελαττωματικών μεταγράφων ανοσοσφαιρινών υποδηλώνει την ύπαρξη ενεργού μηχανισμού επιτήρησης του mRNA στα νεοπλασματικά κύτταρα του ΠΜ.

ΑΠΟ ΤΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΤΗΣ ΠΑΡΑΠΑΝΩ ΜΕΛΕΤΗΣ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΤΑ ΠΑΡΑΚΑΤΩ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:

Αναδιατάξεις του γενετικού τόπου IGK παρατηρούνται στην πλειονότητα των περιπτώσεων λ-ΧΛΛ και λ-ΠΜ.

Η συχνότητα των αναδιατάξεων IGKV-J είναι μεγαλύτερη στη λ-ΧΛΛ σε σχέση προς το λ-ΠΜ.

Το ρεπερτόριο των γονιδίων IGKV τόσο στη λ-ΧΛΛ όσο και στο λ-ΠΜ χαρακτηρίζεται από αυξημένη συχνότητα ελαττωματικών γονιδίων (π.χ., IGKV1-37/1D-37, IGKV2-29).

Οι διαφορές ρεπερτορίου των γονιδίων IGKV μεταξύ αναδιατάξεων IGKV-J και IGKV-KDE στην ΧΛΛ προσφέρει ενδείξεις για τη χρονική εξέλιξη των αναδιατάξεων στους γενετικούς τόπους των ελαφριών αλυσίδων. Επίσης, υποδηλώνει σταδιακή «μετατόπιση» του συμπλόκου ανασυνδυασμού προς τις πιο απομακρυσμένες περιοχές του γενετικού τόπου IGK.

Αποτυχία του αποκλεισμού αλληλομόρφου (lack of allelic exclusion, “allelic inclusion”) παρατηρείται μόνο στην ΧΛΛ. Η συχνότητα του φαινομένου είναι μικρή αλλά συμβαδίζει με την αντίστοιχη συχνότητα που έχει αναφερθεί για τις βαριές αλυσίδες. Το εύρημα αυτό προσφέρει επιπρόσθετες ενδείξεις για την πιθανή οντογενετική προέλευση της ΧΛΛ από κύτταρα της οριακής ζώνης.

Ο ανασυνδυασμός των ελαφριών αλυσίδων στην ΧΛΛ και το ΠΜ συμβαίνει με ιεραρχικό τρόπο και δεν διαφέρει εγγενώς από τον αντίστοιχο των φυσιολογικών Β λεμφοκυττάρων.

Τα κλωνογενή κύτταρα της ΧΛΛ πραγματοποιούν παρατεταμένο ανασυνδυασμό του γενετικού τόπου IGK προτού στραφούν στην παραγωγή λ αλυσίδας.

Η αντικατάσταση πρωτογενών λειτουργικών συμβολών IGKV-J από δευτερογενείς αναδιατάξεις υποδηλώνει την ύπαρξη ενεργού μηχανισμού αναθεώρησης του υποδοχέα (receptor editing) στην ΧΛΛ και παρέχει ενδείξεις για το ρόλο του αντιγόνου στην ανάπτυξη και διατήρηση του λευχαιμικού κλώνου, τουλάχιστον σε ένα ποσοστό περιπτώσεων ΧΛΛ.

Η ανεύρεση ομόλογων («στερεότυπων») αναδιατάξεων IGKV-J στην ΧΛΛ προσφέρει επιπρόσθετες ενδείξεις για τον παθογενετικό ρόλο του αντιγόνου στην επιλογή και νεοπλασματική εξαλλαγή Β λεμφοκυττάρων με ιδιαίτερους αντιγονικούς υποδοχείς.

Τα νεοπλασματικά κύτταρα του ΠΜ έχουν επιλεγεί θετικά κατά την ανάπτυξη στο βλαστικό κέντρο.

Η έκταση του φαινομένου της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης είναι μεγαλύτερη στο ΠΜ σε σχέση προς την ΧΛΛ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

1. ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

Αναλύθηκαν αναδιατάξεις του γενετικού τόπου IGK με DNA-PCR και RT-PCR σε 188 περιπτώσεις κ- και 103 περιπτώσεις λ-ΧΛΛ. Σε 188 περιπτώσεις κ-ΧΛΛ ενισχύθηκαν 219 κλωνικές αναδιατάξεις IGKV-J. Τριάντα μία περιπτώσεις (16.5%) έφεραν διπλές αναδιατάξεις. Διπλές εντός πλαισίου αναδιατάξεις ενισχύθηκαν σε 14/188 περιπτώσεις (7.44%). Μόνο σε 3/188 (1.6%) περιπτώσεις ανιχνεύθηκαν διπλά εντός πλαισίου μετάγραφα IGKV-J. Σε αυτές τις περιπτώσεις δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο να εκφράσθηκαν περισσότερες από μια κ ελαφριά αλυσίδα.

Εικοσι-ένα λειτουργικά γονίδια IGKV που ανήκουν στις υποομάδες IGKV1-4 ανιχνεύθηκαν στις 191 μεταγραφόμενες, εντός πλαισίου αναδιατάξεις IGKV-J. Το γονίδιο IGKV3-20 ήταν το πιο συχνό γονίδιο IGKV, ακολουθούσαν τα IGKV1-39/1D-39, IGKV1-5, IGKV4-1, IGKV2-30 και IGKV3-11. Επίσης, αναλύθηκαν αναδιατάξεις IGKV-KDE και IGKJ-C-INTRON-KDE με DNA-PCR. Συνυπολογίζοντας τις αναδιατάξεις IGKV-J, IGKV-KDE και IGKJ-C-INTRON-KDE, 38% των περιπτώσεων κ-ΧΛΛ έφεραν διαλλαλικές αναδιατάξεις στο γενετικό τόπο IGK. Στην λ-ΧΛΛ, 69 αναδιατάξεις IGKV-J ανιχνεύθηκαν σε 64/103 περιπτώσεις (62%): 24 αναδιατάξεις (38.2%) ήταν εντός πλαισίου. Τέσσερις περιπτώσεις έφεραν εντός πλαισίου μετάγραφα IGKV-J όμως διατηρούσαν μονοτυπική έκφραση ελαφριάς αλυσίδας, εύρημα που υποδηλώνει μετα-μεταγραφική ρύθμιση του αποκλεισμού αλληλομόρφου. Χρησιμοποιήθηκαν 19 διαφορετικά γονίδια των υποομάδων IGKV1-5. Το γονίδιο IGKV4-1 ήταν το πιο συχνό γονίδιο IGKV. Συνυπολογίζοντας τις αναδιατάξεις IGKV-J, IGKV-KDE και IGKJ-C-INTRON-KDE, το 97% των περιπτώσεων λ-ΧΛΛ είχαν τουλάχιστον ένα αναδιαταγμένο αλληλόμορφο IGK, σε αντιστοιχία με τα φυσιολογικά κύτταρα. Δεκατρείς από τις 28 και 26/69 μη εκφραζόμενες αλληλουχίες στην κ- ή λ-ΧΛΛ, αντίστοιχα, είχαν <100% ομολογία με τα γονίδια της γαμετικής σειράς. Το εύρημα αυτό μπορεί να θεωρηθεί ως ένδειξη για δευτερογενείς αναδιατάξεις πριν την έναρξη της σωματικής υπερμεταλλαξιογένεσης. Η αδρανοποίηση δυνητικά λειτουργικών συμβολών IGKV-J υποδηλώνει την ύπαρξη ενεργού μηχανισμού αναθεώρησης του υποδοχέα στην ΧΛΛ και παρέχει περαιτέρω ενδείξεις για το ρόλο του αντιγόνου στην παθογένεση της ΧΛΛ.

