



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ-ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Αναστάσιος Ε. Γερμενής

Διδακτορική Διατριβή

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ BAFF/APRIL
ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΑ ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ»**

υπό

Ειρήνης Σεβδαλή

Βιολόγου

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2018

© 2018 ΕΙΡΗΝΗ ΣΕΒΔΑΛΗ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

- 1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)** **Δρ. Ματθαίος Σπελέτας**
Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 2^{ος} Εξεταστής** **Δρ. Αναστάσιος Ε. Γερμενής**
Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3^{ος} Εξεταστής** **Δρ. Γεώργιος Βασιλόπουλος**
Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 4^{ος} Εξεταστής** **Δρ. Νικόλαος Γιαννακούλας**
Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 5^{ος} Εξεταστής** **Δρ. Μαρία Ιωάννου**
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6^{ος} Εξεταστής** **Δρ. Κωνσταντίνος Μακαρίτσης**
Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 7^{ος} Εξεταστής** **Δρ. Γεώργιος Σίμος**
Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

*Στην οικογένειά μου,
για την αγνή τους αγάπη, στήριξη κι αφοσίωση*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Το υλικό της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν ενήλικοι ασθενείς της Αιματολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας καθώς επίσης και παιδιατρικά περιστατικά από το αρχείο του Εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας. Η διδακτορική αυτή διατριβή δεν θα είχε ολοκληρωθεί χωρίς την αμέριστη βοήθεια και παρουσία πολλών ατόμων.

Θα ήθελα λοιπόν να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: τον Καθηγητή Ιατρικής Ανοσολογίας κι επιβλέποντα της παρούσας μελέτης κ. Ματθαίο Σπελέτα, τον Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας και Διευθυντή του Εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας κ. Αναστάσιο Ε. Γερμενή και τον Καθηγητή Αιματολογίας-Παθολογίας κ. Γεώργιο Βασιλόπουλο.

Αρχικά, οφείλω να ευχαριστήσω ολόψυχα τον κ. Ματθαίο Σπελέτα για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ μαζί του και για την ανάθεση αυτού του πολύ ενδιαφέροντος θέματος. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, για την άρτια επιστημονική του καθοδήγηση, για τη βοήθεια, κατανόηση και υποστήριξη από την πραγματοποίηση των πειραματικών δοκιμών μέχρι και τη συγγραφή της εργασίας. Ευχαριστώ επίσης τον κ. Αναστάσιο Ε. Γερμενή που πριν από εξήμιση περίπου χρόνια στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος με δέχθηκε στο Εργαστήριό του, για την υλικοτεχνική υποδομή που μου προσέφερε όλο αυτό το διάστημα, που ήταν πάντα πρόθυμος να βοηθήσει σε οποιοδήποτε πρόβλημα προέκυπτε και για την ουσιαστική συμβολή του στην παρούσα εργασία. Θα ήθελα να τους εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου που μου παρείχαν τα υλικά και πνευματικά εφόδια να πραγματοποιήσω το συγκεκριμένο διδακτορικό κι ελπίζω να φάνηκα αντάξια της στήριξής τους όλα αυτά τα χρόνια.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον κ. Γεώργιο Βασιλόπουλο, Διευθυντή της Αιματολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας καθώς επίσης κι όλους τις γιατρούς της Κλινικής, τον κ. Νικόλαο Γιαννακούλα, Επίκουρο καθηγητή Αιματολογίας-Παθολογίας, την Ιατρό Αιματολόγο, Επιμελήτρια Α΄ κα. Μαρία Παλασοπούλου και την Ιατρό Αιματολόγο, Διευθύντρια ΕΣΥ κα. Ελένη Μπουρονίκου για την πολύτιμη βοήθειά τους στη συλλογή των ενήλικων περιστατικών της μελέτης.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τον Prof. Hermann Eibel στο Κέντρο Χρόνιων Ανοσοανεπαρκειών του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου του Freiburg της Γερμανίας που με φιλοξένησε στο Εργαστήριό του στο πλαίσιο του προγράμματος Erasmus+, για την

σημαντική υλικοτεχνική εργαστηριακή υποδομή, την προθυμία του να με διδάξει και τη στήριξη που μου παρείχε όλο το διάστημα παραμονής μου στη Γερμανία. Ευχαριστώ τόσο τον ίδιο όσο και τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Cristian R. Smulski που με τις ιδέες τους μας βοήθησαν να πάμε την παρούσα μελέτη ένα βήμα παραπέρα.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω την Δρ. Ελένη Κατσαντώνη στο Κέντρο Βασικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών για την πολύτιμη βοήθειά της στον σχεδιασμό και την πραγματοποίηση των πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης.

Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω θερμά το Ίδρυμα Α.Γ. Λεβέντη που με τίμησε με τη χορήγηση υποτροφίας για τα έτη 2014-2017.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής: τον Επίκουρο Καθηγητή Παθολογίας-Αιματολογίας κ. Νικόλαο Γιαννακούλα, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής κα. Μαρία Ιωάννου, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογίας κ. Κωνσταντίνο Μακαρίτση και τον Καθηγητή Βιοχημείας κ. Γεώργιο Σίμο για την πρόθυμη συμμετοχή τους στην κρίση της διδακτορικής μου διατριβής.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου για την εξαιρετική συνεργασία και τη δημιουργία ενός πραγματικά φιλικού κλίματος όλα αυτά τα χρόνια. Ένα μεγάλο ευχαριστώ από καρδιάς στις δασκάλες μου, τις κ.κ. Λίτσα Καραμούτη, Μαρία Ζαμανάκου, Εύα Γραμουστιάνου και τους υποψήφιους διδάκτορες Γερασιμίνα Τσιντή κι Αδάμ Μολυβδά για τις αμέτρητες ώρες εργαστηριακής δουλειάς που μοιραστήκαμε, για την υπομονή, τη βοήθεια, τη συμπαράσταση, τη στήριξή τους και για τη γνήσια φιλία που μου χάρησαν· όλα αυτά έκαναν ξεχωριστή την παραμονή μου στο Εργαστήριο. Ευχαριστώ επίσης θερμά τους Ζωή Φλώρου, Φανή Τσαντούλα, Αντιγόνη Μαμάρα, Νίκη Αργέντου, Νεφέλη Κολοκοτσά, Γεωργία Τσιούμα, Ανδρονίκη Καπουσουζή, Γεδεών Λουλέ, Νάνσυ Περιστέρη, Παναγιώτη Ντέλλα, Νάνσυ Φουσίκα, Ολυμπία Μαργαριτοπούλου, Ηλέκτρα Σοφού, Ζαχαρούλα Ζαμανάκου, τη γραμματέα του Εργαστηρίου Γεθσημανή Καραϊσκού αλλά κι όλα τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία μας και το άριστο κλίμα που δημιούργησαν όλα αυτά τα χρόνια. Θεωρώ τον εαυτό μου πολύ τυχερό που είχα την ευκαιρία να συναναστραφώ με όλους αυτούς τους υπέροχους ανθρώπους. Τους ευχαριστώ γι αυτό το πολύ όμορφο ταξίδι.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ όλων το οφείλω στην οικογένειά μου, στους γονείς μου Γιώργο και Βασιλική, στον αδερφό μου Βαγγέλη, την Κατερίνα και τη Γεωργία. Τους ευχαριστώ για την αμέριστη υποστήριξη, οικονομική και ηθική, τη συνεχή ενθάρρυνση και

το κουράγιο που μου δίνουν, την αγάπη που μου έμαθαν να δείχνω σε αυτό που κάνω, την κατανόηση και την υπομονή τους. Τους ευχαριστώ που είναι πάντα δίπλα μου και σε αυτούς είναι αφιερωμένη η παρούσα διδακτορική διατριβή. Ελπίζω να είναι τόσο περήφανοι για μένα, όσο ευγνώμων είμαι εγώ που τους έχω στο πλάι μου. Όσα και να πω είναι πραγματικά λίγα σε σχέση με αυτά που πραγματικά τους χρωστάω. Τους ευχαριστώ για όλα...

Ειρήνη Σεβδαλή

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

I. ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Όνοματεπώνυμο:	Ειρήνη Σεβδαλή του Γεωργίου
Ημερομηνία γέννησης:	16 Φεβρουαρίου 1990
Τόπος γέννησης:	Λάρισα
Οικογενειακή κατάσταση:	Άγαμη
Διεύθυνση οικίας:	Χειμάδι Συκουρίου Λάρισας, TK 40006
Τηλέφωνο επικοινωνίας:	+30 6987264869
Email:	esevdali@hotmail.gr, esevdali@med.uth.gr
Ξένες γλώσσες:	Αγγλικά (Άριστα), Γερμανικά (περιορισμένη εμπειρία)

II. ΣΠΟΥΔΕΣ - ΤΙΤΛΟΙ

- 2011-2013 Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής», Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βαθμός: 8.88, «*Άριστα*»
Πτυχιακή εργασία: «Ανίχνευση μεταλλάξεων της ακετυλεστεράσης του σιαλικού οξέος στη Νεανική Ιδιοπαθή Αρθρίτιδα και σε Πρωτοπαθείς Αντισωματικές Ανεπάρκειες.» Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2007-2011 Πτυχίο Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Βαθμός: 7.88, «*Λίαν καλώς*»
Πτυχιακή εργασία: «Χαρακτηρισμός και λειτουργικό προφίλ μεσεγχυματικών κυττάρων του μυελού των οστών και συνοβιοκυττάρων τύπου ινοβλαστών, φυσιολογικών και αρθριτικών επίμυων.» 1. Εργαστήριο Ανοσολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 2. Αιματολογική Κλινική και Μονάδα Μεταμόσχευσης μυελού των οστών, Νοσοκομείο «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη
- 2007 Απολυτήριο Γενικού Λυκείου, Γενικό Λύκειο Συκουρίου, Βαθμός: 19.6, «*Άριστα*»

II.1. Υποτροφίες

2016-2017 Erasmus+ Traineeship

2014-2017 Ίδρυμα Α.Γ. Λεβέντη

2010 Πρόγραμμα Ανταποδοτικών Υποτροφιών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

III. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. BAFF/APRIL system is functional in B cell acute lymphoblastic leukemia in a disease subtype manner. **Sevdali E. et al.**, Blood 2018 (*under review*)
2. An Activating Janus Kinase-3 Mutation Is Associated with Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4-Dependent Immune Dysregulation Syndrome. Sic H, Speletas M, Cornacchione V, Seidl M, Beibel M, Linghu B, Yang F, **Sevdali E**, Germenis AE, Oakeley EJ, Vangrevelinghe E, Sailer AW, Traggiai E, Gram H, Eibel H. Front Immunol. 2017;8:1824
3. *SIAE* Rare Variants in Juvenile Idiopathic Arthritis and Primary Antibody Deficiencies. **Sevdali E**, Tsitsami E, Tsinti M, Farmaki E, Papadopoulou-Alataki E, Germenis AE, Speletas M. J Immunol Res. 2017;2017:1514294
4. MBL2 genotypes and their associations with MBL Levels and NICU morbidity in a cohort of greek neonates. M. Speletas, A. Gounaris, **E. Sevdali**, M. Kompoti, K. Konstantinidi, R. Sokou, E. Tsitsami, and A.E. Germenis. J Immunol Res. 2015;2015:478412

V. ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Ρύθμιση της έκφρασης και λειτουργικότητα των συνδετών και υποδοχέων του BAFF/APRIL συστήματος στη Β-οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (Β-ΟΛΛ). **Ε. Σεβδαλή**, Ε. Κατσαντώνη, C.R. Smulski, Γ. Τσιντή, Ε.Ν. Κολοκοτσά, Α. Μαμάρα, Ν. Αργέντου, Μ. Παλασοπούλου, Ε. Μπουρονίκου, Ν. Γιαννακούλας, Γ. Βασιλόπουλος, Α. Αθανασιάδου, Μ. Αδαμάκη, Σ. Πολυχρονοπούλου, Μ. Μοσχόβη, Α.Ε. Γερμενής, Η. Eibel, Μ. Σπελέτας. 28ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο. Αθήνα 2017
2. Μεταλλάξεις του γονιδίου *CTLA-4* σε Έλληνες ασθενείς με κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια. **Ε. Σεβδαλή**, Α. Καπουσούζη, Ε. Φαρμάκη, Ι. Κάκκας, Α. Ταπάρκου, Γ. Τσιντή, Γ. Πατεράκης, Α.Ε. Γερμενής, Η. Eibel, Μ. Σπελέτας. *Εκ μέρους της Ομάδας*

Μελέτης Πρωτοπαθών Ανοσοανεπαρκειών της Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας. 27ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο. Θεσσαλονίκη 2017

3. Updated data of a nation-wide study of clinical phenotypes and *TACI* mutations in patients with common variable immunodeficiency (CVID). **E. Sevdali**, A. Kapousouzi, E. Farmaki, A. Taparkou, I. Kakkas, G. Paterakis, AE. Germenis, M. Speletas. *On behalf of the Study Group of Primary Immunodeficiencies of the Hellenic Hematology Association*. 8th International Congress of Internal Medicine. Larissa 2016
4. Συμπλήρωμα. Βασικές γνώσεις φυσιολογίας και παθοφυσιολογίας. **Ε. Σεβδαλή**. Νεφρολογικό Συμπόσιο Κεντρικής Ελλάδος 2015. Λάρισα 2015
5. Agammaglobulinemia in a patient with a history of mature ALL and rituximab treatment. **E. Sevdali**. 3rd Workshop on Diagnostics of Immunodeficiencies. Kirchzarten, Germany 2015

VI. ANAPHTHMENES ANAKOINΩΣΕΙΣ

1. *CTLA-4* mutations in Greek patients with common variable immunodeficiency (CVID). **Sevdali E**, Kapoussouzi A, Farmaki E, Kakkas I, Taparkou A, Tsinti G, Germenis AE, Eibel H, Speletas M, *on behalf of the Study Group of Primary Immunodeficiencies of the Hellenic Society of Hematology*. 17th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Barcelona 2016
2. Υπερφερριτιναιμία: Κλινική πορεία και επιλογή θεραπευτικής αντιμετώπισης. Β. Παπαδόπουλος, Σ. Ευφραιμίδου, **Ε. Σεβδαλή**, Ε. Παπαδάκης, Μ. Τοπαλίδου, Κ. Κοκοβιάδου, Α. Μπαντή, Μ. Σπελέτας, Α. Κιουμή. 26ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2015
3. Aberrant BAFF-R expression affects apoptosis rate of B lymphoblasts after corticosteroid treatment. **E. Sevdali**, M. Zamanakou, AE. Germenis, M. Speletas. 20th Congress of the European Hematology Association. Vienna 2015, *Haematologica*, Volume 100, Supplement 1, p.636-637, PB1595
4. Η επίδραση της απρόσφορης έκφρασης BAFF-R από τους Β-λεμφοβλάστες στη δράση χημειοθεραπευτικών παραγόντων. **Ε. Σεβδαλή**, Μ. Ζαμανάκου, Α.Ε. Γερμενής, Μ. Σπελέτας. 25^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο. Θεσσαλονίκη 2014, *Haema*, Volume 5, Supplement 1, p.78-79, P72
5. Απουσία μεταλλάξεων του γονιδίου *EPOR* σε Έλληνες ασθενείς με συγγενή ερυθροκυττάρωση. Ε.Ν. Κολοκοτσά, Μ. Μπεφάνη, **Ε. Σεβδαλή**, Φ. Τσαντούλα, Κ.

- Μαγιάννης, Μ. Σπελέτας. 25^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο. Θεσσαλονίκη 2014, Haema, Volume 5, Supplement 1, p.88, P83
6. Mutational analysis of sialic acid acetyltransferase (*SIAE*) in Juvenile Idiopathic Arthritis (JIA). Tsitsami, E. **Sevdali**, M. Speletas. 20th European Pediatric Rheumatology Congress. Ljubljana 2013, Pediatric Rheumatology, Volume 11, Supplement 2, SP58
 7. Mutational analysis of sialic acid acetyltransferase (*SIAE*) in Juvenile Idiopathic Arthritis (JIA) and primary antibody deficiencies (PADs). E. **Sevdali**, E. Tsitsami, M. Voulgarelis, M. Zamanakou, M. Speletas. 4th Summer School of Immunology. Athens 2013
 8. Sialic acid acetyltransferase (*SIAE*) mutations are not associated with autoimmune disease risk in patients with antibody deficiencies. M. Speletas, E. **Sevdali**, A. Zisimatos, E. Papadopoulou-Alataki, A.E. Germenis. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Florence 2012, Journal of Clinical Immunology, Volume 32, Supplement 1, S403
 9. Bortezomib+mesenchymal stem cells are a potent combination to treat experimental arthritis. E. Yannaki, A. Papadopoulou, E. Athanasiou, N. Zogas, I. **Sevdali**, P. Kaloyannidis, I. Batsis, D. Bougiouklis, M. Yiangou, A. Fassas, A. Anagnostopoulos. 37th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, Paris 2012, Bone Marrow Transplantation, Volume 46, Supplement 1, S319
 10. Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) recover their functionality and act therapeutically in experimental arthritis only when the inflammatory microenvironment is attenuated by pretreatment with a proteasome inhibitor. A. Papadopoulou, E. Athanasiou, I. Batsis, P. Kaloyannidis, I. **Sevdali**, D. Bougiouklis, M. Yiangou, A. Anagnostopoulos, A. Fassas, E. Yannaki. First European Conference on Mesenchymal Stem Cells, Toulouse 2010

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ BAFF/APRIL
ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΑ ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ»**

ΕΙΡΗΝΗ ΣΕΒΔΑΛΗ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Ματθαίος Σπελέτας**, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπων)
2. **Αναστάσιος Ε. Γερμενής**, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Γεώργιος Βασιλόπουλος**, Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι κυτταροκίνες BAFF και APRIL συμβάλλουν στην επιβίωση, ωρίμανση, ομοιόσταση και διαφοροποίηση των φυσιολογικών Β-κυττάρων, μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τρεις υποδοχείς, τους BAFFR, TACI και BCMA. Παρά την απουσία ενός λειτουργικού ρόλου του BAFF/APRIL συστήματος κατά τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης των προγονικών Β-κυττάρων στο μυελό των οστών, προηγούμενες μελέτες έδειξαν μία πιθανή συμμετοχή αυτών των μορίων στην παθογένεση της Β-οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (Β-ΟΛΛ). Η τελευταία συνιστά μια ετερογενή νοσολογική οντότητα, που προκύπτει από την κακοήγη εξαλλαγή των προγονικών Β-κυττάρων. Στην παρούσα μελέτη, αξιολογήσαμε την έκφραση των μορίων του BAFF/APRIL συστήματος στη Β-ΟΛΛ και τη συμμετοχή τους στην αυθόρμητη και στην επαγόμενη από φάρμακα απόπτωση των Β-λεμφοβλαστών, λαμβάνοντας υπόψη τους διακριτούς υποτύπους της νόσου. Η mRNA έκφραση των μορίων του συστήματος αυτού μελετήθηκε σε 70 ασθενείς με ΟΛΛ (παιδιά κι ενήλικες) με RT-PCR, ενώ η πρωτεϊνική έκφραση των υποδοχέων μελετήθηκε σε 12 από αυτούς με κυτταρομετρία ροής. Στη βάση των αποτελεσμάτων μας, πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης στην E2A-PBX1⁺ κυτταρική σειρά προ-Β-ΟΛΛ, 697, και διερευνήσαμε με qPCR την πρόσδεση του E2A-PBX1 χημειοκινητικού μεταγραφικού παράγοντα σε περιοχές με πιθανή ρυθμιστική δράση στο *BAFFR* γονίδιο. Η λειτουργικότητα του BAFFR διερευνήθηκε έπειτα από καλλιέργεια Β-λεμφοβλαστών με BAFF κι έλεγχο της ενεργοποίησης του NF-κB2 με Western blot, ενώ αξιολογήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα για τις ίδιες συνθήκες. Η συμβολή της αλληλεπίδρασης BAFF/BAFFR στην αυθόρμητη και στην επαγόμενη από φάρμακα (αρασυτίνη, γλυκοκορτικοειδή) απόπτωση των Β-λεμφοβλαστών μελετήθηκε με κυτταρομετρία ροής. Τέλος, διερευνήθηκε η επίδραση της συγκαλλιέργειας BAFF/δεξαμεθαζόνης στα επίπεδα του BAFFR, και στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών (NF-κB2, PI3K & NF-κB1). Διαπιστώσαμε ότι ο BAFFR ήταν ο κύριος υποδοχέας του συστήματος που εκφράζεται απρόσφορα σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο στη Β-ΟΛΛ, και η έκφρασή του αυτή, καθώς επίσης και των BCMA & APRIL συνδεόταν με το στάδιο ωρίμανσης των κυττάρων. Επιπλέον, η πρόσδεση του χημειοκινητικού μεταγραφικού παράγοντα E2A-PBX1 στον υποκινητή του *BAFFR* γονιδίου προτείνει ένα πιθανό μηχανισμό που θα μπορούσε να αιτιολογεί την αυξημένη έκφραση του *BAFFR* σε ένα ποσοστό ασθενών με την E2A-PBX1 μετατόπιση. Παρά την απρόσφορη έκφρασή του στη Β-ΟΛΛ, η δέσμευση του BAFF στον BAFFR ενεργοποιεί την κύρια σηματοδοτική οδό, του NF-κB2, υποδεικνύοντας ότι ο υποδοχέας είναι λειτουργικός, ενώ οδηγεί και σε

αποικοδόμηση από την κυτταρική μεμβράνη του BAFFR, ρυθμίζοντας έτσι τα πρωτεϊνικά του επίπεδα. Παρόλα αυτά, διαπιστώσαμε ότι η επώαση με BAFF ενίσχυσε τον αυθόρμητο κυτταρικό θάνατο των BAFFR⁺ B-λεμφοβλαστών ασθενών με BCR-ABL⁺ προ-B-ΟΛΛ. Το εύρημα αυτό ισχυροποιήθηκε από το γεγονός ότι ο BAFF ενέτεινε την επαγόμενη από γλυκοκορτικοειδή απόπτωση της 697 σειράς, χωρίς να επηρεάζει τη δυναμική των κυττάρων να ενεργοποιούν τον NF-κB2 και να αποικοδομούν τον BAFFR. Τα δεδομένα αυτά προτείνουν ένα ρόλο του BAFF-APRIL συστήματος στη Β-ΟΛΛ, ειδικό για τον υπότυπο της νόσου.

ABSTRACT

BAFF and APRIL are master regulators of survival, maturation and homeostasis of normal developing B-cells, by interacting with three cognate receptors, BAFFR, TACI and BCMA. Despite the lack of a functional role of BAFF/APRIL system during normal early B-cell development, previous studies indicated a possible contribution of these molecules in the pathogenesis of B-lineage acute lymphoblastic leukemia (B-ALL), a heterogeneous disease arising from the malignant transformation of progenitor B-cells. Herein, we evaluated the expression of this system in B-ALL and its involvement in spontaneous and drug-induced apoptosis of B-lymphoblasts, taking into consideration the distinct disease subtypes. The mRNA expression of BAFF, APRIL and their receptors was evaluated by RT-PCR in 70 patients with ALL (children and adults), while receptors' protein expression was measured by flow cytometry. According to our results, we performed ChIP experiments in the E2A-PBX1⁺ pre-B-ALL cell line 697 and we investigated binding of the E2A-PBX1 chimeric transcription factor in possible regulatory regions of *BAFFR* gene. The functionality of BAFFR was assessed by treating B-lymphoblasts with exogenous BAFF and checking the NF- κ B2 activation by Western blot. We also evaluated the contribution of BAFF/BAFFR crosstalk in spontaneous and drug-induced apoptosis in B-lymphoblasts. Last but not least, we checked the activation of signaling pathways (NF- κ B2, PI3K & NF- κ B1) in BAFF/dexamethasone treated cells. We found that BAFFR is the most predominant aberrantly expressed receptor in B-ALL at mRNA and protein level and its expression, along with those of BCMA and APRIL, was correlated with the maturation stage of B-lymphoblasts. Moreover, the binding of the E2A-PBX1 chimeric protein to *BAFFR* promoter, suggests a potential mechanism explaining the increased *BAFFR* expression observed in a proportion of pre-B-ALL patients carrying the E2A-PBX1 translocation. Despite its aberrant expression in B-ALL, binding of BAFF to BAFFR activates the NF- κ B2, the major signaling pathway downstream of BAFF/BAFFR crosstalk, indicating that the receptor is functional, while it induces BAFFR processing by cell membrane, regulating its levels. However, we found that BAFF-treatment increased the spontaneous cell death of BAFFR⁺ B-lymphoblasts in patients with BCR-ABL⁺ pre-B-ALL. This finding was strengthened by the fact that BAFF enhanced the glucocorticoid-induced apoptosis in 697 cells, without changing the dynamics of these cells in activating NF- κ B2 and in BAFFR processing. These data suggest a disease-subtype specific role of BAFF/APRIL system in B-ALL pathogenesis.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

APRIL (A proliferation inducing ligand)	Συνδέτης που επάγει τον πολλαπλασιασμό
b2m (b2-microglobulin)	β2 μικροσφαιρίνη
BAFF (B-cell activating factor)	Παράγοντας ενεργοποίησης των Β-κυττάρων
BAFFR (B-cell activating factor receptor)	Υποδοχέας του BAFF
BCMA (B Cell Maturation Antigen)	Αντιγόνο ωρίμανσης των Β-κυττάρων
BCR (B-cell receptor)	Υποδοχέας των Β-κυττάρων
CAML (Calcium modulating ligand)	Συνδέτης που συμμετέχει στη ρύθμιση του ασβεστίου
cIAP1/2 (cellular Inhibitor of Apoptosis proteins 1/2)	Πρωτεΐνες κυτταρικής αναστολής της απόπτωσης 1 ή 2
cIgM (cytoplasmic Immunoglobulin M)	Κυτταροπλασματική μ βαριά άλυσος της ανοσοσφαιρίνης Μ
CRDs (Cysteine rich domains)	Επικράτειες πλούσιες σε κυστεΐνες
Ct (Cycle Threshold)	Κύκλος κατωφλιού
DMSO (dimethylsulphoxide)	διμεθυλο-σουλφοξείδιο
EBV (Epstein Barr Virus)	Ιός Epstein Barr
FBS (Fetal Bovine Serum)	Εμβρυϊκός βόειος ορός
FITC (Fluorescein)	Φλουοροσκεΐνη
Hyper-CVAD (Hyper-Cyclophosphamide, Vincristine Sulfate, Doxorubicin Hydrochloride, Dexamethasone)	υπερκλασματοποιημένο σχήμα αποτελούμενο από κυκλοφωσφαμίδη, βινκριστίνη, δοξορουβικίνη, δεξαμεθαζόνη
H chain (heavy chain)	βαριά (H) αλυσίδα (ενν. ανοσοσφαιρίνης)
IκBα (Inhibitors-of-kappaB-alpha)	Αναστολέας α του πυρηνικού παράγοντα κB
IKK (Kinase of IκB)	Κινάση της IκB
MRD (Minimal Residual Disease)	Ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος
Multiplex PCR	πολλαπλή PCR

L chain (light chain)	ελαφριά (L) αλυσίδα (ενν. ανοσοσφαιρίνης)
NHL (Non-Hodgkin Lymphoma)	Λέμφωμα Non-Χοτζκιν
NF-κB (Nuclear factor-kappa B)	Πυρηνικός παράγοντας-κB
NIK (NF-kappa-B-inducing kinase)	Κινάση που επάγει τον NF-κB
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Ουδέτερο διάλυμα φωσφορικού άλατος
PC5 (Phycoerythrin-Cyanine-5)	Φυκοερυθρίνη-κυανίνη-5
PC7 (Phycoerythrin-Cyanine-5)	Φυκοερυθρίνη-κυανίνη-7
PCR (polymerase chain reaction)	αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PE (phycoerythrin)	φυκοερυθρίνη
Ph (Philadelphia chromosome)	Χρωμόσωμα Φιλαδέλφειας (BCR-ABL)
Pre-BCR (Pre- B cell receptor)	κυτταρικός υποδοχέας των προ-B-κυττάρων
PSG (Penicillin-Streptomycin-Glutamine)	πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη-γλουταμίνη
RT (Room temperature)	θερμοκρασία δωματίου
TACI (transmembrane activator & CAML interactor)	Διαμεμβρανική πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με το CAML
TdT (terminal deoxylribonucleotidyl transferase)	τελική δεσοξυνουκλεοτιδική τρανσφεράση
TRAFs (TNFR associated proteins)	Πρωτεΐνες που σχετίζονται με τους TNFR
WBC (White Blood Cells)	Λευκά αιμοσφαίρια
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
ΟΛΛ	Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία
ΧΛΛ	Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία
7-AAD (7-amino actinomycin D)	7-άμινο ακτινομυκίνη D

Πίνακας περιεχομένων

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ	8
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	13
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	16
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	20
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	22
1.1. Ανάπτυξη, ωρίμανση και διαφοροποίηση των Β-κυττάρων.....	23
1.2. Το σύστημα των κυτταροκινών BAFF, APRIL και των υποδοχέων τους.....	29
1.2.1. Δομή και έκφραση των συνδετών BAFF και APRIL	29
1.2.2. Δομή, έκφραση και λειτουργία των υποδοχέων BAFFR, TACI & BCMA	31
1.2.2.1 Σηματοδότηση καθοδικά των υποδοχέων	35
1.2.3. Ο ρόλος του BAFF/APRIL συστήματος στη νόσο	38
1.3. Β-Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία	39
1.4. Ο ρόλος του BAFF/APRIL συστήματος στη Β-ΟΛΛ	46
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	50
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	51
1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ	52
1.1. Κυτταρικές σειρές	55
2. ΥΛΙΚΑ	56
3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ	64
3.1. Απομόνωση-διατήρηση-απόψυξη μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος ή μυελικού επαιωρήματος.....	64
3.2. Απομόνωση κυτταρικών πληθυσμών με τη μέθοδο του μαγνητικού διαχωρισμού.....	65
3.3. Μοριακή μελέτη.....	67
3.3.1. Απομόνωση RNA.....	67
3.3.2. Σύνθεση cDNA	69
3.3.3. Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων <i>TNFRSF13B/TACI</i> και <i>TNFRSF13C/BAFFR</i> με PCR πραγματικού χρόνου	70
3.3.4. Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων <i>TNFRSF17/BCMA</i> , <i>TNFSF13B/BAFF</i> , <i>ΔBAFF</i> , <i>TNFSF13/APRIL</i> με συμβατική ημι-ποσοτική RT-PCR	76
3.3.5. Multiplex RT-PCR για την ανίχνευση των ανασυνδυασμών t(12;21)/TEL-AML1, t(1;19)/E2A- PBX1, t(9;22)/BCR-ABL p190 και p210.	78
3.3.6. Έλεγχος του γονιδίου <i>TNFRSF13C/BAFFR</i> για τις μεταλλάξεις P21R και H159Y.....	80
3.4. Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση.....	83
3.4.1. Τυποποίηση της Β-ΟΛΛ με βάση τον ανοσοφαινότυπο.....	83
3.4.2. Έλεγχος της έκφρασης της πρωτεΐνης BAFF-R στα νεοπλασματικά και στα φυσιολογικά Β- κύτταρα.....	86
3.4.3. Έλεγχος της έκφρασης των πρωτεϊνών TACI και BCMA στα νεοπλασματικά Β-κύτταρα.....	87
3.4.4. Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση των προγονικών Β-κυττάρων φυσιολογικών ατόμων	88
3.5. Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης και Real Time PCR.....	89
3.6. Ανοσοαποτύπωση κατά Western	93
3.7. Καλλιέργεια Β-λεμφοβλαστών και έλεγχος βιωσιμότητας.....	100
3.8. Μελέτη της απόπτωσης κυτταρικών σειρών παρουσία χημειοθεραπευτικών παραγόντων	100
3.9. Στατιστική ανάλυση.....	102
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	103
4.1. Κλινικοεργαστηριακά ευρήματα των ασθενών με ΟΛΛ	103
4.2. Γονιδιακή έκφραση των υποδοχέων και συνδετών του BAFF/APRIL συστήματος στην ΟΛΛ ..	108
4.2.1. Μεταγραφική έκφραση των γονιδίων <i>TNFRSF13C/BAFFR</i> , <i>TNFRSF13B/TACI</i> και <i>TNFRSF17/BCMA</i> στους ασθενείς και μάρτυρες της μελέτης.....	110

4.2.2. Μεταγραφική έκφραση των <i>TNFSF13B/BAFF</i> , <i>ΔBAFF</i> και <i>TNFSF13/APRIL</i> στους ασθενείς και μάρτυρες της μελέτης	113
4.3. Πρωτεϊνική έκφραση των υποδοχέων του BAFF/APRIL συστήματος	115
4.4. Ρύθμιση της έκφρασης του <i>BAFFR</i> από τον E2A-PBX1 μεταγραφικό παράγοντα	120
4.5. Η ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού του NF-κB από τον BAFF στους B-λεμφοβλάστες ...	122
4.6. Μεσολαβούμενη από τον BAFF αποικοδόμηση του BAFFR στους B-λεμφοβλάστες	124
4.7. Ο BAFF επάγει τον κυτταρικό θάνατο στους λεμφοβλάστες ασθενών με Β-ΟΛΛ.....	127
4.8. Ο BAFF ενισχύει την επαγόμενη από γλυκοκορτικοειδή απόπτωση των Β-λεμφοβλαστών.	130
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	139
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	150

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ΟΛΛ αντιπροσωπεύει την πιο συχνή αιματολογική κακοήθεια της παιδικής ηλικίας που προκύπτει από την κακοήγη εξαλλαγή των πρόδρομων λεμφοκυττάρων (της Β- ή Τ-σειράς) στο μυελό των οστών, ακολουθούμενη από την κλωνική τους επέκταση σε ποικίλες εξωμυελικές θέσεις. Αν και κατά τη τελευταία εικοσαετία η επιβίωση της ΟΛΛ, ειδικά της παιδικής ηλικίας, έχει βελτιωθεί σημαντικά λόγω της εφαρμογής εντατικοποιημένης χημειοθεραπείας, η θεραπεία των νεογνών και των ενηλίκων απαιτεί περαιτέρω βελτίωση, ενώ η έκβαση των ασθενών που υποτροπιάζουν ή εμφανίζουν ανθεκτική νόσο είναι κακή. Στο πλαίσιο αυτό, απαιτείται καλύτερη κατανόηση της βιολογίας του νοσήματος κι εύρεση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων που θα βελτιώσουν τις ήδη υπάρχουσες. Το «μικροπεριβάλλον» του μυελού των οστών φαίνεται να διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη βιολογία της ΟΛΛ μέσω της παραγωγής μίας πληθώρας παραγόντων που προωθούν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των λευχαιμικών κυττάρων, ρυθμίζοντας σε σημαντικό βαθμό διαδικασίες όπως η ανάπτυξη και διατήρηση του λευχαιμικού κλώνου και η ανθεκτικότητα σε φάρμακα. Σχετικά πρόσφατα, μελέτες έδειξαν ότι οι κυτταροκίνες BAFF & APRIL, που φυσιολογικά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση κι ομοιόσταση των ώριμων Β-κυττάρων, πιθανότατα συμμετέχουν στην παθογένεση της Β-ΟΛΛ. Το πρότυπο έκφρασης των BAFF, APRIL και των υποδοχέων τους BAFFR, TACI & BCMA, κατά την πρόωμη ανάπτυξη των Β-κυττάρων προτείνει ότι το σύστημα αυτό δεν έχει κάποιο λειτουργικό ρόλο στα πρόδρομα Β-κύτταρα, κι η έκφραση των συνδετών και υποδοχέων στη Β-ΟΛΛ είναι απρόσφορη και χαρακτηριστική των λευχαιμικών κυττάρων. Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες στη Β-ΟΛΛ δεν έλαβαν υπόψη τους την ετερογένεια του νοσήματος, ενώ τα μέχρι τώρα δεδομένα για το κατά πόσον το σύστημα BAFF/APRIL είναι λειτουργικό στην ΟΛΛ παραμένουν αντιφατικά.

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης ελέγξαμε τη μεταγραφική και πρωτεϊνική έκφραση των συνδετών και υποδοχέων του BAFF/APRIL συστήματος σε ασθενείς με ΟΛΛ και σε ομάδες ελέγχου, συσχετίζοντάς τες με τα κλινικοεργαστηριακά ευρήματα των ασθενών (ανοσοφαινότυπος, κυτταρογενετικές ανωμαλίες, απάντηση στη θεραπεία). Επιπλέον, διερευνήσαμε πιθανούς μοριακούς μηχανισμούς που θα μπορούσαν να μεσολαβούν της ρύθμισης της μεταγραφικής έκφρασης του κυριότερου υποδοχέα, που βρέθηκε να εκφράζεται απρόσφορα στους ασθενείς με Β-ΟΛΛ, του BAFFR. Έπειτα, μελετήσαμε τη λειτουργικότητα της αλληλεπίδρασης BAFF-BAFFR στους Β-λεμφοβλάστες, αξιολογώντας την ενεργοποίηση σηματοδοτικών οδών καθοδικά του υποδοχέα. Τέλος, εκτιμήσαμε τη συμβολή της *in vitro*

αλληλεπίδρασης συνδετών/υποδοχέων στην επιβίωση των Β-λεμφοβλαστών, καθώς και την απάντηση σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Τα δεδομένα μας δείχνουν ότι το BAFF/APRIL σύστημα είναι λειτουργικό στη Β-ΟΛΛ, ακολουθώντας ένα ειδικό για τον υπότυπο της νόσου πρότυπο, ενώ αναδεικνύουν ένα νέο ρόλο της BAFF/BAFFR αλληλεπίδρασης στην ενίσχυση του κυτταρικού θανάτου των Β-λεμφοβλαστών. Η μελέτη μας προτείνει ότι η παρακολούθηση της έκφρασης του BAFFR μαζί με τη μοριακή ταυτοποίηση ογκογόνων μετατοπίσεων μπορεί να παρέχει νέα μέσα για την κατηγοριοποίηση και τελικά τη θεραπεία της Β-ΟΛΛ.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Ανάπτυξη, ωρίμανση και διαφοροποίηση των Β-κυττάρων

Η Β-κυτταρική λεμφοποίηση είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία του ποικιλόμορφου ρεπερτορίου των ώριμων Β-κυττάρων της περιφέρειας, τα οποία μπορούν να δώσουν γένεση σε κύτταρα που παράγουν αντισώματα (πλασματοκύτταρα) μεσολαμβάνοντας της προστασίας έναντι παθογόνων παραγόντων, ενώ παράλληλα εξασφαλίζεται η ανοχή έναντι των ιδίων ιστών του οργανισμού. Η δημιουργία των Β-κυτταρικών υποσυνόλων είναι μία αναπτυξιακά προγραμματισμένη πολυσταδιακή διαδικασία που περιλαμβάνει τις διαδοχικές αναδιατάξεις των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών, τον πολλαπλασιασμό και την επιλογή των αναπτυσσόμενων Β-κυττάρων στο σημείο ελέγχου του προ-αντιγονικού υποδοχέα και την περαιτέρω διαφοροποίησή τους σε ώριμα Β-κύτταρα και πλασματοκύτταρα.¹

Τα Β-λεμφοκύτταρα παράγονται στο μυελό των οστών και μεταναστεύουν στα περιφερικά λεμφικά όργανα, για να επιτελέσουν τις διάφορες λειτουργίες τους. Η ανάπτυξή τους συνοψίζεται στις εξής τέσσερις φάσεις: κατά την πρώτη φάση, η οποία είναι ανεξάρτητη από αντιγόνο, τα προγονικά Β-κύτταρα στο μυελό των οστών αναδιατάσσουν τα γονίδια της βαριάς (H) κι ελαφριάς (L) αλύσου των ανοσοσφαιρινών, όντας σε στενή επαφή με τα στρωματικά κύτταρα του μυελού που εκκρίνουν παράγοντες επιβίωσης και διαφοροποίησης. Ως αποτέλεσμα (δεύτερη φάση), παράγεται ένα ανώριμο Β-κύτταρο που φέρει έναν αντιγονικό υποδοχέα στη μορφή της κυτταροεπιφανειακής IgM ανοσοσφαιρίνης, ικανό πλέον να αλληλεπιδράσει με τα αντιγόνα στο περιβάλλον του. Ανώριμα Β-κύτταρα που διεγείρονται ισχυρά από αντιγόνα σε αυτό το στάδιο είτε πεθαίνουν είτε απενεργοποιούνται μέσω μιας διαδικασίας αρνητικής επιλογής, με στόχο την εξάλειψη πολλών αυτοδραστικών Β-κυττάρων από το ρεπερτόριο. Κατά την τρίτη φάση ανάπτυξης, τα ανώριμα Β-κύτταρα που έχουν επιβιώσει εξέρχονται στην περιφέρεια κι ωριμάζουν περαιτέρω για να εκφράσουν τον IgD Β-κυτταρικό υποδοχέα, πέραν της IgM κι έτσι καθίστανται ικανά να ενεργοποιηθούν συναντώντας ξένα αντιγόνα στα περιφερικά λεμφικά όργανα. Η τελευταία φάση της ανάπτυξης περιλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των ενεργοποιημένων Β-κυττάρων σε πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν αντισώματα και σε μακρόβια μνημονικά Β-κύτταρα.²

Στα ενήλικα άτομα, τα Β-κύτταρα αναπτύσσονται στο μυελό των οστών από στελεχειαία κύτταρα, τα οποία μπορούν να δώσουν γένεση σε όλους τους τύπους κυττάρων του αίματος. Τα πρώτα πολυδύναμα αιμοποιητικά στελεχειαία κύτταρα διαπιστώνονται ήδη κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη στο λεκυθικό σάκο, τα οποία σε μετέπειτα αναπτυξιακά στάδια προέρχονται από μία περιοχή της πρωτοεμβρυϊκής αορτής που ονομάζεται αορτή-γονάδες-μεσόνεφρος.³ Η αλληλεπίδραση των προγονικών αυτών κυττάρων με το ενδοθήλιο στο

εσωτερικό των εμβρυϊκών αγγείων του αίματος⁴ φαίνεται ότι κατευθύνει τη μετανάστευσή τους από το αίμα στα αναπτυσσόμενα πρωτογενή όργανα, κυρίως στο εμβρυϊκό ήπαρ και το μυελό των οστών. Ο τελευταίος εμπλουτίζεται κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής από τα αιμοποιητικά στελεχιαία κύτταρα και αποτελεί το σημαντικότερο χώρο που μπορεί να υποστηρίξει μεταξύ άλλων τη δια βίου παραγωγή Β-λεμφοκυττάρων από αυτά. Τα αρχέγονα αιμοποιητικά στελεχιαία κύτταρα αρχικά διαφοροποιούνται σε πολυδύναμα προγονικά κύτταρα, τα οποία μπορούν να παράγουν κύτταρα τόσο της λεμφικής όσο και της μυελικής σειράς, αλλά χάνουν την ικανότητα αυτοανανέωσης.⁵ Η αλληλεπίδραση των κυττάρων αυτών μέσω του υποδοχέα FLT3, με τον συνδέτη FLT3L που εκφράζεται στα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών σηματοδοτεί και τη μετάβαση στο επόμενο στάδιο, αυτό του κοινού λεμφοκυτταρικού προγονικού κυττάρου, του πρόδρομου των Β-, Τ- και ΝΚ-λεμφοκυττάρων.⁶

Τα αρχικά στάδια της ανάπτυξης των Β-λεμφοκυττάρων εξαρτώνται από το εξειδικευμένο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών. Τα στρωματικά κύτταρα του συνδετικού ιστού του μυελού των οστών αλληλεπιδρούν με τα αναπτυσσόμενα λεμφοκύτταρα μέσω μορίων προσκόλλησης και παρέχουν διαλυτές και μεμβρανοσυνδεδεμένες κυτταροκίνες που ελέγχουν τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων.⁷ Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η έκφραση του FLT3 υποδοχέα στην επιφάνεια των πολυδύναμων προγονικών κυττάρων σηματοδοτεί τη μετάβαση στο στάδιο του κοινού λεμφοκυτταρικού προγονικού κυττάρου. Η μεσολαβούμενη από τον FLT3 σηματοδότηση επάγει την έκφραση του υποδοχέα της IL-7 στα κύτταρα αυτά, ο οποίος αλληλεπιδρά με την προερχόμενη από τα στρωματικά κύτταρα IL-7 επιφέροντας τη δέσμευση του κοινού λεμφοκυτταρικού προγόνου στη Β-κυτταρική σειρά και οδηγώντας στη δημιουργία του πρωιμότερου κυττάρου αυτής, του προ-προ-Β-κυττάρου.⁶

Η επαγωγή της έκφρασης των E2A και EBF μεταγραφικών παραγόντων στο κύτταρο αυτό οδηγεί στην έκφραση πρωτεϊνών που καθορίζουν το συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο (πρώιμο προ-προ-Β-κύτταρο), όπως τα ένζυμα RAG1 & RAG2 που καταλύουν τις αναδιατάξεις των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών. Επιπλέον, ο E2A επάγει την έκφραση του Pax5 μεταγραφικού παράγοντα, που με τη σειρά του ενεργοποιεί την έκφραση πρωτεϊνών όπως τα μόρια CD19 και CD79α, χαρακτηριστικά της Β-κυτταρικής σειράς.⁸ Οι πρώτες αναδιατάξεις εμφανίζονται στον γενετικό τόπο της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης, με την ένωση ενός D_H σε ένα J_H γονιδιακό τμήμα (όψιμο προ-προ-Β-κύτταρο), ακολουθούμενη από μία δεύτερη αναδιάταξη που οδηγεί στη σύνδεση της V_H γονιδιακής περιοχής στο αναδιαταγμένο DJ_H τμήμα, σε ένα από τα δύο χρωμοσώματα. Μία επιτυχημένη αναδιάταξη

οδηγεί στην παραγωγή μίας ακέραιας μ βαριάς αλυσίδας και σηματοδοτεί την είσοδο στο επόμενο στάδιο, αυτό του προ-B-κυττάρου, το οποίο ωστόσο δεν έχει αναδιατάξει ακόμη τα γονίδια της ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών.²

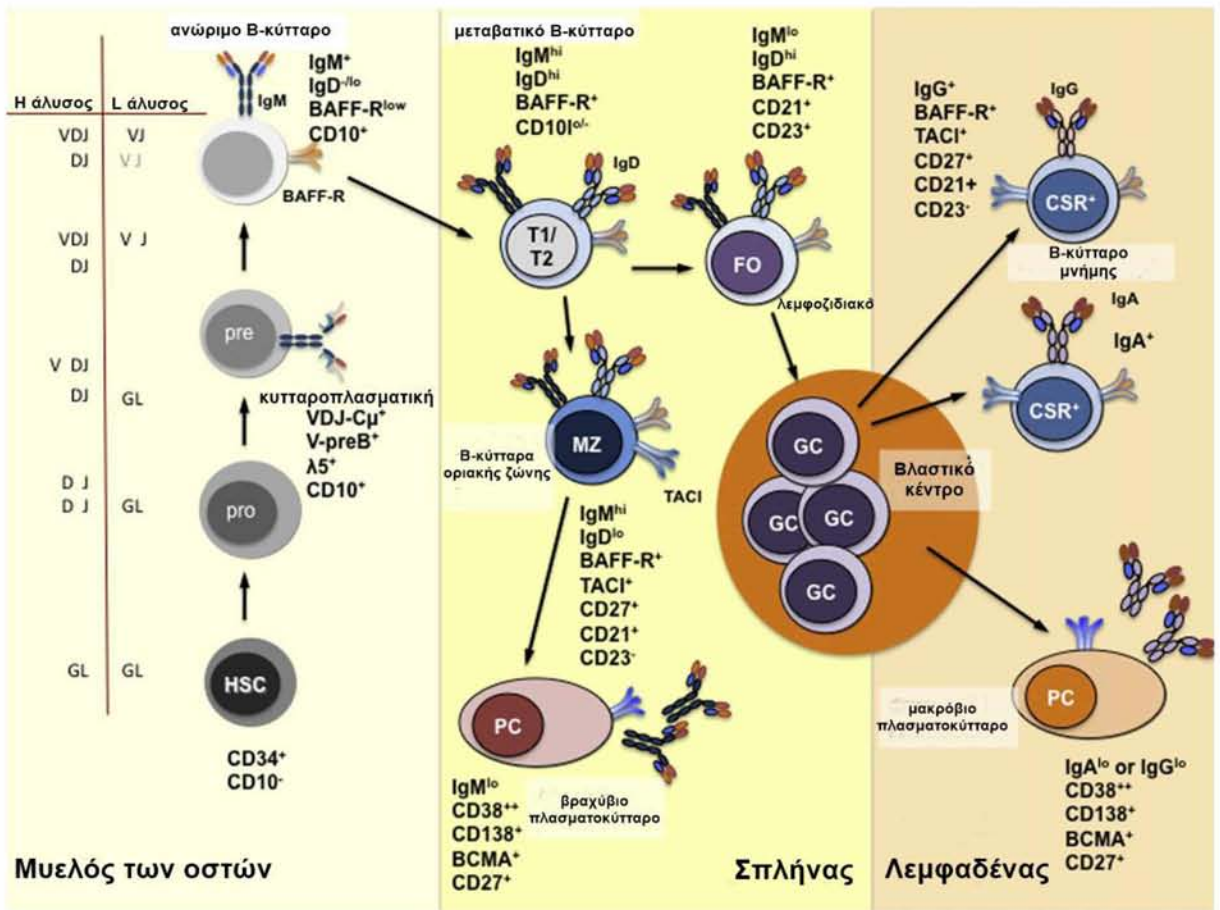
Δύο προσωρινές αμετάβλητες ελαφρές αλυσίδες, οι λ5 και VpreB, σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές που εμφανίζει δομική ομοιότητα με την φυσιολογική ελαφριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης.⁹ Οι πρωτεΐνες αυτές μαζί με τα μόρια CD79α (Igα) και CD79β (Igβ) -που εκφράζονται όλες ήδη από το προ-προ-B-κυτταρικό στάδιο- συνδέονται με τη νεοσχηματισμένη μ βαριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης για να σχηματίσουν το σύμπλοκο του προ-B-κυτταρικού υποδοχέα (pre-BCR). Η συγκρότηση του υποδοχέα αυτού οδηγεί στην αναστολή της έκφρασης και δράσης των ενζύμων που καταλύουν τις αναδιατάξεις της βαριάς αλυσίδας στο άλλο αλληλίο, μια διαδικασία που είναι γνωστή ως αλληλικός αποκλεισμός και αποτρέπει την έκφραση δύο βαριών αλυσίδων ανοσοσφαιρίνης διαφορετικής ειδικότητας.¹⁰ Η ενεργοποίηση του pre-BCR γίνεται κατά έναν αντιγονο-ανεξάρτητο τρόπο, επάγοντας τον πολλαπλασιασμό και την επέκταση των μεγάλων προ-B-κυττάρων.¹¹

Αφού έχει διασφαλιστεί ότι ο γενετικός τόπος της μ βαριάς αλυσίδας δεν υπόκειται σε επιπλέον αναδιατάξεις, ο pre-BCR πρέπει παράλληλα να σημάνει την έναρξη των αναδιατάξεων στον γενετικό τόπο της κ ελαφριάς αλυσίδας σε ένα από τα δύο χρωμοσώματα, μέσω εκ νέου επαγωγής της έκφρασης των Rag ενζύμων (στάδιο μικρού προ-B-κυττάρου) για τη σύνδεση του V_L στο J_L γονιδιακό τμήμα.⁹ Αν ο ανασυνδυασμός στον γενετικό τόπο της κ αλυσίδας δεν είναι λειτουργικός, τότε το κύτταρο αναδιατάσσει το γενετικό τόπο της λ ελαφριάς αλυσίδας.¹² Η αντικατάσταση των προσωρινών λ5 και VpreB ελαφριών αλυσίδων από τη λειτουργική ελαφριά αλυσίδα οδηγεί στο σχηματισμό ακέραιων μορίων IgM και στη μετάβαση στο ανώριμο B-κύτταρο· η σύνδεση της IgM με τα μόρια CD79α και CD79β είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία του λειτουργικού συμπλόκου του BCR. Σε κάθε περίπτωση, ένα B-κύτταρο μπορεί να εκφράζει μόνο τον έναν από τους δύο τύπους ελαφριάς αλυσίδας κι αυτό επιτυγχάνεται μέσω αλληλικού αποκλεισμού στο γενετικό τόπο της ελαφριάς αλυσίδας, ενώ έχει αναφερθεί ότι η επαγωγή γονιδιακής αναδιάταξης της λ ελαφριάς αλυσίδας λαμβάνει χώρα κυρίως στους αυτοδραστικούς BCR που εκφράζουν την κ αλυσίδα.¹² Ανώριμα B-κύτταρα που δεν αναγνωρίζουν με μεγάλη συγγένεια αυτοαντιγόνα στο μυελό των οστών, μεταβαίνουν στον σπλήνα για να ολοκληρώσουν την ωρίμανσή τους, πριν από τη μετανάστευση σε άλλα περιφερικά λεμφικά όργανα.¹³ Η έκφραση της IgM σε αυτό το στάδιο είναι καθοριστικής σημασίας, καθώς αλλάζει το πρότυπο έκφρασης πληθώρας γονιδίων υποκινώντας την έξοδο του κυττάρου από το μυελό των οστών. Παράλληλα, μηχανισμοί κεντρικής ανοχής, όπως η αναδιαμόρφωση του υποδοχέα, δρουν στο στάδιο του ανώριμου B-

κυττάρου με σκοπό να εξαλείψουν το ρεπερτόριο των αυτοδραστικών Β-κυτταρικών κλώνων.¹⁴

Τα ανώριμα Β-κύτταρα μεταναστεύουν στον σπλήνα ως μεταβατικά Β-κύτταρα (τύπου 1 και 2), τα οποία εκφράζουν και IgD ανοσοσφαιρίνη πέραν της IgM,¹³ όπου λαμβάνουν σήματα επιβίωσης μέσω ενός μορίου της οικογένειας των TNFR, τον BAFFR,¹⁵ και ολοκληρώνουν το πρώτο στάδιο ανάπτυξης ως Β-κύτταρα της οριακής ζώνης ή λεμφοζιδιακά Β-κύτταρα ανάλογα με την ειδικότητα του υποδοχέα τους. Στον σπλήνα, τα Β-κύτταρα της οριακής ζώνης αποτελούν την 1^η γραμμή άμυνας έναντι αιματογενών παθογόνων και μεσολαβούν των Τ-κυτταροανεξάρτητων ανοσιακών απαντήσεων,¹⁶ καθώς μετατρέπονται ραγδαία σε βραχύβια εξωλεμφοζιδιακά πλασματοκύτταρα εκκρίνοντας IgM, η οποία σχηματίζει ανοσοσυμπλέγματα με το παθογόνο.¹⁷ Τα Β-κύτταρα της οριακής ζώνης εκφράζουν IgM υποδοχείς που φέρουν σωματικές υπερμεταλλάξεις στις μεταβλητές τους περιοχές ανεξάρτητες της οδηγούμενης από αντιγόνο κλωνικής επέκτασης των Β-κυττάρων στα βλαστικά κέντρα, και τα κύτταρα αυτά ξαναβγαίνουν στην κυκλοφορία έξω από τον σπλήνα.¹⁸ Μάλιστα φαίνεται ότι αυτού του τύπου τα Β-κύτταρα αναπτύσσονται και ωριμάζουν κατά τα πρώτα χρόνια της ζωής ανεξάρτητα από τις ανοσιακές απαντήσεις.¹⁹

Αντίθετα, τα λεμφοζιδιακά Β-κύτταρα ενεργοποιούνται από τη σύνδεση του αντιγόνου και διαφοροποιούνται περαιτέρω στα βλαστικά κέντρα του σπλήνα και των λεμφαδένων, αλληλεπιδρώντας με βοηθητικά Τ-κύτταρα, με στόχο την παραγωγή Β-κυττάρων μνήμης και πλασματοκυττάρων.²⁰ Αυτή η ενεργοποίηση των Β-κυττάρων επάγει το ένζυμο AID και άλλα μόρια υπεύθυνα για τις σωματικές υπερμεταλλάξεις των μεταβλητών περιοχών των ανοσοσφαιρινών, με στόχο την αλλαγή της συγγένειας του BCR για το αντιγόνο.²¹ Ένα δεύτερο επίπεδο ρύθμισης της δράσης των ανοσοσφαιρινών σε αυτά τα κύτταρα είναι η αντικατάσταση της σταθερής περιοχής της IgM έναντι αυτής των IgG, IgA ή IgE, μέσω μίας διαδικασίας που ονομάζεται μεταστροφή τάξης και οδηγεί σε αλλαγή του ισοτύπου της ανοσοσφαιρίνης.²² Τελικά, τα Β-κύτταρα του βλαστικού κέντρου μετατρέπονται είτε σε μακρόβια Β-κύτταρα μνήμης ή πλασματοκύτταρα, τα οποία μπορούν να παραμείνουν στα δευτερογενή λεμφικά όργανα ή να μεταναστεύσουν στο μυελό των οστών^{1,7,19,23-25} (**Εικόνα 1**).



Εικόνα 1. Η ανάπτυξη των Β-κυττάρων. Τα Β-κύτταρα αναπτύσσονται στο μυελό των οστών από αιματοποιητικά στελεχιαία κύτταρα (hematopoietic stem cell, HSC). Διαδοχικές αναδιατάξεις των γονιδίων της βαριάς κι ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών στα πρόδρομα αναπτυξιακά στάδια [προ-προ (pro) και προ- (pre) Β-κύτταρο] οδηγούν στη δημιουργία του ανώριμου Β-κυττάρου. Αυτό εισέρχεται στον σπλήνα ως μεταβατικό Β-κύτταρο, όπου λαμβάνει σήματα επιβίωσης μέσω του BAFFR κι ολοκληρώνει το πρώτο στάδιο ανάπτυξης ως Β-κύτταρο οριακής ζώνης (marginal zone, MZ) ή λεμφοζιδιακό Β-κύτταρο (follicular, FO), ανάλογα με την ειδικότητα του BCR. Κατά την επαφή με το αντιγόνο, κι αλληλεπιδρώντας με τα βοηθητικά των Β-κυττάρων ουδετερόφιλα, τα Β-κύτταρα οριακής ζώνης διαφοροποιούνται σε βραχύβια πλασματοκύτταρα. Τα λεμφοζιδιακά Β-κύτταρα ενεργοποιούνται έπειτα από σύνδεση με το αντιγόνο κι αναπτύσσονται εντός των βλαστικών κέντρων (germinal center, GC), αλληλεπιδρώντας με τα βοηθητικά Τ-κύτταρα, σε Β-κύτταρα μνήμης μεταστροφής τάξης (class-switch recombination, CSR) ή σε πλασματοκύτταρα. Η ενεργοποίηση των Β-κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της συγγένειας του BCR και του ισότυπου της ανοσοσφαιρίνης (IgM προς IgG, IgA, ή IgE). [προέλευση από Pierref και συν. (2013), με τροποποιήσεις]¹⁹

Σε αντίθεση με τα ώριμα Β-κύτταρα της περιφέρειας, οι Β-κυτταρικοί πρόγονοι (αιματογόνια) συναντώνται κατά κανόνα σε μικρούς αριθμούς σε μυελικά εναιωρήματα, αν κι έχει αναφερθεί υψηλό ποσοστό αυτών (5-50%) σε υγιή βρέφη και νεαρά παιδιά, καθώς

επίσης και σε μία ποικιλία νοσημάτων της παιδικής κι ενήλικης ζωής.²⁶ Μάλιστα αυξημένοι αριθμοί αιματογονίων μπορούν να δημιουργήσουν προβλήματα κατά τη διάγνωση, λόγω του ότι μοιράζονται κοινά μορφολογικά κι ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά με τους νεοπλασματικούς λεμφοβλάστες της Β-ΟΛΛ, της πιο κοινής αιματολογικής κακοήθειας της παιδικής ηλικίας.²⁷

Ο πιο πρόδρομος Β-κυτταρικός πληθυσμός που μπορεί να εντοπιστεί στο μυελό (προ-προ-Β-κύτταρο) εκφράζει επιφανειακά το δείκτη στελεχιαίων κυττάρων CD34, το CD22, το CD19 (ασθενώς) όπως επίσης και το ένζυμο TdT που είναι υπεύθυνο για την ποικιλομορφία της μεταβλητής περιοχής της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης. Με την έκφραση του CD19, τα προγονικά Β-κύτταρα μπορούν να διακριθούν σε 3 τύπους αιματογονίων: τα προ-Β-I, τα προ-Β-II και τα ανώριμα/μεταβατικά Β-κύτταρα. Τα τύπου 1 αιματογόνια (προ-Β-I) εκφράζουν υψηλά επίπεδα TdT, CD34, CD38 όπως επίσης και CD10, ενώ η έκφραση των CD45 & CD22 είναι χαμηλή, και του CD20 απύσα. Στο επόμενο στάδιο (προ-Β-II), η έκφραση των TdT και CD34 μηδενίζεται, η έκφραση του CD10 ελαττώνεται μερικώς και τα επίπεδα των CD20, CD45, CD38 αυξάνονται, ενώ πλέον το κύτταρο έχει συνθέσει και εκφράζει ενδοκυττάρια την μ βαριά άλυσσο της ανοσοσφαιρίνης. Στα τύπου 3 αιματογόνια (ανώριμα/μεταβατικά Β-κύτταρα), έχουμε περαιτέρω αύξηση των CD20, CD45 και CD38, εμφάνιση του BCR (IgM) στην επιφάνεια του κυττάρου, με μείωση της έκφρασης του CD10. Τα ώριμα Β-κύτταρα διακρίνονται από την απουσία έκφρασης των CD10 & CD38, διατηρούν την έκφραση του CD20 και αυξάνουν αυτή των CD45 & CD22, και των IgM & IgD ανοσοσφαιρινών επιφανείας.^{26,28,29}

Ανωμαλίες στην ανάπτυξη, επιλογή και διαφοροποίηση των Β-κυττάρων οδηγούν στην εκδήλωση αυτοάνοσων παθήσεων, ανοσοανεπαρκειών, αλλεργιών και κακοηθειών.^{19,24} Μάλιστα στην περίπτωση των τελευταίων, φαίνεται ότι τα αναπτυξιακά στάδια των φυσιολογικών Β-κυττάρων έχουν κακοήθη ομόλογα τα οποία αντικατοπτρίζονται στην επέκταση ενός κυρίαρχου υποκλώνου Β-κυττάρων, οδηγώντας στην ανάπτυξη λευχαιμιών και λεμφωμάτων. Χρωμοσωμικές ανωμαλίες (ανευπλοειδίες, ανασυνδυασμοί) και γονδιακές μεταλλάξεις συμβάλλουν στο μετασχηματισμό και την κλωνική επέκταση των Β-κυττάρων. Ως αποτέλεσμα είναι η εμφάνιση Β-κυτταρικών νεοπλασμάτων που μπορεί να εμπλέκουν ανώριμα Β-κύτταρα του μυελού των οστών (προγονική Β-ΟΛΛ) αλλά και διαφοροποιημένα υποσύνολα ώριμων Β-κυττάρων με προέλευση από τα δευτερογενή λεμφικά όργανα (π.χ. σπληνικό λέμφωμα οριακής ζώνης, ΧΛΛ, κ.ά.).³⁰

Η επιβίωση των Β-κυττάρων της περιφέρειας εξαρτάται τόσο από την παρουσία ενός λειτουργικού BCR όσο κι από σήματα που παράγονται από τη δέσμευση του BAFF στον

κυριότερο υποδοχέα του, τον BAFFR.³¹ Ο BAFF, καθώς επίσης κι ένας ομόλογος συνδέτης, ο APRIL, συνδέονται και σε άλλους 2 υποδοχείς, τους TACI και BCMA οι οποίοι εκφράζονται στα Β-κύτταρα οριακής ζώνης και στα Β-κύτταρα μεταστροφής μνήμης (για τον TACI), καθώς επίσης και στα πλασματοκύτταρα (για τον BCMA).³² Ο ρόλος του BAFF/APRIL συστήματος στην ανάπτυξη των Β-κυτταρικών διαμερισμάτων της περιφέρειας θα συζητηθεί στη συνέχεια.

1.2. Το σύστημα των κυτταροκινών BAFF, APRIL και των υποδοχέων τους

Ο BAFF (TNFSF13B)³³ κι ο APRIL (TNFSF13A)³⁴ αποτελούν μέλη της οικογένειας του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF) και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση κι ομοιόσταση των Β-κυττάρων της περιφέρειας (ανασκόπηση από MacKay & Schneider³²). Οι κυτταροκίνες αυτές μοιράζονται δύο υποδοχείς της οικογένειας των TNFR, τους TACI (TNFRSF13B)³⁵ και BCMA (TNFRSF17)³⁶, ενώ ο BAFF αλληλεπιδρά επιπρόσθετα με έναν ακόμη υποδοχέα της οικογένειας αυτής, τον BAFFR (BR3, TNFRSF13C)¹⁵. Οι υποδοχείς ακολουθούν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο των Β-κυττάρων της περιφέρειας, τα οποία σχετίζονται και με τις διακριτές τους λειτουργίες.³⁷

1.2.1. Δομή και έκφραση των συνδετών BAFF και APRIL

Οι κυτταροκίνες BAFF και APRIL συντίθενται αρχικά ως τύπου II διαμεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες απελευθερώνονται ως προς τις διαλυτές τους μορφές έπειτα από πρωτεολυτική διάσπαση από την κονβερτάση φουρίνη σε μία συντηρημένη θέση αμινοξέος.³⁸ Η διάσπαση του BAFF λαμβάνει χώρα στην κυτταρική μεμβράνη,³⁹ ενώ του APRIL πιθανολογείται ότι συμβαίνει στο σύμπλεγμα Golgi, γι αυτό δεν έχει αποσαφηνιστεί αν ο APRIL μπορεί να εκφραστεί ως μεμβρανοσυνδεδεμένη μορφή.⁴⁰ Επομένως μόνο ο BAFF μπορεί να ανιχνευθεί επάνω στη μεμβράνη, αν και δεν είναι γνωστό το κατά πόσο είναι λειτουργικός.³⁸

Οι διαλυτές μορφές των κυτταροκινών εμφανίζουν την χαρακτηριστική ομοτριμερή μορφή της οικογένειας των TNF, καθώς περιέχουν τη C-τελική ομοτριμερισμένη επικράτεια, ομόλογη αυτής των TNF, η οποία διαμεσολαβεί της πρόσδεσης στους υποδοχείς.⁴¹ Έχει αποδειχθεί ότι υπό ουδέτερο ή βασικό pH, 20 τριμερή του BAFF μπορούν να σχηματίσουν ένα τύπου ιικού σωματιδίου 60-μερές, κάτι το οποίο δε συμβαίνει στην περίπτωση του APRIL. Στο 60-μερές BAFF οι θέσεις πρόσδεσης στον υποδοχέα παραμένουν εκτεθειμένες

και προσβάσιμες στην επιφάνεια αυτής της δομής· ωστόσο, ελάχιστα είναι γνωστά για τη φυσιολογική του λειτουργία, αν και φαίνεται ότι εμφανίζει σχετικά μεγαλύτερη δραστηριότητα *in vitro* σε σχέση με το 3-μερές.⁴²

Ο APRIL περιέχει μία βασική περιοχή αμινοξέων απύσα από τον BAFF, που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδρασή του με πρωτεογλυκάνες και είναι διακριτή από τη θέση δέσμευσης των άλλων υποδοχέων του.⁴³ Οι πρωτεογλυκάνες δεν εμφανίζουν δομική ομολογία με τους TNFR, αλλά πιθανότατα δρουν κατά έναν τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να αυξάνουν τις συγκεντρώσεις του διαλυτού APRIL στην κυτταρική επιφάνεια και κατ' επέκταση τη σηματοδότηση από το συγκεκριμένο συνδέτη, μιμούμενα την ικανότητα του 60-μερούς BAFF να αλληλεπιδρά με περισσότερους του ενός υποδοχείς (ανασκόπηση από Vincent και συν.,⁴⁴ Bossen & Schneider⁴⁵).

Στον ορό ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα έχουν περιγραφεί ετεροτριμερή των BAFF-APRIL διαφορετικής σύστασης (BAFF-APRIL₂, BAFF₂-APRIL), τα οποία είναι βιολογικά ενεργά, αν και σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τα φυσιολογικά BAFF & APRIL ομοτριμερή.^{46,47} Εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου *BAFF* οδηγεί στο σχηματισμό ενός μικρότερου μετάγραφου που στερείται του εξονίου 3, του *ΔBAFF*, με την ισομορφή αυτή, που συναντάται ως μεμβρανοσυνδεδεμένη, να λειτουργεί ως αναστολέας της ενεργούς μορφής, συγκεντρώνοντας τη φυσιολογική πρωτεΐνη σε ετεροπολυμερή στην επιφάνεια του κυττάρου.⁴⁸ Στην περίπτωση του APRIL, έχει διαπιστωθεί η παρουσία δύο μεμβρανοσυνδεδεμένων ισομορφών. Η μία προκύπτει από το εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου, οδηγώντας σε μία πρωτεΐνη (APRIL-δ) που στερείται της θέσης διάσπασης από την φουρίνη και η οποία έχει περιγραφεί σε Β-λεμφοβλάστες ασθενών με ΟΛΛ⁴⁹. Η δεύτερη είναι μία υβριδική πρωτεΐνη (TWE-PRIL) που προκύπτει από το *trans*-μάτισμα του γονιδίου *APRIL* με το γειτονικό γονίδιο *TWEAK* (TNFSF12) και η οποία διατηρεί την επικράτεια πρόσδεσης στον υποδοχέα του APRIL.⁵⁰

Οι κύριες πηγές των BAFF και APRIL είναι τα κύτταρα της φυσικής ανοσίας, συμπεριλαμβανομένων των ουδετεροφίλων, μονοκυττάρων, μακροφάγων και δερμικών κυττάρων (ανασκόπηση από MacKay και συν.⁵¹)· ωστόσο, Β-κύτταρα και ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα μπορούν να παράγουν επίσης τις κυτταροκίνες αυτές.^{32,44} Η έκφραση του BAFF αυξάνεται από πληθώρα παραγόντων όπως η INF-γ, η IL-10, ο G-SCF και έπειτα από ενεργοποίηση μέσω των TLR υποδοχέων, υποστηρίζοντας κατά αυτόν τον τρόπο τη λειτουργία της χυμικής ανοσίας.⁵¹ Κύτταρα της μη αιμοποιητικής σειράς δύναται επίσης να παράγουν BAFF ή/και APRIL. Παραδείγματα αυτών αποτελούν συνοβιοκύτταρα τύπου ινοβλαστών στον αρθρικό υμένα ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα, οστεοκλάστες ασθενών

με πολλαπλόν μυέλωμα, επιθηλιακά κύτταρα σε αμυγδαλές και αεραγωγούς, αστροκύτταρα σε ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση. Μάλιστα η παραγωγή των BAFF και APRIL από κύτταρα της μη αιμοποιητικής σειράς παρέχει τοπικές κοιλότητες ικανές να ρυθμίζουν την επιβίωση των Β-κυττάρων και των πλασματοκυττάρων στην υγεία και τη νόσο (ανασκόπηση από Vincent και συν.,⁴⁴ MacKay & Schneider³², Hengeveld & Kersten⁵²).