2. ΠΟΛΛΑΠΛΟΥΝ ΜΥΕΛΩΜΑ

Σε 43 περιπτώσεις κ-ΠΜ ενισχύθηκαν 52 κλωνικές αναδιατάξεις IGKV-J. Εννέα περιπτώσεις έφεραν διπλές αναδιατάξεις, ενώ διπλά εντός πλαισίου (IF) μετάγραφα ανιχνεύθηκαν σε μια περίπτωση. Στα 42 IF μετάγραφα IGKV-J αναγνωρίστηκαν 16 λειτουργικά γονίδια IGKV των υποομάδων IGKV1-4. Το γονίδιο IGKV4-1 επικρατούσε στα IF μετάγραφα, ενώ ακολουθούσαν τα IGKV1-39/1D-39, IGKV1-33/1D-33 και IGKV3-20. Έξι διαφορετικά γονίδια IGKV αναγνωρίστηκαν σε δέκα εκτός πλαισίου (OF) και/ή μη μεταγραφόμενες αναδιατάξεις IGKV-J: το γονίδιο IGKV4-1 χρησιμοποιήθηκε σε 4/10 περιπτώσεις. Σε 17 περιπτώσεις λ-ΠΜ ενισχύθηκαν 19 κλωνικές αναδιατάξεις IGKV-J: δύο περιπτώσεις έφεραν δυο διαφορετικές αναδιατάξεις. Αναγνωρίστηκαν 10 διαφορετικά γονίδια των υποομάδων IGKV1/2/3/4/7. Το γονίδιο IGKV4-1 επικρατούσε, ενώ ακολουθούσαν τα IGKV1-33/1D-33 και IGKV1-39/1D-39. Οκτώ από τις 19 αναδιατάξεις (42%) ήταν IF, ενώ 11/19 αναδιατάξεις (58%) ήταν OF. Σε 17/43 περιπτώσεις κ-ΠΜ (39.5%) βρέθηκαν ενδείξεις για μονοαλληλικές αναδιατάξεις της αλληλουχίας KDE που οδήγησαν σε λειτουργική αδρανοποίηση του συγκεκριμένου αλληλομόρφου. Το γονίδιο IGKV4-1 επικρατούσε στις αναδιατάξεις IGKV-KDE (3/10 περιπτώσεις). Στο λ-ΠΜ, 42 περιπτώσεις αναλύθηκαν για μη παραγωγικές αναδιατάξεις IGKV-KDE και IGKJ-C-INTRON-KDE. Αναδιατάξεις IGKV-KDE ενισχύθηκαν σε 15/42 (35.7%) περιπτώσεις, ενώ αναδιατάξεις IGKJ-C-INTRON-KDE ενισχύθηκαν σε 26/42 περιπτώσεις (61.9%). Δεκαεννέα από τις 43 περιπτώσεις κ-ΠΜ (44.2%) που αναλύθηκαν για αναδιατάξεις IGKV-J, IGKV-KDE και IGKJ-C-INTRON-KDE έφεραν μόνο μια συμβολή IGKV-J. Ενδείξεις για διαλληλικές αναδιατάξεις του γενετικού τόπου IGK προέκυψαν σε: (i) 17/43 περιπτώσεις (39.5%) που έφεραν μια αναδιάταξη της αλληλουχίας KDE παράλληλα με μια εκφραζόμενη αναδιάταξη IGKV-J, και (ii) 5/43 περιπτώσεις (9.3%) με διπλές αναδιατάξεις IGKV-J. Σαράντα δύο περιπτώσεις λ-ΠΜ αναλύθηκαν για αναδιατάξεις IGKV-J, IGKV-KDE και IGKJ-C-INTRON-KDE. Μόνο σε έξι περιπτώσεις (14.3%) δεν υπήρξαν ενδείξεις για αναδιάταξη του γενετικού τόπου IGK. Δεκαοκτώ περιπτώσεις έφεραν μια αναδιάταξη στο γενετικό τόπο IGK, ενώ 12 και 6 περιπτώσεις, αντιστοίχως, έφεραν δύο ή τρεις αναδιατάξεις στο γενετικό τόπο IGK. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις (14/18) συγκεντρώθηκαν ενδείξεις για διαλληλικές αναδιατάξεις του γενετικού τόπου IGK. Όλα τα IF μετάγραφα IGKV-J στο κ-ΠΜ είχαν ομολογία που κυμαινόταν από 84% έως 98%. Στο λ-ΠΜ, έξι από τις 19 αναδιατάξεις IGKV-J είχαν ομολογία < 100%: 3/6 μεταλλαγμένες περιπτώσεις είχαν ομολογία < 98%. Συνεπώς, τα νεοπλασματικά κύτταρα του ΠΜ έχουν επιλεγεί θετικά κατά την ανάπτυξη στο βλαστικό κέντρο. Η

έκταση του φαινομένου της σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης είναι μεγαλύτερη στο ΠΜ σε σχέση προς την ΧΛΛ.