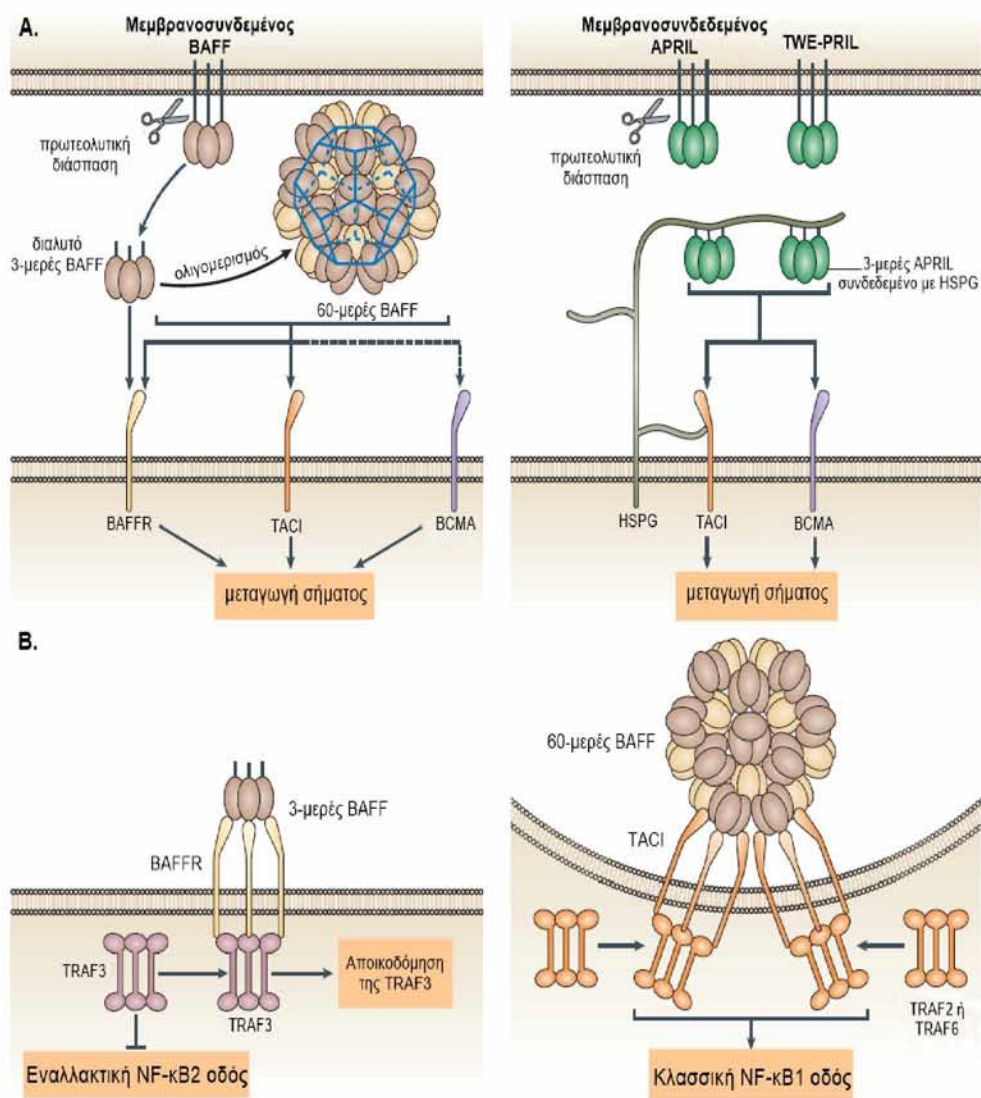
1.2.2. Δομή, έκφραση και λειτουργία των υποδοχέων BAFFR, TACI & BCMA

Οι υποδοχείς BAFFR, BCMA & TACI διαφέρουν σημαντικά από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των TNFR, καθώς είναι τύπου III διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που στερούνται του πεπτιδίου σήματος και φέρουν λιγότερες CRDs στην εξωκυττάρια περιοχή τους. Οι επικράτειες αυτές είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία εκτεταμένων επαφών με ένα μονομερές του συνδέτη εντός των BAFF & APRIL τριμερών. Ο TACI περιέχει 2 CRDs (με τη CRD2 να προσδένει με μεγαλύτερη συγγένεια τους BAFF & APRIL, σε σχέση με την CRD1), ο BCMA μία CRD και ο BAFFR μια μη τυπική CRD. Και οι 3 υποδοχείς εμφανίζουν τριμερή μορφή και περιέχουν στις κυτταροπλασματικές επικράτειές τους θέσεις πρόσδεσης των TRAFs πρωτεϊνών ενώ δεν περιέχουν επικράτειες θανάτου (ανασκόπηση από Bossen & Schneider,⁴⁵ Schneider⁵³).

Οι BAFFR, TACI & BCMA μοιράζονται μία δομικά συντηρημένη δομή β-βρόγχου που αποτελεί τον πυρήνα της αλληλεπίδρασης υποδοχέα-συνδέτη. Η δομή του βρόγχου ακολουθείται από μία σύντομη έλικα μίας στροφής, και το μοτίβο αυτό καθορίζει τις ικανότητες σύνδεσης των προσδετών. Πέραν όμως αυτών των δομικά συντηρημένων χαρακτηριστικών, οι υποδοχείς διαφέρουν, καθώς οι TACI & BCMA έχουν μία επιπρόσθετη έλικα, αλλά εμφανίζουν διαφορετικό προσανατολισμό,⁵⁴ ενώ ο BAFFR φέρει μόνο μία έλικα. Η δομή του β-βρόγχου είναι απαραίτητη για τη δέσμευση του συνδέτη, ενώ η C-τελική επικράτεια καθορίζει την ειδικότητα για τον συνδέτη. Συγκεκριμένα, ένα αρωματικό κατάλοιπο αμινοξέος εντός του βρόγχου που συναντάται μόνο στους TACI & BCMA είναι υπεύθυνο για τη πρόδεση του APRIL, ενώ ένα υδρόφοβο κατάλοιπο στον BAFFR είναι υπεύθυνο για τη πρόδεση του BAFF.^{45,53}

Οι υποδοχείς αυτοί είναι απόντες από τα πρόδρομα Β-κύτταρα του μυελού των οστών, ενώ εμφανίζουν ένα πρότυπο έκφρασης ειδικό των Β-κυτταρικών υποσυνόλων της περιφέρειας.¹⁹ Ο BAFFR είναι ο πρώτος από τους 3 υποδοχείς ο οποίος εκφράζεται μετά το σχηματισμό ενός λειτουργικού BCR στο στάδιο του ανώριμου Β-κυττάρου στο μυελό των οστών,⁵⁵ και αυτή του η έκφραση αυξάνεται καθώς τα μεταβατικά Β-κύτταρα διαφοροποιούνται σε Β-κύτταρα οριακής ζώνης και λεμφοζυδιακά Β-κύτταρα. Ο TACI

εκφράζεται στα Β-κύτταρα της οριακής ζώνης, στα μνημονικά Β-κύτταρα και τα πλασματοκύτταρα,³⁷ ενώ ο BCMA στα πλασματοκύτταρα⁵⁶. Η διαφοροποιημένη έκφραση αυτών των υποδοχέων κατά την ανάπτυξη των Β-κυττάρων επιτρέπει την εξής διάκριση: τα παρθένα Β-κύτταρα εκφράζουν μόνο τον BAFFR, τα Β-κύτταρα της οριακής ζώνης και τα μνημονικά Β-κύτταρα εκφράζουν τους BAFFR και TACI, και τα πλασματοκύτταρα τους TACI & BCMA (ανασκόπηση από Piereg και συν.¹⁹). Παρόλα αυτά, δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως πως η συνδυαστική έκφραση αυτών των υποδοχέων μπορεί να επηρεάζει το αποτέλεσμα των σημάτων που πυροδοτούνται από τους BAFF & APRIL. Να σημειωθεί ότι ο BAFF εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια για τους BAFFR και TACI, ενώ ο APRIL για τους BCMA & TACI, όντας ανίκανος να συνδεθεί με τον BAFFR.⁵⁷ Ωστόσο η ενεργοποίηση του TACI απαιτεί επιπρόσθετο πολυμερισμό των συνδετών, δηλαδή είτε το 60-μερές BAFF είτε τον ολιγομερισμό του APRIL έπειτα από σύνδεση με πρωτεογλυκάνες, ενώ ο ίδιος ο υποδοχέας είναι σε θέση να αλληλεπιδρά επίσης με τις τελευταίες (**Εικόνα 2Α**).⁵⁸



Εικόνα 2. Οι BAFF, APRIL και οι υποδοχείς τους. Α. Σχηματική αναπαράσταση των διαφόρων ισομορφών των BAFF & APRIL και των υποδοχέων τους BAFFR, TACI & BCMA. Οι BAFF και

APRIL συντίθενται ως μεμβρανοσυνδεδεμένες πρωτεΐνες που μπορούν να απελευθερωθούν ως διαλυτές κυτταροκίνες έπειτα από πρωτεολυτική διάσπαση. Ο BAFF συναντάται είτε ως ομοτριμερές είτε ως 60-μερές, ενώ ο διαλυτός τριμερής APRIL δεσμεύεται σε πρωτεογλυκάνες (heparin sulfate proteoglycans, HSPGs), με τον TWE-PRIL να εντοπίζεται μόνο στην κυτταρική μεμβράνη. Ο BAFF αλληλεπιδρά με τους BAFFR και TACI και ασθενώς με τον BCMA, ενώ ο APRIL με τους δύο τελευταίους και τις HSPGs. Β. Πρότυπο σηματοδότησης που προκαλείται από το 3-μερές και 60-μερές BAFF. Οι TRAFs στρατολογούνται σε ομοτριμερισμένους υποδοχείς που προσδένουν τον συνδέτη. Η στρατολόγηση της TRAF2 στον BAFFR οδηγεί στην αποικοδόμησή της, επιτρέποντας την ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού του NF-κB2. Κατόπιν πρόσδεσης στον TACI του 60-μερούς BAFF ή του συνδεδεμένου σε HSPGs APRIL, τουλάχιστον δύο μόρια TRAF2 ή TRAF6 στρατολογούνται στον υποδοχέα για την ενεργοποίηση της κλασσικής οδού του NF-κB1 [προέλευση από Mackay & Schneider (2009), με τροποποιήσεις].³²

Η αλληλεπίδραση του BAFF με τον BAFFR είναι κρίσιμη για την επιβίωση των Β-κυττάρων, καθώς η κύρια λειτουργία του υποδοχέα αυτού είναι να παρέχει σήματα επιβίωσης στα ανώριμα κι ώριμα Β-κύτταρα.^{33,59} Ποντίκια με έλλειψη των γονιδίων *BAFFR*⁶⁰ & *BAFF*⁶⁰ εμφανίζουν παρόμοιο φαινότυπο, ο οποίος χαρακτηρίζεται από σημαντική μείωση των ώριμων Β-κυττάρων λόγω ενός αναπτυξιακού φραγμού στο μεταβατικό στάδιο από το μυελό στον σπλήνα. Η παραγωγή ειδικών αντισωμάτων επίσης είναι μειωμένη σε ποντίκια με ανεπάρκεια για τον *BAFFR*, ωστόσο δύναται να αυξηθεί μετά από ανοσοποίηση με Τ-κυτταροανεξάρτητα και Τ-κυτταροεξαρτώμενα αντιγόνα. Στον άνθρωπο, ανεπάρκεια του BAFFR έχει συσχετισθεί με την εμφάνιση της κοινής ποικίλης ανοσοανεπάρκειας, καθώς χαρακτηρίζεται από αναστολή της ωρίμανσης των Β-κυττάρων στο μεταβατικό στάδιο, συνοδευόμενη από χαμηλούς αριθμούς Β-κυττάρων, μειωμένη παραγωγή IgG και IgM, αλλά όχι IgA, και μειωμένες Τ-κυτταροανεξάρτητες ανοσιακές απαντήσεις έναντι πνευμονιοκοκκικών πολυσακχαριτών.⁶¹ Ωστόσο, ο φαινότυπος ποντικών με ανεπάρκεια του *BAFFR* είναι λιγότερο σοβαρός σε σχέση με αυτά που εμφανίζουν έλλειψη στο γονίδιο του *TACI*, λόγω της ικανότητας του TACI να επάγει Τ-κυτταροανεξάρτητες αντισωματικές απαντήσεις.⁶² Στον αντίποδα, υπερέκφραση του *BAFF* προωθεί την πολυκλωνική επέκταση των Β-κυττάρων και την ανάπτυξη υπεργαμμασφαιριναιμίας, αυτοανοσίας και λεμφοκυττάρωσης.⁶³

Ο ρόλος του TACI στη φυσιολογία των Β-κυττάρων είναι περίπλοκος. Η έκφραση του TACI αυξάνεται στα Β-κύτταρα ως απάντηση σε ενεργοποίηση του BCR και των TLRs.^{64,65} Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ο TACI εκφράζεται σε Β-κύτταρα της οριακής ζώνης που ανταποκρίνονται, μεταξύ άλλων, σε Τ-κυτταροανεξάρτητα τύπου II αντιγόνα, και

φαίνεται να προωθεί τη διαφοροποίηση και επιβίωση των πλασματοβλαστών, καθώς ανεπάρκεια του υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα σοβαρά μειωμένες T-κυτταροανεξάρτητες ανοσιακές απαντήσεις σε πολυσακχαρικά αντιγόνα. Από την άλλη πλευρά, έχει προταθεί ότι ο TACI δρα και ως αρνητικός ρυθμιστής της επιβίωσης των B-κυττάρων, καθώς ποντίκια με ανεπάρκεια του υποδοχέα έχουν αυξημένους αριθμούς B-κυττάρων και τείνουν να εμφανίζουν λεμφοϋπερπλασία και αυτοανοσία με υψηλούς τίτλους αυτοαντισωμάτων⁶⁶. Μεταλλάξεις του TACI εμφανίζονται σε ένα 5-10% των ασθενών με CVID και είναι εντυπωσιακό το γεγονός ότι ασθενείς με CVID μοιράζονται ανοσολογικά χαρακτηριστικά με τα ποντίκια με ανεπάρκεια στο γονίδιο TACI, συμπεριλαμβανομένης της ανοσοανεπάρκειας, της λεμφοϋπερπλασίας και της αυτοανοσίας.⁶⁷ Τα σημαντικά μειωμένα επίπεδα IgA στον ορό ποντικών με έλλειψη του TACI⁶⁸ ή του APRIL⁶⁹, αλλά και σε άτομα με μεταλλάξεις στο γονίδιο του TACI⁶⁷ υποδηλώνουν ότι η αλληλεπίδραση TACI-APRIL είναι σημαντική για την παραγωγή της IgA. Στο πλαίσιο αυτό, έχει βρεθεί ότι B-κύτταρα από ασθενείς με ανεπάρκεια στο TACI δεν μπορούν να πραγματοποιήσουν ανασυνδυασμό μεταστροφής τάξης, όταν συγκαλλιεργούνται είτε με APRIL είτε με BAFF, που συνάδει με τους χαμηλούς τίτλους των IgA και IgG αντισωμάτων στους ασθενείς αυτούς. Από την άλλη πλευρά, η μείωση του αριθμού των υποδοχέων του BAFF λόγω της απουσίας του TACI οδηγεί στην περίσσεια διαλυτών μη δεσμευμένων BAFF μορίων ικανών να προσδεθούν στον BAFFR, υποστηρίζοντας έτσι την μακρόβια επιβίωση των B-κυττάρων και την ανάπτυξη αυτοανοσίας. Δηλαδή, ο αριθμός των θέσεων πρόσδεσης του BAFF είναι αυτός που καθορίζει τις σταθερές συγκεντρώσεις του συνδέτη.⁷⁰

Η έκφραση του BCMA στους πλασμαβλάστες και τα πλασματοκύτταρα φαίνεται ότι προωθεί την επιβίωση των τελευταίων, χωρίς όμως να έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ο ρόλος του. Ποντίκια με ανεπάρκεια του υποδοχέα εμφανίζουν φυσιολογική ανάπτυξη των B-κυτταρικών πληθυσμών, αλλά η επιβίωση των μακρόβιων πλασματοκυττάρων του μυελού των οστών είναι μειωμένη. Έτσι, ο BCMA φαίνεται να έχει διπλό ρόλο στη βιολογία των B-κυττάρων. Από τη μία πλευρά, η έκφραση του υποδοχέα αυξάνεται μαζί με αυτή του FAS σε ενεργοποιημένα B-κύτταρα, με σκοπό τον συνεργικό έλεγχο του πολλαπλασιασμού των B-κυττάρων και την επιλογή τους στην αντίδραση του βλαστικού κέντρου, καθώς ποντίκια με ανεπάρκεια των μορίων αυτών αναπτύσσουν ένα σοβαρό λεμφοϋπερπλαστικό σύνδρομο με μεγάλη αύξηση των βραχύβιων και μακρόβιων πλασματοκυττάρων.⁷¹ Ωστόσο, στο μυελό των οστών, ο BCMA μπορεί να λειτουργεί ως παράγοντας επιβίωσης για τα μακρόβια πλασματοκύτταρα.⁷²

1.2.2.1 Σηματοδότηση καθοδικά των υποδοχέων

Η αλληλεπίδραση των συνδετών BAFF & APRIL με τους υποδοχείς τους οδηγεί στην ενεργοποίηση μίας πληθώρας ενδοκυττάρων σηματοδοτικών οδών που μεσολαβούν των εξειδικευμένων δράσεων των μορίων αυτών. Ο TACI μπορεί να ενεργοποιηθεί κατά κύριο λόγο την κλασσική οδό του NF-κB1 όπως επίσης τα σηματοδοτικά μονοπάτια των AP-1 & NFAT,³⁵ ο BCMA πιθανολογείται ότι μπορεί να επάγει την ενεργοποίηση των NF-κB1, Elk-1, p38 MAPK & JNK οδών,⁷³ ενώ ο BAFFR ενεργοποιεί κατά κύριο λόγο την εναλλακτική οδό του NF-κB2⁷⁴ κι αυτή της PI3K⁷⁵

Η έναρξη της σηματοδότησης γίνεται συνήθως όταν ένας τριμερής συνδέτης όπως οι BAFF και APRIL προσδεθεί σε τρία ανεξάρτητα μόρια του ίδιου υποδοχέα, χωρίς όμως αυτό να οδηγεί απαραίτητα σε μία παραγωγική σηματοδότηση.⁴⁵ Γνωρίζουμε ότι στην περίπτωση του TACI, η σύνδεση του προσδεδεμένου σε πρωτεογλυκάνες πολυμερισμένου APRIL⁴³ και του 60-μερούς BAFF⁵⁸, αλλά όχι των 3-μερών μορφών τους, είναι ικανή να επάγει σηματοδότηση. Κάτι τέτοιο δε συμβαίνει στην περίπτωση του BAFFR, καθώς και οι δύο μορφές του BAFF επαρκούν για να μεταβιβάσουν σήματα μέσω αυτού του υποδοχέα. Έτσι, η σηματοδότηση στο BAFF/APRIL σύστημα καθορίζεται όχι μόνο από την ειδικότητα των BAFF και APRIL για τους αντίστοιχους υποδοχείς, αλλά και από τη μορφή στην οποία αυτοί οι συνδέτες παρουσιάζονται στους υποδοχείς.³²

Η ανάγκη για ολιγομερισμένους συνδέτες άπτεται ενός μοντέλου, όπου ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μόρια στρατολογούνται σε ομοτριμερισμένα σύμπλοκα συνδέτη-υποδοχέα. Τέτοια μόρια είναι οι TRAFs, τριμερείς πρωτεΐνες που προσδέονται στις ενδοκυττάρια επικράτειες των BAFFR, TACI & BCMA. Αν και η συγγένεια των TRAFs για έναν μονομερή υποδοχέα είναι χαμηλή, η αλληλεπίδραση σταθεροποιείται από δράσεις συνάφειας όταν ένα τριμερές TRAF προσδέεται σε τρεις υποδοχείς που συγκρατούνται στη σωστή γεωμετρία από το συνδέτη.⁷⁶ Οι TRAF2, 5 & 6 προσδέονται στον TACI και μπορούν να ενεργοποιήσουν τον NF-κB1 αν τουλάχιστον 2 τριμερή TRAF μόρια συγκρατούνται σε στενή εγγύτητα, μία κατάσταση που μπορεί να επιτευχθεί όταν τουλάχιστον 6 μόρια TACI στρατολογηθούν σε μία θέση από τον πολυμερισμένο συνδέτη.⁷⁷ Στην περίπτωση ωστόσο του BAFFR, ο οποίος διαθέτει μόνο μία θέση πρόσδεσης TRAF, σύνδεση του 3-μερούς ή 60-μερούς BAFF στον υποδοχέα στρατολογεί επιλεκτικά την TRAF3 με σκοπό όμως την αποκωδότησή της, χωρίς να απαιτεί τη δημιουργία ενός συμπλόκου υποδοχέων για να ασκήσει τη δράση του⁷⁸ (**Εικόνα 2B**).

Η TRAF3 αλληλεπιδρά με την NIK, που αποτελεί την κύρια κίνηση που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του εναλλακτικού μονοπατιού του NF-κB (NF-κB2). Απουσία συνδέτη

στον BAFFR, η TRAF3 προσδένεται στη NIK, και με τη βοήθεια της TRAF2 και των cIAP1/2 πρωτεϊνών επάγουν την αποικοδόμηση της NIK από το πρωτεάσωμα. Κατόπιν αλληλεπίδρασης του BAFF με τον BAFFR, η TRAF3 στρατολογείται στην κυτταροπλασματική επικράτεια του BAFFR, σε μία θέση πρόσδεσης ειδική γι αυτήν, και στη συνέχεια αποικοδομείται στο πρωτεάσωμα κατά έναν τρόπο εξαρτώμενο από τις TRAF2 & cIAP1/2 πρωτεΐνες. Αυτό οδηγεί σε σταθεροποίηση της NIK, που δεν αποτελεί πλέον στόχο προς συστατική αποικοδόμηση. Η NIK μπορεί να φωσφορυλιώσει απευθείας την πρόδρομη μορφή του NF-κB2 (p100), είτε να φωσφορυλιώσει μία άλλη κινάση που φωσφορυλιώνει την p100, την IKKα. Η φωσφορυλίωση της p100 οδηγεί στην ουβικουιτίνωση και διάσπαση αυτής στο πρωτεάσωμα ως προς τη λειτουργική p52. Η p52 συνδέεται με ένα άλλο μέλος της οικογένειας των NF-κB παραγόντων, την RelB, και τα ενεργά αυτά διμερή μεταναστεύουν στον πυρήνα για να επάγουν την έναρξη της μεταγραφής γονιδίων, που συμβάλλουν στην επιβίωση των B-κυττάρων (π.χ. αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες όπως Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Pim-2⁷⁹)⁸⁰. Η απαίτηση για τη συσσώρευση της NIK αιτιολογεί και τη χαμηλότερη κινητική της εναλλακτικής σε σχέση με την κλασσική οδό του NF-κB. Η ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού σε διαφορετικά B-κυτταρικά στάδια έχει διακριτό αποτέλεσμα: στα ανώριμα B-κύτταρα προωθεί την επιβίωση και περαιτέρω ωρίμανσή τους, στα B-κύτταρα της οριακής ζώνης συμβάλει στις T-κυτταροανεξάρτητες ανοσιακές απαντήσεις, στα B-κύτταρα του βλαστικού κέντρου συντελεί στη διατήρηση του βλαστικού κέντρου και στα πλασματοκύτταρα στην μακρόβια επιβίωσή τους.^{80,81}

Ο BAFF μέσω της πρόσδεσής του στον BAFFR όχι μόνο επάγει την επιβίωση των B-κυττάρων, αλλά προωθεί επίσης τη γλυκόλυση, την πρωτεϊνική σύνθεση και την κυτταρική ανάπτυξη μέσω ενεργοποίησης του μονοποτιού της PI3K.⁷⁵ Η ενεργοποίηση της PI3K από τον BAFF οδηγεί σε συσσώρευση της φωσφατιδυλινοσιτόλης-3,4,5-τριφωσφορικής [PtdIns (3,4,5)P₃] και σε στρατολόγηση στη μεμβράνη των PDK1 και AKT1. Η AKT1 φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται από την PDK1 και σε μία δεύτερη θέση από την PKCβ και/ή από την mTORC2 αναιρώντας έτσι την αναστολή του mTORC1. Οι πιο καλά χαρακτηρισμένοι στόχοι των mTORC1 & mTORC2 είναι η S6K και ο 4EBP1. Η φωσφορυλιωμένη S6K1 κινάση ενεργοποιεί τα ριβοσώματα και αυξάνει την ικανότητα πρωτεϊνικής σύνθεσης ενώ ο φωσφορυλιωμένος και απενεργοποιημένος 4EBP-1 απελευθερώνει τον EIF4E μεταγραφικό παράγοντα που προωθεί την μετάφραση του mRNA διαφόρων γονιδίων. Ο 4EBP1 είναι επίσης ένας στόχος της Pim-2, μίας κινάσης που επάγεται από τον NF-κB2.⁸² Η ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού του NF-κB2 και της PI3K-AKT1-mTOR μεσολαβούν της δράσης του BAFF στην επιβίωση των B-κυττάρων και στην

μεταβολική τους ικανότητα.^{32,75,81} Σχετικά πρόσφατα, έχει περιγραφεί μία επιπλέον δράση του BAFF-R, η οποία δεν περιορίζεται στην λειτουργία του ως υποδοχέα. Σύμφωνα λοιπόν με τους Fu και συν., ο BAFF-R αλληλεπιδρά με τη c-rel υπομονάδα του NF-κB, δρώντας και ως μεταγραφικός παράγοντας, συμμετέχοντας στην αναδιαμόρφωση της χρωματινής και στην επαγωγή της έκφρασης γονιδίων (*BAFF*, *CD154*, *Bcl-X_L*, *IL-8*) που προωθούν περαιτέρω την επιβίωση τόσο των φυσιολογικών όσο και των νεοπλασματικών Β-κυττάρων.⁸³

Η ομοιόσταση των Β-κυττάρων φαίνεται να βασίζεται κατά κύριο λόγο στη δράση του συμπλόκου BAFF/BAFFR, και στην αλληλεπίδραση της σηματοδότησης καθοδικά του BAFF-R με αυτής από τον BCR.³¹ Η έκφραση του BAFF-R ρυθμίζεται σε σημαντικό βαθμό από την παρουσία ενός λειτουργικού μη αυτοδραστικού BCR στην επιφάνεια του κυττάρου και είναι εξαρτώμενη από το στάδιο ανάπτυξης του Β-κυττάρου. Στα ανώριμα Β-κύτταρα, η τονική (απουσία συνδέτη) σηματοδότηση από τον BCR επάγει την έκφραση του BAFF-R, μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού της PI3K κινάσης, η οποία λαμβάνει χώρα παράλληλα με τη μετάβαση του ανώριμου Β-κυττάρου στο σπλήνα.⁸⁴ Η μετάβαση αυτή συμπίπτει και με μία αυξημένη ευαισθησία κι απάντηση του Β-κυττάρου στη μεσολαβούμενη από τον BAFF επιβίωση.⁸⁵ Υψηλά επίπεδα του BAFF είναι ικανά ωστόσο σε αυτό το σημείο να ευνοήσουν τη θετική επιλογή των χαμηλής συγγένειας αυτοδραστικών Β-κυττάρων στην περιφέρεια, υποδηλώνοντας ότι η διαθεσιμότητα του προσδέτη είναι ιδιαίτερα κρίσιμη για την ομοιόσταση των Β-κυτταρικών πληθυσμών και την αποφυγή αυτοδραστικότητας.⁸⁶ Κατά τα πιο ώριμα Β-κυτταρικά στάδια, η μεσολαβούμενη από τον προσδέτη ενεργοποίηση οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του BAFF-R, η οποία εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την Btk κινάση και την ενεργοποίηση της c-Rel υπομονάδας του NF-κB.⁸⁷ Η συμβολή της σηματοδότησης από τον BCR στην εξαρτώμενη από τους BAFF/BAFFR επιβίωση κι ομοιόσταση των Β-κυττάρων έγκειται σε έναν ακόμη λόγο: ο BCR, ως ο βασικός μεσολαβητής του κλασσικού μονοπατιού του NF-κB, οδηγεί μεταξύ άλλων την παραγωγή του κύριου υποστρώματος του NF-κB2 μονοπατιού (της p100), απαραίτητου συστατικού της BAFF-R σηματοδότησης.^{31,88}

Η ενεργοποίηση του TAC1 επάγει δραστικά το κλασσικό μονοπάτι του NF-κB. Η οδός αυτή περιλαμβάνει τη συστατική διάσπαση της ακέραιας p105 υπομονάδας (NF-κB1) προς την ενεργή μορφή της p50, η οποία σχηματίζει άμεσα διμερή με άλλα μέλη της οικογένειας των NF-κB παραγόντων, τις RelA & c-Rel. Τα σύμπλοκα αυτά διατηρούνται στο κυτταρόπλασμα λόγω της δράσης των Iκ-B πρωτεϊνών, οι οποίες καλύπτουν τα σήματα πυρηνικού εντοπισμού των διμερών αυτών. Η επαγόμενη από συνδέτη ενεργοποίηση του μονοπατιού οδηγεί στη φωσφορυλίωση του συμπλόκου των Iκ-B κινασών (IKK, αποτελούμενο από τις IKKα, IKKβ, IKKγ), με αποτέλεσμα την αποικοδόμησή τους

επιτρέποντας τη μετατοπίση των διμερών που περιέχουν τη p50 στον πυρήνα.³⁵ Ο TAC1 έχει την ικανότητα να προσδέσει τις TRAF2, TRAF5, TRAF6 πρωτεΐνες αλλά η μεταβίβαση του σήματος από τον TAC1 δεν είναι πλήρως χαρακτηρισμένη. Σχετικά πρόσφατα αποδείχθηκε ότι ο TAC1 μπορεί να ενεργοποιήσει τον NF-κΒ κατά έναν MYD88-IRAK4 εξαρτώμενο τρόπο παρόμοιο με την TLR σηματοδότηση.⁸⁹ Οι MYD88 και TRAF2 προσδένονται στην ίδια περιοχή του TAC1 και δρουν συνεργικά για να ενεργοποιήσουν τον NF-κΒ.^{32,81} Στην περίπτωση του BCMA, αν και ο υποδοχέας διαθέτει θέσεις πρόσδεσης για TRAFs (TRAF1, 2, 3), παραμένει ασαφές πώς η πρόσδεση των συνδετών σε αυτόν στρατολογεί τις TRAFs κι επάγει την ενεργοποίηση της κλασσικής κι εναλλακτικής οδού του NF-κΒ, προκειμένου να μεσολαβήσει της επιβίωσης των τελικώς διαφοροποιημένων πλασματοκυττάρων.⁷³

1.2.3. Ο ρόλος του BAFF/APRIL συστήματος στη νόσο.

Ο BAFF ως κρίσιμος παράγοντας επιβίωσης για τα μεταβατικά B-κύτταρα, παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοίωση των B-κυττάρων.⁸⁸ Μάλιστα περίσσεια του BAFF συμβάλλει στη θετική επιλογή και στον αυξημένο πολλαπλασιασμό χαμηλής συγγένειας αυτοδραστικών B-κυττάρων, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη αυτοάνοσων παθήσεων όπως ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος και το σύνδρομο Sjogren.³¹ Αν και τα επίπεδα του BAFF σε διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα είναι αυξημένα, δεν έχει αποσαφηνιστεί αν η περίσσεια αυτών αποτελεί πρωτοπαθή αιτία της αυτοανοσίας ή αν η αυξημένη παραγωγή κυτταροκινών που προωθούν τη φλεγμονή (π.χ. τύπου I ιντερφερόνες) στα πλαίσια μίας αυτοάνοσης κατάστασης, επάγει την παραγωγή του BAFF.⁸⁸

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα των BAFF & APRIL και των συνδετών τους σε νεοπλασίες κυττάρων της λεμφικής σειράς είναι αυξημένα. Τα νεοπλασματικά B κύτταρα εκφράζουν έναν ή περισσότερους από τους υποδοχείς των BAFF/APRIL στην επιφάνειά τους και η αυξημένη έκφραση αυτών φαίνεται να συμβάλλει στην ανάπτυξη ενεργοποιημένων B-κυττάρων και κατεπέκταση καρκίνου. Υψηλά επίπεδα του BAFF έχουν ανιχνευθεί στον ορό ασθενών με B-ΧΛΛ,⁹⁰ πολλαπλούν μυέλωμα⁹¹ και λέμφωμα NHL⁹². Μάλιστα, η μέτρηση των επιπέδων του BAFF έχει ήδη αποκτήσει προγνωστική σημασία στη ΧΛΛ σε συνδυασμό με τους δείκτες CD38, ZAP70 και τις υπερμεταλλάξεις της βαριάς αλυσού των ανοσοσφαιρινών,⁹³ ενώ στο λεμφοζιδιακό λέμφωμα αυξημένα επίπεδα των APRIL⁹⁴ και BAFFR⁹⁵ συνάδουν με χειρότερη πρόγνωση των ασθενών. Η έκφραση των BAFF & APRIL τόσο από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα όσο κι από το μικροπεριβάλλον του όγκου υποδηλώνει ότι αυτοκρινείς και παρακρινείς μηχανισμοί λειτουργούν σε κακοήθη

κύτταρα, με στόχο την προστασία αυτών από την αυθόρμητη απόπτωση κι από τον επαγόμενο από φάρμακα κυτταρικό θάνατο. Ως εκ τούτου, η αναστολή της αλληλεπίδρασης συνδετών-υποδοχέων στα νεοπλασματικά Β-κύτταρα μπορεί να αποτελεί μία νέα θεραπευτική στρατηγική στην ογκολογία. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι έκφραση του BAFF έχει ανιχνευθεί και σε καρκινικά κύτταρα της μη αιμοποιητικής σειράς,⁹⁶ το οποίο υποδεικνύει ότι ο ρόλος του BAFF στον καρκίνο μπορεί να είναι πιο εκτεταμένος. Τα επίπεδα του BAFF είναι επίσης αυξημένα σε καταστάσεις όπως η φλεγμονή, η αλλεργία και η ιική λοίμωξη, λόγω της παραγωγής των επαγωγέων του BAFF όπως οι τύπου I ιντερφερόνες.^{32,44,97}

Παρά την απουσία έκφρασης των συνδετών και υποδοχέων του BAFF/APRIL συστήματος στα προγονικά Β-κύτταρα στο μυελό των οστών, διάφορες μελέτες έχουν υποστηρίξει ότι τα μόρια αυτά μπορεί να εκφράζονται στους νεοπλασματικούς κυτταρικούς ομολόγους τους, τους Β-λεμφοβλάστες της Β-ΟΛΛ, της πιο κοινής αιματολογικής κακοήθειας της παιδικής ηλικίας.

1.3. Β-Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία

Η ΟΛΛ προκύπτει από τον κακοήγη μετασχηματισμό και πολλαπλασιασμό των προγονικών κυττάρων της λεμφικής σειράς (Β- ή Τ-) στο μυελό των οστών, ακολουθούμενη από την κλωνική τους επέκταση στο αίμα και σε ποικίλες εξωμυελικές θέσεις. Αποτελεί τον πιο κοινό τύπο καρκίνου της παιδικής ηλικίας (με την μέγιστη συχνότητα εμφάνισης σε ηλικίες μεταξύ 3 έως 5 ετών)²⁷, ενώ συναντάται σχετικά πιο σπάνια στους ενήλικες (συνήθως κατά την 6^η δεκαετία της ζωής)⁹⁸. Ο επιπολασμός της νόσου ποικίλει σημαντικά ανάλογα με τη φυλή και την εθνικότητα, ενώ κατά την παιδική ηλικία η νόσος φαίνεται να είναι πιο συχνή στα αγόρια (55%) σε σχέση με τα κορίτσια (45%)²⁷. Οι κλινικές εκδηλώσεις κατά την εμφάνιση της νόσου περιλαμβάνουν αναιμία, θρομβοπενία, λευκοπενία (λόγω μυελικής ανεπάρκειας), πυρετό, απώλεια βάρους, νυχτερινές εφιδρώσεις, εύκολη αιμορραγία ή μώλωπες, κόπωση, δύσπνοια και λοιμώξεις, ενώ λόγω της διήθησης εξωμυελικών θέσεων από λεμφοβλάστες, ένα 20% των ασθενών εμφανίζει λεμφαδενοπάθεια, σπληνομεγαλία ή ηπατομεγαλία.⁹⁹ Επιπλέον, ένα ποσοστό των ασθενών (<10%) εμφανίζουν συμπτώματα λόγω διήθησης του ΚΝΣ.¹⁰⁰

Περίπου το 80-85% των περιστατικών με ΟΛΛ προέρχεται από την κακοήγη εξαλλαγή προγονικών κυττάρων της Β-σειράς, ενώ ένα 15-20% από προγονικά κύτταρα της Τ-σειράς, με καθεμία από αυτές τις νοσολογικές οντότητες να διακρίνεται για τα κλινικά

χαρακτηριστικά (ηλικία, αριθμός λευκοκυττάρων, φύλο, φυλή), τον ανοσοφαινότυπο, τις κυτταρογενετικές ανωμαλίες (ανευπλοειδίες, χρωμοσωμικές μετατοπίσεις), τις σημειακές μεταλλάξεις και τις αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση. Η ταξινόμηση της ΟΛΛ βασίζεται στα μορφολογικά, ανοσοφαινοτυπικά και κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά των λεμφοβλαστών.^{101,102} Ο ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός των λευχαιμικών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής αποτελεί ωστόσο τη βασική και πιο άμεση πρακτική για τη διάγνωση και υποκατηγοριοποίηση της ΟΛΛ, ενώ χρησιμοποιείται και για την ανίχνευση και παρακολούθηση της MRD. Στη Β-ΟΛΛ, οι βασικότεροι δείκτες που χρησιμοποιούνται στην κυτταρομετρία είναι οι CD19, CD20, CD22, CD24 και CD79α. Η έκφραση οποιονδήποτε δύο από τους τρεις πρωιμότερους δείκτες της Β-σειράς, CD19, CD22 (μεμβρανική και κυτταροπλασματική) και CD79α, απουσία άλλων δεικτών διαφοροποίησης χαρακτηρίζει την προ-προ-Β-ΟΛΛ. Η παρουσία του CD10 μορίου (common ALL antigen- CALLA αντιγόνο) ορίζει την υποομάδα της "κοινής" ΟΛΛ (CALLA+ ΟΛΛ), η κυτταροπλασματική έκφραση της βαριάς αλυσίδας μ χαρακτηρίζει τον υπότυπο της προ-Β-ΟΛΛ, ενώ η παρουσία ελαφρών αλυσίδων (κ ή λ) της επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης ορίζει την ώριμη Β-ΟΛΛ (λέμφωμα Burkitt).¹⁰³

Μεταξύ των άλλων δεικτών των Β-κυττάρων, οι προ-προ-Β και κοινή Β-ΟΛΛ είναι συχνά θετικές για τον δείκτη CD24, ενώ η έκφραση της TdT και του αντιγόνου των στελεχιαίων κυττάρων CD34 είναι επίσης χαρακτηριστική της προ-προ-Β-ΟΛΛ. Λεμφοβλάστες πέραν του προ-προ-Β-σταδίου, εμφανίζουν ποικίλο πρότυπο έκφρασης των CD20 και CD22 μορίων, ενώ η έκφραση των TdT & CD34 χάνεται στην ώριμη Β-ΟΛΛ. Οι νεοπλασματικοί λεμφοβλάστες δύναται επίσης να εκφράζουν αντιγόνα της μυελικής σειράς (συνήθεστερα CD13 και CD33), ιδιαίτερα σε περιπτώσεις με Β-ΟΛΛ που φέρουν τον ανασυνδυασμό BCR-ABL (συνήθως με κοινή Β-ΟΛΛ θετική για τα CD34, CD38, CD25 και CD13/33). Η προ-προ-Β ΟΛΛ με αναδιατάξη στο γενετικό τόπο του MLL εκφράζει επίσης συχνά δείκτες της μυελικής σειράς. Η απρόσφορη έκφραση Τ-δεικτών στους Β-λεμφοβλάστες είναι λιγότερο συχνή, με μόνο ένα μικρό υποσύνολο της Β-ΟΛΛ να εκφράζει ταυτόχρονα και CD2.^{99,104,105} Λόγω της μερικής επικάλυψης του ανοσοφαινότυπου των λεμφοβλαστών με αυτού των φυσιολογικών αιματογονίων, η παρουσία των τελευταίων σε αυξημένες αναλογίες (5-50%) σε παθολογικές καταστάσεις μπορεί να δυσχαιραίνει τη διάκριση της Β-ΟΛΛ σε πρώιμο στάδιο ή τον προσδιορισμό της MRD.^{26,28,29} Για τους λόγους αυτούς, είναι εξαιρετικά σημαντική η εύρεση νέων δεικτών που θα διαφοροποιούν τα φυσιολογικά αιματογόνα από τους Β-λεμφοβλάστες.

Αρκετά γενετικά σύνδρομα (όπως το σύνδρομο Down¹⁰⁶, η αναιμία Fanconi¹⁰⁷, η αταξία-τηλαγγειεκτασία¹⁰⁸) συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΟΛΛ, αλλά στους περισσότερους ασθενείς δεν έχουν αναγνωριστεί κληρονομικοί παράγοντες. Οι μελέτες γενετικής συσχέτισης μεγάλης κλίμακας¹⁰⁹ έχουν εντοπίσει κάποιες πολυμορφικές παραλλαγές σε αρκετά γονίδια (συμπεριλαμβανομένων των *ARID5B*, *CEBPE*, *GATA3* και *IKZF1*) που εμπλέκονται στην ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων του αίματος και που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΟΛΛ ή συγκεκριμένων υποτύπων της,¹¹⁰ ενώ έχουν ανιχνευθεί και σπάνιες μεταλλάξεις της βλαστικής σειράς στα γονίδια *PAX5* και *ETV6* που συνδέονται με την εμφάνιση οικογενούς ΟΛΛ.^{111,112} Οι κληρονομικές αυτές γονιδιακές παραλλαγές συμβάλλουν στην εγγενή ευαισθησία των πρόδρομων κυττάρων του αίματος σε γεγονότα κακοήθους μετασχηματισμού είτε *in utero* κατά την έναρξη είτε με μεταγενέστερη προώθηση και κλωνική εξέλιξη μετά τη γέννηση, ή και τα δύο.¹¹³ Από την άλλη πλευρά, ελάχιστοι περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου έχουν συσχετισθεί με τον κίνδυνο εμφάνισης ΟΛΛ, με αυτά τα δεδομένα να περιορίζονται κυρίως στους ενήλικες. Αυξημένα ποσοστά της ασθένειας έχουν συνδεθεί με έκθεση σε ιονίζουσα και μη ιονίζουσα (π.χ. ηλεκτρομαγνητική) ακτινοβολία και σε ορισμένες χημικές ουσίες (π.χ. παρασιτοκτόνα), όπως και σε κάποιους ιούς (EBV, HIV), αλλά οι συσχετίσεις αυτές εξηγούν μόνο μια πολύ μικρή μειοψηφία των περιπτώσεων (ανασκόπηση από Inaba και συν.,¹¹³ Terwilliger & Abdul-Hay¹¹⁴). Ωστόσο, στην πλειονότητα των περιπτώσεων, η ΟΛΛ εμφανίζεται ως μία *de novo* κακοήθεια σε προηγουμένως υγιή άτομα.

Η ΟΛΛ περιλαμβάνει ποικίλες νοσολογικές οντότητες με διακριτούς συνδυασμούς σωματικών γενετικών παραλλαγών, οι οποίες ωστόσο από μόνες τους δεν είναι ικανές να επάγουν λευχαιμογένεση, αλλά ο συνδυασμός αυτών ενδέχεται να συμβάλλει στην εγκαθίδρυση του λευχαιμικού κλώνου.¹¹⁵ Αυτές οι γενετικές τροποποιήσεις περιλαμβάνουν ανευπλοειδία (αλλαγές στον αριθμό των χρωμοσωμάτων), χρωμοσωμικές αναδιατάξεις που απορρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση ή οδηγούν σε έκφραση χημικών πρωτεϊνών, ελλείψεις ή ενθέσεις DNA περιοχών, και σημειακές μεταλλάξεις.¹¹⁶ Στη Β-ΟΛΛ, μεγάλες χρωμοσωμικές αλλαγές μπορεί να περιλαμβάνουν υψηλή υπερδιπλοειδία με μη τυχαία προσθήκη τουλάχιστον πέντε χρωμοσωμάτων (συμπεριλαμβανομένων των X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 και 21), υποδιπλοειδία (<44 χρωμοσώματα) και χρωμοσωμικές αναδιατάξεις όπως οι t(12;21) [ETV6-RUNX1], t(1;19) [TCF3-PBX1], t(9;22) [BCR-ABL1] κι αυτές που περιλαμβάνουν τον γενετικό τόπο του *MLL*. Πολλές από αυτές τις γενετικές αλλαγές διαταράσσουν σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες συμπεριλαμβανομένων της μεταγραφικής ρύθμισης γονιδίων που εμπλέκονται στη ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων της λεμφικής σειράς (π.χ. RUNX1, ETV6), της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, του

ογκοκατασταλτικού μονοπατιού του TP53, της σηματοδότησης καθοδικά των Ras, PI3K και JAK-STAT και της επιγενετικής τροποποίησης, ενώ μπορεί να ενεργοποιούν ογκογονίδια ή να ενεργοποιούν συστατικά κινάσες τυροσίνης (π.χ. ABL1).¹¹⁶ Μάλιστα, πολλές από αυτές τις γενετικές βλάβες χρησιμοποιούνται στη διαστρωμάτωση κινδύνου της νόσου.¹¹³

Οι χρωμοσωμικές μετατοπίσεις και οι ενδοχρωμοσωμικές αναδιατάξεις αποτελούν πιθανότατα πρώιμα εναρκτήρια γεγονότα στη λευχαιμογένεση, οι οποίες φαίνεται να είναι παρούσες σε όλα τα λευχαιμικά κύτταρα, να διατηρούνται στην υποτροπή και σε συνδυασμό με άλλες γενετικές βλάβες να επάγουν λευχαιμία σε πειραματικά μοντέλα. Υπάρχουν δύο λειτουργικές κατηγορίες μετατοπίσεων. Η πρώτη μετατοπίζει ογκογονίδια σε ρυθμιστικές περιοχές ενεργά μεταγραφόμενων γονιδίων, προκαλώντας απορρυθμισμένη έκφραση μίας πρωτεΐνης (π.χ. c-MYC/IGH ή IGK και IGL). Η δεύτερη κατηγορία αντιμεταθέτει δύο γονίδια με αποτέλεσμα την παραγωγή μιας χμιαϊκής πρωτεΐνης που έχει διαφορετικές λειτουργίες από τις πρωτεΐνες από τις οποίες προέρχεται (ETV6-RUNX1, TCF3-PBX1, BCR-ABL1).²⁷

Η πιο κοινή χρωμοσωμική αναδιάταξη στη Β-ΟΛΛ είναι η t(12;21)(p13;q22), η οποία συναντάται στο ~25% των ασθενών με κοινή Β-ΟΛΛ (CD10⁺, TdT⁺, CD34⁺, συχνά με απρόσφορη έκφραση CD13) και κωδικοποιεί τον ETV6-RUNX1 (TEL-AML1) χμιαϊκό μεταγραφικό παράγοντα.¹¹⁷ Αυτή η αναδιάταξη συνήθως δεν ανιχνεύεται στον κλασσικό καρυότυπο, παρά μόνο με *in situ* υβριδισμό φθορισμού (Fluorescence *in situ* Hybridization, FISH) και μοριακές τεχνικές. Τόσο ο TEL όσο και ο AML1 μεταγραφικός παράγοντας απαιτούνται για τη φυσιολογική αιμοποίηση, ωστόσο η χμιαϊκή πρωτεΐνη διαταράσσει την έκφραση των ρυθμιζόμενων από τον AML1 γονιδίων, μετατρέποντας τον από ενεργοποιητή σε καταστολέα της μεταγραφής. Έχει επίσης περιγραφεί ότι ο TEL-AML1 προκαλεί υπερέκφραση του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης και την αυξημένη ενεργοποίηση της JAK-STAT σηματοδότησης. Η παρουσία του TEL-AML1 προωθεί την επέκταση προγονικών Β-κυττάρων με αυξημένη δυναμική αυτοανανέωσης και αδυναμία διαφοροποίησης προς πιο ώριμα Β-κυτταρικά στάδια. Παρόλο που ο ανασυνδυασμός αυτός φαίνεται να προκύπτει σε κάποιο προγονικό Β-κύτταρο *in utero*, δευτερογενή γενετικά γεγονότα απαιτούνται για την πρόκληση λευχαιμίας.¹¹⁸⁻¹²⁰

Η μετατόπιση t(1;19)(q23;p13)/E2A-PBX1 (TCF3-PBX1) είναι παρούσα σε ποσοστό 2-6% των παιδιατρικών περιπτώσεων με Β-ΟΛΛ, και ως επί το πλείστον στο 50% αυτών με προ-Β-ΟΛΛ (CD10⁺, CD34^{+/+}, cIgM⁺, ποικίλη έκφραση CD20). Αυτή η μετατόπιση συγχωνεύει τις επικράτειες διενεργοποίησης του E2A με την C-τελική περιοχή του PBX1. Ο E2A αποτελεί έναν βασικό μεταγραφικό παράγοντα που απαιτείται για την ανάπτυξη των

κυττάρων της λεμφικής σειράς, προωθώντας τη διαφοροποίηση κι ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων¹²¹ και μάλιστα διαγραφεί την ανάπτυξη T-κυτταρικού λεμφώματος¹²². Ο PBX1, από την άλλη πλευρά φαίνεται ότι φυσιολογικά είναι απαραίτητος κατά τα πολύ πρώιμα γεγονότα δέσμευσης στη B-κυτταρική σειρά, δρώντας πιθανότατα κατά τη μετάβαση από το στελεχειαίο αιμοποιητικό κύτταρο στο κοινό λεμφοκυτταρικό προγονικό κύτταρο.¹²³ Η χμιαϊκή πρωτεΐνη λειτουργεί ως ένας μεταγραφικός ενεργοποιητής καθώς δεσμεύεται σε γονίδια που κωδικοποιούν τις HOX (homeobox, ομοιοτικές) πρωτεΐνες παρεμβαίνοντας πιθανότατα έτσι στη διαφοροποίηση των κυττάρων της αιμοποιητικής σειράς, με αναστολή της γονιδιακής έκφρασης που ρυθμίζεται από τις πρωτεΐνες αυτές.^{118,124} Η E2A-PBX1 μετατόπιση θεωρείται ότι σχετίζεται με ΟΛΛ ενδιάμεσης πρόγνωσης, αλλά με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής στο ΚΝΣ.¹²⁵

Η t(9;22)(q34;q11)/BCR-ABL1 μετατόπιση συγχωνεύει τις 5' ακολουθίες του *BCR* (breakpoint cluster region) με τις 3' αλληλουχίες του *ABL1*, το οποίο κωδικοποιεί μία κινάση τυροσίνης. Τα σημεία θραύσης στο χρωμόσωμα 9 εκτείνονται μίας περιοχής περίπου 200-kb εντός του πρώτου ιντρονίου του *ABL* γονιδίου, ενώ τα σημεία θραύσης στο *BCR* γονίδιο στο χρωμόσωμα 22 εντοπίζονται σε δύο περιοχές: μία 5.8-kb κύρια BCR (M-bcr) τυπική της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (ΧΜΛ) -καθώς 95% αυτών των ασθενών φέρουν τη συγκεκριμένη μετατόπιση- και μία μικρή BCR (m-bcr) που συναντάται στο 25% των ενήλικων ασθενών με B-ΟΛΛ και στο 3-5% των παιδιατρικών περιπτώσεων. Τα ανασυνδυασμένα ελλείματα που δημιουργούνται με θραύση στο M-bcr (ΧΜΛ-τύπου) κωδικοποιούν μία 210-kDa χμιαϊκή πρωτεΐνη (p210), ενώ αυτά που συμβαίνουν στο m-bcr (ΟΛΛ-τύπου) κωδικοποιούν την πρωτεΐνη p190.¹¹⁸ Και οι 2 ισομορφές μπορούν να μετασχηματίσουν *in vitro* και να επάγουν ένα σύνδρομο παρόμοιο με τη ΧΜΛ σε ποντίκια.¹²⁶ Η BCR-ABL κινάση ενεργοποιεί ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια, επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, κι απορρυθμίζει τη διαφοροποίηση των B-κυττάρων (ανασκόπηση από Mullighan¹¹⁸). Έχει βρεθεί ότι η παρουσία του ανασυνδυασμού αυτού σχετίζεται με μεγαλύτερη ηλικία εμφάνισης της νόσου, υψηλότερο αριθμό λευκοκυττάρων και συχνότερη διήθηση του ΚΝΣ από B-λεμφοβλάστες κατά τη διάγνωση²⁷. Άλλες αναδιατάξεις που σχετίζονται με κακή πρόγνωση είναι αυτές που εμπλέκουν τον γενετικό τόπο της MLL. Οι αναδιατάξεις αυτές εμφανίζονται σε μεγάλη συχνότητα σε βρέφη <1 έτους με B-ΟΛΛ (κατά κανόνα προ-προ-B-ΟΛΛ: CD10⁻, CD19⁺, CD24⁻, CD15⁺), προσδίδουν αυξημένη ικανότητα αυτοανανέωσης σε προγονικά κύτταρα μέσω ρύθμισης επιγενετικών διεργασιών και σχετίζονται με δυσμενέστερη πρόγνωση των περιστατικών αυτών.¹²⁷ Μάλιστα, ασθενείς που φέρουν τις συγκεκριμένες αναδιατάξεις εμφανίζουν ελάχιστες επιπρόσθετες σωματικές

γενετικές βλάβες υποστηρίζοντας τη συμβολή των MLL αναδιατάξεων στη λευχαιμογένεση.¹¹⁸

Οι κύριοι προγνωστικοί παράγοντες στη Β-ΟΛΛ περιλαμβάνουν τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών στη διάγνωση, τα βιολογικά και τα γενετικά χαρακτηριστικά των λευχαιμικών κυττάρων και την αρχική απάντηση στη θεραπεία. Η ηλικία του ασθενούς και ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων κατά τη διάγνωση είναι αντιπροσωπευτικοί της έκβασης της νόσου, καθώς η μεγαλύτερη ηλικία και ο αυξημένος αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων προμηνύουν δυσμενέστερη πρόγνωση.¹¹⁴ Η ηλικία συνδέεται και με την εμφάνιση νόσου με εγγενή δυσμενή βιολογία (π.χ. παρουσία BCR-ABL1 ανασυνδυασμού, υποδιπλοειδία, σύνθετος καρυότυπος), χαμηλή ανεκτικότητα τυπικών χημειοθεραπευτικών παραγόντων σε συνδυασμό με άλλα ιατρικά προβλήματα· μάλιστα, ασθενείς ηλικίας άνω των 60 ετών έχουν ιδιαίτερα κακή έκβαση με μόνο 10-15% να επιτυγχάνουν μακροχρόνια επιβίωση.¹²⁸ Έτσι σε ασθενείς που δεν φέρουν τον BCR-ABL1 ανασυνδυασμό, έχει διαπιστωθεί σημαντική διαφορά στην επιβίωση ελεύθερη νόσου και στη συνολική επιβίωση χρησιμοποιώντας ένα κατώτερο ηλικιακό όριο των 35 ετών.¹²⁹ Ο αυξημένος αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων κατά τη διάγνωση, που ορίζεται ως $>30 \times 10^9$ WBC/L για τη Β-ΟΛΛ ή $>100 \times 10^9$ WBC/L για την Τ-ΟΛΛ, αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για την επιβίωση ελεύθερη νόσου και την συνολική επιβίωση. Βάσει αυτών, η Ph⁻ Β-ΟΛΛ μπορεί να χαρακτηριστεί ως χαμηλού κινδύνου (χωρίς παράγοντες κινδύνου με βάση την ηλικία ή τον αριθμό των λευκοκυττάρων), ενδιάμεσου κινδύνου (ηλικία >35 έτη ή αυξημένος αριθμός WBC) ή υψηλού κινδύνου (ηλικία >35 έτη και αυξημένα WBC).¹²⁹ Στην περίπτωση των παιδιατρικών περιστατικών με ΟΛΛ, ως ηλικιακές ομάδες υψηλού κινδύνου θεωρούνται τα βρέφη <1 έτους και οι έφηβοι (>10 ετών, ιδιαίτερα αυτοί >16 ετών).¹³⁰

Οι κυτταρογενετικές ανωμαλίες διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην διαστρωμάτωση κινδύνου της ΟΛΛ, με την παρουσία του BCR-ABL1 ανασυνδυασμού να έχει το μεγαλύτερο αντίκτυπο στην πρόγνωση και τη θεραπεία της νόσου, αν και η εισαγωγή των αναστολέων τυροσινικών κινασών έχει βελτιώσει κατά πολύ την επιβίωση των ασθενών. Ο επιπολασμός του t(9;22) στην ΟΛΛ της ενήλικης ζωής μπορεί να κυμαίνεται από 15-50% και αυξάνει με την ηλικία, ενώ στα παιδιά συναντάται στο 3-5% των ασθενών.¹³¹ Άλλες κυτταρογενετικές ομάδες που σχετίζονται με κακή πρόγνωση είναι οι t(4;11)/MLL αναδιάταξη, η KMT2A μετατόπιση, t(8;14) (IgH/MYC) αναδιάταξη, ο πολύπλοκος καρυότυπος (≥ 5 χρωμοσωμικές ανωμαλίες), η χαμηλή υποδιπλοειδία (30-39 χρωμοσώματα)/τριπλοειδία (60-78 χρωμοσώματα), όπως επίσης και μία νέα υποομάδα της ΟΛΛ που δεν φέρει τον BCR-ABL1 ανασυνδυασμό αλλά έχει παρόμοιο γενετικό προφίλ με αυτό της Ph⁺

ΟΛΛ. Σε αντίθεση, ασθενείς με υπερδιπλοειδία και del (9p) έχουν σημαντικά καλύτερη έκβαση.¹³² Η αρχική απάντηση στη θεραπεία είναι επίσης αντιπροσωπευτική της έκβασης της νόσου, όπου MRD < 1×10^{-3} μετά την θεραπεία εφόδου και < 5×10^{-4} μετά την πρόωμη φάση εδραίωσης του αποτελέσματος της θεραπείας φαίνεται να σχετίζεται με καλή συνολική επιβίωση.¹³³

Η στρατηγική της θεραπείας είναι παρόμοια στα παιδιά και τους ενήλικες, προσφέροντας μια μακροχρόνια επιβίωση ελεύθερη νόσου που προσεγγίζει το 90% στα παιδιατρικά περιστατικά με ΟΛΛ, αν και το ποσοστό επιτυχίας είναι πολύ πιο χαμηλό στους ενήλικες. Η καθιερωμένη θεραπεία χωρίζεται στις εξής φάσεις: θεραπεία εφόδου, ενίσχυση της θεραπείας-εδραίωση του αποτελέσματος, θεραπεία συντήρησης, ενώ συχνά ενσωματώνεται και προφυλακτική θεραπεία για το ΚΝΣ. Ο στόχος της θεραπείας εφόδου είναι να εξαλείψει το μεγαλύτερο δυνατό φορτίο της νόσου με τη χρήση βινκριστίνης και κορτικοειδών (συνηθέστερα πρεδνιζολόνης ή δεξαμεθαζόνης) και μίας ανθρακυκλίνης. Οι παράγοντες αυτοί ασκούν διακριτές δράσεις στα λευχαιμικά κύτταρα, λειτουργώντας έτσι συνεργικά προκειμένου να επιτευχθεί πλήρης ύφεση και να αποκατασταθεί η φυσιολογική αιμοποίηση.^{113,134} Μία εναλλακτική αλλά αποτελεσματικότερη προσέγγιση στα χημειοθεραπευτικά πρωτόκολλα που περιγράφηκαν προηγουμένως αποτελεί το υπερκλασματοποιημένο σχήμα Hyper-CVAD/μεθοτρεξάτης-αρασυτίνης (92% αποτελεσματικότητα, 32% πενταετής επιβίωση ελεύθερη νόσου) που αποτελείται από τέσσερις κύκλους κυκλοφωσφαμίδης, βινκριστίνης, δοξορουβικίνης και δεξαμεθαζόνης που εναλλάσσονται με τέσσερις κύκλους υψηλών δόσεων αρασυτίνης και μεθοτρεξάτης.¹³⁵ Ως προφυλακτική ενέργεια για το ΚΝΣ, χορηγείται ενδορραχιαία χημειοθεραπεία ανάλογα με τους προγνωστικούς παράγοντες. Μάλιστα η χρήση της δεξαμεθαζόνης έναντι της πρεδνιζολόνης στο σχήμα αυτό εμφανίζει το πλεονέκτημα ότι η πρώτη επιτυγχάνει υψηλότερες συγκεντρώσεις στο ΚΝΣ, αλλά φαίνεται να έχει και μεγαλύτερο κίνδυνο πρόκλησης ανεπιθύμητων ενεργειών.¹³⁶

Μετά την φάση εφόδου και επί παρουσίας δυσμενών προγνωστικών παραγόντων, οι ασθενείς μπορούν εναλλακτικά να οδηγηθούν σε αλλογενή μεταμόσχευση στελεχιαίων κυττάρων από συμβατό δότη. Αν αυτή δεν είναι εφικτή, οι ασθενείς προχωρούν σε πιο εντατικά σχήματα χημειοθεραπείας.¹¹³ Η θεραπεία αυτή ποικίλει στα διάφορα πρωτόκολλα, αλλά γενικά χρησιμοποιεί παρόμοιους παράγοντες με τη φάση εφόδου και περιλαμβάνει ενδορραχιαία χημειοθεραπεία και κρανιακή ακτινοβολία κατά περιόδους για προφύλαξη του ΚΝΣ.¹³⁷

Αν και η θεραπεία των ενηλίκων ακολουθεί τις ίδιες αρχές με τα παιδιατρικά σχήματα, τα ποσοστά επιτυχίας είναι σημαντικά χαμηλότερα καθώς η αντοχή των ασθενών είναι μικρότερη, υπάρχουν συννοσηρότητες, και η ανταπόκριση είναι μειωμένη, αν λάβει κανείς υπόψη και τη συσσώρευση υποκείμενων μοριακών διαταραχών που σχετίζονται με δυσμενέστερη πρόγνωση.¹³⁸ Ωστόσο, η εισαγωγή στη θεραπευτική αντιμετώπιση νέων παραγόντων, όπως τα μονοκλωνικά αντισώματα (π.χ. rituximab, blinatumomab κλπ.), φαίνεται πολλά υποσχόμενη για τη βελτίωση της επιβίωσης των ασθενών.¹³⁹

Η υποτροπή της νόσου προκύπτει από την επικράτηση ενός δευτερεύοντος υποκλώνου που εμφανίζεται σε χαμηλές αναλογίες κατά τη διάγνωση και φέρει γενετικές αλλοιώσεις διακριτές από εκείνες του κυρίαρχου κλώνου στη διάγνωση.²⁷ Αν και στις περισσότερες περιπτώσεις, ο κυτταρικός κλώνος στην υποτροπή μοιράζεται γενετικές βλάβες με τον κυρίαρχο κλώνο της διάγνωσης, υποδηλώνοντας μία κοινή προ-λευχαιμική προέλευση, μπορεί να εμφανίζει επιπρόσθετες παραλλαγές, που του προσδίδουν ανθεκτικότητα στη θεραπεία. Πολύ σπάνια, οι κλώνοι στην υποτροπή είναι πανομοιότυποι ή εντελώς διαφορετικοί από αυτούς της διάγνωσης.¹¹³

Το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών (BM) υποστηρίζει την επιβίωση τόσο των φυσιολογικών αιματοποιητικών στελεχιαίων κυττάρων όσο και των νεοπλασματικών ομολόγων τους. Στο μυελό εντοπίζονται διακριτές μικροπεριβαλλοντικές θέσεις, αποτελούμενες από μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα, οστεοκλάστες κ.ά., οι οποίες παρέχουν καταφύγια, όπου υποσύνολα των λευχαιμικών κυττάρων διαφεύγουν του επαγόμενου από τη χημειοθεραπεία κυτταρικού θανάτου και αποκτούν φαινότυπο ανθεκτικό στα φάρμακα. Τα λευχαιμικά κύτταρα είναι επίσης τα ίδια σε θέση να αναδιαμορφώσουν τις κοιλότητες αυτές κατά τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να υποστηρίξουν καλύτερα την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους. Μάλιστα, οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ του μικροπεριβάλλοντος του μυελού και των λευχαιμικών κυττάρων έχουν οδηγήσει στην ανακάλυψη δυνητικών θεραπευτικών στόχων που περιλαμβάνουν κυτταροκίνες/χημειοκίνες και τους υποδοχείς τους, μόρια προσκόλλησης, οδούς μεταγωγής σήματος και πρωτεΐνες που σχετίζονται με την υποξία, με σκοπό την βελτίωση της έκβασης της Β-ΟΛΛ (ανασκόπηση από Chiarini και συν.¹⁴⁰).