SUMMARY

1. CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

Immunoglobulin kappa (IGK) locus rearrangements were analyzed in parallel on cDNA/genomic DNA in 188 kappa- and 103-lambda chronic lymphocytic leukemia (CLL) cases. In kappa-CLL, 219 IGKV-J clonal rearrangements were amplified in 188 cases. Thirty-one cases (16.5%) carried double rearrangements; both rearrangements were in-frame in 14/188 cases (7.44%). Double in-frame IGKV-J transcripts were detected in only 3/188 cases (1.6%). In such cases, the possibility that leukemic cells expressed more than one kappa chain cannot be excluded.

Twenty-one functional IGKV genes belonging to the IGKV1-4 subgroups were identified in 191 transcribed, in-frame IGKV-J rearrangements. IGKV3-20 was the most frequent IGKV gene, followed by IGKV1-39/1D-39, IGKV1-5, IGKV4-1, IGKV2-30 and IGKV3-11. IGKV-KDE and IGKJ-C-INTRON-KDE rearrangements were also analyzed on genomic DNA. Taking IGKV-J, IGKV-KDE and IGKJ-C-INTRON-KDE rearrangements together, 38% of kappa-CLL cases carried biallelic IGK locus rearrangements. In lambda-CLL, 69 IGKV-J rearrangements were detected in 64/103 cases (62%); 24 rearrangements (38.2%) were in-frame. Four cases carried in-frame IGKV-J transcripts but retained monotypic light chain expression, suggesting post-transcriptional regulation of allelic exclusion. Nineteen different genes of the IGKV1-5 subgroups were used; IGKV4-1 was the most frequent IGKV gene, followed by IGKV1-33/1D-33, IGKV1-39/1D-39, IGKV2-30 and IGKV1-16. In all, taking IGKV-J, IGKV-KDE and IGKJ-C-INTRON-KDE rearrangements together, 97% of lambda-CLL cases had at least one rearranged IGK allele, in keeping with normal cells. IG repertoire comparisons in kappa vs. lambda CLL revealed that CLL precursor cells tried many rearrangements on the same IGK allele before they became lambda producers. Thirteen out of 28 and 26/69 non-expressed sequences in, respectively, kappa- or lambda-CLL had <100% homology to germline. This finding might be considered as evidence for secondary rearrangements occurring after the onset of somatic hypermutation, at least in some cases. The inactivation of potentially functional IGKV-J joints by secondary rearrangements indicates active receptor editing in CLL and provides further evidence for the role of antigen in CLL immunopathogenesis.

2. MULTIPLE MYELOMA

Fifty-two IGKV-J clonal rearrangements were amplified in 43 κ -MM cases. Nine cases carried double rearrangements; double in-frame IGKV-J transcripts were detected in one case. Sixteen functional IGKV genes of the IGKV1-4 subgroups were identified in the transcribed, in-frame IGKV-J rearrangements. Six different IGKV genes were identified in ten out-of-frame and/or non-transcribed IGKV-J rearrangements; the IGKV4-1 gene was used in 4/10 cases. Nineteen clonal IGKV-J rearrangements were amplified in 17 lambda-MM cases; two cases carried 2 different rearrangements. Ten different germline genes of the IGKV1/2/3/4/7 subgroups were identified. IGKV4-1 was the most frequent IGKV gene, followed by IGKV1-33/1D-33 and IGKV1-39/1D-39. Eight out of 19 rearrangements (42%) were in-frame, while 11/19 rearrangements (58%) were out-of-frame. Nine out of 43 kappa-MM cases (20.9%) carried IGKV-KDE rearrangements; IGKJ-C-INTRON-KDE rearrangements were amplified in 8/43 cases (18.6%). Overall, 17/43 kappa-MM cases (39.5%) carried monoallelic KDE rearrangements leading to IGK locus inactivation on that particular allele. In lambda-MM, IGKV-KDE and IGKJ-C-INTRON-KDE rearrangements were amplified in 15/42 cases (35.7%) and 26/42 cases (61.9%), respectively. In both kappa- and lambda-MM, the IGKV gene repertoire in IGKV-KDE rearrangements was diverse; IGKV2-30 was the most frequent gene. Nineteen out of 43 kappa-MM cases (44.2%) analyzed for IGKV-J, IGKV-KDE and IGKJ-C-INTRON-KDE rearrangements carried only one IGK locus rearrangement in the form of a single IGKV-J joint. PCR evidence for biallelic IGK locus rearrangements was obtained in: (i) 17/43 cases (39.5%) carrying a rearrangement to the KDE along with an expressed IGKV-J rearrangement, and (ii) 5/43 cases (11.6%) with double IGKV-J rearrangements. In such cases, biallelic IGK rearrangements were suggested by IGKJ gene repertoire analysis as well as location and mode of recombination of the IGKV genes identified in both rearrangements. In four kappa-MM cases, both IGKV-J rearrangements could have occurred sequentially on either one or both IGK alleles. Only six out of 42 (14.3%) lambda-MM cases had no PCR evidence for IGK locus rearrangements. Eighteen cases carried one rearrangement on the IGK locus, while 12 and 6 cases, respectively, bore two or three IGK locus rearrangements. All transcribed, in-frame IGKV-J rearrangements in kappa-MM were mutated. Seven out of ten non-transcribed and/or out-of-frame IGKV-J rearrangements in kappa-MM had 100% homology to germline. Two out of the remaining three rearrangements were heavily mutated and also carried crippling mutations. In lambda-MM, six out of 19 IGKV-J rearrangements had less than 100% homology to germline, of which five

were in-frame; 3/6 mutated cases had less than 98% homology. In conclusion, the MM clonogenic cell has been positively selected during the development and reaction of the germinal center. Biases in IG repertoire do not seem to be disease-related but generally follow a similar pattern to the normal repertoire.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kuby J. Immunology 4th edition. W.H. Freeman and Company, 2001.
2. Lefranc MP, Lefranc G. The immunoglobulin FactsBook. Academic Press, London, 2001.
3. Janeway CA, Travers P. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, Garland Publishing, 1994.
4. Davies DR, Padlan EA, Sheriff S. Antibody-antigen complexes. Annu Rev Biochem 1990;59:439-73.
5. Stites DP, Terr AI. Medical Immunology, 9th edition, Appleton and Lange, 1997.
6. Rolink A, Melchers F. Molecular and Cellular Origins of B Lymphocyte Diversity. Cell 1991;66:1081-94.
7. Scaviner D, Barbie V, Ruiz M, Lefranc MP. Protein displays of the human immunoglobulin heavy, kappa and lambda variable and joining regions. Exp Clin Immunogenet 1999;16:234-240.
8. Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. Sequences of proteins of immunological interest. Bethesda MD. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, 1991.
9. Grawunder U, West R, Lieber M. Antigen receptor gene rearrangement. Curr Opin Immunol 1998;10:172-180.
10. Okamura H, Rao A. Transcriptional regulation in lymphocytes. Curr Opin Immunol 2001;13:239-243.
11. Schlissel MS. Regulating antigen-receptor gene assembly. Nat Rev Immunol 2003;3:890-899.
12. Schatz DG, Oettinger MA, Schlissel MS. V(D)J recombination: Molecular biology and regulation. Annual Review of Immunology 1992;10:359-383.
13. Lewis SM. The Mechanism of V(D)J Joining: Lessons from Molecular, Immunological, and comparative Analyses. Advances in immunology 1994;56:27-150.
14. Ramsden DA, Baetz K, Wu GE. Conservation of sequence in recombination signal sequence spacers. Nucleic Acids Res. 1994;22:1785-1796.
15. Akira S, Okazaki K, Sakano H. Two pairs of recombination signals are sufficient to cause immunoglobulin V-(D)-J joining. Science 1987;238:1134-1138.

16. Yu K, Taghva A, Lieber MR. The cleavage efficiency of the human immunoglobulin heavy chain VH elements by the RAG complex: implications for the immune repertoire. *J Biol Chem*. 2002;277:5040-5046.
17. Sadovsky M. Rag proteins in VDJ recombination: more than just a nuclease. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:1399-1409.
18. Fugmann SD, Lee AI, Shockett PE, Villey IJ, Schatz DG. The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:495-527.
19. Jones JM, Gellert M. Ordered assembly of the V(D)J synaptic complex ensures accurate recombination. *EMBO J*. 2002;21:4162-4171.
20. Tuaille N, Capra JD. Evidence That Terminal Deoxynucleotidyltransferase Expression Plays a Role in Ig Heavy Chain Gene Segment Utilization, *J Immunol*. 2000;164:6387-97.
21. Nadel B, Feeney AJ. Nucleotide Deletion and P Addition in V(D)J Recombination: a Determinant Role of the Coding-End Sequence. *Mol Cell Biol*. 1997;17:3768-3778.
22. Corbett SJ, Tomlinson IM, Sonnhhammer ELL, Buck D, Winter G. Sequence of the Human Immunoglobulin Diversity (D) Segment Locus: A Systematic Analysis Provides No Evidence for the Use of DIR Segments, Inverted D Segments, "Minor" D Segments or D-D Recombination. *J. Mol. Biol*. 1997;270:587-597.
23. McHeyzer-Williams M, McHeyzer-Williams L, Panus J, Pogue-Caley R, Bikah G, Driver D, Eisenbraun M. Helper T-cell-regulated B-cell immunity. *Microbes Infect*. 2003;5:205-212.
24. Carsetti R. The Development of B Cells in the Bone Marrow Is Controlled by the Balance Between Cell-autonomous Mechanisms and Signals from the Microenvironment. *J Exp Med*. 2000;191:5-8.
25. Karasuyama H, Rolink A, Melchers F. Surrogate light chain in B cell development. *Adv Immunol* 1996;63:1-41.
26. Retter MW, Nemazee D. Receptor editing occurs frequently during normal B cell development. *J Exp Med*. 1998;188:1231-1238.
27. Tiegs SL, Russell DM, Nemazee D. Receptor editing in self reactive bone marrow B cells. *J Exp Med* 1993;177:1009-1020.
28. Nemazee D, Hogquist KA. Antigen receptor selection by editing or downregulation of V(D)J recombination. *Curr Opin Immunol*. 2003;15:182-189.

29. Fang T, Smith BP, Roman CA. Conventional and surrogate light chains differentially regulate Ig mu and Dmu heavy chain maturation and surface expression. *J Immunol* 2001;167:3846-57.
30. Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 2003;301:1374-1377.
31. Nussenzweig MC. Immune receptor editing: revise and select. *Cell* 1998;95:875-878.
32. Barreto V, Ramiro A, Nussenzweig M. Activation-induced deaminase: controversies and open questions. *Trends Immunol.* 2005;26:90-96.
33. Chua K, Alt F, Manis J. The function of AID in somatic mutation and class switch recombination: upstream or downstream of DNA breaks. *J Exp Med* 2002;195:F37-41.
34. McHeyzer-Williams MG. B cells as effectors. *Curr Opin Immunol.* 2003;15:354-361.
35. de Vinuesa CG, Cook MC, Ball J, Drew M, Sunners Y, Cascalho M et al. Germinal centers without T cells. *J Exp Med.* 2000;191:485-494.
36. MacLennan IC, Toellner KM, Cunningham AF, Serre K, Sze DM, Zuniga E et al. Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev.* 2003;194:8-18.
37. Vinuesa CG, Sze DM, Cook MC, Toellner KM, Klaus GG, Ball J, MacLennan IC. Recirculating and germinal center B cells differentiate into cells responsive to polysaccharide antigens. *Eur J Immunol.* 2003;33:297-305.
38. Kotani A, Okazaki IM, Muramatsu M, Kinoshita K, Begum NA, Nakajima T et al. A target selection of somatic hypermutations is regulated similarly between T and B cells upon activation-induced cytidine deaminase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:4506-4511.
39. Nagaoka H, Ito S, Muramatsu M, Nakata M, Honjo T. DNA cleavage in immunoglobulin somatic hypermutation depends on de novo protein synthesis but not on uracil DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:2022-2027.
40. Longerich S, Basu U, Alt F, Storb U. AID in somatic hypermutation and class switch recombination. *Curr Opin Immunol.* 2006;18:164-74.
41. Klobbeck HG, Zachau HG. The human CK gene segment and the kappa deleting element are closely linked. *Nucleic Acids Res.* 1986;14:4591-4603.
42. Siminovitch KA, Bakhshi A, Goldman P, Korsmeyer SJ. A uniform deleting element mediates the loss of kappa genes in human B cells. *Nature* 1985;316:260-262.