1.4. Ο ρόλος του BAFF/APRIL συστήματος στη Β-ΟΛΛ

Η συμβολή του BAFF/APRIL συστήματος στη παθογένεση λεμφωμάτων ώριμης Β-κυτταρικής αρχής έχει μελετηθεί εκτενώς, με τα μόρια αυτά να παίζουν σημαντικό ρόλο στην

επιβίωση κι ανάπτυξη των νεοπλασματικών ομόλογων των ώριμων Β-κυττάρων της περιφέρειας. Παρά το γεγονός ότι οι υποδοχείς του συστήματος αυτού δεν εκφράζονται κατά τα πρόδρομα Β-κυτταρικά στάδια στο μυελό των οστών, με πρωιμότερη όλων την έναρξη της έκφρασης του BAFFR στο στάδιο του ανώριμου Β-κυττάρου λίγο πριν αυτό εγκαταλείψει το μυελό των οστών, διάφορες μελέτες διερεύνησαν την πιθανή εμπλοκή των BAFF/APRIL και των υποδοχέων τους στην ανάπτυξη της Β-ΟΛΛ· ωστόσο τα μέχρι τώρα δεδομένα είναι αντικρουόμενα. Η ομάδα των Parameswaran *και συν.* ήταν η πρώτη η οποία ανέφερε μία απρόσφορη έκφραση του BAFFR στους νεοπλασματικούς Β-λεμφοβλάστες ασθενών με Β-ΟΛΛ, ικανού να δεσμεύσει τον συνδέτη του BAFF και να ενεργοποιήσει την εναλλακτική οδό του NF-κΒ (αν και στην ίδια μελέτη αναφέρθηκε ασθενής ενεργοποίηση και της κλασσικής οδού). Μάλιστα, τα λευχαιμικά κύτταρα των ασθενών παρήγαγαν αυτοκρινώς BAFF στη μεμβρανική ισομορφή, ενώ επώασή τους με εξωγενή ανασυνδυασμένο BAFF βελτίωσε την επιβίωσή τους σε καλλιέργεια απουσία στρωματικών κυττάρων (τα οποία αποτελούν κατά κανόνα πλούσια πηγή BAFF) και μείωσε την επαγόμενη από έναν αναστολέα της BCR-ABL κινάσης (nilotinib) απόπτωση των κυττάρων, μέσω ανοδικής ρύθμισης της έκφρασης της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Pim-2.¹⁴¹

Στο ίδιο μοτίβο κυμάνθηκαν και τα ευρήματα της μελέτης των Maia *και συν.* οι οποίοι ανέδειξαν τον BAFFR ως τον κυριότερο υποδοχέα που εκφράζεται απρόσφορα από τους Β-λεμφοβλάστες, υποστηρίζοντας ότι τα λευχαιμικά κύτταρα των ασθενών με Β-ΟΛΛ εκφράζουν τουλάχιστον έναν από τους τρεις υποδοχείς του συστήματος αυτού. Η έκφραση των BAFF & APRIL τόσο σε κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών όσο και στους Β-λεμφοβλάστες υποδηλώνει ότι πιθανότατα διακυτταρικές επαφές αλλά και αυτοκρινείς μηχανισμοί εμπλέκονται στην επαγωγή σημάτων από το σύστημα αυτό των συνδετών/υποδοχέων. Επιπλέον, διαπιστώθηκε παρουσία ποικίλων εναλλακτικά ματισμένων μεταγράφων, κυρίως του APRIL, στους Β-λεμφοβλάστες, τα οποία ωστόσο είναι άγνωστο αν μεταφράζονται σε λειτουργικές πρωτεΐνες κι αν θα μπορούσαν να επηρεάζουν τα σήματα που μεταβιβάζονται από τις φυσιολογικές ισομορφές των συνδετών & υποδοχέων. Τέλος, επώαση Β-λεμφοβλαστών ασθενών που εξέφραζαν και τους 3 υποδοχείς με BAFF οδήγησε σε ενεργοποίηση ποικίλων σηματοδοτικών οδών (κλασσική οδός του NF-κΒ, MAPK, PI3K/Akt), ενώ επίδραση με BAFF-myc βελτίωσε την επιβίωση των λεμφοβλαστών ασθενών, ιδιαίτερα σε συγκαλλιέργεια με CD40L.⁴⁹

Η ομάδα των Onda *και συν.* επέκτεινε τη μελέτη και στην ώριμη Β-ΟΛΛ, όπου διαπίστωσαν ότι ορισμένοι ασθενείς δύναται να εκφράζουν τον BAFFR μεταγραφικά και πρωτεϊνικά, και το ίδιο συνέβει και με τις περιπτώσεις των ασθενών με ΟΛΛ των πρόδρομων

B-κυττάρων. Μάλιστα, επίδραση με BAFF φάνηκε να προστατεύει τις BAFFR⁺ κυτταρικές σειρές Burkitt λεμφώματος από την επαγόμενη από δεξαμεθαζόνη απόπτωση, ενώ παραδόξως είχε το ακριβώς αντίθετο αποτέλεσμα σε κυτταρικές σειρές ΟΛΛ πρόδρομων B-κυττάρων, υποδηλώνοντας ότι η επίδραση του BAFF στα λευχαιμικά κύτταρα ασθενών με ΟΛΛ των πρόδρομων B-κυττάρων διαφέρει από αυτή στις νεοπλασίες των ώριμων B-κυττάρων.¹⁴²

Τα επίπεδα των διαλυτών BAFF και APRIL έχουν μελετηθεί επίσης σε ένα σύνολο ασθενών με B-ΟΛΛ στη διάγνωση και κατά την ύφεση/υποτροπή της νόσου, όπου και διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα τόσο του BAFF όσο και του APRIL ήταν αυξημένα στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Ενδιαφέρον ωστόσο παρουσιάζει το γεγονός ότι μόνο τα επίπεδα του APRIL φάνηκε να σχετίζονται με την πρόγνωση της νόσου καθώς παρέμεναν αυξημένα σε ασθενείς με φτωχή απάντηση στη θεραπεία και μάλιστα συσχετίστηκαν με πιο σύντομη επιβίωση ελεύθερη νόσου, αλλά και συνολική επιβίωση.¹⁴³⁻¹⁴⁵

Η επικράτηση του BAFFR μεταξύ των άλλων υποδοχέων στο πλαίσιο της απρόσφορης έκφρασης στους B-λεμφοβλάστες οδήγησε τους Fazio και συν. να διερευνήσουν την έκφραση του υποδοχέα αυτού κατά τη διάρκεια της θεραπείας, όπου και διαπίστωσαν ότι κατά τις πρώτες μέρες της θεραπείας εφόδου τα επίπεδα του BAFFR διατηρήθηκαν ή αυξήθηκαν στα εναπομείναντα λευχαιμικά κύτταρα των ασθενών, υποδεικνύοντας μία θετική επιλογή κι επιβίωση των BAFFR⁺ λεμφοβλαστών. Μάλιστα, έδειξαν ότι ο BAFF καταναλώνεται από τα λευχαιμικά κύτταρα στη διάγνωση, με τα επίπεδα αυτού να επιστρέφουν σε φυσιολογικές τιμές μετά την εξάλειψη των λεμφοβλαστών κατά τη θεραπεία εφόδου. Τα δεδομένα αυτά ενισχύουν περισσότερο την άποψη ότι η απρόσφορη έκφραση του BAFFR στους B-λεμφοβλάστες θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένας δείκτης ειδικός για την εκτίμηση της MRD, συμβάλλοντας στη διάκριση των B-λεμφοβλαστών από τα φυσιολογικά αιματογόνια μυελών σε ανάπλαση των ασθενών αυτών.¹⁴⁶

Στο πλαίσιο του νέου ρόλου του BAFF/BAFFR άξονα που αναδύθηκε στη παθογένεση της B-ΟΛΛ, διάφορες ερευνητικές ομάδες αποπειράθηκαν να στοχεύσουν είτε τον συνδέτη BAFF, είτε τον BAFFR με σκοπό να αναστείλλουν τις δράσεις τους. Έτσι, η ερευνητική ομάδα των Parameswaran και συν. χρησιμοποίησε μία χιμαιρική πρωτεΐνη, αποτελούμενη από μία ανασυνδυασμένη τοξίνη, την rGel (recombinant Gelolin) και το τμήμα του BAFF που προσδένεται στον υποδοχέα, με στόχο την είσοδο της τοξίνης στα κύτταρα που εκφράζουν υποδοχείς του BAFF, για την αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης και κατεπέκταση την επαγωγή της απόπτωσης των λευχαιμικών κυττάρων. Η δράση της rGel-BAFF φάνηκε να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική σε συνδυασμό με τη χρήση ενός μη τοξικού

παράγοντα κινητοποίησης των λεμφοβλαστών καθώς συνέβαλε στη μείωση του λευχαιμικού φορτίου στο μυελό των οστών και στην πλήρη εξάλειψη αυτών από την κυκλοφορία σε ένα *in vivo* σύστημα.¹⁴⁷ Σε μία άλλη προσέγγιση, χρησιμοποιήθηκε ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του BAFFR ικανό να επάγει μεσολαβούμενο από FcRγIII υποδοχείς, εξαρτώμενο από αντίσωμα, κυτταρικό θάνατο των Β-λεμφοβλαστών, με τη μεσολάβηση πληθυσμών κυττάρων όπως τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα και τα μακροφάγα.¹⁴⁸ Πρόσφατα ωστόσο, η ομάδα των Turazzi και συν. πρότεινε ότι η στόχευση του BAFFR με τη χρήση χιμαιρικών αντιγονικών υποδοχέων (Chimeric Antigen Receptors, CARs) θα μπορούσε να αποτελέσει μία δεύτερης γραμμής θεραπευτική προσέγγιση σε ασθενείς με Β-ΟΛΛ που εμφανίζουν CD19⁺ Β-λευχαιμικούς κλώνους κατά την υποτροπή της νόσου ή σε συνδυασμό με CD19-στοχευμένες θεραπείες.¹⁴⁹

Αν και τα μέχρι τώρα δεδομένα για την μεταγραφική και πρωτεϊνική έκφραση του BAFFR στους Β-λεμφοβλάστες φαίνεται να συμπίπτουν, ελάχιστα είναι γνωστά για τους μηχανισμούς που ρυθμίζουν την έκφρασή του στους Β-λεμφοβλάστες. Ωστόσο, φαίνεται ότι κυτταρικές σειρές ΟΛΛ των πρόδρομων Β-κυττάρων εκφράζουν τον υποδοχέα μέσω πρόωρης μεταγραφικής ενεργοποίησης του υποκινητή του *BAFFR* γονιδίου που μεσολαβείται από τον c-Rel μεταγραφικό παράγοντα, μέλος της οικογένειας των NF-κB, με τα επίπεδα έκφρασης του πυρηνικού c-Rel να σχετίζονται με τα επίπεδα του BAFFR. Παρόλα αυτά, η πολυπλοκότητα των δικτύων μεταγραφικών παραγόντων και οι επιγενετικοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί που μπορεί να δρουν στους νεοπλασματικούς λεμφοβλάστες επισημαίνουν την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση της ρύθμισης της απρόσφορης έκφρασης των μορίων αυτών στη Β-ΟΛΛ. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι οι μέχρι τώρα μελέτες κάνουν λόγο για ασθενείς με ΟΛΛ των πρόδρομων Β-κυττάρων χωρίς ιδιαίτερες αναφορές στους ανοσοφαινοτυπικούς υπότυπους και τα κλινικοεργαστηριακά ευρήματα των ασθενών.^{49,141,142,146} Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την ετερογένεια του νοσήματος περιπλέκει την κατανόηση της συμμετοχής του BAFF/APRIL συστήματος στην παθογένεση της Β-ΟΛΛ.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Οι περισσότερες μελέτες που διερεύνησαν τη συμμετοχή του BAFF/APRIL συστήματος στην παθογένεση της Β-ΟΛΛ δεν έλαβαν υπόψη τους υποτύπους της νόσου, με τα μέχρι τώρα αποτελέσματα να είναι αντιφατικά. Δεδομένου ότι η Β-ΟΛΛ αποτελεί μια ετερογενή νοσολογικά οντότητα σε διάφορα επίπεδα (ανοσοφαινότυπος, κυτταρογενετικές ανωμαλίες, απάντηση στη θεραπεία), διαφορετικοί μηχανισμοί μεσολαβούν πιθανότατα της απρόσφορης έκφρασης και λειτουργίας των μορίων του συστήματος αυτού στο νόσημα. Μάλιστα, η έκφραση των μορίων αυτών θα μπορούσε πιθανότατα να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση των νεοπλασματικών λεμφοβλαστών από τα φυσιολογικά προγονικά Β-κύτταρα, αποτελώντας ίσως κι έναν δείκτη για τον προσδιορισμό της MRD. Λαμβάνοντας υπόψη ότι αντι-BAFF ή αντι-BAFFR παράγοντες έχει προταθεί ότι θα μπορούσαν να έχουν θεραπευτική εφαρμογή στη Β-ΟΛΛ, καθίσταται αναγκαίος ο προσδιορισμός του προτύπου έκφρασης και λειτουργίας των μορίων του συστήματος ανάλογα με τον νοσολογικό υπότυπο της νόσου, προκειμένου να αποσαφηνιστεί αν θα μπορούσαν να αποτελούν μία καλή επιλογή για τη θεραπεία του νοσήματος.

Αρχικά, στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η μεταγραφική έκφραση των συνδετών BAFF, APRIL και των υποδοχέων τους, BAFFR, TACI & BCMA σε ασθενείς με Β-ΟΛΛ και σε φυσιολογικούς μάρτυρες, καθώς επίσης και σε ασθενείς που έπασχαν από μία λευχαιμία μη Β-αρχής (Τ-ΟΛΛ). Πέραν της σύγκρισης με τις ομάδες ελέγχου, αναζητήθηκαν συσχετίσεις της mRNA έκφρασης των μορίων του συστήματος αυτού με τα κλινικοεργαστηριακά δεδομένα των ασθενών (ανοσοφαινότυπος, κυτταρογενετικές ανωμαλίες, απάντηση στη θεραπεία). Κατόπιν, επεκτείναμε τη μελέτη της έκφρασης των υποδοχέων σε πρωτεϊνικό επίπεδο για ένα μέρος των ασθενών με Β-ΟΛΛ. Στη βάση των αποτελεσμάτων μας κι εστιαζόμενοι κυρίως στον BAFFR, που αποτέλεσε και τον κυριότερο υποδοχέα του συστήματος στους Β-λεμφοβλάστες, διερευνήσαμε πιθανούς μοριακούς μηχανισμούς που θα μπορούσαν να ρυθμίζουν την απρόσφορη έκφρασή του στη Β-ΟΛΛ ενώ ελέγξαμε και τη λειτουργικότητά του, αξιολογώντας την ενεργοποίηση της NF-κB2 οδού καθοδικά της αλληλεπίδρασης BAFF-BAFFR. Τέλος, αξιολογήσαμε την επίδραση του BAFF στην αυθόρμητη κι επαγόμενη από φάρμακα απόπτωση των Β-λεμφοβλαστών.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΑΡΤΥΡΕΣ

Το υλικό της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν δείγματα περιφερικού αίματος ή/και μυελού των οστών 71 ασθενών με ΟΛΛ. Συγκεκριμένα, στη μελέτη συμπεριλήφθησαν 59 παιδιατρικά περιστατικά με ΟΛΛ (αναλογία αρρένων/θηλέων: 36/23, διάμεση ηλικία: 5 έτη, εύρος: 0.8-14 έτη), τα οποία προήλθαν από το αρχείο του Εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας, καθώς επίσης και 12 ενήλικοι ασθενείς (αναλογία αρρένων/θηλέων: 5/7, διάμεση ηλικία: 50 έτη, εύρος: 20-77 έτη), οι οποίοι προσήλθαν κατά το χρονικό διάστημα Απρίλιος 2011 – Ιούλιος 2017 στην Αιματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Η πλειονότητα των ασθενών έπασχε από Β-ΟΛΛ (52 παιδιά και το σύνολο των ενήλικων ασθενών), ενώ 7 παιδιά έπασχαν από Τ-ΟΛΛ. Από τους ασθενείς με Β-ΟΛΛ, 2 έπασχαν από προ-προ-Β-ΟΛΛ, 39 από κοινή Β-ΟΛΛ και 23 από προ-Β-ΟΛΛ. Η διάγνωσή τους έγινε με βάση τα αναθεωρημένα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organisation, WHO) για την κατάταξη των μυελοειδών νεοπλασμάτων και των οξειών λευχαιμιών.^{101,102} Από το σύνολο των ασθενών με Β-ΟΛΛ, 4 ενήλικες επαναξιολογήθηκαν μετά τη θεραπεία εφόδου, κατά την φάση ενίσχυσης της θεραπείας ή κατά τη θεραπεία συντήρησης, έχοντας ενεργή νόσο. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν 3 ασθενείς που έλαβαν το hyper-CVAD χημειοθεραπευτικό σχήμα (ένας εκ των τριών, σε συνδυασμό με τον BCR-ABL αναστολέα dasatinib, όντας θετικός για τον συγκεκριμένο ανασυνδυασμό) κι ένας ασθενής που εμφάνισε ανθεκτική νόσο υπό θεραπεία με το GMALL (German Multicenter Study Group for Adult ALL) πρωτόκολλο.

Πλήρης κλινικοεργαστηριακός έλεγχος πραγματοποιήθηκε για τους περισσότερους ασθενείς με ΟΛΛ, όπου ελήφθησαν κλινικές πληροφορίες και μετρήθηκαν βασικές εργαστηριακές παράμετροι, συμπεριλαμβανομένων του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων ($\times 10^9/L$), της αιμοσφαιρίνης (mg/dL), του αριθμού των αιμοπεταλίων ($\times 10^9/L$), του ποσοστού (%) διήθησης του μυελού των οστών από λεμφοβλάστες, του ανοσοφαινοτύπου, του καρυότυπου, της αρχικής απάντησης στη θεραπεία (ταξινομημένη ως πλήρης ύφεση/μερική ύφεση/ανθεκτική νόσος), της πιθανής υποτροπής της νόσου και της επιβίωσης (σε μήνες). Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά και τα κλινικοεργαστηριακά δεδομένα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1**.

Ως ομάδες ελέγχου στο σύνολο των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μυελού των οστών ή περιφερικού αίματος από 20 άτομα (αναλογία αρρένων/θηλέων: 5/15, διάμεση ηλικία: 44.5 έτη, εύρος: 0.5-72 έτη). Συγκεκριμένα, συλλέχθηκε μυελός των οστών από 9 άτομα (2 παιδιά, 7 ενήλικες) για διαγνωστικούς σκοπούς (συμπεριλαμβανομένων 4 ατόμων με NHL σε πλήρη ύφεση που δεν

λάμβαναν θεραπεία, στο πλαίσιο παρακολούθησης της πορείας της νόσου), όπως επίσης και δείγματα περιφερικού αίματος από 11 υγιείς δότες χωρίς ιστορικό νεοπλασίας ή λήψης κάποιου χημειοθεραπευτικού παράγοντα για τουλάχιστον έξι μήνες πριν συμπεριληφθούν στη μελέτη. Να σημειωθεί ότι και οι ασθενείς με T-ΟΛΛ αποτέλεσαν επίσης ομάδα ελέγχου, ως μία λευχαιμική οντότητα μη Β-αρχής.

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη διακήρυξη του Ελσίνκι και τις μεταγενέστερες αναθεωρήσεις της, έχοντας λάβει έγκριση από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Έγγραφο ενυπόγραφο συγκατάθεση, προηγηθείσα της συλλογής του δείγματος, λήφθηκε από όλους τους ενήλικες συμμετέχοντες, όπως επίσης κι από τους γονείς των παιδιών που συμπεριλήφθησαν στη μελέτη.

Πίνακας 1. Δημογραφικά και κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών και των υγιών μαρτύρων που συμπεριλήφθησαν στη μελέτη.

	Σύνολο ΟΑΛ	T-ΟΑΛ	Σύνολο B-ΟΑΛ	B-ΟΑΛ παιδιών	B-ΟΑΛ ενηλίκων	Υγιείς μάρτυρες
Αρ. δειγμάτων	71	7	64	52	12	20
Φύλο (Α/Θ)^α	41/30	4/3	37/27	32/20	5/7	5/15
Ηλικία (έτη)	6.0	7.0	6.0	4.4	50.0	44.5
ΔΤ^β (εύρος)	(0.8-77.0)	(3.0-13.5)	(0.8-77.0)	(0.8-14.0)	(20.0-77.0)	(0.5-72)
Υπότυποι της ΟΑΛ						
B-αρχής, αρ.(%)	64 (90.1)					
προ-προ-B (pro-B), αρ.(%)	2 (2.8)		2 (3.1)	1 (1.9)	1 (8.3)	
κοινή (common B), αρ.(%)	39 (54.9)		39 (60.9)	35 (67.3)	4 (33.3)	
προ-B (pre-B), αρ.(%)	23 (32.4)		23 (35.9)	16 (30.8)	7 (58.3)	
T-αρχής, αρ.(%)	7 (9.9)					
φλοιός θύμου (cortical T), αρ.(%)	3 (4.2)	3 (42.9)				
υποφλοιός (pre-T), αρ.(%)	2 (2.8)	2 (28.6)				
μυελός θύμου (mature T), αρ.(%)	2 (2.8)	2 (28.6)				
Λευκά αιμοσφαίρια (x10⁹/L)	14.1	164.1	11.9	10.3	20.5	
ΔΤ (εύρος)	(0.3-547.3)	(10.1-547.3)	(0.3-108.3)	(0.3-108.3)	(2.0-80.0)	
Αιμοσφαιρίνη (mg/dL)	9.0	9.8	8.8	8.4	10.8	
ΔΤ (εύρος)	(3.0-14.5)	(8.1-12.7)	(3.0-14.5)	(3.0-13.4)	(4.3-14.5)	
Αιμοπετάλια (x10⁹/L)	80.0	85.0	79.0	75.0	92.0	
ΔΤ (εύρος)	(9.0-952.0)	(20.0-316.0)	(9.0-952.0)	(9.0-952.0)	(10.0-380.0)	
Διήθηση μυελού, %*	73.5	77.0	72.7	71.0	86.9	
ΔΤ (εύρος)	(16.0-98.0)	(68.0-94.0)	(16.0-98.0)	(16.0-98.0)	(50.0-95.0)	
Ανοσοφαινοτυπική Ανάλυση (απρόσφορη έκφραση)						
CD13/33, αρ.(%)		0 (0.0)	8 (12.5)	5 (9.6)	3 (25.0)	
Δεικτών της T-σειράς, αρ.(%)			0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Δεικτών της B-σειράς, αρ.(%)		1 (14.3)				
Καρύοτυπος*						
Υπερδιπλοειδία, αρ.(%)	2 (4.3)	0 (0.0)	2 (4.7)	2 (6.5)	0 (0.0)	
Υψηλή υπερδιπλοειδία, αρ.(%)	8 (17.0)	0 (0.0)	8 (18.6)	8 (25.8)	0 (0.0)	
Υποδιπλοειδία, αρ. (%)	1 (2.1)	0 (0.0)	1 (2.3)	1 (3.2)	0 (0.0)	
Φυσιολογικός καρύοτυπος, αρ.(%)	18 (38.3)	0 (0.0)	18 (41.9)	12 (38.7)	5 (41.7)	
Άλλες χρωμοσωμικές ανωμαλίες, αρ.(%)	21 (44.7)	4 (100.0)	17 (16.3)	11 (35.5)	7 (58.3)	
Ανασυνδυασμοί*						
E2A-PBX1, αρ.(%)	7 (10)	0 (0.0)	7 (11.1)	5 (9.6)	2 (18.2)	
TEL-AML1, αρ.(%)	18 (25.7)	0 (0.0)	18 (28.6)	18 (34.6)	0 (0.0)	
BCR-ABL, αρ.(%)	5 (7.1)	0 (0.0)	5 (7.9)	2 (3.8)	3 (27.3)	
Αρχική απάντηση στη θεραπεία, αρ.(%)*						
Πλήρης ύφεση, αρ.(%)	64 (92.8)	7 (100)	57 (91.9)	50 (98.0)	7 (63.6)	
Μερική ύφεση, αρ.(%)	2 (2.9)	0 (0.0)	2 (3.2)	1 (2.0)	1 (9.1)	
Ανθεκτική νόσος, αρ.(%)	3 (4.3)	0 (0.0)	3 (4.8)	0 (0.0)	3 (27.3)	
Υποτροπή, αρ.(%)*	7 (10.6)	0 (0.0)	7 (11.9)	5 (9.8)	2 (25.0)	
Θάνατος, αρ.(%)	12 (17.1)	1 (14.3)	11 (17.5)	5 (9.8)	6 (50.0)	
Επιβίωση (σε μήνες)	89.0	96.0	87.0	93.0	10.0	
ΔΤ (εύρος)	(1.0-201.0)	(2.0-193.0)	(1.0-201.0)	(3.0-201.0)	(1.0-45.0)	

^αA: Άρρενες, Θ: Θήλειες, ^βΔΤ: διάμεση τιμή.

*Μη διαθέσιμα δεδομένα: 20 περιστατικά για τη διήθηση του μυελού των οστών, 24 για τον καρύοτυπο, 1 για τους ανασυνδυασμούς, 2 για την αρχική απάντηση στη θεραπεία και την υποτροπή και 1 για την επιβίωση

1.1. Κυτταρικές σειρές

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν σε *in vitro* δοκιμές 2 κυτταρικές σειρές ΟΛΛ: η κυτταρική σειρά προ-B-ΟΛΛ 697 (ευγενική χορηγία της Dr. I. Airoidi, G. Gaslini Institute, Γένοβα, Ιταλία) και η Jurkat T-ΟΛΛ κυτταρική σειρά. Τα 697 κύτταρα προέρχονται από Β-λεμφοβλάστες ασθενούς με Β-ΟΛΛ σε υποτροπή. Τα κύτταρα αυτά αναπτύσσονται σε εναιώρηση στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο, είτε ως μονήρη είτε σε ομάδες. Ανοσοφαινοτυπικά, εκφράζουν επιφανειακά τους δείκτες CD19, CD10, CD38, HLA-DR και κυταροπλασματικά τη μ βαριά άλυσσο του BCR, ενώ δεν εκφράζουν τις ελαφρές αλύσους, γεγονός που τα κατατάσσει ως προ-B λεμφοβλάστες. Τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν τον 46(45-48)<2n>XY, t(1;19)(q23;p13), del(6)(q21) καρυότυπο, με χαρακτηριστικό το γεγονός ότι φέρουν τον E2A-PBX1 ανασυνδυασμό.

Τα Jurkat κύτταρα προέρχονται από Τ-λεμφοβλάστες ασθενούς με Τ-ΟΛΛ στην πρώτη υποτροπή και όπως και τα 697 κύτταρα, είναι αιωρούμενα στην καλλιέργεια. Εκφράζουν τους επιφανειακούς δείκτες CD2, CD3, CD5, CD6, CD7 και TCRα/β κι εμφανίζουν σύνθετο καρυότυπο [87(78-91)<4n>XX, -Y, -Y, -5, -16, -17, -22, add(2)(p21)/del(2)(p23)x2 – κι επιπρόσθετα der(5)t(5;10)(q11;p15), del(9)(p11)]. Οι παραπάνω κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες παρουσία θρεπτικού μέσου που περιλάμβανε IMDM, εμπλουτισμένο με 10% θερμικά αδρανοποιημένο FBS και 1x διάλυμα PSG. Οι φλάσκες τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο (37°C, 5% CO₂), υπό άσηπτες συνθήκες.

2. ΥΛΙΚΑ

α) Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις μοριακές αναλύσεις περιγράφονται στον **Πίνακα 2**. Οι αλληλουχίες των εκκινητών και οι συνθήκες των PCR αντιδράσεων των υπό μελέτη γονιδίων αναφέρονται στον **Πίνακα 3**.

β) Το σύνολο των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση των κυτταρομετρικών αναλύσεων & του μαγνητικού διαχωρισμού περιγράφονται στον **Πίνακα 4**, ενώ για την ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης και την ανοσοαποτύπωση κατά Western στον **Πίνακα 5**.

γ) Για τη διεκπεραίωση του συνόλου των πειραματικών διεργασιών της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε πληθώρα αντιδραστηρίων, τα χαρακτηριστικά των οποίων αναγράφονται στον **Πίνακα 6**.

δ) Τα αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη περιγράφονται στον **Πίνακα 7**.

Πίνακας 2. Αντιδραστήρια μοριακών αναλύσεων.

Αντιδραστήριο	Όνομα προϊόντος	Αρ. Καταλόγου	Προέλευση
Αγαρόζη	UltraPure Agarose	16500-500	Invitrogen, USA
Αναστολέας RNασών	RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor	10777-019	Invitrogen, USA
Αντίστροφη μεταγραφή	M-MLV Reverse Transcriptase	28025-021	Invitrogen, USA
Απόλυτη αιθανόλη	Ethanol Absolute 99.8+%, Certified AR for Analysis	E/0650DF/C17	Fischer Scientific, USA
Αποστειρωμένο νερό	Water for injection	-	DEMO S.A., Greece
Βρωμιούχο αιθίδιο	Ethidium Bromide solution 1 %	A1152,0100	Appllichem, Spain
Δεοξυριβονουκλεοτίδια	dNTPs Set (100 mM)	10297-117	Invitrogen, USA
Διάλυμα TBE	UltraPure TBE Buffer, 10X	15581-044	Gibco, USA
Διάλυμα διαχωρισμού	Robosep buffer	20104	STEMCELL Technologies, USA
Διάλυμα προστασίας από RNάσες	RNaseZap RNase Decontamination Solution	AM9780	Ambion, USA
Ισοπροπανόλη	2-Propanol, analytical grade, ACS	ALO323	Scharlau, Spain
Μάρτυρας DNA	DNA Marker 100bp PLUS BLUE	304-105	GeneOn, Japan
Νερό ελεύθερο DNασών/RNασών	UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water	10977-015	Gibco, USA
Περιοριστική ενδονουκλεάση EagI	EagI restriction enzyme	R0505L	New England Biolabs, USA

Πίνακας 2 (συνέχεια)

Αντιδραστήριο	Όνομα προϊόντος	Αρ. Καταλόγου	Προέλευση
Περιοριστική ενδονουκλεάση MscI	MscI restriction enzyme	R0534S	New England Biolabs, USA
Τυχαία εξανουκλεοτίδια	PRIMER RANDOM p(dN) ₆	11034731001	Roche, Switzerland
Χλωροφόρμιο	Acid-Phenol:Chloroform, pH 4.5	AM9720	Ambion, USA
Kit αλληλούχισης	BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit	4337456	Applied Biosystems, USA
Kit απομόνωσης DNA	PureLink Genomic DNA Mini Kit	K1820-01	Invitrogen, USA
Kit απομόνωσης και καθαρισμού υλικού από γέλη	PureLink Quick Gel Extraction Kit	K210012	Invitrogen, USA
Kit καθαρισμού προϊόντων PCR	PureLink PCR Purification Kit	K310002	Invitrogen, USA
SYBR Green I	PLATINUM SYBR GREEN qPCR supermix-UDG	11733-046	Invitrogen, USA
Ταq πολυμεράση	DFS-Taq DNA polymerase	101005	Bioron, Germany
Ταq πολυμεράση για την ενίσχυση πολύπλοκων υποστρωμάτων	MyTaq DNA Polymerase	BIO-21105	Bioline, UK
TRIZOL	TRIsure	BIO-38033	Bioline, UK

Πίνακας 3. Εκκινητές και συνθήκες των PCR αντιδράσεων.

Real-Time qRT-PCR		
Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή	Συνθήκες PCR
<i>BAFFR</i>	Πρόσθιος: 5'-GAGACAAGGACGCCCCAGA-3' Ανάστροφος: 5'-GGTCACCAGTTCAGTGGAGC-3'	50°C για 2 min, 95°C για 2 min, 40 κύκλοι με 95°C για 15 sec, 60°C για 15 sec και 72°C για 45 sec
<i>TACI</i>	Πρόσθιος: 5'-TCTGCCTGTGTGCCGTCCTC-3' Ανάστροφος: 5'-CGGCTTCCATCGCGTGAT-3'	50°C για 2 min, 95°C για 2 min, 40 κύκλοι με 95°C για 15 sec και 64°C για 60 sec
<i>B2M</i>	Εμπορικά διαθέσιμοι από SAbiosciences (αρ. καταλόγου PPH01094E)	50°C για 2 min, 95°C για 2 min, 40 κύκλοι με 95°C για 15 sec και 60°C για 60 sec
Συμβατική ημι-ποσοτική RT-PCR		
Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή	Συνθήκες PCR
<i>BCMA</i>	Πρόσθιος: 5'-TTGGGACTGAGCTTAATAAT-3' Ανάστροφος: 5'-CGGAAGAATAATTCATCAC-3'	94°C για 2 min, 30 κύκλοι με 94°C για 30 sec, 55°C για 30 sec και 72°C για 30 sec, και τελική επιμήκυνση 72°C για 5 min
<i>BAFF & ΔBAFF</i>	Πρόσθιος: 5'-GAGTCTCCCGGAGCAGAGTT-3' Ανάστροφος: 5'-GCAGGAATTATTGGGTAGTGT-3'	94°C για 2 min, 30 κύκλοι με 94°C για 30 sec, 52°C για 30 sec και 72°C για 30 sec, και τελική επιμήκυνση 72°C για 5 min
<i>APRIL</i>	Πρόσθιος: 5'-GAGTCTCCCGGAGCAGAGTT-3' Ανάστροφος: 5'-CTTGGAGGTGGCGTTAATGG-3'	94°C για 2 min, 30 κύκλοι με 94°C για 30 sec, 55°C για 30 sec και 72°C για 30 sec, και τελική επιμήκυνση 72°C για 5 min
<i>B2M</i>	Πρόσθιος: 5'-CTATCCAGCGTACTCCAAAG-3' Ανάστροφος: 5'-GAAAGACCAGTCCTTGCTGA-3'	94°C για 2 min, 24 κύκλοι με 94°C για 30 sec, 53°C για 30 sec και 72°C για 30 sec, και τελική επιμήκυνση 72°C για 5 min
Multiplex RT-PCR		
Αλληλουχία εκκινητή		
1^η αντίδραση: 95°C για 2 min, 30 κύκλοι με 95°C για 30 sec, 58°C για 30 sec και 72°C για 60 sec, και τελική επιμήκυνση 72°C για 5 min		
Ανασυνδυασμός		
<i>E2A-PBX1</i>	PBX1:459L18: 5'-GCCACGCCTTCCGCTAAC-3' E2A:1075U21: 5'-TTCTCGTCCAGCCCTTCTACC-3'	
<i>TEL-AML1</i>	TEL:871U23: 5'-CACTCCGTGGATTTCAAACAGTC-3' AML1:1891L23: 5'-AGCCGAGTAGTTTTTCATCATTGC-3'	
<i>BCR-ABL p190</i> <i>BCR-ABL p210</i>	BCR:1698U19: 5'-CGCTCTCCCTCGCAGAACT-3' BCR:3060U23: 5'-GAGTCACTGCTGCTGCTTATGTC-3' ABL:661L20: 5'-TTTTGGTTTGGGCTTCACAC-3'	
2^{ος} γύρος αντιδράσεων (κοινές συνθήκες με την 1^η αντίδραση)		
<i>E2A-PBX1</i>	PBX1:436L21: 5'-CATGTTGTCCAGCCGCATCAG-3' E2A:1173U19: 5'-CTACGACGGGGTCTCCAC-3'	
<i>TEL-AML1</i>	TEL:944U23: 5'-CTCATCGGGAAGACCTGGCTTAC-3' AML1:1772L21: 5'-AGCACGGAGCAGAGGAAGTTG-3'	
<i>BCR-ABL p190</i>	BCR:1777U19: 5'-ACTGCCCCGTTGTCGTGTC-3' ABL:642L23: 5'-ACACCATCCCCATTGTGATTAT-3'	
<i>BCR-ABL p210</i>	BCR:3128U22: 5'-CACGTTCTGATCTCTCTGAC-3' ABL:642L23: 5'-ACACCATCCCCATTGTGATTAT-3'	
Συμβατική PCR για το <i>TNFRSF13C/BAFFR</i> γονίδιο		
Περιοχή	Αλληλουχία εκκινητή	Συνθήκες PCR
<i>Εξόνιο 1</i>	Πρόσθιος: 5'-AGCCTCAGTCCCCGCAGCT-3' Ανάστροφος: 5'-GTTCTCCCCGCAGCTGCCG-3'	94°C για 2 min, 35 κύκλοι με 94°C για 30 sec, 60°C για 30 sec και 72°C για 30 sec, και τελική επιμήκυνση 72°C για 5 min
<i>Εξόνιο 3</i>	Πρόσθιος: 5'-CCTCCAGAGGAGTCTTCTAG-3' Ανάστροφος: 5'-TCCAAGCCCCCTGGCTGGG-3'	94°C για 2 min, 30 κύκλοι με 94°C για 30 sec, 52°C για 30 sec και 72°C για 30 sec, και τελική επιμήκυνση 72°C για 5 min

Πίνακας 3 (συνέχεια)

Real-Time PCR για τα DNA υποστρώματα των CHIP δοκιμών		
Περιοχή	Αλληλουχία εκκινητή	Συνθήκες PCR
BAFFR	Υποκινητής Πρόσθιος: 5'-GGCGCTATCTCGGCTCA-3' Ανάστροφος: 5'-GCGCCTACAATCTCAGCTAC-3'	95°C για 10 min, 40 κύκλοι με 95°C για 20 sec, 68°C για 30 sec
	2 ^ο ιντρώνιο Πρόσθιος: 5'-GGGCAGGGAGTTGGGG-3' Ανάστροφος: 5'-TTGGGAGTCTAACGGAGCTT-3'	50°C για 2 min, 95°C για 2 min, 40 κύκλοι με 95°C για 15 sec, 55°C για 15 sec και 68°C για 30 sec
	3'UTR Πρόσθιος: 5'-AAATGGCATCTTAGGTTCTG-3' Ανάστροφος: 5'-GCTTGCTTTGGGATTTAGT-3'	50°C για 2 min, 95°C για 2 min, 40 κύκλοι με 95°C για 15 sec, 56°C για 15 sec και 68°C για 30 sec
Περιοχή-μάρτυρας	Πρόσθιος: 5'-CCCATGAAGACCCAGGCAAG-3' Ανάστροφος: 5'-GGCGAGTCCAGAGCAGTGTG-3'	50°C για 2 min, 95°C για 2 min, 40 κύκλοι με 95°C για 30 sec, 61°C για 30 sec και 72°C για 30 sec

Πίνακας 4 . Αντισώματα κυτταρομετρίας ροής και μαγνητικού διαχωρισμού.

Αντιγόνο	Φθοριόχρωμα	Κλώνος	Ισότυπος	Αρ. Καταλόγου	Προέλευση
CD2	FITC	39C1.5	Rat IgG2a	A07743	Beckman Coulter, USA
CD3	FITC PE	UCHT1	Mouse IgG1, κ	IM1281U A07747	Beckman Coulter, USA
CD4	FITC	13B8.2	Mouse IgG1, κ	A07750	Beckman Coulter, USA
CD7	FITC	8H8.1	Mouse IgG2a	IM0585U	Beckman Coulter, USA
CD8	FITC	B9.11	Mouse IgG1, κ	A07756	Beckman Coulter, USA
CD9	FITC	M-L13	Mouse IgG1, κ	555371	BD Biosciencics, USA
CD10	PE	ALB1	Mouse IgG1, κ	A07760	Beckman Coulter, USA
CD13	RD1	366	Mouse IgG1	6602989	Beckman Coulter, USA
CD14	PE FITC	RMO52	Mouse IgG2a	A07764 IM0645U	Beckman Coulter, USA
CD16	FITC	3G8	Mouse IgG1, κ	IM0814	Beckman Coulter, USA
CD19	PE PE-Cy7 FITC PE-Cy5 ECD	J3-119	Mouse IgG1, κ	A07769 IM3628 A07768 A07771 A07770	Beckman Coulter, USA,
CD20	FITC	B9E9	Mouse IgG2a	A07772	Beckman Coulter, USA
CD33	FITC	D3HL60.251	Mouse IgG1, κ	IM1135U	Beckman Coulter, USA
CD34	FITC	581	Mouse IgG1, κ	IM1870	Beckman Coulter, USA
CD36	FITC	FA6.152	Mouse IgG1, κ	IM0766U	Beckman Coulter, USA
CD38	FITC	T16	Mouse IgG1, κ	A07778	Beckman Coulter, USA
CD43	FITC	DFT1	Mouse IgG1, κ	IM3264U	Beckman Coulter, USA
CD45	PE-Cy5	J33	Mouse IgG1, κ	A07785	Beckman Coulter, USA
CD79α	PE	HM47	Mouse IgG1, κ	IM2221	Beckman Coulter, USA
HLADR	PE	Immu357	Mouse IgG1, κ	IM1639	Beckman Coulter, USA
Kappa Light Chains/ Lamda Light Chains	FITC/PE	Polyclonal	Rabbit F(ab') ₂	FR481	Dako, USA

Πίνακας 4 (συνέχεια)

Αντιγόνο	Φθοριόχρωμα	Κλώνος	Ισότυπος	Αρ. Καταλόγου	Προέλευση
CD268 (BAFFR)	PE	11C1	Mouse IgG1, κ	316906	Biolegend, USA
CD268 (BAFFR)	ATTO 488	HuBR9.1	Mouse IgG1	AG-20B-0016TD-T100	Adipogen, Switzerland
CD267 (TAC1)	PE	1A1	Rat IgG2a, κ	311906	Biolegend, USA
CD269 (BCMA)	PE	19F2	Mouse IgG2a, κ	357504	Biolegend, USA
Myeloperoxidase	FITC	CLB-MPO-1	Mouse IgG1, κ	IM1874	Beckman Coulter, USA
TDT (pool)	FITC	HT1, HT4, HT8, HT9	Mouse IgG1, IgG2a	IM3524	Beckman Coulter, USA
Lysozyme	FITC	LZ-2	Mouse IgG1	GIC207	Invitrogen, USA
IgM	FITC	Polyclonal	Rabbit F(ab') ₂	F0317	Dako, USA
7-AAD	Viability Dye	-	-	A07704	Beckman Coulter, USA
Annexin V FITC / 7-AAD apoptosis kit	-	-	-	IM3614	Beckman Coulter, USA

Ισοτυπικά αντισώματα

Αντιγόνο	Φθοριόχρωμα	Κλώνος	Ισότυπος	Αρ. Καταλόγου	Προέλευση
Control Reagent F(ab') ₂ (για τα KAPPA FITC και IgM FITC)	FITC	-	Rabbit	X0929	Dako, USA
Control Reagent F(ab') ₂ (για το LAMDA PE)	PE	-	Rabbit	X0930	Dako, USA
IgG2a ισοτυπικό αντίσωμα (για το TAC1)	PE	eBR2a	Rat	12-4321-83	eBioscience, USA
IgG2a ισοτυπικό αντίσωμα (για το BCMA)	PE	eBM2a	Mouse	12-4729-73	eBioscience, USA
IgG1 ισοτυπικό αντίσωμα (για το BAFFR ATTO 488)	ATTO 488	15H6	Mouse IgG1	AG-35B-0003TD-C050	Adipogen, Switzerland
IgG1 ισοτυπικό αντίσωμα (για το BAFFR PE)	PE	MOPC-21	Mouse IgG1, κ	400112	Biolegend, USA
IgG1 ισοτυπικό αντίσωμα	FITC	679.1Mc7	Mouse IgG1	A07795	Beckman Coulter, USA
IgG1 ισοτυπικό αντίσωμα	PE	679.1Mc7	Mouse IgG1	A07796	Beckman Coulter, USA

Πίνακας 5. Αντισώματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης και ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Αντιγόνο	Κλώνος	Ισότυπος	Αρ. Καταλόγου	Προέλευση
<i>Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης</i>				
Purified Anti-Human E2A-Pbx1	G289-1	Mouse IgG1, κ	556021	BD Biosciencies, USA
Purified Mouse IgG1 κ Isotype Control	MOPC-21	Mouse IgG1, κ	555746	BD Biosciencies, USA
<i>Ανοσοαποτύπωση κατά Western</i>				
NF-κB2 (p100/p52)	-	Mouse IgG2a	05-361	Millipore, USA
BAFFR	-	Polyclonal goat IgG	AF1162	R&D Systems, USA
BAFFR CT	-	Polyclonal rabbit IgG	ADI-905-305-100	Enzo Life Sciencies, USA
IκBα	H-4	Mouse IgG1, κ	sc-1643	Santa Cruz Biotechnology, USA
Tubulin	EPR1333	Rabbit	Ab108629	Abcam, USA
Actin	C-11	Polyclonal goat IgG	sc-1615	Santa Cruz Biotechnology, USA

Πίνακας 6. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και χαρακτηριστικά αυτών.

Αντιδραστήριο	Όνομα προϊόντος	Αρ. Καταλόγου	Προέλευση
100X διάλυμα πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης-L-γλουταμίνης	100X PSG (Penicillin-Streptomycin-Glutamine)	10378-016	Gibco, USA
EDTA	UltraPure 0.5M EDTA, pH 8.0	15575-038	Gibco, USA
Kit ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης	EZ-CHIP KIT	9E+11	Millipore, USA
Kit για την ανίχνευση σήματος στην ανοσοαποτύπωση κατά Western	SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate	34577	Invitrogen, USA
Kit μονιμοποίησης και διαπερατοποίησης κυττάρων	FIX & PERM Cell Permeabilization Kit	GAS003	Invitrogen, USA
Αναστολείς πρωτεασών	cOmplete, Mini Protease Inhibitor Cocktail	11836153001	Roche, Switzerland
Αρασιτίνη	Aracytin	-	Pfizer, USA
Δεξαμεθαζόνη	Dexamethasone	-	Vianex, Greece
Διάλυμα PBS	PBS (10X), pH 7.2	70013-065	Gibco, USA
Διάλυμα λύσης ερυθροκυττάρων	VersaLyse Lysing Solution	A09777	Beckman Coulter, USA
Διάλυμα παρεμπόδισης μη ειδικής σύνδεσης	Negative control rabbit immunoglobulin fraction	X0903	Dako, USA
Διμεθυλσουλφοξείδιο	Dimethyl sulfoxide (DMSO)	D5879	Sigma Aldrich
Εμβρυϊκός βόειος ορός	Fetal Bovine Serum	10270-106	Gibco, USA
Θρεπτικό μέσο	Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	21980-065	Gibco, USA

Πίνακας 6 (συνέχεια)

Αντιδραστήριο	Όνομα προϊόντος	Αρ. Καταλόγου	Προέλευση
Κιτ μαγνητικού διαχωρισμού FITC	EasySep Human FITC Positive Selection Kit	18552R	STEMCELL Technologies, USA
Κιτ μαγνητικού διαχωρισμού PE	EasySep Human PE Positive Selection Kit	18551R	STEMCELL Technologies, USA
Κυτταροκίνη APRIL	Recombinant Human APRIL/TNFSF13	884-AP	R&D Systems, USA
Κυτταροκίνη BAFF (3-μερές)	Recombinant Human BAFF/BLyS/TNFSF13B Protein	2149-BF/CF	R&D Systems, USA
Κυτταροκίνη BAFF (60-μερές)	BAFF, Soluble (human) (60-mer) (rec.) (highly active)	AG-40B-0112-C010	Adipogen, Switzerland
Μεθυλπρεδνιζολόνη	Methylprednisolone	-	Vianex, Greece
Πρεδνιζολόνη	Prednisolone	-	Takeda, Japan
Προεγχρωσμένος δείκτης πρότυπων μοριακών βαρών	Precision Plus Protein Dual Color Standards	1610374	Biorad, USA
Υδροκορτιζόνη	Hydrocortisone	-	Vianex, Greece
Φυκόλη	Biocoll separating solution 1.077 g/mL	L6115	Merck, USA
Φυσιολογικός ορός αρουραίου	Normal Rat Serum Control	24-5555-9	eBioscience, USA
Φυσιολογικός ορός ποντικού	Mouse serum (normal)	X0910	Dako, USA
Χρωστική για τη μέτρηση κυττάρων σε πλάκα Neubauer	Trypan blue solution, 0.4%	15250-061	Gibco, USA

Πίνακας 7. Αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και χαρακτηριστικά αυτών.

Αναλώσιμα	Όνομα προϊόντος	Αρ.Καταλόγου	Προέλευση
Βαθμονομημένη πιπέτα 2 mL	2 mL pipette, sterile	160210	Bioline, Israel
Βαθμονομημένη πιπέτα 5 mL	5 mL pipette, sterile	160510	Bioline, Israel
Βαθμονομημένη πιπέτα 10 mL	10 mL pipette, sterile	161010	Bioline, Israel
Βαθμονομημένη πιπέτα 25 mL	25 mL pipette, sterile	162510	Bioline, Israel
Κυβέτες φωτομέτρου	Eppendorf Uvette 220-1600 nm	30106300	Eppendorf, Germany
Μπουκάλι 125 mL	Sterile squared Media Bottle 125 mL	2019-0125	Nalgene,Denmark
Μπουκάλι 250 mL	250 mL Storage bottles	430281	Corning, USA
Μπουκάλι 500 mL	500 mL Storage bottles	430282	Corning, USA
Μπουκάλι 1000 mL	1L Storage bottles	430518	Corning, USA
Πιάτο καλλιέργειας M24	24 well Cell Culture Cluster, flat bottom plates	3524	Corning, USA
Πιάτο καλλιέργειας M48	48 well Cell Culture Cluster, flat bottom	3548	Corning, USA

Πίνακας 7 (συνέχεια)

Αναλώσιμα	Όνομα προϊόντος	Αρ.Καταλόγου	Προέλευση
Πιάτο καλλιέργειας U96	96 well Cell Culture Cluster, round bottom	3799	Corning, USA
Πλάκα μέτρησης Neubauer	Counting chamber Neubauer	3390054	Fischer Scientific, USA
Ρύγχι Robosep	Robosep tip racks	3520105	STEMCELL Technologies, USA
Ρύγχι πιπέτας 10 µL	10 µL sterilised long tips	DL10ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχι πιπέτας 30 µL, με φίλτρο	30 µL sterilised filter tips	DF30ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχι πιπέτας 100 µL, με φίλτρο	100 µL sterilised filter tips	DF100ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχι πιπέτας 200 µL, με φίλτρο	200 µL sterilised filter tips	DF200ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχι πιπέτας 200 µL, μη αποστειρωμένα	200 µL pipette tips, non-sterile	28063	FL Medical
Ρύγχι πιπέτας 1000 µL	1000 µL sterilised filter tips	DF1000ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχι πιπέτας 1000 µL, μη αποστειρωμένα	1000 µL pipette tips, non-sterile	28053	FL Medical
Σύριγγα 21G	2.5 ml syringe	-	-
Σύστημα φιλτραρίσματος διαλυμάτων 250 mL	250 mL Filter System	430767	Corning, USA
Σύστημα φιλτραρίσματος διαλυμάτων 500 mL	500 mL Filter System	430769	Corning, USA
Σωληνάρια γενικής αίματος	VACUETTE® EDTA tubes	454087	Vacurette, USA
Σωληνάρια κυτταρομετρίας	RIA σωληνάρια 12 x 72 mm, 5ml	-	-
Σωληνάρια πολυστυρενίου 14 mL	Falcon® 14mL Round Bottom Polystyrene Test Tube	352057	BD Biosciences, USA
Φιαλίδια Real-time PCR	Qiagen Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	981103	Qiagen, USA
Φιαλίδιο PCR	PCR tubes, Flat cap, sterile	683201	GREINER BIO-ONE, USA
Φιαλίδιο φυγοκέντρησης 1,5 mL	Rnase- Dnase free, 1,5 mL microfuge tubes	AM12400	Ambion, USA
Φιαλίδιο φυγοκέντρησης 15 mL	15 mL centrifuge tubes- sterile,	430791	Corning, USA
Φιαλίδιο φυγοκέντρησης 50 mL	50 mL centrifuge tubes- sterile,	430291	Corning, USA
Φιαλίδιο ψύξης 2 mL	2 mL self-standing Cryogenic Vials, round bottom, sterile	431386	Corning, USA
Φλάσκες καλλιέργειας	75 cm ² cell culture flask	430641	Corning, USA

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ

3.1. Απομόνωση-διατήρηση-απόψυξη μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος ή μυελικού εναιωρήματος

Η απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων πραγματοποιείται μέσω φυγοκέντρησης διαβαθμισμένης πυκνότητας με τη χρήση ισότονου διαλύματος που περιέχει έναν υψηλού μοριακού βάρους υδρόφιλο πολυσακχαρίτη (φυκόλη). Η φυκόλη εμφανίζει πυκνότητα μεγαλύτερη αυτής των λεμφοκυττάρων, μονοκυττάρων και αιμοπεταλίων αλλά μικρότερη αυτής των κοκκιοκυττάρων και των ερυθροκυττάρων επιτρέποντας τον επιτυχή διαχωρισμό αυτών των κυτταρικών πληθυσμών. Για το σκοπό αυτό, περιφερικό αίμα ή μυελικό εναιώρημα με αντιπηκτικό (K3-EDTA) αραιώθηκαν αρχικά με ρυθμιστικό διάλυμα 1X PBS, ακολούθησε αργή επιστοίβαξη του υλικού σε ίσο όγκο διαλύματος φυκόλης πυκνότητας 1.077 g/mL και το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 30 min στα 400xg, σε RT. Η φυγοκέντρηση αυτή επιτρέπει στα μονοπύρηννα κύτταρα να διαχωριστούν από τους υπόλοιπους κυτταρικούς πληθυσμούς και να συσσωρευτούν στην επιφάνεια της φυκόλης, καθώς τα ερυθροκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα διαπερνούν το στρώμα αυτής λόγω μεγαλύτερης πυκνότητας και συσσωρεύονται στον πάτο, ενώ τα αιμοπετάλια βρίσκονται διαλυμένα στο πλάσμα, πάνω από τη στιβάδα των μονοπύρηνων κυττάρων. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, τα μονοπύρηννα κύτταρα συλλέχθηκαν με μία πιπέτα και μεταφέρθηκαν σε ένα νέο σωληνάριο φυγοκέντρησης, όπου πραγματοποιήθηκε πλύση με τη χρήση 1X PBS διαλύματος για 10 min στα 250xg για την απομάκρυνση των αιμοπεταλίων και της περίσσειας φυκόλης. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης αφαιρέθηκε κι έγινε επανασύσταση των κυττάρων σε κατάλληλη ποσότητα 1X PBS διαλύματος. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των κυττάρων σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer με τη βοήθεια της χρωστικής Trypan blue.

Για την πραγματοποίηση των μοριακών αναλύσεων, μέρος των κυττάρων μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια erpendorf ($\sim 5 \times 10^6$ κύτταρα/φιαλίδιο) και ακολούθησε πλύση σε μικροφυγόκεντρο για 5 min στις 3000 rpm. Κατόπιν, αφαιρέθηκε πλήρως το υπερκείμενο και το ίζημα των κυττάρων αποθηκεύθηκε σε κατάψυξη -80°C , μέχρι τη χρήση τους. Η συλλογή μονοπύρηνων κυττάρων για τις μοριακές δοκιμές κατέστη δυνατή για 70 από τους 71 ασθενείς με ΟΛΛ.

Για την φύλαξη των ζωντανών κυττάρων με σκοπό να διατηρηθούν μέχρι την ημέρα επεξεργασίας τους, τα απομονωμένα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 8 min στις 1200 rpm (4°C) και ακολούθησε επαναδιάλυση του ιζήματος σε θρεπτικό μέσο κρυσυντήρησης που

περιείχε 50% θερμικά αδραντοποιημένο FBS, 40% IMDM (εμπλουτισμένο με 1% διάλυμα PSG) και 10% DMSO, σε αναλογία 10-20x10⁶ κύτταρα/φιαλίδιο/mL διαλύματος κρυσυντήρησης. Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε ειδικό δοχείο με ισοπροπανόλη που επιτρέπει την σταδιακή ελάττωση της θερμοκρασίας κατά 1°C/ώρα και διατηρήθηκαν στους -80°C για τουλάχιστον 24 ώρες. Για την μακρόχρονη φύλαξη αυτών, τα κύτταρα αποθηκεύθηκαν σε δοχεία υγρού αζώτου ή παρέμειναν στους -80°C.

Για την απόψυξη των ζωντανών κυττάρων, τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν αρχικά για 1-2 min σε υδατόλουτρο (37°C) και κατόπιν το περιεχόμενό τους μεταφέρθηκε σε σωληνάρια φυγοκέντρωσης που περιείχαν κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού μέσου εμπλουτισμένου με 10% FBS, με σκοπό να αραιωθεί το τοξικό για τα κύτταρα DMSO (<0.5% v/v). Στη συνέχεια, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 7 min στις 1200 rpm (RT) και επαναδιαλύθηκαν σε προθερμασμένο πλήρες θρεπτικό μέσο (IMDM, 10% FBS, 1% PSG). Τα κύτταρα παρέμειναν στο θρεπτικό μέσο για 10-15 min σε RT, προκειμένου να επιτραπεί η σταδιακή και πλήρης διάχυση του υπολειπόμενου DMSO από τις μεμβράνες τους, ώστε να μπορέσουν αυτά να ανακάμψουν. Στη συνέχεια, έγινε καταμέτρηση των ζωντανών και νεκρών κυττάρων σε πλάκα Neubauer με τη χρήση της χρωστικής Trypan blue, για τον υπολογισμό της βιωσιμότητας και ανάκτησης των κυττάρων. Μετά από μία ακόμη πλύση (7 min, 1200 rpm, RT), τα κύτταρα ήταν έτοιμα προς χρήση.

3.2. Απομόνωση κυτταρικών πληθυσμών με τη μέθοδο του μαγνητικού διαχωρισμού

Για τη μοριακή μελέτη της μεταγραφικής έκφρασης των συνδετών BAFF και APRIL και των υποδοχέων τους BAFFR, TACI και BCMA, χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες ώριμα B-κύτταρα και μονοκύτταρα φυσιολογικών ατόμων που απομονώθηκαν με τη μέθοδο του μαγνητικού διαχωρισμού. Τα κύτταρα ενδιαφέροντος συλλέγονται είτε μέσω αρνητικής είτε θετικής επιλογής, με τη χρήση αντισωματικών συμπλόκων που στοχεύουν ειδικά για τον κυτταρικό πληθυσμό-στόχο επιφανειακά μόρια. Τα αντισωματικά αυτά σύμπλοκα συνδέονται με μαγνητικά μικροσωματίδια, όπου παρουσία κατάλληλου μαγνητικού πεδίου, πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των κυττάρων σε 2 πληθυσμούς: ένας θετικός για τον δείκτη που συνδέεται στους μαγνήτες πληθυσμός (θετικό κλάσμα) και ο αρνητικός πληθυσμός, που δεν συνδέεται στους μαγνήτες (αρνητικό κλάσμα).

Για την απομόνωση των ώριμων B-κυττάρων που συμπεριλήφθησαν στη μοριακή μελέτη της έκφρασης των υποδοχέων και συνδετών του BAFF/APRIL συστήματος,

μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος 3 υγιών μαρτύρων αποψύχθηκαν όπως περιγράφηκε προηγουμένως και επαναδιαλύθηκαν σε 1 mL διαλύματος χρώσης (1% FBS σε 1X PBS). Ακολούθησε χρώση με CD19 αντίσωμα συζευγμένο με PE φθοριόχρωμα για 20 min (RT), και κατόπιν επώαση με το αντι-CD32 (FcγRII) για 13 min (RT), το οποίο είχε ως στόχο να εκτοπίσει τα αντι-CD19 μόρια αντισώματος που είχαν συνδεθεί μη ειδικά σε Fc υποδοχείς άλλων κυττάρων, πέραν των B-κυττάρων. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν (1500 rpm, 6 min) παρουσία διαλύματος χρώσης, επαναδιαλύθηκαν σε 1 mL διαλύματος διαχωρισμού (RoboSep Buffer) και μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια πολυστυρενίου 15 mL. Τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν στη συσκευή μαγνητικού διαχωρισμού Robosep™, όπου πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός των B-κυττάρων με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή για το Positive Selection Human PE Selection Kit της EasySep. Μετά το πέρας της διαδικασίας, τα σωληνάρια απομακρύνθηκαν από το μηχάνημα κι έγινε επανασύσταση των κυττάρων του θετικού κλάσματος (απομονωμένα B-κύτταρα) σε θρεπτικό μέσο. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε μέτρηση των κυττάρων θετικού και αρνητικού κλάσματος σε πλάκα Neubauer, κι ένας μικρός αριθμός αυτών χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογηθεί η καθαρότητα του δείγματος με χρώση με το CD19 PE αντίσωμα και ανάλυση σε κυτταρομετρητή ροής· η καθαρότητα του θετικού κλάσματος κάθε δείγματος ήταν >95%. Τα απομονωμένα B-κύτταρα μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια erpendorf, φυγοκεντρήθηκαν (3000 rpm, 5 min, RT) και μετά την πλήρη απομάκρυνση του υπερκειμένου αποθηκεύθηκαν ως ιζήματα κυττάρων στους -80°C, προς απομόνωση RNA.

Η απομόνωση των μονοκυττάρων για την μοριακή μελέτη έγινε μέσω αρνητικής επιλογής. Μονοπύρηννα κύτταρα 3 φυσιολογικών ατόμων, μετά την απόψυξή τους επαναδιαλύθηκαν σε 1 mL διαλύματος χρώσης και ακολούθησε χρώση με τα CD2, CD4, CD8, CD19, CD43 αντισώματα συζευγμένα με FITC φθοριόχρωμα για 20 min (RT), και στη συνέχεια με το αντι-CD32 (FcγRII) για 13 min (RT). Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν (1500 rpm, 6 min) παρουσία διαλύματος χρώσης, επαναδιαλύθηκαν σε 1 mL διαλύματος απομόνωσης και μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια πολυστυρενίου 15 mL. Τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν στο μαγνήτη, όπου έλαβε χώρα ο διαχωρισμός με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή για το Positive Selection Human FITC Selection Kit της EasySep. Μετά το πέρας της διαδικασίας, το σωληνάριο με το αρνητικό κλάσμα περιείχε το πληθυσμό των μονοκυττάρων. Ακολούθησε καταμέτρηση των απομονωμένων κυττάρων και αξιολόγηση της καθαρότητας με χρώση μέρους αυτών με CD14 PE αντίσωμα, που συνδέεται εκλεκτικά στην επιφάνεια των μονοκυττάρων κι ανάλυση σε κυτταρομετρητή ροής. Τα απομονωμένα μονοκύτταρα μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια erpendorf, φυγοκεντρήθηκαν (3000 rpm, 5 min, RT)

και μετά την απομάκρυνση της υγρής φάσης, τα ιζήματα των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν άμεσα για απομόνωση RNA.

Για τις *in vitro* δοκιμές, Β-λεμφοβλάστες 5 ασθενών με Β-ΟΛΛ καθώς επίσης και ώριμα Β-κύτταρα 3 φυσιολογικών ατόμων απομονώθηκαν μέσω αρνητικής επιλογής - εξαλείφοντας όλους τους μη Β-κυτταρικούς πληθυσμούς- προκειμένου να αποφευχθεί η ενεργοποίηση των επιθυμητών κυττάρων, που θα οφειλόταν στην ειδική δέσμευση ενός αντισώματος στην επιφάνεια αυτών, αν χρησιμοποιούσαμε τη θετική επιλογή ως τρόπο διαχωρισμού. Όμοια με τα προηγούμενα, μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος/ή μυελού των οστών ασθενών με Β-ΟΛΛ και περιφερικού αίματος υγιών μαρτύρων επώασθησαν παρουσία CD2, CD3, CD14, CD16, CD36, CD43 αντισωμάτων συζευγμένων με FITC φθοριόχρωμα, με εξαίρεση την περίπτωση των ασθενών με Β-ΟΛΛ, όπου δεν συμπεριλήφθηκε στη χρώση το CD43 αντίσωμα, καθώς οι νεοπλασματικοί λεμφοβλάστες εκφράζουν το μόριο αυτό. Ο διαχωρισμός έγινε σε μαγνήτη της συσκευής Robosep, με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή για το Positive Selection Human FITC Selection Kit. Το αρνητικό κλάσμα της απομόνωσης περιλάμβανε αντίστοιχα είτε τους απομονωμένους λεμφοβλάστες των ασθενών με Β-ΟΛΛ είτε τα ώριμα Β-κύτταρα των φυσιολογικών μαρτύρων. Μετά από καταμέτρηση των κυττάρων, ελέγξαμε την καθαρότητα με χρώση με CD19 PE αντίσωμα και κυτταρομετρική ανάλυση. Το αρνητικό κλάσμα φυγοκεντρήθηκε (1200 rpm, 7 min, RT), το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο για τις *in vitro* δοκιμές.

3.3. Μοριακή μελέτη

3.3.1. Απομόνωση RNA

Η απομόνωση ολικού RNA από τα κύτταρα των ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων, όπως επίσης κι από τις κυτταρικές σειρές, έγινε με τη μέθοδο φαινόλης-χλωροφόρμιου. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε το μονοφασικό διάλυμα φαινόλης-θειοκυανικής γουανιδίνης Trizol, που επιτρέπει την ταυτόχρονη κατακρήμνιση DNA, RNA και πρωτεϊνών από ποικιλία κυττάρων. Το διάλυμα αυτό διατηρεί την ακεραιότητα του RNA εξασφαλίζοντας εξαιρετικά αποτελεσματική αναστολή της δραστηριότητας των ενδογενών RNασών, ενώ παράλληλα επιφέρει λύση των κυττάρων και των υποκυτταρικών διαμερισμάτων. Μετά την ομογενοποίηση του δείγματος, η προσθήκη του χλωροφορμίου επιτρέπει το σχηματισμό 3 φάσεων, μίας ανώτερης διαγούσης ανόργανης υδάτινης στιβάδας, που περιέχει το RNA, μιας χαμηλότερης οργανικής στιβάδας που περιέχει τις πρωτεΐνες, και

μιας διάμεσης στιβάδας που περιέχει το DNA. Η κατακρήμνιση του RNA από την υδατική φάση γίνεται με τη βοήθεια ισοπροπανόλης, ακολουθούμενη από πλύση με αιθανόλη. Με την απομάκρυνση της αιθανόλης, το RNA ενυδατώνεται σε νερό ελεύθερο RNAσών.

Τα απομονωμένα κύτταρα που είχαν αποθηκευθεί στους -80°C ως ιζήματα επαναδιαλύθηκαν σε 1 mL TRIsure ($5-10 \times 10^6$ κύτταρα/ 1 mL), και μετά από σύντομη ανάμειξη σε ομογενοποιητή, τα κύτταρα διήλθαν μέσα από σύριγγα 21G προκειμένου να επιτευχθεί πλήρης διάλυση του ιζήματος. Τα δείγματα επώαστηκαν για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στα $12.000 \times g$ (4°C). Στη συνέχεια, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο τύπου erppendorf 1.5 mL ελεύθερο RNAσών, και σε αυτό προστέθηκαν 100 μL χλωροφορμίου. Μετά από ήπια ανάδευση των δειγμάτων με αναστροφή του φιαλιδίου, ακολούθησε επώαση για 8 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 10 min στα $12.000 \times g$ (4°C). Η υδάτινη φάση μεταφέρθηκε με προσοχή σε νέο σωληνάριο κι ακολούθησε κατακρήμνιση του RNA με την προσθήκη 500 μL ισοπροπανόλης. Έπειτα από ήπια ανακίνηση, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 8 min στα $12.000 \times g$ (20°C). Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε κι ακολούθησε πλύση με προσθήκη 1 mL 75% αιθανόλης για 5 min στα $7.600 \times g$ (20°C). Μετά την αφαίρεση του υπερκειμένου, τα σωληνάρια έμειναν για λίγη ώρα με ανοιχτά τα καπάκια προκειμένου να εξατμιστεί η περίσσεια της αιθανόλης, η οποία αποτελεί κι έναν εν δυνάμει αναστολέα ενζυμικών αντιδράσεων. Κατόπιν, προστέθηκαν 35 μL νερού ελεύθερου RNAσών και τα δείγματα αποθηκεύθηκαν αμέσως στον πάγο.

Για τον έλεγχο της ποιότητας του απομονωμένου RNA πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες δοκιμές:

1. Φωτομέτρηση του RNA σε οπτική πυκνότητα 260 nm και 280 nm για έλεγχο καθαρότητας και ποσοτικοποίηση. Για το σκοπό αυτό, 5 μL δείγματος αραιώθηκαν 1/40 με νερό ελεύθερο RNAσών και τοποθετήθηκαν σε κυβέττες UVette ως τυφλό δείγμα, χρησιμοποιήθηκε νερό ελεύθερο RNAσών. Οι μετρήσεις έγιναν σε φασματοφωτόμετρο (Bio Photometer, Erppendorf), όπου η τιμή που προέκυπτε από τη μέτρηση σε μήκος κύματος 260 nm (OD_{260}) έδειχνε τη συγκέντρωση του RNA ($\text{ng}/\mu\text{L}$), ενώ η αναλογία των τιμών $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ είναι ενδεικτική της καθαρότητας του δείγματος, η οποία εξαρτάται από την παρουσία πρωτεϊνών ή φαινολών. Αξιόπιστα θεωρήθηκαν τα δείγματα RNA με $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ λόγο μεταξύ 1.6 και 2.1, με βέλτιστη τιμή αυτή του 2.

2. Ηλεκτροφόρηση του RNA σε πηκτή αγαρόζης. Για τον έλεγχο της ακεραιότητας του RNA καθώς επίσης και της πρόσμιξής του με DNA, 2.5 μL υλικού ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1.5% με βρωμιούχο αιθίδιο, με τη χρήση μάρτυρα. Η παρουσία 2 ζωνών

στην πηκτή, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τα 28S και 18S ριβοσωμικά RNA (ribosomal, rRNA), με την 1^η να είναι διπλάσιας έντασης σε σχέση με τη 2^η, ήταν ενδεικτική της ακεραιότητας του RNA.

Στη συνέχεια τα δείγματα αποθηκεύθηκαν στους -80°C. Να σημειωθεί ότι ο χειρισμός του RNA προϋπέθετε τον καθαρισμό των επιφανειών και του εξοπλισμού με κατάλληλο διάλυμα το οποίο καταστρέφει τις RNάσες (RNaseZap).

3.3.2. Σύνθεση cDNA

Η σύνθεση συμπληρωματικών DNA μορίων (complementary, cDNA) με εκμαγείο το ολικό RNA που απομονώθηκε, έγινε με την τεχνική της PCR αντίστροφης μεταγραφής (Reverse transcriptase, RT-PCR). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το πακέτο της Invitrogen που περιλαμβάνει την M-MLV αντίστροφη μεταγραφάση και 2 διαλύματα (5x First-Strand buffer, 0.1M DTT), απαραίτητα για τη βέλτιστη δράση του ενζύμου. Η χρήση της M-MLV οδηγεί στο σχηματισμό κυρίως RNA-cDNA υβριδίων, καθώς η συγκεκριμένη μεταγραφάση εμφανίζει χαμηλή δραστηριότητα RNάσης H, η οποία θα μπορούσε να απομακρύνει τα μόρια RNA. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν ένα πακέτο τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) τελικής συγκέντρωσης 10 mM, ένας αναστολέας RNάσων (RNasin), ενώ ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν τυχαία εξανουκλεοτίδια (random hexamers) (50 pmol/μL).

Προηγηθείσας της σύνθεσης cDNA, ο χώρος και ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκαν καθαρίστηκαν με RNaseZap, ενώ τα αντιδραστήρια και τα δείγματα RNA αποψύχθηκαν στον πάγο και διατηρήθηκαν εκεί μέχρι τη χρήση τους. Το μείγμα της αντίδρασης για την αντίστροφη μεταγραφή παρασκευάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, όπως παρατίθεται στον **Πίνακα 8**.