43. Brauninger A, Goossens T, Rajewsky K, Kuppers R. Regulation of immunoglobulin light chain gene rearrangements during early B cell development in the human. *Eur J Immunol.* 2001;31:3631-3637.
44. Burrows PD, Stephan RP, Wang YH, Lassoued K, Zhang Z, Cooper MD. The transient expression of pre-B cell receptors governs B cell development. *Semin Immunol* 2002;14:343-349.
45. Iber D. Formation of the B cell synapse: retention or recruitment? *Cell Mol Life Sci.* 2005;62:206-213.
46. French DL, Laskov R, Scharff MD. The role of somatic hypermutation in the generation of antibody diversity. *Science* 1989;244:1152-1157.
47. McHeyzer-Williams L, Driver D, McHeyzer-Williams M. Germinal center reaction. *Curr Opin Hematol* 2001;8:52-59.
48. Manser T. Textbook Germinal Centers. *The Journal of Immunology* 2004; 172:3369-3375.
49. Davis DM, Igakura T, McCann FE, Carlin LM, Andersson K, Vanherberghen B et al. The protean immune cell synapse: a supramolecular structure with many functions. *Semin Immunol.* 2003;15:317-324.
50. Friedl P, Storim J. Diversity in immune-cell interactions: states and functions of the immunological synapse. *Trends Cell Biol.* 2004;14:557-567.
51. Papavasiliou FN, Schatz DG. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity. *Cell* 2002;109:35-44.
52. van Es JH, Gmelig Meyling FHJ, Logtenberg T. High frequency of somatically mutated IgM molecules in the human adult blood B-cell repertoire. *European Journal of Immunology* 1992;22:2761-2764.
53. Besmer E, Gourzi P, Papavasiliou F. The regulation of somatic hypermutation. *Curr. Opin. Immunol.* 2004;16:241-245.
54. Michael N, Martin T, Nicolae D, Kim N, Padjen K, Zhan P et al. Effects of sequence and structure on the hypermutability of immunoglobulin genes. *Immunity* 2002;16:123-134.
55. Wagner SD, Milstein C, Neuberger MS. Codon bias targets mutation. *Nature* 1995;376:732.
56. Kenter AL. Class switch recombination: an emerging mechanism. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005;290:171-99.
57. Chaudhuri J, Alt FW. Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:541-552.

58. Dudley DD, Chaudhuri J, Bassing CH, Alt FW. Mechanism and Control of V(D)J Recombination versus Class Switch Recombination: Similarities and Differences. *Adv Immunol.* 2005;86:43-112.
59. Pillai S, Cariappa A, Moran ST. Positive selection and lineage commitment during peripheral B-lymphocyte development. *Immunological Reviews* 2004;197:206-218.
60. Martin F, Kearney JF. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:323-335.
61. Cariappa A, Tang M, Parng C, Nebelitskiy E, Carroll M, Georgopoulos K et al. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk and CD21. *Immunity* 2001;14:603-615.
62. Cariappa A, Pillai S. Antigen-dependent B-cell development. *Curr Opin Immunol.* 2002;14:241-249.
63. Pillai S, Cariappa A, Moran ST. Marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:161-196.
64. Kruetzmann S, Rosado MM, Weber H, Germing U, Tournilhac O, Peter HH et al. Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen. *J Exp Med.* 2003;197:939-945.
65. Weller S, Braun MC, Tan BK, Rosenwald A, Cordier C, Conley ME et al. Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* 2004;104:3647-3654.
66. Cariappa A, Liou HC, Horwitz BH, Pillai S. Nuclear factor kappa B is required for the development of marginal zone B lymphocytes. *J Exp Med.* 2000;192:1175-1182.
67. Maillard I, Weng AP, Carpenter AC, Rodriguez CG, Sai H et al. Mastermind critically regulates Notch-mediated lymphoid cell fate decisions. *Blood* 2004;104:1696-1702.
68. Berland R, Wortis HH. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:253-300.
69. Wortis HH, Berland R. Cutting edge commentary: origins of B-1 cells. *J Immunol.* 2001;166:2163-2166.
70. Martin F, Kearney JF. B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory". *Immunol Rev.* 2000;175:70-79.

71. Pasqualucci L, Migliazza A, Fracchiolla N, William C, Neri A, Baldini L et al. BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:11816-11821.
72. Chang B, Casali P. The CDR1 sequences of a major proportion of human germline IgVH genes are inherently susceptible to amino acid replacement. *Immunol Today* 1994;15:367-373.
73. Betz AG, Rada C, Pannell R, Milstein C, Neuberger MS. Passenger transgenes reveal intrinsic specificity of the antibody hypermutation mechanism: clustering, polarity, and specific hot spots. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:2385-2388.
74. Neuberger NS, Ehrenstein MR, Klix N, Jolly CJ, Yelamos J, Rada C et al. Monitoring and interpreting the intrinsic features of somatic hypermutation. *Immunol Rev*. 1998;162:107-116.
75. Reynaud CA, Aoufouchi S, Faili A, Weill JC. What role for AID: mutator, or assembler of the immunoglobulin mutasome? *Nat Immunol*. 2003;4:631-638.
76. Manis JP, Tian M, Alt FW. Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol*. 2002;23:31-39.
77. Honjo T, Kinoshita K, Muramatsu M. Molecular Mechanism of class switch recombination: Linkage with Somatic Hypermutation. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:165-96.
78. Okazaki I, Yoshikawa K, Kinoshita K, Muramatsu M, Nagaoka H, Honjo T. Activation-induced cytidine deaminase links class switch recombination and somatic hypermutation. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;987:1-8.
79. Tian M, Alt FW. RNA editing meets DNA shuffling. *Nature*. 2000;407:31-33.
80. Ramiro AR, Stavropoulos P, Jankovic M, Nussenzweig MC. Transcription enhances AID-mediated cytidine deamination by exposing single-stranded DNA on the nontemplate strand. *Nat Immunol*. 2003;4:452-456.
81. Carey GB, Donjerkovic D, Mueller CM, Liu S, Hinshaw JA et al. B-cell receptor and Fas-mediated signals for life and death. *Immunol. Rev*. 2000; 176:105-15.
82. Krober A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Bruckle E, Lichter P et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:1410-1416.
83. Norvell A, Monroe JG. Acquisition of surface IgD fails to protect from tolerance-induction. Both surface IgM and surface IgD-mediated signals induce apoptosis of immature murine B lymphocytes. *J. Immunol*. 1996; 156:1328-32.
84. Brink R, Goodnow CC, Crosbie J, Adams J, Eris J et al. Immunoglobulin M and D antigen receptors are both capable of mediating B lymphocyte activation,