Πίνακας 8. Ποσότητες αντιδραστηρίων για τη σύνθεση cDNA (ανά δείγμα)

Αντιδραστήριο	Όγκος ανά δείγμα (μL)
5xFS buffer	5
0.1 DTT	2.25
Διάλυμα dNTPs (10 mM)	2
RNasin (40 U/μL)	0.6
M-MLV RT	1.25

Αρχικά, σε αποστειρωμένα σωληνάρια PCR 0.2 mL μεταφέρθηκαν 4 μ L εξαμερών και 1 μ g RNA, ενώ προστέθηκε ποσότητα νερού ελεύθερου RNAσών έτσι ώστε ο συνολικός όγκος να είναι 14 μ L. Τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν για 2 min στους 72°C στο θερμικό κυκλοποιητή Applied Biosystems Verity Thermal Cycler (Thermo Fischer Scientific), προκειμένου να επιτευχθεί ο υβριδισμός των εξαμερών με το RNA. Κατόπιν, έγινε παύση της αντίδρασης και προσθήκη 11 μ L του μείγματος που περιλάμβανε την αντίστροφη μεταγραφή και η αντίδραση συνεχίστηκε για 60 min στους 42°C. Το τελευταίο στάδιο περιλάμβανε επώαση των δειγμάτων στους 65°C για 10 min προκειμένου να επιτευχθεί αδρανοποίηση των περιεχόμενων ενζύμων. Μετά το πέρας της αντίδρασης, τα cDNA αποθηκεύθηκαν στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

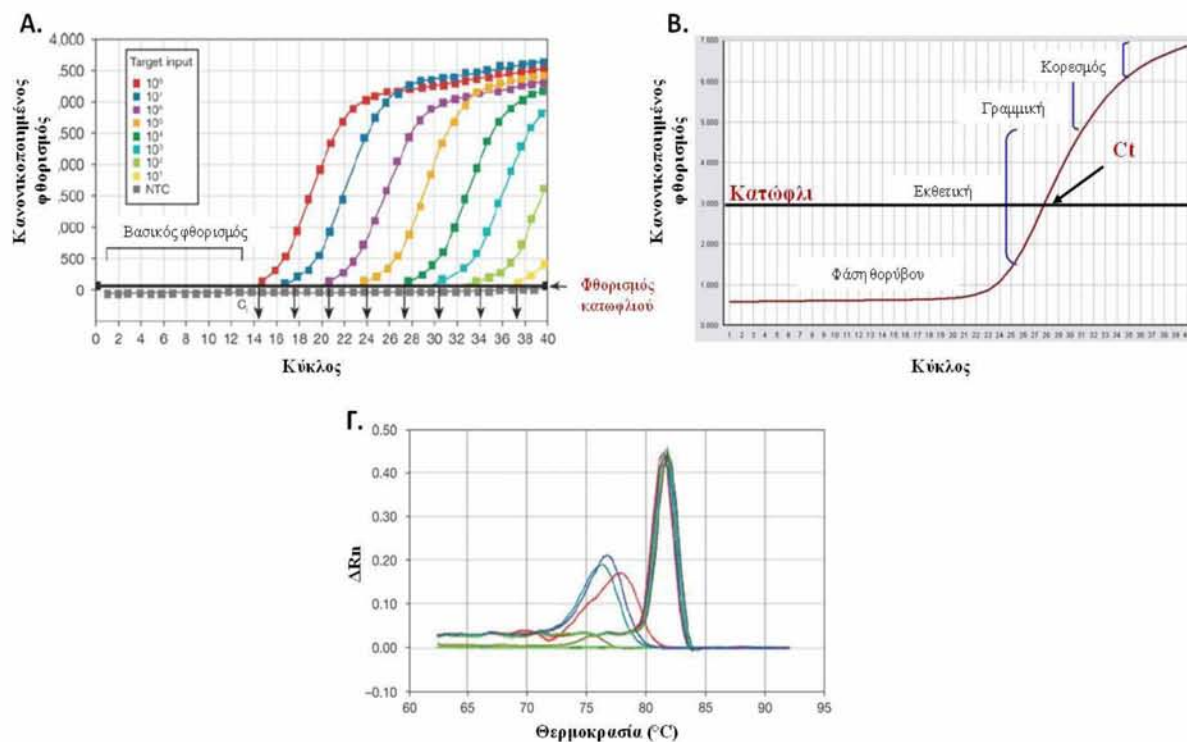
3.3.3. Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *TNFRSF13B/TAC1* και *TNFRSF13C/BAFFR* με PCR πραγματικού χρόνου

Για τον προσδιορισμό της μεταγραφικής έκφρασης των *TNFRSF13B/TAC1* και *TNFRSF13C/BAFFR* γονιδίων, το cDNA που προέκυψε μέσω της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για μία σειρά από αντιδράσεις Real-Time PCR με τη χρήση κατάλληλων εκκινήτων, με στόχο την ενίσχυση των εν λόγω γονιδίων. Στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν cDNA από 70/71 ασθενείς με ΟΛΛ, απομονωμένα μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος 5 υγιών δοτών όπως και μυελού των οστών 4 ατόμων με ιστορικό NHL σε πλήρη ύφεση που δεν λάμβαναν θεραπεία, καθώς επίσης κι από απομονωμένα ώριμα B-κύτταρα και μονοκύτταρα 3 φυσιολογικών ατόμων και τέλος από 4 EBV-μετασηματισμένες κυτταρικές σειρές.

Η Real-Time PCR αποτελεί ένα πολύ σημαντικό εργαλείο στην ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης. Η μέθοδος αυτή συγχωνεύει τη χημεία της συμβατικής PCR με φθορίζοντα μόρια (π.χ. φθορίζουσες χρωστικές που παρεμβάλλονται σε δίκλωνο DNA, συζευγμένοι με φθοριοχρώματα ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές), προκειμένου να προσδιορίσει την παραγωγή των ενισχυμένων προϊόντων σε κάθε κύκλο της PCR αντίδρασης, τα οποία είναι ευθέως ανάλογα του υποστρώματος πριν την έναρξή της. Στη Real-Time PCR, ο φθορισμός μετράται μετά από κάθε κύκλο επιτρέποντας τη δημιουργία μίας καμπύλης ενίσχυσης (amplification plot, **Εικόνα 3Α**) που απεικονίζει τη συσσώρευση του προϊόντος κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Η ένταση του σήματος φθορισμού σε κάθε σημείο της καμπύλης είναι αντιπροσωπευτική της ποσότητας των ενισχυμένων DNA τμημάτων σε ένα δείγμα τη δεδομένη χρονική στιγμή.

Η αντίδραση της Real-time PCR ομοιάζει της συμβατικής PCR στο ότι αποτελείται από 4 φάσεις, που αντιπροσωπεύονται στην καμπύλη ενίσχυσης ως εξής (**Εικόνα 3B**): πρώιμη φάση βασικού φθορισμού (baseline), εκθετική, γραμμική και φάση κορεσμού. Στην πρώιμη φάση, έχουμε μία ελάχιστη αύξηση στο σήμα φθορισμού, κάτω από τα όρια που μπορεί να ανιχνεύσει το μηχάνημα και η οποία ισοδυναμεί με το «θόρυβο» της αντίδρασης. Κατά την εκθετική φάση, πραγματοποιείται ο διπλασιασμός του προϊόντος, με την απόδοση της αντίδρασης να προσεγγίζει το 100% καθώς όλα τα συστατικά της βρίσκονται σε περίσσεια. Επομένως, η αύξηση τους σήματος φθορισμού είναι ευθέως ανάλογη της ποσότητας του ενισχυμένου προϊόντος. Ωστόσο, μετά από αρκετούς κύκλους, η αντίδραση επιβραδύνεται καθώς τα συστατικά της (dNTPs, εκκινητές) παύουν να είναι σε αφθονία, η δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης ελαττώνεται, η πλήρης αποδιάταξη των ενισχυμένων προϊόντων δεν είναι εφικτή και τα προϊόντα διασπώνται από την δραστηριότητα νουκλεάσης της πολυμεράσης. Ως αποτέλεσμα, η αντίδραση εισέρχεται σε μία γραμμική φάση, κατά την οποία τα μόρια-υποστρώματα της αντίδρασης αποτυγχάνουν να διπλασιαστούν πλήρως. Τελικά, επέρχεται η φάση κορεσμού (plateau), όπου η ενίσχυση των προϊόντων έχει πλέον σταματήσει.

Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, πρέπει να οριστεί ένα κατώφλι (threshold) το οποίο καθορίζει σε ποιο σημείο της αντίδρασης μπορούν να συγκριθούν τα δείγματα. Το κατώφλι είναι το επίπεδο εκείνο του σήματος που αντιπροσωπεύει μία στατιστικά σημαντική αύξηση αυτού σε σχέση με το βασικό σήμα θορύβου· η θέση του κατωφλιού εντοπίζεται πάντα εντός της εκθετικής φάσης της PCR, όπου τα συστατικά της αντίδρασης είναι σε περίσσεια. Ο κλασματικός αριθμός των κύκλων της αντίδρασης που απαιτούνται έτσι ώστε το παρατηρούμενο σήμα φθορισμού να διασταυρώσει το κατώφλι ορίζεται ως «ο κύκλος κατώφλι» (threshold cycle, Ct). Η τιμή Ct χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος ή των επιπέδων έκφρασης του mRNA και είναι αντιστρόφως ανάλογη αυτών. Διαδοχικές αραιώσεις ενός υποστρώματος γνωστής συγκέντρωσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να καθορίσουν μία πρότυπη καμπύλη για τον υπολογισμό της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος-στόχου των δειγμάτων και για να προσδιορίσουν την απόδοση της αντίδρασης. Ο λογάριθμος κάθε γνωστής συγκέντρωσης των διαδοχικών αραιώσεων (άξονας x) απεικονίζεται έναντι της τιμής Ct για τη δεδομένη συγκέντρωση (άξονας y). Από την πρότυπη καμπύλη, εξάγονται πληροφορίες όπως η απόδοση της αντίδρασης κι άλλες παράμετροί της (κλίση, συντελεστής συσχέτισης). Μία καλή αντίδραση θα πρέπει να έχει απόδοση μεταξύ 90% με 110%, που αντιστοιχεί σε κλίση μεταξύ -3.58 και -3.10, ενώ ο συντελεστής συσχέτισης που αντανάκλα την γραμμικότητα της πρότυπης καμπύλης θα πρέπει να προσεγγίζει το 0.999.



Εικόνα 3. Καμπύλες ανάλυσης στη Real-Time PCR. **A.** Καμπύλες ενίσχυσης. Οι καμπύλες ενίσχυσης δημιουργούνται ως συνάρτηση του φθορισμού προς τον αριθμό των κύκλων. **B.** Οι φάσεις της Real-Time PCR. **Γ.** Καμπύλες αποδιάταξης. Η ανάλυση της καμπύλης αποδιάταξης μπορεί να ανιχνεύσει μη ειδικά προϊόντα (π.χ. διμερή εκκινητών), όπως διαπιστώνεται από τις κορυφές που εμφανίζονται στα αριστερά των κύριων κορυφών των ειδικών ενισχυμένων προϊόντων. ΔRn: κανονικοποιημένος φθορισμός (με τροποποιήσεις από «*Real time PCR handbook/Life technologies*»).

Υπάρχουν 2 στρατηγικές για την ανίχνευση και μέτρηση σε πραγματικό χρόνο των ενισχυμένων τμημάτων- οι μη ειδικές φθορίζουσες DNA χρωστικές και οι σημασμένοι με φθοριοχρώματα ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές, με τους δεύτερους να χαρακτηρίζονται από εξαιρετική ευαισθησία και ειδικότητα. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η κοινή μη ειδική φθορίζουσα χρωστική SYBR Green I (**Εικόνα 4**), η οποία δεσμεύεται σε δίκλωνο DNA. Το προκύπτον σύμπλοκο DNA-χρωστικής απορροφά μπλε φως ($\lambda_{\max} = 497 \text{ nm}$) και εκπέμπει πράσινο φως ($\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$). Όταν μια τέτοια χρωστική ουσία συνδεθεί με τη μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA, ο φθορισμός αυξάνεται και μπορεί να μετρηθεί στη φάση επιμήκυνσης του κάθε κύκλου της PCR. Η χρήση της SYBR Green I, αν κι αποτελεί μία σχετικά οικονομική και εύχρηστη επιλογή, εμφανίζει κάποιους περιορισμούς, συμπεριλαμβανομένων της σταθερότητας της φθορίζουσας ουσίας και της εξαρτώμενης από τη χρωστική αναστολής της PCR.



Εικόνα 4. Η χρήση της SYBR Green I στη Real Time PCR. **A.** Κατά την έναρξη της αντίδρασης, τα μη δεσμευμένα μόρια χρωστικής παράγουν ένα ελάχιστο σήμα φθορισμού (θόρυβος). **B.** Μετά τον υβριδισμό των εκκινητών, μόρια χρωστικής προσδένονται στο δίκλωνο DNA, οδηγώντας σε σημαντική αύξηση του σήματος φθορισμού. **Γ.** Κατά την επιμήκυνση, και με το σχηματισμό νέων ενισχυμένων προϊόντων, περισσότερα μόρια φθορίζουσας χρωστικής προσδένονται στο δίκλωνο DNA (με τροποποιήσεις από <http://www.gene-quantification.de/chemistry.html>.)

Δεδομένου ότι κατά τη διάρκεια της PCR μπορούν να σχηματισθούν μη ειδικά προϊόντα και διμερή εκκινητών, προτείνεται ανάλυση της καμπύλης αποδιάταξης (**Εικόνα 3Γ**) για τον έλεγχο της ειδικότητας του ενισχυμένου προϊόντος. Η ανάλυση αυτή συνίσταται στην εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας στο δείγμα (από 50°C έως 95°C) και στην παρακολούθηση της εκπομπής φθορισμού κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, λόγω αποδιάταξης του δίκλωνου σε μονόκλωνο DNA. Η θερμοκρασία αποδιάταξης του DNA εμφανίζεται ως απότομη πτώση του σήματος φθορισμού λόγω αποδέσμευσης της φθορίζουσας ουσίας. Τα μη ειδικά προϊόντα και τα διμερή εκκινητών αποδιατάσσονται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες σε σχέση με τα ειδικά προϊόντα. Στην πραγματικότητα, PCR προϊόντα διαφορετικού μήκους και/ή νουκλεοτιδικού περιεχομένου παρουσιάζουν διακριτές κορυφές σε γραφήματα συνάρτησης του παραγόμενου φθορισμού σε σχέση με τη θερμοκρασία ($\Delta R_n = -dF/dT$), λόγω του γεγονότος ότι αποδιατάσσονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Η ανάλυση της καμπύλης αποδιάταξης μετά το πέρας του πολλαπλασιασμού αποτελεί συνήθη πρακτική για τον έλεγχο της ειδικότητας της αντίδρασης και του σχηματισμού διμερών εκκινητών.

Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της Real-time PCR, δύο είναι οι διαθέσιμες μέθοδοι, η απόλυτη και η σχετική. Κατά την απόλυτη ποσοτικοποίηση χρησιμοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης για την κατασκευή μίας απόλυτης πρότυπης καμπύλης, ενώ τα δείγματα προς εξέταση που έχουν συμπεριληφθεί στην ίδια αντίδραση ποσοτικοποιούνται σε σύγκριση με αυτή την πρότυπη καμπύλη. Η μέθοδος αυτή μας παρέχει τη δυνατότητα προσδιορισμού αριθμού αντιγράφων ανά κύτταρο και χρησιμοποιείται συνήθως όταν απαιτείται ακριβής αριθμός του ενισχυμένου προϊόντος, π.χ. μέτρηση ιικού φορτίου.

Στη σχετική ποσοτικοποίηση, οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης του mRNA του γονιδίου ενδιαφέροντος προσδιορίζονται σε συνάρτηση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης ενός άλλου κατάλληλου ενδογενούς συστατικά εκφραζόμενου γονιδίου αναφοράς, το οποίο αναφέρεται ως εσωτερικός μάρτυρας. Η πιο κοινή μέθοδος παρουσίασης των δεδομένων της Real Time PCR είναι η συγκριτική Ct μέθοδος ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ μέθοδος).¹⁵⁰ Η μέθοδος αυτή κάνει αρκετές υποθέσεις, συμπεριλαμβανομένου του ότι η απόδοση της PCR είναι κοντά στην τιμή 1 και ότι είναι παρόμοια για το γονίδιο ενδιαφέροντος και το γονίδιο αναφοράς. Τα πιο κοινά γονίδια αναφοράς, γνωστά και ως γονίδια βασικής λειτουργίας (housekeeping genes), είναι η β-ακτίνη, η δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH), το ριβοσωμικό RNA (ribosomal RNA, rRNA) και η B2M. Τα γονίδια αυτά θεωρητικά θα πρέπει να εκφράζονται σε ένα σταθερό επίπεδο μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών τύπων του οργανισμού, σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια και τα επίπεδά τους θα πρέπει να παραμένουν σταθερά σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς αυτό της B2M. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας, που εκφράζεται σε όλα τα εμπύρηννα κύτταρα με σχετικά σταθερό πρότυπο έκφρασης στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους, ενώ δεν έχουν αναφερθεί ψευδογονίδια.

Για τον προσδιορισμό της σχετικής έκφρασης, απαιτείται μία επιπλέον σύγκριση με ένα δείγμα που ορίζεται ως βαθμονομητής, για παράδειγμα RNA από απομονωμένα ώριμα Β-κύτταρα. Οι τιμές Ct των δειγμάτων προς εξέταση και του βαθμονομητή για το γονίδιο ενδιαφέροντος κανονικοποιούνται αρχικά ως προς τις αντίστοιχες τιμές τους για το γονίδιο αναφοράς, προς αποφυγή συστηματικού λάθους που μπορεί να έγκειται σε διάφορους παράγοντες όπως μικρές διαφορές στην αρχική ποσότητα του RNA που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του cDNA, η ποιότητα του τελευταίου κ.ά.

Η μαθηματική εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε για την σχετική ποσοτικοποίηση των δεδομένων είναι: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, όπου $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ δείγματος - ΔCt βαθμονομητή, όπου ΔCt δείγματος είναι η κανονικοποιημένη τιμή Ct για κάθε δείγμα (ΔCt δείγματος = $Ct_{\text{δείγματος, γονιδίου-στόχου}} - Ct_{\text{δείγματος, γονιδίου αναφοράς}}$), ενώ η τιμή ΔCt βαθμονομητή είναι, αντίστοιχα, η κανονικοποιημένη τιμή CT για το δείγμα αναφοράς. Εξ' ορισμού, για το βαθμονομητή ισχύει ότι $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^0 = 1$, οπότε η διαφορά στην έκφραση του γονιδίου-στόχου στο δείγμα αναφοράς σε σχέση με τον εαυτό του, ισούται με 1. Οι αντίστοιχες εξισώσεις για τα υπόλοιπα δείγματα δείχνουν πόσες φορές είναι αυξημένη ή μειωμένη η έκφραση του γονιδίου-στόχου στα δείγματα προς μελέτη, σε σχέση με το βαθμονομητή. Έτσι, τα παρατηρούμενα αποτελέσματα

μπορούν να εκφραστούν ως υψηλότερα ή χαμηλότερα πολλαπλάσια με αναφορά το πρότυπο αυτό δείγμα.

Σχεδιασμός εκκινητών

Ο σχεδιασμός των εκκινητών αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές παραμέτρους στη Real-time PCR. Το βέλτιστο μήκος των ενισχυμένων προϊόντων θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 80-250bp, καθώς μεγαλύτερα τμήματα δεν πολλαπλασιάζονται τόσο αποτελεσματικά. Οι εκκινητές θα πρέπει να έχουν μήκος 18-24 νουκλεοτίδια, θα πρέπει να είναι ειδικοί για την αλληλουχία-στόχο και ελεύθεροι ενδογενών δευτεροταγών δομών ή επαναλαμβανόμενων μοτίβων (ιδιαίτερα ως προς τα 3' άκρα), καθώς αυτό καθιστά ακατάλληλο τον υβριδισμό τους. Η θερμοκρασία τήξης των εκκινητών πρέπει να είναι κοντά στους 60°C, τα ζεύγη των εκκινητών πρέπει επίσης να έχουν συμβατές θερμοκρασίες τήξης (ιδανικά, με διαφορές κάτω του 1°C) και η περιεκτικότητά τους σε GC να μην ξεπερνά κατά πολύ το 50%, καθώς μπορεί να σχηματίσουν σταθερά μεταξύ τους υβρίδια. Όπου είναι εφικτό, το 3' άκρο του εκκινητή θα πρέπει να είναι πλούσιο σε GC (η τελευταία βάση να είναι G ή C), καθώς αυτό ενισχύει τον υβριδισμό του άκρου το οποίο θα καθορίσει και τη θέση έναρξης της επιμήκυνσης για την πολυμεράση. Επίσης οι εκκινητές θα πρέπει να ελέγχονται για την συμπληρωματικότητά τους, ιδιαίτερα ως προς το 3' άκρο καθώς αυτό σχετίζεται με την ικανότητά τους να σχηματίζουν ισχυρά διμερή μεταξύ τους. Έλεγχος της ειδικότητας των εκκινητών ως προς την αλληλουχία-στόχο μπορεί να επιτευχθεί μέσω σύγκρισης αυτής με το BLAST σε βάσεις δεδομένων. Επίσης, οι εκκινητές θα πρέπει να σχεδιάζονται έτσι ώστε να υβριδίζονται σε εξόνια εκατέρωθεν ενός ιντρονίου ή να εκτείνονται κατά μήκος των ορίων διαφορετικών εξονίων, επιτρέποντας την ειδική πρόσδεση σε cDNA κι όχι σε γενωμικό DNA. Με βάση τις προϋποθέσεις αυτές, σχεδιάστηκαν οι εκκινητές για την ενίσχυση των γονιδίων *BAFFR* και *TACI*, ενώ οι εκκινητές για τη *B2M* διατίθενται εμπορικά (SABiosciences, Qiagen). Οι αλληλουχίες και οι ιδιότητες των εκκινητών παρατίθενται στον **Πίνακα 3**.

Πειραματική διαδικασία

Για τη μέτρηση της μεταγραφικής έκφρασης των υποδοχέων *BAFFR* και *TACI* χρησιμοποιήθηκε η Real-Time qRT-PCR δύο σταδίων. Το πρώτο στάδιο ήταν η σύνθεση του συμπληρωματικού cDNA με εκμαγείο το RNA, μέσω της αντίστροφης μεταγραφής που περιγράφηκε προηγουμένως. Στη συνέχεια, 2 μL cDNA χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με 23 μL από το μείγμα της αντίδρασης που περιλάμβανε το Platinum SYBR Green qPCR

SuperMix-UDG (Invitrogen) και το αντίστοιχο ζευγάρι εκκινητών για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των δύο γονιδίων. Όλα τα αντιδραστήρια αποψύχθηκαν και διατηρήθηκαν σε πάγο μέχρι τη χρήση τους. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στον **Πίνακα 9**. Σε κάθε αντίδραση, πέραν από τα προς εξέταση δείγματα συμπεριλήφθηκε κι ένας μάρτυρας (με ddH₂O, αντί cDNA), για τον έλεγχο της καθαρότητας των αντιδραστηρίων. Λόγω της πολύ μεγάλης ευαισθησίας της Real-time, κάθε δείγμα αναλύθηκε εις διπλούν (duplicates). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε φιαλίδια των 100 μL, τα οποία τοποθετήθηκαν στην 72-θέσεων μεταλλική πλάκα του μηχανήματος Real Time PCR RotorGene 6000 (Corbett). Η απόδοση όλων των αντιδράσεων κυμαινόταν από 0.9-1.05. Η σχετική έκφραση των γονιδίων προσδιορίστηκε σε σύγκριση με την έκφρασή τους σε φυσιολογικά ώριμα Β-κύτταρα (βαθμονομητής).

Πίνακας 9. Ποσότητες αντιδραστηρίων για τη Real-Time qPCR (ανά δείγμα)

Αντιδραστήριο	Όγκος ανά δείγμα (μL)
Platinum SYBR Green qPCR Supermix- UDG	12.5
Πρόσθιος (20μM)*	0.5
Ανάστροφος (20μM)*	0.5
H ₂ O	9.5

*Στην περίπτωση των εμπορικά διαθέσιμων εκκινητών χρησιμοποιήθηκε 1 μL από αυτούς.

3.3.4. Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *TNFRSF17/BCMA*, *TNFSF13B/BAFF*, *ΔBAFF*, *TNFSF13/APRIL* με συμβατική ημι-ποσοτική RT-PCR

Η μεταγραφική έκφραση των *BCMA*, *BAFF*, *ΔBAFF* και *APRIL*, καθορίστηκε με συμβατική RT-PCR, η οποία τροποποιήθηκε με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να επιτρέπει τη συγκριτική μελέτη της έκφρασης των παραπάνω γονιδίων για το σύνολο των δειγμάτων που αναλύθηκαν. Η συμβατική PCR αποτελεί μία τελικού σταδίου δοκιμή, καθώς τα ενισχυμένα προϊόντα δεν μπορούν να αξιολογηθούν σε πραγματικό χρόνο, παρά μόνο μετά το πέρας της αντίδρασης, όπου έχει επέλθει κορεσμός αυτής, μέσω ηλεκτροφόρησης των προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η αντίδραση της PCR είναι αρχικά εκθετική, ωστόσο μετά φτάνει σε κορεσμό όταν η δραστηριότητα του ενζύμου πέφτει και όλοι οι υπόλοιποι παράγοντες της αντίδρασης εξαντλούνται. Στο σημείο κορεσμού, τα cDNA τα οποία αρχικά μπορεί να εμφάνιζαν υψηλή έκφραση μπορεί να δώσουν προϊόντα ίσης έντασης με cDNA χαμηλότερης έκφρασης.

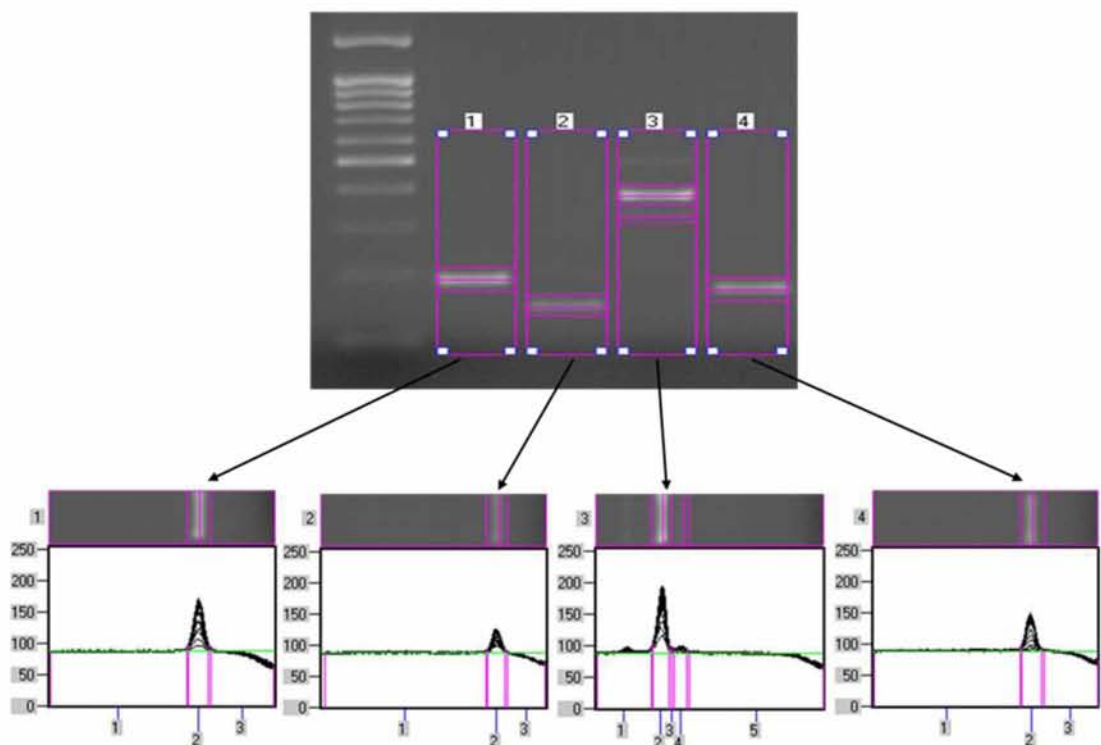
Για το σκοπό αυτό, οι συνθήκες των αντιδράσεων για την ενίσχυση του κάθε γονιδίου σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε η αντίδραση για καθένα από τα αναλυθέντα cDNA να μην φτάνει σε κορεσμό. Η επιλογή της θερμοκρασίας υβριδισμού των εκκινητών έγινε με βάση τις οδηγίες του λογισμικού Oligo 6.0. Το βασικό πρόγραμμα για την ενίσχυση των παραπάνω γονιδίων αποτελούνταν από έναν κύκλο στους 94°C για 2 min, ακολουθούμενο από 30 sec στους 94°C, 30 sec στην αντίστοιχη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών, 30 sec στους 72°C, για έναν αριθμό κύκλων που προσδιορίστηκε ξεχωριστά για το κάθε γονίδιο, και τέλος έναν κύκλο στους 72°C για 5 min. Η επιλογή του αριθμού των κύκλων κάθε αντίδρασης έγινε με τέτοιον τρόπο έτσι ώστε το ενισχυμένο προϊόν να είναι ορατό στην πηκτή ηλεκτροφόρησης για να μπορεί να ποσοτικοποιηθεί, αλλά επίσης η αντίδραση να βρίσκεται στην εκθετική φάση και να μην έχει φτάσει σε κορεσμό. Στα πειράματά μας το εύρος των κύκλων που αξιολογήθηκε ήταν 20-47 κι επιλέχθηκε ο κατάλληλος αριθμός για το αντίστοιχο γονίδιο. Να σημειωθεί ότι όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στον ίδιο θερμικό κυκλοποιητή.

Οι εκκινητές για την ενίσχυση των *BCMA*, *APRIL* και *B2M* σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του Oligo 6.0 λογισμικού, πληρώνοντας τις προδιαγραφές που αναφέρθηκαν και προηγουμένως για τη Real-Time PCR. Για την ενίσχυση των *BAFF* και *ΔBAFF*, χρησιμοποιήθηκε ένα κοινό ζευγάρι εκκινητών που είχαν προηγουμένως περιγραφεί στην βιβλιογραφία.¹⁵¹ Οι εκκινητές αυτοί επέτρεπαν την ταυτόχρονη ανίχνευση και των 2 μεταγράφων, καθότι το mRNA του *ΔBAFF* στερείται του εξονίου 3 του γονιδίου (μήκους 57 bp), οπότε κατά την ηλεκτροφόρηση μπορούν δυνητικά να εντοπιστούν 2 προϊόντα, ένα στις 379 bp (πλήρες μετάγραφο του *BAFF*) και ένα στις 322 bp (*ΔBAFF*).

Για τον προσδιορισμό της μεταγραφικής έκφρασης των γονιδίων *BCMA*, *BAFF*, *ΔBAFF*, *APRIL* και *B2M*, 2 μL cDNA ενισχύθηκαν σε αντίδραση 30 μL που περιλάμβανε 1x PCR buffer (το οποίο περιέχει dNTPs, MgCl₂ και ενισχυτές της αντίδρασης σε βέλτιστες συγκεντρώσεις), 0.7 pmol/μL από τον κάθε εκκινητή (πρόσθιο και ανάστροφο) και 0.044 U/μL MyTaq DNA polymerase. Σε κάθε αντίδραση, συμπεριλαμβανόταν κι ένα σωληνάριο, που αντί γενετικού υλικού περιείχε νερό, ως αρνητικός μάρτυρας, προκειμένου να διασφαλιστεί η καθαρότητα των αντιδραστηρίων. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και οι συνθήκες των αντιδράσεων για την ενίσχυση του κάθε γονιδίου περιγράφονται στον **Πίνακα 3**.

Με το πέρας της αντίδρασης, 5 μL ενισχυμένου προϊόντος κι από τα 4 γονίδια για τα οποία αναλύθηκε το κάθε cDNA, αναμείχθηκαν με 2 μL χρωστικής και όλη η ποσότητα μεταφέρθηκε σε 2% πηκτή αγαρόζης σε 1x TBE ρυθμιστικό διάλυμα με βρωμιούχο αιθίδιο.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε παρουσία μάρτυρα DNA, προς επιβεβαίωση του μοριακού βάρους των ενισχυμένων προϊόντων για 40 min στα 120V, στη συσκευή Wide Mini Subcell GT system (Biorad) συνδεδεμένη με το τροφοδοτικό PowerPac Basic power supply (Biorad). Η φωτογράφιση της πηκτής έγινε με έκθεσή της σε υπεριώδες φως (UVITEC) με χρήση του συνοδού λογισμικού 'gel capture' (DNR Bioimaging Systems). Σε κάθε ηλεκτροφόρηση, συμπεριλαμβανόταν το ενισχυμένο προϊόν των γονιδίων ενδιαφέροντος, όπως επίσης και του γονιδίου αναφοράς για το κάθε δείγμα. Για την ποσοτικοποίηση των τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό UVIdoc (UVItec), όπου προσδιορίστηκε ο αριθμός των εικονοστοιχείων (pixels) της αντίστοιχης ζώνης στην ηλεκτροφόρηση (**Εικόνα 5**). Η σχετική έκφραση των γονιδίων *BCMA*, *BAFF*, *ΔBAFF*, *APRIL* αποδόθηκε ως ο λόγος των εικονοστοιχείων του αντίστοιχου γονιδίου ενδιαφέροντος ως προς τα εικονοστοιχεία για τη *B2M* (γονίδιο αναφοράς).



Εικόνα 5. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων *APRIL* (2), *BAFF* (3), *ΔBAFF* (3, κατώτερη ζώνη), *BCMA* (4) ως προς τη *B2M* (1) με τη χρήση του λογισμικού UVIdoc.

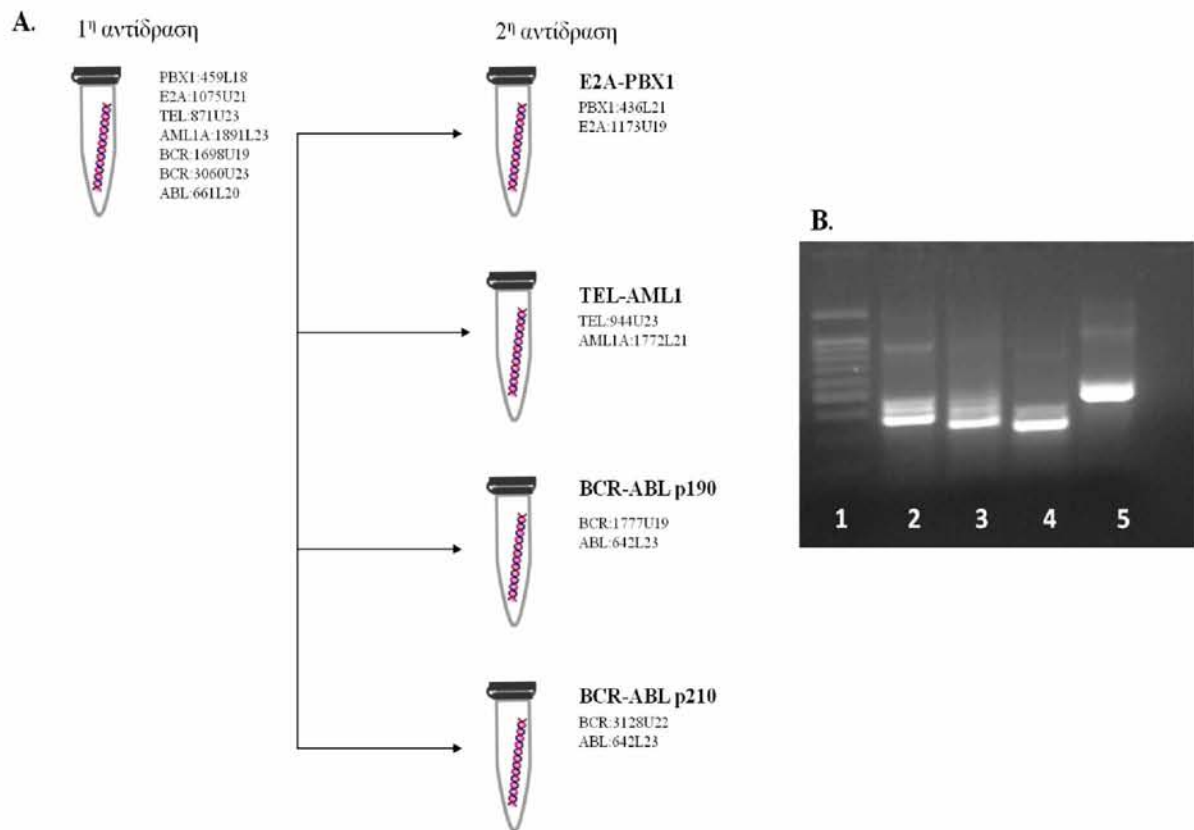
3.3.5. Multiplex RT-PCR για την ανίχνευση των ανασυνδυασμών t(12;21)/TEL-AML1, t(1;19)/E2A-PBX1, t(9;22)/BCR-ABL p190 και p210.

Ο προσδιορισμός των πιο κοινών χρωμοσωμικών ανωμαλιών που συναντώνται στους ασθενείς με B-ΟΛΛ- t(12;21)/TEL-AML1, t(1;19)/E2A-PBX1, t(9;22)(q34;q11)/BCR-ABL

(p210 & p190 οι ανασυνδυασμοί που συναντώνται συχνότερα στη ΧΜΛ και στη Β-ΟΛΛ, αντίστοιχα) έγινε με την τεχνική της multiplex RT-PCR για 70/71 ασθενείς με ΟΛΛ. Η τεχνική αυτή προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι του συμβατικού καρυότυπου, καθώς απαιτεί πολύ μικρότερο αριθμό κυττάρων, έχει μεγαλύτερη ευαισθησία, είναι ταχύτερη κι επίσης καθιστά δυνατή την ανίχνευση χρωμοσωμικών μετατοπίσεων, οι οποίες δεν ταυτοποιούνται με τις καθιερωμένες τεχνικές μελέτης των χρωμοσωμάτων (οι λεγόμενες «κρυφές» χρωμοσωμικές ανωμαλίες)· χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής αποτελεί ο TEL-AML1 ανασυνδυασμός. Η multiplex PCR επιτρέπει την ταυτόχρονη ενίσχυση περισσότερων του ενός γενωμικών στόχων με τη χρήση διαφορετικών ζευγών εκκινητών στην ίδια αντίδραση, προσφέροντας τη δυνατότητα ανίχνευσης πολλαπλών γενετικών βλαβών σε μικρό αριθμό αντιδράσεων.

Η ταυτοποίηση των προαναφερθέντων κυτταρογενετικών βλαβών στο υλικό της παρούσας μελέτης έγινε με multiplex PCR σε δύο στάδια στο θερμικό κυκλοποιητή Applied Biosystems Verity Thermal Cycler. Στο πρώτο στάδιο, 2 μL cDNA από το κάθε δείγμα ενισχύθηκαν σε μία αντίδραση τελικού όγκου 30 μL , παρουσία 1x PCR buffer, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM νουκλεοτιδίων, 5% DMSO, 1 pmol/ μL των αντίστοιχων ζευγών εκκινητών και 0.044 U/ μL DFS Taq DNA polymerase. Οι αλληλουχίες των εκκινητών και οι συνθήκες της αντίδρασης φαίνονται στον **Πίνακα 3**.

Στη συνέχεια, 2 μL από το προϊόν της 1^{ης} PCR αραιώθηκαν 1/5 με νερό και χρησιμοποιήθηκαν σε μία 2^η σειρά αντιδράσεων, με στόχο την ανίχνευση του κάθε ανασυνδυασμού ξεχωριστά (4 συνολικά αντιδράσεις). Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν, όπως και οι συνθήκες της αντίδρασης, ήταν όμοιες με αυτές της 1^{ης} PCR, αλλά σε κάθε μία από τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα ζεύγη εκκινητών για την ανίχνευση των TEL-AML1, E2A-PBX1, BCR-ABL p210 και p190 ανασυνδυασμών. Στη συνέχεια, 5 μL από τα προϊόντα της 2^{ης} PCR ηλετροφορήθηκαν σε πηκτική αγαρόζης 2% με βρωμιούχο αιθίδιο, παρουσία μάρτυρα DNA (**Εικόνα 6**).



Εικόνα 6. Ταυτοποίηση των ανασυνδυασμών E2A-PBX1, TEL-AML1, BCR-ABL p190 & p210 σε ασθενείς με ΟΛΛ. **A.** Διπλή multiplex PCR με μείγματα εκκινητών που καλύπτουν τους παραπάνω ανασυνδυασμούς. **B.** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της 2^{ης} multiplex PCR σε πηκτή αгарόζης παρουσία μάρτυρα DNA (1). Δείγματα θετικά για τους E2A-PBX1 (2), TEL-AML1 (3), BCR-ABL p190 (4) & p210 (5) ανασυνδυασμούς.

Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν είτε παλιότερα δείγματα με ήδη τεκμηριωμένο καρυότυπο, είτε οι κυτταρικές σειρές 697 και K562, για τις χρωμοσωμικές μετατοπίσεις E2A-PBX1 και BCR-ABL p210 αντίστοιχα. Προς επιβεβαίωση των χρωμοσωμικών βλαβών που ανιχνεύθηκαν με την παραπάνω τεχνική, πραγματοποιήθηκε ανάλυση αλληλουχίας βάσεων για ένα μέρος των δειγμάτων μετά από κατάλληλο καθαρισμό των PCR προϊόντων (Purelink PCR purification kit) και επεξεργασία αυτών στο γενετικό αναλυτή ABI Prism 310 (Applied Biosystems), με τη χρήση ειδικού kit (Big Dye Terminator DNA sequencing kit).

3.3.6. Έλεγχος του γονιδίου *TNFRSF13C/BAFFR* για τις μεταλλάξεις P21R και H159Y.

Για εκείνα τα δείγματα των ασθενών που πέραν της μεταγραφικής ανάλυσης του *BAFFR* πραγματοποιήθηκε και μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης του υποδοχέα, και

συγκεκριμένα γι αυτά που βρέθηκε να εκφράζουν τον υποδοχέα, ελέγξαμε την παρουσία 2 λειτουργικών πολυμορφισμών στο γονίδιο *BAFFR* πραγματοποιώντας PCR σε επίπεδο DNA.

A. Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε το PureLink Genomic DNA Kit που βασίζεται στην επιλεκτική δέσμευση του DNA σε μεμβράνη με βάση το πυρίτιο, παρουσία χαοτροπικών αλάτων. Σε σωληνάριο φυγοκέντρησης τύπου eppendorf των 1.5 mL μεταφέρθηκαν 200 μL από κάθε φιαλίδιο γενικής περιφερικού αίματος ή μυελού των οστών που περιείχε ως αντιπηκτικό το K₃EDTA. Στη συνέχεια προστέθηκαν 20 μL πρωτεΐνάσης K, υπεύθυνης για τη διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών στις καρβοξυτελικές θέσεις αλειφατικών, αρωματικών και υδρόφοβων αμινοξέων, και 20 μL RNάσης για την απομάκρυνση του RNA που υπάρχει στο δείγμα, ακολούθησε ανάδευση και τα δείγματα επώαστηκαν για 2 min (RT). Κατόπιν, προστέθηκαν 200 μL διαλύματος λύσης (Genomic Lysis/ Binding Buffer) που ενισχύει τη δραστηριότητα της πρωτεΐνάσης K, με στόχο την περαιτέρω αποδιάταξη των πρωτεϊνών και κατ' επέκταση την αποτελεσματικότερη λύση των κυττάρων, και ακολούθησε ανάδευση και επώαση στους 55°C για 25 min. Έπειτα προστέθηκαν 200 μL αιθανόλης 100% και ακολούθησε μεταφορά του μείγματος σε ειδική στήλη (Spin Column) η αιθανόλη σε συνδυασμό με το διάλυμα λύσης διευκολύνει την πρόσδεση του DNA στη στήλη μέσω της κατακρήμνισης που επιφέρει. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 10.000xg για 1 min και ακολούθησαν δύο διαδοχικές πλύσεις της στήλης, με προσθήκη 500 μL από τα διαλύματα Wash Buffer 1 και Wash Buffer 2 και φυγοκέντρηση στα 10.000xg για 1 min και στα 14.000xg για 3 min, αντίστοιχα, προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν προσμίξεις (πρωτεΐνες, RNA) και ενζυμικοί αναστολείς (π.χ. περίσσεια αιθανόλης από τα διαλύματα). Στο τελευταίο στάδιο, η στήλη μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο φυγοκέντρησης των 1.5 mL, όπου και προστέθηκαν 100 μL διαλύματος έκλυσης (PureLink Genomic Elution Buffer) σε αυτή. Ακολούθησε επώαση για 1 min για την αποτελεσματικότερη ενυδάτωση του DNA στη στήλη, και στη συνέχεια φυγοκέντρηση στα 14.000xg για 1 min. Τα δείγματα DNA διατηρήθηκαν στους -20°C μέχρι τη χρήση τους.

B. PCR για το γονίδιο του *BAFFR*.

Για την ανίχνευση των γενετικών βλαβών p.P21R (g.5106C>G, c.62C>G, rs77874543) και p.H159Y (g.6371C>T, c.475C>T, rs61756766), ενισχύθηκαν με συμβατική PCR τα εξόνια 1 και 3 του *BAFFR* γονιδίου. 100–200 ng γενομικού DNA πολλαπλασιάστηκαν σε

τελικό όγκο 30 μL παρουσία 1X ρυθμιστικού διαλύματος πολυμεράσης, 0.2 mM από κάθε τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο, 1 μM από τον κάθε εκκινητή (για την ενίσχυση της αντίστοιχης περιοχής), 0.15 mM MgCl_2 , 12% DMSO και 0.04 U/ μL του ενζύμου DFS Taq DNA πολυμεράση. Στον **Πίνακα 3** παρατίθενται οι αλληλουχίες των εκκινητών και οι συνθήκες της αντίδρασης. Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος κυκλικός μετατροπέας θερμοκρασίας Applied Biosystems Verity Thermal Cycler, και ακολουθήθηκαν όλες οι προφυλάξεις για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων σε κάθε πείραμα συμπεριλήφθηκε ένα σωληνάριο με dH_2O , αντί γενετικού υλικού, για τον έλεγχο της καθαρότητας των αντιδραστηρίων. Η ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%, ενώ για την απεικόνισή τους εκτέθηκαν σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

G. Πέψη με περιοριστικά ένζυμα

Για την ανίχνευση της p.P21R μετάλλαξης, πραγματοποιήθηκε πέψη των προϊόντων PCR του 1ου εξονίου με το ένζυμο περιορισμού EagI. Για την πέψη 6 μL προϊόντος PCR, χρησιμοποιήθηκαν 0.16 U/ μL του ενζύμου, παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος 10X NEBuffer 4, που παρέχεται από τον κατασκευαστή. Ακολούθησε ολονύκτια επώαση σε υδατόλουτρο στους 37°C και τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε 3% πηκτή αγαρόζης. Το ένζυμο αναγνωρίζει 2 θέσεις κοπής στην αλληλουχία αγρίου τύπου με αποτέλεσμα τη δημιουργία 3 τμημάτων (101, 62, 60 bp). Η παρουσία της γενετικής παραλλαγής καταργεί τη μία θέση κοπής οπότε κατά την ηλεκτροφόρηση εμφανίζονται 2 τμήματα (163, 60 bp) στην περίπτωση ενός ομόζυγου για τη βλάβη ατόμου, ενώ σε περίπτωση ετεροζυγωτίας προκύπτουν 4 τμήματα (163, 101, 62, 60 bp). Ως θετικοί μάρτυρες συμπεριλήφθηκαν δείγματα που δεν έφεραν τον εν λόγω πολυμορφισμό.

Για την μελέτη της p.H159Y γενετικής βλάβης, περάσαμε σε πέψη των προϊόντων PCR του εξονίου 3 με το ένζυμο περιορισμού MscI (NEB), μόνο στα δείγματα εκείνα που έφεραν την p.P21R γενετική παραλλαγή, λόγω του ότι η p.H159Y βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με την p.P21R αλλαγή. Για το σκοπό αυτό, 6 μL PCR προϊόντος επώαστηκαν παρουσία 0.32 U/ μL του ενζύμου, με τη χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος 10X NEBuffer 4. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 37°C για >16h και τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε 3% πηκτή αγαρόζης. Το ένζυμο αναγνωρίζει 1 θέση κοπής στην αλληλουχία αγρίου τύπου με αποτέλεσμα τη δημιουργία 2 τμημάτων (181, 142 bp). Η παρουσία της p.H159Y μετάλλαξης καταργεί τη θέση κοπής του ενζύμου, οπότε κατά την ηλεκτροφόρηση εμφανίζεται μία ζώνη στις 343 bp στην περίπτωση ενός ομόζυγου για τη

βλάβη ατόμου, ενώ σε περίπτωση ετεροζυγωτίας προκύπτουν 3 τμήματα (343, 181, 142 bp). Δείγματα που δεν έφεραν τον εν λόγω πολυμορφισμό αποτέλεσαν τους θετικούς μάρτυρες της πέψης με το MscI.

3.4. Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μία τεχνική που επιτρέπει την ανάλυση κυτταρικών πληθυσμών, με ταυτόχρονη μέτρηση πολλαπλών χαρακτηριστικών (π.χ. μέγεθος, ενδοκυττάρια κοκκίωση, έκφραση πρωτεϊνικών αντιγόνων) σε επίπεδο ενός μόνο κυττάρου, καθώς κύτταρα που βρίσκονται σε εναιώρημα διέρχονται μέσω μίας συσκευής μέτρησης που χρησιμοποιεί μία ή περισσότερες δέσμες laser και ανιχνευτές φωτός. Η λειτουργία της βασίζεται στην ικανότητα ανίχνευσης των σκεδαστικών χαρακτηριστικών των υπό διερεύνηση κυττάρων, τα οποία μπορεί να προέρχονται από χρωστικές ή σημασμένα με φθοριόχρωμα αντισώματα που στοχεύουν εξωκυττάρια ή ενδοκυττάρια πρωτεΐνες. Αυτή η προσέγγιση καθιστά την κυτταρομετρία ροής ισχυρό εργαλείο για τη λεπτομερή ανάλυση σύνθετων κυτταρικών πληθυσμών σε σύντομο χρονικό διάστημα. Στην παρούσα μελέτη, η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό των υποπληθυσμών των λευκών αιμοσφαιρίων. Η πρώτη διάκριση γίνεται με βάση τον πρόσθιο (forward scatter, FS) και πλάγιο σκεδασμό (side scatter, SS) των κυττάρων, όπου τα λευκοκύτταρα διαχωρίζονται σε υποπληθυσμούς με βάση το μέγεθος και την κοκκίωσή τους. Ωστόσο για τον ακριβή χαρακτηρισμό τους απαιτείται η χρώση τους με ειδικά αντισώματα συζευγμένα με φθοριοχρώματα. Προηγούμενης της ανάλυσης των λευκοκυττάρων στον κυτταρομετρητή ροής, απαιτείται λύση των ερυθροκυττάρων με κατάλληλο διάλυμα το οποίο συνδέεται εκλεκτικά στη μεμβράνη τους κι οδηγεί στην επικείμενη λύση τους, χωρίς ωστόσο να επηρεάζει τα χαρακτηριστικά των λευκοκυττάρων.

3.4.1. Τυποποίηση της B-ΟΛΛ με βάση τον ανοσοφαινότυπο

Για τον ανοσοφαινοτυπικό χαρακτηρισμό των λευχαιμικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν πρωτόκολλα τριπλού φθορισμού (**Πίνακας 10**), όπου πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη χρώση με τα μονοκλωνικά αντισώματα CD45 και CD19 σε συνδυασμό με τους δείκτες CD10, CD38, CD34, CD20, HLADR, CD9, CD33 (και/ή CD13) και CD2 (και/ή CD7). Η χρήση του CD45 συνετέλεσε στη διάκριση του λεγόμενου «βλαστικού παραθύρου» από τους υπόλοιπους πληθυσμούς των λευκοκυττάρων, αποτελούμενου από τους παθολογικούς B-λεμφοβλάστες που χαρακτηρίζονται από χαμηλή έκφραση του

συγκεκριμένου δείκτη, ενώ το CD19 αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε ως ένας επιπλέον δείκτης για το χαρακτηρισμό των Β-λεμφοβλαστών, καθώς τα κύτταρα αυτά όντας της Β-γενεαλογίας εκφράζουν την πρωτεΐνη. Οι υπόλοιποι δείκτες συνέβαλαν στην ταυτοποίηση του σταδίου ωρίμανσης των Β-λεμφοβλαστών, πλην των CD2/CD7 και CD33/CD13, που συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση καθώς οι Β-λεμφοβλάστες μπορεί να εκφράζουν απρόσφορα δείκτες είτε της Τ-σειράς (CD2/CD7) είτε της μυελικής σειράς (CD33/CD13). Ακόμη, χρησιμοποιήθηκε κι ένα σωληνάριο ελέγχου το οποίο περιείχε ισοτυπικά αντισώματα, δηλαδή αντισώματα χωρίς καμία ειδικότητα, ίδιου όμως υπότυπου, συγκέντρωσης και αναλογίας πρωτεΐνης-φθοριοχρώματος με τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο του κάθε κυτταρικού πληθυσμού. Τα ισοτυπικά αντισώματα χρησιμοποιούνται για να οριοθετήσουν την ειδική από τη μη ειδική σύνδεση των αντισωμάτων, προκειμένου να προσδιοριστεί το αληθώς θετικό σήμα για τον κάθε πληθυσμό. Για το σκοπό αυτό, 0.5×10^6 κύτταρα περιφερικού αίματος ή μυελικού εναιωρήματος επώαστηκαν με 10 μL από το κάθε αντίσωμα σε σκοτεινό μέρος για 15 min (RT). Κατόπιν, ακολούθησε λύση των ερυθρών με την προσθήκη 0.5 mL λυτικού διαλύματος (Versalyse) κι επώαση 15 min (RT). Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα αναλύθηκαν στον κυτταρομετρητή ροής FC500 της Beckman Coulter.

Για τον προσδιορισμό της ωριμότητας του Β-λεμφοβλάστη, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της κλωνικότητας των Β-κυττάρων με τη βοήθεια αντισωμάτων που στοχεύουν τις κ και λ ελαφρές αλυσούς του BCR, οι οποίες εκφράζονται από το στάδιο του ανώριμου Β-κυττάρου, λίγο πριν αυτό εγκαταλείψει το μυελό των οστών και βγει στην περιφέρεια, μέχρι τα ώριμα Β-κύτταρα. Στο πλαίσιο αυτό, 0.5×10^6 κύτταρα περιφερικού αίματος ή μυελικού εναιωρήματος επώαστηκαν με 0.5 mL λυτικού διαλύματος για 10 min. Πραγματοποιήθηκαν 2 πλύσεις στις 1600 rpm για 5 min για την πλήρη απομάκρυνση των ερυθρών και της περίσσειας του λυτικού διαλύματος και κατόπιν στα κύτταρα προστέθηκαν 10 μL ορού κόνικλου (negative control rabbit immunoglobulin fraction) προς αποφυγή της μη ειδικής σύνδεσης των υπό διερεύνηση αντισωμάτων. Μετά από επώαση 20 min στους 37°C , προστέθηκαν 10 μL του διπλού πολυκλωνικού αντισώματος Kappa Light Chains/FITC + Lambda Light Chains/RPE, που επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση των κ και λ ελαφρών αλυσών, και 10 μL του CD19 Pe-Cy5. Χρησιμοποιήθηκε επίσης ένα ακόμη σωληνάριο, όπου αντί των ειδικών αντισωμάτων για τις κ και λ αλυσούς, τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία ισοτυπικών αντισωμάτων. Ακολούθησε επώαση για 15 min σε σκοτεινό μέρος (RT), μία πλύση με 1X PBS, και κυτταρομετρική ανάλυση του δείγματος.

Πέραν της μελέτης των ελαφριών αλυσίδων του BCR, πραγματοποιήθηκε κι ενδοκυττάρια μελέτη της έκφρασης της μ βαριάς αλυσού του BCR (cIgM). Για το σκοπό αυτό, 1×10^6 κύτταρα τοποθετήθηκαν σε 2 δοκιμαστικά σωληνάρια (εκ των οποίων το ένα χρησιμοποιήθηκε ως σωληνάριο ελέγχου), πραγματοποιήθηκε αρχικά λύση των ερυθρών, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, και μετά από 2 πλύσεις τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία 10 μ L από τα μονοκλωνικά αντισώματα CD45 Pe-Cy5 και CD19 PE για 15 min σε σκοτεινό μέρος (RT). Κατόπιν, προστέθηκαν 100 μ L του Fix & Perm buffer A, υπεύθυνου για την μονιμοποίηση των κυττάρων, και τα κύτταρα επώαστηκαν για 15 min. Μετά από μία ακόμη πλύση, στα κύτταρα προστέθηκαν 100 μ L του Fix & Perm buffer B κι ακολούθησε επώαση για 5 min σε σκοτεινό μέρος, με στόχο την διαπερατοποίησή τους. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επώαστηκαν για 10 min παρουσία 10 μ L ορού κόνικλου, για την αποφυγή της μη ειδικής σύνδεσης των αντισωμάτων που συμπεριλαμβάνονται στην ενδοκυττάρια χρώση. Έπειτα προστέθηκαν 10 μ L του πολυκλωνικού αντισώματος IgM FITC, ενώ στο σωληνάριο ελέγχου προστέθηκαν 10 μ L του ισοτυπικού μάρτυρα IgG2 FITC. Τα δείγματα επώαστηκαν για 20 min σε σκοτεινό μέρος (RT), και μετά από μία πλύση τα κύτταρα αναλύθηκαν στον κυτταρομετρητή ροής. Παρόμοιο πρωτόκολλο ακολούθηθηκε και για την ανίχνευση της έκφρασης των ενδοκυττάρια αντιγόνων MPO, Lysozyme, CD3, TdT, CD79 α , για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό των B-λεμφοβλαστών. Για τον προσδιορισμό της έκφρασης των μορίων αυτών η εξωκυττάρια χρώση περιλάμβανε το CD45 μονοκλωνικό αντίσωμα, και μετά από μονιμοποίηση και διαπερατοποίηση των κυττάρων, ακολούθησε η ενδοκυττάρια χρώση για τους προαναφερθέντες δείκτες.

Πίνακας 10. Συνδυασμοί αντισωμάτων για την τυποποίηση της B-ΟΛΛ.

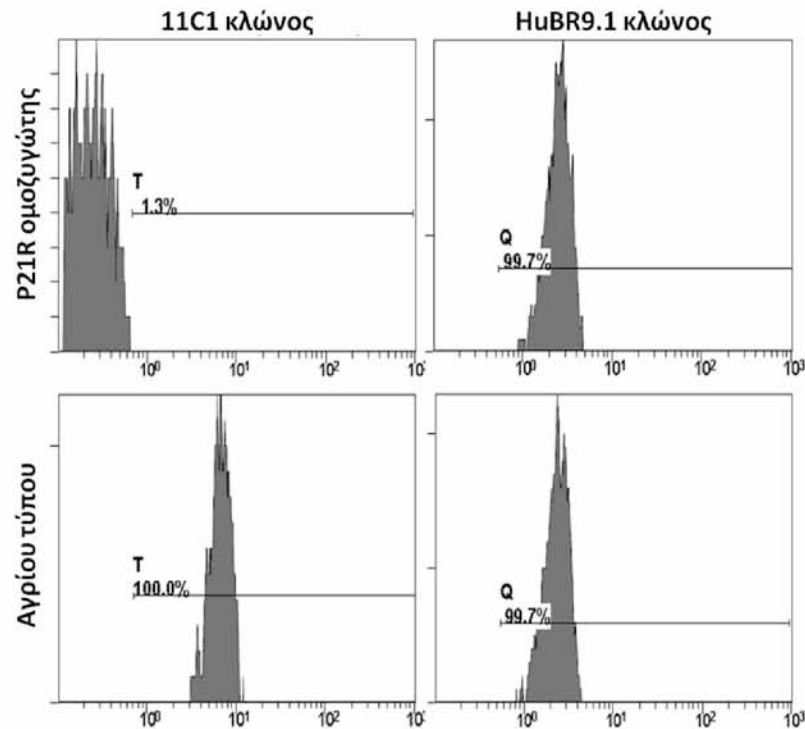
	FITC	PE	PE-Cy5
Επιφανειακή χρώση	IgG1	IgG1	CD45
	CD19	CD10	CD45
	CD38	CD19	CD45
	CD34	CD19	CD45
	CD20	CD19	CD45
	CD9	CD19	CD45
	CD19	HLADR	CD45
	CD2/CD7	CD19	CD45
	CD33/CD13	CD19	CD45
	IgG2	IgG2	CD19
Kappa	Lamda	CD19	
Ενδοκυττάρια χρώση	IgG2	CD19	CD45
	IgM	CD19	CD45
	IgG1	IgG1	CD45
	MPO/Lysozyme	CD3	CD45
	TdT	CD79 α	CD45

3.4.2. Έλεγχος της έκφρασης της πρωτεΐνης BAFF-R στα νεοπλασματικά και στα φυσιολογικά B-κύτταρα.

5×10^5 κύτταρα περιφερικού αίματος ή μυελού των οστών σημάνθηκαν με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των CD45 PE-Cy5, CD19 FITC και BAFF-R PE μορίων για 15 min. Η χρήση του CD45 αντισώματος συνέβαλε στη διάκριση του βλαστικού παραθύρου από τους υπόλοιπους πληθυσμούς των λευκοκυττάρων, ενώ σε συνδυασμό με το CD19 δείκτη επέτρεψε την ταυτόχρονη ανίχνευση των νεοπλασματικών B-λεμφοβλαστών και των ώριμων B-λεμφοκυττάρων. Για την οριοθέτηση του ειδικού από τον μη ειδικό φθορισμό, χρησιμοποιήθηκε σε ξεχωριστό σωληνάριο (ως μάρτυρας) μονοκλωνικό αντίσωμα IgG1 άσχετης ειδικότητας αλλά ίδιου ισοτύπου, συζευγμένο με PE φθοριόχρωμα όπως το ειδικό για το BAFF-R αντίσωμα. Στη συνέχεια ακολούθησε λύση των ερυθροκυττάρων με κατάλληλο διάλυμα για 10 min και τα κύτταρα αναλύθηκαν στον κυτταρομετρητή. Η έκφραση του BAFF-R στα φυσιολογικά ώριμα B-λεμφοκύτταρα ασθενών με Β-ΟΛΛ αποτέλεσε ενδογενή μάρτυρα επιτυχούς χρώσης (όπου αυτό ήταν εφικτό).

Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι ο συγκεκριμένος κλώνος αντισώματος (11C1) που χρησιμοποιήθηκε στην εξωκυττάρια χρώση για τη μελέτη της έκφρασης του BAFF-R παρουσιάζει αδυναμία ανίχνευσης της πρωτεΐνης σε περιπτώσεις ατόμων που φέρουν σε ομοζυγωτία την *BAFFR*-P21R βλάβη -καθώς αναγνωρίζει αντιγονικό επίτοπο που περιλαμβάνει το 21^ο αμινοξύ της πρωτεΐνης- πραγματοποιήθηκε χρώση των κυττάρων με ένα άλλο αντίσωμα για το BAFF-R που αναγνωρίζει διαφορετικό επίτοπο (κλώνος HuBR9.1, **Εικόνα 7**). Για την ανάλυση των δειγμάτων, 5×10^5 κύτταρα περιφερικού αίματος ή μυελού των οστών επώαστηκαν σε 2 σωληνάρια για 15 min με λυτικό διάλυμα, για την απομάκρυνση των ερυθροκυττάρων. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 1600 rpm για 5 min, και ακολούθησε άλλη μία πλύση με 1X PBS διάλυμα για την απομάκρυνση της περίσσειας του λυτικού διαλύματος και των νεκρών κυττάρων. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 1X PBS διάλυμα που περιείχε 5% FBS και 0.04% αζίδιο του νατρίου και προστέθηκαν σε αυτά τα μονοκλωνικά αντισώματα CD19 PE, CD45 PE-Cy5 και BAFF-R ATTO 488 ενώ στο σωληνάριο ελέγχου προστέθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα IgG1 ATTO 488 αντί του BAFFR, για τον διαχωρισμό του ειδικού από τον μη ειδικό φθορισμό. Ακολούθησε επώαση στους 4°C για 30 min, και κατόπιν μία πλύση στις 1600 rpm για 5 min. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου έγινε ανασύσταση σε 1X PBS διάλυμα και ανάλυση στον κυτταρομετρητή. Να σημειωθεί ότι το συγκεκριμένο πρωτόκολλο

ακολουθήθηκε για εκείνα τα δείγματα των οποίων η ανάλυση του BAFF-R στα εναπομείναντα φυσιολογικά ώριμα Β-λεμφοκύτταρα των ασθενών έδειξε μηδενική έκφραση.



Εικόνα 7. Ανίχνευση επιφανειακής έκφρασης του BAFFR με 2 διαφορετικούς κλώνους αντισωμάτων σε ασθενή με ομοζυγωτία για τον p.P21R πολυμορφισμό και σε έναν φυσιολογικό μάρτυρα.

3.4.3. Έλεγχος της έκφρασης των πρωτεϊνών TACI και BCMA στα νεοπλασματικά Β-κύτταρα.

Για τον κυτταρομετρικό προσδιορισμό της έκφρασης των πρωτεϊνών TACI και BCMA, 5×10^5 κύτταρα περιφερικού αίματος ή μυελού των οστών μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια κυτταρομετρίας (ένα σωληνάριο ελέγχου κι ένα σωληνάριο δοκιμασίας για τον έλεγχο της έκφρασης της κάθε πρωτεΐνης) και προστέθηκαν σε αυτά 500μL λυτικού διαλύματος. Έπειτα από επώαση 10 min, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 1600 rpm για 5 min. Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου, έγινε ανασύσταση του ιζήματος των κυττάρων σε 1X PBS ρυθμιστικό διάλυμα κι ακολούθησε άλλη μία φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Κατόπιν, αφαιρέθηκε η υγρή φάση και προστέθηκαν στο σωληνάριο ελέγχου και στο σωληνάριο δοκιμασίας για το TACI 5μL ορού αρουραίου (rat serum) και στα σωληνάρια ελέγχου και δοκιμασίας για το BCMA 5μL ορού ποντικού (mouse serum), με σκοπό να παρεμποδιστεί η μη ειδική σύνδεση των ειδικών για τα TACI και BCMA αντισωμάτων. Ακολούθησε επώαση για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν έγινε χρώση με τα μονοκλωνικά αντισώματα. Σε όλα τα σωληνάρια (ελέγχου και δοκιμασίας) προστέθηκαν 10 μL των

αντισωμάτων CD19 FITC και CD45 PE-Cy5, ενώ όσον αφορά τον έλεγχο της έκφρασης του TACI προστέθηκαν στο σωληνάριο δοκιμασίας 5 μ L TACI PE αντίσωμα ή αντίστοιχη ποσότητα από το μονοκλωνικό αντίσωμα IgG2a αρουραίου στο σωληνάριο ελέγχου. Ομοίως, για την μέτρηση της έκφρασης του BCMA προστέθηκαν 5 μ L BCMA PE αντίσωμα στο σωληνάριο δοκιμασίας ή αντίστοιχη ποσότητα από το μονοκλωνικό αντίσωμα IgG2a ποντικού στο σωληνάριο ελέγχου. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου και σκοτεινό μέρος, ακολούθησε πλύση στις ίδιες συνθήκες που αναφέρθηκαν προηγουμένως, επανασύσταση του ιζήματος σε κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος και κυτταρομετρική ανάλυση του δείγματος.

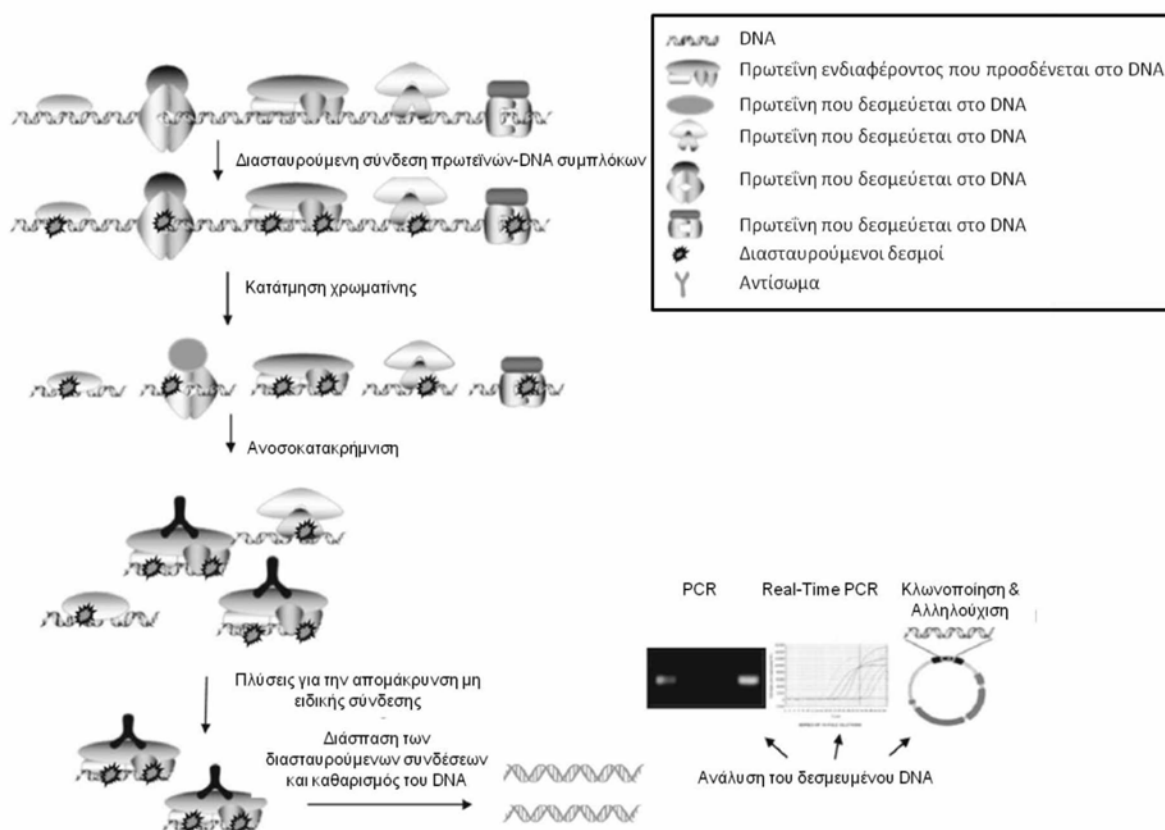
3.4.4. Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση των προγονικών B-κυττάρων φυσιολογικών ατόμων

Μυελικά εναιωρήματα εμπλουτισμένα σε αιματογόνια από 5 φυσιολογικά άτομα (3 ενήλικες, 2 παιδιά) στα πλαίσια αποκλεισμού κάποιας υποκείμενης νεοπλασίας αναλύθηκαν για την ωρίμανση των B-κυττάρων. Για το σκοπό αυτό, 0.5×10^6 κύτταρα επώαστηκαν παρουσία 10 μ L CD19 Pe-Cy5 και CD10 PE σε συνδυασμό με ένα από τα παρακάτω αντισώματα συζευγμένα με FITC φθοριόχρωμα: CD20, CD38, CD34. Στη συνέχεια ακολούθησε λύση των ερυθρών και κυτταρομετρική ανάλυση. Επιπλέον, μελετήθηκε η ενδοκυττάρια έκφραση της μ βαριάς αλυσού του BCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε προηγουμένως για τους B-λεμφοβλάστες, όπου για την επιφανειακή χρώση χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα CD19 Pe-Cy5 και CD10 PE και για την ενδοκυττάρια το IgM FITC. Για τον καλύτερο χαρακτηρισμό των υποπληθυσμών, αναλύθηκαν >1000 B-κύτταρα στο σύνολο.

Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης μας που έδειχναν μία πρόωμη έναρξη της έκφρασης του BAFFR από τους B-λεμφοβλάστες ασθενών με Β-ΟΛΛ, θελήσαμε να διερευνήσουμε την έκφραση του BAFF-R σε διαφορετικά στάδια της ωρίμανσης των φυσιολογικών B-κυττάρων. Για το σκοπό αυτό, 5×10^5 κύτταρα μυελού των οστών των παραπάνω δειγμάτων σημάνθηκαν με ειδικά αντισώματα έναντι των CD10 FITC, CD19 PE-Cy5 και BAFF-R PE. Η χρήση του CD10 μορίου συντέλεσε στον χαρακτηρισμό των διαφορετικών B-υποπληθυσμών (αιματογόνια και ώριμα B-λεμφοκύτταρα) ως προς την έκφραση της BAFF-R πρωτεΐνης. Και στις δοκιμές αυτές, χρησιμοποιήθηκε ισοτυπικό αντίσωμα για το διαχωρισμό του ειδικού από τον μη ειδικό φθορισμό για το BAFF-R, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

3.5. Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης και Real Time PCR

Η ανοσοκατακρήμιση της χρωματίνης (ChIP) αποτελεί μία προσέγγιση που επιτρέπει τον προσδιορισμό αλληλεπιδράσεων μεταξύ γονιδιώματος-πρωτεώματος. Η δυναμική των ChIP δοκιμών βασίζεται στην ικανότητά τους να αποτυπώσουν συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-DNA σε ένα σύστημα, παρέχοντας τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης των αλληλεπιδράσεων αυτών σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές, όπως η Real Time PCR. Η δοκιμή ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης απαιτεί ένα συνδυασμό μεθόδων πρωτεωμικής και μοριακής βιολογίας συμπεριλαμβανομένων της μονιμοποίησης των κυττάρων, της λύσης αυτών, της κατάτμησης της χρωματίνης, της μεσολαβούμενης από αντίσωμα ανοσοκατακρήμισης, της απομόνωσης του DNA και της PCR (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της δοκιμασίας ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης.

Με βάση τα δεδομένα που προέκυψαν από την ανάλυση της μεταγραφικής έκφρασης των μορίων του BAFF/APRIL συστήματος στους ασθενείς με ΟΛΛ και στο πλαίσιο διερεύνησης μιας πιθανής ρύθμισης της μεταγραφικής έκφρασης του *BAFFR* από τον E2A-PBX1 μεταγραφικό παράγοντα, η προ-B-ΟΛΛ 697 κυτταρική σειρά, που φέρει τον E2A-

PBX1 ανασυνδυασμό κι εκφράζει τον BAFFR υποδοχέα, καλλιεργήθηκε σε φλάσκες 75 mm² μέχρι τα κύτταρα να καλύψουν το 80-90% της επιφάνειας της φλάσκας (περίπου 30 x 10⁶ κύτταρα/φλάσκα). Στη συνέχεια έγινε μονιμοποίηση των κυττάρων με προσθήκη 37% φορμαλδεΐδης, σε τελικό ποσοστό της τάξης του 1%, και ανάδευση για 20 min σε RT. Με τη φορμαλδεΐδη επιτυγχάνεται η σταθεροποίηση των ομοιοπολικών συνδέσεων πρωτεϊνών στο DNA, εξασφαλίζοντας έτσι τη συ-κατακρήμνιση του DNA με την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Η παύση της δράσης της φορμαλδεΐδης επήλθε με την προσθήκη υδατικού διαλύματος γλυκίνης σε τελική συγκέντρωση 0.125 M, ακολουθούμενη από ήπια ανάδευση. Κατόπιν, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια φυγοκέντρωσης των 50 mL και φυγοκεντρήθηκαν στις 1200 rpm για 5 min. Ακολούθησε πλύση με κρύο 1X PBS εμπλουτισμένο με αναστολείς πρωτεασών στις 1200 rpm για 5 min (4°C). Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύθηκε σε κρύο 1X PBS, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια erpendorf και ακολούθησε πλύση σε μικροφυγόκεντρο (1200 rpm, 5 min, 4°C). Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου, τα φιαλίδια με το ίζημα των κυττάρων αποθηκεύθηκαν στους -80°C, μέχρι το επόμενο στάδιο.

Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε διάλυμα κυτταρικής λύσης που περιείχε SDS και αναστολείς πρωτεασών. Η κατάτμηση της χρωματίνης σε τμήματα μεγέθους των ~200-1000 bp έγινε με τη χορήγηση υπερήχων, όπου τα κύτταρα εκτέθηκαν για χρόνο 5 min παραμένοντας στον πάγο, καθότι η όλη διαδικασία παράγει θερμότητα η οποία μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή της χρωματίνης. Στη συνέχεια, τα φιαλίδια φυγοκεντρήθηκαν στα 12.000xg για 10 min (4 °C) και τα υπερκείμενα τα οποία περιείχαν καθαρά θραύσματα χρωματίνης μεταφέρθηκαν σε νέα φιαλίδια, όπου προσδιορίσαμε τη συγκέντρωση της χρωματίνης με τη μέθοδο Bradford.

Προκειμένου να καθορίσουμε τα βαθμό κατάτμησης της χρωματίνης, μέρος αυτής ηλκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης μετά από απομόνωση του DNA. Συγκεκριμένα, μία μικρή ποσότητα του υπερκειμένου (~ 20 µL) που περιείχε την κατατμημένη χρωματίνη επώαστηκε παρουσία δεκαπλάσιου όγκου κατάλληλου διαλύματος (Tris-EDTA, 1% SDS) στους 65°C για ~16 ώρες, με στόχο να σπάσουν οι δεσμοί μεταξύ πρωτεϊνών και DNA που είχαν σταθεροποιηθεί παρουσία της φορμαλδεΐδης. Στη συνέχεια, στο μείγμα προστέθηκε RNάση σε τελική συγκέντρωση 50 ng/µL, ακολούθησε επώαση στους 37°C για 30 min, και κατόπιν επίδραση με πρωτεϊνάση (στην ίδια συγκέντρωση με την RNάση) στους 45°C για 1h. Μετά την προσθήκη NaCl (σε τελική συγκέντρωση 0.3 M), έγινε απομόνωση του DNA με τη μέθοδο φαινόλης-χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης. Συγκεκριμένα, στο παραπάνω μείγμα προστέθηκε ίσος όγκος φαινόλης-χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (αναλογία διαλυμάτων 25:24:1), και μετά από γρήγορη ανάδευση, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις

13.000 rpm για 10 min. Η υδατική φάση που σχηματίστηκε μεταφέρθηκε σε νέο eppendorf κι ακολούθησε κατακρήμνιση του DNA με την προσθήκη 100% αιθανόλης (που περιείχε γλυκογόνο σε συγκέντρωση 0.2-0.4 μg/μL) 2.5 φορές τον όγκο της τελικής υδατικής φάσης. Τα δείγματα επώαστηκαν για ~16 h στους -20°C, έπειτα φυγοκεντρήθηκαν στις 13.000 rpm για 30 min (4°C), και μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου, στο ίζημα που περιείχε το κατακρημνισμένο DNA προστέθηκε 1 mL 70% αιθανόλης. Πραγματοποιήθηκε ήπια ανάδευση και φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 5 min (4°C), και μετά την πλήρη απομάκρυνση της αιθανόλης, το DNA ενυδατώθηκε σε Tris-EDTA διάλυμα και ηλεκτροφορήθηκε σε 1% πηκτή αραρόζης, όπου και διαπιστώθηκε η παρουσία των επιθυμητών τμημάτων μήκους 200-1000 bp.

Η δοκιμή ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης πραγματοποιήθηκε με βάση της οδηγίες του κατασκευαστή για το EZ-ChIP kit. Αρχικά, για τις αντιδράσεις ανοσοκατακρήμνισης, 200 μg κατατμημένης χρωματίνης τοποθετήθηκαν σε 6 φιαλίδια eppendorf (συνολικά έλαβαν χώρα 6 ανοσοκατακρημνίσεις, τρεις με το προς μελέτη αντίσωμα και τρεις με το αντίσωμα-μάρτυρα) και αραιώθηκαν 1:10 με κατάλληλο διάλυμα (ChIP dilution buffer) που περιείχε αναστολείς πρωτεασών· 1% της αραιωμένης χρωματίνης από κάθε φιαλίδιο αποθηκεύθηκε ως δείγμα αναφοράς (input) στους -80°C. Στη συνέχεια προστέθηκαν στα φιαλίδια με την αραιωμένη χρωματίνη 40 μL σφαιριδίων αραρόζης καλυμμένα με πρωτεΐνη G (ChIP bloCked Protein G Agarose) και ακολούθησε επώαση για 1 h στους 4°C με ανάδευση και ήπια φυγοκέντρωση (3000xg για 1 min)· το στάδιο αυτό αποσκοπούσε στην απομάκρυνση πρωτεϊνών ή DNA που θα μπορούσαν να συνδεθούν μη ειδικά στα σφαιρίδια αραρόζης-πρωτεΐνης G. Τα υπερκείμενα της φυγοκέντρωσης μεταφέρθηκαν σε νέα φιαλίδια για τις ανοσοκατακρημνίσεις και σε αυτά προστέθηκαν 6 μg είτε του E2A-PBX1 αντισώματος, που ανιχνεύει την χιμαιρική πρωτεΐνη, είτε ενός φυσιολογικού IgG αντισώματος ποντικού και ακολούθησε επώαση στους 4°C, για ~16 ώρες, με ήπια ανάδευση (4°C). Την επόμενη μέρα, προσετέθησαν 70 μL σφαιριδίων αραρόζης-πρωτεΐνης G τα οποία συνδέονται εκλεκτικά σε σύμπλοκα αντισώματος/DNA, και πραγματοποιήθηκε επώαση για 2 h στους 4°C· η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη G αναγνωρίζει τη σταθερή περιοχή του μορίου των αντισωμάτων, ενώ η παρουσία του BSA στο διάλυμα των σφαιριδίων συμβάλλει στην αποφυγή μη ειδικής αλληλεπίδρασης της χρωματίνης με την ελεύθερη επιφάνεια των σφαιριδίων. Τα φιαλίδια φυγοκεντρήθηκαν (3000xg για 1 min), και μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου τα σωματίδια αραρόζης-πρωτεΐνης G-πρωτεΐνης ενδιαφέροντος-DNA ξεπλύθηκαν με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στα 3000xg για 2 min, με 1 mL από τα παρακάτω διαλύματα: διάλυμα χαμηλής αλατότητας (Low Salt Immune Complex Wash Buffer), διάλυμα υψηλής

αλατότητας (High Salt Immune Complex Wash Buffer), διάλυμα πλύσης LiCl (LiCl Immune Complex Wash Buffer), TE ρυθμιστικό διάλυμα (TE Buffer) (2 πλύσεις).

Μετά την τελευταία πλύση και προκειμένου να αποδεσμεύσουμε τα σύμπλοκα αντισώματος-χρωματίνης από τα σωματίδια αγαρόζης, προσετέθησαν σε κάθε φιαλίδιο 100 μL διάλυμα έκλουσης των κατακρημνίσεων (1% SDS, 0.1 M NaHCO_3 σε στείρο απεσταγμένο νερό). Έπειτα από ήπια ανάδευση και επώαση για 15 min (RT), πραγματοποιήθηκε σύντομη φυγοκέντρηση και τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν σε νέα φιαλίδια, όπου έλαβε χώρα ακόμη μία πλύση των σφαιριδίων με 100 μL διαλύματος έκλουσης, και τελικά τα υπερκείμενα από τις 2 πλύσεις συλλέχθηκαν σε ένα ενιαίο σωληνάριο (τελικός όγκος υπερκειμένου: 200 μL). Στα φιαλίδια που είχαν αποθηκευθεί ως μάρτυρες (input) στους -80°C , προστέθηκαν επίσης 200 μL από το διάλυμα έκλουσης.

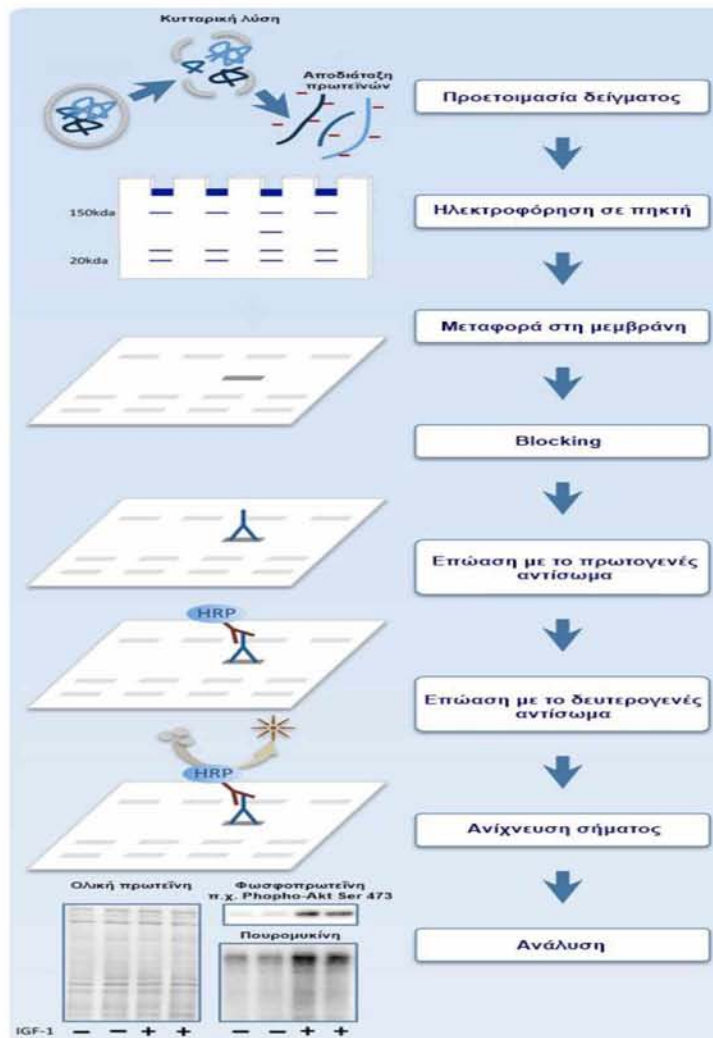
Προκειμένου να αίρουμε τη σύνδεση πρωτεϊνών-DNA, προσθέσαμε NaCl σε τελική συγκέντρωση 0.3 M και επώασαμε στους 65°C για ~ 7 h. Στη συνέχεια επιδράσαμε με RNάση A (50 ng/ μL τελική συγκέντρωση) για 45 min (37°C) και κατόπιν προσετέθησαν επιπλέον 4 μL 0.5M EDTA, 8 μL 1M Tris-HCl και 1 μL πρωτεϊνάση K και επώασαμε στους 45°C για 1-2 h. Έπειτα, περάσαμε στην απομόνωση του DNA, ξεκινώντας με τη προσθήκη πενταπλάσιου όγκου διαλύματος Bind Reagent “A”. Ακολούθησε μεταφορά του μείγματος σε 2 βήματα σε στήλη απομόνωσης και φυγοκέντρηση στις 13.000xg για 30 sec, μία πλύση με το διάλυμα Wash Reagent “B” (13.000xg, 30 sec) και τέλος στέγνωμα του φίλτρου για την πλήρη απομάκρυνση υπολειμμάτων διαλυμάτων με φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο φιαλίδιο eppendorf και σε αυτή προστέθηκαν 50 μL διαλύματος έκλουσης C (Elution Buffer “C”) κι έπειτα από φυγοκέντρηση (13.000xg, 30 sec), έγινε ανάκτηση του DNA το οποίο και αποθηκεύθηκε στους -20°C .

Στη συνέχεια, τα DNA αυτά (ανοσοκατακρημνισμένη χρωματίνη) χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα στη Real Time PCR με σκοπό να διερευνήσουμε με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών συγκεκριμένες περιοχές στο γονίδιο του *BAFFR* που φέρουν πιθανές θέσεις πρόσδεσης για τον E2A-PBX1 (υποκινητής, 2^ο ιντρόνιο, 3' UTR), ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε περιοχή που δεν έφερε τέτοια μοτίβα. Οι αντιδράσεις της Real-Time PCR πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφηκε προηγουμένως, όπου 2 μL από το 1:10 αραιωμένο DNA από την κάθε αντίδραση ανοσοκατακρήμνισης ενισχύθηκε εις διπλούν παρουσία μείγματος αποτελούμενο από Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG και 0.4 μM από το αντίστοιχο ζευγάρι εκκινητών, σε τελικό όγκο 25 μL . Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3**.

Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε σύμφωνα με τους Litt και συν, όπου υπολογίσαμε πόσες φορές περισσότερα DNA μόρια-στόχοι (υποκινητής, 2^ο ιντρόνιο, 3' UTR, περιοχή-μάρτυρας) του E2A-PBX1 υπάρχουν στα δείγματα (ανοσοκατακρημνισμένα κλάσματα) που χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα που ανιχνεύει τον ανασυνδυασμό ή το αντίσωμα-μάρτυρας, ως προς τα δείγματα ελέγχου (input), που δεν προστέθηκε αντίσωμα (ChIP/Input= $2^{\text{Input Ct}-\text{ChIP Ct}}$).¹⁵²

3.6. Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Η ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western blot) αποτελεί μία αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται στην κυτταρική και μοριακή βιολογία για την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνικών μορίων από ένα μείγμα πρωτεϊνών, προερχόμενων από ομογενοποιημένο ιστό ή κυτταρικό εκχύλισμα. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, οι πρωτεΐνες αρχικά διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή, στη συνέχεια μεταφέρονται («αποτυπώνονται») σε μεμβράνη υψηλής συγγένειας για πρωτεΐνες, όπου με τη χρήση σημασμένων αντισωμάτων ανιχνεύονται οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος στην επιφάνεια της μεμβράνης (**Εικόνα 9**).



Εικόνα 9. Τα στάδια της ανοσοαποτύπωσης κατά Western [προέλευση από Bass και συν. (2017), με τροποποιήσεις].¹⁵³

Στην παρούσα μελέτη, η τεχνική του Western blot χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του NF-κB2 (p100 & p52 υπομονάδες), του BAFFR, της IκBα και του 4E-BP1, σε καλλιέργειες της προ-B-ΟΛΛ κυτταρικής σειράς 697 και/ή λεμφοβλαστών ασθενών με Β-ΟΛΛ. Παρακάτω περιγράφεται αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την ανίχνευση των πρωτεϊνών στα υπό εξέταση δείγματα.

A. Απομόνωση πρωτεϊνών

2×10^6 κύτταρα από την κυτταρική σειρά προ-B-ΟΛΛ 697 και 0.5×10^6 λεμφοβλάστες ασθενών με Β-ΟΛΛ καλλιεργήθηκαν σε πιάτα των 48 οπών στους 37°C , υπό την επίδραση διαφορετικών παραγόντων. Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε φιαλίδια τύπου erpendorf, φυγοκεντρήθηκαν στις 10.000 rpm για 2 min (4°C) και το

υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Για να απομονωθούν οι πρωτεΐνες, τα κύτταρα επώαστηκαν σε υψηλή θερμοκρασία παρουσία λυτικού διαλύματος που περιείχε το ανιονικό απορρυπαντικό μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου (sodium dodecyl sulfate, SDS) και τον αναγωγικό παράγοντα β-μερκαπτοαιθανόλη. Η β-μερκαπτοαιθανόλη διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς καταστρέφοντας τη δευτεροταγή και τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης, οδηγώντας στο ξεδίπλωμα αυτής, μετατρέποντάς την σε γραμμικό μόριο κι επιτρέποντας της να κινηθεί στην πηκτή ηλεκτροφόρησης ανάλογα με το μοριακό της βάρος. Το SDS, εκτός του ότι αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, δεσμεύεται πάνω σε αυτές προσδίδοντάς τους ένα ενιαίο αρνητικό φορτίο, καλύπτοντας το ενδογενές φορτίο των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων. Επειδή το SDS προσδέεται ομοιόμορφα σε αποδιαταγμένες πρωτεΐνες (1.4 gr SDS/gr πρωτεΐνης), το συνολικό φορτίο της πρωτεΐνης γίνεται ανάλογο του μοριακού βάρους του SDS, καθορίζοντας το διαχωρισμό των πρωτεϊνών στο επόμενο στάδιο. Η χρήση του SDS και της β-μερκαπτοαιθανόλης διασφαλίζει ότι οι πρωτεΐνες θα διαχωριστούν μόνο με βάση το μοριακό τους βάρος κι όχι βάση του φορτίου ή της τρισδιάστατης δομής τους.

Συγκεκριμένα λοιπόν, στο ίζημα των κυττάρων προστέθηκε 1x διάλυμα λύσης, αραιωμένο με δις απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα λύσης (4x) αποτελούνταν από 40% γλυκερόλη, 240 mM Tris-HCl pH 6.8, 8% SDS, 0.04% κυανού της βρωμοφαινόλης και 5% β-μερκαπτοαιθανόλη. Ακολούθησε γρήγορη ανάδευση για 5 sec και τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 95°C για 5 min, το οποίο συνετέλεσε στην περαιτέρω αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Μετά την επιτυχή απομόνωση και αποδιάταξη των πρωτεϊνών, ακολούθησε μεταφορά των δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, PAGE) και κάθετη ηλεκτροφόρηση κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες για το διαχωρισμό αυτών με βάση το μοριακό τους βάρος.

B. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου.

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών επιτρέπει το διαχωρισμό των αρνητικά φορτισμένων πρωτεϊνικών μορίων καθώς αυτά διέρχονται μέσω πηκτής υπό την επίδραση ηλεκτρικού ρεύματος. Οι πηκτές αυτές λειτουργούν ως μοριακοί ηθμοί, διότι λόγω της πορώδους δομής τους καθιστούν ευκολότερο το διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Υλικό επιλογής για το σχηματισμό των πηκτών αποτελεί η πολυακρυλαμίδη, ένα θερμοσταθερό και σχετικά χημικά αδρανές μέσο, αρκετά ευέλικτο καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή πηκτών με ποικίλο εύρος πόρων.

Οι πηκτές πολυακρυλαμίδης σχηματίζονται όταν σε διάλυμα μονομερών ακρυλαμίδης και Ν'-μεθυλενοδισακρυλαμίδιου, προστεθούν ο χημικός εκκινητής του συμπολυμερισμού

υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulfate, APS) και ο καταλύτης N,N,N,N'-τετραμεθυλενοδιαμίνη (N,N,N,N'- tetramethylenediamine, TEMED), που προάγει την παραγωγή ελεύθερων ριζών από το APS, που συμβάλλουν στον πολυμερισμό των μορίων ακρυλαμίδης. Το μέγεθος των πόρων είναι αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης ακρυλαμίδης και επηρεάζει και τη μεταναστευτική ικανότητα των πρωτεϊνών εντός της πηκτής.

B1. Πειραματική διαδικασία

Για τη βέλτιστη ανάλυση των πρωτεϊνών, η ηλεκτροφόρησή τους έγινε σε πηκτική SDS-PAGE δύο διαστάσεων, η οποία παρασκευάστηκε σε ειδική υάλινη μήτρα πάχους 1.5 mm. Η πηκτική αποτελούνταν από 2 τμήματα:

1. Το κατώτερο τμήμα (πηκτική διαχωρισμού), το οποίο κατασκευάζεται από υψηλότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης, έχει βασικό pH (8.8), με πιο μικρούς πόρους επιτρέποντας τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών βάση του μοριακού τους βάρους. Για το σχηματισμό μίας 10% πηκτής διαχωρισμού χρησιμοποιήθηκαν: 3.75 mL 1M Tris-HCl pH 8.8, 5 mL 30% διάλυμα Ακρυλαμίδης/Δις Ακρυλαμίδης, 6 μ L TEMED, 150 μ L 10% APS, 6.1 mL H₂O. Στην ειδική κατασκευή προστέθηκαν 7.2 mL του διαλύματος αυτού, κι επάνω σε αυτό περί τα 170 μ L ισοπροπανόλης για την ευθυγράμμιση της επιφάνειας της πηκτής. Το διάλυμα αφέθηκε να πήξει για 30 min, κατόπιν απομακρύνθηκε προσεκτικά η ισοπροπανόλη, και αφού η επιφάνεια στέγνωσε, πάνω στην πηκτική διαχωρισμού τοποθετήθηκε το δεύτερο τμήμα.

2. Το ανώτερο τμήμα (πηκτική επιστοιβάξης) που έχει χαμηλότερη περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδη, όξινο pH (6.8) κι επιτρέπει στο δείγμα να συγκεντρωθεί εντός μίας στενής ζώνης κατά την έναρξη της ηλεκτροφόρησης, πριν περάσει στο τμήμα εκείνο της πηκτής στο οποίο θα λάβει χώρα ο διαχωρισμός. Για την παρασκευή μίας 5% πηκτής επιστοιβάξης χρησιμοποιήθηκαν: 1.5 mL 1M Tris-HCl pH 6.8, 1 mL 30% διάλυμα Ακρυλαμίδης/Δις Ακρυλαμίδης, 6 μ L TEMED, 60 μ L 10% APS, 3.45 mL H₂O. Κατόπιν, 2.6 mL από το διάλυμα αυτό τοποθετήθηκαν επάνω στην πηκτική διαχωρισμού, όπως επίσης και το ειδικό χτενάκι με πάχος οπών 1.5 mm. Το διάλυμα αφέθηκε να πήξει για περίπου 30 λεπτά και στη συνέχεια αφαιρέθηκε το χτενάκι.

Η κάθετη ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στη συσκευή Mini-PROTEAN Tetra Cell (Biorad) σε θερμοκρασία δωματίου, παρουσία διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Running buffer) αποτελούμενο από 248 mM Tris Base, 1.9 M γλυκίνη, 35 mM SDS σε δις απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα αυτό αραιώθηκε 10 φορές πριν τοποθετηθεί

στην συσκευή. Τα δείγματα (20 μL από το καθένα) μεταφέρθηκαν στις οπές της πηκτής και αρχικά η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 80 V για 30 min, έως ότου τα δείγματα εισχωρήσουν στην πηκτική διαχωρισμού ταυτόχρονα. Η διεπιφάνεια των δύο πηκτών αποτελεί ουσιαστικά την έναρξη διαχωρισμού των πρωτεϊνών με βάση το μέγεθός τους. Στη συνέχεια, η ηλεκτροφόρηση συνεχίστηκε στα 120 V για περίπου 1 ώρα. Η έξοδος της χρωστικής (κυανούν της βρωμοφαινόλης) που περιλαμβανόταν στο διάλυμα λύσης από την πηκτική διαχωρισμού σηματοδοτεί και την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης. Εκτός από τα δείγματα, στην πηκτική τοποθετήθηκε κι ένα μείγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους ως μάρτυρας (Precision Plus Protein Dual Color Standard), επιτρέποντας τη σύγκριση της απόστασης που διανύει η υπό διερεύνηση πρωτεΐνη μέσα στην πηκτική με αυτή των πρότυπων πρωτεϊνών για τον προσδιορισμό του μοριακού της βάρους. Να σημειωθεί επίσης ότι οι κενές θέσεις της πηκτής συμπληρώθηκαν με αντίστοιχο όγκο διαλύματος λύσης, προκειμένου να επιτευχθεί ομοιόμορφη ηλεκτροφόρηση.

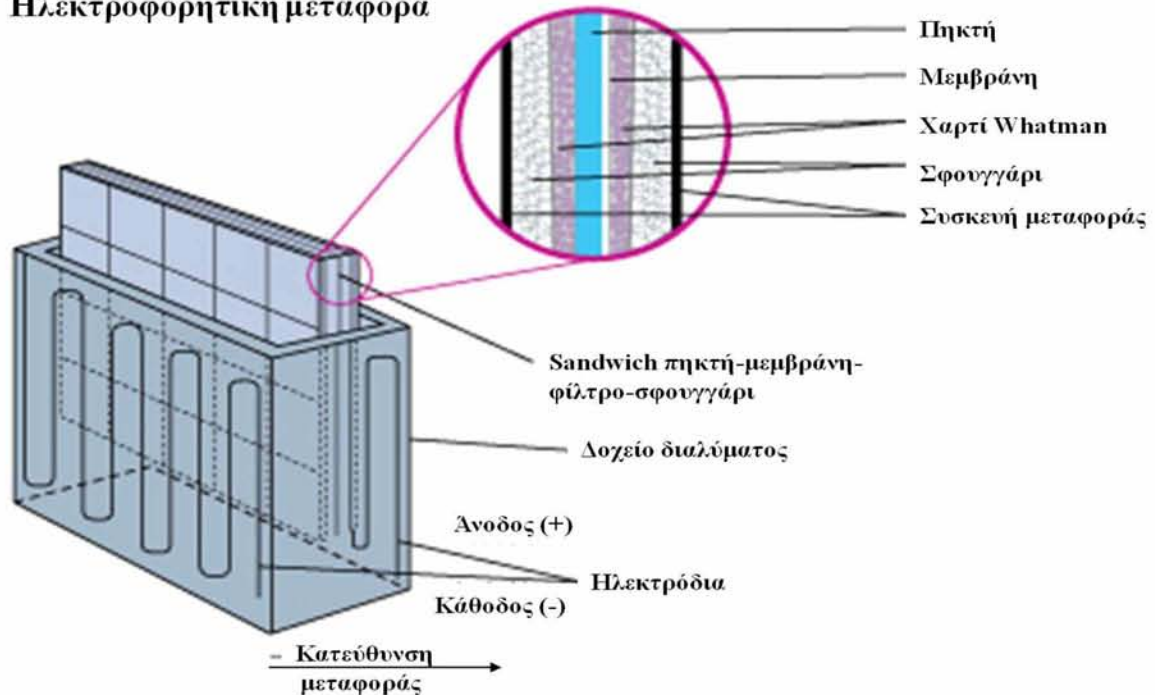
G. Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες μεταφέρονται από την πηκτική πολυακρυλαμίδης σε μία μεμβράνη, αποτελούμενη από μία χημικά αδρανή ουσία (συνήθως νιτροκυτταρίνη ή διφθοριούχο πολυβινυλιδένιο), μέσω ηλεκτροφορητικής μεταφοράς. Η πηκτική τοποθετείται σε άμεση στενή επαφή με τη μεμβράνη σε μία διάταξη sandwich αποτελούμενη επιπλέον από δύο σφουγγάρια και διηθητικά χαρτιά Whatman. Όταν εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο κάθετα στην επιφάνεια της πηκτής, οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες απομακρύνονται από αυτήν προς τη μεμβράνη, η οποία τοποθετείται μεταξύ της πηκτής και του θετικού πόλου της συσκευής. Το αποτέλεσμα είναι μια μεμβράνη- αντίγραφο του προτύπου των πρωτεϊνών που εμπεριέχονταν στην πηκτική.

Για να γίνει αυτό, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτική αρχικά απομακρύνθηκε από τη θήκη της προσεκτικά κι αφαιρέθηκε το επάνω τμήμα της (πηκτική επιστοίβαξης). Στη συνέχεια, κατασκευάστηκε μία στιβάδα με την εξής διάταξη: σφουγγαράκι \rightarrow διηθητικό χαρτί Whatman \rightarrow πηκτική πολυακρυλαμίδης \rightarrow μεμβράνη νιτροκυτταρίνης \rightarrow διηθητικό χαρτί Whatman \rightarrow σφουγγαράκι (**Εικόνα 10**). Η επίστρωση έγινε εφαρμόζοντας πίεση έτσι ώστε να μην εγκλωβιστούν φυσαλίδες σε κανένα σημείο της διάταξης αυτής, που θα παρεμπόδιζε την επιτυχή μεταφορά των πρωτεϊνών. Όλες οι στρώσεις είχαν προηγουμένως εμποτιστεί πολύ καλά στο διάλυμα μεταφοράς αποτελούμενο από: 1x διάλυμα αποτύπωσης (10x blotting buffer- 248 mM Tris Base, 1.9 M γλυκίνη) και 20% μεθανόλη σε δις απεσταγμένο νερό η παρουσία της μεθανόλης συμβάλει στην επιτυχή δέσμευση των

πρωτεϊνών στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Στη συνέχεια, η παραπάνω διάταξη τοποθετήθηκε στην ειδική συσκευή υγρής μεταφοράς Mini Trans-Blot Cell (Biorad), με την μεμβράνη νιτροκυτταρίνης να είναι τοποθετημένη προς την άνοδο, προκειμένου οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες να μετακινηθούν προς αυτή. Έπειτα, τοποθετήθηκε το διάλυμα μεταφοράς όπως επίσης και μία παγοκύστη, προς αποφυγή υπερθέρμανσης του συστήματος λόγω της παρουσίας μεθανόλης. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση για 1 ώρα στα 100 V, ενώ το ρεύμα έφτασε στα 200 mA.

Ηλεκτροφορητική μεταφορά



Εικόνα 10. Διάταξη πηκτής-μεμβράνης κατά την ηλεκτροφορητική μεταφορά (με τροποποιήσεις από «Western blot transfer methods. <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/>»).

Δ. Ανοσοεντόπιση πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Μετά το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς, η μεμβράνη απομακρύνθηκε προσεκτικά κι ακολούθησε πλύση της με δις απεσταγμένο νερό και χρώση με Ponceau Red για 2 min υπό ανάδευση. Το Ponceau Red συνδέεται μη ειδικά στο σύνολο των πρωτεϊνών, προκειμένου να διαπιστωθεί η ισοφόρτωση των δειγμάτων και η επιτυχής μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Μετά από 2 ακόμη πλύσεις με δις απεσταγμένο νερό, η μεμβράνη επώαστηκε σε διάλυμα κορεσμού (5% σκόνη άπαχου γάλακτος σε 1X PBS - 1% Tween) για 1 h υπό συνεχή ανάδευση, με στόχο την παρεμπόδιση της μη ειδικής σύνδεσης στη μεμβράνη των αντισωμάτων ενδιαφέροντος που θα χρησιμοποιούνταν σε επόμενα στάδια, περιορίζοντας πιθανές μη ειδικές αλληλεπιδράσεις. Μετά από 2 σύντομες πλύσεις με 1X PBS - 1% Tween,

η μεμβράνη επώαστηκε ολονύκτια στους 4°C με το εκάστοτε αντίσωμα (**Πίνακας 5**) στην κατάλληλη αραιώση σε 5% σκόνη γάλακτος σε 1X PBS-1% Tween, υπό συνεχή ανάδευση.

Την επόμενη μέρα, μετά από 2 σύντομες πλύσεις με 1X PBS-1% Tween για την απομάκρυνση της περίσσειας του πρωτογενούς αντισώματος, η μεμβράνη επωαζόταν για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου με το αντίστοιχο δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση της αγριοραφανίδας (horseradish peroxidase, HRP), το οποίο αναγνώριζε και δεσμευόταν ειδικά στο πρωτογενές αντίσωμα. Η αραιώση του δευτερογενούς αντισώματος γινόταν επίσης σε 5% σκόνη γάλακτος σε 1X PBS-1% Tween. Μετά την απομάκρυνση του δευτερογενούς αντισώματος και 5 πλύσεις με 1X PBS-1% Tween, η ανίχνευση του σήματος έγινε με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate. Για το σκοπό αυτό, η μεμβράνη εμποτίστηκε με διάλυμα αποτελούμενο από ίσους όγκους των reagents 1 και 2 (διάλυμα υπεροξειδίου και ενισχυτής της αντίδρασης) του συστήματος χημειοφωταύγειας. Κατόπιν, μέσα σε σκοτεινό θάλαμο, η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε ειδική θήκη, καλύφθηκε με διαφανή μεμβράνη επάνω στην οποία τοποθετήθηκε φωτοευαίσθητο φωτογραφικό φιλμ για ποικίλους χρόνους έκθεσης ανάλογα με το προς εξέταση αντίσωμα και ακολούθησε εμφάνιση αυτού σε κατάλληλο σύστημα (AGFA Curix 60).

Προκειμένου η μεμβράνη να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση περισσότερων της μίας πρωτεϊνών (συμπεριλαμβανομένων αυτών για τον έλεγχο του ισόποσου φορτώματος των δειγμάτων-ακτίνη, τουμπουλίνη), μετά την εμφάνιση του φιλμ, επώαστηκε σε διάλυμα το οποίο καταστρέφει την υπεροξειδάση του δευτερογενούς αντισώματος, αποτελούμενο από 1X PBS-1% Tween, 1% H₂O₂, 1% NaN₃ για μία ώρα υπό ανάδευση. Μετά από 5 πλύσεις των 5 min με 1X PBS-1% Tween, η μεμβράνη επώαστηκε παρουσία ενός δεύτερου πρωτογενούς και δευτερογενούς αντισώματος, τα οποία ωστόσο έπρεπε να προέρχονται από διαφορετικό ζώο σε σχέση με τα αντισώματα με τα οποία είχε επωαστεί η μεμβράνη προηγουμένως· κατόπιν ακολούθησε η διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως.

E. Ποσοτικοποίηση

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του Western blot, τα φιλμ εκείνα με τη μεγαλύτερη ευκρίνεια σαρώθηκαν, τα αρχεία αποθηκεύθηκαν σε ψηφιακή μορφή (.jpg), κι ακολούθησε η μέτρηση των εικονοστοιχείων κάθε ζώνης πρωτεΐνης με το πρόγραμμα Image J (National Institutes of Health). Για την κανονικοποίηση των δεδομένων, χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι πρωτεϊνών βασικής λειτουργίας (ακτίνη ή τουμπουλίνη) και αποδόθηκε ο

λόγος των εικονοστοιχείων των υπό διερεύνηση πρωτεϊνών προς αυτών της ακτίνης (ή τουμπουλίνης).

3.7. Καλλιέργεια B-λεμφοβλαστών και έλεγχος βιωσιμότητας

Οι απομονωμένοι λεμφοβλάστες των ασθενών με B-ΟΛΛ και τα φυσιολογικά B-κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πλάκες 96 οπών σχήματος U, σε αναλογία 0.05×10^6 κύτταρα/0.2 mL/οπή. Τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία 5 διαδοχικών αραιώσεων (0.049, 0.195, 0.781, 3.125 και 12.5 ng/mL) 60-μερούς BAFF ενώ ως δείγματα εσωτερικού ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία καλλιεργήθηκαν χωρίς την παρουσία διεγέρτη. Κάθε συνθήκη εξετάστηκε εις τριπλούν. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε στους 37°C, 5% CO₂ για 5 και 17 h (όσον αφορά τους B-λεμφοβλάστες) και για 3 ημέρες (για την περίπτωση των φυσιολογικών B-κυττάρων).

Στα αντίστοιχα χρονικά σημεία, οι πλάκες με τα κύτταρα φυγοκετρήθηκαν για 5 min στα 400xg, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και πραγματοποιήθηκε χρώση με το CD19 PE-Cy7 αντίσωμα για 20 min (RT). Στη συνέχεια προστέθηκαν στα κύτταρα 10 μL 7-AAD και τα κύτταρα επώαστηκαν για 10 min στους 4°C· το 7-AAD συνδέεται εκλεκτικά σε περιοχές πλούσιες σε γουανίνη-κυτοσίνη στο DNA και χρησιμοποιήθηκε για τη διάκριση των νεκρών από τα ζωντανά κύτταρα. Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα επανασυστάθηκαν σε 250 μL διαλύματος χρώσης (5% FBS σε 1X PBS, 2mM EDTA) και αναλύθηκαν στον κυτταρομετρητή ροής για 60 sec. Η επίδραση του BAFF στην επιβίωση των κυττάρων αξιολογήθηκε από την ανάκτηση των CD19⁺ 7-AAD⁻ κυττάρων.

3.8. Μελέτη της απόπτωσης κυτταρικών σειρών παρουσία χημειοθεραπευτικών παραγόντων

Η απόπτωση αποτελεί έναν κύριο τύπο προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου των οργανισμών. Κατά τα πρώιμα αποπτωτικά στάδια, η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης διατηρείται αλλά τα κύτταρα χάνουν την ασυμμετρία των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων. Ως αποτέλεσμα, η φωσφατιδυλοσερίνη, ένα αρνητικά φορτισμένο φωσφολιπίδιο που εντοπίζεται στο εσωτερικό στρώμα της πλασματικής μεμβράνης εκτίθεται στην επιφάνεια του κυττάρου, λειτουργώντας ως σήμα για την απομάκρυνση των αποπτωτικών κυττάρων από τα μακροφάγα. Καθώς η απόπτωση εξελίσσεται, η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης χάνεται. Με τη χρήση DNA χρωστικών, όπως ο 7-AAD που δεσμεύεται σε ζεύγη GC, και της αννεξίνης V, μιας ασβεστιο-εξαρτώμενης πρωτεΐνης που δεσμεύεται σε φωσφολιπίδια, και

μάλιστα με μεγάλη ειδικότητα και συγγένεια σε φωσφατυδιλοσερίνες, καθίσταται δυνατή η διάκριση ανάμεσα σε πρόιμα και όνιμα αποπτωτικά ή νεκρωτικά κύτταρα, επιτρέποντας τη μελέτη της απόπτωσης.

Οι κυτταρικές σειρές 697 (προ-B-ΟΛΛ) και Jurkat (T-ΟΛΛ) επώαστηκαν παρουσία 3-μερούς ή 60-μερούς BAFF και κοινών χημειοθεραπευτικών παραγόντων και αξιολογήθηκε η επίδραση της συγκαλλιέργειας αυτής στην επιβίωση των λεμφοβλαστών. Οι κυτταρικές σειρές χρησιμοποιήθηκαν απευθείας από την καλλιέργεια, και μετά την καταμέτρησή τους τοποθετήθηκαν σε πιάτα 48-οπών με επίπεδο πάτο, σε αναλογία 0.01×10^6 κύτταρα / 0.5 mL / οπή. Την ημέρα 0 προστέθηκαν στην καλλιέργεια είτε το 3-μερές (5-200 ng/mL) είτε το 60-μερές (5 ng/mL) BAFF και τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε κλίβανο επώασης στους 37°C, 5% CO₂ για 2 ημέρες. Στη συνέχεια, ακολούθησε μία δεύτερη ώση με 3-μερές (5-800 ng/mL) ή 60-μερές (5 ng/mL) BAFF και προσθήκη κοινών χημειοθεραπευτικών φαρμάκων σε υποτοξικές δόσεις. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 160 ng/mL αρασυτίνη, 10 and 20 ng/mL δεξαμεθαζόνη, 0.8 µg/mL πρεδνιζολόνη, 1.3 µg/mL μεθυλπρεδνιζολόνη, 53 µg/mL υδροκορτιζόνη για την 697 σειρά, ενώ 200 µg/mL δεξαμεθαζόνη χρησιμοποιήθηκαν στην περίπτωση των Jurkat κυττάρων. Ο πειραματικός σχεδιασμός περιλάμβανε τις εξής συνθήκες καλλιέργειας: κύτταρα που δεν έλαβαν φάρμακο και BAFF (εσωτερικοί μάρτυρες), κύτταρα που έλαβαν μόνο BAFF, κύτταρα που έλαβαν μόνο φάρμακο και κύτταρα που έλαβαν φάρμακο και BAFF. Η επίδραση της συγκαλλιέργειας BAFF-φαρμάκων αξιολογήθηκε μετά από 3 ημέρες, όπου προσδιορίστηκε η βιωσιμότητα των κυττάρων με το Annexin V cell apoptosis kit σε κυτταρομετρητή ροής.

Το πρωτόκολλο περιλάμβανε μέτρηση του αριθμού των κυττάρων κάθε συνθήκης την ημέρα 5, όπου 0.2×10^6 κύτταρα συλλέγονταν σε σωληνάρια RIA, επαναιωρούνταν σε κρύο 1X PBS και φυγοκεντρώνταν για 5 min στα 500xg. Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου, τα κύτταρα επαναδιαλύονταν σε 100 µL 1x binding buffer και τοποθετούνταν άμεσα στον πάγο· το binding buffer παρέχει τη βέλτιστη συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου που απαιτούνται για τη δέσμευση της αννεξίνης στα κατάλοιπα φωσφατυδιλοσερίνης των μεμβρανικών δομών. Στη συνέχεια, προστέθηκαν στα δοκιμαστικά σωληνάρια 2 µL Annexin V συζευγμένη με FITC φθοριόχρωμα και 10 µL 7-AAD, και ακολουθούσε επώαση για 15 min, σε σκοτεινό μέρος στους 4°C. Μετά το πέρας της επώασης, στα σωληνάρια προστέθηκαν 400 µL 1x binding buffer και ακολουθούσε ανάλυση των δειγμάτων στον κυτταρομετρητή ροής, όπου αξιολογήθηκε το ποσοστό (%) των ζωντανών κυττάρων ως Annexin V⁻ 7-AAD⁻.

3.9. Στατιστική ανάλυση

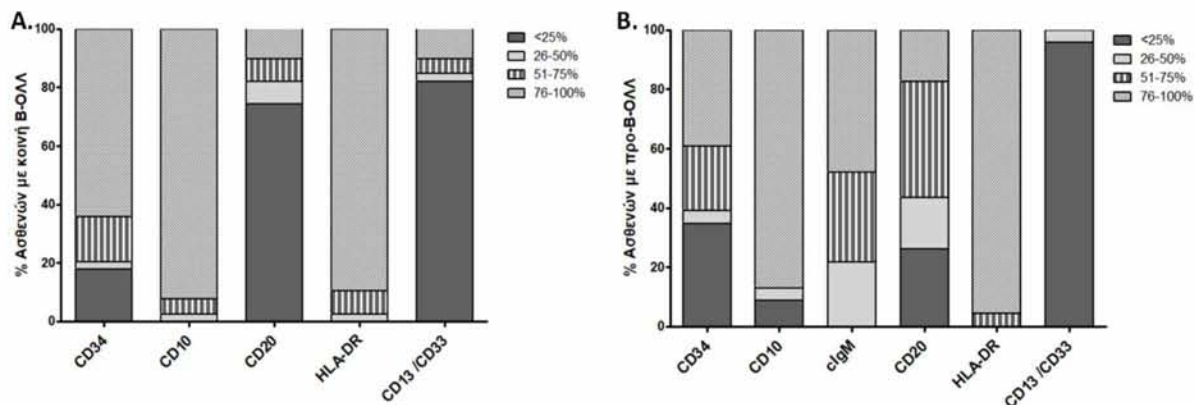
Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Στατιστικού Πακέτου για τις Κοινωνικές Επιστήμες (Statistical Package for the Social Sciences 22.0, SPSS 22.0, Chicago, USA). Οι συγκρίσεις σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των υποτύπων της ΟΛΛ (συμπεριλαμβανομένων των κλινικοεργαστηριακών παραμέτρων) βασίστηκαν στις μη παραμετρικές στατιστικές δοκιμές Mann-Whitney U και Kruskal-Wallis H . Οι συσχετίσεις σε επίπεδο έκφρασης έγιναν με βάση τη χρήση του συντελεστή συσχέτισης (rank correlation coefficient, r) κατά Spearman. Η στατιστική σημαντικότητα για τις *in vitro* κυτταρικές δοκιμασίες με τα φάρμακα ελέγχθηκε με τη δοκιμή Wilcoxon signed-rank. Τα γραφήματα σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Graphpad Prism 6. Στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα θεωρήθηκε όπου p (2-sided) < 0.05.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Κλινικοεργαστηριακά ευρήματα των ασθενών με ΟΛΛ

Στην παρούσα μελέτη συμπεριλήφθησαν 71 ασθενείς με ΟΛΛ, εκ των οποίων 64 (90.1%) έπασχαν από Β-ΟΛΛ (52 παιδιά και 12 ενήλικες), ενώ 7 παιδιά (9.9%) έπασχαν από Τ-ΟΛΛ, τα οποία κι αποτέλεσαν μία επιπλέον ομάδα ελέγχου, πέραν των φυσιολογικών μαρτύρων. Για την πλειονότητα των ασθενών, ήταν διαθέσιμα τα δημογραφικά (ηλικία, φύλο) και κλινικοεργαστηριακά δεδομένα (ημερομηνία διάγνωσης, % διήθησης του μυελού, αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων, αιμοσφαιρίνη, αριθμός αιμοπεταλίων, έκφραση ανοσοφαινοτυπικών δεικτών, καρυότυπος, αρχική απάντηση στη θεραπεία, υποτροπή της νόσου, επιβίωση, **Πίνακας 1**).

Οι πρώτοι δείκτες που δηλώνουν τη δέσμευση ενός στελεχιαίου κυττάρου στη Β-σειρά είναι τα μόρια CD79α και CD19, με την έκφρασή τους να διατηρείται σε όλα σχεδόν τα στάδια ωρίμανσης των Β-κυττάρων.¹⁹ Το σύνολο λοιπόν των ασθενών με Β-ΟΛΛ που συμπεριλήφθησαν στη μελέτη εξέφραζε τους συγκεκριμένους δείκτες σε συνδυασμό με τις πρωτεΐνες CD10, CD20, CD34, HLADR και την cIgM, με το πρότυπο έκφρασης αυτών να καθορίζει και τον ανοσοφαινοτυπικό υπότυπο της Β-ΟΛΛ (**Εικόνα 11**). Πιο συγκεκριμένα, οι 2 από τους 64 ασθενείς με Β-ΟΛΛ (3.1%, ένα παιδί κι ένας ενήλικας), έπασχαν από την πρωιμότερη μορφή της νόσου, την προ-προ-Β-ΟΛΛ, καθώς δεν εξέφραζαν επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη, όπως προσδιορίζεται από τον έλεγχο των κ και λ ελαφρών αλύσων του BCR (χαρακτηριστικές της ώριμης Β-ΟΛΛ), cIgM (τυπική της προ-Β-ΟΛΛ, απουσία επιφανειακής κ ή λ αλύσου), το μόριο CD10 (κοινή Β-ΟΛΛ, απουσία cIgM και κ ή λ ελαφρών αλύσων) ή CD20, ενώ εξέφραζαν CD34, έναν δείκτη στελεχιαίων κυττάρων της αιμοποιητικής σειράς καθώς επίσης και HLA-DR. Η πλειονότητα των ασθενών με Β-ΟΛΛ (60.9%, 35 παιδιά & 4 ενήλικες) έπασχε από τον πιο κοινό υπότυπο της νόσου, την κοινή Β-ΟΛΛ (CD10⁺, cIgM⁺, κ⁻/λ⁻), κι εμφάνιζε ποικίλο πρότυπο έκφρασης των υπόλοιπων δεικτών που εξετάστηκαν. Πιο συγκεκριμένα, οι περισσότεροι εξέφραζαν CD34 (82.1%) και HLA-DR (100%), ενώ λιγότερο συχνά CD20 (25.6%). Μάλιστα, 7 ασθενείς (17.9%) εξέφραζαν απρόσφορα δείκτες της μυελικής σειράς (CD33 ή/και CD13).



Εικόνα 11. Ποσοστά (%) των διαφορετικών επιπέδων έκφρασης των ανοσοφαινοτυπικών δεικτών (σε κλίμακα: <25%, 26-50%, 51-75%, 76-100%) στην κοινή (A) και προ-B-ΟΛΛ (B).

Οι υπόλοιποι ασθενείς με Β-ΟΛΛ που αναλύθηκαν (35.9%, 16 παιδιά & 7 ενήλικες) έπασχαν από προ-B-ΟΛΛ. Ειδικότερα, το σύνολο των ασθενών εξέφραζε cIgM (με ποσοστό έκφρασης που κυμαινόταν από 25-100%) καθώς επίσης κι HLA-DR. Η έκφραση του CD34 ήταν λιγότερο συχνή (65,2%), ενώ τα λευχαιμικά κύτταρα των ασθενών συνεξέφραζαν τους δείκτες CD10 (91.3%), CD20 (73.9%) κι ένα 4.3% των ασθενών εξέφραζε επιπλέον CD33 ή/και CD13. Κανένας ασθενής της μελέτης δεν έπασχε από ώριμη Β-ΟΛΛ, ενώ δεν παρατηρήθηκε απρόσφορη έκφραση δεικτών της Τ-σειράς (CD2, CD7) στα λευχαιμικά κύτταρα των ασθενών με Β-ΟΛΛ.

Ο έλεγχος για χρωμοσωμικές ανωμαλίες παρέχει σημαντική πληροφορία για την πρόγνωση και τη θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών με Β-ΟΛΛ. Στη μελέτη αυτή, δεδομένα για τον καρυότυπο ήταν διαθέσιμα για 31 από τα 52 παιδιατρικά περιστατικά και για το σύνολο των ενήλικων ασθενών με Β-ΟΛΛ. Η κυτταρογενετική ανάλυση έδειξε υπερδιπλοειδία (47-48 χρωμοσώματα) σε 2 από τα 31 παιδιά (6.5%), υψηλή υπερδιπλοειδία (51-61 χρωμοσώματα) σε 7 παιδιά (22.6%) και τετραπλοειδία (87 χρωμοσώματα) σε ένα ακόμη παιδιατρικό περιστατικό (3.2%), με συνηθέστερες τις τρισωμίες για τα χρωμοσώματα X, 21, 6 και 18· αξίζει να σημειωθεί ότι κανένας από τους ενήλικες με Β-ΟΛΛ δεν έφερε κάποια ανωμαλία ως προς τον αριθμό των χρωμοσωμάτων. Εννέα παιδιά (29%) κι ενήλικες (58.3%) είχαν συνολικά 48 χρωμοσώματα, έφεραν ωστόσο υπομικροσκοπικές βλάβες, όπως μικρά ελλείμματα ή διπλασιασμούς των χρωμοσωμάτων 9, 11, 12, 19, ισοχρωμοσώματα του 7^{ου} κι 9^{ου} χρωμοσώματος, αλλά κι επιπρόσθετες μετατοπίσεις, μεταξύ των οποίων αναδιατάξεις στο γενετικό τόπο του MLL κι ανασυνδυασμούς όπως οι PAX5/JAK2, BCR/ABL, E2A-PBX1. Τα λευχαιμικά κύτταρα ενός από αυτούς τους ασθενείς παρουσίαζαν μεγάλη κλωνική ετερογένεια εμφανίζοντας υποδιπλοειδικό, διπλοειδικό και τετραπλοειδικό

καρυότυπο, ενώ ένα ακόμη παιδί έφερε μονοσωμία για το 20^ο και τρισωμία για το 21^ο χρωμόσωμα. Τέλος, 12 παιδιά (38.7%) και 5 ενήλικες (41.7%) εμφάνιζαν φυσιολογικό καρυότυπο. Οι κυτταρογενετικές ανωμαλίες των ασθενών με ΟΛΛ (B- και T-) παρουσιάζονται στον **Πίνακα 11**.

Πίνακας 11. Κυτταρογενετικές ανωμαλίες των ασθενών με ΟΛΛ της μελέτης με βάση τον καρυότυπο.

Ασθενής #	ΟΛΛ παιδικής ηλικίας/ενήλικων	Υπότυπος ΟΛΛ	Καρυότυπος
1	Παιδί	κοινή B-ΟΛΛ	46XX, add(9)(p13), del(9)(p13p24), t(X;13)(q13;q22) [15] / 46, XX [1]
2	Παιδί	προ-B-ΟΛΛ	46XY, t(3;4)(q21;p16), t(8;16;11)(q13;q22;p11.2) [6] / 46XY [4]
4	Παιδί	κοινή B-ΟΛΛ	46,XX,t(9;22)(q34;q11),i(9)(q10)[3] / 46,XX[3]
7	Παιδί	κοινή B-ΟΛΛ	46,XX,i(7)(q10)[19] / 46,XX[1]
8	Παιδί	T-ΟΛΛ φλοιού θύμου	46,XY,t(11;14)(p13;q11)[7] / 46,XY[8]
9	Παιδί	προ-B-ΟΛΛ	46,XX,i(7)(q10),der(19)t(1;19)(q23;p13)[1]/ /46,XX,der(4)t(1;4)(q21;p16),der(16)t(1;16)(q21;q24),der(19)t(1;19)(q23;p13)[2]/46,XX[12]
10	Παιδί	προ-προ-B-ΟΛΛ	48,XY, +X, der(1), t(2;9)(p10;q10), +6, t(11;19)(q23;p13.3)[14] / 46, XY[1]
26	Παιδί	προ-B-ΟΛΛ	56,XX,+X,dup(1)(q31q41),+4?,+6,+8,+10,+11,+14,+15,+21,+21[1]/46,XX[19]
27	Παιδί	προ-B-ΟΛΛ	45,XY,t(9;22)(q34;q11.2), der(9)t(9;13)(p12;q1) del(11)(q13qter),13[3] / 46,sl,+mar[6]/45,sl1,mar,add(22)(p11.1)[3]/ 88,sl x 2,-17,-Y[3]
29	Παιδί	κοινή B-ΟΛΛ	87,<4n>,XY,+Y,+1,+1,+2,+2,+3,+3,+4,+4,+5,+5,+6,+6,+7,+7,+8,+8,+9,+9,+10,+11,+11,+12,+12,+13,+14,+15,+16,+16,+17,+17,+18,+18,+19,+19,+20,+20,+21,+21,+22,+22[5] / 46,XY[5]
34	Παιδί	προ-B-ΟΛΛ	46,XX,t(1;7)(p32;q32),t(2;8)(p13;q22),add(12)(p13),-20,+21[16] / 46,XX[4]
35	Παιδί	T-ΟΛΛ υποφλοιού	46,XX,t(1;19)(p32;q13.113.3), t(1;11)(q32;p13), del(6)(q23q27) [7]/ 46,XX [8]
37	Παιδί	κοινή B-ΟΛΛ	47,XY,+18[7]/46,XY[14]
39	Παιδί	T-ΟΛΛ φλοιού θύμου	46,XY,del(7)(q11.2),add(10)(p13)[6]/46,XY[14]
41	Παιδί	προ-B-ΟΛΛ	46,XY,der(19)t(1;19)(q23;p13)[12]/46,XY[13]
42	Παιδί	T-ΟΛΛ μυελού θύμου	46,XY,del(6)(q13q27),der(13)t(6;13)(q13p11.2)[8]/46,XY[1]
44	Παιδί	κοινή B-ΟΛΛ	46,XY,add(19)(q13)[4]/46,XY[3]
47	Παιδί	κοινή B-ΟΛΛ	51,XY,+X,+6,+14,+17,+21[1]/46,XY[14]
48	Παιδί	κοινή B-ΟΛΛ	52,XY,+4,+6,+10,+17,+21,+21[5]/46,XY[2]
49	Παιδί	κοινή B-ΟΛΛ	61,XY,+X,+4,+5,+6,+7,+8,+10,+12,+?14,+16,+17,+18,+21,+21,+21[4]/46,XY[6]
52	Παιδί	προ-B-ΟΛΛ	53,XX,+18,+19,+20,+21,+22,+22,+mar [14.3%]
54	Παιδί	προ-B-ΟΛΛ	61,XY,+X,+Y,+3,+4,+5,+6,+10,+11,+17,+17,+18,+18,+20,+21,+21 [10%]
55	Παιδί	προ-B-ΟΛΛ	53,XY,+X,+6,+10,+18,+21+dup(21)(q22), +mar [33%]
59	Ενήλικας	προ-B-ΟΛΛ	46XY, t(1;19)(q23;p13)
61	Ενήλικας	προ-B-ΟΛΛ	46XY, t(1;19)(q23;p13)

Πίνακας 11 (συνέχεια)

Ασθενής #	ΟΛΛ παιδικής ηλικίας/ενήλικων	Υπότυπος ΟΛΛ	Καρυότυπος
62	Ενήλικας	προ-B-ΟΛΛ	46XX, t(4,11)(q21,q23)
63	Ενήλικας	κοινή B-ΟΛΛ	46XX, t(9;22)(q34;q11)
65	Ενήλικας	προ-B-ΟΛΛ	46XX, t(9;22)(q34;q11)
69	Ενήλικας	προ-B-ΟΛΛ	46XX, t(9;22)(q34;q11)
72	Ενήλικας	προ-προ-B-ΟΛΛ	46XY, t(4,11)(q21,q23)

Πέραν του συμβατικού καρυότυπου, για 70 από τους 71 ασθενείς με ΟΛΛ πραγματοποιήθηκε έλεγχος με multiplex RT-PCR για τις χρωμοσωμικές μετατοπίσεις E2A-PBX1, TEL-AML1, BCR-ABL (p190 & p210 υπότυποι), παρέχοντας έτσι επιπλέον πληροφορίες τόσο για τα δείγματα εκείνα των ασθενών για τα οποία δεν υπήρχαν δεδομένα για τον καρυότυπο, όπως επίσης και για τον TEL-AML1 ανασυνδυασμό, ο οποίος δεν ανιχνεύεται με τις συμβατικές κυτταρογενετικές μεθόδους (**Πίνακας 12**). Πιο συγκεκριμένα, από το σύνολο των ασθενών με B-ΟΛΛ που αναλύθηκαν, το 28.6% (N= 20) έφερε τον TEL-AML1 ανασυνδυασμό. Μάλιστα, το ποσοστό αυτό ανταποκρινόταν σε παιδιατρικά περιστατικά ($p= 0.021$), τα οποία έπασχαν όλα από κοινή B-ΟΛΛ ($p<0.001$), και το μεγαλύτερο μέρος αυτών ήταν άρρενες (77.7% των TEL-AML1⁺ ασθενών). Επιπλέον, η παρουσία του συγκεκριμένου ανασυνδυασμού συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση δεικτών της μυελικής σειράς (CD13/CD33, $p= 0.014$), ενώ το αντίθετο φάνηκε να συμβαίνει με τα μόρια CD20 ($p= 0.044$) και cIgM ($p= 0.002$), γεγονός που συνάδει και με την εμφάνιση του συγκεκριμένου ανασυνδυασμού σε ασθενείς με κοινή B-ΟΛΛ. Αξίζει να σημειωθεί ότι 8 από τα 12 παιδιά που με βάση την κυτταρογενετική ανάλυση είχαν φυσιολογικό καρυότυπο, έφεραν τον συγκεκριμένο ανασυνδυασμό. Ο TEL-AML1 έχει συσχετισθεί με ευνοϊκή πρόγνωση της νόσου, ιδιαίτερα στο πλαίσιο εντατικοποιημένης θεραπείας με ασπαραγινάση (ανασκόπηση από Inaba και συν.¹¹³).¹⁵⁴

Ο δεύτερος σε συχνότητα ανασυνδυασμός που ανιχνεύθηκε στους ασθενείς με B-ΟΛΛ ήταν ο E2A-PBX1 (N= 5, 11.1%), τόσο σε ενήλικες (N= 2, 18.2%) όσο και σε παιδιά (N= 3, 9.6%). Το σύνολο των ασθενών αυτών έπασχε από προ-B-ΟΛΛ ($p= 0.001$), κι όπως αναμενόταν, η παρουσία του ανασυνδυασμού συσχετίστηκε σημαντικά και με την έκφραση της cIgM ($p<0.001$) που χαρακτηρίζει τον συγκεκριμένο ανοσοφαινοτυπικό υπότυπο της νόσου, ενώ δεν παρατηρήθηκαν άλλες συσχετίσεις του ανασυνδυασμού με τα κλινικοεργαστηριακά και δημογραφικά δεδομένα των ασθενών με B-ΟΛΛ. Ασθενείς με τον E2A-PBX1 ανασυνδυασμό εμφανίζουν ενδιάμεση πρόγνωση, λόγω αυξημένου κινδύνου υποτροπής της νόσου στο ΚΝΣ,¹¹³ αλλά πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι παρουσιάζουν πολύ καλή απάντηση στο hyper-CVAD χημειοθεραπευτικό σχήμα.¹⁵⁵

Ο ανασυνδυασμός εκείνος ο οποίος σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση κι οριοθετεί έναν υψηλού κινδύνου υπότυπο της ΟΛΛ, είναι ο BCR-ABL. Η μετατόπιση αυτή ήταν παρούσα σε 5 ασθενείς με Β-ΟΛΛ (7.9%), κυρίως ενήλικες (N= 3, 27.3%) (p= 0.009). Όσον αφορά τον ανοσοφαινοτυπικό υπότυπο, δύο ασθενείς (1 παιδί κι ένας ενήλικας) με τον ανασυνδυασμό έπασχαν από κοινή Β-ΟΛΛ και οι υπόλοιποι τρεις (1 παιδί και 2 ενήλικες) από προ-Β-ΟΛΛ. Όπως αναμενόταν, η παρουσία του BCR-ABL συσχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα λευκών αιμοσφαιρίων (p= 0.019), φτωχή αρχική απάντηση στη θεραπεία (p<0.001) και αυξημένο κίνδυνο υποτροπής της νόσου (p= 0.015). Συγκεκριμένα, τα δύο παιδιά που έφεραν τον ανασυνδυασμό έδειξαν καλή και φτωχή αντίστοιχα αρχική απάντηση στη θεραπεία, αλλά υποτροπίασαν και τελικά κατέληξαν. Από τους ενήλικες ασθενείς, ένας εξ αυτών εμφάνισε ανθεκτική νόσο και απεβίωσε, ενώ οι άλλοι δύο, με καλή και φτωχή αρχική απάντηση στη θεραπεία διανύουν διάστημα ελεύθερο νόσου. Να σημειωθεί ότι κανένας από τους ασθενείς με Τ-ΟΛΛ δεν έφερε τους υπό διερεύνηση ανασυνδυασμούς.

Πίνακας 12. Συνολικά κυτταρογενετικά ευρήματα των ασθενών με ΟΛΛ.

	T-ΟΛΛ	Σύνολο Β-ΟΛΛ	Β-ΟΛΛ παιδιών	Β-ΟΛΛ ενηλίκων
Υπερδιπλοειδία, αρ.(%)	0 (0.0)	2 (4.7)	2 (6.5)	0 (0.0)
Υψηλή υπερδιπλοειδία, αρ.(%)	0 (0.0)	7 (16.3)	7 (22.6)	0 (0.0)
Τετραπλοειδία, αρ.(%)	0 (0.0)	1 (2.3)	1 (3.2)	0 (0.0)
Μονοσωμίες, αρ.(%)	0 (0.0)	1 (2.3)	1 (3.2)	0 (0.0)
Ελλείμματα, αρ.(%)	3 (75)	2 (4.7)	2 (6.5)	0 (0.0)
Διπλασιασμοί, αρ.(%)	1 (25)	6 (14)	6 (19.4)	0 (0.0)
Ισοχρωμοσώματα, αρ.(%)	0 (0.0)	2 (4.7)	2 (6.5)	0 (0.0)
Αναδιατάξεις*, αρ.(%)				
PAX5/JAK2, αρ.(%)	0 (0.0)	1 (2.3)	1 (3.2)	0 (0.0)
MLL αναδιατάξεις, αρ.(%)	0 (0.0)	3 (7)	1 (3.2)	2 (16.7)
E2A-PBX1, αρ.(%)	0 (0.0)	7 (11.1)	5 (9.6)	2 (18.2)
BCR-ABL, αρ.(%)	0 (0.0)	5 (7.9)	2 (3.8)	3 (27.3)
TEL-AML1, αρ.(%)	0 (0.0)	18 (28.6)	18 (34.6)	0 (0.0)
Άλλες αναδιατάξεις, αρ.(%)	3 (75)	6 (14)	6 (19.4)	0 (0.0)
Φυσιολογικός καρυότυπος, αρ.(%)	0 (0.0)	17 (39.5)	12 (38.7)	5 (41.7)

*Τα ποσοστά για τους ανασυνδυασμούς E2A-PBX1, BCR-ABL, TEL-AML1 αφορούν στα δεδομένα από την μοριακή ανάλυση, όπου ελέγχθηκαν 52 παιδιά και 11 ενήλικες με Β-ΟΛΛ και 7 παιδιά με Τ-ΟΛΛ. Για τις υπόλοιπες χρωμοσωμικές ανωμαλίες, τα ποσοστά προκύπτουν από τα δεδομένα για τον καρυότυπο 31 παιδιών και 12 ενηλίκων με Β-ΟΛΛ και 4 παιδιών με Τ-ΟΛΛ.