- deletion, or anergy after interaction with specific antigen. *J. Exp. Med.* 1992;176:991-1005.
85. Lanham S, Hamblin T, Oscier D, Ibbotson R, Stevenson F, Packham G. Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2003;101:1087-1093.
 86. Oppezzo P, Vuillier F, Vasconcelos Y et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells expressing AID display dissociation between class switch recombination and somatic hypermutation. *Blood* 2003;101:4029-4032.
 87. Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 1992;71:649-110.
 88. Taniguchi T, Kobayashi T, Kondo J et al. Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis. *J Biol Chem.* 1991;266:15790-15796.
 89. Keating MJ, Lerner S, Kantarjian H et al. The serum β 2-microglobulin level is more powerful than stage in predicting response and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1995;86:606a.
 90. Kuppers R, Dalla-Favera R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* 2001;20:5580-5594.
 91. Dyer MJ., Oscier DG. The configuration of the immunoglobulin genes in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2002;16:973-984.
 92. Shapiro-Shelef M, Calame K. Plasma cell differentiation and multiple myeloma. *Curr Opin Immunol.* 2004;16:226-34.
 93. Moyes SP, Brown CM, Scott BB, Maini RN, Mageed RA. Analysis of V kappa genes in rheumatoid arthritis (RA) synovial B lymphocytes provides evidence for both polyclonal activation and antigen-driven selection. *Clin Exp Immunol.* 1996;105:89-98.
 94. Pichurin P, Guo J, Yan X, Rapoport B, McLachlan SM. Human monoclonal autoantibodies to B-cell epitopes outside the thyroid peroxidase autoantibody immunodominant region. *Thyroid.* 2001;11:301-313.
 95. Portolano S, McLachlan SM, Rapoport B. High affinity, thyroid-specific human autoantibodies displayed on the surface of filamentous phage use V genes similar to other autoantibodies. *J Immunol.* 1993;151:2839-2851.
 96. Sthoeger ZM, Wakai M, Tse DB, Vinciguerra P, Allen SL, Budman DR et al. Production of autoantibodies by CD5-expressing B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med.* 1989;169:255-268.

97. Rassenti LZ, Kipps TJ. Lack of allelic exclusion in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 1997;185:1435-45.
98. Stamatopoulos K, Belessi C, Hadzidimitriou A, Smilevska T, Kalagiakou E, Hatzi K et al. Immunoglobulin light chain repertoire in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005; Aug 2 [Epub ahead of print].
99. Suzuki N, Harada T, Mihara S, Sakane T. Characterization of a germline Vk gene encoding cationic anti-DNA antibody and role of receptor editing for development of the autoantibody in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*. 1996;98:1843-1850.
100. Casellas R, Shih TA, Kleinewietfeld M, Rakonjac J, Nemazee D, Rajewsky K et al. Contribution of receptor editing to the antibody repertoire. *Science* 2001;291:1541-1544.
101. Juul L, Hougs L, Andersen V, Svejgaard A, Barington T. The normally expressed kappa immunoglobulin light chain gene repertoire and somatic mutations studied by single-sided specific polymerase chain reaction (PCR); frequent occurrence of features often assigned to autoimmunity. *Clin Exp Immunol*. 1997;109:194-203.
102. Foster SJ, Brezinschek HP, Brezinschek RI, Lipsky PE. Molecular mechanisms and selective influences that shape the kappa gene repertoire of IgM+ B cells. *J Clin Invest*. 1997;99:1614-1627.
103. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1848-1854.
104. Chiorazzi N, Ferrarini M. 2001. Immunoglobulin variable region gene characteristics and surface membrane phenotype define B-CLL subgroups with distinct clinical courses. See Ref. 277, pp. 81-109.
105. Schroeder J, Dighiero G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol. Today* 1994;15:288-94.
106. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Thorn I, Soderberg O et al. Somatic mutations of Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;99:2262-64.
107. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J. Clin. Invest*. 1998;102:1515-25.
108. Wang J, Vock VM, Li S, Olivas OR, Wilkinson MF. A quality control pathway that down-regulates aberrant T-cell receptor (TCR) transcripts by a mechanism requiring UPF2 and translation. *J Biol Chem*. 2002;277:18489-18493.

109. Buhler M, Paillusson A, Muhlemann O. Efficient downregulation of immunoglobulin mu mRNA with premature translation-termination codons requires the 5'-half of the VDJ exon. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:3304-3315.
110. Ignatovich O, Tomlinson IM, Jones PT, Winter G. The Creation of Diversity in the Human Immunoglobulin V λ Repertoire. Academic Press Limited 1997.
111. Farner NL, Dorner T, Lipsky PE. Molecular Mechanisms and Selection Influence the Generation of the Human V λ J λ Repertoire, *The Journal of Immunology* 1999;162:2137-2145.
112. Wasserman R, Ito Y, Galili N, Yamada M, Reichard BA, Shane S et al. The pattern of joining (JH) gene usage in the human IgH chain is established predominantly at the B precursor cell stage. *J Immunol* 1992;149:511-6.
113. Widhopf GF 2nd, Kipps TJ. Normal B cells express 51p1-encoded Ig heavy chains that are distinct from those expressed by chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol.* 2001;166:95-102.
114. Ghiotto F, Fais F, Valetto A. Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest.* 2004;113:1008-1016.
115. 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* 2004;104:2499-2504.
116. Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med.* 2004;200:519-525.
117. Tobin G, Thunberg U, Karlsson K. Subsets with restricted immunoglobulin gene rearrangement features indicate a role for antigen selection in the development of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2004;104:2879-2885.
118. Kenny JJ, Rezanka LJ, Lustig A, Fischer RT, Yoder J, Marshall S et al. Autoreactive B cells escape clonal deletion by expressing multiple antigen receptors. *J. Immunol.* 2000;164:4111-4119.
119. Li Y, Li H, Weigert M. Autoreactive B cells in the marginal zone that express dual receptors. *J. Exp. Med.* 2002;195:181-188.
120. Widhopf GF, Brinson DC, Kipps TJ, Tighe H. Transgenic expression of a human polyreactive Ig expressed in chronic lymphocytic leukemia generates memory-type B cells that respond to nonspecific immune activation. *J. Immunol.* 2004;172:2092-2099.