Από τους ασθενείς της μελέτης, 5 παιδιατρικοί ασθενείς (8.2%) και 6 ενήλικες (50%) κατέληξαν από επιπλοκές της νόσου, κυρίως είτε γιατί εμφάνισαν ανθεκτική νόσο είτε γιατί υποτροπίασαν κατά τη διάρκεια της θεραπείας, ενώ υπήρχε και η περίπτωση μίας ασθενούς

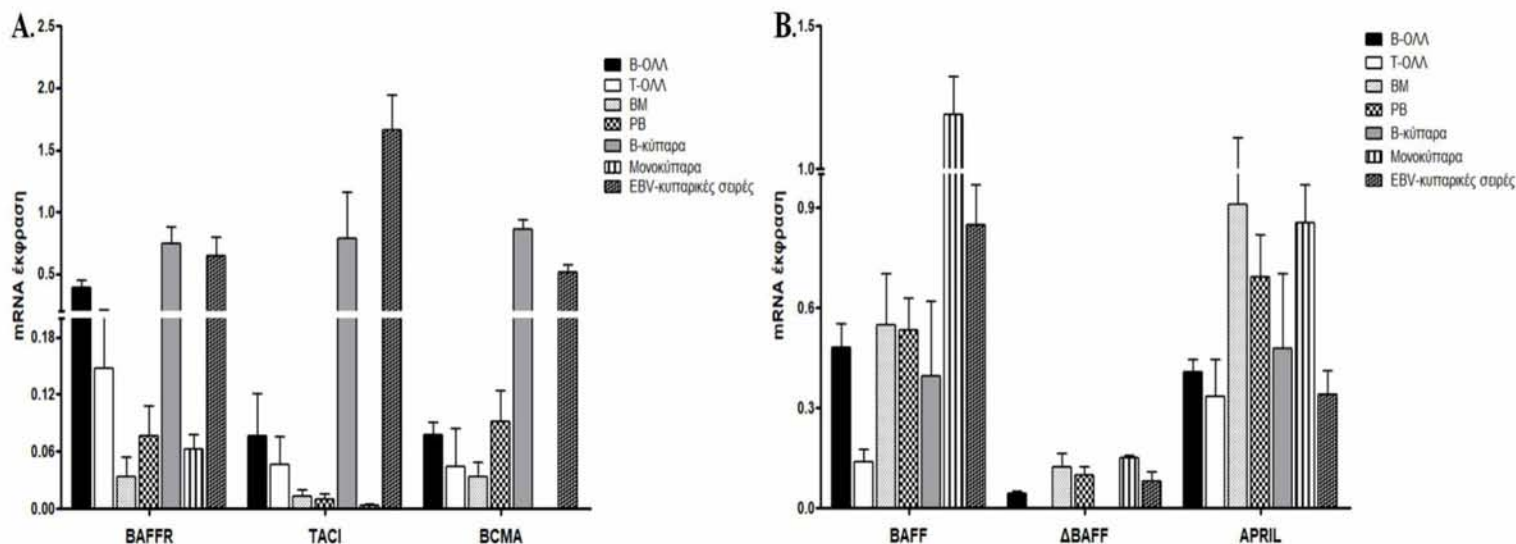
που συνεδιαγνώσθη με καρκίνο μαστού. Ο μέσος χρόνος επιβίωσης ήταν 93 μήνες (3-210 μήνες) για τα παιδιά και 10 μήνες (1-45 μήνες) για τους ενήλικες. Η μεγάλη ηλικία εμφάνισης της νόσου, η αρχική απάντηση στη θεραπεία και η υποτροπή της νόσου αποτέλεσαν τους πιο ισχυρούς παράγοντες κινδύνου ($p < 0.001$), όπως και η παρουσία του BCR-ABL ανασυνδυασμού που αναφέρθηκε προηγουμένως ($p = 0.002$). Λαμβάνοντας υπόψη την υπάρχουσα βιβλιογραφία, έγιναν επιπλέον υποκατηγοριοποιήσεις ποσοτικών μεταβλητών που έχουν συσχετισθεί με δυσμενέστερη έκβαση της νόσου. Συγκεκριμένα, οι παιδιατρικοί ασθενείς ταξινομήθηκαν στις ηλικιακές κλάσεις 1-9 ετών και 10-14 (έφηβοι), όπου και διαπιστώθηκε φτωχότερη πρόγνωση για τη δεύτερη ομάδα ($p = 0.030$).¹³⁰ Όσον αφορά τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων που αποτελεί επίσης ισχυρό προγνωστικό δείκτη της νόσου, ορίστηκε σαν κατώφλι τα 30×10^9 κύτταρα/L,¹¹⁴ ωστόσο δεν ανεβρέθη κάποιια στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την επιβίωση των ασθενών με Β-ΟΛΛ.

Από την στατιστική επεξεργασία των υπόλοιπων κλινικοεργαστηριακών δεδομένων προέκυψαν κάποιες επιπλέον συσχετίσεις. Συγκεκριμένα, η ηλικία εμφάνισης της νόσου φάνηκε να συσχετίζεται θετικά με τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης ($p = 0.002$, $r = 0.385$). Ακόμη, ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων ήταν αυξημένος σε ασθενείς με υψηλό ποσοστό διήθησης του μυελού ($p < 0.001$, $r = 0.605$) και αντιστρόφως ανάλογος του αριθμού των αιμοπεταλίων ($p = 0.001$, $r = -0.410$).

Τέλος, όσον αφορά τους ασθενείς με Τ-ΟΛΛ, τρεις από αυτούς (42.6%) έπασχαν από Τ-ΟΛΛ του φλοιού του θύμου, δύο (28.6%) από Τ-ΟΛΛ υποφλοιού και άλλοι 2 από Τ-ΟΛΛ μυελού του θύμου. Όλοι οι ασθενείς επέδειξαν καλή αρχική απάντηση στη θεραπεία, αλλά ένας εξ αυτών απεβίωσε χωρίς προηγούμενη υποτροπή της νόσου. Ο καρύοτυπος των ασθενών αυτών συμπεριλαμβάνεται στον **Πίνακα 11**.

4.2. Γονιδιακή έκφραση των υποδοχέων και συνδετών του BAFF/APRIL συστήματος στην ΟΛΛ

Στο πλαίσιο διερεύνησης του ρόλου των μορίων του BAFF/APRIL συστήματος στη Β-ΟΛΛ, εξετάσαμε αρχικά τη μεταγραφική έκφραση των *BAFFR*, *TACI*, *BCMA*, *BAFF*, *ΔBAFF* κι *APRIL* σε 63 ασθενείς με Β-ΟΛΛ, και στις ομάδες ελέγχου οι οποίες αποτελούνταν από 7 ασθενείς με Τ-ΟΛΛ, μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος 5 υγιών μαρτύρων και μυελού των οστών 4 ατόμων με NHL σε πλήρη ύφεση μακριά από θεραπεία, φυσιολογικά ώριμα Β-κύτταρα ($N = 3$) και μονοκύτταρα ($N = 3$), καθώς επίσης και 4 EBV-μετασηματισμένες κυτταρικές σειρές (**Εικόνα 12**, **Εικόνα 13**, **Πίνακας 13**).

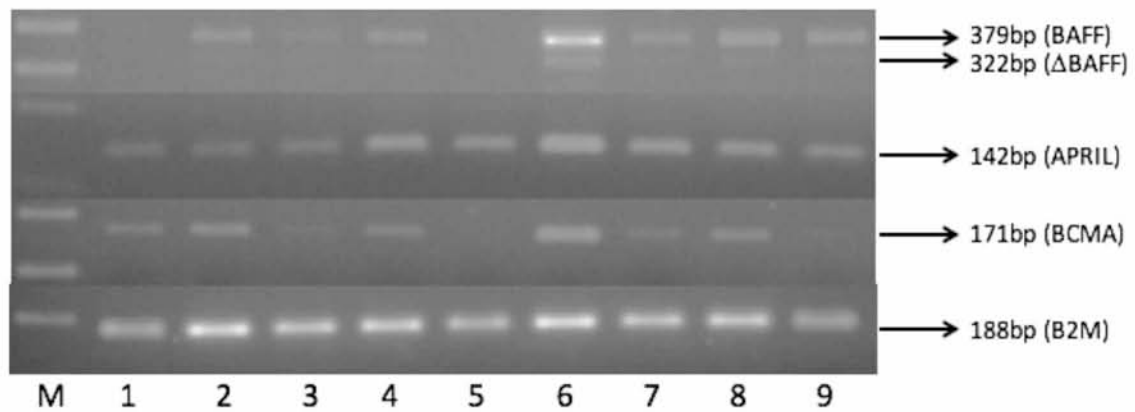


Εικόνα 12. Πρότυπο mRNA έκφρασης των μορίων του BAFF/APRIL συστήματος στους ασθενείς και τις ομάδες ελέγχου της μελέτης. Ο κάθετος άξονας αντιπροσωπεύει τις τιμές της κανονικοποιημένης σχετικής γονιδιακής έκφρασης. **A.** mRNA επίπεδα των υποδοχέων και **B.** συνδετών στους ασθενείς με B-ΟΛΛ (N= 63) και T-ΟΛΛ (N= 7), στα μονοπύρρηνα κύτταρα μυελού των οστών (BM, N= 4) και περιφερικού αίματος (PB, N= 5), σε ώριμα B-κύτταρα (N= 3) και μονοκύτταρα (N= 3) υγιών μαρτύρων και σε EBV-μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές (N= 4). Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν την μέση έκφραση των γονιδίων και οι γραμμές την τυπική απόκλιση της μέσης τιμής.

Πίνακας 13. Σχετική έκφραση των γονιδίων των συνδετών και υποδοχέων του BAFF/APRIL συστήματος στη B-ΟΛΛ και στις ομάδες ελέγχου.

Γονίδιο	Ομάδες ελέγχου						
	B-ΟΛΛ (αρ. 63) μτ ^α ± τα ^β	T-ΟΛΛ (αρ. 7) μτ ^α ± τα ^β	BM (αρ. 4) μτ ^α ± τα ^β	PB (αρ. 5) μτ ^α ± τα ^β	B-κύτταρα (αρ. 3) μτ ^α ± τα ^β	Μονοκύτταρα (αρ. 3) μτ ^α ± τα ^β	EBV-κυτταρικές σειρές (αρ. 4) μτ ^α ± τα ^β
<i>BAFFR</i>	0.394 ± 0.059	0.147 ± 0.068	0.034 ± 0.020	0.076 ± 0.032	0.747 ± 0.135	0.062 ± 0.015	0.650 ± 0.150
<i>TAC1</i>	0.076 ± 0.045	0.046 ± 0.029	0.013 ± 0.006	0.010 ± 0.005	0.789 ± 0.372	0.003 ± 0.001	1.658 ± 0.283
<i>BCMA</i>	0.077 ± 0.013	0.044 ± 0.040	0.034 ± 0.014	0.092 ± 0.032	0.861 ± 0.072	0.000 ± 0.000	0.512 ± 0.064
<i>BAFF</i>	0.481 ± 0.069	0.139 ± 0.035	0.547 ± 0.153	0.533 ± 0.094	0.394 ± 0.224	1.192 ± 0.130	0.847 ± 0.120
<i>ΔBAFF</i>	0.042 ± 0.008	0.001 ± 0.001	0.122 ± 0.041	0.098 ± 0.024	0.000 ± 0.000	0.151 ± 0.006	0.079 ± 0.030
<i>APRIL</i>	0.408 ± 0.036	0.335 ± 0.110	0.909 ± 0.200	0.691 ± 0.127	0.478 ± 0.224	0.853 ± 0.115	0.341 ± 0.069

^α μτ: μέση τιμή, ^β τα: τυπική απόκλιση



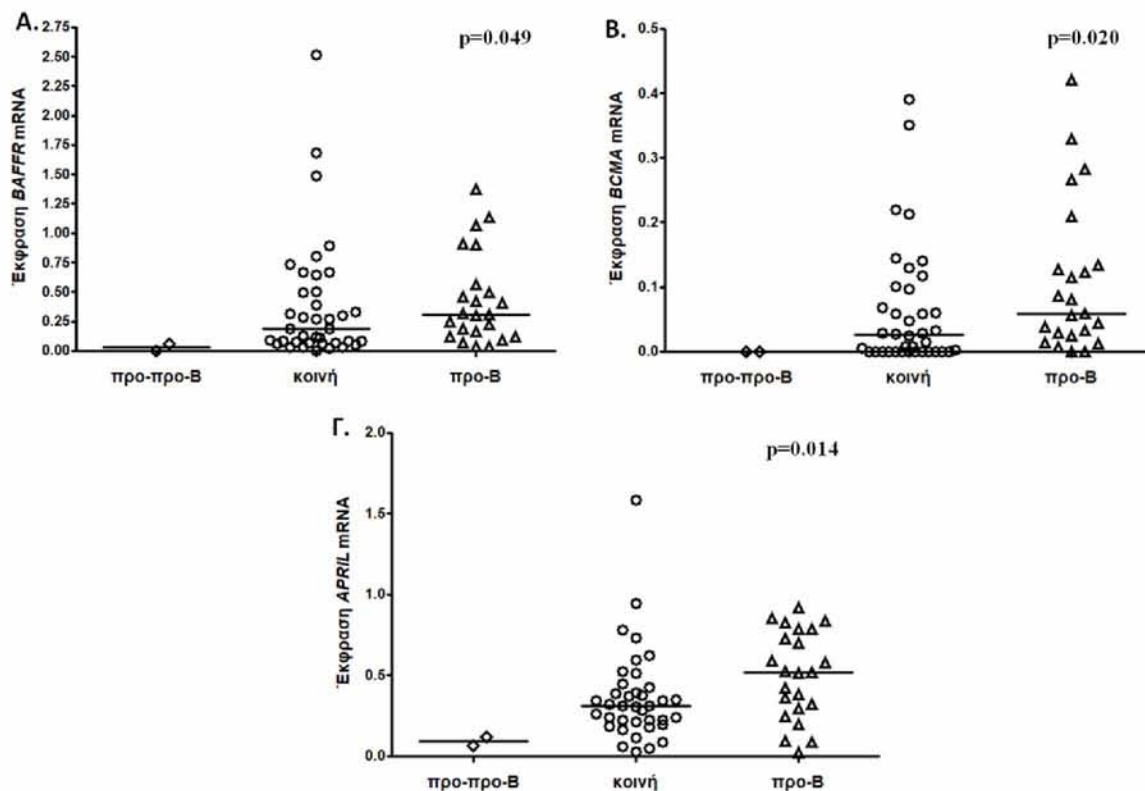
Εικόνα 13. Αντιπροσωπευτικά δεδομένα των ημιποσοτικών συμβατικών RT-PCR για τη μελέτη της έκφρασης των *BAFF* & *ΔBAFF*, *APRIL*, *BCMA*, *B2M* σε ασθενείς και μάρτυρες της μελέτης. M: 100 bp μάρτυρας DNA, στήλες 1-2: ασθενείς με κοινή B-ΟΛΛ, στήλες 3-6: ασθενείς με προ-B-ΟΛΛ, στήλη 7: ασθενής με T-ΟΛΛ υποφλοιού, στήλη 8: μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος υγιούς μάρτυρα, στήλη 9: μονοπύρηνια κύτταρα μυελού των οστών υγιούς μάρτυρα.

4.2.1. Μεταγραφική έκφραση των γονιδίων *TNFRSF13C/BAFFR*, *TNFRSF13B/TACI* και *TNFRSF17/BCMA* στους ασθενείς και μάρτυρες της μελέτης

Η ανάλυση της μεταγραφικής έκφρασης των υποδοχέων του BAFF/APRIL συστήματος στη B-ΟΛΛ ανέδειξε τον *BAFFR* ως τον κυριότερο υποδοχέα που εκφράζεται απρόσφορα στους B-λεμφοβλάστες (**Εικόνα 12A**), καθώς 42 (66.7%) από τους 63 ασθενείς με B-ΟΛΛ παρουσίαζαν μετάγραφα του υποδοχέα. Η mRNA έκφραση του *BAFFR* στους ασθενείς ήταν ωστόσο χαμηλότερη σε σχέση με τα απομονωμένα φυσιολογικά ώριμα B-κύτταρα περιφερικού αίματος και τις EBV B-λεμφοβλαστοειδείς κυτταρικές σειρές, υποδηλώνοντας ότι ο *BAFFR* μπορεί να εκφράζεται απρόσφορα στους B-λεμφοβλάστες, αλλά σε μικρότερα επίπεδα σε σχέση με τα ώριμα B-κύτταρα. Αντίθετα, σε σύγκριση με τα δείγματα εκείνα που λειτούργησαν ως αρνητικοί μάρτυρες, και συγκεκριμένα με τα μονοκύτταρα, που φυσιολογικά δεν εκφράζουν τους υποδοχείς του συστήματος αυτού, και τα μονοπύρηνια περιφερικού αίματος και μυελού των οστών, που δεν αποτελούν κλάσματα κυττάρων εμπλουτισμένα σε B-κύτταρα, τα επίπεδα mRNA έκφρασης του *BAFFR* ήταν υψηλότερα στους ασθενείς με B-ΟΛΛ. Τέλος, αν και κατά κανόνα τα T-κύτταρα δεν εκφράζουν τους υποδοχείς των BAFF/APRIL, με ελάχιστες μελέτες να υποστηρίζουν το αντίθετο,^{156,157} τρεις ασθενείς (45,4%) με T-ΟΛΛ εμφάνισαν μετάγραφα του *BAFFR*.

Αυξανόμενου του σταδίου ωρίμανσης των B-λεμφοβλαστών, η έκφραση του BAFFR φάνηκε επίσης να είναι υψηλότερη ($p=0.049$, προ-προ-B < κοινή B < προ-B), ωστόσο το

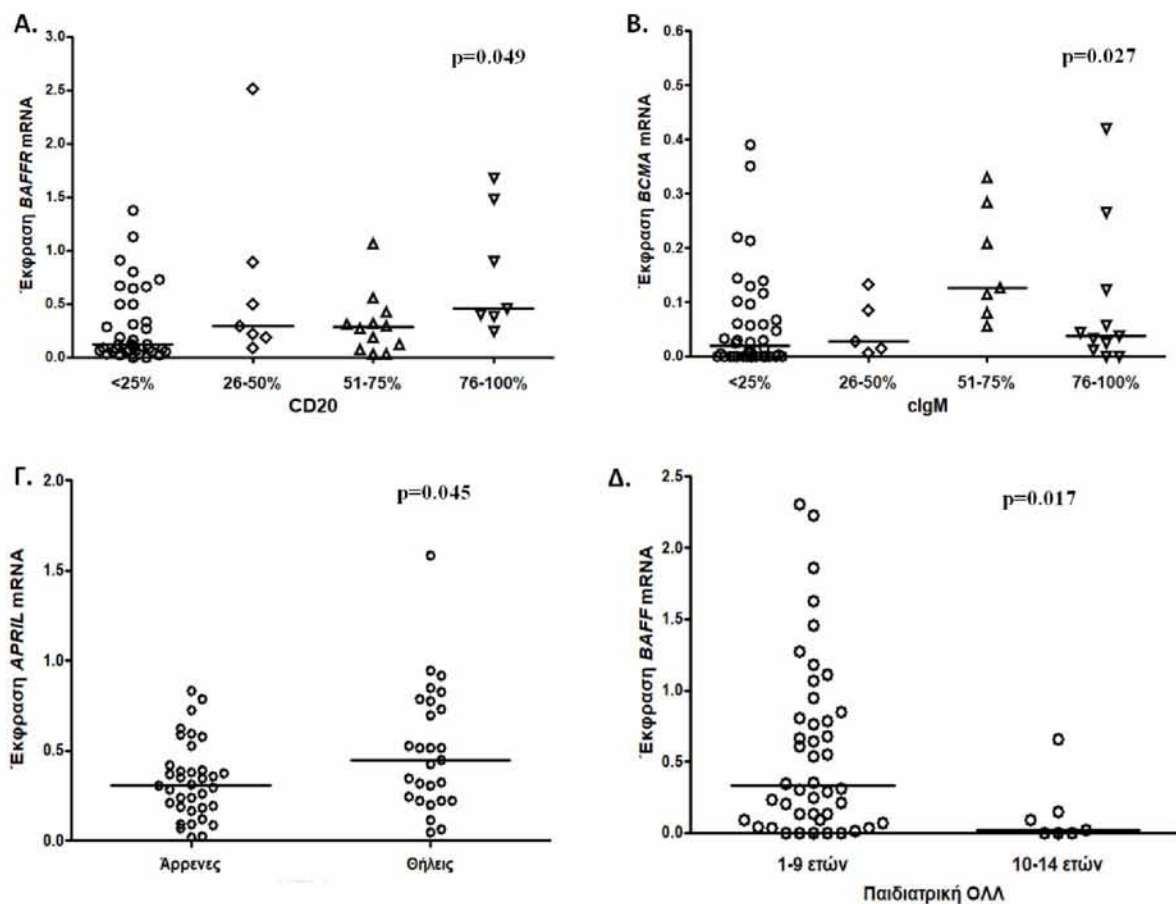
πρότυπο έκφρασης ποίκιλε μεταξύ των διακριτών ανοσοφαινοτυπικών υποτύπων της Β-ΟΛΛ (**Εικόνα 14Α**). Τα ευρήματα αυτά ενισχύθηκαν από τη θετική συσχέτιση της mRNA έκφρασης του *BAFFR* με την επιφανειακή έκφραση του CD20 ($p=0.022$, **Εικόνα 15Α**), που συναντάται σε ωριμότερες μορφές Β-ΟΛΛ. Το CD20 μόριο αποτελεί έναν ειδικό της Β-κυτταρικής σειράς δείκτη ο οποίος εμφανίζεται φυσιολογικά στην επιφάνεια των προγονικών Β-κυττάρων μετά την έκφραση των HLA-DR, TdT, CD19 και CD10 μορίων και λίγο πριν την cIgM, και το πρότυπο έκφρασης του CD20 φαίνεται ότι διατηρείται τόσο στις νεοπλασίες των ώριμων Β-κυττάρων όσο και στην Β-ΟΛΛ. Σε συμφωνία με τα προηγούμενα, διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του *BAFFR* ήταν επίσης αυξημένη στους ασθενείς εκείνους που έφεραν τον E2A-PBX1 ανασυνδυασμό ($p=0.014$, **Εικόνα 21Α**), ο οποίος εμφανίζεται κατά κανόνα στην προ-Β-ΟΛΛ, υποστηρίζοντας ακόμη περισσότερο την ανοδική έκφραση του υποδοχέα σε ωριμότερους τύπους Β-ΟΛΛ.



Εικόνα 14. Συσχέτιση των mRNA επιπέδων των (Α) *BAFFR*, (Β) *BCMA* και (Γ) *APRIL* με το στάδιο ωρίμανσης των Β-λεμφοβλαστών. Οι γραμμές στα στικτογράμματα αντιπροσωπεύουν τη διάμεση τιμή της σχετικής έκφρασης για κάθε ανοσοφαινοτυπικό υπότυπο της Β-ΟΛΛ. Η τιμή στατιστικής σημαντικότητας (p) αναφέρεται στη στατιστική δοκιμασία Kruskal-Wallis H .

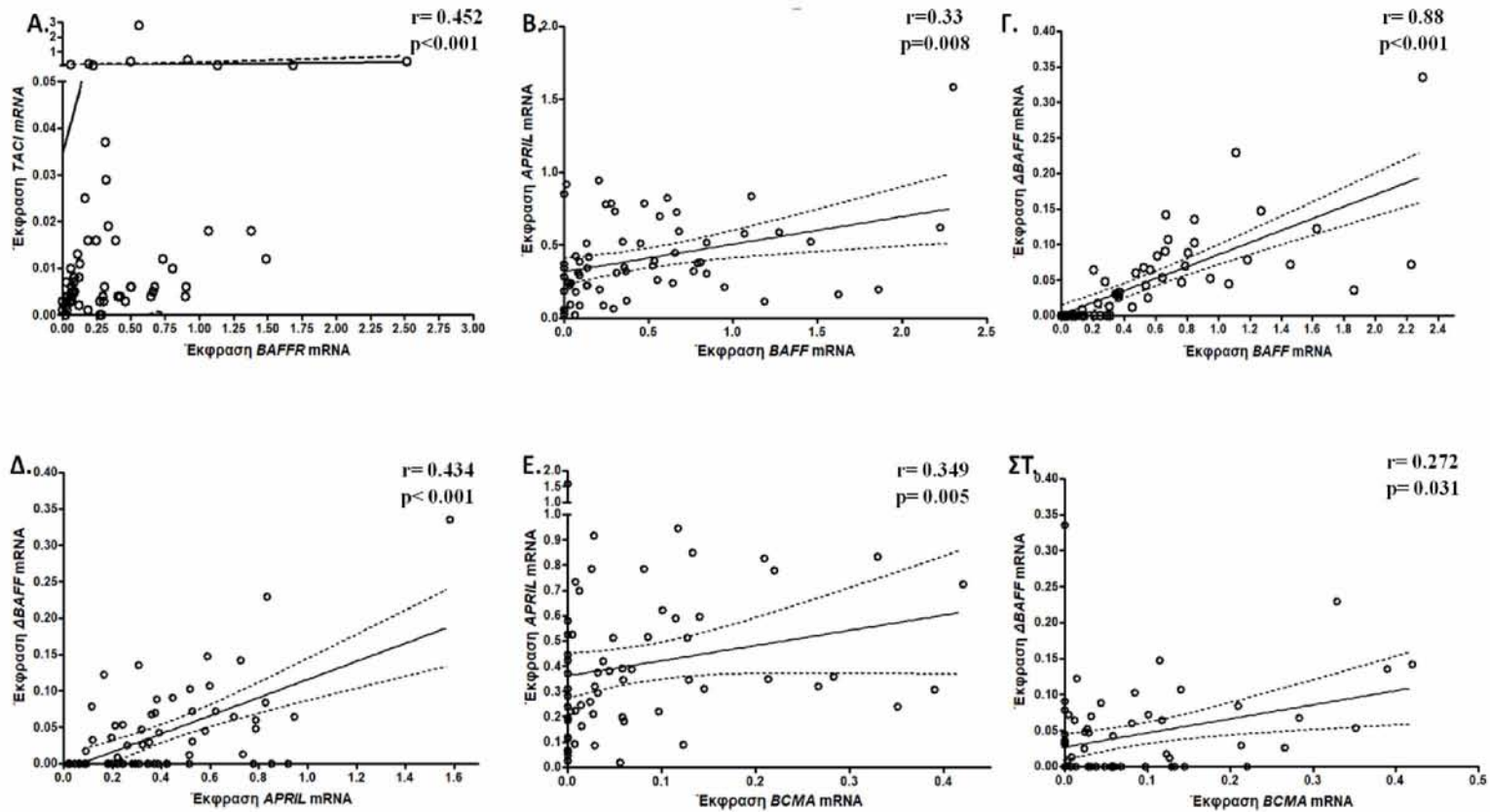
Πέραν της απρόσφορης έκφρασης του *BAFFR* στους Β-λεμφοβλάστες, ανιχνεύθηκε επίσης η παρουσία μεταγράφων και των άλλων 2 υποδοχέων *BCMA* και *TACI*, αλλά σε

μικρότερο ποσοστό ασθενών. Συγκεκριμένα, ο *BCMA*, που φυσιολογικά απαντάται στα πλασματοκύτταρα, εκφραζόταν σε 18 ασθενείς με Β-ΟΛΛ (28.6%), ενώ ο *TACI* ήταν παρών μόνο σε 6 ασθενείς (9.5%), και πάντα σε συνέκφραση είτε με τον *BAFFR* ή/και με τον *BCMA*. Μάλιστα τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης του *TACI* σχετίστηκαν θετικά με αυτά του *BAFFR* ($p < 0.001$, $r = 0.452$, **Εικόνα 16Α**). Όπως αναμενόταν, η έκφραση των *BCMA* και *TACI* στα λευχαιμικά κύτταρα ήταν χαμηλότερη σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου των απομονωμένων ώριμων Β-κυττάρων και των EBV-κυτταρικών σειρών (θετικοί μάρτυρες) και υψηλότερη από τα μονοκύτταρα, ενώ η πλειονότητα των ασθενών με Τ-ΟΛΛ δεν εξέφραζε τους συγκεκριμένους δείκτες, με εξαίρεση ένα περιστατικό (**Εικόνα 12Α**).



Εικόνα 15. Συσχέτιση της έκφρασης των υποδοχέων και συνδετών με δημογραφικά και κλινικοεργαστηριακά δεδομένα. **Α.** Τα mRNA επίπεδα του *BAFFR* σχετίζονται με την έκφραση του CD20 (Kruskal-Wallis H στατιστική δοκιμή). **Β.** Τα mRNA επίπεδα του *BCMA* σχετίζονται με την έκφραση της clgM (Kruskal-Wallis H στατιστική δοκιμή). **Γ.** Η μεταγραφική έκφραση του *APRIL* είναι αυξημένη στα θηλυκά άτομα με Β-ΟΛΛ (Mann-Whitney U στατιστική δοκιμή). **Δ.** Ο βαθμός έκφρασης του *BAFF* mRNA είναι αυξημένος στην ηλικιακή ομάδα χαμηλού κινδύνου της παιδιατρικής ΟΛΛ (Mann-Whitney U στατιστική δοκιμή).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι όπως και με τον *BAFFR*, ο *BCMA* εκφραζόταν σε μεγαλύτερο βαθμό στις πιο ώριμες μορφές Β-ΟΛΛ (κοινή και προ-Β-ΟΛΛ, $p=0.020$, **Εικόνα 14B**). Το γεγονός αυτό υποστηρίχθηκε και από τη θετική συσχέτιση του *BCMA* με την *cIgM* ($p=0.027$, **Εικόνα 15B**) που χαρακτηρίζει την προ-Β-ΟΛΛ. Να σημειωθεί ότι δεν διαπιστώθηκαν διαφορές στη μεταγραφική έκφραση των υποδοχέων μεταξύ των παιδιατρικών κι ενήλικων περιστατικών με Β-ΟΛΛ, ούτε κάποια σύνδεση της έκφρασης αυτών με άλλες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους ($p>0.05$ σε όλες τις περιπτώσεις).



Εικόνα 16. Αποτελέσματα της ανάλυσης συσχέτισης κατά Spearman. Παρατηρούνται θετικές συσχετίσεις μεταξύ των μεταγραφικών επιπέδων των *BAFFR* - *TACI* (**A**), *BAFF* - *APRIL* (**B**), *BAFF* - Δ *BAFF* (**Γ**), *APRIL* - Δ *BAFF* (**Δ**), *BCMA* - *APRIL* (**Ε**), *BCMA* - Δ *BAFF* (**ΣΤ**) στο σύνολο των ασθενών με Β-ΟΛΛ.

4.2.2. Μεταγραφική έκφραση των *TNFSF13B/BAFF*, Δ *BAFF* και *TNFSF13/APRIL* στους ασθενείς και μάρτυρες της μελέτης

Οι κυτταροκίνες *BAFF* κι *APRIL* παράγονται κι εκκρίνονται κυρίως από κύτταρα της φυσικής ανοσίας (μονοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα) καθώς επίσης κι από ενεργοποιημένα Τ-κύτταρα.³² Μετάγραφα ωστόσο των κυτταροκινών αυτών έχουν ανιχνευθεί και σε φυσιολογικά ώριμα Β-κύτταρα της περιφέρειας,^{158,159} με την έκφρασή τους να αυξάνεται στα

νεοπλασματικά ώριμα Β-κύτταρα (π.χ. ΧΛΛ,⁹⁰ πολλαπλούν μυέλωμα,⁹¹ NHL⁹²). Από την mRNA ανάλυση των *BAFF* κι *APRIL* στη Β-ΟΛΛ προέκυψε ότι παρά την επικράτηση του *BAFFR* μεταξύ των υποδοχέων, παραδόξως ο πιο κοινός συνδέτης που εκφράζεται στους Β-λεμφοβλάστες είναι ο *APRIL*, καθώς 55 από τους 63 ασθενείς (87.3%) εμφάνιζαν μετάγραφα του μορίου αυτού. Πιο συγκεκριμένα, η πλειονότητα των ασθενών με Β-ΟΛΛ (63.5%) εξέφραζε και τις 2 κυτταροκίνες, το 23.8% μόνο τον *APRIL* και το 3.2% μόνο τον *BAFF*, σε χαμηλότερο ωστόσο βαθμό σε σχέση με τα φυσιολογικά μονοκύτταρα. Σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες ελέγχου, στην περίπτωση του *BAFF*, τα επίπεδα έκφρασης ήταν παρόμοια με αυτά των φυσιολογικών Β-κυττάρων καθώς και των μονοπύρηνων κυττάρων της περιφέρειας και του μυελού των οστών (που απαρτίζονται κυρίως από Τ-κύτταρα και μονοκύτταρα), αλλά υψηλότερα αυτών των ασθενών με Τ-ΟΛΛ. Ο βαθμός έκφρασης του *APRIL* στους ασθενείς με Β-ΟΛΛ ήταν παρόμοιος με αυτόν στην Τ-ΟΛΛ και στα απομονωμένα Β-κύτταρα, αλλά σημαντικά χαμηλός σε σχέση με τα μονοπύρηνια κύτταρα του αίματος και του μυελού των οστών (**Εικόνα 12**). Να σημειωθεί ότι η mRNA έκφραση και των δύο συνδετών στη Β-ΟΛΛ ήταν χαμηλότερη σε σχέση με τα μονοκύτταρα και τις EBV-κυτταρικές σειρές (θετικοί μάρτυρες).

Μετάγραφα του *ΔBAFF*, που προκύπτει από το εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου *BAFF*, ανευρέθηκαν σε χαμηλά επίπεδα στους ασθενείς με Β-ΟΛΛ και σε όλες τις ομάδες ελέγχου, και σε σχεδόν μηδενικά επίπεδα στους ασθενείς με Τ-ΟΛΛ και στα απομονωμένα Β-κύτταρα, δηλαδή εκεί, όπου και τα επίπεδα των φυσιολογικών μεταγράφων του *BAFF* ήταν χαμηλά. Μάλιστα, η στατιστική ανάλυση έδειξε μία σημαντική θετική συσχέτιση της *BAFF* έκφρασης με αυτή της εναλλακτικής ισομορφής *ΔBAFF* ($p < 0.001$, $r = 0.88$, **Εικόνα 16Γ**), για την οποία είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη που προκύπτει αντιτίθεται της δράσης της φυσιολογικής.⁴⁸ Να σημειωθεί ότι σε όλες τις περιπτώσεις, η έκφραση του *ΔBAFF* ήταν πολύ μικρότερη αυτής του φυσιολογικού *BAFF* mRNA.

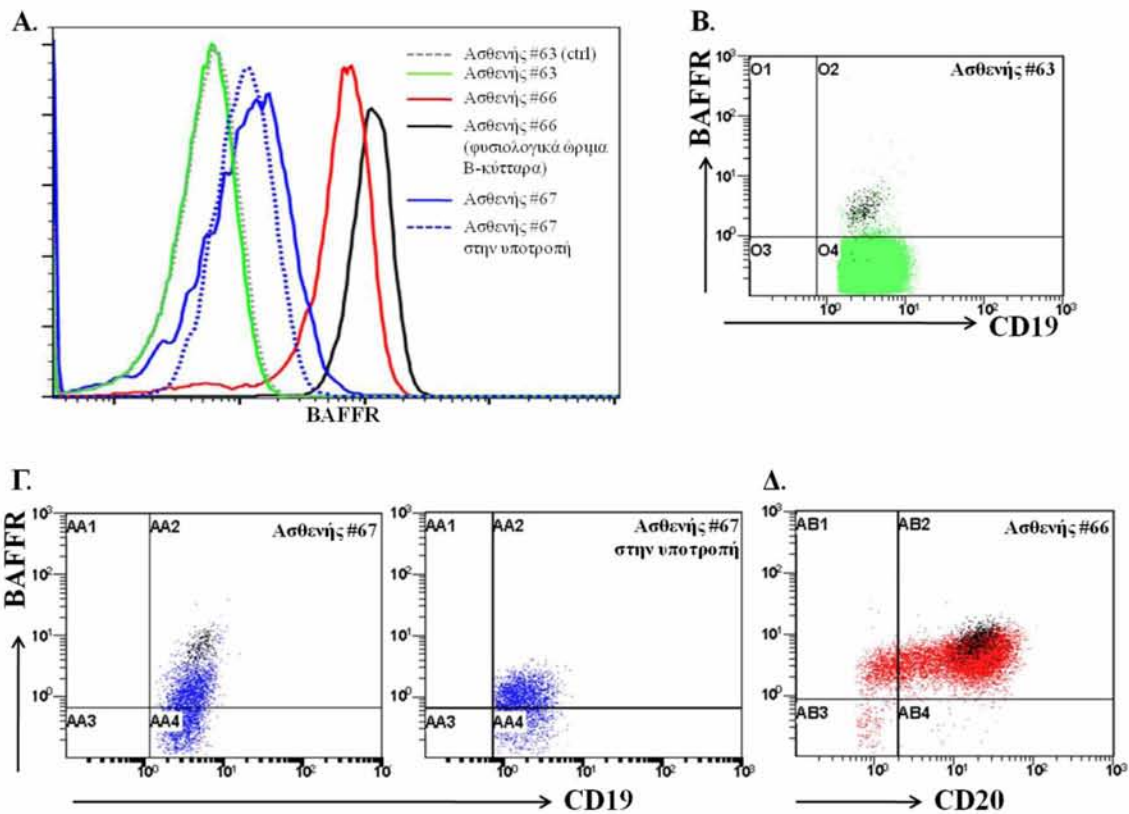
Πέραν της συνέκφρασης των *BAFF* και *APRIL* στους Β-λεμφοβλάστες των ασθενών, τα mRNA επίπεδά τους φάνηκε να σχετίζονται επίσης θετικά ($p = 0.008$, $r = 0.33$, **Εικόνα 16Β**). Μάλιστα, ως συνέχεια της συσχέτισης *BAFF-ΔBAFF* που αναφέρθηκε προηγουμένως, παρατηρήθηκε μία επιπλέον σύνδεση της έκφρασης του *APRIL* με τον *ΔBAFF* ($p < 0.001$, $r = 0.434$, **Εικόνα 16Δ**). Αν και δεν διαπιστώθηκε κάποια συσχέτιση της παρουσίας του *BAFF* με το στάδιο ωρίμανσης του Β-λεμφοβλάστη, τα επίπεδα του *APRIL* φάνηκε να είναι υψηλότερα στους πιο ώριμους τύπους Β-ΟΛΛ ($p = 0.014$, **Εικόνα 14Γ**). Όσον αφορά τη σχέση της έκφρασης υποδοχέων-συνδετών, διαπιστώθηκε μόνο μία σύνδεση των επιπέδων του *BCMA*

με του *APRIL* ($p=0.005$, $r=0.349$, **Εικόνα 16Ε**) και του *BAFF* ($p=0.031$, $r=0.272$, **Εικόνα 16ΣΤ**).

Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές συσχετίσεις της mRNA έκφρασης των προαναφερθέντων μορίων με τα κλινικοεργαστηριακά ευρήματα των ασθενών (π.χ. αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων, αιμοπετάλια, αιμοσφαιρίνη, αρχική απάντηση στη θεραπεία, επιβίωση, $p>0.05$ σε όλες τις περιπτώσεις). Εξαιρέση αποτελούν τα αυξημένα επίπεδα του *APRIL* που διαπιστώθηκαν στα θηλυκά άτομα με Β-ΟΛΛ ($p=0.045$, **Εικόνα 15Γ**) και του *BAFF* στην ηλικιακή ομάδα χαμηλού κινδύνου 1-9 ετών της παιδικής ηλικίας σε σχέση με τα άτομα 10-14 ετών ($p=0.017$, **Εικόνα 15Δ**).

4.3. Πρωτεϊνική έκφραση των υποδοχέων του BAFF/APRIL συστήματος

Η επιφανειακή έκφραση των BAFFR, TACI και BCMA διερευνήθηκε με κυτταρομετρία ροής σε 12 ασθενείς με Β-ΟΛΛ (10 ενήλικες και 2 παιδιά) για την πλειονότητα των ασθενών αυτών (με εξαίρεση έναν ασθενή με κοινή Β-ΟΛΛ) υπήρχαν δεδομένα και για τα mRNA επίπεδα των υποδοχέων. Σε συμφωνία λοιπόν με τα ευρήματα από τη μελέτη της μεταγραφικής έκφρασης, διαπιστώσαμε ότι ο BAFFR είναι και πρωτεϊνικά ο επικρατών υποδοχέας στη Β-ΟΛΛ, καθώς εντοπίστηκε σε 8 από τους 12 ασθενείς (66.7%) που αξιολογήθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, 2 από τους 5 ασθενείς (40%) με κοινή Β-ΟΛΛ και 6 από τους 7 ασθενείς (85.7%) με προ-Β-ΟΛΛ εξέφραζαν επιφανειακά τον BAFFR, επιδεικνύοντας ωστόσο ένα ποικίλο πρότυπο έκφρασης όπως φαίνεται στην **Εικόνα 17**. Ειδικότερα, η μέση τιμή έκφρασης για τους λεμφοβλάστες των ασθενών με κοινή Β-ΟΛΛ ήταν 39.6% (εύρος 1.2-99.8%), ενώ για τους ασθενείς με προ-Β ήταν 41.3% και κυμαινόταν από 4.3% μέχρι 78.8%. Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι σε όλους τους ασθενείς με Β-ΟΛΛ που εξέφραζαν τον υποδοχέα, η ένταση της έκφρασης ήταν αρκετά χαμηλότερη στους Β-λεμφοβλάστες σε σύγκριση με τα εναπομείναντα φυσιολογικά ώριμα Β-κύτταρα των ασθενών αυτών (**Εικόνα 17Β-Δ**). Το εύρημα αυτό ενισχύεται ακόμη περισσότερο από τα δεδομένα της μεταγραφικής ανάλυσης, όπου διαπιστώθηκε μειωμένη mRNA έκφραση του *BAFFR* στους Β-λεμφοβλάστες σε σχέση με τα απομονωμένα ώριμα Β-κύτταρα φυσιολογικών μαρτύρων, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο υποδοχέας παρά την απρόσφορη έκφραση του συναντάται σε χαμηλότερα επίπεδα στα λευχαιμικά κύτταρα των ασθενών αυτών. Όσον αφορά τους άλλους 2 υποδοχείς, TACI και BCMA, για την πλειοψηφία των ασθενών τα επίπεδα έκφρασης ήταν χαμηλά έως και μηδενικά (μέση έκφραση TACI: 5% με εύρος 1.4-16%, μέση έκφραση BCMA: 3.6% με εύρος 1.7-11%).



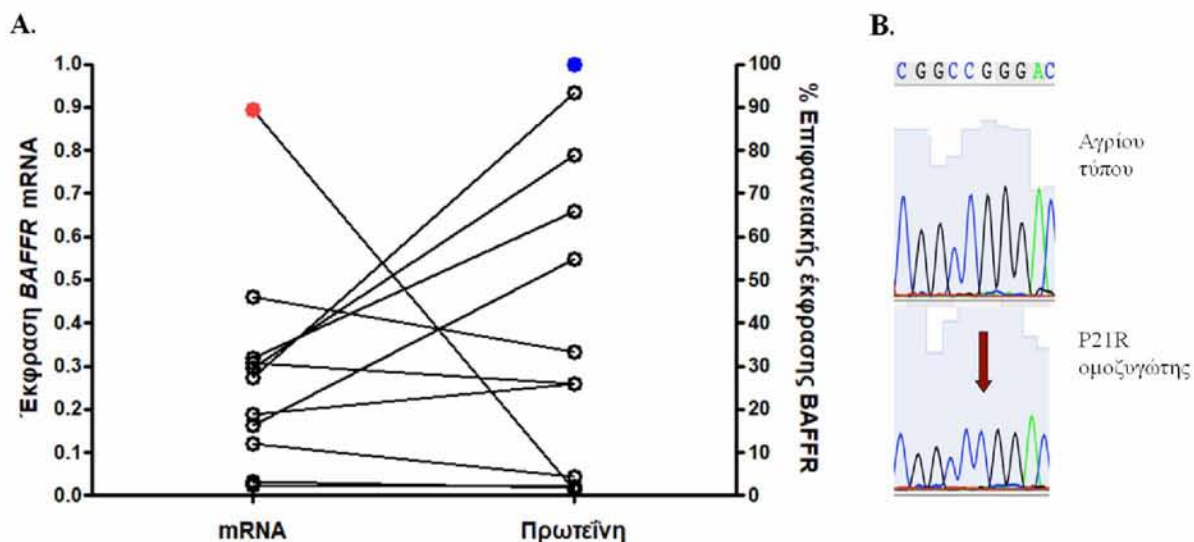
Εικόνα 17. Πρωτεϊνική έκφραση του BAFFR στους ασθενείς με Β-ΟΛΛ. Δεδομένα της κυτταρομετρικής ανάλυσης της επιφανειακής έκφρασης του BAFFR σε αντιπροσωπευτικά δείγματα ασθενών με Β-ΟΛΛ. Ο BAFFR εκφράζεται σε ένα ποσοστό ασθενών με Β-ΟΛΛ, αλλά σε χαμηλότερο βαθμό σε σχέση με τα εναπομείναντα φυσιολογικά ώριμα Β-κύτταρα. **Α.** Τα ιστογράμματα δείχνουν την έκφραση του BAFFR επί των $CD19^+$ κυττάρων των λεμφοβλαστών ή των λεμφοκυττάρων με βάση την έκφραση του $CD45$ (ctrl: ισotypικός μάρτυρας για το BAFFR αντίσωμα). **Β-Δ.** Τα στικτογράμματα δείχνουν την έκφραση του BAFFR στο σύνολο των $CD19^+$ κυττάρων. Τα μαύρα σημεία αντιπροσωπεύουν τα εναπομείναντα φυσιολογικά ώριμα Β-κύτταρα στους ασθενείς με Β-ΟΛΛ. Ασθενείς #63 (**Β**) και #66 (**Δ**): κοινή Β-ΟΛΛ. ασθενής #67 (**Γ**): προ-Β-ΟΛΛ στη διάγνωση και στην υποτροπή.

Σχετικά με τη σύνδεση της πρωτεϊνικής έκφρασης του BAFFR με τα κλινικοεργαστηριακά δεδομένα των ασθενών, ο αριθμός των δειγμάτων δεν ήταν αρκετός για να γίνει στατιστική επεξεργασία. Ωστόσο, προέκυψε ότι οι άρρενες ασθενείς εξέφραζαν 2.5 φορές περισσότερη πρωτεΐνη στην επιφάνειά τους σε σχέση με τα θηλυκά άτομα. Επιπλέον, από τους ασθενείς με προ-Β-ΟΛΛ που εξέφραζαν τον υποδοχέα, δύο εξ αυτών έφεραν τον E2A-PBX1 (μέση έκφραση: 72.4%) και άλλοι 2 τον BCR-ABL ανασυνδυασμό (μέση έκφραση: 25.9%). Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει η περίπτωση ενός ασθενούς με κοινή Β-

ΟΛΛ ο οποίος εμφάνιζε 2 πληθυσμούς με βάση την έκφραση του CD20, και παρόμοιο πρότυπο φάνηκε να ακολουθεί και η έκφραση του BAFFR σε αυτόν (**Εικόνα 17Δ**).

Στη συνέχεια θελήσαμε να διερευνήσουμε κατά πόσο η θεραπεία θα μπορούσε να επηρεάσει την πρωτεϊνική έκφραση του BAFFR, επανεξετάζοντας ασθενείς που είχαν ενεργή νόσο είτε μετά τη θεραπεία εφόδου είτε κατά τη θεραπεία συντήρησης. Διαπιστώσαμε ότι δύο ασθενείς με καλή αρχική απάντηση στη θεραπεία εφόδου (μία εκ των οποίων υποτροπίασε), μία ασθενής με φτωχή απάντηση στη θεραπεία, αλλά κι ένας ασθενής με ανθεκτική νόσο διατήρησαν την πρωτεϊνική έκφραση του BAFFR σε παρόμοια-σχετικά αυξημένα επίπεδα επί των λεμφοβλαστών (**Εικόνα 17Γ**), υποδηλώνοντας πιθανότατα μία κάποια θετική επιλογή των κυτταρικών εκείνων κλώνων που εξέφραζαν τον υποδοχέα στη διάγνωση. Η σύγκριση με τα φυσιολογικά ώριμα Β-κύτταρα δεν ήταν εφικτή σε αυτή τη φάση, καθώς η θεραπεία που έλαβαν οι ασθενείς οδήγησε κατά τα αναμενόμενα σε εξάλειψη αυτών.

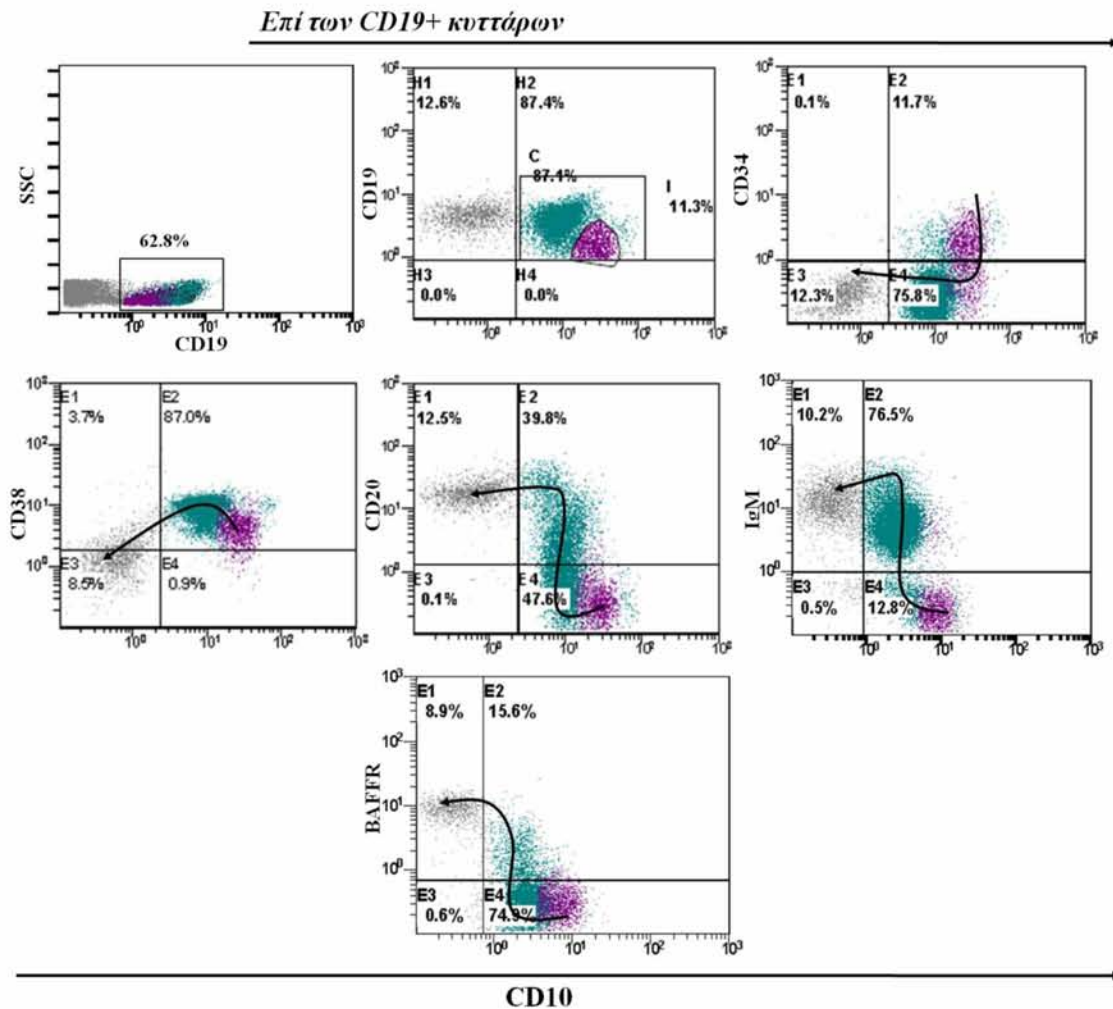
Από τους 5 ασθενείς με κοινή Β-ΟΛΛ που αναλύθηκαν για την πρωτεϊνική έκφραση του BAFFR, ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση μίας ασθενούς που ενώ εμφάνιζε υψηλά mRNA επίπεδα του υποδοχέα, δεν ανιχνεύθηκε σε αυτή επιφανειακά η πρωτεΐνη (**Εικόνα 18Α**). Λαμβάνοντας υπόψη ότι η δέσμευση του κλώνου 11C1 του αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε για την κυτταρομετρική ανίχνευση του υποδοχέα αναστέλλεται από την παρουσία του πολυμορφισμού *BAFFR-P21R* (rs77874543), διαπιστώσαμε ότι η συγκεκριμένη ασθενής ήταν ομόζυγη για τη βλάβη αυτή (**Εικόνα 18Β**), χωρίς να φέρει τον *BAFFR-H159Y* πολυμορφισμό που κατά κανόνα συναντάται σε ανισορροπία σύνδεσης με τον πρώτο.¹⁶⁰ Στο πλαίσιο αυτό, ελέγξαμε όλους τους υπόλοιπους ασθενείς στους οποίους είχε ανιχνευθεί ο υποδοχέας πρωτεϊνικά, για την παρουσία των 2 λειτουργικών πολυμορφισμών του *BAFFR* γονιδίου (p.P21R και p.H159Y) και διαπιστώσαμε ότι κανένας άλλος δεν έφερε τις εν λόγω γενετικές βλάβες.



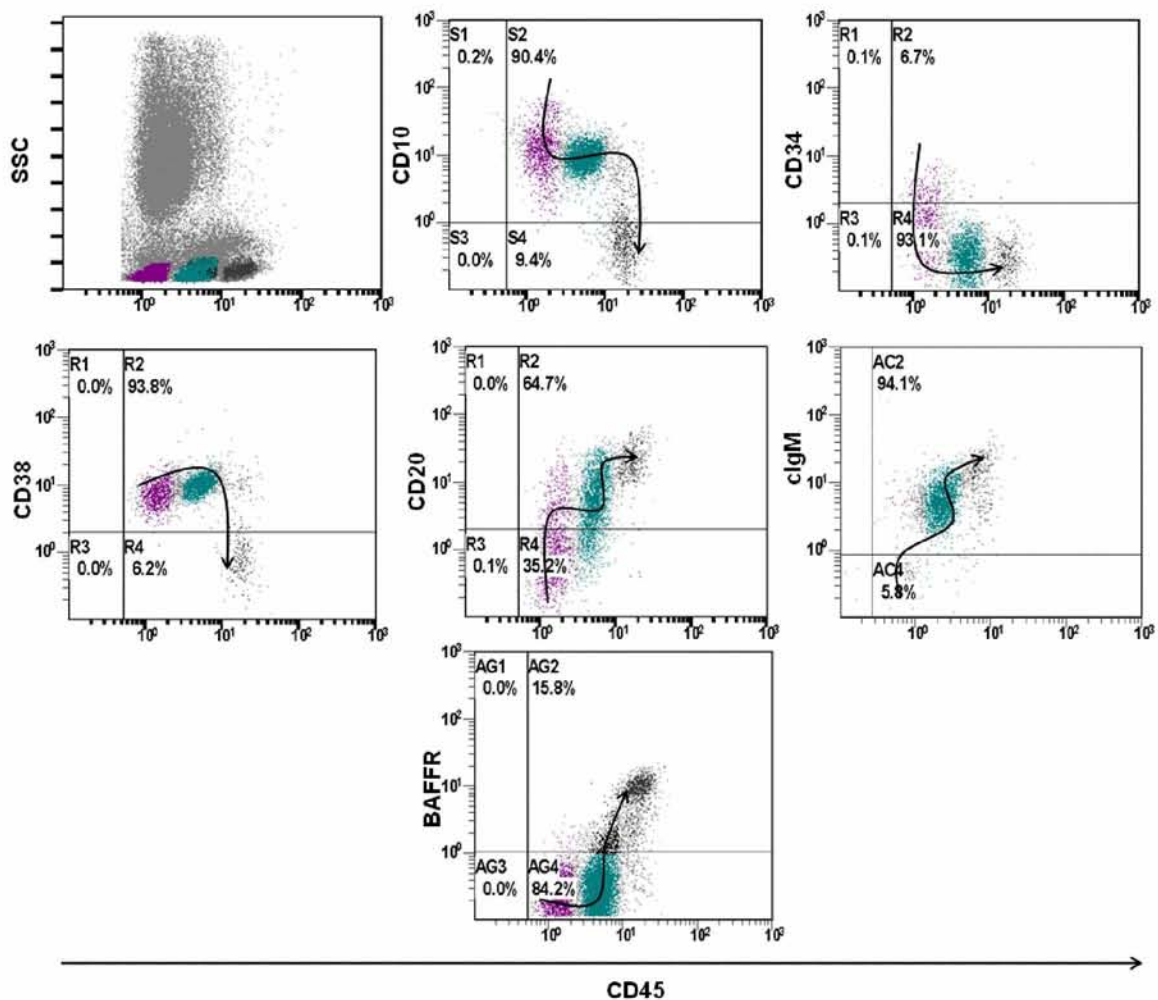
Εικόνα 18. Α. Σύνδεση μεταγραφικής και πρωτεϊνικής έκφρασης του BAFFR υποδοχέα. Το κόκκινο σημείο στο γράφημα αντιπροσωπεύει τον ασθενή με τον *BAFFR-P21R* πολυμορφισμό, ενώ το μπλε σημείο αντιπροσωπεύει τον ασθενή για τον οποίο δεν κατέστη δυνατή η μοριακή ανάλυση της έκφρασης του υποδοχέα. **Β.** Η ανάλυση αλληλουχίας βάσεων για τον ασθενή με αυξημένη mRNA αλλά μηδενική πρωτεϊνική BAFFR έκφραση αποκάλυψε την παρουσία της p.P21R γενετική βλάβης.

Προκειμένου να αποδείξουμε ότι η απρόσφορη έκφραση του BAFFR περιορίζεται στους B-λεμφοβλάστες και είναι απύσα από τους φυσιολογικούς κυτταρικούς ομολόγους τους, αξιολογήσαμε την επιφανειακή έκφραση του BAFFR σε μυελούς των οστών πλούσιους σε αιματογόνια από 5 άτομα (3 ενήλικες και 2 παιδιά). Η διάκριση των αιματογονίων από τα ώριμα B-κύτταρα έγινε με τη χρήση του CD10 δείκτη που δεν εκφράζεται στις ώριμες μορφές των B-κυττάρων, ενώ σε συνδυασμό με άλλους δείκτες όπως οι CD34, CD38, CD20 διαφοροποιεί τις τάξεις των αιματογονίων (**Εικόνα 19**).²⁹ Αν και η πλειονότητα των CD10⁺ κυττάρων δεν εξέφραζε BAFFR (προ-προ-B και προ-B-κύτταρα), διαπιστώθηκε ένας μικρός πληθυσμός με χαμηλή έκφραση CD10 και υψηλή έκφραση CD45, πλησίον των λεμφοκυττάρων ο οποίος εξέφραζε μεν BAFFR, αλλά σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα ώριμα λεμφοκύτταρα (**Εικόνα 20**). Ο πληθυσμός αυτός πιθανότατα αντιστοιχεί στα ανώριμα/μεταβατικά (immature/transitional) B-κύτταρα λίγο πριν αυτά εγκαταλείψουν το μυελό των οστών για να μεταβούν στην περιφέρεια για την περαιτέρω ωρίμανσή τους. Μάλιστα η διαπίστωση αυτή συμπίπτει με τη βιβλιογραφία που υποστηρίζει έναρξη της έκφρασης του BAFFR στο στάδιο του ανώριμου/μεταβατικού B-κυττάρου.⁵⁵ Σε αντίθεση λοιπόν με τις νεοπλασίες των ώριμων B-κυττάρων που φαίνεται να διατηρούν την έκφραση του BAFFR, οι B-λεμφοβλάστες αποκτούν μία πρόιμη έναρξη της έκφρασης του υποδοχέα, η οποία είναι απύσα από τα φυσιολογικά προγονικά B-κύτταρα. Συνολικά, τα ευρήματά μας

σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο υποστηρίζουν τη επικράτηση του BAFFR μεταξύ των υποδοχέων του BAFF/APRIL συστήματος και υποδεικνύουν ότι αυτή του η έκφραση περιορίζεται στις πιο ώριμες μορφές Β-ΟΛΛ.



Εικόνα 19. Αντιπροσωπευτικό πρότυπο έκφρασης δεικτών κατά την ωρίμανση των Β-κυττάρων σε συνδυασμό με την έκφραση του CD10. Τα στικτογράμματα δείχνουν την έκφραση επί των CD19⁺ κυττάρων. Τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση ωρίμανσης. Ο BAFFR δεν εκφράζεται στα πρώιμα προγονικά Β-κύτταρα. Με μωβ χρώμα απεικονίζονται οι πρωιμότερες μορφές των αιματογονίων και με γκρι τα ώριμα Β-κύτταρα.



Εικόνα 20. Πρότυπο έκφρασης δεικτών κατά την ωρίμανση των B-κυττάρων με βάση την έκφραση του CD45. Η ανάλυση έχει γίνει στο πληθυσμό των CD19⁺ κυττάρων. Τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση ωρίμανσης. Με μωβ χρώμα απεικονίζονται οι πρωιμότερες μορφές των αιματογονίων και με γκρι τα ώριμα B-κύτταρα.

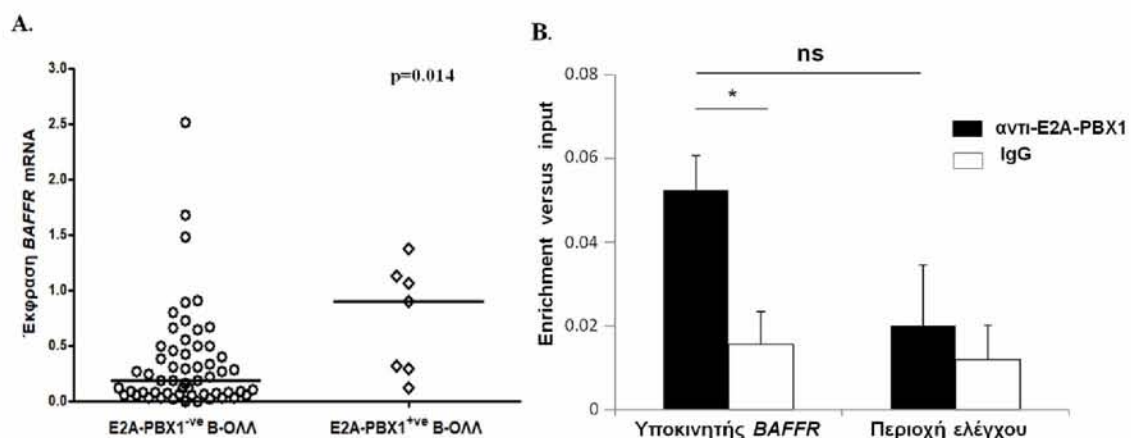
4.4. Ρύθμιση της έκφρασης του *BAFFR* από τον E2A-PBX1 μεταγραφικό παράγοντα

Από την ανάλυση της μεταγραφικής έκφρασης του *BAFFR* προέκυψε ότι τα mRNA επίπεδα του υποδοχέα ήταν αυξημένα στους ασθενείς με προ-B-ΟΛΛ που έφεραν τον E2A-PBX1 ανασυνδυασμό, γεγονός που μας οδήγησε στο να διερευνήσουμε υποκείμενους μοριακούς μηχανισμούς που θα μπορούσαν να εμπλέκονται στο φαινόμενο αυτό. Η πιθανή ρύθμιση της έκφρασης του *BAFFR* από τον E2A-PBX1 μεταγραφικό παράγοντα προσεγγίστηκε πειραματικά χρησιμοποιώντας την κυτταρική σειρά 697. Τα κύτταρα 697 αντιπροσωπεύουν προ-B-λεμφοβλάστες που φέρουν τον E2A-PBX1 ανασυνδυασμό και εκφράζουν –όπως επιβεβαιώθηκε μεταγραφικά και πρωτεϊνικά– μόνο τον BAFFR,

προσομοιάζοντας σε μεγάλο βαθμό τον φαινότυπο των ασθενών της μελέτης στους οποίους βρέθηκαν αυξημένα μετάγραφα του *BAFFR* κατά την μοριακή ανάλυση. Προκειμένου λοιπόν να μελετήσουμε την *in vivo* δέσμευση του E2A-PBX1 στο γονίδιο του *BAFFR*, πραγματοποιήσαμε στα 697 κύτταρα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης με ειδικό για τον ανασυνδυασμό αντίσωμα όπως επίσης και με ένα αντίσωμα χωρίς ειδικότητα (IgG), ως αρνητικό μάρτυρα.

Η DNA αλληλουχία του *BAFFR* γονιδίου, συμπεριλαμβανομένου και του υποκινητή του που οριοθετείται ~500 bp πλησίον της θέσης έναρξης της μεταγραφής, χρησιμοποιήθηκε για την αναζήτηση συντηρημένων μοτίβων πρόσδεσης του E2A-PBX1 μεταγραφικού παράγοντα. Η ανάλυση αυτή κατέδειξε με υψηλή πιθανότητα θέσεις πρόσδεσης για τον E2A-PBX1 στον υποκινητή του *BAFFR* γονιδίου, καθώς επίσης και στο 2^ο ιντρόνιο και στην 3' UTR. Στο πλαίσιο αυτό, σχεδιάστηκαν ζεύγη εκκινητών ειδικά για αυτές τις περιοχές για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων των ChIP με Real-Time PCR. Στην ανάλυση συμπεριλήφθηκε ένα ακόμη ζευγάρι εκκινητών για την ενίσχυση μιας DNA αλληλουχίας που δεν έφερε μοτίβα πρόσδεσης για τον E2A-PBX1, ως περιοχή ελέγχου.

Οι ChIP δοκιμασίες έδειξαν 3.3 φορές μεγαλύτερη πρόσδεση του E2A-PBX1 έναντι του IgG αντισώματος στον υποκινητή του *BAFFR* γονιδίου και 2.6 φορές έναντι της περιοχής ελέγχου (Εικόνα 21B), όπως επίσης και μία οριακή πρόσδεση στις αλληλουχίες του 2^{ου} ιντρονίου και της 3' UTR. Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι ο E2A-PBX1 προσδέεται στον υποκινητή του *BAFFR* και μπορεί να εμπλέκεται στην ανοδική ρύθμιση της μεταγραφικής του έκφρασης στη Β-ΟΛΛ. Το γεγονός ωστόσο ότι ακόμη κι ασθενείς που δεν έφεραν τον ανασυνδυασμό, εξέφραζαν *BAFFR* υποδηλώνει ότι ο E2A-PBX1 δεν είναι ικανός από μόνος του να επάγει την έκφραση του υποδοχέα στους Β-λεμφοβλάστες.



Εικόνα 21. Ο E2A-PBX1 εμπλέκεται στη ρύθμιση της *BAFFR* έκφρασης στους Β-λεμφοβλάστες. **A.** Τα μετάγραφα του *BAFFR* είναι αυξημένα στους ασθενείς με προ-B-ΟΛΛ που φέρουν τον E2A-

PBX1 ανασυνδυασμό (Mann-Whitney U στατιστική δοκιμή). **B.** Ο E2A-PBX1 προσδένεται στον υποκινητή του *BAFFR* γονιδίου στην προ-B-ΟΛΛ 697 κυτταρική σειρά. Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης στα 697 κύτταρα με το ειδικό για τον E2A-PBX1 ανασυνδυασμό αντίσωμα και το IgG αντίσωμα ελέγχου. Δύο ζευγάρια εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν: ένα ζευγάρι για την ενίσχυση του υποκινητή του *BAFFR* κι ένα ζευγάρι για την ενίσχυση περιοχής που δεν φέρει μοτίβα πρόσδεσης του E2A-PBX1. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν μέσες τιμές και οι γραμμές την τυπική απόκλιση της μέσης τιμής από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα. Οι τιμές στατιστικής σημαντικότητας προσδιορίστηκαν με Student's t δοκιμή, όπου ns (not-significant/μη στατιστικά σημαντικό) p: 0.13 και *p= 0.019.

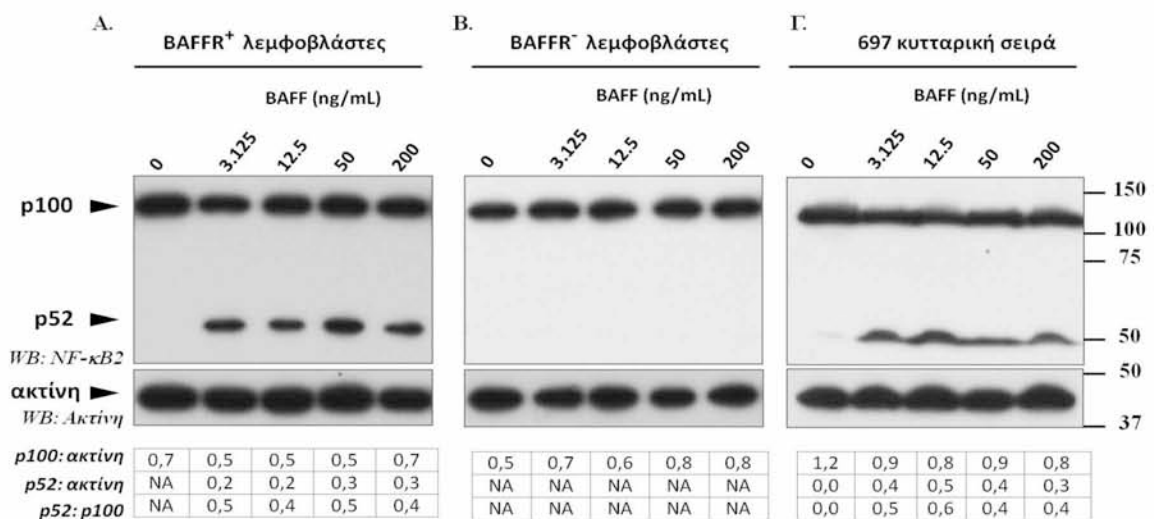
4.5. Η ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού του NF-κB από τον BAFF στους B-λεμφοβλάστες.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο BAFFR είναι ο επικρατών υποδοχέας του BAFF/APRIL συστήματος που εκφράζεται στα λευχαιμικά κύτταρα των ασθενών με Β-ΟΛΛ, θελήσαμε να διερευνήσουμε αν η πρωτεΐνη αυτή παρά την απρόσφορη έκφρασή της διατηρεί τη λειτουργική της ακεραιότητα. Για το σκοπό αυτό, αξιολογήσαμε την ενεργοποίηση της κύριας σηματοδοτικής οδού καθοδικά της αλληλεπίδρασης BAFF/BAFFR, αυτής του εναλλακτικού μονοπατιού του NF-κB (NF-κB2). Σε αντίθεση με την κλασσική οδό (NF-κB1) που ενεργοποιείται από ένα μεγάλο εύρος υποδοχέων, η ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού λαμβάνει χώρα μόνο από κάποια μέλη της οικογένειας των TNF.⁸⁰ Παρά το ότι ο BAFF παράγεται από μία ποικιλία κυτταρικών τύπων, το γεγονός ότι ο BAFFR εκφράζεται αποκλειστικά και μόνο στα Β-κύτταρα περιορίζει τα αποτελέσματα της δράσης της μεσολαβούμενης από τον BAFF ενεργοποίησης του NF-κB2 μονοπατιού αποκλειστικά σε αυτά. Ακόμη, επειδή ο BAFF αποτελεί τον μοναδικό συνδέτη για τον BAFFR σε συνδυασμό με το ότι η πρόσδεσή του στους άλλους 2 υποδοχείς του BAFF/APRIL συστήματος ενεργοποιεί την κλασσική και όχι εναλλακτική οδό του NF-κB, μας επέτρεψε να χρησιμοποιήσουμε την ενεργοποίηση του NF-κB2 ως έναν αντιπροσωπευτικό δείκτη της λειτουργικότητας του BAFFR υποδοχέα.