121. Giachino C, Padovan E, Lanzavecchia A. kappa+lambda+ dual receptor B cells are present in the human peripheral repertoire. *J Exp Med* 1995;181:1245-50.
122. Lefranc MP. Nomenclature of the human immunoglobulin kappa (IGK) genes. *Exp Clin Immunogenet.* 2001;18:161-174.
123. Dorner T, Foster SJ, Farmer NL, Lipsky PE. Immunoglobulin kappa chain receptor editing in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1998;102:688-694.
124. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2005;352:804-815.
125. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C et al. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood* 2005;105:1678-1685.
126. Lampman GW, Furie B, Schwartz RS, Stollar BD, Furie BC. Amino acid sequence of a platelet-binding human anti-DNA monoclonal autoantibody. *Blood* 1989;74:262-269.
127. Rioux JD, Zdarsky E, Newkirk MM, Rauch J. Anti-DNA and anti-platelet specificities of SLE-derived autoantibodies: evidence for CDR2H mutations and CDR3H motifs. *Mol. Immunol.* 1995;32:683-696.
128. Kawasaki K, Minoshima S, Nakato E, Shibuya K, Shintani A, Asakawa S et al. Evolutionary dynamics of the human immunoglobulin kappa locus and the germline repertoire of the Vkappa genes. *Eur J Immunol.* 2001;31:1017-28.
129. Klein R, Jaenichen R, Zachau HG. Expressed human immunoglobulin k genes and their hypermutation. *Eur. J. Immunol.* 1993;23:3248-3271.
130. Radic MZ, Erikson J, Litwin S, Weigert M. B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors. *J Exp Med* 1993;177:1165-1173.
131. Martin D, Huang RQ, LeBien T, Van Ness B. Induced rearrangement of kappa genes in the BLIN-1 human pre-B cell line correlates with germline J-C kappa and V kappa transcription. *J Exp Med.* 1991;173:639-645.
132. Chen C, Nagy Z, Prak EL, Weigert M. Immunoglobulin heavy chain gene replacement: a mechanism of receptor editing. *Immunity* 1995;3:747-755.
133. Diaw L, Siwarski D, DuBois W, Jones G, Huppi K. Double producers of kappa and lambda define a subset of B cells in mouse plasmacytomas. *Mol. Immunol.* 2000;37:775-781.
134. Dorner T, Farmer NL, Lipsky PE. Ig lambda and heavy chain gene usage in early untreated systemic lupus erythematosus suggests intensive B cell stimulation. *J. Immunol.* 1999;163:1027-1036.

135. Itoh K, Meffre E, Albesiano E et al. Immunoglobulin heavy chain variable region gene replacement as a mechanism for receptor revision in rheumatoid arthritis synovial tissue B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 2000;192:1151-1164.
136. Kaschner S, Hansen A, Jacobi A et al. Immunoglobulin V λ light chain gene usage in patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2001;44:2620-2632.
137. Lenze D, Greiner A, Knorr C, Anagnostopoulos I, Stein H, Hummel M. Receptor revision of immunoglobulin heavy chain genes in human MALT lymphomas. *Mol. Pathol.* 2003;56:249-255.
138. Meffre E, Davis E, Schiff C et al. Circulating human B cells that express surrogate light chains and edited receptors. *Nat. Immunol.* 2000;1:207-213.
139. Meffre E, Schaefer A, Wardemann H, Wilson P, Davis E, Nussenzweig MC. Surrogate Light Chain Expressing Human Peripheral B Cells Produce Self-reactive Antibodies. *J. Exp. Med.* 2004;199:145-150.
140. 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;10:1551-1556.
141. Zhang Z, Burrows PD, Cooper MD. The molecular basis and biological significance of VH replacement. *Immunol. Rev.* 2004;197:231-242.
142. Zhang Z, Wu X, Limbaugh BH, Bridges SL. Expression of recombination-activating genes and terminal deoxynucleotidyl transferase and secondary rearrangement of immunoglobulin κ light chains in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 2001;44: 2275-2284.
143. Goossens T, Brauningner A, Klein U, Kuppers R, Rajewsky K. Receptor revision plays no major role in shaping the receptor repertoire of human memory B cells after the onset of somatic hypermutation. *Eur. J. Immunol.* 2001;31:3638-3648.
144. Magari M, Sawatari T, Kawano Y et al. Contribution of light chain rearrangement in peripheral B cells to the generation of high affinity antibodies. *Eur. J. Immunol.* 2002;32:957-966.
145. Goossens T, Klein U, Kuppers R. Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998;95:2463-2468.
146. Klein U, Goossens T, Fischer M, Kanzler H, Braeuningner A, Rajewsky K et al. Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunol. Rev.* 1998;162:261-280.

147. Kuppers R, Goossens T, Klein U. The role of somatic hypermutation in the generation of deletions and duplications in human Ig V region genes and chromosomal translocations. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1999;246:193-198.
148. Benito C, Gomis R, Fernandez-Alvarez J, Usac EF, Gallart T. Transcript expression of two Iglambda rearrangements and RAG-1/RAG-2 in a mature human B cell producing IgMlambda islet cell autoantibody. *J. Clin. Immunol.* 2003;23:107-118.
149. Darlow JM, Farrell AM, Stott DI. Non-functional immunoglobulin G transcripts in a case of hyper-immunoglobulin M syndrome similar to type 4. *Immunology* 2004;111:212-222.
150. Bakkus MH, Heirman C, Van Riet I, Van Camp B, Thielemans K. Evidence that multiple myeloma Ig heavy chain VDJ genes contain somatic mutations but show no intraclonal variation. *Blood* 1992;80:2326-35.
151. Rettig MB, Vescio RA, Cao J, Wu CH, Lee JC, Han E et al. VH gene usage is multiple myeloma: complete absence of the VH4.21 (VH4-34) gene. *Blood* 1996;87:2846-52.
152. Nemazee D. Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 2000;18:19-51.
153. Baker BW, Deane M, Gilleece MH, Johnston D, Scarffe JH, Norton JD. Distinctive features of immunoglobulin heavy chain variable region gene rearrangement in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 1994;14:291-301.
154. Gonzalez D, Gonzalez M, Balanzategui A, Sarasquete ME, Lopez-Perez R, Chillon MC et al. Molecular characteristics and gene segment usage in IGH gene rearrangements in multiple myeloma. *Haematologica* 2005;90:906-13.
155. Juge-Morineau N, Heirman C, Bakkus M, Van Camp B, Malfait R, Harousseau JL et al. Immunoglobulins D and M multiple myeloma variants are heavily mutated. *Clin Cancer Res* 1997;3:2501-6.
156. Vescio RA, Cao J, Hong CH, Lee JC, Wu CH, Der Danielian M et al. Myeloma Ig heavy chain V region sequences reveal prior antigenic selection and marked somatic mutation but no intraclonal diversity. *J Immunol* 1995;155:2487-97.
157. Kosmas C, Stamatopoulos K, Papadaki T, Belessi C, Yataganas X, Anagnostou D et al. Somatic hypermutation of immunoglobulin variable region genes: focus on follicular lymphoma and multiple myeloma. *Immunological Reviews* 1998;162:281-292.

158. Kosmas C, Viniou NA, Stamatopoulos K, Courtenay-Luck NS, Papadaki T, Kollia P et al. Analysis of the kappa light chain variable region in multiple myeloma. *British Journal of Haematology* 1996;94:306-317.
159. Perfetti V, Vignarelli MC, Palladini G, Navazza V, Giachino C, Merlini G. Insights into the regulation of immunoglobulin light chain gene rearrangements via analysis of the kappa light chain locus in lambda myeloma. *Immunology* 2004;112(3):420-7.
160. Sahota SS, Leo R, Hamblin TJ, Stevenson FK. Myeloma VL and VH sequences reveal a complementary imprint of antigen selection in tumor cells. *Blood* 1997;89:219-226.
161. Comenzo RL, Wally J, Kica G, Murray J, Ericsson T, Skinner M et al. Clonal immunoglobulin light chain variable region germline gene use in AL amyloidosis: association with dominant amyloid-related organ involvement and survival after stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 1999;106:744-51.
162. Comenzo RL, Zhang Y, Martinez C, Osman K, Herrera GA. The tropism of organ involvement in primary systemic amyloidosis: contributions of Ig V(L) germ line gene use and clonal plasma cell burden. *Blood* 2001;98:714-20.
163. Perfetti V, Casarini S, Palladini G, Vignarelli MC, Klersy C, Diegoli M et al. Analysis of V(lambda)-J(lambda) expression in plasma cells from primary (AL)amyloidosis and normal bone marrow identifies 3r (lambdaIII) as a new amyloid-associated germline gene segment. *Blood* 2002;100:948-53.
164. Gay D, Saunders T, Camper S, Weigert M. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J Exp Med*1993;177:999-1008.
165. Nemazee D. Receptor editing in B cells. *Adv Immunol* 2000;74:89-126.
166. Han S, Dillon SR, Zheng B, Shimoda M, Schlissel MS, Kelsoe G. V(D)J recombinase activity in a subset of germinal center B lymphocytes. *Science* 1997;278:301-305.
167. Han S, Zheng B, Schatz DG, Spanopoulou E, Kelsoe G. Neoteny in lymphocytes. Rag1 and Rag2 expression in germinal center B cells. *Science* 1996;274:2094-2097.
168. Hertz M, Kouskoff V, Nakamura T, Nemazee D. V(D)J recombinase induction in splenic B lymphocytes is inhibited by antigen-receptor signalling. *Nature* 1998; 394:292-295.
169. Hikida M, Ohmori H. Rearrangement of lambda light chain genes in mature B cells in vitro and in vivo. Function of reexpressed recombination-activating gene (RAG) products. *J Exp Med* 1998;187:795-9.

170. Meffre E, Papavasiliou F, Cohen P et al. Antigen receptor engagement turns off the V(D)J recombination machinery in human tonsil B cells. *J Exp Med* 1998;188:765-72.
171. Papavasiliou F, Casellas R, Suh H et al. V(D)J recombination in mature B cells: a mechanism for altering antibody responses. *Science* 1997;278:298-301.
172. Kelsoe G. V(D)J hypermutation and receptor revision: coloring outside the lines. *Curr Opin Immunol* 1999;11:70-75.
173. Nemazee D, Weigert M. Revising B cell receptors. *J Exp Med* 2000;191:1813-7.
174. George AJ, Gray D. Receptor editing during affinity maturation. *Immunol Today* 1999;20:196.
175. Wilson PC, Wilson K, Liu YJ, Banchereau J, Pascual V, Capra JD. Receptor revision of immunoglobulin heavy chain variable region genes in normal human B lymphocytes. *J Exp Med* 2000;191:1881-94.
176. Giachino C, Padovan E, Lanzavecchia A. Re-expression of RAG-1 and RAG-2 genes and evidence for secondary rearrangements in human germinal center B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1998;28:3506-13.
177. de Wildt RM, Hoet RM, van Venrooij WJ, Tomlinson IM, Winter G. Analysis of heavy and light chain pairings indicates that receptor editing shapes the human antibody repertoire. *J Mol Biol* 1999;285:895-901.
178. Bellan C, Lazzi S, Zazzi M et al. Immunoglobulin gene rearrangement analysis in composite Hodgkin disease and large B-cell lymphoma: evidence for receptor revision of immunoglobulin heavy chain variable region genes in Hodgkin-Reed-Sternberg cells? *Diagn Mol Pathol* 2002;11:2-8.
179. Nadel B, Marculescu R, Le T, Rudnicki M, Bocskor S, Jager U. Novel insights into the mechanism of t(14;18)(q32;q21) translocation in follicular lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 2001;42:1181-1194.
180. Rosenquist R, Menestrina F, Lestani M, Kuppers R, Hansmann ML, Brauner A. Indications for peripheral light-chain revision and somatic hypermutation without a functional B-cell receptor in precursors of a composite diffuse large B-cell and Hodgkin's lymphoma. *Lab Invest.* 2004; 84:253-62.
181. Monestier M, Zouali M. Receptor revision and systemic lupus. *Scand J Immunol* 2002;55:425-31.