Στα φυσιολογικά Β-κύτταρα, η BAFF-μεσολαβούμενη ενεργοποίηση του NF-κB2 περιλαμβάνει την αποικοδόμηση της p100 ισομορφής προς τη λειτουργική p52 (NF-κB2) υπομονάδα, ακολουθούμενη από το σχηματισμό και την είσοδο στον πυρήνα των μεταγραφικά ενεργών συμπλόκων p52-RelB. Μάλιστα, η έλλειψη ιδιοσυστατικής αποικοδόμησης της p100 σημαίνει ότι για να συμβεί ενεργοποίηση του μονοπατιού

απαιτείται το κατάλληλο σήμα, οπότε η μέτρηση των p100 και p52 ισομορφών αποτελεί έναν δείκτη αντιπροσωπευτικό της μεσολαβούμενης από συνδέτη ενεργοποίησης της οδού.¹⁶¹

Για το σκοπό αυτό, απομονωμένα κύτταρα από 3 ενήλικες ασθενείς με Β-ΟΛΛ καλλιεργήθηκαν παρουσία εξωγενούς BAFF και κατόπιν ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western η ενεργοποίηση του εναλλακτικού μονοπατιού του NF-κΒ. Πιο συγκεκριμένα, εμπλουτισμένα σε λεμφοβλάστες μονοπύρηνια κύτταρα από έναν ασθενή με κοινή Β-ΟΛΛ που δεν εξέφραζε BAFFR κι από 2 ασθενείς με προ-Β-ΟΛΛ που εξέφραζαν τον υποδοχέα, και οι οποίοι έφεραν και τον BCR-ABL ανασυνδυασμό, διεγέρθηκαν με ένα εύρος συγκεντρώσεων (3.125-200.0 ng/mL) της 60-μερούς μορφής του συνδέτη για 18 ώρες και κατόπιν ελέγχθηκε ο βαθμός αποικοδόμησης της p100 προς τη p52 ισομορφή με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Παρατηρήσαμε ότι ακόμη και οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις BAFF είναι ικανές να επάγουν 2-4 φορές περισσότερη αποικοδόμηση της p100, και το φαινόμενο αυτό δεν φάνηκε να είναι εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση της κυτταροκίνης (**Εικόνα 22Α**). Το εύρημα αυτό ενισχύθηκε ακόμη περισσότερο από το γεγονός ότι καλλιέργεια της προ-Β-ΟΛΛ 697 κυτταρικής σειράς με τις συγκεντρώσεις 60-μερούς BAFF που χρησιμοποιήθηκαν και στα κύτταρα των ασθενών, είχε ακριβώς το ίδιο αποτέλεσμα στην ενεργοποίηση της NF-κΒ2 οδού (**Εικόνα 22Γ**). Να σημειώσουμε ότι όπως ήταν αναμενόμενο, δε διαπιστώθηκε ενεργοποίηση του εναλλακτικού μονοπατιού στους λεμφοβλάστες του ασθενούς που δεν εξέφραζαν τον BAFFR (**Εικόνα 22Β**). Επομένως, η αυξημένη ευαισθησία του εναλλακτικού μονοπατιού του NF-κΒ2 στη διέγερση με BAFF υποστηρίζει την άποψη ότι ο BAFFR, παρά την απρόσφορη έκφρασή του, είναι λειτουργικός στη Β-ΟΛΛ.



Εικόνα 22. Ο BAFF ενεργοποιεί το εναλλακτικό μονοπάτι του NF-κΒ2 στους BAFFR⁺ λεμφοβλάστες. Η ανοσοαποτύπωση κατά Western έδειξε την αποικοδόμηση της p100 προς p52 σε

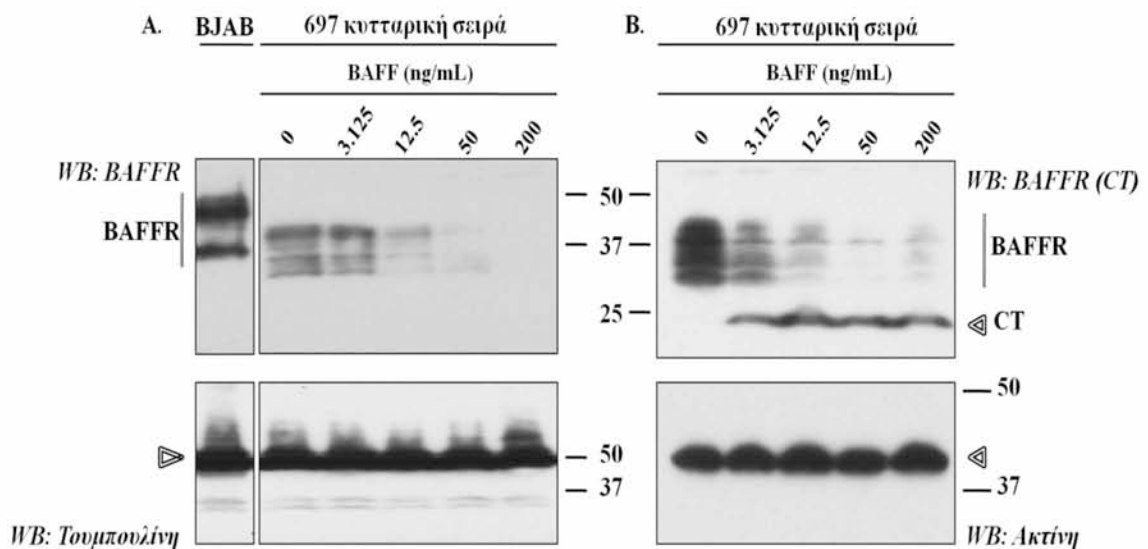
μονοπύρηνια κύτταρα ασθενών με Β-ΟΛΛ εμπλουτισμένα σε λεμφοβλάστες (Α) και στην 697 κυτταρική σειρά (Γ) μετά από ολονύκτια επώαση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις 60-μερούς BAFF, όπως διαπιστώνεται κι από τον πυκνομετρικό λόγο της p52 προς την p100 (NA: μη εφαρμόσιμη τιμή). Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη-μάρτυρας για τον έλεγχο του ισόποσου φορτώματος των πρωτεϊνών.

4.6. Μεσολαβούμενη από τον BAFF αποικοδόμηση του BAFFR στους Β-λεμφοβλάστες

Πρόσφατα, οι Smulski και συν. έδειξαν ότι ο BAFFR μπορεί να αποδομηθεί από την επιφάνεια του κυττάρου κατά ένα τρόπο συντονισμένο και όχι συστατικό, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των άλλων δύο υποδοχέων του BAFF/APRIL συστήματος, TACI και BCMA. Η πρωτεολυτική διάσπαση του BAFF λαμβάνει χώρα μετά τη πρόσδεση του BAFF (είτε της 3-μερούς είτε της 60-μερούς μορφής του) μόνο σε εκείνα τα Β-κύτταρα που συνεκφράζουν TACI, αποτελώντας έτσι έναν μηχανισμό που όχι μόνο ρυθμίζει τα επιφανειακά επίπεδα του BAFFR αλλά και την μεσολαβούμενη από τον BAFFR επιβίωση των Β-κυττάρων. Η διάσπαση του υποδοχέα πιθανολογείται ότι συμβαίνει στην εξωκυττάρια επικράτεια της πρωτεΐνης οδηγώντας στην εμφάνιση ενός C-τελικού τμήματος 22 kDa που φαίνεται να περιλαμβάνει τη διαμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα. Πειράματα σε κυτταρικές σειρές έδειξαν ότι αν και μετά από 24ωρη επώαση με τον BAFF σχεδόν όλος ο υποδοχέας έχει αποικοδομηθεί, μετά από 72 ώρες τα πρωτεϊνικά επίπεδα του BAFFR φτάνουν πάλι τις φυσιολογικές τιμές.¹⁶²

Θελήσαμε λοιπόν να εξετάσουμε κατά πόσο η σύνδεση του BAFF στον BAFFR που εκφράζεται στους Β-λεμφοβλάστες θα μπορούσε να επηρεάσει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ίδιου του υποδοχέα, όπως συμβαίνει στα φυσιολογικά ώριμα Β-κύτταρα, με την εξαίρεση όμως ότι οι Β-λεμφοβλάστες δεν εκφράζουν τον TACI. Για το σκοπό αυτό, η 697 κυτταρική σειρά που εκφράζει μόνο τον BAFFR από τους υποδοχείς του BAFF/APRIL συστήματος, καλλιεργήθηκε παρουσία του 60-μερούς BAFF (3.125-200 ng/mL) για ~18 ώρες και κατόπιν αναλύθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα. Επειδή ωστόσο το αντι-BAFFR αντίσωμα που χρησιμοποιείται για την κυτταρομετρική ανάλυση του υποδοχέα και το οποίο συνδέεται στο εξωκυττάριο τμήμα του BAFFR αναστέλλεται από το συνδεδεμένο στον υποδοχέα BAFF, η ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης του BAFFR έγινε με ανοσοαποτύπωση κατά Western με ένα αντίσωμα που ανιχνεύει την ακέραια πρωτεΐνη καθώς και με ένα 2^ο αντίσωμα που ανιχνεύει επιπλέον το C-τελικό τμήμα αυτής.

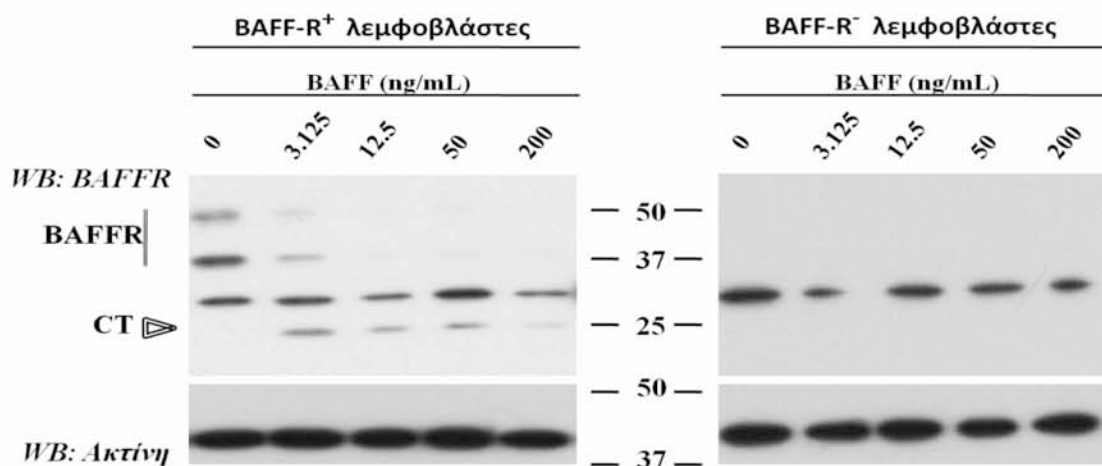
Διαπιστώσαμε λοιπόν ότι παρά το γεγονός ότι τα 697 κύτταρα δεν εκφράζουν TACI (ούτε μεταγραφικά ούτε πρωτεϊνικά), όταν επωαστούν παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων του BAFF, σταδιακά τα επίπεδα του BAFFR πέφτουν. Μάλιστα, ακόμη και η πιο χαμηλή συγκέντρωση του συνδέτη (3.125 ng/mL) ήταν σε θέση να επιφέρει μείωση των επιπέδων του υποδοχέα στο μισό των φυσιολογικών, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις του BAFF, τα επίπεδα του υποδοχέα εκμηδενίζονταν (**Εικόνα 23A**). Η χρήση του 2^{ου} αντισώματος έναντι του C-τελικού άκρου ανέδειξε, πέρα από την μείωση των επιπέδων του BAFFR, την εμφάνιση του C-τελικού τμήματος μεγέθους ~22 kDa, ως προϊόν της υποκειμένης διάσπασης του υποδοχέα, χωρίς ωστόσο σημαντικές διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων του BAFF που χρησιμοποιήθηκαν (**Εικόνα 23B**). Να σημειώσουμε ωστόσο ότι ενώ φυσιολογικά στην ανοσοαποτύπωση κατά Western με το αντι-BAFFR αντίσωμα αναμένονται 2 ζώνες, στα ~50 kDa και στα 36 kDa (με τη δεύτερη να πιθανολογείται ότι ανταποκρίνεται σε μία μορφή της πρωτεΐνης που έχει υποστεί κάποια μετα-μεταφραστική τροποποίηση, χωρίς ωστόσο αυτό να έχει διευκρινιστεί), το πρότυπο της πρωτεΐνης για τα 697 κύτταρα ήταν διαφορετικό καθώς εμείς εντοπίσαμε ένα χαμηλότερου μοριακού βάρους πρωτεϊνικό κλάσμα.



Εικόνα 23. Ο BAFF επάγει την αποικοδόμηση του BAFFR στην 697 προ-B-ΟΛΛ κυτταρική σειρά. Ανοσοαποτύπωση κατά Western για τον BAFFR στην 697 κυτταρική σειρά παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων BAFF με **(A)** ένα αντίσωμα που ανιχνεύει την ακέραη πρωτεΐνη και **(B)** ένα αντίσωμα που ανιχνεύει επιπλέον το C-τελικό τμήμα (CT ~22 kDa) του υποδοχέα. Η ακέραη πρωτεΐνη του BAFFR εντοπίζεται φυσιολογικά περί τα ~50 & 36 kDa, όπως φαίνεται στην κυτταρική σειρά Burkitt λεμφώματος BJAB, ενώ η 697 εμφανίζει μία χαμηλότερου μοριακού βάρους πρωτεΐνη. Αυξανόμενης της συγκέντρωσης του BAFF, αυξάνεται και ο βαθμός αποικοδόμησης του BAFFR, με

την εμφάνιση του CT θραύσματος. Η τουμουλίνη και η ακτίνη χρησιμοποιήθηκαν ως πρωτεΐνες-μάρτυρες στα αντίστοιχα πειράματα, για τον έλεγχο του ισόποσου φορτώματος των πρωτεϊνών.

Στη συνέχεια, προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε το παραπάνω φαινόμενο και σε κύτταρα ασθενών με Β-ΟΛΛ. Για το σκοπό αυτό, μονοπύρρηνα κύτταρα από έναν ασθενή με προ-Β-ΟΛΛ (BCR-ABL⁺) που εξέφραζε τον BAFFR κι από έναν ασθενή με κοινή Β-ΟΛΛ που δεν εξέφραζε τον υποδοχέα καλλιεργήθηκαν με τις ίδιες συγκεντρώσεις 60-μερούς BAFF για ~18 ώρες και κατόπιν αναλύσαμε με ανοσοαποτύπωση κατά Western την έκφραση του BAFFR, χρησιμοποιώντας το αντίσωμα που αναγνωρίζει το C-τελικό τμήμα της πρωτεΐνης. Διαπιστώσαμε ότι και στην περίπτωση του ασθενούς με Β-ΟΛΛ που εξέφραζε τον υποδοχέα έλαβε χώρα αποικοδόμηση του BAFFR μετά από προσθήκη του BAFF, και μάλιστα τα κύτταρα του ασθενούς φάνηκε να είναι εξίσου ευαίσθητα, αφού το αποτέλεσμα της δράσης του BAFF ήταν αντιληπτό ακόμη και στις χαμηλές συγκεντρώσεις του συνδέτη (**Εικόνα 24**). Να σημειώσουμε ωστόσο ότι στα κύτταρα των ασθενών οι ζώνες που ανιχνεύσαμε για τον BAFFR ανταποκρινόταν στις αναμενόμενες τιμές (~50 & 36 kDa). Τα δεδομένα αυτά αναδεικνύουν μία νέα δράση του BAFF στον έλεγχο των επιπέδων της επιφανειακής έκφρασης του BAFFR στους Β-λεμφοβλάστες και πιθανότατα και της δράσης του, και μάλιστα το φαινόμενο αυτό δεν μεσολαβείται από τον TACI.



Εικόνα 24. Ο BAFF επάγει την αποικοδόμηση του BAFFR σε κύτταρα ασθενών με Β-ΟΛΛ που εκφράζουν τον υποδοχέα. Ανοσοαποτύπωση κατά Western για τον BAFFR σε έναν BAFFR⁺ ασθενή (προ-Β-ΟΛΛ) & έναν BAFFR⁻ ασθενή (κοινή Β-ΟΛΛ). Στα κύτταρα των ασθενών η ακέραια πρωτεΐνη του BAFFR εμφανίζεται στο αναμενόμενο μήκος (~50 & 36 kDa). Αυξανόμενης της συγκέντρωσης του BAFF, αυξάνεται κι ο βαθμός αποικοδόμησης του BAFFR με την εμφάνιση του C-τελικού (CT) τμήματος (~22 kDa). Η ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη-μάρτυρας για τον έλεγχο του ισόποσου φορτώματος των πρωτεϊνών.

4.7. Ο BAFF επάγει τον κυτταρικό θάνατο στους λεμφοβλάστες ασθενών με B-ΟΛΛ

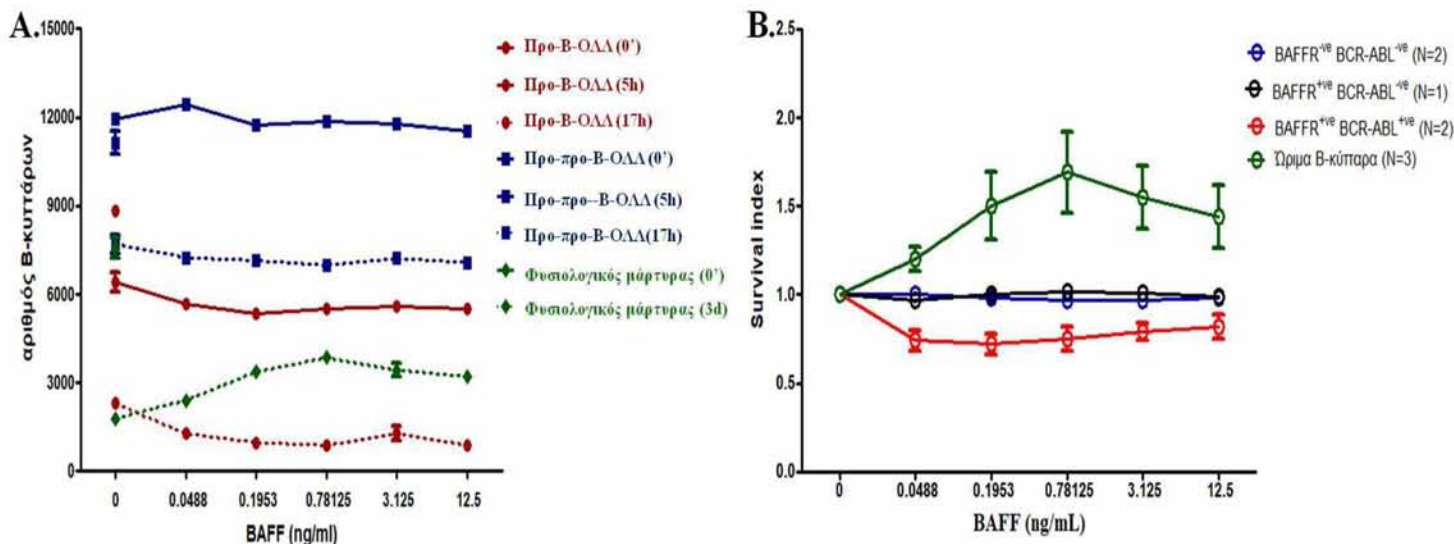
Από τα μέχρι τώρα δεδομένα της μελέτης έχουμε διαπιστώσει ότι ο BAFFR παρά την απρόσφορη έκφρασή του στη B-ΟΛΛ είναι λειτουργικός. Αν και οι B-λεμφοβλάστες των ασθενών είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς στην απόπτωση *in vitro* λόγω της έλλειψης κατάλληλων σημάτων επιβίωσης,¹⁴¹ θελήσαμε να διερευνήσουμε την επίδραση του BAFF στην επιβίωση των λευχαιμικών κυττάρων. Για το σκοπό αυτό, απομονωμένοι CD19⁺ λεμφοβλάστες από 2 ασθενείς που δεν εξέφραζαν BAFFR – έναν με προ-προ-B κι έναν με κοινή B-ΟΛΛ– κι από 3 ασθενείς που εξέφραζαν τον υποδοχέα –έναν με κοινή και 2 με προ-B-ΟΛΛ– επώαστηκαν παρουσία ποικίλων συγκεντρώσεων του 60-μερούς BAFF (0.049-12.5 ng/mL) για μικρό χρονικό διάστημα, συγκεκριμένα 5 και 17 ώρες, λόγω της ταχείας απόπτωσης που υφίστανται τα κύτταρα αυτά στην καλλιέργεια. Οι συνθήκες εξετάστηκαν εις τριπλούν και η επίδραση του BAFF στην επιβίωση των B-λεμφοβλαστών προσδιορίστηκε κυτταρομετρικά με χρονομετρημένη ανάλυση, όπου αξιολογήθηκε ο αριθμός των ζωντανών B-λεμφοβλαστών, ως CD19⁺ 7-AAD⁻ κύτταρα. Απομονωμένα ώριμα CD19⁺ B-κύτταρα περιφερικού αίματος από 3 υγιείς μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες σε κάθε πείραμα, για τα οποία ωστόσο η επίδραση του BAFF αξιολογήθηκε μετά από 3 ημέρες καλλιέργειας.

Παρά την παγιωμένη συμβολή του BAFF στην επιβίωση των φυσιολογικών B-κυττάρων της περιφέρειας, διαπιστώσαμε ότι ο συνδέτης αυτός ενέτεινε την απόπτωση των B-λεμφοβλαστών που εξέφραζαν BAFFR, αλλά μόνο στους ασθενείς με προ-B-ΟΛΛ που αναλύθηκαν και οι οποίοι έφεραν επιπλέον και τον BCR-ABL ανασυνδυασμό. Το φαινόμενο αυτό δεν φάνηκε να είναι εξαρτώμενο της συγκέντρωσης του BAFF, αφού ακόμη και οι πιο χαμηλές συγκεντρώσεις κυτταροκίνης ενέτειναν την απόπτωση των λευχαιμικών κυττάρων. Μάλιστα, τα λευχαιμικά κύτταρα ενός από τους 2 ασθενείς μετά τη θεραπεία εφόδου επέδειξαν παρόμοια απάντηση στην καλλιέργεια με BAFF, όπως και στη διάγνωση. Κάτι τέτοιο ωστόσο δεν παρατηρήθηκε ούτε στους ασθενείς που δεν εξέφραζαν τον BAFFR, αλλά παραδόξως ούτε στον ασθενή με κοινή B-ΟΛΛ που εξέφραζε τον υποδοχέα, εγείροντας ερωτήματα για το κατά πόσο το στάδιο ωρίμανσης του B-λεμφοβλάστη θα μπορούσε να επηρεάσει την απάντηση των κυττάρων στον BAFF. Αξίζει να σημειώσουμε ότι τα B-κύτταρα των υγιών μαρτύρων συμπεριφέρθηκαν κατά τα αναμενόμενα, αφού εκείνα που έλαβαν BAFF επέδειξαν καλύτερη επιβίωση σε σχέση με τα κύτταρα χωρίς κυτταροκίνη, και μάλιστα κατά ένα τρόπο δοσοεξαρτώμενο (**Εικόνα 25**). Από όσο γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη φορά που περιγράφεται ένας νέος ρόλος για τον BAFF, ως ένας παράγοντας που

δύναται να επάγει τον κυτταρικό θάνατο των Β-λεμφοβλαστών. Συνολικά, η επιβίωση των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη παρουσιάζονται στον **Πίνακα 14**.

Πίνακας 14. Ο BAFF επάγει την απόπτωση των Β-λεμφοβλαστών ασθενών με BCR-ABL⁺ προ-B-ΟΛΛ. Απομονωμένοι λεμφοβλάστες 5 ασθενών με Β-ΟΛΛ καλλιεργήθηκαν για 5 και 17 ώρες με το 60-μερές BAFF (0.049-12.5 ng/mL). CD19⁺ Β-κύτταρα 3 φυσιολογικών μαρτύρων αξιολογήθηκαν μετά από 3 μέρες, λειτουργώντας ως θετικοί μάρτυρες· κάθε συνθήκη ελέγχθηκε εις τριπλούν. Ο αριθμός των CD19⁺ 7-AAD⁻ κυττάρων προσδιορίστηκε με κυτταρομετρία ροής (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση της μέσης τιμής). Εντός παρένθεσης αναγράφεται ο λόγος των ανακτημένων κυττάρων της κάθε συνθήκης καλλιέργειας προς τα κύτταρα που δεν έλαβαν BAFF. Ασθενής #64: BAFFR⁻ κοινή Β-ΟΛΛ, ασθενής #71: BAFFR⁺ κοινή Β-ΟΛΛ, ασθενείς #65 & #69: BAFFR⁺ BCR-ABL⁺ προ-B-ΟΛΛ, ασθενής #72: BAFFR⁻ προ-προ-B-ΟΛΛ, φυσιολογικοί μάρτυρες 1-3: CD19⁺ κύτταρα απομονωμένα από μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος 3 υγιών μαρτύρων.

Ασθενής #	BAFF (ng/mL)					
	0	0.049	0.195	0.781	3.125	12.5
Ασθενής 64 (5h)	11100 ± 315 (1.00)	11686 ± 742 (1.05)	11343 ± 356 (1.02)	11025 ± 57 (0.99)	11093 ± 172 (0.99)	11135 ± 127 (1.00)
Ασθενής 64 (17h)	10044 ± 51 (1.00)	10523 ± 287 (1.05)	10495 ± 224 (1.09)	10551 ± 88 (1.05)	10106 ± 152 (1.01)	10116 ± 174 (1.01)
Ασθενής 71 (5h)	10768 ± 564 (1.00)	10254 ± 373 (0.95)	10627 ± 408 (0.99)	11012 ± 523 (1.02)	10489 ± 83 (0.97)	10458 ± 107 (0.97)
Ασθενής 71 (17h)	7471 ± 129 (1.00)	7394 ± 135 (0.99)	7564 ± 64 (1.01)	7626 ± 353 (1.02)	7766 ± 325 (1.04)	7569 ± 405 (1.01)
Ασθενής 65 (5h)	2354 ± 24 (1.00)	1697 ± 32 (0.72)	1791 ± 134 (0.76)	1937 ± 104 (0.82)	1964 ± 93 (0.83)	2014 ± 43 (0.86)
Ασθενής 65 (17h)	478 ± 35 (1.00)	361 ± 11 (0.76)	352 ± 20 (0.74)	420 ± 18 (0.88)	391 ± 52 (0.82)	448 ± 38 (0.94)
Ασθενής 69 (5h) – 1^ο πείραμα	6412 ± 591 (1.00)	5692 ± 114 (0.89)	5358 ± 220 (0.83)	5527 ± 142 (0.86)	5575 ± 69 (0.87)	5522 ± 114 (0.86)
Ασθενής 69 (17h)– 1^ο πείραμα	2295 ± 65 (1.00)	1281 ± 32 (0.56)	982 ± 90 (0.43)	881 ± 124 (0.38)	1278 ± 417 (0.56)	888 ± 185 (0.39)
Ασθενής 69 (5h)– 2^ο πείραμα	6346 ± 221 (1.00)	5766 ± 64 (0.91)	5544 ± 230 (0.87)	5668 ± 289 (0.89)	5901 ± 91 (0.93)	6138 ± 117 (0.97)
Ασθενής 69 (17h)– 2^ο πείραμα	2453 ± 40 (1.00)	1269 ± 265 (0.52)	1221 ± 60 (0.50)	1257 ± 40 (0.51)	1469 ± 51 (0.60)	1685 ± 90 (0.69)
Ασθενής 72 (5h)– 1^ο πείραμα	11939 ± 71 (1.00)	12450 ± 346 (1.04)	11740 ± 331 (0.98)	11855 ± 303 (0.99)	11779 ± 196 (0.99)	11529 ± 91 (0.97)
Ασθενής 72 (17h)– 1^ο πείραμα	7709 ± 508 (1.00)	7251 ± 118 (0.94)	7147 ± 144 (0.93)	6990 ± 102 (0.91)	7215 ± 223 (0.94)	7078 ± 140 (0.92)
Ασθενής 72 (5h)– 2^ο πείραμα	11474 ± 123 (1.00)	11189 ± 229 (0.98)	11366 ± 777 (0.99)	11129 ± 99 (0.97)	11449 ± 153 (1.00)	11868 ± 286 (1.03)
Ασθενής 72 (17h)– 2^ο πείραμα	8251 ± 420 (1.00)	7563 ± 98 (0.92)	7281 ± 150 (0.88)	7310 ± 324 (0.89)	7566 ± 126 (0.92)	7777 ± 120 (0.94)
Ασθενής 69 (5h) μετά θεραπεία εφόδου	6155 ± 185 (1.00)	5817 ± 35 (0.94)	5799 ± 256 (0.94)	5830 ± 105 (0.95)	5823 ± 140 (0.95)	6170 ± 232 (1.00)
Ασθενής 69 (17h) μετά θεραπεία εφόδου	2433 ± 165 (1.00)	1616 ± 114 (0.66)	1580 ± 190 (0.65)	1685 ± 186 (0.69)	1875 ± 164 (0.77)	2087 ± 137 (0.86)
Φυσιολογικός μάρτυρας #1	1797 ± 133 (1.00)	2407 ± 155 (1.34)	3378 ± 98 (1.88)	3855 ± 149 (2.15)	3442 ± 405 (1.92)	3216 ± 191 (1.79)
Φυσιολογικός μάρτυρας #2	5986 ± 762 (1.00)	6628 ± 156 (1.11)	7620 ± 112 (1.27)	8415 ± 324 (1.41)	8013 ± 186 (1.34)	7172 ± 149 (1.20)
Φυσιολογικός μάρτυρας #3	3390 ± 147 (1.00)	3900 ± 144 (1.15)	4611 ± 70 (1.36)	5107 ± 72 (1.51)	4750 ± 220 (1.40)	4466 ± 107 (1.32)



Εικόνα 25. Επίδραση του BAFF στην επιβίωση των Β-λεμφοβλαστών. **A.** Απομονωμένοι λεμφοβλάστες ενός ασθενή με BAFFR⁺ προ-B-ΟΛΛ κι ενός ασθενή με BAFFR⁻ προ-προ-B-ΟΛΛ καλλιεργήθηκαν για 5 και 17 ώρες (h) με το 60-μερές BAFF (0.049-12.5 ng/ml). Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν CD19⁺ B-κύτταρα φυσιολογικών ατόμων τα οποία αξιολογήθηκαν 3 ημέρες (d) μετά την προσθήκη του συνδέτη. Στο γράφημα απεικονίζονται οι μέσες τιμές (\pm τυπική απόκλιση της μέσης τιμής) του αριθμού των CD19⁺ 7-AAD⁻ κυττάρων για κάθε συνθήκη. **B.** Λόγος των ζωντανών Β-λεμφοβλαστών της κάθε συνθήκης καλλιέργειας προς τους λεμφοβλάστες που δεν έλαβαν BAFF (survival index), για όλες τις χρονικές στιγμές που ελέγχθηκαν. BAFFR^{-ve} BCR-ABL^{-ve}: ασθενείς με προ-προ-B και κοινή Β-ΟΛΛ, BAFFR^{+ve} BCR-ABL^{-ve}: ασθενής με κοινή Β-ΟΛΛ, BAFFR^{+ve} BCR-ABL^{+ve}: ασθενείς με προ-B-ΟΛΛ (συμπεριλαμβανομένου ενός μετά από θεραπεία εφόδου).

4.8. Ο BAFF ενισχύει την επαγόμενη από γλυκοκορτικοειδή απόπτωση των Β-λεμφοβλαστών.

Στη συνέχεια, διερευνήσαμε εάν ο BAFF θα μπορούσε να προστατεύσει τους Β-λεμφοβλάστες από την επαγόμενη από χημειοθεραπευτικά φάρμακα απόπτωση. Ωστόσο, επειδή όπως αναφέραμε οι Β-λεμφοβλάστες των ασθενών είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς *in vitro* στην απόπτωση λόγω της έλλειψης κατάλληλων σημάτων επιβίωσης, χρησιμοποιήσαμε στα πειράματά μας την προ-B-ΟΛΛ κυτταρική σειρά 697 που εκφράζει BAFFR, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά T-ΟΛΛ Jurkat. Οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν παρουσία συγκεντρώσεων φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στη θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών με Β-ΟΛΛ – και συγκεκριμένα αρασιτίνης και γλυκοκορτικοειδών (δεξαμεθαζόνη, υδροκορτιζόνη, πρεδνιζολόνη, μεθυλπρεδνιζολόνη)- με ή χωρίς το 3-μερές ή 60-μερές BAFF. Όλα τα φάρμακα που ενσωματώθηκαν στην καλλιέργεια

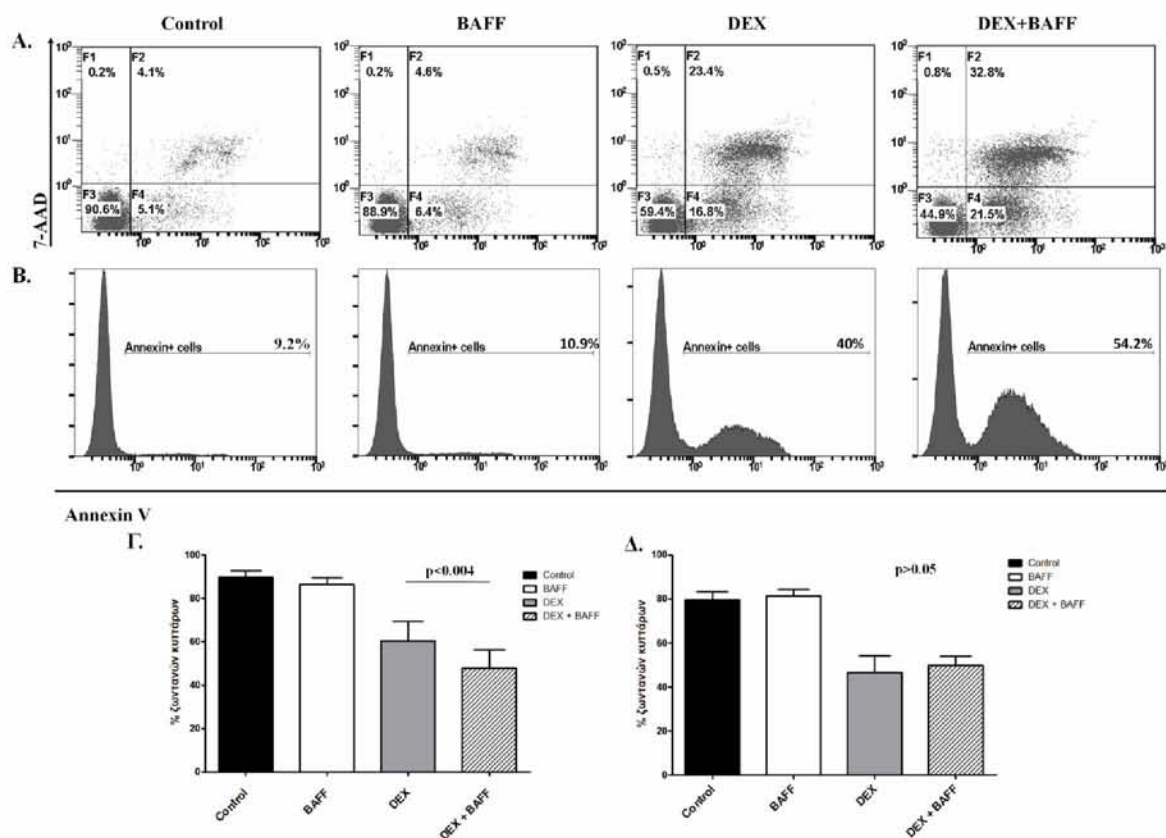
χρησιμοποιήθηκαν σε υποτοξικές δόσεις, καθώς είναι γνωστό ότι χρησιμοποιώντας συγκεντρώσεις που αναστέλλουν την κυτταρική ανάπτυξη $>50\%$ *in vitro* (IC50), ο κυτταρικός θάνατος είναι μη αναστρέψιμο γεγονός οπότε δε θα ήταν εφικτό να δούμε οποιαδήποτε επίδραση (αν υπήρχε) του BAFF στην καλλιέργεια με τα φάρμακα. Επίσης, στα πειράματα είχε αρχικά συμπεριληφθεί και η κυκλοφωσφαμίδη, καθώς αποτελεί ένα πρώτης γραμμής φάρμακο στη θεραπεία της Β-ΟΛΛ, αλλά παρά το μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων που δοκιμάστηκαν, διαπιστώσαμε ότι το φάρμακο αυτό ήταν ανενεργό στην καλλιέργεια της 697 σειράς *in vitro*, λόγω του ότι *in vivo* το φάρμακο αυτό μεταβολίζεται προς την ενεργή του μορφή στο ήπαρ, και πιθανότατα τα 697 κύτταρα δεν διαθέτουν τα κατάλληλα ένζυμα για τη μετατροπή αυτή. Επιπλέον, στην καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε ένα αρκετά μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων για το 3-μερές BAFF (5-800 ng/mL), ενώ το 60-μερές λόγω της υψηλής δραστηριότητάς του χρησιμοποιήθηκε σε χαμηλότερη συγκέντρωση (5 ng/mL).

Ο πειραματικός σχεδιασμός περιλάμβανε 4 συνθήκες καλλιέργειας: κύτταρα χωρίς BAFF & φάρμακο, κύτταρα με BAFF/χωρίς φάρμακο, κύτταρα χωρίς BAFF/με φάρμακο, κύτταρα με BAFF και φάρμακο. Στην αρχή της καλλιέργειας (ημέρα 0), προστίθετο στα κύτταρα είτε το 3-μερές (5-200 ng/mL) είτε το 60-μερές BAFF (5 ng/mL). Μετά από 48 ώρες (ημέρα 2), ακολουθούσε προσθήκη του αντίστοιχου φαρμάκου σε υποτοξικές δόσεις καθώς και μία δεύτερη ώση με BAFF (5-800 ng/mL 3-μερές ή 5 ng/mL 60-μερές) και επιπλέον επώαση για άλλες 72 ώρες, όπου και αξιολογούνταν με κυτταρομετρία ροής η απόπτωση των κυττάρων με χρώση για την αννεξίνη και τον 7-AAD (ημέρα 5, **Εικόνα 26Α,Β**). Η επιλογή της ημέρας 5 για τη μελέτη της συγκαλλιέργειας φαρμάκου-BAFF έγινε γιατί μεταξύ 48-72 ωρών ήταν αισθητή η δράση του φαρμάκου στα κύτταρα.

Διαπιστώσαμε λοιπόν ότι στην καλλιέργεια με δεξαμεθαζόνη, ο BAFF -είτε στην τριμερή είτε στην 60-μερή μορφή του- όχι μόνο δεν προστάτευε τα κύτταρα από την επαγόμενη από το φάρμακο απόπτωση, αλλά αντίθετα ενέτεινε τον κυτταρικό θάνατο αυτών. Το φαινόμενο ήταν αντιληπτό ανεξαρτήτου συγκέντρωσης της κυτταροκίνης, με ισχυρότερη ωστόσο την επίδραση του BAFF στην καλλιέργεια με τα 20 ng/mL δεξαμεθαζόνης ($p < 0.004$ για τα κύτταρα που έλαβαν φάρμακο σε σύγκριση με αυτά που έλαβαν φάρμακο και BAFF, Wilcoxon signed-rank στατιστική δοκιμή), η οποία συγκέντρωση βρίσκεται πιο κοντά στην IC50 τιμή όσον αφορά την τοξικότητα της. Να σημειώσουμε ότι μεταξύ των κυττάρων που έλαβαν μόνο την κυτταροκίνη κι αυτών που καλλιεργήθηκαν απουσία συνδέτη/φαρμάκου διαπιστώθηκε διαφορά στην επιβίωση μικρότερη του 3% (**Εικόνα 26Γ**). Μάλιστα, όταν στην καλλιέργεια αντικαταστήσαμε τον BAFF με τον APRIL (200 ng/ml την ημέρα 0 και 800 ng/ml την ημέρα 2), δεν είδαμε καμία πρόσθετη δράση της κυτταροκίνης σε αυτή της

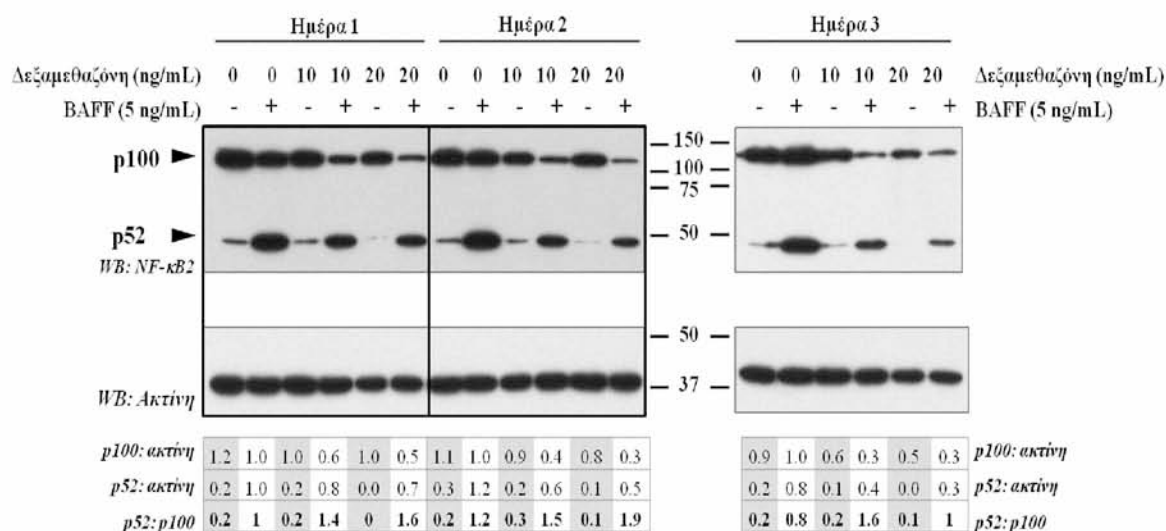
δεξαμεθαζόνης (20 ng/ml). Τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώθηκαν και σε καλλιέργεια χωρίς προ-επώαση με τον BAFF, όπου τα 697 κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 3 ημέρες (ημέρα 0-ημέρα 3) παρουσία 60-μερούς BAFF (5 ng/mL) και/ή δεξαμεθαζόνης (20 ng/mL), υποδεικνύοντας ότι ο BAFF δεν κατευθύνει από την αρχή την επαγόμενη από τη δεξαμεθαζόνη απόπτωση.

Προκειμένου να αποσαφηνίσουμε αν η δράση του BAFF στην συγκαλλιέργεια με δεξαμεθαζόνη στα 697 κύτταρα είναι ειδική, χρησιμοποιήσαμε και μία κυτταρική σειρά T-ΟΛΛ (Jurkat), η οποία δεν εκφράζει κανέναν από τους υποδοχείς του BAFF/APRIL συστήματος. Πράγματι, δε διαπιστώσαμε κάποια επιπλέον επίδραση του BAFF στην επαγόμενη από τη δεξαμεθαζόνη απόπτωση των Jurkat κυττάρων (**Εικόνα 26Δ**). Ακόμη, όταν επιδράσαμε στα 697 κύτταρα με το κυτταροστατικό φάρμακο αρασυτίνη και με 3-μερές BAFF, δεν υπήρξε κάποια προστατευτική ή μη δράση του συνδέτη στα κύτταρα που έλαβαν αρασυτίνη. Στη συνέχεια, θελήσαμε να επεκτείνουμε τα ευρήματα από την καλλιέργεια με δεξαμεθαζόνη και σε άλλα γλυκοκορτικοειδή, και συγκεκριμένα χρησιμοποιήσαμε πρεδνιζολόνη, μεθυλπρεδνιζολόνη και υδροκορτιζόνη. Και σε αυτές τις περιπτώσεις, όταν επιδράσαμε στα κύτταρα με το 60-μερές BAFF είχαμε ακριβώς το ίδιο φαινόμενο, δηλαδή εντονότερη απόπτωση των κυττάρων που έλαβαν φάρμακο και κυτταροκίνη έναντι αυτών που έλαβαν μόνο φάρμακο. Τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η δράση αυτή του BAFF να ενισχύει την επαγόμενη από φάρμακα απόπτωση, φαίνεται να περιορίζεται στα γλυκοκορτικοειδή.



Εικόνα 26. Ο BAFF ενισχύει την επαγόμενη από δεξαμεθαζόνη απόπτωση των 697 κυττάρων. (A, B) Κυτταρομετρική ανάλυση των 697 κυττάρων υπό την επίδραση 5 ng/mL 60-μερούς BAFF και 20 ng/mL δεξαμεθαζόνης. (Γ) Ποσοστό βιώσιμων κυττάρων (Annexin V 7-AAD) σε καλλιέργεια 5 ημερών με 3-μερές ή 60-μερές BAFF και 20 ng/mL δεξαμεθαζόνης για την 697 σειρά και (Δ) την Jurkat κυτταρική σειρά (200 ng/mL δεξαμεθαζόνη). Control: κύτταρα χωρίς BAFF/φάρμακο, BAFF: κύτταρα με το συνδότη/χωρίς φάρμακο, DEX: κύτταρα χωρίς BAFF/με δεξαμεθαζόνη, DEX+BAFF: κύτταρα με BAFF και δεξαμεθαζόνη.

Κατόπιν, διερευνήσαμε εάν η ενισχυμένη από τον BAFF επαγόμενη από δεξαμεθαζόνη απόπτωση των Β-λεμφοβλαστών μεσολαβείται από τη δράση του NF-κB2. Σε μία απλουστευμένη εκδοχή του πειράματος, τα 697 κύτταρα επώαστηκαν για 3 ημέρες με 2 υποτοξικές συγκεντρώσεις δεξαμεθαζόνης (10 και 20 ng/mL) και 5 ng/mL 60-μερές BAFF και κατόπιν ελέγχθηκαν για την ενεργοποίηση του NF-κB2 με ανοσοαποτύπωση κατά Western, για κάθε ημέρα ξεχωριστά. Διαπιστώσαμε λοιπόν ότι ο BAFF ήταν σε θέση να ενεργοποιήσει το εναλλακτικό μονοπάτι ακόμη και παρουσία δεξαμεθαζόνης, χωρίς ωστόσο να υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των συνθηκών καλλιέργειας (Εικόνα 27).

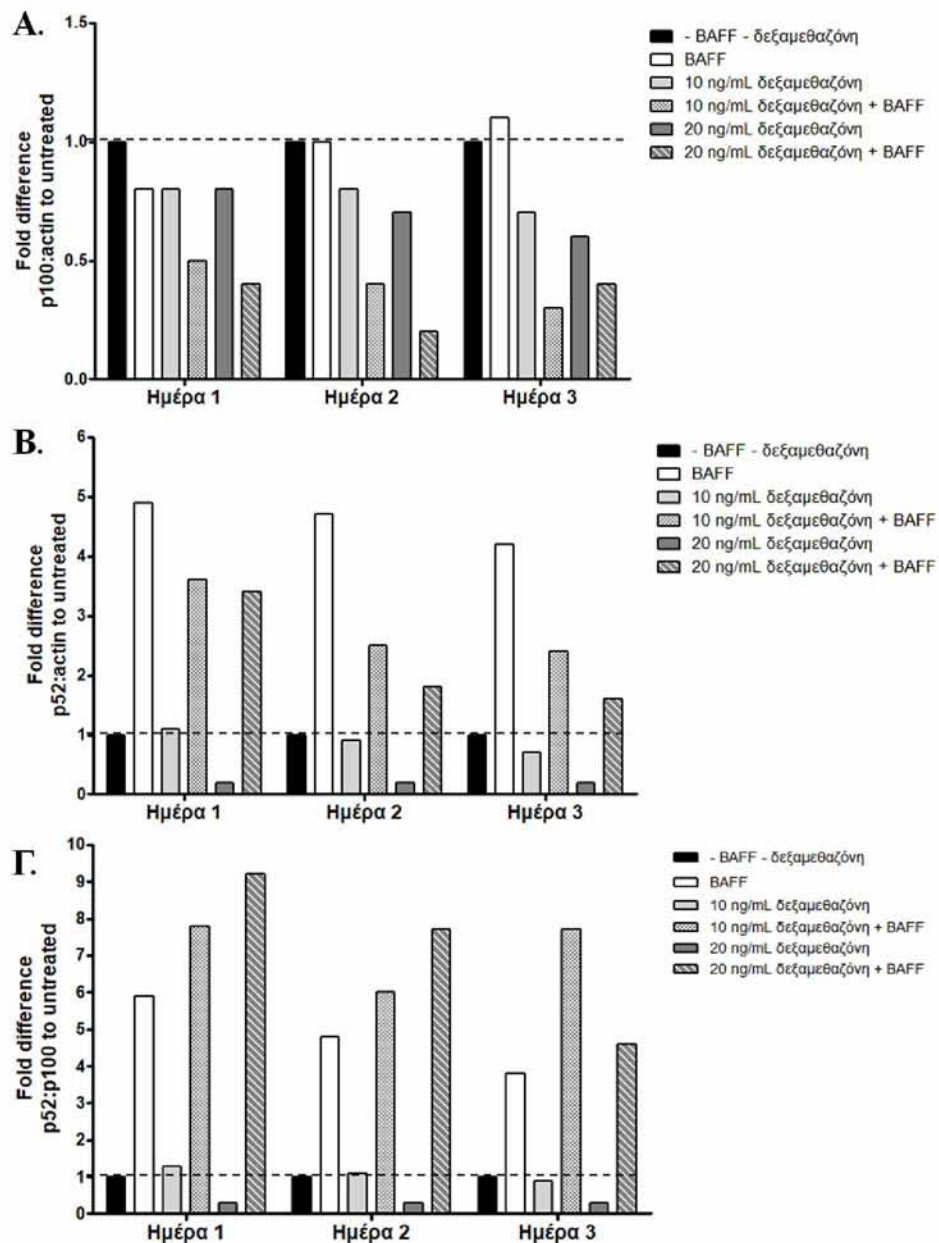


Εικόνα 27. Η ενεργοποίηση του εναλλακτικού μονοπατιού του NF-κΒ στην καλλιέργεια των 697 κυττάρων παρουσία δεξαμεθαζόνης (10 & 20 ng/mL) και 60-μερούς BAFF (5 ng/mL). Ο έλεγχος της ενεργοποίησης έγινε για 3 διαδοχικές ημέρες, χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ των συνθηκών καλλιέργειας.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα επίπεδα των p100 & p52 για τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν απουσία BAFF/δεξαμεθαζόνης κινήθηκαν σε παρόμοια επίπεδα μεταξύ των 3 ημερών, οι συγκρίσεις των υπόλοιπων συνθηκών έγιναν ως προς τα επίπεδα των πρωτεϊνών των κυττάρων απουσία συνδέτη/φαρμάκου για την κάθε ημέρα ξεχωριστά (πυκνομετρικός λόγος της κάθε πρωτεΐνης για τα κύτταρα μάρτυρες κάθε ημέρας= 1). Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τα επίπεδα της p100, παρατηρήσαμε ότι απουσία φαρμάκου αλλά παρουσία BAFF τα 697 κύτταρα ήταν σε θέση να συνθέτουν εκ νέου τη πρωτεΐνη με το πέρασμα των ημερών προκειμένου να ανατροφοδοτούν συνεχώς το εναλλακτικό μονοπάτι με νέο υπόστρωμα. Ωστόσο, η προσθήκη δεξαμεθαζόνης φάνηκε να μειώνει σταδιακά τα επίπεδα της p100 υπομονάδας και η προσθήκη του BAFF ενίσχυσε το αποτέλεσμα αυτό (**Εικόνα 28A**). Δεν μπορούμε να γνωρίζουμε αν η δυναμική των κυττάρων παρουσία φαρμάκου να συνθέτουν την p100 είναι η ίδια, αλλά αν λάβει κανείς υπόψη του ότι τα γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν το κλασικό μονοπάτι του NF-κΒ,¹⁶³ το οποίο είναι υπεύθυνο μεταξύ άλλων για την παραγωγή της p100,⁸⁸ η μείωση της πρωτεΐνης που βλέπουμε παρουσία δεξαμεθαζόνης θα μπορούσε να δικαιολογηθεί από αυτό το γεγονός.

Όσον αφορά τη p52 που προϋπήρχε στα κύτταρα ως αποτέλεσμα της διάσπασης της p100, υποκινούμενης πιθανότατα από κάποιο άλλο ενδογενές σήμα, αν και η παρουσία

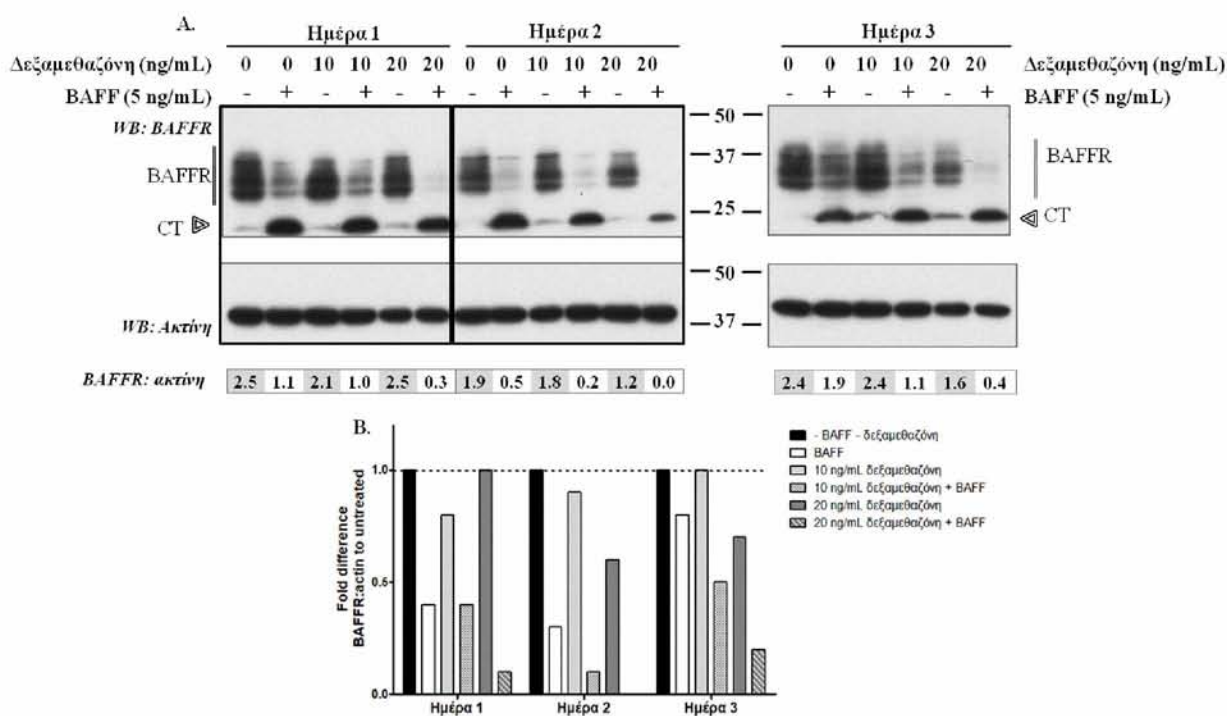
δεξαμεθαζόνης από μόνη της φάνηκε να οδηγεί σε μικρή μείωση των επιπέδων της, όπως αναμενόταν, η προσθήκη του BAFF αύξησε σημαντικά τα επίπεδά της ανεξάρτητα από την παρουσία του φαρμάκου, κυρίως τις 2 πρώτες ημέρες (**Εικόνα 28B**). Συνολικά, από τη σύγκριση του λόγου p52/p100 προκύπτει μη αναμενόμενα ότι η δυναμική των κυττάρων που λάμβαναν δεξαμεθαζόνη και BAFF να διασπάσουν την p100 προς p52 ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με αυτά τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν απουσία φαρμάκου (**Εικόνα 28Γ**). Τα ευρήματά μας αυτά δεν παρέχουν ωστόσο μία ισχυρή ένδειξη ότι η ενισχυμένη από τον BAFF δράση της δεξαμεθαζόνης στα 697 κύτταρα εξαρτάται από την ενεργοποίηση του NF-κB2 μονοπατιού.



Εικόνα 28. Σύγκριση των επιπέδων των p100 & p52 πρωτεϊνών, καθώς και του λόγου p52/p100 μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών καλλιέργειας με 5 ng/mL 60-μερούς BAFF και δεξαμεθαζόνη

(10 & 20 ng/mL) στην 697 σειρά, με κανονικοποίηση ως προς τα κύτταρα που δεν έλαβαν φάρμακο και κυτταροκίνη (fold difference to untreated).

Ελέγξαμε επίσης στο ίδιο σύστημα αν η καλλιέργεια με δεξαμεθαζόνη και BAFF επιφέρει αλλαγές στα επίπεδα του BAFFR υποδοχέα, πραγματοποιώντας ανοσοαποτύπωση κατά Western με το αντίσωμα που ανιχνεύει ταυτόχρονα τόσο την ακέραιη πρωτεΐνη όσο και το C-τελικό τμήμα του BAFFR (**Εικόνα 29**). Στα πειράματα αυτά αξιολογήσαμε το λόγο της ακέραιης πρωτεΐνης προς την ακτίνη, κανονικοποιώντας τις μετρήσεις των υπό μελέτη συνθηκών ως προς τα κύτταρα που δεν έλαβαν συνδέτη/φάρμακο για την κάθε ημέρα. Αν και υπήρχαν κάποιες μικρές διακυμάνσεις στα επίπεδα έκφρασης του BAFFR υπό φυσιολογικές συνθήκες μεταξύ των ημερών, διαπιστώσαμε ότι η παρουσία της δεξαμεθαζόνης μειώνει μερικώς τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με την ήδη γνωστή επίδραση της δεξαμεθαζόνης στην αναστολή του κλασσικού μονοπατιού του NF-κB,¹⁶³ το οποίο ωστόσο μεσολαβεί της επαγωγής της έκφρασης του BAFFR στα φυσιολογικά B-κύτταρα.⁸⁸ Παρόλα αυτά, φάνηκε ότι η παρουσία του BAFF στην καλλιέργεια με δεξαμεθαζόνη ήταν σε θέση να επάγει ακόμη ισχυρότερη αποικοδόμηση του BAFFR σε σχέση με αυτά τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν απουσία φαρμάκου (**Εικόνα 29B**).



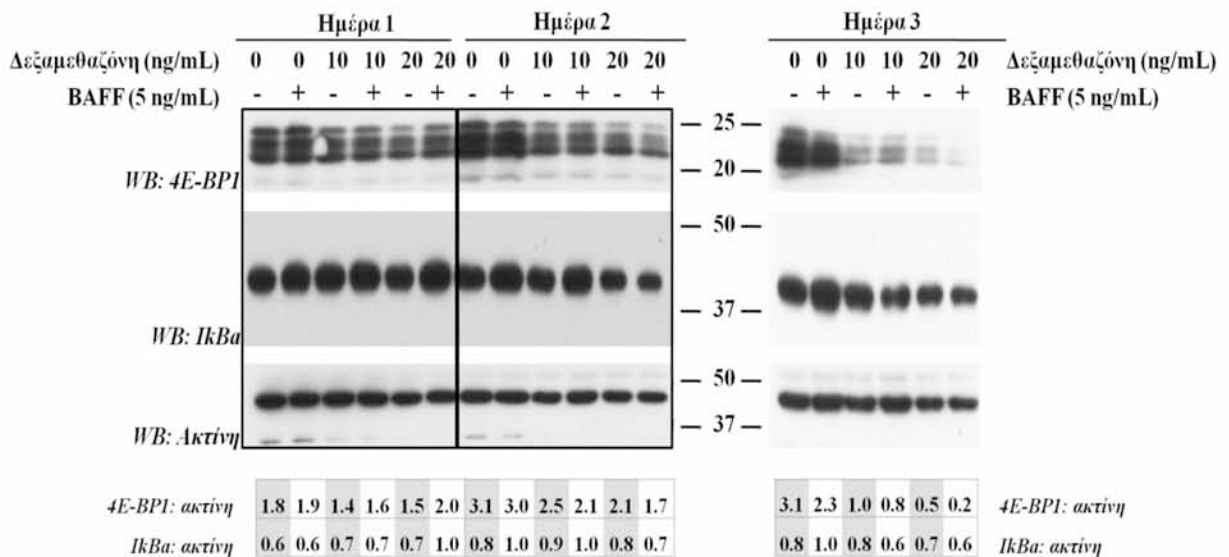
Εικόνα 29. Αποικοδόμηση του BAFFR υποδοχέα στην καλλιέργεια των 697 κυττάρων παρουσία δεξαμεθαζόνης (10 & 20 ng/ml) και 60-μερούς BAFF (5 ng/mL). **A.** Ανοσοαποτύπωση κατά Western με το αντίσωμα που ανιχνεύει την ακέραιη πρωτεΐνη καθώς και το C-τελικό τμήμα του υποδοχέα στο

προαναφερθέν σύστημα καλλιέργειας. **B.** Κανονικοποίηση του λόγου BAFFR/ακτίνη ως προς τα κύτταρα που δεν έλαβαν κυτταροκίνη και φάρμακο, για κάθε ημέρα ξεχωριστά.

Δεδομένου ότι η δεξαμεθαζόνη αναστέλλει την κλασσική οδό ενεργοποίησης του NF-κB, σε συνδυασμό με το ότι ο BAFF δεν ενεργοποιεί το μονοπάτι αυτό σε κύτταρα που εκφράζουν μόνο τον BAFFR, διερευνήσαμε κατά πόσο η καλλιέργεια με αυτούς τους 2 παράγοντες θα είχε κάποια επίδραση στον NF-κB1. Ωστόσο, επειδή η αξιολόγηση της αποικοδόμησης της p105 προς p50 ως δείκτης ενεργοποίησης της κλασσικής οδού δεν αποτελεί αξιόπιστο εργαλείο καθώς λαμβάνει χώρα συστατική διάσπαση της πρόδρομης p105, εξετάσαμε τα επίπεδα της IκBα πρωτεΐνης, καθώς φαίνεται ότι η δεξαμεθαζόνη δύναται να αναστείλει αυτό το μονοπάτι επάγοντας μεταξύ άλλων την έκφραση της IκBα, με στόχο τη διατήρηση των συμπλόκων του NF-κB1 σε ανενεργή μορφή στο κυτταρόπλασμα.¹⁶³ Από τα πειράματά μας ωστόσο δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα της IκBα ούτε με την πάροδο των ημερών ούτε μεταξύ των συνθηκών καλλιέργειας (**Εικόνα 30**). Αν λάβει κανείς υπόψη το γεγονός ότι έχει αναφερθεί αναστολή του NF-κB1 από γλυκοκορτικοειδή χωρίς αύξηση των επιπέδων της IκBα, θα μπορούσε αυτή να είναι και η περίπτωση στο δικό μας πειραματικό μοντέλο.

Ο BAFF μέσω της πρόσδεσής του στον BAFFR ενεργοποιεί και το μονοπάτι της PI3K/Akt/mTor, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των κυττάρων καθώς εμπλέκεται στην πρωτεϊνική σύνθεση. Στο πλαίσιο αυτό εξετάσαμε αν η ενισχυμένη από τον BAFF δράση της δεξαμεθαζόνης στα λευχαιμικά 697 κύτταρα θα μπορούσε να μεσολαβείται από αυτό το μονοπάτι. Για το σκοπό αυτό ελέγξαμε ένα βασικό συστατικό της PI3K/Akt/mTor οδού, τον 4E-BP1, καθώς υψηλά επίπεδα της φωσφορυλιωμένης μορφής του, που αντιστοιχούν και στην ανενεργή πρωτεΐνη, έχουν ανιχνευθεί σε ποικίλους τύπους καρκίνου. Παρόλα αυτά, ο 4E-BP1 φαίνεται να έχει διπλό ρόλο ανάλογα με το μικροπεριβάλλον του όγκου, λειτουργώντας είτε ογκοκατασταλτικά, εμποδίζοντας τη μετάφραση του mRNA και τον πολλαπλασιασμό, ενώ από την άλλη έχει προ-ογκογόνες λειτουργίες καθώς φαίνεται να υπερεκφράζεται σε διάφορους τύπους καρκίνου και να προωθεί την προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων στο μεταβολικό στρες, επάγοντας ή αναστέλλοντας τη μετάφραση συγκεκριμένων γονιδίων.¹⁶⁴ Στην παρούσα μελέτη, επειδή η αξιολόγηση του φωσφορυλιωμένου 4E-BP1 δεν κατέστη δυνατή, μελετήσαμε τη συνολική πρωτεΐνη μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών καλλιέργειας. Μετά από 2 ημέρες καλλιέργειας διαπιστώσαμε μία αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης στα κύτταρα που δεν έλαβαν φάρμακο, ωστόσο η δεξαμεθαζόνη φάνηκε να μειώνει σταδιακά τα επίπεδα του 4E-

BP1, και το αποτέλεσμα αυτό ενισχύθηκε μερικώς με την προσθήκη του BAFF (**Εικόνα 30**). Λόγω του αντικρουόμενου ρόλου του 4E-BP1 στην ανάπτυξη τόσο των φυσιολογικών όσο και καρκινικών κυττάρων,¹⁶⁵ σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το μονοπάτι της PI3K/Akt/mTor είναι εξαιρετικά πολύπλοκο με πληθώρα σημείων ελέγχου, και με τα συστατικά του να αποκρίνονται με τελείως διαφορετική κινητική σε ερεθίσματα, δε μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα άλλα μόρια της οδού, τα οποία να μεταβάλλονται πολύ άμεσα ως απάντηση στην καλλιέργεια με BAFF και δεξαμεθαζόνη, να εμπλέκονται στο προαναφερθέν φαινόμενο.



Εικόνα 30. Έκφραση του 4E-BP1 και της IκBα στην καλλιέργεια των 697 κυττάρων παρουσία δεξαμεθαζόνης (10 & 20 ng/ml) και 60-μερούς BAFF (5 ng/mL). Η ενισχυμένη από τον BAFF επαγόμενη από δεξαμεθαζόνη απόπτωση της 697 κυτταρικής σειράς δεν μεσολαβείται από τη δράση των 4E-BP1 και IκBα μορίων, που εμπλέκονται αντίστοιχα στην ενεργοποίηση του PI3K/Akt/mTor μονοπατιού και της κλασσικής οδού του NF-κB.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη παρέχει σημαντικές αποδείξεις ότι ο ρόλος του BAFF/APRIL συστήματος συνδέεται με συγκεκριμένα νοσολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με Β-ΟΛΛ. Τα δεδομένα μας δείχνουν ότι η απρόσφορη έκφραση των υποδοχέων και συνδετών του BAFF/APRIL συστήματος σχετίζεται με τα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά των Β-λεμφοβλαστών, καθώς αυξάνεται ανάλογα με το στάδιο ωρίμανσης του νεοπλασματικού κυττάρου. Επιπλέον, παρέχουμε ενδείξεις ότι ο BAFFR, που είναι ο επικρατών υποδοχέας του συστήματος αυτού στους Β-λεμφοβλάστες, παρά την απρόσφορη έκφρασή του, παραμένει λειτουργικός, ενώ ο E2A/PBX1 χιμαιρικός μεταγραφικός παράγοντας φαίνεται να εμπλέκεται στην ανοδική ρύθμιση της έκφρασής του στην προ-Β-ΟΛΛ. Τέλος, για πρώτη φορά, αναδεικνύεται από τη μελέτη μας ένας νέος ρόλος της BAFF-BAFFR αλληλεπίδρασης στην ενίσχυση της αυθόρμητης αλλά και της επαγόμενης από γλυκοκορτικοειδή απόπτωσης των Β-λεμφοβλαστών.

Το σύστημα των BAFF, APRIL και των υποδοχέων τους διαδραματίζει θεμελιώδη ρόλο στην οντογένεση των φυσιολογικών Β-κυττάρων, προάγοντας την επιβίωση, την ομοιοστάση και την περαιτέρω διαφοροποίησή τους στην περιφέρεια.^{32,44} Μάλιστα, διάφορες μελέτες σε νεοπλασματικά νοσήματα των ώριμων Β-κυττάρων (π.χ. ΧΛΛ, NHL, πολλαπλούν μυέλωμα) έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση των συνδετών και υποδοχέων του συστήματος αυτού είναι εξίσου σημαντική και για την επιβίωση των νεοπλασματικών ομολόγων των ώριμων Β-κυττάρων.^{52,90,92} Παρά το γεγονός όμως ότι οι BAFF/APRIL και οι υποδοχείς τους δεν εμπλέκονται στα πρόδρομα στάδια ανάπτυξης των Β-κυττάρων στο μυελό των οστών, πρόσφατες μελέτες πρότειναν ότι θα μπορούσαν να συμβάλουν στην παθογένεση και την εξέλιξη της Β-ΟΛΛ, που προκύπτει από τον κακοήθη εξαλλαγή των φυσιολογικών προγονικών Β-κυττάρων.^{49,141-143,146} Είναι ωστόσο αξιοσημείωτο ότι όλες οι προηγούμενες μελέτες κάνουν λόγο για ασθενείς με ΟΛΛ των πρόδρομων Β-κυττάρων, προσδιορίζοντάς την ανοσοφαινοτυπικά από την παρουσία/απουσία των CD10 ή cIgM επί των Β-λεμφοβλαστών, ενοποιώντας πολλές φορές την κοινή και προ-Β-ΟΛΛ στην ίδια ομάδα.^{49,141,146} Ωστόσο, η ετερογένεια που επιδεικνύει η νόσος σε διάφορα επίπεδα (ανοσοφαινότυπος, μοριακές βλάβες, απάντηση στη θεραπεία) περιπλέκει την κατανόηση της συμβολής του συστήματος αυτού στην ανάπτυξη της Β-ΟΛΛ.

Στην παρούσα μελέτη δείξαμε μια πρόιμη έναρξη της έκφρασης των μορίων του BAFF/APRIL συστήματος στους Β-λεμφοβλάστες ασθενών με ΟΛΛ, η οποία φάνηκε να είναι χαρακτηριστική του σταδίου ωρίμανσης των κυττάρων. Σε συμφωνία με προηγούμενες

μελέτες,^{49,141} ο BAFFR είναι ο επικρατών υποδοχέας που εκφράζεται στη Β-ΟΛΛ σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο και η έκφρασή του αυτή αυξάνεται σε πιο ώριμους τύπους Β-ΟΛΛ (κοινή και προ-Β). Τα ευρήματα αυτά υποστηρίχθηκαν κι από το γεγονός ότι η mRNA έκφραση του *BAFFR* συνδέεται με την παρουσία του CD20 μορίου, το οποίο εκφράζεται μετά το στάδιο του προ-προ-Β-κυττάρου και διατηρείται και στα ώριμα Β-κύτταρα, με εξαίρεση τα πλασματοκύτταρα.

Το ίδιο πρότυπο mRNA έκφρασης - αν και σε χαμηλότερα επίπεδα και σε μικρότερο αριθμό ασθενών - παρατηρήθηκε επίσης για τον BCMA, όπως φάνηκε κι από τη θετική συσχέτιση των επιπέδων του με την έκφραση της cIgM, που χαρακτηρίζει τα προ-Β-κύτταρα. Όσον αφορά τον τρίτο υποδοχέα του συστήματος αυτού, ο TACI εκφραζόταν σε ένα πολύ μικρό ποσοστό των ασθενών και πάντα σε συνδυασμό με τον BAFFR. Να σημειωθεί ωστόσο ότι τα mRNA επίπεδα των *BAFFR*, *TACI* και *BCMA* ήταν χαμηλότερα σε σχέση με αυτά των ώριμων Β-κυττάρων. Επιπλέον, σε αντίθεση με τη μελέτη των Μαΐα και συν. που υποστήριξαν ότι οι νεοπλασματικοί λεμφοβλάστες των ασθενών με Β-ΟΛΛ εκφράζουν τουλάχιστον έναν από τους τρεις υποδοχείς του BAFF/APRIL συστήματος,⁴⁹ διαπιστώσαμε ότι αυτό δεν αποτελούσε κανόνα στη δική μας ομάδα ασθενών.

Τα ευρήματα της mRNA ανάλυσης ενισχύθηκαν από τα δεδομένα σε πρωτεϊνικό επίπεδο, όπου φάνηκε ότι ο BAFFR ήταν ο κύριος υποδοχέας που εκφράζεται και στην επιφάνεια των νεοπλασματικών Β-λεμφοβλαστών. Ωστόσο, σε κάθε περίπτωση, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του BAFFR στους Β-λεμφοβλάστες ήταν αισθητά χαμηλότερα σε σχέση με αυτά των εναπομείναντων φυσιολογικών ώριμων Β-κύτταρων σε αυτούς τους ασθενείς, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της μεταγραφικής ανάλυσης του υποδοχέα. Όσον αφορά τους άλλους δύο υποδοχείς, BCMA και TACI, τα πρωτεϊνικά τους επίπεδα ήταν πολύ χαμηλά έως και μηδενικά στους ασθενείς που αναλύθηκαν.

Εστιαζόμενοι λοιπόν στον BAFFR, αποδείξαμε ότι η έκφρασή του στη Β-ΟΛΛ αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των νεοπλασματικών Β-λεμφοβλαστών, καθώς πρόδρομα Β-κύτταρα (αιματογόνια) στο μυελό ατόμων χωρίς ιστορικό αιματολογικής κακοήθειας δεν εξέφραζαν τον συγκεκριμένο υποδοχέα. Η ανάλυση των φυσιολογικών αιματογονίων έδειξε ότι οι πρόδρομοι Β-κυτταρικοί πληθυσμοί (προ-προ- και προ-Β-κύτταρα) δεν εκφράζουν τον BAFFR, σε αντίθεση με την υψηλή έκφραση που συναντάται στα ώριμα Β-κύτταρα, με έναν μικρό πληθυσμό CD19⁺ CD10^{low} (ανώριμων/μεταβατικών Β-) κυττάρων να εμφανίζει ενδιάμεση BAFFR έκφραση. Ο πληθυσμός αυτός φαίνεται ότι αντιπροσωπεύει το αναπτυξιακό στάδιο στο οποία ξεκινά η πρωτεϊνική έκφραση του BAFFR υποδοχέα, όπως προκύπτει κι από προηγούμενες μελέτες.⁵⁵ Τα ευρήματα αυτά είναι επίσης

σε συμφωνία με την φυσιολογική ανάπτυξη των πρόδρομων μορφών των Β-κυττάρων στο μυελό των οστών μέχρι το στάδιο του μεταβατικού Β-κυττάρου που εμφανίζουν ποντίκια με έλλειψη στο γονίδιο του *BAFFR*.⁶⁰ Ενδιαφέρον ωστόσο παρουσιάζει η μελέτη των *Μαία και συν.*, οι οποίοι έδειξαν ότι αν και τα προγονικά Β-κύτταρα ($CD19^+$, κ/λ⁻) δεν εκφράζουν επιφανειακά κανέναν από τους υποδοχείς του BAFF/APRIL συστήματος, φέρουν μετάγραφα αυτών, υποστηρίζοντας ότι μετα-μεταγραφικοί μηχανισμοί λαμβάνουν χώρα για να μεσολαβήσουν της πρωτεϊνικής έκφρασης των μορίων αυτών κατά τη φυσιολογική Β-κυτταρική ανάπτυξη.⁴⁹

Η πρωτεϊνική έκφραση του BAFFR διατηρήθηκε επίσης στους Β-λεμφοβλάστες ασθενών με Β-ΟΛΛ της μελέτης που εμφάνισαν ενδιάμεση/φτωχή απάντηση στη θεραπεία εφόδου ή εδραίωσης του αποτελέσματος. Πολύ πρόσφατα, οι *Fazio και συν.* έδειξαν ότι η έκφραση του BAFFR διατηρείται ή αυξάνεται στα λευχαιμικά κύτταρα που επιβιώνουν κατά την πρώιμη φάση της θεραπείας, προτείνοντας μία θετική επιλογή των BAFFR⁺ λεμφοβλαστών.¹⁴⁶ Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την απουσία έκφρασης του BAFFR στα φυσιολογικά αιματογόγια, θα μπορούσε να καταστήσει το μόριο αυτό ως ένα δείκτη ειδικό να διαχωρίσει τα εναπομείναντα λευχαιμικά κύτταρα στον έλεγχο υπολειπόμενης νόσου από τα φυσιολογικά προγονικά Β-κύτταρα μυελών σε ανάπλαση μετά από θεραπεία.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι ένας συχνός πολυμορφισμός στο γονίδιο του *BAFFR*, ο *BAFFR-P21R* (rs77874543), επηρεάζει τη λειτουργικότητα του υποδοχέα, καθώς ακόμη και σε ετεροζυγωτία παρεμποδίζει τον ομοπολυμερισμό του, μειώνοντας έτσι την ικανότητά του να δεσμεύσει τον BAFF,¹⁶⁰ διερευνήσαμε την παρουσία του συγκεκριμένου πολυμορφισμού σε εκείνους τους ασθενείς με Β-ΟΛΛ που εξέφραζαν πρωτεϊνικά τον BAFFR. Διαπιστώσαμε λοιπόν ότι μόνο ένας από τους ασθενείς που αναλύθηκαν έφερε σε ομοζυγωτία τον εν λόγω πολυμορφισμό. Μία σπανιότερη γενετική βλάβη στο γονίδιο του *BAFFR*, ο *BAFFR-H159Y* (rs61756766) που σχετίζεται με έναν υπερδραστικό υποδοχέα¹⁶⁶ βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με τον *TNFRSF13C-P21R* και φαίνεται να αντισταθμίζει τη δράση του. Ελέγχοντας τον p.P21R-ομόζυγο ασθενή για την παρουσία της p.H159Y βλάβης, διαπιστώσαμε ότι δεν έφερε αυτή τη μετάλλαξη. Προηγούμενη ανάλυση από το Εργαστήριό μας ενός μεγάλου δείγματος ασθενών με Β-ΟΛΛ (~300 παιδιά) έδειξε μία παρόμοια συχνότητα όσον αφορά τα p.P21R & p.H159Y ποικιλόμορφα μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων, υποδηλώνοντας ότι οι γενετικές αυτές βλάβες δεν είναι αιτιοπαθογενετικές της νόσου (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Σε κάθε περίπτωση, προτείνουμε ότι οι ασθενείς με Β-ΟΛΛ που εκφράζουν πρωτεϊνικά τον BAFFR υποδοχέα θα πρέπει να ελέγχονται για την παρουσία αυτών των πολυμορφισμών οι οποίοι δύναται να επηρεάζουν την απάντησή του στη διέγερση από τον

συνδέτη του, BAFF, και κατ' επέκταση τη λειτουργικότητά του. Πρόκειται για την πρώτη μελέτη στη βιβλιογραφία η οποία έλαβε υπόψη το γενετικό προφίλ του *BAFFR* γονιδίου σε ασθενείς με Β-ΟΛΛ, στους οποίους ελέγχθηκε η έκφραση του συγκεκριμένου υποδοχέα.

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι τόσο οι νεοπλασματικοί Β-λεμφοβλάστες όσο και τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών ασθενών με Β-ΟΛΛ εκφράζουν μετάγραφα των συνδετών BAFF & APRIL και παράγουν τις πρωτεΐνες όχι μόνο στη διαλυτή αλλά και στη μεμβρανοσυνδεδεμένη μορφή, υποδεικνύοντας ότι αυτοκρινείς αλλά και παρακρινείς μηχανισμοί μεσολαβούν των αλληλεπιδράσεων συνδέτη-υποδοχέα στη Β-ΟΛΛ.^{49,141} Στην παρούσα μελέτη, διαπιστώσαμε επίσης την παρουσία μεταγράφων τόσο του *BAFF* όσο και του *APRIL* στους Β-λεμφοβλάστες των ασθενών με ΟΛΛ, ακόμη κι απουσία υποδοχέα. Η mRNA έκφραση των *BAFF* & *APRIL* ήταν αισθητά χαμηλότερη σε σχέση με τα απομονωμένα μονοκύτταρα αλλά παρόμοια με τα ώριμα Β-κύτταρα φυσιολογικών ατόμων. Επιπλέον, τα mRNA επίπεδα του *APRIL* φάνηκε να αυξάνονται σε πιο ώριμους Β-λεμφοβλάστες, κατά ένα τρόπο ανάλογο της έκφρασης του υποδοχέα BCMA. Ενδιαφέρον ωστόσο παρουσιάζει το γεγονός ότι η έκφραση του *APRIL* ήταν πιο συχνή σε σχέση με τον *BAFF*, αν κι ο επικρατών υποδοχέας του BAFF/APRIL συστήματος στα λευχαιμικά Β-κύτταρα είναι ο BAFFR, ο οποίος ως γνωστόν δεν προσδένει τον APRIL.

Ωστόσο, δεν μπορούμε να γνωρίζουμε αν τα μεταγραφικά επίπεδα των συνδετών συμφωνούν με τα πρωτεϊνικά, καθώς δεν κατέστη δυνατή η μέτρηση ούτε της επιφανειακής έκφρασης ούτε των διαλυτών τους μορφών στους ασθενείς της παρούσας μελέτης. Προηγούμενες βέβαια μελέτες υποστήριξαν ότι η μεταγραφική και πρωτεϊνική έκφραση των συνδετών ταυτίζονται τόσο στους Β-λεμφοβλάστες όσο και στα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών.^{49,141} Παρ' όλα αυτά, προγονικά Β-κύτταρα φυσιολογικών μυελών φαίνεται να εμφανίζουν μετάγραφα των συνδετών, στερούνται όμως πρωτεϊνικής έκφρασης αυτών, και σε συνάρτηση με την απουσία των υποδοχέων τους, δεν τίθεται θέμα αυτοκρινών μηχανισμών δράσης των μορίων αυτών στις πρόδρομες μορφές των Β-κυττάρων.⁴⁹

Έχει διαπιστωθεί ότι τα επίπεδα των BAFF & APRIL είναι αυξημένα στον ορό ασθενών με Β-ΟΛΛ κατά τη διάγνωση σε σχέση με τα υγιή άτομα, ενώ φαίνεται ότι επιστρέφουν σε φυσιολογικές τιμές σε εκείνους τους ασθενείς που μπαίνουν σε ύφεση μετά από θεραπεία. Εξαιρεση ωστόσο φαίνεται να αποτελεί ο APRIL, του οποίου τα διαλυτά επίπεδα παραμένουν αυξημένα στους ασθενείς που εμφανίζουν φτωχή απάντηση στη θεραπεία και συνδέονται μάλιστα με μικρότερο διάστημα ελεύθερο νόσου αλλά και με συντομότερη συνολική επιβίωση. Στο πλαίσιο αυτό, έχει προταθεί ότι η μέτρηση των

επιπέδων του APRIL θα μπορούσε να έχει προγνωστική αξία στη Β-ΟΛΛ¹⁴³⁻¹⁴⁵ Από τα δεδομένα της παρούσας μελέτης σε μεταγραφικό επίπεδο δεν προέκυψε κάποια συσχέτιση της έκφρασης των συνδετών με παράγοντες κινδύνου στους ασθενείς με Β-ΟΛΛ που αναλύθηκαν.

Ερωτήματα όμως εγείρει γενικότερα το κατά πόσο η μέτρηση των επιπέδων των BAFF & APRIL στον ορό ασθενών με Β-ΟΛΛ αποτελεί αντιπροσωπευτικό δείκτη των επιπέδων τους στο μυελό των οστών ή στους προσβεβλημένους ιστούς (π.χ. ΚΝΣ). Μέτρηση των κυτταροκινών αυτών σε υπερκείμενα μυελού των οστών θα μπορούσε πιθανότατα να οδηγήσει στην εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων σχετικά με την προγνωστική αξία της έκφρασης των BAFF & APRIL στη Β-ΟΛΛ. Το γεγονός επίσης ότι οι συγκετρώσεις του BAFF σε σταθερή κατάσταση στην περιφέρεια καθορίζονται από τα επίπεδα των Β-κυττάρων και την έκφραση των υποδοχέων του σε αυτά,⁷⁰ υποδηλώνει ότι και στην περίπτωση της Β-ΟΛΛ τα διαλυτά επίπεδα των συνδετών ίσως θα έπρεπε να κανονικοποιούνται ως προς τον αριθμό των λευχαιμικών κυττάρων, ως ένδειξη της «κατανάλωσης» των κυτταροκινών αυτών από τους Β-λεμφοβλάστες όταν το φορτίο της νόσου είναι μεγάλο¹⁴⁶ και για τη διερεύνηση του κατά πόσο τα επίπεδα αυτά επανέρχονται μετά από θεραπεία.

Παρουσία εναλλακτικά ματισμένων ισομορφών των συνδετών έχει αναφερθεί μόνο για την περίπτωση του APRIL. Οι Μαία και συν. περιέγραψαν μία νέα ισομορφή του συνδέτη που εκφράζεται στους Β-λεμφοβλάστες, την APRIL-δ, η οποία στερείται του εξονίου 2, και κατεπέκταση της θέσης αναγνώρισης για την πρωτεολυτική διάσπαση από την φουρίνη. Μάλιστα, ο APRIL που ανίχνευσαν στην κυτταρική μεμβράνη των Β-λεμφοβλαστών πιθανότατα ανταποκρινόταν σε αυτή την ισομορφή, γιατί φυσιολογικά η κυτταροκίνη δεν απαντάται στη μεμβράνη· ο βιολογικός ρόλος ωστόσο αυτής δεν έχει αποσαφηνιστεί.⁴⁹ Στην παρούσα μελέτη, τα αποτελέσματα της μεταγραφικής έκφρασης αφορούν στην παρουσία του φυσιολογικού mRNA του *APRIL* στους Β-λεμφοβλάστες.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα mRNA επίπεδα του *BAFF* στους ασθενείς της μελέτης μας φάνηκε να συνδέονται θετικά με αυτά μίας ισομορφής που προκύπτει από εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου, του *ΔBAFF*, που στερείται του εξονίου 3. Ο *ΔBAFF* εντοπίζεται φυσιολογικά στη μεμβράνη και έχει προταθεί ως ένας νέος ρυθμιστής της επιβίωσης των Β-κυττάρων καθώς μπορεί να σχηματίσει ετεροπολυμερή με τη φυσιολογική ακέραιη πρωτεΐνη BAFF, συγκρατώντας τη στην κυτταρική μεμβράνη και μειώνοντας έτσι την απελευθέρωση και τη βιοδραστικότητά της.⁴⁸ Αν και είναι η πρώτη φορά που διερευνάται η συμμετοχή του *ΔBAFF* στη βιολογία της Β-ΟΛΛ, περαιτέρω μελέτες απαιτούνται προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ακριβής ρόλος του.

Τα υψηλά mRNA επίπεδα του *APRIL* που βρέθηκαν στη μελέτη μας, ακόμη και απουσία των υποδοχέων του και παρά το γεγονός ότι ο *BAFFR* είναι ο επικρατών υποδοχέας που εκφράζεται στους Β-λεμφοβλάστες, μπορεί να υποδεικνύουν ότι σε πρωτεϊνικό επίπεδο, ο *APRIL* θα μπορούσε να σχηματίζει ετεροτριμερή με τον *BAFF*, ρυθμίζοντας έτσι τη λειτουργία του συνδέτη του *BAFFR*, όπως είχε προταθεί προηγουμένως ότι συμβαίνει σε διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες.^{46,47} Πρόσφατα, δείχθηκε ότι τόσο τα *BAFF-APRIL*₂ ετεροτριμερή που προσομοιάζουν τον *APRIL*, όσο και τα *APRIL-BAFF*₂ ετεροτριμερή που προσομοιάζουν τον *BAFF* διατηρούν την ικανότητα σύνδεσης στους *TACI* & *BCMA*, αλλά συνδέονται ασθενώς στον *BAFFR* και δεν μπορούν να ενεργοποιήσουν τον υποδοχέα. Εικάζεται λοιπόν ότι η λειτουργία αυτών των ετεροτριμερών είναι στο να περιορίζουν την δραστηριότητα του φυσιολογικού *BAFF*.¹⁶⁷ Θα άξιζε λοιπόν να διερευνηθεί αν στους ασθενείς με Β-ΟΛΛ συναντώνται τέτοιες δομές και κατά πόσο θα μπορούσαν να επηρεάσουν την δράση των μεμονωμένων συνδετών στους Β-λεμφοβλάστες. Από τη θετική συσχέτιση των mRNA επιπέδων του *BAFF* τόσο με τον *ΔBAFF* όσο και με τον *APRIL*, υποθέτουμε ότι μία μετα-μεταφραστική ρύθμιση της δράσης των συνδετών θα μπορούσε να λαμβάνει χώρα στους Β-λεμφοβλάστες, κρίνοντας και το τελικό αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης συνδέτη-υποδοχέα.

Οι μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν την έκφραση των *BAFF*, *APRIL* και των υποδοχέων τους στη Β-ΟΛΛ δεν είναι καλά τεκμηριωμένοι. Στα φυσιολογικά ώριμα Β-κύτταρα, η πρωτεΐνη *c-Rel*, μέλος της οικογένειας των *NF-κB* μεταγραφικών παραγόντων, μεσολαβεί της επαγόμενης από τον *BCR* ανοδικής ρύθμισης της έκφρασης του *BAFFR*, αλλά και του υποστρώματος της κύριας σηματοδοτικής οδού που ενεργοποιεί ο *BAFFR* (*p100*).⁸⁷ Οι *Mihalcić και συν.* έδειξαν ότι σε κυτταρικές σειρές ΟΛΛ των πρόδρομων Β-κυττάρων η *c-Rel* ενεργοποιεί πρώιμα τον υποκινητή του *BAFFR* γονιδίου· μάλιστα, τα πυρηνικά επίπεδα της *c-Rel* φάνηκε να σχετίζονται θετικά με τα επίπεδα έκφρασης του *BAFFR* σε αυτές τις κυτταρικές σειρές.¹⁶⁸

Από την ανάλυση των μεταγραφικών επιπέδων του *BAFFR* στους ασθενείς της μελέτης μας, προέκυψε ότι τα επίπεδα του υποδοχέα είναι αυξημένα σε άτομα με προ-Β-ΟΛΛ που φέρουν τον *E2A-PBX1* ανασυνδυασμό. Η χιμαιρική πρωτεΐνη *E2A-PBX1* λειτουργεί ως μεταγραφικός επαγωγέας της έκφρασης διαφόρων γονιδίων που ρυθμίζονται από τον *PBX1*, συμβάλλοντας έτσι στην κακοήγη εξαλλαγή των προγονικών Β-κυττάρων.¹²⁴ Η *E2A-PBX1* αναδιάταξη είναι παρούσα στο 3-5% των περιπτώσεων με Β-ΟΛΛ (σχεδόν στο 50% των ασθενών με προ-Β-ΟΛΛ)¹⁶⁹, κι αν κι από μόνη της δεν μπορεί να επάγει λευχαιμογένεση, έχει αναφερθεί ότι ρυθμίζει βασικά συστατικά του *pre-BCR* και των σηματοδοτικών οδών

καθοδικά του υποδοχέα.¹⁷⁰ Στη παρούσα μελέτη, ελέγχοντας πιθανές θέσεις δέσμευσης για τον E2A-PBX1 σε περιοχές με υποτιθέμενη ρυθμιστική σημασία στο *BAFFR* γονίδιο (υποκινητής, 2^ο ιντρόνιο, 3^ο UTR), διαπιστώσαμε ότι ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας προσδένεται στον υποκινητή του *BAFFR* γονιδίου. Το γεγονός αυτό προτείνει μία πιθανή συμμετοχή του E2A-PBX1 στη μεταγραφική ρύθμιση του *BAFFR*. Ωστόσο, η έκφραση του υποδοχέα σε ασθενείς με κοινή ή προ-B-ΟΛΛ χωρίς τη μετατόπιση υποδηλώνει ότι η παρουσία του E2A-PBX1 δεν είναι ικανή κι αναγκαία συνθήκη για την επαγωγή της έκφρασης του *BAFFR* στα λευχαιμικά κύτταρα. Επίσης, εντός των ασθενών με προ-B-ΟΛΛ που έφεραν τον συγκεκριμένο ανασυνδυασμό, υπήρχαν περιπτώσεις που εξέφραζαν χαμηλά μεταγραφικά επίπεδα του *BAFFR*. Το γεγονός ότι ασθενείς με τον E2A-PBX1 φέρουν επιπρόσθετες γενετικές βλάβες (π.χ. ελλείψεις των γονιδίων *IKZF1*, *CDKN2A*, *PAX5*, *ETV6*)¹⁷¹ θα μπορούσε να συμβάλει στη διαφοροποίηση των E2A-PBX1⁺ ασθενών ως προς την έκφραση του *BAFFR*. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι ο E2A-PBX1 πιθανότατα δρα συνεργικά με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες για τη ρύθμιση της πρώιμης έναρξης της έκφρασης του *BAFFR* στους B-λεμφοβλάστες.

Η σύνδεση του BAFF στον BAFFR ενεργοποιεί τον NF-κB2, διαδραματίζοντας θεμελιώδη ρόλο για την επιβίωση κι ωρίμανση των φυσιολογικών B-κυττάρων της περιφέρειας.⁸⁰ Ενεργοποίηση αυτής της οδού έχει αναφερθεί σε μία κυτταρική σειρά προ-B-ΟΛΛ¹⁴² και σε ένα ξενομόσχευμα προερχόμενο από B-λεμφοβλάστες ενός ασθενούς με Ph⁺ B-ΟΛΛ¹⁴¹. Στην παρούσα μελέτη διαπιστώσαμε ότι λευχαιμικά κύτταρα από τους ασθενείς με BAFFR⁺ προ-B-ΟΛΛ ήταν πολύ ευαίσθητα στη διέγερση με BAFF ως προς την ενεργοποίηση της NF-κB2 σηματοδότησης, ακόμη και στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις του συνδέτη. Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν περαιτέρω την άποψη ότι ο BAFFR, παρά την απρόσφορη έκφρασή του στους B-λεμφοβλάστες, είναι λειτουργικός στο πλαίσιο της ενεργοποίησης σηματοδοτικών οδών.

Μελέτες έχουν δείξει ότι τόσο ο TACI όσο κι ο BCMA απευλευθερώνονται συστατικά από την κυτταρική μεμβράνη με μεσολάβηση των δράσεων της μεταλλοπρωτεάσης ADAM10 και της γ-σεκρετάσης για τους δύο υποδοχείς αντίστοιχα, με τελικό αποτέλεσμα τη μειωμένη ενεργοποίηση της NF-κB σηματοδότησης στα κύτταρα στα οποία εκφράζονται.^{172,173} Στην περίπτωση ωστόσο του BAFFR, η ομάδα των Smulski και συν. απέδειξε ότι ο υποδοχέας αποικοδομείται από την κυτταρική μεμβράνη κατά έναν συντονισμένο τρόπο κι όχι συστατικά, όπως οι TACI & BCMA. Συγκεκριμένα, ο BAFFR στα ώριμα B-κύτταρα διασπάται πρωτεολυτικά έπειτα από πρόσδεση του BAFF, αλλά μόνο σε εκείνα τα κύτταρα που εκφράζουν TACI. Μάλιστα οι δύο ισομορφές του BAFF επάγουν

διαφορετικά μονοπάτια για την αποικοδόμηση του BAFFR, με το 3-μερές να μεσολαβεί της διάσπασης του BAFFR μέσω της μεταλλοπρωτεάσης ADAM10, χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα του TACI, ενώ το 60-μερές ενεργοποιεί την αποικοδόμηση των BAFFR και TACI από τις μεταλλοπρωτεάσες ADAM10 & ADAM17.¹⁶² Η εξαρτώμενη από τον BAFF διάσπαση του BAFFR οδηγεί στην απελευθέρωση ενός διαλυτού υποδοχέα κι αποτελεί πιθανότατα έναν μηχανισμό που ρυθμίζει τα επιφανειακά επίπεδα του BAFFR στα Β-κύτταρα και κατ' επέκταση την μεσολαβούμενη από τον BAFFR επιβίωση.¹⁶²

Παρόλα αυτά δεν έχει διευκρινιστεί αν ο διαλυτός BAFFR διατηρεί την ικανότητα πρόσδεσης του BAFF και αν θα μπορούσε να ρυθμίζει σε ένα επιπλέον επίπεδο τη δράση του συνδέτη. Παραδόξως, στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι το 60-μερές BAFF, ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, μπορεί να επάγει αποικοδόμηση του BAFFR σε λεμφοβλάστες ασθενών με Β-ΟΛΛ που εκφράζουν τον υποδοχέα καθώς επίσης και στην 697 κυτταρική σειρά. Ωστόσο, η απουσία έκφρασης του TACI στα λευχαιμικά κύτταρα των ασθενών αλλά και στην 697 κυτταρική σειρά υποδεικνύει μία ανεξάρτητη από τον TACI επαγόμενη από τον BAFF διάσπαση του BAFFR, που θα μπορούσε να ρυθμίζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα και κατ' επέκταση την ενεργοποίηση σηματοδοτικών οδών και την δράση του. Η χρήση αναστολέων μεταλλοπρωτεασών (π.χ. marimastat) θα μπορούσε να συμβάλει στη διερεύνηση του αν η αποικοδόμηση του BAFFR μεσολαβείται από τις ήδη γνωστές μεταλλοπρωτεάσες, ή αν διαφορετικοί μηχανισμοί εμπλέκονται στο φαινόμενο αυτό. Επιπλέον η μέτρηση των διαλυτών επιπέδων του BAFFR στον ορό ή σε υπερκείμενα μυελού ασθενών με Β-ΟΛΛ θα μπορούσε να παράσχει μία ένδειξη για το κατά πόσο αυτό αποτελεί ένα *in vivo* φαινόμενο στον οργανισμό των ασθενών. Συνολικά, η επαγόμενη από τον BAFF αποικοδόμηση του BAFFR μπορεί να επηρεάζει τόσο τη βιοδιαθεσιμότητα του συνδέτη, στην περίπτωση που ο διαλυτός BAFFR διατηρεί την ικανότητα σύνδεσης για τον BAFF, αλλά ταυτόχρονα θα μπορούσε να περιορίζει τα επίπεδα του BAFFR και κατ' επέκταση τη δυναμική της δράσης του.

Η μεσολαβούμενη από τον BAFF ενεργοποίηση της NF-κB2 οδού συμβάλλει στην επιβίωση τόσο των φυσιολογικών^{80,174} όσο και των νεοπλασματικών ώριμων Β-κυττάρων⁹⁰⁻⁹². Ωστόσο, η επίδραση του BAFF στην επιβίωση των λεμφοβλαστών της Β-ΟΛΛ είναι μάλλον αμφιλεγόμενη, αφ' ενός λόγω της έλλειψης ενός κατάλληλου *in vitro* συστήματος καλλιέργειας και αφ' ετέρου γιατί τα κύτταρα των ασθενών είναι πολύ επιρρεπή στην αυθόρμητη απόπτωσή τους *ex vivo*.¹⁷⁵ Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε ότι ο εξωγενής BAFF ενέτεινε την αυθόρμητη απόπτωση λεμφοβλαστών ασθενών με BCR-ABL⁺ προ-Β-ΟΛΛ που εξέφραζαν τον BAFFR, γεγονός το οποίο έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενες

μελέτες. Η διαφορά ανάμεσα στα αποτελέσματά μας κι αυτά των άλλων ερευνητικών ομάδων πιθανότατα μπορεί να εξηγηθεί από τις πειραματικές προσεγγίσεις που ακολουθήθηκαν, καθώς οι Parameswaran και συν. ανέλυσαν τις εξαρτώμενες από τον BAFF απαντήσεις καλλιεργώντας Β-λεμφοβλάστες ασθενών, προερχόμενους από ξενομόσχευμα ποντικού, παρουσία των στρωματικών κυττάρων OP9 ποντικού, τα οποία αποτελούν πλούσια πηγή ενδογενούς BAFF,¹⁴¹ ενώ η δική μας καλλιέργεια περιλάμβανε απομονωμένους Β-λεμφοβλάστες απουσία τροφοδοτικών κυττάρων. Γνωρίζουμε ότι στην περίπτωση των φυσιολογικών προγονικών Β-κυττάρων, που αναπτύσσονται *in vitro* από CD34⁺ στελεχιαία κύτταρα της αιμοποιητικής σειράς, η παρουσία τροφοδοτικών κυττάρων μπορεί να παρεμβάλλεται των φυσιολογικών αναπτυξιακών διαδικασιών.¹⁷⁶ Κατά ανάλογο τρόπο, η παρουσία των OP9 κυττάρων στην καλλιέργεια των Β-λεμφοβλαστών στην ομάδα των Parameswaran και συν. θα μπορούσε να παρέχει επιπλέον παράγοντες που προωθούν την επιβίωση,¹⁴¹ οι οποίοι ωστόσο δεν ήταν παρόντες στο δικό μας σύστημα καλλιέργειας.

Η απρόσμενη ενίσχυση της απόπτωσης από την αλληλεπίδραση BAFF-BAFFR στους νεοπλασματικούς προ-Β-λεμφοβλάστες, θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα επαγόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια πιθανότατα επικαλύπτονται με ή μπορεί να ενισχύουν την εξαρτώμενη από τον pre-BCR-σηματοδότηση. Γνωρίζουμε ότι η αυτόνομη σηματοδότηση του pre-BCR υποδοχέα παρέχει σήματα πολλαπλασιασμού και περαιτέρω διαφοροποίησης στα φυσιολογικά προ-Β-κύτταρα.¹⁷⁷ Ωστόσο, έχει προταθεί ότι η ενεργοποίηση της σηματοδότησης θα πρέπει να είναι ενδιάμεσης ισχύος, γιατί στην αντίθετη περίπτωση λαμβάνει χώρα αρνητική επιλογή των αναπτυσσόμενων Β-κυττάρων.¹⁷⁷ Η BCR-ABL τυροσινική κινάση μιμείται συστατικά την pre-BCR σηματοδότηση, και μάλιστα η παρουσία της μετατόπισης αυτής σε προ-Β-κύτταρα αποκλείει την έκφραση ενός λειτουργικού pre-BCR.¹⁷⁸ Έχει δειχθεί ότι ενίσχυση των σηματοδοτικών οδών καθοδικά της BCR-ABL κινάσης (π.χ. μέσω αύξησης της δραστηριότητας της SYK τυροσινικής κινάσης κι άλλων σηματοδοτικών μορίων) επάγει τον κυτταρικό θάνατο¹⁷⁹ όπως συμβαίνει και στην περίπτωση της ενεργοποίησης ενός αυτοδραστικού pre-BCR. Ο BAFFR στα φυσιολογικά Β-κύτταρα που έχουν σχηματίσει ένα λειτουργικό υποδοχέα ενεργοποιεί επίσης τη SYK και κατεπέκταση το μονοπάτι της PI3K.¹⁸⁰ Η επαγωγή των εξαρτώμενων από τον BAFFR σημάτων στους προ-Β-λεμφοβλάστες θα μπορούσε να δρα συνεργικά στη δράση κινάσης τυροσίνης της BCR-ABL πρωτεΐνης και να παρέχει μία εξήγηση για τον ενισχυμένο από τον BAFF κυτταρικό θάνατο των λεμφοβλαστών σε ασθενείς με BCR-ABL⁺ προ-Β-ΟΛΛ. Δεν μπορούμε ωστόσο να γνωρίζουμε αν η εξαρτώμενη από τον BAFF αποικοδόμηση του BAFFR στους Β-λεμφοβλάστες λαμβάνει χώρα πριν την δράση των μηχανισμών που προωθούν την απόπτωση, ή αν συμβαίνει το αντίθετο.

Ως προέκταση των προηγούμενων ευρημάτων μας, διαπιστώσαμε ότι ο BAFF φάνηκε επίσης να ενισχύει σημαντικά την επαγόμενη από γλυκοκορτικοειδή απόπτωση της 697 κυτταρικής σειράς. Παρόμοια δράση του BAFF είχε παρουσιαστεί και στην μελέτη από την ομάδα των Onda και συν. οι οποίοι έδειξαν ότι ο συνδέτης μπορούσε να ενισχύσει την επαγόμενη από δεξαμεθαζόνη απόπτωση μίας άλλης κυτταρικής σειράς προ-B-ΟΛΛ, της NALM-6, χωρίς όμως να δοθεί έμφαση στο φαινόμενο αυτό.¹⁴² Χαρακτηριστικό γνώρισμα και των δύο κυτταρικών σειρών αποτελεί η έκφραση ενός λειτουργικού pre-BCR.¹⁸¹ Σε αντίθεση με την BCR-ABL⁺ προ-B-ΟΛΛ, η οποία διακρίνεται από την έκφραση ενός μη λειτουργικού pre-BCR, αλλά από την αυξημένη σηματοδότηση καθοδικά υποδοχέων κυτταροκινών, περίπου 15% των περιπτώσεων B-ΟΛΛ εμφανίζει αυξημένη αυτόνομη σηματοδότηση από τον pre-BCR (π.χ. μέσω ενεργοποίησης της PI3K & MAPK/ERK) και μάλιστα φέρει συχνά και την χρωμοσωμική αναδιάταξη E2A-PBX1. Ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας φαίνεται ότι επάγει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν «πρωτεΐνες-κλειδιά» αυτής της σηματοδότησης, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη της pre-BCR⁺ B-ΟΛΛ.¹⁸² Ασθενείς με την E2A-PBX1 χρωμοσωμική αναδιάταξη εμφανίζουν πολύ καλή απάντηση στο hyper-CVAD θεραπευτικό σχήμα, το οποίο περιλαμβάνει γλυκοκορτικοειδή (κυρίως δεξαμεθαζόνη).¹⁵⁵ Αν λοιπόν στους B-λεμφοβλάστες ο E2A-PBX1 μεταγραφικός παράγοντας επάγει την απρόσφορη έκφραση του BAFFR, κι ο υποδοχέας αυτός αλληλεπιδρά με τον pre-BCR, η αυξημένη σηματοδότηση καθοδικά των δύο υποδοχέων θα μπορούσε να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο κατά τρόπο όμοιο με αυτόν μίας πιθανής αλληλεπίδρασης BAFFR & BCR-ABL κινάσης, και να ενισχύσει την απόπτωση που επάγεται από γλυκοκορτικοειδή.

Τα γλυκοκορτικοειδή ασκούν την ανοσοκατασταλτική τους δράση έπειτα από πρόσδεση στον υποδοχέα τους, ο οποίος δρα ως μεταγραφικός παράγοντας προκειμένου να ρυθμίσει άμεσα την έκφραση γονιδίων-στόχων, ή αλληλεπιδρά με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (π.χ. p65) και κινάσες (π.χ. PI3Kδ), επηρεάζοντας τη δραστηριότητά τους.¹⁸³ Στην παρούσα μελέτη, η ενισχυμένη από τον BAFF επαγόμενη από δεξαμεθαζόνη απόπτωση των 697 κυττάρων δε φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά το βαθμό ενεργοποίησης της NF-κB2 οδού και της αποικοδόμησης του BAFFR. Το γεγονός αυτό πιθανότατα υποδεικνύει ότι ο BAFFR και τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν διαφορετικά μονοπάτια προκειμένου να πυροδοτήσουν την απόπτωση των λευχαιμικών κυττάρων, τα οποία τελικά αλληλοεπικαλύπτονται και προωθούν την απόπτωση των κυττάρων. Περαιτέρω μελέτες άλλων οδών (π.χ. NF-κB1, PI3K), που ενεργοποιούνται πιο άμεσα ως απάντηση σε ερεθίσματα, αλλά και διερεύνηση της έκφρασης πρωτεϊνών που προωθούν ή καταστέλλουν την απόπτωση θα μπορούσαν να βοηθήσουν στο να αποσαφηνιστούν οι μηχανισμοί που οδηγούν το συγκεκριμένο φαινόμενο.

Συνοπτικά, τα δεδομένα μας δείχνουν ότι το σύστημα BAFF/APRIL είναι λειτουργικό στη Β-ΟΛΛ ακολουθώντας ένα ειδικό για τον υπότυπο της νόσου πρότυπο. Επιπλέον, η συμμετοχή του E2A-PBX1 στη μεταγραφική ρύθμιση του BAFFR ρίχνει περισσότερο φως στην κατανόηση της απορρυθμισμένης έκφρασης του επικρατώντα υποδοχέα του BAFF/APRIL συστήματος στη Β-ΟΛΛ. Ωστόσο, η συσχέτιση της απρόσφορης έκφρασης του BAFFR με τους υποτύπους της νόσου και η επίδειξη ενός πιθανού ρόλου του BAFF στην ενίσχυση του κυτταρικού θανάτου στη Β-ΟΛΛ συνεπάγεται ότι οι στρατηγικές που στοχεύουν το BAFFR και/ή τον συνδέτη θα πρέπει να εξεταστούν διεξοδικότερα και ίσως με σκεπτικισμό. Τέλος, εφόσον η ενεργοποίηση του BAFFR φαίνεται να ενισχύει τον κυτταρικό θάνατο σε BCR-ABL⁺ προ-B-λεμφοβλάστες και σε E2A-PBX1⁺ λευχαιμικά κύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία γλυκοκορτικοειδών, η παρακολούθηση της έκφρασης του BAFFR μαζί με τη μοριακή ταυτοποίηση ογκογόνων μετατοπίσεων μπορεί να παρέχει νέα μέσα για την κατηγοριοποίηση και τελικά τη θεραπεία της νόσου.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Melchers F.** Checkpoints that control B cell development. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(6):2203-2210.
2. **Murphy K.** *Janeway's immunobiology 8th edition*. United States of America 2012.
3. **Medvinsky A, Dzierzak E.** Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell*. 1996;86(6):897-906.
4. **Yokomizo T, Ng CE, Osato M, Dzierzak E.** Three-dimensional imaging of whole midgestation murine embryos shows an intravascular localization for all hematopoietic clusters. *Blood*. 2011;117(23):6132-6134.
5. **Akashi K, Kondo M, Cheshier S, et al.** Lymphoid development from stem cells and the common lymphocyte progenitors. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 1999;64:1-12.
6. **Sitnicka E, Brakebusch C, Martensson IL, et al.** Complementary signaling through flt3 and interleukin-7 receptor alpha is indispensable for fetal and adult B cell genesis. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198(10):1495-1506.
7. **Nagasawa T.** Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nature reviews. Immunology*. 2006;6(2):107-116.
8. **Nutt SL, Kee BL.** The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity*. 2007;26(6):715-725.
9. **Bankovich AJ, Raunser S, Juo ZS, Walz T, Davis MM, Garcia KC.** Structural insight into pre-B cell receptor function. *Science*. 2007;316(5822):291-294.
10. **ten Boekel E, Melchers F, Rolink AG.** Precursor B cells showing H chain allelic inclusion display allelic exclusion at the level of pre-B cell receptor surface expression. *Immunity*. 1998;8(2):199-207.
11. **Melchers F.** The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire. *Nature reviews. Immunology*. 2005;5(7):578-584.
12. **Vettermann C, Schlissel MS.** Allelic exclusion of immunoglobulin genes: models and mechanisms. *Immunological reviews*. 2010;237(1):22-42.
13. **Chung JB, Silverman M, Monroe JG.** Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends in immunology*. 2003;24(6):343-349.
14. **Nemazee D.** Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nature reviews. Immunology*. 2017;17(5):281-294.
15. **Thompson JS, Bixler SA, Qian F, et al.** BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science*. 2001;293(5537):2108-2111.
16. **Martin F, Oliver AM, Kearney JF.** Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity*. 2001;14(5):617-629.
17. **Balazs M, Martin F, Zhou T, Kearney J.** Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity*. 2002;17(3):341-352.
18. **Weill JC, Weller S, Reynaud CA.** Human marginal zone B cells. *Annual review of immunology*. 2009;27:267-285.

19. **Pieper K, Grimbacher B, Eibel H.** B-cell biology and development. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;131(4):959-971.
20. **Liu YJ, Arpin C.** Germinal center development. *Immunological reviews*. 1997;156:111-126.
21. **Teng G, Papavasiliou FN.** Immunoglobulin somatic hypermutation. *Annual review of genetics*. 2007;41:107-120.
22. **Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE.** Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annual review of immunology*. 2008;26:261-292.
23. **Bolland ERWaS.** B Cells: Development, Differentiation, and Regulation by Fcγ Receptor IIB in the Humoral Immune Response. *Antibody Fc. Linking Adaptive and Innate Immunity*2014:115-129.
24. **LeBien TW, Tedder TF.** B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. 2008;112(5):1570-1580.
25. **Welner RS, Pelayo R, Kincade PW.** Evolving views on the genealogy of B cells. *Nature reviews. Immunology*. 2008;8(2):95-106.
26. **McKenna RW, Washington LT, Aquino DB, Picker LJ, Kroft SH.** Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. *Blood*. 2001;98(8):2498-2507.
27. **Hunger SP, Mullighan CG.** Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *The New England journal of medicine*. 2015;373(16):1541-1552.
28. **McKenna RW, Asplund SL, Kroft SH.** Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) and neoplastic lymphoblasts by 4-color flow cytometry. *Leukemia & lymphoma*. 2004;45(2):277-285.
29. **Sedek L, Bulsa J, Sonsala A, et al.** The immunophenotypes of blast cells in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: How different are they from their normal counterparts? *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*. 2014.
30. **Rickert RC.** New insights into pre-BCR and BCR signalling with relevance to B cell malignancies. *Nature reviews. Immunology*. 2013;13(8):578-591.
31. **Cancro MP.** Signalling crosstalk in B cells: managing worth and need. *Nature reviews. Immunology*. 2009;9(9):657-661.
32. **Mackay F, Schneider P.** Cracking the BAFF code. *Nature reviews. Immunology*. 2009;9(7):491-502.
33. **Schneider P, MacKay F, Steiner V, et al.** BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *The Journal of experimental medicine*. 1999;189(11):1747-1756.
34. **Hahne M, Kataoka T, Schroter M, et al.** APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. *The Journal of experimental medicine*. 1998;188(6):1185-1190.
35. **von Bulow GU, Bram RJ.** NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Science*. 1997;278(5335):138-141.
36. **Laabi Y, Gras MP, Carbonnel F, et al.** A new gene, BCM, on chromosome 16 is fused to the interleukin 2 gene by a t(4;16)(q26;p13) translocation in a malignant T cell lymphoma. *The EMBO journal*. 1992;11(11):3897-3904.

37. **Darce JR, Arendt BK, Wu X, Jelinek DF.** Regulated expression of BAFF-binding receptors during human B cell differentiation. *Journal of immunology.* 2007;179(11):7276-7286.
38. **Nardelli B, Belvedere O, Roschke V, et al.** Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood.* 2001;97(1):198-204.
39. **Bossen C, Tardivel A, Willen L, et al.** Mutation of the BAFF furin cleavage site impairs B-cell homeostasis and antibody responses. *European journal of immunology.* 2011;41(3):787-797.
40. **Lopez-Fraga M, Fernandez R, Albar JP, Hahne M.** Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase. *EMBO reports.* 2001;2(10):945-951.
41. **Liu Y, Xu L, Opalka N, Kappler J, Shu HB, Zhang G.** Crystal structure of sTALL-1 reveals a virus-like assembly of TNF family ligands. *Cell.* 2002;108(3):383-394.
42. **Kim HM, Yu KS, Lee ME, et al.** Crystal structure of the BAFF-BAFF-R complex and its implications for receptor activation. *Nature structural biology.* 2003;10(5):342-348.
43. **Ingold K, Zumsteg A, Tardivel A, et al.** Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners. *The Journal of experimental medicine.* 2005;201(9):1375-1383.
44. **Vincent FB, Saulep-Easton D, Figgett WA, Fairfax KA, Mackay F.** The BAFF/APRIL system: emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. *Cytokine & growth factor reviews.* 2013;24(3):203-215.
45. **Bossen C, Schneider P.** BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. *Seminars in immunology.* 2006;18(5):263-275.
46. **Roschke V, Sosnovtseva S, Ward CD, et al.** BLyS and APRIL form biologically active heterotrimers that are expressed in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Journal of immunology.* 2002;169(8):4314-4321.
47. **Dillon SR, Harder B, Lewis KB, et al.** B-lymphocyte stimulator/a proliferation-inducing ligand heterotrimers are elevated in the sera of patients with autoimmune disease and are neutralized by atacicept and B-cell maturation antigen-immunoglobulin. *Arthritis research & therapy.* 2010;12(2):R48.
48. **Gavin AL, Ait-Azzouzene D, Ware CF, Nemazee D.** DeltaBAFF, an alternate splice isoform that regulates receptor binding and biopresentation of the B cell survival cytokine, BAFF. *The Journal of biological chemistry.* 2003;278(40):38220-38228.
49. **Maia S, Pelletier M, Ding J, et al.** Aberrant expression of functional BAFF-system receptors by malignant B-cell precursors impacts leukemia cell survival. *PloS one.* 2011;6(6):e20787.
50. **Pradet-Balade B, Medema JP, Lopez-Fraga M, et al.** An endogenous hybrid mRNA encodes TWE-PRIL, a functional cell surface TWEAK-APRIL fusion protein. *The EMBO journal.* 2002;21(21):5711-5720.
51. **Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J.** BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annual review of immunology.* 2003;21:231-264.
52. **Hengeveld PJ, Kersten MJ.** B-cell activating factor in the pathophysiology of multiple myeloma: a target for therapy? *Blood cancer journal.* 2015;5:e282.

53. **Schneider P.** The beautiful structures of BAFF, APRIL and their receptors. *BlyS Ligands and Receptors*. 2009:1-18.
54. **Hymowitz SG, Patel DR, Wallweber HJ, et al.** Structures of APRIL-receptor complexes: like BCMA, TACI employs only a single cysteine-rich domain for high affinity ligand binding. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(8):7218-7227.
55. **Mihalcik SA, Huddleston PM, 3rd, Wu X, Jelinek DF.** The structure of the TNFRSF13C promoter enables differential expression of BAFF-R during B cell ontogeny and terminal differentiation. *Journal of immunology*. 2010;185(2):1045-1054.
56. **Benson MJ, Dillon SR, Castigli E, et al.** Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL. *Journal of immunology*. 2008;180(6):3655-3659.
57. **Day ES, Cachero TG, Qian F, et al.** Selectivity of BAFF/BlyS and APRIL for binding to the TNF family receptors BAFFR/BR3 and BCMA. *Biochemistry*. 2005;44(6):1919-1931.
58. **Bossen C, Cachero TG, Tardivel A, et al.** TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts. *Blood*. 2008;111(3):1004-1012.
59. **Batten M, Groom J, Cachero TG, et al.** BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(10):1453-1466.
60. **Shulga-Morskaya S, Dobles M, Walsh ME, et al.** B cell-activating factor belonging to the TNF family acts through separate receptors to support B cell survival and T cell-independent antibody formation. *Journal of immunology*. 2004;173(4):2331-2341.
61. **Warnatz K, Salzer U, Rizzi M, et al.** B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(33):13945-13950.
62. **Sasaki Y, Casola S, Kutok JL, Rajewsky K, Schmidt-Supprian M.** TNF family member B cell-activating factor (BAFF) receptor-dependent and -independent roles for BAFF in B cell physiology. *Journal of immunology*. 2004;173(4):2245-2252.
63. **Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, et al.** Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *The Journal of experimental medicine*. 1999;190(11):1697-1710.
64. **Groom JR, Fletcher CA, Walters SN, et al.** BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(8):1959-1971.
65. **Ng LG, Mackay CR, Mackay F.** The BAFF/APRIL system: life beyond B lymphocytes. *Molecular immunology*. 2005;42(7):763-772.
66. **Seshasayee D, Valdez P, Yan M, Dixit VM, Tumas D, Grewal IS.** Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BlyS receptor. *Immunity*. 2003;18(2):279-288.
67. **Salzer U, Chapel HM, Webster AD, et al.** Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nature genetics*. 2005;37(8):820-828.

68. **von Bulow GU, van Deursen JM, Bram RJ.** Regulation of the T-independent humoral response by TACI. *Immunity*. 2001;14(5):573-582.
69. **Castigli E, Scott S, Dedeoglu F, et al.** Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(11):3903-3908.
70. **Kreuzaler M, Rauch M, Salzer U, et al.** Soluble BAFF levels inversely correlate with peripheral B cell numbers and the expression of BAFF receptors. *Journal of immunology*. 2012;188(1):497-503.
71. **Jiang C, Loo WM, Greenley EJ, Tung KS, Erickson LD.** B cell maturation antigen deficiency exacerbates lymphoproliferation and autoimmunity in murine lupus. *Journal of immunology*. 2011;186(11):6136-6147.
72. **O'Connor BP, Raman VS, Erickson LD, et al.** BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *The Journal of experimental medicine*. 2004;199(1):91-98.
73. **Hatzoglou A, Roussel J, Bourgeade MF, et al.** TNF receptor family member BCMA (B cell maturation) associates with TNF receptor-associated factor (TRAF) 1, TRAF2, and TRAF3 and activates NF-kappa B, elk-1, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase. *Journal of immunology*. 2000;165(3):1322-1330.
74. **Morrison MD, Reiley W, Zhang M, Sun SC.** An atypical tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor-binding motif of B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF) receptor mediates induction of the noncanonical NF-kappaB signaling pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(11):10018-10024.
75. **Jellusova J, Miletic AV, Cato MH, et al.** Context-specific BAFF-R signaling by the NF-kappaB and PI3K pathways. *Cell reports*. 2013;5(4):1022-1035.
76. **Ye H, Wu H.** Thermodynamic characterization of the interaction between TRAF2 and tumor necrosis factor receptor peptides by isothermal titration calorimetry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(16):8961-8966.
77. **Baud V, Liu ZG, Bennett B, Suzuki N, Xia Y, Karin M.** Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes & development*. 1999;13(10):1297-1308.
78. **Gardam S, Sierro F, Basten A, Mackay F, Brink R.** TRAF2 and TRAF3 signal adapters act cooperatively to control the maturation and survival signals delivered to B cells by the BAFF receptor. *Immunity*. 2008;28(3):391-401.
79. **Mackay F, Figgett WA, Saulep D, Lepage M, Hibbs ML.** B-cell stage and context-dependent requirements for survival signals from BAFF and the B-cell receptor. *Immunological reviews*. 2010;237(1):205-225.
80. **Gardam S, Brink R.** Non-Canonical NF-kappaB Signaling Initiated by BAFF Influences B Cell Biology at Multiple Junctions. *Frontiers in immunology*. 2014;4:509.
81. **Rickert RC, Jellusova J, Miletic AV.** Signaling by the tumor necrosis factor receptor superfamily in B-cell biology and disease. *Immunological reviews*. 2011;244(1):115-133.

82. **Patke A, Mecklenbrauker I, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Tarakhovsky A.** BAFF controls B cell metabolic fitness through a PKC beta- and Akt-dependent mechanism. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(11):2551-2562.
83. **Fu L, Lin-Lee YC, Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, Ford RJ.** BAFF-R promotes cell proliferation and survival through interaction with IKKbeta and NF-kappaB/c-Rel in the nucleus of normal and neoplastic B-lymphoid cells. *Blood*. 2009;113(19):4627-4636.
84. **Rowland SL, Leahy KF, Halverson R, Torres RM, Pelanda R.** BAFF receptor signaling aids the differentiation of immature B cells into transitional B cells following tonic BCR signaling. *Journal of immunology*. 2010;185(8):4570-4581.
85. **Monroe JG.** Ligand-independent tonic signaling in B-cell receptor function. *Current opinion in immunology*. 2004;16(3):288-295.
86. **Thien M, Phan TG, Gardam S, et al.** Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity*. 2004;20(6):785-798.
87. **Castro I, Wright JA, Damdinsuren B, et al.** B cell receptor-mediated sustained c-Rel activation facilitates late transitional B cell survival through control of B cell activating factor receptor and NF-kappaB2. *Journal of immunology*. 2009;182(12):7729-7737.
88. **Khan WN.** B cell receptor and BAFF receptor signaling regulation of B cell homeostasis. *Journal of immunology*. 2009;183(6):3561-3567.
89. **He B, Santamaria R, Xu W, et al.** The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. *Nature immunology*. 2010;11(9):836-845.
90. **Endo T, Nishio M, Enzler T, et al.** BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF-kappaB pathway. *Blood*. 2007;109(2):703-710.
91. **Moreaux J, Legouffe E, Jourdan E, et al.** BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis induced by interleukin 6 deprivation and dexamethasone. *Blood*. 2004;103(8):3148-3157.
92. **Novak AJ, Grote DM, Stenson M, et al.** Expression of BLyS and its receptors in B-cell non-Hodgkin lymphoma: correlation with disease activity and patient outcome. *Blood*. 2004;104(8):2247-2253.
93. **Ferrer G. HK, Abrisqueta P., Pons A., Jansa S., Gel B., Filella X., Colomer D., Pereira A., Montserrat E., Moreno C.** BAFF and APRIL in Chronic Lymphocytic Leukemia: Clinico-Biological Correlates and Prognostic Significance. *Blood*. 2009;114:1235.
94. **Li YJ, Li ZM, Xia ZJ, et al.** High APRIL but not BAFF serum levels are associated with poor outcome in patients with follicular lymphoma. *Annals of hematology*. 2015;94(1):79-88.
95. **Li YJ, Jiang WQ, Rao HL, et al.** Expression of BAFF and BAFF-R in follicular lymphoma: correlation with clinicopathologic characteristics and survival outcomes. *PloS one*. 2012;7(12):e50936.
96. **Pelekanou V, Kampa M, Kafousi M, et al.** Expression of TNF-superfamily members BAFF and APRIL in breast cancer: immunohistochemical study in 52 invasive ductal breast carcinomas. *BMC cancer*. 2008;8:76.

97. **Lied GA, Berstad A.** Functional and clinical aspects of the B-cell-activating factor (BAFF): a narrative review. *Scandinavian journal of immunology*. 2011;73(1):1-7.
98. **Bassan R, Gatta G, Tondini C, Willemze R.** Adult acute lymphoblastic leukaemia. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2004;50(3):223-261.
99. **Alvarnas JC, Brown PA, Aoun P, et al.** Acute Lymphoblastic Leukemia, Version 2.2015. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*. 2015;13(10):1240-1279.
100. **Jabbour E, O'Brien S, Konopleva M, Kantarjian H.** New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2015;121(15):2517-2528.
101. **Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al.** The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405.
102. **Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al.** The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-951.
103. **Gluzman DF, Nadgornaya VA, Sklyarenko LM, Ivanovskaya TS, Poludnenko LY, Ukrainskaya NI.** Immunocytochemical markers in acute leukaemias diagnosis. *Experimental oncology*. 2010;32(3):195-199.
104. **Chiaretti S, Zini G, Bassan R.** Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2014;6(1):e2014073.
105. **Lemmers B, Arnoulet C, Fossat C, et al.** Fine characterization of childhood and adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) by a proB and preB surrogate light chain-specific mAb and a proposal for a new B cell ALL classification. *Leukemia*. 2000;14(12):2103-2111.
106. **Buitenkamp TD, Izraeli S, Zimmermann M, et al.** Acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome: a retrospective analysis from the Ponte di Legno study group. *Blood*. 2014;123(1):70-77.
107. **Shah A, John BM, Sondhi V.** Acute lymphoblastic leukemia with treatment--naive Fanconi anemia. *Indian pediatrics*. 2013;50(5):508-510.
108. **Bielorai B, Fisher T, Waldman D, et al.** Acute lymphoblastic leukemia in early childhood as the presenting sign of ataxia-telangiectasia variant. *Pediatric hematology and oncology*. 2013;30(6):574-582.
109. **Mullighan CG, Downing JR.** Global genomic characterization of acute lymphoblastic leukemia. *Seminars in hematology*. 2009;46(1):3-15.
110. **Trevino LR, Yang W, French D, et al.** Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nature genetics*. 2009;41(9):1001-1005.
111. **Shah S, Schrader KA, Waanders E, et al.** A recurrent germline PAX5 mutation confers susceptibility to pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature genetics*. 2013;45(10):1226-1231.
112. **Zhang MY, Churpek JE, Keel SB, et al.** Germline ETV6 mutations in familial thrombocytopenia and hematologic malignancy. *Nature genetics*. 2015;47(2):180-185.
113. **Inaba H, Greaves M, Mullighan CG.** Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2013;381(9881):1943-1955.

114. **Terwilliger T, Abdul-Hay M.** Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood cancer journal*. 2017;7(6):e577.
115. **Hunger SP, Mullighan CG.** Redefining ALL classification: toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine. *Blood*. 2015;125(26):3977-3987.
116. **Harrison CJ.** Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of haematology*. 2009;144(2):147-156.
117. **Shurtleff SA, Buijs A, Behm FG, et al.** TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia*. 1995;9(12):1985-1989.
118. **Mullighan CG.** Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(10):3407-3415.
119. **Linka Y, Ginzl S, Kruger M, et al.** The impact of TEL-AML1 (ETV6-RUNX1) expression in precursor B cells and implications for leukaemia using three different genome-wide screening methods. *Blood cancer journal*. 2013;3:e151.
120. **Zelent A, Greaves M, Enver T.** Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Oncogene*. 2004;23(24):4275-4283.
121. **Zhuang Y, Soriano P, Weintraub H.** The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell*. 1994;79(5):875-884.
122. **Bain G, Engel I, Robanus Maandag EC, et al.** E2A deficiency leads to abnormalities in alphabeta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. *Molecular and cellular biology*. 1997;17(8):4782-4791.
123. **Sanyal M, Tung JW, Karsunky H, et al.** B-cell development fails in the absence of the Pbx1 proto-oncogene. *Blood*. 2007;109(10):4191-4199.
124. **Aspland SE, Bendall HH, Murre C.** The role of E2A-PBX1 in leukemogenesis. *Oncogene*. 2001;20(40):5708-5717.
125. **Jeha S, Pei D, Raimondi SC, et al.** Increased risk for CNS relapse in pre-B cell leukemia with the t(1;19)/TCF3-PBX1. *Leukemia*. 2009;23(8):1406-1409.
126. **Van Etten RA.** Studying the pathogenesis of BCR-ABL+ leukemia in mice. *Oncogene*. 2002;21(56):8643-8651.
127. **Pui CH, Behm FG, Downing JR, et al.** 11q23/MLL rearrangement confers a poor prognosis in infants with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1994;12(5):909-915.
128. **Rowe JM.** Prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of haematology*. 2010;150(4):389-405.
129. **Rowe JM, Buck G, Burnett AK, et al.** Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: results of more than 1500 patients from the international ALL trial: MRC UKALL XII/ECOG E2993. *Blood*. 2005;106(12):3760-3767.
130. **Teachey DT, Hunger SP.** Predicting relapse risk in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of haematology*. 2013;162(5):606-620.
131. **Ribeiro RC, Abromowitch M, Raimondi SC, Murphy SB, Behm F, Williams DL.** Clinical and biologic hallmarks of the Philadelphia chromosome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1987;70(4):948-953.

132. **Moorman AV, Harrison CJ, Buck GA, et al.** Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood*. 2007;109(8):3189-3197.
133. **Ribera JM, Oriol A, Morgades M, et al.** Treatment of high-risk Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia in adolescents and adults according to early cytologic response and minimal residual disease after consolidation assessed by flow cytometry: final results of the PETHEMA ALL-AR-03 trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(15):1595-1604.
134. **Scavino HF, George JN, Sears DA.** Remission induction in adult acute lymphocytic leukemia. Use of vincristine and prednisone alone. *Cancer*. 1976;38(2):672-677.
135. **Kantarjian HM, O'Brien S, Smith TL, et al.** Results of treatment with hyper-CVAD, a dose-intensive regimen, in adult acute lymphocytic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2000;18(3):547-561.
136. **Hurwitz CA, Silverman LB, Schorin MA, et al.** Substituting dexamethasone for prednisone complicates remission induction in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2000;88(8):1964-1969.
137. **Pui CH, Howard SC.** Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia. *The Lancet. Oncology*. 2008;9(3):257-268.
138. **Narayanan S, Shami PJ.** Treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2012;81(1):94-102.
139. **Hoelzer D.** Targeted therapy with monoclonal antibodies in acute lymphoblastic leukemia. *Current opinion in oncology*. 2013;25(6):701-706.
140. **Chiarini F, Lonetti A, Evangelisti C, et al.** Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment: From biology to therapeutic targeting. *Biochimica et biophysica acta*. 2016;1863(3):449-463.
141. **Parameswaran R, Muschen M, Kim YM, Groffen J, Heisterkamp N.** A functional receptor for B-cell-activating factor is expressed on human acute lymphoblastic leukemias. *Cancer research*. 2010;70(11):4346-4356.
142. **Onda K, Iijima K, Katagiri YU, et al.** Differential effects of BAFF on B cell precursor acute lymphoblastic leukemia and Burkitt lymphoma. *International journal of hematology*. 2010;91(5):808-819.
143. **Bolkun L, Lemancewicz D, Jablonska E, et al.** Prognostic significance of ligands belonging to tumour necrosis factor superfamily in acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia research*. 2015;39(3):290-295.
144. **Sun B, Li L, Xu M, Wang X, Wang F, Ni H.** Significance of BAFF/APRIL Expression and Their Receptors in Pediatric Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2016;38(3):167-172.
145. **Sun B, Wu Y, Wu L, et al.** Raised expression of APRIL in Chinese children with acute lymphoblastic leukemia and its clinical implications. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2014;36(4):276-280.

146. **Fazio G, Turazzi N, Cazzaniga V, et al.** TNFRSF13C (BAFFR) positive blasts persist after early treatment and at relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of haematology*. 2017.
147. **Parameswaran R, Yu M, Lyu MA, et al.** Treatment of acute lymphoblastic leukemia with an rGel/BLyS fusion toxin. *Leukemia*. 2012;26(8):1786-1796.
148. **Parameswaran R, Lim M, Fei F, et al.** Effector-mediated eradication of precursor B acute lymphoblastic leukemia with a novel Fc-engineered monoclonal antibody targeting the BAFF-R. *Molecular cancer therapeutics*. 2014;13(6):1567-1577.
149. **Turazzi N, Fazio G, Rossi V, et al.** Engineered T cells towards TNFRSF13C (BAFFR): a novel strategy to efficiently target B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of haematology*. 2017.
150. **Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408.
151. **Novak AJ, Slager SL, Fredericksen ZS, et al.** Genetic variation in B-cell-activating factor is associated with an increased risk of developing B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Cancer research*. 2009;69(10):4217-4224.
152. **Litt MD, Simpson M, Recillas-Targa F, Prioleau MN, Felsenfeld G.** Transitions in histone acetylation reveal boundaries of three separately regulated neighboring loci. *The EMBO journal*. 2001;20(9):2224-2235.
153. **Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, et al.** An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 2017;27(1):4-25.
154. **Moorman AV, Enshaei A, Schwab C, et al.** A novel integrated cytogenetic and genomic classification refines risk stratification in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014;124(9):1434-1444.
155. **Garg R, Kantarjian H, Thomas D, et al.** Adults with acute lymphoblastic leukemia and translocation (1;19) abnormality have a favorable outcome with hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and dexamethasone alternating with methotrexate and high-dose cytarabine chemotherapy. *Cancer*. 2009;115(10):2147-2154.
156. **Wang H, Marsters SA, Baker T, et al.** TACI-ligand interactions are required for T cell activation and collagen-induced arthritis in mice. *Nature immunology*. 2001;2(7):632-637.
157. **Ye Q, Wang L, Wells AD, et al.** BAFF binding to T cell-expressed BAFF-R costimulates T cell proliferation and alloresponses. *European journal of immunology*. 2004;34(10):2750-2759.
158. **Kern C, Cornuel JF, Billard C, et al.** Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood*. 2004;103(2):679-688.
159. **Chu VT, Enghard P, Riemekasten G, Berek C.** In vitro and in vivo activation induces BAFF and APRIL expression in B cells. *Journal of immunology*. 2007;179(9):5947-5957.
160. **Pieper K, Rizzi M, Speletas M, et al.** A common single nucleotide polymorphism impairs B-cell activating factor receptor's multimerization, contributing to common variable immunodeficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2014;133(4):1222-1225.

161. **Beinke S, Ley SC.** Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *The Biochemical journal.* 2004;382(Pt 2):393-409.
162. **Smulski CR, Kury P, Seidel LM, et al.** BAFF- and TACI-Dependent Processing of BAFFR by ADAM Proteases Regulates the Survival of B Cells. *Cell reports.* 2017;18(9):2189-2202.
163. **Yamamoto Y, Gaynor RB.** Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *The Journal of clinical investigation.* 2001;107(2):135-142.
164. **Musa J, Orth MF, Dallmayer M, et al.** Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1): a master regulator of mRNA translation involved in tumorigenesis. *Oncogene.* 2016;35(36):4675-4688.
165. **Wang R, Ganesan S, Zheng XF.** Yin and yang of 4E-BP1 in cancer. *Cell cycle.* 2016;15(11):1401-1402.
166. **Hildebrand JM, Luo Z, Manske MK, et al.** A BAFF-R mutation associated with non-Hodgkin lymphoma alters TRAF recruitment and reveals new insights into BAFF-R signaling. *The Journal of experimental medicine.* 2010;207(12):2569-2579.
167. **Schuepbach-Mallepell S, Das D, Willen L, et al.** Stoichiometry of Heteromeric BAFF and APRIL Cytokines Dictates Their Receptor Binding and Signaling Properties. *The Journal of biological chemistry.* 2015;290(26):16330-16342.
168. **Mihalcik SA, Tschumper RC, Jelinek DF.** Transcriptional and post-transcriptional mechanisms of BAFF-receptor dysregulation in human B lineage malignancies. *Cell cycle.* 2010;9(24):4884-4892.
169. **Nourse J, Mellentin JD, Galili N, et al.** Chromosomal translocation t(1;19) results in synthesis of a homeobox fusion mRNA that codes for a potential chimeric transcription factor. *Cell.* 1990;60(4):535-545.
170. **Geng H, Hurtz C, Lenz KB, et al.** Self-enforcing feedback activation between BCL6 and pre-B cell receptor signaling defines a distinct subtype of acute lymphoblastic leukemia. *Cancer cell.* 2015;27(3):409-425.
171. **Asai D, Imamura T, Yamashita Y, et al.** Outcome of TCF3-PBX1 positive pediatric acute lymphoblastic leukemia patients in Japan: a collaborative study of Japan Association of Childhood Leukemia Study (JACLS) and Children's Cancer and Leukemia Study Group (CCLSG). *Cancer medicine.* 2014;3(3):623-631.
172. **Hoffmann FS, Kuhn PH, Laurent SA, et al.** The immunoregulator soluble TACI is released by ADAM10 and reflects B cell activation in autoimmunity. *Journal of immunology.* 2015;194(2):542-552.
173. **Laurent SA, Hoffmann FS, Kuhn PH, et al.** gamma-Secretase directly sheds the survival receptor BCMA from plasma cells. *Nature communications.* 2015;6:7333.
174. **Mackay F, Browning JL.** BAFF: a fundamental survival factor for B cells. *Nature reviews. Immunology.* 2002;2(7):465-475.
175. **Pal D, Blair HJ, Elder A, et al.** Long-term in vitro maintenance of clonal abundance and leukaemia-initiating potential in acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia.* 2016;30(8):1691-1700.
176. **Kraus H, Kaiser S, Aumann K, et al.** A feeder-free differentiation system identifies autonomously proliferating B cell precursors in human bone marrow. *Journal of immunology.* 2014;192(3):1044-1054.

177. **Buchner M, Swaminathan S, Chen Z, Muschen M.** Mechanisms of pre-B-cell receptor checkpoint control and its oncogenic subversion in acute lymphoblastic leukemia. *Immunological reviews.* 2015;263(1):192-209.
178. **Klein F, Feldhahn N, Harder L, et al.** The BCR-ABL1 kinase bypasses selection for the expression of a pre-B cell receptor in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. *The Journal of experimental medicine.* 2004;199(5):673-685.
179. **Chen Z, Shojaee S, Buchner M, et al.** Signalling thresholds and negative B-cell selection in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature.* 2015;521(7552):357-361.
180. **Konigsberger S, Kiefer F.** The BAFFling function of Syk in B-cell homeostasis. *The EMBO journal.* 2015;34(7):838-840.
181. **Anbazhagan K, Rabbind Singh A, Isabelle P, et al.** Human pre-B cell receptor signal transduction: evidence for distinct roles of PI3kinase and MAP-kinase signalling pathways. *Immunity, inflammation and disease.* 2013;1(1):26-36.
182. **Muschen M.** Rationale for targeting the pre-B-cell receptor signaling pathway in acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2015;125(24):3688-3693.
183. **Oakley RH, Cidlowski JA.** The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *The Journal of allergy and clinical immunology.* 2013;132(5):1033-1044.